

**Entwicklung eines Tumormodells zur *in vivo* Untersuchung
neuartiger Substanzen (Naturstoffe) auf antineoplastische
Eigenschaften unter Einsparung von Versuchstieren**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

THOMAS DAVID GREINER

Aus der Klinik für Tumorbilogie, Freiburg im Breisgau

Betreuer: PD Dr. A. M. Burger

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. M. Reinacher

**Entwicklung eines Tumormodells zur *in vivo* Untersuchung
neuartiger Substanzen (Naturstoffe) auf antineoplastische
Eigenschaften unter Einsparung von Versuchstieren**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
THOMAS DAVID GREINER
Tierarzt aus Freiburg im Breisgau

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: PD Dr. A. M. Burger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	5
2.1. Die Maus als Versuchstier	5
2.2. Das Nacktmausmodell und antitumorale Substanztestung	6
2.3. Subkutane Implantation humaner Tumoren	7
2.4. Naturstoffe	8
3. Material und Methoden	15
3.1. Nacktmäuse	15
3.2. Merkmale der untersuchten humanen Tumormodelle	15
3.3. Transplantationstechniken	15
3.3.1. Operationsbesteck und Verbrauchsmaterialien	18
3.3.2. Subkutane Implantation	18
3.3.2.1. Subkutane Implantation von einzelnen Tumoren	18
3.3.2.2. Subkutane Implantation von vier verschiedenen Tumoren	19
3.4. Kontrolle des Wachstumsverlaufs	20
3.5. Körpergewichtsbestimmung	20
3.6. Kriterien für die Etablierung von Tumorquartettmodellen	20
3.7. Aufbau der Versuche zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens	20
3.8. Aufbau der Lokalisationsversuche	23
3.9. Aufbau der Doppelimplantationsversuche	24
3.10. Aufbau der Chemotherapieversuche	24
3.10.1. Versuche zum Vergleich der Chemoresponsivität	24
3.10.2. Naturstoffversuche	26
3.11. Parameter zur Beurteilung der Chemotherapie	27
3.11.1. Wachstumsverlauf	28
3.11.2. Tumorwachstumshemmung	28

3.11.3 .	Relative Tumorwachstumsverzögerung	28
3.12.	Erstellen von Tumorwachstumskurven und Berechnung der Verdopplungszeiten	29
3.13.	Computerprogramme zur Datenerfassung und statistischen Auswertung	29
3.14.	Histologische Untersuchungen	30
3.15.	Fotographische Methoden	30
4.	Ergebnisse	31
4.1.	Etablierung von Tumorquartetts auf der Nacktmaus	31
4.2.	Ergebnisse der Etablierung des Tumorquartetts I	32
4.2.1.	Doppelimplantationen	32
4.2.2.	Lokalisationsversuche	36
4.2.3.	Eigene Wachstumsstudien	42
4.2.3.1.	Direkter Vergleich Einzelimplantation – Vierfachimplantation	45
4.2.4.	Vergleich der eigenen Wachstumsdaten mit vorherigen Studien	50
4.2.5.	Standardchemotherapie der Xenografts im Tumorquartetmodell	55
4.2.6.	Vergleich der Chemosensitivität	61
4.2.7.	Histologischer Vergleich	63
4.2.8.	Fotographische Abbildungen der Nacktmäuse	71
4.2.9.	Endbeurteilung der Etablierung des Tumorquartetmodells I	73
4.3.	Ergebnisse der Etablierung des Tumorquartetts II	76
4.3.1.	Doppelimplantationen	76
4.3.2.	Lokalisationsversuche	81
4.3.3.	Eigene Wachstumsstudien	87
4.3.4.	Vergleich der eigenen Wachstumsdaten mit vorherigen Studien	89
4.3.5.	Standardchemotherapie der Xenografts im Tumorquartetmodell	98

4.3.6.	Vergleich der Chemosensitivität	104
4.3.7.	Histologischer Vergleich	107
4.3.8.	Fotographische Abbildungen der Nacktmäuse	116
4.3.9.	Endbeurteilung der Etablierung des Tumorquartettmodells II	118
4.4.	Ergebnisse der Etablierung des Tumorquartetts III	122
4.4.1.	Doppelimplantationen	122
4.4.2.	Lokalisationsversuche	128
4.4.3.	Eigene Wachstumsstudien	135
4.4.4.	Vergleich der eigenen Wachstumsdaten mit vorherigen Studien	139
4.4.5.	Standardchemotherapie der Xenografts im Tumorquartettmodell	145
4.4.6.	Vergleich der Chemosensitivität	150
4.4.7.	Histologischer Vergleich	152
4.4.8.	Fotographische Abbildungen der Nacktmäuse	160
4.4.9.	Endbeurteilung der Etablierung des Tumorquartettmodells III	162
4.5.	Beispiel einer Wachstumsbeeinflussung durch einen Tumor	164
4.5.1.	Wachstumsbeeinflussung von RXF 944LX durch den Lewis Lung Tumor	164
4.5.2.	Wachstumsbeeinflussung von XF 575 durch den Lewis Lung Tumor	166
4.6.	Ergebnisse der Naturstofftestung	168
4.6.1.	Substanzen aus der Universität Tübingen	168
4.6.2.	Substanzen von der GBF Braunschweig	177
5.	Diskussion	187

6.	Zusammenfassung	201
7.	Summary	203
8.	Literaturverzeichnis	205
9.	Anhang	213
9.1.	Versuchsanordnungen	213
9.2.	Histologische Präparation	218
9.3.	Abbruchkriterien	220

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
5-FU	5-Fluoruracil
a.a.i	<i>aqua ad injectabilliam</i> : Wasser für Injektionszwecke
Abb.	Abbildung
ADR	Adriamycin
aqua demin.	entmineralisiertes Wasser
aqua dest.	destilliertes Wasser
AT	animal tumor
bzw.	beziehungsweise
BXF	Xenograft eines Blasenkarzinoms
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CR	complete remission; Komplettremission
CY	Cyclophosphamid
CXF	Xenograft eines Kolonkarzinoms
d	days; Tage
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e	extrapoliert
EMEA	<i>European Agency for the Evaluation of Medicinal Products</i>
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
FR	Freiburg
g	Gramm
GD	growth delay; Wachstumsverzögerung
GXF	Xenograft eines Magenkarzinoms
h	hour; Stunde
HCl	Salzsäure
HL	hintere linke Flanke
HR	hintere rechte Flanke
HE	Hämatoxylin-Eosin
HTS	Hochdurchsatzscreening
HTX	Humanes Tumorxenograft
IC 70	Inhibitory concentration (Hemmkonzentration) 70%
Impl.	Implantation
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IT	Induktionszeit
K	tägliche Kontrolle des Allgemeinbefindens
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
l	Liter
LXFA	Xenograft eines adenoiden Lungenkarzinoms

LXFL	Xenograft eines großzelligen Lungenkarzinoms
MAXF	Xenograft eines Mammakarzinoms
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MEXF	Xenograft eines Melanoms
MR	minor remission; minimale Remission
MTD	maximal tolerable Dosis
M+W	Messen und Wiegen der Tumoren und Versuchstiere
n	number; Anzahl
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NC	No Change; Wachstumsstillstand
NCI	National Cancer Institute, USA
NMRI-nu/nu	Nacktmausstamm
OVXF	Xenograft eines Ovarialkarzinoms
P	Progression
PAXF	Xenograft eines Pankreaskarzinoms
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PLAT	Cisplatin
PR	partial remission; Partielle Remission
R	Randomisation
R	Registrierte Handelsmarke
resorb.	resorbierbar
RNA	Ribonukleinsäure
RXF	Xenograft eines Nierenkarzinoms
s.c.	subkutan
Sol.	Lösung
Subst.	Substanz
T/C	Quotient aus Testwert und Kontrollwert am Tag x
Tab.	Tabelle
TCA	Tumor-Kolonie-Assay
Tx/To	Quotient aus Testwert am Tag x und Testwert am Tag 0
VA	Versuchsanfang
VDZ	mediane Verdopplungszeit
VE	Versuchsende
VIND	Vindesin
VL	vordere linke Flanke
VR	vordere rechte Flanke
VT	Versuchstag
XF	Xenograft eines Tumors aus Freiburg
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist es, erstmals bis zu vier verschiedene humane Tumorfragmente subkutan auf eine Nacktmaus zu implantieren.

Ein solches Testmodell wurde bislang nicht beschrieben.

Zielsetzung der subkutanen Implantation von vier verschiedenen Xenografts auf die Nacktmaus ist es, ein möglichst kliniknahes, reproduzierbares Tumormodell zu entwickeln. Damit soll speziell Naturstoffen, die nur in kleinsten Mengen zur Verfügung stehen, eine optimale Chance zur Demonstration antineoplastischer Aktivität *in vivo* gegeben werden und gleichzeitig soll die Anzahl der Versuchstiere auf ein Minimum beschränkt werden.

Aufgabe eines ersten Teilaspekts ist es, die Praktikabilität des 4-Tumormodells (Tumorquartettmodells) sowie dessen Eigenschaften zu untersuchen.

Da sich in der Literatur zahlreiche Hinweise auf eine Beeinflussung des Wachstums von Metastasen durch Primärtumoren und von Sekundärimplantaten durch bereits bestehende Tumormassen finden (Himmele et al., 1986; O'Reilly et al., 1994), müssen im Rahmen dieser Arbeit bei der Etablierung eines solchen Testmodells verschiedene Fragen beantwortet werden:

1. Wird das Wachstum der Xenografts durch die Anwesenheit eines bis zu dreier anderer Tumoren unterschiedlichen Ursprungs auf der Nacktmaus beeinflusst?
2. Wirkt sich die Implantationslokalisierung auf das biologische Verhalten der Tumoren aus?
3. Verändert sich die Chemoresponsivität der Xenografts in dem Doppel- bzw. Quartettmodell?
4. Sind bei den Tumoren histologische Veränderungen feststellbar?
5. Ist das Tumormodell in der Lage, die generierbare Datenmenge der getesteten Substanzen entscheidend zu vergrößern, um so die Chance zur Demonstration antineoplastischer Aktivität zu verbessern?
6. Kann die Anzahl der zur Gewinnung einer aussagekräftigen Datenmenge eingesetzten Versuchstiere reduziert werden?

Um die ersten beiden Fragen beantworten zu können, sollen mit den jeweiligen Tumoren der Quartettmodelle Doppel-, Vierfach- und Lokalisationsimplantationen als Wachstumsstudien durchgeführt werden. Die erhobenen Wachstumsparameter werden mit dem bekannten Wachstumsverhalten der Xenografts bei Einzelimplantationen verglichen.

Eine weitere Aufgabe ist es, die Chemoresponsivität der Xenografts im Quartettmodell gegenüber Standardchemotherapeutika mit ihrem bekannten Ansprechen zu vergleichen.

Von den Tumoren der Mehrfachimplantationen werden histologische Präparate angefertigt und anhand charakteristischer Kriterien mit dem bekannten histologischen Bild der Xenografts aus Einzelimplantationen verglichen.

Um die Fragen 5 und 6 beantworten zu können, wird die Angehensrate der Xenografts im Quartettmodell ausgewertet. Anhand der Zahl der zur Testung zur Verfügung stehenden Tiere und des daraus gewinnbaren Datenmaterials soll die Effizienz des Testmodells beurteilt werden.

In einem zweiten Teil dieser Untersuchungen sollen Naturstoffe, die wie in Abb.1.8 (siehe Kapitel 1.4) beschrieben in *in vitro* Testverfahren als wirksam identifiziert werden und nur in kleiner Menge vorhanden sind, auf *in vivo* Aktivität geprüft werden.

Für die *in vivo* Testung, bei der nach Körperoberfläche oder Körpergewicht dosiert wird, stellt die geringe zur Verfügung stehende Substanzmenge (wenige Milligramm) eine beträchtliche Einschränkung des möglichen Testumfanges dar. Bei der herkömmlichen Testung mit jeweils einem subkutan wachsenden Tumor auf der Nacktmaus kann die Substanz ihre antiproliferative Aktivität nur an wenigen Xenograftmodellen und Mäusen demonstrieren.

So können zum Beispiel bei einer Dosis von 2 mg/kg und einer dreimaligen Applikation mit 1 mg vorhandener Substanz nur 5-6 Mäuse mit einem Körpergewicht von 25-30 Gramm therapiert werden. Dies entspricht einer vorläufigen Datenlage bezüglich der Aktivität gegenüber maximal 6 Tumorarten auf je einer Nacktmaus.

Mit dem Tumormodell mit vier Tumorarten auf einer Nacktmaus könnte mit dieser Substanzmenge das Ansprechen von 12 verschiedenen Xenografts mit je zwei Tieren pro Therapiegruppe untersucht werden. Alternativ kann die Hälfte der Tiere (und der Substanz) eingespart werden.

Um jeder Substanz eine möglichst große Chance zur Demonstration antitumorale Aktivität zu geben, soll daher eine umfangreiche Palette an Tumoren mit unterschiedlichen Histologien, möglichen Bindungsstrukturen und Angriffsmöglichkeiten für eine antitumorale Wirkung in die Testung einbezogen werden. Da die Zahl der Versuchstiere den limitierenden Faktor darstellt, soll versucht werden, auf einer Maus gleichzeitig mehrere Tumoren wachsen zu lassen. Auf diese Weise könnte mit der gegebenen Anzahl von Mäusen ein Vielfaches an Daten generiert werden und es müßten für ein gewisses Datenmaterial nur einen Bruchteil der Versuchstiere eingesetzt werden.

Diese Arbeit soll zur Etablierung von *in vivo* Testmodellen führen, bei denen zum ersten Mal vier verschiedene humane Tumoren auf einer Nacktmaus wachsen.

Aus Gründen des Tierschutzes und der Substanzeinsparung soll so eine möglichst hohe Aussagekraft über die Antitumoraktivität neuer Leitstrukturen (Molekülklassen) aus Naturstoffen gewonnen werden.

Da dieses Tumormodell zu einem frühen Zeitpunkt im Ablauf der *in vivo* Testungen eingesetzt werden soll, um die vorläufige Datenlage zu erweitern, müssen die Ergebnisse im Falle von Wirksamkeit auf herkömmlichem Wege reproduziert werden. Vielmehr soll das Tumormodell als **orientierendes Primärscreening** eingesetzt werden denn es kann nicht Ziel sein, dieses Modell in statistisch relevanten Kollektiven einzusetzen.

Aus diesen Gründen soll auch im Rahmen der Etablierung dieses Modells versucht werden, die nötigen Informationen über geeignete Naturstoffe für eine komplette präklinische Entwicklung mit einem Minimum an Versuchstieren zu gewinnen.

2. Literaturübersicht

2.1. Die Maus als Versuchstier

Seit dem ersten Bericht über wissenschaftlichen Versuche mit Mäusen im Jahre 1664 hat die Bedeutung der Maus in der biomedizinischen Forschung kontinuierlich zugenommen. Heute sind mehr als 90% aller in der Forschung verwendeten Säugetiere Mäuse (Malakoff, 2000).

Da die Maus neben dem Primaten das repräsentativste Versuchstier für den Organismus Mensch darstellt, ist sie aus sämtlichen Fachbereichen der Biomedizin nicht mehr wegzudenken. Insbesondere für die pharmakologische Forschung liefert das Mausmodell sehr gut übertragbare Daten bezüglich Dosierung, Verabreichungsintervall, Wirksamkeit und Nebenwirkungen (Newell et al., 1999).

In der onkologischen Forschung wurde seit 1920 mit speziellen Mausstämmen, die besonders anfällig für die spontane Entstehung von Tumoren waren (Bagg albino: Mamma- und Lungentumore; Strain 129: Hodentumor), gearbeitet.

Auch mit chemisch und physikalisch induzierten Tumoren wurde bei Maus und Ratte experimentiert (Malakoff, 2000).

Vor der Entdeckung der immundefizienten Mäuse wurden syngene transplantable Mäusetumorsysteme oder autochtone Rattentumoren als die hauptsächlichen oder einzigen Hilfsmittel bei der Entwicklung antitumorale Medikamente eingesetzt (Ovejera, 1987; Staquet et al., 1983; Bibby, 1999). Die meisten der heute in der Klinik verwandten Chemotherapeutika wurden an diesen Nagetiertumormodellen entwickelt.

Die gebräuchlichsten murinen Tumoren waren die Leukämien L1210 und P388, das Melanom B16 und das Lewis Lung Modell. Allerdings konnten mit diesen Systemen nur wenige Verbindungen, nämlich hauptsächlich DNA-interagierende Substanzklassen wie z.B. die Alkylantien, als aktiv erkannt (Ovejera, 1987; Fiebig et al., 1999; Goldin et al., 1981) werden.

Bis Mitte der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts wurden menschliche Tumoren auf verschiedene künstlich (meist durch subletale Bestrahlung und Cortisontherapie) immunsupprimierte Tiere (Hamster, Mäuse, Ratten) mit sehr geringen Angangsraten implantiert.

2.2. Das Nacktmausmodell und antitumorale Substanztestung

Bedeutung der thymusaplastischen Nacktmaus für die onkologische Forschung

1961 entstanden in Glasgow infolge einer Spontanmutation in einem Albinostamm (NMRI) thymusaplastische, unbehaarte Mäuse. Diese fortan als Nacktmaus bezeichnete Mutante unterliegt einem autosomal-rezessivem Erbgang, wobei Haarlosigkeit und Thymusaplasie untrennbar miteinander verbundene Eigenschaften sind (Panterlouris, 1968). Die Haarlosigkeit liegt an einer Defizienz an Sulfhydrylgruppen und ist damit durch eine abnormale Keratinisierung der Haarfollikel begründet (Panterlouris, 1968).

Im Laufe der Jahre stellte sich heraus, daß sich diese Nacktmäuse in einem hohen Maße für heterologe Transplantationen eignen, da die Thymusaplasie mit immunologischen Defizienzen einhergeht. Während die B-Zellpopulation der Lymphozyten normal ist, fehlen reife, funktionelle T-Lymphozyten (Sprent, 1974). Somit ist die Nacktmaus ein idealer Wirt für heterologe Transplantate (Xenografts), da mit immunologischen Komplikationen und damit einer Abstoßungsreaktion nicht zu rechnen ist.

Allerdings hat die fehlende T-Lymphozytenfunktion ein hohes Maß an Infektionsgefährdung für die Tiere zur Folge. Dies erfordert besondere Haltungsbedingungen, wie spezielle Nahrung, staubfreie Einstreu, Temperaturen von 25°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 65%. Ferner ist eine möglichst keimarme Umgebung in Laminar-Flow Käfigen nötig (Fortmeyer et al., 1977; Fortmeyer, 1981).

1971 berichteten Rygaard und Povlsen erstmals über die erfolgreiche Transplantation eines humanen Kolonkarzinoms auf die Nacktmaus (Povlsen et al., 1971). Weitere Gruppen konnten die verschiedensten humanen Tumoren erfolgreich transplantieren und in Serienpassage überführen (Sordat et al., 1977; Giovanella et al., 1978). Auch in der Zellkultur wachsende humane Tumorzelllinien führten nach subkutaner Injektion in der Nacktmaus zur Ausbildung solider Tumoren (Giovanella et al., 1972).

Neben den Untersuchungen über das Wachstumsverhalten unterschiedlicher menschlicher Tumoren in der Nacktmaus war es möglich geworden, die Wirkung verschiedener Substanzen auf das Wachstum solcher Tumortransplantate zu beobachten. Povlsen und Rygaard gelang 1974 erstmals die erfolgreiche Behandlung eines in Serienpassage auf der Nacktmaus

gehaltenen Burkitt Lymphoms (Povlsen et al., 1974). Damit war ein neues präklinisches Testmodell für die Zytostatikaentwicklung eingeführt worden.

2.3. Subkutane Implantation humaner Tumoren

Stabil wachsende, subkutan implantierte humane Tumorfragmente aus chirurgischen Resektaten stellen, da sie das Verhalten des Tumors im Patienten noch besonders gut reflektieren, ein sehr kliniknahes Modell zur Testung neuer antitumoral wirksamer Substanzen dar. Übereinstimmungen zwischen subkutan wachsendem Xenotransplantat und dem Spendertumor wurden unter anderem gefunden beim Vergleich der Histologien (Resasova et al., 1992), der Expression von Tumormarkern (Randt, 1984), der Pharmakokinetik (Kubota et al., 1993) und der Chemosensibilität (Duplan, 1984; Berger et al., 1992).

Um den prädiktiven Wert der Substanztestung an Xenografts auf der Nacktmaus zu bestimmen, wurde die Korrelation zwischen den Ergebnissen der Nacktmausversuche und den Behandlungsergebnissen des Patienten, von welchem die Tumoren stammten, untersucht. Für die Freiburger Xenograftsammlung lag die korrekte Voraussage für Sensitivität bei 90%, diejenige für Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum bei 97% (Fiebig et al., 1992).

Tab.1.1 Vergleich des Verhaltens der Tumoren auf der Nacktmaus und beim Patienten. Es wurden 80 Vergleiche bei 55 Tumoren angestellt. Die Xenografts lieferten eine korrekte Vorhersage für Resistenz in 57/59 (97%) und für Ansprechen in 19/21 (90%) Fällen der klinischen Resultate.

Nacktmaus	Patient	Total
Remission	Remission	19
Keine Remission	Remission	2
Keine Remission	Keine Remission	57
Remission	Keine Remission	2

Tab.1.1 Ergebnisvergleich Nacktmausversuch-Patient

Seitdem die Entwicklung neuer Medikamente von der Anwendung generell zytotoxischer Mechanismen in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts zu targetorientierten Behandlungsstrategien übergegangen ist, besteht die Notwendigkeit, Tumortypen und individuelle Patiententumoren zu identifizieren, die das Target exprimieren und so von selektiveren Therapien in klinischen Phase II und III Studien profitieren können. Ein Beispiel

für eine solche Entwicklung stellt das Medikament Herceptin^R (Trastuzumab, monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des HER 2 Rezeptors) dar, das gezielt für die Behandlung von Mammakarzinomen und Lungenkarzinomen, die HER 2 Rezeptoren exprimieren, zugelassen ist (Harries et al., 2002; McKeage und Perry, 2002).

Daher sind die Modelle, die heute in der präklinischen Entwicklung benutzt werden „Krankheits-orientiert“ und bezüglich der molekularen Zielstruktur charakterisiert. Es handelt sich dabei *in vivo* entweder um Explantate humaner Tumoren oder humaner Zelllinien - also Xenografts - auf immunsuppressive Mäuse (Nacktmäuse, SCID-Mäuse, Beige usw.) oder speziell gezüchtete transgene Mäuse, welche die gewünschte Zielstruktur für ein Tumorthapeutikum auf einem bestimmten Tumortyp exprimieren.

Aus Kosten und Praktikabilitätsgründen stellen Xenografts heute den Goldstandard in der Entwicklung von Krebstherapeutika dar (Fiebig et al., 1992). Ihr Einsatz wird in den Richtlinien der Zulassungsbehörden wie der EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) empfohlen oder sogar gefordert (Internetseite EMEA, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (<http://www.eudra.org/emea.html>)).

2.4. Naturstoffe

Viele der zur Zeit gebräuchlichen Antitumormedikamente kommen in der Natur vor. Die Naturstoffe stammen im Wesentlichen aus Pflanzen, Mikroorganismen und marinen Organismen.

Eine Analyse von Anzahl und Quelle antineoplastischer und antiinfektiver Wirkstoffe (Annual Report of Medical Chemistry 1983-1994) zeigt, daß über 60% der zugelassenen Arzneimittel, die in diesen Indikationsgebieten entwickelt wurden, natürlicher Abstammung sind (Cragg und Newman, 1999). Von den insgesamt 92 Antitumormedikamenten, die vor 1983 auf dem Markt waren und die zwischen 1983 und 1994 zugelassen wurden, können 62 einem natürlichen Ursprung zugeordnet werden (Cragg et al., 1997). Zwischen 1995 und 1999 wurden drei weitere Wirkstoffe natürlicher Herkunft und zwei weitere Substanzen, deren Strukturen zuerst bei Naturstoffen identifiziert worden waren, zugelassen. Im selben Zeitraum wurden nur zwei neue synthetische Medikamente registriert (Cragg und Newman, 2000).

Viele der Naturstoffe pflanzlichen Ursprungs wurden vor der Entdeckung ihrer antineoplastischen Aktivität als Extrakte in der traditionellen Medizin angewandt.

Die bestbekanntesten Wirkstoffe pflanzlichen Ursprungs sind die sogenannten Vincaalkaloide Vinblastin (siehe Abb.1.1) und Vincristin isoliert aus *Catharanthus roseus* (Cragg und Newman, 1999), die zu einer Reihe von semisynthetischen Derivaten geführt haben, die wie Vinorelbine oder Vindesine bereits zugelassen sind oder sich in klinischen Phase I (Vinflunine, Vinxaltine) und II (Vinfosiltine) Studien befinden (Cragg und Newman, 2000).

Weitere klinisch bedeutsame Beispiele sind die halbsynthetischen Epipodophyllotoxinderivate Etoposide und Teniposide (ursprünglich aus *Podophyllum spp.*), Paclitaxel (siehe Abb.1.2) aus *Taxus brevifolia* bzw. *T. baccata* (Cragg und Newman, 1999) und die halbsynthetischen Camptothecinderivate Irinotecan, Topotecan und 9-Aminocamptothecin (Camptothecin wird aus *Camptotheca acuminata* isoliert, siehe auch Abb.1.3) (Potmeisel und Pinedo, 1995).

Auch der lange bekannte Naturstoff Betulinsäure ist Dank neuer Testsysteme momentan als hoffnungsvoller Kandidat mit Wirksamkeit gegen Melanome in der präklinischen Entwicklung (Cragg und Newman, 2000).

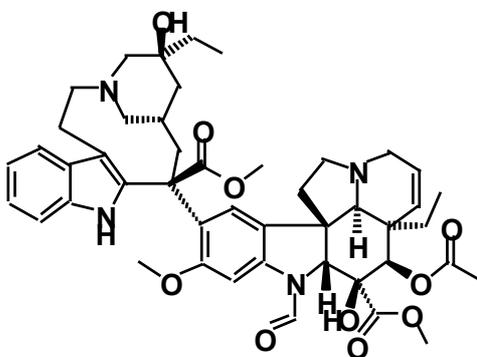


Abb.1.1 Strukturformel Vinblastin

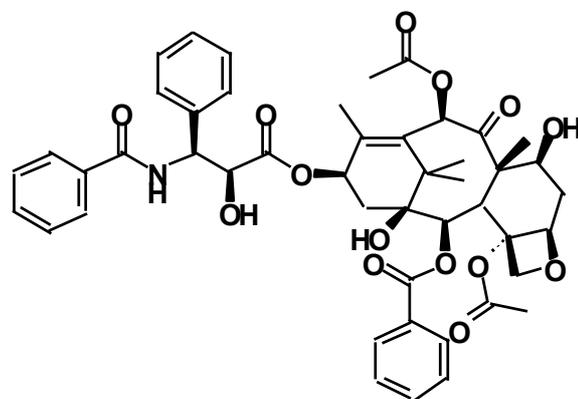
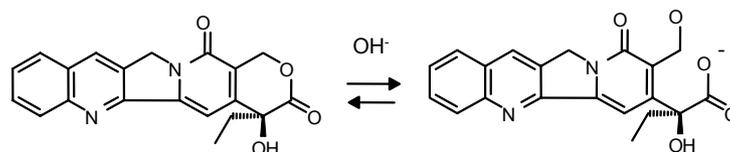


Abb.1.2 Strukturformel Taxol (Paclitaxel)



20-S-Camptothecin

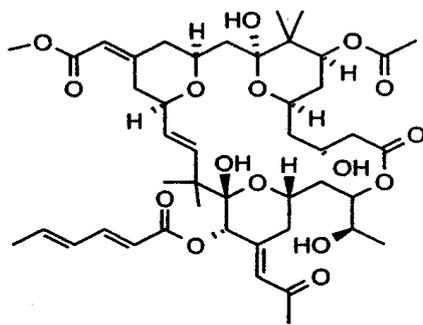
Lakton Form

Karboxylierte Form

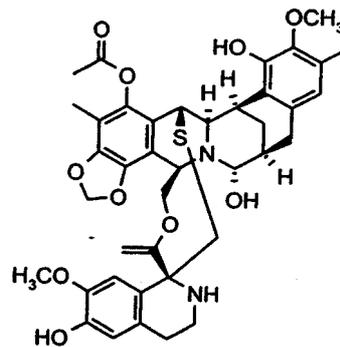
Abb.1.3 Strukturformel Camptothecin (Lakton: therapeutisch wirksame Form)

Die systematische Untersuchung der marinen Lebensräume als Quellen neuer biologisch aktiver Substanzen begann in größerem Umfang erst Mitte der siebziger Jahre aufgrund großer Schwierigkeiten bei der Probensammlung. Allein von 1977 bis 1987 wurden ungefähr 2500 neue Metaboliten von einer Vielzahl mariner Organismen, die zum Teil antiproliferative Aktivitäten besitzen, berichtet. Diese Studien belegen deutlich, daß der marine Lebensraum eine reiche Quelle bioaktiver Verbindungen darstellt. Viele von ihnen gehören zu gänzlich neuen chemischen Klassen, die nicht in terrestrischen Lebensformen gefunden werden (Cragg und Newman, 1999).

Obwohl noch keine Verbindung marinen Ursprungs eine Zulassung erhalten hat, befinden sich einige vielversprechende Substanzen in klinischen Phase I und II Studien: unter anderem Bryostatin 1 (Abb. 1.4), isoliert aus dem Bryozooan *Bugula neritina*; Ecteinascidin 743 (Abb. 1.5), ein Metabolit der Tunicate *Ecteinascidia turbinata*; Dolastatin 10 aus dem



Bryostatin 1



Ecteinascidin 743

Abb. 1.4 Strukturformel Bryostatin 1

Abb. 1.5 Strukturformel Ecteinascidin 743

Seehasen *Dolabella auricularia* (Abb. 1.6) (und dem marinen Cyanobakterium *Symploca hydroides* (Harrigan et al., 1999)) und verschiedene aus Schwämmen gewonnene Stoffe z.B. Halichondrin B (Nuijen et al., 2000).

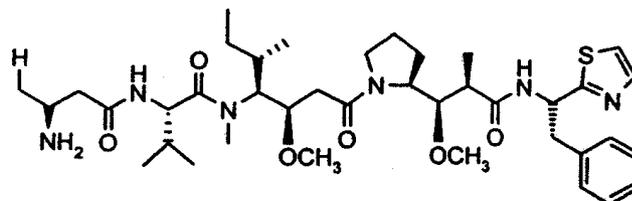
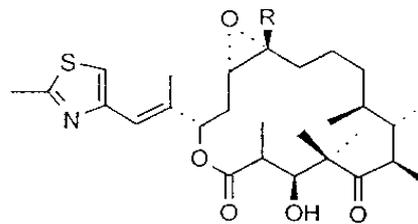


Abb. 1.6 Strukturformel Dolastatin 10

Antineoplastisch wirksame Antibiotika stellen mit die wichtigsten Chemotherapeutika dar. Bereits im breiten klinischen Gebrauch sind u.a. Daunomycin und seine Derivate Doxorubicin, Idarubicin und Epirubicin; Bleomycin A2 und B2, die Gruppe der Peptolide (Dactinomycin), der Mitosane (Mitomycin C) und der glycosilierten Anthracene (Mithramycin). Letztere sind sämtlich Isolate aus *Streptomyces spp.* Eine große Anzahl weiterer von *Streptomyces spp.* abstammender Sekundärmetabolite befindet sich in klinischen Studien, wie z.B. auch das von Myxobakterien abstammende Epothilon (Cragg und Newman,1999).



Epothilone A; R = H
Epothilone B; R = CH₃

Abb. 1.7 Strukturformel Epothilon

Ein entscheidendes Problem der meisten bereits zugelassenen Chemotherapeutika und auch der Naturstoffe ist die Tatsache, daß sie vorwiegend gegen schnell proliferierende Tumoren wie Leukämien und Lymphome wirksam sind, aber nur geringe Aktivität gegen die langsamwachsenden, soliden Tumoren, die üblicherweise bei Erwachsenen auftreten, wie Lungen-, Kolon-, Prostata-, Pankreas- und Gehirntumoren, aufweisen (Cragg et al., 1997). Hieraus ergibt sich der weiterhin große Bedarf an neuen Wirkstoffen.

Basierend auf dem heutigen Stand der Forschung schätzt man, daß nur 5% bis 15% der ungefähr 250,000 Arten der höheren Pflanzen systematisch auf das Vorhandensein biologisch aktiver Verbindungen untersucht worden sind (Balandrin et al., 1993), während der marine Lebensraum bisher weitgehend unangetastet blieb (McConnell et al., 1994).

Obwohl die Familie der Actinomycetales bisher schon ausgiebig untersucht worden ist, bleibt sie immer noch eine bedeutende Quelle neuer mikrobieller Metaboliten (Horan, 1994).

Das Potential dieser und anderer mikrobieller Naturstoffquellen, speziell der aus extremen Lebensräumen stammenden Organismen (Adams und Kelly, 1995); (Cragg und Newman, 2000), erscheint unbegrenzt.

Die Anwendung von molekulargenetischen Techniken erlaubt die Manipulation biosynthetischer Abläufe zur Generierung neuartiger chemischer Klassen. Ebenso wurde die Kultivierung bisher unkultivierbarer Mikroorganismen, die jetzt zur Gewinnung von Sekundärmetaboliten zur Verfügung stehen, möglich gemacht. Die Verbindung der Entwicklung natürlicher Leitsubstanzen mit den Möglichkeiten der kombinatorischen Chemie öffnet die Tür zu einer ungeahnten molekularen Vielfalt und biologischen Funktionalität (Nisbet und Moore, 1997; Khosla und Zawada, 1996).

Um die Entwicklung neuer Arzneimittel aus der biologischen Vielfalt der Naturstoffe zu optimieren, sind verschiedene interdisziplinäre Kooperationen ins Leben gerufen worden (Cragg und Newman, 1999). Eine solche Kooperation ist der Naturstoffpool des Hans-Knöll-Instituts Jena (HKI), dessen Mitglied das Institut für Experimentelle Onkologie, Prof. Fiebig, Freiburg ist.

Ziel dieses Naturstoffpools ist, sowohl die Bereitstellung einer möglichst großen Sammlung an Naturstoffen als auch ein optimales, targetorientiertes Screening der Substanzen zu ermöglichen (Koch et al., 2000).

In dieser Kooperation werden die Naturstoffe von verschiedenen akademischen und universitären Gruppen zur Verfügung gestellt. Das HKI führt eine Qualitätsbestimmung durch, bestimmt die jeweilige Löslichkeit und Reinheit, stellt definierte Lösungen her und liefert diese zusammen mit dem zugehörigen Datenmaterial an die jeweiligen Partner zur Testung aus.

Mit der primären Auslieferung werden den Labors von Prof. Fiebig je 1mg Substanz, die in 1ml reinem DMSO gelöst ist, zur Verfügung gestellt. Zunächst durchlaufen die Naturstoffe zwei hintereinandergeschaltete *in vitro* Testsysteme: den Fluoreszenzassay (Dengler et al., 1995) und den Kolonienbildungstest (Tumor Colony Assay) (Fiebig, 1983). Bei Identifizierung zytotoxischer bzw. antitumoraler *in vitro* Aktivität kann mit dem jeweiligen Erzeuger eine Nachlieferung der Substanz vereinbart werden, um *in vivo* Testungen zu ermöglichen (5-10mg) (siehe auch Abb. 1.8).

Die geringe Menge der zur Verfügung stehenden Substanz ergibt sich durch die sehr zeit-, kosten- und arbeitsaufwendige Gewinnung der Rohmaterialien, Isolierung, Strukturaufklärung und Herstellung reiner, stabiler Lösungen (Koch et al., 2000; Nuijen et al., 2000).

Abbildung 1.8 zeigt den Ablauf der Testungen einer Substanz. Die Therapieversuche mit den hier zu etablierenden Tumormodellen erfolgen zu einem frühen Zeitpunkt der *in-vivo* Tests

und sollen eine breite (12 Tumoren) Datenlage liefern. Die Absicherung dieser Daten mit größeren Kollektiven erfolgt im weiteren Ablauf.

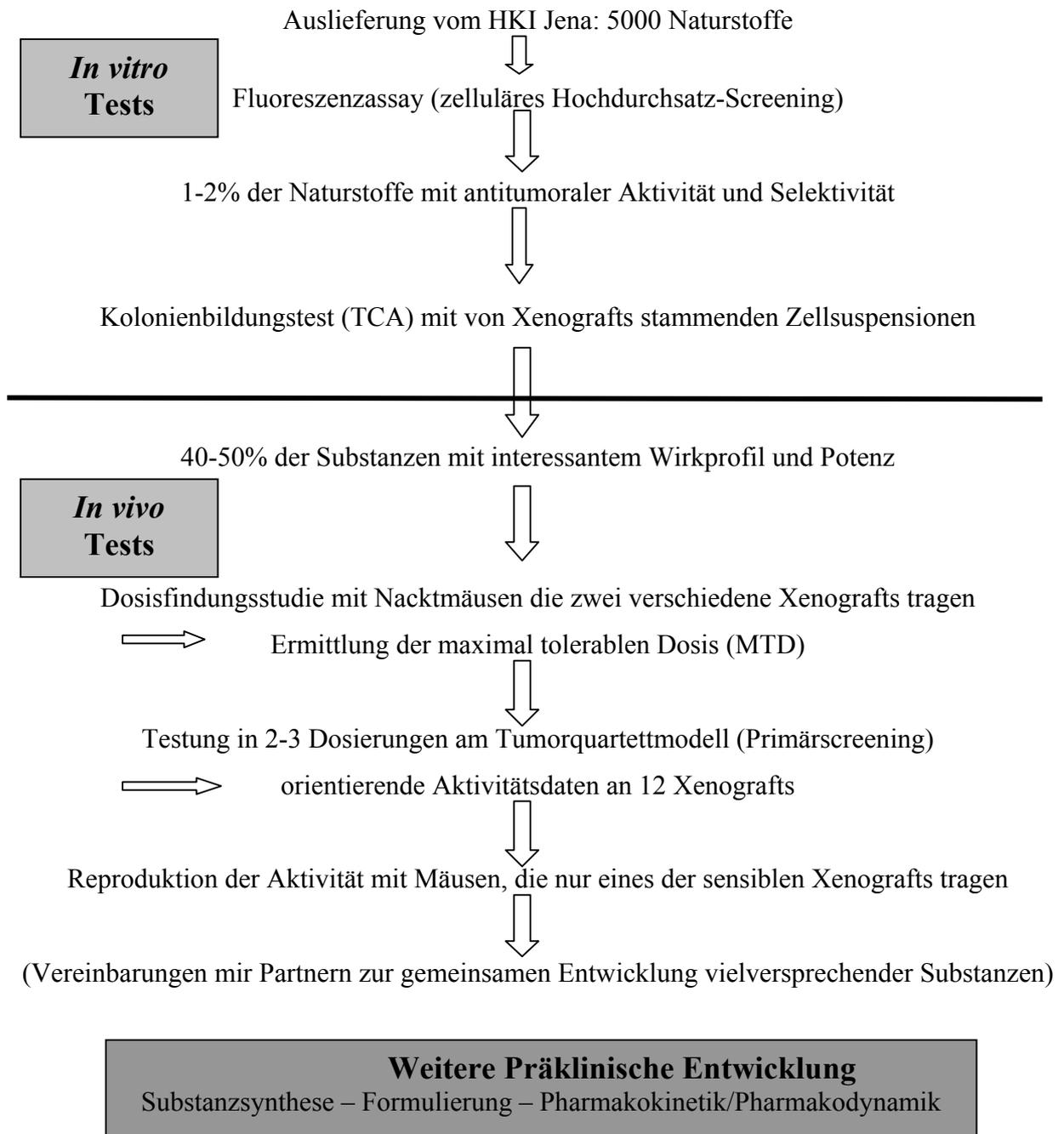


Abb. 1.8 Weg der Naturstoffe durch die Testsysteme

3. Material und Methoden

3.1. Nacktmäuse

Die im Rahmen dieser Studie verwendeten Nacktmäuse (NMRI-nu/nu) wurden im Labor Prof. Fiebig gezüchtet (Fiebig, 1983). Es handelt sich um einen Auszuchtstamm. Es wurden bevorzugt weibliche Nacktmäuse verwendet, da diese eine etwas geringere Körpermasse aufweisen (ca. 25 g, Männchen wiegen durchschnittlich 30 g) und somit weniger Substanz für die Behandlung des einzelnen Tieres benötigt wird. Weiterhin haben Weibchen kaum ein Aggressionspotential, welches bei Männchen oft zu gegenseitigem Verbiß der Tiere und damit streßbedingten Körpergewichtsabnahmen führt. Fütterung und Tränke erfolgten mit einer hochkalorischen, pelletierten Nacktmausdiät (1439 Extrudat, Altromin, Lage) und entmineralisiertem Wasser. Das entmineralisierte Wasser wurde mit HCl auf pH 2,5 angesäuert und zur Infektionsprophylaxe mit 1.75 g/l (entspricht 87.5 mg/l Tetracyclin HCl) Friesomycin^R (Essex Tierarznei, München) und 2.5 g/l Kaliumsorbat (Merck, Darmstadt) versetzt.

Die Tiere wurden je nach Gruppengröße in Macrolonkäfigen Typ 2 oder 3, die mit Filterhauben versehen waren, auf staubfreier, autoklavierter Einstreu (Charles River Laboratories) gehalten. Wasser und Einstreu wurden zweimal wöchentlich gewechselt. Die Temperatur betrug konstant 25°C +/- 2°C bei einer relativen Feuchtigkeit von 60% +/- 10%, das Lüftungssystem sorgte in den Haltungsräumen für einen konstanten gerichteten Luftstrom mit achtfacher Luftumwälzung pro Tag.

3.2. Merkmale der untersuchten humanen Tumormodelle

Bei den transplantierten Tumoren handelt es sich um humane Tumorexplantate, die (mit Ausnahme von MAXF MX1 und XF 575) im Labor Prof. Fiebig etabliert wurden. Dies geschieht durch subkutane Transplantation von Resektionspräparaten menschlicher Tumoren auf thymusaplastische Nacktmäuse (NMRI-nu/nu). Solche Tumoren bezeichnet man als Xenografts (xeno (griech.) = fremd; graft (engl.) = Setzling / Transplantat).

Die Xenografts werden in Serienpassage gehalten oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Tumoren erhalten fortlaufende Nummern. Die Tumorexplantate werden nach ihrer Histologie benannt, beispielsweise Xenografts von Blasenkarzinomen mit „BXF“ (Bladder Xenograft Freiburg) und Kolonkarzinome mit „CXF“. Bisher umfaßt die Freiburger

Xenograftsammlung ca. 400 Modelle aus über 1700 Patientenresektaten. Die Tumoren behalten stets die gleichen Nummern (z.B. BXF 1299 bzw. CXF 280) bei.

Nach der Tumornummer steht hinter einem Schrägstrich die Passagenzahl, die angibt wie oft der Xenograft bereits in der Maus in Serienpassage transplantiert wurde (z.B. BXF 1299/8 = 8. Passage seit Patient). In der Regel werden nicht mehr als 20-25 Passagen vorgenommen. Zusätzlich steht hinter dem Schrägstrich ein „N“ mit entsprechender Zahl, wenn das Xenotransplantat in Stickstoff zwischengelagert und erneut auf die Nacktmaus transplantiert wurde (z.B. BXF 1299/8N3). Wurde ein Xenograft von einer Zelllinie etabliert wird dies durch die Buchstaben LX hinter der Tumornummern kenntlich gemacht z.B. RXF 944LX/12N4.

Bis auf das Hepatom XF 575 sind sämtliche in dieser Studie verwendeten Xenografts hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens, der Chemosensitivität gegenüber Standardtherapeutika, auf ihre Histologie hin, auf immunhistochemische Parameter (Randt, 1984) und auf die Expression von Tumormarkern hin bereits detailliert charakterisiert worden (Fiebig, 1983; Fiebig et al., 1992; Fiebig et al., 1999).

Die Xenografts, die Bestandteil eines Quartetts werden sollten, wurden aufgrund ihrer bekannten Wachstumsparameter (Induktionszeit, Verdopplungszeiten auf 200% und 400%) vorselektiert. Tabelle 3.1 listet die morphologischen Charakteristika der ursprünglich rezidierten Patiententumoren, aus denen die Xenografts etabliert wurden, auf.

Es wurden keine Xenografts ausgewählt, die bekanntermaßen eine Tumorkachexie oder andere paraneoplastische Syndrome bei den Nacktmäusen auslösen, um einerseits die Möglichkeit einer Wachstumsbeeinflussung der Xenografts untereinander gering zu halten, und andererseits eine möglichst lange Zeitspanne bis zum ethisch notwendigen Versuchsabbruch zu bekommen.

Bei Tumorquartett I mit den Xenografts LXFL 529, MAXF 401, CXF 280, und MEXF 989 handelt es sich um mittelmäßig schnell wachsende, chemosensible Tumormodelle. Aufgrund ihrer guten Angehensraten (70-90%) und ihrer hohen Chemosensibilität gehören sie zu den am häufigsten für Testungen neuartiger Substanzen verwendeten Xenografts im Labor Prof. Fiebig (Fiebig et al., 1999).

Tumorquartett II umfaßt sehr schnell wachsende Xenografts: RXF 944LX, OVXF 899, XF 575 und MAXF MX 1. Alle Xenografts weisen gute Angehensraten von 80-90% auf. Bei MAXF MX 1 handelt es sich um ein vom National Cancer Institute (NCI) stammendes Mammakarzinom mit einer hohen Empfindlichkeit gegen die meisten klinisch wirksamen Chemotherapeutika (Ovejera, 1987; Fiebig et al., 1999).

RXF 944LX war als Patientenxenograft verlorengegangen und wurde von einer vorhandenen Zelllinie als Xenograft neu etabliert. Das 3. Quartett besteht aus langsam wachsenden weitgehend chemoresistenten Xenografts: PAXF 736, GXF 251, LXFA 629 und BXF 1299.

Tab. 3.1. Morphologische Charakteristika der eingesetzten Tumoren (Resektionspräparate)

Tumor (Herkunft)	Histopathologischer Befund¹	Morphologie¹
MAXF MX 1 (NCI)	Infiltrativ wachsendes duktales Mammakarzinom	Nicht spezifiziert
OVXF 899 (FR)	Mittel- bis hochdifferenziertes, papillär – seröses Karzinom des Ovars	Teilweise hochdifferenzierte Abschnitte, Kerne teils mäßig, teils gar nicht vergrößert, kaum entrundet prominente Nukleoli
RXF 944 LX (Zelllinie)	Kleinzelliges Nierenkarzinom	Solide, trabekulär angeordnete epitheliale Zellen mit hellem Zytoplasma; Zellen gleichförmig nur wenige Zellteilungsfiguren
CXF 280 (FR)	Hautmetastase eines undifferenzierten Adenokarzinoms des <i>Colon ascendens</i>	Solide wachsender Tumor, viele Zellteilungsfiguren
MAXF 401 (FR)	Lungenmetastase eines hochdifferenzierten Adenokarzinoms der Mamma	Polymorph, hyperchromatisch, zylindrisch, unregelmäßig große drüsige Ausdifferenzierung
LXFL 529 (FR)	Großzelliges, undifferenziertes Karzinom der Lunge (Primärtumor)	Großleibig, polygonal; ein- und mehrkernige Riesenzellen, zahlreiche atypische Mitosen, Vakuolisierung, beträchtliche Größenunterschiede der Zellen, bizarre Formen, vesikuläre Kernstrukturen mit riesigen und bizarren Nukleolen
MEXF 989 (FR)	Lymphknotenmetastase eines malignen Melanoms	Amelanotische, kleine Zellen, nur mikrofokale Zeichen einer melaninartigen Pigmentbildung
BXF 1299 (FR)	Solide wachsendes, infiltratives Übergangsepithelkarzinom	Mäßig polymorphe, hyperchromatische Kerne, schaumiges Zytoplasma, adenoider Aufbau, polychromatische Zellen
GXF 251 (FR)	Teils exophytisch, teils ausgesprochen infiltrativ wachsendes Siegelringzellkarzinom des Magens	Nicht spezifiziert

¹ Angaben der Arztbriefe sind direkt übernommen

Tab. 3.1. Forts. Morphologische Charakteristika der eingesetzten Tumoren (Resektionspräparate)

Tumor (Herkunft)	Histopathologischer Befund¹	Morphologie¹
LXFA 629 (FR)	Wenig differenziertes Adenokarzinom des rechten Oberlappenbronchus	Epithelial, großzellig, atypische Mitosen, Vakuolisierung im Zytoplasma, teils Stränge und Trabekel, teils drüsig formiert, Kern- und Zellpolymorphie, Chromatindichte des Zellkerns
PAXF 736 (FR)	Infiltratives, wenig differenziertes , gering schleimbildendes Adenokarzinom des Pankreas	Überwiegend ungeordnete, gering kleindrüsig angeordnete Verbände eines malignen, epithelialen Tumorgewebes, Kernpolymorphie, Hyperchromasie, große Nukleoli
XF 575 (Dr. Taetle, San Diego, USA)	Hepatozelluläres Karzinom	Nicht spezifiziert

¹ Angaben der Arztbriefe sind direkt übernommen

Tabelle 3.1. stellt die aus den Arztbriefen der Patienten direkt übernommenen Histopathologischen Befunde und morphologischen Beschreibungen der in den Studien eingesetzten Tumoren dar.

3.3. Transplantationstechniken

3.3.1. Operationsbesteck und Verbrauchsmaterialien

Chirurgiebesteck
Einmalkanülen
Isofluran-Baxter

Medizinisches O₂
Ketanest^R (Ketamin, 10 mg/ml)
Rompun^R (Xylazin, Sol. 2%)
PBS (Phosphate Buffered Saline)
Softasept N^R-Spray
Iodobac^R (PVP-Iod)
Wundklammern N.Michel^R
Vicryl-Faden, 3-0 resorb., traumat. Nadel
Ohrmarken
ES Kompressen^R

Histoacryl^R Gewebekleber

Hersteller:

Aesculap, Tuttlingen
Braun, Spangenberg
Baxter Deutschland
GmbH, Unterschleißheim
Messer, Griesheim
Parke-Davis, Berlin
Bayer, Leverkusen
GibcoBRL, Schottland
Braun Melsungen AG
Bode Chemie, Hamburg
Aesculap, Tuttlingen
Ethicon, Norderstedt
Hauptner, Dietlikon-Zürich, CH
Paul Hartmann AG,
Heidenheim
Aesculap AG & CO KG,
Tuttlingen

3.3.2. Subkutane Implantation

3.3.2.1. Subkutane Implantation von einzelnen Tumoren

Der Spendertumor oder das Resektionspräparat wurden sofort nach der Entnahme in PBS überführt. Das Tumormaterial wurde makroskopisch auf nekrotische Anteile hin untersucht und soweit wie möglich davon befreit. Das verbleibende Material wurde in Fragmente von 2-3 mm Durchmesser geschnitten, wobei besonders auf das Vorhandensein eines Blutgefäßes in der Tumorkapsel, ausgehend von der Überlegung, daß hier am wahrscheinlichsten vitale Tumorzellen vorhanden sein würden, geachtet wurde. Bis zur Implantation verblieben die Tumorstücke in einer Petrischale mit PBS.

Die Empfängertiere wurden durch eine Isofluran-O₂-Inhalationsnarkose in einem offenen Narkosesystem (Anästhesietechnik, Albert- Ludwigs- Universität Freiburg) in einer Kammer unter einer Sterilbank anästhesiert. Mehrere Tiere wurden mit 3,5 Volumenprozent Isofluran angeflutet, die Erhaltungsdosis betrug 2,5 % bei einem Gasflow von 2,5 l/min medizinischem Sauerstoff.

Nach Desinfektion der Haut mit einem jodhaltigen und einem alkoholischen Desinfektionsmittel wurde mittels Scherenschlag ein 3-4 mm langer Hautschnitt in der dorsalen Medianen gesetzt. Das subkutane Gewebe wurde mit einer Schere stumpf nach ventral über 1.5-2.0 cm (bei weiblichen Tieren bis zur Gesäugeleiste) untertunnelt und die Tumorstückchen mit einer Pinzette eingeführt. Hautwunden über 4 mm Länge wurden mit einem Einzelwundheft oder Wundklammern verschlossen, kleinere Einschnitte wurden mit Histoacryl^R Gewebekleber verschlossen. Anschließend erfolgte eine erneute Desinfektion des Wundbereichs und die Kenntlichmachung des Tieres mit einer Ohrmarke.

Dann wurde die Narkose beendet und die Tiere zum Aufwachen und zur Nachbeobachtung in einen mit Streu und sterilen Kompressen ausgelegten Käfig verbracht. Die Nacktmäuse waren bei der Implantation zwischen 4 und 8 Wochen alt (Fiebig, 1983).

3.3.2.2. Subkutane Implantation von vier verschiedenen Tumoren

Als Narkose wurde anfangs eine Injektionsnarkose mit 80 mg/kg Ketamin + 16 mg/ml Xylazin i.p. durchgeführt, die später wegen der besseren Steuerbarkeit der Narkose durch die Isofluran-Inhalationsnarkose ersetzt wurde. Um eine subkutane Verschiebung der Fragmente und damit das Risiko einer Verwechslung der Xenografts auszuschließen und eine optimale

Ausnutzung der Wachstumsfaktoren der Wunde zu gewährleisten, wurden insgesamt vier 2-3 mm lange Hautschnitte kaudal der *Tuber olecrani* bzw. kranial des Kniegelenks gesetzt und die Tumorstückchen in der Nähe der Gesäugeleiste implantiert. Die Hautwunden wurden mit Histoacryl^R Gewebekleber verschlossen.

3.4. Kontrolle des Wachstumsverlaufs

Bei der Untersuchung des Wachstumsverhaltens der gleichzeitig implantierten Xenografts wurde das Tumorwachstum bis zum Erreichen der maximal tolerablen Tumorlast (maximaler Durchmesser bei Zweifachimplantation: 1,5 cm; bei 4-fach Implantation: 1,2 cm) verfolgt. Der Längs- und Breitendurchmesser wurde 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 wurden Tumordurchmesser von 2 mm (entspricht einem 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 Vergleichsdaten für die Einzelimplantationen stammten aus Experimenten, die mit Tumoren, deren Passagezahl sich von denen der eigenen Studien um maximal 10 unterschieden, im Labor Prof. Fiebig mit den betreffenden Xenografts durchgeführt wurden. Durch diese zeitliche Nähe der Experimente zueinander wurde sichergestellt, daß eventuelle Veränderungen des Wachstumsverhaltens über die Passagen hinweg so gering wie möglich gehalten werden konnten.

3.5. Körpergewichtsbestimmung

Während der Vermessung der Tumoren wurde auch das Körpergewicht der Einzeltiere auf 1/10 Gramm genau bestimmt. Damit war eine quantitative Größe zur Überwachung des Allgemeinzustandes der Tiere gegeben. Fiel das Körpergewicht auf weniger als 80% seines Ausgangswertes, mußte das Experiment beendet werden (siehe Abbruchkriterien).

3.6. Kriterien für die Etablierung der Tumorquartettmodelle

Im Rahmen dieser Arbeit galt ein Tumorquartett als etabliertes Modell, wenn ein reproduzierbares Verfahren entwickelt worden war, mit Hilfe dessen vier verschiedene

Xenograftfragmente gleichzeitig auf einer Nacktmaus wuchsen. Als Etablierungskriterien wurden folgende Forderungen an die Modelle gestellt:

1. Angehensrate aller vier Tumoren > 60%
2. kontinuierliches Wachstum der einzelnen Xenografts mit Steigerung des Volumens auf 200% und 400%
3. ausreichendes Therapiezeitfenster vom Ende der Induktionszeit des langsamsten Tumors bis zur Beendigung des Versuchs gemäß der tierschutzrechtlichen Abbruchkriterien
4. erhaltene Chemoresponsivität gegenüber Standardchemotherapeutika
5. unverändertes histologisches Bild

Bei wiederholtem Nichterfüllen dieser Kriterien galt das Tumormodell als ungeeignet für Testzwecke, und es wurde auf weitere Experimente verzichtet. Nach jedem durchgeführten Teilversuch wurden die Ergebnisse hinsichtlich dieser Forderungen ausgewertet. Mit dem Versuchsplan wurde nur im Falle des Erfüllens fortgefahren.

3.7. Aufbau der Versuche zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens

Bei den Wachstumsstudien wurden jeweils zwei oder vier Xenografts gleichzeitig subkutan implantiert. In der darauf folgenden Induktionszeit, d.h. der Zeit von der Implantation bis zum sicheren progredienten Wachstum des Xenografts, wurde das Allgemeinbefinden der Tiere täglich kontrolliert sowie zweimal wöchentlich das implantierte Fragment makroskopisch beurteilt und das Körpergewicht gemessen. Die Dokumentation des Wachstumsverhaltens des Tumors begann ab dem Zeitpunkt, an dem beide oder alle vier Tumoren folgende Kriterien erfüllten:

- Tumolvolumen von mindestens 30 mm³
- geschätzter Durchmesser des Tumors zwischen Bauchwand und Haut in der Mitte des Tumors beträgt mindestens die Hälfte des kleineren Tumordurchmessers
- rötliche Farbe, vitales Aussehen, keine subkutane Verschieblichkeit

Bei Erfüllung dieser Kriterien traten bei Einzelimplantationen in den Kontrollgruppen keine Spontanremissionen und auch kein stationäres Wachstumsverhalten auf (Fiebig, 1983). Um eine ausreichende Datenbasis zum Vergleich des Wachstumsverhaltens zu erhalten, sollte jeder Tumor sein Anfangsvolumen während des Versuchs um mindestens 400% vergrößert haben, sofern dies unter Berücksichtigung der tierschutzrechtlichen Abbruchkriterien möglich

war. Um eine bessere Datenerfassung zu ermöglichen, wurde jedem Xenograft einer Wachstumsstudie eine eigene Kennzeichnung (Versuchsnummer), bestehend aus einem Buchstaben und einer dreistelligen Ziffer, gegeben (z.B. K 211). Damit sind jedem Versuch, an dem ein Xenograftdoppel oder -quartett beteiligt war, zwei bzw. vier Versuchsnummern zuzuordnen. Anhand dieser Nummern können die Ergebnisse der Versuche jederzeit mit dem Datenerfassungsprogramm extrahiert und nachvollzogen werden.

Neben den reinen Wachstumsdaten der Tumoren wurde als Kriterium einer möglichen gegenseitigen Beeinflussung der Xenografts die Angehensrate beider bzw. aller vier Tumoren, d.h. der prozentuale Anteil der Tiere, auf denen alle implantierten Xenografts nach Ablauf der Induktionszeit progredient wuchsen, erhoben.

Nach Auswertung der Lokalisationsversuche wurde eine größere Anzahl Nacktmäuse mit der als optimal erscheinenden Xenograftkonstellation implantiert:

Tumorquartett I a

n = 10 (Anzahl implantierter Mäuse)

Versuchsnummer: Xenograft/Passage:

K 148	MAXF 401/29N15
K 149	CXF 280/27N17
K 150	MEXF 989/20N7
K 151	LXFL 529/14N10

Tumorquartett II

n = 20

Versuchsnummer: Xenograft/Passage:

K 082	OVXF 899/43N18
K 083	RXF 944LX/24N10
K 084	XF 575/11N7
K 085	MAXF MX 1/25N13

I b

n = 10

Versuchsnummer: Xenograft/Passage:

K136	MAXF 401/29N15
K137	LXFL 529/14N10
K138	CXF 280/27N17
K139	MEXF 989/19N6

Tumorquartett III

n = 10

Versuchsnummer: Xenograft/Passage:

K 132	PAXF 736/19N6
K 133	GXF 251/13N4
K 134	LXFA 629/14N7
K135	BXF 1299/17N5

Abbildung 3.1. gibt den zeitlichen Ablauf der Wachstumsstudien beispielhaft wieder. Zwischen den einzelnen Studien ergaben sich Unterschiede in der Versuchsdauer und Dauer der Induktionszeit, der grundsätzliche Ablauf der Versuche entsprach aber stets dem dargestellten Schema.

3.9. Aufbau der Doppelimplantationsversuche

Um beeinflussende und beeinflusste Xenografts genauer zu identifizieren, wurden die Tumoren eines Quartetts in allen 6 möglichen Kombinationen als Doppel auf die Nacktmaus implantiert. Die Versuchsanordnungen der Doppelkombinationen der drei Tumorquartetts sind im Anhang 9.1.2. aufgelistet.

3.10. Aufbau der Chemotherapieversuche

3.10.1. Versuche zum Vergleich der Chemoresponsivität

Um zu untersuchen, ob die gleichzeitige Implantation von vier verschiedenen Xenografts sich auf deren Ansprechen gegenüber antineoplastischen Substanzen auswirkt, wurden die drei Tumorquartetts mit jeweils vier Standardchemotherapeutika unterschiedlicher Wirkstoffklassen und Wirkmechanismen therapiert.

Nach Ablauf der Induktionszeit wurden die Nacktmäuse, auf denen alle vier Tumoren angegangen waren nach einem Zufallsprinzip auf die fünf Gruppen (Kontrolle + vier Therapiegruppen) verteilt (Randomisation). Die Randomisierung anhand von Lindner Tabellen durchgeführt (Geran et al., 1977). Die verwendeten Zytostatika wurden in ähnlichen Therapieschemata wie in der Klinik gegeben. Die hochdosierte intermittierende Gabe hat sich bei den meisten Medikamenten wirksamer als die tägliche Behandlung erwiesen.

Bei den Nacktmäusen wurden zwei bzw. drei Therapiezyklen in wöchentlichem Abstand verabreicht (Fiebig, 1983), sofern das Therapiezeitfenster ausreichte.

Die Applikation der Substanzen erfolgte dosiert nach dem Körpergewicht unter sterilen Kautelen intravenös (Injektionsstelle: laterale Schwanzvene) oder intraperitoneal (Injektionsstelle: zwischen Kniefalte und inguinalem Mammarkomplex).

Bei den Chemotherapeutika handelte es sich um folgende klinikübliche Handelspräparate:

- Adrimedac^R (Adriamycin) = ADR Medac, Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Hamburg
- Eldesine^R (Vindesine) = VIND Lilly Deutschland GmbH, Gießen
- 5-FU Medac^R (5-Fluoruracil) = 5-FU Medac, Hamburg
- Endoxan^R (Cyclophosphamid) = CY Asta Medica AWD GmbH, Frankfurt
- Platiblastin^R (Cisplatin) = PLAT Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen

Die Vergleichsdaten der Chemoresponsivität der einzelnen Xenografts wurden der Datenbank des Labors Prof. Fiebig entnommen. Im Falle von XF 575 wurde das Ansprechen gegenüber den verwendeten Standardsubstanzen in einem eigenen Vorversuch ermittelt. Der chronologische Ablauf der Therapieversuche ist in Abbildung 3.2. dargestellt.

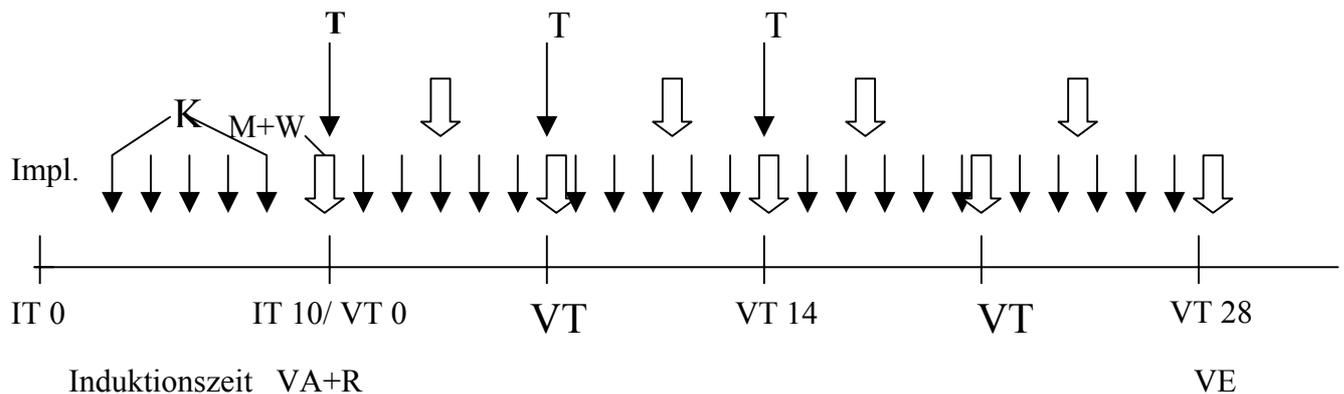


Abb. 3.2. Zeitlicher Ablauf der Chemotherapiestudien

- Impl.: Implantation der Tumorfragmente s.c.
- IT: Induktionstag
- VT: Versuchstag
- K: → tägliches Kontrolle des Allgemeinbefindens der Tiere (sowie Adspektion und Palpation der Xenografts während der Induktionszeit (IT 0-IT 10))
- M+W: ⇨ Messen der Tumordurchmesser und Wiegen der Tiere inkl. Dokumentation
- T: → Therapie der Tiere
- VA+R: Versuchsanfang nach Ablauf der Induktionszeit + Randomisierung (zufallsgemäße Verteilung) der Versuchstiere in die Kontroll- und Therapiegruppen
- VE: Versuchsende bei Erreichen eines Abbruchkriteriums

Einzelheiten der Standardchemotherapieversuche sind im Anhang 9.1.3. aufgeführt.

3.10.2. Naturstoffversuche

Die Naturstoffe wurden im Rahmen der Naturstoffpoolvereinbarung dem Institut für Experimentelle Onkologie durch das Hans-Knöll-Institut Jena zu Verfügung gestellt.

Die initiale Menge betrug 1 mg, die für die in-vitro Testung in 1 ml reinem DMSO gelöst wurde. Nach Identifizierung einer antineoplastischen Aktivität und Selektivität wurden auf Anforderung 5-10 mg der jeweiligen Substanz nachgeliefert, die dann ebenfalls in 1 ml reinem DMSO gelöst für die *in vivo* Testung zur Verfügung standen.

Die gelösten Substanzen wurden bei -20°C gelagert.

Je nach zu applizierender Dosis wurden Verdünnungen hergestellt, die ein Injektionsvolumen von 10, 5, 3.34 oder 3 ml/kg ergaben.

Als Verdünnungsmedium diente 0.9 % NaCl mit 0.05 % Tween 80.

Um eine möglichst gute Substanzstabilität zu gewährleisten, wurde nur die für den jeweiligen laufenden Versuch benötigte Menge des Naturstoffs aus der Stammlösung entnommen und während der Therapie dem Auftau- und Einfriervorgang (die Substanzen wurden zwischen den Therapietagen bei -20° C gelagert und zur nächsten Applikation erneut aufgetaut) unterzogen.

Die Substanzen wurden intraperitoneal verabreicht. Als substanzfreie Kontrolle diente das Verdünnungsmedium 0.9% NaCl mit 0.05% Tween 80 in einer Dosis von 10 ml/kg.

Im Rahmen der initialen Dosisfindungsstudie wurden die meisten Substanzen in der Dosierung 10, 3 und 1 mg/kg appliziert. In Einzelfällen war von den *in vitro* Testungen die hohe zytotoxische Potenz bekannt. Diese Substanzen wurden initial in Dosierungen von 1.0, 0.3 und 0.1mg/kg verabreicht. Es wurde jeweils an den Versuchstagen 0, 4, 8 oder 1, 5, 9 therapiert (abhängig vom Wochentag an dem die Versuche begannen, da möglichst keine Therapie an Wochenenden stattfinden sollte).

Abb. 3.3. stellt den chronologischen Ablauf eines Naturstoffversuchs dar.

Entsprechend der Verträglichkeit wurde die Dosis im folgenden Experiment angepaßt, bis die maximal tolerable Dosis (MTD), die einer Gewichtsabnahme von über 20% des Ausgangsgewichts oder einer Letalitätsrate von über 20%) entspricht, erreicht war. Wurde in der ersten Dosisfindungsstudie in der höchsten verabreichten Dosis keine Gewichtsabnahme der Tiere (oder andere Hinweise auf eine Dosis limitierende Toxizität) festgestellt, wurden die Dosierungen erhöht; war die niedrigste Dosis zu toxisch (Gewichtsabnahme > 20%, Letalitäten) wurden die Dosierungen in 2er- logarithmischen Schritten verkleinert. Die Ergebnisse (optimaler T/C siehe Kap. 3.11.2.) der Therapiegruppen in denen die Kriterien einer MTD erreicht wurden, wurden als Hauptkriterium bei der Beurteilung der antineoplastischen Aktivität benutzt. Abbildung 3.3. stellt den zeitliche Ablauf der Naturstoffversuche dar.

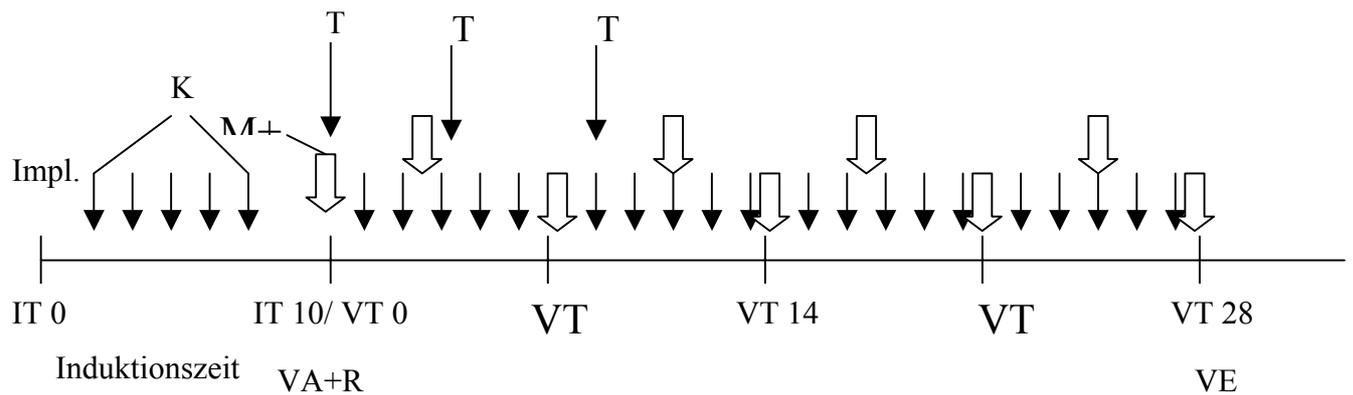


Abb. 3.3. Zeitlicher Ablauf der Naturstoffversuche

Legende siehe Zeitachse Chemotherapieversuche (Abb. 3.2).

Das Beispiel eines Versuchsplans für die Naturstofftestung mit bereits angepassten Dosierungen ist im Anhang aufgeführt.

3.11. Parameter zur Beurteilung der Chemotherapie

Als Maß für die Tumorgöße wurde das Tumolvolumen verwendet. Da die Tumoren zu Therapiebeginn eine gewisse 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:

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

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

3.11.1. Wachstumsverlauf

Einstufung in Bezug auf den Ausgangswert nach klinischen Kriterien:

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

3.11.2. Tumorwachstumshemmung

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

Mit Hilfe des optimalen T/C in Verbindung mit dem Wachstumsverlauf wurde eine Aktivitätsbewertung vorgenommen:

- = inaktiv = $T/C > 50\%$
- + = Tumorhemmung = $T/C > 25\% - 50\%$
- ++ = Tumorstillstand = $T/C < 25\%$ und $T_x/T_0 > 75\% - 125\%$
- +++ = partielle Remission = $T/C < 25\%$ und $T_x/T_0 > 10\% - 75\%$
- ++++ = komplette Remission = $T/C < 25\%$ und $T_x/T_0 < 10\%$

3.11.3. Relative Tumorwachstumsverzögerung

Nach dem oben geschilderten Verfahren wurde die Zeit errechnet, nach der jeder einzelne Tumor seine Ausgangsgröße verdoppelt hatte. Nach Berechnung der medianen Verdopplungszeit (VDZ) für die Kontroll- und die Testgruppe wurde die Wachstumsverzögerung (growth delay = GD; Kopper und 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.

3.12. Erstellen von Tumorwachstumskurven und Berechnung der Verdopplungszeiten

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 und Reinsch, 1973) durchgeführt. Hierbei ergab sich ein geglätteter Kurvenverlauf, die gemessenen Punkte lagen auf einer Kurve. Die Zeit, nach der ein einzelner Tumor 200% und 400% der Ausgangsgröße erreichte, wurde durch Interpolation errechnet.

Die mediane Verdopplungszeit wurde zur Charakterisierung der Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors sowie zur Berechnung der Wachstumsverzögerung unter Therapie verwendet.

3.13. Computerprogramme zur Datenerfassung und statistischen Auswertung

Zur Erfassung und Auswertung der Versuchsdaten stand in der Arbeitsgruppe Fiebig ein System von Rechnerprogrammen zur Verfügung. Es handelt sich dabei um eine in MS DOS programmierte Spezialsoftware, die im Arbeitskreis Prof. Fiebig entwickelt wurde.

Neben den Versuchsprotokollen mit Originaldaten und relativierten Einzelwerten konnten statistische Parameter (U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon, Student-t-Test, Mann Whitney Rank Sum Test), die Wachstums-Zeit-Funktion jedes Einzeltumors und des Medians, die Wachstumsverzögerung von Therapiegruppen gegenüber der Kontrolle einer Gruppe, sowie eine zusammenfassende Tabelle zu jedem Therapieversuch abgerufen werden. Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Sigma Plot^R Programms durchgeführt.

Wachstumskurven die mehrere Tumoren gleichzeitig darstellen und Säulendiagramme wurden mit dem MS Office^R Programm Excel^R erstellt.

3.14. Histologische Untersuchungen

Nach Versuchsende wurde von den drei Doppelkombinationen, vier Lokalisationsstudien und von drei Vierfachimplantationen (Wachstumsstudie, Standardchemotherapie, Naturstoffversuch) von jeweils einer typischen Nacktmaus der Kontrollgruppe die Tumoren asserviert. Insgesamt wurden von jedem Xenograft 10 histologische Präparate aus Mehrfachimplantationen mit dem Vergleichspräparat aus der Einzelimplantation verglichen.

Nach Fixation des Gewebes in 10% Formalin wurden die Xenografts in Alkoholreihen entwässert. Anschließend erfolgte die Einbettung der Tumoren in Paraffinblöcken und die Anfertigung von 2-3µm dicken Schnitten mittels eines Mikrotoms. An dieser Stelle sei dem Tierhygienischen Institut der Stadt Freiburg für die zur Verfügungstellung des Entwässerungsautomaten gedankt.

Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt. Eine detaillierte Beschreibung der durchgeführten Arbeitsschritte und verwandten Materialien findet sich im Anhang 9.2.

Die gefärbten histologischen Präparate wurden mit der Histologie der ursprünglichen Xenografts morphologisch verglichen.

3.15. Fotografische Methoden

Die Farbfotographien der Nacktmäuse wurden mit einer Kodak^R DX3600 Digital Kamera unter Verwendung des Nahaufnahmemodus aufgenommen und mit der Kodak^R Bildbearbeitungssoftware bearbeitet.

Die Photographien der histologischen Präparate wurden mit einer PENTAX MZ-50^R Spiegelreflexkamera, die an ein Zeiss Axiovert 35^R Mikroskop angeschlossen war, aufgenommen.

Die Bilder wurden vom RST Fotofachlabor Freiburg entwickelt und digitalisiert.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung von Tumorquartettmodellen

Es wurden drei Tumorquartette, die insgesamt zwölf humane Tumormodelle umfassten, durch subkutane Implantation etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit galt ein Tumorquartett als etabliertes Modell, wenn ein reproduzierbares Verfahren entwickelt worden war, mit Hilfe dessen vier verschiedene Xenograftfragmente gleichzeitig auf einer Nacktmaus wuchsen. Als Etablierungskriterien wurden die in Kapitel 3.6. aufgelisteten Forderungen an die Modelle gestellt.

Zunächst wurden jeweils zwei der Tumoren eines Quartetts in allen Kombinationsmöglichkeiten implantiert. In Vorversuchen war für jedes Tumorquartett die optimale Konstellation der Xenografts in den verschiedenen Implantationsorten ermittelt worden. Gleichzeitig wurde untersucht, ob die Lokalisation der Implantation das biologische Verhalten der Xenografts beeinflusst. Nachdem die Etablierungskriterien in den Vorversuchen erfüllt worden waren, folgten Wachstumsstudien mit größeren Mausezahlen. Um die Datenmenge zu vergrößern, wurden die Kontrollgruppen des Standardchemotherapieversuchs und verschiedener Naturstoffversuche in die Wachstumsstudien mit einbezogen.

Tab. 4.1.1. Eingesetzte Versuchstiere bei der Etablierung der drei Tumorquartettmodelle

Anzahl Tiere					
Tumorquartett	Doppel- implantation	Lokalisations- versuch	Wachstums- studie ^a	Standard- chemo- therapie	auswertbare/ gesamt = Angehensrate
I	6 x 4 = 24	4 x 6 = 24	2 x 10 = 20 (+7 + 6 = 33) <i>dir. Vergleich:</i> 8x4+12= 44	39	124/151 = 82%
II	6 x 4 = 24	4 x 5 = 20	20 (+ 6 + 6 = 32)	30	79/94 = 84%
III	6 x 5 = 30	4 x 4 = 16	10 (+ 7 + 8 = 25)	30	79/86 = 92%
gesamt	n = 78	n = 60	n = 94 (134)	99	282/331=85%

^a: Wachstumsverhalten der Kontrollgruppen aus Standardchemotherapieversuch und Naturstoffversuch wurden ebenfalls ausgewertet

Tabelle 4.1 listet die im Rahmen dieser Studie eingesetzten Versuchstiere auf und stellt der Gesamtzahl die Zahl der auswertbaren Mäuse gegenüber.

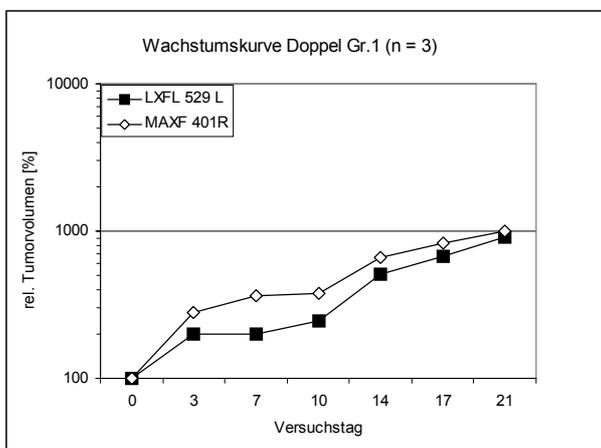
Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der einzelnen Validierungsschritte für jedes Tumorquartett chronologisch aufgeführt.

4.2 Ergebnisse der Etablierung des Tumorquartetts I

4.2.1 Doppelimplantationen

Tumorquartett I bestand aus LXFL 529, MAXF 401, CXF 280 und MEXF 989. Um zu überprüfen, ob die Xenografts sich gegenseitig im Wachstum beeinflussen, wurden initial alle 6 möglichen 2fach-Kombinationen der vier Tumoren überprüft. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

Die Induktionszeit bis zur Randomisierbarkeit (siehe Kap. 3.7.) beider Tumoren betrug 13 Tage. Von 24 implantierten Nacktmäusen konnten 20 an den Studien teilnehmen. Nach 21 Versuchstagen mussten die Versuche abgebrochen werden, da die maximale Tumormast ($2 \times 1500 \text{ mm}^3$) erreicht war. Das Wachstumsverhalten wird im Folgenden als relative mediane Volumenzunahme bezogen auf das Tumolvolumen an Versuchstag 0 im logarithmischen Maßstab in Liniendiagrammen dargestellt:



Ausgangsvolumen (Median):
 MAXF 401/29N15: 47.2 mm^3
 LXFL 529/13N9: 83.1 mm^3

Verdopplungszeiten in Tagen:

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
MAXF 401/29N15:	2.4	6.7
LXFL 529/13N9:	2.9	7.8

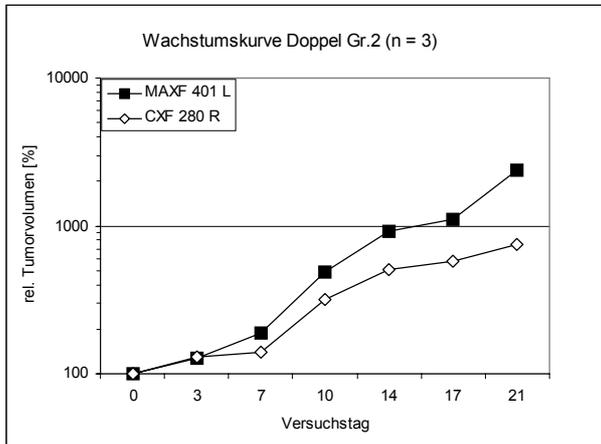
Angehensrate: 3/4 (75%)

L: linke Flanke R: rechte Flanke

Abb. 4.2.1. Ergebnis Kombination 1

Drei der vier implantierten Nacktmäuse konnten am Versuch teilnehmen. Beide Tumoren befanden sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase, wuchsen weitgehend synchron und konstant bis zum Versuchsende. MAXF 401 vergrößerte sein Volumen in der ersten Versuchshälfte schneller als LXFL 529. LXFL 529 wies von VT 3 bis VT 10 ein relativ langsames Wachstum auf, um anschließend beschleunigt zu proliferieren und im relativen Tumolvolumen annähernd mit MAXF 401 aufzuschließen. Auch MAXF 401 zeigte eine

weniger ausgeprägte Wachstumsverlangsamung zwischen VT 7 und 10. Beim absoluten Endvolumen übertraf LXFL 529 (761.1 mm³) das Mammakarzinom (474.4 mm³). Das größere mediane Ausgangsvolumen von LXFL 529 ließ sich durch dessen etwas kürzere Induktionszeit von durchschnittlich 10 Tagen - verglichen mit 13-16 Tagen bei MAXF 401- erklären.



Ausgangsvolumen (Median):

MAXF 401/29N15: 38.3 mm³
 CXF 280/25N16: 35.2 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
MAXF 401/29N15:	6.2	8.2
CXF 280/25N16:	6.8	10.8

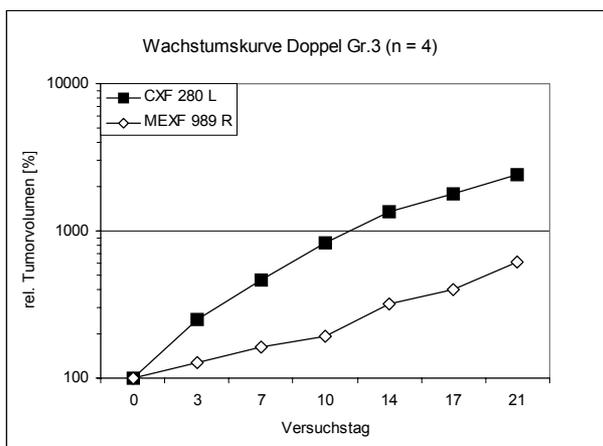
Angehensrate: 3/4 (75%)

L: linke Flanke R: rechte Flanke

Abb. 4.2.2. Ergebnis Kombination 2

Beide Xenografts vergrößerten ihr relatives Volumen synchron und proliferierten konstant. Das relativ langsame Wachstum von Tag 0 bis Tag 7 deutete darauf hin, daß sie sich zur Zeit des Versuchsbeginns erst am Anfang des exponentiellen Wachstums befanden, was die kleinen Ausgangsvolumina belegten. Dies erklärte auch die relativ lange erste Verdopplungszeit.

Ab VT 7 proliferierte das Mammakarzinom bis zum Versuchsende mit konstant hoher Geschwindigkeit während das Colonkarzinom ab VT 14 etwas langsamer wuchs.



Ausgangsvolumen (Median):

CXF 280/25N16: 129.9 mm³
 MEXF 989/18N5: 74.7 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
CXF 280/25N16:	2.2	5.1
MEXF 989/18N5:	8.9	18.3

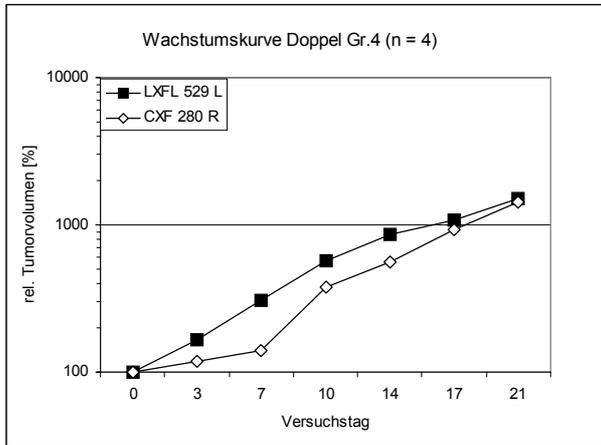
Angehensrate: 4/4 (100%)

L: linke Flanke R: rechte Flanke

Abb. 4.2.3. Ergebnis Kombination 3

In dieser Gruppe befand sich CXF 280 von Anfang an in der exponentiellen Wachstumsphase (vergleichbar mit dem Wachstum in Kombination 2 ab Tag 7), die Verdopplungszeiten waren

um 50% kürzer als in Kombination 2. Das Ausgangsvolumen war um den Faktor 3.7 größer. MEXF 989 erreichte erst kurz vor Versuchsende die 400% seines Ausgangsvolumens. Die geforderten Kriterien (siehe Tab.3.2.) wurden auch von dieser Gruppe erfüllt.



Ausgangsvolumen (Median):

LXFL 529/13N9: 78.0 mm³

CXF 280/25N16: 80.1 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
LXFL 529/13N9:	3.7	7.1
CXF 280/25N16:	6.8	9.5

LXFL 529/13N9: 3.7 7.1

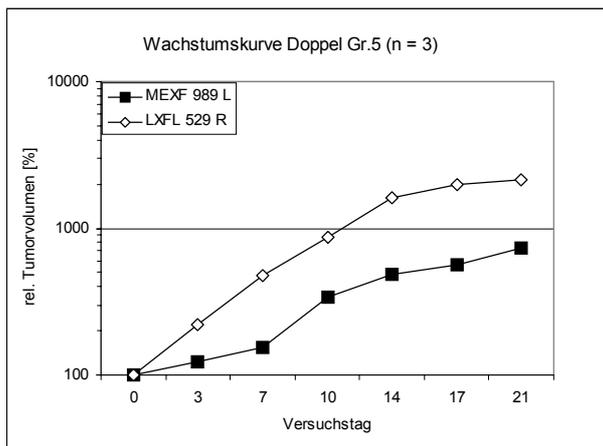
CXF 280/25N16: 6.8 9.5

Angehensrate: 4/4 (100%)

L: linke Flanke R: rechte Flanke

Abb. 4.2.4. Ergebnis Kombination 4

LXFL 529 glich in seinem Wachstumsverhalten Kombination 1 (Abb. 4.2.1.) mit konstantem exponentiellem Wachstum. CXF 280 verhielt sich ähnlich wie in Gruppe 2 und begann mit der exponentiellen Proliferation erst ab Tag 7, obwohl das Ausgangsvolumen bedeutend größer war als bei Kombination 2 (Abb. 4.2.2.). Ab VT 7 wuchs das Colonkarzinom mit ähnlicher Geschwindigkeit wie in Kombination 3 (Abb. 4.2.3.) und erreichte ein vergleichbares absolutes Endvolumen wie LXFL 529 (CXF 280: 1577.8 mm³; LXFL 529: 1580.1 mm³).



Ausgangsvolumen (Median):

MEXF 989/18N5: 65.7 mm³

LXFL 529/13N9: 94.2 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
MEXF 989/18N5:	6.8	17.1
LXFL 529/13N9:	2.5	5.4

MEXF 989/18N5: 6.8 17.1

LXFL 529/13N9: 2.5 5.4

Angehensrate: 3/4 (75%)

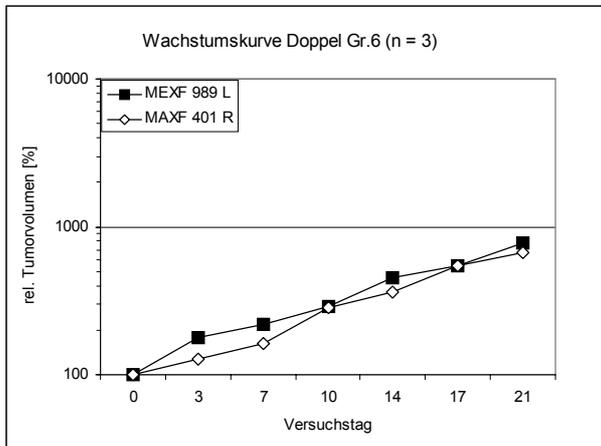
L: linke Flanke R: rechte Flanke

Abb. 4.2.5. Ergebnis Kombination 5

Zusammen mit MEXF 989 wuchs LXFL 529 etwas schneller als in Kombination 1 (Abb. 4.2.1.) und 4 (Abb. 4.2.4.) bei einem größeren Ausgangsvolumen. MEXF 989 verhielt sich

charakteristisch, indem er erst ab Tag 7 zügig wuchs und erst kurz vor Versuchsende die 400% Marke überschritt (vergleiche Kombination 3 (Abb. 4.2.3.)).

MEXF 989 wuchs in Kombination 6 (Abb. 4.2.6.) bedeutend schneller als in Kombination 3 (Abb. 4.2.3.) und 5 (Abb. 4.2.5.) während er ein relativ kleines Ausgangsvolumen aufwies.



Ausgangsvolumen (Median):
MEXF 989/18N5: 46.2 mm³
MAXF 401/29N15: 54.0 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
MEXF 989/18N5:	3.7	7.5
MAXF 401/29N15:	6.4	11.3

Angehensrate: 3/4 (75%)

L: linke Flanke R: rechte Flanke

Abb. 4.2.6. Ergebnis Kombination 6

MAXF 401 wuchs hier am langsamsten, wobei insbesondere der Unterschied zu den Verdopplungszeiten in Kombination 1 (Abb. 4.2.1) auffiel.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Etablierungskriterien (siehe Kap. 3.6.) in allen Gruppen erfüllt wurden. Die Angehensraten betragen mindestens 75% und das Zeitfenster war mit 21 Tagen lang genug für Substanztestungen mit herkömmlichen Therapieschemata.

LXFL 529 zeigte in allen Kombinationen konstantes, exponentielles Wachstum und hatte nur geringe Schwankungen in den Verdopplungszeiten. MAXF 401 proliferierte in allen Gruppen konstant, wobei das Wachstumsverhalten von Kombination 2 und 6 (Abb. 4.2.2. und Abb. 4.2.6.) ähnlich war. Die Verdopplungszeiten in Kombination mit LXFL 529 bei ähnlichem medianen Ausgangsvolumen waren dagegen wesentlich kürzer. MEXF 989 zeigte ein recht widersprüchliches Bild, indem es in Kombination 6 (Abb. 4.2.6.) bei kleinerem Ausgangsvolumen schneller wuchs als in Gruppe 3 und 5 (Abb. 4.2.3. und Abb. 4.2.5.), was auf den ersten Blick zu Lasten der Wachstumsgeschwindigkeit von MAXF 401 zu gehen schien. CXF 280 wuchs in Kombination 2 und 4 (Abb. 4.2.2. und 4.2.4.) vergleichbar, war aber in Kombination 3 (Abb. 4.2.3.) zusammen mit MEXF 989 bedeutend schneller.

Aufgrund der kleinen Gruppengröße liess sich aus diesem Vorversuch lediglich schließen, dass kein Xenograft in der Lage war, einen anderen vollständig in seinem Wachstum zu unterdrücken. Die Schwankungen traten zudem bevorzugt im ersten Versuchsdrittel bei relativ kleiner Tumormasse auf.

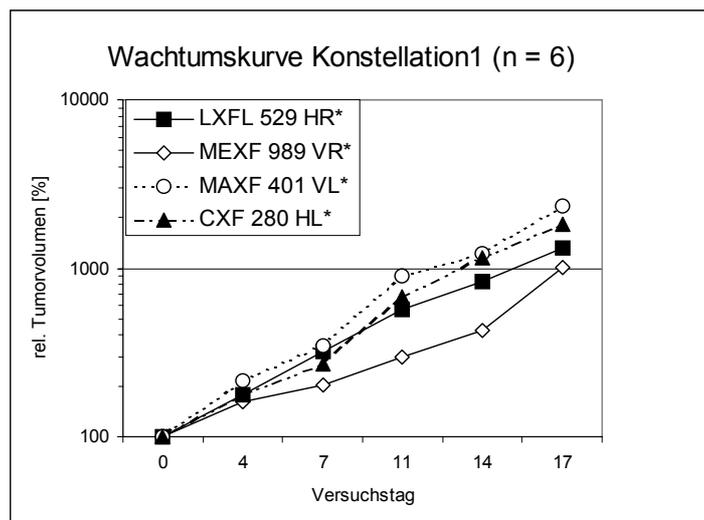
4.2.2. Lokalisationsversuche

Um den Einfluß der Implantationslokalisierung auf der Nacktmaus (hintere oder vordere Flanke) und dadurch bedingte Unterschiede in der Versorgung der Tumorfragmente mit Nährstoffen und Sauerstoff zu untersuchen, wurden die vier verschiedenen Xenografts in vier verschiedenen Konstellationen einem Rotationsprinzip folgend so implantiert, daß jeder Tumor einmal an einer der vier möglichen Lokalisationen wuchs.

Von 24 implantierten Mäusen waren 20 für die Studie geeignet (d.h. gutes Allgemeinbefinden und Angang aller vier Tumoren).

Die Induktionszeit betrug 10 Tage.

Das Wachstumsverhalten der Xenografts wird im folgenden als relative mediane Tumolvolumenzunahme bezogen auf das Ausgangsvolumen am Versuchstag 0 in Form von Liniendiagrammen im logarithmischen Maßstab dargestellt. Die Versuchsnummern sind K399 bis K402.



*HR: hintere rechte Flanke VR: vordere rechte Flanke HL: hintere linke Flanke VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.2.7. Ergebnis Konstellation 1

Ausgangsvolumen (Median):

MAXF 401/22N8:	29.5 mm ³
MEXF 989/26N13:	39.5 mm ³
CXF 280/10N4:	40.0 mm ³
LXFL 529/14N10:	79.8 mm ³

Verdopplungszeiten (in Tagen):

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
MAXF 401/22N8:	3.5	7.4
MEXF 989/26N13:	7.1	13.2
CXF 280/10N4:	3.4	7.3
LXFL 529/14N10:	4.2	7.8

Angehensrate: 6/6 (100%)

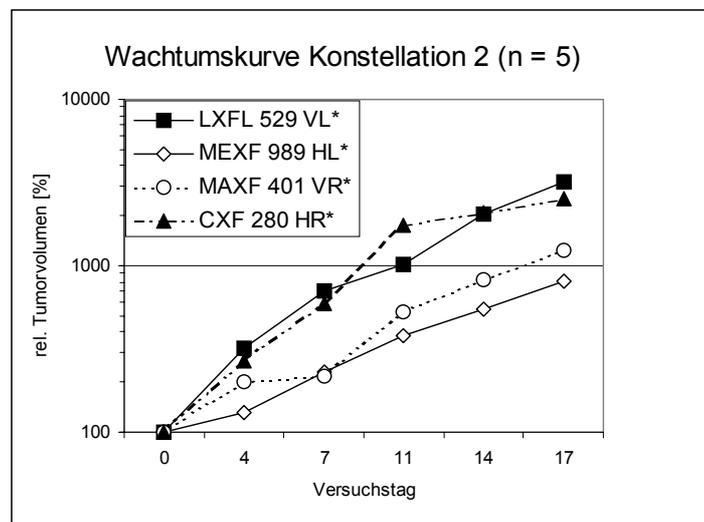
Nach der Induktionszeit von 10 Tagen erfüllten alle implantierten Tumoren die Vitalitätskriterien und wuchsen von Versuchstag 0 an exponentiell.

Das Ausgangsvolumen von LXFL 529 war um den Faktor 2 größer als das der anderen Xenografts. MAXF 401 verdoppelte sein Volumen in dieser Lokalisation am schnellsten und erreichte mit 2324% sein zweitgrößtes Endvolumen. Das Mammakarzinom hatte hier die steilste Wachstumskurve. LXFL 529 startete mit seinem größten Endvolumen und wuchs anschließend langsamer als in den anderen Gruppen (zweite Verdopplung 2.3-2.6 Tage später). Das relative Endvolumen des Xenografts war mit 1307% deutlich kleiner als in den anderen Lokalisationen.

CXF 280 wies das kleinste Anfangsvolumen auf und proliferierte hier etwas langsamer als in den anderen Konstellationen. Auch das Endvolumen war mit 1827% am kleinsten.

MEXF 989 zeigte ab Tag 4 eine Abflachung seiner Wachstumskurve bis VT 14, was sich auch in den langsamen Verdopplungen widerspiegelte. Ab VT 14 nahm die Proliferationsgeschwindigkeit deutlich zu und der Tumor erreichte in dieser Gruppe sein größtes Endvolumen mit 1006%.

Die Wachstumskurven in dieser Konstellation ergaben ein weitgehend synchrones Bild. Alle Xenografts verdoppelten sich mindestens zweimal und die Angehensrate lag bei 100%. Damit waren hier alle Etablierungskriterien erfüllt.



*HR: hintere rechte Flanke VR: vordere rechte Flanke HL: hintere linke Flanke VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.2.8. Ergebnis Konstellation 2

Ausgangsvolumen (Median):

Verdopplungszeiten (in Tagen):

MAXF 401/22N8:	37.9 mm ³
MEXF 989/26N13:	23.9 mm ³
CXF 280/10N4:	45.0 mm ³
LXFL 529/14N10:	47.6 mm ³

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
MAXF 401/22N8:	5.1	9.4
MEXF 989/26N13:	5.9	11.5
CXF 280/10N4:	2.9	5.8
LXFL 529/14N10:	2.9	5.5

Angehensrate: 5/6 (83%)

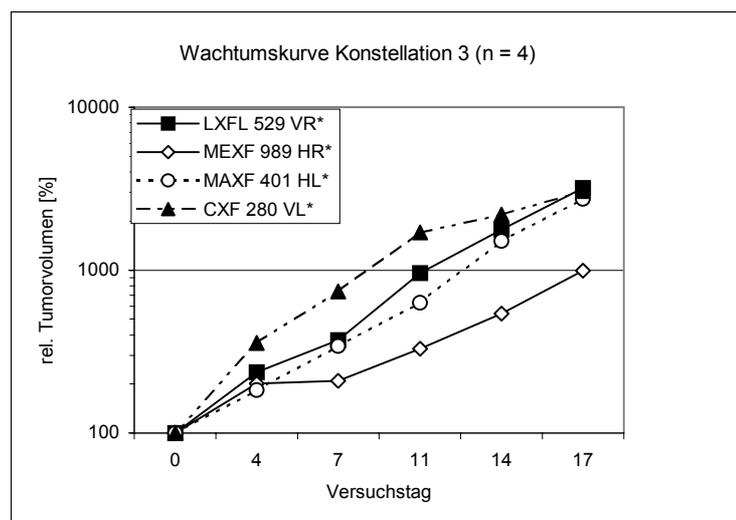
MAXF 401 proliferierte in dieser Gruppe langsamer als in Konstellation 1 (Abb. 4.2.7.) und 3 (Abb. 4.2.9.) und wies das kleinste Endvolumen auf (1236%). Die Wachstumskurve verlief wesentlich flacher als die von LXFL 529 und CXF 280.

LXFL 529 hatte ein kleineres Ausgangsvolumen als in Konstellation 1 (Abb. 4.2.7.) und proliferierte wesentlich schneller bis zu einem größeren relativen Endvolumen.

Bis VT 11 war die Wachstumskinetik von CXF 280 fast identisch mit der von LXFL 529. Nach diesem Messwert verlief die Kurve aber flacher und der Tumor schien vom logarithmischen zum linearen Wachstum überzugehen. Besonders in der ersten Versuchshälfte wuchs das Kolonkarzinom schneller als in Konstellation 1 (Abb. 4.2.7.).

Zu Anfang der Studie wuchs MEXF 989 schneller als in Konstellation 1 (Abb. 4.2.7.) und hatte kürzere Verdopplungszeiten. Ohne den oben (Abb. 4.2.7.) beobachteten Wachstumsschub zwischen VT 14 und VT 17 war das Endvolumen hier mit 816% kleiner.

Die Etablierungskriterien wurden auch hier erfüllt, die Xenografts wuchsen aber weniger synchron als in Konstellation 1 (divergierende Wachstumskurven).



*HR: hintere rechte Flanke VR: vordere rechte Flanke HL: hintere linke Flanke VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.2.9. Ergebnis Konstellation 3

Ausgangsvolumen (Median):

MAXF 401/22N8: 27.6 mm³
 MEXF 989/26N13: 35.7 mm³
 CXF 280/10N4: 64.4 mm³
 LXFL 529/14N10: 33.8 mm³

Verdopplungszeiten (in Tagen):

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
MAXF 401/22N8:	3.2	7.6
MEXF 989/26N13:	4.1	11.6
CXF 280/10N4:	1.6	4.3
LXFL 529/14N10:	2.8	5.3

Angehensrate: 4/6 (67%)

In der dritten Konstellation (Abb. 4.2.9.) wurde die niedrigste Angehensrate erreicht. MAXF 401 zeigte an dieser Implantationsstelle ähnliche Wachstumsparameter wie in Konstellation 1

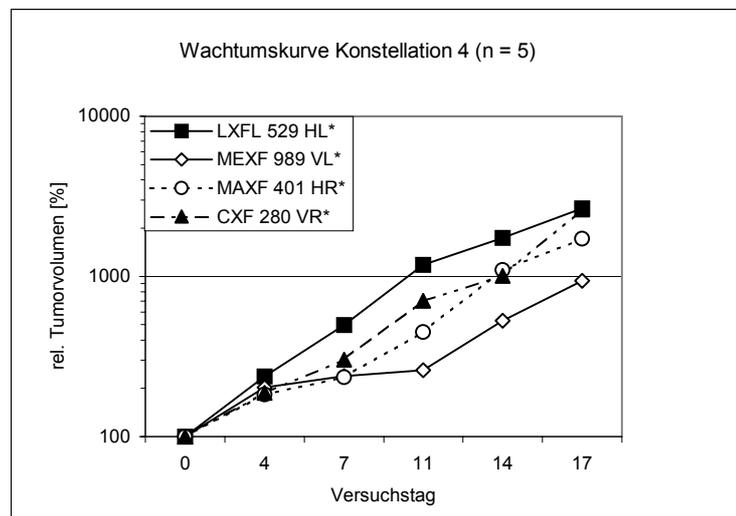
(Abb. 4.2.7.) und die Kurve verlief wieder auf einer Höhe mit der von LXFL 529 und CXF 280. Hier wurde das größte Endvolumen mit 2731% erreicht.

Das Wachstumsverhalten von LXFL 529 glich dem von Konstellation 2 (Abb. 4.2.8.) und auch der Lungentumor hatte am Versuchstag 17 in dieser Lokalisation das größte relative Volumen.

CXF 280 nutzte die Lokalisation in der vorderen linken Flanke zum optimalen Wachstum aus: größtes Ausgangsvolumen, kürzeste Verdopplungszeiten und größtes Endvolumen. Auch hier wurde die Kurve ab Versuchstag 11 flacher.

Nach dem Wachstumsstopp zwischen VT 4 und VT 7 beschleunigte MEXF 989 sein Wachstum ähnlich wie in Gruppe 1 und erreichte sein zweitgrößtes Endvolumen (994%).

Bei erfüllten Kriterien erschien der Kurvenverlauf durch die rasche Proliferation von CXF 280, LXFL 529 und MAXF 401 im Vergleich zu MEXF 989 weniger synchron.



*HR: hintere rechte Flanke VR: vordere rechte Flanke HL: hintere linke Flanke VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.2.10. Ergebnis Konstellation 4

Ausgangsvolumen (Median):

Verdopplungszeiten (in Tagen):

		<u>200%</u>	<u>400%</u>
MAXF 401/22N8:	37.0 mm ³	5.7	10.6
MEXF 989/26N13:	30.1 mm ³	3.5	13.0
CXF 280/10N4:	51.3 mm ³	2.1	7.3
LXFL 529/14N10:	38.9 mm ³	2.3	5.2

Angehensrate: 5/6 (83%)

In Konstellation 4 wuchs MAXF 401 in der hinteren linken Flanke bis VT 11 am langsamsten, konnte sich danach im Gegensatz zu Konstellation 2 (Abb. 4.2.8.) aber LXFL 529 und CXF 280 annähern. LXFL 529 hatte hier bei relativ kleinem Anfangsvolumen die kürzesten Verdopplungszeiten. Ab VT 11 wurde die Kurve etwas flacher und der Tumor schien in langsames Wachstum überzugehen.

Die Wachstumskurve von CXF 280 war hier flacher als in Konstellation 2 und 3 (Abb. 4.2.8. und Abb. 4.2.9.), zeigte aber ab VT 11 einen spiegelbildlichen Verlauf indem sie steiler statt flacher wurde.

Nach einer schnellen ersten Verdopplung benötigte MEXF 989 sehr lange für das Erreichen der 400% Marke und wuchs erst gegen Versuchsende wieder linear.

Trotz Erfüllung der Etablierungskriterien hatten die Wachstumskurven insbesondere durch das sehr langsame Wachstum von MEXF 989 einen recht großen Abstand voneinander.

4.2.2.1 Bestimmung der optimalen Konstellation der vier Xenografts zueinander

Neben den Schaubildern wurde als Hilfsparameter für Wachstumssynchronizität die Differenz des maximalen medianen prozentualen Volumenzuwachses (Volumenzuwachs des Xenografts mit dem größten prozentualen Volumenvergrößerung – Volumenzuwachs des Xenografts mit dem kleinsten prozentualen Volumenzuwachs) herangezogen:

Konstellation: Differenz medianen relativen
Tumervolumenzuwachses:

1:	1318%
2:	2380%
3:	2204%
4:	1719%

Aufgrund dieser statistisch nicht überprüfbar Ergebnisse wurde die Xenograftkonstellation 1 (VL MAXF 401, VR MEXF 989, HL CXF 280, HR LXFL 529) rein empirisch als optimal angesehen und für die weiteren Versuche ausgewählt.

Um zu überprüfen ob die von Kyriazis (1980) postulierte These, daß die Lokalisation das biologische Verhalten der Xenografts beeinflusst, auch für die hier verwandten Tumoren zutraf, wurde der maximale prozentuale Volumenzuwachs der einzelnen Xenografts in den vier Implantationslokalisationen (vordere und hintere, linke und rechte Flanke VL,VR,HL,HR) verglichen:

MAXF 401:

VL: 2324% VR: 1236%
HL: 2731% HR: 1716%

MEXF 989:

VL: 938% VR: 1006%
HL: 816% HR: 994%

CXF 280:

VL: 3058% VR: 2619%
HL: 1827% HR: 2535%

LXFL 529:

VL: 3196% VR: 3199%
HL: 1307% HR: 2657%

MAXF 401 erreichte auf beiden Seiten größere Volumenzuwächse in der hinteren Lokalisation (HL 117% des Zuwachses von VL und HR 139% von VR). Die Ausgangsvolumina waren nahezu identisch.

Die anderen drei Xenografts zeigten die umgekehrte Tendenz: bessere Proliferation in der vorderen Flanke.

Die geringsten Unterschiede wies MEXF 989 auf: in der linken vorderen Flanke wurde 15% mehr Volumen als in der linken hinteren Flanke zugelegt, während die Differenz auf der rechten Seite nur 1% betrug. Das Anfangsvolumen in der hinteren linken Flanke war mit 23.9 mm³ sehr klein was für einen verspäteten Proliferationsstart sprach.

CXF 280 proliferierte in der vorderen linken Flanke um 67% mehr als in der hinteren Lokalisation - auf der rechten Seite war der Unterschied mit 3% sehr gering. Bereits das Ausgangsvolumen der linken Seite bestätigte diese Tendenz zur besseren Proliferation: VL 64.4 mm³, HL 40.0 mm³ (VL 161% von HL). Die Ausgangsvolumina der rechten Seite waren annähernd gleich groß.

Die größte Differenz wurde durch LXFL 529 auf der linken Seite erreicht: VL 245% (3196%) von HL (1307%).

Rechts betrug der Unterschied nur 20%. Das Ausgangsvolumen VL übertraf HL um lediglich um 22%. Der Unterschied in der Volumenzunahme auf der rechten Seite beruhte offensichtlich auf dem um 236% größeren Ausgangsvolumen HR: die absoluten Werte ergaben hier ein umgekehrtes Verhältnis.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, daß die Ergebnisse der linken Seiten von CXF 280 und LXFL 529 Kyriazis Hypothese bestätigten, während auf der rechten Seite kein deutlicher Unterschied in der Proliferation der Xenografts beobachtet werden konnte.

MAXF 401 schien zumindest auf der linken Seite die hintere Flanke zu bevorzugen.

Eine einheitliche Tendenz des besseren Wachstums in der vorderen (Kyriazis, 1980) oder hinteren Lokalisation konnte hier nicht festgestellt werden.

Durch die geringe Anzahl der hier eingesetzten Versuchstiere und Xenografts (4 bis 6 pro Konstellation) können auch individuelle Wachstumsschwankungen als Ursache der unterschiedlichen Zunahmen des relativen Tumorumens nicht ausgeschlossen werden.

4.2.3. Eigene Wachstumsstudien

Nach Bestimmung der optimalen Tumorlokalisation wurden die vier Xenografts (MAXF 401, LXFL 529, CXF 280 und MEXF 989) in Konstellation 1 auf eine größere Anzahl ($n = 2 \times 10$) von Nacktmäusen implantiert (Abb. 4.2.11. A und B).

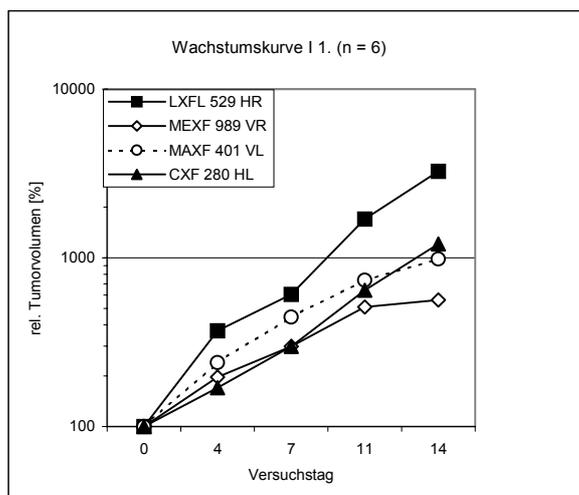
Weiterhin wurde das Wachstumsverhalten der nur mit dem Kontrollvehikel behandelten Kontrollgruppen aus Standardchemotherapie- und Naturstoffversuchen dokumentiert.

Bei den beiden Wachstumsversuchen waren jeweils 10 Tiere implantiert worden, von denen 6 bzw. 8 an den Studien teilnehmen konnten (d.h. gutes Allgemeinbefinden und Angang aller vier Tumoren).

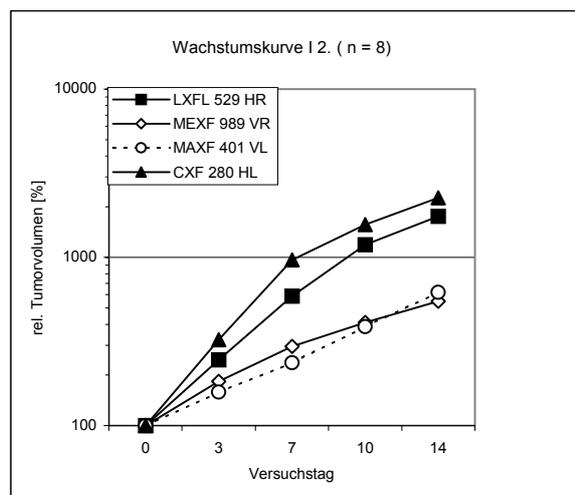
Das Wachstumsverhalten der Xenografts wird im Folgenden als relatives Tumolvolumen bezogen auf das Ausgangsvolumen im logarithmischen Maßstab in Form von Liniendiagrammen dargestellt.

Bei Erreichen der maximal tolerablen Tumorlast wurden die Versuche beendet (letzter VT).

A



B



HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; VL: vordere linke Flanke; HL: hintere linke Flanke

Abb. 4.2.11. A Ergebnis Wachstumsstudie I 1. **B** Ergebnis Wachstumsstudie I 2.

Wachstumsdaten Studie I 1. (Abb. 4.2.11. A):

Ausgangsvolumen (Median):

LXFL 529/14N10: 70.6 mm³
 MAXF 401/29N15: 42.5 mm³
 CXF 280 /27N17: 56.4 mm³
 MEXF 989/20N7: 87.9 mm³

Angehensrate: 6/10 (60%)

Verdopplungszeiten (in Tagen):

	200%	400%
LXFL 529	2.0	5.4
MEXF 989	3.6	6.8
CXF 280	3.6	7.6
MAXF 401	3.1	7.7

Die Induktionszeit betrug 14 Tage.

Wachstumsdaten I 2. (Abb. 4.2.11. B):

Ausgangsvolumen (Median):

LXFL 529/14N10: 90.8 mm³
 MAXF 401/29N15: 43.5 mm³
 CXF 280 /27N17: 69.6 mm³
 MEXF 989/19N6: 35.5 mm³
 Angehensrate: 8/10 (80%)

Verdopplungszeiten (in Tagen):

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
LXFL 529	2.0	5.0
MAXF 401	5.2	10.6
CXF 280	2.4	4.2
MEXF 989	5.5	11.3

Die Induktionszeit betrug 11 Tage.

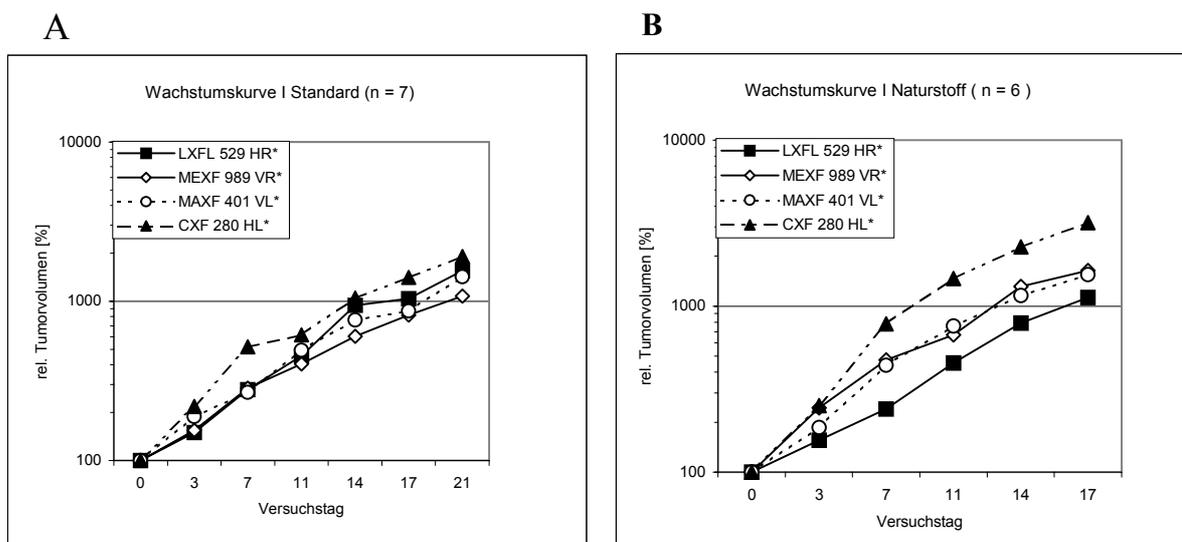
Die geforderten Etablierungskriterien wurden von allen vier Quartettimplantationen erfüllt.

Jedes der Xenografts vergrößerte sein Volumen im Versuchszeitraum um mehr als 400%.

Die Beobachtungszeiträume waren mit 14 – 21 Versuchstagen für Kurzzeitversuche, insbesondere Naturstoffversuche mit dem Therapieschema d: 0, 4, 8 ausreichend lang.

Die geforderte Angehensrate von 60% wurden mit 60%, 80%, 69% und 75% jeweils erreicht.

Weitere Wachstumskurven von Vierfachimplantationen mit Tumorquartett I stehen aus den Kontrollgruppen des Standardchemotherapieversuchs und des Naturstoffversuchs zur Verfügung (Abb 4.2.12. A und B).



HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; VL: vordere linke Flanke; HL: hintere linke Flanke

Abb. 4.2.12. A Kontrollgruppe Standardtherapie **B** Kontrollgruppe Naturstoff

Wachstumsdaten Kontrollgruppe Standardchemotherapieversuch (Abb. 4.2.12. A):

Ausgangsvolumen:

LXFL 529 /9N5: 108.0 mm³
 MAXF 401 /19N5: 67.8 mm³
 CXF 280 /31N22: 213.2 mm³
 MEXF 989 /24N11: 58.5 mm³
 Angehensrate: 27/39 (69%).

Verdopplungszeiten (in Tagen):

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
LXFL 529	3.7	8.3
MAXF 401	2.7	9.0
CXF 280	2.2	5.5
MEXF 989	4.4	9.5

Die Induktionszeit betrug 17 Tage.

Wachstumsdaten Kontrollgruppe Naturstoffversuch (Abb. 4.2.12. B):

<u>Ausgangsvolumen:</u>	<u>Verdopplungszeiten (in Tagen):</u>	
	<u>200%</u>	<u>400%</u>
LXFL 529 /10N6: 51.1 mm ³	3.3	8.0
MAXF 401 /20N6: 44.8 mm ³	2.8	6.2
CXF 280 /32N23: 213.2 mm ³	2.1	4.1
MEXF 989 /25N12: 58.5 mm ³	2.5	7.1
Angehensrate: 30/40 (75%)		

Die Induktionszeit betrug 13 Tage.

Die Induktionszeiten betragen zwischen 11 (Studie I 2., Abb. 4.2.11. B) und 17 Tagen (Kontrollgruppe Standard Abb. 4.2.12. A).

Die unterschiedlichen langen Zeiträume bis zum Beginn der Messungen bewirkten bei LXFL 529 (51.1 - 108mm³), MAXF 401 (42.5 - 67.8mm³) und MEXF 989 (35.5 - 87.9mm³) nur geringe Unterschiede im absoluten medianen Tumolvolumen an VT 0.

CXF 280 zeigte größere zeitabhängige Differenzen: 56.4 mm³ und 69.6mm³ (Abb. 4.2.12. und Abb. 4.2.14.) bei den früheren Messungen und je 213.2mm³ bei den längeren Induktionszeiten Abb. 4.2.11. und 4.2.13.). Mit geringen Differenzen war in jeder Abbildung ein gleichmäßiges, weitgehend synchrones Wachstum der vier Tumoren zu erkennen (siehe Abb. 4.2.11.-4.2.12.).

Die Verdopplungszeiten (in Tagen angegeben) der einzelnen Xenografts variierten zwischen den verschiedenen Implantationen nur mäßig:

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
LXFL 529:	2.0 - 3.7	5.0 - 8.0
MAXF 401:	2.7 - 5.2	6.2 - 10.6
CXF 280:	2.1 - 3.6	4.1 - 7.6
MEXF 989:	2.5 - 5.5	7.1 - 11.3

Diese Unterschiede in der medianen Wachstumsgeschwindigkeit konnten aufgrund der geringen Anzahl zu vergleichender Werte nicht statistisch überprüft werden.

Ähnliche Schwankungen der Verdopplungszeiten in Abhängigkeit von Induktionszeit, Ausgangsvolumen und Passagezahl waren auch in historischen Datensätzen für Einzelimplantationen zu finden (siehe Kapitel 4.2.4.).

Für das Tumormodell - insbesondere für die Länge des Versuchszeitraumes - erwies es sich als günstig, wenn die schneller proliferierenden Xenografts LXFL 529 und CXF 280 etwas längere Verdopplungszeiten aufwiesen (siehe Kontrollgruppe Standard, Abb. 4.2.13. und Kontrollgruppe Naturstoff, Abb. 4.2.14.). Diese Diagramme zeigten die größte Synchronizität der einzelnen Kurven und die längsten Versuchs - bzw. Beobachtungszeiträume.

4.2.3.1. Direkter Vergleich des Wachstumsverhaltens der Xenografts in der Vierfachimplantation und in Einzelimplantationen

Für Quartett I wurde der direkte Vergleich des Wachstumsverhaltens der Xenografts in Einzel- und Vierfachimplantation angestellt.

Für den simultanen Wachstumsvergleich und um möglichst viele Parameter, die das Wachstum der Xenografts beeinflussen können, zu eliminieren, wurden aus dem gleichen Spendermaterial folgende Implantationen auf weibliche Nacktmäuse gleichen Alters parallel durchgeführt:

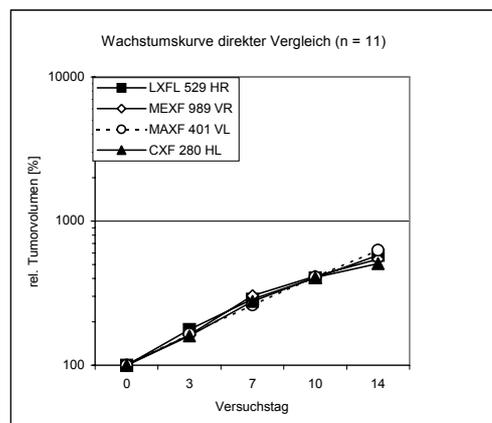
- 12 Nacktmäusen wurde je ein Fragment der vier Xenografts in den beschriebenen Lokalisationen implantiert (Tumorquartettmodell)
- je 8 Tieren wurden je zwei Fragmente des gleichen Xenografts in die Mitte der linken und rechten Flanke implantiert

Dieser Versuchsansatz erlaubte eine statistische Auswertung nach den Kriterien des U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon und damit konkrete Schlußfolgerungen bezüglich bestehender Wachstumsunterschiede.

Nach 13 Tagen Induktionszeit erfüllten die Xenografts die Vitalitätskriterien und die Messung und Dokumentation des Tumorstwachstums wurde begonnen.

Die Wachstumsstudie dauerte 14 Versuchstage. Die laborinternen Versuchsnummern waren K515 bis K518.

Abbildung 4.2.13. stellt das Wachstum der Xenografts in der Vierfachimplantation als Liniendiagramm im logarithmischen Maßstab dar.



HR: hintere rechte Flanke, VR: vordere rechte Flanke; HL: hintere linke Flanke; VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.2.13. Ergebnis des direkten Vergleichs zwischen Vierfach- und Einzelimplantation (bei parallelem Versuchsbeginn und gleichem Tumormaterial)

Von den zwölf implantierten Nacktmäusen waren elf nach Ablauf der Induktionszeit in gutem Allgemeinzustand und zeigten je vier vitale Tumoren. Bei einem Tier erfüllte MEXF 989 nicht die Vitalitätskriterien.

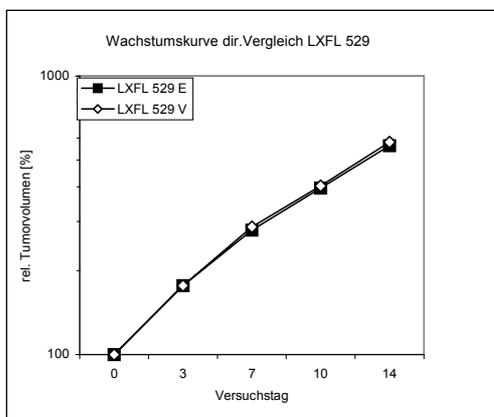
Wachstumsdaten der Xenografts in der Vierfachimplantation beim direkten Vergleich zwischen Vierfach- und Einzelimplantation

<u>Ausgangsvolumen (Median):</u>	<u>Verdopplungszeiten (in Tagen):</u>	
	<u>200%</u>	<u>400%</u>
LXFL 529/18N14: 171.1 mm ³	3.8	9.9
MAXF 401/25N11: 86.3 mm ³	4.4	9.8
CXF 280/13N7: 135.2 mm ³	4.4	9.9
MEXF 989/8N4: 73.8 mm ³	4.1	9.6

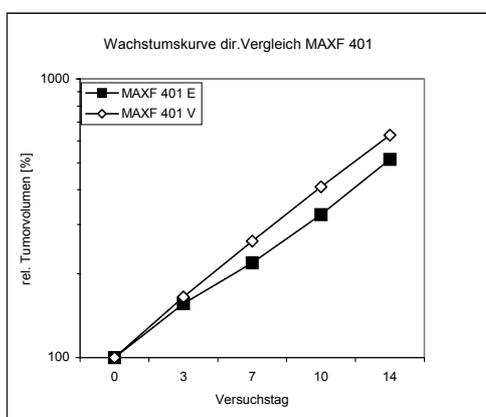
Sowohl das Liniendiagramm als auch die Verdopplungszeiten zeigten ein sehr synchrones relatives Wachstum der Xenografts. Im Vergleich mit den vorher dargestellten Wachstumsstudien (Abb. 4.2.11. und Abb. 4.2.12.) wuchsen LXFL 529 und CXF 280 langsamer.

Bei der Betrachtung des medianen Ausgangsvolumens (siehe Wachstumsdaten) und des medianen absoluten Endvolumens lagen LXFL 529 und CXF 280 mit Endvolumina von 769.8 mm³ und 751.7 mm³ deutlich vor MAXF 401 und MEXF 989 (Endvolumina 559.8 mm³ und 428.5 mm³). Dies unterstrich die Stellung des Lungenkarzinoms und des Kolontumors als schnell proliferierende Xenografts in diesem Quartett.

Im Folgenden wurden die Wachstumskinetiken der Xenografts in Einzel- und Vierfachimplantation miteinander verglichen:



E: Einzelimplantation; V: Vierfachimplantation



E: Einzelimplantation; V: Vierfachimplantation

Abb. 4.2.14.A. Ergebnis Vergleich LXFL 529 **B.** Ergebnis Vergleich MAXF 401

Wachstumsdaten direkter Vergleich:

	<u>Ausgangsvolumen (median):</u>	<u>Verdopplungszeiten (in Tagen):</u>	
		<u>200%</u>	<u>400%</u>
<u>LXFL 529/18N4:</u>			
Einzelimpl.:	143.8 mm ³	3.9	10.1
Vierfachimpl.:	171.1 mm ³	3.8	9.9
<u>MAXF 401/25N11:</u>			
Einzelimpl.:	127.8mm ³	5.8	11.6
Vierfachimpl.:	86.3mm ³	4.4	9.8

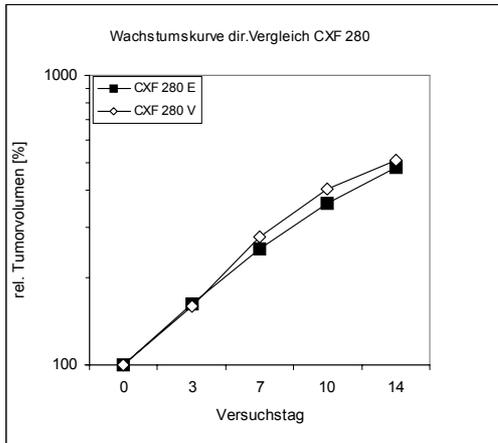
In der Einzelimplantation von LXFL 529 waren 15 der 16 implantierten Xenografts vital, was einer Angehensrate von 94% entsprach. Die Angehensrate in der Vierfachimplantation lag bei 92% (11 von 12 Tieren auswertbar). Abb. 4.2.14.A. und die Wachstumsdaten demonstrierten ein sehr synchrones Wachstum eines Xenografts in den beiden unterschiedlichen Implantationen. Der Median des Ausgangsvolumen war in der Mehrfachimplantation nur geringfügig größer und die Verdopplungszeiten wurden im Median 0.1 bzw. 0.2 Tage früher erreicht.

Die Volumenwerte der einzelnen Xenografts der unterschiedlichen Implantationsarten an Versuchstag 14 wurden mit dem U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon verglichen. Der Test ergab mit $p > 0.05$ keinen statistisch signifikanten Unterschied. Bei Betrachtung der Xenografts während des Versuch erschien deren Wachstum in den beiden verglichenen Implantationen gleichförmig.

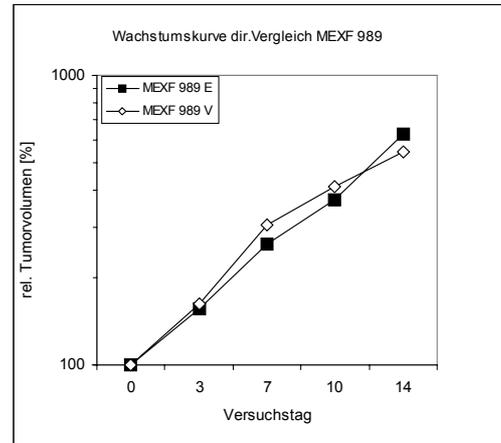
Bei MAXF 401 war das Wachstum der Xenografts in Einzel- und Vierfachimplantation etwas weniger übereinstimmend (Abb. 4.2.14.B. und Wachstumsdaten); die mediane Wachstumskurve der Mehrfachimplantation verlief über derjenigen der Einzelimplantation und die Verdopplungen wurden 1.4 (200%) und 1.8 (400%) Tage früher erreicht. Das mediane Ausgangsvolumen war in der Vierfachimplantation um 51.5 mm³ kleiner als das der Einzelimplantation. Das absolute Endvolumen unterschied sich nur minimal (Einzelimplantation: 564.5 mm³; Vierfachimplantation: 559.8 mm³)

Der U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon ergab beim Vergleich an Versuchtag 14 mit $p > 0.05$ keine statistisch signifikante Differenz und für den Untersucher waren zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der Tumorgröße zu erkennen. Die Angehensrate der Xenografts in der Einzelimplantation lag bei 81 % (13 von 16 implantierten Tumoren waren vital).

Abbildungen 4.2.14.C. und D. zeigen die Ergebnisse des direkten Vergleichs zwischen Einzel- und Vierfachimplantation bei den Xenografts CXF 280 und MEXF 989.



E: Einzelimplantation; V: Vierfachimplantation



E: Einzelimplantation; V: Vierfachimplantation

Abb. 4.2.14. C. Ergebnis Vergleich CXF 280 **D.** Ergebnis Vergleich MEXF 989

Wachstumsdaten der Xenografts beim direkten Vergleich der Implantationen:

Ausgangsvolumen (Median):

Verdopplungszeiten (in Tagen):

200%

400%

CXF 280/13N7:

Einzelimpl.:	159.4 mm ³	4.7	11.3
Vierfachimpl.:	135.2 mm ³	4.4	9.9

MEXF 989/8N4:

Einzelimpl.:	78.7 mm ³	4.7	10.4
Vierfachimpl.:	73.8 mm ³	4.1	9.6

Die Angehensrate von CXF 280 in der Einzelimplantation lag bei 87.5% und war damit etwas niedriger als die der Vierfachimplantation (92%).

Das Liniendiagramm CXF 280 E vs. CXF 280 V (Abb. 4.2.14. C) zeigt fast deckungsgleiche Kurvenverläufe, wobei die Mehrfachimplantation auf etwas höherem Niveau verlief. Dieses schnellere relative Wachstum spiegelte sich auch in den kürzeren medianen Verdopplungszeiten der Tumoren in der Vierfachimplantation wieder: die beiden Marken (200%, 400%) wurden 0.3 bzw. 1.4 Tage früher durchlaufen.

Bedingt durch das größere mediane Ausgangsvolumen in der Einzelimplantation unterschieden sich die absoluten medianen Endvolumina bei geringfügig langsamerem

relativem Wachstum gegenüber der Vierfachimplantation nur minimal: 751.7 mm^3 (Einzel) gegenüber 769.8 mm^3 (Vierfachimplantation).

Der Mann-Whitney-Wilcoxon U-Test ergab mit $p > 0.05$ an Versuchstag 14 keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den absoluten Volumina der Einzel- und Vierfachimplantation.

Die Angehensrate von MEXF 989 in der Einzelimplantation betrug 81% (Vierfachimplantation = 92%).

Abbildung 4.2.14.D. zeigt schnelleres relatives Wachstum der Xenografts im Tumorquartettmodell bis Versuchstag 10. Die Wachstumsdaten gaben dies durch schnellere Verdopplungszeiten wieder. Die Mehrfachimplantation erreichte die Verdopplungen 0.6 (200%) und 0.8 Tage (400%) früher. Zum Ende des Versuchszeitraumes nahm die Wachstumsgeschwindigkeit der Xenografts in der Einzelimplantation offensichtlich zu und das mediane relative Endvolumen lag minimal über dem der Vierfachimplantation.

Auch das mediane absolute Volumen an Versuchstag 14 war in der Einzelimplantation mit 467 mm^3 größer als das in der Vierfachimplantation (428.5 mm^3).

Der Vergleich der einzelnen Werte des absoluten Volumens zwischen Einzel- und Vierfachimplantation mittels Mann-Whitney-Wilcoxon U-Test ergab mit $p > 0.05$ keine statistisch signifikante Differenz. Für den Untersucher schienen Größe und Wachstum des Xenografts in Einzel- und Vierfachimplantation gleich zu sein.

Der direkte Vergleich des Wachstums der Xenografts in Einzel- und Vierfachimplantation ließ zusammenfassend folgenden Feststellung zu.

- > Die Xenografts in der Vierfachimplantation hatten sehr gute Angehensraten die ebenso hoch oder höher als die der Einzelimplantation waren.
- > Die Vierfachimplantationen wiesen geringfügig schnellere Verdopplungszeiten als die Einzelimplantationen auf.
- > Bei statistischer Überprüfung auf einen Wachstumsunterschied zwischen den unterschiedlichen Implantationen war bei keinem Xenograft eine statistisch signifikante Differenz feststellbar.

4.2.4. Vergleich der eigenen Wachstumsstudien mit vorherigen Studien

Die historischen Daten der unbehandelten Tumoren von Kontrollgruppen zeigen, daß auch bei der Einzelimplantation des Xenografts gewisse Schwankungen bezüglich der Induktionszeit und der Verdopplungszeiten bestehen, die durch verschiedene Faktoren hervorgerufen werden können:

a) Größe und Vitalität der implantierten Fragmente, b) Gesundheitszustand und Restimmunität der Nacktmaus, c) Transplantationsintervall (Zeitspanne zwischen Entnahme des Tumors und Implantation in den Empfänger) und d) Passagezahl des Tumors.

Aus der Datenbank des Labors Prof.Fiebig wurden je Tumor 8 – 10 Datensätze von historischen Kontrollgruppen ähnlicher Passagenummern ausgewählt. Diese Kontrollgruppen umfaßten 4-12 Versuchstiere. Es wurde der Median der Induktionszeit und der beiden Verdopplungszeiten gebildet. Weiterhin wurden die für jeden Parameter kleinsten und größten Werte dokumentiert (Min-Max Werte).

Die Tabellen 4.2.1. – 4.2.4. zeigen die Vergleiche der Wachstumsdatensätze der vier Xenografts von Tumorquartettmodell I.

Bei der Betrachtung der Mediane ergibt sich ein charakteristisches Bild des Wachstumsverhaltens des Xenografts bei dem die genannten Einflüsse weniger Gewicht haben. Bei der statistischen Auswertung der Daten der Einzel- und der Vierfachimplantationen wurde im Falle einer Normalverteilung (berechnet durch das Sigma Plot^R Programm) der (medianen) Werte der Verdopplungszeiten der Student-t-Test, ansonsten der Mann-Whitney Rank Sum Test angewandt.

Die Mediane der Induktionszeit von CXF 280 unterschieden sich bei den einzelnen Implantationsarten nur um einen Tag. Auch die Schwankungsbreite bei Einzel- und Vierfachimplantation war nahezu identisch .

Die erste Verdopplung des Tumolvolumens dauerte bei der Doppelimplantation 2.4 Tage länger, während die Xenografts der Vierfachimplantation sich 2.1 Tage schneller verdoppelten als die einzeln wachsenden Tumoren.

Die 400%- Marke wurde bei der Doppelimplantation 0.8 Tage später als bei der Einzelimplantation erreicht; die Xenografts in der Vierfachimplantation wuchsen hier 3.7 Tage schneller als die Vergleichstumoren (Tab. 4.2.1.).

Tab. 4.2.1. Wachstumsdatenvergleich für CXF 280

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzelimplantation ^a	Median	14	4.4	8.7
	Min-Max	13-17	3.2-7.0	6.4-13.7
Doppelimplantation ^b	Median	13	6.8	9.5
	Min-Max	13	2.2-6.8	5.1-10.8
Vierfach-Implantation ^c	Median	14	2.3	5.0
	Min-Max	11-17	2.1-5.2	4.1-8.4

^a: Passage 23 – 32 ; ^b: Passage 25 ; ^c: Passage 27,31,32

Insgesamt proliferiert CXF 280 in Anwesenheit von drei anderen Xenografts im Vergleich mit der Einzelimplantation offensichtlich etwas schneller auf der Nacktmaus. Bei den Vierfachimplantationen proliferierte das Xenograft in Passage 32 schneller als in Passage 27 (Tab 4.2.1. Min-Max Werte). Diese Tendenz zur größeren Wachstumsgeschwindigkeit ab einer gewissen Passagezahl liess sich auch über diverse Passagen der Einzelimplantationen beobachten.

Beim Vergleich der Werte der ersten Verdopplungszeiten ergab sich eine Normalverteilung, der Student-t-Test ergab eine signifikante Differenz der Vierfachimplantation gegenüber der Einzelimplantation ($p = 0.005$).

Die normalverteilten zweiten Verdopplungszeiten unterschieden sich ebenfalls signifikant ($p = 0.002$).

Tabelle 4.2.2. zeigt, daß die Induktionszeiten von Einzel- und Doppelimplantation bei LXFL 529 im allgemeinen identisch waren, während der Median der Vierfachimplantationen um einen Tag länger war. Dies wurde durch die etwas längere Induktionszeit von MEXF 989 bedingt (siehe Abb 4.2.11. C).

Die Mediane der ersten Verdopplungszeit unterschieden sich um 1.1 Tage wobei die Tendenz zu schnelleren Verdopplungen bei Doppel -und Vierfachimplantation ersichtlich wurde. Die Werte der Mehrfachimplantationen lagen im unteren Bereich der Variationsbreite der Einzelimplantationen.

Dieser Unterschied manifestierte sich auch bei der zweiten Verdopplungszeit: Die Mediane von Doppel- und Vierfachimplantation waren um 0.5 und 0.9 Tage kürzer als bei der

Einzelimplantation und auch die Variationsbreite lag unter der bei alleinigem Wachstum (Tab. 4.2.2.).

Innerhalb der Vierfachimplantationen nahm die Proliferationsgeschwindigkeit von Passage 9 bis Passage 14 zu.

Tab. 4.2.2. Wachstumsdatenvergleich für LXFL 529

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzelimplantation ^a	Median	13	3.8	7.6
	Min-Max	10-14	2.0-7.2	6.2-11.7
Doppelimplantation ^b	Median	13	3.7	7.1
	Min-Max	13	2.5-3.7	5.4-7.8
Vierfach-Implantation ^c	Median	14	2.7	6.7
	Min-Max	11-17	2.0-3.7	5.0-8.3

^a: Passagen 4–14 ; ^b: Passage 13 ; ^c: Passage 9,10,14

Das Wachstumsverhalten von LXFL 529 in Anwesenheit von zwei oder vier anderen Tumoren glich dem von CXF 280, indem das Xenograft etwas schneller zu proliferieren schien als bei alleinigem Wachstum auf der Nacktmaus.

Der statistische Vergleich der normalverteilten Werte der ersten Verdopplungszeit von LXFL 529 ergab mit $p = 0.181$ keinen signifikanten Unterschied.

Die zweite Verdopplungszeit lieferte beim Mann–Whitney Rank Sum Test ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p = 0.065$).

Tabelle 4.2.3. zeigt, daß für MAXF 401 beim Erreichen der geforderten Kriterien für den Versuchsbeginn (Induktionszeit) kein Unterschied zwischen den verschiedenen Implantationsarten bestand.

Bis zur Tumorvergrößerung auf 200% benötigte das Mammakarzinom in der Doppelimplantation im Median 0.7 Tage mehr und in den Vierfachimplantationen 2.3 Tage weniger als die einzeln wachsenden Tumoren. Auch die Variationsbreiten befanden sich im unteren Bereich der Verteilung der Einzelimplantationen und darunter.

Diese Wachstumskinetik setzte sich auch in der zweiten Verdopplungszeit fort, bei der die Vierfachimplantation ebenfalls die niedrigsten Werte erzielte. Die Differenz der Mediane der zweiten Verdopplungszeiten zwischen Einzel- und Mehrfachimplantationen betrug nun 3.3

Tage bei der Doppelimplantation, die jetzt auch schneller als die Einzelzumoren war, und 3.6 Tage bei der Vierfachimplantation.

Im Falle der Vierfachimplantation wurden Xenografts der Passagen 29, 19 und 20 verwendet. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei CXF 280 und LXFL 529 (Vierfachimplantation) wuchs die frühere Passage 20 schneller als die Xenografts aus Passage 29.

Wie bei den anderen Xenografts lies sich auch bei MAXF 401 die Tendenz zur schnelleren Proliferation in den Mehrfachimplantationen, vor allem in der Vierfachimplantation erkennen (Tab. 4.2.3).

Der Student- t-Test ergab bei der ersten Verdopplungszeit mit $p = 0.100$ keinen signifikanten Unterschied. Die zweite Verdopplungszeit zeigte mit $p = 0.012$ eine signifikante Differenz.

Tab. 4.2.3. Wachstumsdatenvergleich für MAXF 401

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzelimplantation ^a	Median	13.8	5.5	11.5
	Min-Max	10-20	3.0-8.9	8.1-14.8
Doppelimplantation ^b	Median	13	6.2	8.2
	Min-Max	13	2.4-6.2	6.7-11.3
Vierfach-Implantation ^c	Median	14	3.2	7.9
	Min-Max	11-17	2.7-5.2	6.2-10.6

^a: Passagen 15 – 33 ; ^b: Passage 29 ; ^c: Passage 19,20,29

Die Daten in Tabelle 4.2.4. zeigen die relativ kurze Induktionszeit von MEXF 989 bei den Mehrfachimplantationen im Vergleich zur Einzelimplantation, was im Falle des Melanoms als langsamstem Tumor des Quartetts durch das Bestreben, die Versuche bei einem nicht zu weit fortgeschrittenen Wachstum der anderen Xenografts zu beginnen, begründet war. Dies spiegelte sich auch in den relativ kleinen Ausgangsvolumina bei den meisten Studien (siehe Kap. 4.2.1.- 4.2.3.) wieder.

Die Xenografts der Doppelimplantation schienen langsamer zu wachsen als die Vergleichstumoren. Der Median der ersten Verdopplung war um 1.1 Tage höher, die 400% Marke wurde erst 4.1 Tage später erreicht. Der Range ist beim ersten Wert nahezu gleich,

während bei zwei Studien die zweite Verdopplung deutlich später erreicht wurde (17.1 und 18.3 Tage).

Tab. 4.2.4. Wachstumsdatenvergleich für MEXF 989

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzelimplantation ^a	Median	18.4	5.7	13.0
	Min-Max	11-25	3.9-8.1	7.9-14.3
Doppelimplantation ^b	Median	13	6.8	17.1
	Min-Max	13	3.7-8.9	7.5-18.3
Vierfach-Implantation ^c	Median	14	3.8	8.8
	Min-Max	11-17	2.5-5.5	7.1-13.2

^a: Passagen 16 – 25; ^b: Passage 18 ; ^c: Passage 19,20,24,25

In Gegenwart von allen drei anderen Xenografts zeigte sich ein anderes Wachstumsverhalten für MEXF 989: Beide Verdopplungszeiten lagen unter dem Median der Einzeltumoren, die entsprechenden Volumina wurden 1.9 und 4.2 Tage früher erreicht. Diese schnellere Proliferation spiegelte sich auch in dem Range beider Werte (Tab. 4.2.4). Wie bei LXFL 529 und CXF 280 wurde das zügigste Wachstum bei der höchsten Passage (25) beobachtet.

Die normalverteilten Werte der ersten Verdopplungszeit zeigte beim Student t-Test mit $p = 0.117$ keinen signifikanten Unterschied zwischen Einzel- und Vierfachimplantation.

Der Mann-Whitney Rank Sum Test ergab beim Vergleich der nicht normalverteilten zweiten Verdopplungszeiten ebenfalls keine signifikante Differenz zwischen den Implantationen ($p = 0.195$).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß alle vier Xenografts in Gegenwart der anderen Tumoren auf der selben Nacktmaus konstant proliferierten und in ihrem Wachstum nicht im Sinne einer Wachstumsverzögerung beeinflusst wurden.

4.2.5. Standardchemotherapie der Xenografts im Tumorquartettmodell

Für die Chemoresponsivitätsstudie der Xenografts des Tumorquartetts I wurden 39 weibliche Nacktmäuse mit Fragmenten der Tumoren implantiert. Die Randomisation in Kontroll- und Therapiegruppen erfolgte 17 Tage später. Es konnten 27 Mäuse in die Studie aufgenommen werden, was einer Angehensrate von 69% entspricht. Die Studie dauerte 21 Versuchstage.

Die Kontrollgruppe bestand aus 7 Nacktmäusen, die an den Versuchstagen 1, 8 und 15 jeweils mit 10 ml/kg NaCl 0.9% + Tween 80 0.05% (Verdünnungsmedium für Naturstoffstammlösung) intraperitoneal therapiert wurden.

Gruppe 2 umfaßte 5 Tiere, die an Tag 1 und 15 intravenös mit 8 mg/kg Adriamycin therapiert wurden.

Die 5 Mäuse in Versuchsgruppe 3 wurden mit Vindesin 1.5 mg/kg im Schema 1, 8, 15 intravenös therapiert.

In Gruppe 4 (5 Tiere) bestand die Therapie aus 100 mg/kg intraperitoneal appliziertem 5-Fluoruracil.

Gruppe 5 umfaßte ebenfalls 5 Tiere, die 200 mg/kg Cyclophosphamid an den Tagen 1 und 15 intraperitoneal verabreicht bekamen.

Diese Therapieschemata und Dosierungen entsprachen der historischen maximal tolerablen Dosis für den im Labor Prof. Fiebig gezüchteten NMRI-Nacktmaus-Auszuchtstamm (Fiebig et al., 1992).

Während in der Kontrollgruppe und unter CY-Therapie alle Mäuse bis zum Versuchsende überlebten, traten in den anderen Gruppen trotz unterstützender Therapie (Flüssigkeitssubstitution, Glucoseinjektionen, hochkalorische Spezialdiät) Gewichtsabnahmen und Todesfälle auf:

- Unter ADR-Therapie verstarben drei Tiere am Versuchstag 10
- Applikation von Vindesin führte zu einem Todesfall am Versuchstag 7
- drei Tiere unter 5-FU-Behandlung starben an den Versuchstagen 7, 15 und 21

Der Gewichtsmedian der einzelnen Gruppen sank zwar bis auf ein Minimum von 80% des Ausgangsgewichts (ADR Gruppe 2, VT 7) ab, unterschritt diese Marke aber nicht und steigerte sich zum Versuchsende wieder auf 87.6 %. Damit konnte der Versuch trotz der Letalitäten von zum Teil 60% der Tiere (Gruppe 2 und 4) bis Versuchstag 21 beobachtet werden.

Im Folgenden werden die Wachstumskurven der vier beteiligten Tumoren jeweils als medianes, relatives Tumolvolumen im logarithmischen Maßstab dargestellt.

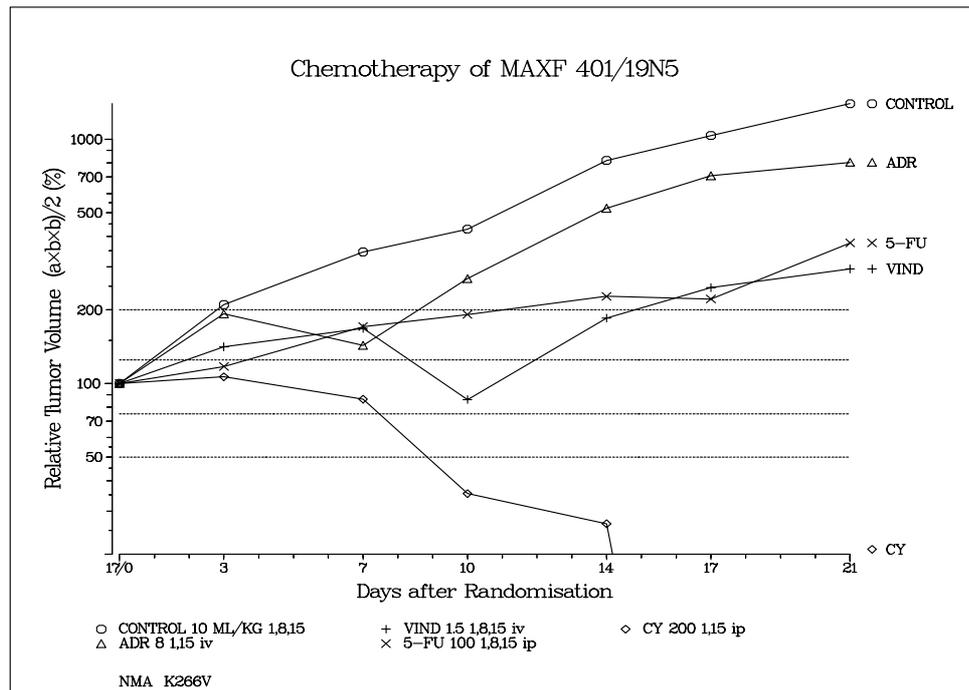


Abb. 4.2.15. Chemotherapie von MAXF 401 im Quartettmodell
ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

Im Falle des Mammakarzinoms MAXF 401 lagen die Ausgangsvolumina der einzelnen Gruppe im Median zwischen 55.2 mm^3 und 67.8 mm^3 .

Die Kontrollgruppe (Abb. 4.2.15., o) zeigte konstantes, progressives Wachstum, was die Vitalität des Tumors demonstrierte.

Unter Adriamycintherapie (Abb. 4.2.15.Δ) wurde der optimale T/C Wert nach einem kurzen Rückgang im Tumolvolumen von VT 3 bis VT 7 an Versuchstag 7 mit 41.5% erreicht. Dies entsprach in der Einteilung nach klinischen Parametern einer Progression. Nach Versuchstag 7 näherte sich die Kurve dieser Gruppe zunehmend der Kontrollgruppe an.

Versuchsgruppe 3 (Vindesin, Abb. 4.2.15., +) zeigte die größte Tumorchemmung an Versuchstag 10 mit einem T/C von 20.1%. Zuvor war ein leichte Regression des Tumors zu beobachten gewesen. Auch hier lag bei Betrachtung der gesamten Versuchsdauer nach klinischen Parametern eine Progression vor. Der Tumor blieb aber auch im weiteren Verlauf des Versuchs deutlich hinter der Kontrollgruppe zurück und erreichte nur ein Endvolumen von 294.5% (Kontrolle 1399%, ADR 804%, 5-FU 376%).

Einen ähnlicher T/C von 21.4% wurde in Gruppe 4 durch 5-FU-Therapie (Abb. 4.2.15., x) erzielt. Dieser maximale Effekt trat aber erst an Versuchstag 17 auf, wirkte mit einem

Endvolumen von 376% weniger nachhaltig und entsprach ebenfalls einer Tumorprogression mit Wachstumsverzögerung.

Der deutlichste Effekt wurde durch Cyclophosphamidtherapie (Abb. 4.2.15, \diamond) erreicht. Die Wachstumskurve schnitt nach Versuchstag 14 die x-Achse, da der Tumor danach nicht mehr meßbar war und an Tag 21 das Endvolumen von 0% aufwies. Dies entsprach einer kompletten Remission mit dem T/C von 0%.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, daß MAXF 401 in Anwesenheit der anderen Xenografts auf die Therapie mit Standardchemotherapeutika in unterschiedlicher Art und Weise – ähnlich dem historischen Ansprechen als Einzeltumor (Fiebig et al. 1992) (siehe Kapitel 4.2.6.) - reagierte: sowohl mit weitgehend unbeeinflusstem Wachstum (ADR) als auch mit einer kompletten Remission (CY).

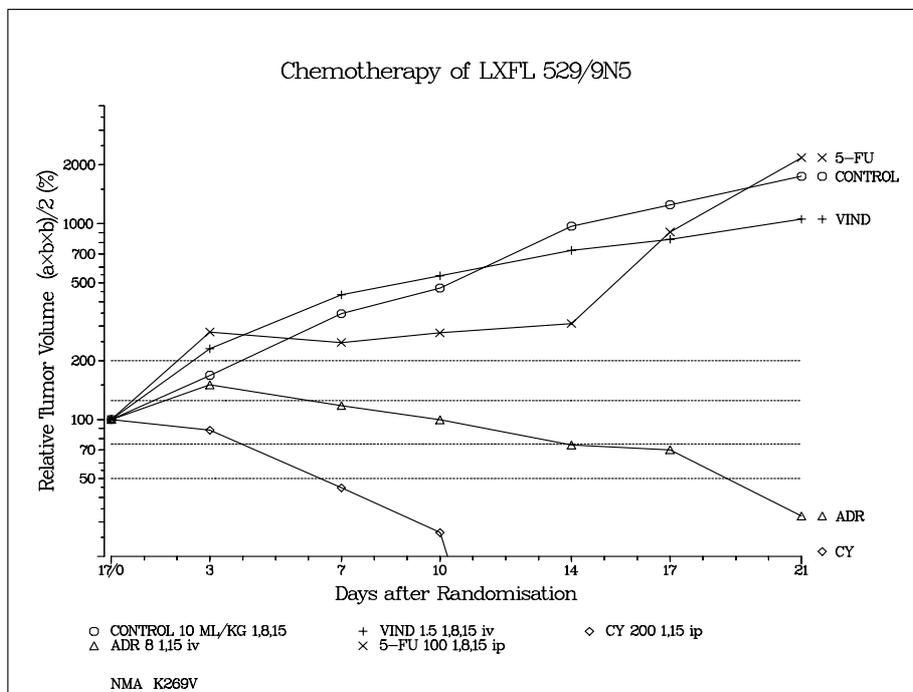


Abb. 4.2.16. Chemotherapie von LXFL 529 im Quartett
 ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

Die Auswertung der Daten für LXFL 529 im Quartett zeigten, daß die Ausgangsvolumina zwischen 47.6 mm³ (Gruppe 5) und 118.6 mm³ (Gruppe 2) lagen.

Die mit dem Kontrollvehikel behandelten Tumoren zeigten logarithmisches Wachstum (Abb. 4.2.16, o).

Die Adriamycintherapie von Gruppe 2 resultierte in einer konstanten Abnahme des Tumolvolumens ab Versuchstag 3. Der optimale T/C wurde erst gegen Ende des Versuchs an

Versuchstag 21 mit 1.8% erreicht, was bei einem Endvolumen von 32.2% des Ausgangsvolumens einer partiellen Remission entsprach (Abb. 4.2.16, Δ).

Vindesin zeigte seine maximale Wirkung erst an Versuchstag 21 mit einem T/C von 60.4%.

Die Kurve verlief in der ersten Versuchshälfte über der der Kontrollgruppe (Abb. 4.2.16., +).

Die klinische Einteilung entsprach einer Progression (Aktivitätsbewertung: negativ).

Die Therapie mit 5-Fluoruracil führte von Versuchstag 3 bis 14 zu einem stagnierenden Wachstum des Tumors, der optimale Effekt lag somit am Versuchstag 14 bei einem T/C von 31.8% (Abb. 4.2.16., x). Gegen Ende des Versuchs nahm das Wachstum stark zu und übertraf an Tag 21 die Kontrolle mit einem Volumen von 2172% (Kontrolle 1745%). Klinisch entsprach diese kurze Wachstumshemmung einer Progression.

Auch bei diesem Xenograft wurde der größte Effekt durch Cyclophosphamidtherapie erzielt.

Bereits an Versuchstag 14 war der Tumor nicht mehr meßbar (Abb. 4.2.16., \diamond), was einer kompletten Remission mit einem T/C von 0% entsprach.

Innerhalb des Tumorquartetts demonstrierte LXFL 529 mit diesen Resultaten, ähnlich wie als Einzeltumor (siehe historische Daten Kapitel 4.2.6 (Fiebig et al., 1992)), die unterschiedlichsten Reaktionsmöglichkeiten auf eine antineoplastische Therapie: von Unwirksamkeit (VIND) bis hin zur kompletten Remission (CY).

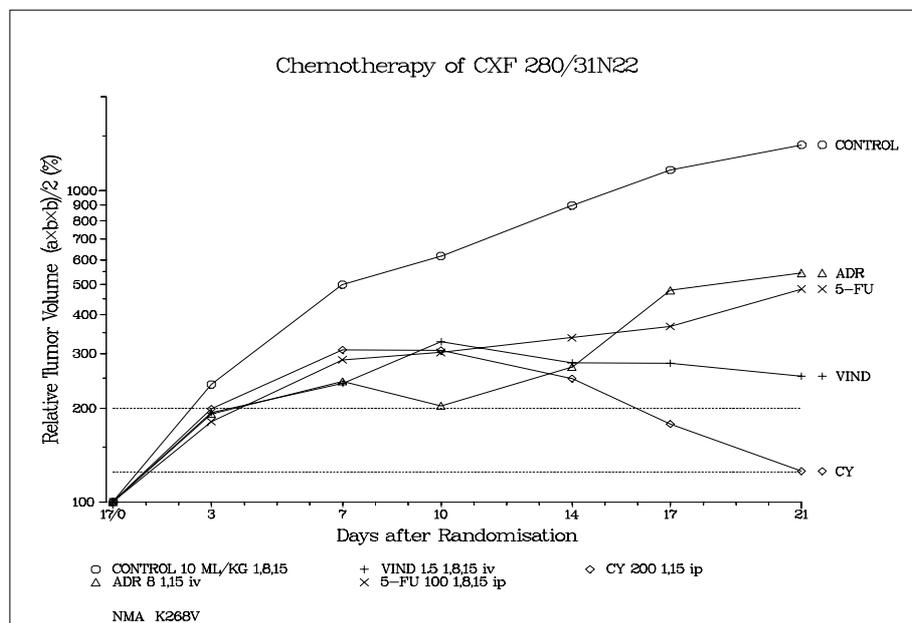


Abb. 4.2.17. Chemotherapie von CXF 280 im Quartettmodell
 ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

Im Falle des Colonkarzinoms CXF 280 waren die Tumoren zum Zeitpunkt der Randomisierung schon deutlich etabliert. Die medianen Ausgangsvolumina der einzelnen Gruppen lagen zwischen 176.7 mm^3 (Gruppe 5) und 360.1 mm^3 (Gruppe 2).

Die Adriamycintherapie resultierte in einer deutlichen Wachstumshemmung von Versuchstag 3 bis 14 mit einem optimalen T/C von 30.3% an Versuchstag 14

(Abb. 4.2.17.△). Der Effekt der zweiten ADR Gabe an VT 15 war weniger deutlich und führte nur zu einem leichtem Abflachen der Kurve bis zum Versuchsende mit einem relativen Endvolumen von 544.4%, was klinisch einer Tumorprogression entsprach.

Ein ähnlicher T/C von 31.4% wurde mit 5-FU Therapie erzielt. Ab der zweiten Applikation an Versuchstag 8 flachte die Kurve deutlich ab und wurde erst nach Therapieende wieder steiler (Abb. 4.2.17., x). Mit einem relativen Endvolumen von 483.3% lag auch hier eine Tumorprogression vor.

Die Vindesintherapie wirkte nachhaltiger als 5-FU und ADR. Ab Versuchstag 10 nahm das Tumolvolumen bis zum Versuchsende konstant ab und erreichte an VT 21 den optimalen T/C von 18.1% (Abb. 4.2.17., +). Da bei Versuchsende das Tumolvolumen 253.4% betrug, lag auch hier klinisch eine Progression vor.

Den größten antineoplastischen Effekt hatte die Cyclophosphamidtherapie: Ab VT 7 wurde das Tumolvolumen konstant kleiner und erreichte an VT 21 mit 125.6% fast das Ausgangsvolumen (Abb. 4.2.17.,◇). Die optimalen T/C-Werte betragen 9.0%. Nach der hier verwandten klinischen Einteilung lag (bis zum Versuchsende) eine Progression vor.

Insgesamt zeigte sich CXF 280 auch im Quartett als sehr chemosensibles Tumormodell. Auch hier ließen sich durch die verschiedenen Standardchemotherapeutika unterschiedliche Kurvenverläufe herausarbeiten (siehe Abb. 4.2.17.).

Wie die anderen Xenografts reagierte MEXF 989 am deutlichsten auf Cyclophosphamid: Der Tumor war lediglich bis VT 10 meßbar, die Kurve in Abb. 4.2.18 (◇) schnitt nach VT 10 die x-Achse, was klinisch einer kompletten Remission mit einem T/C von 0% entsprach.

Die Ausgangsvolumina variierten zwischen 46.7 mm^3 (Gruppe 2) und 58.5 mm^3 (Gruppe 1 und 5).

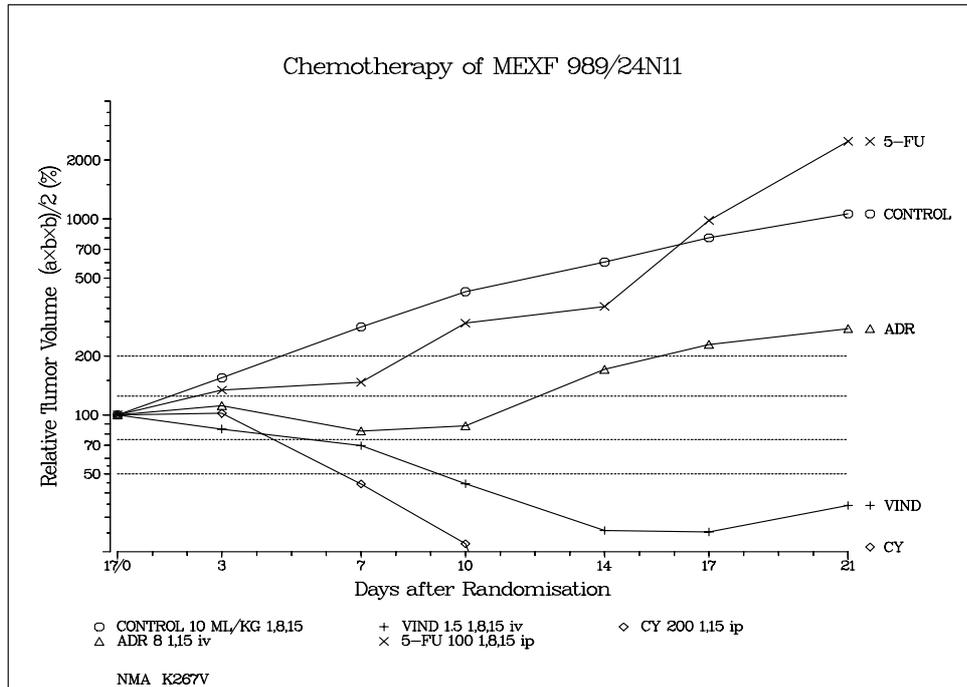


Abb 4.2.18. Chemotherapie von MEXF 989 in Quartettmodell
ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

Die Kontrollgruppe zeigte stetes, logarithmisches Wachstum und erreichte ein relatives Endvolumen von 1063% (Abb. 4.2.18., o).

Die dreimalige Applikation von 5-FU resultierte nur in einer geringen Wachstumshemmung von Versuchstag 0 bis 14 mit einem optimalen T/C von 52.2% am Tag 7. Ab VT 17 verlief die Wachstumskurve über der Kontrolle (Abb. 4.2.18., x): Klinisch entsprach dieser Behandlungserfolg einer Progression bei einer negativen Aktivitätsbewertung (siehe Kap. 3.11.2.).

Die Adriamycintherapie zeigte die deutlichste Wirkung bis Tag 10 (bis zu diesem Zeitpunkt eine partielle Remission) mit einem optimalen T/C von 20.7%. Im weiteren Verlauf nahm der Tumor wieder ein schnelleres Wachstum auf und erreichte ein Endvolumen von 275.8% (Abb. 4.2.18., Δ).

Zu einer nachhaltigen Wachstumsverzögerung und einer partiellen Remission kam es unter Vindesintherapie. Das mediane Volumen der Xenografts nahm bis VT 17 ab und wuchs erst nach Therapieende wieder langsam an (Abb. 4.2.18., ◇). Der optimale T/C wurde somit am Versuchstag 17 mit 3.2% erreicht.

MEXF 989 demonstrierte in dieser Studie die gesamte Bandbreite der Reaktionsmöglichkeiten auf Chemotherapie: von weitgehender Resistenz (5-FU) bis hin zur kompletten Remission (CY) (siehe Abb. 4.2.18.).

4.2.6. Vergleich der Chemosensitivität

Um zu untersuchen, inwieweit durch die Anwesenheit von jeweils drei anderen Tumoren auf derselben Nacktmaus die Reaktion der Xenografts auf Therapie mit Standardchemotherapeutika beeinflusst werden kann, wurden die im Quartettmodell erzielten Ergebnisse der vier antineoplastisch wirksamen Substanzen Adriamycin, 5-FU, Cyclophosphamid und Vindesin mit deren bereits bekannten Wirksamkeitsdaten aus Einzelimplantationen verglichen.

Als Vergleichswerte dienten die optimalen T/C Werte sowie die Einstufung im Aktivitätsbewertungssystem (Erklärung der Begriffe siehe Kapitel 3.11.2.).

Tab. 4.2.5. Chemosensitivitätsvergleich Tumorquartett I

Tumor	Standard-chemo-thera-peutikum	Einzelimplantation		Vierfachimplantation	
		Aktivitäts-bewertung	T/C ^e	Aktivitäts-bewertung	T/C ^e
MAXF 401	ADR ^a	+	37%	+	41.5%
	5-FU ^b	+	47.8%	+	21.4%
	CY ^c	+++	1.9%	+++	0%
	VIND ^d	+	36.8%	++	20.1%
LXFL 529	ADR	+++	2%	+++	1.8%
	5-FU	+	37.7%	+	31.8%
	CY	+++	1.0%	+++	0%
	VIND	-	71.7%	-	60.4%
CXF 280	ADR	+	26%	+	30.3%
	5-FU	+	25.9%	+	31.4%
	CY	+++	2%	++	9.0%
	VIND	+	35%	+	18.1%
MEXF 989	ADR	+	28.8%	++	20.7%
	5-FU	-	79.8%	-	52.2%
	CY	+++	1.7%	+++	0%
	VIND	+++	0.8%	+++	3.2%

^a: Adriamycin; ^b: 5-Fluoruracil; ^c: Cyclophosphamid; ^d: Vindesin ^e: optimaler Wert Test/Control;

Tabelle 4.2.5. stellt die Wirksamkeitsdaten der vier Standardsubstanzen auf die vier Xenografts in Einzel- und Vierfachimplantation einander gegenüber.

Beim Vergleich aller vier Tumoren und der Ergebnisse aller vier Testsubstanzen ließen sich folgende Übereinstimmungen feststellen:

- Ergebnisse innerhalb derselben 50% T/C und Beurteilung
aktiv (+ - +++) oder inaktiv (-): **16 / 16** (= 100%)
- Ergebnisse innerhalb 20% T/C: **14 / 16** (= 87.5%)
- Ergebnisse innerhalb 10% T/C: **11 / 16** (= 69%)

Bei der Betrachtung der einzelnen Xenografts zeigte sich LXFL 529 als das Modell mit der größten Übereinstimmung: drei von vier Ergebnissen lagen innerhalb derselben 10% T/C, der vierte Wert befand sich im Bereich von 20% T/C und wies nur die maximale Abweichung von 11.3% T/C auf.

Nur unwesentlich ungenauer fiel die Übereinstimmung bei CXF 280 aus: Es lagen ebenfalls drei der Werte innerhalb 10% während der vierte Wert mit 16,9% Unterschied sich noch innerhalb von 20% befand.

Während bei MEXF 989 drei Werte innerhalb 10% T/C lagen, war der vierte Wert mit einer Differenz von 27.6% nur noch innerhalb derselben 50%T/C zu finden.

Die größten Differenzen wies MAXF 401 auf: Nur zwei Ergebnisse lagen innerhalb 10% T/C, der dritte zeigte eine Übereinstimmung von 20%, während ein Wert nur innerhalb von 50% mit einer maximalen Abweichung von 26.4% lag.

Im Substanzvergleich zeigten Adriamycin und Cyclophosphamid mit jeweils vier Ergebnissen innerhalb derselben 10% T/C als Wirkstoffe die größte Übereinstimmung zwischen Einzel- und Vierfachimplantation. Die größten Abweichungen wurden bei jeweils zwei Tumoren unter 5-Fluoruracil (MAXF 401 und MEXF 989) und unter Vindesin (LXFL 529 und CXF 280) erzielt. Die Abweichungen bei Vindesin waren mit weniger als 20% Differenz dennoch sehr gering. Auch die Differenzen in den Ergebnissen der 5-FU-Testung führten nicht zu einer falschen Beurteilung der antineoplastischen Aktivität.

Insgesamt fiel der Vergleich der Chemosensitivität gegenüber vier Standardchemotherapeutika mit jeweils unterschiedlichem Wirkmechanismus und Pharmakokinetik sehr positiv im Hinblick auf das Kriterium „gleiche Responsivität“ im Quartett aus. Insbesondere die 100%ige Übereinstimmung bezüglich der antineoplastischen Aktivität einer Substanz spricht für die Tauglichkeit des 4-fach Modells für die Substanztestung.

4.2.7. Histologischer Vergleich

Zur Überprüfung der Erhaltung von histologischen und zytologischen Besonderheiten der einzelnen Xenografts von Quartett I nach dem Wachstum in Anwesenheit von drei anderen Tumoren wurden die HE-gefärbten histologischen Präparate der vier Xenografts des Quartetts anhand charakteristischer Kriterien (siehe Tab. 3.1) mit dem jeweiligen HE-gefärbten Schnitt eines einzeln auf der Nacktmaus gewachsenen Tumors ähnlicher Passage verglichen.

Als morphologische Kriterien dienten Charakteristika, die beim ursprünglichen Patientenresektat beschrieben worden waren und in dem Vergleichspräparat, einem Implantationstumor aus einer unbehandelten Einzelimplantation, wiedergefunden werden konnten (siehe Tab. 4.2.7.1.- 4.2.7.4.).

Es wurden in erster Linie Areale vitalen Tumorgewebes in der Nähe der Tumorkapsel, die durch eine ausreichende Gefäßdichte gut mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt schienen, miteinander verglichen.

Die bei jedem Xenograft ab einem gewissen Volumen auftretende zentrale Nekrose wurde nicht bewertet. Das quantitative Vorkommen vitalen Tumorgewebes konnte anhand der HE Schnitte nur grob geschätzt werden.

4.2.7.1. Histologischer Vergleich MAXF 401

<p>Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten): Lungenmetastase eines mäßig bis hochdifferenzierten Adenokarzinoms der Mamma</p>
<p>Histologische Charakteristika des Xenografts:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Gewebearchitektur mit adenoiden Tumorzellen auf papillärem, trabekelartigem Stroma 2. relativ viele erythrozytengefüllte Gefäße 3. Gewebzwischenräume („Drüsenlumina“) teilweise mit amorphem Inhalt und Zelltrümmern gefüllt 4. zylindrische Zellen mit teilweise hyperchromatischen Kernen bilden ein-bis mehrreihiges Drüsenepithel 5. große, teils ovale, teils rundliche, meist basalständige Zellkerne mit prominenten Nukleoli, lumennahe Mitosefiguren

Tab. 4.2.7.1. Vergleichskriterien der histologischen Untersuchung von MAXF 401

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 22N8)

- Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 29N15)
- Lokalisationskonstellationen 1-4 (Passage 22N8)
- Wachstumsstudie (Passage 29N15)
- Standardchemotherapieversuch (Passage 19N5)
- Naturstoffversuch (Passage 20N6)

In allen untersuchten histologischen Schnitten aus dem Quartettmodell waren die beim

Ursprungsresektat und dem Vergleichsschnitt (Abb. 4.2.19.) auffindbaren histopathologischen Merkmale vorhanden. Die in die Photographien eingefügten Ziffern entsprechen den Merkmalen in Tab. 4.2.7.1.

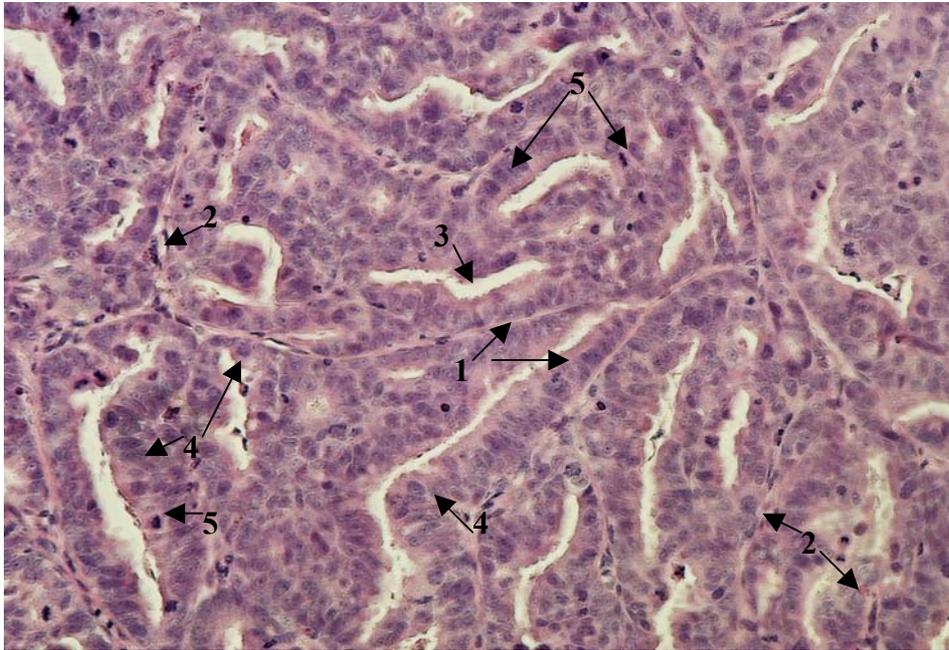


Abb. 4.2.19. HE-gefärbtes histologisches Präparat von MAXF 401 aus einer Einzelimplantation (Objektvergrößerung 20 x).
1-5 siehe Tab.4.2.7.1.

Abbildung 4.2.19. zeigt die 200fache Vergrößerung eines HE-gefärbten Präparates von einem einzeln auf der Nacktmaus gewachsenen Tumor. Die zweite photographische Abbildung (Abb. 4.2.20.), zeigt den Anschnitt eines Xenografts aus dem Tumorquartettmodell (Kontrollgruppe des Standardchemotherapieversuchs).

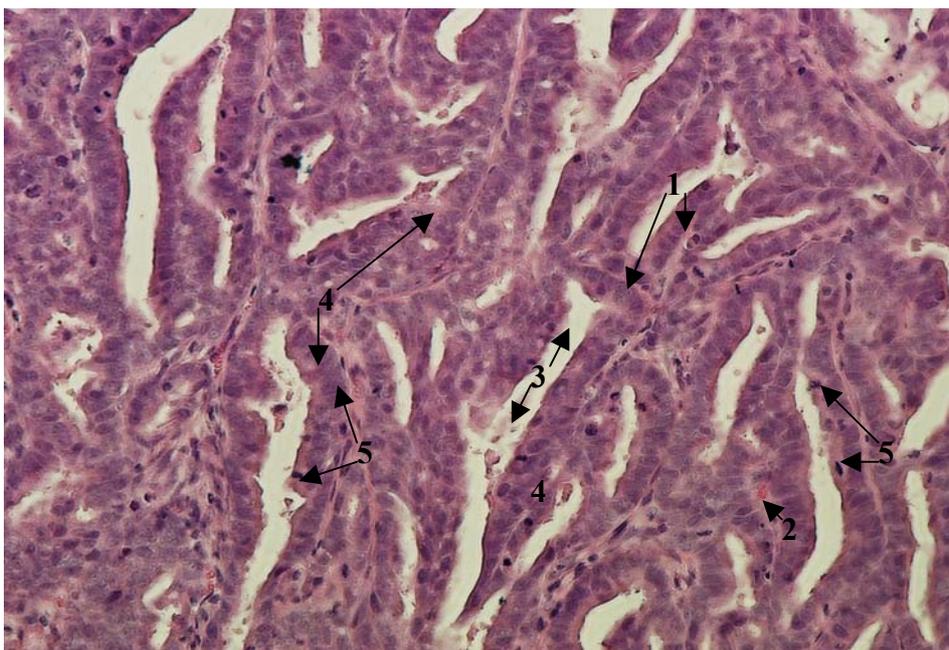


Abb.4.2.20. HE-Schnitt MAXF 401 aus einer Vierfachimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-5 siehe Tab.4.2.7.1.

Insbesondere die sehr charakteristische Gewebestruktur dieses relativ hochdifferenzierten Mammakarzinoms (Tab. 4.2.7.1. Punkt 1.-3.) war in jedem der zehn Schnitte der Mehrfachimplantationen, die hier durch Abb. 4.2.20 repräsentativ dargestellt sind, sehr gut zu erkennen.

Die zytologischen Merkmale (Tab. 4.2.7.1. 4. und 5.) waren in allen Xenografts (Abb. 4.2.20.) der Mehrfachimplantationen charakteristisch ausgeprägt.

Im Randbereich der Schnitte (Tumorkapsel) war in jedem Präparat eine Zone vitalen Tumorgewebes zu sehen, die in ihrer Breite ungefähr dem Vergleichsschnitt entsprach.

Auf beiden Photographien sind nur relativ wenige und kleine erythrozytengefüllte Gefäße zu erkennen.

Die im HE-Schnitt qualitativ beurteilbaren Kriterien deuteten auf eine unveränderte mikroskopische Morphologie von MAXF 401 in den Mehrfachimplantationen im Vergleich mit der Histologie von MAXF 401 in der Einzelimplantation hin.

4.2.7.2. Histologischer Vergleich LXFL 529

Tabelle 4.2.7.2. listet die histologischen und zytologischen Kriterien für den Vergleich des mikroskopischen Bild des großzelligen Lungenkarzinoms in Einzel- und Vierfachimplantation auf.

Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten):

Großzelliges undifferenziertes Karzinom der Lunge (Primärtumor)

Histologische Charakteristika des Xenografts:
--

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. großleibige, polygonale Tumorzellen, Zytoplasma teilweise vakuolisiert2. Kerne mit Kernwandhyperchromasie und großen, häufig multiplen Nukleoli3. Interzellularräume mit hyalinen, eosinophilen Massen und Erythrozyten gefüllt4. atypische Mitosen5. ein- und mehrkernige Riesenzellen |
|--|

Tab. 4.2.7.2. Vergleichskriterien der histologischen Untersuchung von LXFL 529

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 12N8)

- Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 13N9)
- Lokalisationskonstellationen 1-4 (Passage 14N10)
- Wachstumsstudie (14N10)
- Standardchemotherapieversuch (9N5)
- Naturstoffversuch (10N6)

Bei LXFL 529 bezogen sich aufgrund des Fehlens einer deutlichen Gewebearchitektur die histologischen Vergleichskriterien hauptsächlich auf die Zytologie. Lediglich die teilweise breiten, mit Erythrozytendetritus und intakten roten Blutkörperchen gefüllten Interzellularräume (Tab. 4.2.7.2. Punkt 3.) und die meist leeren Gefäßlumina waren als Gewebemerkmale jeweils in Einzelimplantation (Abb. 4.2.21.) und im Tumorquartettmodell (Abb. 4.2.22.) gut ausgeprägt.

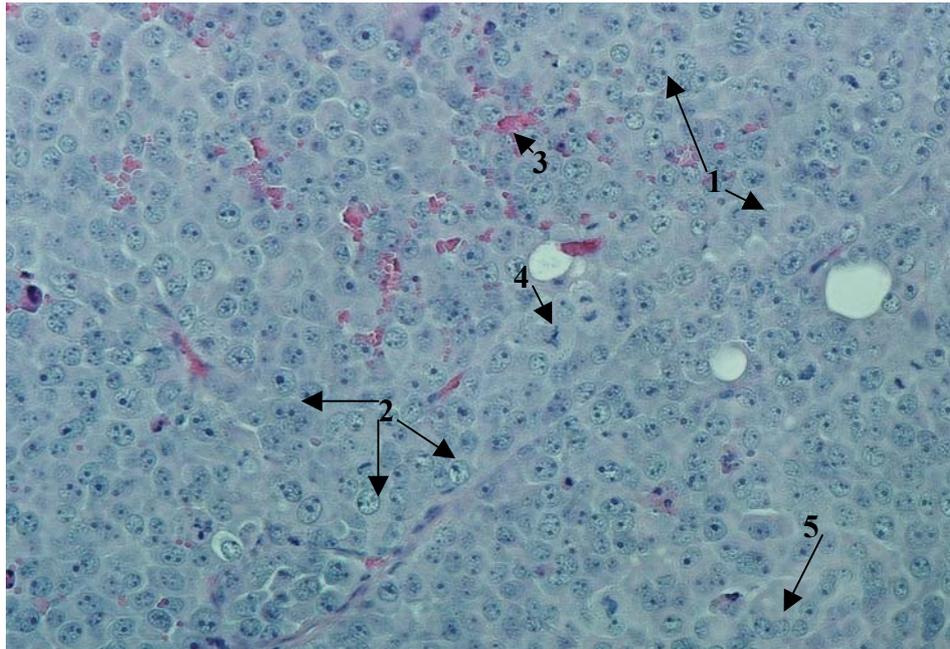


Abb. 4.2.21. HE-gefärbtes histologisches Präparat von LXFL 529 aus der Einzelimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-5 siehe Tab.4.2.7.2.

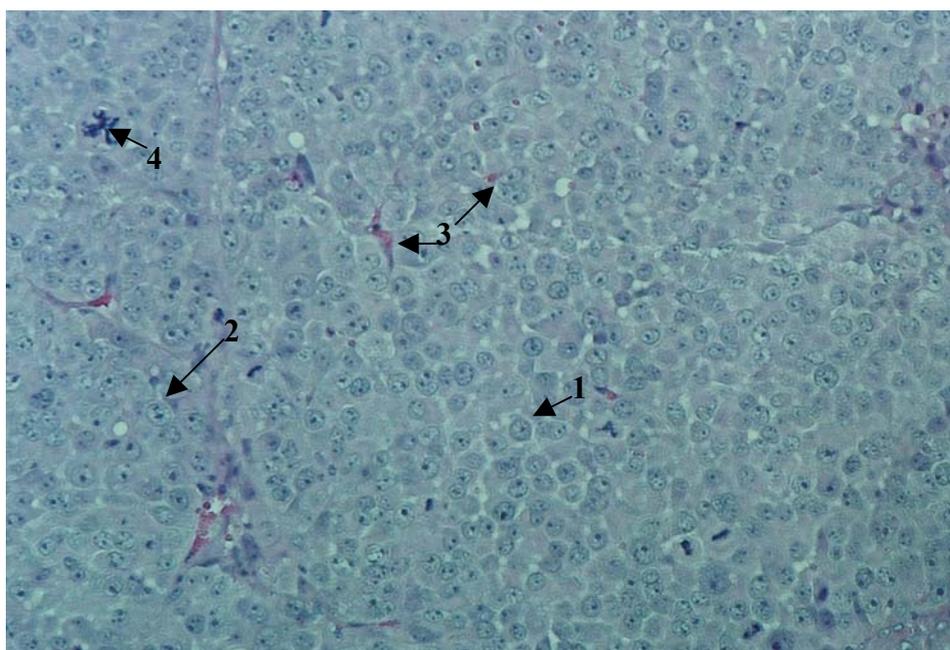


Abb. 4.2.22. HE-gefärbter Schnitt von LXFL 529 aus einer Vierfachimplantation (Wachstumsstudie), Objektvergrößerung 20 x)

1-5 siehe Tab. 4.2.7.2.

Die in die Abbildungen eingefügten Ziffern entsprechen den Merkmalen in Tab. 4.2.7.2.

Die Tumorzellen wurden bei allen Präparaten in den vitalen Zonen mit ihren typischen Merkmalen (Tab. 4.2.7.2. 1. und 2.) gefunden.

Ein- und mehrkernige Riesenzellen konnten ebenfalls in allen Schnitten im Rahmen der mikroskopischen Untersuchung bei 400-facher Vergrößerung differenziert werden. Die mit einem 20er Objektiv aufgenommenen Photographien der HE- Schnitte (Abb. 4.2.21. und 4.2.22.) lassen die Zellgrenzen zum großen Teil nicht deutlich genug hervortreten, um Riesenzellen eindeutig differenzieren zu können.

Mitosen waren in sämtlichen Schnitten zu erkennen. Bezüglich der Atypie konnte nicht in allen Fällen eine klare Aussage gemacht werden. Die beiden Abbildungen (Abb. 4.2.21. und Abb. 4.2.22.) zeigen mehrere meist stern- oder y- förmige atypische Mitoseformen. Riesenzellen und atypische Mitosen konnten allerdings photographisch nicht auf derselben Aufnahme festgehalten werden.

Unter Berücksichtigung der normalen, durch das Tumolvolumen bedingten Unterschiede in Ausmaß und Verteilung der zentralen Nekrose sowie des von der Maus stammenden Tumorstromas stellte sich LXFL 529 in allen Präparaten des Tumorquartettmodells gegenüber der Einzelimplantation unverändert dar.

4.2.7.3. Histologischer Vergleich CXF 280

In Tabelle 4.2.7.3. werden die angewandten Kriterien für den histologischen Vergleich des Colonkarzinoms aufgelistet.

Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten): Hautmetastase eines undifferenzierten Adenokarzinoms des <i>Colon ascendens</i>
Histologische Charakteristika des Xenografts: 1. undeutliche Gewebestruktur: viele Kapillaren zwischen Tumorzellansammlungen, die von schmalen Streifen bindegewebigen, fibroblastenhaltigen Stromas unterteilt werden 2. Zell- und Kernpolymorphie; die Mehrzahl der Tumorzellen hat polygonale Form mit großem zentralem Zellkern 3. Zellkerne zeigen teilweise Kernwandhyperchromasie und deutlich ausgeprägte Nukleoli 4. viele Mitosefiguren

Tab. 4.2.7.3. Vergleichskriterien für die histologische Untersuchung von CXF 280

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 29N20)

- Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 25N16)
- Lokalisationskonstellationen 1-4 (10N4)

- Wachstumsstudie (27N17)
- Standardchemotherapieversuch (31N22)
- Naturstoffversuch (32N23)

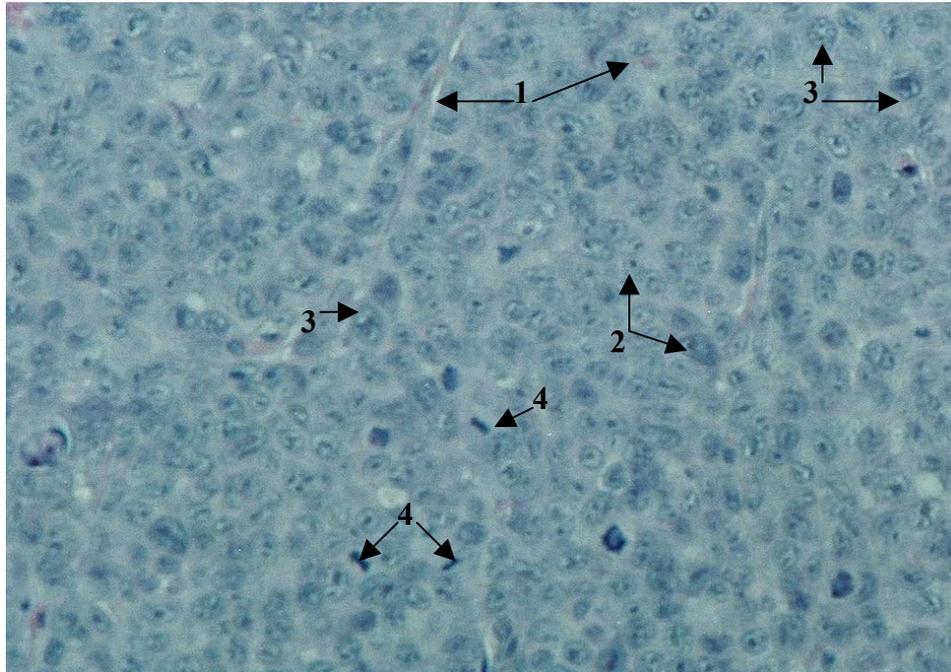


Abb. 4.2.23. HE-gefärbter Paraffinschnitt von CXF 280 aus einer Einzelimplantation, (Objektvergrößerung 20 x); 1-5 siehe Tab. 4.2.7.3.

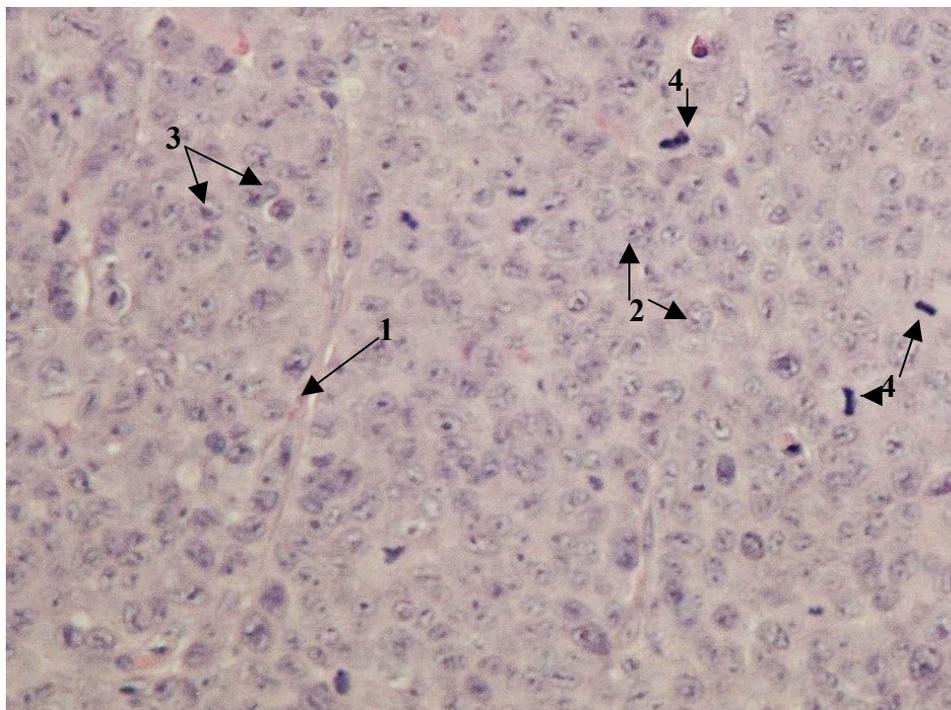


Abb. 4.2.24. HE-gefärbter Paraffinschnitt von CXF 280 aus dem Tumorquartettmodell (Kontrollgruppe Naturstoffversuch, Objektvergrößerung 20 x) 1-5 siehe Tab. 4.2.7.3.

Bezüglich der Gewebestruktur (Tab. 4.2.7.3. Punkt 1.) bestanden zwischen den einzelnen Präparaten geringe Unterschiede in der Ausprägung des (hier angeschnittenen) Stromas und den darin auffindbaren Zellen (Fibroblasten, Granulozyten, Histiozyten und Lymphozyten).

Die beiden Abbildungen (Abb. 4.2.23. und Abb. 4.2.24.) zeigen jeweils nur einen sehr schmalen Stromabereich, in dem sich vorwiegend Fibroblasten befinden.

Die Tumorzellen erfüllten in allen Präparaten die beschriebenen Kriterien (Tab. 4.2.7.3. 2. und 3.). In den vitalen Arealen waren zumeist zahlreiche Mitosen erkennbar.

Zusammenfassend erschien CXF 280 in den Mehrfachimplantationen (Abb. 4.2.24.) anhand der hier beurteilten Kriterien im Vergleich mit der Einzelimplantation (Abb. 4.2.23.) histologisch unverändert.

4.2.7.4. Histologischer Vergleich MEXF 989

Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten):

Lymphknotenmetastase eines malignen Melanoms
--

Histologische Charakteristika des Xenografts:
--

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. undeutliche Gewebestruktur
(Areale vitaler Tumorzellansammlungen neben Stroma und Nekrosen)2. viele erythrozytengefüllte Gefäße3. polygonale Zellen mit großen polymorphen Kernen und prominenten Nukleoli4. vereinzelte Mitosen5. mikrofokale Anzeichen einer melaninartigen Pigmentbildung |
|---|

Tab. 4.2.7.4. Vergleichskriterien für die histologische Untersuchung von MEXF 989

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 22N9):

- Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 18N5)
- Lokalisationskonstellationen 1-4 (26N13)
- Wachstumsstudie (20N7)
- Standardchemotherapieversuch (24N11)
- Naturstoffversuch (25N12).

Wie die anderer Xenografts des Quartetts zeigte sich auch MEXF 989 bezüglich der in Tab. 4.2.7.4. aufgeführten zytologischen Parameter (Punkt 3.) unverändert.

Je nach Schnittebene des Paraffinpräparates variierte die Verteilung von Tumorparenchym, Stroma und nekrotischen Arealen. Die in Abbildung 4.2.25. und 4.2.26. eingefügten Ziffern entsprechen den Merkmalen in Tab. 4.2.7.4.

In verschiedenen Präparaten der Mehrfachimplantationen (Beispiel: Abb.4.2.26.) waren in den vitalen Zonen nicht so viele Gefäße wie im Schnitt der Einzelimplantation zu erkennen (bzw. angeschnitten).

In jedem der Präparate war eine (teilweise sehr kleine) Zone geringer Pigmentbildung zu erkennen, die photographisch (Abb. 4.2.25. und 26.) allerdings nicht deutlich dargestellt werden konnte.

Insgesamt konnten keine bedeutenden Unterschiede zwischen dem Vergleichspräparat (Abb. 4.2.25.) und dem histologischen Bild der Xenografts aus den Mehrfachimplantationen (Abb. 4.2.26.) festgestellt werden.

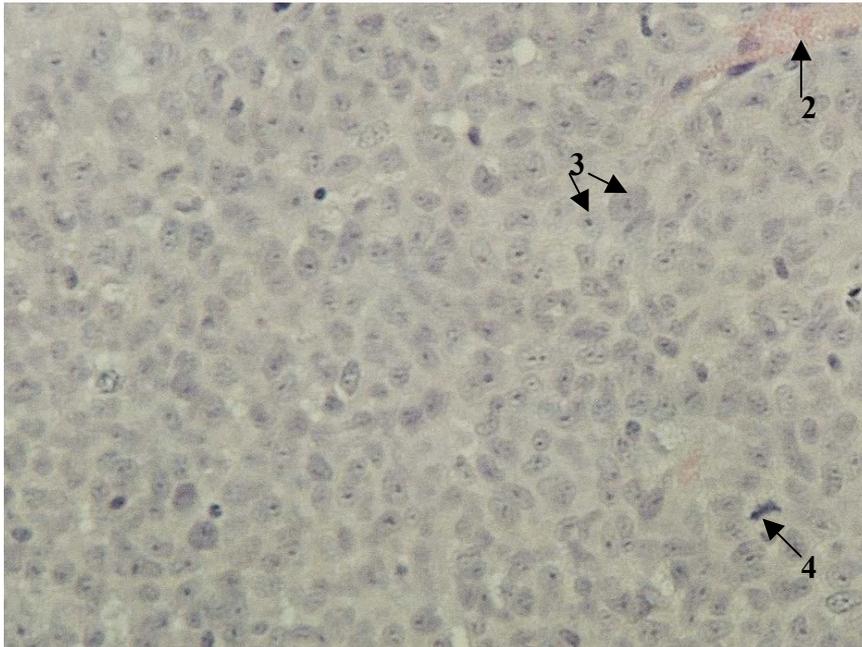


Abb. 4.2.25. HE-gefärbter Paraffinschnitt von MEXF 989 aus einer Einzelimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-5 siehe Tab.4.2.7.4.

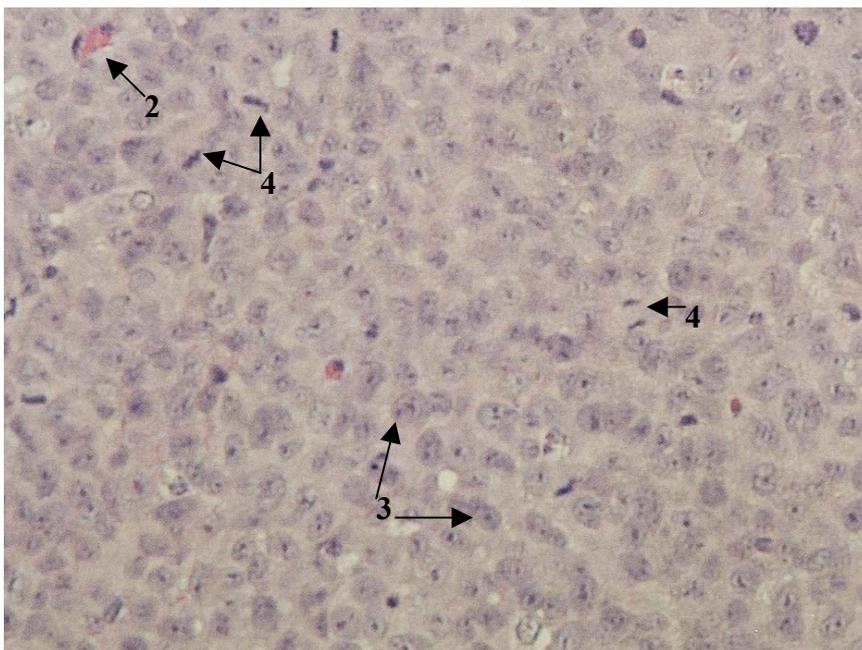


Abb. 4.2.26. HE-gefärbter Paraffinschnitt von MEXF 989 aus einer Vierfachimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-5 siehe Tab.4.2.7.4.

4.2.8. Fotografische Abbildungen der Nacktmäuse

Zur Veranschaulichung der subkutanen Tumorlokalisationen und des Wachstums der Xenografts wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Implantation Fotografien der tumortragenden Nacktmäuse aufgenommen.

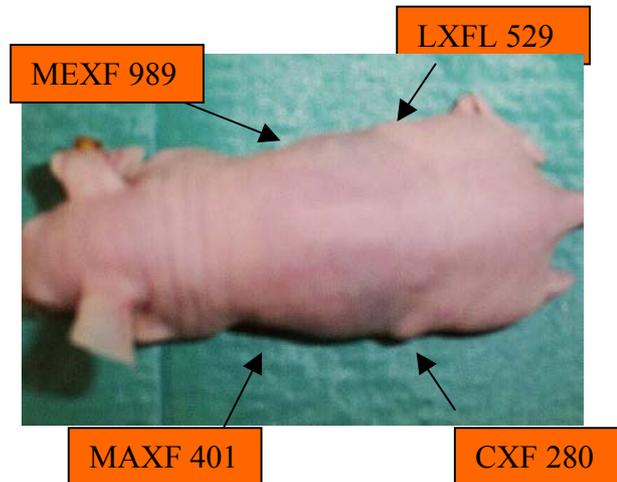


Abb. 4.2.27. Nacktmaus mit Tumorquartett I 9 Tage nach der Implantation.

Die Implantationswunden sind durch komplikationslose, primäre Wundheilung vollständig verheilt. Während LXFL 529 (HR) und CXF 280 (HL) bereits als kleine subkutane Umfangsvermehrungen erkennbar sind, kann man MAXF 401 und MEXF 989 nach 9 Tagen noch nicht erkennen.

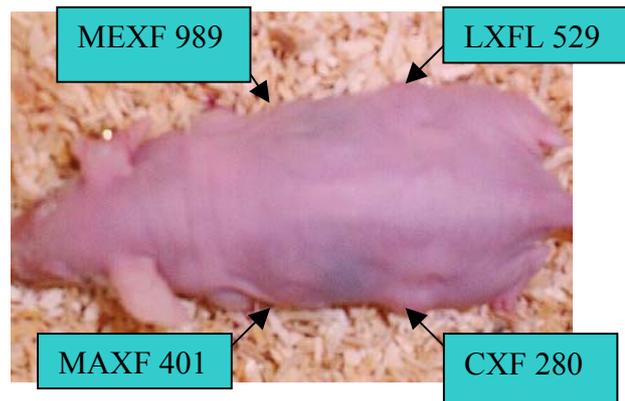


Abb. 4.2.28. Nacktmaus mit Tumorquartett I 13 Tage nach der Implantation

Vier Tage später sind auch die Xenografts in den vorderen beiden Flanken als subkutane, rosafarbene, nicht verschiebliche Gebilde erkennbar (Abb. 4.2.28.). Die beiden schnelleren Xenografts CXF 280 und LXFL 529 befinden sich in der frühen Phase des exponentiellen Wachstums und haben hier einen Durchmesser von etwa 7 mm x 6 mm (entspricht ca. 120-130 mm³), was die optimale Größe für den Versuchsbeginn darstellt.

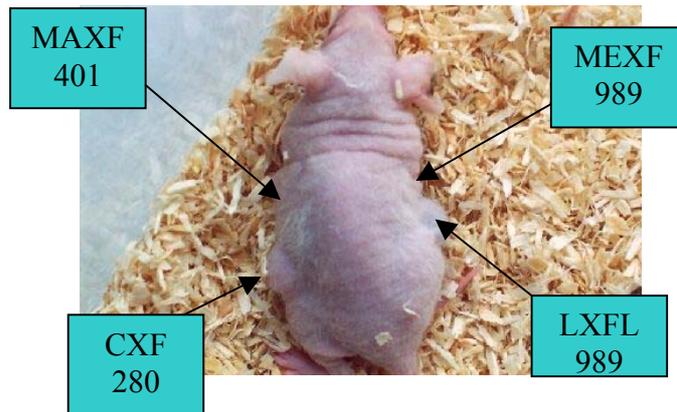


Abb. 4.2.29. Nacktmaus mit Tumorquartett I 20 Tage nach der Implantation

Eine Woche später als in Abb. 4.2.28. befinden sich alle subkutanen Xenografts in der logarithmischen Wachstumsphase (Abb. 4.2.29.). Die Tumoren sind in jeder Lokalisation deutlich als erbsen bis bohngroße Gebilde, die sich zum Teil auch durch ihre charakteristische Farbe unterscheiden lassen (LXFL 529 bläulich), zu sehen. Der größte Tumor hat hier einen maximalen Durchmesser von ca. 1 cm.

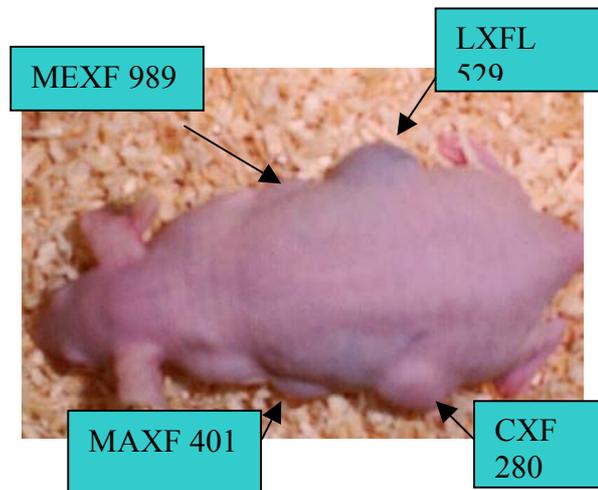


Abb. 4.2.30. Nacktmaus mit Tumorquartett I 25 Tage nach der Implantation

Hier ist die maximale erlaubte Tumorlast (siehe Abbruchkriterien im Anhang 9.3.) erreicht: LXFL 529 hat einen Durchmesser von 120 mm (Abb. 4.2.30.). Die anderen Xenografts erscheinen etwas kleiner, haben aber zu diesem Zeitpunkt ihr Volumen zweimal verdoppelt. Zu diesem Zeitpunkt werden die Versuche beendet. Der Ernährungszustand der abgebildeten Nacktmaus ist gut und sie hat ein ungestörtes Allgemeinbefinden.

4.2.9. Endbeurteilung der Etablierung des Tumorquartettmodells I

Anhand der durchgeführten Untersuchungen und der erhobenen Ergebnisse soll hier mit dem Maßstab der bereits in Kapitel 3.6. aufgeführten Kriterien abschließend beurteilt werden, ob das Tumormodell als etabliert und für die geplanten Substanztestungen geeignet erschien.

Etablierungskriterien für das Tumorquartettmodell:

1. Angehensrate aller vier Tumoren > 60%
2. kontinuierliches Wachstum der einzelnen Xenografts mit Wachstum auf 200% und 400%
3. ausreichendes Therapiezeitfenster von Ende der Induktionszeit des langsamsten Tumors
4. bis zur Beendigung des Versuchs gemäß der tierschutzrelevanten Abbruchkriterien erhaltene Chemoresponsivität gegenüber Standardchemotherapeutika
5. ursprüngliches histologisches Bild

Bei der Auswertung sämtlicher Wachstumsstudien wurden zunächst nur die ersten drei Etablierungskriterien angewandt. Das histologische Bild der hier anhand von Wachstumsparametern untersuchten Xenografts wurde in einem eigenen Abschnitt ausgewertet.

Bei den **Doppelimplantationen** wurden in allen 6 Kombinationen der vier beteiligten Xenografts die ersten drei Etablierungskriterien erfüllt. Die beobachteten Schwankungen in der Wachstumsgeschwindigkeit von MAXF 401, CXF 280 und MEXF 989 (LXFL 529 wuchs zusammen mit allen drei Tumoren absolut konstant) gaben Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Wachstumskinetik durch die Anwesenheit eines anderen Tumors auf der Nacktmaus.

Diese Beeinflussung war aber nicht stark genug, um das Erfüllen der ersten beiden Etablierungskriterien zu behindern. In den Fällen in denen eine Verlangsamung des Xenograftwachstums zu beobachten war, trat diese unabhängig von der Masse des zweiten Tumors auf.

Die vier Gruppen der **Lokalisationsstudie** erfüllten die ersten drei Etablierungskriterien.

Das Therapiezeitfenster betrug hier 17 Tage, was für die Substanztestung mit dem Therapieschema d: 0, 4, 8 oder 1, 5, 9 als ausreichend betrachtet werden konnte.

Auch hier traten Wachstumsschwankungen in den unterschiedlichen Implantationslokalisationen auf, die aber die Erfüllung der Etablierungskriterien nicht gefährdeten und keine einheitliche Tendenz der schnelleren Proliferation in einer bestimmten Lokalisation aufzeigten.

Durch Selektion der Konstellation mit dem geringsten prozentualen relativen Wachstumsunterschied (möglichst synchrones Wachstum aller vier Xenografts und damit maximales Therapiezeitfenster) wurde versucht das Tumorquartettmodell für die Testungen zu optimieren.

Die beiden eigens für die **Untersuchung des Wachstumsverhaltens** implantierten Gruppen von 10 Nacktmäusen sowie die Kontrollgruppen des Standardchemotherapieversuchs und eines Naturstoffversuchs erfüllten die Anforderungen an das Tumorquartettmodell.

Die Angehensraten lagen jeweils über 60% (60% - 80%), die GesamtAngehensrate betrug 72%.

Die Therapiezeitfenster waren 14 bis 21 Tage lang. Während 17 und 21 Tage als gut ausreichend angesehen werden konnten, ist die Nachbeobachtungszeit von 5 bzw. 6 Tagen nach der letzten Applikation der zu testenden Substanz (Therapiezeitfenster 14 Tage) relativ kurz. Für einen Schnelltest im Sinne eines Primärscreenings, bei dem zudem bei antitumoraler Wirksamkeit (und damit langsamerer Tumorprogression) länger beobachtet werden kann, war auch dieses Zeitfenster als ausreichend anzusehen.

In allen vier Gruppen wurden ein Wachstum auf ein Vierfaches des Anfangsvolumens von allen Tumoren innerhalb des Therapiezeitfensters erreicht.

Die Schwankungen in der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Xenografts in den vier Gruppen bewegten sich jeweils in Bereichen, die auch von unterschiedlichen Passagen der Xenografts bei alleinigem Wachstum auf der Maus bekannt sind.

Der **direkte Vergleich** des Wachstumsverhaltens der Xenografts in der Einzel- und Vierfachimplantation ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Volumenzunahmen im Versuchszeitraum zwischen den verschiedenen Implantationsarten.

Das Ergebnis des **Wachstumsdatenvergleichs** der vier Xenografts in den Einzel- und Mehrfachimplantationen zeigte eine moderate Beschleunigung des Wachstums aller beteiligter Tumoren bei Mehrfachimplantation. Zum Teil lief diese Beschleunigung parallel zu den steigenden Passagezahlen. Ein Hinweis auf eine negative Beeinträchtigung des Xenograftwachstums durch Mehrfachimplantation konnte hier nicht gefunden werden.

Durch diese Ergebnisse kann das Tumorquartettmodell I bezüglich der ersten drei Kriterien als etabliert angesehen werden.

Bei der **Standardchemotherapie** des Tumorquartettmodells demonstrierte jeder der vier Xenografts die Eigenschaft auf verschiedene antitumorale Wirkstoffe jeweils unterschiedlich zu reagieren: es traten Progressionen, geringe Wachstumsverzögerungen, minimale und komplette Remissionen auf.

Beim **Vergleich der Chemosensivität** der beteiligten Xenografts im Quartettmodell und der Einzelimplantation zeigte sich eine große Übereinstimmung der Ergebnisse: 100% der Werte lagen innerhalb von denselben 50% T/C (aktiv/inaktiv) 69% der Werte unterschieden sich um weniger als 10% T/C.

Drei der vier Xenografts hatten im Vergleich drei Werte innerhalb 10% T/C. MAXF 401 hatte zwar nur zwei genaue Übereinstimmungen, aber mit 26.4% nur ein geringe maximale Abweichung. Diese Ergebnisse zeigen deutlich die erhaltene Chemosensivität gegenüber antitumoral wirksamen Substanzen und erfüllen das vierte Etablierungskriterium.

Der **histologische Vergleich** der Xenografts im Quartettmodell mit dem charakteristischen mikroskopischen Bild des Tumors anhand von HE-Schnitten zeigte nur minimale Unterschiede bezüglich der histologischen und zytologischen Merkmale.

Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse waren alle fünf Kriterien erfüllt.

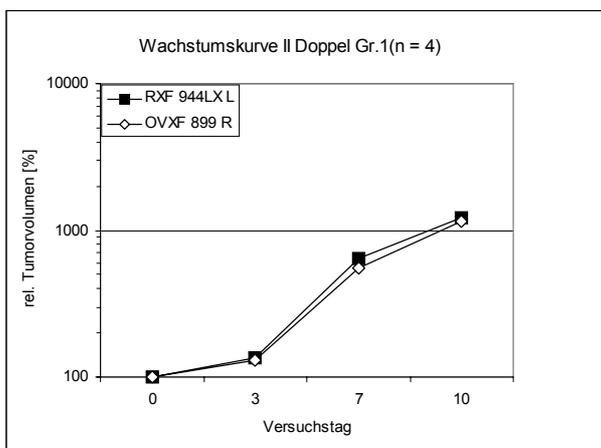
Das Tumorquartettmodell I mit den Xenografts LXFL 529, MAXF 401, CXF 280 und MEXF 989 in der beschriebenen Konstellation auf weiblichen NMRI Nacktmäusen gilt damit als etabliert.

4.3. Ergebnisse der Etablierung des Tumorquartetts II

4.3.1. Doppelimplantation

Tumorquartett II bestand aus RXF 944LX, OVXF 899, MAXF MX 1 und XF 575. Um zu überprüfen, ob die Xenografts sich gegenseitig im Wachstum beeinflussen, wurden initial alle 6 möglichen 2-fach-Kombinationen der vier Tumoren überprüft und die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

Von 24 implantierten Mäusen konnten 22 an der Studie teilnehmen. Die Induktionszeit betrug 8 Tage. Nach 10 bzw. 14 Versuchstagen mussten die Versuche abgebrochen werden, da die maximal erlaubte Tumorlast (siehe Abbruchkriterien, Anhang 9.3.) erreicht war. Die Versuchsnummern waren K108 bis K111. Das Wachstumsverhalten wird im Folgenden als relativer medianer Volumenzuwachs, bezogen auf das Ausgangsvolumen in Form von Liniendiagrammen im logarithmischen Maßstab dargestellt:



Ausgangsvolumen (Median):
 RXF 944LX/25N11: 132.0 mm³
 OVXF 899/44N19: 158.3 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
RXF 944LX/25N11:	3.5	5.1
OVXF 899/44N19:	3.7	5.5

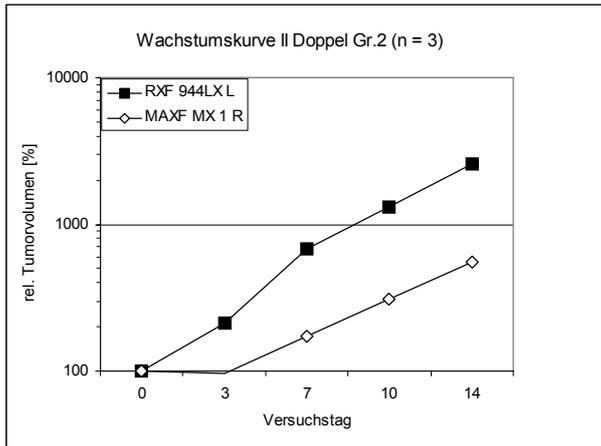
Angehensrate: 4/4 (100%)

L: linke Flanke; R: rechte Flanke

Abb. 4.3.1. Ergebnis Kombination 1

Beide Xenografts befanden sich spätestens ab Versuchstag 3 in ihrer logarithmischen Wachstumsphase. Die Wachstumskurven verliefen fast deckungsgleich (Abb. 4.3.1.). Das synchrone Wachstum beider Tumoren spiegelte sich auch in den sehr ähnlichen Ausgangsvolumina und Verdopplungszeiten wieder. Auch bei Betrachtung der Angehensrate von 100% stellten sich die Xenografts als für Testzwecke geeignetes Tumorpaar dar. Während das Nierenkarzinom die größere relative Volumenzunahme aufwies, erreichte OVXF 899 ein um 462 mm³ größeres absolutes Endvolumen.

Abb. 4.3.2. zeigt das Ergebnis der gleichzeitigen Implantation von RXF 944LX und MAXF MX 1.



Ausgangsvolumen (Median):
 RXF 944LX/25N11: 106.2 mm³
 MAXF MX 1/26N14: 82.5mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
RXF 944LX/25N11:	2.7	4.6
MAXF MX 1/26N14:	6.9	10.6

Angehensrate: 3/4 (75%)

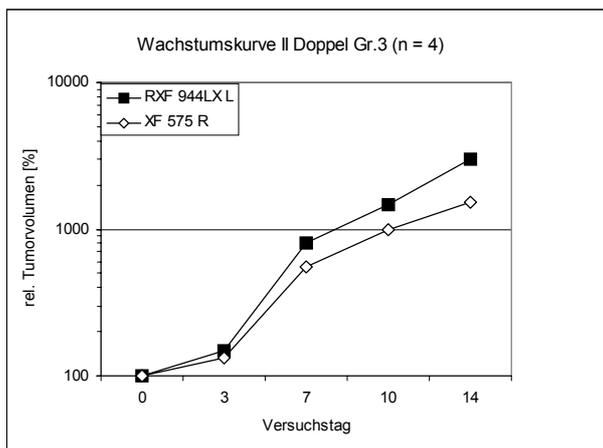
L: linke Flanke; R: rechte Flanke

Abb. 4.3.2. Ergebnis Kombination 2

RXF 944LX befand sich ab Versuchstag 0 in der exponentiellen Wachstumsphase, sein medianes Ausgangsvolumen war kleiner als in Kombination 1 (Abb. 4.3.1.). Die Verdopplungszeiten waren etwas kürzer als in Kombination 1.

MAXF MX 1 verringerte dagegen sein Volumen von VT 0 bis VT 3. Ab Versuchstag 3 befand sich auch das Mammakarzinom in seiner exponentiellen Wachstumsphase und die Kurve verlief ab hier annähernd parallel zu der Kurve von RXF 944LX. Die 400%- Marke wurde erst kurz vor Versuchsende überschritten.

Abbildung 4.3.3. zeigt das Ergebnis der gleichzeitigen Implantation von RXF 944LX und XF 575.



Ausgangsvolumen (Median):
 RXF 944LX /25N11: 71.3 mm³
 XF 575/12N8: 115.9 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
RXF 944LX/25N11:	3.3	4.7
XF 575/12N8:	3.3	4.5

Angehensrate: 4/4 (100%)

L: linke Flanke; R: rechte Flanke

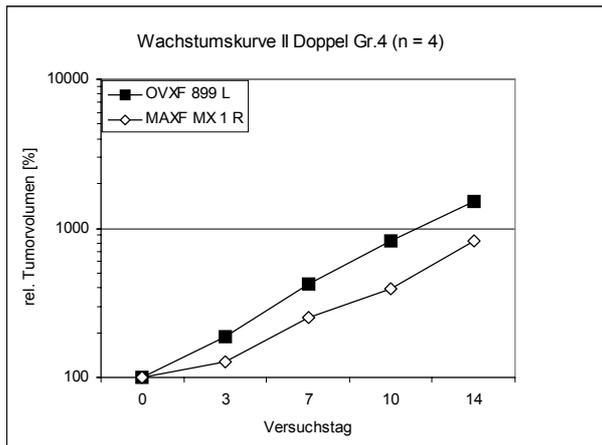
Abb. 4.3.3 Ergebnis Kombination 3

Diese Tumorkombination lieferte ein ähnliches Bild wie Kombination 1 (Abb. 4.3.1.). Auch hier schienen die Xenografts sich erst ab Versuchstag 3 in ihrer exponentiellen Wachstumsphase zu befinden (flacher Kurvenverlauf von VT 0 bis VT 3).

RXF 944LX hatte in dieser Konstellation das kleinste Ausgangsvolumen, verdoppelte dieses Volumen aber ähnlich schnell wie in Kombination 1 und 2 (siehe Abb. 4.3.1. und Abb. 4.3.2.). Das sehr synchrone Wachstum wurde neben den parallelen Kurven auch durch die

nahezu identischen Verdopplungszeiten belegt (Abb. 4.3.3.). Auch die Angehensrate von 100% sprach für ein für Substanztestungen gut geeignetes Tumorpaar.

Während RXF 944LX mit 1635% die größere relative Volumenzunahme hatte, war das absolute mediane Endvolumen von XF 575 (1147.9 mm³) um 90.7 mm³ größer (RXF 944LX: 1057.2 mm³). Abbildung 4.3.4. zeigt das Wachstumsverhalten von OVXF 899 und MAXF MX 1 bei gleichzeitiger Implantation.



Ausgangsvolumen (Median):

OVXF 899/ 44N19: 99.1 mm³

MAXF MX 1/26N14: 86.1 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
OVXF 899/44N19:	4.2	7.2
MAXF MX 1/26N14:	5.0	9.6

MAXF MX 1/26N14: 5.0 9.6

Angehensrate: 4/4 (100%)

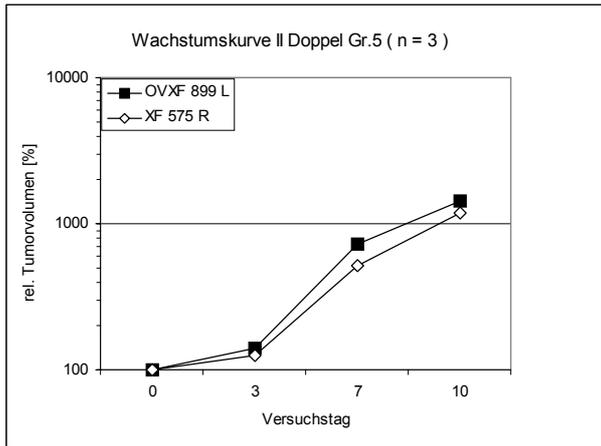
L: linke Flanke; R: rechte Flanke

Abb. 4.3.4. Ergebnis Kombination 4

OVXF 899 wuchs in dieser Kombination etwas langsamer als in Kombination 1 (Abb. 4.3.1.), befand sich aber auch hier in seiner exponentiellen Wachstumsphase. Trotz des steileren Kurvenverlaufs von Versuchstag 0 bis Versuchstag 3 benötigte das Ovarialkarzinom hier (Abb. 4.3.4.) für zwei Verdopplungen länger als in Anwesenheit von RXF 944LX.

MAXF MX 1 wuchs in dieser Kombination bereits von Versuchsbeginn an und vergrößerte spätestens ab VT 3 sein Volumen exponentiell. Die Verdopplungszeiten waren bei annähernd gleichem Ausgangsvolumen etwas kürzer als in Anwesenheit von RXF 944LX (Abb. 4.3.2.). Die zweite Volumenverdopplung fand hier vor VT 10 statt; das relative Endvolumen war mit 869.4% bedeutend größer als in Kombination 2 (Abb. 4.3.2.)(569.2%).

Das gleichzeitige Wachstum von OVXF 899 und XF 575 wird in Abb. 4.3.5. veranschaulicht.



Ausgangsvolumen (Median):
 OVXF 899/44N19: 156.8 mm³
 XF 575/12N8: 148.8 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
OVXF 899/44N19:	3.4	4.8
XF 575/12N8:	3.3	4.5

Angehensrate: 3/4 (75%)

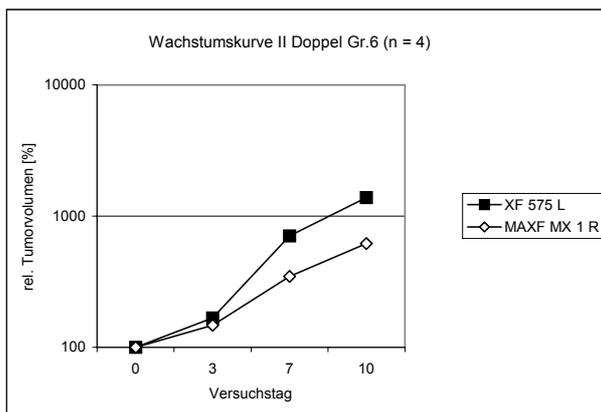
L: linke Flanke; R: rechte Flanke

Abb. 4.3.5. Ergebnis Kombination 5

Beide Xenografts wiesen hier ein relativ großes Ausgangsvolumen auf. OVXF 899 wuchs mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie in Kombination 1 (Abb. 4.3.1.) erreichte aber die 400% Marke 0.7 Tage früher (Abb. 4.3.5.).

XF 575 hatte die exakt gleichen Verdopplungszeiten wie in Kombination 3 (Abb. 4.3.3.). Die Kombination zeigte ein sehr synchrones Wachstum bei einer Angehensrate von 75%. Aufgrund des ähnlichen Ausgangsvolumens betrug der Unterschied im absoluten Endvolumen nur 343.8 mm³ zugunsten von XF 575 bei einer relativen medianen Endvolumendifferenz von 256.3% zugunsten von OVXF 899.

Abb. 4.3.6. zeigt das Ergebnis der Kombination von XF 575 und MAXF MX 1.



Ausgangsvolumen (Median):
 XF 575/12N8: 222.4 mm³
 MAXF MX 1: 106.2 mm³

Verdopplungszeit in Tagen:

	200%	400%
XF 575/12N8:	1.8	3.8
MAXF MX 1/26N14 :	3.8	6.5

Angehensrate: 4/4 (100%)

L: linke Flanke; R: rechte Flanke

Abb. 4.3.6. Ergebnis Kombination 6

XF 575 hatte in dieser Kombination ein sehr großes Ausgangsvolumen. Das Leberkarzinom wuchs in dieser Studie bedeutend schneller als in den anderen Kombinationen.

Auch MAXF MX 1 zeigte von Anfang an exponentielles Wachstum und verdoppelte sich schneller als in Anwesenheit der anderen Tumoren (Abb. 4.3.6.). Die 400%- Marke wurde hier deutlich vor Versuchsende erreicht. Das Ausgangsvolumen des Mammakarzinoms war

etwas größer als in den anderen Studien. In dieser Kombination erreichte das Mammakarzinom mit 950.8% das größte relative Endvolumen aller Gruppen. Die gute Angehensrate trug dazu bei, daß auch diese Tumorkombination alle geforderten Kriterien erfüllte.

RXF 944 LX wuchs in Anwesenheit aller anderen Xenografts konstant.

Die Abweichungen bei den Verdopplungszeiten lagen innerhalb von 0.8 Tagen (200%) bzw. 0.5 Tagen (400%).

OVXF 899 zeigte in Kombination 1 und 5 (Abb. 4.3.1. und Abb. 4.3.5.) eine vergleichbare Wachstumskinetik, während es in Anwesenheit von MAXF MX 1 etwas längere Verdopplungszeiten hatte.

Das Ausgangsvolumen in dieser Kombination (Abb. 4.3.4.) war deutlich kleiner als in den beiden anderen Gruppen: 99.1 mm³ gegenüber 158. mm³ bzw. 156.8 mm³.

XF 575 wuchs in Kombination 3 und 5 (Abb. 4.3.3. und Abb. 4.3.5.) mit ähnlicher Geschwindigkeit, während es in Kombination 6 (Abb. 4.3.6.) in Anwesenheit von MAXF MX 1 deutlich schneller proliferierte.

MAXF MX 1 war in Anwesenheit von RXF 944 LX am langsamsten und zeigte zusammen mit OVXF 899 etwas kürzere Verdopplungszeiten. In beiden Fällen war das Wachstumsverhalten für diese Passagezahl und die relativ kurze Induktionszeit charakteristisch (siehe Vergleich der Wachstumsdaten, Kapitel 4.3.4.). Das fast um den Faktor 2 schnellere Wachstum in Anwesenheit - des für seine Verhältnisse ebenfalls sehr schnell wachsenden - XF 575 stellte eine Besonderheit dar.

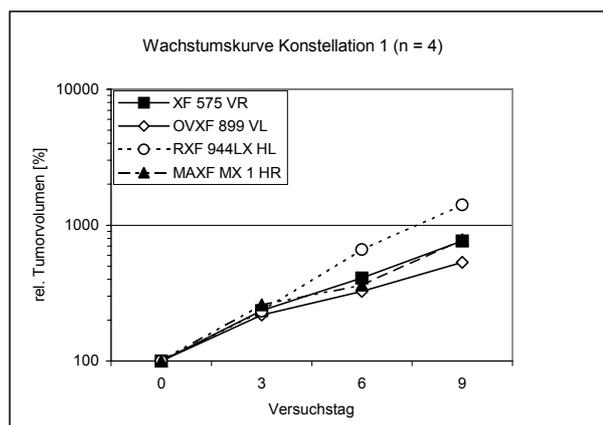
Zusammenfassend ließ sich durch diese Vorversuche feststellen, daß es zumindest *keine negative Wachstumsbeeinflussung* der Tumoren dieses Quartetts untereinander gab. Alle vier Xenografts *wuchsen* in jeder der Kombinationen *logarithmisch* und *erreichten beide Verdopplungen*. Die *Angehensrate* lag in 4 Gruppen bei 100% in zwei Studien bei 75%, womit auch dieses Kriterium erfüllt war. Das Kriterium des ausreichenden *Therapiezeitfensters* wurde bei einer maximalen Versuchsdauer von 10 Tagen zumindest für das übliche Therapieschema der Naturstoffversuche (0, 4, 8 bzw. 1, 5, 9) knapp erfüllt.

4.3.2. Lokalisationsversuche

Um den Einfluß der Implantationslokalisierung auf der Nacktmaus (hintere oder vordere Flanke) und dadurch bedingte Unterschiede in der Versorgung der Tumorfragmente mit Nährstoffen und Sauerstoff zu untersuchen, wurden die vier verschiedenen Xenografts in vier verschiedenen Konstellationen einem Rotationsprinzip folgend so implantiert, daß jeder Tumor einmal an einer der vier möglichen Lokalisationen wuchs.

Von 20 implantierten Mäusen waren 13 für die Studie geeignet (d.h. gutes Allgemeinbefinden und Angang aller vier Tumoren). Die Induktionszeit betrug 13 Tage.

Das Wachstumsverhalten der Xenografts wird im folgenden als relative mediane Tumolvolumenzunahme bezogen auf das mediane Ausgangsvolumen an Versuchstag 0 in Form von Liniendiagrammen im logarithmischen Maßstab dargestellt. Die Versuchsnummern waren K102 bis K105.



HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; HL: hintere linke Flanke; VL: vordere linke Flanke;

Abb. 4.3.7. Ergebnis Konstellation 1

Ausgangsvolumen (Median):	Verdopplungszeiten (in Tagen):	
	200%	400%
OVXF 899/42N17: 519.5 mm ³	2.4	6.7
RXF 944LX/23N9: 109.7 mm ³	1.5	3.6
XF 575/10N6: 529.7 mm ³	1.7	5.3
MAXF MX 1/24N12: 63.5 mm ³	3.0	7.0

Angehensrate: 4/5 (80%)

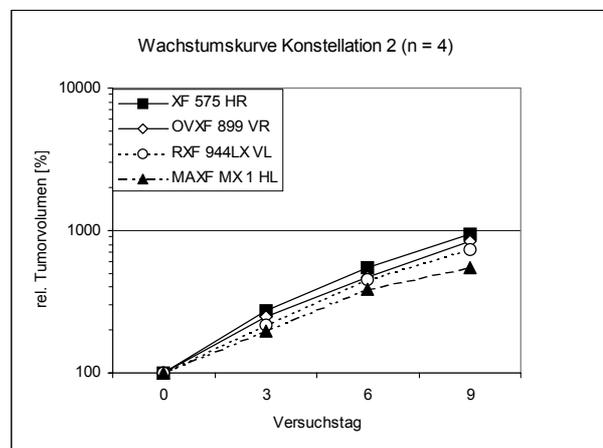
Die Ausgangsvolumina der beteiligten Xenografts variierten hier sehr stark. Die sehr schnell proliferierenden Tumoren XF 575 und OVXF 899 hatten nach 13 Tagen Induktionszeit bereits die Anfangsphase ihres exponentiellen Wachstums durchschritten. Zu diesem Zeitpunkt hatte MAXF MX 1 gerade erst die Vitalitätskriterien erfüllt. RXF 944LX befand

sich in seiner logarithmischen Wachstumsphase und verdoppelte sein Volumen im Versuchszeitraum am schnellsten. Die bereits wesentlich größeren XF 575 und OVXF 899 benötigten für die zweite Verdopplung länger (Übergang in lineares Wachstum) und blieben somit im prozentualen Wachstum zurück (Abb. 4.3.7.).

MAXF MX 1 zeigte insgesamt (für das Mammakarzinom typische, siehe Wachstumsdatenvergleich, Kap. 4.3.4.) längere Verdopplungszeiten und sorgte so für ein weites Auseinanderdriften der Wachstumskurven ab Versuchstag 3 bis zum Versuchsende.

Die Angehensrate lag mit 80% über dem in Kap. 3.6 geforderten Wert.

In Abbildung 4.3.8. sind alle Xenografts bezüglich der Implantationslokalisierung gegenüber Abb 4.3.7. eine Position im Uhrzeigersinn weitergerückt.



HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; HL: hintere linke Flanke; VL: vordere linke Flanke;

Abb. 4.3.8. Ergebnis Konstellation 2

Ausgangsvolumen (Median):

Verdopplungszeiten (in Tagen):

OVXF 899/42N17: 376.6 mm³
 RXF 944LX/23N9: 467.6 mm³
 XF 575/10N6: 254.7 mm³
 MAXF MX 1/24N12: 125.2mm³

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
OVXF 899	1.7	4.7
RXF 944LX	1.8	4.8
XF 575	1.7	4.4
MAXF MX 1	3.4	6.3

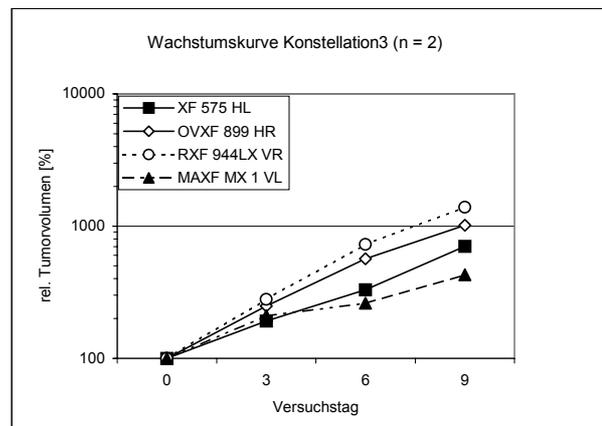
Angehensrate: 4/5 (80%)

In dieser Versuchsanordnung hatten RXF 944LX und MAXF MX 1 größere Ausgangsvolumina, während die beiden anderen Xenografts an VT 0 kleiner als in Konstellation 1 (Abb. 4.3.7.) waren. Dies führte im Vergleich zu Konstellation 1 zu verändertem prozentualen Wachstum der einzelnen Tumoren:

- OVXF 899 und XF 575 verdoppelten sich schneller (insbesondere zweite Verdopplungszeit)
- MAXF MX 1 erreichte die 400% ebenfalls früher

- RXF 944LX brauchte für die zweite Verdopplung 1.2 Tage länger als in Konstellation 1 (Abb. 4.3.7.)

Diese veränderte Wachstumskinetik glich die beobachteten Abweichungen im Verlauf der Wachstumskurven in Konstellation 1 weitgehend aus (Abb. 4.3.8.). In dieser Implantationskonstellation wuchsen die Xenografts weitgehend synchron. Die Angehensrate war mit 80% hoch. Abbildung 4.3.9. stellt das Wachstum der vier Tumoren in der nächsten im Uhrzeigersinn veränderten Lokalisation dar.



HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; HL: hintere linke Flanke; VL: vordere linke Flanke;

Abb. 4.3.9. Ergebnis Konstellation 3

Ausgangsvolumen (Median):	Verdopplungszeiten (in Tagen):	
	<u>200%</u>	<u>400%</u>
OVXF 899/42N17: 142.9 mm ³	1.8	4.2
RXF 944LX/23N9: 147.6 mm ³	1.4	3.4
XF 575/10N6: 44.8 mm ³	3.0	6.3
MAXF MX 1/24N12: 312.3 mm ³	2.7	8.5

Angehensrate: 2/5 (40%)

In Anbetracht der unterdurchschnittlichen Angehensrate und der daraus resultierenden zu geringen Anzahl an Mäusen war diese Gruppe nur mit Vorbehalt auswertbar.

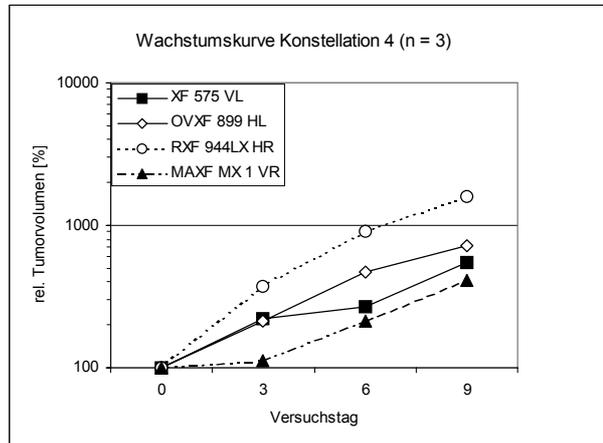
Die Etablierungskriterien wurden in dieser Konstellation nicht erfüllt.

RXF 944LX zeigte bei etwas größerem Ausgangsvolumen ein mit Konstellation 1 (Abb. 4.3.7.) vergleichbares Wachstumsverhalten.

OVXF 899 startete mit einem recht kleinen Ausgangsvolumen und erreichte die 400% Marke in dieser Lokalisation am schnellsten.

XF 575 hatte ein sehr kleines Ausgangsvolumen und proliferierte auch im weiteren Verlauf deutlich langsamer als in den anderen Konstellationen.

MAXF MX 1 hatte bis VT 0 schon ein relativ großes Volumen erreicht und verdoppelte sich zum ersten Mal schneller als in den anderen Gruppen. Die zweite Verdopplung wurde aber erst kurz vor Versuchsende erreicht (Übergang zum linearen Wachstum) (siehe Abb. 4.3.9.). Wie in Konst. 1 (Abb. 4.3.7.) liefen die Wachstumskurven nach VT 3 zunehmend auseinander.



HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; HL: hintere linke Flanke; VL: vordere linke Flanke;

Abb. 4.3.10. Ergebnis Konstellation 4

Ausgangsvolumen (Median):	Verdopplungszeiten (in Tagen):	
	200%	400%
OVXF 899/42N17: 282.1 mm ³	2.6	5.0
RXF 944LX/23N9: 105.1 mm ³	2.3	4.4
XF 575/10N6: 424.4 mm ³	3.0	5.4
MAXF MX 1/24N12: 75.8 mm ³	3.8	6.7

Angehensrate: 3/5 (60%)

Die Angehensrate erfüllte mit 60% die Mindestanforderung.

Die Wachstumskurven liefen in dieser Versuchsanordnung von VT 0 an deutlich auseinander (Abb. 4.3.10.). RXF 944LX hatte in dieser Lokalisation das kleinste Ausgangsvolumen und zeigte für seine Verhältnisse ein relativ langsames Wachstum (insbesondere erste Verdopplungszeit). Auch OVXF 899 wies die längste erste Verdopplungszeit bei relativ großem Ausgangsvolumen auf. Die 400% Marke wurde dagegen in ähnlicher Zeit wie in Kombination 2 und 3 (Abb. 4.3.8. und Abb. 4.3.9.) erreicht.

MAXF MX 1 lag mit den Verdopplungszeiten im Gruppenvergleich exakt wie OVXF 899: langsamste erste Verdopplung gefolgt von zweitschnellstem Erreichen der 400%-Marke. Das Xenograft trat erst an VT 3 in sein exponentielles Wachstum ein (Abb. 4.3.10.).

XF 575 hatte sehr viel größeres Anfangsvolumen als in Konstellation 3 (Abb. 4.3.9.), aber eine ähnliche Wachstumskinetik. Auffällig in dieser Tumorkonstellation auf den drei

Nacktmäusen war, daß jedes Xenograft offensichtlich unabhängig vom Ausgangsvolumen die längste erste Verdopplungszeit hatte.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, daß es in den einzelnen *Implantationsorten* und der Tumorkonstellation durchaus große *Unterschiede im Wachstum* der Xenografts, sowohl beim Ausgangsvolumen als auch bei den daraus resultierenden Verdopplungszeiten, gab.

Für die Substanztestung ist es von Vorteil wenn die Xenografts sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Im Falle dieses Tumorquartetts wurde auf ein synchrones Wachstum der Tumoren besonderer Wert gelegt, da so im (sehr kurzen) Versuchszeitraum jedes Xenograft ein Mindestmaß an Volumen zulegt. Wachstumsunterschiede zwischen Kontroll- und Therapiegruppe können dann bei allen vier Tumoren deutlich werden.

4.3.2.1 Bestimmung der optimalen Konstellation der vier Xenografts zueinander

Neben den Schaubildern wurde als Hilfsparameter für Wachstumssynchronizität die Differenz des maximalen prozentualen Volumenzuwachses (Volumenzuwachs des Xenografts mit dem größten prozentualen Volumenvergrößerung – Volumenzuwachs des Xenografts mit dem kleinsten prozentualen Volumenzuwachs) herangezogen:

	<u>Differenz medianen relativen Tumorvolumenzuwaches</u>
Konstellation 1:	887%
Konstellation 2:	385%
Konstellation 3:	962%
Konstellation 4:	1181%

Aufgrund dieser statistisch nicht überprüfaren Ergebnisse wurde die Xenograftkonstellation 2 (*VL* RXF 944LX, *VR* OVXF 899, *HL* MAXF MX 1, *HR* XF 575) rein empirisch als optimal angesehen und für die weiteren Versuche ausgewählt.

Um zu überprüfen ob die von Kyriazis (1980) postulierte These, daß die Lokalisation das biologische Verhalten der Xenografts beeinflusst, auch für die hier verwandten Tumoren zutrifft, wurde der maximale prozentuale Volumenzuwachs der einzelnen Xenografts in den vier Implantationslokalisationen (vordere und hintere, linke und rechte Flanke VL, VR, HL, HR) verglichen:

<u>OVXF 899</u>		<u>RXF 944LX</u>	
VL: 532%	VR: 845%	VL: 725%	VR: 1390%
HL: 1015%	HR: 714%	HL: 1419%	HR: 1595%
<u>XF 575</u>		<u>MAXF MX 1</u>	
VL: 553%	VR: 766%	VL: 428%	VR: 414%
HL: 939%	HR: 701%	HL: 554%	HR: 554%

RXF 944LX zeigte auf der linken Seite in der hinterer Flanke einen fast doppelt (196%) so großen Volumenzuwachs wie vorne, während der Unterschied rechts wesentlich geringer ausfiel (hinten 115% des Zuwachses der vorderen Lokalisation). Der unterschiedliche Volumenzuwachs auf der linken Seite war durch das wesentlich größere Ausgangsvolumen und das in der zweiten Versuchshälfte langsamere Wachstum in der vorderen Flanke begründet. Das absolute Volumen war in etwa gleich.

Ein ähnliches Bild bot sich bei XF 575 auf der linken Seite (hinten 170% des vorderen Zuwachses) während der Unterschied rechts minimal zugunsten der vorderen Lokalisation ausfiel (vorne 109%). Auch hier lagen ähnliche Verhältnisse bezüglich des Anfangsvolumens wie bei RXF 944LX vor.

Bei MAXF MX 1 erschien die hintere rechte Flanke gegenüber der vorderen rechten bessere Wachstumsbedingungen zu bieten: HR 188% des relativen Zuwachses von VR. Die linke Flanke zeigte dagegen nur eine geringe Abweichung (HL (554%) 129% von VR (428%)). In diesem Fall lagen auf der rechten Seite keine nennenswerten Unterschiede im Ausgangsvolumen oder der Verdopplungszeiten vor.

OVXF 899 bevorzugte die hintere linke Flanke im Vergleich zur vorderen: HL 191% des relativen Zuwachses von VL, während es auf der rechten Seite in der vorderen Lokalisation mehr Volumen zulegte: VR (845%) 118% von HR (714%). Das Ausgangsvolumen der vorderen linken Flanke betrug 184% der hinteren Lokalisation was eine um 1.7 Tage längere zweite Verdopplungszeit bedingte. Zusammenfassend läßt sich kein einheitliches Bild für die Entwicklung der vier Tumoren feststellen.

Bis auf OVXF 899 und XF 575, die auf rechten Seite die vorderen Flanke jeweils geringfügig bevorzugten (119% und 109% des Zuwachses in der hinteren Flanke), erschien bei unseren Xenografts und Nacktmäusen jedoch die hintere Lokalisation die günstigeren Wachstumsbedingungen bezüglich des prozentualen Volumenzuwachses im Versuchszeitraum zu bieten.

Bezüglich der Ausgangsvolumina stimmten die Ergebnisse dieses Vorversuchs mit Kyriazis Untersuchungen (Kyriazis, 1980) überein: die vorderen Lokalisationen wiesen jeweils den größeren Wert auf der betrachteten Seite auf. Bei gleicher Größe der implantierten Fragmente wurden also in der vorderen Lokalisation vom Implantationstag bis zum Versuchsbeginn größere absolute Volumen erreicht. Die von den Ausgangsvolumina abhängigen Verdopplungszeiten waren dagegen bei OVXF 899 und MAXF MX 1 in der hinteren Flanke kürzer. Bei RXF 944LX und XF 575 gab es keine einheitliche Tendenz.

4.3.3. Eigene Wachstumsstudien

Nach Bestimmung der optimal erscheinenden Tumorkonstellation wurden die vier Xenografts (RXF 944LX, OVXF 899, MAXF MX 1 und XF 575) in dieser Konstellation (Konst. 2) auf eine größere Anzahl (n=20) von Nacktmäusen implantiert.

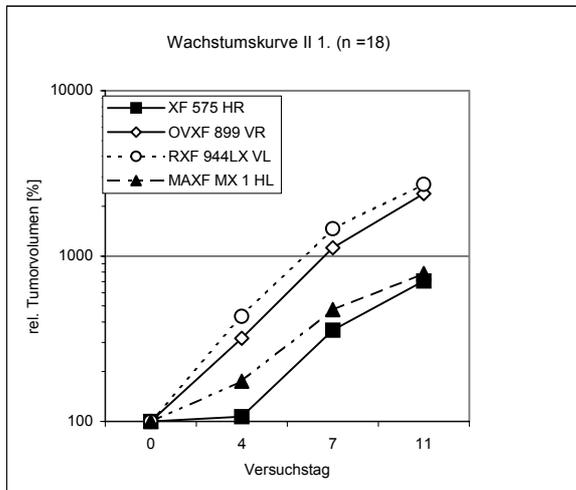
Weiterhin wurde das Wachstumsverhalten der vehikelbehandelten Kontrollgruppen aus dem Standardchemotherapieversuch und den Naturstoffversuchen dokumentiert.

Von 20 implantierten Mäusen der Wachstumsstudie waren 18 für die Studie geeignet (d.h. gutes Allgemeinbefinden und Angehen aller vier Tumoren).

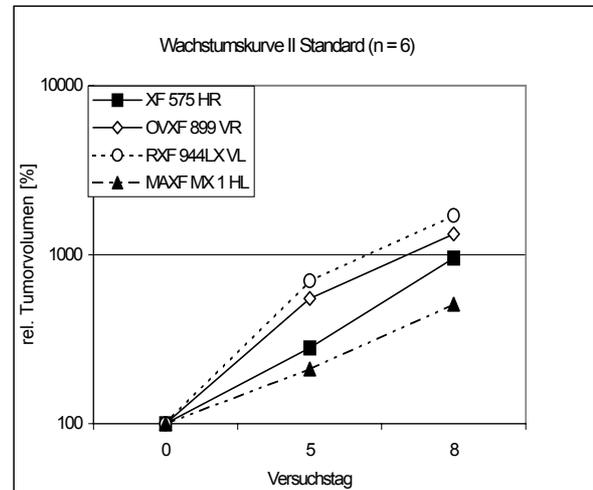
Das Wachstumsverhalten der Xenografts wird im folgenden in Abb. 4.3.11 A-D als relativer Volumenzuwachs bezogen auf das Ausgangsvolumen im logarithmischen Maßstab in Liniendiagrammen dargestellt.

Bei Erreichen der maximal tolerablen Tumorlast wurden die Versuche beendet (letzterVT).

A



B



HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; HL: hintere linke Flanke; VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.3.11. A Ergebnis Wachstumsstudie

Versuchs# K082 bis K085 (n = 18)

B Ergebnis Standard

Versuchs# K114 bis K117 (n = 6)

Wachstumsdaten Wachstumsstudie (Abb. 4.3.11. A):

Ausgangsvolumen (Median):	Verdopplungszeit (in Tagen):	
	<u>200%</u>	<u>400%</u>
OVXF 899/43N18: 113.1 mm ³	2.3	4.5
RXF 944LX/24N10: 87.5 mm ³	1.9	4.3
XF 575/11N7: 92.2 mm ³	4.6	7.1
MAXF MX 1/25N13: 53.0 mm ³	4.3	7.0
Angehensrate: 18/20 (90%)		

Die Induktionszeit betrug 7 Tage.

Wachstumsdaten Kontrollgruppe Standardchemotherapieversuch (Abb. 4.3.11. B):

<u>Ausgangsvolumen (Median):</u>	<u>Verdopplungszeit (in Tagen):</u>	
	<u>200%</u>	<u>400%</u>
OVXF 899/45N20: 124.8 mm ³	1.1	3.3
RXF 944LX/26N12: 115.8 mm ³	0.9	2.8
XF 575/13N9: 98.2 mm ³	3.8	5.8
MAXF MX 1/27N15: 84.9 mm ³	5.1	6.9

Angehensrate: 26/30 (86.7%)

Induktionszeit: 8 Tage

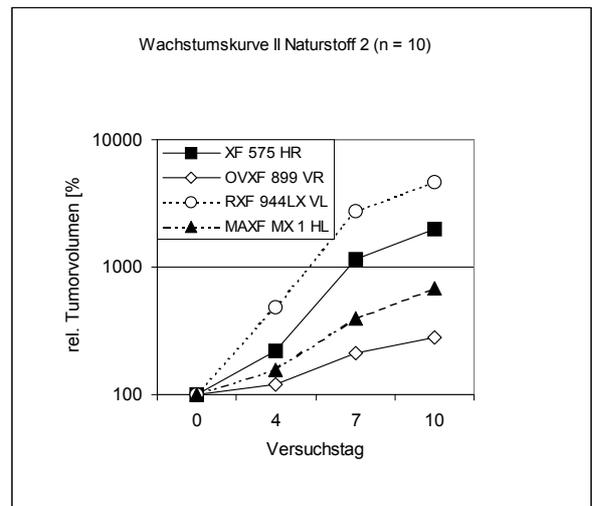
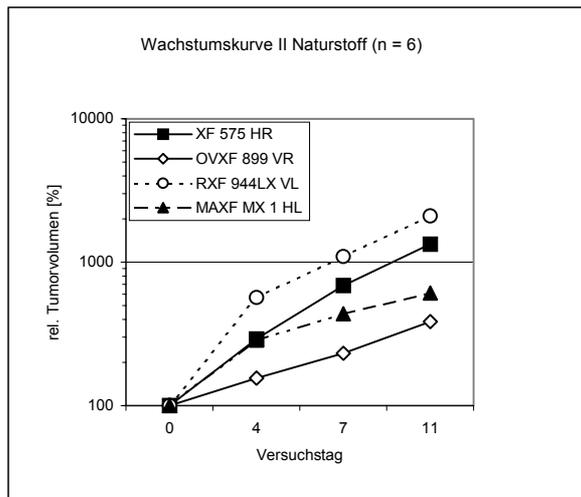
Die ersten beiden Quartettimplantationen (Abb. 4.3.11. A und Abb. 4.3.11. B) erfüllten die gestellten Etablierungskriterien weitgehend.

Alle beteiligten Tumoren verdoppelten ihr Ausgangsvolumen mindestens zweimal.

Es konnten 90% bzw. 86.7% der eingesetzten Mäuse an den Studien teilnehmen, was den geforderten Wert von 60% deutlich übertraf.

Der Versuchszeitraum war 11 (Abb. 4.3.11. A) und 8 Tage lang (Abb. 4.3.11. B), was lediglich einen Schnelltest darstellte und die Beobachtung der Wirkung der dritten Dosisapplikation an Versuchstag 8 schwierig oder unmöglich machte.

Zwischen den beiden Versuchsgruppen gab es lediglich moderate, statistisch nicht signifikante Schwankungen in der Länge der Verdopplungszeiten und der Größe des Ausgangsvolumens der einzelnen Tumoren.



HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; HL: hintere linke Flanke; VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.3.11. C Ergebnis Naturstoff 1

Versuchs# K271 bis K274 (n = 6)

D Ergebnis Naturstoff 2

Versuchs# K376 bis K379 (n = 10)

Wachstumsdaten der Xenografts in Kontrollgruppe Naturstoffversuch 1 (Abb. 4.3.11.C):

Ausgangsvolumen (Median):

OVXF 899/46N21: 68.4 mm³
 RXF 944LX/25N11: 300.0 mm³
 XF 575/20N16: 126.3 mm³

MAXF MX 1/32N18: 77.0 mm³
 Angehensrate: 29/40 (72.5%)
 Die Induktionszeit betrug 9 Tage.

Verdopplungszeit (in Tagen):

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
OVXF 899/46N21	5.4	12.7 (E)
RXF 944LX/25N11	0.9	2.7
XF 575/20N16	1.4	4.1
MAXF MX 1/32N18	2.5	6.9

Wachstumsdaten Kontrollgruppe Naturstoffversuch 2 (Abb. 4.3.11D):

Ausgangsvolumen (Median):

RXF 944LX/ 33N20: 64.9 mm³
 OVXF 899/ 31N6 : 74.7 mm³
 XF 575/ 26N22 : 81.6 mm³
 MAXF MX 1/ 35N22 : 60.6 mm³

Angehensrate : 34/40 (85%)
 Die Induktionszeit betrug 8 Tage.

Verdopplungszeit (in Tagen):

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
RXF 944LX/ 33N20	0.9	2.6
OVXF 899/ 31N6	6.1	10.6 (E)
XF 575/ 26N22	3.2	4.7
MAXF MX 1/ 35N22	4.3	6.5

Die oben dargestellten Studien (Abb. 4.3.11C und 4.3.11D) erfüllten mit 72.5% und 85% einsetzbaren Tieren das Kriterium der Angehensrate über 60% deutlich.

Wie in den beiden vorigen Studien war auch hier der Beobachtungszeitraum mit 10 und 11 Tagen sehr kurz.

Drei der beteiligten Xenografts (RXF 944LX, MAXF MX1, XF 575) vergrößerten ihr Ausgangsvolumen um mehr als 400%. Die Wachstumskinetik dieser drei Xenografts glich derjenigen in den ersten beiden Studien (Abb. 4.3.11. A und Abb. 4.3.11. B) weitgehend.

In der Kontrollgruppe des ersten Naturstoffversuchs (Abb. 4.3.11. A) hatte OVXF 899/46N21 trotz der relativ langen Induktionszeit von 9 Tagen ein kleineres Ausgangsvolumen als in den vorigen Studien (Wachstumsstudie II und Standard II).

Das Ovarialkarzinom wies in dieser Studie (Abb. 4.3.11. C) um den Faktor 4–5 verlängerte Verdopplungszeiten auf und erreichte die zweite Verdopplung des Ausgangsvolumen nicht (der Wert in der Auflistung der Wachstumsdaten wurde extrapoliert = E).

Da OVXF 899 in dieser Passage makroskopisch und histologisch sein Aussehen (auch in parallel laufenden Einzelimplantationen in der Tumorbank des Labors Prof. Fiebig) verändert hatte, wurde für weitere Studien eine niedrigere Passage aus dem in flüssigem Stickstoff gelagerten Bestand aufgetaut.

Diese Passage wurde in der Kontrollgruppe des zweiten Naturstoffversuchs (Abb. 4.3.11. D) implantiert.

Die Etablierungskriterien wurden auch mit diesem Xenograft nicht erfüllt. Die zweite Verdopplungszeit konnte ebenfalls nur extrapoliert werden.

In parallel laufenden Versuchen mit OVXF 899/31N6 als einzigem Tumor auf der Nacktmaus hatte dieser eine wesentlich längere Induktionszeit von 16 Tagen und Verdopplungszeiten von 4.5 (200%) und 10.8 (400%) Tagen. Die makroskopische Morphologie des Ovarialkarzinoms war wieder erkennbar.

Aufgrund des deutlich veränderten Wachstumsverhalten von OVXF 899 und dem dadurch bedingten Nichterfüllen der Etablierungskriterien wurde auf weitere Versuche mit diesem Tumorquartettmodell verzichtet.

4.3.4. Vergleich der eigenen Wachstumsdaten mit vorherigen Studien

Die historischen Daten der unbehandelten Tumoren von Kontrollgruppen zeigen, daß auch bei der Einzelimplantation des Xenografts gewisse Schwankungen bezüglich der Induktionszeit und der Verdopplungszeiten bestehen, die durch verschiedene Faktoren hervorgerufen werden können:

a) Größe und Vitalität der implantierten Fragmente, b) Gesundheitszustand und Restimmunität der Nacktmaus, c) Transplantationsintervall (Zeitspanne zwischen Entnahme des Tumors und Implantation in den Empfänger) und d) Passagezahl des Tumors.

Aus der Datenbank des Labors Prof. Fiebig wurden je Tumor 8 – 10 Datensätze von historischen Kontrollgruppen ähnlicher Passagenummern ausgewählt. Diese Kontrollgruppen umfaßten 4-12 Versuchstiere. Es wurde der arithmetische Mittelwert der Induktionszeit und der beiden Verdopplungszeiten gebildet. Weiterhin wurden die für jeden Parameter kleinsten und größten Werte dokumentiert (Min- Max Werte).

Bei der Betrachtung der Mittelwerte ergibt sich ein charakteristisches Bild des Wachstumsverhaltens des Xenografts bei dem die genannten Einflüsse weniger Gewicht haben.

Die Tabellen 4.3.1. – 4.3.4. zeigen die Vergleiche der Wachstumsdatensätze der vier Xenografts von Tumorquartettmodell II.

Bei der statistischen Auswertung der Daten der Einzel- und der Vierfachimplantationen wurde im Falle einer Normalverteilung der (medianen) Werte der Verdopplungszeiten der Student t-Test, ansonsten der Mann - Whitney Rank Sum Test angewandt.

Im Falle von RXF 944LX waren die Induktionszeiten von Einzel - und Doppelimplantation waren fast identisch. Die Vierfachimplantation wies sowohl beim Mittelwert als auch in der Variationsbreite höhere Werte auf (Tab.4.3.1.). Diese verspätete Induktion lag weniger an einem verzögerten Erfüllen der Vitalitätskriterien als vielmehr daran, daß auf die Vitalität der beteiligten anderen Xenografts gewartet werden mußte.

Die erste Verdopplungszeit des Nierenkarzinoms zeigte beim Mittelwert eine geringe Verlangsamung des Tumorwachstums in der Doppelimplantation, während die Variation der Einzelwerte am oberen Ende der Spanne der Werte der Einzelimplantation lag.

Ergebnisse II: Vergleich der eigenen Wachstumsdaten mit vorherigen Studien

Die Vierfachimplantation war nicht nur im Mittelwert sondern auch bezüglich der Variationsbreite (Min- Max-Werte) der ersten Verdopplungszeit deutlich schneller.

Für die zweite Verdopplung brauchten die Xenografts in Einzel- und Doppelimplantation ähnlich lange: der Mittelwert war fast identisch und die Einzelwerte der Doppelimplantation lagen im mittleren Bereich der Variationsbreite der Einzelimplantation.

Die Vierfachimplantation war auch bei diesem Wert deutlich schneller.

Die kürzesten Verdopplungszeiten wurden sowohl bei den Einzel- als auch in den Vierfachimplantationen in den höchsten Passagen erreicht (Tab. 4.3.1.).

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzel- implanta- tion ^a	Mittel- wert	8.6	2.0	4.6
	Min-Max	6-12	1.0-3.7	3.3-6.1
Doppel- implanta- tion ^b	Mittel- wert	8	3.2	4.8
	Min-Max	8	2.7-3.5	4.6-5.1
Vierfach- Implanta- tion ^c	Mittel- wert	10	1.5	3.6
	Min-Max	7-13	0.9-2.3	2.6-4.8

^a: Passagen 6 – 33

Tab. 4.3.1 Wachstumsdatenvergleich RXF 944LX

^b: Passage 25

^c: Passage 24,25,26,33

Weder in Doppel- noch in Vierfachimplantationen konnte eine negative Beeinflussung des Wachstums erkannt werden.

Die langsamere erste Verdopplungszeit der Doppelimplantation wurde in Ihrer Bedeutung durch die normale zweite Verdopplung relativiert.

Die normalverteilten Daten der ersten Verdopplungszeit ergaben im Vergleich zwischen Einzelimplantationen und Vierfachimplantationen anhand des Student- t-Tests keine statistisch signifikante Differenz ($p = 0.148$).

Der Unterschied der zweiten Verdopplungszeit war mit $p = 0.044$ statistisch signifikant.

Ergebnisse II: Vergleich der eigenen Wachstumsdaten mit vorherigen Studien

Bei OVXF 899 zeigte schon der Vergleich der Induktionszeiten eine sehr große Schwankung: parallel zur steigenden Passagenzahl wurden die Induktionszeiten immer kürzer.

In den Mehrfachimplantationen wurden bis zum ersten Naturstoffversuch hohe Passagenummern implantiert (Siehe auch Kapitel 4.3.1.-3.).

Die Doppelimplantationen konnten bereits nach 8 Tagen gemessen werden, da OVXF 899 die Vitalitätskriterien erfüllt hatte.

Die erste und zweite Verdopplungszeit, die jeweils bedeutend kürzer als die Vergleichsdaten waren, demonstrierten diese gesteigerte Proliferationsfähigkeit des Xenografts in Passage 44.

Der Mittelwert der ersten Verdopplung war zwar um über 40% geringer, aber die einzelnen Werte lagen noch innerhalb der Variationsbreite der Einzelimplantationen.

Bei der zweiten Verdopplung wurden bei zwei Kombinationen Werte erreicht, die kürzer als der Minimalwert der historischen Vergleichsdaten waren (Tab.4.3.2. Spalte Doppelimplantation). Der Mittelwert betrug weniger als 50% des Vergleichs (Daten der Einzelimplantationen).

Ein ähnliches Bild ergab sich bei den Wachstumsstudien des Quartettmodells bis zur Kontrollgruppe des ersten Naturstoffversuchs: auf eine kurze Induktionszeit folgten sehr kurze Verdopplungszeiten, die meist außerhalb der bei den Einzelimplantationen dokumentierten Wertevariation lagen (Tab.4.3.2. Spalte Vierfachimplantation).

Bei der ersten Naturstoffstudie kehrte sich die Tendenz zur immer schnelleren Proliferation ins Gegenteil um: der Tumor zeigte plötzlich ein Wachstumsverhalten, das den langsameren Werten der Vergleichsdaten (Einzelimplantation) entsprach. In der nachfolgenden Studie wurde eine jüngere, aufgetaute Passage verwendet, die zwar etwas schneller wuchs, aber immer noch stark in der Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu den ersten Mehrfachimplantationsversuchen zurückblieb.

Tabelle 4.3.2. stellt die ausgewerteten Datensätze der verschiedenen Implantationen einander vergleichend gegenüber.

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzelimplantation ^a	Mittelwert	16.4	6.7	12.1
	Min-Max	9-22	3.6-9.8	6.3-19.8
Doppelimplantation ^b	Mittelwert	8	3.8	5.8
	Min-Max	8	3.4-4.2	4.8-7.2
Vierfach-Implantation ^c	Mittelwert	10	2.9	6.5
	Min-Max	7-13	1.1-6.1	3.3-12.7

Tab. 4.3.2 Wachstumsdatenvergleich OVXF 899

^a: Passagen 31-46

^b: Passage 44

^c: Passage 31,43,45,46

In den ersten Studien hatte OVXF 899 aufgrund seiner extrem schnellen Proliferation für ein sehr kurzes Therapiezeitfenster gesorgt. In den letzten beiden Mehrfachimplantationen wurden die Kriterien nicht erfüllt, da das Tumolvolumen während des Versuchs keine zwei Verdopplungen aufwies.

Es erscheint unwahrscheinlich, daß in mehreren Studien das Wachstum von OVXF 899 in Anwesenheit der anderen Tumoren – einer Stimulation gleichend- immer schneller wurde, um dann abrupt durch den Einfluß der anderen Xenografts in seinem Wachstum gehemmt zu werden.

Eine klonale Selektion des heterogenen Xenografts von Passage zu Passage zugunsten immer schneller proliferierender Zellen, die schließlich bei einer Transplantation avital wurden, erschien eher plausibel. Die veränderte Morphologie und die Dokumentation desselben Phänomens zur gleichen Zeit auf Mäusen, die ausschließlich das Ovarialkarzinom trugen, sprachen für diese Hypothese.

Die Daten beider Verdopplungszeiten (Einzelimplantation und Vierfachimplantation) waren normalverteilt und ergaben jeweils statistisch signifikante Unterschiede

(200%: $p = 0.001$; 400%: $p = 0.013$) zwischen Vierfach- und Einzelimplantation.

Die Induktionszeit der Doppelimplantation war bei MAXF MX 1 bedeutend kürzer als die der Einzel- und Vierfachimplantation. Zu Gunsten der schnelleren Tumoren waren die Versuche hier sehr früh gestartet worden.

Auch bei den Vierfachimplantationen wurde so früh wie möglich angefangen zu messen, um ein zu großes Anfangsvolumen der schnelleren Xenografts zu verhindern (Tab.4.3.3.).

Bei der ersten Verdopplungszeit machte sich diese für MAXF MX 1 relativ kurze Induktionszeit bemerkbar: in der Doppelimplantation wurden die 200% deutlich später erreicht. Die Xenografts traten erst verzögert in ihre exponentielle Wachstumsphase ein.

Diese Tendenz zeigte sich auch bei den Vierfachimplantationen: je früher mit dem Messen angefangen wurde, desto länger waren die ersten Verdopplungszeiten- einzige Ausnahme war der erste Naturstoffversuch mit einer sehr hohen Passagenummer. Mittelwert und Variationsbreite bei Einzel- und Vierfachimplantation stimmten weitgehend überein (Tab.4.3.3).

Der Mittelwert der zweiten Verdopplungszeit der Doppelimplantation war in Folge ebenfalls länger als der Vergleichswert, während die Minima und Maxima weitgehend übereinstimmten.

Die Vierfachimplantationen zeigten in der zweiten Versuchshälfte zumeist ein beschleunigtes Wachstum von MAXF MX 1. Der Mittelwert war zwar um 1.0 Tage kürzer, aber bezüglich der Variationsbreiten (Min- Max-Werte) ergab sich ein weitgehend übereinstimmendes Bild.

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzelimplantation ^a	Mittelwert	12.6	3.8	8.0
	Min-Max	9-16	2.7-5.4	6.5-9.1
Doppelimplantation ^b	Mittelwert	8	5.4	8.6
	Min-Max	8	3.8-6.9	6.5-10.6
Vierfach-Implantation ^c	Mittelwert	10	3.6	7.0
	Min-Max	7-13	2.5-5.1	6.3-8.5

^a: Passagen 6 – 35

^b: Passage 26

^c: Passage 25,27,32,35

Tab. 4.3.3. Wachstumsdatenvergleich MAXF MX 1

Insgesamt konnte bei den Mehrfachimplantationen keine Wachstumshemmung von MAXF MX 1 beobachtet werden.

Der statistische Vergleich der Daten der Einzel- und Vierfachimplantationen mit dem Student t-Test ergab bei der ersten Verdopplungszeit keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0.737$).

Die Differenz der zweiten Verdopplungszeiten war mit $p = 0.029$ statistisch signifikant (t-Test).

Die Induktionszeit der Doppelimplantation war bei XF 575 etwas kürzer als die der Einzelimplantation. Der höhere Mittelwert der Einzelimplantationen kam durch das langsamere Erreichen der Vitalitätskriterien in früheren Passagen zustande (Tab. 4.3.4.).

Der frühere Versuchsanfang bei den Mehrfachimplantationen hatte keinen Einfluß auf das Wachstumsverhalten des Xenografts: die erste Verdopplung wurde jeweils im Durchschnitt etwas früher als die Vergleichswerte erreicht. Einzelne Studien erreichten Werte, die weit unterhalb der Variationsbreite der Einzelimplantationen lagen.

In der Folge wurde auch die 400% Marke früher als bei den Vergleichswerten erreicht: die Xenografts der Doppelimplantationen verdoppelten ihr Volumen im Schnitt 2.1 Tage früher, während die Vierfachimplantationen 1.1 Tage weniger benötigten. Alle Xenografts der Doppelmodelle hatten Verdopplungszeiten, die an der unteren Grenze der Vergleichswerte oder darunter lagen.

Die Variationsbreite des Quartettmodells unterschied sich nur unwesentlich von den Vergleichswerten, da insbesondere in den frühen Experimenten längere zweite Verdopplungszeiten erzielt wurden.

Tabelle 4.3.4. vergleicht die ausgewerteten Datensätze der verschiedenen Implantationsarten.

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzelimplantation ^a	Mittelwert	10.5	3.2	6.4
	Min-Max	8-13	2.5-4.0	4.5-7.7
Doppelimplantation ^b	Mittelwert	8	2.8	4.3
	Min-Max	8	1.8-3.3	3.8-4.5
Vierfach-Implantation ^c	Mittelwert	10.5	3.1	5.3
	Min-Max	8-13	1.4-3.8	4.1-7.1

^a: Passagen 4-26

^b: Passage 12

^c: Passage 12,13,20,26

Tab. 4.3.4 Wachstumsdatenvergleich XF 575

Insgesamt konnte bei XF 575 die Tendenz zur schnelleren Proliferation in den Mehrfachmodellen, die parallel zum Ansteigen der Passagezahl verlief, erkannt werden.

Hinweise auf eine negative Wachstumsbeeinflussung durch die Anwesenheit der anderen Xenografts konnten nicht gefunden werden.

Die Werte der ersten Verdopplungszeit der Einzel- und Vierfachimplantation waren nicht normalverteilt und wurden mit dem Mann Whitney Rank Sum Test ausgewertet: die Differenz war mit p (exakt) = 0.505 nicht statistisch signifikant.

Der t-Test ergab bei den normalverteilten Werten der zweiten Zeit mit p = 0.075 ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

4.3.5. Standardchemotherapie der Xenografts im Tumorquartettmodell

Für die Chemoresponsivitätsstudie der Xenografts des Tumorquartetts II wurden 30 weibliche Nacktmäuse mit Fragmenten der Tumoren implantiert. Die Randomisation in Kontroll- und Therapiegruppen erfolgte 8 Tage später. Es konnten 26 Mäuse in die Studie aufgenommen werden, was einer Angehensrate von 86.7% entspricht. Die Studie dauerte insgesamt 22 Versuchstage, wobei die Kontrollgruppe nach 8 Tagen und die Gruppen 2, 3 und 4 nach 15 bzw. 12 Tagen beendet wurden. Die Versuchsnummern waren K114 bis K117.

Die Kontrollgruppe bestand aus 6 Nacktmäusen, denen am Versuchstag 1 10 ml/kg 0.9% NaCl mit 0.05% Tween 80 (Verdünnungsmedium für Naturstoffstammlösung) intraperitoneal verabreicht wurde.

Gruppe 2 umfaßte 5 Tiere, die an Tag 1 intravenös mit 8 mg/kg Adriamycin therapiert wurden.

Den 5 Mäuse in Gruppe 3 wurden 100mg/kg 5-Fluoruracil intraperitoneal an Tag 1 und 8 verabreicht.

In Gruppe 4 (5 Tiere) bestand die Therapie in 6 mg/kg Cisplatin intraperitoneal an Tag 1.

Gruppe 5 bestand ebenfalls aus 5 Tieren, denen 1.5 mg/kg Vindesin intraperitoneal an VT 1 und 8 appliziert wurde.

In der Kontrollgruppe sowie unter Adriamycin- und 5-FU Therapie überlebten alle Tiere bis zum tumorlastbedingten (Abbruchkriterien) Versuchsende.

Unter Vindesintherapie verstarben zwei Mäuse an Versuchstag 14.

Bei Verabreichung von Cisplatin verstarb je ein Tier an Versuchtag 7 und 11. Ein weiteres Tier mußte am Tag 8 aufgrund seines schlechten Allgemeinzustandes (Apathie, Gewichtsverlust, Exsikkose) euthanasiert werden.

Beim Auftreten von Nebenwirkungen der Chemotherapie wurde durch symptomatische Therapie (Flüssigkeits- und Glucoseinjektionen, hochkalorische Diät) versucht, die Tiere zu stabilisieren.

Der Gewichtsmedian der einzelnen Gruppen sank zeitweilig bis auf ein Minimum von 89.9% des Ausgangsgewichts (PLAT Gruppe 4, VT 7) ab, unterschritt aber zu keinem Zeitpunkt die Marke von 80%. Damit konnte der Versuch trotz der Letalitäten von zum Teil 60% der Tiere (Gruppe 4) bis Tag 8, 12, 15 und 22 beobachtet werden.

Im Folgenden werden die Wachstumskurven der vier beteiligten Tumoren jeweils als medianes, relatives Tumolvolumen im logarithmischen Maßstab dargestellt.

Abb. 4.3.12. zeigt das Verhalten von RXF 944LX unter verschiedenen Chemotherapien.

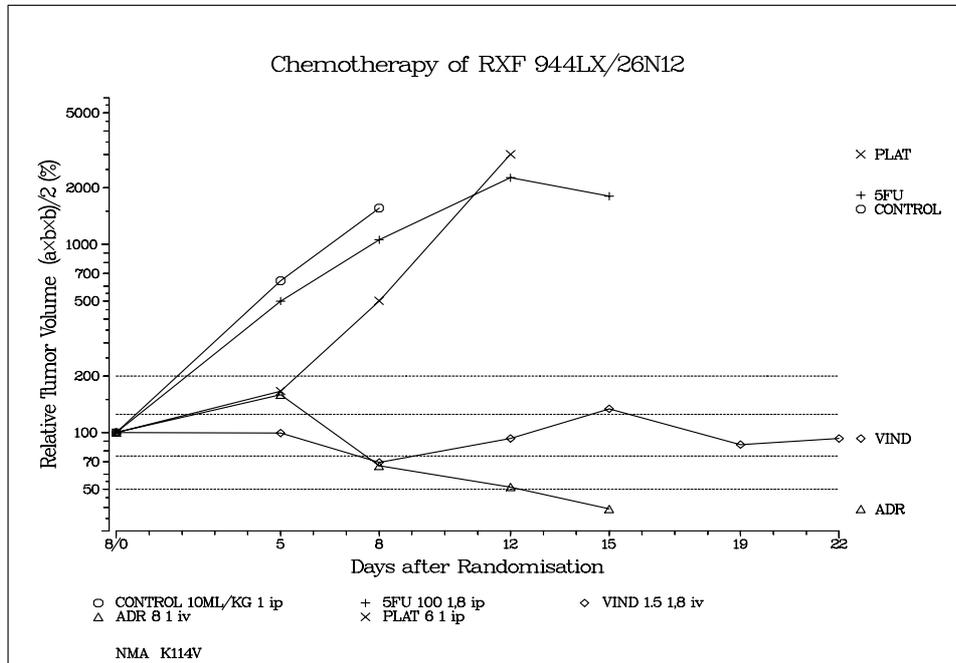


Abb. 4.3.12. Chemotherapie von RXF 944LX im Quartettmodell

ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

Die Ausgangsvolumina lagen zwischen 115.8 mm^3 (Gruppe 1, Kontrolle) und 37.9 mm^3 (Gruppe 3, 5-FU-Therapie).

Die mit dem Kontrollvehikel behandelten Tumoren proliferierten exponentiell und die Gruppe wurde an Tag 8 aufgrund der Tumorlast beendet (Abb. 4.3.12., o).

Unter 5-FU Therapie verlief die Kurve (Abb. 4.3.12., +) zunächst annähernd parallel zur Kontrollgruppe, wurde dann flacher und das Volumen verkleinerte sich von VT 12 bis VT 15 geringgradig. Die geringe Wirksamkeit dieser Therapie äußerte sich in einem T/C von 67.8% an Tag 15 (Aktivitätsbewertung: negativ, siehe Kap. 3.11.2.) und einer klinischen Progression.

Der Effekt der Cisplatintherapie (Abb. 4.3.12., x) zeigte zeitlich einen spiegelbildlich umgekehrten Verlauf:

Der maximale Effekt war am Anfang des Versuchs mit einem T/C von 25.9% an Tag 5 zu verzeichnen. Ab VT 5 wurde die Kurve zunehmend steiler und erreichte die Größenordnung der Kontrollgruppe. Diese kurze Wirksamkeit wurde in der klinischen Einteilung ebenfalls als Progression gewertet.

Die Vindesintherapie (Abb. 4.3.12., \diamond) zeigte einen wesentlich nachhaltigeren Effekt: Die Kurve hielt sich über den ganzen Versuch hinweg im Bereich um 100% des Ausgangsvolumen auf. Die maximale Wirksamkeit wurde an VT 8 mit einem optimalen T/C von 4.5%, was klinisch einer Tumorstase entsprach.

In Gruppe 2 wurde unter Adriamycintherapie (Abb. 4.3.12., Δ) eine partielle Remission mit einem optimalen Effekt von 2.0% T/C an Tag 15 erreicht. Der Kurvenverlauf deutete an, daß eine weitere Verbesserung des Effekts zu erwarten gewesen wäre, hätte der Versuch nicht aufgrund des Erreichens der maximal erlaubten Tumorlast durch andere Xenografts abgebrochen werden müssen.

Durch die unterschiedlichen Wirkmechanismen der Standardsubstanzen und dem daraus resultierenden unterschiedlichen Ansprechen des Xenografts wurde in dieser Studie die beibehaltene Sensibilität von RXF 944LX (Progression unter 5-FU, Partielle Remission unter ADR) im Quartettmodell demonstriert.

Abbildung 4.3.13. stellt die Wachstumskurven von OVXF 899 unter Chemotherapie dar.

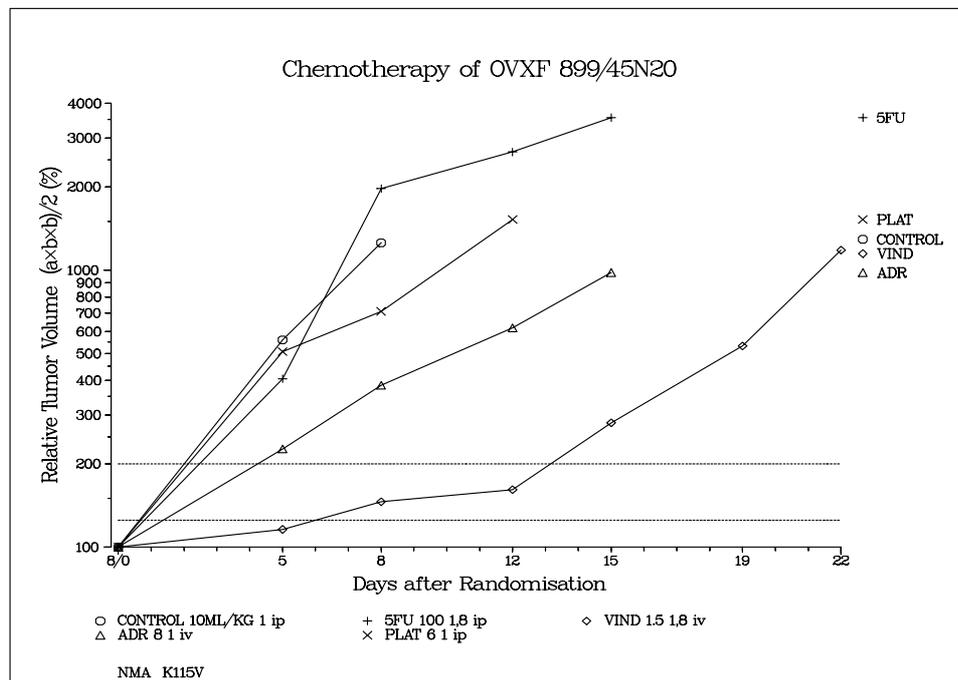


Abb. 4.3.13. Chemotherapie von OVXF 899 im Quartettmodell

ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

Die Ausgangsvolumina variierten zwischen 124.8 mm³ (Kontrolle) und 90.8 mm³ (ADR, Gruppe 2). Das Diagramm zeigt in der Übersicht, daß die Tumoren in allen Therapiegruppen schließlich progredient wuchsen. Der Unterschied zwischen den weitgehend

parallel verlaufenden Kurven lag im Ausmaß der Wachstumsverzögerung durch die jeweilige Therapie.

Die Kurve der 5-FU-Therapie (Abb. 4.3.13, +) verlief bis Tag 7 etwas unter der Kontrollgruppe, um sie dann zu kreuzen und sogar schneller zu proliferieren. Diese Unwirksamkeit wurde auch durch den optimalen T/C von 72.3% (Aktivitätsbewertung: negativ) an Tag 5 belegt.

Nur wenig wirksamer stellte sich die Therapie mit Cisplatin dar: erst ab VT 5 flachte die Kurve etwas ab und erreichte einen optimalen T/C von 56.5% an Tag 8 (Abb. 4.3.13., x).

Eine bedeutendere Wachstumshemmung wurde durch Adriamycin erreicht: Der optimale Effekt lag mit einem T/C von 30.6% an Tag 8. Die Kurve (Abb. 4.3.13., Δ) zeigte die konstant geringere Proliferation des Tumors anhand der deutlich flacheren Steigung, was sich auch in der Wachstumsverzögerung von 2.9 (200%) bzw. 5.0 Tagen (400%) äußerte.

Den besten Effekt auf das Wachstum von OVXF 899 hatte die Vindesintherapie (Abb. 4.3.13., \diamond): Die Kurve verlief bis VT 12 sehr flach, um danach etwas steiler zu werden. Die erste Verdopplung wurde erst mit 11.9 Tagen Verspätung erreicht. Der optimale T/C lag an VT 8 mit 11.6%.

Insgesamt war keine Therapie in der Lage, das Wachstum von OVXF 899 zu verhindern. Die Reaktionsfähigkeit des eher resistenten Xenografts äußerte sich aber in den veränderten Proliferationsgeschwindigkeiten in den einzelnen Gruppen.

Abbildung 4.3.14. zeigt das Ansprechen von XF 575 auf unterschiedliche Standardchemotherapien.

Die medianen Ausgangsvolumina bewegten sich zwischen 128.4 mm³ (Gruppe 3, 5-FU) und 81.5 mm³ (Gruppe 5, VIND).

Ähnlich wie bei OVXF 899 stellte sich auch XF 575 als eher resistentes Xenograft, bei dem die Standardsubstanzen nur eine Wachstumsverzögerung bewirken konnten, dar.

Die Vitalität des Tumors wurde durch die steile Wachstumskurve der Kontrollgruppe demonstriert (Abb. 4.3.14., o).

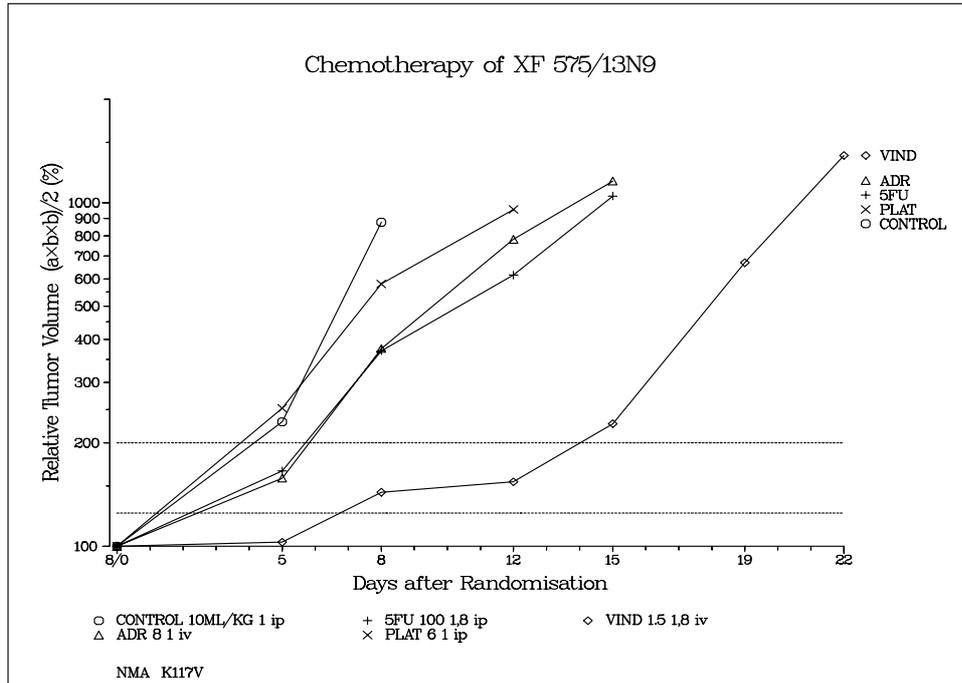


Abb. 4.3.14. Chemotherapie von XF 575 im Quartettmodell
ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

Die Therapie mit Cisplatin (Abb. 4.3.14., x) bewirkte lediglich eine leichte Abflachung der Kurve ab Tag 8. Der optimale T/C wurde an VT 8 mit 66.1% notiert.

Die Adriamycin- (Abb. 4.3.14., Δ) und 5-FU-Therapie (+) lieferten fast deckungsgleiche Verlaufskurven: Beide Therapien erzielten ihr bestes Ergebnis an VT 8 mit 42.9% bzw. 42.3% T/C. Auch die Verdoppelungsverzögerungen entsprachen sich mit jeweils 1.7 Tagen (200%) und 2.4 bzw. 2.7 Tagen (400%) weitgehend.

Wie bei den vorherigen Xenografts war Vindesin (Abb. 4.3.14., ◇) hier am wirksamsten. Bis VT 12 verlief die Kurve sehr flach - der Tumor konnte nur sehr langsam proliferieren. Ab Tag 12 ließ der Effekt stark nach und das Xenograft nahm seine normale Wachstumsgeschwindigkeit auf. Der optimale Effekt war an VT 8 mit einem T/C von 16.4%. Die Verdoppelungsverzögerung lag bei 10.0 Tagen für den 200% Wert.

Trotz der weitgehenden Resistenz von XF 575 konnte im Quartettmodell deutliche Unterschiede in der antineoplastischen Aktivität der Standardsubstanzen herausgearbeitet werden.

Abb. 4.3.15 stellt den Verlauf der Wachstumskurven von MX 1 unter Chemotherapie dar.

Die Ausgangsvolumina des Mammakarzinoms lagen zwischen 59.2 mm³ (Gruppe 3, 5-FU) und 96.9 mm³ (Gruppe 2, ADR). Das gegenüber den anderen Xenografts langsamere Wachstum spiegelte sich in den wesentlich flacheren Kurven (Abb. 4.3.15., o) wieder.

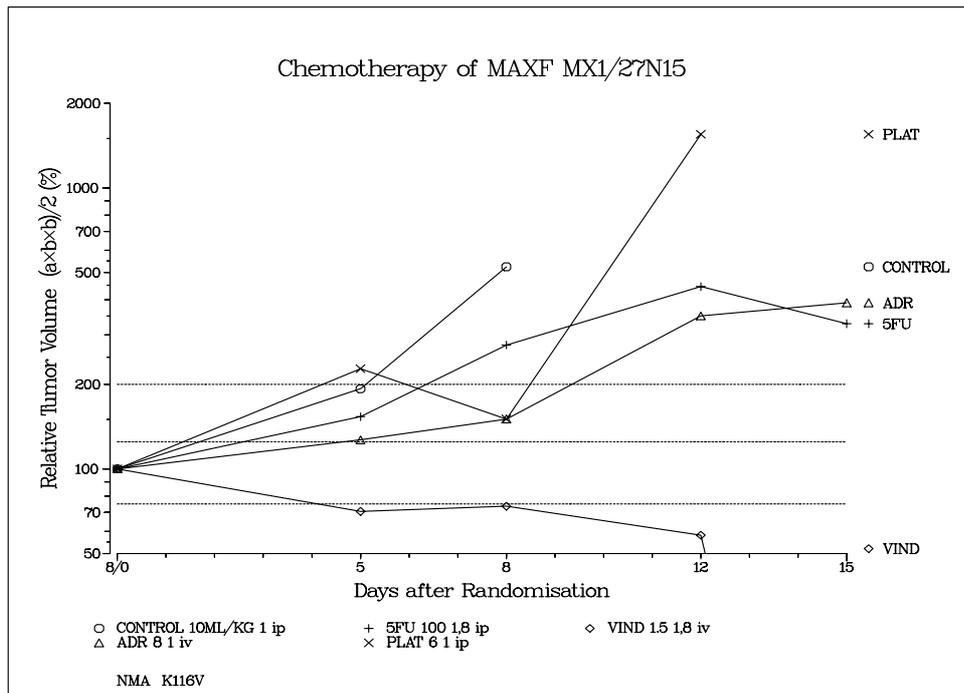


Abb. 4.3.15. Chemotherapie von MAXF MX 1 im Quartettmodell
 ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

Die Tumoren der Kontrollgruppe (Abb. 4.3.15., o) proliferierten bis Tag 5 nur relativ langsam, wuchsen dann bis VT 8 aber exponentiell und verdoppelten ihr Volumen zweimal.

Die Cisplatintherapie hatte von VT 0 bis VT 5 keinen Effekt, bewirkte von VT 5 bis VT 8 eine Volumenabnahme, um den Tumor anschließend gänzlich unbeeinflusst zu lassen (Abb. 4.3.15., x). Der optimale T/C lag an VT 8 mit 28.7%.

Unter 5-FU Therapie (Abb. 4.3.15., +) wuchs der Tumor kontinuierlich langsamer als die Kontrolle. Von VT 12 bis VT 15 war ein leichter Rückgang im Tumolvolumen zu verzeichnen. Der optimale Effekt wurde an Tag 8 mit einem T/C von 52.7 gemessen.

Das Endvolumen der Adriamycintherapie (Abb. 4.3.15.Δ) war zwar größer als das der 5-FU-Therapie, die Wachstumsverzögerung gegenüber der Kontrolle manifestierte sich aber bis VT 12 deutlicher: An VT 8 wurde ein T/C von 28.7% erreicht.

Alle drei obengenannten Therapien wurden klinisch als Tumorprogression eingestuft.

Die Wachstumskurve der Vindesintherapie (Abb. 4.3.15.,◇) endet mit VT 12, da der Tumor nach diesem Zeitpunkt nicht mehr meßbar war. Klinisch entsprach dies einer kompletten Remission mit einem T/C von 0% ab VT 15.

Auch MAXF MX 1 reagierte im Quartettmodell auf unterschiedlichste Art und Weise auf die Chemotherapie, was seine erhaltene Reagibilität verdeutlichte.

Zusammenfassend lies sich feststellen, daß jedes der Xenografts deutlich auf die Therapie mit den einzelnen Substanzen reagieren konnte.

4.3.6. Vergleich der Chemosensitivität

Um zu untersuchen, inwieweit durch die Anwesenheit von jeweils drei anderen Tumoren auf derselben Nacktmaus die Reaktion der Xenografts auf Therapie mit Standardchemotherapeutika beeinflusst werden kann, wurden die im Quartettmodell erzielten Ergebnisse der vier antineoplastisch wirksamen Substanzen Adriamycin, 5-FU, Cisplatin und Vindesin mit deren bereits bekannten Wirksamkeitsdaten aus Einzelimplantationen verglichen.

Als Vergleichswerte dienten die optimalen T/C Werte sowie die Einstufung im Aktivitätsbewertungssystem (Erklärung der Begriffe siehe Kapitel 3.11.2).

Tab. 4.3.5. Chemosensitivitätsvergleich Tumorquartett II

Tumor	Standard-chemotherapeutikum	Einzelimplantation		Vierfachimplantation	
		Aktivitätsbewertung	T/C ^e	Aktivitätsbewertung	T/C ^e
OVXF 899	ADR ^a	+	43%	+	30.6%
	5-FU ^b	-	76%	-	72.3%
	PLAT ^c	-	55.2%	-	56.5%
	VIND ^d	-	53.6%	+	11.6%
RXF 944LX	ADR	+	29%	+++	2%
	5-FU	+	43.5%	-	67.8%
	PLAT	+++	10%	+	25.9%
	VIND	+++	CR	+++	4.5%
XF 575	ADR	+	21.1%	+	42.9%
	5-FU	-	52.8%	+	42.3%
	PLAT	+	35.1%	-	66.1%
	VIND	++	10.2%	++	16.4%
MAXF MX 1	ADR	+	49.4%	+	28.7%
	5-FU	-	52%	-	52.7%
	PLAT	++	4.6%	+	28.7%
	VIND	+++	1.4%	+++	0%CR

^a: Adriamycin; ^b: 5-Fluoruracil; ^c: Cisplatin; ^d: Vindesin; ^e: optimaler Wert

Tabelle 4.3.5. stellt die erzielten Wirksamkeitsdaten aus Vierfach- und Einzelimplantation einander gegenüber.

Beim Vergleich aller vier Tumoren und der Ergebnisse aller vier Testsubstanzen ließen sich folgende Übereinstimmungen feststellen:

- Ergebnisse innerhalb derselben 50% T/C und Beurteilung aktiv (+ - +++) oder inaktiv (-): **12 / 16 (75%)**
- Ergebnisse innerhalb 20% T/C: **9 /16 (56%)**
- Ergebnisse innerhalb 10% T/C: **6 / 16 (37.5%)**

Bei Betrachtung der einzelnen Xenografts war MAXF MX 1 der Tumor mit der größten Übereinstimmung. Alle Werte lagen innerhalb derselben 50% T/C und hatten die gleiche Aktivitätseinstufung. Zwei der Werte waren mit 0.7% bzw. 1.4% Differenz fast identisch.

Die anderen beiden Substanzen lagen in ihren Ergebnissen nur etwas mehr als 20% auseinander (20.7% und 24.1%).

Von den vier Tumoren dieses Quartetts hat MAXF MX 1 die höchste Wiedererkennungsrate für klinisch aktive Substanzen (Ovejera, 1987).

RXF 944LX zeigte im Quartettmodell drei Übereinstimmungen bezüglich der Aktivitätsbeurteilung. Die schwache Aktivität von 5-FU wurde in diesem Modell nicht erkannt, allerdings lagen auch hier die beiden Werte innerhalb derselben 50% T/C (24.3% Differenz). Die Komplettremission durch Vindesintherapie wurde annähernd erreicht.

OVXF 899 erkannte die Aktivität von drei Substanzen wieder. Die T/C Werte für 5-FU und Cisplatin waren fast identisch. Auch die Aktivität von Adriamycin wurde zufriedenstellend dargestellt.

Eine relativ große Diskrepanz wiesen die Ergebnisse der Vindesintherapie auf: während der Tumor im Quartettmodell deutlich reagierte, war in Einzelimplantationen nur ein grenzwertiger T/C erzielt worden.

XF 575 lag im Quartettmodell nur bezüglich der Aktivität von zwei Substanzen richtig.

Im Fall von 5-FU betrug die T/C Differenz allerdings lediglich 10.5%, die aber gerade im Bereich der Wirksamkeitsgrenze lagen.

Der deutlichste Unterschied war bei der Cisplatintherapie aufgetreten, wo die Aktivität der Substanz durch das Leberzellkarzinom im Quartettmodell nicht reproduziert werden konnte. In dieser Therapiegruppe war allerdings erhebliche Toxizität aufgetreten und der zweite Therapiezyklus konnte aufgrund des kurzen Zeitfensters nicht appliziert werden.

Bei der Betrachtung der Wiedererkennung der Wirksamkeit der einzelnen Substanzen schnitt Adriamycin mit einer 100%igen Reproduktion der generellen Aktivität am besten ab. Allerdings wurden hier in drei Fällen Differenzen von über 20% erzielt.

Die Wirksamkeit von Vindesin gegenüber dreier Xenografts war auf 10% genau nachweisbar, während bei OVXF 899 der größte Unterschied aller Vergleiche auftrat.

Die Wirksamkeit von Cisplatin war ebenfalls dreimal reproduzierbar.

Die geringste Übereinstimmung trat bei 5-FU auf. In zwei Fällen wurde im Quartettmodell die Aktivität falsch eingestuft. Mit einer maximalen Differenz von 24.3% lagen jedoch auch hier die Ergebnisse nicht allzuweit auseinander. Die Aktivität lag bei drei Tumoren im Grenzbereich, was zur hohen Fehlerrate bei diesem Kriterium führte.

Im Quartettmodell konnte das Therapieschema der Standardsubstanzen nicht vollständig durchgeführt werden. Unter diesen Umständen überraschte es nicht, daß RXF 944LX und XF 575 in drei Fällen weniger sensibel reagierten. MAXF MX 1 zeigte je zweimal mehr und weniger Wachstumshemmung als bei alleiniger Implantation. OVXF 899 dagegen zeigte sich gegenüber drei Substanzen sensibler als in der Einzelimplantation.

4.3.7. Histologischer Vergleich

Zur Überprüfung der Beibehaltung morphologischer und histologischer Besonderheiten der Xenografts nach Vierfachimplantation wurden die HE-gefärbten histologischen Präparate der vier Xenografts des Quartetts anhand charakteristischer Kriterien mit dem HE-gefärbten Schnitt eines einzeln auf der Nacktmaus gewachsenen Tumors verglichen.

Als morphologische Kriterien dienten Charakteristika, die beim ursprünglichen Resektat beschrieben worden waren (siehe Tab. 3.1. Kap. 3.2.) und auf dem Vergleichspräparat wiedergefunden werden konnten (siehe Tab. 4.3.7.1.- 4.3.7.4.)

Es wurden in erster Linie Areale vitalen Tumorgewebes in der Nähe der Tumorkapsel, die durch eine ausreichende Gefäßdichte gut mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt schienen, miteinander verglichen.

Die bei jedem Xenograft ab einem gewissen Volumen auftretende zentrale Nekrose wurde nicht bewertet.

Das quantitative Vorkommen vitalen Tumorgewebes konnte anhand der HE Schnitte nur grob geschätzt werden.

4.3.7.1. Histologischer Vergleich RXF 944LX

Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten): kleinzelliges Nierenzellkarzinom
Histologische Charakteristika des Xenografts: 1. Gewebestruktur: teils trabekulär angeordnete epitheliale Zellen , teils Zellhaufen 2. weitgehend gleichförmige Zellen mit hellem, basophilem Zytoplasma 3. wenige Zellteilungsfiguren 4. Kernpolymorphie, hyperchromatische Zellkerne mit großen, eosinophilen, häufig multiplen Nukleoli, heller Hof um Kernkörperchen, vesikuläre Kernstrukturen 5. viele Gefäße

Tab. 4.3.7.1. Vergleichskriterien der histologischen Untersuchung von RXF 944LX

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 24N10)

- Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 25N11)
- Lokalisationskonstellationen 1-4 (Passage 23N9)
- Wachstumsstudie (Passage 24N10)
- Standardchemotherapieversuch (Passage 26N12)
- Naturstoffversuch (Passage 25N11)

Die in den Abbildungen 4.3.16. und 4.3.17. eingefügten Ziffern entsprechen den Merkmalen in Tab. 4.3.7.1. Die beim Ursprungsresektat beschriebene und im Vergleichspräparat

angesprochene relativ undeutliche Gewebestruktur des kleinzelligen Nierenzellkarzinoms mit trabekulär angeordneten Tumorzellen neben ungeordneten Zellansammlungen (Tab. 4.3.7.1. Punkt 1.) war in allen histologischen Präparaten der Mehrfachimplantationen (hier repräsentiert durch Abb. 4.3.17.) vorhanden.

Die zytologischen Merkmale der Tumorzellen (Tab. 4.3.7.1. 2.+ 4.) konnten in allen Präparaten klar identifiziert werden.

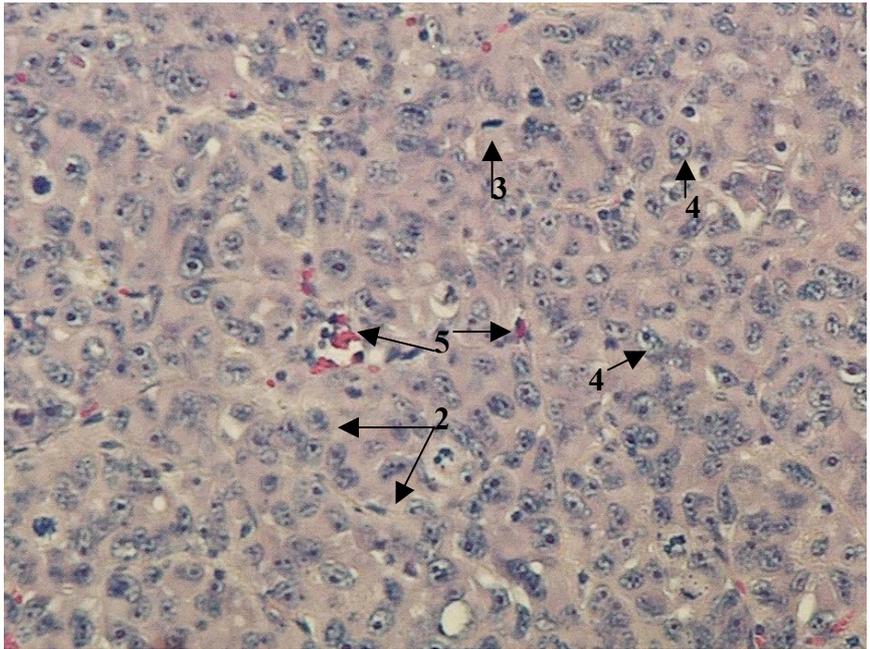


Abb. 4.3.16. HE-gefärbter Paraffinschnitt von RXF 944LX aus der Einzelimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-5 siehe Tab. 4.3.7.1

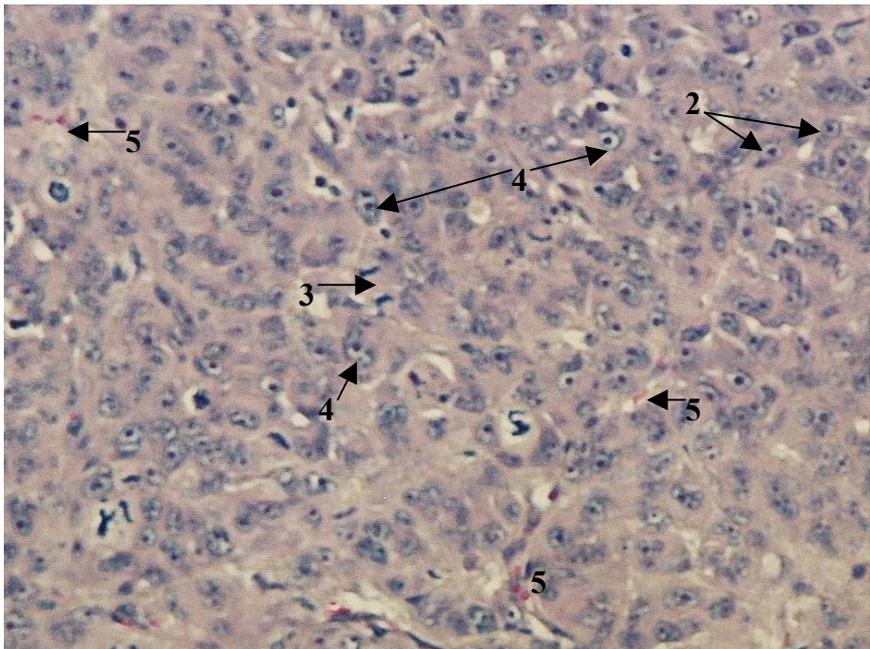


Abb. 4.3.17 HE-gefärbter Paraffinschnitt von RXF 944LX im Tumorquartettmodell (Kontrollgruppe Standardchemotherapie), (Objektvergrößerung 20 x) 1-5 siehe Tab.4.3.7.1.

Die Anzahl der Mitosen variierte zwischen den einzelnen Präparaten und den jeweils betrachteten angeschnittenen Bezirken von keiner erkennbaren bis zu vielen auffindbaren Zellteilungsfiguren (Tab. 4.3.7.1. 3.). Die fotografierten Ausschnitte zeigen vergleichbare Anzahlen mitotischer Kerne in der Einzel- und Mehrfachimplantation (Abb. 4.3.16. und Abb. 4.3.17.).

Beide Abbildungen (Abb. 4.3.16. und Abb. 4.3.17.) zeigen Fotos der 200fach vergrößerten HE-Schnitte des Xenografts aus der Einzelimplantation (Abb. 4.3.16.) und dem Tumorquartettmodell (Abb. 4.3.17.).

Eines der prägnanten Merkmale dieses Xenografts, die sehr prominenten, häufig multiplen Nukleoli mit dem sie umgebenden hellen Hof, ist in beiden Fotografien deutlich zu erkennen. Das Tumorstroma ist hier nur schwach ausgebildet. In beiden Bildern sind längs- und querschnittene Kapillaren zu sehen.

Bezüglich des Verhältnisses zwischen vitalem Tumorgewebe (Kapsel) und zentraler Nekrose schienen alle Schnitte gemäß der Tumorgröße und der angeschnittenen Fläche ähnliche Proportionen aufzuweisen.

Anhand der hier erstellten Kriterien wurde das Nierenzellkarzinom in jedem Präparat klar erkannt und es konnten keine bedeutenden Veränderungen des histologischen Bildes in den Mehrfachimplantationen festgestellt werden.

4.3.7.2. Histologischer Vergleich OVXF 899

Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten): mittel bis hochdifferenziertes, papillär – seröses Karzinom des Ovars
Histologische Charakteristika des Xenografts: 5. Tumorzellansammlungen durch Stromaadern in Trabekel und teilweise drüsenartige Strukturen unterteilt 6. Kernpolymorphismus: teils große rundliche Kerne, in drüsigen Arealen eher ovale Kerne; Kernwandhyperchromasie; undeutlichen Nukleoli 7. verschwommen wirkendes Zytoplasma, Zellgrenzen kaum erkennbar 4. nur vereinzelte Mitosen

Tab. 4.3.7.2. Vergleichskriterien der histologischen Untersuchung von OVXF 899

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 40N15):
Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 44N19)
Lokalisationskonstellationen 1-4 (42N17)
Wachstumsstudie (43N18)
Standardchemotherapieversuch (45N20)
Naturstoffversuch (46N21)

Die in die Abbildungen eingefügten Ziffern entsprechen den Merkmalen in Tabelle 4.3.7.2.

In sämtlichen HE-Schnitten bis zum Präparat aus dem Naturstoffversuch waren die ursprünglich beschriebenen und im Vergleichspräparat wiedergefundenen histologischen (Tab. 4.3.7.2. Punkt 1.) und zytologischen (Tab. 4.3.7.2. 2., 3., 4.) Merkmale identifizierbar. Mit zunehmender Passagezahl nahm der drüsige Charakter des Xenografts zu, das Tumorstroma wurde breiter und es traten vermehrt Gewebezwisehräume (Kavernen, Drüsenlumina), die meist amorphes Material und Zelltrümmer enthielten, auf.

Abb. 4.3.19. zeigt einen Ausschnitt des Präparats eines Xenografts aus dem ersten Naturstoffversuchs, in dem der Xenograft bedeutend langsamer wuchs. In diesem Präparat war kaum eine drüsige Struktur mehr zu erkennen. Der HE-Schnitt zeigte eine ausgeprägte Unterteilung des Tumorgewebes durch Fibrozyten und Kollagenfasern enthaltendes Tumorstroma, das stärker ausgebildet war, als in den anderen Präparaten (Abb. 4.3.19. S). Die breiten Stromastreifen enthielten zum Teil größere Mengen amorphen hyalinen Materials (**H**). Drüsenlumina waren nicht zu finden. Die Tumorzellen zeigten weniger Kernpolymorphismus. Die weitgehend gleichartigen Zellen hatten im Vergleich (mit Abb. 4.3.18. und Abb. 4.3.20.) größere, meist rundliche Kerne (**K**), die eine sehr deutliche Kernwandhyperchromasie (Abb. 4.3.19. **W**) aufwiesen und prominentere Nukleoli hatten, als das Vergleichspräparat. Das Zytoplasma (**Z**) der Zellen war in den meisten Arealen weniger gut anfärbbar. Mitosefiguren waren in diesem Präparat nicht zu erkennen (Abb. 4.3.19.).

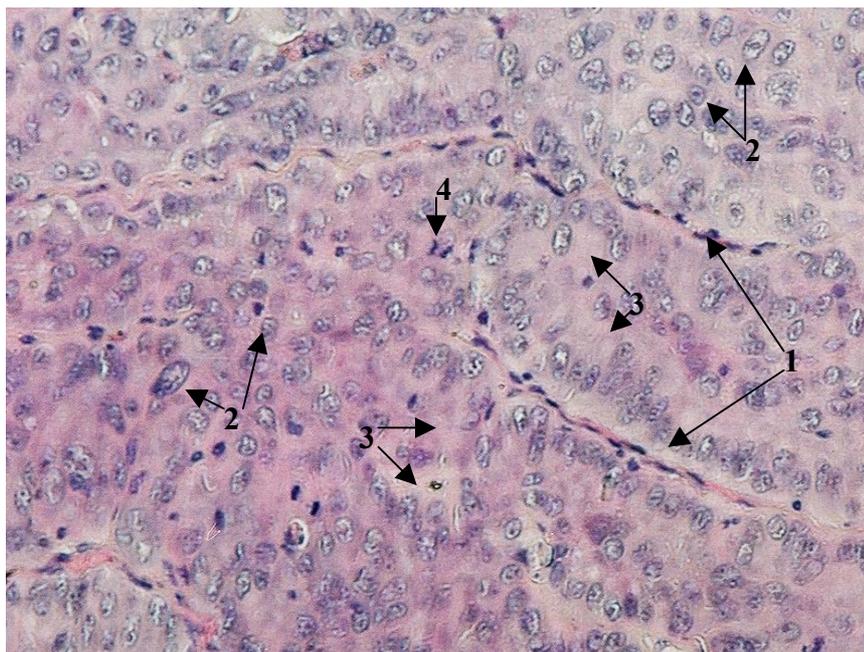


Abb. 4.3.18. HE-gefärbter Paraffinschnitt von OVXF 899 aus der Einzelimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-4-siehe Tab. 4.3.7.2.

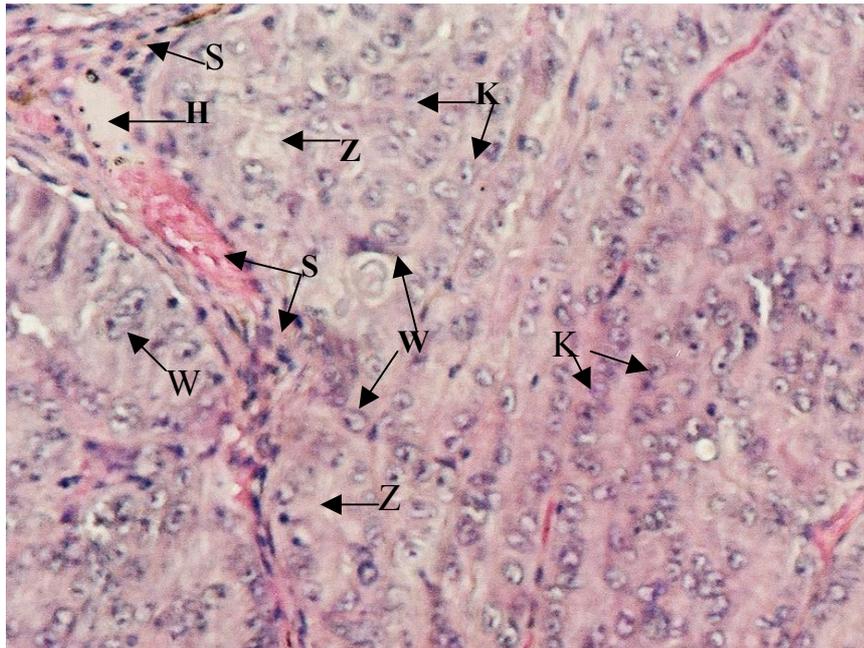


Abb. 4.3.19. HE-gefärbter Paraffinschnitt von OVXF 899 im Tumorquartettmodell Kontrollgruppe Naturstoffversuch 1, (Objektvergrößerung 20 x)
S = Stroma; H = hyalines Material; W = Kernwandhyperchromasie; K = rundliche Kerne;
Z = Zytoplasma

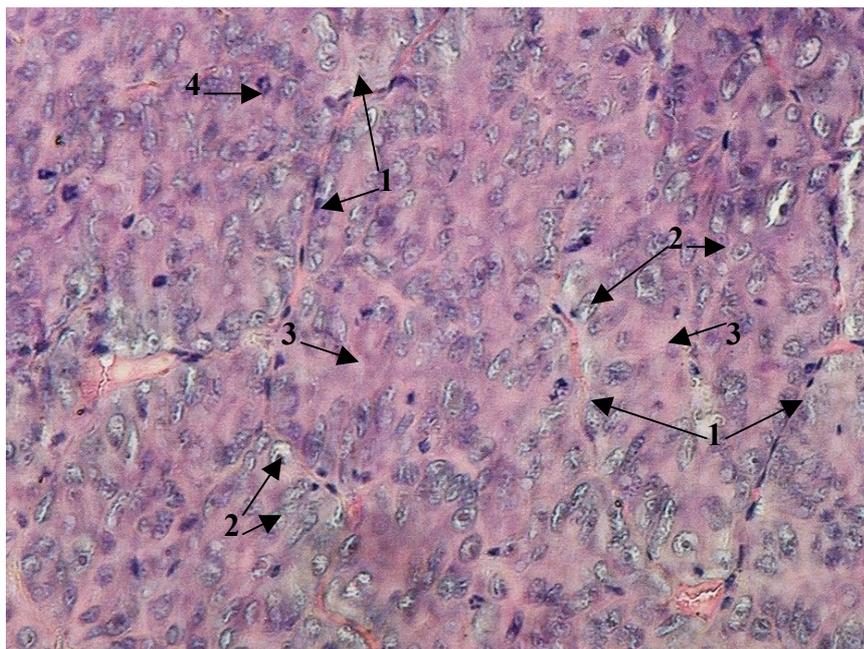


Abb. 4.3.20. HE-gefärbter Paraffinschnitt von OVXF 899 im Tumorquartettmodell Naturstoffversuch 2, (Objektvergrößerung 20 x); 1-4 siehe Tab.4.3.7.2.

Abbildung 4.3.20. zeigt den Anschnitt des neu aufgetauten OVXF 899 in niedrigerer Passage, der für den zweiten Naturstoffversuch implantiert wurde. Das histologische Bild gleicht wieder dem Vergleichspräparat (Abb. 4.3.18.). Alle Abbildungen zeigen 200fache Vergrößerungen der HE-gefärbten Paraffinschnitte. OVXF 899 hatte sich im Verlauf der Versuche erst minimal, im ersten Naturstoffversuch in Passage 46 aber deutlich in seinem

makroskopischen (das Xenograft hatte eine hellere Farbe und derbere Konsistenz als die vorherigen Passagen) und histologischen Aussehen verändert.

4.3.7.3. Histologischer Vergleich MAXF MX 1

Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten): infiltrativ wachsendes duktales Mammakarzinom
Histologische Charakteristika des Xenografts: 1. Gewebestruktur: ungeordnete Zellansammlungen, dazwischen nekrotische Areale, wenig erkennbares Tumorstroma 2. polygonale Zellen mit hellem Zytoplasma, undeutliche Zellgrenzen 3. große rundliche, zentralständige Zellkerne mit deutlichen Nukleoli, teilweise Kernwandhyperchromasie 4. viele Zellteilungsfiguren (zum Teil atypisch)

Tab. 4.3.7.3. Vergleichskriterien der histologischen Untersuchung von MAXF MX 1

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 24N12)

Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 26N14)
Lokalisationskonstellationen 1-4 (24N12)
Wachstumsstudie (25N13)
Standardchemotherapieversuch (27N15)
Naturstoffversuch (32N18)

Bei diesem wenig differenzierten Mammakarzinom waren die histologischen Merkmale (Tab. 4.3.7.3. Punkt 1.) schon im Vergleichspräparat relativ unspezifisch.

In der Aufsicht boten die Xenografts aus den Mehrfachimplantationen eine mit der Einzelimplantation vergleichbare ungeordnete histologische Struktur (Abb. 4.3.22.).

Die zytologischen Kriterien wurden von allen untersuchten HE-Schnitten erfüllt (Tab. 4.3.7.3. 2.,3.).

In beiden fotografischen Abbildungen (Abb. 4.3.21. und Abb. 4.3.22.) sind Mitosefiguren abgebildet, die einen atypischen Eindruck machen (Y- bzw. sternförmige Formen in der Metaphase). Die Histologien zeigen die geringe Unterteilung der Xenograftzellansammlungen durch Tumorstroma.

Mit der hier angewandten Untersuchungsmethode des mikroskopischen Vergleichs anhand histologisch charakterischer Merkmale konnte in *keinem der Präparate* ein Unterschied zum Vergleichspräparat (Abb. 4.3.21.) gefunden werden.

Es sind jeweils Vergrößerungen der HE gefärbten Paraffinschnitte, die unter Verwendung eines 20er Objektivs aufgenommen wurden, abgebildet.

Die in die Abbildungen eingefügten Ziffern entsprechen den Merkmalen in Tab. 4.3.7.3.

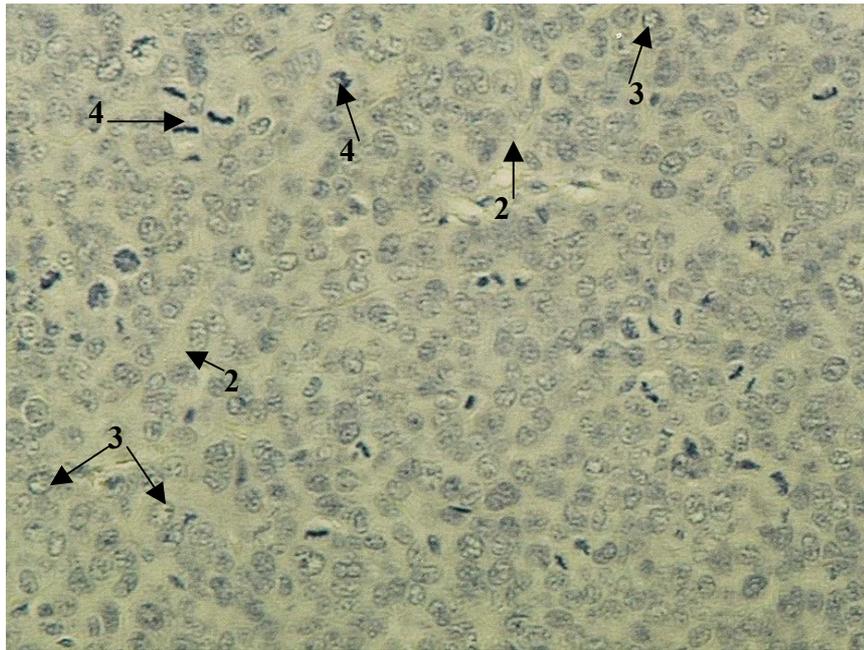


Abb. 4.3.21. HE-gefärbter Paraffinschnitt von MAXF MX 1 aus der Einzelimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-4 siehe Tab. 4.3.7.3.

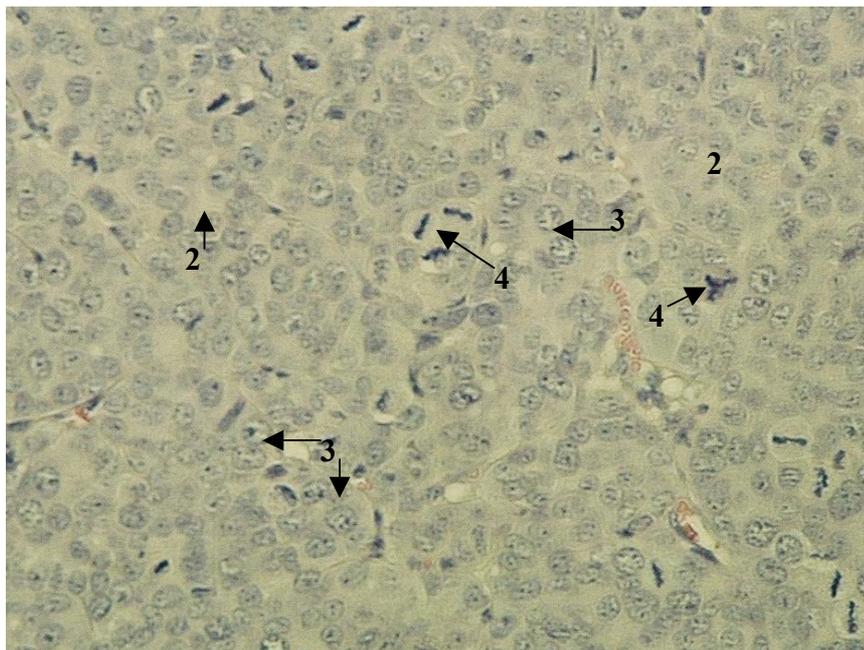


Abb. 4.3.22 MAXF MX 1 im Tumorquartettmodell (Kontrollgruppe Naturstoffversuch), (Objektvergrößerung 20 x); 1-4 siehe Tab. 4.3.7.3.

4.3.7.4 Histologischer Vergleich XF 575

Die beim Ursprungsresektat beschriebene und im Vergleichspräparat vorhandene typische kavernöse Gewebestruktur des Lebertumors (Tab. 4.3.7.4 Punkt 1.) waren in allen histologischen Präparaten der Mehrfachimplantationen (Abb. 4.3.24.) auffindbar.

Die eingefügten Ziffern in den Abbildungen entsprechen den Merkmalen in Tab. 4.3.7.4.

In manchen HE-Schnitten stellten sich die Kavernen oder Lumina weniger deutlich als im Vergleichsschnitt (Abb. 4.3.23.) dar oder enthielten weniger oder keinen amorphen Inhalt (Tab.4.3.7.4., 2.).

Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten):

hepatozelluläres Karzinom

Histologische Charakteristika des Xenografts:

1. kavernöse Gewebestruktur
2. Lumina mit amorphem eosinophilen Inhalt (Erythrozytentrümmer und Zelldetritus)
3. epitheliale, zylindrische, adenoide Zellen mit hellem eosinophilem Zytoplasma, fadenähnliche Zellausläufer ins Lumen hinein
4. rundliche basalständige und eher ovale lumennahe Zellkerne
5. vereinzelte Mitosen

Tab. 4.3.7.4. Vergleichskriterien der histologischen Untersuchung von XF 575

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 11N7)

Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 12N8)
Lokalisationskonstellationen 1-4 (Passage 10N6)
Wachstumsstudie (11N7)
Standardchemotherapieversuch (13N9)
Naturstoffversuch (20N16)

In diesen Präparaten war die adenoide Anordnung des Tumors mit auf Basalmembranen angeordneten epithelialen Zellen trotz der fehlenden Lumina und des enger gedrängten Gewebes erhalten. Innerhalb eines HE-Schnittes konnten zwischen verschiedenen betrachteten Arealen ebenfalls größere Unterschiede bezüglich dieses Merkmals gefunden werden.

Die zytologischen Merkmale der Tumorzellen (Tab. 4.3.7.4. 3.und 4.) konnten in allen Präparaten klar identifiziert werden.

Bei vergleichbar großen lumenbildenden Zellverbänden wurde stets eine ähnliche Anzahl an Mitosefiguren beobachtet (Tab. 4.3.7.4., 5.). Abbildung 4.3.24. läßt im fotografierten Ausschnitt der Mehrfachimplantation mehr Mitoseformen als im Vergleichsschnitt der Einzelimplantation (Abb. 4.3.23.) erkennen.

Anhand der hier erstellten Kriterien wurde das hepatozelluläre Karzinom in jedem Präparat klar erkannt und es konnten keine bedeutenden Veränderungen des histologischen Bildes in den Mehrfachimplantationen festgestellt werden. Die beobachteten Unterschiede bei der Ausprägung der Gewebzwischenräume wurden auf zufällige Anschnitte verschiedener Xenograftareale zurückgeführt.

Es handelt sich in beiden Fällen um Photographien der HE-gefärbten Paraffinschnitte, die unter Verwendung eines 20er Objektivs aufgenommen wurden.

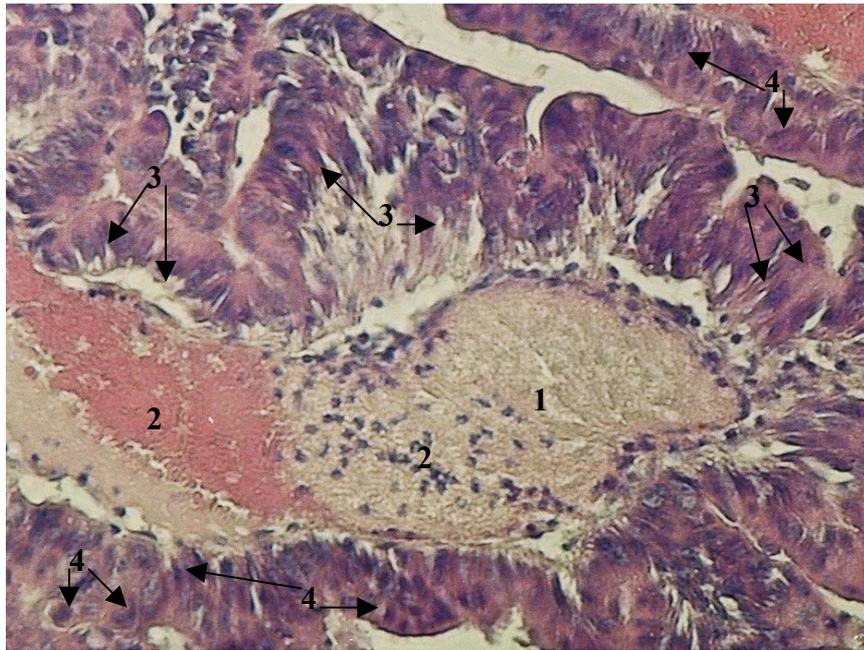


Abb. 4.3.23 XF 575 in der Einzelimplantation (Objektvergrößerung 20 x)
1-5 siehe Tab.4.3.7.4.

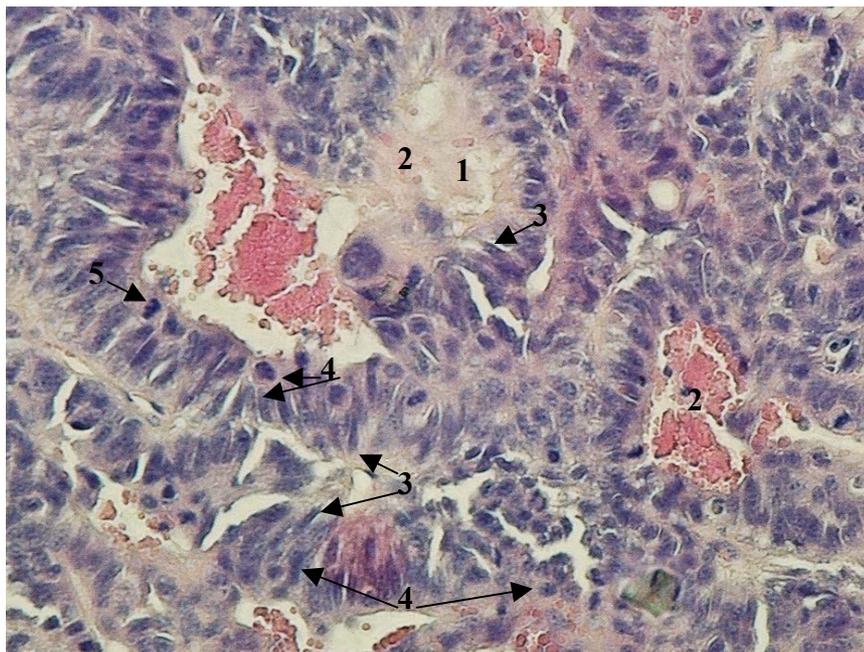


Abb. 4.3.24 XF 575 im Tumorquartettmodell (Objektvergrößerung 20 x)
1-5 siehe Tab. 4.3.7.4.

Während RXF 944LX, MAXF MX 1 und XF 575 ihr charakteristisches histologisches und zytologisches Bild in den Mehrfachimplantationen beibehielten und mit den hier angewandten Untersuchungen keine grundlegende Veränderung festgestellt werden konnte, war bei OVXF 899 eine gravierende (siehe Abb. 4.3.19. und Text) Veränderung zu beobachten. Diese Beobachtung stand mit der veränderten Wachstumskinetik des Xenografts in Einklang (siehe Wachstumsstudie und Vergleich der Wachstumsdaten Kap.4.3.3. und Kap.4.3.4.).

4.3.8. Fotografische Abbildungen der Nacktmäuse

Zur Veranschaulichung der subkutanen Tumorlokalisationen und des Wachstums der Xenografts wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Fotografien der tumortragenden Nacktmäuse aufgenommen. Die Bilder stammen von Tieren der Wachstumsstudie in der OVXF 899 noch schnell proliferierte.

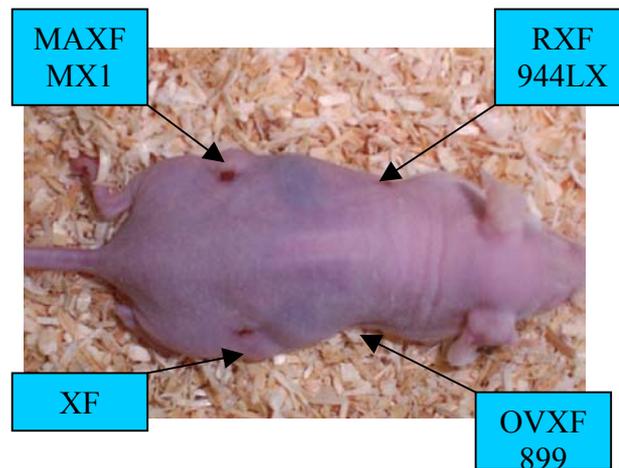


Abb. 4.3.25. Nacktmaus 6 Tage nach der Implantation von Tumorquartett II

Weniger als eine Woche nach der Operation sind die vier Inzisionswunden bereits weitgehend verheilt. Die implantierten Fragmente von RXF 944LX und OVXF 899 sind auf diesem Bild schwer zu erkennen, da sie sich relativ weit ventral über dem Brustkorb befinden.

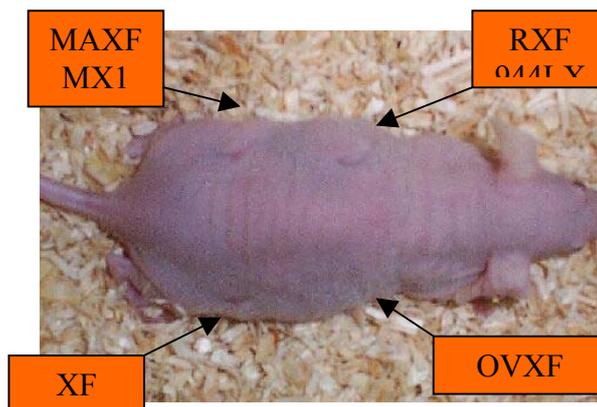


Abb. 4.3.26. Nacktmaus 9 Tage nach der Implantation von Tumorquartett II

Drei Tage später sind die subkutanen Umfangsvermehrungen aller vier Xenograftfragmente deutlich zu erkennen und die Tumoren erfüllen die Vitalitätskriterien (Abb. 4.3.26). Während die vorderen Xenografts (RXF 944LX und OVXF 899) im Vergleich zum ersten Bild

(Abb. 4.3.25.) ihr Volumen vergrößert haben, sind die Umfangsvermehrungen von MAXF MX1 und XF 575 kleiner geworden (Resorption avitalen Tumorgewebes und Ödemflüssigkeit). Diese Maus konnte an Tag 7 (also zwei Tage vor dieser Aufnahme) randomisiert werden.

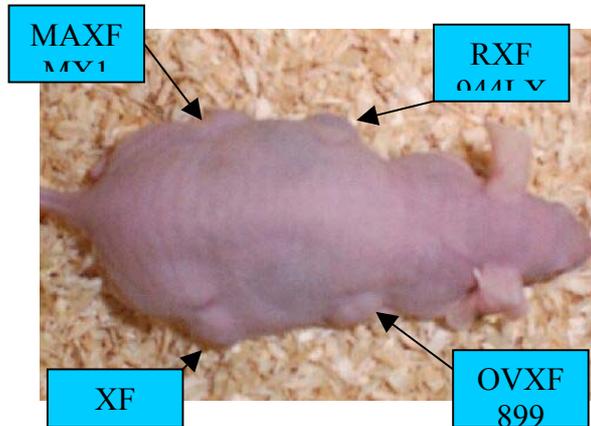


Abb. 4.3.27. Nacktmaus 13 Tage nach der Implantation von Tumorquartett II

Bereits 5 bis 6 Tage nach dem Versuchsanfang sind bei allen vier Tumoren Volumenzunahmen von über 400% zu beobachten. Bei RXF 944LX ist die charakteristische, durch die hohe Gefäßdichte bedingte blaviolette Färbung des Xenografts zu erkennen.

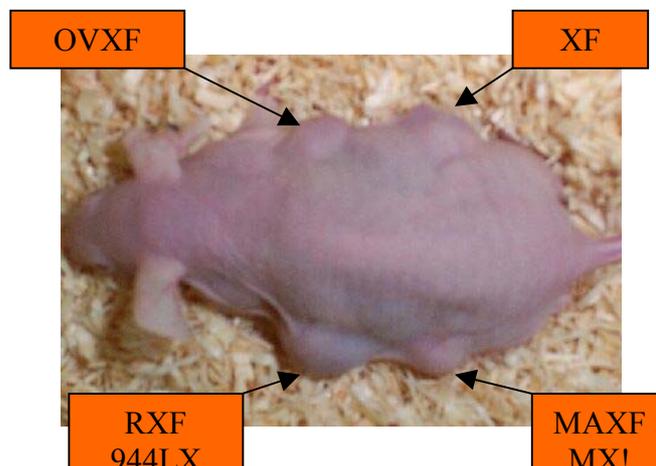


Abb. 4.3.28. Nacktmaus 17 Tage nach Implantation von Tumorquartett II (Versuchsende)

Durch das rasante exponentielle Wachstum von RXF 944LX ist hier bereits nach 10 Versuchstagen die maximal tolerable Tumorlast erreicht. Alle vier Xenografts haben ihr Volumen mehrfach verdoppelt und haben ein vergleichbares absolutes Endvolumen (ca.750 mm³) erreicht. Die Nacktmaus zeigt einen guten Ernährungszustand und ungestörtes Allgemeinbefinden.

4.3.9. Endbeurteilung der Etablierung des Tumorquartetts II

Die in den verschiedenen Studien mit den Xenografts des Tumorquartettsmodells II erzielten Ergebnisse sollen hier an dem Maßstab der fünf in Kapitel 3.6 aufgelisteten Etablierungskriterien gemessen werden und so die Eignung des Modells für die geplanten Substanztestungen (Naturstoffe) überprüft werden.

Die Wachstumsstudien (Doppel- Lokalisations- und Quartettwachstumsstudien) wurden hier nur mit den ersten drei Kriterien (Wachstumsparameter) verglichen. Das histologische Bild der in diesen Studien verwandten Xenografts wurde in einem eigenen Abschnitt ausgewertet.

In der **Doppelimplantationsstudie** konnten 22 der eingesetzten 24 Tiere auch an der Studie teilnehmen (Angehensrate 75-100%, Gesamtangehensrate: 92%).

Das Therapiezeitfenster war 10 bis 14 Tage lang, was zwei und sechs Tage Nachbeobachtungszeit nach der letzten Applikation einer Substanz im Schema d: 0, 4, 8 erlaubt hätte.

Beim raschen Wachstum der hier implantierten Xenografts konnte das Tumormodell nur als Schnelltest dienen, wobei zwei Tage Nachbeobachtung sowohl für antitumorale als auch für toxische Wirkungen eine zu kurze Beobachtungszeit sein kann.

Alle vier Xenografts erreichten in den sechs möglichen Kombinationen ein Wachstum auf mindestens 400% des Ausgangsvolumens.

Während RXF 944LX in Anwesenheit aller drei anderen Tumoren sehr konstant wuchs, zeigte OVXF 899 in Anwesenheit von MAXF MX 1 eine Wachstumsverlangsamung. MAXF MX 1 und XF 575 zeigte bei gleichzeitigem Wachstum auf einer Nacktmaus eine schnellere Tumorprogression als in den anderen Kombinationen.

Das Erreichen der beiden Volumenverdopplungen wurde nicht wesentlich behindert und es bestand keine offensichtliche Abhängigkeit der Wachstumsbeeinflussung von der Tumormasse des zweiten Xenografts.

Bei der **Lokalisationsstudie** wurde in Gruppe drei mit zwei geeigneten von fünf implantierten Mäusen nur eine Angehensrate von 40% erreicht und damit das Etablierungskriterium in dieser Gruppe verfehlt.

Gruppe 4 erreichte mit 3 einsetzbaren von 5 implantierten Mäusen nur knapp den Mindestwert von 60%.

Das Therapiezeitfenster war mit neun Tagen für das geplante Versuchsschema von drei Applikationen an den Tagen 0, 4 und 8 sehr kurz.

In allen Gruppen wurden die beiden geforderten Volumenverdopplungen erreicht.

Zwischen den Gruppen bestanden Unterschiede in den Verdopplungszeiten der vier Xenografts, die keine einheitliche Tendenz der Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von einem bestimmten Implantationsort oder der konstanten negativen Beeinflussung eines Xenografts durch einen anderen Tumor erkennen ließen.

Die für die **Studie des Wachstumsverhaltens** eigens implantierten und die ausgewertete Kontrollgruppe der Standardchemotherapiestudie sollen hier getrennt von der Auswertung der beiden Naturstoffversuche betrachtet werden, da sich bei den Naturstoffversuchen das Wachstum von OVXF 899 entscheidend geändert hat.

Diese ersten beiden Versuche hatten mit 18/20 Tieren (90%) und 26/30 Tieren (86.7%) und einem Gesamtwert von 88% eine sehr gute Angehensrate.

Das Therapiezeitfenster war mit 8 und 11 Tagen sehr kurz.

Alle Tumoren verdoppelten ihr Volumen mindestens zweimal. Die Tumoren zeigten in beiden Gruppen eine zufriedenstellende Wachstumssynchronizität und die Verdopplungszeiten der jeweiligen Xenografts unterschieden sich bei den beiden Implantationen nur unwesentlich.

Die beiden Naturstoffversuche hatten Angehensraten bei 29 und 34 einsetzbaren Nacktmäusen von insgesamt 40 implantierten Nacktmäusen (72.5% und 85%).

Die Therapiezeitfenster waren 11 und 10 Tage lang.

Die untypisch lange Versuchsdauer im ersten Versuch ergab sich aus dem späteren Erreichen der maximal zulässigen Tumorlast durch die langsame Proliferation von OVXF 899.

Die beiden geforderten Volumenverdopplungen konnten von OVXF 899 in beiden Versuchen nur extrapoliert werden, da die Versuche aufgrund des Erreichens der maximal tolerablen Tumorlast durch das Wachstum anderer Xenografts abgebrochen werden mußten.

Die Verdopplungszeiten waren 400% - 500% länger als in den bisherigen Versuchen. Auch die niedrigere Passage, die im zweiten Versuch eingesetzt wurde, blieb im Wachstum stark hinter der bisher beobachteten Geschwindigkeit zurück.

Die Wachstumskurven der vier Xenografts dieser beiden Kontrollgruppen zeigten eine sehr große Divergenz.

Die zu geringe Angehensrate in einer der Lokalisationsgruppen konnte in Anbetracht der guten Angehensraten in den folgenden Implantationen als einmaliger Ausreißer gewertet werden.

Das sehr kurze Therapiezeitfenster war in Anbetracht der bekannten Wachstumskinetik der beteiligten Xenografts nicht anders zu erwarten. Als Schnelltest im Rahmen eines Primärscreenings mit folgenden Reproduktionen der Ergebnisse in Versuchen mit längerer Beobachtungszeit konnte das Risiko, antitumorale und toxikologische Effekte zu übersehen, in Kauf genommen werden.

Die veränderte Wachstumskinetik von OVXF 899 führte zum Verfehlen des Kriteriums der zwei Volumenverdopplungen im Versuchszeitraum.

Die das Wachstum der Xenografts betreffenden Etablierungskriterien wurden durch das Tumorquartett II somit nicht erfüllt.

In der **Chemoresponsivitätsstudie** demonstrierte jedes der vier Xenografts die Eigenschaft, auf vier verschiedene antineoplastische Therapien unterschiedlich (Tumorprogression bis komplette Remission) zu reagieren.

Beim **Vergleich der Chemosensibilität** der Tumoren im Quartettmodell und in der Einzelimplantation ergab sich eine 75%ige Übereinstimmung bei der Bewertung als aktiv oder inaktiv (innerhalb 50% T/C) und 37.5% der Werte hatten eine geringere Abweichung als 10% T/C.

Diese im Vergleich mit den anderen Tumorquartettmodellen (I und III) recht ungenaue Reproduktion der bekannten Sensibilität relativierte sich bei genauerer Betrachtung.

Viele der bezüglich der Einteilung als aktive oder unwirksame Substanz falschen Ergebnisse lagen im Grenzbereich dieser Einteilung und die T/C Differenz betrug wesentlich weniger als 50%.

Unter Berücksichtigung der kurzen Versuchsdauer und dem daraus resultierenden nicht vollständig durchgeführten Therapieschema ist die erreichte Übereinstimmung der Ergebnisse als zufriedenstellend zu bewerten.

Insbesondere OVXF 899 hatte mit zwei Ergebnissen innerhalb 10% und einem Wert innerhalb 20% T/C bei einer maximalen Abweichung von 42% eine befriedigende Chemosensitivitätsreproduktion.

Das Kriterium der unveränderten Chemosensitivität wird damit als erfüllt angesehen.

Der **histologische Vergleich** der Tumoren aus den Mehrfachimplantationen zeigte bei RXF 944LX, MAXF MX 1 und XF 575 keine bedeutenden Abweichungen des mikroskopischen Bildes im Vergleich zu einem HE-Schnitt eines Xenografts aus einer Einzelimplantation.

Mit geringen Schwankungen wurden die charakteristischen zytologischen und histologischen Merkmale in allen untersuchten HE-Schnitten erkannt.

Der HE-Schnitt von OVXF 899 aus dem ersten Naturstoffversuch zeigte deutliche Abweichungen von den ursprünglichen histologischen und zytologischen Merkmalen. Im folgenden Naturstoffversuch lag bei der neu aufgetauten kleineren Passage wieder das ursprüngliche Bild vor.

Das Kriterium des durchgehend unveränderten mikroskopischen Erscheinungsbildes des Xenografts war damit nicht erfüllt.

In Folge der nicht erfüllten Kriterien der Volumenverdopplungen und des histologischen Bildes galt das Tumorquartettmodell II mit den Xenografts RXF 944LX, OVXF 899, MAXF MX 1 und XF 575 auf weiblichen NMRI Nacktmäusen als nicht etabliert.

Die erhobenen Ergebnisse der beiden Naturstoffversuche wurden im Sinne des Primärscreenings verwandt und durch Reproduktionen mit Mäusen, die nur einen Tumortyp trugen abgesichert.

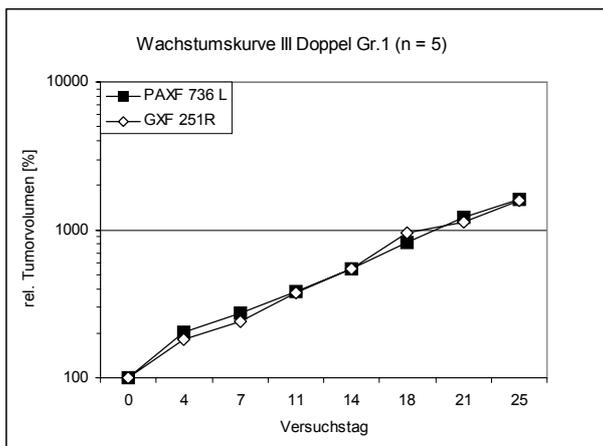
4.4. Ergebnisse der Etablierung des Tumorquartetts III

4.4.1 Doppelimplantationen

Tumorquartett III bestand aus PAXF 736, GXF 251, LXFA 629 und BXF 1299. Um genau zu überprüfen, ob die Xenografts sich gegenseitig im Wachstum beeinflussen und von welchem Tumor eine mögliche Beeinflussung ausgeht, wurden initial alle 6 möglichen 2-fach-Kombinationen der vier Tumoren überprüft und die Ergebnisse im Folgenden beschrieben.

Von 30 implantierten Mäusen konnten 30 an der Studie teilnehmen. Die Induktionszeit betrug 15 Tage. Nach 25 Versuchstagen mußten die Versuche abgebrochen werden, da die maximale Tumormast ($2 \times 1500 \text{ mm}^3$) erreicht war. Die internen Versuchsnummern der Studien waren K436 bis K439. Das Wachstumsverhalten wird im Folgenden als relativer medianer Volumenzuwachs bezogen auf das Ausgangsvolumen am Tag 0 in Form von Liniendiagrammen im logarithmischen Maßstab dargestellt.

Abbildung 4.4.1. zeigt das gleichzeitige Wachstum von PAXF 736 und GXF 251.



Ausgangsvolumen (Median):

PAXF 736/28N25: 79.8 mm^3

GXF 251/21N12: 74.4 mm^3

Verdopplungszeiten in Tagen:

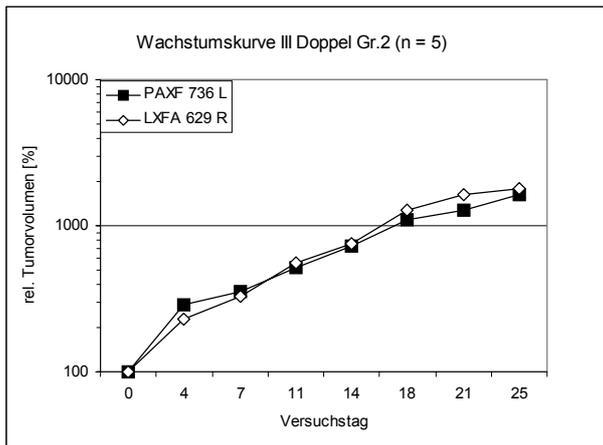
	200%	400%
PAXF 736/28N25:	3.8	11.3
GXF 251/21N12:	5.0	11.4

Angehensrate: 5/5 (100%)

L: linke Flanke; R: rechte Flanke

Abb. 4.4.1. Ergebnis Kombination 1

Beide Xenografts in Kombination 1 (Abb. 4.4.1.) vergrößerten ihr Volumen ab dem ersten Versuchstag exponentiell. Alle implantierten Fragmente entwickelten sich zu vitalen Tumoren. Bei dieser Paarung fielen insbesondere die sehr ähnlichen medianen Werte für Ausgangsvolumen und die beiden Volumenverdopplungen auf. Dieses nahezu identische Wachstumsverhalten führte nicht nur zu zwei parallelen (fast deckungsgleichen) Kurven im Schaubild (Abb. 4.4.1.), sondern auch zu sehr ähnlichen absoluten Volumenwerten (VT 25: GXF 251 990.9 mm^3 , PAXF 736 1218.4 mm^3).



Ausgangsvolumen (Median):
 PAXF 736/28N25: 71.3 mm³
 LXFA 629/20N13: 49.4 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
PAXF 736/28N25:	2.1	8.2
LXFA 629/20N13:	3.0	8.3

Angehensrate: 5/5 (100%)
 L: linke Flanke; R: rechte Flanke

Abb. 4.4.2. Ergebnis Kombination 2

In dieser Kombination konnten die implantierten Fragmente von PAXF 736 und LXFA 629 ab VT 0 als vital erkannt werden und wuchsen ab diesem Zeitpunkt exponentiell (Abb. 4.4.2.).

Die Volumina der beiden Xenografts unterschieden sich mit 45% Volumenunterschied deutlicher als in Kombination 1 (Abb. 4.4.1.). Die Verdopplungszeiten waren bei den beiden Tumoren sehr ähnlich, insbesondere die 400%- Marke wurde fast zum gleichen Zeitpunkt erreicht. Dadurch verliefen auch in dieser Kombination die Wachstumskurven (Abb. 4.4.2.) weitgehend parallel.

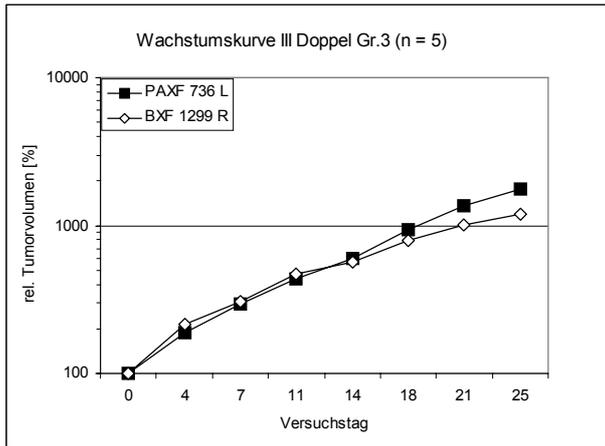
Die absoluten Volumenwerte unterschieden sich bis VT 14 noch recht deutlich (PAXF 736: 545.7 mm³, LXFA 629: 385.1 mm³), näherten sich aber durch das schnellere relative Wachstum von LXFA 629 zum Versuchsende aneinander an (PAXF 736: 1109.4 mm³, LXFA 629: 1094.0 mm³).

PAXF 736 wuchs im Vergleich zu Kombination 1 (Abb. 4.4.1.) hier in Kombination 2 (Abb. 4.4.2.) ausgehend vom gleichen Volumen deutlich schneller.

Abbildung 4.4.3. stellt das Wachstum von PAXF 736 und BXF 1299 bei gleichzeitiger Implantation dar.

Sämtliche implantierte Fragmente entwickelten sich zu vitalen Tumoren. Beide Xenografts zeigten vom Anfang der Messungen an exponentielles Wachstum (Abb. 4.4.3.).

BXF 1299 hatte zu Versuchsbeginn bereits das doppelte Volumen von PAXF 736.



Ausgangsvolumen (Median):
 PAXF 736/28N35: 73.8 mm³
 BXF 1299/27N15: 150.8 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
PAXF 736/20N17:	4.3	9.9
BXF 1299/18N6:	3.5	9.4

Angehensrate: 5/5 (100%)

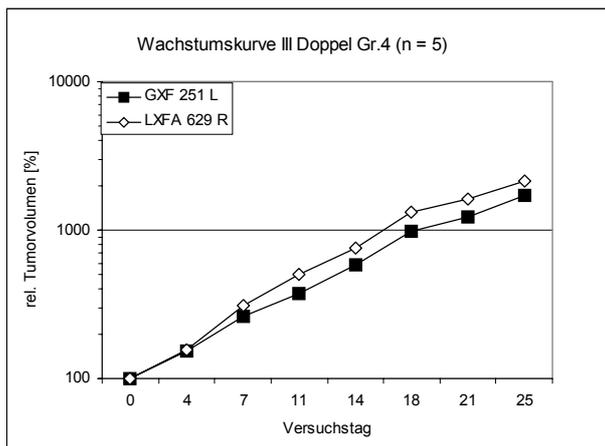
L: linke Flanke; R: rechte Flanke

Abb. 4.4.3. Ergebnis Kombination 3

Aufgrund des kleineren absoluten Volumen durchlief PAXF die beiden Verdopplungszeiten 0.8 und 0.5 Tage schneller als das Blasenkarzinom und erreichte ein größeres relatives Endvolumen.

(PAXF 736: 1774.8% gegenüber BXF 1299: 1189.2%). Die absoluten Werte zeigten ein umgekehrtes Bild (PAXF 736: 1160.9 mm³; BXF 1299: 1322 mm³). Die Wachstumsgeschwindigkeit von PAXF 736 lag hier zwischen der langsameren Kombination 1 (Abb. 4.4.1.) und dem schnelleren Wachstum in Kombination 2 (Abb. 4.4.2.).

Das Ergebnis der Doppelimplantation von GXF 251 und LXFA 629 wird in Abb. 4.4.4. dargestellt.



Ausgangsvolumen (Median):
 GXF 251/21N12: 78.7 mm³
 LXFA 629/20N13: 60.0 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
GXF 251/21N12:	5.3	11.4
LXFA 629/20N13:	4.9	8.9

Angehensrate: 5/5 (100%)

L: linke Flanke; R: rechte Flanke

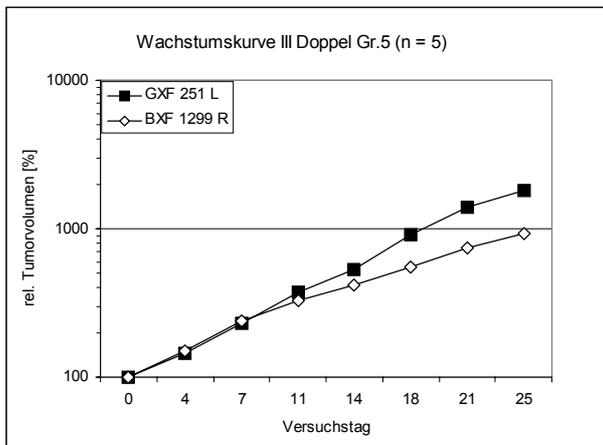
Abb. 4.4.4. Ergebnis Kombination 4

Alle Fragmente des Magen- und des Lungenkarzinoms waren zu Versuchsbeginn vital und proliferierten exponentiell. Ausgehend von einem 31% größeren Ausgangsvolumen wuchs GXF 251 im Vergleich zu LXFA 629 konstant langsamer, was sich in den um 0.4 und 2.5

Tagen späteren Verdopplungen und der flacher verlaufenden Wachstumskurve verdeutlichte (Abb. 4.4.4.).

Durch das unterschiedliche Volumen an VT 0 ergaben sich umgekehrte Verhältnisse bei den relativen (GXF 251: 1719.1%, LXFA 629: 1954.7%) und absoluten (GXF 251: 1351.4 mm³; LXFA 629: 1247.1 mm³) Endvolumina.

Kombination 5 wurde durch GXF 251 und BXF 1299 gebildet; ihr Wachstum bei gleichzeitiger Implantation auf die Nacktmaus ist in Abb 4.4.5. dargestellt.



Ausgangsvolumen (Median):

GXF 251/21N12: 82.5 mm³

BXF 1299/27N15: 133.0 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
GXF 251/21N12:	5.9	11.5
BXF 1299/27N15:	5.7	13.4

GXF 251/21N12: 5.9 11.5

BXF 1299/27N15: 5.7 13.4

Angehensrate: 5/5 (100%)

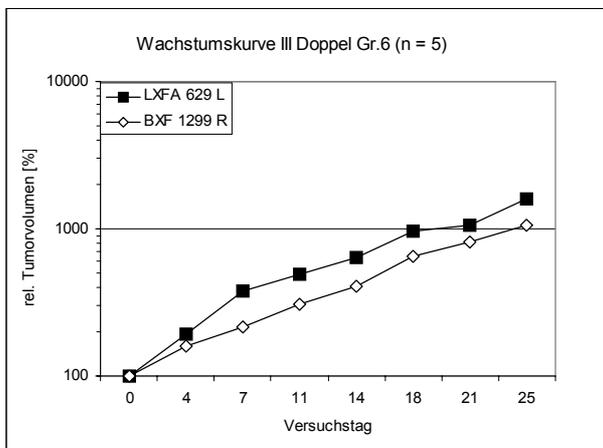
L: linke Flanke; R: rechte Flanke

Abb. 4.4.5. Ergebnis Kombination 5

Alle mit Xenografftfragmenten der Kombination 5 implantierten Versuchstiere konnten an dieser Wachstumsstudie teilnehmen.

BXF 1299 hatte zu Beginn der Messungen ein um 61% größeres Volumen als das Magenkarzinom. Während beide Tumoren die erste Verdopplung in etwa der gleichen Zeit bewältigten, benötigte BXF 1299 für die 400% Marke 1.9 Tage länger und blieb bis zum Versuchsende in der Wachstumsgeschwindigkeit hinter GXF 251 zurück. Dies spiegelte sich in den ab VT 7 flacher verlaufenden Kurve (Abb. 4.4.5.) des Übergangsepithelkarzinoms. Während GXF 251 annähernd das Doppelte des relativen Endvolumens von BXF 1299 (GXF 251: 1805.6%, BXF 1299: 929.0%) aufzeigte, hatte das Blasenkarzinom das größere absolute Volumen an Versuchstag 25 (GXF 251: 1489.6 mm³; BXF 1299: 1235.6 mm³).

Abbildung 4.4.6. stellt das Ergebnis der kombinierten Implantation von LXFA 629 und BXF 1299 dar.



Ausgangsvolumen (Median):
 LXFA 629/20N13: 49.4 mm³
 BXF 1299/27N15: 130.5 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
LXFA 629/20N13:	4.1	7.9
BXF 1299/27N15:	6.2	13.8

Angehensrate: 5/5 (100%)

L: linke Flanke; R: rechte Flanke

Abb. 4.4.6. Ergebnis Kombination 6

Alle implantierten Tiere konnten aufgrund des exponentiellen Wachstums der Tumorfragmente an der Studie teilnehmen.

Nach 15 Tagen Induktionszeit war das Volumen von BXF 1299 um 264% größer als der mediane Wert von LXFA 629.

Das Lungenkarzinom proliferierte während des gesamten Versuchs deutlich schneller. Der Unterschied beim Erreichen der beiden Verdopplungen (2.1 Tage 200 %, 5.9 Tage 400 %) und der Kurvenverlauf (Abb. 4.4.6.) verdeutlichen diese divergierende Wachstumskinetik.

Wie bereits in anderen Kombinationen, zeichnen diese relativen Werte (LXFA 629: 1589.4 %; BXF1299: 1055.5 % Endvolumina) ein anderes Bild als die absoluten Werte: Endvolumen LXFA 629: 775.7 mm³; BXF 1299:1377.4 mm³.

Bei der Betrachtung der Wachstumskinetik der Xenografts in den einzelnen Gruppen stellte sich insgesamt folgendes Bild dar:

Während GXF 251 und LXFA 629 sehr konstante Wachstumsparameter aufwiesen, zeigten sich bei PAXF 736 und BXF 1299 deutlichere Unterschiede in Anwesenheit der verschiedenen Tumoren.

GXF 251 hatte eine maximale Differenz von 0.9 Tagen bei der ersten und 0.1 Tagen bei der zweiten Verdopplung ausgehend von fast identischen Volumina (Differenz: 8.1 mm³).

LXFA 629 unterschied sich bei den Verdopplungen um 1.9 bzw. 1.0 Tage und hatte einen Volumenunterschied von 10.6 mm^3 (die längsten Verdopplungszeiten entstanden beim größten Ausgangsvolumen).

Die maximalen Differenzen der Verdopplungszeiten von PAXF 736 betragen 2.2 bzw. 3.1 Tage, wobei die langsamste erste Verdopplung in Gruppe 3 (+ BXF 1299), die langsamste zweite Verdopplung in Gruppe 1 (+ GXF 251) auftrat. Die Ausgangsvolumina unterschieden sich nur minimal (8.5 mm^3).

Das Pankreaskarzinom hatte die größte Wachstumsgeschwindigkeit in Anwesenheit von LXFA 629 und benötigte mit GXF 251 (insbesondere 2. Verdopplung) und BXF 1299 (1. Verdopplung) mehr Zeit für die Volumenzunahmen.

BXF 1299 hatte mit 2.7 und 4.4 Tagen die größten Differenzen bei den Verdopplungszeiten, wobei die schnellsten Verdopplungen vom größten Volumen ausgingen.

In Anwesenheit von PAXF 736 wuchs das Blasenkarzinom schneller als zusammen mit GXF 251 und LXFA 629.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, daß *in allen Gruppen sämtliche Tumoren vital waren und exponentiell proliferierten*. Jeder Tumor *verdoppelte* sein Volumen *mindestens zweimal* und mit *25 Tagen Therapiezeitfenster* bis zum Versuchsende können herkömmliche (wie in Kapitel 3.10.2. beschriebene) Substanztestungen problemlos durchgeführt werden.

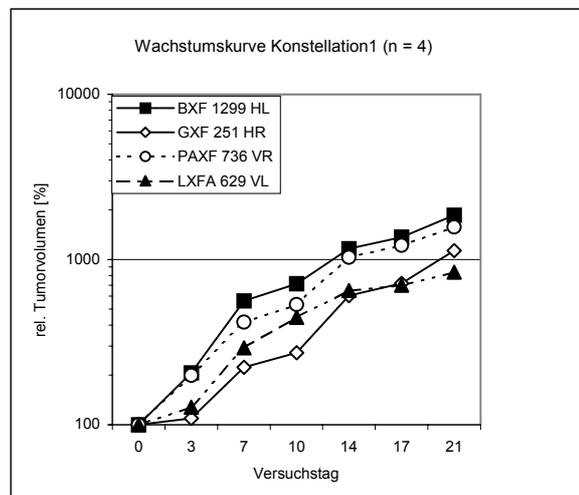
Bei den unterschiedlichen Wachstumskinetiken ließ sich *keine eindeutige Tendenz der Wachstumsbeeinflussung* eines Xenografts durch einen anderen Tumor erkennen..

4.4.2. Lokalisationsversuche

Um den Einfluß der Implantationslokalisierung auf der Nacktmaus (hintere oder vordere Flanke) und dadurch bedingte Unterschiede in der Versorgung der Tumorfragmente mit Nährstoffen und Sauerstoff zu untersuchen, wurden die vier verschiedenen Xenografts in vier verschiedenen Konstellationen einem Rotationsprinzip folgend so implantiert, daß jeder Tumor einmal an einer der vier möglichen Lokalisationen wuchs.

Von 16 gleichzeitig implantierten Mäusen konnten 12 an der Studie teilnehmen (Auswahlkriterium: gutes Allgemeinbefinden und Angang aller vier Tumoren). Die Induktionszeit betrug 13 Tage. Nach 21 Versuchstagen war die maximal tolerable Tumorlast (siehe Abbruchkriterien) erreicht und die Versuche mußten abgebrochen werden. Die Versuchsnummern waren K119 bis K122.

Das Wachstumsverhalten der Tumoren wird im Folgenden als relativer medianer Volumenzuwachs bezogen auf das Ausgangsvolumen in Form von Liniendiagrammen im logarithmischen Maßstab dargestellt. Insgesamt wurden vier Konstellationen untersucht.



HL: hintere linke Flanke; HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.4.7. Ergebnis Konstellation 1

Ausgangsvolumen (Median):

Verdopplungszeiten in Tagen:

		<u>200%</u>	<u>400%</u>
BXF 1299/16N4:	71.2 mm ³	3.0	4.9
GXF 251/12N3:	40.7 mm ³	5.6	11.2
PAXF 736/18N15:	65.0 mm ³	3.2	6.9
LXFA 629/13N6:	60.2 mm ³	3.5	6.2

Angehensrate: 4/4 (100%)

In der ersten untersuchten Konstellation (Abb. 4.4.7) variierten die Ausgangsvolumina lediglich um 31 mm³.

Das Diagramm (Abb. 4.4.7) zeigte weitgehend parallel verlaufende Wachstumskurven ab VT 7.

BXF 1299 war erwartungsgemäß der am schnellsten proliferierende Tumor dieses Quartetts. Das Übergangszellkarzinom hatte zu Versuchsbeginn das größte Volumen und verdoppelte dieses bereits vor Versuchstag 5 zweimal. Als „schnellstes“ Xenograft stellte BXF 1299 den zeitlimitierenden Faktor dar (siehe Abbruchkriterien).

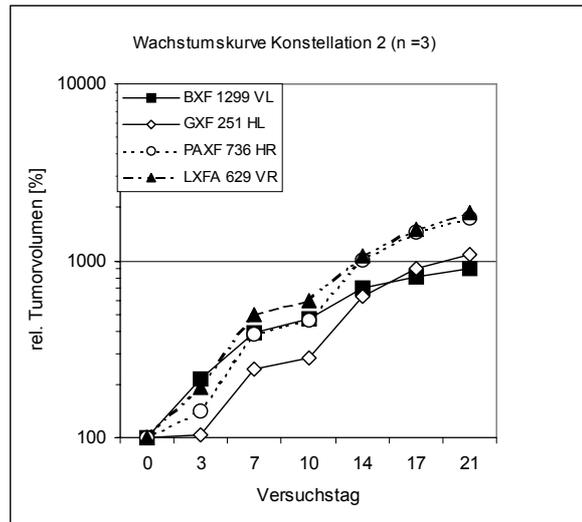
Die Wachstumskurve von PAXF 736 verlief ebenfalls bereits ab VT 0 linear und demonstrierte das progressive Wachstum des Tumors von Versuchsbeginn an. Für die zweite Verdopplung benötigte das Xenograft dann aber zwei Tage länger als der Blasentumor.

LXFA 629 und insbesondere GXF 251 traten erst ab VT 3 in die exponentielle Wachstumsphase ein: Zwischen VT 0 und VT 3 verliefen die Kurven wesentlich flacher als die der erstgenannten Tumoren. LXFA 629 konnte ab diesem Zeitpunkt mit der Proliferationsgeschwindigkeit der anderen Xenografts schritthalten, während GXF 251 bis VT 14 zurückblieb. Das geringe Ausgangsvolumen von GXF 251 unterstrich seinen verzögerten Wachstumsbeginn.

Die Etablierungskriterien für das Tumormodell wurden in dieser Konstellation sämtlich erfüllt: 100% Angehensrate, zwei Verdopplungen je Tumor, annähernd synchrones Wachstum und keine offensichtliche Beeinflussung des Xenograftwachstums untereinander.

Abbildung 4.4.8. stellt das Wachstum der vier Xenografts in der nächsten (eine Position im Uhrzeigersinn weiterrotierten) Konstellation dar.

BXF 1299 startete in dieser Konstellation mit dem größten Ausgangsvolumen aller vier Konstellationen. Die anfangs recht steile Kurve flachte im Verlauf der Studie zunehmend ab (Abb. 4.4.8.). Die Verdopplungszeiten verdeutlichten dieses Wachstumsverhalten: Die erste Verdopplung wurde 0.5 Tage später als in Konstellation 1 (Abb. 4.4.7.) erreicht und für die Zweite benötigte das Xenograft 5.0 Tage länger.



HL: hintere linke Flanke; HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.4.8. Ergebnis Konstellation 2

Ausgangsvolumen (Median):

Verdopplungszeit in Tagen:

		<u>200%</u>	<u>400%</u>
BXF 1299/16N4:	166.6 mm ³	3.5	10.1
GXF 251/12N3:	42.0 mm ³	6.6	11.8
PAXF 736/18N15:	45.6 mm ³	2.2	4.1
LXFA 629/13N6:	51.6 mm ³	3.4	5.8

Angehensrate: 3/4 (75%)

PAXF 736 hatte hier ein relativ kleines Ausgangsvolumen, verdoppelte sich aber schneller als in der ersten Konstellation: Insbesondere die sehr schnelle zweite Verdopplungszeit nach 4.1 Tagen und der steile Verlauf der Kurve in diesem Zeitraum fielen auf (Abb. 4.4.8.).

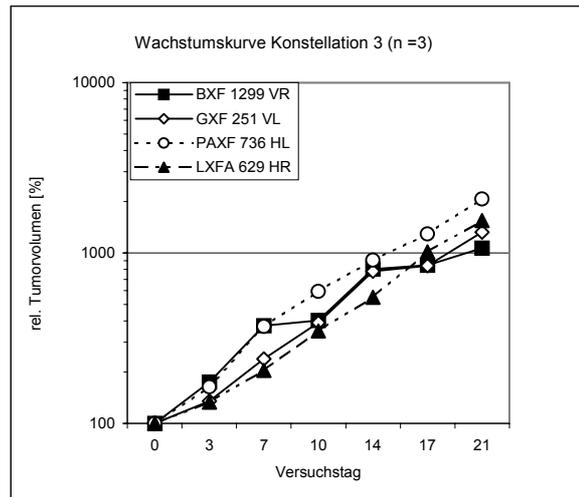
Auch LXFA 629 proliferierte in dieser Lokalisation etwas schneller als in der vorigen Studie (Abb. 4.4.7.), was insbesondere nach dem Erreichen der 400% Marke deutlich wurde.

Bei GXF 251 machte sich wieder die kurze Induktionszeit bemerkbar; der Magentumor trat erst ab VT 3 in sein exponentielles Wachstum ein und verdoppelte sich bis VT 12 noch etwas langsamer als in Konstellation 1, schloß dann aber zu den anderen Xenografts auf (Abb. 4.4.8.).

Die Etablierungskriterien wurden auch hier erfüllt.

Das Wachstumsverhalten von BXF 1299 in dieser Lokalisation könnte aber Hinweise auf eine Wachstumshemmung in der zweiten Versuchshälfte liefern.

In der Konstellation, deren Ergebnis in Abb. 4.4.9. dargestellt wird, sind die vier Xenografts wiederum um eine Position im Uhrzeigersinn weitergerückt worden.



HL: hintere linke Flanke; HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.4.9. Ergebnis Konstellation 3

Ausgangsvolumen (median):

Verdopplungszeiten in Tagen:

BXF 1299/16N4:	108.5 mm ³
GXF 251/12N3:	73.3 mm ³
PAXF 736/18N15:	48.4 mm ³
LXFA 629/13N6:	28.9 mm ³

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
BXF 1299/16N4:	3.3	7.9
GXF 251/12N3:	5.0	9.6
PAXF 736/18N15:	3.8	7.5
LXFA 629/13N6:	7.1	13.3

Angehensrate: 2/4 (50%)

Im Wachstumsversuch mit Konstellation 3 wurde das Kriterium der Angehensrate nicht erfüllt und die Daten beruhen lediglich auf zwei Mäusen. Deshalb hat dieser Versuch nur begrenzte Aussagekraft.

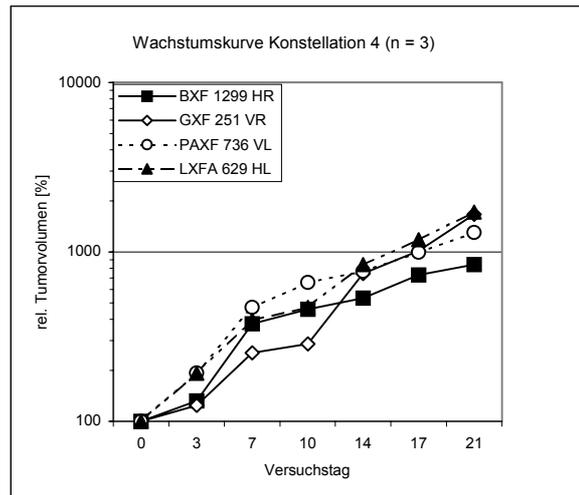
BXF 1299 lag hier (Abb. 4.4.9.) bezüglich Ausgangsvolumen und Verdopplungszeiten jeweils zwischen den beiden Werten von Konstellationen 1 und 2 (Abb. 4.4.7. und Abb. 4.4.8.).

Die Verlangsamung des Wachstums in der zweiten Versuchshälfte war in dieser Konstellation nicht zu beobachten.

PAXF 736 wuchs in dieser Konstellation etwas langsamer als in den anderen Konstellationen, was sich in den beiden Verdopplungszeiten und der flacheren Kurve darstellte (Abb. 4.4.9.). Nach der zweiten Verdopplung proliferierte das Pankreaskarzinom aber mit seiner gewohnter Geschwindigkeit.

LXFA 629 wuchs ausgehend von einem sehr kleinen Volumen an VT 0 konstant langsam. Erst nach Tag 14 nahm das Xenograft seine typische Proliferationsgeschwindigkeit auf.

GXF 251 zeigte in dieser Lokalisation das schnellste Wachstum aller Konstellationen: Ausgehend von dem größten Volumen wuchs der Magentumor bereits ab VT 0 exponentiell und verdoppelte sich ca. 1.5 Tage früher (400%).



HL: hintere linke Flanke; HR: hintere rechte Flanke; VR: vordere rechte Flanke; VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.4.10. Ergebnis Konstellation 4

Ausgangsvolumen (Median):

BXF 1299/16N4:	76.7 mm ³
GXF 251/12N3:	46.5 mm ³
PAXF 736/18N15:	86.2 mm ³
LXFA 629/13N6:	43.6 mm ³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
BXF 1299/16N4:	4.1	9.1
GXF 251/12N3:	5.5	11.0
PAXF 736/18N15:	2.6	5.9
LXFA 629/13N6:	4.6	9.7

Angehensrate: 3/4 (75%)

In Konstellation 4 (Abb. 4.4.10.) zeigte BXF 1299 ein ähnliches Wachstumsverhalten wie in Konstellation 2 (Abb. 4.4.8.): ausgehend von einem durchschnittlichen Volumen benötigte der Blasen tumor relativ lange für seine Verdopplungen und zeigte eine deutlich Abflachung der Kurve in der zweiten Versuchshälfte (Abb. 4.4.10.).

PAXF 736 demonstrierte in dieser Lokalisation sein typisches Wachstumsverhalten.

Sowohl im Ausgangsvolumen als auch bei den Verdopplungszeiten proliferierte LXFA 629 etwas zügiger als in Konstellation 3 (Abb. 4.4.9.), blieb aber gegenüber den ersten beiden Implantationslokalisationen deutlich zurück.

GXF 251 verhielt sich ähnlich wie in Konstellation 1 (Abb. 4.4.7.) mit dem Unterschied, daß zwischen VT 0 und VT 3 etwas mehr Volumen zugelegt wurde.

Die geforderten Kriterien wurden hier alle erfüllt. Ähnlich wie in Konstellation 2 (Abb. 4.4.8.) mußte auch in dieser Konstellation der mögliche Hinweis auf eine Wachstumsbeeinträchtigung von BXF 1299 zur Kenntnis genommen werden.

Die Schaubilder zeigten in allen vier Konstellationen einen weitgehend parallelen Kurvenverlauf. Die Proliferationsgeschwindigkeiten der Xenografts variierte aber deutlich mehr als bei den anderen Xenografts (Kapitel 4.2.2.).

4.4.2.1. Bestimmung der optimalen Konstellation der vier Xenografts zueinander

Neben den Schaubildern wird als Hilfsparameter für Wachstumssynchronizität die Differenz des maximalen prozentualen Volumenzuwachses (Volumenzuwachs des Xenografts mit dem größten prozentualen Volumenvergrößerung – Volumenzuwachs des Xenografts mit dem kleinsten prozentualen Volumenzuwachs) herangezogen:

Konstellation	Differenz medianen relativen Tumorumvolumenzuwachses
----------------------	---

1:	1015%
2:	970%
3:	1012%
4:	877%

Aufgrund dieser statistisch nicht überprüfaren (zu geringe Anzahl zu vergleichender Werte) Ergebnisse wurde die Xenograftkonstellation 4 (*VL* PAXF 736, *VR* GXF 251, *HL* LXFA 629, *HR* BXF 1299) rein empirisch als optimal angesehen und für die weiteren Versuche ausgewählt.

Um zu überprüfen, ob die von Kyriazis (1980) postulierte These, daß die Lokalisation das biologische Verhalten der Xenografts beeinflusst, auch für die hier verwandten Tumoren zutrif, wurde der maximale prozentuale Volumenzuwachs der einzelnen Xenografts in den vier Implantationslokalisationen (vordere und hintere, linke und rechte Flanke VL,VR,HL,HR) verglichen.

PAXF 736

VL: 1300% VR: 1507%
HL: 2078% HR: 1729%

GXF 251

VL: 1328% VR: 1664%
HL: 1085% HR: 1130%

LXFA 629

VL: 839% VR: 1875%
HL: 1720% HR: 1550%

BXF 1299

VL: 905% VR: 1066%
HL: 1854% HR: 843%

PAXF 736 zeigte auf beiden Seiten in der hinteren Flanke einen größeren Volumenzuwachs: HL 160% des Zuwachses von VL und HR 115% der Volumenvergrößerung von VR. Das Verhältnis der Ausgangsvolumina zueinander war umgekehrt, die absoluten Volumina waren also in allen Lokalisationen vergleichbar.

Bei GXF 251 war das Verhältnis umgekehrt: Die vorderen Volumenzunahmen übertrafen die in den hinteren Implantationsstellen erzielten (VL (1328%) 122% von HL (1085%) und VR (1664%) 147% von HR (1130%)). Die Ausgangsvolumina waren ebenfalls größer, was für eine bevorzugtes Wachstum des Xenografts in den vorderen Lokalisationen sprach.

LXFA 629 zeigte auf den beiden Seiten ein unterschiedliches Bild. Während auf der linken Seite in der hinteren Flanke mehr als das Doppelte an Volumen von vorne erreicht wurde (HL 205% von VL), übertraf auf der rechten Seite der vordere Volumenzuwachs den hinteren um 22%. Das Ausgangsvolumen unterschied sich auf beiden Seiten nur gering.

Ein ähnliches Verhältnis lag bei BXF 1299 vor: HL 205% des Zuwachses von VL und VR wurden 126% der Volumenzunahme von HR erreicht.

Eine einheitliche Aussage über das Verhalten der vier Tumoren in Tumorquartett III konnte also nicht gemacht werden, auch hier scheint Kyriazis These nicht allgemein anwendbar zu sein.

Immerhin konnten die (statistisch nicht signifikanten) Wachstumsunterschiede aber bei der Auswahl der optimalen erscheinenden Xenograftkonstellation genutzt werden, um zu versuchen, die schneller wachsenden Xenografts (PAXF 736, BXF 1299) etwas in ihrem Wachstum zu limitieren und den langsameren Tumoren (GXF 251, LXFA 629) optimale Bedingungen zu bieten.

So wurde versucht, ein möglichst synchrones Wachstum zu erreichen, um das Zeitfenster für Therapieversuche möglichst zu verlängern.

4.4.3. Eigene Wachstumsstudien

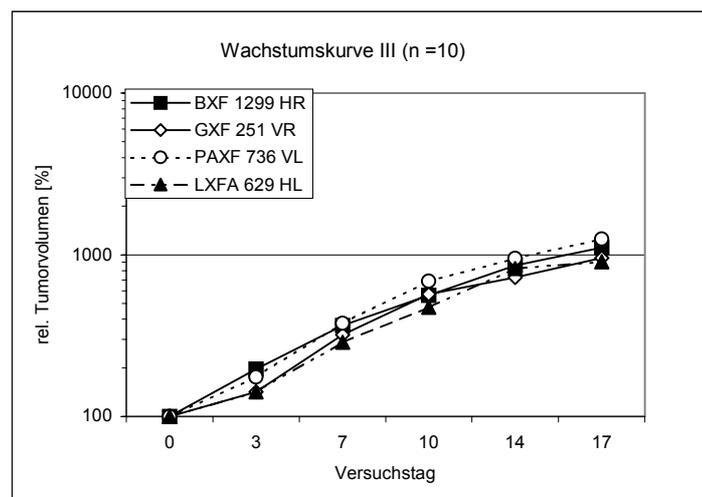
Nach Bestimmung der optimalen Tumorlokalisation wurden die vier Xenografts (PAXF 736, GXF 251, LXFA 629 und BXF 1299) in Konstellation 4 (siehe Kap. 4.4.2.) auf eine größere Anzahl ($n = 10$) von Nacktmäusen implantiert.

Weiterhin wurde das Wachstumsverhalten unbehandelter Kontrollgruppen aus Standardchemotherapie- und Naturstoffversuchen dokumentiert.

Von 10 implantierten Mäusen waren 10 für die Wachstumsstudie geeignet (d.h. gutes Allgemeinbefinden und Angehen aller vier Tumoren).

Das Wachstumsverhalten der Xenografts wird im Folgenden als relativer medianer Volumenzuwachs bezogen auf das Ausgangsvolumen in Form von Liniendiagrammen dargestellt. Die Versuchsnummern der Wachstumsstudie waren K 132 bis K135.

Bei Erreichen der maximal tolerablen Tumorlast (gemäß der Abbruchkriterien Anhang 9.3.) wurden die Versuche beendet (letzter VT).



HR: hintere rechte Flanke; VR vordere rechte Flanke; HL: hintere linke Flanke; VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.4.11. Ergebnis Wachstumsstudie III 1.

Ausgangsvolumen (Median):

Verdopplungszeiten (in Tagen):

BXF 1299/17N5: 135.4 mm³
 GXF 251/13N4: 77.5 mm³
 PAXF 736/19N6: 89.3 mm³
 LXFA 629/14N7: 64.6 mm³

	<u>200%</u>	<u>400%</u>
BXF 1299/17N5:	3.5	7.9
GXF 251/13N4:	4.4	8.1
PAXF 736/19N6:	3.8	7.5
LXFA 629/14N7:	5.7	11.3

Angehensrate: 10/10 (100%)

Die Induktionszeit betrug 14 Tage. Die geforderten Etablierungskriterien wurden in allen drei Versuchsreihen erfüllt.

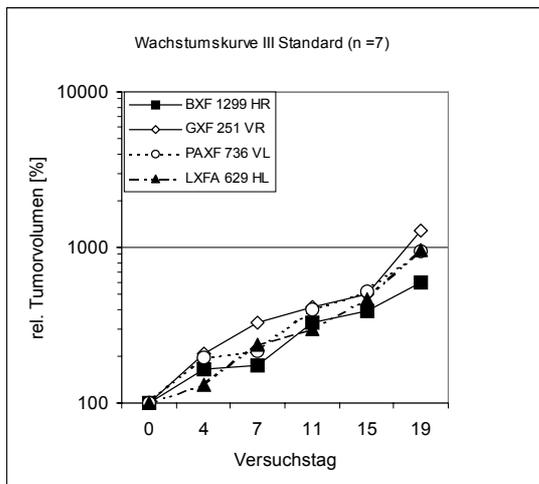
Jedes der Xenografts vergrößerte sein Volumen im Versuchszeitraum um mehr als 400%.

Die Beobachtungszeiträume waren mit 14 bis 19 Versuchstagen für Kurzzeitversuche, insbesondere Naturstoffversuche mit dem Therapieschema d: 0, 4, 8 ausreichend lang.

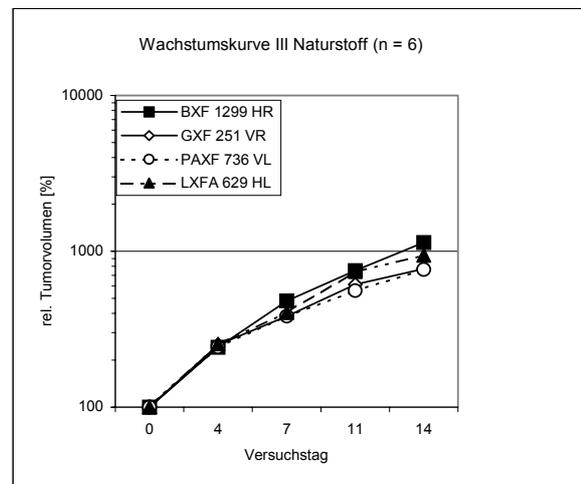
Die Angehensraten lagen mit 100%, 90%, und 77.5% über dem geforderten Wert von 60%.

Die drei Liniendiagramme (Abb. 4.4.11. bis Abb. 4.4.12. A und B) zeigen durch den weitgehend parallelen Kurvenverlauf eine sehr synchrone relative Volumenzunahme der Xenografts. Abbildung 4.4.12. A und B zeigt die vehikelbehandelten Kontrollgruppen der Therapieversuche, die das beschriebene (Abb. 4.4.11.) Wachstumsverhalten der vier Xenografts bestätigen.

A



B



HR: hintere rechte Flanke; VR vordere rechte Flanke; HL: hintere linke Flanke; VL: vordere linke Flanke

Abb. 4.4.12. A Kontrollgruppe Standard

B Kontrollgruppe Naturstoff

Wachstumsdaten Kontrollgruppe Standardchemotherapieversuch (Abb. 4.4.12. A):

Ausgangsvolumen (Median):

Verdopplungszeiten (in Tagen):

BXF 1299/25N23:	311.6	mm ³
GXF 251/19N10:	49.0	mm ³
PAXF 736/26N23:	63.8	mm ³
LXFA 629/18N11:	37.0	mm ³

200% 400%

5.0	15.1
3.5	9.1
2.8	9.0
4.5	10.7

Angehensrate: 27/30 (90%)

Die Induktionszeit betrug 16 Tage.

Wachstumsdaten Kontrollgruppe Naturstoffversuch (Abb. 4.4.12B):

Ausgangsvolumen (Median):

Verdopplungszeiten (in Tagen):

BXF 1299/26N14:	152.4	mm ³
GXF 251/19N12:	52.0	mm ³
PAXF 736/27N24:	48.8	mm ³
LXFA 629/19N12:	48.8	mm ³

200% 400%

2.8	6.0
2.7	7.3
2.8	7.4
2.6	6.9

Angehensrate : 31/ 40 (77.5%)

Die Induktionszeit betrug 15 Tage (Abb. 4.4.12B)

Die Induktionszeiten der Kontrollgruppen von Tumorquartett III betragen zwischen 14 und 16 Tagen, die Xenografts erfüllten die Vitalitätskriterien in den drei Versuchsreihen nach ähnlichen Zeiträumen.

Die Ausgangsvolumina der Xenografts GXF 251, LXFA 629 und PAXF 736 unterschieden sich in den einzelnen Implantationen nur geringfügig: GXF 251 (49.0 mm³- 77.5 mm³), LXFA 629 (37.0 mm³- 64.6 mm³), PAXF 736 (48.8 mm³- 89.3 mm³).

BXF 1299 hatte in der Kontrollgruppe des Standardchemotherapieversuchs (Abb. 4.4.12.) nach 16 Tagen Induktionszeit ein um den Faktor 2 größeres Volumen (311.6 mm³) als in den anderen beiden Studien (Abb. 4.4.11. und Abb. 4.4.13.) (135.4 mm³ und 152.4 mm³).

GXF 251 und PAXF 736 zeigten bei den beiden Verdopplungszeiten nur sehr geringe Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen:

	<u>200%</u>	<u>400% (in Tagen)</u>
GXF 251:	2.7 - 4.4	7.3 - 9.1
PAXF 736:	2.8 - 3.8	7.4 - 9.0

LXFA 629 und BXF 1299 waren in ihrer Wachstumskinetik weniger konstant und wiesen größere Differenzen bei den Verdopplungszeiten auf.

	<u>200%</u>	<u>400% (in Tagen)</u>
LXFA 629:	2.6 - 5.7	6.9 - 11.3
BXF 1299:	2.8 - 5.0	6.0 - 15.1

Bei BXF 1299 ließ sich eine Abhängigkeit der relativen Volumenzunahmegeschwindigkeit vom Ausgangsvolumen erkennen. Die längsten Verdopplungszeiten wurden in der Studie mit dem größten Ausgangsvolumen festgehalten (Kontrollgruppe Standardchemotherapieversuch, Abb. 4.4.12.). In den beiden Versuchen mit vergleichbarem Ausgangsvolumen war die Differenz der Verdopplungszeiten wesentlich geringer.

Bei LXFA 629 ließ sich aufgrund der minimalen Unterschiede im Tumolvolumen zu Versuchsbeginn keine solche Abhängigkeit beschreiben.

Wie auch aus den historischen Vergleichsdaten (Kapitel 4.4.) der Einzelimplantationen zu erkennen, traten hier bei manchen Xenografts unter gleichen Bedingungen (Vierfachimplantation) Schwankungen in der Wachstumskinetik auf.

4.3.1 Direkter Vergleich des Wachstumsverhaltens der Xenografts in der Vierfachimplantation und in Einzelimplantationen

Die bis zu diesem Punkt der Etablierung dieses Tumorquartetts erhobene Datenlage bezüglich des Wachstumsverhaltens der vier Xenografts in der Vierfachimplantation läßt keine Rückschlüsse auf eine negative Beeinflussung der Tumoren untereinander zu.

Im Hinblick auf den Vergleich der Wachstumsparameter des Tumorquartetmodells mit den historischen Daten (Kap. 4.4.4.), die eher auf ein schnelleres Wachstum in der Vierfachimplantation hindeuten und die vergleichbare Datenlage bei Tumorquartett I (Kap. 4.2.3. und Kap. 4.2.4.), bei dessen direktem Vergleich (Kap. 4.2.3.1.) kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Implantationsarten bestand, wurde bei der Etablierung von Tumorquartett III auf den direkten Vergleich verzichtet.

Für den Untersucher war der zu erreichende mögliche Informationsgewinn des direkten Vergleichs nicht bedeutend genug, um den Einsatz von Versuchstieren in statistisch relevanter Anzahl (direkter Vergleich Tumorquartett I: 44 Nacktmäuse) zu rechtfertigen.

Da dieses Tumortestmodell insbesondere der Einsparung von Versuchstieren dienen soll, schien es ethisch und tierschutzrechtlich nicht vertretbar, im Rahmen der Etablierung mehr Versuchstiere als unbedingt nötig einzusetzen.

4.4.4. Vergleich der eigenen Wachstumsdaten mit vorherigen Studien

Die historischen Daten der unbehandelten Tumoren von Tumorquartett III in den Kontrollgruppen zeigen, daß auch bei der Einzelimplantation des Xenografts gewisse Schwankungen bezüglich der Induktionszeit und der Verdopplungszeiten bestehen, die durch verschiedene Faktoren hervorgerufen werden können:

a) Größe und Vitalität der implantierten Fragmente, b) Gesundheitszustand und Restimmunität der Nacktmaus, c) Transplantationsintervall (Zeitspanne zwischen Entnahme des Tumors und Implantation in den Empfänger) und d) Passagezahl des Tumors.

Aus der Datenbank des Labors Prof. Fiebig wurden je Tumor 8 bis 10 Datensätze von historischen Kontrollgruppen ähnlicher Passagenummern ausgewählt. Diese Kontrollgruppen umfassten 4 bis 12 Versuchstiere. Es wurde der arithmetische Median der Induktionszeit und der beiden Verdopplungszeiten gebildet. Weiterhin wurden die für jeden Parameter kleinsten und größten Werte dokumentiert (Min - Max Werte).

Bei der Betrachtung der Mediane ergibt sich ein charakteristisches Bild des Wachstumsverhaltens des Xenografts bei dem die genannten Einflüsse weniger Gewicht haben. Bei der statistischen Auswertung der Daten der Einzel- und der Vierfachimplantationen wurde im Falle einer Normalverteilung der (medianen) Werte der Verdopplungszeiten der Student-t-Test ansonsten der Mann-Whitney Rank Sum Test angewandt.

Die Mediane der Induktionszeiten waren in Einzel- und Mehrfachimplantationen von PAXF 736 (Tab.4.4.1.) nahezu identisch. Die größere Schwankungsbreite in den Einzelimplantationen ist auch auf die größere Anzahl an Versuchen und die dabei verwandten Passagezahlen des Xenografts, die aus den Datenbanken zur Auswertung herangezogen werden konnten, zurückzuführen.

Bei beiden Verdopplungen wurden in den Mehrfachimplantationen kürzere Zeiten festgestellt (Tab. 4.4.1.).

Die erste Verdopplungszeit war bei den Doppelimplantationen im Median 1.3 und bei den Vierfachimplantationen 2.3 Tage kürzer. Auch die jeweiligen Minimalwerte lagen unter denen der Einzelimplantationen.

Die zweite Verdopplung wurde bei den Doppelimplantationen nur 1.0 Tage früher erreicht, das im Vergleich zu den Einzelimplantationen schnellere Wachstum war geringer geworden. Der Minimalwert war annähernd gleich.

Bei den Vierfachimplantationen setzte sich die Tendenz der ersten Verdopplungszeit auch bei der zweiten fort: Die 400%- Marke wurde im Mittel 3.4 Tage früher erreicht. Hier waren auch die Minimal- und Maximalwerte deutlich zu den kürzeren Zeiten hin verschoben.

Tabelle 4.4.1. stellt die ausgewerteten Datensätze der verschiedenen Implantationsarten einander gegenüber.

Tab. 4.4.1. Wachstumsdatenvergleich PAXF 736

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzelimplantation ^a	Median	14.4	5.1	10.9
	Min-Max	11-17	3.1-7.0	8.1-12.7
Doppelimplantation ^b	Median	15	3.8	9.9
	Min-Max	15	2.1-4.3	8.2-11.3
Vierfachimplantation ^c	Median	15	2.8	7.5
	Min-Max	14-16	2.2-3.8	4.1-9.0

^a: Passagen 10– 28; ^b: Passage 28; ^c: Passage 18,19, 26, 27

Es war bei den Vierfachimplantationen keine eindeutige Tendenz zu schnellerem Wachstum in höheren Passagen festzustellen.

Der Vergleich der normalverteilten Werte der ersten Verdopplungszeit (200%) von Einzel- und Vierfachimplantation mittels Student-t-Test ergab mit $p = 0.002$ einen statistisch signifikanten Unterschied.

Die Differenz der zweiten Verdopplungszeiten war zwischen Einzel- und Vierfachimplantation mit $p < 0.001$ statistisch signifikant (Student-t-Test).

Im Falle von GXF 251 zeigten sowohl Mediane als auch die Variationsbreiten der Induktionszeiten geringere Werte bei den Mehrfachimplantationen (Tab. 4.4.2.). Das

Bestreben, sofort nach Erfüllen der Vitalitätskriterien durch alle Tumoren mit den Messungen zu beginnen, um eine möglichst lange Zeitspanne bis zum Erreichen der maximalen Tumorlast zu erhalten, ist eine Erklärung für die kürzeren Zeiten bei diesem ansonsten etwas später (bei größerem Ausgangsvolumen) randomisierten Tumor.

Die erste Volumenverdopplung wurde in den Doppelimplantationen im Mittel geringfügig (0.2 Tage) später erreicht, während die 400%-Marke 0.8 Tage früher als in den Einzelimplantationen durchschritten wurde. Bei Betrachtung der Minimal- und Maximalwerte lag die Doppelimplantationen im Schwankungsbereich der Einzelimplantationen (Tab.4.4.2.). Die Wachstumsgeschwindigkeit der Vierfachimplantationen war vor allem bei der zweiten Verdopplungszeit deutlich größer als die der Vergleichswerte. Die Verdopplungen wurden im Mittel 1.6 und 3.1 Tage früher gemessen und die Minimalwerte lagen unter den niedrigsten Vergleichswerten.

Tabelle 4.4.2. vergleicht die erhobenen Wachstumsdaten von GXF 251 in den unterschiedlichen Implantationen.

Tab.4.4.2 Wachstumsdatenvergleich GXF 251

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzelimplantation ^a	Median	18.2	5.1	12.2
	Min-Max	17-19	3.8-5.6	9.0-14.8
Doppelimplantation ^b	Median	15	5.3	11.4
	Min-Max	15	5.0-5.9	11.4-11.5
Vierfachimplantation ^c	Median	15	3.5	9.1
	Min-Max	14-16	2.7-6.6	7.3-11.8

^a: Passagen 8– 21; ^b: Passage 21 ; ^c: Passage 12,13,19

Der Vergleich der ersten Verdopplungszeit ergab beim Mann–Whitney Rank Sum Test mit $p = 0.867$ keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Werten der Einzel- und Vierfachimplantationen.

Bei der 400% Marke war die Differenz gemäß dem Student-t-Test mit $p = 0.023$ statistisch signifikant.

Die kürzeren Induktionszeiten der Mehrfachimplantationen zeigten, daß LXFA 629, ähnlich wie GXF 251, zu den etwas langsameren Tumoren dieses Quartetts gehört und in Einzelimplantationen gewöhnlich etwas später randomisiert wird (Tab. 4.4.3.). Die

Minimalwerte der Vergleiche (Einzelimplantation) demonstrieren aber die Möglichkeit, auch bereits 14 Tage nach der Implantation aufgrund der festgestellten Vitalität mit den Messungen zu beginnen.

Die Wachstumscharakteristik des Xenografts unterschied sich in den Mehrfachimplantationen deutlich. Sämtliche Verdopplungszeiten waren bedeutend kürzer (Tab.4.4.4).

Die schnellste Volumenzunahme wurde hier bei den Doppelimplantationen festgestellt: für die erste Verdopplung wurde nur 2/3 der Zeit benötigt und die 400%-Marke wurde im Median 5.9 Tage früher erreicht (60% des Vergleichswertes). Auch der Range der Einzelwerte beider Verdopplungen war deutlich zu kürzeren Zeiten hin verschoben.

Die Doppelimplantationen wurden mit der höchsten der hier verwandten Passagen durchgeführt.

Die Mediane der Vierfachimplantationen waren etwas niedriger als die der Doppelimplantationen. Die Maximalwerte der einzelnen Versuche lagen hier aber noch innerhalb des Ranges der Vergleichswerte. Die jeweils niedrigsten Minimalwerte wurden bei Vierfachimplantationen gemessen.

Tabelle 4.4.3. zeigt die im Text beschriebene Auswertung der Datensätze von LXFA 629.

Tab. 4.4.3. Wachstumsdatenvergleich LXFA 629

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzelimplantation ^a	Median	17.4	6.2	14.2
	Min-Max	14-19	4.5-7.5	11.3-17.8
Doppelimplantation ^b	Median	15	4.0	8.4
	Min-Max	15	3.0-4.9	7.9-8.9
Vierfachimplantation ^c	Median	15	4.5	9.1
	Min-Max	14-16	2.6-7.1	5.8-13.3

^a: Passagen 7– 20; ^b: Passage 20 ; ^c: Passage 13,14,18,19

Beim Vergleich der Verdopplungszeiten zwischen Einzel- und Vierfachimplantation waren die Differenzen mit $p = 0.025$ (200%) und $p = 0.002$ (400%) jeweils statistisch signifikant (Student-t-Test).

Die Induktionszeit zeigte, daß BXF 1299 als einziger Tumor vor Versuchsbeginn der Mehrfachimplantationen die Vitalitätskriterien erfüllte (niedrigere Werte in der Einzelimplantation, Tab. 4.4.4.). Bei den Mehrtumormodellen mußte auf die anderen

Xenografts gewartet werden, was meist zum relativ großen Ausgangsvolumen von BXF 1299 führte.

Hier ergab sich für die Doppel- und Vierfachimplantationen ein unterschiedliches Bild des Wachstumsverhaltens.

Die Mediane der Doppelimplantation stimmten weitgehend mit den Vergleichswerten überein und die Minimalwerte lagen über denen der Einzelimplantation (Tab.4.4.4.). Die Doppelimplantationen wurden mit der höchsten Passage durchgeführt.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Vierfachmodelle war im Mittel deutlich größer als die der Einzelimplantationen: Die beiden Verdopplungen wurden 1.6 und 4.9 Tage früher erreicht.

Während die Werte der ersten Verdopplung alle innerhalb der Variation der Einzelwerte lagen, waren einige Zeiten der 400% Marke deutlich schneller als die minimalen Vergleichswerte.

Tabelle 4.4.4. illustriert den besprochenen Wachstumsdatenvergleich von BXF 1299.

Tab.4.4.4. Wachstumsdatenvergleich BXF 1299

Art der Implantation		Induktionszeit	Verdopplungszeit 200% (Tage)	Verdopplungszeit 400% (Tage)
Einzelimplantation ^a	Median	14	5.1	12.8
	Min-Max	9-19	2.8-7.2	9.0-17.2
Doppelimplantation ^b	Median	15	5.7	13.4
	Min-Max	15	3.5-6.2	9.4-13.8
Vierfach-Implantation ^c	Median	15	3.5	7.9
	Min-Max	14-16	2.8-5.0	6.0-15.1

^a: Passagen 16 – 32; ^b: Passage 28; ^c: Passage 16, 17, 25, 26

Zum Vergleich der Werte der Verdopplungszeiten der Vierfach- und Einzelimplantationen wurde der Student t-Test herangezogen und ergab für beide Zeiten mit $p = 0.029$ (200%) und $p = 0.019$ (400%) eine statistisch signifikante Differenz

Ergebnisse III: Vergleich der eigenen Wachstumsdaten mit vorherigen Studien

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bei allen Xenografts dieses Quartettmodells die Tendenz zu schnellerem Wachstum in den Mehrfachimplantationen zu beobachten war.

Die Vierfachimplantationen zeigten jeweils niedrigere Mediane bei den Verdopplungszeiten. Die Verteilungsbreite der Einzelwerte war ebenfalls bei allen vier Tumoren in den Vierfachimplantationen zu schnelleren Zeiten hin verschoben.

Mit der Ausnahme von LXFA 629 konnte keine eindeutige Tendenz des schnelleren Wachstums in höheren Passagen beobachtet werden. Für die Doppelimplantationen wurde bei allen Xenografts die höchste Passage verwandt und nur LXFA 629 zeigte kleinere Mediane in der Doppelimplantation im Vergleich mit der Vierfachimplantation.

Bei keinem der Xenografts konnte ein verzögertes Erfüllen der Vitalitätskriterien, eine verminderte Angehensrate, oder eine Wachstumsverzögerung festgestellt werden.

Der Vergleich der Wachstumsdaten gab hier den Hinweis auf eine *Stimulation des Wachstums* durch die Anwesenheit, insbesondere aller drei, anderen Xenografts.

4.4.5. Standardchemotherapie der Xenografts im Tumorquartettmodell

Für die Chemoresponsivitätsstudie der Xenografts des Tumorquartetts III wurden 30 Nacktmäuse mit Fragmenten der Tumoren implantiert. Die Randomisation in Kontroll- und Therapiegruppen erfolgte 17 Tage später. Es konnten 27 Mäuse in die Studie aufgenommen werden, was einer Angehensrate von 90% entsprach. Die Studie dauerte 22 Versuchstage. Die laborinternen Versuchsnummern waren K385 bis K388.

Die Kontrollgruppe bestand aus 7 Nacktmäusen, die an den Versuchstagen 0, 7 und 14 jeweils mit 10 ml/kg 0.9% NaCl + 0.05% Tween 80 (Verdünnungsmedium für Naturstoffstammlösung) intraperitoneal therapiert wurden.

Versuchsgruppe 2 umfaßte 5 Tiere, die an den Versuchstagen 0 und 14 intravenös mit 4 mg/kg Adriamycin (modifizierte maximal tolerable Dosis) therapiert wurden.

Den 5 Tieren in Versuchsgruppe 3 wurde an den Versuchstagen 0, 7 und 14 intraperitoneal 100 mg/kg 5-Fluoruracil verabreicht.

Therapiegruppe 4 bestand ebenfalls aus 5 Tieren denen an den Versuchstagen 0 und 14 200 mg/kg Cyclophosphamid intraperitoneal appliziert wurde.

Die 5 Mäuse in Versuchsgruppe 5 wurden mit Vindesin 1.5 mg/kg im Schema d: 0, 7, 14 intravenös therapiert.

Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt in anderen Versuchen aufgetretenen Toxizität von Adriamycin wurde die Dosis in dieser Studie von den bisherigen 8 mg/kg auf 4 mg/kg im Schema 0, 14 herabgesetzt.

Während in der Kontrollgruppe und unter Cyclophosphamidtherapie alle Mäuse bis zum Versuchsende überlebten, traten in der Adriamycin-, 5-FU- und Vindesingruppe trotz unterstützender Therapie (Flüssigkeitssubstitution, Glucoseinjektionen, hochkalorische Spezialdiät) Gewichtsabnahmen und je ein Todesfall an den Versuchstagen 6, 10 und 14 auf. Der Gewichtsmedian der einzelnen Gruppen sank in unterschiedlichem Maße ab.

In den Therapiegruppe 3, 4 und 5 (5-FU, CY, VIND) schwankten die Werte zwischen 80% und 100%, unterschritten aber zu keinem Zeitpunkt 80% des Ausgangsgewichts.

Die Tiere unter 5-FU Therapie nahmen am stärksten ab und hatten am VT 21 nur noch 76.1% ihres Ausgangsgewichts. Damit war ein Abbruchkriterium erfüllt, und der Versuch wurde beendet.

Die Kontroll- und die Vindesingruppe wurden wegen der Tumorlast am Versuchstag 18 beendet.

Im Folgenden werden die Wachstumskurven der vier beteiligten Tumoren jeweils als medianes, relatives Tumolvolumen im logarithmischen Maßstab dargestellt.

Abb. 4.4.13. zeigt das Ansprechen von PAXF 736 auf die Chemotherapie im Quartettmodell.

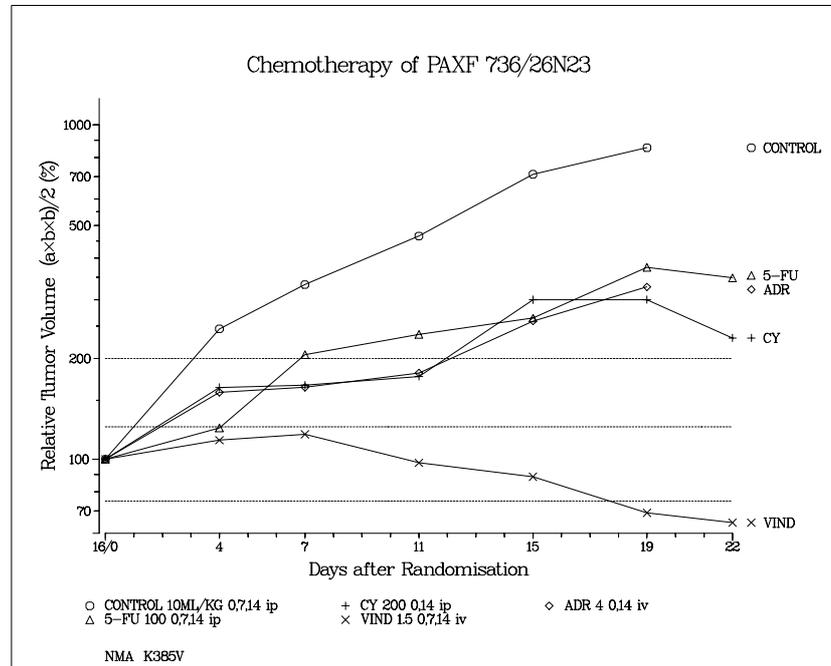


Abb 4.4.13 Chemotherapie von PAXF 736 im Quartettmodell

ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

Die medianen Ausgangsvolumina von PAXF 736 in den einzelnen Therapiegruppen lagen zwischen 41.2mm^3 (ADR) und 63.8mm^3 (Kontrollgruppe).

Die Vitalität und das exponentielle Wachstum des Xenografts wurden durch die Wachstumskurve der Kontrollgruppe demonstriert (Abb. 4.4.13. o).

Die Kurven der 5-FU, Cyclophosphamid und Adriamycintherapie verliefen auf einem ähnlichen Niveau. Auch die Effektivitätsdaten unterschieden sich kaum: 5-FU bewirkte einen optimalen T/C von 37.1% (Abb. 4.4.3△) an Versuchstag 15, Adriamycin (◇) erreichte an VT 15 einen Wert von 36.4% und unter Cyclophosphamidtherapie (+) lag der beste Wert von 25.2% an VT 22. In allen Fällen lag gemäß der klinischen Einteilung eine Progression vor.

Während 5-FU und Cyclophosphamid ihre maximale Wirksamkeit gegen Versuchsende entwickelten, wurde die Verlaufskurve der Adriamycintherapie hier wieder steiler, was für einen Wirkungsverlust nach der zweiten Dosierung sprach.

Ab Tag 15 war unter Cyclophosphamidtherapie eine leichte Tumorregression (Abb. 4.4.13.) zu beobachten.

Die Vindesintherapie (Abb. 4.4.13., x) bewirkte bei dem Pankreaskarzinom im Versuchszeitraum eine „Minimale Remission“ mit einem optimalen T/C von 4.2% an Versuchstag 22.

Chemotherapien demonstrierte PAXF 736 in diesem Versuch seine erhaltene Reaktionsfähigkeit auf antineoplastische Wirkstoffe im Quartettmodell.

Abbildung 4.4.14. zeigt die Wachstumskurven von GXF 251 unter Chemotherapie.

Anhand der unterschiedlichen Ergebnisse und Kurvenverläufe (Abb. 4.4.13.) unter verschiedenen

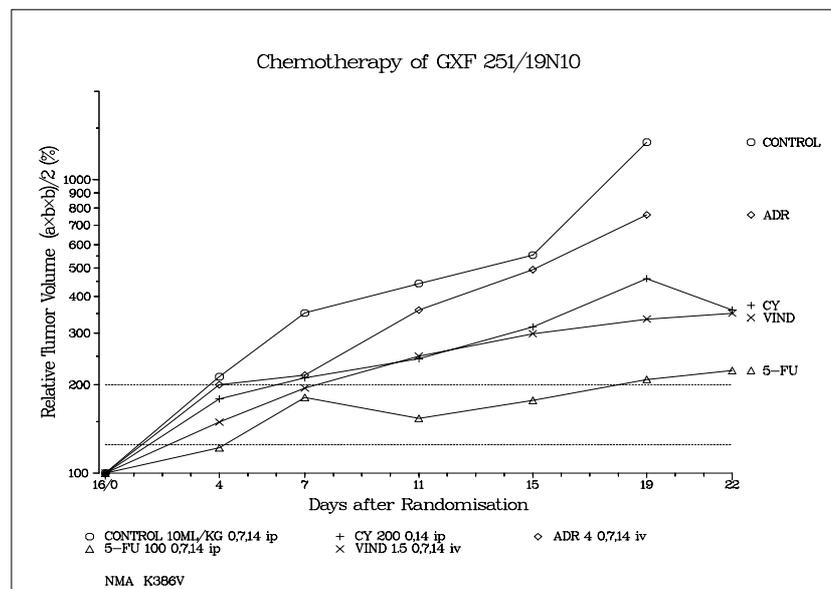


Abb. 4.4.14 Chemotherapie von GXF 251 im Quartettmodell
ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

GXF 251 wuchs in der Kontrollgruppe im Versuchszeitraum exponentiell (Abb. 4.4.14., o).

Durch Adriamycintherapie (◇) wurde nur eine geringe Wachstumsverzögerung bewirkt und die Kurve verlief auf etwas niedrigerem Niveau weitgehend parallel zur Kontrollkurve. Die klinische Progression äußerte sich im optimalen T/C von 56.5% am Versuchstag 19 (negative Aktivitätsbewertung siehe Kap. 3.11.2).

Deutlichere Wachstumshemmungen wurden durch Cyclophosphamid (Abb. 4.4.14., +) und Vindesintherapie (x) erzielt. Während Cyclophosphamid seinen optimalen T/C mit 29.6% am VT 22 hatte, lag der beste Wert der Vindesintherapie am VT 19 mit einem T/C von 25.0%.

In beiden Fällen lag klinisch eine Progression vor. Ähnlich wie bei PAXF 736 bewirkte Vindesin ab Versuchstag 19 einen leichten Rückgang im Tumolvolumen von GXF 251 (x).

Den größten Effekt auf das Wachstum von GXF 251 hatte die Therapie mit 5-FU: die Kurve verlief deutlich flacher und auf niedrigerem Niveau als die anderen und der optimale T/C betrug am VT 19 15.5% (△).

GXF 251 wuchs unter allen Therapien progredient, zeigte aber deutliche Unterschiede in den Endvolumina: Kontrolle 1273%, ADR 808% und 5-FU 261% des Ausgangsvolumen. Die Reaktionen von LXFA 629 auf die vier Chemotherapien werden in Abb. 4.4.15. dargestellt.

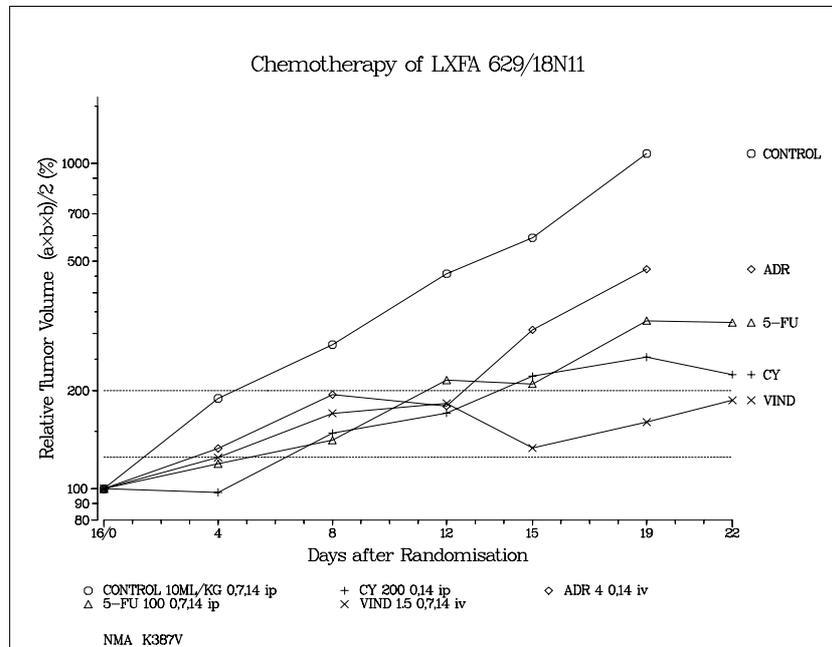


Abb. 4.4.15. Chemotherapie von LXFA 629 im Quartettmodell
ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

Die Tumoren der Kontrollgruppe zeigten sehr konstantes, exponentielles Wachstum (Abb. 4.4.15. o).

Die geringste Wachstumsverzögerung wurde durch Adriamycintherapie (◇) erzielt. Während die erste Applikation zu einem Rückgang des Volumens zwischen VT 8 und VT 12 und dem optimalen T/C von 39.2% (VT 12) führte, blieb die zweite Dosis offensichtlich wirkungslos. 5-FU entwickelte seine maximale Wirkung nach der dritten Applikation. Zwischen VT 12 und VT 16 und nach VT 19 stagnierte das Volumen, der optimale T/C lag mit 30.6% am VT 22 (Abb. 4.4.15.△). Einen ähnlichen Verlauf nahm die Kurve der Cyclophosphamidtherapie (+). Auch hier war die maximale Wirksamkeit, nachdem das Tumolvolumen ab Versuchstag 19 zurückging, am VT 22 mit einem T/C von 23.3%. Am stärksten reagierte LXFA 629 auf die Therapie mit Vindesin (x). Nach dem zweiten Zyklus flachte die Kurve zunehmend ab, um von Tag 12 bis Tag 16 regressiv zu verlaufen. Der optimale T/C wurde am Versuchstag 19 mit 15.0% gemessen. Sämtliche Therapieresultate wurden klinisch als Progression eingeteilt. Trotz viermaliger Tumorprogression zeigte LXFA unterschiedliche Reaktionen auf die Therapien. Neben den Kurvenverläufen (Abb. 4.4.15.) äußerte sich dies in den einzelnen

Endvolumina der Therapiegruppen, die von 190% (VIND) bis 382% (ADR) reichten (Kontrollgruppe: 959%).

Abbildung 4.4.16. zeigt das Ansprechen von BXF 1299 im Quartettmodell auf antitumorale Therapie.

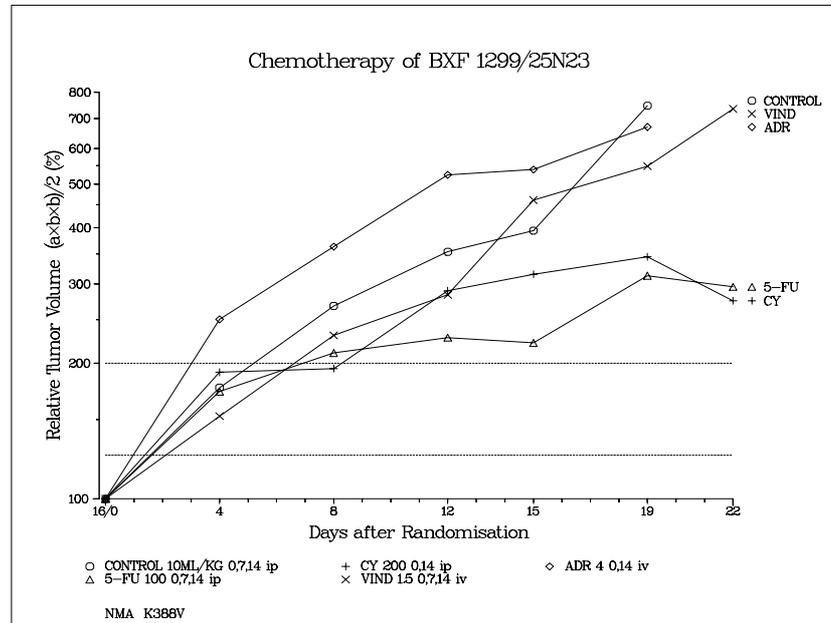


Abb. 4.4.16. Chemotherapie von BXF 1299 im Quartettmodell
ADR = Adriamycin, CY= Cyclophosphamid, 5-FU= 5-Fluoruracil, VIND= Vindesin

BXF 1299 wuchs in der Kontrolle bis VT 12 stetig exponentiell, schien dann langsamer zu werden, um ab VT 15 nochmal einen Wachstumsschub zu zeigen (Abb. 4.4.16. o).

Der Kurvenverlauf der vier Therapiegruppen zeigte, daß BXF 1299 auch im Quartettmodell gegenüber der Standardchemotherapie eher resistent war. Unter Adriamycintherapie (◇) proliferierte das Übergangszellkarzinom in der ersten Versuchshälfte schneller als die Kontrolle. Erst am letzten Versuchstag konnte ein T/C < 100% (89.7% VT 19) gemessen werden. Auch die Vindesintherapie (Abb. 4.4.16., x) beeinflusste das Wachstum des Tumors nur wenig. Die Kurve verlief weitgehend auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolle. Der optimale T/C lag mit 73.4% am VT 19.

Cyclophosphamid (Abb. 4.4.16., +) und 5-FU (Δ) waren insbesondere in der zweiten Versuchshälfte wirksam. 5-FU erreichte den optimalen T/C mit 41.9% am VT 22.

Nach VT 19 nahm das Tumolvolumen unter Cyclophosphamidtherapie ab und der optimale T/C wurde am Tag 22 mit 39.0% beobachtet.

Unter sämtlichen Therapien wuchs der Tumor gemäß der klinischen Einteilung progredient. Die Endvolumina variierten zwischen 472% (CY) und 820% (ADR), was eine gut erhaltene Reagibilität des Xenografts auf antineoplastisch aktive Substanzen demonstrierte.

4.4.6. Vergleich der Chemosensitivität

Um zu untersuchen, inwieweit die Anwesenheit von jeweils drei anderen Tumoren auf derselben Nacktmaus die Reaktion der Xenografts auf Therapie mit Standardchemotherapeutika beeinflussen kann, wurden die im Quartettmodell erzielten Ergebnisse der vier antineoplastisch wirksamen Substanzen Adriamycin, 5-FU, Cyclophosphamid und Vindesin mit bereits bekannter Wirksamkeitsdaten aus Einzelimplantationen (Fiebig et al., 1992) verglichen.

Tab. 4.4.6. Chemosensitivitätsvergleich Tumorquartett III

Tumor	Standard-chemo-thera-peutikum	Einzelimplantation		Vierfachimplantation	
		Aktivitätsbewertung	T/C ^e	Aktivitätsbewertung	T/C ^e
PAXF 736	ADR ^a	+	26.5%	+	36.4%
	5-FU ^b	+	41.3%	+	37.1%
	CY ^c	+	34%	+	25.2%
	VIND ^d	+++	8.1%	+++	4.2%
LXFA 629	ADR	+	42%	+	39.2%
	5-FU	+	43.5%	+	30.6%
	CY	+	25%	+	23.3%
	VIND	++	14.6%	++	15.0%
GXF 251	ADR	-	66.5%	-	56.5%
	5-FU	+	16.8%	+	15.5%
	CY	+	25%	+	29.6%
	VIND	-	55%	+	25.0%
BXF 1299	ADR	-	87.9%	-	89.7%
	5-FU	+	44.5%	+	41.9%
	CY	+	37.4%	+	46.2%
	VIND	-	60.3%	-	73.4%

^a: Adriamycin; ^b: 5-Fluoruracil; ^c: Cyclophosphamid; ^d: Vindesin; ^e: optimaler Wert (Test/ Control)

Als Vergleichswerte dienten die optimalen T/C Werte sowie die Einstufung im Aktivitätsbewertungssystem (historische Daten, Erklärung der Begriffe siehe Kapitel 3.11.2.).

Tabelle 4.4.6 stellt die antitumoralen Wirksamkeitsdaten der vier Standardchemotherapeutika für die vier Xenografts des 3. Tumorquartetts in Einzel- und Vierfachimplantation dar.

Beim Vergleich aller vier Tumoren und der Ergebnisse aller vier Testsubstanzen ließen sich folgende Übereinstimmungen feststellen:

- Ergebnisse innerhalb derselben 50% T/C bzw. Beurteilung aktiv (+ - +++) oder inaktiv (-): **15 / 16** (= 94%)
- Ergebnisse innerhalb 20% T/C: **14 / 16** (= 87.5%)
- Ergebnisse innerhalb 10% T/C: **13 / 16** (= 81%)

Bei der Betrachtung der einzelnen Xenografts zeigte sich PAXF 736 als Modell mit der größten Übereinstimmung: Alle vier Ergebnisse lagen innerhalb derselben 10% T/C.

Die maximale Abweichung betrug 9.9%. Die anderen drei Xenografts hatten jeweils drei Ergebnisse innerhalb von 10% T/C. Die genaueste Wiedergabe der Chemosensibilität dieser Tumoren lieferte LXFA 629 mit einer maximalen Differenz von 12.9%.

Nur unwesentlich ungenauer fiel die Übereinstimmung bei BXF 1299 aus. Es lagen ebenfalls drei der Werte innerhalb 10% während der vierte Wert mit 13.1% Unterschied sich noch innerhalb von 20% befand. Die größte Differenz wies GXF 251 auf. Das Magenkarzinom lieferte den einzigen Ausrutscher durch die Einstufung von Vindesin als aktiver Substanz mit einem optimalen T/C von 25.0%. In der Einzelimplantation war der Wirkstoff bei einem grenzwertigen T/C von 55% als unwirksam eingestuft worden. Die maximale Differenz betrug auch hier nur 30.0% und erfüllte damit zumindest eine Teilkategorie der Übereinstimmungskriterien (innerhalb derselben angenommenen 50 % T/C Grenze).

Der Substanzvergleich zeigte Adriamycin und Cyclophosphamid mit jeweils vier Ergebnissen innerhalb derselben 10% T/C als Wirkstoffe mit der größten Übereinstimmung. Cyclophosphamid erbrachte mit einer maximalen Differenz von 8.8% die genaueste Reproduktion der Wirksamkeit in der Einzelimplantation. Die Vindesintherapie zeigte die größten Abweichungen zwischen den Empfindlichkeiten der Xenografts im Quartettmodell und in der Einzelimplantation. *Insgesamt fiel der Vergleich der Chemosensitivität gegenüber vier Standardchemotherapeutika mit jeweils unterschiedlichem Wirkmechanismus und Pharmakokinetik sehr positiv im Hinblick auf das Kriterium der „gleichen Responsivität“ im Quartett aus.*

Insbesondere die **94%ige** Wiedererkennung der antineoplastischen Aktivität einer Substanz (bzw. 100% der Werte innerhalb von 50% T/C) und **81%** der Werte innerhalb derselben 10% T/C spricht für die Tauglichkeit des Modells für die Substanztestung.

4.4.7. Histologischer Vergleich

Zur Überprüfung der Erhaltung morphologischer und histologischer Besonderheiten der Xenografts nach Vierfachimplantation wurden die HE-gefärbten histologischen Präparate der vier Xenografts des Quartetts anhand charakteristischer Kriterien mit dem HE-gefärbten Schnitt eines einzeln auf der Nacktmaus gewachsenen Tumors verglichen.

Als morphologische Kriterien dienten Charakteristika, die beim ursprünglichen Resektat beschrieben worden waren (siehe Tab. 3.1., Kap. 3.2.) und auf dem Vergleichspräparat (Präparat aus einer unbehandelten Einzelimplantation) wiedergefunden werden konnten (siehe Tab. 4.4.7.1.- 4.4.7.4.)

Es wurden in erster Linie Areale vitalen Tumorgewebes in der Nähe der Tumorkapsel, die durch eine ausreichende Gefäßdichte gut mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt schienen, miteinander verglichen.

Die bei jedem Xenograft ab einem gewissen Volumen auftretende zentrale Nekrose wurde nicht bewertet. Das quantitative Vorkommen vitalen Tumorgewebes konnte anhand der HE Schnitte nur grob geschätzt werden.

Die in die Abbildungen (4.4.17. – 4.4.24.) eingefügten Ziffern entsprechen den in den Tabellen (4.4.7.1. – 4.4.7.4.) beschriebenen Merkmalen.

4.4.7.1. Histologischer Vergleich PAXF 736

Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten): infiltratives, wenig differenziertes, gering schleimbildendes Adenokarzinom des Pankreas
<u>Histologische Charakteristika des Xenografts:</u> 1. ungeordnete, kleindrüsige Verbände epithelialen Tumorgewebes 2. Drüsenlumina teilweise mit amorphem Inhalt (Muzin) und Zelldetritus 3. polymorphe, meist polygonale Tumorzellen mit teilweise hyperchromen, polymorphen Kernen, die große, teils multiple Nukleoli besitzen 4. Zytoplasma teilweise aufgelockert, teils vakuolisiert

Tab. 4.4.7.1. Vergleichskriterien der histologischen Untersuchung von PAXF 736

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 19N16)

- Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 28N25)
- Lokalisationskonstellationen 1-4 (Passage 18N15)
- Wachstumsstudie (Passage 19N16)
- Standardchemotherapieversuch (Passage 26N23)
- Naturstoffversuch (Passage 22N19)

Die beim Ursprungsresektat beschriebene und im Vergleichspräparat angesprochene typische Gewebestruktur des Adenokarzinoms (Tab. 4.4.7.1. Punkt1) waren in allen histologischen Präparaten der Mehrfachimplantationen vorhanden.

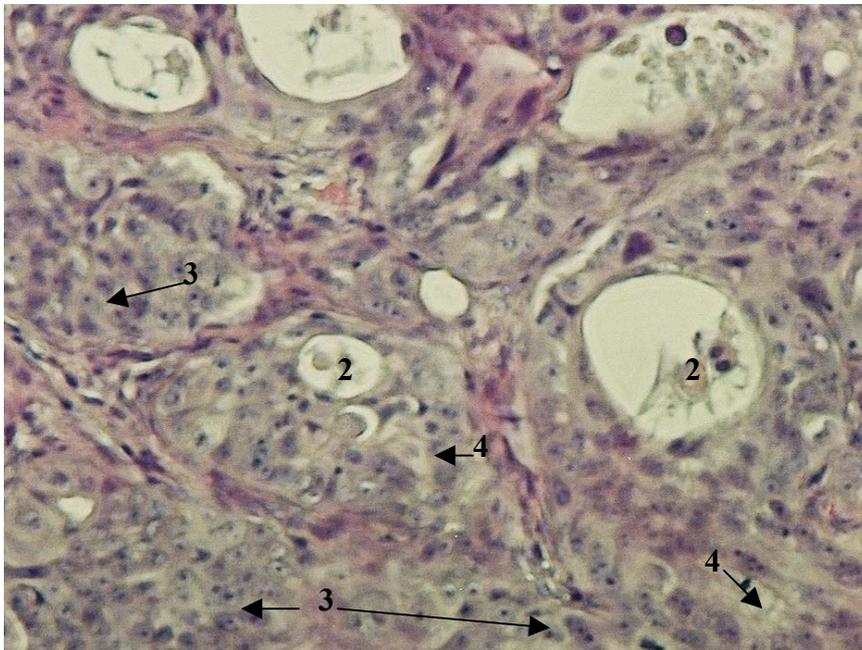


Abb. 4.4.17. HE-gefärbtes histologisches Präparat von PAXF 736 aus der Einzelimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-4 siehe Tab.4.4.7.1.

Die beiden fotografischen Abbildungen (Abb. 4.4.17. und Abb. 4.4.18.) zeigen Ausschnitte der 200-fach vergrößerten HE-gefärbten histologischen Präparate aus Einzelimplantation (Vergleichspräparat) und dem Tumorquartettmodell (Kontrollgruppe Standardchemotherapieversuch).

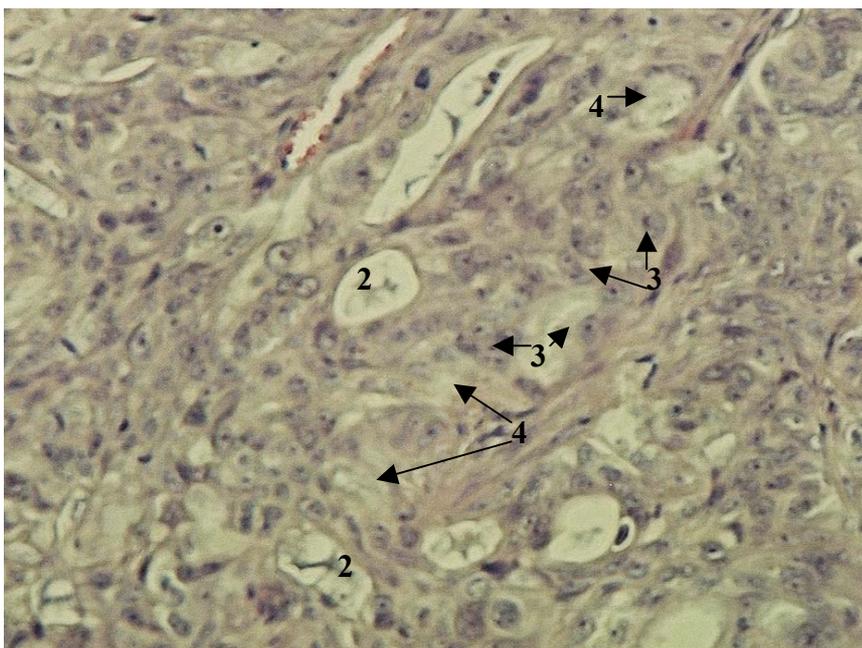


Abb. 4.4.18. HE-gefärbtes histologisches Präparat von PAXF 736 aus der Vierfachimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-4 siehe Tab. 4.4.7.1.

In manchen HE-Schnitten stellten sich die Drüsenlumina weniger deutlich dar oder enthielten weniger oder keinen amorphen Inhalt (Tab. 4.4.7.1. 2., Abb. 4.4.18.). In diesen Präparaten schienen die Drüsenazini kleiner und englumiger zu sein.

Die zytologischen Merkmale der Tumorzellen (Tab. 4.4.7.1. 3. und 4.) konnten in allen Präparaten klar angesprochen werden (siehe Abb. 4.4.17. und Abb. 4.4.18.).

Bezüglich des Verhältnisses zwischen vitalem Tumorgewebe (Kapsel) und zentraler Nekrose schienen alle Schnitte gemäß der Tumorgröße und der angeschnittenen Fläche ähnliche Proportionen aufzuweisen.

Anhand der hier erstellten Kriterien wurde das Pankreaskarzinom in jedem Präparat klar anhand der typischen Merkmale identifiziert und es konnten keine bedeutenden Veränderungen des histologischen Bildes in den Mehrfachimplantationen (typisches Präparat: Abb. 4.4.18.) festgestellt werden.

4.4.7.2. Histologischer Vergleich GXF 251

Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten):

teils exophytisch, teils ausgesprochen infiltrativ wachsendes Siegelringzellkarzinom des Magens
--

<u>Histologische Charakteristika des Xenografts:</u>
--

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">8. stark ausgeprägte zentrale Nekrose, vitales Tumorparenchym nur randständig (Kapsel)
Tumorzellansammlungen nur andeutungsweise durch schmale Stromaadern unterteilt9. polygonale Zellen mit großem, teilweise randständigem Kern und basophilem Zytoplasma10. Zellkerne mit großen eosinophilen Nukleoli, viele Mitosefiguren11. Siegelringzellen: große rundliche Zellen mit sichelförmigem Zellkern in randständiger
Aufreibung, Zytoplasma wabig vakuolisiert |
|---|

Tab. 4.4.7.2. Vergleichskriterien der histologischen Untersuchung von GXF 251

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 15N6)

Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 20N11)
Lokalisationskonstellationen 1-4 (12N3)
Wachstumsstudie (13N4)
Standardchemotherapieversuch (19N10)
Naturstoffversuch (15N6)

Sämtliche zytologischen Merkmale (Tab. 4.4.7.2. 2. und 3.) waren in den untersuchten Präparaten deutlich ausgeprägt (Abb. 4.4.19. und Abb. 4.4.20.).

Die Abbildungen 4.4.19. und 4.4.20. stellen das histologische Bild des Xenografts in Einzel- und Vierfachimplantation bei 200-facher Vergrößerung (HE-Färbung) gegenüber.

Insbesondere die charakteristischen Siegelringzellen (Tab. 4.4.7.2. 4.) konnten jeweils eindeutig angesprochen werden und sind in den beiden Photographien deutlich zu erkennen.

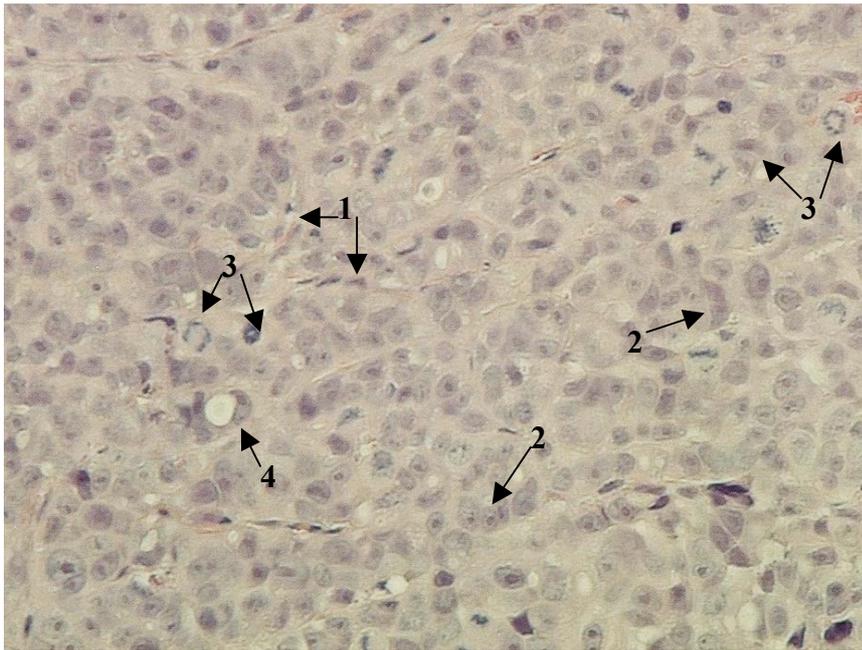


Abb. 4.4.19. HE-gefärbtes histologisches Präparat von GXF 251 aus der Einzelimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-4 siehe Tab. 4.4.7.2.

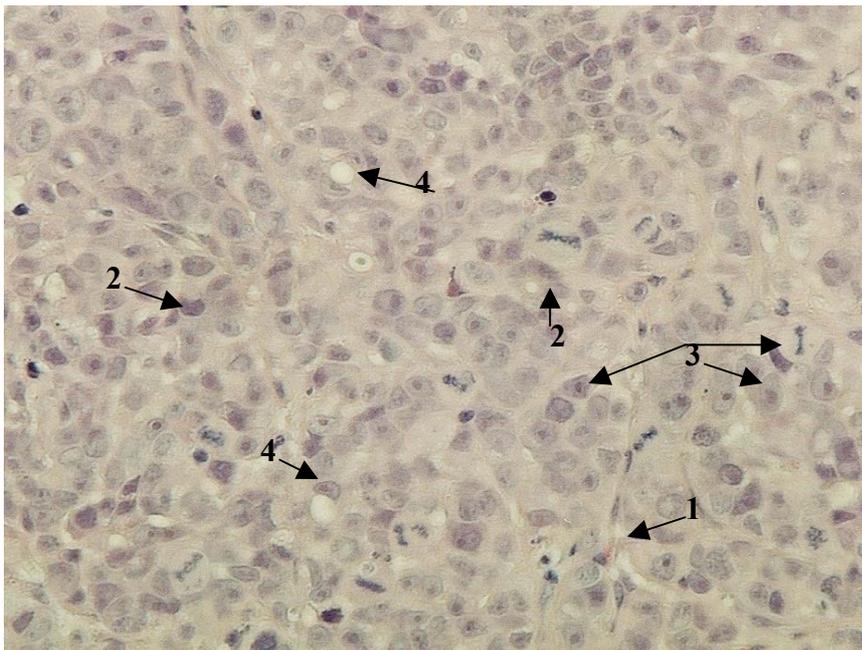


Abb. 4.4.20. HE-gefärbtes histologisches Präparat von GXF 251 aus der Vierfachimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-4 siehe Tab.4.4.7.2.

Die Basophilie des Zytoplasmas und die eosinophile Anfärbbarkeit der Nukleoli variierten minimal je nach angeschnittenem Areal und Intensität der Färbung (siehe Abb. 4.4.19. und 20.). Auch in Präparaten mit kleinerer Anschnittfläche war das Zentrum stets stark nekrotisch und nur die blutgefäßversorgten Randregionen um die Tumorkapsel enthielten vitales Gewebe (Tab. 4.4.7.2., 1.). GXF 251 stellte sich bei dieser Untersuchung in den Mehrfachimplantationen histologisch unverändert dar.

4.4.7.3. Histologischer Vergleich LXFA 629

Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten): wenig differenziertes Adenokarzinom des rechten Oberlappenbronchus
Histologische Charakteristika des Xenografts: 1. Tumorzellen durch Stroma grob in Trabekel und Stränge angeordnet, teils drüsenartig formiert 2. großleibige epitheliale Zellen teilweise mit vakuolisiertem Zytoplasma 3. wenig Zell- und Kernpolymorphie, teilweise Kernhyperchromasie 4. atypische Mitosen

Tab. 4.4.7.3. Vergleichskriterien der histologischen Untersuchung von LXFA 629

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 18N11)

Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 19N12)
Lokalisationskonstellationen 1-4 (13N6)
Wachstumsstudie (14N7)
Standardchemotherapieversuch (18N11)
Naturstoffversuch (15N8).

Bei diesem wenig differenzierten Bronchialkarzinom waren die histologischen Merkmale (Tab.4.4.7.3., 1.) schon im Vergleichspräparat (Abb. 4.4.21.) relativ unspezifisch.

In der Übersicht (geringe Vergrößerung, 10fach) boten die Xenografts aus den Mehrfachimplantationen (als Beispiel: Abb. 4.4.22.) eine vergleichbar ungeordnete histologische Struktur. Die zytologischen Kriterien (Tab. 4.4.7.3., 2. + 3.) wurden von allen untersuchten HE-Schnitten erfüllt.

Das Merkmal der atypischen Mitosen (Tab. 4.4.7.3., 4.) wurden hier nur qualitativ untersucht. In manchen Schnitten konnten solche Zellteilungsfiguren nicht zweifelsfrei identifiziert werden. In den fotografierten Ausschnitten (Abb. 4.4.21. und 4.4.22.) sind keine eindeutig atypischen Mitosefiguren abgebildet.

Die in Abbildung 4.4.21. und 4.4.22. eingefügten Zahlen stellen die Merkmale aus Tabelle 4.4.7.3. dar.

In den fotografischen Abbildungen (Abb. 4.4.21. und Abb, 4.4.22.) ist der beschriebene histologische Aufbau des Tumors in den HE-Schnitten jeweils deutlich zu erkennen. Das Tumorstroma stellt sich deutlich dar und unterteilt die Tumorzellen in kleinere drüsige Kompartimente bzw. bildet trabekelartige Strukturen.

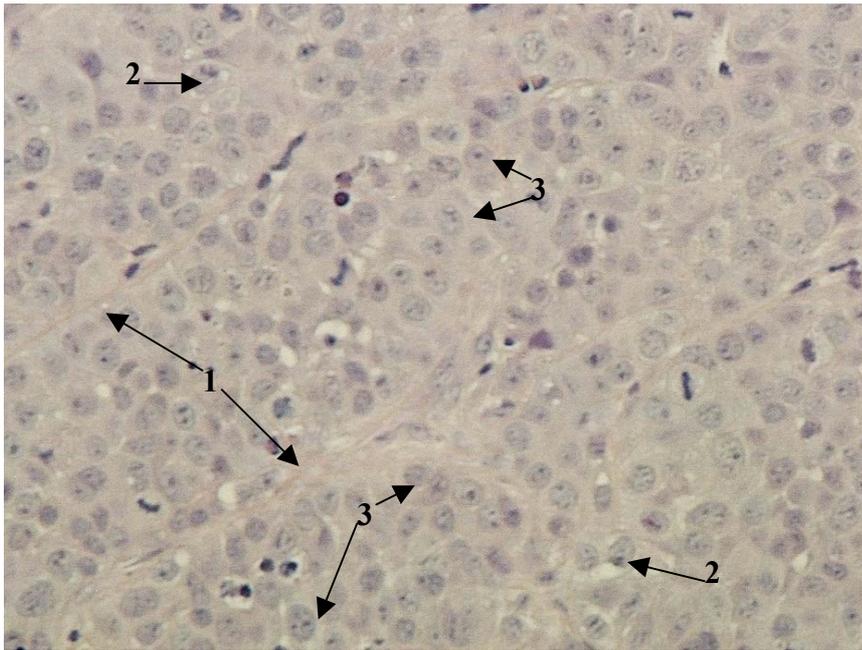


Abb. 4.4.21. HE-Färbung Paraffinschnittes von LXFA 629 in der Einzelimplantation (Objektvergrößerung 20 x), 1-4 siehe Tab. 4.4.7.3.

Die relativ große Uniformität der Zellkerne lässt sich im Überblick beurteilen.

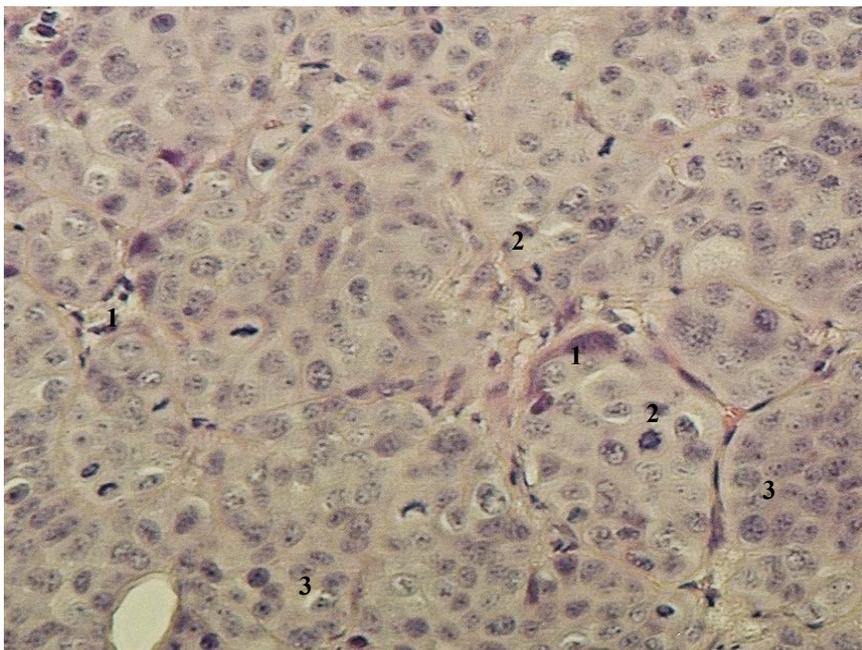


Abb. 4.4.22. HE-Färbung Paraffinschnittes von LXFA 629 in der Mehrfachimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-4 siehe Tab. 4.4.7.3.

Mit allenfalls geringen Unterschieden stellte sich LXFA 629 anhand der beurteilten Kriterien hier histologisch weitgehend unverändert dar.

4.4.7.4. Histologischer Vergleich BXF 1299

Histologisch-pathologischer Befund (des Ursprungsresektats vom Patienten):

solide wachsendes, infiltratives Übergangsepithelkarzinom

<u>Histologische Charakteristika des Xenografts:</u>
--

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. teils drüsige Gewebestruktur, teils lockere strangartige Zellverbände2. adenoide, meist polygonale, in drüsigen Arealen teils zylindrische Zellen3. schaumig erscheinendes, teils vakuolisiertes Zytoplasma4. Zellkerne polymorph, teilweise Kernwandhyperchromasie, oft randständig, deutliche Nukleoli |
|--|

Tab. 4.4.7.4. Vergleichskriterien der histologischen Untersuchung von BXF 1299

Untersuchte Präparate (Vergleichspräparat: Passage 15N3)

Doppelimplantationskombinationen 1-3 (Passage 26N14)

Lokalisationskonstellationen 1-4 (Passage 16N4)

Wachstumsstudie (17N5)

Standardchemotherapieversuch (25N13)

Naturstoffversuch (20N8)

BXF 1299 zeigte im Vergleichsschnitt (Abb. 4.4.23.) eine sehr markante, gut definierbare Gewebearchitektur im histologischen Bild (Tab. 4.4.7.4., 1.), das in allen untersuchten Präparaten vorhanden war.

Die in die Abbildungen eingefügten Ziffern entsprechen den Merkmalen in Tab. 4.4.7.4.

In jedem der Präparate des Übergangsepithelkarzinoms waren in den vitalen Bereichen jeweils Areale mit angedeutetem drüsigem Charakter neben Tumorzellansammlungen, die durch das Tumorstroma in strangartige Gebilde unterteilt waren, zu finden (siehe Abb. 4.4.23. und Abb. 4.4.24.).

Das zytologische Erscheinungsbild des Übergangsepithelkarzinoms zeigte innerhalb eines Präparates und im Vergleich der Schnitte aus Einzel- und Mehrfachimplantation geringe Unterschiede beim Grad der Ausprägung der vesikulären Kernstrukturen. Abb. 4.4.24. zeigt Tumorzellen mit deutlichen vesikulären Kernstrukturen, während die Kerne in Abb. 4.4.23. homogener angefärbt sind.

Das Ausmaß der Vakuolisierung des Zytoplasmas und sein schaumiges Erscheinungsbild variierte (Tab. 4.4.7.4.) zwischen den betrachteten Arealen innerhalb eines Präparates und auch die beiden Abbildungen (Abb. 4.4.23. und 4.4.24.) zeigen bezüglich dieser Kriterien Unterschiede.

Beide Abbildungen (Abb. 4.4.23. und Abb. 4.4.24.) stellen Photographien der HE- gefärbten Paraffinschnitte dar. Die vitalen Tumorareale sind sehr gut mit Kapillargefäßen versorgt.

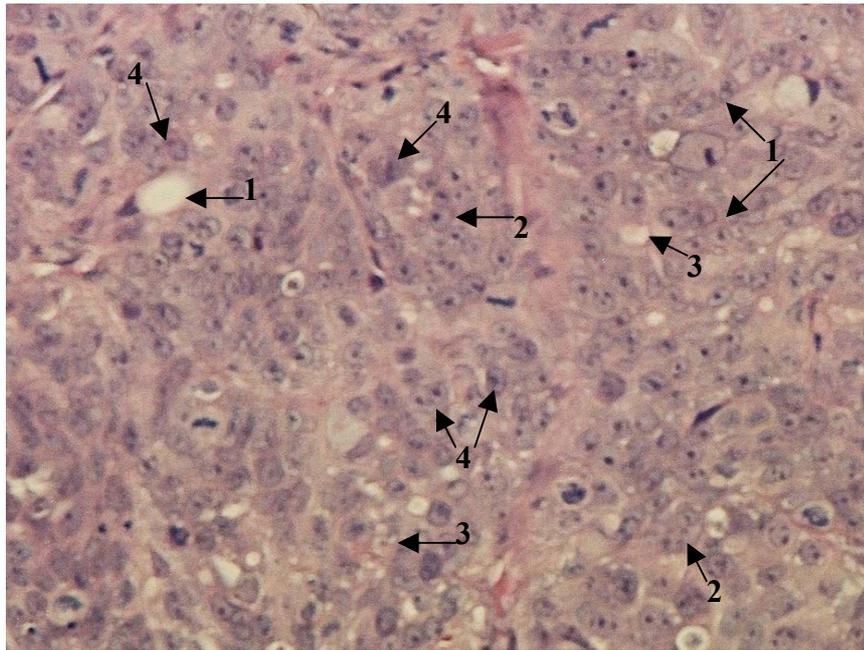


Abb. 4.4.23 HE- gefärbter Paraffinschnitt von BXF 1299 aus der Einzelimplantation (Objektvergrößerung 20 x), 1-4 siehe Tab. 4.4.7.4.

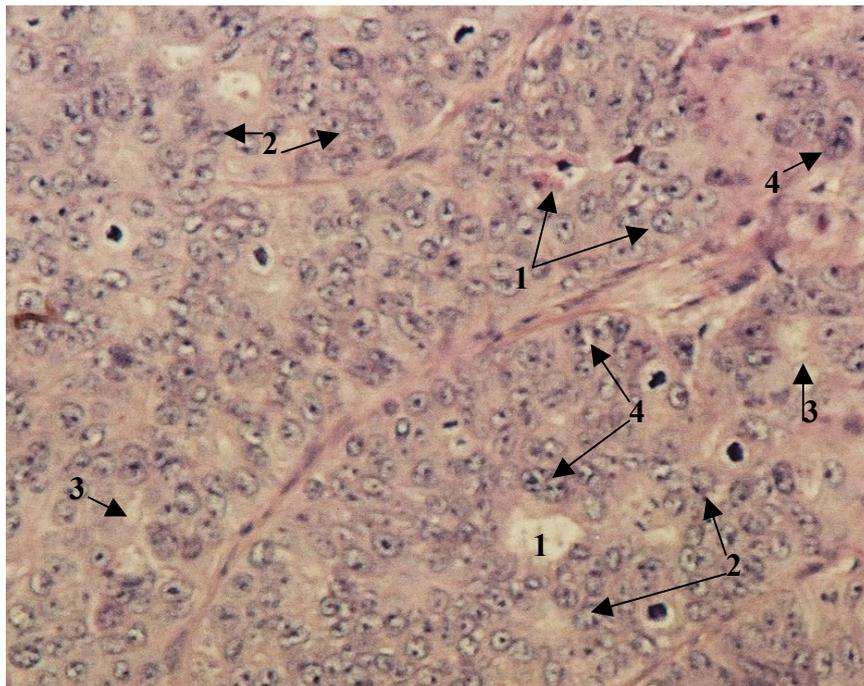


Abb. 4.4.24 HE- gefärbter Paraffinschnitt von BXF 1299 aus der Mehrfachimplantation (Objektvergrößerung 20 x); 1-4 siehe Tab. 4.4.7.4.

Die sichtbaren Hohlräume stellen zum Teil Gefäße (Endothelzellen), zum Teil drüsenluminaartige Strukturen dar. Bei einfacher HE-Färbung und lichtmikroskopischer Betrachtung erschien BXF 1299 in den Mehrfachimplantationen (Beispiel: Abb. 4.4.24.) keine bedeutenden histologischen oder zytologischen Unterschiede zum Vergleichsschnitt (Abb. 4.4.23.) aufzuweisen.

4.4.8. Fotografische Abbildungen der Nacktmäuse

Zur Veranschaulichung der subkutanen Tumorlokalisationen und des Wachstums der Xenografts wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Implantation Fotografien der tumortragenden Nacktmäuse aufgenommen.

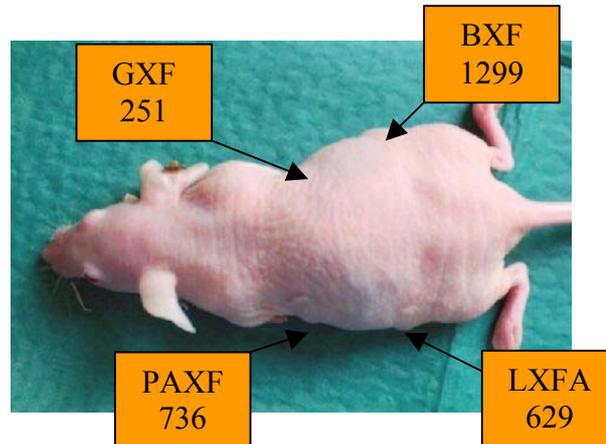


Abb. 4.4.25. Nacktmaus 10 Tage nach der Implantation von Tumorquartett III

Zehn Tage nach der Operation sind von den Inzisionen nur noch komplikationslos verheilte Narben zu erkennen (Abb. 4.4.25.). Von den Xenografts PAXF 736, GXF 251 und LXFA 629 sind die noch in der Induktionszeit befindlichen Implantationsfragmente zu erkennen. BXF 1299 ist bereits am Ende seiner Induktionszeit und erfüllt bereits die Vitalitätskriterien.

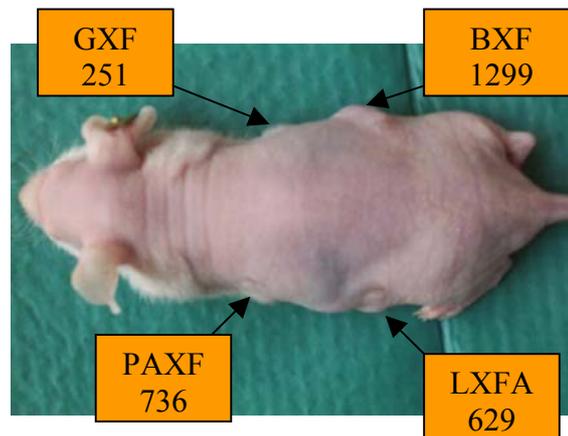


Abb. 4.4.26. Nacktmaus 15 Tage nach der Implantation von Tumorquartett III

Fünf Tage später erfüllen alle beteiligten Xenografts die Vitalitätskriterien, und es kann mit dem Messen und der Therapie begonnen werden (Abb. 4.4.26.). Während die drei langsamer wachsenden Tumoren noch relativ klein sind (ca 4.5 mm x 4.0 mm), hat BXF 1299 das exponentielle Wachstum aufgenommen und seine Durchmesser auf ca. 8 mm x 6 mm vergrößert.

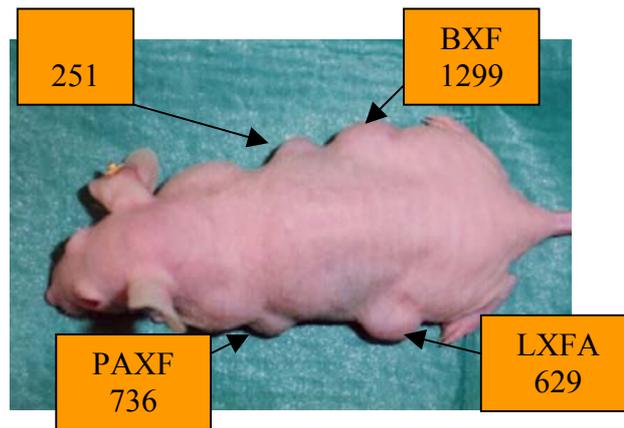


Abb. 4.4.27. Nacktmaus 24 Tage nach der Implantation von Tumorquartett III

Neun Tage nach der Randomisierung (Tag 15, Abb. 4.4.26.) erkennt man die deutliche Volumenzunahme aller vier Xenografts, die zu diesem Zeitpunkt bereits annähernd beide Verdopplungen (200%, 400%) durchschritten haben (Abb. 4.4.27.).

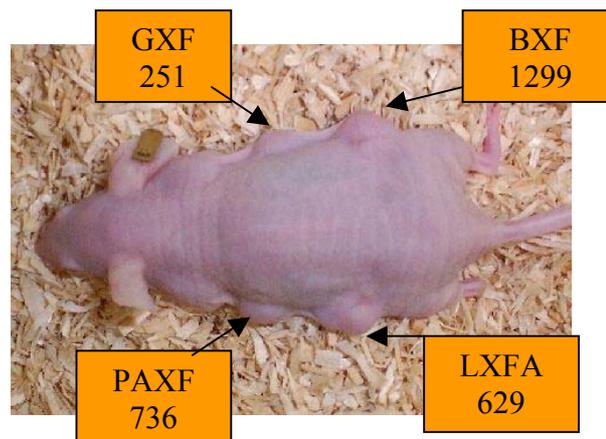


Abb. 4.4.28. Nacktmaus 28 Tage nach der Implantation von Tumorquartett III (Versuchsende)

Vier Tage später haben die Tumoren weiterhin ihr Volumen kontinuierlich vergrößert und die maximal tolerable Tumorlast erreicht (Abb. 4.4.28.). GXF 251 und PAXF 736 sind in etwa gleich groß mit einem Durchmesser von ca. 10 mm. BXF 1299 stellt das größte Xenograft mit einem maximalen Durchmesser von ca. 12 mm dar. Zu diesem Zeitpunkt wird das Tumormodell beendet. Das abgebildete Versuchstier hat einen sehr guten Ernährungszustand und ein ungestörtes Allgemeinbefinden.

4.4.9. Endbeurteilung der Etablierung des Tumorquartettmodells III

Die in den verschiedenen Studien mit den Xenografts des Tumorquartettmodells III erzielten Ergebnisse sollen hier an dem Maßstab der fünf in Kapitel 3.6. aufgelisteten Etablierungskriterien gemessen werden und so die Eignung des Modells für die geplanten Substanztestungen (Naturstoffe) überprüft werden.

Die Wachstumsstudien (Doppel-, Lokalisations- und Quartettwachstumsstudien) wurden hier nur mit den ersten drei Kriterien (Wachstumsparameter) verglichen. Das histologische Bild der in diesen Studien verwandten Xenografts wurde in einem eigenen Abschnitt ausgewertet.

In der **Doppelimplantationsstudie** konnten alle eingesetzten Tiere auch an der Studie teilnehmen (Angehensrate 100%).

Das Therapiezeitfenster war 25 Tage lang und erfüllte damit das Kriterium mehr als zufriedenstellend. Alle vier Xenografts erreichten in den sechs möglichen Kombinationen mindestens zwei Verdopplungen. Während zwei Xenografts (GXF 251, LXFA 629) in Anwesenheit aller drei anderen Tumoren sehr konstant wuchsen, wiesen PAXF 736 und BXF 1299 Unterschiede in der Wachstumskinetik in den unterschiedlichen Kombinationen auf. Diese Beeinflussung ließ aber keine einheitliche Tendenz erkennen.

Das Erreichen der beiden Volumenverdopplungen wurde nicht wesentlich behindert, und es bestand keine offensichtliche Abhängigkeit der veränderten Wachstumskinetik von der Tumormasse des zweiten Xenografts.

Bei der **Lokalisationsstudie** wurde in Gruppe drei mit zwei geeigneten von vier implantierten Mäusen nur eine Angehensrate von 50% erreicht und damit das Etablierungskriterium in dieser Gruppe verfehlt. Die anderen Gruppen und die Gesamtangehensrate lagen mit jeweils 75% über den geforderten 60%. Das Therapiezeitfenster war mit 21 Tagen für die Testzwecke ausreichend lang. In allen Gruppen wurden die beiden geforderten Volumenverdopplungen erreicht.

Zwischen den Gruppen bestanden Unterschiede in den Verdopplungszeiten der vier Xenografts, die auch hier keine einheitliche Tendenz der Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von einem bestimmten Implantationsort oder der konstanten negativen Beeinflussung eines Xenografts durch einen anderen Tumor erkennen ließen.

Die für die **Studie des Wachstumsverhaltens** eigens implantierten Kontrollgruppen der Standardchemotherapiestudie und des Naturstoffversuchs hatten Angehensraten von 77.5%-100% bei einer Gesamtangehensrate von 85%. Das Therapiezeitfenster war zwischen 14 und

19 Tagen lang. Während 17 und 19 Tage auch für herkömmliche Testungen eine akzeptable Versuchsdauer darstellten, boten 14 Tage Versuchsdauer eine Nachbeobachtungszeit von nur sechs Tagen nach der letzten Applikation einer Substanz im Schema d: 0, 4, 8, was nur für einen Schnelltest als Primärscreening ausreichte.

Sämtliche Volumenverdopplungen wurden erreicht und trotz der unterschiedlichen Verdopplungszeiten der vier Xenografts zwischen den einzelnen Implantationen zeigte sich stets ein recht synchrones Wachstum der Tumoren.

Beim Vergleich der experimentell gewonnenen mit den historischen Wachstumsdaten der beteiligten Xenografts in Einzel- Doppel- und Vierfachimplantation ergab sich eine offensichtliche Stimulation der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren im Quartettmodell.

Bis auf eine Gruppe der Lokalisationsstudie *erfüllten alle* hier betrachteten Versuchsergebnisse die *ersten drei Etablierungskriterien*.

In der **Chemoresponsivitätsstudie** demonstrierte jedes der vier Xenografts die Eigenschaft, auf vier verschiedene antineoplastische Therapien unterschiedlich von einer Tumorprogression bis zur kompletten Remission mit allen möglichen Zwischenstufen zu reagieren.

Beim **Vergleich der Chemosensibilität** der Tumoren im Quartettmodell und in der Einzelimplantation ergab sich eine 94%ige Übereinstimmung bei der Einteilung aktiv oder inaktiv (innerhalb 50% T/C). 81% der Werte hatten eine geringere Abweichung als 10% T/C. Ein Tumor (PAXF 736) hatte bei allen vier Ergebnissen eine kleinere Abweichung als 10%, während alle anderen zumindest drei dieser guten Übereinstimmungen zeigten. Die maximale Abweichung hielt sich mit 30% in engen Grenzen.

Durch diese Ergebnisse wurde das vierte Kriterium – die *erhaltene Chemosensitivität* – voll erfüllt und das Tumorquartettmodell bezüglich dieses Kriteriums als *etabliert* angesehen.

Der **histologische Vergleich** der Tumoren aus den Mehrfachimplantationen zeigte keine bedeutenden Abweichungen des mikroskopischen Bildes im Vergleich zu einem HE-Schnitt des jeweiligen Xenografts aus einer Einzelimplantation. Mit geringen Schwankungen wurden die charakteristischen zytologischen und histologischen Merkmale in allen untersuchten HE-Schnitten erkannt.

Mit der *Erfüllung des fünften Kriterium* – des *erhaltenen histologischen Bildes* - wird das Tumorquartettmodell III mit den Xenografts PAXF 736, GXF 251, LXFA 629 und BXF 1299 in der beschriebenen Konstellation *bezüglich aller Kriterien als etabliert* und das *Tumormodell als für Testungen geeignet angesehen*.

4.5. Beispiel einer Wachstumsbeeinflussung durch einen Tumor

In dieser Studie sollte der Einfluß des Lewis Lung Karzinoms auf das Wachstum von zwei der schnell proliferierenden Xenografts aus Tumorquartett II untersucht werden.

Von verschiedenen aus injizierten Zellsuspensionen abstammenden subkutanen Tumoren mancher Zelllinien des Lewis Lung Karzinoms ist in der Literatur ein wachstumshemmender Einfluß sowohl auf eigene Lungenmetastasen als auch auf Sekundärimplantate durch die Sekretion des Angiogenesehemmstoff Angiostatin beschrieben (O'Reilly et al., 1994). In diesen Studien wurden die Metastasen und später implantierten Tumoren bei Anwesenheit des subkutan wachsenden Primärtumors abhängig von dessen Tumolvolumen reversibel in ihrem Wachstum gehemmt.

Untersuchungsziel dieser Studien war es zu überprüfen, ob das Lewis Lung Karzinom in der Lage ist, die humanen Tumoren des Labors Prof. Fiebig in ihrem Wachstum zu beeinflussen. Aufgrund des rasanten Wachstums des aus der Maus stammenden Lewis Lung Karzinoms wurden beide Tumoren gleichzeitig implantiert, um bis zum Erreichen der maximalen Tumorlast ein ausreichendes Zeitfenster zur Beobachtung des Wachstumsverhaltens der Xenografts zu schaffen.

In beiden Versuchen wurden acht männliche Nacktmäuse als Kontrollgruppe mit RXF 944LX bzw. XF 575 beidseitig implantiert. Die Testgruppe bestand aus 8 Mäusen, denen in die eine Flanke das humane Xenograft und auf die andere Seite der murine Tumor implantiert wurde.

4.5.1. Wachstumsbeeinflussung von RXF 944LX durch das Lewis Lung Karzinom

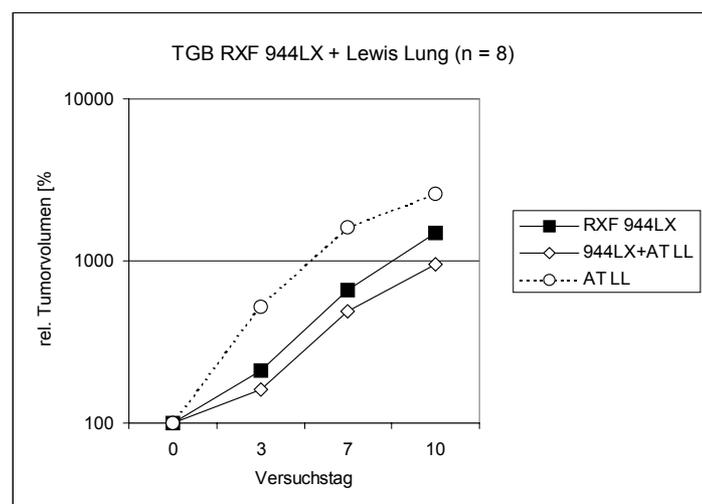


Abb. 4.5.1. Doppelimplantation RXF 944LX und Lewis Lung (K354)
AT: animal tumor (murin) LL: Lewis Lung

Abbildung 4.5.1. stellt das Wachstum von RXF 944LX in der Einzelimplantation und in Anwesenheit von AT LL dar.

Wachstumsdaten des Beeinflussungsversuchs AT LL + RXF 944LX (Abb. 4.5.1):

<u>Ausgangsvolumen (Median):</u>	<u>Verdopplungszeiten in Tagen:</u>	
	<u>200%</u>	<u>400%</u>
AT Lewis Lung: 169 mm ³	0.7	2.1
RXF 944LX: 157 mm ³	2.7	4.7
944LX + LL: 169 mm ³	3.5	5.9
Wachstumsverzögerung 944LX + LL: T/C 64.3 an Tag 10	0.8 Tage (200%)	1.2 Tage (400%)

Nach 7 Tagen erfüllten alle Xenografts die Vitalitätskriterien und es konnte mit den Messungen begonnen werden.

In beiden Gruppen konnten alle acht implantierten Tiere an der Studie teilnehmen. Somit waren 16 Tumoren in der Kontrolle (RXF 944LX) und je acht Tumoren (944LX+AT LL; AT LL) in der Testgruppe auswertbar. Nach zehn Versuchstagen wurden der Versuch aufgrund der großen Tumormasse (siehe Abbruchkriterien Anhang 9.3.) beendet.

Das Lewis Lung Karzinom wuchs deutlich am schnellsten und ging in der zweiten Hälfte des Versuchs in lineares Wachstum über (flacher werdende Kurve, Abb. 4.5.1.: gepunktete Kurve mit hellen Kreisen).

In der Kontrollgruppe wuchs das Nierenkarzinom ab Versuchsbeginn logarithmisch (Abb. 4.5.1.: Kurve mit dunklem Quadrat) mit typischen Verdopplungszeiten für dieses Xenograft (siehe Wachstumsdatenvergleich Kap. 4.3.4.).

In Anwesenheit des Lewis Lung Karzinoms auf derselben Nacktmaus hatte RXF 944LX ein vergleichbares Ausgangsvolumen.

Sowohl der Kurvenverlauf als auch die Verdopplungszeiten zeigten ein geringgradig langsames Wachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4.5.1.: Kurve mit heller Raute).

Die Wachstumsverzögerung betrug 0.8 Tage für die erste und 1.2 Tage für die zweite Verdopplung.

Der maximale Unterschied wurde am letzten Versuchstag mit einem T/C von 64.3% also einer 35.7%igen Wachstumshemmung gemessen.

Der Wachstumsunterschied zwischen RXF 944LX bei alleinigem Wachstum und in Anwesenheit von AT LL wurde an Versuchstag 10 mit dem U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon statistisch überprüft und war signifikant ($p < 0.05$). Auch makroskopisch erschien

das Kollektiv der Nierentumoren, die in Anwesenheit von AT LL wuchsen, geringfügig kleiner als die Xenografts, die alleine wuchsen.

4.5.2. Wachstumsbeeinflussung von XF 575 durch den Lewis Lung Karzinom (AT LL)

Im zweiten Versuch konnten alle acht Nacktmäuse der Kontrollgruppe (XF 575 beidseitig implantiert) mit insgesamt 15 auswertbaren Xenografts an der Studie teilnehmen.

Die Testgruppe umfasste 7 Tiere mit je sieben auswertbaren Tumoren (XF 575 und AT LL).

Nach sieben Tagen Induktionszeit konnte mit den Messungen begonnen werden.

Abbildung 4.5.2. stellt das Wachstumsverhalten von XF 575 bei alleinigem Wachstum und in Anwesenheit von AT LL dar.

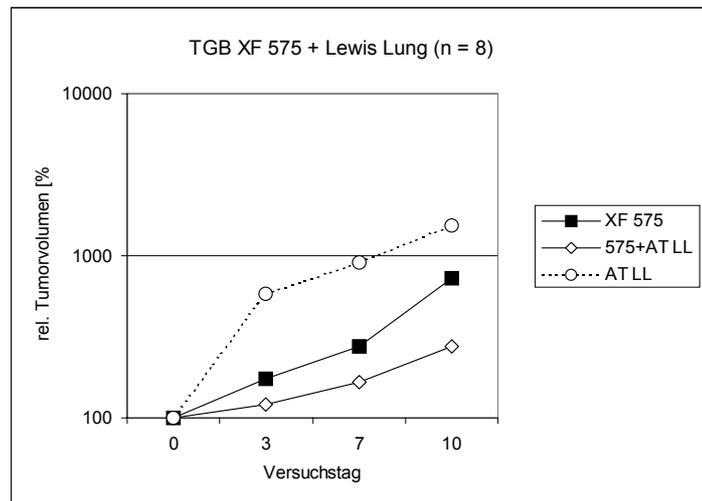


Abb. 4.5.2. Doppelimplantation XF 575 und Lewis Lung (K338)
AT: animal tumor (murin) LL: Lewis Lung

Ausgangsvolumen (Median):

AT Lewis Lung: 375 mm³
XF 575: 59 mm³
XF 575 + LL: 86 mm³

Verdopplungszeiten in Tagen:

	200%	400%
AT Lewis Lung:	1.0	3.0
XF 575:	4.8	7.8
XF 575 + LL:	7.9	12.9(E)

Wachstumsverzögerung (Tage):
T/C: 38.4%

3.1 (200%) 5.0 (400%)

Wie im vorigen Versuch (Abb. 4.5.1.) war das Lewis Lung Karzinom auch hier das am schnellsten proliferierende Xenograft (Abb. 4.5.2.: gepunktete Kurve), hatte aber im Vergleich etwas längere Verdopplungszeiten ausgehend von einem doppelt so großen Volumen.

XF 575 hatte in der Kontrollgruppe (Abb. 4.5.2.: dunkles Quadrat) ein etwas geringeres Volumen als in der Testgruppe.

Ergebnisse : Beispiel einer Wachstumsbeeinflussung durch einen Tumor

Die Verdopplungszeiten des Hepatoms waren etwas länger als die Mediane der Einzelimplantationen dieses Tumors (Wachstumsdatenvergleich).

Zusammen mit AT LL auf einer Nacktmaus proliferierte das Xenograft deutlich langsamer (Abb. 4.5.2.: Kurve mit heller Raute). Die 400% Marke wurde im Versuchszeitraum nicht erreicht, die zweite Verdopplungszeit konnte daher nur extrapoliert werden.

Gegenüber der Kontrollgruppe entsprach dies einer Wachstumsverzögerung von 3.1 und 5.0 Tagen und einem T/C Wert von 38.4% an Versuchstag 10.

RXF 944LX wurde durch die Anwesenheit des Lewis Lung Karzinoms nur wenig in seinem Wachstum beeinflusst. Bis zum letzten Versuchstag unterschieden sich die relativen medianen Volumenwerte der Kontroll- und der Testgruppe nur minimal.

Zum letzten Versuchstag hin drifteten die beiden Kurven deutlicher auseinander. Der Wachstumsunterschied am VT 10 mit einem T/C von 64.3% entsprach nach Kriterien der Substanztestung einer negativen Aktivitätsbewertung und damit einer zu vernachlässigenden Wirkung.

Für eine Beeinflussung durch den zweiten Tumor sprach, daß der Wachstumsunterschied zur Kontrollgruppe mit zunehmender Versuchsdauer und damit zunehmender Tumormasse von AT LL größer wurde.

Das hepatozelluläre Karzinom XF 575 reagierte deutlicher als der Nierentumor RXF 944LX auf die Anwesenheit des Lewis Lung Karzinoms.

Bereits am VT 3 betrug die Wachstumshemmung gegenüber der Kontrolle 31.0% und wurde bis zum Versuche mit 61.6% Hemmung am VT 10 stetig größer (VT 7: 39%). Auch hier lag offensichtlich eine direkte Abhängigkeit zwischen Tumormasse von AT LL und der Wachstumshemmung des Xenografts vor.

Der T/C Wert von 38.4% entsprach einer positiven Aktivitätsbewertung und damit einer beachtenswerten Wirkung.

Auch diese Wachstumshemmung war bei Überprüfung am Versuchstag 10 durch den Mann-Whitney-Wilcoxon U-Test statistisch signifikant ($p < 0.05$). Der Unterschied in den Tumorgrößen der beiden Kollektive zu den verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs fiel hier deutlicher ins Auge als bei dem vorigen Versuch mit RXF 944LX und AT LL.

4.6. Ergebnisse der Naturstofftestungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwölf Substanzen aus dem Naturstoffpool des Hans-Knöll-Instituts Jena auf ihre antineoplastische Aktivität gegenüber zwölf humanen Tumoren auf der Nacktmaus getestet.

Im Anschluß an die Feststellung eines interessanten Aktivitäts- und Selektivitätsprofils in *in vitro* Testsystemen wurden umfassende Recherchen bezüglich der Substanzen angestellt und die wissenschaftlich und klinisch interessanten Kandidaten für die *in vivo* Testung ausgewählt.

Vor der breiten *in vivo* Testung dieser neuartigen Substanzen an verschiedenen Xenografts wurden jeweils Dosisfindungsstudien an Nacktmäusen, die nur zwei der Xenografts eines Tumorquartettmodells trugen, durchgeführt.

Diese Dosisfindungsstudien dienten der Ermittlung einer maximal tolerablen Dosis (MTD) der Substanzen. In Anlehnung an die Richtlinien der EMEA wurde die MTD als Dosis definiert, bei der maximal 20% Letalitäten und maximal 20% Körpergewichtsabnahme auftraten.

Nach Festlegung der (vorläufigen) MTD wurden die Naturstoffe an den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Testmodellen getestet. Die Substanzen wurden jeweils an den Versuchstagen 0, 4 und 8 an Nacktmäuse, die vier humane Tumoren trugen (Tumorquartettmodell I – III) intraperitoneal verabreicht. Die Naturstoffe wurden in der maximal tolerablen Dosis und ein bis zwei niedrigeren Dosierungen an je ein bis zwei Tiere pro Dosis verabreicht.

Bei Naturstoffen, die an einem der getesteten Xenografts eine dosisabhängige antineoplastische Aktivität (optimaler T/C <50%) demonstrierten, wurden Wiederholungstestungen mit Nacktmäusen, die nur den sensiblen Tumor trugen, durchgeführt.

Die hier präsentierten Daten stellen die Ergebnisse nach der orientierenden Testung an den Tumorquartettmodellen und Wiederholungen mit kleinen Gruppen dar.

Anhand dieser Daten wurde im Labor Prof. Fiebig entschieden, ob der jeweilige Naturstoff in größerem Umfang präklinisch untersucht werden sollte, oder ob die Charakterisierung hiermit abgeschlossen war und auf weitere Tests verzichtet wurde.

4.6.1. Substanzen aus der Universität Tübingen (Arbeitsgruppe Prof. Fiedler)

Insgesamt wurden sechs definierte, reine Naturstoffe mikrobiellen Ursprungs mit *in vitro* Aktivität von der Arbeitsgruppe Prof. Fiedler erhalten. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der orientierenden *in vivo* Testung dargestellt werden.

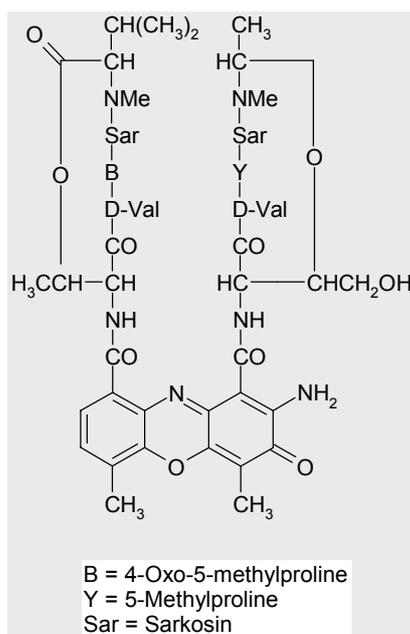
Ergebnis der *in vivo* Testung von Actinomycin Z5 (F 0672)

Bei Actinomycin Z5 handelt es sich um ein von *Streptomyces fradiae* ETH 20675 und *Micromonospora floridensis* produziertes Chromopeptid-Antibiotikum.

Die Summenformel lautet $C_{62}H_{84}N_{12}O_{18}$ das Molekulargewicht beträgt 1.285.

Abbildung 4.6.1.1. zeigt die Strukturformel dieses Naturstoffs.

Der Wirkmechanismus der Substanz besteht in ihrer Fähigkeit, an DNA zu binden und zu



einer Interkalation der DNA-Stränge zu führen. In der Literatur sind antibakterielle (gegen grampositive Bakterien) und antitumorale Aktivitäten beschrieben (Bossi et al., 1958; Lackner et al., 2000).

Im Rahmen der *in vitro* Tests wurde im Kolonienbildungstest (TCA) ein mittlerer IC 70 (Konzentration bei der eine kolonienbildungshemmung von 70% auftritt) von 0.003 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt. In diesem Kolonienbildungstest hatten sich je ein ZNS- Nieren- und Prostataumor, sowie ein Melanom als sensibel gezeigt.

Abb. 4.6.1.1. Strukturformel von Actinomycin Z5

Im Rahmen der *in vivo* Testung von Actinomycin Z5 mußten insgesamt drei Dosisfindungsstudien durchgeführt werden, um die vorläufige maximal tolerable Dosis mit 0.01 mg/kg festzulegen.

Es wurden insgesamt 34 Nacktmäuse für die Charakterisierung dieses Naturstoffs in 8 verschiedenen Dosierungen eingesetzt. Abbildung 4.6.1.2. zeigt das Ergebnis der *in vivo* Testungen in Form eines Balkendiagramms, das die optimalen T/C Werte den getesteten Xenografts zuordnet.

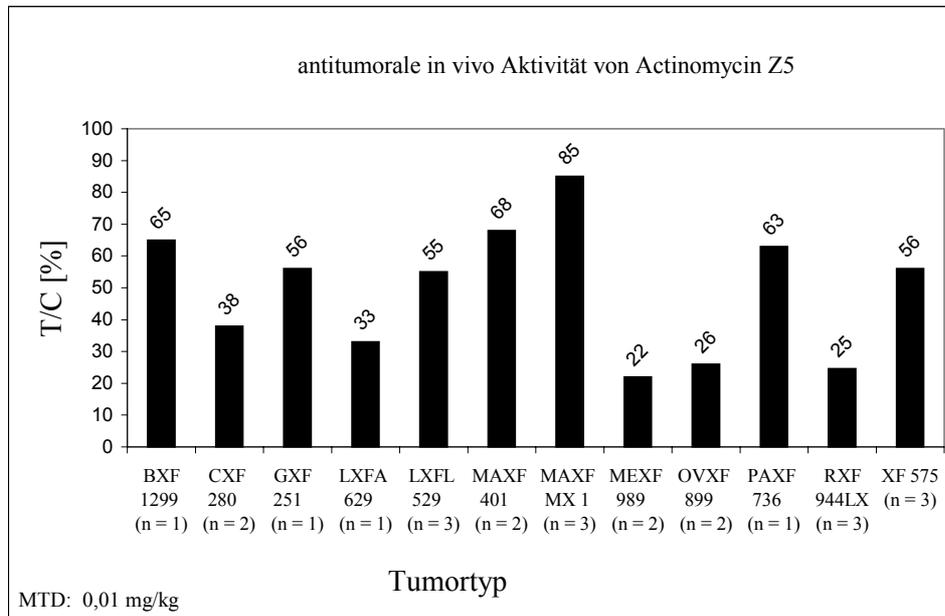


Abb.4.6.1.2. Antitumorale Aktivität von Actinomycin Z5 in der *in vivo* Testung

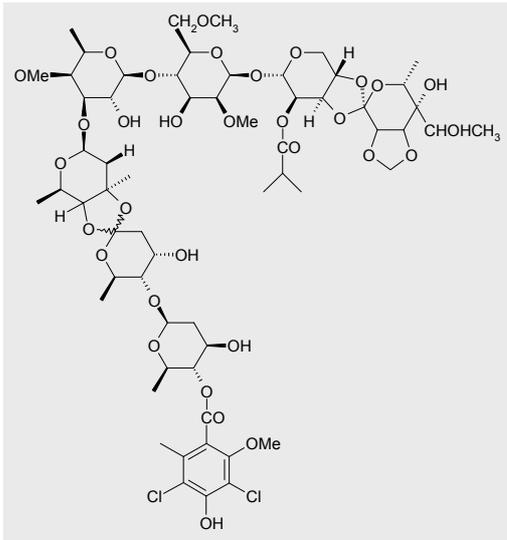
Der T/C Wert gibt den Quotienten aus der relativen medianen Größe der Tumoren in der Testgruppe und der medianen Größe der Kontrolltumoren zu einem bestimmten Zeitpunkt in Prozent an. Die hier dargestellten Werte sind optimale T/C Werte, d.h. sie zeigen die im Verlauf der Testungen jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreichten minimalen Prozentwerte. Werte von 50 % und darunter wurden als vielversprechend gewertet und nachgetestet. Bei den Werten handelt es sich um die Ergebnisse in den MTD-Therapiegruppen, die bei antineoplastischer Aktivität der Substanz mit Tieren, die nur einen sensiblen Xenografttyp trugen, reproduziert wurden. Die Anzahl der therapierten Tiere und Xenografts, aus deren Median der jeweilige T/C Wert ermittelt wurde, ist durch (n = x) gekennzeichnet. Bei den reproduzierten Aktivitäten (T/C < 50%) wurden Nacktmäuse, die zwei Xenografts desselben Tumortyps trugen, verwandt. Der Median wurde in diesen Fällen aus den Wachstumshemmungen der therapierten Tumoren berechnet. Die Tierzahl n ist in diesen Fällen zu verdoppeln, um die eingesetzten Xenografts zu erhalten.

Eine problematische Eigenschaft von Actinomycin Z5 war die geringe therapeutische Breite der Substanz. Bereits bei 0.01 mg/kg (Gesamtdosis: 0.02 mg/kg) oberhalb der maximal tolerablen Dosis betrug der Anteil der verstorbenen Tiere über 50%, während bei einer Dosis von 0.005 mg/kg keine antineoplastische Aktivität mehr zu verzeichnen war.

Aufgrund dieser ungünstigen pharmakologischen Eigenschaft des Naturstoffes wurde auf eine weitere *in vivo* Untersuchung von Actinomycin Z5 verzichtet.

Ergebnis der *in vivo* Testungen von Avilamycin C (F0677)

Avilamycin C ist ein von *Streptomyces viridochromogenes* ETH 23575 produziertes Antibiotikum mit der Summenformel: C₆₁H₉₀C₁₂O₃₂ und einem Molekulargewicht von 1.406. Abbildung 4.6.1.3. stellt die Strukturformel von Avilamycin C dar.



Der Wirkmechanismus dieses Naturstoffs besteht in einer Hemmung der Funktion der ribosomalen 30S Untereinheit.

In der Literatur (Buzzetti et al., 1968; Wolf 1973) sind antibakterielle (gegen grampositive Bakterien) Aktivitäten beschrieben. Die Substanz wird als Futterzusatz (Leistungsförderer) verwandt.

In der *in vitro* Testung wurde ein mittlere IC 70 von 0.679 µg/ml festgestellt.

Abb. 4.6.1.3. Strukturformel von Avilamycin C

Ein epidermoider Lungentumor, ein Ovarialkarzinom, ein Pankreaskarzinom und ein Prostata tumor reagierten mit einer Kolonienbildungshemmung im TCA.

Im Rahmen von zwei Dosisfindungsstudien wurde eine MTD von 20 mg/kg festgestellt. Insgesamt wurde der Naturstoff an 19 tumortragende Tiere in fünf Dosierungen verabreicht. Abbildung 4.6.1.4 zeigt die mit den zwölf getesteten Xenografttypen erzielten optimalen T/C Werte.

Die Substanz schien einen ausreichend großen therapeutischen Index zu haben: 40 mg/kg entsprachen einer Letaldosis 50 und bei 10 mg/kg war bei einigen der sensiblen Xenografts noch antineoplastische Aktivität feststellbar.

Avilamycin wurde im Labor Prof. Fiebig als Naturstoff mit dem Wirkmechanismus einer Telomerasehemmung identifiziert und wird derzeit in umfangreichen präklinischen und klinischen Testungen weiterentwickelt.

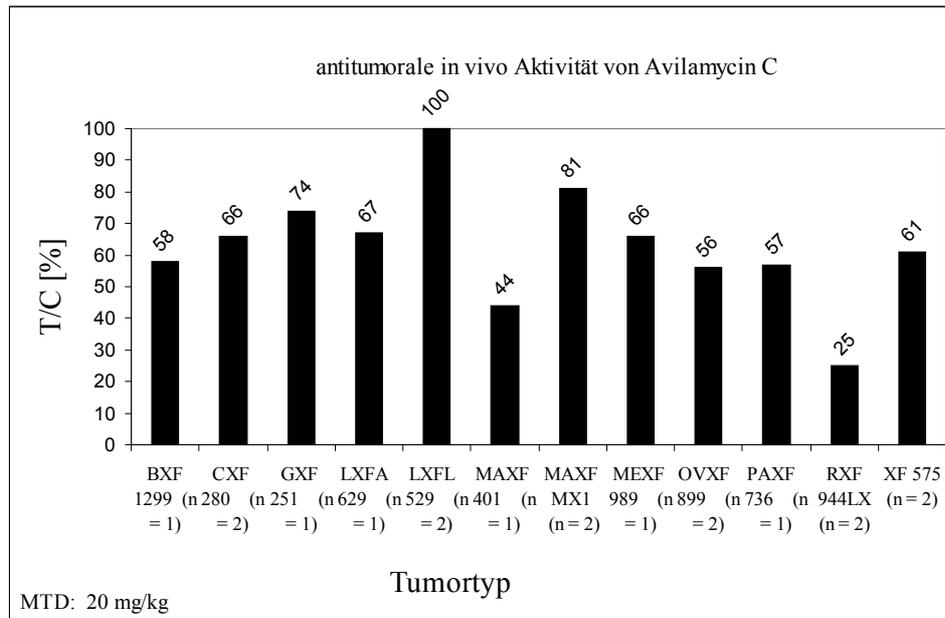
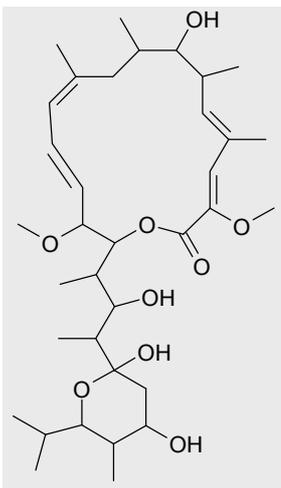


Abb. 4.6.1.4. Antitumorale Aktivität von Avilamycin C in der *in vivo* Testung

Ergebnis der *in vivo* Testung von Bafilomycin A₁ (F 0676)

Bafilomycin A₁ stellt ein von dem Actinomyceten *Streptomyces griseus* ssp. *sulphurus* produziertes 16 gliedriges Makrolakton dar. Der Naturstoff besitzt die Summenformel C₃₅H₅₈O₉ und hat ein Molekulargewicht von 622. Abbildung 4.6.1.5. zeigt die Strukturformel der Substanz.



In der Literatur ist eine Wachstumshemmung für grampositive Bakterien, Protozoen, Pilze und Hefen beschrieben. Weiterhin besitzt die Substanz insektizide, nematozide und immunsuppressive Eigenschaften.

Der Wirkmechanismus von Bafilomycin A₁ liegt in einer spezifischen Hemmung von ATPasen vom V-Typ (Fiedler und Fiedler, 1994).

Abb. 4.6.1.5. Strukturformel Bafilomycin A₁

In vitro lag die IC₇₀ des Naturstoffs im Kolonienbildungstest bei 0.262 µg/ml. Ein Melanom und zwei Prostatatumoren reagierten in diesem Test sensibel auf Bafilomycin A₁.

Die zwei durchgeführten Dosisfindungsstudien ergaben eine maximal tolerable Dosis im Nacktmausversuch von 0.3 mg/kg. Insgesamt wurde die Substanz an 18 tumortragenden Tieren in 6 Dosierungen getestet.

Abbildung 4.6.1.6. zeigt die durch 0.3 mg/kg Bafilomycin A₁ an zwölf getesteten Xenografts bewirkten Wachstumshemmungen.

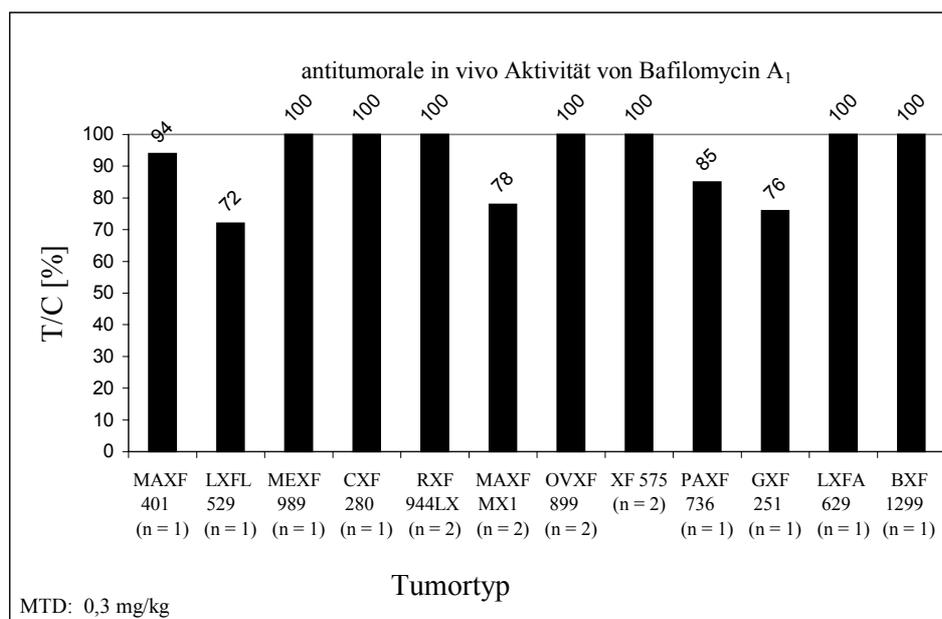
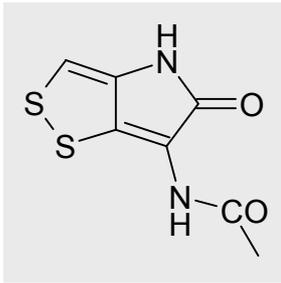


Abb. 4.6.1.6. Antitumorale Aktivität von Bafilomycin A₁ in der *in vivo* Testung

Die therapeutische Breite der Substanz beschränkte sich im Nacktmausversuch auf einen relativ engen Bereich: 1 mg/kg kam einer Letaldosis 100 gleich, bei 0.1 mg/kg war nur noch eine minimale antineoplastische Aktivität der (relativ unwirksamen) Substanz zu verzeichnen. Die dargestellte geringe antineoplastische Wirksamkeit von Bafilomycin A₁ gegenüber den hier getesteten Xenografts führte zum Teststopp dieses Naturstoffs.

Ergebnis der *in vivo* Testung von Holomycin (F 1101)

Holomycin ist ein von *Streptomyces griseus* ETH 17474 produziertes Pyrrothinantibiotikum mit der Summenformel C₇H₆N₂O₂S₂ und einem Molekulargewicht von 214. Abbildung 4.6.1.7. zeigt die Strukturformel der Substanz.



Der Wirkmechanismus der Substanz besteht in einer Hemmung der RNA Synthese (Oliva et al., 2001).

In der Literatur finden sich Beschreibungen von antibakterieller, antimykotischer und antiprotozoischer Aktivität des Naturstoffs (Ettliger et al., 1959; Oliva et al., 2001).

Abb. 4.6.1.7. Strukturformel Holomycin

In vitro wurde im Kolonienbildungstest ein mittlerer IC₇₀ von 0.066 µg/ml dokumentiert. Holomycin führte insbesondere bei einem Mammakarzinom, einem Melanom und zwei Prostata Tumoren zu einer Hemmung der Kolonienbildung.

Im Rahmen von zwei Dosisfindungsstudien wurde bei der *in vivo* Testung der Substanz eine maximal tolerable Dosis von 3 mg/kg herausgearbeitet.

Holomycin wurde in vier verschiedenen Dosen an 34 Tiere im Rahmen dieser Testungen verabreicht.

Abbildung 4.6.1.8. zeigt das Ansprechen der zwölf getesteten Xenografts auf die Therapie mit 3 mg/kg Holomycin.

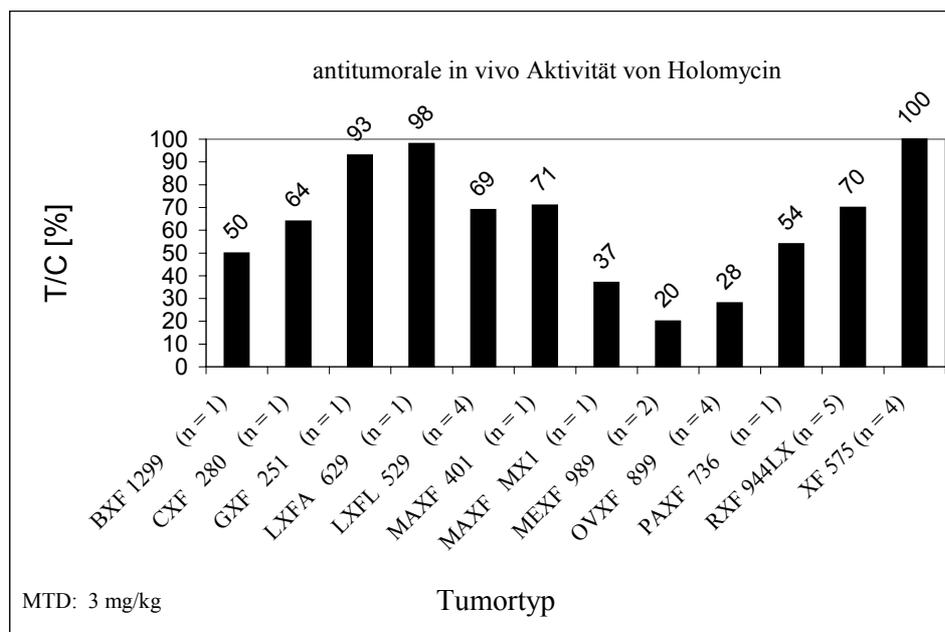


Abb. 4.6.1.8. Antitumorale Aktivität von Holomycin in der *in vivo* Testung

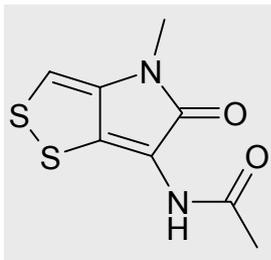
Die Substanz besaß eine befriedigende therapeutische Breite im Nacktmausversuch: 6 mg/kg entsprachen einer Letaldosis 25 und die sensiblen Xenografts zeigten auch bei einer Dosis von 1 mg/kg eine gewisse Wachstumshemmung.

Holomycin wurde im Anschluß an die Auswertung dieser Testungen im größeren Umfang an den sensiblen Tumortypen weiterentwickelt.

Ergebnis der *in vivo* Testung von Thiolutin (F 0436)

Thiolutin ist ein von verschiedenen Stämmen von *Streptomyces albus* und *Streptomyces pimprina* produziertes Antibiotikum der Pyrrothinklasse.

Die Substanz weist die Summenformel $C_8H_8N_2O_2S_2$ und ein Molekulargewicht von 228 auf. Abbildung 4.6.1.9. zeigt die Strukturformel des Naturstoffs.



Thiolutin hemmt das Mikrobewachstum im Bier. In hohen Dosierungen ist es phytotoxisch und hemmt die Blutplättchenaggregation (Römpp, 1997).

Abb. 4.6.1.9. Strukturformel Thiolutin

Im Kolonienbildungstest hatte die Verbindung eine IC_{70} von 0.181 $\mu\text{g/ml}$. Ein epidermoider und ein großzelliger Lungentumor, ein Mammakarzinom, ein Prostata tumor und ein Melanom reagierten in diesem *in vitro* Testsystem sensibel auf Thiolutin.

Die durch die Dosisfindungsstudie festgelegte MTD lag bei diesem Naturstoff im Nacktmausversuch bei 10 mg/kg. Insgesamt wurden 25 Nacktmäuse mit der Substanz in 6 verschiedenen Dosierungen therapiert.

Abbildung 4.6.1.10 zeigt das Ansprechen der zwölf Xenografts der drei Quartettmodelle auf eine Therapie mit 10 mg/kg Thiolutin (Versuchstage 0, 4, 8).

Eine Dosis von 20 mg/kg führte bei einer im Rahmen der Dosisfindungsstudie therapierten Nacktmaus zum *Exitus* nach einer Applikation.

Die sensiblen Xenografts zeigten auch bei niedrigeren Dosierungen von 8 mg/kg und 5 mg/kg noch dosisabhängig geringere Wachstumshemmungen.

Die hier festgestellte antitumorale Wirksamkeit von Thiolutin gab keinen ausreichenden Anreiz, um den Naturstoff weiter präklinisch onkologisch zu entwickeln und die Testungen wurden gestoppt.

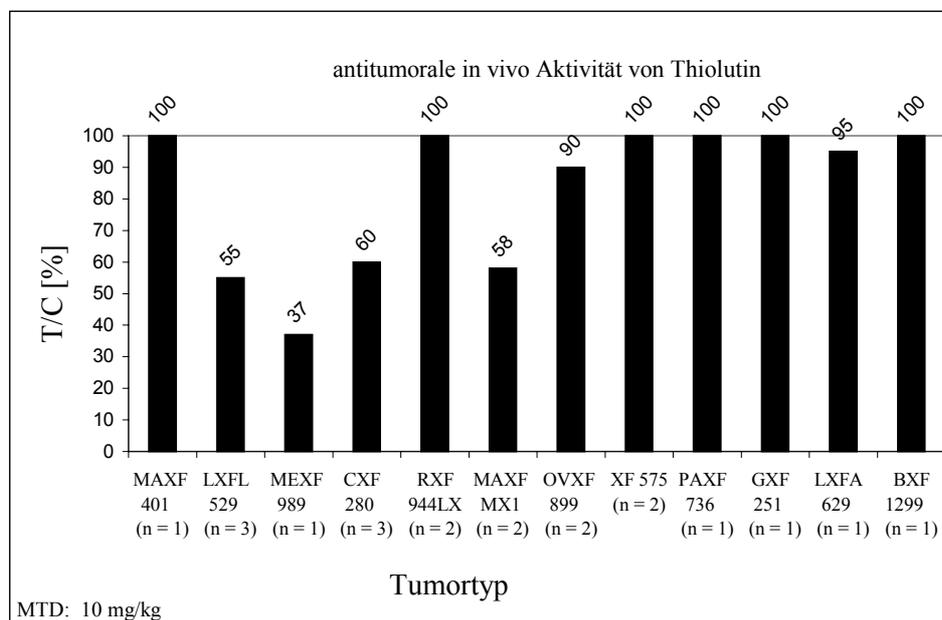


Abb. 4.6.1.10. Antitumorale Aktivität von Thiolutin in der *in vivo* Testung

Ergebnis der *in vivo* Testung von Venturicidin A (F 0850)

Venturicidin A stellt ein aus *Streptomyces aureofaciens* isoliertes 3' Karbamat dar. Die Summenformel der Verbindung lautet $C_{41}H_{67}NO_{11}$ und das Molekulargewicht beträgt 749. Abbildung 4.6.1.11. zeigt die Strukturformel des Naturstoffs.

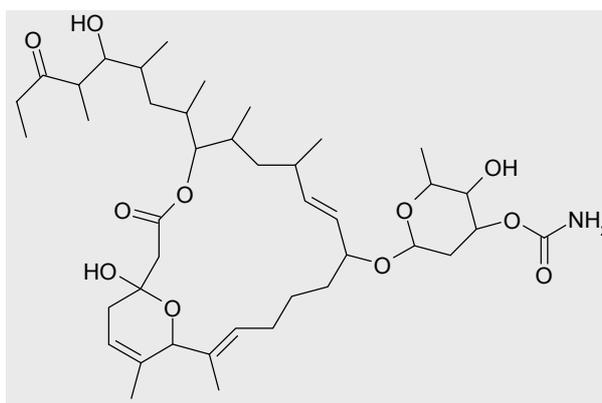


Abb. 4.6.1.11. Strukturformel Venturicidin A

In der Literatur ist eine antimykotische Aktivität der Substanz beschrieben (Chapman & Hall, 2001).

Die *in vitro* IC₇₀ im Kolonienbildungstest lag bei 0.551 µg/ml. Ein großzelliger Lungentumor, ein Ovarialkarzinom und drei Prostatatumoren reagierten hier sensibel.

Die Dosisfindungsstudie ergab bei diesem Naturstoff eine maximal tolerable Dosis von 10 mg/kg.

Es wurden 34 tumortragende Tiere (Vierfachimplantationen und Einzelimplantationen zur Überprüfung positiver Ergebnisse) in 3 verschiedenen Dosierungen therapiert.

Abbildung 4.6.1.12. zeigt die durch 10 mg/kg Venturicidin A erreichten Wachstumshemmungen der zwölf getesteten Xenografts.

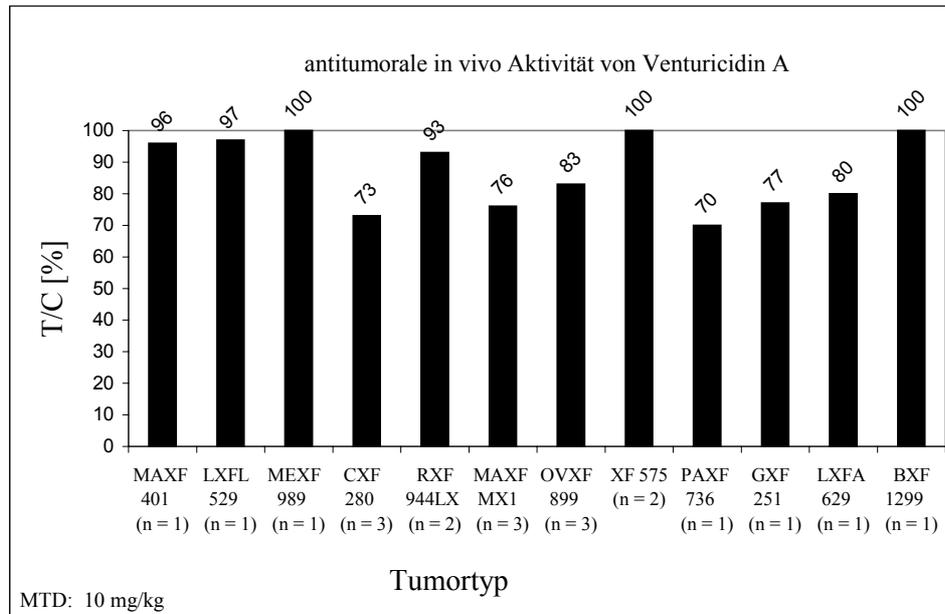


Abb. 4.6.1.12. Antitumorale Aktivität von Venturicidin A in der *in vivo* Testung

Aussagen zur therapeutischen Breite der relativ unwirksamen Substanz (sämtliche T/C Werte lagen deutlich über 50%) waren anhand der hier erhobenen Ergebnisse nur schwer zu treffen: Bei einer Dosis von 3 mg/kg konnte keine antitumorale Aktivität mehr beobachtet werden. Die Testungen von Venturicidin A auf antitumorale Aktivität wurden aufgrund dieser Resultate gestoppt.

4.6.2. Substanzen von der GBF Braunschweig

Insgesamt wurden sechs definierte, reine Naturstoffe mikrobiellen Ursprungs mit *in vitro* Aktivität von der GBF Braunschweig erhalten. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der orientierenden *in vivo* Testung dargestellt werden.

Ergebnis der *in vivo* Testung von Disorazol-A₁

Disorazol A₁ ist ein von *Sorangium cellulosum* So ce 12 produziertes makrozyklisches Dilactonantibiotikum.

Der Naturstoff hat die Summenformel C₄₃H₅₄N₂O₁₀ und ein Molekulargewicht von 759.

Abbildung 4.6.2.1. stellt die Strukturformel von Disorazol-A₁ dar.

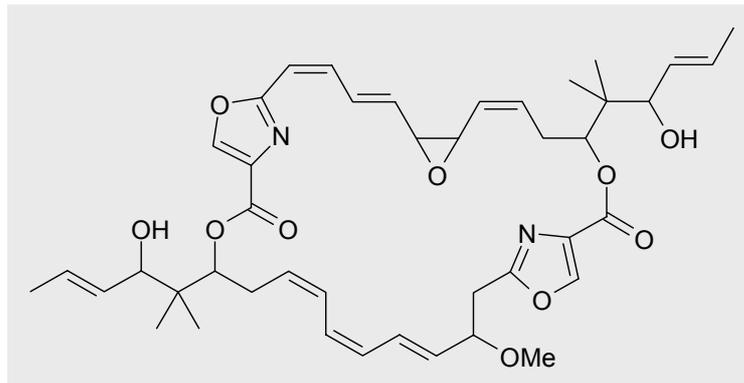


Abb. 4.6.2.1. Strukturformel von Disorazol-A₁

Der Wirkmechanismus der Substanz besteht in einer Hemmung der RNA Synthese. In der Literatur finden sich Beschreibungen von antimykotischer Aktivität und Zytotoxizität in Säugetierzellkulturen (Irschik et al., 1995).

Der mittlere IC 70 lag im Kolonienbildungstest bei 0.014 µg/ml.

In diesem *in vitro* Testsystem reagierten ein Blasen-, ein Kolon-, ein adenoider Lungen-, zwei Mamma-, zwei Prostata-, ein Nieren-, ein Uterus- und ein Lebertumor besonders sensibel mit einer Kolonienbildungshemmung auf Disorazol A₁.

Die beiden mit Disorazol-A₁ durchgeführten Dosisfindungsstudien ergaben eine maximal tolerable Dosis von 0.02 mg/kg für den Nacktmausstamm im Labor Prof. Fiebig. Insgesamt wurden 57 Tiere in 7 verschiedenen Dosierungen des Naturstoffs im Schema d: 0, 4, 8 therapiert. Abbildung 4.6.2.2. stellt die antitumorale Aktivität von Disorazol-A₁ bei Applikation der MTD von 0.02 mg/kg dar.

Die therapeutische Breite des Naturstoffs im Nacktmausversuch war ausgesprochen gering: Eine im selben Therpieschema verabreichte Dosis von 0.05 mg/kg führte bei über 80% der eingesetzten Mäuse zum *Exitus*. 0.01 mg/kg bewirkten bei den sensibel getesteten Xenografts keine nennenswerten (T/C < 50%) Wachstumshemmungen mehr.

Diese unvorteilhafte pharmakologische Eigenschaft des Naturstoffs führte zum Teststopp von Disorazol A₁.

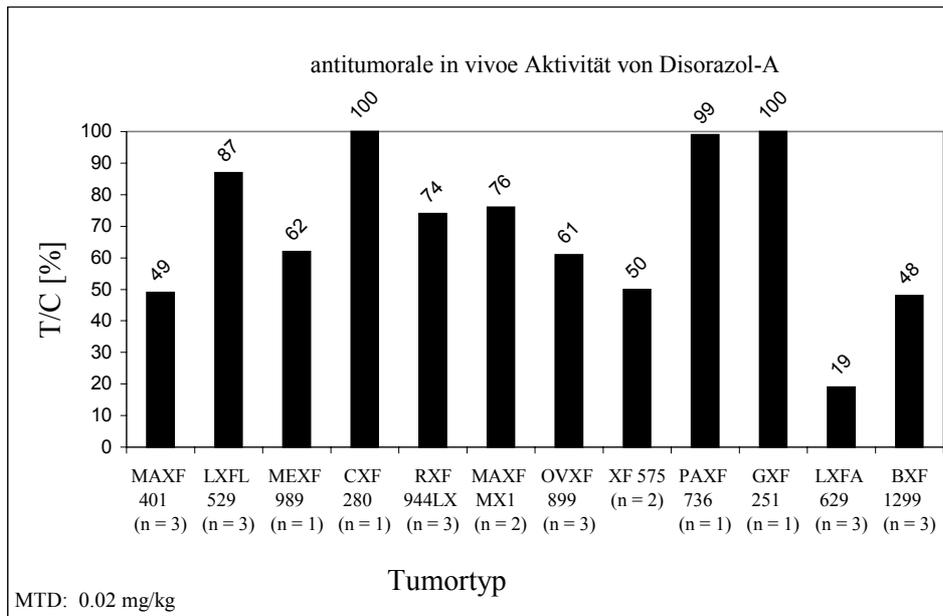


Abb. 4.6.2.2. Antitumorale Aktivität von Disorazol-A₁ in der *in vivo* Testung

Ergebnis der *in vivo* Testung von Gephyronsäure

Gephyronsäure wird von *Archangium gephyra* Stamm Ar 3895 produziert. Es handelt sich um eine mehrfach verzweigte aliphatische Säure. Die Substanz hat die Summenformel $C_{26}H_{47}NaO_8$ und ein Molekulargewicht von 511. Abbildung 4.6.2.3. stellt die Strukturformel des Naturstoffs dar.

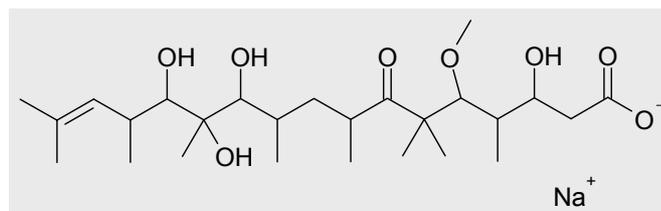


Abb. 4.6.2.3. Strukturformel von Gephyronsäure

Der Wirkmechanismus der Substanz besteht in einer spezifischen Hemmung der eukariotischen Proteinsynthese. Die Substanz hemmt das Wachstum der meisten Hefen und Fadenpilze (Sasse et al., 1995).

Die IC₇₀ im Kolonienbildungstest (TCA) lag bei 0.051 $\mu\text{g/ml}$. In diesem Test reagierten Blasen-, Kolon-, Lungen-, Mamma-, Ovarial-, Prostata-, Nieren- und Uterustumoren sowie zwei Melanome sensibel auf Gephyronsäure.

Im Rahmen einer Dosisfindungsstudie, die mit tumortragenden Nacktmäusen durchgeführt wurde, wurde die maximal tolerable Dosis von 3 mg/kg für die hier verwandten Tiere festgestellt. Gephyronsäure wurde an insgesamt 27 Tiere in drei verschiedenen Dosierungen im für Naturstoffe üblichen Therapieschema verabreicht.

Abbildung 4.6.2.4. stellt die durch Therapie mit 3 mg/kg des Naturstoffs bewirkten Wachstumshemmungen als optimale T/C Werte bei zwölf Xenografts dar.

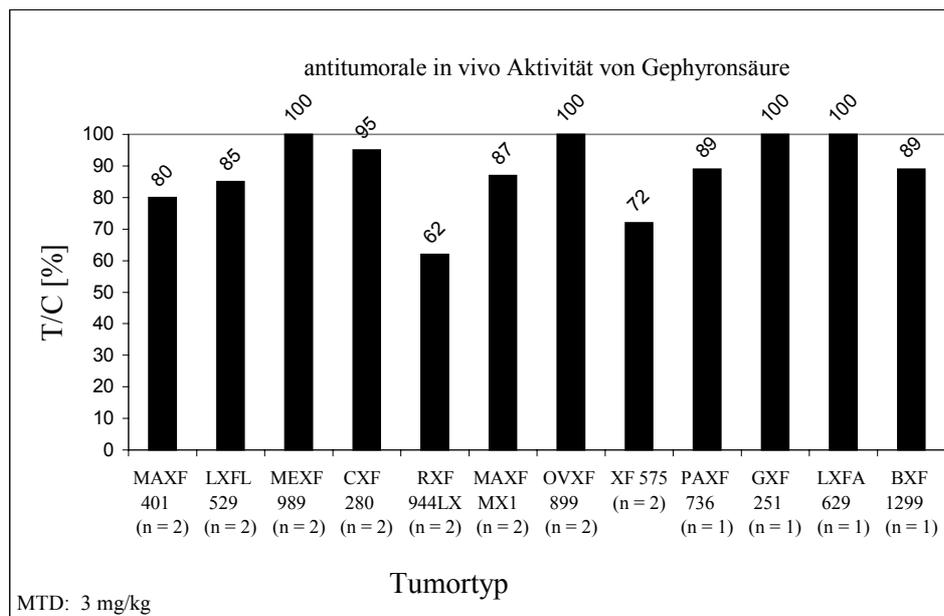


Abb. 4.6.2.4. Antitumorale Aktivität von Gephyronsäure in der *in vivo* Testung

Aussagen zur therapeutischen Breite von Gephyronsäure im Nacktmausversuch ließen sich hier nur schwer treffen, da keine höhere Dosis als die MTD verabreicht wurde und in niedrigeren Dosierungen (1 mg/kg) der unwirksamen Substanz (alle T/C >50%) keine bedeutenden Tumorchemmungen mehr auftraten.

Aufgrund der geringen antineoplastischen Aktivität der Substanz wurde von weiteren *in vivo*- Testungen mit Gephyronsäure abgesehen.

Ergebnis der *in vivo* Testung von Vioprolid A (F 0300)

Vioprolid A ist ein von *Cystobacter violaceus* Cb vi37 produziertes zyklisches Peptid, das ungewöhnliche Aminosäuren enthält.

Die Summenformel lautet: $C_{40}H_{62}N_8O_{11}S$, das Molekulargewicht beträgt 863.

Es sind antibakterielle und antimykotische Eigenschaften des Naturstoffs bekannt (Schummer et al, 1996). Abbildung 4.6.2.5. zeigt die Strukturformel des Naturstoffs.

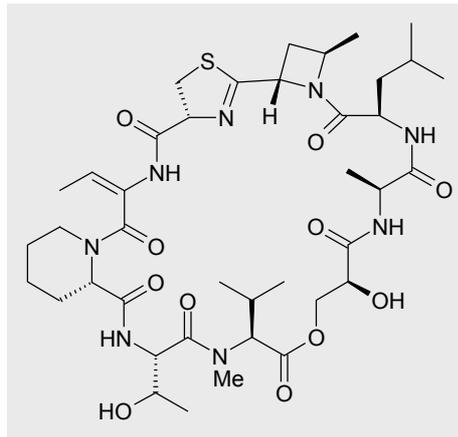


Abb. 4.6.2.5. Strukturformel von Vioprolid A

In den vorgeschalteten *in vitro* Versuchen Kolonienbildungstest wurde ein mittlerer IC 70 von 0.049 µg/ml berechnet. In diesen Tests reagierte eine breite Palette von Tumoren sensibel auf Vioprolid A: Kolon-, Lungen-, Mamma-, Pankreas-, Prostata-, Nieren-, Uterus- und Lebertumoren sowie ein Melanom zeigten Kolonienbildungshemmungen.

Durch zwei Dosisfindungsstudien wurde die MTD von 2 mg/kg für die Nacktmaus definiert. Es wurden 36 Tiere in vier Dosierungen mit Vioprolid A therapiert.

Abbildung 4.6.2.6. zeigt das Ansprechen der zwölf im Rahmen dieser Arbeit getesteten Xenografts auf Therapie mit 2 mg/kg Vioprolid A.

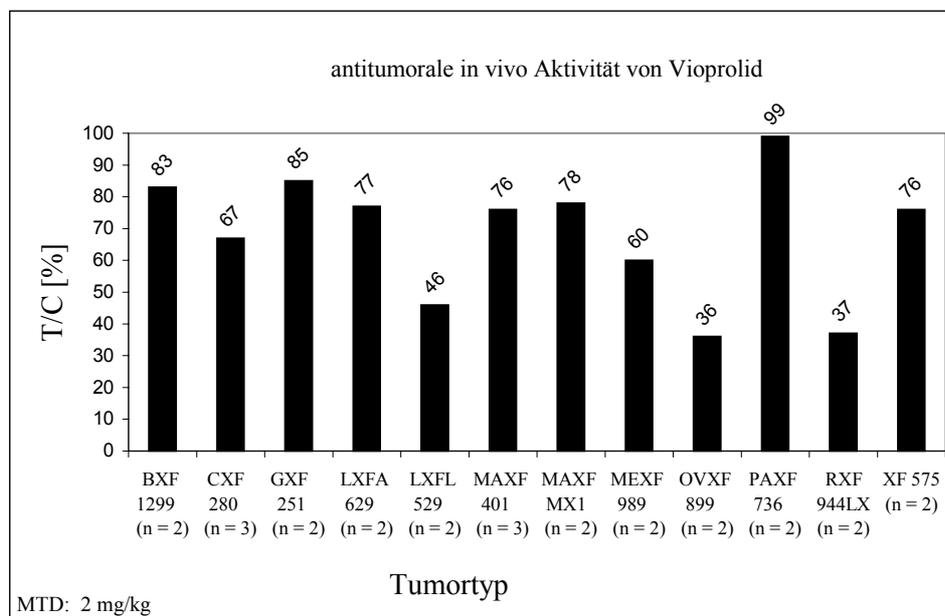


Abb. 4.6.2.6 Antitumorale Aktivität von Vioprolid in der *in vivo* Testung

Eine einmalige Applikation von 3 mg/kg des Naturstoffs führte zum *Exitus* des Tieres.

Die Therapie mit 1 mg/kg bewirkte dosisabhängig geringere Wachstumshemmungen bei den sensiblen Tumoren.

Vioprolid A wurde im Anschluß an diese Testergebnisse in größerem Umfange an den sensiblen Xenografttypen weiterentwickelt.

Ergebnis der *in vivo* Testung von Rhizopodin (F 0746)

Bei dem Naturstoff Rhizopodin handelt es sich um eine von *Myxococcus stipitatus* Mx fl64 produzierte makrolidische Polyketidverbindung.

Die Summenformel lautet: $C_{39}H_{62}N_2O_{11}$ und die Verbindung hat ein Molekulargewicht von 735. Abbildung 4.6.2.7. zeigt die Strukturformel von Rhizopodin.

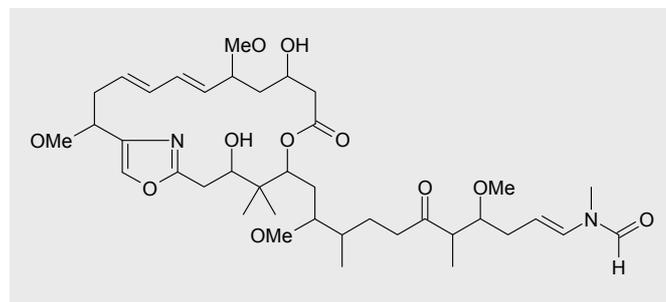


Abb. 4.6.2.7. Strukturformel von Rhizopodin

Der Wirkmechanismus der Substanz besteht in einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. In der Literatur ist antitumorale (*in vitro*) Aktivität beschrieben (Sasse et al., 1993; Gronwold et al., 1999).

In vitro wurde im TCA ein mittlerer IC 70 von 0.466 μ g/ml festgestellt. Kolon-, Mamma-, Prostata-, Nieren- und Uteruskarzinome reagierten in diesem Test mit Kolonienbildungshemmungen.

Bei den *in vivo* Testungen wurde mittels zweier Dosisfindungsstudien die maximal tolerable Dosis von 1 mg/kg für die hier verwandten Nacktmäuse definiert.

Um die Aktivität der Substanz gegenüber zwölf Xenografts zu testen, wurden insgesamt 36 tumortragende NMRI Nacktmäuse mit fünf verschiedenen Dosierungen von Rhizopodin therapiert.

Abbildung 4.6.2.8. zeigt das Ansprechen der zwölf getesteten Tumoren auf eine Therapie mit 1 mg/kg Rhizopodin im Therapieschema d: 0, 4, 8.

1.5 mg/kg Rhizopodin im gleichen Therapieschema verabreicht entsprachen eine LD 100. 0.5 mg/kg führten zu einer dosisabhängig geringeren, aber noch interessanten Wachstumshemmung der sensiblen Xenografts.

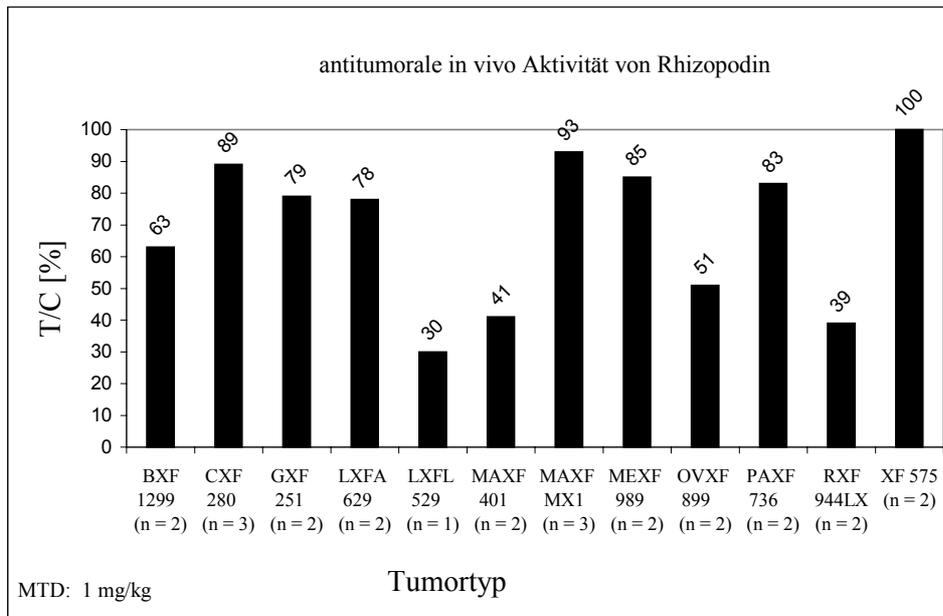


Abb. 4.6.2.8. Antitumorale Aktivität von Rhizopodin in der *in vivo* Testung

Die im Vergleich mit anderen am Zytoskelett oder dem Spindelapparat angreifenden Chemotherapeutika geringe antineoplastische Aktivität der Substanz veranlaßte den Teststopp von Rhizopodin.

Ergebnis der *in vivo* Testung von Spirangien A (F 0266)

Der Naturstoff Spirangien A wird von *Sorangium cellulosum* DSM6868 produziert.

Die Substanz hat die Summenformel $C_{41}H_{66}O_9$ und ein Molekulargewicht von 703.

Abbildung 4.6.2.9. zeigt die Strukturformel von Spirangien A.

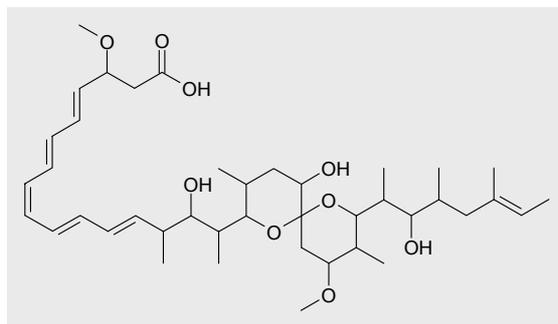


Abb. 4.6.2.9. Strukturformel von Spirangien A

Die Verbindung besitzt antimykotische Wirksamkeit (Gerth et al., 1996).

In vitro hatte Spirangien A im Kolonienbildungstest eine mittlere IC₇₀ von 0.017 µg/kg.

Dieses Testsystem zeigte Kolonienbildungshemmungen bei Blasen-, Kolon-, Magen-,

Lungen-, Mamma-, Pankreas-, Prostata-, Nieren-, Uterus- und einem Lebertumor sowie bei einem Melanom.

In vivo wurde eine maximal tolerable Dosis von 1 mg/kg für den Nacktmausstamm des Labors Prof. Fiebig im Rahmen von zwei Dosisfindungsstudien definiert.

38 tumortragende Nacktmäuse wurden zur Charakterisierung von Spirangien A in vier verschiedenen Dosierungen mit dem Naturstoff im Therapieschema d: 0, 4, 8 therapiert.

Abbildung 4.6.2.10. zeigt das Ansprechen der zwölf getesteten Xenografts auf die maximal tolerable Dosis.

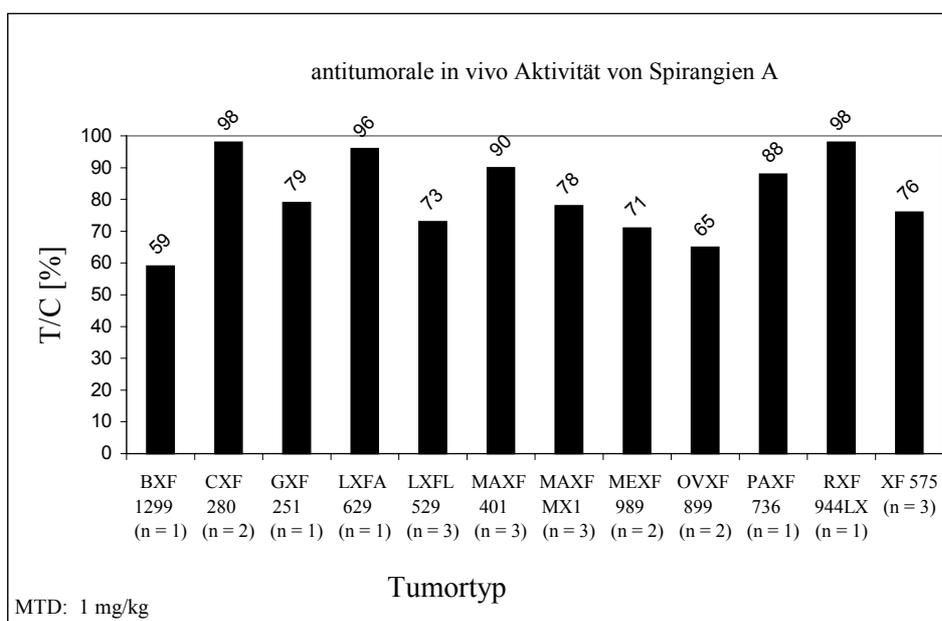


Abb. 4.6.2.10. Antitumorale Aktivität von Spirangien A in der *in vivo* Testung

Eine Dosis von 3 mg/kg führte bei einmaliger Applikation zum *Exitus* des therapierten Tieres. Spirangien A führte in einer Dosis von 0.3 mg/kg zu keinerlei Wachstumshemmung der Xenografts mehr.

Spirangien A wurde aufgrund der hier festgestellten ungenügenden antitumoralen Aktivität nicht weiter getestet.

Ergebnis der *in vivo* Testung von Tartrolon B (F 0964)

Tartrolon B ist ein von *Sorangium cellulosum* So ce 678 produziertes makrozyklisches Polyketidlacton, ein symmetrisches Makrodiolid. Die Substanz hat ein Molekulargewicht von 856 und die Summenformel: $C_{46}H_{68}BO_{14}$. Der Wirkmechanismus der Substanz besteht in einer Beeinflussung des zellulären Ionentransports, insbesondere des Kaliumausstroms aus der Zelle. Gegen grampositive Bakterien besitzt die Verbindung antibakterielle Wirkung (Irschik et al., 1995). Abb. 4.6.2.11. stellt die Strukturformel von Tartrolon B dar.

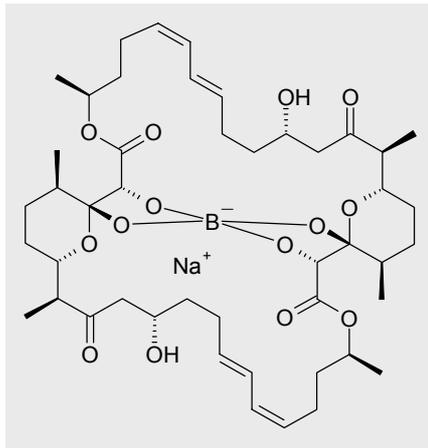


Abb. 4.6.2.11. Strukturformel von Tartrolon B

In vitro hatte Tartrolon B im Kolonienbildungstest (TCA) eine mittlere IC₇₀ von 0.353 µg/kg. Je ein Kolon-, Lungen-, Pankreas-, Prostata-, Nieren- und ein Uterustumor reagierten in diesem Testsystem sensibel auf Tartrolon B.

Die maximal tolerable Dosis *in vivo* lag für die Nacktmaus bei 0.2 - 0.3 mg/kg (beide Dosen bewirkten vergleichbare Gewichtsabnahmen und Letalitätsraten der Tiere). Es wurden 47 Nacktmäuse mit fünf verschiedenen Dosen des Naturstoffs therapiert.

Abbildung 4.6.2.12. stellt die durch die MTD im Therapieschema d: 0, 4, 8 erreichten optimalen T/C Werte der zwölf getesteten Xenografts dar.

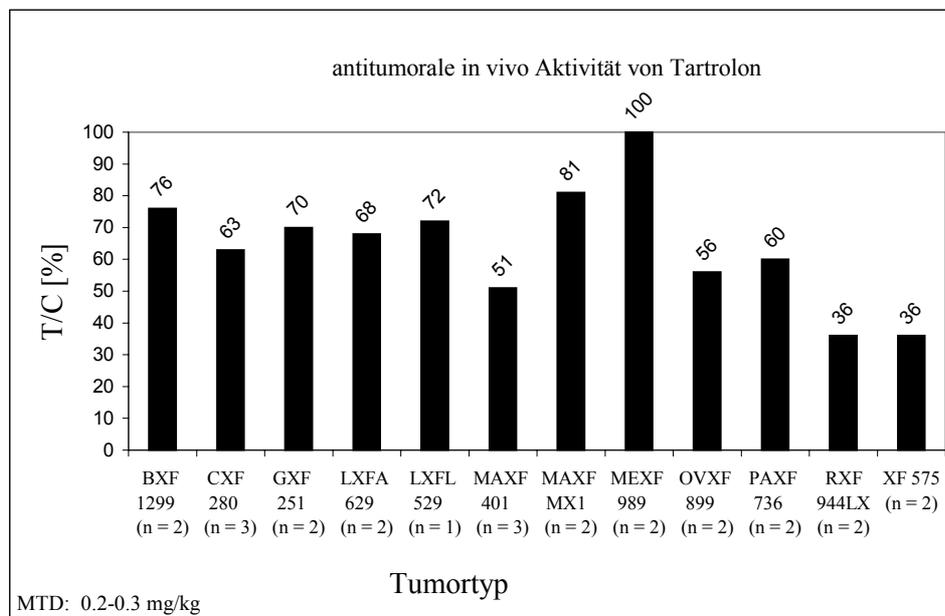


Abb. 4.6.2.12. Antitumorale Aktivität von Tartrolon B in der *in vivo* Testung

Eine Applikation von 1 mg/kg Tartrolon B hatte den akuten Exitus der therapierten Tiere zur Folge. Die optimalen T/C Werte der beiden Dosierungen 0.2 mg/kg und 0.3 mg/kg unterschieden sich nur minimal.

0.1 mg/kg im gleichen Therapieschema verabreicht bewirkte bei den sensiblen Xenografts nur eine geringe Wachstumshemmung.

Tartrolon B wurde nach Auswertung dieser Ergebnisse in abgewandelten Therapieprotokollen im Labor Prof. Fiebig weiter auf antitumorale Wirksamkeit untersucht.

Von den zwölf hier auf antitumorale *in vivo* Aktivität getesteten Naturstoffen mikrobieller Herkunft wurden neun der Substanzen aufgrund der hier präsentierten Wirksamkeitsdaten oder ihren pharmakologischen Eigenschaften von weiteren präklinischen Testungen ausgeschlossen.

Einer dieser neun Naturstoffe (Avilamycin C) wurde durch die Arbeitsgruppe Dr. Burger als möglicher Telomeraseinhibitor identifiziert und weiteren *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen unterzogen.

Drei der mit dem Tumorquartettmodell getesteten Naturstoffe zeigten eine vielversprechende orientierende Datenlage und wurden im Anschluß an die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Testungen für eine weiterführende präklinische Entwicklung vorgesehen.

Die Untersuchungen der Naturstoffe verdeutlichte die Potenz des Tumorquartettmodells, als *in vivo* Primärscreening eine breite Datenlage über die antitumorale Wirksamkeit der in nur sehr begrenzter Menge zur Verfügung stehenden Naturstoffe zu generieren. Damit kann die Entscheidung über weitere Testungen der Substanzen auf einer gut fundierten Basis getroffen werden.

Das Beispiel von Avilamycin C verdeutlicht aber auch die Grenzen des Testsystems.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, ein repräsentatives, reproduzierbares, präklinisches Tumormodell für das Primärscreening von Naturstoffen zu entwickeln. Bei diesem Tumormodell sollten vier verschiedene Xenografts gleichzeitig auf der Nacktmaus wachsen (Tumorquartettmodell) und der Substanztestung auf antitumorale Aktivität dienen.

Um die drei Tumorquartettmodelle zu etablieren und zu validieren, wurden Kriterien aufgestellt, die von den vier Xenografts des Modells erfüllt werden mußten. Anhand der Ergebnisse wurden verschiedene Fragestellungen beantwortet.

Erstes Ziel der Studien war es festzustellen, ob die Xenografts ihr Wachstum gegenseitig beeinflussen würden. In der Literatur finden sich viele Berichte über Tumor-Tumorinteraktionen aus präklinischen und klinischen Studien.

In verschiedenen klinischen Studien wurde die Unterdrückung des Wachstums von Sekundärtumoren durch einen Primärtumor beobachtet (Brunschwig et al., 1965).

Die Unterdrückung des Wachstums von Fernmetastasen wurde sowohl durch den gleichen Primärtumor (Gorelik et al., 1981; Keller, 1985; O'Reilly et al., 1994) als auch durch Tumormassen anderer Tumoren unterschiedlicher Histologien (Lange et al., 1980) beschrieben.

Eine Unterdrückung der Proliferation des Primärtumors ist auch durch rasches Wachstum der Metastasen dieses Tumors möglich (Yuhas et al., 1974).

Verschiedene transplantable Tumoren sind in der Lage, Sekundärimplantate desselben Xenografts (Gorelik, 1983; Ruggiero et al., 1985; Keller, 1985), aber auch anderer Tumorarten (Gorelik, 1983; Himmele et al., 1986) in ihrem Wachstum zu hemmen oder zu verlangsamen.

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Erklärungsansätze für diese Tumor-Tumorinteraktionen diskutiert.

Paul Ehrlich (Ehrlich, 1906) machte das Phänomen der „Athrepsie“, also einen Entzug von für das Tumorwachstum essentiellen Nährstoffen durch einen Primärtumor, für das gehemmte Wachstum anderer Tumoren auf dem gleichen Wirt verantwortlich.

Andere Autoren gingen von einer „mitbedingten Immunität (concomitant immunity)“ gegen den Sekundärtumor durch das Wachstum des Primärtumors aus (Bashford et al., 1907, Gorelik, 1983). Diese Immunität war proportional abhängig von der Masse des Primärtumors und verhielt sich umgekehrt proportional zur Größe des Sekundärinokulums, war unabhängig

vom T-Zellsystem, den Makrophagen oder NK-Zellen des Wirtes und war nicht tumorspezifisch (Gorelik, 1983).

Die Produktion antimitotischer Faktoren durch Tumorzellen wurde ebenfalls nachgewiesen (DeWys, 1972; Ellemann et al., 1977; Rothbarth, 1977).

Die Arbeitsgruppe von Judah Folkman isolierte den Angiogenesehemmstoff Angiostatin aus einer Sublinie des Lewis Lung Karzinoms, der das Wachstum von Lewis-Lung-Metastasen und von Sekundärimplantaten reversibel unterdrücken konnte (O'Reilly et al., 1994).

Aufgrund der beschriebenen Wachstumsbeeinflussungen war im Falle der hier durchgeführten Studien zu erwarten, daß sich eine gegenseitige Beeinflussung der Xenografts in verminderten Angehensraten eines oder mehrerer Xenografts oder in zunehmender Wachstumsverlangsamung eines oder mehrerer Tumoren in Abhängigkeit von der zunehmenden Masse des hemmenden Tumors äußern würde. Das Beeinflussungsbeispiel, in dem das Lewis Lung Karzinom RXF 944LX und vor allem XF 575 in seinem Wachstum hemmt (Kap.4.5), zeigt diese Art der tumormasseabhängigen Beeinflussung.

Mit diesem Experiment wurde bewiesen, daß auch die hier verwandten Xenografts auf Beeinflussung durch einen anderen (murinen) Tumor reagieren können.

Die meisten der bisher an Mäusen durchgeführten Studien wiesen in Methodik und Material aber einige Unterschiede zu den hier durchgeführten Versuchen auf.

- Die untersuchten transplantablen Tumoren waren meistens murinen Ursprungs (Lewis Lung, B16, T10 usw.), während in dieser Arbeit nur mit humanen Tumoren gearbeitet wurde (mit Ausnahme von Kap.4.5).
- Es wurden meist Zellen injiziert, während in dieser Arbeit stets Tumorfragmente implantiert wurden. Dieser Umstand bedingte, daß hier heterogene Tumoren anstatt genau definierter Zelllinien auf den Mäusen wuchsen.
- In keiner der zitierten Studien wurde ein NMRI nu/nu Auszuchtnacktmausstamm verwandt.
- In sämtlichen Studien wurden die Sekundärtumoren erst implantiert, als bereits eine relativ große Tumormasse des Primärtumors bestand, während in dieser Arbeit grundsätzlich alle Xenografts gleichzeitig transplantiert wurden.
- Alle hier verwandten Tumoren waren zuvor zusammen mit einem zweiten Xenograft desselben Ursprungs (zwei Fragmente desselben Spendertumors) ohne erkennbare Beeinflussung gewachsen.

Die Ergebnisse der Wachstumsstudien von Tumorquartett I und III zeigten zwar mehr oder weniger auffällige Schwankungen in den Wachstumsparametern der einzelnen Xenografts, sowohl zwischen den Versuchen als auch im Vergleich mit den historischen Daten, aber sie demonstrierten keinen eindeutigen, über mehrere Experimente konstanten Abfall in der Angehensrate, der Verlängerung der Induktionszeit oder der tumormasseabhängigen Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit.

Tumorquartett I hatte eine Gesamtangehensrate von 82 %, bei Tumorquartett III lag dieser Wert bei 85 %. Bei einer bekannten Angehensrate der Xenografts in der Einzelimplantation von 80 – 90 %, schloß dies eine selektive Verminderung der Angehensrate eines Tumors durch den Einfluß eines der drei anderen Xenografts aus.

Der Vergleich mit den historischen Daten zeigte auf den ersten Blick eine zum Teil statistisch signifikante Stimulation des Wachstums in den Mehrfachimplantationen. Dieser Unterschied in der Wachstumskinetik kam wohl durch die vielen Einflußfaktoren auf die historischen Versuche zustande und führte bei deren Werten zu einer hohen Streuung.

Beim Zustandekommen der Streuung spielten bei den unterschiedlichen Versuchen und Implantationen viele das Wachstum der Xenografts beeinflussende Faktoren in jeweils unterschiedlichem Ausmaß eine Rolle und sorgten für große Schwankungen in den Werten zwischen den einzelnen Versuchen. Solche allgemeinen Faktoren, die bei jeder Implantation zum Tragen kommen, sind unter anderem a) Größe und Vitalität der implantierten Fragmente, b) Gesundheitszustand und Restimmunität der Nacktmaus, c) Transplantationsintervall (Zeitspanne zwischen Entnahme des Tumors und Implantation in den Empfänger) und d) Passagezahl des Tumors (Bashford et al., 1907; Fiebig, 1983).

Weiterhin kommt dem Wundheilungsprozeß der Implantationswunde ein wachstumsstimulierender Einfluß zu (Hofer et al., 1999; Bogden et al., 1997; Abramovitch et al., 1998). Dieser stimulierende Einfluß wurde bei den Mehrfachimplantationen gezielt durch das Setzen von vier kleineren Inzisionen in unmittelbarer Nähe des implantierten Tumorfragments ausgenutzt. Weiterhin wurde auf die Verabreichung von steroidal und nichtsteroidal Analgetika und Antiphlogistika im Anschluß an die (wenig schmerzhaft) Operation gemäß Tierversuchsantrag verzichtet, da sonst die Phospholipase A2 oder Cyclooxygenasekaskade, die ebenfalls wachstumsfördernde Eicosanoide und Leukotriene freisetzt (Hofer et al., 1999), gehemmt worden wäre.

Viele dieser Faktoren konnten im direkten Vergleich des Wachstums der Xenografts von Tumorquartett I in der Einzel- und Vierfachimplantation standardisiert und somit in ihrer Wirkung auf die Streuung reduziert werden, was zu dem Ergebnis führte, daß kein statistisch signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten der Xenografts zwischen den verschiedenen Implantationsarten bestand (Kap.4.2.3.1.). Bei Tumorquartett III ergab sich aus den Wachstumsstudien und dem Vergleich mit den historischen Wachstumsdaten eine ähnliche Datenlage, wie im Falle von Quartett I. Daraufhin wurde auf einen solchen Versuch mit Tumorquartett III verzichtet, da aus Sicht des Untersuchers der mögliche Erkenntnisgewinn den Einsatz der Versuchstiere nicht gerechtfertigt hätte.

Das Wachstumsverhalten der Xenografts von Tumorquartettmodell II ähnelte bis zum ersten Naturstoffversuch den bei Quartett I und III beobachteten Ergebnissen. Die Etablierungskriterien waren bis zu diesem Zeitpunkt weitgehend erfüllt worden. Bezüglich der Wachstumsparameter der einzelnen Xenografts traten leichte Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen auf. Bei Vergleich mit den historischen Daten aus den Einzelimplantationen ergaben sich bei drei der vier Tumoren eine statistisch signifikante Differenz vor allem der zweiten Verdopplungszeit. Dieser Unterschied deutete auf eine Stimulation des Xenograftwachstums im Tumorquartettmodell hin.

Im ersten Naturstoffversuch zeigte OVXF 899 eine deutlich veränderte Wachstumskinetik. Das Ovarialkarzinom wuchs um den Faktor 4-5 langsamer als in den vorangegangenen Studien, was zu einem Verfehlen der Etablierungskriterien führte.

OVXF 899 befand sich bereits in den ersten Studien in einer sehr hohen Passage (42). Im Verlauf der Versuche steigerte das Ovarialkarzinom mit zunehmender Passagezahl (42-45) seine Wachstumsgeschwindigkeit bis zur extremen Verlangsamung in Passage 46 im ersten Naturstoffversuch. Die neu aufgetaute Passage 33 im zweiten Naturstoffversuch blieb in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit ebenfalls deutlich hinter Passage 42 bis 45 zurück.

Für dieses Phänomen bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten an.

Im Falle einer kontinuierlichen Weiterimplantation des Xenografts aus einer Vierfachimplantation ins nächste Tumorquartettmodell über vier Passagen, wäre es denkbar gewesen, daß sich der Effekt der Anwesenheit der anderen Tumoren auf der Nacktmaus während vier Passagen erst in Passage 46 im Sinne einer Wachstumshemmung des Ovarialkarzinoms bemerkbar macht. Solch eine retardierte, erst nach langfristiger kontinuierlicher Substanzapplikation eintretende Wirkung kann bei *in vivo* Experimenten mit Telomeraseinhibitoren beobachtet werden (Burger, unveröffentlichte Daten).

Im Falle der hier durchgeführten Versuche stammte das Spendermaterial aber nicht aus Vierfachimplantationen sondern aus parallel gewachsenen Einzelimplantationen der Tumorbank des Labors Prof. Fiebig. Dieser Umstand und das ebenfalls stark verlangsamte Wachstum in einer gleichzeitigen Einzelimplantation von Passage 46 lassen diese Erklärung hier nicht zutreffen.

Ein zweiter Erklärungsansatz ist die klonale Selektion des heterogenen Ovarialkarzinoms in der hohen Passage. Ein solches Phänomen ist bei *in vitro* Untersuchungen beobachtet worden, wobei sich das Wachstumsverhalten der Tumorzellen aber nicht änderte (Vindelov et al., 1982).

Für OVXF 899 ist eine Selektion einer schneller wachsenden Subpopulation von Tumorzellen während der Passagen bis 45 denkbar. Diese schnellere Subpopulation verlor in Passage 46 ihre Vitalität bzw. Proliferationsgeschwindigkeit oder im Rahmen der Präparation des Spendermaterials für Passage 46 wurde zufällig ein Tumorareal aus Passage 45 ausgewählt, in dem diese Subpopulation nicht vertreten war (siehe Bashford et al., 1907) oder das weniger vitale Zellen enthielt.

Bei OVXF 899 bestand das Problem, daß die im flüssigen Stickstoff gelagerten Reserven des Tumors allesamt aus recht hohen Passagezahlen stammten (auch das neu aufgetaute Xenograft befand sich bereits in Passage 33). Die sonst übliche Begrenzung der Nacktmauspässagen eines Tumors auf 20 bis 25 war hier nicht möglich.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Überwucherung des Ovarialkarzinoms durch Mäusefibroblasten, die normalerweise nur das Tumorstroma bilden (Fiebig, 1983).

Diese Möglichkeit schloß allerdings das Ergebnis der histologischen Untersuchung aus (siehe Kap.4.3.7).

Aus Sicht des Autors scheint die klonale Selektion das plausibelste Phänomen zu sein.

Unabhängig von der Ursache dieser Veränderung des Wachstumsverhaltens von OVXF 899 ist die Konsequenz das Verfehlen der Etablierungskriterien durch dieses, aufgrund des extrem kurzen Therapiezeitfensters des Tumorquartetts II schon fragwürdigen Modells. Der Versuch der Etablierung dieses Viertumormodells ist somit als gescheitert anzusehen.

Daraus folgte die logische Entscheidung, auf einen Versuch zum direkten Vergleich des Wachstums in Einzelimplantation und Tumorquartetmodell zu verzichten.

Bei vier verschiedenen Tumoren, die gleichzeitig auf der Nacktmaus in vier verschiedenen Lokalisationen wuchsen, stellte sich die Frage ob die Xenografts in den unterschiedlichen Lokalisationen (vordere bzw. hintere Flanke) Differenzen in ihrem Wachstum demonstrieren würden. In der Literatur finden sich verschiedene Berichte über eine verändertes biologisches

Verhalten in Abhängigkeit von der Implantationslokalisierung (Kyriazis und Kyriazis, 1980; Dipersio, 1981). Kyriazis und Kyriazis (1980) beobachteten ein statistisch signifikant schnelleres Wachstum von injizierten humanen Tumorzelllinien und von als Fragment implantierten humanen Tumoren in der vorderen Flanke im Vergleich zur hinteren Flanke der Nacktmäuse. Dieses schnellere Wachstum war unabhängig von der Histologie der Tumoren. Weiterhin wurde festgestellt, daß die Xenografts in der vorderen Flanke besser vaskularisiert, weniger nekrotisch und fibrotisch waren, öfter metastasierten und invasiver wuchsen. Die Autoren dieser Studien erklärten ihre Beobachtungen mit der besseren subkutanen Vaskularisierung in der vorderen Flanke der Tiere, weiterhin wurde eine mögliche Beeinflussung des Ansprechens der Xenografts auf antitumorale Therapie in den verschiedenen Implantationsstellen postuliert (Kyriazis und Kyriazis, 1980).

Bei den Untersuchungen in Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls Fragmente der Xenografts in den beschriebenen Lokalisationen auf Nacktmäuse implantiert. Der NMRI nu/nu Nacktmaus Auszuchtstamm des Labors Prof. Fiebig dürfte sich dabei von den von Kyriazis und Kyriazis (1980) verwandten Tieren zumindest geringfügig unterscheiden.

Es wurde ausschließlich die für dieses Projekt interessante Wachstumsgeschwindigkeit der Xenografts untersucht. Bei den Implantationen in die vier verschiedenen anatomischen Positionen waren hier stets die anderen Xenografts auf der Nacktmaus anwesend.

Aufgrund der geringen Anzahl der Tiere und Xenografts in diesem Vorversuch konnte keine aussagekräftige statistische Untersuchung durchgeführt werden.

Die erkennbaren Tendenzen der Auswertungen ließen darauf schließen, daß das hier verwandte Nacktmaus-Mehrtumormodell nicht in bedeutendem Ausmaß von der beschriebenen Bevorzugung einer anatomischen Position durch die Xenografts betroffen wird.

Bei einigen Tumoren konnten mehr oder weniger deutliche Schwankungen in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen den einzelnen Lokalisationen festgestellt werden.

Teilweise wurden in der vorderen Flanke größere Volumenzunahmen erreicht, wobei auf linker und rechter Körperseite deutliche Unterschiede auftraten (CXF 280, LXFL 529, GXF 251). Manche Xenografts schienen die hintere Flanke zu bevorzugen (MAXF 401, PAXF 736), teils lagen auf den beiden Körperseiten umgekehrte Verhältnisse vor (LXFA 629 und BXF 1299) und bei einem Tumor war der Unterschied zwischen vorderer und hinterer Position nur minimal ausgeprägt (MEXF 989). Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte der fehlende Unterschied in der subkutanen Vaskularisierung beim hier verwandten Nacktmausstamm sein. Die aufgetretenen Wachstumsunterschiede in den verschiedenen

Lokalisationen könnten außerdem auf individuellen Schwankungen (geringe Anzahl von Versuchstieren in den Gruppen) zurückzuführen sein.

Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sollen und können im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft oder widerlegt werden. Für die Etablierung der Tumorquartettmodell scheinen sie aber allenfalls eine untergeordnete Rolle zu spielen, wie auch die Ergebnisse der Chemosensibilitätstestungen zeigen.

Es sind verschiedene Möglichkeiten denkbar, auf welche Art und Weise eine Beeinflussung des Ansprechens eines Tumors auf eine antitumorale Therapie durch die Anwesenheit eines anderen Xenografts bewirkt werden könnte.

Grundsätzlich können Tumorzellen direkt (Sekretion einer inhibitorischen Substanz, siehe O'Reilly et al., 1994) oder indirekt (immunologische Komponenten, siehe Gorelik, 1983) in ihrem Stoffwechsel und ihrer Proliferation durch die Anwesenheit anderer Tumorzellen beeinflusst werden.

Da die meisten antitumoral wirksamen Substanzen zellzyklusphasenspezifisch wirken, könnte eine Arretierung der Tumorzellpopulation in bestimmten Phasen des Zellzyklus (Bichel, 1971) zu einer veränderten Reaktion des heterogenen Gesamttumors auf eine solche antineoplastische Therapie führen, wenn sich vermehrt Tumorzellen zum Zeitpunkt der Medikamenteneinwirkung in unempfindlichen Phasen des Zellzyklus (z.B. G₀) befinden. Die Beeinflussung der Protein- und DNAsynthese (Rothbart, 1977) könnte ebenfalls phasenspezifische Substanzen in ihrer Wirkung beeinträchtigen.

Unter Einfluß einer angiogenesehemmenden Substanz wie Angiostatin, die von Tumoren ausgeschieden werden (O'Reilly et al., 1994), kann es zu einer Unterversorgung des Tumors mit Nähr- und Sauerstoff kommen, was den Zustand der chronischen Hypoxie herbeiführt, in dem die Zellen zum großen Teil in der G₀-Phase verharren. Weiterhin kann eine solche Unterversorgung mit Gefäßen einen geringeren Gewebespiegel der Antitumormedikamente im Tumor (insbesondere in hypoxischen Arealen) bedingen.

Denkbare Veränderungen an der tumoralen Gefäßarchitektur (insbesondere an der fenestrierten, porösen Basalmembran) und den Transportmechanismen der Endothelzellen könnten ähnliche Folgen haben. Makromoleküle, wie sie häufig unter den Naturstoffen anzutreffen sind, könnten dann möglicherweise nicht ins Tumorparenchym vordringen um dort ihre Wirkung zu entfalten.

Andere Möglichkeiten, die Reaktion auf eine Therapie zu beeinflussen sind die Hoch- oder Herabregulierung verschiedener Rezeptoren auf oder in den Tumorzellen oder Veränderungen in der Expression von Onkogenen und Molekülen der Signaltransduktionskaskade.

In den Versuchen zur Untersuchung der Chemosensibilität der Xenografts im Tumorquartettmodell wurden jeweils vier Standardchemotherapeutika mit unterschiedlichem Wirkmechanismus und Phasenspezifität appliziert, um ein möglichst breites Spektrum an denkbar veränderten Reaktionen der Tumoren abzudecken.

Der Antimetabolit 5-Fluoruracil (Hemmung der RNA und DNAsynthese) wirkt hauptsächlich in der S-Phase (Neumann, 1996).

Der Tubulinhemmer Vindesin verhindert den korrekten Aufbau des Spindelapparates in der M-Phase (Neumann, 1996).

Das bifunktionelle Alkylans Cisplatin wirkt phasenunspezifisch (guaninspezifische Quervernetzung der DNA) allerdings mit dem Schwerpunkt in der S-Phase (Neumann, 1996). Alternativ zu Cisplatin wurde das ebenfalls phasenunspezifische Alkylans Cyclophosphamid eingesetzt.

Adriamycin akkumuliert in der G₂-Phase und wirkt vor allem in der S-Phase durch Interkalation, Sauerstoffradikalbildung und Schwesterchromatidaustausch (Neumann, 1996).

Diese Substanzen hatten den Vorteil, daß bis auf wenige Ausnahmen (XF 575) bereits eine umfassende historische Datenlage bezüglich der Empfindlichkeit der Xenografts der Quartettmodelle gegenüber diesen Substanzen in der Einzelimplantation bestand und somit keine Versuchstiere zur Testung ihres Ansprechens oder der maximal tolerablen Dosis eingesetzt werden mußten.

Weiterhin besitzen diese Substanzen die vorteilhafte Eigenschaft, in relativ kurzer Zeit einen antitumoralen Effekt zu demonstrieren. In sonst üblichen Therapieversuchen mit zwei implantierten Fragmenten desselben Xenografts kann meistens über einen Zeitraum von 28 Tagen gemessen und beobachtet werden. Die Tumorquartettmodelle haben aufgrund der höheren Gesamttumorlast nur ein relativ kurzes Versuchszeitfenster von 10 bis 17 Tagen. Es stehen also 11 bis 18 Tage weniger zur Demonstration des optimalen Effekts zur Verfügung. Für den Vergleich der T/C Werte und der Aktivitätsbewertung war es daher wichtig, daß die eingesetzten Substanzen ihre maximale Wirkung innerhalb des kürzeren Versuchszeitraumes entwickeln konnten.

Obwohl bei Tumorquartett II das bei der Gewinnung der Vergleichsdaten angewandte Therapieschema nicht vollständig durchgeführt werden konnte, wurde auch hier eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse erreicht.

Insbesondere die absolute Reproduzierbarkeit der Wirksamkeitsdaten durch Tumorquartett I und III widerlegten auch die Theorie, daß neben dem biologischen Verhalten der Xenografts

auch ihr Ansprechen auf antitumorale Therapie sich mit der Lokalisation verändern könnte (Kyriazis und Kyriazis, 1980). Im Tumorquartettmodell wachsen alle Tumoren gegenüber der anatomischen Position in der Einzelimplantation (Mitte der Flanke) versetzt.

Teilweise wurde ein intensiveres Ansprechen der Xenografts gegenüber den Chemotherapeutika im Tumorquartettmodell festgestellt. Eine mögliche Erklärung wäre eine Zytokinproduktion der Tumoren, die zu einer Sensibilisierung der anderen Xenografts gegenüber den Medikamenten führte, ohne die Wachstumskinetik der Tumoren zu beeinflussen.

Das Ergebnis des histologischen Vergleichs der Xenografts aus Einzelimplantation und Mehrfachimplantation anhand von HE-gefärbten Schnitten war, mit Ausnahme von OVXF 899, die Feststellung, daß das charakteristische histologische Bild der Tumoren im Quartettmodell beibehalten wurde.

Vorstellbare Veränderungen der Histologien wären eine verminderte Vaskularisierung (O'Reilly, 1994; Kyriazis und Kyriazis, 1980), vermehrtes Auftreten von Nekrosen und Fibrosen (Kyriazis und Kyriazis, 1980), verminderte Anzahl von mitotischen Kernen (Vindelov et al., 1982; Gorelik, 1983) oder aber histologische und zytologische Differenzierungs- bzw. Entdifferenzierungserscheinungen gewesen.

Quantitative Merkmale (Vaskularisierung, Nekrose, Fibrose und Mitosen) hängen stark von der Schnittebene bei der histologischen Präparation der Xenografts und dem betrachteten Tumorareal ab. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine standardisierten quantitativen Untersuchungsmethoden angewandt. Es wurden stets vital erscheinende Areale miteinander verglichen.

Bei OVXF 899 Passage 46 aus dem ersten Naturstoffversuch waren die makroskopischen (hellere Farbe und derbere Konsistenz des Xenografts) und histologischen Veränderungen augenfällig, ohne daß man sie genau quantifizieren mußte.

Anhand der hier beurteilten qualitativen Merkmale, die mit allenfalls geringen Schwankungen bei elf der zwölf Xenografts in allen Mehrfachimplantationen unverändert vorhanden waren, kann (insbesondere unter gleichzeitiger Wertung der anderen Ergebnisse) mit ausreichender Sicherheit von der Beibehaltung der mikroskopischen Morphologie der Xenografts der etablierten Tumorquartettmodelle ausgegangen werden.

Zur genaueren Abklärung der unveränderten (auch molekularbiologischen) Charakteristik der einzelnen Tumoren in der Mehrfachimplantation, könnten weiterführend immunhistochemische Untersuchungen, Durchführung eines TUNEL Assays zur quantitativen Analyse der relativen Anzahl an apoptotischen Tumorzellen, Isoenzymanalysen

(Fiebig, 1983) und die Erstellung von Tumormarkerprofilen durchgeführt werden, um so zu einer fortgeschritteneren Validierung der Tumorquartettmodelle zu kommen.

Die im Rahmen dieser Arbeit an die Etablierung des Modells gestellten Anforderungen wurden anhand der durchgeführten Untersuchung und der gewonnenen Erkenntnisse von zwei Tumorquartettmodellen komplett erfüllt.

Nachdem das Wachstumsverhalten, die Chemosensitivität und das histologische Bild der Xenografts im Tumorquartettmodell durch zwei der drei getesteten Quartette im Sinne der Etablierungskriterien positiv beurteilt werden konnte, stellen sich weiterhin zwei für den Sinn des Projekts entscheidende Fragestellungen.

1. Ist das Testmodell in der Lage, im Rahmen der *in vivo* Naturstofftestung den Einsatz von Versuchstieren zu reduzieren?
2. Kann die generierbare Datenmenge der antitumoralen *in vivo* Aktivität eines Naturstoffs entscheidend vergrößert werden?

Zur Beantwortung beider Fragen soll hier ein Beispiel aus der Naturstofftestung herangezogen werden.

Ziel des Experiments K307 bis K310 war es, Aktivitätsdaten von 6 Naturstoffen an den vier Xenografts von Tumorquartett I zu gewinnen. Jede Substanz sollte in 2 Dosierungen getestet werden, in jeder Therapiegruppe sollten sich zwei Nacktmäuse befinden, die Kontrollgruppe sollte aus vier Mäusen bestehen.

Insgesamt wurden also 28 Nacktmäuse, die alle vier Xenografts des Tumorquartetts I in logarithmischen Wachstum trugen, benötigt.

Die Angehensrate in diesem Experiment, d.h. der Prozentsatz der einsetzbaren Mäuse, betrug 75 %. Um die gewünschten 28 Versuchstiere zur Verfügung zu haben, mußten also insgesamt etwa 38 Nacktmäuse für dieses Experiment eingesetzt werden.

Im Vergleich mit der Einzelimplantation ergeben sich verschiedene Rechenmöglichkeiten zur Generierung der gleichen Datenmenge.

Würde die gleiche Anzahl an Versuchstieren in den Therapiegruppen gewünscht, müßten bei einer angenommenen optimalen Angehensrate von 100 %, 4 x 28, also 112 Tiere, implantiert werden. Dies entspräche einer Einsparung von 74 Nacktmäusen oder 66% der in der Einzelimplantation benötigten Versuchstiere. Bei einer realistischeren Angehensrate von 90% in der Einzelimplantation könnten 85 Mäuse oder 69% der Tiere eingespart werden.

Würde statt der gleichen Zahl an Nacktmäusen die gleiche Anzahl an Xenografts in den Therapiegruppen gewünscht, so müßte man theoretisch nur die Hälfte der Mäuse in der Einzelimplantation einsetzen, da zwei Fragmente desselben Xenografts auf eine Maus implantiert werden können.

Bei einer optimalen Angehensrate von 100% müßten für die Einzelimplantation also 56 Nacktmäuse implantiert werden. Dies entspräche einer Einsparung von 18 Mäusen oder 32% durch die Vierfachimplantation.

Bei einer Angehensrate von nur 90% in der Einzelimplantation läge die Anzahl der weniger benötigten Mäuse bei 24 Tieren oder 39%.

In Anbetracht der Tatsache, daß bei verschiedenen Vierfachimplantationen deutlich höhere Angehensraten als in diesem Rechenbeispiel erreicht wurden und hier von sehr optimistischen Werten für die Einzelimplantation ausgegangen wurde, erscheint eine Einsparung an einzusetzenden Versuchstieren von 40 bis 70 % realistisch.

Um die orientierenden Ergebnisse der *in vivo* Testungen mit dem Tumorquartettmodell zu verifizieren, müssen die Ergebnisse an Mäusen, die nur den sensiblen Tumor tragen, reproduziert werden.

Bei diesen Reproduktionen ist keine Einsparung an Versuchstieren mehr möglich. Allerdings werden nur positive, d.h. dosisabhängig antitumorale Aktivität anzeigende Ergebnisse reproduziert und nur diese sensiblen Xenografts müssen einzeln auf Nacktmäuse implantiert werden.

Da im Primärscreeningmodell der Vierfachimplantation mit einem geforderten optimalen T/C von < 50 % bei bestehender Dosisabhängigkeit ein relativ weiches Kriterium für die Entscheidung bezüglich der Durchführung eines Verifizierungstests angewandt wird, besteht eine hinreichend große Sicherheit, daß kein falsch negatives Ergebnis vorliegt, wenn die zwei Xenografts pro Therapiegruppe im Median keine entsprechende Wachstumshemmung zeigen.

Aus dem oben aufgeführten Rechenbeispiel läßt sich im Umkehrschluß eine um etwa denselben Prozentsatz größere generierbare Datenmenge herleiten, wenn die Anzahl der therapierten Mäuse (z.B. durch die Substanzmenge bei weniger potenten Naturstoffen) limitiert ist.

Das Tumorquartettmodell kann als Testmodell nur als *in vivo* Primärscreening dienen, um orientierende Hinweise über die Aktivität, Selektivität und die pharmakologischen Eigenschaften eines Naturstoffs zu liefern.

Festgestellte Aktivitäten müssen auf jeden Fall aus Gründen der Aussagesicherheit der generierten Daten an Nacktmäusen, die nur einen Tumor tragen, reproduziert werden, da

- a) aus Gründen des Arbeitsaufwandes meist nur zu kleine Gruppenumfänge für eine statistisch sichere Überprüfung der Daten gebildet werden können,
- b) nicht mit 100 %iger Sicherheit ausgeschlossen werden kann, daß je nach Substanz und ihren pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften im Viertumormodell Abweichungen in den Aktivitätsdaten entstehen könnten,
- c) es sich bei dem Tumorquartettmodell um einen Schnelltest mit einem Versuchszeitfenster von nur 14-17 Tagen handelt.

Die Aussage von Punkt c) bedeutet, daß eine Substanz, die längere Zeit benötigt, um ihre antitumorale Aktivität zu demonstrieren, in diesem Testsystem benachteiligt werden könnte.

Bei Substanztestungen mit nur einem Xenograft auf der Nacktmaus besteht je nach Tumor und Ausmaß der antitumoralen Aktivität die Möglichkeit, die antitumorale Wirkung des Medikaments sehr viel länger (bis zu mehreren Monaten) zu beobachten.

Ein Beispiel für eine solche Substanz ist der im Rahmen dieser Arbeit getestete Naturstoff Avilamycin C. Aufgrund der im Tumorquartettmodell erreichten Wirkungen und der anschließenden Reproduktion in kleinem Umfang war ein *in vivo* Teststop im Labor Prof. Fiebig beschlossen worden. Bei der Auswertung der *in vitro* Daten mittels TARGET-COMPARE zeigte sich eine hohe Korrelation mit dem Wirkmechanismus der Telomeraseinhibition. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden weitere *in vitro* und *in vivo* Langzeittherapiestudien geplant (Burger, unveröffentlichte Daten).

Eine Schwachstelle des Testmodells der Vierfachimplantation ist demnach das kurze Therapiezeitfenster. Wirkstoffe, die geringe Zytotoxizität besitzen und daher nicht in der Lage sind, einen schnellen antitumoralen Effekt herbeizuführen, aber aufgrund ihres Wirkmechanismus über einen längeren Therapiezeitraum einen Tumor im Wachstum hemmen und so eine klinische Gesundheit bei stabilem Allgemeinbefinden des Patienten ohne vollständige Tumorremission erreichen könnten (wie viele der targetorientierten Therapiekonzepte) werden mit diesem Testsystem tendenziell nicht entdeckt.

Weiterhin muß der orientierende, vorläufige Charakter der Daten, die mit dem Viertumormodell gewonnen werden, beachtet werden. Die Naturstoffe werden in nur einem Therapieschema (d: 0, 4, 8) und auf eine Art (intraperitoneal) appliziert. Es ist denkbar, daß durch Optimierung des Applikationsschemas und -weges, sowie der Formulierung der Substanz und durch pharmakokinetischen Studie bei vielen Naturstoffen ein besserer Effekt

als im Viertumormodell herausgearbeitet werden kann. Das Tumorquartettmodell steht somit ganz am Anfang einer präklinischen *in vivo* Entwicklung einer Substanz.

Als Konsequenz aus diesen Schwächen des Tumorquartettmodells ergibt sich, daß im Vorfeld der *in vivo* Testungen die *in vitro* Daten optimal ausgewertet und eine lückenlose Recherche bezüglich der Substanz, ihres Wirkmechanismus und bekannten Toxizitäten durchgeführt werden muß. Anschließend kann entschieden werden, ob ein Einsatz im Viertumormodell sinnvoll ist, ob ein anderes *in vivo* Modell erfolgversprechender erscheint oder ob bei ungünstiger Datenlage von unnötigen Testungen abgesehen werden muß.

Trotz der zu beachtenden Nachteile des Testsystems und der hier nicht vollständig erschöpfenden Charakterisierung ist das Tumorquartettmodell in der Lage, im Rahmen einer Testsequenz, wie sie im Labor Prof. Fiebig durchgeführt wird, als orientierendes *in vivo* Primärscreeningmodell eine breite Datenlage zur antitumorale Aktivität einer Substanz zu liefern und erheblich zur Einsparung von Versuchstieren bei diesen Testungen beizutragen.

6. Zusammenfassung

Eine der wichtigsten Aufgaben der onkologischen Forschung ist die Entdeckung und Entwicklung neuartiger Antitumormedikamente, um das Spektrum der zugelassenen Substanzen zu erweitern und zu ergänzen oder um ältere, nebenwirkungsreiche Medikamente ersetzen zu können.

Die Naturstoffe bieten hier eine scheinbar unerschöpfliche, zum größten Teil noch unerforschte Vielfalt an neuartigen Strukturen und möglichen antineoplastischen Wirkmechanismen. Um diese Vielzahl interessanter Verbindungen pflanzlicher, mikrobieller, mariner und tierischer Herkunft präklinisch effektiv untersuchen zu können, bedarf es eines gut organisierten, gestaffelten *in vitro* und *in vivo* Screeningverfahrens.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in vivo* Primärscreeningmodell etabliert. Bei diesem Tumorquartettmodell wachsen vier verschiedene humane Tumoren gleichzeitig subkutan auf einer NMRI nu/nu Nacktmaus und können so der Substanztestung dienen.

Da viele mögliche Interaktionen zwischen verschiedenen Tumoren beschrieben worden sind, mußte eine gegenseitige Beeinflussung der Xenografts untereinander ausgeschlossen werden, um das Modell zu etablieren.

Es wurden drei Viertumormodelle auf das Wachstumsverhalten, die Chemosensibilität und das histologische Bild der Xenografts im Modell im Vergleich zur Einzelimplantation der Tumoren untersucht.

Tumorquartettmodell I mit dem großzelligen Lungenkarzinom LXFL 529, dem Mammakarzinom MAXF 401, dem Colonkarzinom CXF 280 und dem Melanom MEXF 989 und Tumorquartettmodell III (Pankreaskarzinom PAXF 736, Magentumor GXF 251, adenoides Lungenkarzinom LXFA 629 und Übergangsepithelkarzinom BXF 1299) erfüllten alle im Rahmen der Etablierung gestellten Forderungen und wurden somit als für Testungen geeignet angesehen. Es konnten keine Interaktionen zwischen den verschiedenen Tumoren festgestellt werden.

Tumorquartett II (RXF 944LX, OVXF 899, MAXF MX 1, XF 575) scheiterte an der sich im Verlauf der Versuchsreihe ändernden Wachstumskinetik des Ovarialkarzinoms OVXF 899. Dieses veränderte Wachstum war aber wahrscheinlich eher einer klonalen Selektion des von Tumorzellen in hoher Passage, als einer Beeinflussung durch eines der anderen Xenografts zuzuschreiben.

Nach der Etablierung des Testmodells wurden zwölf Naturstoffe mikrobieller Herkunft auf antitumorale Aktivität mit den drei Tumorquartetten an den insgesamt zwölf Xenografts getestet. Anhand dieser Testungen konnten Vor- und Nachteile sowie Grenzen des Modells charakterisiert werden.

Es handelt sich um ein als Schnelltest (Versuchsdauer 14-17 Tage) ablaufendes, orientierendes Primärscreening.

Nicht alle Substanzen und Wirkmechanismen haben in diesem Testmodell vergleichbar gute Chancen zur Demonstration antitumoraler Aktivität und Selektivität, da ein langsamer Wirkungseintritt eventuell als keine Wirkung interpretiert werden kann.

Das Viertumormodell ist in der Lage, die Anzahl der benötigten Versuchstiere für einen festgelegten Testumfang um 40 – 70 % gegenüber den herkömmlichen *in vivo* Testverfahren zu reduzieren.

Weiterhin kann das Modell die generierbare *in vivo* Datenmenge eines kostbaren, nur in sehr geringer Menge (wenige Milligramm) zur Verfügung stehenden Naturstoffs entscheidend vergrößern und vermag so, die Chance der Entdeckung antineoplastischer Aktivität einer Verbindung zu verbessern.

7. Summary

The discovery and development of novel anticancer drugs is one of the most important tasks of cancer research. The goal is to expand the limited spectrum of registered antineoplastic compounds and to replace old sideeffect-prone drugs.

Natural compounds offer a seemingly unlimited, for the most part undiscovered and untested variety of novel molecules and effective mechanisms. To be able to examine this multitude of promising compounds of plant, microbiological, marine and animal origin, a well designed cascade of *in vitro* and *in vivo* testing systems is necessary.

In this study a primary screening model for *in vivo* testing termed tumor quartet model was established.

In the tumor quartet model four different human tumors are implanted simultaneously, and are growing subcutaneously in a NMRI nu/nu nude mouse for the purpose of anticancer drug testing.

Since interactions between different tumors in the same host have been described, a prerequisite for the establishment of the model was the exclusion of reciprocal interference among the four different xenografts.

Three tumor quartet models were characterized for their growth behaviour, chemosensitivity, and the histological appearance of the tumors compared to single graft implantation.

Tumor quartet model I, comprising the large cell lung carcinoma LXFL 529, the mammary carcinoma MAXF 401, the colon carcinoma CXF 280 and the melanoma MEXF 989, as well as tumor quartet model III (pancreatic carcinoma PAXF 736, gastric carcinoma GXF 251, adenoid lung carcinoma LXFA 629 and transitional epithelium carcinoma BXF 1299) met all the establishment criteria and were subsequently regarded as useful for testing purposes.

In these models no kind of tumor-tumor interaction could be observed.

Tumor quartet model II (RXF 944LX, OVXF 899, MAXF MX 1, XF 575), however, failed to fulfill the established criteria due to the growth kinetics of the ovarian carcinoma OVXF 899 which changed during the course of the sequence of experiments.

This altered growth behaviour, however, was more likely due to a clonal selection of tumor cells at a high passage number than due to an interference by xenografts of different origin in the quartet model.

After the establishment of the model, twelve natural products of microbiological origin were tested for antitumor activity against twelve xenografts using the three tumor quartets.

In the process of these tests, the advantages, several disadvantages and limitations of the model became apparent and were characterized.

Finally, the model established here represents a primary *in vivo* screening test that has to be run as a short-term *in vivo* assay (experimental time frame of 14-17 days).

Not every tested agent of natural origin and not every mechanism of action, however, will get the chance of demonstrating antitumor activity and selectivity under these conditions, since substances with slowly developing effects might be considered ineffective.

The tumor quartet model is able to significantly reduce the number of animals necessary for testing antitumor substances in the order of 40-70 % in comparison to the commonly used *in vivo* test procedures.

Moreover, the model is capable of significantly enlarging the database on natural products with antitumor activity and a limited availability since four tumors can be tested with one dose. Thus the chance to discover new drugs with antineoplastic activity has been increased.

8. Literaturverzeichnis

- Abramovitch R., Marikovsky M., Meir G., Neeman M., 1998.
Stimulation of tumour angiogenesis by proximal wounds: spatial and temporal analysis by MRI
Brit. J. Cancer. 77, 440-447.
- Adams M. W. W., Kelly R. M., 1995.
Enzymes from microorganisms in extreme environments.
Chem. Eng. News. 32-42.
- Balandrin M.F., Kinghorn A.D., Farnsworth N.R., 1993.
Plant derived natural products in drug discovery and development, An overview.
In Kinghorn A.D., Balandrin M.F. (eds.),
Human Medicinal Agents from Plants.
Am. Chem. Soc. Symposium Series. 534, pp. 2-12.
- Bashford E. F., Murray J. A., Cramer W., 1907.
The natural and induced resistance of mice to the growth of cancer.
Proc. R. Soc. Lond. (B). 79,164-187.
- Bashford E., Murray J., Haaland M., Bowen W., 1908.
General results of propagation of malignant new growths.
Third Scientific Report on the Investigation of the Imperial Cancer Research Fund. 3, pp. 262-268.
- Berger D.P., Winterhalter B.R., Fiebig H.H., 1992.
Establishment and Characterization of Human Tumor Xenografts in Thymus-Aplastic Nude Mice.
In Fiebig H.H., Berger D.P. (eds.), Immunodeficient Mice in Oncology.
Verlag Karger, Basel, pp. 23-46.
- Bibby M.C., 1999.
Transplantable tumors in mice-the way forward.
In Fiebig H.H., Burger A.M (eds.), Relevance of tumor models for anticancer drug development.
Contrib. Oncol. 54, pp.1-13.
- Bichel P., 1971.
Autoregulation of ascites tumor growth by inhibition of the G-1 and G-2 phase.
Eur. J. Cancer. 7, 349-355.
- Bogden A.E., Moreau J-P., Eden P.A., 1997.
Proliferative response of human and animal tumours to surgical wounding of normal tissues :onset duration and inhibition
Brit. J. Cancer. 75, 1021-1027.
- Bossi R., Hutter R., Keller-Schierlein W., Neipp L., Zahner H., 1958.
Metabolic products from Actinomycetes. XIV. Actinomycin Z.
Helv. Chem. Acta. 41, 1645-52.

Brunschwig A., Southam C.M., Levin A.G., 1965.

Clinical experiments by homotransplants, autotransplants and admixture of autologous leukocytes.

Ann. Surgery. 162, 416-425.

Buzzetti F., Eisenberg F., Grant H.N., Keller-Schierlein W., Voser W., Zahner H., 1968.

Avilamycin

Experientia 24, 320-3.

Cragg G.M., Newman D.J., 1999.

Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources.

Cancer Invest. 17, 153-163.

Cragg G.M., Newman D.J., 2000.

Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions.

Exp. Opin. Invest. Drugs. 9, 2783-2797.

Cragg G.M., Newman D.J., Snader K.M., 1997.

Natural products in drug discovery and development.

J. Nat. Prod. 60.

DeWys W. D., 1972.

Studies correlating the growth rate of a tumor and its metastasis and providing evidence for tumor-related systemic growth-retarding factors.

Cancer Res. 32, 374-379.

Dengler W.A., Schulte J., Berger D.P., Mertelsmann R., Fiebig H.H., 1995.

Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays.

Anticancer Drugs 6, 522-532.

Dipersio L.P., 1981.

Regional growth differences of human tumour xenografts in nude mice.

Lab. Anim. 15, 179-180.

Duplan J.F., 1984.

Use of xenografts for the evaluation of tumor chemotherapy. Application to adjuvant chemotherapy.

Bull. Cancer. 71, 292-296.

Ehrlich P., 1906.

Experimentelle Karzinomstudien an Mäusen.

Arb. Inst. exp. Ther. Frankfurt. 1, 65.

Ellemann C.J., Eidinger D., 1977.

Suppressive factors in ascitic fluids and sera of mice bearing ascites tumors.

J. Natl. Cancer Inst. 59, 925-931.

Ettliger L., Gaumann E., Hutter R., Keller-Schierlein W., Kradolfer F., Neipp L., Prelog V., Zahner H., 1959.

Metabolic products of actinomycetes. XVII. Holomycin.

Helv. Chim. Acta. 42, 563-569.

Fiebig H.H., 1983.

Wachstum und Chemotherapie menschlicher Tumoren - vorwiegend Dickdarm-, Magen- und Bronchialkarzinome - in der thymusaplastischen Nacktmaus.

Habilitationsschrift 1983, Freiburg.

Fiebig H.H., Berger D.P., Dengler W.A., Wallbrecher E., Winterhalter B.R., 1992.

Combined In Vitro/ In Vivo Test Procedure with Human Tumor Xenografts for New Drug Development.

In: Fiebig H.H., Berger D.P. (eds), Immunodeficient Mice in Oncology..

Verlag Karger, Basel, 321-351.

Fiebig H.H., Dengler W.A., Roth T., 1999.

Human tumor xenografts: predictivity, characterization and discovery of new-anticancer agents.

In: Fiebig H.H., Burger A.M.(eds.), Relevance of tumor models for anticancer drug development.

Contrib. Oncol. 54, pp. 29-50.

Fiedler E., Fiedler H.-P. (eds), 1994.

Secondary Metabolites Isolated by Hans Zähler and his group 1954-1994.

Zeeb-Druck, Tübingen.

Fortmeyer H. P., 1983.

Thymusaplastische Maus - (nu/nu) Thymusaplastische Ratte (rnu/rnu) - Haltung, Zucht, Versuchsmodelle.

Schriftenreihe Versuchstierkunde 8, Verlag P.Parey, Berlin, Hamburg.

Fortmeyer H..P., Bastert G., 1977.

Breeding and Keeping of nu/nu mice.

Z. Versuchstierk. 19, 339.

Geran R.I., Greenbaum N.H., Macdonald M.M., Abbott B.J., 1977.

Modified protocol for the testing of new synthetics in the lymphoid leukemia murine model in the DR&D program, DCT, NCI

Natl. Cancer Inst. Monogr. 45, 151-153.

Gerth K., Washausen P., Hofle G., Irschik H., Reichenbach H., 1996.

The jerangolids: A family of new antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties of jerangolid A.

J. Antibiot. 49, 71-5.

Giovanella B.C., Fogh J., 1978.

Present and future trends in investigations with the nude mouse as a recipient of human tumor transplants.

In: Fogh J., Giovanella B.C., 281-312.

Giovanella B.C., Yim S.O., Stehlin J.S., Williams L.J., 1972.

Development of invasive tumors in the nude mouse after injection of cultured human melanoma cells.

J. Natl. Cancer Inst. 48, 1531-33.

- Goldin A., Venditti J.M., MacDonald J.S., Muggia F.M., Henney J.E., DeVita V.T., 1981.
Current results of the screening program at the division of cancer treatment, National Cancer Institute.
Eur. J. Cancer. 17, 129-142.
- Gorelik E., 1983.
Resistance of tumor-bearing mice to a second tumor challenge.
Cancer Res. 43, 138-145.
- Gorelik E., Segal S., Feldman M., 1981.
On the mechanism of tumor „concomitant immunity.“
Int. J. Cancer. 27, 847-856.
- Gronwold T., Sasse F., Liinsdorf H., Reichenbach H., 1999.
Effects of rhizopodin and latrunculin B on the morphology and on the actin cytoskeleton of mammalian cells.
Cell. Tissue Res. 295, 121-129.
- Harries M., Smith I., 2002.
The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin^R).
Endocr. Relat. Cancer. 9, 75-85.
- Harrigan G.G., Luesch H., Yoshida W.Y., Moore R.E., Nagle D.G., Paul V.J., 1999.
Symplostatin 2: A dolastatin 13 analogue from the marine cyanobacterium *Symploca hydroides*.
J.Nat.Prod. 62, 655-658.
- Herriot J.G., Reinsch C.H., 1973.
Procedures for Natural Spline Interpolation.
C.A.C.M. (Communication of Association for Computing Machinery) 16, 763-768.
- Himmele J.C., Rabenhorst B., Werner D., 1986.
Inhibition of Lewis lung tumor growth and metastasis by Ehrlich ascites tumor growing in the same host.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 111, 160-165.
- Hofer S.O.P., Molema G., Hermens R.A.E.C, Wanebo H.J., Reichner J.S. and Hoekstra H.J., 1999.
The effect of surgical wounding on tumour development
Eur. J. Surg. Oncol. 25, 231-243.
- Horan A.C., 1994.
Aerobic Actinomycetes: A continuing source of novel natural products
In: Gullo V.P. (ed), *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*.
Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 3-30.
- Internetseite EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products):
Note for guidance on the pre-clinical evaluation of anticancer medicinal products
(<http://www.eudra.org/emea.html>).

Irschik H., Schummer D., Gerth K., Hoefle G., Reichenbach H., 1995.
Antibiotics from gliding bacteria. 60. The Tartrolons, new boron-containing antibiotics from a myxobacterium, sorangium cellulosum.
J. Antibiot. 48, 26-30.

Khosla C., Zawada R.J.X., 1996.
Generation of polyketide libraries via combinatorial biosynthesis.
Trends Biotechnol. 14, 335-341.

Koch C., Neumann T., Thierike R. and Grabley S., 2000.
A Central Natural Products Pool-New Approach in Drug Discovery Strategies.
In: Grabley S., Thiericke R.(eds.), Drug Discovery from Nature
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Kopper L., Steel G.G., 1975.
The Therapeutic Response of Three Human Tumor Lines Maintained in Immuno-suppressed Mice.
Cancer Res. 35, 2704-2713.

Kubota T., Inoue S., Furukawa T., Ishibiki K., Kitajima M., Kawamura E., Hoffman R.M., 1993.
Similarity of serum-tumor Pharmacokinetics of antitumor agents in man and nude mice.
Anticancer Res. 13, 1481-1484.

Kyriazis A.A., Kyriazis A.P., 1980.
Preferential Sites of Growth of Human Tumors in Nude Mice following Subcutaneous Transplantation
Cancer Res., 40, 4509-4511.

Lackner H.; Bahner I.; Shigematsu N.; Pannell L.K.; Mauger A.B., 2000.
Structures of five components of the actinomycin Z complex from Streptomyces fradiae, two of which contain 4- chlorothreonine.
J. Nat. Prod. 63, 352-356.

Lange P. H., Hekmat K., Bosi G., Kennedy B.J., and Fraley E.E., 1980.
Accelerated growth of testicular cancer after cytoreductive surgery.
Cancer 45, 1498-1506.

Malakoff D., 2000.
The Rise of the Mouse, Biomedecine`s Model Mammal.
Science 288, 248-253.

McConnell O., Longley R.E., Koehn F.E., 1994.
The discovery of marine natural products with therapeutic potential,
In: Gullo V.P. (ed.),
The discovery of Natural Products with Therapeutic Potential.
Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 109-174.

McKeage K., Perry C.M., 2002.
Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER 2.
Drugs 62, 209-243.

- Mohr U., Althoff J., Kinzel V., Suss R., Volm M., 1968.
Melanoma regression induced by "chalone": a new tumor inhibiting principle acting in vivo.
Nature 220, 138-139.
- Neumann H.-G., 1996.
Entstehung und Behandlung von Tumoren, Immunsuppressiva.
In: Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Newell D.R., Burtles S.S., Fox B.W., Jodrell D.I., Connors T.A., 1999.
Evaluation of rodent-only toxicology for early clinical trials with novel cancer therapeutics
Brit. J. Cancer. 81, 760-768.
- Nisbet L.J., Moore M., 1997.
Will natural products remain an important source of drug research for the future?
Curr. Op. Biotech. 8, 708-712.
- Nuijen B., Bouma M., Manada C., Jimeno J.M., Schellens J.H.M., Bult A., Beijnen J.H., 2000.
Pharmaceutical development of anticancer agents derived from marine sources
Anti Cancer Drugs 11, 793-811.
- Oliva B., O'Neill A., Wilson J.M., O'Hanlon P.J., Chopra I., 2001.
Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin.
Antimicrobial agents and chemotherapy 45, 532-539.
- O'Reilly M., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J., 1994.
Angiostatin: A Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma
Cell 79, 315-328.
- Ovejera A.A., 1987.
The use of human tumor xenografts in large scale drug screening.
In: Kallmann R.F.(ed), Rodent tumor models in experimental cancer therapy.
Pergamon Press, New York, Oxford, pp. 218-220.
- Pantelouris E.M., 1968.
Absence of the thymus in a mouse mutant.
Nature 217, 370.
- Potmeisel M., Pinedo H., 1995.
Camptothecins: New Anticancer Agents.
Boca Raton, Fl., CRC.
- Povlsen C.O., 1980.
Heterotransplantations of human tumors in nude mice.
Antibiot. Chemother. 28, 15-20.
- Povlsen C.O., Rygaard J., 1971.
Heterotransplantation of human adenocarcinoma of the colon and rectum to the mouse of the mutant nude. A study of nine consecutive transplantations.
Acta pathol. microbiol. scand. 79, 159-169.

Povlsen C.O., Rygaard J., 1971.

Effects of Cyclophosphamide (Endoxan^R) on a Burkitt's Lymphoma serially grown in nude mice.

In: Rygaard J., Povlsen C.O. (eds.), Proceedings of the first international workshop on nude mice. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart, New York, pp. 285-92.

Randt T., 1984.

Immunhistologischer CEA-Nachweis an serienmäßig aus Nacktmäuse xenotransplantierten menschlichen Dickdarntumoren.

Inaugural-Dissertation Medizin. Fakult. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Brsg.

Resasova E.S., Solovjov Y.N., Chumakov P.M., Kushlinskij N.E., Tkachlova G.A., Spitkovsky D.D., Karamov E.V., Frolova E.L., 1992.

Study of human tumor models established in nude mice.

In: Fiebig H.H., Berger D.P. (eds.), Immunodeficient Mice in Oncology. Verlag Karger, Basel, pp. 126-127.

Römpp-Lexikon Naturstoffe Hrsg. Burkhard Fugmann Stuttgart; New York: Thieme 1997

Rothbarth K., Maier G., Schöpf E., Werner D., 1977.

Inhibition of DNA synthesis by a factor from ascites tumor cells.

Eur. J. Cancer 13, 1195-1196.

Rounds D.E., 1970.

A growth modifying factor from cell lines of human malignant origin.

Cancer Res. 30, 2847-2851.

Ruggiero R.A., Bustuoabad O.D., Cramer P., Bonfil R.D., Pasqualini C.D., 1990.

Correlation between seric antitumor activity and concomitant resistance in mice bearing nonimmunogenic tumors.

Cancer Res. 50, 7159-7165.

Sasse F., Steinmetz H., Hoefle G., Reichenbach H., 1993.

Antibiotics from gliding bacteria. 49. Rhizopodin, a new compound from *Myxococcus stipitatus* (myxobacteria) causes formation of rhizopodia-like structures in animal cell cultures: production, isolation, physico-chemical and biological properties.

J. Antibiot. 46, 741-748.

Sasse F., Steinmetz H., Hoefle G., Reichenbach H., 1995.

Gephyronic acid, a novel inhibitor of eukariotic protein synthesis from *Archangium gephyra* (myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action.

J. Antibiot. 48, 21-25.

Schummer D., Forche E., Wray V., Domke T., Reichenbach H., Hoefle G., 1996.

Antibiotics from gliding bacteria. Part LXXVI. Vioprolides: new antifungal and cytotoxic peptolides from *Cystobacter violaceus*.

Liebigs Ann. 6, 971-978.

Sordat B., Merenda C., Carrel S., 1977.

Invasive growth and dissemination of human solid tumors and malignant cell lines grafted subcutaneously to new-born nude mice.

In: Nomura T. (ed.), Proceedings of the second international workshop of nude mice.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 313-326.

Sprent J., 1971.

Migration and Lifespan of Circulating B-Lymphocytes of Nude (nu/nu) Mice.

In: Ryygard J., Povlsen C.O. (eds.), Proc. First Intern. Workshop Nude Mice,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 11-12.

Staquet M.J., Byar D.P., Green S.B., Rozenzweig M., 1983.

Clinical predictivity of transplantable tumor systems in the selection of new drugs for solid tumors. Rationale of a three-stage strategy.

Cancer Treat. Rep. 67, 753-765.

Vindelov L.L., Spang-Thomsen M., Visfeldt J., Povlsen C.O., Jensen G.,

Nissen N.I., 1982.

Clonal evolution demonstrated by flow cytometric DANN analysis of a human colonic carcinoma grown in nude mice.

Exp. Cell. Biol. 50, 216-221.

Wolf H., 1973.

Avilamycin, an inhibitor of the 30 S ribosomal subunits function.

F.E.B.S. Lett. 36, 181-6.

Yuhas J.M., Pazmino N.H., 1974.

Inhibition of subcutaneously growing line 1 carcinomas due to metastatic spread.

Cancer Res. 34, 2005-2010.

9. Anhang

9.1. Versuchsanordnungen

9.1.1. Versuchsanordnungen Lokalisationsversuche zu Kapitel 3.7.

Versuchsanordnung Tumorquartett I (Versuchsnummern K399 bis K402)

Gruppe 1 (n = 6)

vorne links: vorne rechts:
MAXF 401 MEXF 989
hinten links: hinten rechts:
CXF 280 LXFL 529

Gruppe 2 (n = 6)

vorne links: vorne rechts:
LXFL 529 MAXF 401
hinten links: hinten rechts:
MEXF 989 CXF 280

Gruppe 3 (n = 6)

vorne links: vorne rechts:
CXF 280 LXFL 529
hinten links: hinten rechts:
MAXF 401 MEXF 989

Gruppe 4 (n = 6)

vorne links: vorne rechts:
MEXF 989 CXF 280
hinten links: hinten rechts:
LXFL 529 MAXF 401

Versuchsanordnung Tumorquartett II (Versuchnummern K 102 bis K105)

Gruppe 1 (n = 4)

vorne links: vorne rechts:
OVXF 899 XF 575
hinten links: hinten rechts:
RXF 944LX MAXF MX 1

Gruppe 2 (n = 4)

vorne links: vorne rechts:
RXF 944LX OVXF 899
hinten links: hinten rechts:
MAXF MX 1 XF 575

Gruppe 3 (n = 4)

vorne links: vorne rechts:
MAXF MX 1 RXF 944LX
hinten links: hinten rechts:
XF 575 OVXF 899

Gruppe 4 (n = 4)

vorne links: vorne rechts:
XF 575 MAXF MX 1
hinten links: hinten rechts:
OVXF 899 RXF 944LX

Versuchsanordnung Tumorquartett III (Versuchnummern K119 bis K122)

Gruppe 1 (n = 4)

vorne links: vorne rechts:
LXFA 629 PAXF 736
hinten links: hinten rechts:
BXF 1299 GXF 251

Gruppe 2 (n = 4)

vorne links: vorne rechts:
BXF 1299 LXFA 629
hinten links: hinten rechts:
GXF 251 PAXF 736

Gruppe 2 (n = 4)

vorne links: vorne rechts:
GXF 251 BXF 1299
hinten links: hinten rechts:
PAXF 736 LXFA 629

Gruppe 4 (n = 4)

vorne links: vorne rechts:
PAXF 736 GXF 251
hinten links: hinten rechts:
LXFA 629 BXF 1299

9.1.2. Versuchsanordnungen Doppelimplantationen zu Kapitel 3.8.

Versuchsanordnung: Doppelkombinationen der Xenografts aus Tumorquartett I
(Versuchsnummern K155 bis K158)

	<i>Gruppe 1 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
LXFL 529/13N9		MAXF 401/28N14
	<i>Gruppe 2 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
MAXF 401/28N14		CXF 280/25N16
	<i>Gruppe 3 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
CXF 280/25N16		MEXF 989/18N5
	<i>Gruppe 4 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
LXFL 529/13N9		CXF 280/25N16
	<i>Gruppe 5 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
MEXF 989/18N5		LXFL 529/13N9
	<i>Gruppe 6 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
MEXF 989/18N5		MAXF 401/28N14

Versuchsanordnung: Doppelkombinationen der Xenografts aus Tumorquartett II
(Versuchnummern K 108 bis K 111)

Reproduktion Gruppe 6 Versuchsnummern K153 + K154 (n = 5)

	<i>Gruppe 1 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
RXF 944LX/25N11		OVXF 899/44N19
	<i>Gruppe 2 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
RXF 944LX/25N11		MAXF MX 1/26N14
	<i>Gruppe 3 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
RXF 944LX/25N11		XF 575/12N8
	<i>Gruppe 4 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
OVXF 899/44N19		MAXF MX 1/26N14
	<i>Gruppe 5 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
OVXF 899/44N19		XF 575/12N8
	<i>Gruppe 6 (n = 4)</i>	
<u>links</u>		<u>rechts</u>
XF 575/12N8		MAXF MX 1/26N14

Versuchsanordnung: Doppelkombinationen der Xenografts aus Tumorquartett III
(Versuchsnummern K436 bis K439)

<i>Gruppe 1 (n = 5)</i>	
<u>links</u>	<u>rechts</u>
PAXF 736/28N25	GXF 251/21N12
<i>Gruppe 2 (n = 5)</i>	
<u>links</u>	<u>rechts</u>
PAXF 736/28N25	LXFA 629/20N13
<i>Gruppe 3 (n = 5)</i>	
<u>links</u>	<u>rechts</u>
PAXF 736/28N25	BXF 1299/27N15
<i>Gruppe 4 (n = 5)</i>	
<u>links</u>	<u>rechts</u>
GXF 251/21N12	LXFA 629/20N13
<i>Gruppe 5 (n = 5)</i>	
<u>links</u>	<u>rechts</u>
GXF 251/21N12	BXF 1299/27N15
<i>Gruppe 6 (n = 5)</i>	
<u>links</u>	<u>rechts</u>
LXFA 629/20N13	BXF 1299/27N15

9.1.3. Einzelheiten der Standardchemotherapieversuche zu Kapitel 3.9.1.

Versuchsplan Tumorquartett I

Versuchsnummer:

Xenografts:

K 266	MAXF 401 / 19N5
K 267	MEXF 989 / 24N11
K 268	CXF 280 / 31N22
K 269	LXFL 529 / 19N5

Gruppe	Substanz	Dosis	Schedule	Applikation	n	Lösungs- mittel
1	NaCl 0.9%	10 ml/kg	0,7,14	i.p.	7	
2	ADR	8 mg/kg	0,14	i.v.	5	NaCl 0.9%
3	VIND	1.5 mg/kg	0,7,14	i.v.	5	NaCl 0.9%
4	5-FU	100 mg/kg	0,7,14	i.p.	5	Klin.Form.
5	CY	200 mg/kg	0,14	i.p.	5	NaCl 0.9%

ADR: Adriamycin; VIND: Vindesine; 5-FU: %- Fluoruracil; CY: Cyclophosphamid
i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenös; Klin. Form.: Fertigarzneimittel wurde verwandt
Applikation: Weg der Verabreichung; Schedule: Therapieschema (Behandlungstage)

Versuchsplan Tumorquartett II

<u>Versuchsnummer:</u>	<u>Xenografts:</u>
K 114	RXF 944LX / 26N12
K 115	OVXF 899 / 45N20
K 116	MAXF MX 1 / 27N15
K 117	XF 575 / 13N9

Gruppe	Substanz	Dosis	Schedule	Applikation	n	Lösungs- mittel
1	NaCl 0.9%	10 ml/kg	0,7,(14)	i.p.	6	
2	ADR	8 mg/kg	0,(14)	i.v.	5	NaCl 0.9%
3	5-FU	100 mg/kg	0,7,(14)	i.p.	5	Klin.Form.
4	PLAT	6mg/kg	0,(14)	i.p.	5	Aqua dest.
5	VIND	1.5 mg/kg	0,7,(14)	i.v.	5	NaCl 0.9%

ADR: Adriamycin; VIND: Vindesine; 5-FU: %- Fluoruracil; PLAT: Cisplatin
i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenös; Klin. Form: Fertigarzneimittel wurde verwendet
Applikation: Weg der Verabreichung; Schedule: Therapieschema (Behandlungstage)

Versuchsplan Tumorquartett III

<u>Versuchsnummer:</u>	<u>Xenografts:</u>
K 385	PAXF 736 / 26N23
K 386	GXF 251 / 19N10
K 387	LXFA 629 / 18N11
K 388	BXF 1299 / 25N23

Gruppe	Substanz	Dosis	Schedule	Applikation	n	Lösungs- mittel
1	NaCl 0.9%	10 ml/kg	0,7,14	i.p.	7	
2	ADR	4 mg/kg	0,14	i.v.	5	NaCl 0.9%
3	5-FU	100 mg/kg	0,7,14	i.p.	5	Klin.Form.
4	CY	200 mg/kg	0,14	i.p.	5	NaCl 0.9%
5	VIND	1.5 mg/kg	0,7,14	i.v.	5	NaCl 0.9%

ADR: Adriamycin; VIND: Vindesine; 5-FU: %- Fluoruracil; CY: Cyclophosphamid
i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenös; Klin. Form: Fertigarzneimittel wurde verwendet
Applikation: Weg der Verabreichung; Schedule: Therapieschema (Behandlungstage)

9.1.4. Einzelheiten zu den Naturstoffversuchen (Beispiel) zu Kapitel 3.9.2.:

Versuchsnummer:

Xenografts:

K216

RXF 944LX / 22N9

K217

OVXF 899 / 45N20

K218

MAXF MX 1 / 29N15

K219

XF 575 / 17N13

Gruppe	Substanz	Dosis (mg/kg)	Schedule	Applikation	n	Lösungsmittel
1	Kontrolle	10 ml/kg	0,4,8	i.p.	4	NaCl0.9% +Tween 80 0.05%
2	Naturstoff 1	0.01	0,4,8	i.p.	2	NaCl0.9% +Tween 80 0.05%
3	“	0.1	0,4,8	i.p.	2	“
4	“	0.3	0,4,8	i.p.	2	“
5	Naturstoff 2	0.01	0,4,8	i.p.	2	“
6	“	0.1	0,4,8	i.p.	2	“
7	Naturstoff 3	1	0,4,8	i.p.	1	“
8	“	3	0,4,8	i.p.	1	“
9	“	6	0,4,8	i.p.	2	“
10	Naturstoff 4	1	0,4,8	i.p.	1	“
11	“	3	0,4,8	i.p.	1	“
12	“	10	0,4,8	i.p.	2	“
13	Naturstoff 5	5	0,4,8	i.p.	1	“
14	“	10	0,4,8	i.p.	2	“
15	Naturstoff 6	10	0,4,8	i.p.	1	“
16	“	20	0,4,8	i.p.	2	“

i.p.: intraperitoneal; Applikation: Weg der Verabreichung; Schedule: Therapieschema (Behandlungstage)

9.2. Histologische Präparation

9.2.1. Gebrauchsmaterialien und Geräte

Entwässerungsautomat Leica TP 1050	Leica Instruments GmbH Nussloch, Germany
Mikrotom Leica RM 2135	„
Einbettkassetten	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger (geputzt, gebrauchsfertig 76 x 26mm)	„
PBS (Phosphate Buffered Sodium)	GibcoBRL, Schottland
Formaldehydlösung mind. 36.5%	Sigma-Aldrich, Laborchemikalien GmbH D-30926 Seelze
Paraplast Plus ^R	Sherwood Medical Co. St.Louis MO. USA
Ethanol 100% (reinst)	Merck KG a A 64271 Darmstadt, Germany
Propanol 100% (reinst)	„
Xylol Isomerengemisch (reinst)	„
Hämatoxylin II nach Gill	„
Accustain ^R	Sigma Diagnostics
Eosin Y Solution Alcoholic	St.Louis MO. USA

Das 10% gepufferte Formalin wurde aus 361.5 ml PBS und 138.5 ml Formaldehydlösung mind. 36.5% hergestellt.

Aqua demin. wurde in der hauseigenen Millipor^R Wasseraufbereitungsanlage aus Leitungswasser produziert.

Aus den Stammlösungen der Alkohole wurden mit Aqua demin. die entsprechend konzentrierten Verdünnungen hergestellt.

9.2.2. Verfahren

I Probeentnahme

Nach der Tötung der Versuchstiere wurden die subkutan gewachsenen Xenografts chirurgisch entfernt und in einem je nach Größe der Probe ausreichenden Volumen 10%igem gepuffertem Formalin in Kunststoffgefäßen fixiert.

Nach der Fixation wurden die Tumoren in passende Gewebestücke zurechtgeschnitten (möglichst große Anschnittfläche der Tumorkapsel mit vitalem Gewebe) und in Einbettkassetten verbracht. Bis zur Weiterverarbeitung verblieben die Einbettkassetten in Formalin.

II Paraffinverfahren

Im Entwässerungsautomaten wurden die fixierten, wasserhaltigen Gewebeproben in paraffindurchtränkte Gewebestücke überführt. Im einzelnen erfolgte dies in folgenden Schritten:

1. Entwässern durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 50% - 96%, Propanol)
2. Überführen in Intermedium (Xylol)
3. Penetration des Gewebes mit geschmolzenem Paraffin

Aus den so bearbeiteten Proben wurden Gewebe-Paraffinblöcke hergestellt.

Hierzu wurden die Gewebestücke mit warmem, flüssigem Paraffin in Metallförmchen gegeben und hier orientiert und fixiert. Anschließend wurde das Paraffin zum Erkalten gebracht.

III Anfertigung der Gewebeschnitte

Nach Erkalten der Gewebe-Paraffinblöcke wurden mit dem Mikrotom 2-3 µm dicke Schnitte angefertigt und im Wasserbad auf beschrifteten Objektträgern montiert.

Die Objektträger wurden in Färbegestellen plaziert und im Brutschrank getrocknet.

IV Rehydratation des Gewebes

Die 2-3 µm dicken, auf den Objektträgern montierten Gewebeproben wurden durch absteigende Alkoholreihen (Xylol I+II, Propanol, Ethanol 96%, 70%, 50%, Aqua dest.) entparaffiniert und rehydriert.

V Färbung der Präparate

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung wurde durch manuelles Verbringen der Präparate in folgende Chemikalien für die jeweils angegebene Zeit hergestellt:

- | | | | |
|----------------------|-------------------|----------------|--------|
| 1. Hämatoxylin | 8 min. | 7. Ethanol 96% | 1 min. |
| 2. Leitungswasser I | 8 min. | 8. Propanol I | 1 min. |
| 3. Leitungswasser II | 8 min. | 9. Propanol II | 1 min. |
| 4. Eosin | 1.5 min | 10. Xylol I | 1 min. |
| 5. Ethanol 70% | } je kurz tauchen | 11. Xylol II | 1 min. |
| 6. Ethanol 70% | | | |

Nach Trocknung der Schnitte wurden durch Versiegeln der gefärbten Gewebestücke mit Deckgläsern auf dem Objektträger Dauerpräparate hergestellt.

9.3. Kriterien zur vorzeitigen Tötung der Versuchstiere vor dem planmäßigen Versuchsende

(Abbruchkriterien der ATBW – Arbeitsgemeinschaft der Tierschutzbeauftragten in Baden-Württemberg)

1. Tumorgröße mehr als 1,8 cm Durchmesser bei einem Tumor pro Tier, 1,5 cm Durchmesser bei zwei Tumoren pro Tier und 1,2 cm Durchmesser bei vier Tumoren pro Tier
2. Ulzerierender Tumor
3. Gewichtsverlust des Tieres von mehr als 20 % gegenüber dem Ausgangsgewicht
4. Apathie
5. Auffallende Aggressivität beim Palpieren der Tumoren als Zeichen starker Schmerzen
6. Deutlich verminderte Futter- oder Wasseraufnahme
7. Motorische Ausfallserscheinungen
8. Abnorme Körperhaltung
9. Auffällige Atemstörungen

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an lebenden Wirbeltieren nach §8 des Tierschutzgesetzes in der Bekanntmachung der Neufassung vom 25. Mai 1998 ausgestellt vom Regierungspräsidium Freiburg: Registriernummer G-01/29.

Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Dr. M. Reinacher für umfangreiche Korrekturlesungen, sein Interesse und sehr angenehme, konstruktive wissenschaftliche Gespräche.

Prof. Dr. H. H. Fiebig für die Überlassung des Themas, jederzeitige Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und zwei angenehme Jahre in seinem Institut.

Frau PD Dr. A. M. Burger für die sehr gute Betreuung und für umfangreiche Hilfestellungen bei der Durchführung der Arbeit und während des Zusammenschreibens.

Frau Sandra Kissel, Frau Veronika Jung und Frau Elke Simon für die gründliche Einarbeitung in die experimentellen Techniken, für Ihre Hilfsbereitschaft und ein freundschaftliches Arbeitsklima.

Frau Elke Tettling für die gründliche Einarbeitung in die histologischen Techniken und für die tatkräftige Unterstützung bei den histologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. Armin Meier für die Hilfe bei der Naturstoffrecherche und die Lösung mancher Computerprobleme.

Frau Hildegard Willmann für die stets freundliche Unterstützung bei EDV Fragen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Eltern, die mich in allen beruflichen und sonstigen Belangen stets unterstützen, bei meinen Freunden und allen Mitarbeitern der Instituts für Experimentelle Onkologie für eine sehr angenehme Zeit in Freiburg bedanken.