

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Mammatumoren sind beim Hund eine der wichtigsten Tumorerkrankungen, die gewisse Parallelen zur entsprechenden Erkrankungen des Menschen aufweisen. Trotz der bisher allgemein üblichen chirurgischen Exstirpation und der Anwendung verschiedener adjuvanter Therapiemaßnahmen, rezidivieren maligne Mammatumoren des Hundes häufig, weshalb die Überlebenszeiten für diese Patienten unbefriedigend sind.

Es war daher das Ziel der vorliegenden Arbeit, eine zuverlässige in vitro Methode zur Chemosensitivitätstestung kultivierter Mammatumoren des Hundes zu entwickeln. In diesem Modell sollte die in vitro Wirksamkeit der Chemotherapeutika Carboplatin, Cisplatin und Doxorubicin gegenüber Adenokarzinomen, soliden Karzinomen und malignen Mischtumoren der Mamma der Hündin geprüft werden.

Hierzu wurden Zellkulturen von 30 caninen Mammatumoren angelegt, die nach ihrem histologischen Typ in die 3 Tumorgruppen (Adenokarzinom, solides Karzinom, maligner Mischtumor) unterteilt wurden.

Ein Vergleich zweier verschiedener Gewebeaufarbeitungsmethoden zeigte, daß die Kombination aus mechanischen und enzymatischen Dissoziationsverfahren die effektivste Technik darstellt, um vitale, teilungsfähige Mammatumorzellen des Hundes zu gewinnen. Mit dieser Methode ließen sich von allen Tumorproben ausreichend Zellen für die umfangreiche Chemosensitivitätstestung anzuzüchten.

Die Proliferationsrate der verschiedenen Tumorkulturen in den drei Tumorgruppen variierten jedoch deutlich. Dabei ließ sich statistisch kein Zusammenhang zur Endzellzahl und Verdopplungsfaktor der Kultur, bezogen auf eine Tumorgruppe, aufzeigen. Es ist damit innerhalb der histologisch klassifizierten Gruppen mit individuellen Proliferationsaktivitäten zu rechnen.

Der epitheliale Charakter der kultivierten Mammatumorzellen wurde durch den Nachweis von Cytokeratin-Antikörpern belegt. Eine Vimentinexpression konnte ebenfalls festgestellt werden. Dadurch muß auch eine mesenchymale Komponente

der Kulturen mit berücksichtigt bzw. eine Koexpression von Vimentin und Cytokeratin von epithelialen Zellen angenommen werden

Mit Hilfe des Tetrazoliumsalz-WST-1-, des DNA- und des Laktatdehydrogenase-Assays konnte der konzentrations- und zeitabhängige Verlauf der Chemosensitivität der Kulturen gegenüber Carboplatin, Cisplatin und Doxorubicin präzise dokumentiert werden

Aufgrund der ausgeprägten Eigenextinktion von Doxorubicin mußten bei den mit dieser Substanz behandelten Kulturen die Meßwerte des WST-1-Assays korrigiert werden.

Ein Vergleich der *in vitro* Wirksamkeit der verwendeten Chemotherapeutika an caninen Mammatumorzellen zeigte, daß Doxorubicin einen wesentlich stärkeren inhibitorischen Effekt als Carboplatin und Cisplatin aufwies

Wurden Carboplatin und Cisplatin mit der hier vorgestellten Methode verglichen, so war deren Wirksamkeit etwa gleich.

Es fielen jedoch auch deutliche individuelle Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber den getesteten Chemotherapeutika auf. Dies verlangt nach einer Einzelbetrachtung bzw. der individuellen Prüfung des jeweiligen Tumors unabhängig von der Histogenese

Der Vergleich der *in vitro* Sensitivität der Tumorgruppen ließ dagegen keinen durchgehenden Unterschied erkennen. Vor allem bei Substanzkonzentrationen, die vergleichbar sind mit *in vivo* Plasmaspiegeln, war die Chemosensitivität der Tumorgruppen vergleichbar.

Die mittleren wirksamen Konzentrationen (MWK) zeigten für die Substanzen Carboplatin und Doxorubicin eine gute Korrelation zu den entsprechenden Blutspiegeln beim Patienten nach therapeutischen Dosierungen. Bei Cisplatin dagegen lagen die MWK-Werte lediglich in etwa der Hälfte der Fälle in therapeutischen Konzentrationsbereichen.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Methode zur Kultivierung und Chemosensitivitätstestung von Mammatumoren des Hundes ist geeignet, unterschiedliche Chemotherapeutika in vitro in ihrer Wirksamkeit zu vergleichen.

Trotz vieler für die in vitro Chemosensitivitätstestung geltenden Einschränkungen, können mit Hilfe der in vitro Testung wertvolle Informationen zur Sensitivität und vor allem auch Resistenz von Tumoren gegenüber bestimmten Medikamenten gewonnen werden.

Die Relevanz der erhaltenen Ergebnisse für die in vivo Situation muß jedoch durch weitere Studien zur in vitro - in vivo Korrelation geprüft werden

Daniela Simon

In vitro investigation on chemosensitivity testing of canine malignant mammary gland tumors

VII. SUMMARY

Mammary gland tumors represent an important neoplastic disease in the dog and exhibit parallel characteristics to the pertaining disease in humans.

In spite of treatments such as surgical excision as well as various adjuvant therapeutic approaches, canine malignant mammary gland tumors are often characterized by high rates of recurrence and metastasis resulting in poor disease-free intervals and survival times of the patients.

It was therefore the aim of the present study to develop a reliable method for the in vitro cultivation and chemosensitivity testing of these tumors as a step towards the screening of further therapeutic modalities as well as the prediction of individual sensitivity or resistance patterns.

In addition, the in vitro effects of the chemotherapeutics carboplatin, cisplatin and doxorubicin towards these tumors were investigated

For this, cell cultures were established from samples of 30 canine mammary gland tumors. These tumors were divided into three groups according to their histologic type (adenocarcinoma, solid carcinoma and malignant mixed tumor).

The comparison of different tissue diagggregation methods showed that the combination of mechanical and enzymatic disassociation represents the most effective explant technique regarding a rapid gain of vital cells. The application of this method therefore contributed significantly to the cultivation of an adequate number of cells for the elaborate chemosensitivity testing to be performed

The rates of proliferation of the different tumor cultures varied substantially. However, no statistical correlation could be made between certain cell numbers or

doubling factors and a certain tumor group. The cultures, therefore, exhibited individual proliferation activities.

In the immun-histochemistry testing a positive reaction of different degrees towards the broad-spectrum cytokeratin antibodies was found in all cultures, thus confirming the epithelial character of the tumor cultures. A vimentin expression was also documented in all cases. Therefore, a certain mesenchymal component of the cultures must be considered. However, a coexpression of cytokeratins and vimentin by epithelial cells represents another possible explanation for this phenomenon.

The tetrazolium salt-WST-1-, DNA- and Lactatedehydrogenase-assays allowed a precise documentation of the concentration- and time-dependent course of the cell cultures' chemosensitivity towards carboplatin, cisplatin and doxorubicin.

Due to the substantial photometric extinction of doxorubicin, especially in higher concentration ranges, the measurement values of all doxorubicin treated cultures in the WST-1 assay had to be corrected pertinently in order to avoid alterations in the chemosensitivity results.

The statistical comparison of the chemotherapeutics' in vitro efficacy showed that doxorubicin exhibited a significantly stronger inhibitory effect than carboplatin and cisplatin in nearly all concentrations tested. In contrast, the anti-tumor effects of carboplatin and cisplatin were comparable. Therefore, a similar efficacy of carboplatin and cisplatin could at least be confirmed for the in vitro situation of canine mammary gland tumors.

However, a clear variation in the sensitivity reactions of the tumor cultures could also be documented. Thus, substantial individual sensitivity and resistance patterns of these tumors had to be considered.

The comparison of the sensitivity of the three tumor groups towards the tested drugs showed no consistent difference between the three histologic types. Especially in concentration ranges that possess a certain in vivo relevance the exhibited chemosensitivities were similar in the tumor groups.

The medium effective concentrations (MEC) of carboplatin and doxorubicin exhibited a good correlation to those plasma concentrations that are attainable with therapeutic drug dosages in vivo. Only half of the MEC-values of cisplatin were found to be in the area of plasma concentrations that can be reached with therapeutic dosages in the dog.

The presented method for the in vitro cultivation and chemosensitivity testing of canine mammary gland tumors can be considered as a promising approach to developing further adjuvant therapeutic modalities.

In spite of numerous restrictions, in vitro drug sensitivity testing may render valuable information on sensitivity patterns of tumors. Especially in face of increasing problems with multiple drug resistance in neoplastic conditions, the detection and prediction of tumor resistance patterns is of great importance for therapeutic decision-making

The relevance of the presented in vitro chemosensitivity results for the in vivo situation must, however, be examined by further studies on in vitro - in vivo correlations.