

Aus dem  
Med. Zentrum für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde  
der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor:  
Prof. Dr. med. J. A. Werner

Titel der Dissertation:  
**Untersuchungen zum Lymphabfluss und zur lymphogenen Metastasierung von im  
Bereich der Ohrmuschel bei weißen Neuseelandkaninchen induzierten  
VX2-Karzinomen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Sibylle Plehn**

aus Neuwied

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
am 03.04.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch  
Referent: Prof. Dr. J. A. Werner  
Korreferent: Prof. Dr. L. Flores-de-Jacoby

## **Inhalt**

### **1 Einleitung**

### **2 Fragestellung**

### **3 Material und Methode**

#### 3.1 Tiere

#### 3.2 Lymphographie

#### 3.3 Tumorzellen

##### *3.3.1 Ursprung*

##### *3.3.2 Intramuskuläre Passage und Präparation*

#### 3.4 Tumorimplantation

#### 3.5 Anästhesie und Tötung

#### 3.6 Makroskopische Untersuchung

#### 3.7 Histopathologische Untersuchung

### **4 Ergebnisse**

#### 4.1 Lymphographie

#### 4.2 Tumorwachstum

##### *4.2.1 Intramuskuläre Passage*

##### *4.2.2 Tumorimplantation im Bereich der Ohrmuschel*

#### 4.3 Lymphatische Metastasierung

#### 4.4 Lungenmetastasen

### **5 Diskussion**

### **6 Zusammenfassung**

- 7    Literatur**
- 8    Anhang**
- 9    Verzeichnis der akademischen Lehrer**
- 10   Danksagung**
- 11   Ehrenwörtliche Erklärung**

## 1 Einleitung

Der Anteil maligner Tumore des oberen Aerodigestivtraktes beträgt weltweit etwa 6% aller Krebserkrankungen. Unter den verschiedenen Tumorentitäten überwiegen im Bereich der oberen Luft- und Speisewege mit über 90% Plattenepithelkarzinome. Hinsichtlich der Inzidenz ist ein Altersgipfel in der 5. bis 7. Lebensdekade bekannt, wobei Männer etwa viermal häufiger als Frauen betroffen sind. Als äthiologische Faktoren gelten ein vermehrter Tabak- und Alkoholkonsum. Die Prognose von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs wird weniger durch die Größe des Primärtumors, als vielmehr durch das Ausmaß der Metastasierung bestimmt, die beim Plattenepithelkarzinom ganz überwiegend lymphogen erfolgt. Die immense prognostische Bedeutung einer lymphogenen Metastasierung wird an der teils drastischen Reduktion der 5-Jahres-Überlebensrate bei Vorliegen histologisch gesicherter Halslymphknotenmetastasen deutlich [67]. Trotz der stetigen Weiterentwicklung der Behandlungsstrategien konnte in den letzten beiden Jahrzehnten die Überlebensrate nur in begrenztem Maße verbessert werden [41]. Die Verbesserung ist weniger auf neue chirurgische Verfahren als vielmehr auf die Verbreitung der Radiochemotherapie zurückzuführen [40].

Die weiterhin notwendige Entwicklung neuer Therapieansätze setzt die genaue Kenntnis der Mechanismen der Tumorprogression und der hiermit einhergehenden lymphogenen Metastasierung voraus. Ein bereits etabliertes Tiermodell bezüglich des Verhaltens von Tumoren stellt unter anderem die Ratte dar. Entsprechend der Ergebnisse ausführlicher Untersuchungen zu deren Lymphgefäßsystem [66] und Topographie der Lymphknoten [35] ist sie als Tiermodell für Plattenepithelkarzinome des Menschen jedoch nur bedingt geeignet, da induzierte Plattenepithelkarzinome bei Ratten bevorzugt hämatogen metastasieren [59]. Demgegenüber zeichnet sich das sogenannte VX2-Karzinom beim weißen Neuseelandkaninchen durch eine dem humanen Plattenepithelkarzinom entsprechende lymphogene Metastasierung aus. Bei dem VX2-Karzinom handelt es sich um einen ausschließlich bei Kaninchen auftretenden, malignen Tumor. Das VX2-Karzinom stammt ursprünglich von einem virusinduzierten Hautpapillom ab [48], das sich später aufgrund einer spontanen

Transformation zu einem hochmalignen, anaplastischen und lymphogen metastasierenden Plattenepithelkarzinom weiterentwickelte [42].

Obgleich es eine Vielzahl von Untersuchungen zu an verschiedenen Lokalisationen (Ösophagus, Leber, Magen) induzierten VX2-Tumoren beim weißen Neuseelandkaninchen gibt, existieren keine Berichte über das zeitliche und topographische Muster der lymphogenen Metastasierung in die regionären Lymphknoten bei Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Die Erarbeitung dieser Fragestellung könnte dazu beitragen, ein Tiermodell zur Therapie im Kopf-Hals-Bereich lokalisierter Plattenepithelkarzinome zu entwickeln.

## **2 Fragestellung**

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Eignung des VX2-Karzinoms beim weißen Neuseelandkaninchen als Tiermodell zur Untersuchung der lymphogenen Metastasierung von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich zu überprüfen. Hierzu galt es folgende Arbeitsschritte auszuführen.

1. Erarbeitung eines reproduzierbaren Konzepts zur in vivo Reimplantation von VX2-Karzinomzellen beim weißen Neuseelandkaninchen
2. Herstellung einer transplantationsfähigen Vitalzellsuspension zur Induktion eines VX2-Ohrmuschelkarzinoms beim weißen Neuseelandkaninchen
3. Lymphographische Darstellung der Lymphabflusswege der Ohrmuschel beim weißen Neuseelandkaninchen
4. Lokalisation und zeitliche Abfolge der lymphogenen Metastasierung in die zervikofazialen Lymphknoten beim VX2-Ohrmuschelkarzinom des weißen Neuseelandkaninchens

### **3 Material und Methode**

Alle Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit der PHS, Policy on Human Care and Use Laboratory Animals, der NIH, Guide for Care and Use of Laboratory Animals sowie der Animal Welfare ACT (7. U.S.C. et seq.) durchgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden nach zuvor gestelltem Tierversuchsantrag beim zuständigen Regierungsdezernenten in Gießen bewilligt.

#### 3.1 Tiere

Die verwendeten Tiere stammten aus einer Kontrollgruppe der Behring Werke, Marburg. Es handelte sich um 30 gesunde, adulte (1/2-1 jährig), weibliche Iffa Credo/weiße Neuseelandkaninchen (ICO/NZW outbreed) mit einem Gewicht von ca. 2,5-3,5 kg. Sie wurden in 56 x 100 x 60 cm großen Einzelkäfigen (K99/30KU<sup>®</sup>, Ebeco, Castro-Rauxel, Deutschland) gehalten, mit Haltungsdiät-2020<sup>®</sup>-Pellets (Altromin, Lage, Deutschland) für Kaninchen und Leitungswasser ad libitum ernährt. Die Umgebungstemperatur wurde zwischen 18°C und 20°C gehalten, die relative Luftfeuchtigkeit betrug unreguliert ca. 70%. Der Tag/Nacht-Zyklus ergab sich während der Sommerzeit aus der Tageslichtstundenzahl, die zur Winterzeit durch zusätzliche elektrische weiße Beleuchtung auf ca. 12 h ergänzt wurde. Alle Untersuchungen wurden am Tag durchgeführt.

An 20 der insgesamt 30 Tiere wurde ausschließlich die Metastasierung von Ohrmuscheltumoren untersucht. Vier Tiere wurden sowohl für die Untersuchung des Metastasierungsverhaltens von Ohrmuscheltumoren als auch zur intramuskulären Passage verwendet. Bei 6 Tieren wurden durch intramuskuläre Passage Tumorzellen gewonnen und eine Lymphographie durchgeführt.



## 3.2 Lymphographie

Unter Anästhesie mit Ketaminhydrochlorid wurde bei 6 weißen Neuseelandkaninchen eine Farbstofflymphographie durchgeführt. Hierzu wurde 0,35-0,5 ml Methylenblau bei je zwei Tieren submukös bzw. subkutan im Bereich der Zunge, der Wangenschleimhaut und der Rückfläche der Ohrmuschel injiziert. Fünfzehn Minuten später wurden die Tiere mit T61<sup>®</sup> getötet und der Hals, wie nachfolgend unter Punkt 3.6 beschrieben, untersucht. Die Befundung umfasste die Beurteilung des Lymphabflusses mit makroskopischer Identifikation und Resektion der blau gefärbten Lymphknoten des entsprechenden Abflussgebietes sowie die exakte Dokumentation im Hinblick auf die Injektionsstelle.

## 3.3 Tumorzellen

### *3.3.1 Ursprung*

In Anlehnung an die Literatur wurde zur Tumorinduktion im Bereich der Ohrmuschel zunächst eine Vitalzellsuspension verwendet, die mit dem Verfahren der intramuskulären in vivo Reimplantation zur Induktion eines VX2-Karzinoms gewonnen wurde. Dieses Vorgehen begründet sich in der Beobachtung, dass in vitro kultivierte VX2-Zelllinien eine deutlich weniger aggressive Wachstumstendenz zeigen, als es für humane Plattenepithelkarzinome kennzeichnend ist und zudem die lymphogene Metastasierungstendenz unsicher bleibt [11; 59]. Die zur initialen Implantation verwendeten VX2-Karzinomzellen stammen von Prof. Dr. Robert J.J. van Es (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Medical Center Utrecht, Utrecht, Niederlande). Die zugrunde liegende in vivo VX2-Zelllinie wurde mehrfach erfolgreich in weiße Neuseelandkaninchen retransplantiert, die Vermehrung der Zellen als in vitro Kultur misslang [62]. Aufgrund dessen wurden die Tumorzellen über intramuskuläre Passage in den Hinterläufen von weißen Neuseelandkaninchen reproduziert.

### *3.3.2 Intramuskuläre Passage und Präparation*

Zur späteren Karzinominduktion mussten zunächst ausreichende Mengen einer tiefgefrorenen VX2-Vitalsuspension durch wiederholte Inokulation, Extraktion und Aufbereitung der VX2-Karzinome gewonnen werden. Die VX2-Zellsuspension der ersten Passage stammte wie zuvor erwähnt aus dem Labor von Prof. Dr. Robert J.J. van Es. Bei der Inokulation wurden 0,3 ml der bei Raumtemperatur langsam aufgetauten VX2-Zellsuspension mit  $10\text{-}20 \times 10^6$  vitalen Zellen/ml in die Hinterlaufmuskulatur von 6 Neuseelandkaninchen injiziert. Nach vierzehn Tagen wurden die Tiere durch Injektion von 0,3 ml T61<sup>®</sup> in die Ohrvene getötet, um die Tumore im Bereich der Hinterläufe zu gewinnen.

Für die Herstellung einer Vitalzellsuspension ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Tumorzellen von diesem Zeitpunkt an bis zur maximal 2 Stunden späteren Einimpfung permanent gekühlt werden. Zu diesem Zweck wurde das Tumorgewebe sofort nach der Entnahme in 0-4°C kaltes DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium<sup>®</sup>, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gegeben. In etwa 1 cm<sup>3</sup> großen Anteilen wurde der resezierte Tumor auf einer eisgekühlten Glasplatte mit einer Rasierklinge fein zerkleinert, vorsichtig durch ein Nylonsieb (Maschengröße: 300 µm) gestrichen und in eisgekühltem DMEM aufgefangen. Die Tumorzellmasse wurde mit kaltem DMEM gespült und über 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert, worauf der Überstand verworfen wurde. Die verbleibenden Tumorzellen wurden in einem zweiten Zyklus in DMEM resuspendiert und zentrifugiert. Das gewonnene Pellet aus Tumorzellen wurde erneut in kaltes DMEM aufgenommen und soweit verdünnt, bis eine zähflüssige Konsistenz erreicht war, die gerade eben eine Injektion mit einer 0,5 mm Venüle erlaubt. Eine Probe der Tumorzellsuspension wurde entnommen, um in der Zählkammer die Zellzahl zu bestimmen. Zur Abgrenzung vitaler gegenüber abgestorbener Zellen, wurden die abgestorbenen Zellen zuvor mit Trypan-Blau angefärbt. Anhand dieser Auszählung wurde die VX2-Zellsuspension auf eine Dichte von  $10\text{-}20 \times 10^6$  standardisiert.

Mit der VX2-Frischzellsuspension wurden, wie nachfolgend unter Punkt 3.4 beschrieben, VX2-Karzinome im Bereich der Ohrmuschel von weißen Neuseelandkaninchen induziert. Weiterhin wurde sie zur Tumorgewebebegewinnung erneut in die

beiden Hinterläufe weiterer 4 Neuseelandkaninchen injiziert. Der verbliebene Teil wurde zur späteren Applikation tiefgefroren. Vorbereitend zum Gefrieren, wurde das in der VX2-Zellsuspension enthaltende Medium durch eine Lösung, bestehend aus 70% DMEM, 20% FCS (Fetal Calf Serum<sup>®</sup>, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid<sup>®</sup>, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) als Gefrierschutzkomponente, ersetzt. In einem 'freezing container' wurde die Suspension über 24 h langsam heruntergekühlt und nachfolgend bei -80°C gelagert.

### 3.4 Tumorimplantation

Jeweils 0,1-0,25 ml VX2-Frischzellsuspension wurden an der Hinterfläche beider Ohrmuscheln von 24 weißen Neusselandkaninchen im unteren Drittel mittig zwischen zentraler Ohrarterie und lateralem Ohrmuschelrand mit einer 0,5 mm Kanüle subkutan appliziert. Vor Injektion der Tumorzellen wurde ein Luftdepot von ca. 5 x 5 mm gesetzt, um die dem Perichondrium fest aufsitzende Haut atraumatisch abzuheben. Die Tumorzellen konnten so mit geringem Druck in den Hohlraum injiziert werden, wobei der Anschliff der Venüle seitlich ausgerichtet wurde, damit die Kanülenöffnung nicht durch den Ohrmuschelknorpel blockiert wird. Diese moderate Injektionstechnik minimiert den passiven Rückfluss der Tumorzellsuspension durch die Einstichstelle und die akzidentielle Infusion von Tumorzellen in die Gefäße.

Das Tumorwachstum wurde täglich durch Vermessung mit einer Schieblehre dokumentiert. Insgesamt 20 Tiere wurden in Gruppen von jeweils 4 Kaninchen nach 7, 14, 21, 28 und 32 Tagen getötet. Vier weitere Tiere wurden nach erfolgloser Tumorinduktion im Bereich der Ohrmuschel der Gruppe zur Tumorgewinnung durch intramuskuläre Passage zugeordnet.

### 3.5 Anästhesie und Tötung

Die Lymphographie wurde unter Anästhesie durch eine i.m. Mischinjektion aus 60 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketavet<sup>®</sup>, Parke-Davis, Freiburg, Deutschland) und 6 mg/kg Xylazin (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen, Deutschland) durchgeführt. Die Tötung der Kaninchen erfolgte mit T61<sup>®</sup> (Hoechst Veterinär GmbH, München, Deutschland).

### 3.6 Makroskopische Untersuchung

Sowohl die 24 Tiere mit Ohrmuschelkarzinomen, als auch die 6 Kaninchen, bei denen zuvor unter Anästhesie eine Lymphographie durchgeführt wurde, wurden mit T61<sup>®</sup> getötet. Die Lymphknoten des regionären Lymphabflussgebietes wurden, wie nachfolgend ausführlich beschrieben, seitengetreunt entsprechend ihrer Topographie (Abb. 1,2) für die pathohistologische Aufarbeitung entnommen, ebenso die vorhandenen Primärtumoren.

Zunächst wurden die Kaninchen im Bereich des Halses rasiert. Anschließend wurde ein Hautschnitt bogenförmig vom Hinterrand der Ohrwurzel entlang der ventralen Spitze der Spina scapula bis zum mittleren Anteil der Clavicula geführt. Danach erfolgte die Präparation des Hautlappens mit Freilegung des M. trapezius, Pars cervicalis, mit der Fascia cervicalis und der Gl. parotis mit der ihr aufliegenden Fascia parotidea. Der unterhalb der Fascia parotidea in der Gl. parotis dorsal der V. auricularis caudalis lokalisierte Ln. parotideus konnte makroskopisch leicht identifiziert und herauspräpariert werden.

Die zwischen oberflächlichem und tiefem Blatt der Fascia cervicalis in der Aufzweigung der V. jugularis externa in die V. maxillaris und die V. linguofacialis gelegenen Lnn. mandibulares caudales wurden zunächst palpatorisch identifiziert und nachfolgend freipräpariert.

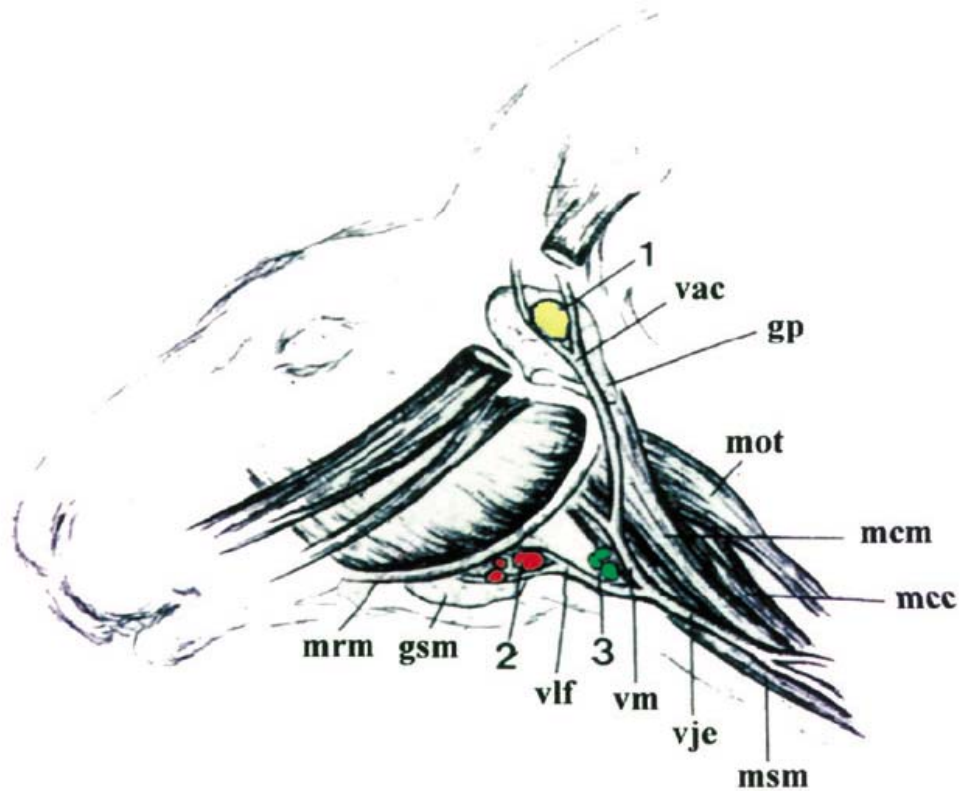


Abb.1 Topographie der zervikofazialen Lymphknoten im Kopf-Hals-Bereich beim weißen Neuseelandkaninchen

- |     |  |
|-----|--|
| 1   | <i>Lymph nodus parotideus</i>            |
| 2   | <i>Lymph nodi mandibulares caudales</i>  |
| 3   | <i>Lymph nodi mandibulares rostrales</i> |
| gp  | <i>Glandula parotis</i>                  |
| gsm | <i>Glandula submandibularis</i>          |
| vac | <i>Vena auricularis caudalis</i>         |
| vje | <i>Vena jugularis externa</i>            |
| vm  | <i>Vena maxillaris</i>                   |
| vlf | <i>Vena linguofacialis</i>               |
| mot | <i>Musculus omotransversarius</i>        |
| mcm | <i>Musculus cleidomastoideus</i>         |
| mcc | <i>Musculus cleidocephalus</i>           |
| msm | <i>Musculus sternomastoideus</i>         |
| mrm | <i>Musculus retractor mandibulae</i>     |

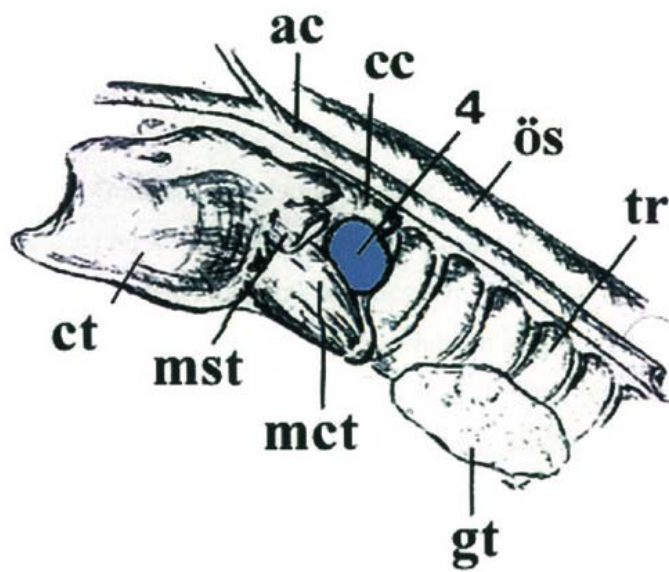


Abb. 2 Topographie des paratrachealen Lymphknoten beim weißen Neuseelandkaninchen

4	<i>Lymph nodus paratrachealis</i>
gt	<i>Glandula thyroidea</i>
ac	<i>Arteria carotis</i>
ös	<i>Ösophagus</i>
tr	<i>Trachea</i>
ct	<i>Cartilago thyroideus</i>
cc	<i>Cartilago cricoideus</i>
mst	<i>Musculus sternothyroideus</i>
mct	<i>Musculus cricothyroideus</i>

Zur Darstellung der Lnn. mandibulares rostrales musste das oberflächliche Blatt der Fascia cervicalis vom Unterrand des M. retractor mandibulae abgelöst werden. Sie liegen am dorsalen Pol der Gl. submandibularis unterhalb der Abzweigung der V. submentalis von der V. linguofacialis zwischen dem M. digastricus und dem M. retractor mandibulae.

Nach Freilegung der Gefäßscheide durch Lateralisierung des M. omotransversarius, des M. cleidomastoideus und des M. cleidocephalus konnten die Lnn. paratracheales, sofern sie nur gering vergrößert waren, lateral des Ringknorpels in der ihn umgebenden Faszie bzw. bei fortgeschrittener Größenzunahme zunehmend nach medial in die Gefäßscheide verdrängt, lokalisiert und entnommen werden. Abschließend wurden die Primärtumore der Ohrmuschel im Verband mit dem angrenzenden Knorpel bzw. der bedeckenden Haut und einem Sicherheitsabstand von mindestens 4 mm im Gesunden reseziert.

Bei allen Tieren wurden die Primärtumoren und die dargestellten Lymphknoten zunächst in situ fotodokumentiert und nach der Entnahme mit einer Schieblehre vermessen. Primärtumor und resezierte Lymphknoten wurden seitengetreunt zur pathohistologischen Beurteilung, wie unter Punkt 3.7 beschrieben, aufgearbeitet. Zusätzlich erfolgte zur Abklärung einer möglichen pulmonalen Metastasierung die Entnahme der Lungen von den 4 Tieren mit 32-tägigem Tumorwachstum.

### 3.7 Histopathologische Untersuchung

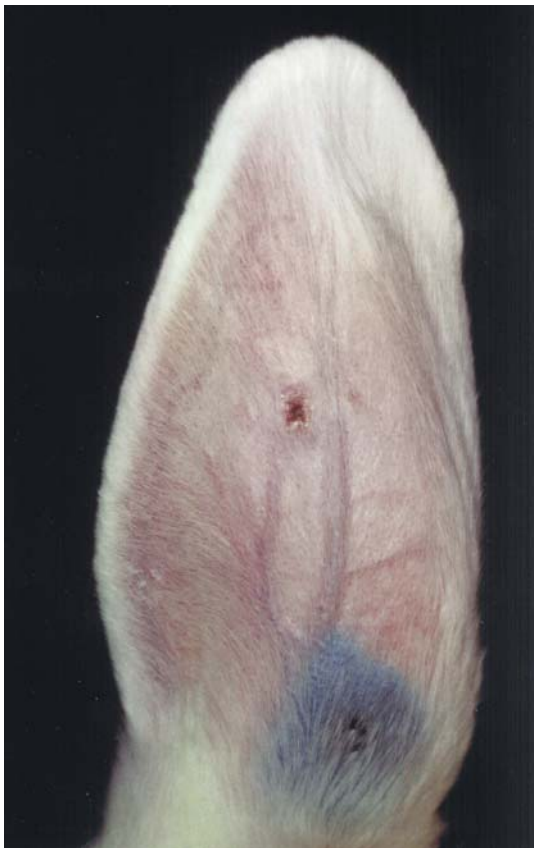
Die zur histologischen Untersuchung entnommenen Gewebeproben und Lymphknoten wurden für 48 h in 4%iger Formalinlösung fixiert, in Alkoholreihe und Rotohistol entwässert. Nach Einbettung in Paraffin wurden von den Präparaten Schnitte (3 µm) hergestellt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die histopathologische Beurteilung erfolgte durch Frau Dr. Annette Ramaswamy, Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Lymphographie

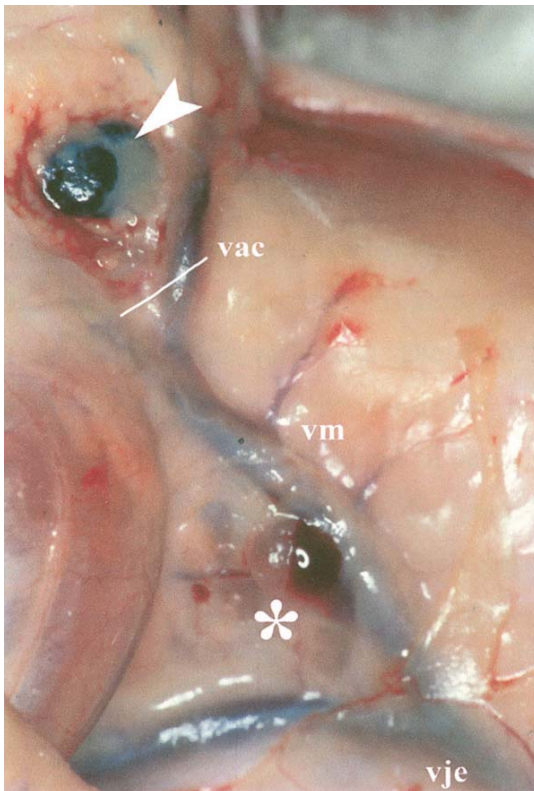
Fünfzehn Minuten nach der Farbstoffinjektion wurden die Lnn. parotidei, Lnn. mandibulares caudales, Lnn. mandibulares rostrales und die Lnn. paratracheales entnommen und auf unterschiedliche Anreicherung des blauen Farbstoffs untersucht.

Bei Injektion in die Rückfläche der Ohrmuschel mittig zwischen lateralem Ohrmuschelrand und zentraler Ohrmuschelarterie im cranialen Abschnitt des unteren Ohrmuscheldrittels, wies bei beiden Tieren der parotideale, erstdrainierende Lymphknoten ebenso wie der mandibulär caudale, zweitdrainierende Lymphknoten eine intensive Blaufärbung auf (Abb. 3,4). Die Lnn. mandibulares rostrales und die Lnn. paratracheales blieben makroskopisch farbstofffrei.



*Abb. 3 Farbstofflymphographie.  
Injektionsort im Bereich der Ohrmuschel*





*Abb. 4 Farbstofflymphographie.  
Es zeigt sich eine intensive Blaufärbung  
des erstdrainierenden parotidealen  
Lymph-knotens (Pfeil) sowie der  
sekundären mandibulär caudalen  
Lymphknoten-station (Stern). vac =  
Vena auricularis caudalis; vm = Vena  
maxillaris; vje = Vena jugularis externa*

Die vier Tiere mit Injektion im Bereich der Wangenschleimhaut oder Zunge zeigten durch eine intensive Blaufärbung die Lnn. mandibulares rostrales als erstdrainierende Lymphknotenstation und die mandibulär caudalen Lymphknoten als zweitdrainierende Lymphknotenstation. Die Lnn. parotidei und die Lnn. paratracheales färbten sich bei Farbstofflymphographie der Wangenschleimhaut und Zunge nicht an.

## 4.2 Tumorwachstum

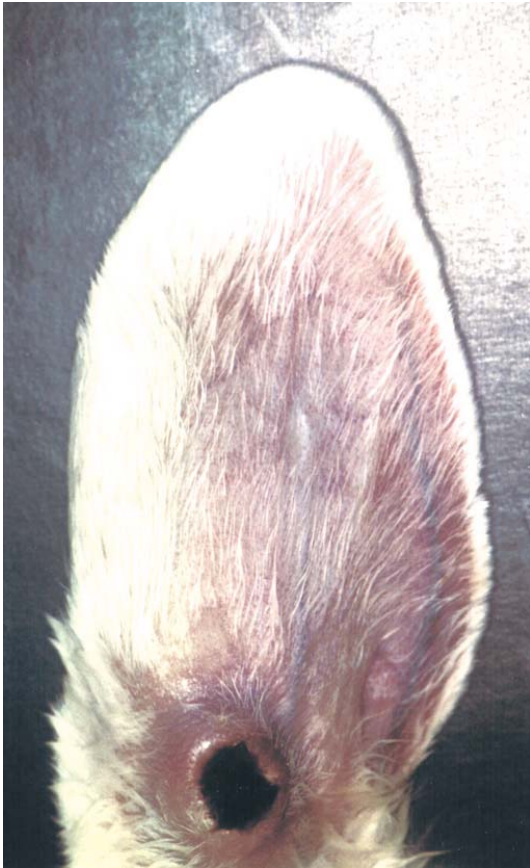
### *4.3.1 Intramuskuläre Passage*

Bei 4/10 Tieren kam es nach Injektion der VX2-Zellsuspension in die Hinterlaufmuskulatur zu einer beidseitig erfolgreichen Tumorinduktion. Bei 5 Tieren zeigte sich ein einseitiges, bei einem Tier kein makroskopisch feststellbares Tumorwachstum.

Unter den 7 Injektionsstellen mit ausbleibendem Tumorwachstum fand sich in 4 Fällen eine Abkapselung der Tumorzellen, die makroskopisch verhärtet erschien und mikroskopisch nahezu ausschließlich aus devitalen Tumorzellen bestand. In den übrigen 3 Fällen war makroskopisch kein Anzeichen für die 14 Tage zuvor erfolgte Tumorzellinjektion vorhanden. Die nach 14 Tagen entnommenen Tumore zeigten in 4/13 Fällen bei einer Größe von 61 cm<sup>3</sup> bis 84 cm<sup>3</sup> ausgeprägte zentrale Nekrosen und enthielten einen zu hohen Anteil an devitalen Tumorzellen, um sie zur Tumorinduktion verwenden zu können. Neun der entnommenen Tumore wiesen bei einer Größe zwischen 15 cm<sup>3</sup> und 36 cm<sup>3</sup> multiple nekrotische Einschmelzungen bis zu 1,5 mm auf und waren zur Herstellung einer Vitalzellsuspension geeignet.

#### *4.2.2 Tumorimplantation im Bereich der Ohrmuschel*

Die Injektion der VX2-Zellsuspension führte bei 20 von 24 Tieren zu einem Tumorwachstum (Abb. 5) im Bereich beider Ohrmuscheln (Erfolgsrate 83%). Sieben Tage nach Tumorimplantation betrug die mittlere Tumorgöße 2,36 cm<sup>2</sup>, nach 14 Tagen 3,68 cm<sup>2</sup>, nach 21 Tagen 8,06 cm<sup>2</sup> und 28 Tagen später 13,28 cm<sup>2</sup>. Nach diesem Zeitraum begannen 3/8 Ohrtumore zu ulzerieren. Die mittlere Tumorgöße nach 32 Tagen lag bei 20,45 cm<sup>2</sup> (Tab. 1, s. Anhang). Die Tumore der letztgenannten Gruppe waren zu diesem Zeitpunkt alle soweit ulzeriert, dass rezidivierende Arrosionsblutungen die Folge waren. In Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten erfolgte die Tötung der Tiere daraufhin bereits am 32. Tag post injectionem.

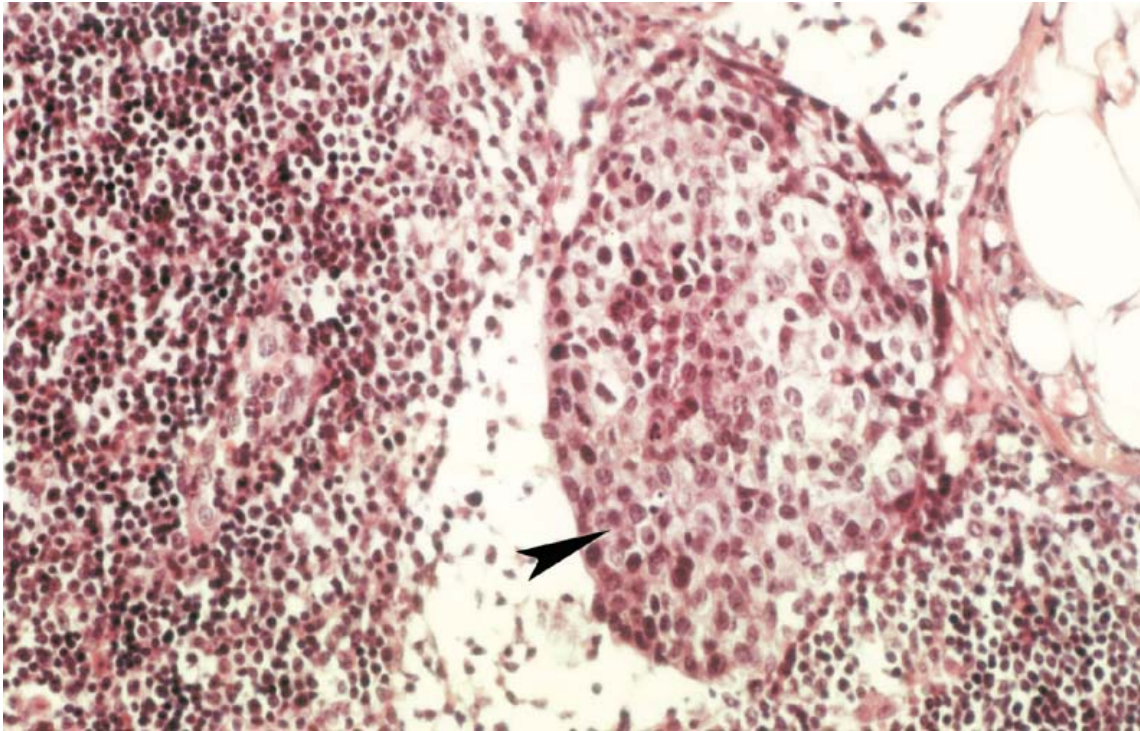


*Abb. 5 VX2-Ohrmuschelkarzinom nach 28-tägigem Wachstum mit zentraler Ulzeration*

#### 4.3 Lymphatische Metastasierung

Die regionären Lymphknoten der Tiere mit Ohrmuschelkarzinomen zeichneten sich im Vergleich zu denen gesunder Tiere alle durch eine deutliche Vergrößerung aus. Der histopathologische Befund ergab meist eine reaktive Hyperplasie, insbesondere bei denjenigen Tieren mit einem kurzen Zeitraum des Tumorwachstums. Auch hinsichtlich der Verfärbung von blassrosa bei gesunden Tieren zu dunkelrot bei den Tieren mit Tumoren im entsprechenden Lymphabflussgebiet unterschieden sich die Lymphknoten mit reaktiver Hyperplasie nicht von denen mit Metastasen.

Sieben Tage nach Tumorimplantation enthielten die parotidealen Lymphknoten in 2/8 (25%) der untersuchten Halsseiten isolierte Metastasen (Abb. 6).



*Abb. 6 Histologisches Bild der ersten metastatischen Tumorabsiedlung (Pfeil) nach 7-tägigem Tumorwachstum im Bereich des Ln. parotideus (HE; x200)*

Zwei Wochen nach Tumorinduktion zeigten sich in 5/8 (62,5%) Halsseiten Parotislymphknoten mit isolierten soliden Metastasen von 0,25-0,39 cm. In der Gruppe der nach 21 Tagen getöteten Tiere wurden in 5/8 (62,5%) Halsseiten isolierte Parotismetastasen von 0,63-1,13 cm nachgewiesen, 3 davon waren solide, eine war eine solide Metastase mit perinodalem Wachstum, eine weitere enthielt Nekrosen (Abb. 7,8).

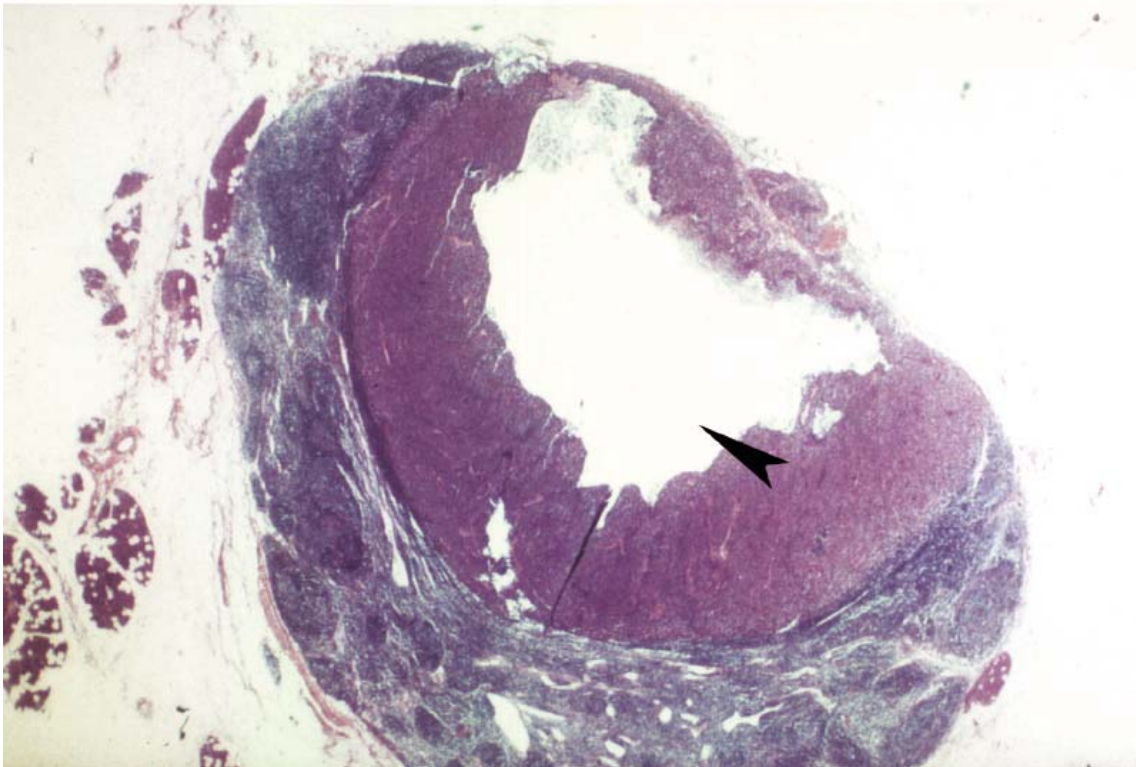


Abb. 7 Histologisches Bild einer nekrotischen (Pfeil) Lymphknotenmetastase nach 21-tägigem Tumorwachstum (HE; x10)

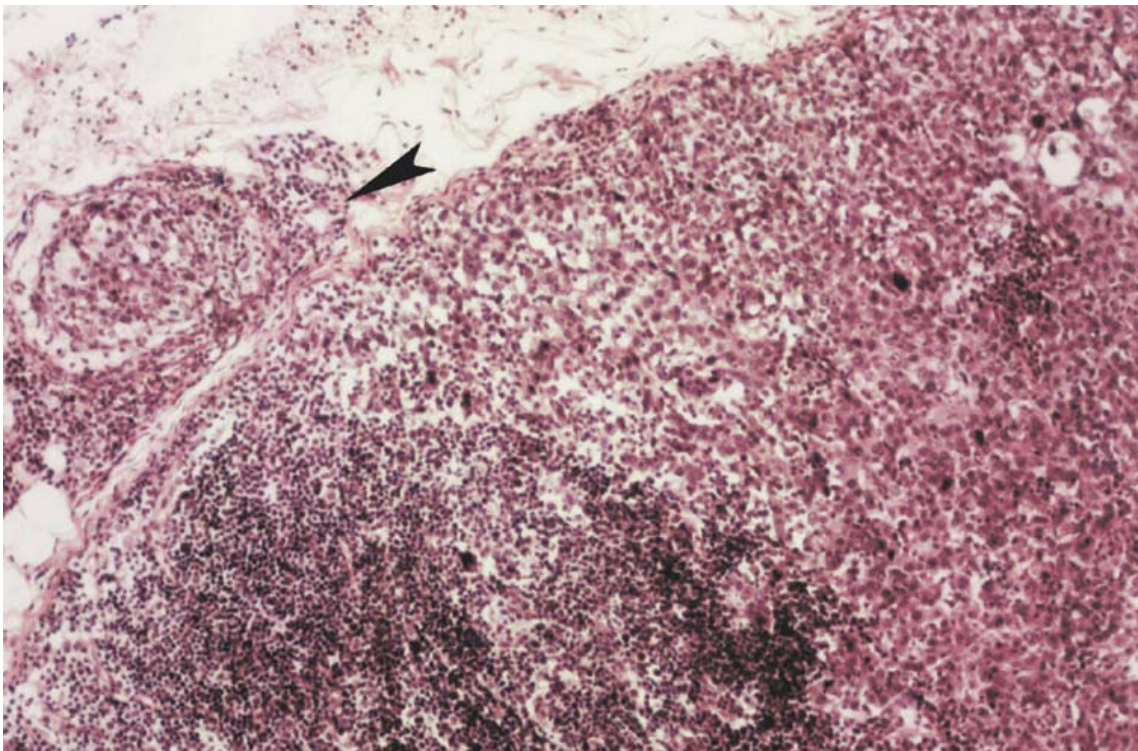
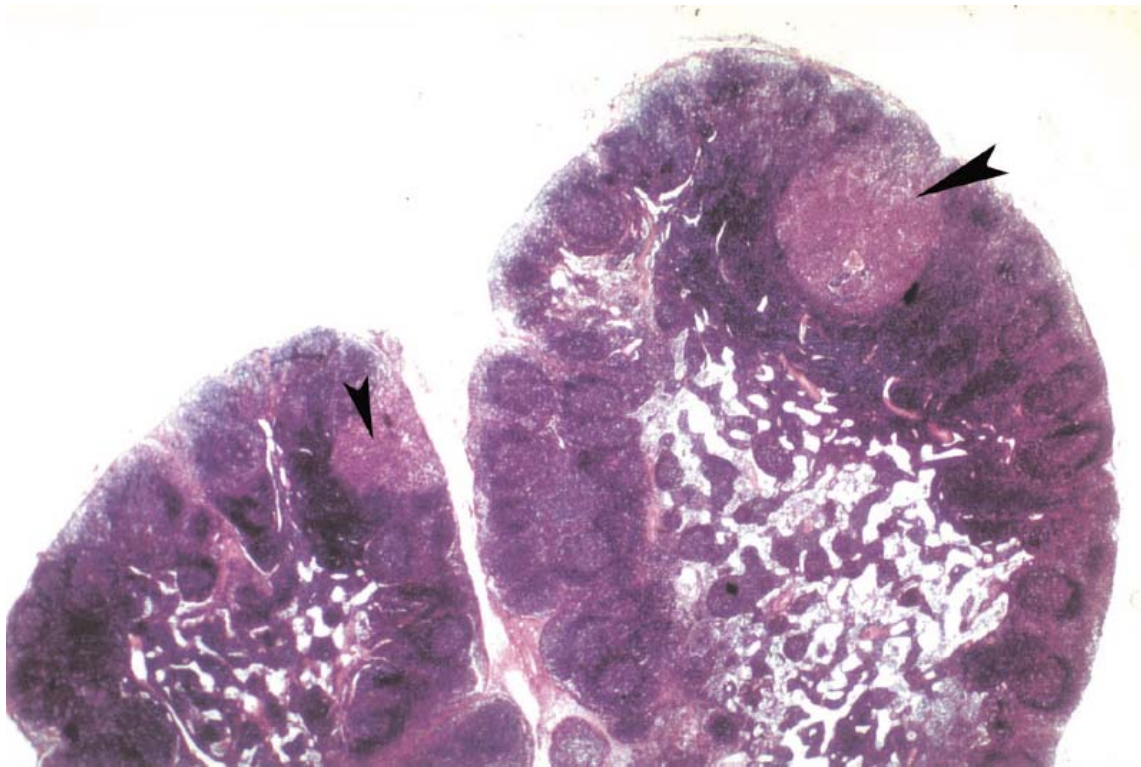


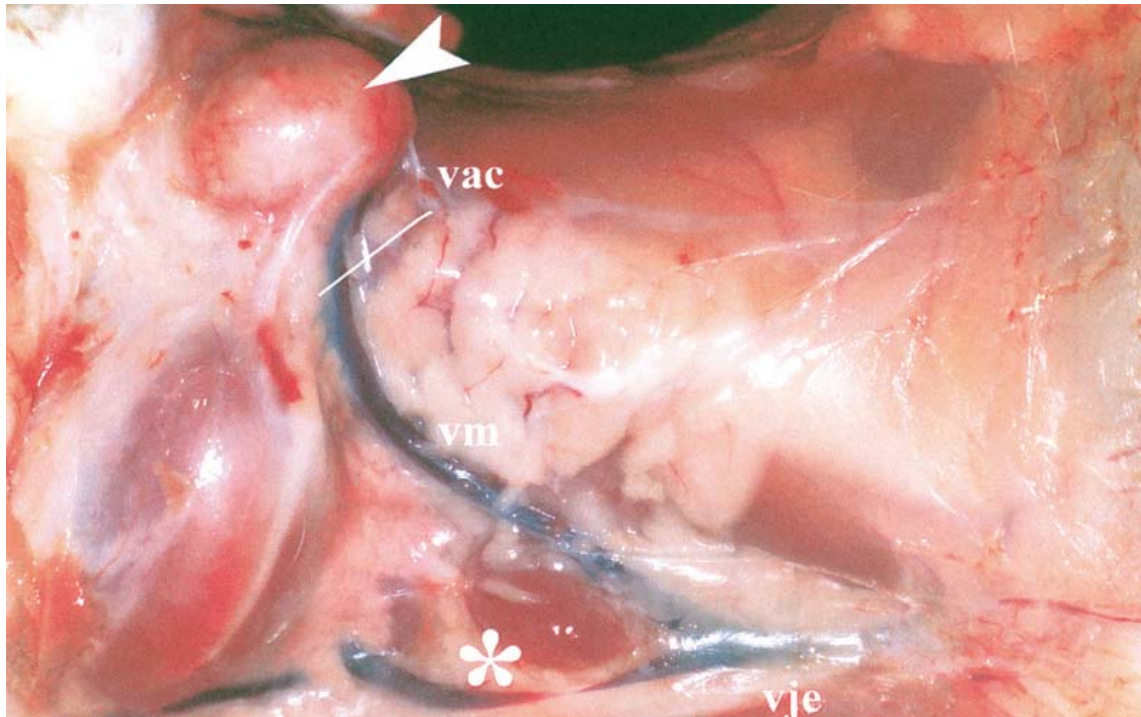
Abb. 8 Histologisches Bild des perinodalen Wachstums (Pfeil) einer Lymphknotenmetastase bei 21-tägigem Tumorwachstum (HE; x100)

Übereinstimmend mit humanen Lymphknotenmetastasen eines Plattenepithelkarzinoms fanden sich in den VX2-Lymphknotenmetastasen Tumorzellen im subkapsulären marginalen Sinus der erstdrainierenden Lymphknoten (Abb. 9).



*Abb. 9 Histologisches Bild einer subkapsulär lokalisierten Lymphknotenmetastase (Pfeil) bei 21-tägigem Tumorwachstum (HE; x10)*

Bei den Tieren mit einem Tumorwachstum über 28 Tage (Abb. 10) hatten sich in den Parotislymphknoten in 7/8 (87,5%) Halsseiten Metastasen von 1,77-1,93 cm ausgebildet. Darunter wurden 3 als solide und 4 als nekrotische Metastasen eingestuft. Zusätzlich trat in 3 Fällen ein perinodales Wachstum auf. In einem Fall wurde neben einer ausgedehnten Lymphknotenmetastasierung im Bereich des erstdrainierenden Lymphknotens ein begrenzter Befall der sekundären Lymphknotenstation in Form einer kleinen soliden Metastase nachgewiesen (Tab. 1, s. Anhang).



*Abb. 10 Makroskopisches Bild nach Präparation der zervikalen Lymphknoten mit großer Metastase im erstdrainierenden, parotidealen Lymphknoten (Pfeil) und kleiner solider Metastase in der sekundären, mandibulär caudalen Lymphknotenstation (Stern) nach 28-tägigem Tumorwachstum. vm = Vena maxillaris; vje = Vena jugularis externa*

In der Gruppe mit 32-tägigem Tumorwachstum wiesen 8/8 (100%) Halsseiten parotideale Lymphknotenmetastasen von 1,26-3,02 cm mit großen zentralen Nekrosen auf. Auf einer der 8 Halsseiten enthielt auch ein caudal mandibulärer Lymphknoten eine Metastase. Bei keinem der untersuchten Tiere wurden Metastasen in einem der rostral mandibulären Lymphknoten gefunden. Die Durchmesser der histologisch befundenen Metastasen ergaben graphisch dargestellt in Abhängigkeit von der Tumorgröße eine Kurve mit tendenziell linearem Anstieg (Abb. 11). Ein klarerer exponentieller Zusammenhang ergab sich bei Korrelierung der Metastasendurchmesser mit dem Zeitraum des Tumorwachstums (Abb. 12).

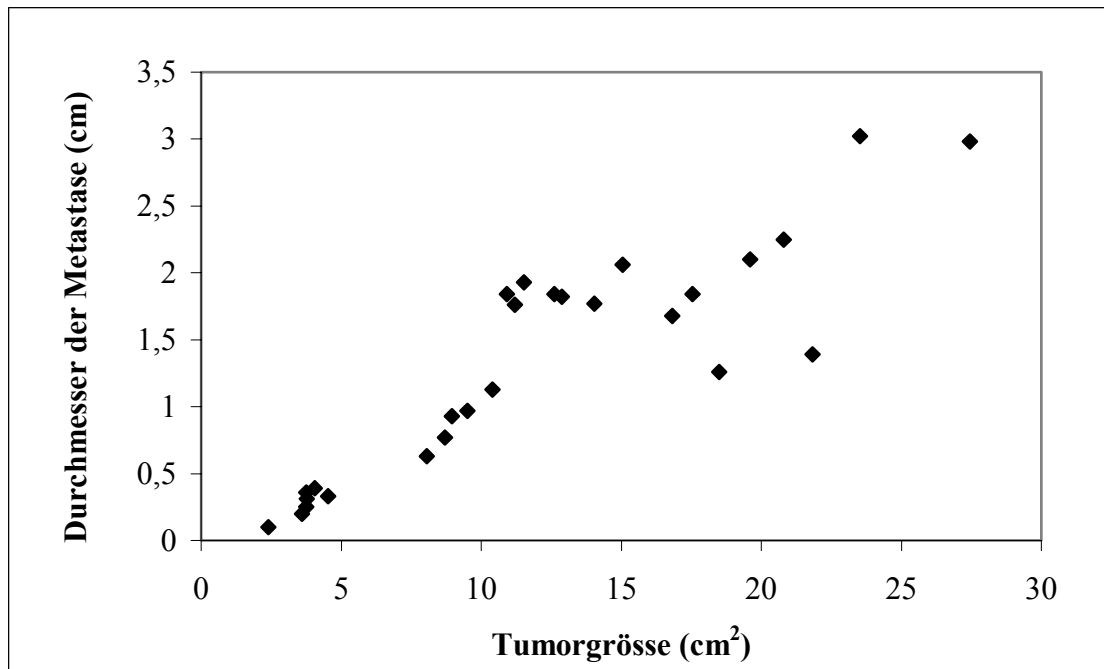


Abb. 11 Korrelation (nach Spearman; SPSS/PC, StatSoft Inc. Tulsa, Okla.) zwischen Tumorgröße und Größe der Lymphknotenmetastase

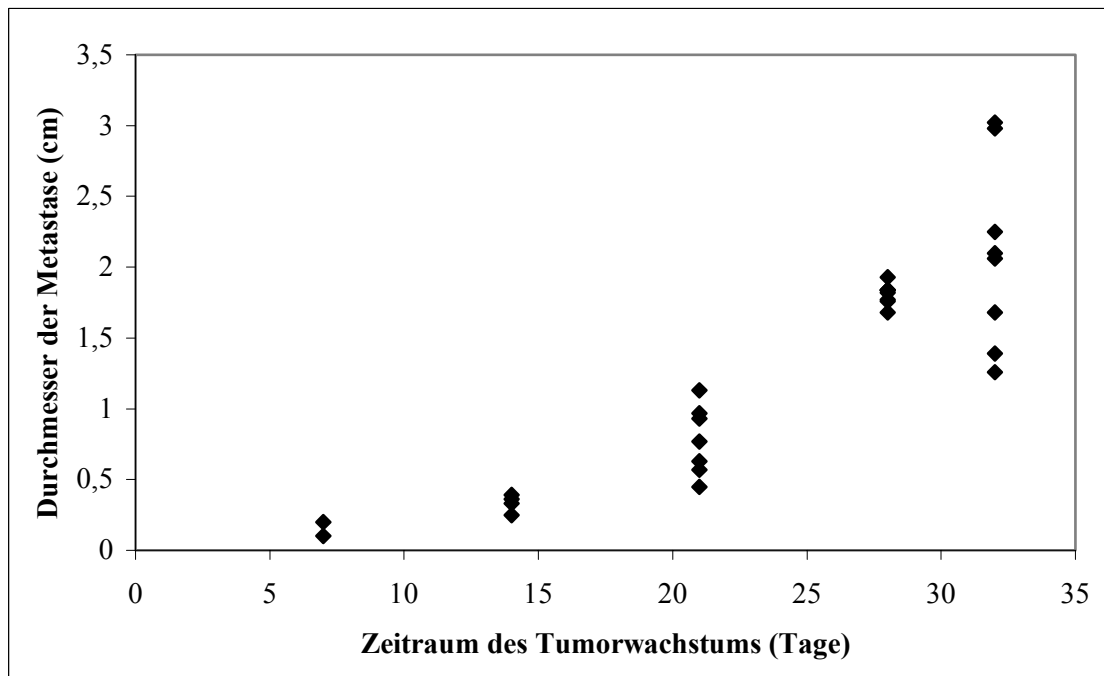
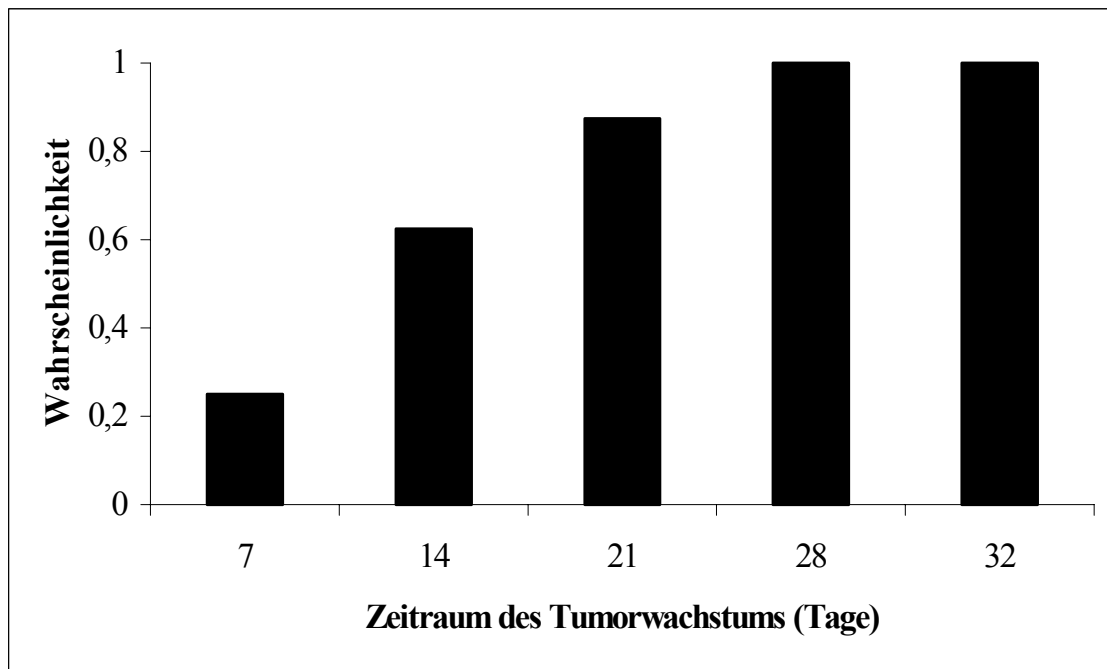


Abb. 12 Korrelation (nach Spearman; SPSS/PC, StatSoft Inc. Tulsa, Okla.) zwischen Größe der Lymphknotenmetastase und Zeitraum des Tumorwachstums

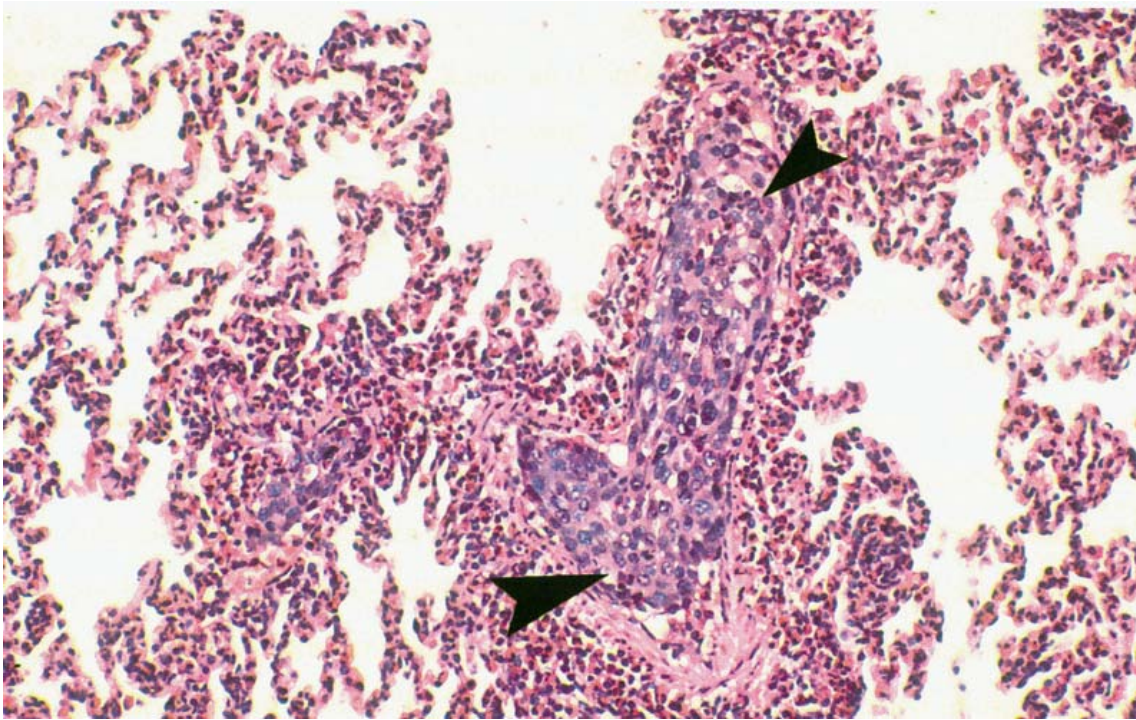




*Abb. 13* Wahrscheinlichkeit des Auftretens von parotidealene Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit vom Zeitraum des Tumorwachstums in Tagen (SPSS/PC, StatSoft Inc. Tulsa, Okla.)

#### 4.4 Lungenmetastasen

In einer der vier entnommenen Lungen wurden Tumorzellen in den zuführenden Blutgefäßen nachgewiesen (Abb. 14). Zu einer parenchymatösen metastatischen Absiedlung war es zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere noch nicht gekommen.



*Abb. 14 Histologisches Bild einer Hämatoangiosis pulmonaris (Pfeil) nach 32-tägigem Tumorwachstum (HE; x200)*

## 5. Diskussion

Maligne Tumore des oberen Aerodigestivtraktes machen weltweit ca. 6% aller Krebserkrankungen aus. Darunter ist das Plattenepithelkarzinom mit etwa 90% die weitaus häufigste Tumorentität. Trotz aggressiver multimodaler Therapiekonzepte konnte die teils sehr ungünstige Prognose dieser Patienten bisher noch nicht durchgreifend verbessert werden.

Bei der Mehrzahl der Patienten kann der Primärtumor chirurgisch komplett reseziert oder durch eine Radio(-Chemo-)Therapie zur vollständigen Regression gebracht werden. Als prognoselimitierende Faktoren gelten in erster Linie die hohe lymphogene Metastasierungsfrequenz und die Ausbildung von Fernmetastasen sowie das gehäufte Auftreten von Zweitkarzinomen im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes. Die besondere Bedeutung der lymphogenen Metastasierung in die regionären Lymphknoten zeigt sich anhand der zum Teil drastischen Reduktion der 5-Jahres-Überlebensrate bei Vorliegen histologisch gesicherter Halsmetastasen [67]. Dies spiegelt sich auch in der Beeinflussung des Auftretens von Fernmetastasen in Abhängigkeit von der Anzahl histologisch nachgewiesener Halslymphknotenmetastasen wieder [54]. Einer Fernmetastasierung geht beim Plattenepithelkarzinom der oberen Luft- und Speisewege nahezu immer eine lymphogene Metastasierung in die regionären Lymphknoten voraus.

Durch die Einführung der radikalen Neck dissection durch Crile im Jahr 1906 [7] erfuhr die Behandlung metastatisch besiedelter Halslymphknoten einen entscheidenden Fortschritt. Basierend auf der Idee der „small-dissection“, wie sie bereits 1944 Silvestre-Begniss publizierte [50], beschrieb Suárez 1962 erstmals die funktionelle Neck dissection [53]. Basierend auf umfangreichen Untersuchungen zur bevorzugten Metastasierungsrichtung von Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege von Lindberg [31], gewann in den letzten Jahrzehnten die Durchführung noch stärker limitierter Neck dissection-Formen bei Patienten ohne Hinweis auf eine lymphogene Metastasierung zunehmend an Bedeutung.

Ungeachtet der chirurgisch wie strahlentherapeutisch und medikamentös zu verzeichnenden Fortschritte bei der Behandlung von im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes lokalisierten Karzinomen, konnte das Langzeitüberleben von Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren und/oder einer eingetretenen lymphogenen Metastasierung immer noch nicht nachhaltig verbessert werden. Vor diesem Hintergrund ist eine detaillierte Kenntnis der Tumorprogression und des lymphogenen Metastasierungsverhaltens von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region unmittelbare Voraussetzung zur Erarbeitung neuer Diagnostik- und Therapieansätze.

Der Lymphabfluss des Kopf-Hals-Bereichs erfolgt beim Menschen über etwa 300 in diesem Gebiet lokalisierte Lymphknoten, von denen der weitaus größte Teil im Bereich des Halses lokalisiert ist. Untersuchungen zum Lymphabfluss der oberen Luft- und Speisewege zeigten, dass der Lymphabfluss entlang bevorzugter und relativ konstanter Drainagerichtungen und Lymphknotengruppen erfolgt, was jedoch eine individuelle Variabilität nicht ausschließt [67].

Zu Beginn des lymphogenen Metastasierungsprozesses penetrieren Tumorzellen initiale Lymphgefäße, die eine fehlende oder diskontinuierlich ausgebildete Basallamina aufweisen. Die Tumorzellen gelangen mit dem Lymphfluss in den subkapsulären Sinus der Lymphknoten, wo sie häufig verbleiben und mit der Formation einer Kolonie an dieser Stelle beginnen [5]. Rasch wachsende Tumore entsenden Tausende bis Millionen von Zellen pro Tag in den Zirkulationsvorgang. Es sind aber weniger als 0,01% dieser Zellen in der Lage, metastaseninitiierende Kolonien zu bilden, und diese gehen keinesfalls zwangsläufig in ein weiteres Tumorwachstum über [12]. Im Anfangsstadium der Krebserkrankung scheint die Filter- und Barrierefunktion des Lymphknotens noch ausreichend intakt zu sein, um das Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten. Auch wenn Tumorzellen gelegentlich einen Lymphknoten überspringen und sich erst im nachfolgenden Lymphknoten einnisten können, ist in der Regel der erste Lymphknoten die Lokalisation der ersten metastatischen Kolonie. Wenn der Lymphknoten zunehmend durch den metastatischen Tumor eingenommen ist, kann die Barrierefunktion nicht mehr aufrecht erhalten werden und es kommt zum lymphogenen Fortschreiten der Erkrankung. In diesem Fall vermag der metastasendurchsetzte Lymphknoten selbst als

Fokus für den weiteren Progress der Krebserkrankung zu dienen. Die weitere Ausbreitung kann über Lymphbahnen, über lymphovenöse Anastomosen, über den Blutstrom oder auch über eine direkte Infiltration der V. jugularis interna oder anderer großer venöser Gefäße erfolgen [67].

Zur Erprobung und Etablierung neuer Therapiekonzepte bei Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes wäre ein für diese Tumorentität repräsentatives Tiermodell von entscheidendem Nutzen. Vor diesem Hintergrund wurden in der Vergangenheit verschiedene Tiermodelle erprobt, deren Eignung für die vorgenannte Tumorentität jedoch aus unterschiedlichen Gründen zweifelhaft blieb.

Einer der verwendeten Tiermodelltypen nutzt spontan auftretende Tumore, wie Plattenepithelkarzinome der Ohrmuschel von Schafen [19] und im Bereich der Augen von Rindern [8]. Da es sich hierbei jedoch um selten auftretende Tumore handelt, sind standardisierte Versuchsbedingungen nur schwer zu schaffen.

Weiterhin lassen sich Karzinome durch lokale Applikation von Karzinogenen induzieren. Mit 4-Nitroquinolin-1-oxid (4NQO) induzierte Plattenepithelkarzinome bei Mäusen und Ratten [32; 51] und mit 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracen (DMBA) induzierte Karzinome der Wangentasche von Hamstern [47] dienen beispielsweise als Tiermodelle. Nachteilig bei diesem Tiermodelltyp ist der hohe Zeitaufwand der Tumorinduktion. Dysplastische Läsionen entstehen 3-4 Monate nach Applikation des Karzinogens. Daran schließt sich eine Latenzphase von weiteren 14-26 Wochen, bis sich der Tumor entwickelt. Abweichend von humanen Plattenepithelkarzinomen führen diese Läsionen nicht immer zu infiltrierenden Karzinomen und eine Metastasierung in die Halslymphknoten ist selten zu beobachten. Gerade dieser Sachverhalt läßt das vorgenannte Tiermodell ungeeignet für Untersuchungen zum lymphogenen Metastasierungsverhalten erscheinen. An dieser Stelle soll der zusätzliche Hinweis nicht fehlen, dass sich die chromosomalen Veränderungen in den durch diese Karzinogene induzierten Tumore von denen in humanen Plattenepithelkarzinomen unterscheiden [30]. Weiterhin verursacht die kumulative Toxizität der zur Karzinominduktion verwendeten Agentien eine erhöhte Mortalität der Tiere [20].

Ein weiterer Typ von Tiermodellen verwendet mittels Inokulation transplantierbarer Zelllinien induzierte Tumore. Im Falle der Fischer Ratte wurden [26] Zellen, die von Plattenepithelkarzinomen der Prostata, und bei der Wag-Rij Ratte [45] Zellen, die von Plattenepithelkarzinomen der Haut stammen, benutzt. Die aus diesen Zelllinien hervorgehenden Tumore haben jedoch ein überwiegend hämatogenes Metastasierungspotential. Auch die jüngst von der Arbeitsgruppe um Myers [37] entwickelte in vitro Zelllinie (MDA1986) der Maus zeigt nur eine lymphogene Metastasierungstendenz von Werten zwischen 20-30%.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, dass die bisher bekannten Tiermodelle für Untersuchungen zum lymphogenen Metastasierungsverhalten von Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege letztlich begrenzt geeignet sind. Dies ist in der fehlenden oder unsicheren lymphogenen Metastasierung der Primärtumore in die regionären Lymphknoten begründet. Im Gegensatz zu den vorgenannten Tiermodellen, zeichnet sich das VX2-Karzinom beim weißen Neuseelandkaninchen, einem bisher für den Kopf-Hals-Bereich wenig bekannten Tiermodelltyp, durch eine hohe lymphogene Metastasierungsfrequenz aus.

Shope und Hurst entdeckten 1933 ein Virus, das bei Kaninchen natürlich entstehende kutane Papillome induziert [48]. Aufgrund einer spontanen Transformation verursachten diese Papillomaviren teilweise hochmaligne Plattenepithelkarzinome. Die Inokulation von Shope-Papillomaviren enthaltenden Extrakten in Hautinzisionen hatte nach etwa 10 Monaten die Entstehung von Karzinomen zur Folge [27]. Kidd et al. berichteten 1936 von der ersten erfolgreichen Transplantation der Karzinome, die sie V1 nannten, jedoch blieb bei einer zweiten Transplantation das Wachstum aus. In dem Experiment, dass zur Entwicklung der V2-Zelllinie führte, waren zunächst nur 5% der Inokulationen in Dutch belted rabbits erfolgreich. Bereits in der dritten Tumorgeneration bildeten sich in 21% der inokulierten Tiere Karzinome aus. Von einer Transplantation wird bis in die vierzehnte Generation berichtet. Von da an wuchs das V2-Karzinom in den meisten Tieren, in die es transplantiert wurde [28]. Während der fortlaufenden Übertragungen zeigte sich der V2-Tumor im histologischen Erscheinungsbild zunehmend anaplastisch. Seitdem 1952 erstmals die Unabhängigkeit

des VX2-Karzinoms vom Virus beschrieben wurde [43], gilt es als frei von viralen Charakteristika, behielt jedoch seine leichte Übertragbarkeit [14].

In den 1950ern wurde die Transplantation der V2-Karzinome nicht nur erfolgreich in verschiedenen Kaninchenspezies weitergeführt, sondern auch an unterschiedlichen Lokalisationen in Meerschweinchen, Mäusen, Hamstern und Ratten [17]. Wegen der derzeit weltweit existierenden verschiedenen Stämme unterschiedlicher Transplantationsgenerationen, wurde die Bezeichnung VX2-Karzinom gewählt.

Steward et al. [52] beschrieben 1959 detailliert die Histologie des VX2-Tumors in weißen Neuseelandkaninchen. Bezeichnend für das VX2-Karzinom sind der geringe Differenzierungsgrad ohne Keratinisierung, die Infiltration umliegender Strukturen, die Ausbildung von Ulzerationen ab einer gewissen Tumorgroße und die Tendenz, in die regionären Lymphknoten zu metastasieren [34]. In Hinblick auf die lymphogene Metastasierung ist das schnelle Wachstum des Tumors vorteilhaft. Eine zu langsame Entwicklung des Primärtumors bewirkte bei chemisch induzierten Ösophaguskarzinomen in Ratten und Mäusen eine diffuse Streuung, was diese Methode als inadäquat zur Untersuchung der lymphogenen Metastasierung erscheinen lässt [9; 24; 44].

Seit den 1960ern werden VX2-Tumore in einer Vielzahl von experimentellen Studien genutzt. Sie finden Verwendung bei Untersuchungen der Mechanismen der Karzinogenese und um neue Behandlungsmodalitäten gegen Krebs zu überprüfen. Vor diesem Hintergrund erschienen Mitteilungen über die Entwicklung von in vitro Zelllinien des VX2-Karzinoms in der Literatur. Osato und Ito [38] berichteten über eine in vitro VX2- und eine weniger anaplastische VX7-Zelllinie, jedoch ging die VX2-Kultur verloren und wurde nicht mehr neu etabliert. Später schrieben andere Autoren über in vitro VX2-Zelllinien in Rahmen von Untersuchungen unter anderem zu Prostaglandin(E2)synthese und Kalziummetabolismus in Tumoren [64; 68]. Gleichwohl wurden diese Zelllinien nicht im Zusammenhang mit einer Reimplantation in Kaninchen erwähnt. Galasko und Haynes [14] zeigten, dass das Kulturmedium zur erfolgreichen Lagerung von VX2-Zellen bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff

notwendigerweise 10% DMSO, eine Gefrierschutzkomponente, die eine ausreichende Zahl vitaler Zellen nach dem Auftauen gewährleistet, enthalten muss. Weiterhin berichteten Shah and Dickson [46] über den Erhalt von VX2-Tumoren in vitro, jedoch bemerkten sie, dass ihre Zelllinie schnell ihre Fähigkeit in vivo zu wachsen verlor. Die VX2-Tumorzellen, die über 3 Wochen in Kultur Wachstum zeigten, riefen nach Inokulation in Kaninchen keine Karzinome mehr hervor.

Eine von Easty und Easty 1982 [11] entwickelte VX2-Zelllinie konnte dagegen nach mehreren Monaten in kontinuierlicher Kultur, die Bedingungen haben sie detailliert beschrieben, erfolgreich reimplantiert werden. Die Fähigkeit, VX2-Tumorzellen in Kultur aufrecht zu erhalten, ermöglichte eine Reihe von in vitro Untersuchungen und umging die Notwendigkeit einer fortlaufenden Transplantation in Kaninchen, wodurch die Anzahl der für die Forschung verwendeten Tiere reduziert werden konnte.

Dennoch bevorzugen die meisten Untersucher in der praktischen Umsetzung die Fortpflanzung der VX2-Zelllinie in vivo durch intramuskuläre Passage im Hinterlauf von Kaninchen [18; 21; 33; 36; 58; 65], da das nach mehrfacher Reimplantation der in vitro Zelllinie zu beobachtende Tumorwachstum durch eine deutlich weniger aggressive Wachstumstendenz gekennzeichnet ist, als es für humane Plattenepithelkarzinome bekannt ist und zudem hinsichtlich seiner lymphogenen Metastasierungstendenz unsicher blieb [62]. Die Transplantation von VX2-Zellen kann einerseits durch Injektion einer Tumorzellsuspension [18; 21; 33; 65] oder durch Implantation solider Tumorgewebsstücke [2; 55] erfolgen.

Die VX2-Karzinom Zelllinie im Kaninchen wurde in verschiedenen Untersuchungen verwendet. Sie diente der Evaluation von intraarterieller Chemotherapie unter anderem in Leber [39; 65], Uterus [18], Niere [15] und in der Harnblase [22]. Man setzte sie auch zur Untersuchung der Tumorangiogenese [2; 33; 55] und zur Bestimmung der Immunkompetenz gegen Tumore [6; 25; 36] ein.

Hinsichtlich des lymphogenen Metastasierungsverhaltens wurde am weißen Neuseelandkaninchen bisher die Lokalisation regionärer Lymphknotenmetastasen beim



Oesophaguskarzinom untersucht [34]. Andere Arbeiten beschäftigen sich mit der Wirkung von Radiatio und Chemotherapie auf lymphogen metastasierte VX2-Karzinome des Appendix und Oesophagus der Kaninchen [23; 56]. Anhand der Lymphknotenmetastasen von intramuskulär in die Hinterläufe der Kaninchen implantierten VX2-Karzinome wurde die Fragestellung untersucht, welches Kontrastmittel eine derartige Darstellung von Lymphknoten dahingehend erlaubt, dass eine Differenzierung von tumorfreien und tumorbefallenen Lymphknoten im MRT möglich ist [65]. Van Es führte Untersuchungen zur Wirksamkeit der intraarteriellen Chemotherapie und peritumoralen IL2-Behandlung von im Bereich der Ohrmuschel induzierten VX2-Karzinomen durch. Hierbei beschrieb der Autor auch das regelhafte Auftreten von zervikofazialen Lymphknotenmetastasen [59; 61 - 63].

Viele Arbeiten, die sich mit dem VX2-Tumormodell an weißen Neuseelandkaninchen beschäftigen, zielen somit auf die Erprobung neuer diagnostischer oder therapeutischer Maßnahmen ab, so dass lediglich der Frequenz der Behandlungserfolge Beachtung geschenkt wird. Demzufolge machen die Autoren keine expliziten Angaben über die Erfolgsrate der Tumorimplantation [18; 36; 39; 58]. Bei den Autoren, die ihre Implantationserfolge in Zahlenangaben dokumentieren, variiert die Erfolgsrate unter Verwendung einer Tumorzellsuspension zur Induktion eines VX2-Karzinoms in der Hinterlaufmuskulatur zwischen 95% und 100% [21; 65]. In den Arbeiten zum Kopf-Hals-Bereich, in denen die Implantation von VX2-Tumorgewebestücken in die Cornea beschrieben wird, finden sich ebenfalls keine exakten Zahlenangaben [2; 55], obwohl Brem und Folkmann [2] berichten, dass keine spontane Regression der Tumoren auftrat.

Van Es [59] macht in einer Arbeit zur intraarteriellen Embolisation bei VX2-Ohrmuschelkarzinomen detaillierte Angaben zu den Implantationserfolgen, die zusammengefasst eine Erfolgsrate von 62,5% ergeben. Er weist an anderer Stelle [62] darauf hin, dass Misserfolge der eigentlichen Implantation häufig nicht zuverlässig von einer spontanen Regression unterschieden werden können. Er führt dies auf die in den ersten Tagen nach Injektion der Tumorzellen auftretende reaktive Schwellung zurück, die das eigentliche Tumorwachstum überlagert und so der Beurteilung entzieht.

Lediglich in Fällen eines späteren Stillstandes des Tumorwachstums kann sicher von einer spontanen Regression gesprochen werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Implantationserfolge an der Ohrmuschel der weißen Neuseelandkaninchen ergaben eine Erfolgsrate von über 80%. Wenngleich das untersuchte Kollektiv zu klein ist, um statistisch relevante Ergebnisse mit hoher Aussagekraft zu liefern, ist diese Tendenz im Vergleich zu ähnlichen Zielgeweben anderer Tiermodelle als sehr günstig zu bewerten. Prinzipiell kommt als Ursache für nicht erfolgtes Tumorwachstum nach Transplantation ein zu hoher Anteil devitaler Tumorzellen in der Zellsuspension in Frage. Vermutlich verursachen viele devitale Zellen einen Immunisierungseffekt, der eine effektive Immunantwort des Körpers stimuliert und darüber ein Anwachsen des Tumors verhindert [13]. Daher ist die Möglichkeit des Trypanblau-Ausschlusses devitaler Zellen bei der Methode der Tumorzellsuspension im Gegensatz zur Transplantation solider Tumorgewebestücke von Bedeutung. Die Transplantationsmisserfolge bei der Injektion tiefgefrorener Zellen führt van Es [62] auf das gleiche Phänomen wie das bei devitalen Zellen aufgetretene zurück. In der vorliegenden Untersuchung wurde der Trypanblau-Ausschluss daher sowohl bei der Implantation mit Frischzellsuspension als auch mit der tiefgefrorenen VX2-Zellsuspension durchgeführt. Der Anteil devitaler Zellen in den im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Zellsuspensionen war so gering, dass auf die in der Literatur empfohlene Entfernung der toten Zellen [46] aus Gründen der Zeitersparnis bewusst verzichtet wurde. So konnte eine vermutlich vorteilhafte Verkürzung der Bearbeitungszeit zwischen Gewebegewinnung und Reimplantation erreicht werden. Zur Herstellung der VX2-Zellsuspension wurde zudem ausschließlich Tumorgewebe verwendet, das sich noch in einem frühen Wachstumsstadium mit fester Konsistenz ohne zentrale Nekrose befand.

Ebenfalls Einfluss auf die Erfolgsrate hat die Lokalisation des Primärtumors. Kidd und Rous [28] beobachteten ein regelhaft schlechtes Transplantationsergebnis im subkutanen Gewebe und ein besseres in der Skelettmuskulatur. Daraus erklären sich möglicherweise die im Vergleich zur vorliegenden Arbeit hohen, oben schon erwähnten, Erfolgsraten zwischen 95% und 100%, die bei Tumormodellen der

Hinterlaufmuskulatur [21; 65] oder der Zunge [33] erzielt wurden. Infolge dieser Problematik wurden im Rahmen dieser Untersuchung eine im Vergleich zu anderen Autoren [56, 65] hohe Zellzahl von  $10\text{-}20 \times 10^6$  zur Tumorinduktion eingesetzt, van Es [62] verwendet für die gleiche Lokalisation des Primärtumors  $20 \times 10^6$  VX2-Zellen als Minimum.

Die beschriebene technische Optimierung zur sicheren Reimplanation und Induktion von VX2-Karzinomen wurde in der vorliegenden Untersuchung um initiale lymphographische Untersuchungen ergänzt. Die dabei zugrundeliegenden anatomischen und topographischen Untersuchungen [10] konnten vier regelmäßig nachweisbare zervikofaziale Lymphknotenstationen nachweisen. Die gewählte Farbstofflymphographie galt der Klärung der Frage, in welche dieser Lymphknotenstationen unterschiedlich lokalisierte Primärtumore im Kopf-Hals-Bereich drainieren.

Bei der Lymphographie unterscheidet man eine direkte von einer indirekten Technik. Beim direkten Vorgehen wird das Lymphgefäß mit einer Kanüle punktiert und die Tusche oder das Röntgenkontrastmittel direkt in die Lymphe abgegeben. Mit dieser Methode werden Lymphkollektoren und Lymphstämme sehr gut dargestellt. Das im Lymphabflussbereich lokalisierte initiale Lymphgefäßsystem wird dagegen nur unzureichend erfasst [3; 49], was vor allem auf Lymphgefäßklappen zurückzuführen ist, die eine retrograde Anfüllung initialer Lymphgefäße weitgehend verhindern. Dieses Defizit wird durch die von Teichmann [57] begründete indirekte Lymphographie ausgeglichen.

Die indirekte Lymphographie kann entweder in vivo oder am frisch entnommenen Organpräparat erfolgen, wobei der Lymphtransport am Gewebeexziseat reduziert ist [1]. Die lymphgängige Substanz, z.B. Tusche, wird ins Interstitium injiziert, wodurch der interstitielle Druck ansteigt. Übertrifft dieser den endovaskulären Druck, wird die endotheliale Endigung türflügelartig in das Lumen gedrückt. Über die auseinandergewichenen interendothelialen Zellkontakte fließt die im Interstitium befindliche Tusche in das Lymphgefäß. Die für die Lymphbildung notwendige Interaktion von interstitiellem und endovaskulärem Druck ist eingehend analysiert und

beschrieben [29]. Unter den indirekten Lymphographieverfahren ist die auf Gerota [16] zurückgehende Farbstoffinjektionsmethode am verbreitetsten [66].

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte indirekte Farbstofflymphographie am narkotisierten Tier, galt dem Nachweis der regionären Lymphabflussrichtung und der Darstellung der den Primärtumor drainierenden Lymphknotenstationen. Die Lymphographie im Bereich der Zunge und der Wangenschleimhaut bestätigte die Zugehörigkeit der mandibulär rostralen und caudalen Lymphknoten zum Abflussgebiet der Mundhöhle. Bei der Lymphographie im Bereich der Ohrmuschel, der in der vorliegenden Arbeit gewählten Primärtumorlokalisation, konnte reproduzierbar der parotideale Lymphknoten als erstdrainierende und die Lnn. mandibulares caudales als zweite drainierende Lymphknotenstation nachgewiesen werden. Die paratrachealen Lymphknoten liessen sich weder durch die Farbstoffinjektion in der Ohrmuschel anfärben, noch konnten bei den Untersuchungen zum Metastasierungsverhalten Tumorzellabsiedlungen im histologischen Bild nachgewiesen werden. Die leichte Zugänglichkeit für die Inokulation und Wachstumskontrolle der Tumore bestimmte die Auswahl der Ohrmuschel als Primärtumorlokalisation, die zusätzlich die Umgehung einer protektiven Tracheotomie ermöglicht, wie sie im Falle einer Tumorinduktion im Bereich der Mundhöhle notwendig wäre.

Bei der histopathologischen Untersuchung der resezierten Lymphknotenstationen liessen sich ausgehend vom VX2-Ohrmuschelkarzinom nach 7 Tagen erste metastatische Absiedlungen im erstdrainierenden parotidealen Lymphknoten nachweisen. Im Rahmen des fortschreitenden Tumorprogresses entwickelten sich bis zum 21. Tag post injectionem bei 5/8 (62,5%) der zu diesem Zeitpunkt untersuchten Halsseiten Metastasen im Bereich der erstdrainierenden, parotidealen Lymphknotenstation. Die erste metastatische Absiedlung mit nachfolgender Ausbildung einer manifesten Metastase ist in Anlehnung an den lymphogenen Metastasierungsmechanismus humaner Plattenepithelkarzinome im Bereich des subkapsulären Randsinus lokalisiert. Entsprechend dem beim Menschen im weiteren klinischen Verlauf nachweisbaren lymphogenen Metastasierungspotential humaner Plattenepithel-

karzinome konnte drei Wochen post injectionem pathohistologisch ein perinodales Wachstum mit Lymphspalteneinbruch nachgewiesen werden. Nach 28 Tagen Tumorwachstum wurden auf 7/8 (87,5%) Halsseiten große, zum Teil nekrotische Lymphknotenmetastasen nachgewiesen. Am 32. Tag post injectionem zeigten sich bei jedem der vier zu diesem Zeitpunkt getöteten Tieren beidseitig (100%) nekrotische Lymphknotenmetastasen.

Die lymphogene Metastasierung blieb also zunächst auf den erstdrainierenden Lymphknoten beschränkt und erst 4 Wochen post injectionem konnte eine Lymphknotenmetastase in der zweiten Lymphknotenstation nachgewiesen werden. Bei keinem der untersuchten Tiere zeigte sich histologisch ein metastatischer Befall einer dritten Lymphknotengruppe. Vorgenannte Beobachtung sowie die dem humanen lymphogenen Metastasierungsmuster entsprechende subkapsuläre Lokalisation metastatischer Absiedlungen prädisponiert das vorgestellte Tumormodell für gezielte weiterführende Untersuchungen zum sogenannten Sentinel Node Konzept, bei dem der erstdrainierende Lymphknoten als Wächterlymphknoten (Sentinel Node) definiert ist. In ihm wird die erste Metastase erwartet. Beim Sentinel Node Konzept wird das Ausmaß der Lymphknotendissektion unmittelbar vom histologischen Befund abhängig gemacht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung geben berechtigte Hoffnung darauf, dass das VX2-Karzinom beim weißen Neuseelandkaninchen ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der lymphogenen Metastasierungsmechanismen bei im Kopf-Hals-Bereich lokalisierten Plattenepithelkarzinomen darstellt. Hierbei bietet das Ohrmodell den entscheidenden Vorteil einer guten Zugänglichkeit für Tumorinduktion und Kontrolle des Tumorwachstums bei geringer Belastung der Versuchstiere. Im Hinblick auf die technische Durchführbarkeit erscheint die Verwendung einer Zellsuspension verhältnismäßig unkompliziert. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie mittels Trypanblau-Ausschluss die Bestimmung des prozentualen Anteils vitaler Zellen erlaubt und somit die anschließende Injektion vergleichbarer Mengen vitaler Zellen bei jeder Transplantation möglich macht. Daraus resultieren annähernd gleiche Tumorgrößen.

Allerdings kann der bei der Injektion ausgeübte Druck eine akzidentielle Infusion von Tumorzellen in Gefäße verursachen, mit dem Ergebnis schon in frühem Stadium auftretender Lungenmetastasen, einem Phänomen, das als 'Streuung bei Implantation' bezeichnet wird [15]. Wenn die lymphogene Metastasierung, die Tumorprogression oder die Auswirkung einer Antitumorthherapie eingeschätzt werden soll, sind solche artifiziell erzeugten Lungenmetastasen nachteilig, da sie die Überlebenszeit der Kaninchen deutlich verringern. Folglich hat bei der Verwendung des vorgestellten Tiermodells neben der Herstellung der Tumorzellsuspension auch eine moderate Injektionstechnik einen entscheidenden Einfluß auf die Repräsentativität des Tiermodells. Die in der vorliegenden Untersuchung am besten bewährte Technik bestand in der vorhergehenden subkutanen Injektion eines Luftdepots (ca. 5 x 5 mm) bei seitlich ausgerichtetem Anschliff der Venüle, um eine externe Blockierung der Kanülenöffnung durch den Ohrmuschelknorpel zu vermeiden. Diese Methode hat sich nicht zuletzt auch aus Gründen der Praktikabilität bei der Inokulation der Tumorzellen bewährt. Die fest dem Perichondrium aufsitzende Haut wird durch das subkutane Luftdepot atraumatisch abgehoben und bietet so genügend Raum, die injizierten Tumorzellen ohne passiven Rückfluss durch die Einstichstelle aufzunehmen. So gelingt eine leichte Applikation der Tumorzellsuspension mit gleichmäßigem Druck und in definierter Menge.

Zusammenfassend ergab die vorliegende Untersuchung, dass das im Bereich der Ohrmuschel von weißen Neuseelandkaninchen induzierte VX2-Karzinom ein geeignetes Tiermodell für weiterführende Untersuchungen zum lymphogenen Metastasierungsprozess von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs darstellt. Die Repräsentativität des Tiermodells ergibt sich zum einen aufgrund der dem anaplastischen Plattenepithelkarzinom zugrundeliegenden initialen lymphogenen Metastasierungstendenz. Zum anderen beruht die Eignung auf der im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nachgewiesenen, konstanten topographischen und zeitlichen Abfolge der lymphogenen Metastasierung. Beides prädisponiert das untersuchte Tiermodell besonders zu weiterführenden Untersuchungen zum aktuell intensiv diskutierten Konzept des Sentinel Node in der klinischen Onkologie.

## 6 Zusammenfassung

Maligne Tumore des oberen Aerodigestivtraktes machen weltweit ca. 6% aller Krebserkrankungen aus. Darunter ist das Plattenepithelkarzinom mit etwa 90% die weitaus häufigste Tumorentität. Trotz aggressiver multimodaler Therapiekonzepte konnte die teils sehr ungünstige Prognose dieser Patienten bisher nicht deutlich verbessert werden. Zur Erprobung und Etablierung neuer Therapiekonzepte haben sich Tiermodelle als hilfreich erwiesen. Alle bisher unter diesem Aspekt etablierten Modelle zu Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes erfüllen jedoch nicht zuletzt aufgrund des Fehlens des, für das humane Plattenepithelkarzinom entscheidende, lymphogenen Metastasierungspotentials, nicht den an ein Tiermodell zu stellenden Anspruch der Repräsentativität.

Das VX2-Karzinom ist ein ausschließlich bei Kaninchen auftretender Tumor, der ursprünglich von einem virusinduzierten Hautpapillom abstammt [48], das sich später aufgrund einer spontanen Transformation zu einem hochmalignen, anaplastischen Plattenepithelkarzinom weiterentwickelte [42]. Bezeichnend für das VX2-Karzinom sind der geringe Differenzierungsgrad ohne Keratinisierung, die Infiltration umliegender Strukturen, die Ausbildung von Ulzerationen ab einer gewissen Tumorgroße und ein initial lymphogenes Metastasierungspotential [34].

Die mit der vorliegenden Arbeit zu klärende Fragestellung galt der Eignung von im Bereich der Ohrmuschel von weißen Neuseelandkaninchen induzierten VX2-Karzinomen als Tiermodell für weiterführende Untersuchungen zum lymphogenen Metastasierungsprozess von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Die als Grundlage für die lymphogene Metastasierung dienende Kenntnis der Lymphabflussrichtung in bestimmte Lymphknotenregionen wurde zunächst mit Hilfe der Farbstofflymphographie erarbeitet. Im Anschluß an die Identifikation der drainierenden Lymphknotenstationen der Ohrmuschel erfolgte die detaillierte Analyse der zeitlichen und topographischen Abfolge der lymphogenen Metastasierung von im Bereich der Ohrmuschel induzierten VX2-Karzinomen. Die Ergebnisse illustrierten eine konstante zeitliche und topographische Metastasierung in die erstdrainierende Lymphknoten-

station über 21 Tage, mit darauffolgendem Metastasennachweis im Bereich der sekundären Lymphknotenstation nach 28-tägigem Tumorwachstum. Entsprechend dem Metastasierungsmuster von Plattenepithelkarzinomen lag die erste metastatische Absiedlung im Bereich des subkapsulären marginalen Sinus. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete lymphogene Metastasierungsfrequenz lag bei 5/8 nach 21 Tagen, 7/8 nach 28 Tagen und 8/8 nach 32 Tagen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass die Konstanz in der topographischen und zeitlichen Abfolge der lymphogenen Metastasierung von VX2-Ohrmuschelkarzinomen ebenso wie die dem humanen lymphogenen Metastasierungsmuster entsprechende charakteristische subkapsuläre Lokalisation früher metastatischer Absiedlungen das untersuchte Tumormodell zu gezielten weiterführenden Untersuchungen zum lymphogenen Metastasierungsmechanismus von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich und insbesondere zum Sentinel Node Konzept prädisponiert.



## 7 Literatur

- [1] Beck C, Mann W. The inner laryngeal lymphatics. *Acta Otolaryngol* 1980;89:265-270
- [2] Brem H, Folkman J. Inhibition of tumour angiogenesis mediated by cartilage. *J Exp Med* 1975;141:427-439
- [3] Burgdorfer WH, Mukai K, Rosai J. Immunohistochemical identification of Factor VIII-related antigen in endothelial cells of cutaneous lesions of alleged vascular nature. *Am J Clin Pathol* 1981;75:167-171
- [4] Burgerer FA, Barbaric ZL. Treatment of VX2 Carcinomas in rabbits by percutaneous intratumoral injection of heated 0.9% NaCl Solutions. *Cancer Research* 1979;39:3429-3434
- [5] Carr P. Lymphatic Metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1983;2:307-317
- [6] Carroll WR, Bunge FR, Wolf GT, Carey TE, McClatchey KD, Poore J. Perilesional interleukin-2 in the VX-2 carcinoma in rabbits: a preliminary investigation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;112:430-436
- [7] Crile GW. Excision of cancer of the head and neck with a special reference to the plan of dissection based upon one hundred thirty-two operations. *JAMA* 1906;47:1780-1786
- [8] Den Otter W, De Groot JW, Bernsen MR, Heintz APM, Maas R, Hordijk GJ, Hill FWG, Klein WR, Ruitenberg EJ, Rutten VPMG. Optimal regimens for local IL-2 tumour therapy. *Int J Cancer* 1996;66:400-403

- [9] Druckrey H, Landschütz C, Preussmann R. Oesophagus-Carcinome nach Inhalation von Methylbutyl-nitrosamine (MBNA) an Ratten. *Z Krebsforsch* 1968;71:135-139
- [10] Dünne AA, Plehn S, Schulz S, Levermann A, Ramaswamy A, Lippert BM, Werner JA. Lymph node topography of the head and neck in New Zealand rabbits. *Lab Anim* 2003;37:37-43
- [11] Easty DM, Easty GC. Establishment of an in vitro cell line from the rabbit VX2 carcinoma. *Virchows Arch B (Cell Pathol)* 1982;39:333-337
- [12] Fajardo LF. Lymph nodes and cancer. A review. *Front Radiat Ther Oncol* 1994;28:1-10
- [13] Förg P, Von Hoegen P, Dalemans W, Schirmacher V. Superiority of the ear pinna over muscle tissue as site for DNA vaccination. *Gene Therapy* 1998;5:789-797
- [14] Galasko CS, Haynes DW. Survival of VX2 carcinoma cells in vitro. *Eur J Cancer* 1976;12:1025-1026
- [15] Gadeholt-Göthlin G, Göthlin JH. Comparison of nephrectomy and/or doxorubicin treatment in rabbit renal VX-2 carcinoma. *J Surg Oncol* 1995;58:134
- [16] Gerota D. Zur Technik der Lymphgefäßinjektion. *Anat Anz* 1896;12:216-224
- [17] Greene HSN. The heterologous transplantation of the V-2 rabbit carcinoma. *Cancer Res* 1953;13:610-612

- [18] Harima Y, Harima K, Hasegawa T, Shikata N, Tanaka Y. Histopathological changes in rabbit uterus carcinoma after transcatheter arterial embolization using cisplatin. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 1996;38:317-322
- [19] Harker GJ, Stephens FO. Comparison of intra-arterial versus intravenous 5-fluorouracil administration on epidermal squamous cell carcinoma in sheep. *European Journal of Cancer* 1992;28A:1437-1441
- [20] Hawkins BL, Heniford BW, Ackermann DM, Leonberger M, Martinez SA, Hendler FJ. 4NQO carcinogenesis: a mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma *Head Neck* 1994;16:424-432
- [21] Herman PG, Kim CS, DeSousa MAB, Mellins HZ: Microcirculation of the lymph node with metastases. *Am J Pathol* 1976;85:333-341
- [22] Hoshi S, Mao H, Takahashi T, Suzuki K, Bose M, Orikasa S. Internal iliac arterial infusion chemotherapy for rabbits invasive bladder cancer. *Int J Urol* 1997;4:493
- [23] Inoue K. Experimental studies of metastases of esophageal carcinoma to lymph nodes. Mode of metastases to lymph nodes and effects of irradiation and bleomycin in VX2 carcinoma. *Nippon Geka Hokan* 1977;46:434-447
- [24] Ito N, Kamamoto Y, Hiasa Y, Makiura S, Marugami M, Yokota Y, Sugihara S, Hirao K. Histopathological and ultrastructural studies on esophageal tumors in rats treated with N-nitrosopiperidine. *Gann* 1971;62:445-451
- [25] Jeglum KA, Mangan C, Wheeler JE. Enhanced antitumor effects with intralymphatic delivery using *Bacillus Calmette-Guerin* in animal models. *Cancer Drug Delivery* 1985;31:127-132

- [26] Karanfilian RG, Rush F, Murphy T. Regional vs systemic effect of cis-dichlordiammine platinum (II) on squamous cell carcinoma in rats. *The American Surgeon* 1983;49:116-119
- [27] Kidd JG, Beard JW, Rous PJ. Serological reactions with a virus causing rabbit papillomas which become cancerous. *J Exp Med* 1936;64:79
- [28] Kidd JG, Rous P. A Transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form. *J Exp Med* 1940;71:813-837
- [29] Leak LV. Pathophysiology and pathology of the lymphatic system. In: Abramson DI, Dobrin PB (Hrsg.): *Blood vessels and lymphatics in organ system*. Academic Press, Orlando 1984:164
- [30] Lin MH, Hsieh SC, Li SY, Shih HC, Chiang T, McBride J, Todd R, Chou LSS, Chou MY, Wong DTW. Sequential cytogenic alterations in hamster oral keratinocytes during DMBA-induced oral carcinogenesis. *Oral Oncology, European Journal of Cancer* 1994;30B:252-264
- [31] Lindberg RD. Distribution of cervical lymph node metastasis from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1972;29:1446-1449
- [32] Nauta JM, Roodenburg JLN, Nikkels PGJ, Witjes MJH, Vermey A. Comparison of epithelial dysplasia - the 4NQO rat palate model versus human oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1995;24:53-58
- [33] Matsumoto K, Ninomiya Y, Inoue M, Tomioka T. Intra-tumor injection of an angiogenesis inhibitor, TNP-470, in rabbits bearing Vx2 carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1999; 28:118-124

- [34] Mine H, Nakamura T. Mode of lymph node metastases in esophageal cancer induced in rabbits with Vx2 carcinoma. *Jpn J Surg* 1983;13:236-245
- [35] Miotti R. Die Lymphknoten und Lymphgefäße der weißen Ratte (*Rattus norvegicus* Berkenhout, *Epimys norvegicus*). *Acta Anat* 1965;62:489-527
- [36] Muckle DS, Dickson JA. The selective inhibitory effect of hyperthermia on the metabolism and growth of malignant cells. *British Journal of Cancer* 1971;25:771-778
- [37] Myers JN, Holsinger FC, Jasser SA, Bekele BN, Fidler IJ. An orthotopic nude mouse model of oral tongue squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8(1):293-298
- [38] Osato T, Ito Y. In vitro cultivation and immunofluorescent studies of transplantable carcinomas Vx2 and Vx7. *J Exp Med* 1967;126:881-886
- [39] Päuser S, Wagner S, Lippmann M, Pohlen U, Reszka R, Wolf KJ, Berger G. Evaluation of efficient chemoembolization mixtures by magnetic resonance imaging therapy monitoring: an experimental study on the VX2 tumor in the rabbit liver. *Cancer Res* 1996;56:1863-1867
- [40] Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 2000;355(9208):949-55
- [41] Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Erratum: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;83:18-29

- [42] Rous P, Beard JW. Progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J Exp Med* 1935;62:523
- [43] Rous P, Kidd JG, Smith WE. Experiments on cause of rabbit carcinomas derived from virus-induced papillomas. Loss by VX2 carcinoma of power to immunize hosts against papilloma virus. *J Exp Med* 1952;96:159
- [44] Sander J. Weitere Versuche zur Tumor Induktion durch orale Applikation niederen Dosen von N-Methylbenzyl-amine und Natriumnitrite. *Z Krebsforsch* 1971;76:93-96
- [45] Schouwenburg PF, Van Putten LM, Snow GB. External carotid artery infusion with single and multiple drug regimens in the rat. *Cancer* 1980;45:2258-2264
- [46] Shah SA, Dickson JA. Preservation of enzymatically prepared rabbit VX2 tumour cells in vitro. *Eur J Cancer* 1978;14:447-448
- [47] Shklar G. Experimental oral pathology in the Syrian hamster. *Program Experimental Tumor Research* 1972;16:518-538
- [48] Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits with note on histopathology. *J Exp Med* 1933;58:607
- [49] Sillau AH, Banchemo N. Visualization of capillaries in skeletal muscle by the ATPase reaction. *Pflügers Arch* 1977;369:269-271
- [50] Silvestre-Begniss C. Consideraciones sobre el problema del tratamiento quirúrgico de los ganglios en los cánceres de la laringe. Acta II, Congreso Sudamericano ORL, Montevideo, Uruguay 1944

- [51] Steidler NE, Reade PC. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-nitroquinoline-1-oxide. *Oral Surgery* 1984;57:524-531
- [52] Steward HL, Snell KC, Dunham LJ, Schlyen SM. V2 carcinome, rabbit. In: *Atlas of tumor pathology, transplantable and transmissible tumors of animals, section XII-fascicle 40*. Washington D.C.:AFIP,1959:38-42
- [53] Suárez O. Le problème chirurgical du cancer du larynx. *Ann Oto Laryngol* 1962;79:22-34
- [54] Suárez C, Llorente JL, Nunez F, Diaz C, Gomez J. Neck dissection with or without postoperative radiotherapy in supraglottic carcinomas. *Head Neck Surg* 1993;109:3-9
- [55] Tamargo RJ, Bok RA, Brem H. Angiogenesis inhibition by minocycline. *Cancer Res* 1991;51:672-675
- [56] Tanigawa N, Satomura K, Hikasa Y, Hashida M, Muranishi S, Sezaki H. Surgical chemotherapy against lymph node metastases: an experimental study. *Surgery* 1980;87:147-152
- [57] Teichmann L. *Das Saugadersystem vom anatomischen Standpunkte*. Engelmann, Leipzig 1861
- [58] Tromberg BJ, Orenstein A, Kimel S, Barker SJ, Hyatt J, Nelson JS, Berns MW. In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* 1990;52:375-85

- [59] van Es RJ, Franssen O, Dullens HF, Bernsen MR, Bosman F, Hennink WE, Slootweg PJ. The VX2 carcinoma in the rabbit auricle as an experimental model for intra-arterial embolization of head and neck squamous cell carcinoma with dextran microspheres. *Lab Anim* 1999;33:175-184
- [60] van Es RJ, Baselmans AH, Koten JW, Van Dijk JE, Koole R, Den Otter W: Perilesional IL-2 treatment of a VX2 head-and-neck cancer model can induce a systemic anti-tumour activity. *Anticancer Res* 2000a;20:4163-4170
- [61] van Es RJ, Dullens HF, van der Bilt A, Koole R, Slootweg PJ: Evaluation of the VX2 rabbit auricle carcinoma as a model for head and neck cancer in humans. *J Craniomaxillofac Surg* 2000b;28:300-307
- [62] van Es RJ. The rabbit VX2 carcinoma. Utrecht, Zuidam & Uithof 2001a
- [63] van Es RJ, Nijssen JF, Dullens HF, Kicken M, van der Bilt A, Hennink W, Koole R, Slootweg PJ: Tumour embolization of the Vx2 rabbit head and neck cancer model with Dextran hydrogel and Holmium-poly(L-lactic acid) microspheres: a radionuclide and histological pilot study. *J Craniomaxillofac Surg* 2001b;29:289-297
- [64] Voelkel EF, Tashijan AH jr, Franklin R, Wasserman E, Levine L. Hypercalcemia and tumor-prostaglandins: The VX2 carcinoma model in the rabbit. *Metabolism* 1975;24:973-986



- [65] Wagner S. Benign lymph node hyperplasia and lymph node metastases in rabbits. Animal models for magnetic resonance lymphography. Invest Radiol. 1994;29:364-371
- [66] Werner JA. Untersuchungen zum Lymphgefäßsystem der oberen Luft- und Speisewege, Aachen, Shaker 1995
- [67] Werner JA. Aktueller Stand der Versorgung des Lymphabflusses maligner Kopf-Hals Tumoren. Eur Arch Otorhinolaryngol 1997 (Suppl I): 47-85
- [68] Yoneda T, Kitamura M, Ogawa T, Aya S, Sakuda M. Control of VX2 carcinoma cell growth in culture by calcium, calmodulin and prostaglandins. Cancer Res 1985;45:398-405

## 8 Anhang

Tab. 1 Tumorgröße in Abhängigkeit vom Zeitraum des Tumorwachstums

		Tumorgröße (cm <sup>3</sup> )	Metastasen der Lnn. parotidei (Durchmesser)	histologische Charakteristika	Metastasen der Lnn. caudales mandibulares	histologische Charakteristika
<b>Tötung nach 7 Tagen</b>						
<b>Kaninchen 1</b>	r	2.40	0.1 cm	solide	-	
	l	1.90	-		-	
<b>Kaninchen 2</b>	r	2.88	-		-	
	l	1.68	-		-	
<b>Kaninchen 3</b>	r	2.28	-		-	
	l	3.60	0.2 cm	solide	-	
<b>Kaninchen 4</b>	r	1.96	-		-	
	l	2.18	-		-	
<b>Tötung nach 14 Tagen</b>						
<b>Kaninchen 5</b>	r	2.70	-		-	
	l	2.88	-		-	
<b>Kaninchen 6</b>	r	3.75	0.25 cm	solide	-	
	l	3.78	0.31 cm	-	-	
<b>Kaninchen 7</b>	r	3.75	0.36 cm	solide	-	
	l	4.06	0.39 cm	solide	-	
<b>Kaninchen 8</b>	r	3.98	-		-	
	l	4.54	0.33 cm	solide	-	
<b>Tötung nach 21 Tagen</b>						
<b>Kaninchen 9</b>	r	8.23	-		-	
	l	8.96	0.93 cm	solide, perinodales Wachstum	-	
<b>Kaninchen 10</b>	r	10.40	1.13 cm	solide	-	
	l	3.75	-		-	
<b>Kaninchen 11</b>	r	9.50	0.97 cm	nekrotisch	-	
	l	8.05	0.63 cm	solide	-	
<b>Kaninchen 12</b>	r	6.90	-		-	
	l	8.70	0.77 cm	solide	-	
<b>Tötung nach 28 Tagen</b>						
<b>Kaninchen 13</b>	r	11.20	1.76 cm	solide	0.2 cm	solide
	l	12.88	1.82 cm	nekrotisch	-	
<b>Kaninchen 14</b>	r	17.55	1.84 cm	nekrotisch, perinodales Wachstum	-	
	l	14.04	1.77 cm	solide, perinodales Wachstum	-	
<b>Kaninchen 15</b>	r	11.52	1.93 cm	nekrotisch	-	
	l	10.92	1.84 cm	solide, perinodales Wachstum	-	
<b>Kaninchen 16</b>	r	15.60	-		-	
	l	12.60	1.84 cm	nekrotisch	-	
<b>Tötung nach 32 Tagen</b>						
<b>Kaninchen 17</b>	r	20.80	2.25 cm	nekrotisch	0.25 cm	solide
	l	21.83	1.39 cm	nekrotisch	-	
<b>Kaninchen 18</b>	r	23.52	3.02 cm	nekrotisch	-	
	l	27.44	2.98 cm	nekrotisch	-	
<b>Kaninchen 19</b>	r	18.50	1.26 cm	nekrotisch	-	
	l	16.82	1.68 cm	nekrotisch	-	
<b>Kaninchen 20</b>	r	15.05	2.06 cm	nekrotisch	-	
	l	19.60	2.10 cm	nekrotisch	-	

## **9 Verzeichnis der akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Austermann, Barth, Basler, Coca, Czubayko, Dibbets, Flores-de-Jacoby, Gente, Gudermann, Hasilik, Heeg, Hochbahn, Höffken, Jungclas, Kern, Klötzer, Koolman, Kretschmer, Lang, Lange, Lehmann, Lemke, Lill, Lohoff, Lotzmann, Mueller, Moll, Pieper, Radsak, Rausch, Renz, Röhm, Sommer, Stachniss, Steiniger, Umstadt, Werner, Wisser

## **10 Danksagung**

Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. Jochen A. Werner, Direktor der HNO-Klinik der Philipps-Universität Marburg, für die Möglichkeit, an seiner Klinik über das vorgelegte Thema zu promovieren. Seine kontinuierliche Unterstützung und konstruktive Hilfestellung war unmittelbare Voraussetzung für die praktische Durchführung, Auswertung und Niederschrift dieser Dissertation. Dafür möchte ich ihm sehr herzlich danken.

Mein weiterer und besonders herzlicher Dank gilt Frau Dr. Anja-A. Dünne, wissenschaftliche Mitarbeiterin der HNO-Klinik Marburg, für ihre tatkräftige Unterstützung. Ihr stets verlässlicher Einsatz und ihre Freundschaft haben aus dieser wissenschaftlichen Arbeit eine wertvolle Erfahrung werden lassen, die ich nicht mehr missen möchte.

Herrn Prof. Dr. Robert J.J. van Es (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Medical Center Utrecht, Utrecht, Niederlande) bin ich sehr zu Dank für die Bereitstellung der VX2-Tumorzelllinie zur initialen Tumorinduktion verpflichtet.

Frau Dr. Annette Ramaswamy, Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg, danke ich vielmals für die Hilfestellung bei der histopathologischen Beurteilung der Schnittpräparate.

Herrn Schemken, Tierpflegermeister der Philipps-Universität Marburg, gilt mein Dank für die Ratschläge und Hilfen beim Umgang mit den Kaninchen. Frau Roswitha Peldszus und Frau M. Grazyna Sadowski danke ich für ihren hilfreichen und engagierten Einsatz bei der Herstellung der Zellsuspensionen und der Bearbeitung der histologischen Präparate sowie für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor. Herrn Dr. Immo Rathcke danke ich für die geduldige Einführung in die Planung und Umsetzung wissenschaftlichen Arbeitens und besonders für seine ansteckende Begeisterung für die Welt der HNO.

Meiner Familie, ganz besonders meiner Mutter, und meinen Freunden - darunter insbesondere Tanja, Maggy und Olli - danke ich für ihre ständigen Ermutigungen, nützlichen Diskussionen und Aufmunterungen, wenn einmal nicht alles sofort funktionierte.

## **11 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel 'Untersuchungen zum Lymphabfluss und zur lymphogenen Metastasierung von im Bereich der Ohrmuschel bei weißen Neuseelandkaninchen induzierten VX2-Karzinomen' im Medizinischen Zentrum für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jochen A. Werner mit Unterstützung durch Frau Dr. Anja-A. Dünne ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit werden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht.

Dünne AA, Mandic R, Ramaswamy A, Plehn S, Schulz S, Lippert BM, Moll R, Werner JA. Lymphogenic metastatic spread of auricular VX2 carcinoma in New Zealand white rabbits. *Anticancer Res* 2002 Nov-Dec;22(6A):3273-9

Dünne AA, Plehn S, Schulz S, Levermann A, Ramaswamy A, Lippert BM, Werner JA. Lymph node topography of the head and neck in New Zealand rabbits. *Lab Anim* 2003 Jan;37(1):37-43

Marburg, den

Sibylle Plehn