

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire
ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 139 (1997)

Heft: 10

Artikel: Bestimmung der potentiellen Verdopplungszeit von Tumoren mittels Bromodeoxyuridin und Durchflusszytometrie

Autor: Schwyn, U. / Kaser-Hotz, B. / Hauser, B.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-592993>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 29.03.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Veterinär-medizinisches Departement¹ und Institut für Veterinärpathologie² der Universität Zürich;
Institut für medizinische Radiobiologie³ des Paul Scherrer Instituts, Villigen, und der Universität Zürich

Bestimmung der potentiellen Verdopplungszeit von Tumoren mittels Bromodeoxyuridin und Durchflusszytometrie

U. Schwyn¹, B. Kaser-Hotz¹, B. Hauser², G. Fodor¹, H. Ruckstuhl¹, N.E.A. Crompton³

Zusammenfassung

Die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors beeinflusst die Prognose und die Planung der Therapie wesentlich. Für den Tumorpatienten kann die potentielle Tumorverdopplungszeit durch Analyse einer Biopsie nach In-vivo-Injektion von Bromodeoxyuridin mit der Durchflusszytometrie bestimmt werden. Die Methode ist wenig invasiv und liefert innerhalb von 24 Stunden ein für den individuellen Patienten repräsentatives Resultat. Diese Arbeit erläutert die Bestimmung der potentiellen Tumorverdopplungszeit und präsentiert Resultate von Tumoren bei Hunden und Katzen.

Schlüsselwörter: Tumor – Markierung in vivo – Bromodeoxyuridin – Durchflusszytometrie (flow cytometry) – Prognose – Therapiewahl – Therapieerfolg

Determination of potential doubling time through bromodeoxyuridine and flow cytometry

Tumor growth-rate affects prognosis and treatment planning. The injection of bromodeoxyuridine in dogs and cats permits determination of the potential doubling time following a biopsy of neoplastic tissue and flow cytometric analysis. The essentially non-invasive method gives exact results within 24 hours. This report describes a method to measure potential tumor doubling time of different tumors, and presents results of canine and feline tumors.

Key-words: tumour – labeling in vivo – bromodeoxyuridine – flow cytometry – prognosis – choice of therapy – success of therapy

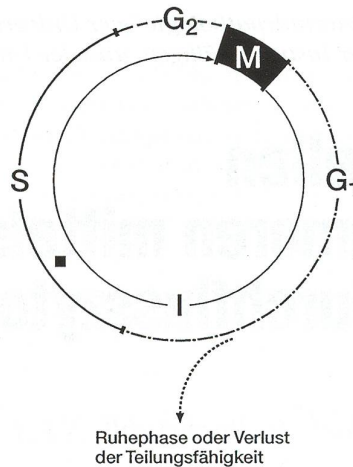
Einleitung

Krebs wird bei Hunden und Katzen immer häufiger diagnostiziert. Als Entscheidungsgrundlage zur Therapie oder Euthanasie werden verschiedene Untersuchungsmethoden zu Hilfe genommen. Zuerst gibt eine sorgfältig erhobene Anamnese Hinweise auf das Wachstumsverhalten des Tumors. Mit bildgebenden Verfahren kann die Grösse und die Lokalisation eines Tumors bestimmt werden. Zytologische und histopathologische Resultate erlauben eine Aussage über den Tumortyp und den histologischen Grad des Tumors. Aufgrund dieser Daten wird dann eine Prognose formuliert und darauf gestützt eine Therapie in Betracht gezogen. Das Tumorwachstum beeinflusst den Therapieerfolg. Leider geben sowohl hi-

stologische als auch röntgenologische Untersuchungen nur sehr grobe Anhaltspunkte über das effektive Tumorwachstum. Innerhalb des gleichen Tumortyps oder des gleichen radiologischen Bildes kann das Tumorwachstum, abhängig von der Lokalisation, sehr unterschiedlich sein. Es ist natürlich möglich, den Tumor über einen gewissen Zeitraum zu beobachten oder serielle Röntgenbilder anzufertigen. Man verliert aber dabei wertvolle Zeit, wenn es darum geht, wirkungsvoll ein Tumorleiden zu behandeln. Eine Methode, mit welcher das Tumorwachstum vorausgesagt werden könnte, wäre zur Beratung der Besitzer und Tierärzte sehr erwünscht.

1985 wurde von A.C. Begg et al. ein neues Verfahren vorgestellt, mit welchem die potentielle Tumorverdopp-

Abbildung 1:
Schematische
Darstellung des
Zellzyklus.
M = Mitose;
I = Interphase,
bestehend aus G_1 =
postmitotischer
Phase,
S = DNS-Synthese-
Phase und G_2 =
prämitotischer Phase.



lungszeit *in vivo* bestimmt werden kann. Während die In-vitro-Bestimmung der potentiellen Tumorverdopplungszeit mit radioaktiv markiertem Thymidin schon seit längerer Zeit etabliert ist (Steel, 1966), wurde eine In-vivo-Methode erst durch die Herstellung von Anti-BrdUrd-Antikörpern und anschließender Durchflusszytometrie ermöglicht. Bei diesem Verfahren wird intravenös eine Substanz injiziert, welche in der S-Phase des Zellzyklus in die DNS eingebaut wird (Abb. 1). Nach 4–6 Stunden wird eine Biopsie entnommen und nachfolgend mit dem Durchflusszytometer (Flow Cytometer) analysiert. An die markierten Zellen bindet ein monoklonaler, Fluoresceinisothiozyanat-markierter Antikörper. Die Gesamtfluoreszenzstärke der markierten Zellen wird beim Beleuchten im Durchflusszytometer gemessen. Es besteht ein grosses Interesse, genauere Angaben über das Wachstumsverhalten von Tumoren bei unseren Haustieren zu gewinnen. Ziel dieser Studie war es, diese Methode, welche bereits in der Humanmedizin (Giordano et al., 1991; Begg, 1989) und auch der Veterinärmedizin (LaRue, 1995; Vail, 1993) angewendet wird, bei unseren Krebspatienten einzusetzen und die Durchführbarkeit für verschiedene Tumortypen bei Hunden und Katzen zu überprüfen. In diesem Artikel wird die Methode erläutert, und es werden erste Resultate präsentiert. Das noch geringe Zahlenmaterial erlaubt keine detaillierte statistische Analyse.

Tiere, Material und Methode

Für diese Studie standen Hunde und Katzen zur Verfügung, welche am Tierspital Zürich zur Abklärung eines Tumorleidens vorgestellt wurden. Es handelte sich um Hunde und Katzen mit Tumoren verschiedener Grössen und unterschiedlichen Lokalisationen. Die Besitzer wurden jeweils über die Methodik und das Ziel der Arbeit aufgeklärt, bevor sie sich zur Teilnahme an der Studie entschieden. Diesen Tieren wurde dann 4–6 Stunden vor der chirurgischen Exzision oder der Biopsieentnahme Bromodeoxyuridin (BrdUrd) intravenös injiziert. Das Bromodeoxyuridin ist eine pulverförmige Substanz,

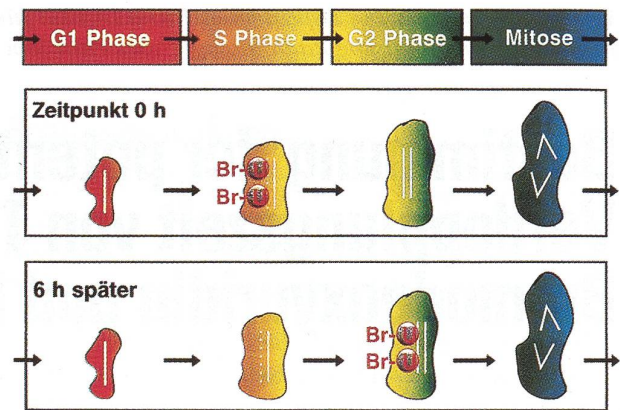
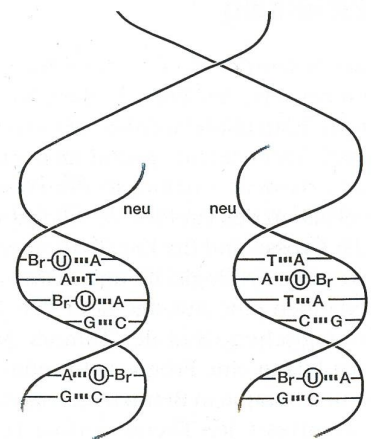


Abbildung 2: Bestimmung der Zellteilungsgeschwindigkeit. Zum Zeitpunkt 0 h sind nur Zellen in der S-Phase mit BrdUrd markiert. Diese haben zwischen 1 und 2 Kopien der DNS (durchschnittlich 1.5). Nach 6 h sind diese Zellen weiter durch den Zellzyklus in die G_2 -Phase gewandert und haben 2 vollständige Kopien der DNS.

welche in steriler, pyrogenfreier, physiologischer Kochsalzlösung gelöst wird. Diese Substanz wurde schon mehrfach in der Humanmedizin verwendet. Bei in der Humanmedizin üblicher Dosierung und einmaliger Injektion wurden keine Nebenwirkungen festgestellt (Begg et al., 1985; Cooke et al., 1994; Giordano et al., 1991; Popert et al., 1993). Auch in der Veterinärmedizin wurde diese Substanz schon bei mehr als 100 Hunden mit einem Tumorleiden angewendet (LaRue et al., 1994). Uridin ist eine Pyrimidin-Base wie das Thymidin. Das Bromodeoxyuridin im speziellen ist ein Thymidin-Analogon und wird während der S-Phase des Zellzyklus anstelle des Thymidins in die DNS eingebaut (Abb. 2 und 3). Das nicht in die DNS inkorporierte Bromodeoxyuridin wird im Körper in 2 Schritten abgebaut: 1. durch eine enzymatische Dehalogenierung, d.h. durch Abspaltung des Halogens Brom mit Hilfe einer Dehalogenase und 2. durch die Phosphorylierung des Uridins. Die Abbauprodukte werden innerhalb von 24 Stunden zu mehr als 70% über Niere und Darm wieder ausgeschieden.

Abbildung 3:
DNS während der
Duplikation =>
Einbau des
Bromodeoxyuridins
anstelle der
Pyrimidin-Base
Thymidin.



Von der chirurgisch entnommenen Masse wurden zwei Biopsiestücke aus der Peripherie des Tumors, d.h. aus einer nicht nekrotischen Stelle, entnommen. Das eine Stück wurde in Formaldehyd für die histologische Untersuchung und die Bestimmung des Mitoseindex eingelegt (B. Hauser). Der Mitoseindex wird mikroskopisch im histologischen Schnitt durch Auszählung der vorhandenen Mitosen der Tumorzellen in einem genau definierten Feld (bei 400facher Vergrößerung = 0.1734 mm^2) bestimmt. Er wird auch als Zellteilungsindex bezeichnet und gibt zum Beobachtungszeitpunkt die Anzahl von sich in Teilung befindenden Zellen einer bestimmten Zellpopulation in 10 Feldern bei 400facher Vergrößerung an. Das zweite Stück wurde in 50%igem Äthanol fixiert und danach für mindestens 12 Stunden im Kühlschrank gelagert, damit das Stück bis ins Zentrum gut fixiert war. Letztere Probe in 50%igem Äthanol wurde für die Bestimmung der potentiellen Verdopplungszeit verwendet.

Die Proben wurden nach folgendem Protokoll im Labor für Durchflusszytometrie am Institut für medizinische Radiobiologie des Paul Scherrer Instituts zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und für die Durchflusszytometrie vorbereitet:

Ein kleines Gewebestückchen von ca. 3 mm^3 Volumen, möglichst nur aus Tumorzellen bestehend, wurde mit dem Skalpell zu sehr kleinen Gewebsbröckchen zerkleinert. Diese Gewebstückchen wurden in 4 ml einer Pepsin/HCl-Lösung hineingegeben (0.4 mg Pepsin/ml 0.1 N HCl) und 20 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Der Überstand, bestehend nach diesen 20 Minuten aus Pepsin, HCl und Zellen, wurde mit einer Spritze aufgesogen und durch einen $40\text{-}\mu\text{m}$ -Filter in ein Probenröhrchen hindurchgepresst. Nun wurde die gefilterte Zellsuspension bei 1300 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert.

Die Flüssigkeit über dem nun sichtbaren Pellet wurde abgesogen, und es wurde eine Pufferlösung (HBSS = Hanks Balanced Salt Solution[®]) zugegeben, um das Pellet wieder aufzulösen. Diese Lösung wurde nochmals zentrifugiert (1300 U/min; 5 min) und der Überstand abgesogen. Zum Pellet wurde nun $500 \mu\text{l}$ 2 N HCl zugegeben, gemischt und im Wasserbad bei 37°C 10 Minuten inkubiert. Zu dieser Suspension wurde danach $1000 \mu\text{l}$ der vorhin erwähnten Pufferlösung zugegeben, die Lösung zentrifugiert und der Überstand über dem Pellet wieder abgesogen.

Danach wurden die Zellen 2mal mit der Hanks-Pufferlösung gewaschen. Nach den 2 Waschschrritten wurden $100 \mu\text{l}$ Hanks-Pufferlösung und $20 \mu\text{l}$ des FITC(Fluoresceinisothiocyanat)-markierten Anti-BrdUrd-Antikörpers zugegeben, um das in der DNS inkorporierte BrdUrd zu erkennen, und während 25 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 3 ml Hanks zugegeben, alles zentrifugiert und der Überstand abgesogen. Dieses Sediment wurde, um den DNS-Gehalt jeder Zelle zu messen, mit $1000 \mu\text{l}$ Hanks in Suspension gebracht und nach Zugabe von $20 \mu\text{l}$ Propidiumjodid im Kühlschrank mindestens 10 Minuten inkubiert. Die so

entstandene und angefärbte Einzelzellsuspension konnte dann im Durchflusszytometer analysiert werden.

Das Prinzip des Durchflusszytometers besteht darin, dass die Zellen in einer Trägerflüssigkeit im «Gänsemarsch» an einer Laser-Lichtquelle vorbeigeführt werden. Der Laser sendet Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm aus. Das Licht regt Propidiumjodid und das Fluoresceinisothiocyanat (FITC) des Antikörpers zur Fluoreszenz an. Die gesamte DNS wurde mit Propidiumjodid angefärbt und fluoresziert somit rot. Diejenige DNS, welche Bromodeoxyuridin eingebaut hat und mit einem FITC-markierten Anti-BrdUrd-Antikörper versehen wurde, fluoresziert im Laser dagegen grün (Rew et al., 1992). Neben dem Fluoreszenzlicht wird auch das an den Zellen gestreute Licht für jede einzelne Zelle gemessen. Während vorwärts gestreutes Licht mit dem Zellvolumen korreliert, gibt das seitlich gestreute Licht Aufschluss über die inneren Zellstrukturen wie Granularität oder Kernsegmentierung.

Die Daten von 10 000–50 000 Zellen werden erfasst und in verschiedenen Graphiken dargestellt (Carlton et al., 1991; Raffael, 1988). Zuerst wird der DNS-Gehalt (x-Achse) gegenüber der Häufigkeit der Zellen (y-Achse) aufgetragen. Dies ergibt die Verteilung der Zellen über die Zellzyklusphasen G_1 , S und G_2/M einer Probe (Abb. 4). Abbildungen 5a–c zeigen eine durchflusszytometrische Analyse eines intestinalen Tumors bei einem Hund. Bei diesem Beispiel sind zwei G_1 -Maxima zu erkennen (Abb. 5a), wobei das erste den gesunden ruhenden Zellen entspricht (normales Gewebe), und nur das zweite der G_1 entspricht den Tumorzellen. Es ist sofort zu erkennen, dass diese Tumorzellen mehr DNS enthalten, es handelt sich also um einen aneuploiden Tumor. Dann wird der BrdUrd-Gehalt der Zellen (x-Achse) gegenüber der Häufigkeit der Zellen (y-Achse) aufgetragen. Dies ergibt die Frequenz der S-Phase-Zellen (Labelling Index) zum Zeitpunkt der BrdUrd-Markierung (Abb. 5b). Die Zweiparameterdarstellung (Abb. 5c) stellt die Fluoreszenzstärke

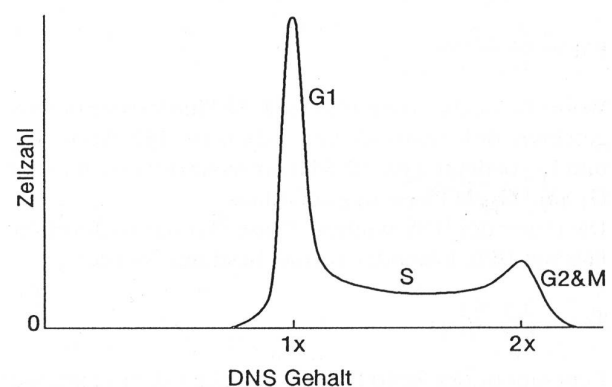


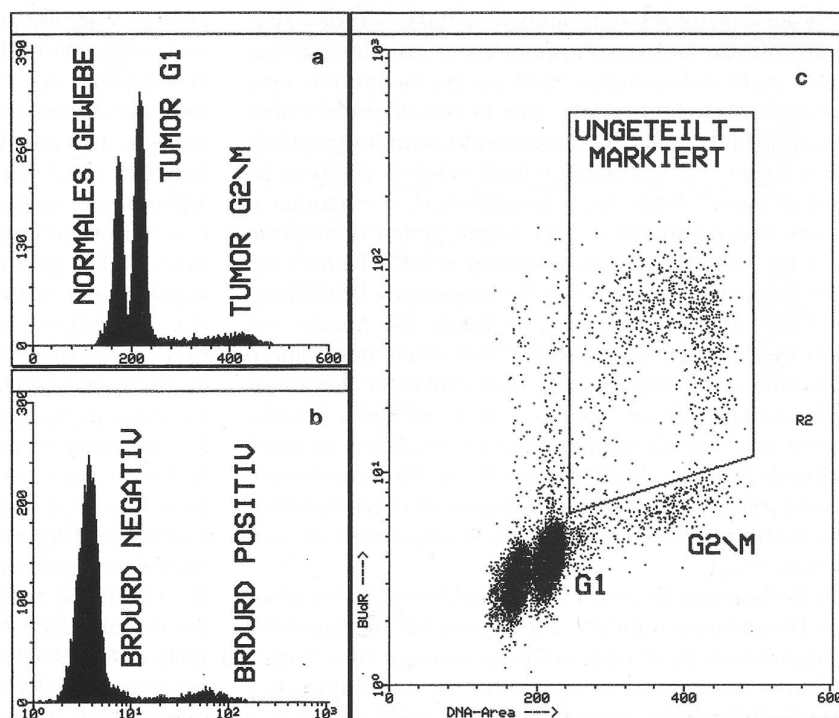
Abbildung 4: Histogramm der DNS mit den Zellphasen G_1 , S und G_2/M . Der relative DNS-Gehalt (x-Achse) ist gegenüber der Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Der DNS-Gehalt wird im Verhältnis zur G_1 -Phase diploider Zellen ($= 1\times$) dargestellt.

Abbildung 5: Beispiel einer Biopsie-Analyse eines sich schnell teilenden Tumors (intestinaler Mastzelltumor) eines Hundes. Die Analyse der Probe ergab eine potentielle Tumorverdopplungszeit (T_{pot}) von 3.46 d.

5a: DNS-Histogramm. Der DNS-Gehalt (x-Achse) ist gegenüber der Häufigkeit der Zellen (y-Achse) aufgetragen.

5b: Histogramm des in die Zellen eingebauten BrdUrd: Der BrdUrd-Gehalt der Zellen (x-Achse) ist gegenüber der Häufigkeit der Zellen (y-Achse) aufgetragen.

5c: Zweiparametrische «Dot-Plot»-Graphik. Der DNS-Gehalt (x-Achse) ist gegenüber des BrdUrd-Gehaltes (y-Achse) einer jeder einzelnen Zelle aufgetragen.



des BrdUrd pro Zelle der totalen DNS pro Zelle gegenüber. Jeder Punkt entspricht somit einer Zelle, und man kann dadurch die jeweiligen Zellhaufen zuordnen. Die eingerahmte Zellagglomeration oben rechts entspricht den ungeteilten, BrdUrd-markierten Zellen. Dadurch, dass die mittlere Fluoreszenzstärke jeder Zellgruppe bestimmt werden kann, ist es möglich, mit den im folgenden beschriebenen Formeln die potentielle Verdopplungszeit zu bestimmen (Raffael, 1988).

Nachfolgend wird die Berechnung der potentiellen Verdopplungszeit von Tumoren gezeigt (Begg et al., 1985). Als erstes wird die relative Bewegung (RM = Relative Movement) der Zellen durch die S-Phase mit der Gleichung berechnet:

$$RM = \frac{F_L - F_{G1}}{F_{G2} - F_{G1}}$$

Wobei F_L die durchschnittliche DNS-Fluoreszenz der ungeteilten BrdUrd-markierten Zellen ist. Die Werte F_{G1} und F_{G2} bedeuten die DNS-Fluoreszenz der Zellen in der G_1 - und G_2 /M-Phase des Zellzyklus.

Die Dauer der DNS-Synthese-Phase (T_s) kann dann ebenfalls mit Hilfe folgender Formel bestimmt werden:

$$T_s = \frac{0.5 \times t}{RM - 0.5}$$

t entspricht der Zeitdifferenz zwischen dem Zeitpunkt der BrdUrd-Injektion und dem Zeitpunkt der Biopsiefixation. Die zwei Faktoren 0.5 in der Formel besagen, dass zum Zeitpunkt der Markierung F_L die durchschnittliche DNS-Fluoreszenz der BrdUrd-markierten Zellen annäherungsweise auf halbem Weg zwischen den G_1 - und G_2 -Werten ist. Das heisst, dass RM zum Zeitpunkt der

Markierung, also zum Zeitpunkt Null, annäherungsweise 0.5 ist. Es wird angenommen, dass die Zellen mit einer konstanten Geschwindigkeit durch die S-Phase laufen. Schliesslich wird die potentielle Verdopplungszeit der Zellen bestimmt mit der Formel:

$$T_{pot} = \frac{\lambda \times T_s}{LI}$$

λ ist der Faktor, welcher die exponentielle Verteilung der Zellen im Zellzyklus berücksichtigt und LI (Labelling Index) der Markierungsindex, welcher die Fraktion der Zellen beschreibt, welche sich in der DNS-Synthese befinden.

Resultate

Wir konnten bei 44 Tieren BrdUrd injizieren und nachfolgend eine histologische Untersuchung sowie die oben erwähnte Analyse durchführen. Bei 4 Patienten wurden die Biopsien aus einer nekrotischen und/oder entzündlichen Zone des Tumors entnommen und ergaben zum Teil weder histologisch noch in der T_{pot} -Bestimmung ein brauchbares Resultat. Bei einem 5. Patienten wurde von einer Masse an der Pfote eine Biopsie genommen und als Leckgranulom diagnostiziert. Bei einem 6. Fall stellte sich die Veränderung der Milz als Malpighiom (reaktive Hyperplasie der weissen Pulpa) heraus. Die letzten 2 Resultate werden nicht berücksichtigt, da es sich dabei nicht um Tumoren handelt.

Bei 38 gesammelten Fällen verschiedenartiger Tumoren konnte die potentielle Verdopplungszeit bestimmt werden. Das Signalement, die histologische Diagnose, der

Tabelle 1: Signalement der Patienten, Histologie, Mitoseindex und Resultate der potentiellen Verdopplungszeiten (in Tagen, d) der untersuchten Tumoren von Hunden.

Signalement				Histologie	Mitoseindex	T _{pot}
Rasse	Geschlecht	Alter (J)	Tumortyp und Lokalisation		Mitosen/ 1.734 mm ²	
1	Boxer	m	11	Hämangiosarkom, Lunge	25	24.42
2	Boxer	wk	12	Hämangiosarkom, Abdomen	5	28.25
3	Boxer	m	11	Hämangiosarkom, Prostata	53	112.92
4	Terrier Corgi	m	13	Fibrosarkom, periostal, links gestielt im Pharynx	-	6.83
5	Mischling	m	0.7	Fibrosarkom, Oberkiefer Caninus -P ₃	1	18.42
6	Mischling	w	10	Fibrosarkom, über Sakrum	6	26.08
7	Mischling	wk	11	Hämangioperizytom, Oberschenkel	55	7.33
8	Golden Retriever	m	9	T-Zell-Lymphosarkom, Mesenterial-Lymphknoten	34	25.42
9	Schnauzer	m	12	Plattenepithelkarzinom, verhornend, Pfote	39	3.67
10	Spaniel	w	15	Plattenepithelkarzinom, nicht verhornend, Gingiva	58	5.17
11	Deutscher Schäferhund	w	4	Schweissdrüsenkarzinom, Carpus bis Scapula	37	3.71
12	Leonberger	m	9	Schweissdrüsenkarzinom, Poplitealbereich	6	40.92
13	Dackel	w	11	kombiniertes Karzinom, Lunge	54	9.83
14	Dogge	wk	8	Adenokarzinom, differenzierter Typ, Lunge	17	62.92
15	Spaniel	mk	10	Perianaldrüsenkarzinom, Metastase in Beckenhöhle	59	1.13
16	Mischling	m	11	Perianaldrüsenkarzinom, links & ventral des Anus	24	6.25
17	Mischling	wk	11	Perianaldrüsenkarzinom, Anus rechts	72	9.17
18	Dackel	mk	11	Karzinom vom Pankreasausführungsgang	44	5.75
19	Schnauzer	m	7	Perianaldrüsenadenom, links des Anus	0	46.79
20	Dackel	w	8	Mammamisch tumor, 4. Komplex links	1	35.96
21	Dobermann	wk	8	Mastozytom, multiple kutane Knoten	11	8.92
22	Boxer	w	5	Mastozytom, Oberschenkel	2	18.29
23	Schnauzer	wk	8	Mastozytom, Knoten dorsal neben LWS	0	139.42
24	Sennenhund Berner	w	5	Epulis, akanthomatös & fibromatös, Oberkiefer P ₃	7	8.50
25	Sennenhund Berner	m	9	Epulis, akanthomatös & fibromatös, Oberkiefer P ₂	6	8.67
26	Terrier	m	14	Melanom, Oberkiefer Palatum durum	94	3.04
27	Dackel	mk	7	Mesotheliom, Abdomen	32	4.17
28	Terrier Airdale	wk	9	Lipom, Mitte Tibia bis Mitte Femur	0	28.25

Mitoseindex sowie die errechnete potentielle Tumorverdopplungszeit sind in Tabelle 1 (Hunde) und Tabelle 2 (Katzen) aufgelistet.

Es ist beim Vergleich der erhaltenen Verdopplungszeiten ersichtlich, dass innerhalb desselben histologischen Tumortyps und auch zwischen den verschiedenen Tu-

mortypen eine grosse Variabilität der Tumorverdopplungszeiten und auch der Mitoseindizes besteht. Die Verdopplungszeiten der Sarkome bei Hunden zeigen z.B. einen Minimalwert von 6.83 d und einen Maximalwert von 112.92 d; der Medianwert beträgt 24.92 d. Die Verdopplungszeiten der Karzinome bei Hunden zeigen ei-

Tabelle 2: Signalement der Patienten, Histologie, Mitoseindex und Resultate der potentiellen Verdopplungszeiten (in Tagen, d) der untersuchten Tumoren von Katzen.

Signalement				Histologie	Mitoseindex	T _{pot}
Rasse	Geschlecht	Alter (J)	Tumortyp und Lokalisation		Mitosen/ 1.734 mm ²	
1	Hauskatze	mk	16	Fibrosarkom, Rezidiv, dorsal zwischen Scapulae	76	3.21
2	Khmer	mk	14	Fibrosarkom, Gingiva Unterkiefer rechts	31	5.04
3	Hauskatze	wk	11	Fibrosarkom, Thorax bis kaudaler Scapularand	21	13.04
4	Hauskatze	wk	8	Fibrosarkom, Rezidiv, kranialer Scapularand / Hals	48	15.88
5	Hauskatze	mk	12	Plattenepithelkarzinom, nicht verhornend, Zungengrund	107	5.04
6	Hauskatze	wk	13	Plattenepithelkarzinom, über Kiefergelenk	-	10.46
7	Hauskatze	mk	15	Plattenepithelkarzinom, Palatum durum	59	20.75
8	Hauskatze	w	13	Mamma-Adenokarzinom, 1./2. Mammarkomplex	62	1.92
9	Hauskatze	w	13	Mastozytom, Jejunum	49	3.46
10	Hauskatze	w	13	Myxosarkom, Beckenbereich bis Mitte Oberschenkel	-	6.79

nen Minimalwert von 1.13 d und einen Maximalwert von 62.92 d; der Medianwert beträgt 7.71 d. Bei den Verdopplungszeiten der Sarkome bei Katzen ergibt sich ein Minimalwert von 3.21 d und ein Maximalwert von 15.88 d; es lässt sich ein Medianwert von 9.04 d errechnen. Bei den Verdopplungszeiten der Karzinome bei Katzen ist der Minimalwert 1.92 d und der Maximalwert 20.75 d; der Medianwert beträgt 7.75 d.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenste Tumortypen markiert, biopsiert und mit dem beschriebenen Protokoll analysiert. Diese Studie hat gezeigt, dass verschiedene Tumoren bei Hunden und Katzen mit der Durchflusszytometrie beurteilt werden können. Das Resultat, die potentielle Tumorverdopplungszeit (T_{pot}), liegt in weniger als 24 Stunden vor, wenn die Biopsie über Nacht im Äthanol fixiert wird und die Aufbereitung der Probe am nächsten Tag erfolgt. Die Methode ist somit für die klinische Anwendung tauglich.

Mit der vorliegenden Methode wird die potentielle Verdopplungszeit der Tumorzellen bestimmt, weil die tatsächliche Verdopplung des Tumorzellvolumens nicht nur durch die teilungsfähigen Tumorzellen bestimmt wird, sondern auch durch Zellen, die absterben. Diese Differenz zwischen potentieller Tumorverdopplung und effektiver Tumorverdopplung fasst man unter dem Begriff «Cell loss factor» oder Zellverlust zusammen. Tumoren können daher langsamer wachsen, als mit der bestimmten potentiellen Tumorverdopplungszeit vorausgesagt wurde. Zu diesem Zellverlust tragen verschiedene Faktoren bei: Der Tod von Zellen durch inadäquate Ernährung infolge Verdrängung dieser Zellen von Blutgefässen, defekte Mitosemechanismen, immunologische Abwehr oder die Abschwemmung von Zellen in der Blutbahn, wobei die Abschwemmung zu Metastasen führen kann. Zudem neigen epitheliale Zellen zur Exfoliation. Daher zeigen Karzinome im Vergleich zu Sarkomen einen grösseren Zellverlust. Dieser beträgt bei den Sarkomen bis zu 30% und bei den Karzinomen bis zu 70% (Denekamp, 1972). Ein Karzinom mit gleicher Zellzahl wie ein Sarkom spricht auf eine Therapie vermeintlich schneller an, weil neben der Zerstörung der Tumorzellen durch die Therapie zusätzlich ein grosser Zellverlust vorhanden ist.

Neben den teilenden Zellen besteht eine Zellpopulation auch aus ruhenden, sich nicht teilenden Zellen, die mit der beschriebenen Methode berücksichtigt werden, obwohl sie kein Bromodeoxyuridin aufnehmen. Bei soliden Tumoren kann der Anteil ruhender Zellen bis zu 15% des gesamten Tumors ausmachen (Hall, 1988). Ihre Bestimmung kann durch Injektion von Tritium-Thymidin und nachfolgender Autoradiographie erfolgen (Dold et al., 1993).

Bei den von uns untersuchten Tumorbiospien wurden stark variierende potentielle Tumorverdopplungszeiten bestimmt. Dies auch für Tumoren der gleichen Histolo-

gie. Die gleiche Beobachtung haben bereits LaRue et al. gemacht, die Biopsien von Osteosarkomen bei Hunden untersuchten. In derselben Studie wurde auch die Heterogenität innerhalb eines einzelnen Tumors bestimmt, indem mehrere Biopsien an verschiedenen Lokalisationen entnommen wurden. Auch intratumoral konnten Unterschiede der potentiellen Tumorverdopplungszeit erfasst werden, die Variation war aber wesentlich geringer als zwischen den untersuchten Hunden. Bei einem Tumor stammen die entarteten Zellen vermutlich aus einer einzigen oder aus wenigen Zelllinien. Dadurch ist das biologische Verhalten innerhalb des Tumors für alle Zellen ähnlich. Bei wenig differenzierten Neoplasien kann jedoch ein und derselbe Tumor aus verschiedenen Subpopulationen bestehen (Rew et al., 1991; Begg et al., 1988). Wenn nur eine einzelne Biopsie entnommen wird, besteht besonders bei schlecht differenzierten Tumoren die Gefahr, dass die potentielle Tumorverdopplungszeit unter- oder überschätzt wird. Daher scheint es empfehlenswert, mehr als eine Biopsie zu entnehmen und den Mittelwert der potentiellen Tumorverdopplungszeit dieser Proben zu ermitteln. In der Klinik ist es leider aus praktischen Gründen nicht immer möglich, Mehrfachproben zu entnehmen.

Neben der potentiellen Tumorverdopplungszeit wurde in dieser Studie auch der Mitoseindex bestimmt (Tabellen 1 und 2). Dieser Index dient ebenfalls als prognostischer Faktor, der bei gewissen Tumortypen, wie zum Beispiel beim Melanom des Hundes, gut mit der Überlebenszeit des Tieres korreliert (Bostock, 1979). Verschiedene Studien haben eine positive Korrelation zwischen dem Mitoseindex und der potentiellen Tumorverdopplungszeit nachgewiesen (Hall, 1988; Seki et al., 1993; Tarnowski et al., 1993). Auch in unserem beschränkten Zahlenmaterial ist ein Trend in diese Richtung zu sehen, haben doch die meisten Tumoren mit einem hohen Mitoseindex auch eine niedrige potentielle Tumorverdopplungszeit. Der Mitoseindex gibt zu einem bestimmten Zeitpunkt die Anzahl der sich in der Mitose befindenden Zellen in einem histologischen Schnitt einer Biopsie wieder, sagt aber nichts über die Geschwindigkeit aus, mit der sich diese Zellen teilen. Der Labelling Index, diejenige Zellfraktion, welche DNS synthetisiert, ist auf ähnliche Weise auch eine indirekte Funktion der potentiellen Tumorverdopplungszeit.

Mit der Bromodeoxyuridin-Markierung der Zellen und der «Inkubation» dieser Tumorzellen über mehrere Stunden wird *in vivo* die Kinetik der Zellen erfasst. Wir erhalten einen Wert in Tagen, welcher uns sehr genau über die Teilungsaktivität der lebenden Zellen in der biopsierten Masse Auskunft gibt. Dieses Ergebnis kann in der Therapie direkt verwendet werden, indem die zeitlichen Abstände der Chemo- und Strahlentherapien, die sich meist über mehrere Wochen erstrecken, angepasst wird. Der therapeutische Gewinn einer Therapie kann z. B. bei einem sehr rasch wachsenden Tumor verloren gehen, wenn die zeitlichen Intervalle zwischen den einzelnen Therapien zu weit auseinander liegen. Solche Tumoren müssten in kürzeren Abständen therapiert werden.

Die grosse Variabilität der Tumorverdopplungszeiten, auch innerhalb der gleichen histologischen Diagnose, zeigt, dass für jeden an einer Tumorerkrankung leidende Organismus eine individuell abgestimmte Therapie angewendet werden müsste, um einen maximalen therapeutischen Effekt zu gewinnen. Die sehr kurzen Tumorverdopplungszeiten zeigen aber auch, dass die Prognose und daher auch die Aussicht auf Heilung deutlich schlechter wird, wenn Tage oder gar Wochen mit einer Therapie zugewartet wird. Abwarten und Beobachten ist keine adäquate Strategie bei der Betreuung von Krebspatienten. Die besten Aussichten auf eine Heilung des Patienten bestehen, wenn rasch und aggressiv therapiert wird. Je grösser der Primärtumor ist, desto grösser ist auch die Metastasierungstendenz.

Mit dieser Arbeit wurde die Technik der Bestimmung der potentiellen Tumorverdopplungszeit für Tiertumoren etabliert. Weiterführende Studien sollen diesen wertvollen prognostischen Parameter in bezug auf verschiedene Therapien untersuchen.

Literatur

Begg A.C., McNally N.J., Shrieve D.C., Kärcher H. (1985): A method to measure the duration of DNA syntheses and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry* 6, 620-626.

Begg A.C., Moonen L., Hofland I., Dessing M., Bartelink H. (1988): Human tumour cell kinetics using a monoclonal antibody against iododeoxyuridine: intratumour sampling variations. *Radiother. Oncol.* 11, 337-347.

Begg A.C. (1989): Derivation of cell kinetic parameters from human tumours after labelling with bromodeoxyuridine or iododeoxyuridine. *Br. J. Radiology* 13, 113-119.

Bostock D.E. (1979): Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet. Pathol.* 16, 32-40.

Carlton J.C., Terry N.H.A., White R.A. (1991): Measuring potential doubling times of murine tumors using flow cytometry. *Cytometry* 12, 645-660.

Cooke L.D., Cooke T.G., Forster G., Jones A.S., Stell P.M. (1994): Prospective evaluation of cell kinetics in head and neck squamous carcinoma: the relationship to tumour factors and survival. *Br. J. Cancer* 69, 717-720.

Denekamp J. (1972): The relationship between the «cell loss factor» and the immediate response to radiation in animal tumors. *Eur. J. Cancer* 8, 335.

Dold U., Hermanek P., Höffken K., Sack H. (1993): *Praktische Tumorthherapie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 65-66.

Giordano M., Riccardi A., Danova M., Brugnattelli S., Mazzini G. (1991): Cell proliferation of human leukemia and solid tumors studied with in vivo bromodeoxyuridine and flow cytometry. *Cancer Detect Prevention* 15, 391-396.

Hall E.J. (1988): *Radiobiology for Radiologist*. J.B. Lippincott Company Philadelphia 220-228.

LaRue S.M. (1995): Persönliches Gespräch. Colorado State University, comparative oncology unit.

LaRue S.M., Fox M.H., Witbrow S.J., Powers B.E., Straw R.C., Côté R.C., Côté I.M., Gillette E.L. (1994): Impact of heterogeneity in the predictive value of kinetic parameters in canine osteosarcoma. *Cancer Research* 54, 3916-3921.

Popert R.J.M., Joyce A.D., Thomas D.J., Walmsley B.H., Coptcoat M.J. (1993): Bromodeoxyuridine labelling of transitional cell carcinoma of the bladder - an index of recurrence? *Br. J. Urol.* 71, 279-283.

Raffael A. (1988): *Analytical flow cytometry-basics and principles*. Labor Medizin 11, 89-97.

Rew D.A., Wilson G.D., Taylor I., Weaver P.C. (1991): Proliferation characteristics of human colorectal carcinomas measured in vivo. *Br. J. Surg.* 78, 60-66.

Rew D.A., Campbell I., Wilson G.D. (1992): Proliferation indices of invasive breast carcinomas after in vivo 5-bromo-2'-deoxyuridine labelling: a flow cytometric study of 75 tumours. *Br. J. Surg.* 79, 335-339.

Seki H., Konstantinidou A.E., Papaevangelou M., Apostolikas N. (1993): Assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

Détermination du temps potentiel de duplication de tumeurs au moyen de la bromodéoxyuridine et de la cytométrie de passage

La vitesse de croissance d'une tumeur influence profondément le pronostic et la planification de la thérapie. Pour le patient atteint d'une tumeur, le temps potentiel de duplication de la tumeur est déterminé par l'analyse d'une biopsie au moyen de cytométrie de passage après injection in vivo de bromodéoxyuridine. La méthode est peu invasive et révèle en l'espace de 24 heures un résultat représentatif pour le patient. Ce travail décrit la détermination du temps potentiel de duplication et présente des résultats de tumeurs de chiens et de chats.

Determinazione del tempo di raddoppio possibile del tumore tramite la bromodeoxyuridina e la flussocitometria

La velocità di crescita di un tumore influenza in maniera essenziale la prognosi e la pianificazione di una terapia. Il tempo di raddoppio possibile del tumore può essere determinato tramite l'analisi flussocitometrica di una biopsia prelevata dal paziente dopo l'iniezione in vivo della bromodeoxyuridina. Il metodo è poco invasivo e dà entro 24h un risultato rappresentativo per il singolo paziente. Questo lavoro spiega la metodica del tempo di raddoppio possibile del tumore e presenta dei risultati di tumori rilevati presso cani e gatti.

immunoreactivity in exocrine pancreatic carcinomas. *Anticancer Research* 13, 2393-2398.

Steel G.G. (1966): Delayed uptake by tumours of tritium from thymidine. *Nature (London)* 210, 806.

Tarnowski B.I., Donald A., Nicholson J.H. (1993): Automatic quantitation of cell growth and determination of mitotic index using DAPI nuclear staining. *Pediatric Pathol.* 13, 249-265.

Vail D.M. (1993): Analysis of tumor cell-cycle kinetics: a tool for predicting prognosis and treatment response. *Proc. 11th ACVIM Forum*, 778-781.

Dank

Den Tierärzten/Innen der Kleintierklinik danken wir für die Mithilfe bei der Gewinnung der Biopsien.

Herrn Dr. R. Weinreich und Herrn L. Wyer des Paul Scherrer Institutes danken wir für die Herstellung des Bromodeoxyuridins. Zudem wurde das Projekt durch die finanzielle Unterstützung des National-Fonds (3100-040482.94) möglich.

Korrespondenzadresse: Frau Dr. B. Kaser-Hotz, Veterinär-medizinisches Departement, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich

Manuskripteingang: 27. November 1995

DIE EDV-LÖSUNG FÜR GROSS- UND KLEINTIERPRAXEN:



WINDOWS, MAC, DOS

Deutsch, Français, Italiano. Vielseitig, einfach, übersichtlich
...besser.

Amacker & Partner
I N F O R M A T I K

Amacker & Partner, Aemtlerstrasse 30, CH-8003 Zürich, Telefon: 01/463 12 36 - Telefax: 01/463 18 53

«DER SERVICE
ENTSCHEIDET»