

3. Material und Methoden

3.1 Die Tierhaltung und die Tierpflege

Alle Tiere (80 männliche, 4-6 Wochen alte BD IX-Ratten mit einem Aufnahmegewicht von ca. 200-250 g, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden entsprechend den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes unter standardisierten Laborbedingungen mit einem Tag-/Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden eine Woche vor dem geplanten Eingriff in einem eigens für Kleintiere vorgesehenen und klimatisierten Raum (Temperatur 22-24 °C, Luftfeuchtigkeit 50-60%) untergebracht, um einerseits die Gewöhnung der Tiere untereinander und andererseits die Gewöhnung an die neue Umgebung zu gewährleisten. Den Tieren wurde Wasser und Futterpellet (Standardfutter) ad libitum zur Verfügung gestellt. An den Operationstagen wurden die Tiere nüchtern belassen. Engmaschige Kontrollen der Tiere (Atmung, Wachheitsgrad) wurden über zwei Stunden postoperativ durchgeführt. Bei allen Eingriffen erfolgten Gewichtsbestimmungen, um das Wachstum der Tiere im Verlauf beurteilen zu können. Nach neun Wochen wurden die Tiere durch eine Kohlendioxid-Inhalation getötet und durch einen „geblindeten“ Untersucher obduziert. Die Lagerung der Kadaver erfolgte bis zur sachgerechten Abholung durch die Tierkörperverwertung bei -21 °C. Alle Untersuchungen wurden nach dem vom Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit Berlin genehmigten Protokoll durchgeführt.

3.2 Die Zelllinie

Die verwendeten syngenetischen DHD/K12/TRb - Kolonkarzinomzellen (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, United Kingdom) wurden in Dulbeccos MEM (Biochrom, Deutschland) und HAMs F10-Medium (Biochrom, Deutschland) 1:1 mit 10%igem fetalen Rinderserum (Dibco BRL, Deutschland), 2 mmol/l Glutamin (Biochrom, Deutschland) und Penicillin-Streptomycin 1000 IU/ml (Gibco, Deutschland) kultiviert. Zur Herstellung der gewünschten Tumorzellkonzentration erfolgte eine fünfminütige Passagierung mit 0.5% EDTA Trypsin (Trypsinierung) in einer angefeuchteten Atmosphäre von 5% CO₂ und bei 37 °C. Nach der anschließenden Neutralisation des Trypsins durch Zugabe von 5 ml Vollmedium wurde die Zellsuspension für fünf Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert und die Zellpellets in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellzählung wurde in der Neubauer-Zählkammer (0.1 µl) nach der Trypan-Blau-Methode durchgeführt. Hierzu wurde die Zellsuspension ebenso wie das Trypan-Blau in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und unter dem Mikroskop ausgezählt; hierbei

war es gleichzeitig möglich, die Rate an avitalen Zellen einzuschätzen. Entsprechend der Zellzahl erfolgte die Verdünnung der Suspension mit Fertigmedium ohne fetalem Rinderserum und die Abfüllung von jeweils 1 ml in Eppendorfgefäße. Die Gefäße verblieben im Inkubator und wurden vor der Applikation geschwenkt, um abgesunkene Tumorzellen wieder in Suspension zu bringen.

3.3 Das Studiendesign

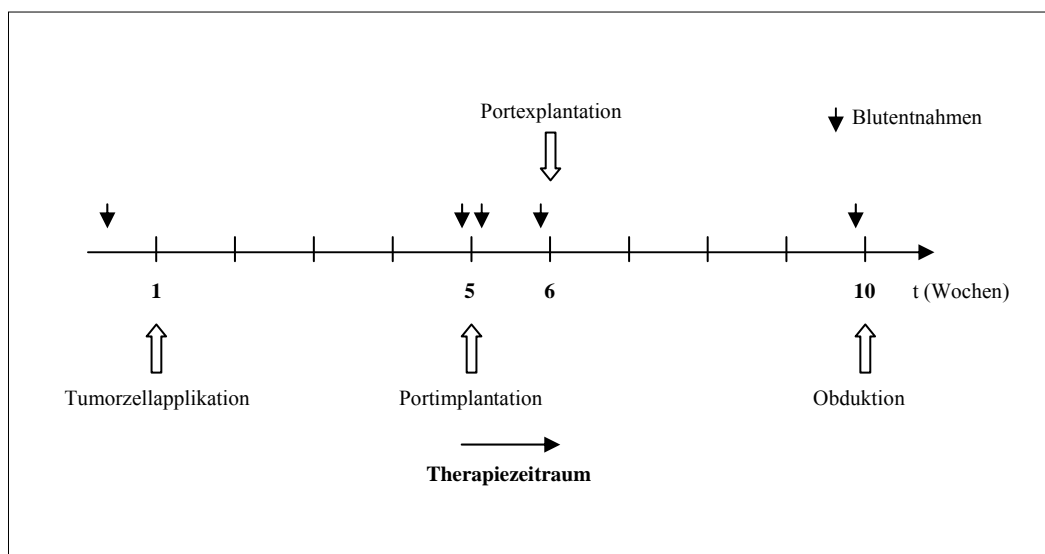


Abbildung 1. Zeitschema der Versuchsreihe

Nach einwöchiger Eingewöhnungszeit für die Tiere (Abbildung 1) wurden die Tumorzellen appliziert. Nach körperrgewichtskorrelierter Pentobarbitalnarkose (0.25 g in 10 ml NaCl; injiziert wurden 10 IE/100 g Körpergewicht) und Eintritt der Narkosewirkung wurden die Tiere am Rücken und am Bauch rasiert und dort desinfiziert. Die Operationszeiten begannen mit dem Hautschnitt und betragen bis zum Beginn der Hautnaht jeweils 30 Minuten. Die Tiere wurden auf dem Rücken gelagert und nach erneuter Desinfektion mit Jod die Bauchdecken durch eine mediane Laparotomie von ca. 4 cm Länge von einem Operateur, der die Therapieform nicht wusste (= geblindet), eröffnet. Zur Simulation realitätsnaher Bedingungen wurde eine etwa 5-minütige Eventeration zur Antrocknung des Darmes in der Hälfte der Operationszeit (15 Minuten) und nach Reponierung die intraperitoneale Applikation der Tumorzellsuspension (2×10^4 Zellen, DHD/K12/TRb) durchgeführt. Am offenen Abdomen wurden die Tumorzellen über das Peritoneum verteilt. Der Wundverschluss der medianen Laparotomie erfolgte zweischichtig durch fortlaufende Naht der Bauchwandmuskulatur mit Vicryl 4/0 sowie fortlaufende Naht der

Haut mit Vicryl 4/0. Nach erneuter Desinfektion mit Jod erfolgte anschließend standardisiert in Bauchlage die subkutane Injektion der Tumorzellsuspension (2×10^4 Zellen, DHD/K12/TRb) in den Rücken der Tiere. Vier Wochen nach der Tumorzellapplikation fand unter Pentobarbitalnarkose die subkutane Portimplantation (Polysulfone-ROP Ports, Access Technologies, Skokie, Illinois, USA) durch den selben Operateur statt. Nach Randomisierung wurde der Katheter entweder in der rechten Vena jugularis interna oder in der Bauchhöhle platziert. Nach Rasur und Desinfektion des Operationsfeldes und anschließendem Freipräparieren der gesuchten Strukturen wurden die Ports subkutan in zuvor präparierte Taschen platziert. Die Katheter wurden je nach Gruppe durch eine Gefäßligatur oder durch Fixation an der Bauchdecke zum Schutz vor Dislokation gesichert. Es erfolgte wiederum ein zweischichtiger Wundverschluss mit Vicryl 4/0. Die Tiere wurden dreimal täglich (achtstündlich = intermittierend) über den Zeitraum von einer Woche (21 Applikationen) durch zwei Mitarbeiter behandelt. Um negative Effekte zu vermeiden, wurden die Agentien (1 ml) vorsichtig mit einer minimalen Infusionsdauer von etwa 15 Sekunden verabreicht. Nach einer Woche (Therapiezeitraum) wurden die Ports wieder entfernt. Nach Rasur und Desinfektion des Operationsfeldes wurde die Haut eröffnet und die Ports durch den selben Operateur explantiert. Nach einer genauen Beurteilung des Situs auf Bluttrockenheit und Infektionszeichen (Entzündungsexsudat) wurde das Operationsfeld sorgfältig gespült und mit Taurolidin 0.5% desinfiziert. Nach der Desinfektion erfolgte ein einschichtiger fortlaufender Wundverschluss der Haut mit Vicryl 4/0. 28 Tage nach der Portexplantation wurden die Tiere durch CO₂-Inhalation getötet und das gesamte intraperitoneale und subkutane Tumorgewicht sowie die Tumoranzahl bestimmt.

3.4 Die Herstellung der unterschiedlichen Taurolidinkonzentrationen

Zur Herstellung der verschiedenen Taurolidinkonzentrationen wurde als Basis Taurolin® 2% (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz) verwendet. Durch Verdünnung mit Ringer-Laktat-Lösung im Verhältnis von 1:1 wurde eine Taurolidinkonzentration von 1% hergestellt. Zur Herstellung einer höchstmöglichen 3%igen Taurolidinkonzentration wurde basierend auf vorherigen Erfahrungen und den Empfehlungen des Herstellers 3.75 g Kollidonpulver (PVP-16) und 1.5 g Taurolinpulver (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz) in auf 65°C erwärmter Ringer-Laktat-Lösung gelöst. Die abgekühlte Lösung wurde im Anschluss auf einen physiologischen pH-Wert von 7.4 eingestellt und durch einen Bakterienfilter (0.2 µm) injiziert, um die hergestellten Taurolidinlösungen keimfrei zu erhalten und ungelöste Kristalle zu

entfernen. Alle Lösungen wurden schließlich mit 10 IE/ml Heparin versetzt, um eine Thrombosierung der Katheter im Laufe der einwöchigen Therapie zu verhindern.

3.5 Taurolidin (intravenös) bei fortgeschrittenen Tumoren in der konventionellen Chirurgie

Gemäß der Randomisierung in 2 x 4 Gruppen erfolgte bei 40 Tieren im Zeitraum von einer Woche alle acht Stunden eine systemische Therapie (siehe Tabelle 1). Unter einer Äther-Kurz-Inhalationsnarkose wurden die unterschiedlichen Konzentrationen der Taurolidinlösungen oder Ringer-Laktat-Lösung über den Port dreimal täglich intravenös appliziert:

Gruppe 1: je 1 ml Taurolidin 1% intravenös (iv) (n = 10)

Gruppe 2: je 1 ml Taurolidin 2% iv (n = 10)

Gruppe 3: je 1 ml Taurolidin 3% iv (n = 10)

Gruppe 4: je 1 ml isotoner Ringerlösung (Kontrollgruppe) iv (n = 10)

3.6 Taurolidin (intraperitoneal) bei fortgeschrittenen Tumoren in der konventionellen Chirurgie

Bei 40 Tieren wurde die lokale einwöchige Infusionstherapie über die Ports intraperitoneal durchgeführt. Die Applikationen der Substanzen erfolgten unter kurzer Äther-Inhalationsnarkose dreimal täglich alle acht Stunden gemäß den randomisierten Gruppen:

Gruppe 5: je 1 ml Taurolidin 1% intraperitoneal (ip) (n = 10)

Gruppe 6: je 1 ml Taurolidin 2% ip (n = 10)

Gruppe 7: je 1 ml Taurolidin 3% ip (n = 10)

Gruppe 8: je 1 ml isotoner Ringerlösung (Kontrollgruppe) ip (n = 10)

	Taurolidin 1%	Taurolidin 2%	Taurolidin 3%	Ringer-Laktat
Intermittierende Therapie (i.v.)	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Intermittierende Therapie (i.p.)	Gruppe 5	Gruppe 6	Gruppe 7	Gruppe 8

Tabelle 1. Randomisierung der Tiere in die jeweiligen Therapiegruppen

3.7 Analyse des Differentialblutbildes

Um einen Einfluss der verschiedenen Taurolidinkonzentrationen nach intravenöser Applikation oder intraperitonealer Resorption auf die Granulozyten zu analysieren, wurden 5 peripher-venöse Blutentnahmen vorgenommen: 7 Tage vor der Tumorzellapplikation, 2 Stunden, 2 Tage sowie 7 Tage nach der Portimplantation und 28 Tage nach der Portexplantation (siehe Abbildung 1). Vor der Blutentnahme wurden die Tiere durch inhaliertes Äther narkotisiert. Mittels einer Glaskapillare wurde das Blut aus dem retrobulbären Plexus entnommen und unter Kühlung (+4°C) in Eppendorfgefäßen gesammelt. Zur Bestimmung des Differentialblutbildes wurden für jedes Tier bei allen Blutentnahmen Ausstriche angefertigt und ausgezählt. Die Blutausstriche wurden auf einem fettfreien Objektträger angefertigt.

Die Bestimmung der peripheren Granulozytenzahlen erfolgte nach erythrozytärer Lyse mit dreiprozentiger Essigsäure aus dem vorher gemischten Vollblut in der Neubauer-Zählkammer. Die Errechnung der Zellzahlen / μl erfolgte bei bekanntem Volumen der Zählkammer (0.1 μl). Anschließend wurde das restliche Vollblut 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (10.000 U/min) und der Überstand in zwei Eppendorfgefäße (jeweils 70-80 μl) aliquotiert. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80 °C.

3.8 Die Bestimmung des intraperitonealen und subkutanen Tumorgewichts

Die Obduktion der Tiere erfolgte 28 Tage nach der operativen Portexplantation (siehe Abb. 1). Die Tiere wurden durch eine CO₂-Narkose getötet. Für die Inspektion des gesamten Bauchraumes wurde ein Kreuzschnitt (para-mediane und quere Laparotomie) durchgeführt. Durch die Schnittführung konnte eine Untersuchung der vorherigen Inzisionen vorgenommen werden und die Ermittlung der Inzidenz von Inzisionsmetastasen erfolgen. Auf standardisierten Bögen wurden die Lokalisation und die Anzahl aller Tumore bzw. Tumorknötchen für jedes Tier dokumentiert (siehe Abbildung 2). Nach sorgfältiger Präparation wurden alle Tumoren und Tumorknötchen des Abdomens gesammelt und deren Gewicht bestimmt. Das Gewicht und das Auftreten von Tumorknoten an den ehemaligen Inzisionen wurden parallel erfasst.

Nach abgeschlossener Untersuchung des Abdomens erfolgte am Rücken der Tiere das Aufsuchen der tastbaren, subkutanen Tumore. Durch eine kaudal des Tumors gelegene, quere Inzision wurde das vollständige Präparieren der Tumore ermöglicht. Die Gewichtsbestimmung der einzelnen Kompartimente (abdominal und subkutan) erfolgte mit einer Präzisionswaage (BP 610, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Proben der gefundenen intraperitonealen sowie

subkutanen Tumorknoten und Metastasen wurden in Formaldehyd eingebettet und für eine histologische Aufarbeitung bei -80 °C kryokonserviert.

3.9 Die Dokumentation der Daten und die statistische Auswertung

Jedes Tier wurde bei der ersten Untersuchung (präoperative Blutentnahme 7 Tage vor der Tumorzellapplikation) durch eine kleine Lochstanze am Ohr eindeutig markiert und erhielt einen Dokumentationsbogen (siehe Abb. 2).

Universitätsklinikum Charité
Abteilung für Experimentelle Chirurgie
PD Dr. Ch. Jacobi

Projektname bzw. Operationsart: _____

Rattenart: _____ Ratten-Nr.: _____

ZEITPLAN

Aufnahmedatum: 2002

Tumorzellapplikation: 2002

Port-Implantation: 2002

Port-Explantation: 2002

Therapiezeitraum: 2002

Obduktion: 2002

Blutentnahmen	Leukozytenzahl (pro µl)
1. Blutentnahme 2002
2. Blutentnahme 2002
3. Blutentnahme 2002
4. Blutentnahme 2002
5. Blutentnahme 2002

Bemerkungen / Besonderheiten

Universitätsklinikum Charité
Abteilung für Experimentelle Chirurgie
PD Dr. Ch. Jacobi

Projektname bzw. Operationsart: _____

Rattenart: _____ Ratten-Nr.: _____

Aufnahmedatum: 2002
OP-Datum: 2002

Aufnahmegewicht: g
OP-Gewicht: g
Obduktionsgewicht: g

Lokalisation:

kl. Becken paraaortal Niere (li) Niere (re)

Netz Pankreas Milz Darm

Mesenterium Zwerchfell Bauchwand Leber

davon an der Wundfläche davon im Leberhilus sonstige

Anzahl:

kl. Becken paraaortal Niere (li) Niere (re)

Netz Pankreas Milz Darm

Mesenterium Zwerchfell Bauchwand Leber

davon an der Wundfläche davon im Leberhilus sonstige

Anzahl gesamt: _____
Gewicht gesamt: _____

Datum: Unterschrift:

Abbildung 2. Protokoll-Bögen zur Dokumentation der erhobenen Daten

In diesem Protokoll wurden der Code für das entsprechende Tier, das Aufnahmedatum, die verschiedenen OP-Daten, das perioperative Gewicht vor den operativen Eingriffen, die Lokalisation und das Gewicht der Tumoren sowie die Leukozytenanzahl zum jeweiligen Zeitpunkt detailliert erfasst.

Bei den nicht normal verteilten Parametern erfolgten die Mittelwertvergleiche aller Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test. Die folgenden Einzelvergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung von alpha-Fehlerkumulierung durchgeführt. Kategoriale Daten wurden mit dem Fisher's-Exact-Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0.05$ festgelegt. Die Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm „SPSS 11.0 für Windows“ durchgeführt. Die Daten im Text wurden als Median und 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes angegeben. Die Grafiken wurden mittels „box-whisker-plots“ dargestellt. Neben dem Median wurden die obere und untere Quartile (box) sowie 1.5 Quartildifferenzen (whisker) abgebildet. Ausreißer werden als kleine Kreise in den jeweiligen Abbildungen dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde ein einheitlicher Maßstab bei der Darstellung der Leukozytenzahlen sowohl bei intravenöser als auch bei intraperitonealer Therapie gewählt.