

3. Material und Methoden

3.1. In-vitro Versuche

3.1.1. Die Zelllinien

Der Effekt von Taurolidin (Taurolidin, Boehringer Ingelheim, Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland) wurde an 5 unterschiedlichen Urothelzelllinien untersucht. Hierbei wurden eine normal differenzierte humane Urothelzelllinie, drei humane Urothelkarzinomzelllinien und eine Urothelkarzinomzelllinie der Ratte untersucht. Die humanen Karzinomzellen wurden aus Harnblasenkarzinomen isoliert. Die folgenden Zelllinien wurden verwendet:

- HCV-29- Urothelzellen des Menschen mit normaler Differenzierung. Diese Zellen stammten aus dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg, Prof. Dr. R. Knüchel- Clarke.
- RT-4, gut differenzierte humane Urothelkarzinomzellen, histologischer Grad G 1 aus einem T2 Tumor (Dr. J. R. W. Masters, University College London, London, UK). Dabei handelt es sich um Zellen eines papilläres Urothelkarzinoms, die sich von einem Tumorrezidiv nach Chemotherapie eines 68jährigen männlichen Patienten mit Harnblasenkarzinom ableiten und aus dessen Harnblase 1968 gewonnen wurden.
- RT-122, mäßig differenzierte humane Urothelkarzinomzellen, histologischer Grad G 2 (Dr. J. R. Masters, University College London, London, UK). Hierbei handelt es sich um nicht-invasive oder invasive Formen des Harnblasenkarzinoms mit histologisch mäßigen Zelltypen. Isoliert wurden die Zellen 1973 aus einem unbehandelten, primären Harnblasenkarzinom einer weiblichen Patientin.
- J-82, schlecht differenzierte humane Urothelkarzinomzellen eines invasiven Tumors (T3, G3), (Human Tumor Cell Bank- HTB). Die Zellen stammen aus einem invasiv wachsenden Harnblasenkarzinom eines 58jährigen männlichen Schweden, und konnten 1972 aus der Harnblase gewonnen werden.
- AY-27, Harnblasenkarzinomzellen der Ratte mit guter Vergleichbarkeit zum menschlichen Harnblasenkarzinom, die ursprünglich in Harnblasen von Fischer F

344 Ratten durch Fütterung mit [4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazoyl] formamid erzeugt, isoliert, kultiviert und konserviert wurden durch Dr. Steve Selman am Medical College of Ohio, Toledo, USA. Die AY-27 Zellen für diese Studie haben wir durch die freundliche Unterstützung von Dr. D. Notter, Marseille, Frankreich erhalten.

Für die Anzucht wurden die Zelllinien als Monolayer- Kultur in einer Lösung aus 90% RPMI 1640 Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) unter Zugabe von L-Glutamin, 100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin (PAA, Laboratory GmbH, Österreich, Linz) in einer Atmosphäre aus 5% Kohlendioxid in 95% Luft bei 37°C gehalten. Zur Ablösung der adhären wachsenden Zellen aus den Zellkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) erfolgte eine Trypsinierung für 5 Minuten mit Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA) (PAA, Laboratory GmbH, Österreich). Nach anschließender Neutralisation des Trypsins durch Zugabe von 5 ml Vollmedium wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert (Labofuge 400 R, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Deutschland) und die Zellpellets in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellzählung wurde in einer Neubauer-Zählkammer (0,1 µl) mit der Trypan-Blau- Färbung durchgeführt. Dabei wurden die Zellsuspension sowie das Trypan-Blau in einem Verhältnis von 1:5 gemischt. Dadurch war die Zählung der avitalen, blau angefärbten Zellen unter dem Mikroskop möglich.

3.1.2. Bestimmung der Zellaktivität bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und Konzentrationen von Taurolidin

Es wurde der Einfluss von acht verschiedenen Konzentrationen von Taurolidin auf die unter 3.1.1. genannten Urothelzellen bzw. Urothelkarzinomzellen mit 3 verschiedenen Einwirkungszeiten untersucht. Hierfür wurde Taurolidin mit RPMI (Wachstumsmedium) gemischt, um Konzentrationen von 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 und 128 µmol/l herzustellen. Jeweils drei Wellplatten wurden pro Zelllinie angesetzt, eine für jede der unterschiedlichen Einwirkungszeiten von 24, 48 und 72 Stunden von Taurolidin auf die verschiedenen Zelllinien. Je 6 der einzelnen mit Zellen besäten Wells einer Platte wurden mit je 100 µl Taurolidinlösung einer Konzentrationsstufe versehen. Die

nächsten 6 Wells erhielten jeweils eine höhere Konzentrationsstufe. Pro Well betrug die Zellzahl 2000.

Tabelle 1: Unterschiedliche Inkubationszeiten und unterschiedliche Konzentrationen von Taurolidin in den in-vitro Taurolidinversuchen

Taurolidinkonzentration [$\mu\text{mol/l}$]	0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128
Einwirkzeit [h]	24, 48, 72
Zellen, human: Ratte:	HCV-29, RT-4, RT-122, J-82 AY-27

3.1.3. Bestimmung der Zellaktivität bei unterschiedlichen Zellzahlen und Konzentrationen von Taurolidin

Es wurde untersucht, inwiefern das Ausmaß der Proliferationshemmung unter Taurolidinzugabe durch unterschiedliche Zellzahlen der Zelllinien in den Versuchsansätzen beeinflusst wird. Hierfür wurde den vier humanen Zelllinien Taurolidin in unterschiedlichen Konzentrationen für 48 h zugesetzt. Pro untersuchter Zelllinie wurden jeweils vier Wellplatten angesetzt mit je 2000, 4000, 6000 und 8000 Zellen pro Well.

Tabelle 2: Unterschiedliche Zellzahl und unterschiedliche Konzentrationen von Taurolidin in den in-vitro Taurolidinversuchen

Taurolidinkonzentration [$\mu\text{mol/l}$]	0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128
Zellzahl pro Well	2000, 4000, 6000, 8000
Zellen, human:	HCV-29, RT-4, RT-122, J-82

3.1.4. Versuchsablauf

Entsprechend der gewünschten Zellzahl erfolgte die Verdünnung der Zellsuspension mit Wachstumsmedium. Mit einer Pipette (Multipipette, Eppendorf) wurden je 100 µl der Zellsuspension auf eine Well-Platte überführt (96er Cellstar Micro- Plate TC, steril, Greiner). Nach Inkubation von 24 Stunden bei 37°C, in welcher die Anheftung der Zellen an ihrem Untergrund erfolgte, wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und 100 µl Taurolidinlösung in den vorher definierten Konzentrationen dazugegeben.

Zur Auswirkung der Inkubationszeit auf das Ausmaß der Hemmung der Zellaktivität durch Taurolidin wurden die 5 Zelllinien jeweils in den 3 Wellplatten für 24 h, 48 h und 72 h Taurolidin in unterschiedlichen Konzentrationen bei 37°C ausgesetzt. Nach Ablauf der jeweiligen Zeitspannen wurde Taurolidin im Überstand abgesaugt und 100 µl frisches Wachstumsmedium substituiert. Die Versuchsansätze wurden einem XTT-Test unterzogen (s.u.).

Zur Auswirkung der Zellzahl der verschiedenen Zelllinien in Kultur auf das Ausmaß der Hemmung der Zellaktivität durch Taurolidin wurden die 4 humanen Zelllinien jeweils in 4 verschiedenen Wellplatten mit Zellkonzentrationen pro Well von 2000, 4000, 6000 und 8000 gesät und für eine festgesetzte Dauer von 48 Stunden Taurolidin in steigenden Konzentrationen bei 37°C und 5% Kohlendioxid in der Umgebungsluft ausgesetzt. Nach Ablauf von 48 h wurde Taurolidin im Überstand abgesaugt und 100 µl frisches Medium substituiert. Die Versuchsansätze wurden wiederum einem XTT- Test unterzogen.

XTT-Test

Als Maß für die Zellaktivität der verschiedenen Zelllinien wurde die mitochondriale Aktivität der behandelten Zelllinien durch Testung mit XTT- Reagenz untersucht (Cell Proliferation Kit II (XTT), Roche Diagnostics GmbH, Deutschland). Die Stoffwechsellleistung von intakten Mitochondrien vitaler Zellen lässt sich durch die Reduktion von XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) zu einem wasserlöslichen Formazan-Salz proportional dokumentieren, welche mit einem Farbumschlag von gelb nach orange der Reagenzien einhergeht. Zum optimalen Ablauf der Reaktion wurde 0,1 ml PMS (phenazine methosulfate) als Elektronenakzeptor (electron- coupling reagent) zu je 5 ml XTT zugefügt, 50 µl dieser Lösung wurden dann jeweils in ein Well der einzelnen

Versuchsansätze gegeben. Bei allen Versuchsansätzen wurde eine Einwirkzeit der XTT-Reagenz für 4 Stunden gewählt. Unmittelbar nach Ablauf der Einwirkungszeit erfolgte eine Auswertung im Spektralphotometer (Anthos HT III, Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Österreich). Dabei werden die zu untersuchende Substanzen Licht eines definierten Spektralbereiches ausgesetzt, bei der die jeweilige Probe ihr Absorptionsmaximum erreicht und die Lichtintensität nach Passage des Lichtes durch die Probe gemessen. Beim Durchtritt von Licht durch einen Stoff wird es bei Auftreffen auf Materie absorbiert oder reflektiert. Dadurch wird der Anteil an durchtretendem Licht geringer. Das Ausmaß ist abhängig von der Substanz als auch der Konzentration, in welcher sie vorliegt, so dass die gemessene Schwächung der Lichtintensität zur Konzentrationsberechnung eines Stoffes benutzt werden kann. Als Maß für die Schwächung der Lichtintensität durch Absorption dient die Extinktion.

Die prozentuale Änderung der Absorption für Licht im Spektralbereich von 492 nm und 690 nm Wellenlänge durch den durch die Reduktion von XTT bedingten Farbumschlages, ließ eine Quantifizierung der Zellvitalität der einzelnen Kulturen zu. Maß für eine Zellaktivität von 100% war die Absorptionsänderung, welche durch eine Kultur ohne Taurolidineinwirkung verursacht wurde. Prozentuale Änderungen der Extinktion waren Maßstab für prozentuale Veränderung der Zellaktivität unter Taurolidineinwirkung.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm Graph Pad Prism 4.03. In parameterfreien Tests für nicht normalverteilte Daten (Mann-Whitney-Test) wurden die Proliferationsaktivitäten (%) in den Zellansätzen miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3.2. In-vivo Versuche

Die Versuche wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt (Genehmigungsnummer: G0306/03).

Um die phänotypischen und zytogenetischen Charakteristika der AY-27 Tumorzellen aufrecht zu erhalten, erfolgte eine Passage als orthotoper Tumor in der Harnblase von weiblichen Fischer Ratten (F 344).

Es wurden 52 weibliche Fischer Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 175 g (Fischer 344 Ratten/ Crl 159, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Dieser Rattenstamm wurde benötigt, da in unserem in-vivo Versuchsteil mit AY-27 Blasenkarzinomzellen gearbeitet und diese Zelllinie in diesem Tierstamm entwickelt wurde. Es wurden weibliche Tiere verwendet, da die Harnröhre wesentlich kürzer und der Zugang zu der Harnblase einfacher ist als bei männlichen Ratten.

3.2.1. Tierhaltung und Tierpflege

Die Tiere für diesen Versuch (n=52) Tiere wurden 7 Tage vor dem geplanten Eingriff in einem eigens für Labortiere vorgesehenen und klimatisierten Raum (Temperatur 22-24°C, Luftfeuchtigkeit 50-60%) untergebracht und erhielten Futter und Wasser ad libitum. Die Tiere wurden in Gruppen zu maximal 5 Ratten pro Käfig zufällig aufgeteilt (Polycarbonat- Käfig, Transparent Macro 2808, Typ 4).

3.2.2. Die Zelllinie für die Tierversuche

Die AY-27 Tumorzellen wurden als Monolayer in RPMI 1640 Medium (PAA, Österreich) 1:1 mit 10%igem fetalem Rinderserum (PAA), 2 mmol/l Glutamin (PAA), 100 U/ml Penizillin G und 100 mg/l Streptomycin (PAA, Österreich) in einer Atmosphäre mit 95% Luft zu 5% Kohlendioxid bei 37°C kultiviert. Zur Herstellung der gewünschten Tumorzellkonzentration erfolgte eine Trypsinierung für 5 Minuten. Nach anschließender

Neutralisation des Trypsins durch Zugabe von 5 ml Vollmedium wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert (Labofuge 400 R, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Deutschland) und die Zellpellets in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellzählung wurde in einer Neubauer- Zählkammer (0.1 µl) nach der Trypan- Blau- Methode durchgeführt. Dabei wurden die Zellsuspension sowie das Trypan- Blau in einem Verhältnis von 1:5 gemischt, und unter dem Mikroskop ausgezählt. Entsprechend der ermittelten Zellzahl erfolgte die Verdünnung der Suspension mit Fertigmedium ohne fetalem Rinderserum um Lösungen mit definierter Zellzahl herzustellen und die Abfüllung von jeweils 1 ml in Eppendorfgefäße. Die Zellen verblieben im Inkubator und wurden vor der Applikation geschwenkt um abgesunkene Tumorzellen erneut in Suspension zu bringen.

3.2.3. Tumorzellimplantation

Für die Tierversuche wurde die Injektionsmethode nach Bachor et al. verwendet **(4)**. Die Tiere wurden mit einer Maskeninhalationsnarkose mittels Isofluran (2-4%) (Isofluran, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) in Rückenlage narkotisiert. Anschließend wurden den Ratten der Bauch suprapubisch rasiert und desinfiziert. Danach wurde das Abdomen mit einer medianen Laprotomie von circa 1cm Länge mit einem Skalpell eröffnet und die Blase dargestellt und herausluxiert. Die Muskularis der Blase wurde mit einer 27 G Kanüle von außen punktiert und 2×10^6 bzw. im zweiten Versuchsteil 2×10^4 Tumorzellen in 0,05 ml in die Muskularis injiziert. Nach dem Eingriff wurde das Abdomen mit einer Einzelknopfnah wieder verschlossen und den Tieren zur postoperativen Analgesie Tramal (2 mg/kg KG) (Tramal, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) subkutan appliziert.

3.2.4. Therapie mit Taurolidin

In diesem Versuch wurde die Wirkung von Taurolidin auf das Blasenkarzinom in-vivo überprüft. Die lokale-intravesikale und die systemisch-intravenöse Therapie wurden miteinander bezüglich ihrer möglichen Wirksamkeit auf das Harnblasenkarzinom der

Ratte verglichen. Die Tiere wurden entsprechend der Randomisierung den einzelnen Therapieschemata bzw. den Kontrollgruppen zugeordnet. Die Kontrolltiere erhielten anstelle einer Therapie mit Taurolidin eine mengenmäßig entsprechende Applikation von 0,9% NaCl. Sie dienten als Vergleich für die Häufigkeit des Auftretens eines Harnblasenkarzinoms nach Tumorzellimplantation und unter Belastungsbedingungen, die sich durch die Durchführung des Therapieschemas ergaben. Es wurde mit zwei Versuchsansätzen gearbeitet.

Tabelle 3: Erster und zweiter Versuchsansatz der in-vivo Taurolidinversuche

Ver- suchs- ansatz	Anzahl der Tiere (n)	Injizierte Zellzahl	Behand- lungsdauer	Therapie- form	Beginn der Taurolidin- therapie	Behandlungs- schema
1	26	2×10^6	6 Wochen	lokal systemisch	2 Tage nach OP 2 Tage vor OP	1x pro Woche 3x pro Woche
2	26	2×10^4	7 Wochen	lokal systemisch	10 Tage nach OP 10 Tage nach OP	1x pro Woche Täglich über 7d, Behandlungs- pause über 3 Wochen, erneut täglich über 7d

3.2.4.1. Erster Versuchsansatz

Im ersten Versuchsansatz wurden bei 26 Tieren Harnblasenkarzinome durch Tumorzellapplikation mit einer Zellzahl von 2×10^6 generiert. Die intravesikale Therapie mit Taurolidin 2% bzw. Verabreichung der Kochsalzlösung (Isotone Natriumchloridlösung 0,9%, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) intravesikal mit

einem Katheter durch die Harnröhre in der Kontrollgruppe wurde 1x pro Woche über einen Zeitraum von 6 Wochen durchgeführt. Beginn der Taurolidintherapie war der 2. Tag nach Tumorzellinjektion. Die intravenöse Therapie mit 2%iger Taurolidinlösung durch Injektion in eine Schwanzvene wurde 3x wöchentlich über ebenfalls 6 Wochen durchgeführt, wie auch bei der zugehörigen Kontrollgruppe. Mit der Taurolidingabe wurde in der intravenös Behandlungsgruppe bereits 2 Tage vor Tumorzellinjektion begonnen.

Tabelle 4: Therapieschema des ersten Versuchsansatzes der in-vivo Taurolidinversuche

Gruppe		n	Behandlung		Therapieschema
1, 3	Kontrolle	8	4 Tiere lokal mit NaCl	ca. 0,5 ml pro Instillation	1x pro Woche
			4 Tiere systemisch mit NaCl	15 ml/kg KG pro Injektion	3x pro Woche
2	intravesikal/ lokal	9	Taurolidin 2%	ca. 0,5 ml pro Instillation	1x pro Woche
4	intravenös/ systemisch	9	Taurolidin 2%	15 ml/kg KG pro Injektion	3x pro Woche

3.2.4.2. Zweiter Versuchsansatz

Der zweite Versuchsansatz wurde mit 26 Ratten in modifizierter Weise durchgeführt, da durch den gewählten Versuchsaufbau im ersten Versuchsansatz durch Taurolidin kein tumorhemmender Effekt auf das verwendete Harnblasenkarzinommodell erzielt werden konnte. Zur Generierung der Harnblasenkarzinome wurde die in die Tunica muskularis der Blase applizierte Zellmenge auf 2×10^4 Tumorzellen verringert. Erst 10 Tage nach Anwachsen der Harnblasentumore wurde mit der Taurolidintherapie begonnen. Die intravesikale Therapie wurde mit 1%iger Taurolidinlösung 1x pro Woche über einen Zeitraum von 7 Wochen durchgeführt. Hierfür wurde die gebrauchsfertige 2%ige Taurolidinlösung mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 1% verdünnt. Die intravenöse Therapie mit Taurolidin 2% wurde in 2 Blöcken verabreicht. Ein Block bestand aus einer täglichen

Taurolidinapplikation jeweils über 7 Tage. Zwischen den beiden Blöcken lag eine Behandlungspause von 3 Wochen. Die Kontrolltiere erhielten nach demselben Schema NaCl.

Tabelle 5: Therapieschema des zweiten Versuchansatzes der in-vivo Taurolidinversuche

Gruppe		n	Behandlung		Therapieschema
5, 7	Kontrolle	8	4 Tiere lokal mit NaCl	ca. 0,5 ml pro Instillation	1x pro Woche
			4 Tiere systemisch mit NaCl	15 ml/kg KG pro Injektion	Täglich über 7d, Behandlungspause über 3 Wochen, erneut täglich über 7d
6	intravesikal/ lokal	9	Taurolidin 1%	ca. 0,5 ml pro Instillation	1x pro Woche
8	intravenös/ systemisch	9	Taurolidin 2%	15 ml/kg KG pro Injektion	Täglich über 7d, Behandlungspause über 3 Wochen, erneut täglich über 7d

Während des Versuches wurden die Tiere regelmäßig auf ihren Allgemeinzustand hin kontrolliert und gewogen. Für die lokale Therapie wurde in Inhalationsnarkose mit Isofloran eine Blaseninstillation mit der Taurolidinlösung durchgeführt (Abb. 3). Dafür wurde den Tieren in Rückenlage ein passender Polyethylenschlauch (Polythene Tubing- 0,86 mm ID 1,52 mm OD) als Katheter in die Blase via Urethra eingeführt, über welchen die körperwarme Taurolidinlösung mittels einer am Polyethylenschlauch befestigten Injektionskanüle appliziert wurde. Durch Auftragen von Lidocain-Gel (Farco Pharma GmbH) wurde das manuelle Einführen des Katheters erleichtert und die Urethra lokal anästhesiert. Die Einwirkzeit von Taurolidin nach Instillation betrug bei allen Tieren 20 Minuten. Um einen vorzeitigen Verlust des Taurolidins über die Urethra zu verhindern, wurde die Harnröhre für die Dauer der Behandlung von außen mit einer gepolsterten Klammer komprimiert. Die Kontrolltiere erhielten wiederum physiologische

Kochsalzlösung. Durch Palpation wurde der Füllungszustand der Blase kontrolliert und die applizierte Flüssigkeitsmenge so dosiert, dass eine maximale Füllung der Blase ohne unphysiologische Druckbelastung gewährleistet war.

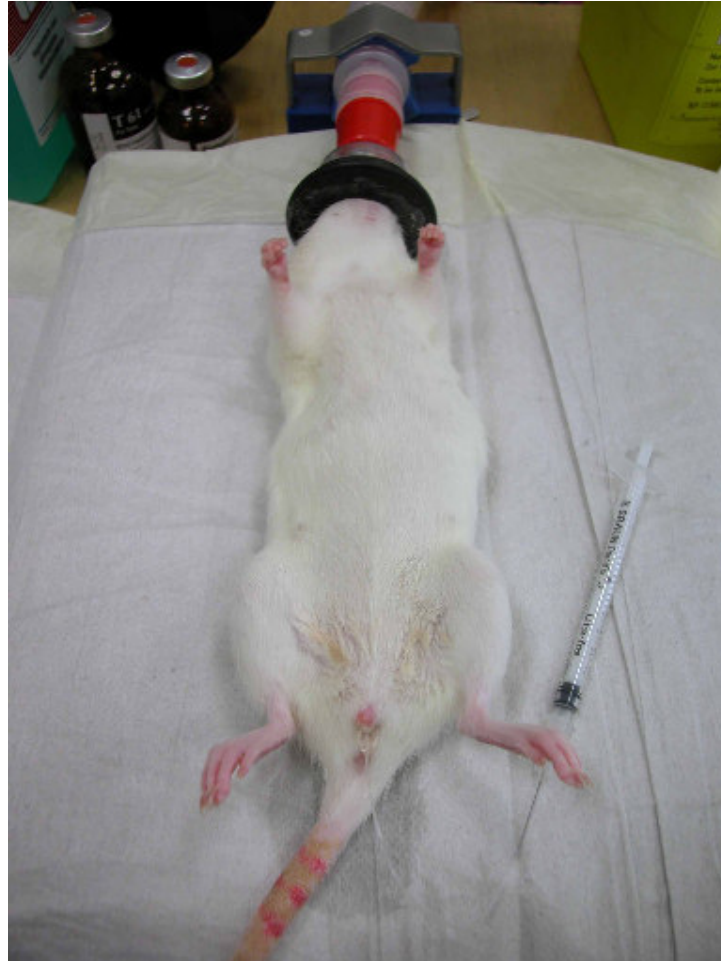


Abbildung 3: Weibliche Ratte in Inhalationsnarkose

Für die systemische Therapie wurden die Tiere ebenfalls kurzzeitig mit Isofloran narkotisiert. Anschließend wurde den Ratten Taurolidin in einer Dosis von 15 ml/kg Körpergewicht intravenös durch Punktion einer seitlichen Schwanzvene injiziert. Als Kontrolle diente auch hier 0,9% NaCl.

Die Euthanasie und anschließende Obduktion der Versuchstiere erfolgte am **42. Tag im ersten**, bzw. am **49. Tag im zweiten Versuchsansatz** nach Tumorzellimplantation.

Zur Euthanasie wurden den Tiere in tiefer Narkose 1ml/kg Körpergewicht des Tötungsmittels T61 (50ml Injektionslösung Intervet, Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) injiziert

3.2.5. Aufarbeitung, Auswertung und Dokumentation der Daten

Für die Inspektion wurde das Abdomen durch einen Kreuzschnitt (mediale und transversale Laparotomie) eröffnet. Zur Gewichtsbestimmung des Tumors wurde die Harnblase entnommen und eröffnet. Anschließend wurde der Tumor abpräpariert und mit einer Präzisionswaage (BP 610) der Firma Sartorius (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) gewogen.

Zur statistischen Auswertung der gewonnenen Daten untereinander wurden parameterfreie Tests für nicht normalverteilte Daten verwendet. Verglichen wurde jeweils das Tumorgewicht in g der einzelnen Versuchsgruppen mittels des Mann-Whitney-Tests. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Die Ergebnisse sind anhand Box-whisker-plots dargestellt (Abb.10 und Abb.11).