

## 4. Ergebnisse

### 4.1. In-vitro Versuche

#### 4.1.1. Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten und Konzentrationen von Taurolidin auf die Zellaktivitätshemmung

Der Einfluss der Inkubationszeit und Konzentration von Taurolidin auf die Zellaktivitätshemmung humaner Blasen/(tumor-)zellen wurde in einem Zellversuch untersucht.

Die prozentuale Änderung der Extinktion im XTT-Test war direkt proportional zur Änderung der Zellaktivität in %. Zum Zeitpunkt des jeweiligen Versuchsendes wurde den Ansätzen XTT-Reagenz zugefügt, welche man 4 h lang vor Messung der Extinktion einwirken ließ. Eine Zellaktivität von 100% lag definitionsgemäß bei einer zugesetzten Taurolidinkonzentration von 0% vor.

##### *HCV-29- Zelllinie*

Bei der HCV-29- Zelllinie wurde eine Hemmung der Zellproliferation bis zu über 90% erreicht, die umso stärker ausgeprägt war, desto höher konzentriert Taurolidin dem Versuchsansatz zugefügt wurde. Für den Beobachtungszeitraum von 24 h war eine Hemmung der Zellaktivität um ca. 50% bei einer Konzentration von ca. 25  $\mu\text{mol/l}$  Taurolidin im Versuchsansatz zu beobachten. Bei einer Konzentration von 64  $\mu\text{mol/l}$  waren die Zellen im Versuchsansatz um bis zu über 90% in ihrer Zellaktivität gehemmt. Eine weitere Verdopplung der zugesetzten Taurolidinkonzentration auf 128  $\mu\text{mol/l}$  erbrachte keine weitere messbare Steigerung des Effektes. Für die Beobachtungszeiträume von 48 h und 72 h konnte derselbe Effekt auf die Zellproliferation, jedoch bei jeweils etwas niedrigeren Taurolidinkonzentrationen beobachtet werden (Abb. 4).

#### *RT-4-Zelllinie*

Für diese Zelllinie wurde ebenfalls eine prozentuale Senkung der Zellproliferation durch Zusatz von Taurolidin erreicht, welche umso stärker war, je höher Taurolidin konzentriert wurde. Bei Konzentrationen von Taurolidin über 32  $\mu\text{mol/l}$  bei einer Einwirkungszeit von 24 h wurden die Zellen um 50% in ihrer Aktivität gehemmt. Ab einer Konzentration von über 64  $\mu\text{mol/l}$  lag die Zellproliferationsaktivität bei nahezu 0%. Bei Einwirkungszeiten von 48 h und 72 h wurde die Zellaktivität mit jeweils niedrigeren Konzentrationen von Taurolidin prozentual gleich gehemmt, wie bei einer höheren Taurolidinkonzentration und einer Einwirkungszeit von 24 h (Abb. 4).

#### *RT-112-Zelllinie*

Die Hemmung der Zellaktivität war umso stärker ausgeprägt, desto höher Taurolidin im Zellansatz konzentriert wurde. Bei einer Taurolidinkonzentration zwischen 16 und 32  $\mu\text{mol/l}$  konnte die Zellproliferation um 50% gehemmt werden, ab einer Konzentration von 64  $\mu\text{mol/l}$  lag sie bei allen drei untersuchten Einwirkungszeiten bei nahezu 0%. Bei einer Einwirkungszeit von 24 h musste Taurolidin entsprechend höher dosiert werden, um den quantitativ selben Effekt zu erzielen wie bei einer Einwirkungszeit von 48 h, bzw. 72 h (Abb. 4).

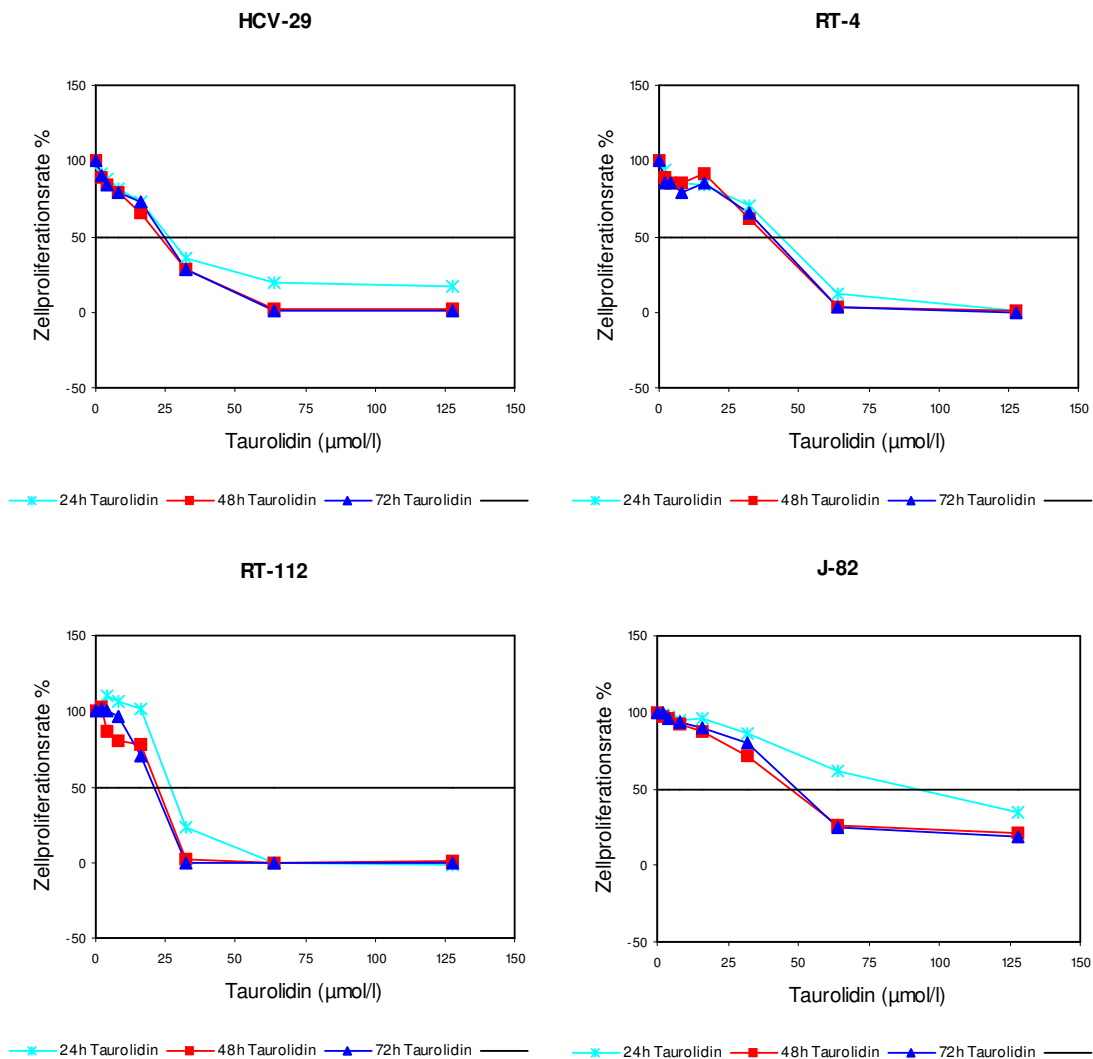
#### *J-82-Zelllinie*

Auch diese Zelllinie wurde durch steigende Konzentrationen von Taurolidin relativ stärker in ihrer Zellproliferation gehemmt. Bei einer 24-stündigen Einwirkungszeit von Taurolidin in einer Verdünnung von 64  $\mu\text{mol/l}$  lag die relative Zellproliferationsaktivität der J-82-Zelllinie bei ca. 65%. Durch Verdoppelung der Einwirkungszeit auf 48 h von Taurolidin in derselben Verdünnung konnte hingegen die relative Zellproliferationsrate auf ca. 25% gesenkt werden (Abb. 4).

#### *AY-27-Zelllinie*

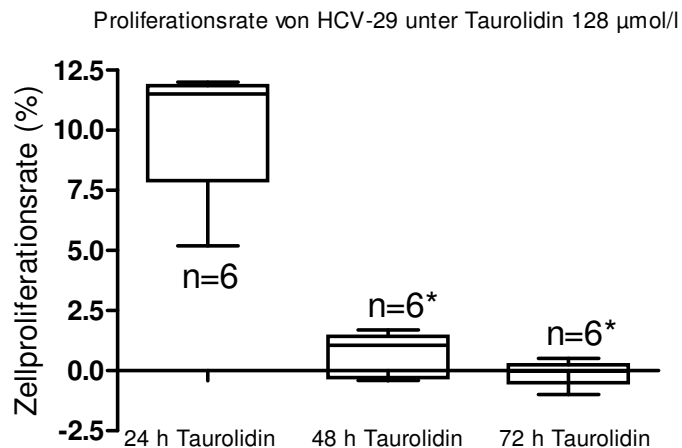
Mit steigenden Taurolidinkonzentrationen sank auch bei dieser Zelllinie die messbare Zellaktivität der Versuchsansätze ab, wobei mit längeren Einwirkungszeiten von 48 h und 72 h eine quantitativ stärkere Hemmung der Proliferationsaktivität bei jeweils gleicher Taurolidinkonzentration zu messen war, als bei 24 h. Ab einer Konzentration von 32  $\mu\text{mol/l}$  Taurolidin lag die Proliferation der Zellen nach 24 h Einwirkungszeit bei ca. 90%, nach 48 h bei über 50%, bei 72 h unter 50%. Ab einer Konzentration von 64

$\mu\text{mol/l}$  konnte nach 48 h und 72 h die Zellaktivität fast vollständig supprimiert werden, wobei nach 24 h eine Restaktivität von unter 50% messbar war (Abb. 5).



**Abbildung 4:** Einfluss der Dauer der Taurolidineinwirkung (24 h, 48 h, 72 h) in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die relative Hemmung der Zellproliferation von humanen Urothel(karzinom)zellen (HCV-29, RT-4, RT-112, J-82; 2000 Zellen/100  $\mu\text{l}$ ). Messung 4 h nach XTT-Zugabe

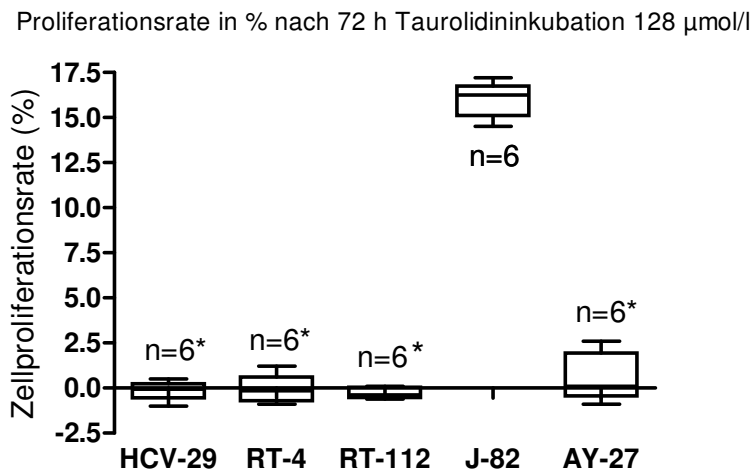




**Abbildung 6:** relative Zellproliferationsrate (%) von HCV-29-Zellen unter Taurolidin 128  $\mu\text{mol/l}$

\* signifikanter Unterschied zu 24 h Taurolidininkubation

Die Zelllinien wurden außerdem untereinander bezüglich ihrer Sensibilität gegenüber Taurolidin verglichen. Beim exemplarischen Vergleich der Proliferationsaktivität der Zellansätze nach 72-stündiger Inkubation mit 128  $\mu\text{mol/L}$  Taurolidin war ein quantitativ signifikanter Unterschied festzustellen (Abb. 7). Im Vergleich zu schlecht differenzierte J-82 Tumorzellen, welche selbst unter 72 h Inkubation mit 128  $\mu\text{mol/l}$  Taurolidin eine restliche Proliferationsaktivität von ca. 15% (Median: 16,5%; 95% Konfidenzintervall: 15-16,9%) aufwiesen, waren die Proliferationsraten der RT-4 (Median: -0,14%; 95% Konfidenzintervall: -0,8-0,7%) [ $p=0,002$ ; Mann-Whitney-Test], RT-112 (Median: -0,3%; 95% Konfidenzintervall: -0,5-0) [ $p=0,002$ ; Mann-Whitney-Test] aber auch normal differenzierter HCV-29 Blasen zellen (Median: -0,06; 95% Konfidenzintervall: -0,6-0,3%) [ $p=0,0022$ ; Mann-Whitney-Test] signifikant niedriger bei ca. 0% (Abb. 4 u. Abb. 7). AY-27 Harnblasenkarzinomzellen der Ratte wiesen im Vergleich zu J-82 Blasenkarzinomzellen des Menschen nach 72 h Taurolidininkubation eine ebenfalls signifikant niedrigere Proliferationsaktivität auf (Median: 0,11%; 95% Konfidenzintervall: -0,75-1,82%) [ $p=0,002$ ; Mann-Whitney-Test] (Abb. 5 u. Abb. 7). Demnach wiesen schlecht differenzierte humane J-82 eine signifikant geringere Sensibilität gegenüber Taurolidin auf, als RT-4 und RT-112 humane Harnblasenkarzinomzellen aber auch normale humane HCV-29- Urothelzellen und AY-27 Harnblasenkarzinomzellen der Ratte.



**Abbildung 7:** relative Zellproliferationsrate (%) der (Tumor-)Zellen (HCV-29, RT-4, RT-112, J-82, AY-27) nach 72 h Taurolidininkubation 128  $\mu\text{mol/l}$ . \* signifikanter Unterschied zu J-82

In diesem Versuchsteil zeigte sich, dass die Wirkung von Taurolidin Konzentrationsabhängig war. Mit steigenden Konzentrationen von Taurolidin sank bei allen Zellansätzen deren messbare Proliferationsaktivität (Abb. 4, 5). Alle untersuchten Tumor-/Zelllinien (HCV-29, RT-4, RT-112, J-82, AY-27) konnten durch Taurolidin in ihrem Wachstum gehemmt werden. Mit Zunahme der Inkubationszeit sank die benötigte Taurolidinkonzentration, um einen gleichwertig hemmenden Effekt auf die Zellproliferation zu erzielen (Abb. 6). Weiterhin zeigten die daraufhin untersuchten Tumor-/Zelllinien eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber Taurolidin (Abb. 7).

#### 4.1.2. Einfluss unterschiedlicher Zellzahlen auf das Ausmaß der Zellaktivitätshemmung durch Taurolidin

Im weiteren Versuchsablauf wurde der Einfluss der Zellzahl auf die Hemmung der Proliferation von humanen Blasen(tumor-)zellen durch verschiedene Taurolidin-Konzentrationen über einen Zeitraum von 48 h untersucht.

##### *HCV-29-Zelllinie*

Je höher konzentriert Taurolidin den Versuchsansätzen zugesetzt wurde, desto stärker war das erzielte Ausmaß der Hemmung der Zellproliferation. Bei den Zellansätzen mit 2000 und 4000 Zellen/100  $\mu$ l/Well konnte die Zellproliferationsaktivität durch Taurolidin in einer Konzentration von 64  $\mu$ mol/l auf nahezu 0% gesenkt werden, wobei in Zellansätzen mit 6000 Zellen eine Zellaktivität unter 50% bzw. mit 8000 Zellen über 50% bei derselben Taurolidinkonzentration messbar war (Abb. 8).

##### *RT-4- Zelllinie*

Je höher die Taurolidinkonzentration desto höher die Hemmung der Zellproliferation. Zellansätze mit 2000 Zellen benötigten niedrigere Taurolidinkonzentrationen um in ihrer Aktivität um 50% gehemmt zu werden, als 8000 Zellen. Ab einer Taurolidinkonzentration von 128  $\mu$ mol/l war die messbare Zellproliferation in allen vier Ansätzen nahezu 0% (Abb. 8).

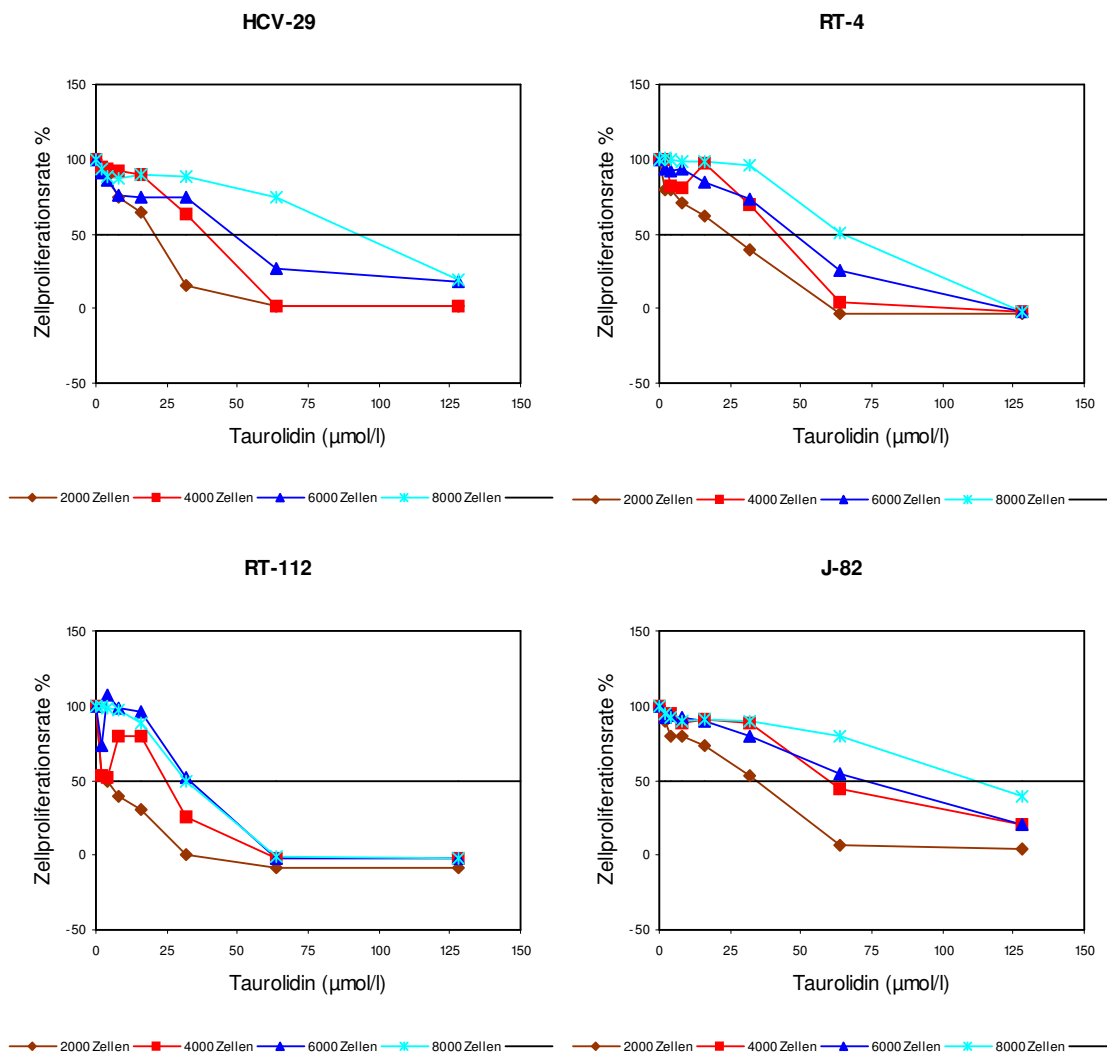
##### *RT-112- Zelllinie*

Je höher die Konzentration von Taurolidin, desto größer das Ausmaß der Zellaktivitätshemmung. Zellansätze mit 2000 Zellen benötigten niedrigere Taurolidinkonzentrationen um in ihrer Aktivität um 50% gehemmt zu werden, als 8000 Zellen. Bei einer Taurolidinkonzentration von 64  $\mu$ mol/l waren bei allen vier Ansätzen die Zellen nahezu vollständig in ihrer Proliferation gehemmt (Abb. 8).

##### *J-82- Zelllinie*

Die gemessene Proliferationsrate lag bei einer Taurolidinkonzentration von 64  $\mu$ mol/l für 2000 Zellen bei nahezu 0%, für 4000 unter 50% und für 6000 Zellen über 50%. Zellansätze mit 8000 Zellen zeigen im Vergleich die größte Restaktivität von ca. 90%

bei einer Taurolidinkonzentration von 64  $\mu\text{mol/l}$ . Selbst bei Taurolidinkonzentrationen von 128  $\mu\text{mol/l}$  wurden 8000 Zellen weniger in ihrer Aktivität gehemmt werden als 2000 Zellen/100  $\mu\text{l}$  Well.

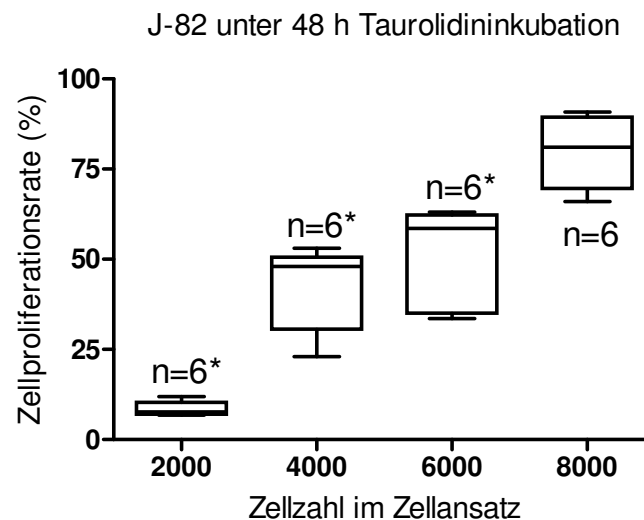


**Abbildung 8:** Einfluss der Zellzahl (2000, 4000, 6000, 8000 Zellen/100  $\mu\text{l}$ ) auf die relative Hemmung der Proliferation von Blaszellen (HCV-29, RT-4, RT-112, J-82) durch Taurolidin in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128  $\mu\text{mol/l}$ ) nach 48 stündiger Inkubation. Messung 4 h nach XTT-Zugabe

Am Beispiel der J-82- Zelllinie wurde der Einfluss der Zellzahl auf das Ausmaß der Proliferationshemmung statistisch untersucht. Die restliche Proliferationsaktivität im



Zellansatz mit 8000 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Taurolidin 128  $\mu\text{mol/l}$  (Median: 81%; 95% Konfidenzintervall: 70,2-89,6%) war signifikant höher als im Zellansatz mit 2000 (Median: 7,6%, 95% Konfidenzintervall: 6,2-10,24%) [ $p=0,0022$ , Mann-Whitney-Test], 4000 (Median: 48%; 95% Konfidenzintervall 26,8-55,5%) [ $p=0,0043$ ; Mann-Whitney-Test] und 6000 Zellen (Median: 58%, 95% Konfidenzintervall: 37-65%) [ $p=0,0022$ ; Mann-Whitney-Test] (Abb. 9). Demnach zeigte sich, dass 8000 Zellen höhere Konzentrationen an Taurolidin benötigen, um in ihrer Proliferationsaktivität quantitativ gleichwertig gehemmt zu werden, als Zellansätze mit 2000, 4000 und 6000 Zellen (Abb. 8, 9).



**Abbildung 9:** relative Zellproliferationsrate von J-82 Zellansätzen mit unterschiedlichen Zellzahlen (2000, 4000, 6000, 8000) unter Taurolidin 128  $\mu\text{mol/l}$ . \* signifikanter Unterschied zu 8000 Zellen

In diesem Versuchsteil konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Reduktion der Zellaktivität bei unterschiedlichen Taurolidinkonzentrationen von der Anzahl der Zellen im Zellansatz abhängt. Mit Zunahme der Zellzahl im Versuchsansatz stieg die benötigte Taurolidinkonzentration, um einen gleichwertig hemmenden Effekt auf die Zellproliferation zu erzielen (Abb. 8, 9).

## 4.2. In-vivo Versuche

Im in-vivo Versuchsteil wurden Tierversuche zur Therapie mit Taurolidin durchgeführt.

### 4.2.1. Erster Versuchsansatz

Im ersten Versuchsansatz wurden zwei Therapieschemata mit Taurolidin ( **$2 \times 10^6$  Zellen, 1x wöchentliche intravesikale Instillation von Taurolidin 2%, 3x wöchentlich intravenöse Injektion von Taurolidin 2%**) im Vergleich zu einer mit NaCl behandelten Kontrollgruppe hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Harnblasenkarzinom der Ratte untersucht. Die Anwachsrate der Harnblasenkarzinomzellen war nach intramuraler Tumorzellinjektion ( $2 \times 10^6$  Zellen) in der Kontrollgruppe (8/8) als auch in der lokal (9/9) und systemisch (9/9) mit Taurolidin behandelten Gruppe 100%. Weder durch lokale, intravesikale Applikation von Taurolidin noch durch systemische Taurolidingabe über einen **Therapiezeitraum von 42 d** wurde das Auftreten eines Harnblasenkarzinoms nach Tumorzellinjektion bei den Ratten verhindert. Im ersten Versuchsansatz verstarben vor Versuchsende 1 intravesikal behandeltes Tier der Kontrollgruppe am 14. Tag unter Durchführung der Inhalationsnarkose und 3 Tiere der intravesikal mit Taurolidin behandelten Tiere nach 21, 35 und 37 Tagen aufgrund der Folge ausgedehnten Tumorwachstums. Diese Tiere wurden nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Die verbliebenen Ratten der 3 verschiedenen Versuchstiergruppen wurden bezüglich des Gewichts der Harnblasenkarzinome nach Therapieende am 42. Tag miteinander verglichen, um einen möglichen Effekt von Taurolidin, bzw. des Therapieschemas auf das Tumorwachstum festzustellen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte die intravesikale Therapie mit Taurolidin einen signifikanten Effekt auf das Tumorgewicht ( $p=0,028$ ), im Gegensatz zur intravenösen Therapie ( $p=0,28$ ) ( Abb.10).

### *Tumorgewicht unter lokaler, intravesikaler Therapie*

Die mit Taurolidin intravesikal behandelte Gruppe unterschied sich bezüglich des Tumorgewichtes am 42. Tag nach Tumorzellimplantation (Median: 10,4 g, 95% Konfidenzintervall: 2,02-21,95 g) signifikant von der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe (Median: 2,4 g, 95% Konfidenzintervall: 0,76-4,67 g) [ $p=0,028$ ; Mann-Whitney-Test] (Abb. 10). Der Median des Tumorgewichts war bei den mit Taurolidin behandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Demnach konnten die Tumorgewichte durch intravesikale Taurolidintherapie bei den Versuchstieren nicht reduziert werden, sondern die Tiere mit 2% Taurolidintherapie 1x/Woche wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant größere Tumorgewichte auf. **In diesem Versuchsansatz wirkte sich Taurolidin 2% bei intravesikaler Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe fördernd auf das Tumorstadium aus** (Abb. 10).

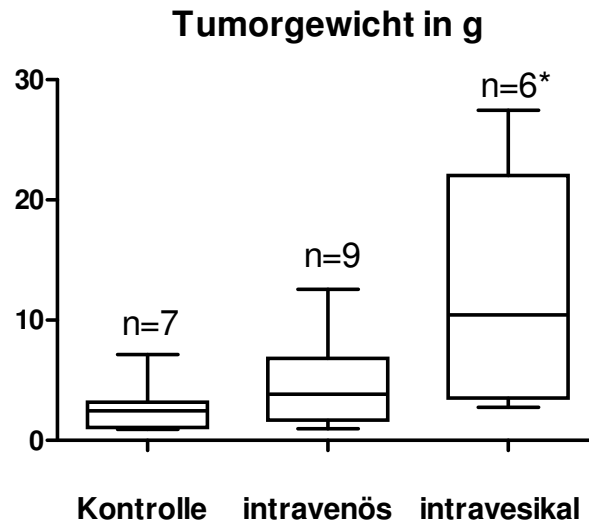
### *Tumorstadium unter systemischer, intravenöser Therapie*

Die intravenöse, systemische Therapie mit Taurolidin zeigte nach 42 Tagen keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich des Tumorgewichts (Median 3,8 g, 95% Konfidenzintervall 1,56-7,46 g) im Vergleich zur den Kontrolltieren (Median: 2,4 g, 95% Konfidenzintervall 0,76-4,67 g) [ $p=0,28$ ; Mann-Whitney-Test] (Abb. 10). **Unter systemischer Therapie mit Taurolidin 2% 3x/Woche kam es weder zu einer signifikanten Reduktion noch zu einer signifikanten Erhöhung der Tumorgewichte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Tendenziell waren aber Tumore der mit Taurolidin i.v. behandelten Tiere schwerer als die der Kontrollgruppe.**

### *Tumorstadium unter lokaler und systemischer Therapie im Vergleich*

Lokale und systemische Therapieschema nach Schema des ersten Versuchsansatzes unterschieden sich nicht signifikant bezüglich ihren Effekts auf das Tumorgewicht beim Versuchstier [ $p= 0,051$ ; Mann-Whitney-Test] (Abb. 10). Der Median der Tumorgewichte bei intravesikal therapierten Tieren war gegenüber dem bei intravenös behandelten

Tieren erhöht. Der Unterschied der Tumorgewichte zwischen intravesikal und intravenös behandelten Tieren war jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 10:** Gewichte (g) der Harnblasentumore nach intravesikaler und intravenöser Therapie mit Taurolidin nach dem ersten Versuchsansatz im Vergleich zur Kontrollgruppe. \* signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe

#### 4.2.2. Zweiter Versuchsansatz

Im zweiten Versuchsansatz wurden ebenfalls zwei weitere, modifizierte Therapieschemata mit Taurolidin ( **$2 \times 10^4$  Zellen, Taurolidin 1% intravesikal und intravenöse Blocktherapie Taurolidin 2%**) im Vergleich zu einer mit NaCl behandelten Kontrollgruppe hinsichtlich ihrer Wirkung auf Harnblasentumore der Ratte untersucht. Die Anwachsrate der Harnblasenkarzinomzellen war nach intramuraler Tumorzellinjektion ( $2 \times 10^6$  Zellen) in der Kontrollgruppe (8/8) als auch in der lokal (9/9) und systemisch (9/9) mit Taurolidin behandelten Gruppe 100%. Weder durch lokale, intravesikale Applikation von Taurolidin noch durch systemische Taurolidingabe über einen **Therapiezeitraum von 49 d** wurde das Auftreten eines Harnblasenkarzinoms nach Tumorzellinjektion bei den Ratten verhindert. In der 6. Woche vor Versuchsende verstarben 1 intravesikal und 1 intravenös behandeltes Tier der Kontrollgruppe während der Inhalationsnarkose sowie am 42. Tag 1 Tier der intravesikal mit Taurolidin

behandelten Tiere aufgrund ausgedehnten Tumorwachstums. Diese Tiere wurden nicht in die statistische Auswertung aufgenommen. Nach Therapieende am 49. Tag wurden die Gewichte der Harnblasenkarzinome der 3 verschiedenen Versuchstiergruppen des zweiten Versuchsansatzes miteinander verglichen, um einen möglichen Effekt von Taurolidin, bzw. des modifizierten Therapieschemas auf das Tumorgewicht festzustellen (Abb. 11).

Weder die intravesikale noch die intravenöse Taurolidinterapie nach Schema des 2. Versuchsansatzes zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikanten Effekt auf das Tumorgewicht bei den Versuchstieren [ $p > 0,05$ , Mann-Whitney Test] (Abb. 11).

#### *Tumorwachstum unter lokaler, intravesikaler Therapie*

Die mit Taurolidin 1% intravesikal behandelte Gruppe unterschied sich bezüglich des Tumorgewichtes am 49. Tag nach Tumorzellimplantation (Median: 4,65 g, 95% Konfidenzintervall 2,62-7,19 g) nicht signifikant von der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe (Median: 8,1 g, 95% Konfidenzintervall 3,21-14,82 g) [ $p = 0,18$ ; Mann-Whitney Test] (Abb. 11). Der Median des Tumorgewichts war bei den mit Taurolidin 1% intravesikal behandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant erniedrigt. **Die intravesikale Therapie mit Taurolidin 1% zeigte in diesem Versuchsansatz im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikant hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum** (Abb. 11).

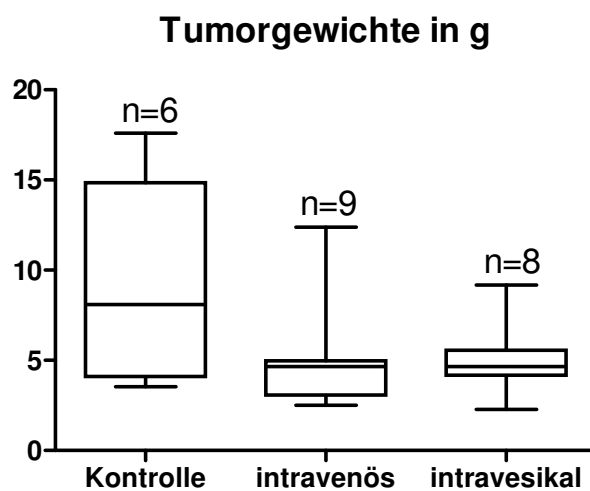
#### *Tumorwachstum unter systemischer, intravenöser Therapie*

Das Tumorgewicht der systemisch, d.h. intravenös mit Taurolidin 2% im Blocktherapierten Ratten (Median: 4,65 g, 95% Konfidenzintervall 3,35-6,7 g) zeigte am 49. Tag nach Tumorzellimplantation keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median: 8,1 g, 95% Konfidenzintervall 3,21-14,82 g) [ $p = 0,18$ ; Mann-Whitney-Test] (Abb. 11). Der Median des Tumorgewichts war bei den mit Taurolidin behandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant erniedrigt. **Demnach zeigte sich unter intravenöser Blocktherapie mit Taurolidin 2% im Vergleich zur**

**Kontrollgruppe kein signifikanter wachstumshemmender Effekt auf die Blasentumore der Versuchstiere (Abb. 11).**

*Tumorstadium unter lokaler und systemischer Therapie im Vergleich*

Das Tumorgewicht unterschied sich zwischen lokal und systemisch mit Taurolidin nach Schema des 2. Versuchsansatzes nicht signifikant [ $p=0,74$ ; Mann-Whitney-Test] (Abb. 11).



**Abbildung 11:** Gewichte (g) der Harnblasenkarzinome nach intravesikaler und intravenöser Therapie mit Taurolidin nach dem zweiten Versuchsansatz im Vergleich zur Kontrollgruppe