

5. Diskussion

Taurolidin, ein Abkömmling der Aminosäure Taurin, wird in der Klinik als antimikrobielles Chemotherapeutikum zur Behandlung der Sepsis beim Menschen, bei Peritonitiden und in der Traumatologie als Spüllösung zur Behandlung von Infektionen eingesetzt **(35)**. Experimentelle Untersuchungen und Studien haben gezeigt, dass Taurolidin außerdem auch hemmend auf das Wachstum von Tumoren wirken soll **(35;52;69)**. Bisherige in-vitro und in-vivo Experimente konnten eine Suppression des Tumorwachstums unterschiedlicher Tumorarten wie z.B. des Ovarial- und Kolonkarzinom, Mesotheliom, Melanom und Glioblastom durch Taurolidin zeigen, verbunden mit einem geringen Nebenwirkungsprofil **(11;35;52;55;70)**. Ferner konnte Taurolidin bereits für einzelne Tumore, z.B. beim metastasierten Melanom und dem Glioblastom beim Menschen eingesetzt werden **(35;69)**. Die bisherigen Erfahrungen mit Taurolidin waren die Grundlage der Idee dieser Arbeit, eine ebenfalls mögliche Wirkung des Taurolidins auf das Harnblasenkarzinom zu überprüfen. Bisher liegen noch keine wissenschaftlichen Untersuchungen zu dieser Tumorentität vor.

In dieser Arbeit wurden zunächst an Zelllinien Versuche durchgeführt, um die Wirkung von Taurolidin auf verschieden differenzierte Urothel(karzinom)-Zelllinien des Menschen und der Ratte zu untersuchen. An die Zellversuche schlossen sich in-vivo Versuche mit zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen in einem Rattenmodell an um die Wirksamkeit unterschiedlicher Therapieschemata von Taurolidin auf das Harnblasenkarzinom zu erfassen.

5.1. In-vitro Versuche

Anhand der eigenen in-vitro Zellversuche konnten die Erfahrungen in der Literatur über die Wirksamkeit von Taurolidin auf Karzinomzellen und die Erwartung bezüglich der Wirksamkeit auf Harnblasenkarzinomzellen durch die erzielten Ergebnisse bestätigt werden **(35;52;69)**. Durch Zugabe steigender Konzentrationen von Taurolidin in den Versuchsansätzen konnte eine Zunahme der Hemmung der Tumorzellproliferation nachgewiesen werden. Daraus ist zu folgern, dass Taurolidin auf Urothel(karzinom)zellen wirkt und die proliferationshemmende Wirkung von Taurolidin auf

Urothel(karzinom)zellen konzentrationsabhängig ist. Eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung von Taurolidin konnte beispielsweise bereits auch für Kolonkarzinomzellen gezeigt werden **(52)**. Im eigenen Zellversuch wurde eine Hemmung der Zellproliferation für alle untersuchten humanen Harnblasen(karzinom)zellreihen beobachtet, wobei sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Sensibilität der getesteten Zelllinien gegenüber Taurolidin ergab. Bei gleicher Taurolidindosis wurden schlecht differenzierte J-82 Harnblasenkarzinomzellen weniger in ihrer Proliferationsaktivität gehemmt als RT-4 und RT-112 Karzinomzellen aber auch normal differenzierte HCV-29 Urothelzellen (Abb. 4, 7). Für Taurolidin ergab sich anhand der Versuchsergebnisse aus den Zellversuchen (Abb. 4, 7) daher kein Hinweis auf eine selektive Proliferationshemmung ausschließlich auf Tumorzellen, wie in der Literatur beschrieben **(52;69)**. Normal differenzierte humane HCV-29 Urothelzellen wurden gleichwertig wie beispielsweise RT-4 und RT-112 Harnblasenkarzinomzellen des Menschen unter Taurolidineinwirkung in ihrer Proliferation gehemmt (Abb. 4, 7). Die Proliferationshemmung von Taurolidin auf AY-27-Harnblasenkarzinomzellen der Ratte wurde ebenfalls nachgewiesen. Die Hemmbarkeit der Proliferation der AY-27-Harnblasenkarzinomzellen unter Taurolidineinwirkung war anhand des Ausmaßes, der Dosisabhängigkeit und der Abhängigkeit der Einwirkungszeit von Taurolidin im Versuchsansatz mit den humanen Zelllinien vergleichbar.

Die gewonnenen Ergebnisse der Zellkulturversuche bildeten die Grundlage zur Erprobung der Wirksamkeit von Taurolidin auf das Harnblasenkarzinom im Tierversuch. Die AY-27 Harnblasenkarzinomzellen der Ratte konnten, aufgrund ihrer den humanen Karzinomzellen ähnlichen Wachstumseigenschaften, für den weiteren Versuchsablauf zur Erprobung der Wirksamkeit von Taurolidin auf das Harnblasenkarzinom im Tiermodell eingesetzt werden. Hierdurch könnte es möglich sein, die Komplexität der Tumorgenese besser zu erfassen. Weiterhin könnte ein besseres Verständnis für die Wirkung von Taurolidin und eine bessere Vergleichbarkeit zum menschlichen Organismus erreicht werden.

5.2. In-vivo Versuche

Ziel der tierexperimentellen Studie war es, die Effekte einer Taurolidinthherapie auf das oberflächliche Harnblasenkarzinom nachzuweisen und Unterschiede zwischen der systemisch-intravenösen und lokal-intravesikalen Taurolidingabe zu untersuchen. Da das oberflächliche Harnblasenkarzinom mit 70% aller diagnostizierten Harnblasenkarzinome in Europa die häufigste Form ist, kommt ihm die größte Bedeutung in der Entwicklung einer möglichst nebenwirkungsarmen adjuvanten Chemotherapie zu **(45;49)**. Ein großes Problem in der Sanierung des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms durch transurethrale Tumorsektion stellt die hohe Rezidivneigung, unter Anderem wahrscheinlich durch vom Primärtumor unter Resektion versprengte Tumorzellen, dar **(1;17;20)**. In der Literatur wird ein Modell von Bisson beschrieben, welche die Situation nach Tumorsektion des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms am besten für die experimentelle Testung im Tiermodell nachstellen soll. In diesem Modell wird über einen liegenden Blasenkateter ein Draht, bzw. Abrasions-Leiter in die Blase eingeführt, mit welchem die Blasenwand von innen oberflächlich verletzt wird. Anschließend werden Harnblasenkarzinomzellen über den Katheter instilliert, welche am Ort des geschaffenen Urotheldefektes anwachsen sollen **(7)**. Um im Experiment einen Therapieerfolg, in diesem Fall durch Taurolidin, bezüglich Tumorfreiheit oder Tumormassenreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe sicher beurteilen zu können, ist jedoch eine hohe Anwachsrate von Tumorzellen und Ausbildung eines Karzinomes beim Versuchstier nötig **(4)**. Für die Methode nach Bisson ist es denkbar, dass nach mechanischer Verletzung der lumenseitigen Blasenwand und Spülung mit Tumorzellen diese vorzeitig aus dem nach außen hin offenen System der Blasen ausgespült werden könnten, bevor diese die Möglichkeit haben, anzuwachsen. Ein weiterer möglicher Schwachpunkt dieses Modells ist es, dass keine Möglichkeit gegeben sein könnte, bei allen Tieren Harnblasenkarzinome mit gleichen Ausgangszellzahlen zu schaffen. Vielmehr könnte wahrscheinlich die Menge an Tumorzellen, welche in der Blase anwächst, abhängig von der Größe des blind durch Einbringen eines scharfen Abrasions-Leiters in die Blase geschaffenen Urotheldefektes sein. Die Tumore der Versuchstiere würden somit unter Umständen bereits zum Versuchsbeginn unterschiedliche Gewichte aufweisen. Eine quantitative Vergleichbarkeit der Versuchstiergruppen wäre somit möglicherweise eingeschränkt, so

dass ein Therapieerfolg durch Taurolidin im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eventuell nicht erkannt würde. Um für den Versuchsablauf ein Tiermodell mit hoher, möglichst 100%iger Sicherheit eines Harnblasenkarzinoms beim Versuchstier zur Verfügung zu haben, wählten wir daher die Injektionsmethode nach Bachor **(4)**. Bei den von uns nach dieser Methode behandelten Tieren der Kontrollgruppe waren bei einer injizierten Tumorzellzahl von 2×10^6 als auch 2×10^4 zum Tötungszeitpunkt nach 42 bzw. 49 Tagen in 100% der Fälle ein makroskopisch nachweisbares Harnblasenkarzinom vorhanden. Um eine qualitative Vergleichbarkeit unter den Versuchstieren garantieren zu können war es ein weiterer Vorteil, Karzinome durch Injektion identischer Zellmengen zu erzeugen. Nachteil dieses Modells ist aber, dass die derart generierten Tumore nicht ausschließlich einem oberflächlichen Stadium entsprechen, sondern auch intramuskulär wachsen **(76)**. Darüber hinaus ist es möglich, dass das Karzinom von einer Schicht normaler oder hyperplastischer Zellen bedeckt sein kann **(4)**. Taurolidin bzw. seine wirksamen Metabolite erreichten unter Umständen nur erschwert das Harnblasenkarzinom, so dass eventuell Probleme bei der Testung der lokalen Wirksamkeit von Taurolidin bei intravesikaler Instillation auf das Harnblasenkarzinom auftraten. Die Genese des Harnblasenkarzinoms entsprach des Weiteren nicht der von Rezidivtumoren nach TURB beim Menschen. Es wird angenommen, dass bei der transurethralen Tumoresektion einzelne Tumorzellen vom Primärtumor gelöst werden, welche in der Blase verbleiben und erneut anwachsen könnten **(1;17;25)**. Eine antiadhärente Wirkung von Taurolidin auf freie Harnblasenkarzinomzellen konnte daher nicht untersucht werden, sondern nur eine wachstums-supprimierende auf Tumorzellen eines soliden Tumorzellverbandes.

Im ersten Versuchsansatz wurden den Ratten 2×10^6 Tumorzellen injiziert, um Harnblasenkarzinome lokal zu generieren. Das intravenöse Therapieschema bestand aus einer 3x wöchentlichen Taurolidingabe 2% von 15 ml/kg Körpergewicht. Beginn der Therapie war 2 Tage vor Tumorzellinjektion. Die lokale Therapie wurde 1x wöchentlich mit Taurolidin 2% durchgeführt. Begonnen wurde am 2. Tag nach Tumorzellinjektion. Durch die Taurolidintherapie nach Therapieschema des ersten Versuchsansatzes kam es im Tiermodell zu keiner Supprimierung des Tumorwachstums. Weder das Auftreten eines Harnblasenkarzinoms noch das eigentliche Tumorgewicht konnte nach 42 Tagen durch intravesikale oder intravenöse Taurolidinapplikation 2% im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert werden. Im ersten Versuchsansatz waren Tumore

der lokal mit Taurolidin 2% therapierten Tiere dagegen schwerer als die der Kontrollgruppe, so dass eventuell ein das Tumorwachstum fördernder Effekt durch Taurolidin erwogen werden muss.

Die systemische, d.h. intravenöse Taurolidinapplikation stellt im Einsatz gegen Tumore bisher keine einheitlich anerkannte Therapieoption dar **(35)**. Im Gegensatz dazu wird die lokale intraperitoneale Applikation bei intraperitonealen Tumoren bereits in der Klinik durchgeführt **(35)**. Bedrosian et al. beschreiben, dass für die Wirkung von Taurolidin auf Tumore der direkte Zellkontakt nötig ist **(5)**. Taurolidin ist bei lokaler Applikation in der Lage, Apoptose bei Tumorzellen zu induzieren **(14;52;70)**. Die Wirkung soll durch direkte Übertragung von Methylolgruppen auf Aminosäuren von Oberflächenrezeptoren der Tumorzellen zustande kommen, die beim Abbau von Taurolidin freiwerden. Eventuell könnten aber auch intrazelluläre Effekte auf apoptoseinduzierende Signalwege durch Taurolidin bzw. Taurolidinmetabolite zum Zelluntergang führen **(5;35;36)**. Des Weiteren konnte die Induktion eines mitochondrialen Cytochrom-C abhängigen Apoptoseweges durch Taurolidineinwirkung gezeigt werden **(29)**. In Glia- und neuronalen Hirntumorzellen löste Taurolidin Apoptose über einen bisher unbekanntem Apoptosemechanismus aus **(69)**. Viele Tumore, wie auch das Harnblasenkarzinom, zeigen eine Tendenz, Metastasen auszubilden **(49)**. Unter operativer Tumoresektion kann es außerdem zur Versprengung von Tumorzellen des Primärtumors kommen, die, wenn sie anwachsen, zu Tumorzidiven und Tumormetastasen führen können **(1;17;75)**. Bei der Ausbildung von Tumormetastasen spielen pathophysiologisch Adhäsionsvorgänge zwischen Tumorzellen und Organoberflächen, Lymph- und Gefäßsystem eine Rolle und fördern die Tumorzellausbreitung und Verschleppung via Lymphe und/oder Blutkreislauf **(25)**. Die direkte Übertragung von reaktiven Methylolgruppen durch Taurolidin auf verschiedene, für Zelladhäsionen notwendige Oberflächenrezeptoren könnte ferner auch für eine antiadhärente und die Inzidenz von Tumormetastasen senkende Wirkkomponente sprechen **(25;35;52)**. Eine antiadhärente Wirkung von Taurolidin auf Mikroorganismen, ferner auch auf Tumorzellen konnte anhand von Untersuchungen gezeigt werden **(9;14;20)**. Da jedoch, wie oben beschrieben, in unserem Versuchsvorhaben der Effekt von Taurolidin auf einen soliden Tumor untersucht wurde, war eine antiadhärente Wirkung durch Taurolidin nur eingeschränkt auf die in diesem Versuchsvorhaben erzielten Ergebnisse übertragbar.

Das Versagen der systemischen Taurolidintherapie im ersten Versuchsansatz könnte aber zunächst darin begründet sein, dass Taurolidin bei systemisch-intravenöser Gabe nur unzureichend konzentriert am Tumor vorliegt um dort seine Wirkung zu entfalten. Wie oben bereits erwähnt, soll für einen Teil der Taurolidinwirkung der direkte Zellkontakt nötig sein **(5)**. Bei Taurolidin und seinen Metaboliten handelt es sich um stark polare Substanzen **(35)**. Der Taurolidinmetabolit Taurin liegt beispielsweise bei einem pH von 7,4 nahezu vollständig in ionisierter Form vor und ist stark lipophob **(12)**, so dass es bei pH 7,4 Zellmembranen schlecht passiv überwinden und den Wirkort nur unzureichend erreichen könnte **(32)**. Ein pH von 7,4 entspricht in etwa dem physiologischen arteriellem pH-Wert der Ratte, und wirkt auf Taurolidin bei intravenöser Gabe, wie wahrscheinlich auch in unserem Versuch. Dagegen spricht jedoch eine geringe Molekülgröße von Taurolidin für eine gute Membrangängigkeit **(35)**. Daneben wird bei intraperitonealer Taurolidinapplikation Taurolidin resorbiert und systemische Taurolidinspiegel sind nachweisbar **(44)**. Ein Überwinden zumindest der Peritonealmembran ist für Taurolidin also wahrscheinlich möglich. Für den Einsatz bei intraperitonealen Tumoren wurde darüber hinaus eine eventuell sogar hauptsächliche systemische Wirkkomponente von Taurolidin, d.h. eine Wirkung, welche nach Überwindung der Peritonealmembran zustande kommt, diskutiert **(35)**. Ein Ausbleiben der Wirkung von Taurolidin im ersten Versuchsansatz aufgrund kompletter Unfähigkeit, den Wirkort bei systemischer Gabe zu erreichen, erscheint daher unwahrscheinlich, so dass ein Ausbleiben der Wirkung von Taurolidin auf das Blasenkarzinom wahrscheinlich andere Ursachen hat. Für ein Versagen der systemischen Therapie, wie in unserem Versuch, könnte außerdem eine Bindung an Plasmaproteine bei i.v.-Gabe verantwortlich gemacht werden. Für Taurolidin selbst konnte eine Bindung an Plasmaproteine widerlegt werden. Die reaktiven Methylolgruppen andererseits werden aber teilweise reversibel an Plasmaproteine gebunden, so dass sie bei intravenöser Therapie vermindert zur Verfügung stehen könnten **(35)**. Im Gegensatz dazu konnte Braumann et al. eine tumorsupprimierende Wirkung durch Taurolidin mit einer intravenösen „long-term-therapy“ (über 7 d im 8 Stunden-Takt jeweils 1 ml Taurolidin 3%) auf subkutane Tumoren erzielen, welche signifikant die Inzidenz von Metastasen und tendenziell die messbaren Tumorgewichte senken konnte **(11)**. Ferner sind erste Therapieerfolge durch intravenöse Taurolidingabe beim Einsatz gegen das Glioblastom beschrieben **(69)**. Eine Taurolidindosis von 2%, wie in dem von uns gewählten systemischen Therapieschema, könnte bei intravenöser Gabe jedoch zu niedrig dosiert

sein, um auf das Harnblasenkarzinom zu wirken. Gutt et al. konnten aber ihrerseits eine Wirkung auf Lebermetastasen eines Kolonkarzinoms durch intravenöse Gabe von Taurolidin 2% erzielen **(35)**. In dem genannten Versuch wurde Taurolidin jedoch intravenös über die Vena portae gegeben, so dass Taurolidin die Leber wahrscheinlich in hoher Konzentration erreichen konnte. Für die intravenöse Gabe von Taurolidin 2% zur Therapie eines Harnblasenkarzinoms ist aber eventuell mit einer höheren Verdünnung aufgrund schnellerer Verteilung auf das Plasmavolumen zu rechnen, so dass Taurolidin in einer unzureichenden Konzentration den Wirkort in der Harnblase erreicht haben könnte um das Tumorwachstum zu hemmen. Andererseits werden Taurolidin und seine Metabolite hauptsächlich aus dem Blutkreislauf über die Nieren mit dem Harn ausgeschieden **(35)**. Daher könnte die Substanz auch auf diesem Wege in die Blase gelangen und lokal auf das Harnblasenkarzinom wirken, wobei jedoch bei hohen Urinzeitvolumina wahrscheinlich nur niedrige Taurolidinkonzentrationen vorliegen. McCourt konnte bei Inkubation intraperitonealer Tumoren mit Taurolidin durch Zusatz einer puffernden Substanz (phosphatgepufferte Salinelösung: PBS) die tumorsupprimierende Wirkung von Taurolidin aufheben. Diese Beobachtung könnte als Hinweis für eine Wirksamkeit nur bei direktem Tumorzellkontakt sprechen, die dann bei ungenügender Wirkstoffanreicherung am Tumor aufgrund der Verdünnung der applizierten Taurolidindosis ausbleibt **(52)**. Ferner kann Taurolidin bei intravenöser Gabe durch Hydrolyse rasch zu Taurultam, Methyltaurultam, Tauramid und Kohlendioxid abgebaut werden und stünde somit nicht mehr zur Verfügung. Andererseits wird gerade eine Wirkungsentfaltung von Taurolidin über seine Metabolite diskutiert und konnte teilweise in Studien gezeigt werden **(35;66)**. Gründe für ein Versagen der systemischen Taurolidintherapie im ersten Versuchsansatz könnten ferner im Versuchsaufbau liegen. In unserem Experiment wurde den Tieren bereits 2 Tage vor Tumorzellinjektion in die Harnblase Taurolidin i.v. appliziert um einen Wirkstoffspiegel zu erzeugen. Die vorzeitige Taurolidingabe könnte zu einer Immunsuppression der Versuchstiere geführt haben. Eine Begünstigung des Tumorwachstums bei Immundefizienz ist in der Literatur beschrieben **(41;53)**. Die Wirkung von Taurolidin in niedrigen Dosierungen soll für die daraufhin untersuchten Tumorzellen spezifisch sein **(52;70)**. Bei höheren Dosierungen induziert Taurolidin jedoch auch Zellnekrose. Für diese Wirkung wurde dagegen keine spezifische Wirkung ausschließlich auf Bakterien oder Tumorzellen beschrieben **(35)**. Es ist also denkbar, dass Taurolidin in höheren Dosen eventuell auch eine unspezifische Wirkung auf Zellen

der Immunabwehr hat. Weiterhin wird in der Literatur über eine immunmodulatorische Wirkung von Taurolidin, unter Anderem über eine Hemmung der Zytokinproduktion und Ausschüttung durch Entzündungszellen, berichtet **(5;35;36)**. Diese Zytokine üben wahrscheinlich ihre Wirkung neben Zellen der Immunantwort auch auf Tumorzellen aus und sollen daher das Auftreten von Tumorrezidiven und Tumormetastasen begünstigen, so dass Taurolidin über seine antiinflammatorische Wirkung das Tumorwachstum hemmen könnte **(5;36)**. Die immunmodulatorische Wirkung äußert sich nicht im Auftreten einer Leukopenie. Eine perioperative Leukopenie war durch Braumann et al. im Tierversuch gleichermaßen bei mit Taurolidin therapierten Tieren als auch in der Kontrollgruppe feststellbar **(11)**. Dennoch könnten beispielsweise die oben beschriebenen reaktiven Methylolgruppen auf Oberflächenrezeptoren übertragen werden, welche für Zellkontakte von Zellen der Immunabwehr verantwortlich sind und beispielsweise eine direkte zytotoxische T-Killerzell-Immunantwort verhindert werden. Darüber hinaus könnte sich eine Hemmung der physiologischen Endzündungsreaktion neben der proliferationshemmenden Wirkung auf Tumorzellen ab einem gewissen Grad auch negativ auf die Bekämpfung von Tumorzellen auswirken. Die Ausschüttung von TNF-alpha, das von Makrophagen beim Ablauf einer Endzündungsproduktion produziert wird und unter Anderem auch zu einer Zytolyse von Tumorzellen führt, wird durch Taurolidin supprimiert **(35)**. In unserem 2. Versuchsansatz wurde daher erst nach Zellinjektion und nachdem mit einem Anwachsen eines Tumors zu rechnen war, mit der Taurolidintherapie am 10.Tag begonnen. Um möglicherweise den Wirkstoffspiegel am Tumor zu optimieren, wurde das Therapieschema für die systemische Therapie von 3 mal wöchentlich an ein anderes in der Klinik gebräuchliches Therapieschema angeglichen und als Blocktherapie von jeweils 7 Tagen hintereinander mit täglicher Taurolidingabe 2% durchgeführt (siehe unten) **(35)**.

In der intravesikal mit Taurolidin nach Therapieschema des ersten Versuchsansatzes behandelten Versuchsgruppe kam es ebenfalls zu keiner Suppression, sondern zu einer Begünstigung des Tumorwachstums. Für einen ausbleibenden Therapieerfolg durch intravesikale Taurolidininstillation im ersten Versuchsansatz könnte zunächst eine unzureichende Resorption bei lokaler Instillation in die Blase verantwortlich gemacht werden. In der Klinik wird Taurolidin teilweise lokal als Spüllösung bei intraperitonealen Tumoren eingesetzt **(35)**. Bei der intraperitonealen Instillation ist eine eindeutige Resorption von Taurolidin beschrieben, sogar systemische Taurolidinspiegel sind nach intraperitonealer Gabe messbar **(14;44)**. Zur Therapie des oberflächlichen

Harnblasenkarzinoms werden ebenfalls lokal Chemotherapeutika wie Mitomycin, Doxorubicin und Thiotepa eingesetzt. Diese werden hierzu lokal in die Harnblase instilliert **(32)**. Die Penetration der Chemotherapeutika um zum Wirkort zu gelangen ist abhängig von Molekulargewicht, pH-Wert (Polarität der Substanz), Einwirkdauer und Veränderungen in der Urotheloberfläche (Aufhebung der Kontinuität der Oberflächenauskleidung der Harnblaseninnenfläche durch den Tumor) **(32)**. Eine Penetration des Urothels durch die gängigen Chemotherapeutika konnte zwar durch Highley et al. im Tierversuch gezeigt werden, Taurolidin wurde im Rahmen dieser Versuche aber nicht getestet **(32)**. Taurolidin weist jedoch, wie oben bereits erwähnt, ein geringes Molekulargewicht auf **(35)**, was für eine gute Membrangängigkeit sprechen würde. Außerdem könnte Taurolidin unter anderem aber direkt an der Zelloberfläche, durch Übertragung von Methylolgruppen wirksam werden **(35)**, so dass es für die Entfaltung seiner Wirksamkeit eventuell gar nicht penetrieren muss. Es ist weiterhin nicht auszuschließen, dass die Einwirkungszeit von Taurolidin auf das Harnblasenkarzinom in unserem Experiment mit 20 Minuten zu gering gewählt war, um einen Therapieerfolg mit Taurolidin zu erzielen. Bei einer möglicherweise das Tumorstadium stimulierenden Wirkung durch Taurolidin könnten durch längere Einwirkungszeiten jedoch andererseits größere Tumoren bei den Versuchstieren resultieren. Für die Tiere war diese Einwirkungszeit außerdem die maximal zumutbare Belastung um ohne versuchsbeeinträchtigende Folgen wie Verluste von Versuchstieren durch zu lange Narkose arbeiten zu können. Des Weiteren aber handelte es sich bei den in unseren Versuchen nach der Methode von Bachor generierten Tumoren, wie in der Literatur beschrieben, nicht um ein vorwiegend oberflächliches Harnblasenkarzinom, sondern auch um einen intramuskulären, von normalem Urothel bedeckten Tumor **(4)**, so dass Taurolidin möglicherweise nicht oder nur in zu geringer Konzentration an den erwünschten Wirkort gelangte. Mit zunehmender Eindringtiefe der Chemotherapeutika nimmt außerdem deren Konzentration ab **(32)**. Die Wirkung von Taurolidin ist jedoch dosisabhängig, d.h. in niedrigen Dosierungen nimmt seine Wirksamkeit auf Tumorzellen ab **(52)**. Taurolidin weist jedoch eine geringe maximale Löslichkeit bei Konzentrationen von Taurolidin 2% auf, höhere Konzentrationen von maximal 3% können daher nur durch Zugabe von Kolloiden wie PVP (Polyvinylpropidon), einem Löslichkeitsfördernden Stabilisator, erreicht werden. Diese Taurolidinlösungen sind hypoton **(35)**. Um Taurolidin lokal ausreichend konzentriert in einer Dosis von 2% verabreichen zu können, könnte es durch Instillation von Taurolidin

in hypotoner Lösung zu Elektrolytverschiebungen über die Zellmembran der Tumorzellen und Aufbau eines Spannungsgradienten kommen und so das Tumorzellwachstum sogar stimuliert werden **(56)**. O'Grady und Lee beschreiben einen spannungsabhängigen Kalium-Kanal von Epithelzellen, dessen Aktivierung, möglicherweise durch Elektrolytverschiebung, für Zellproliferation und Tumorzellwachstum verantwortlich sein soll **(56)**. Ferner soll die intrazelluläre Konzentration von Mg^{2+} eine Rolle in der Wachstumsregulation von Zellen einnehmen **(63)**. Auch in unserem ersten Versuchsansatz waren bei lokal mit Taurolidin behandelten Tieren signifikant größere Tumoren zu verzeichnen, als bei der Kontrollgruppe. In ersten Versuchsteil könnte Taurolidin bei der lokalen Therapie daher ebenfalls zu hoch dosiert verabreicht worden sein und aufgrund seiner Darreichungsform als hypotone Lösung aber auch seiner Wirkungseigenschaften zu einem Therapieversagen bzw. zur Stimulation des Tumorzellwachstums geführt haben. Taurolidin soll nämlich, wie oben beschrieben, neben seiner spezifischen Wirkung auf Tumorzellen in hoher Dosierung auch Zellnekrosen verursachen, welche alle Zellarten, unter Anderem auch Zellen der Immunabwehr betreffen könnten **(5;35)**. Ferner soll Taurolidin eine immunmodulatorische Wirkkomponente aufweisen **(5;35;36)**. Wie oben beschrieben wirkt Taurolidin auf Tumorzellen, u.a. auch durch Übertragung von Methylolgruppen auf Oberflächenrezeptoren **(35)**. Eventuell könnte man über den selben Mechanismus, des weiteren aber auch über die antiinflammatorische Wirkkomponente von Taurolidin **(5;11;26;35;44)** ebenfalls eine supprimierende Wirkung auf Zellen der Immunabwehr diskutieren, welche bei hohen Dosen (Taurolidin 2%) der tumorsupprimierenden Wirkung überwiegt. Im zweiten Versuchsansatz wurde daher die lokal-intravesikale Dosis von Taurolidin 2% auf Taurolidin 1% reduziert.

Ein weiterer Grund für das Versagen der systemischen als auch der lokalen Therapie mit Taurolidin 2% in unserem ersten Tierversuch könnte zusätzlich in der hohen Zellzahl von 2×10^6 Zellen liegen, mit welcher durch Injektion in die Muskularis der Blase die Tumoren erzeugt wurden. Die Tumormasse der entstandenen Karzinome könnte durch Injektion von 2×10^6 Zellen per se relativ zu hoch gewesen sein um durch Gabe eines Chemotherapeutikums in entsprechender hoher Dosis einen Effekt auf den Tumor zu erzeugen, ohne schädliche Nebenwirkungen herbeizuführen. Für einen Tierversuch mit humanen Leukämiezellen ist ein Scheitern der Chemotherapie aufgrund zu hoher Tumormasse in den Versuchstieren beschrieben **(23)**.

Die überraschenden Ergebnisse des ersten Versuchsansatzes bildeten die Grundlage einen zweiten Versuch mit verändertem Aufbau anzusetzen. Im zweiten Versuchsansatz wurden bei den Ratten Harnblasenkarzinome mit einer verringerten Zellinjektionsmenge von 2×10^4 Zellen erzeugt um die Tumorlast zu reduzieren. Bei den intravenös mit Taurolidin behandelten Tieren wurde darauf verzichtet, den Ratten vor Tumorzellinjektion Taurolidin zu injizieren um eine mögliche Immunsuppression vor Tumorzellinjektion mit besseren Startbedingungen für das Tumorwachstum zu vermeiden. Die intravenöse Therapie wurde daher erst ab dem 10. Tag postoperativ mit Taurolidin 2%, 15 ml/kg Körpergewicht als Blocktherapie mit täglicher Taurolidingabe über jeweils 7 Tage, Behandlungspause von 3 Wochen und erneuter Therapie über 7 Tage durchgeführt. Ziel war es, ein anderes ebenfalls in der Klinik verwendetes Therapieschema auf seine Wirksamkeit zu untersuchen und eventuell höhere Wirkstoffspiegel mit besserer Anreicherung am erwünschten Wirkort zu erzielen. Die lokal, intravesikal applizierte Taurolidindosis wurde von Taurolidin 2% auf 1% verringert um einen möglichen toxischen, bzw. das Tumorwachstum stimulierenden Effekt hoher lokaler Dosen von Taurolidin abzuschwächen, bzw. zu vermeiden. Ab der ersten Woche postoperativ wurde die intravesikale Therapie 1x wöchentlich mit Taurolidin 1% durchgeführt. Für die systemische Therapie stellte nach unseren Überlegungen die höhere Dosierung von Taurolidin 2% kein Problem dar, weil sich die applizierte Taurolidinmenge schneller auf ein größeres Verteilungsvolumen verteilte. Im zweiten Versuchsteil wurde ebenfalls keine Reduktion der Tumorgewichte im Vergleich zur Kontrollgruppe bei sowohl intravenös als auch intravesikal mit Taurolidin behandelten Tieren erzielt.

Auch im 2. Versuchsansatz konnten daher die durch Braumann beschriebenen Ergebnisse, wonach durch intravenöse Gaben von Taurolidin eine Hemmung des Tumorwachstums beim Versuchstier erzielt werden konnte, nicht bestätigt werden (11). Trotz Umstellung des Schemas für die systemische Taurolidintherapie konnten wir keine hemmende Wirkung von Taurolidin auf das Tumorwachstum von Harnblasenkarzinomen erzielen. Die Gabe von Taurolidin als Block schien sich aber insofern als günstig zu erweisen, als dass es zu keiner Zunahme der Tumorgewichte (kein Auftreten schwererer Tumore bei mit Taurolidin behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe, wie im ersten Versuchsansatz) kam. Wie oben beschrieben, wurde außerdem im zweiten Versuchsansatz die Tumorlast der zu therapierenden Harnblasenkarzinome verringert. In Kombination mit dem Wegfallen einer möglichen

Immunsuppression vor Tumorzellimplantation durch vorzeitige Taurolidingaben könnten beide Faktoren ebenfalls eine Rolle für ein etwas besseres Abschneiden der systemischen Taurolidintherapie im zweiten Versuchsansatz spielen **(5;23)**. Eventuell wurden aber auch im 2. Versuchsansatz noch keine ausreichende Wirkstoffverfügbarkeit oder höherer Konzentrationen an Taurolidin während des Therapieblocks erreicht, um einen das Tumorwachstum hemmenden Effekt durch Taurolidin zu erzielen. Andererseits bestände bei höheren Konzentrationen an Taurolidin die Gefahr, dass eine möglicherweise das Tumorwachstum stimulierende gegenüber der Tumorwachstums-hemmenden Wirkung durch Taurolidin überwiegen würde.

Auch durch lokale Applikation von Taurolidin 1% konnte das Tumorwachstum im 2. Versuchsansatz nicht gehemmt werden. Im Gegensatz zum ersten Versuchsansatz, in welchem mit Taurolidin 2% gearbeitet wurde, kam es durch lokal-intravesikale Instillation mit NaCl-Lösung auf 1% verdünnter Taurolidinlösung jedoch zu keiner Stimulation des Tumorwachstums. Diese Beobachtung könnte, wie oben beschrieben, für eine das Wachstum von Tumorzellen stimulierenden Nebenwirkung von Taurolidinlösung sprechen, welche eventuell nur bei höheren Taurolidinkonzentrationen (2%) eine Rolle spielt. Verantwortlich hierfür könnte sowohl ein immunmodulatorischer Effekt, eine toxische Wirkung als auch eine proliferationsstimulierende Wirkung aufgrund der größeren Hypotonität der Taurolidinlösung 2% sein **(36;52;56;63)**. Diese das Tumorwachstum stimulierende Wirkung wäre dann bei auf 1% mit isotoner NaCl verdünnter Taurolidinlösung lokal weniger ausgeprägt, so dass es im 2. Versuchsansatz zu keiner Förderung des Tumorwachstums kam.

In unserem Tierversuch konnte durch keines der im ersten und zweiten Versuchsansatz gewählten Therapieschemata mit Taurolidin eine Hemmung auf das Wachstum des Harnblasenkarzinoms erzielt werden. Beim Vergleich der systemischen und lokalen Therapie fiel aber auf, dass die lokale Therapie im ersten Versuchsansatz signifikant zu einer Zunahme der Tumorgewichte bei den Versuchstieren geführt hat, im Gegensatz zu Tieren, welche Taurolidin systemisch erhielten. Tendenziell waren im ersten Versuchsansatz Tumore nach lokaler Taurolidibehandlung auch schwerer als die der Tiere nach systemischer Taurolidintherapie. In beiden Versuchsansätzen kam es weiterhin zu vorzeitigen Verlusten an Versuchstieren (n=7). 4 dieser Tiere gehörten zu der lokal mit Taurolidin behandelten Gruppe, wovon drei unter der Taurolidin 2% im

ersten Versuchsansatz, und eines im zweiten Versuchsansatz unter lokaler Taurolidintherapie 1% eventuell aufgrund des bei Obduktion nachweisbaren ausgedehnten Tumorwachstums verstarben. Demgegenüber verstarb lediglich 1 Tier der systemisch mit Taurolidin behandelten Gruppe des zweiten Versuchsansatzes unter Durchführung der für die Behandlung notwendigen Inhalationsnarkose. Es verstarben aber insgesamt auch 2 Tiere der Kontrollgruppe, welche lokal mit NaCl behandelt wurden. Eines der Tiere der Kontrollgruppe verstarb unter Narkose, das andere am ehesten an den Folgen ausgedehnten Tumorwachstums. Neben einer Taurolidin-nebenwirkung als Ursache für diese Beobachtung könnte daher ein weiterer Grund in der höheren Belastung der Tiere durch die Ausführung der lokalen gegenüber der systemischen Behandlung liegen. Unterschiedliche Belastung für die Versuchstiere ergibt sich durch Ausführung der verschiedenen Therapieschemata, z.B. durch unterschiedlichen Behandlungszyklus und Punktion einer Vene für die intravenöse Injektion versus Katheterisierung der Harnblase bei intravesikaler Instillation, und könnte bei Taurolidingabe gegenüber der Kontrollgruppe zusätzlich gesteigert werden. Die Ausschüttung von Stresshormonen wie Glucokorticoiden, welche z.B. bei chirurgischen Eingriffen abhängig von Größe und Dauer des Eingriffes freigesetzt werden, kann immunsuppressiv und stimulierend auf das Tumorwachstum wirken **(41)**. Daneben wurden zur Durchführung der Therapie bei lokal und systemisch therapierten Versuchsgruppen unterschiedlich lange Narkosezeiten benötigt. Eine immunsuppressive Wirkung durch Narkotika und eine Begünstigung des Wachstums von Tumoren, in Abhängigkeit von Dosis und Narkosezeit, ist in der Literatur ebenfalls beschrieben, und könnte beim Einsatz von Isoflurane zusätzlich eine Rolle spielen **(41;53)**. Isoflurane führte im Tierversuch zu einer Hemmung der Funktion von Natürlichen Killerzellen, die in der Bekämpfung von Tumorzellen involviert sind **(51)**. In unserem Versuch waren die Ratten, die lokal behandelt wurden, jeweils für mindestens 20 Minuten in Inhalationsnarkose mit Isoflurane während der Taurolidininstillation, wobei intravenös therapierte Ratten teilweise mit kürzeren Narkosezeiten behandelt werden konnten. Andererseits erfolgte die systemische Taurolidintherapie pro Versuchsansatz insgesamt öfter (1x pro Woche lokal vs. 3x pro Woche systemisch bzw. 1x pro Woche lokal vs. Blocktherapie). Die Immunsuppression mit Begünstigung des Tumorwachstums wäre damit vermutlich bei den systemisch behandelten Tieren aufgrund ihrer häufigeren Exposition mit Isoflurane stärker ausgeprägt. Über eine kreislaufdepressive Wirkung könnten Inhalationsnarkotika außerdem zu einem pH-

Abfall führen. Bei Azidosen wird eine resultierende Immunsuppression und Stimulation des Tumorwachstums diskutiert, eventuell über eine Funktionsänderung bei Makrophagen (37;47). Taurolidin wirkt ebenfalls Atem- und Kreislaufdepressiv, zusätzlich positiv vagoton, so dass es zu einer Azidose beim Versuchstier kommen könnte (35). Diese Nebenwirkung ist besonders bei schneller intravenöser Injektion, d.h. systemischer Therapie mit Taurolidin ausgeprägt (35). Folglich hätte eine proliferationsstimulierende Wirkung durch Azidose im Versuchstier besonders für systemisch behandelte Tiere erwartet werden können. Eine Stimulation des Tumorwachstums bei den lokal therapierten Tieren im ersten Versuchsansatz lässt sich somit wahrscheinlich nicht auf Isoflurane-Exposition und/oder Azidose beim Versuchstier zurückführen.