

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Laserchirurgie
der evangelischen Elisabeth Klinik – Berlin
akademisches Lehrkrankenhaus der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss des Antiangiogenetikums Taurolidin auf das Wachstum des
Osteosarkoms – ein Mausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leuta Larissa Naumann
aus Berlin

Datum der Promotion: 26.6.2022

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis.....	7
Abstracts	8
Einleitung	11
Osteosarkom	11
Taurolidin	24
Zusammenfassung und Zielsetzung.....	29
Material und Methodik.....	30
Materialien	30
Herkunft der Tiere.....	32
Randomisierung.....	32
Zelllinie und Zellkultivierung.....	33
Studiendesign.....	34
Intravenöse und intraperitoneale Therapie.....	34
Obduktion und Dokumentation	37
Fixierung, Gewebereinbettung und Schnitthanfertigung.....	38
Färbungen.....	39
Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	42
Statistische Auswertung	42
Ergebnisse	44
Einschlusskriterien.....	44
Mortalitätsrate.....	45
Anzahl und Lokalisation der Tumorabsiedlungen.....	46
Tumorgewicht des intravenösen Therapiearms.....	50
Tumorgewicht des intraperitonealen Therapiearms.....	53
Entwicklung des Gewichts der Tiere im Verlauf	55
Mikrogefäßdichte des intramuskulär gewachsenen Tumors	59
Mitoserate des intramuskulär gewachsenen Tumors	63
Beobachtete Nebenwirkungen während des Versuchszeitraums.....	67
Diskussion.....	68
Zusammenfassung.....	91
Anhang	93
Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung eines infizierten Tieres (Score Sheet „Humane Endpoints“).....	93
Literaturverzeichnis	94

Eidesstattliche Versicherung.....	102
Lebenslauf (mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht)	103
Danksagung.....	104

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	"sunburst pattern" eines Osteosarkoms	15
Abb. 2:	Abbildung der Austrittsstelle des zentralvenösen Katheters (ZVK)	35
Abb. 3:	Injektionsbesteck zur Applikation der i. v.-Therapie	35
Abb. 4:	Verschlussmechanismus des verwendeten Kathetersystems	36
Abb. 5:	Vermeiden einer Luftembolisation	36
Abb. 6:	Handhabung des Katheters	36
Abb. 7:	Aufsetzen der Kanüle	36
Abb. 8:	Injektion der Lösung	37
Abb. 9:	Intraperitoneale Injektion	37
Abb. 10:	Intramuskulärer Tumor	46
Abb. 11:	Präparation des intramuskulären Tumors	47
Abb. 12:	Querschnitt des parossären, intramuskulären Osteosarkoms	47
Abb. 13:	Mittels Längslaparotomie eröffnetes Abdomen	48
Abb. 14:	Vergrößerung einer das Mesenterium und den Dünndarm infiltrierenden Metastase	48
Abb. 15:	Das intramuskuläre Tumorgewicht (in mg) des intravenösen Therapiearms	50
Abb. 16:	Das intraperitoneale Tumorgewicht (in mg) des intravenösen Therapiearms	51
Abb. 17:	Das intramuskuläre Tumorgewicht (in mg) des intraperitonealen Therapiearms	53
Abb. 18:	Das intraperitoneale Tumorgewicht (in mg) des intraperitonealen Therapiearms	54
Abb. 19:	Darstellung des Gewichtsverlaufs der intravenösen Therapiegruppen während des gesamten Beobachtungszeitraums (Tag 0-35)	56
Abb. 20:	Darstellung des Gewichtsverlaufs der intraperitonealen Therapiegruppen während des gesamten Beobachtungszeitraums (Tag 0-35)	58
Abb. 21:	„hot spots“ der Vaskularisierung bei 400-facher Vergrößerung	59
Abb. 22:	Vergleich der Gefäßdichte insgesamt	60

Abb. 23:	Vergleich der Gefäßdichte der einzelnen intravenösen Therapiegruppen	61
Abb. 24:	Vergleich der Gefäßdichte der einzelnen intraperitonealen Therapiegruppen	62
Abb. 25:	„hot spots“ der Mitoserate bei 400-facher Vergrößerung	63
Abb. 26:	Vergleich der in der S-Phase der Mitose befindlichen Zellen (Zellteilungsrate) insgesamt	64
Abb. 27:	Vergleich der in der S-Phase der Mitose befindlichen Zellen (Zellteilungsrate) der intravenösen Therapiegruppen	65
Abb. 28:	Vergleich der in der S-Phase der Mitose befindlichen Zellen (Zellteilungsrate) der einzelnen intraperitonealen Therapiegruppen	66

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Geschlechtsspezifische Verteilung des Osteosarkoms insgesamt und innerhalb der einzelnen Altersgruppen	13
Tab. 2:	Verteilung des Osteosarkoms in Abhängigkeit von der Altersgruppe	14
Tab. 3:	Relative 5-JÜR (Fünfjahresüberlebensrate) in Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors und der Altersgruppe	14
Tab. 4:	Besonderheiten der wichtigsten von der WHO anerkannten Subtypen des Osteosarkoms	17
Tab. 5a:	Definitionen des Enneking-Staging-Systems	18
Tab. 5b:	Enneking-Staging-System für maligne Tumoren	19
Tab. 6:	Einfluss Tauolidins auf die Zytokinfreisetzung	25
Tab. 7:	Darstellung der Randomisierung	33
Tab. 8a:	Übersicht über die verwendeten Primär-Antikörper	41
Tab. 8b:	Übersicht über den verwendeten Sekundär-Antikörper	41
Tab. 9:	Anzahl und Verteilung der Tiere, die für die Auswertung herangezogen wurden	44
Tab. 10:	Ausschlusskriterien für die Auswertung	45
Tab. 11:	Absolute und relative Häufigkeit (X/Y%) des Befalls der einzelnen abdominalen Organe	49
Tab. 12:	Vergleich des Ausgangsgewichts der Versuchstiere der einzelnen Therapiegruppen (i. v. und i. p.)	55

Abstracts

Hintergrund: Das Osteosarkom ist die häufigste maligne Entität des Knochens im Kinder- und jungen Erwachsenenalter. Die Fünfjahresüberlebensrate konnte mit Einführung der neoadjuvanten und adjuvanten Chemotherapie ergänzend zur operativen Therapie von ursprünglich 20% auf bis zu 70% verbessert werden. Jedoch sind weitere Therapieoptimierungen darüber hinaus kaum vorhanden. Insbesondere ist gerade die Versorgung disseminierter und rezidivierter Befunde ernüchternd, sodass neue Therapieoptionen erforderlich sind.

Taurolidin, ein Derivat der Aminosäure Taurin, scheint aufgrund seiner antiadhärenten, antineoplastischen und antiangiogenetischen Eigenschaften einerseits und seines geringen Nebenwirkungsspektrums andererseits vielversprechend für den Einsatz in der experimentellen Tumorthherapie zu sein.

Material und Methodik: Verwendet wurden 60 Balb/c Mäuse, denen $2,5 \times 10^5$ Osteosarkomzellen der Linie K7M2 intramuskulär sowie intraperitoneal appliziert wurden. Die Therapie wurde unmittelbar nach Tumorzellimplantation begonnen und für eine Woche fortgesetzt. Die Versuchstiere wurden zu gleichen Teilen in einen intravenösen und einen intraperitonealen Therapiearm eingeteilt. Innerhalb des jeweiligen Therapiearms erfolgte die Therapie entsprechend der Gruppenzugehörigkeit in einer Kontrollgruppe (0,9% NaCl-Lösung), einer 1% Taurolidin-Gruppe (400 mg/kg Körpergewicht (KG) und Tag) und einer 2% Taurolidin-Gruppe (800 mg/kg KG und Tag). Die Obduktion und Gewebefixierungen erfolgten drei Wochen später. Die Mikrogefäßdichte wurde mittels CD31-Färbung, die Mitoserate mittels BRDU-Färbung beurteilt.

Ziel war es, den Einfluss Taurolidins auf das Tumorwachstum, die Zellteilungsrate und die Mikrogefäßdichte zu ermitteln.

Ergebnisse: Es konnte eine signifikante Reduktion der intraperitonealen Tumorlast in den intraperitonealen Therapiegruppen gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Der intramuskuläre Tumor der intraperitonealen Therapiegruppen konnte nicht signifikant beeinflusst werden. Die intravenöse Applikation von Taurolidin zeigte keinen Einfluss auf das intramuskuläre Tumorwachstum, jedoch eine nicht-signifikante Inhibition der intraperitonealen Tumorlast. Dieses Ergebnis korreliert mit einer Tendenz hin zu einer niedrigeren Mitoserate (BrdU) in dieser Therapiegruppe.

Die Auswertung der immunhistochemischen CD31-Färbung ergab keine signifikanten Veränderungen der Gefäßdichte in beiden Therapiearmen.

Zusammenfassung und Ausblick: Die Arbeit untersuchte die antiproliferative Wirkung Taurolidins auf intraperitoneale Tumorzellen. Ein signifikanter Einfluss auf das intramuskuläre Tumorstadium und die Angiogenese war nicht feststellbar. Ob Taurolidin als Kombinationspartner zu anderen Chemotherapeutika weiter infrage kommt, muss in weiteren Studien insbesondere untersucht werden.

Background: The osteosarcoma is the most common malignant bone tumor in children and young adults. Recent development of new chemotherapeutic agents and strategies in combination with surgical resection have improved the overall survival rate to up to 70%. However, there have only been very few advances beyond this multimodal concept in regard to quality of life. New treatments are needed specifically for metastatic and recurring disease. Taurolidine, a derivative of the amino acid taurine, has proven to own antineoplastic and antiangiogenetic properties combined with a small spectrum of adverse effects.

Material and Methods: 60 male Balb/c mice received 2.5×10^5 K7M2 osteosarcoma cells intramuscularly and intraperitoneally. The treatment started subsequently for a period of 7 days. The treatment has been divided into intravenous and intraperitoneal therapy arms. In both arms the groups were defined as control (NaCl 0.9%), 400mg/kg bodyweight or 800 mg/kg b. w. Taurolidine per day. The study was terminated after 3 weeks post-therapy and primary tumor plus metastases were harvested for further analyses. A CD31- and BRDU-staining has been performed to measure microvessel density and proliferation rate.

Results: A significant reduction in intraperitoneal tumor load was observed in the intraperitoneal therapy groups compared to the control group. The intravenous application of Taurolidine showed a non-significant inhibition of intraperitoneal tumor load. Both therapy branches had no effect on the intramuscular tumor growth. The result correlates with a tendency to lower mitosis rates (BrdU) in the corresponding therapy groups. The evaluation of vessel density using CD31-staining showed no significant changes in either group.

Summary: We could demonstrate an antiproliferative effect of Taurolidine on intraperitoneal tumor growth. An impact on intramuscular tumor growth was not noticeable. There was no effect on angiogenesis.

Conclusion: The role of Taurolidine as a combination partner to other chemotherapy drugs in tumor therapy remains promising. Optimized studies are needed to gain clarification of better therapy regimens.

Einleitung

Osteosarkom

Epidemiologie

Das Osteosarkom ist ein primär maligner Knochentumor, der insbesondere Kinder und junge Erwachsene betrifft, und in dieser Altersgruppe die häufigste Ursache für einen primär malignen ossären Prozess darstellt (1). Kennzeichnend ist der aggressive Verlauf, der durch eine frühe Metastasierung charakterisiert ist (1). Unter multimodaler Therapie, bestehend aus neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie sowie radikaler operativer Therapie, lässt sich bei lokalisiertem Ausgangsbefund eine Langzeitüberlebensrate von bis zu 70% erreichen (2, 3). Für Patient*innen mit disseminiertem oder irresektablem Befund sowie für Patient*innen mit Rezidivbefund (Fünfjahresüberlebensrate (5-JÜR): 20% und 5-JÜR: 23-29%) ist die Prognose weiterhin schlecht (1-4).

Es ist weiterhin anzumerken, dass die Gesamtüberlebensrate seit Einführung dieses multimodalen Therapiekonzepts für gut drei Jahrzehnte nahezu unverändert blieb (2, 5). Wu et al. veröffentlichen 2018 eine Auswertung der „SEER Datenbank“ des „National Cancer Institutes“ bezüglich der Inzidenz und Überlebensrate von Osteosarkom-Patient*innen (6). Erstmals seit drei Jahrzehnten wurde mit der Veröffentlichung dieser Daten ein leicht verbessertes Langzeitergebnis in der Osteosarkomtherapie beschrieben. Insgesamt wurden 2.925 Patient*innendaten analysiert. Die Zehnjahresüberlebensrate (10-JÜR) aller Altersgruppen (0-29 Jahre) verbesserte sich vom 57,7% auf 61,0% (6). Ursächlich für die Diskrepanz zu oben genannter 5-JÜR von 70% scheinen die Gesamtauswertung (lokalisierter Ausgangsbefund versus alle Tumorstadien) und der längere Beobachtungszeitraum. Auf die einzelnen Altersstufen (Kinder 0-9 Jahre, Jugendliche 10-19 Jahre und junge Erwachsenen 20-29 Jahre) bezogen, konnte der größte Zugewinn bezüglich der 10-JÜR bei den 0-9-Jährigen ausgemacht werden: Verbesserung der 10-JÜR von 48,2% auf 64,7%. Bei den 10-19-Jährigen stieg die 10-JÜR von 60,5% auf 62,0% und in der Altersgruppe 20-29 von 54,7% auf 60,0%. Die Gründe für die beobachtete Verbesserung der Überlebensrate sahen Wu et al. jedoch in erster Linie in einer umfassenderen Gesundheitsversorgung (einschließlich eines frühzeitigen Stellens der definitiven Diagnose) und eines breiteren Zugangs zur bestehenden Kombinationstherapie (6). Diese Schlussfolgerung scheint plausibel, da die

Fortschritte bezüglich der Überlebensrate in den sozial benachteiligten Gesellschaftsschichten am ausgeprägtesten waren. Bezüglich dieser Studie muss jedoch berücksichtigt werden, dass die eingeschlossenen Daten aus dem SEER-Programm (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program) akquiriert wurden und diese somit aus einer populationsbasierten, epidemiologischen Datenbank der USA (United States of America) stammen. Eine unmittelbare Übertragung dieser Ergebnisse auf die Überlebensrate in Deutschland ist somit aufgrund unterschiedlicher Gesundheitssysteme nicht möglich. Wichtig erscheint dennoch, dass Wu et al. keinen signifikanten klinischen Behandlungsfortschritt aufgrund neuer Therapieoptionen beschrieben (6). Daher ist die Entwicklung neuer Therapiemodelle zur Verbesserung des Therapieerfolges und bei Erhaltung der Langzeit-Lebensqualität erforderlich (3, 5).

Bezüglich der Lebensqualität ist herauszuheben, dass die schwerwiegenden Nebenwirkungen und Folgeerscheinungen insbesondere der Chemotherapie gerade in Hinblick auf das junge Alter der Patient*innen weiterhin eine Herausforderung darstellen (1, 3).

Prävalenz, Inzidenz und Ätiologie

Die Betrachtung der Inzidenz verdeutlicht den Stellenwert der Verträglichkeit der Chemotherapie und möglicher Langzeitfolgen vor dem Hintergrund des Erkrankungsalters. Die Inzidenz des Osteosarkoms ist mit 4/1.000.000 seit drei Jahrzehnten zwar stabil (6), weist jedoch zwei Häufigkeitsgipfel auf: Mit 4,4/1.000.000 tritt es am häufigsten bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen (0-24 Jahre) auf. Zwischen dem 25.-59. Lebensjahr (LJ.) stellt sich ein Plateau mit einer niedrigeren Erkrankungshäufigkeit ein (1,7/1.000.000), gefolgt von einem zweiten Häufigkeitsgipfel um die 7.-8. Lebensdekade (4,2/1.000.000) (1, 5). Somit ist ein nicht unerheblicher Teil der Patient*innen zum Erkrankungszeitpunkt im Kinder- und Jugendalter.

Bei der Geschlechtsverteilung scheint das männliche (m) Geschlecht insgesamt häufiger betroffen zu sein (Tab.1) (1). Allerdings zeigte sich, dass das weibliche (w) Geschlecht insbesondere in der Adoleszenz früher erkrankt (Häufigkeitsgipfel: m:w = 16:12 Jahre). Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte das frühere Einsetzen der Pubertät und die damit einhergehenden hormonellen Veränderungen sowie das daraus resultierende verstärkte Knochenwachstum sein (1). Es wird vermutet, dass die maligne Entartung in jungem Alter mit hoher Wahrscheinlichkeit in schnell wachsenden Zellen auftritt (5).

Altersgruppe	gesamt	0-24 Jahre	25-59 Jahre	60+ Jahre
m:w	1,22:1	1,34:1	1,2:1	0,89:1

Tab. 1: Geschlechtsspezifische Verteilung des Osteosarkoms insgesamt und innerhalb der einzelnen Altersgruppen (1).

Das Osteosarkom weist zwei Häufigkeitsgipfel auf, zum einen Patient*innen unter 25 Jahren und zum anderen Patient*innen über 60 Jahren. Zwischen dem 25. und 59. Lebensjahr ist die Inzidenz geringer. Außerdem betrifft das Osteosarkom insgesamt häufiger das männliche Geschlecht als das weibliche. Lediglich in der Altersgruppe über 60 Jahren erkranken mehr Frauen als Männer.

Letztendlich ist die Ätiologie des Osteosarkoms jedoch weitgehend ungeklärt. Es scheint im Kindesalter sporadisch aufzutreten (5). Genetisch prädisponierend scheinen das hereditäre Retinoblastom, das Li-Fraumeni-Syndrom, das Rothmund-Thomson-Syndrom, das Bloom-Syndrom und das Werner-Syndrom zu sein (5, 7).

Als Risikofaktor für das Auftreten im Erwachsenenalter gelten eine durchlaufene Radiatio oder Chemotherapie, ein Zustand nach (Z. n.) Morbus Paget oder ein Z. n. einem benignen Knochentumor, wobei hier möglicherweise eine Überinterpretation früherer Daten erfolgt sein könnte. So widersprachen Mirabello et al. den 1986 von Huvos et al. veröffentlichten Ergebnissen, dass das Osteosarkom in höherem Lebensalter v. a. als Zweitumor auftritt. Mirabello et al. konnten nur in 34% der Fälle eine Assoziation mit einem Morbus Paget oder einem vorherigen Malignom feststellen und gehen davon aus, dass ca. 2/3 der Osteosarkome auch in fortgeschrittenem Lebensalter spontan entstehen (1).

Klinik, Prognose und Diagnostik

Somit sind Prävalenz und Inzidenz wichtige zusätzliche Parameter, insbesondere aufgrund der initial unspezifischen Klinik zur Einleitung der weiteren Diagnostik. Die initiale Vorstellung der Erkrankten erfolgt meist mit seit Monaten bestehenden unspezifischen Schmerzen, häufig im Bereich der langen Röhrenknochen, insbesondere der Metaphysen des distalen Femurs und der proximalen Tibia (Tab. 2) (1, 5, 7). Zusätzlich lassen sich in der klinischen Untersuchung oft eine Schwellung und Bewegungseinschränkungen feststellen (5).

Die Lokalisation des Tumors ist von großer prognostischer Bedeutung. Der Befall der kurzen und langen Röhrenknochen geht hier mit einer vergleichsweise guten Überlebensrate einher, während eine Beteiligung des Achsenskeletts, insbesondere der Beckenregion, zu einem reduzierten Gesamtüberleben führt (Tab. 3) (1, 7).

Lokalisation \ Altersgruppe	0-24 J.	25-59 J.	60+ J.
Lange Röhrenknochen der UE	<u>74,5%</u>	43,4%	<u>26,7%</u>
Lange Röhrenknochen der OE	11,2%	9,8%	7,5%
Beckenregion	3,6%	10,9%	<u>18,8%*</u>
Schädelknochen	3,2%	10,0%	5,3%
Mandibula	1,9%	7,2%	5,8%**
Brustkorb	1,8%	3,7%	4,1%**
Wirbelsäule	1,2%	3,8%	4,9%**
Kurze Röhrenknochen der UE	1,1%	1,3%	1,4%
Kurze Röhrenknochen der OE	0,3%	0,9%	0,7%

Tab. 2: Verteilung des Osteosarkoms in Abhängigkeit von der Altersgruppe (1).

Insgesamt tritt das Osteosarkom am häufigsten im Bereich der langen Röhrenknochen, insb. des distalen Femurs und der proximalen Tibia auf. Ein abweichendes Verteilungsmuster zeigt sich in der Altersgruppe 60+, in der das Osteosarkom häufiger als Zweitumor, bspw. nach Radiatio, auftritt und häufiger das Aschenskelett betrifft. Am häufigsten wird das Osteosarkom als Zweitumor in der Backenregion beobachtet*. Weiterhin fallen geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich des Verteilungsmusters des Zweitumors auf**; beim weiblichen Geschlecht bevorzugt im Brustbereich (und Mandibula), beim männlichen Geschlecht bevorzugt im Bereich der Wirbelsäule und des Beckens.

UE = untere Extremität; OE = obere Extremität

Lokalisation \ Altersgruppe	0-24 J.	25-59 J.	60+ J.
Lange Röhrenknochen der UE	64,1%	67,1%	29,8%
Lange Röhrenknochen der OE	56,6%	53,9%	7,3%
Beckenregion	<u>25,4%</u>	<u>30,8%</u>	<u>4,4%</u>
Brustkorb	51,9%	45,8%	19,7%
Wirbelsäule	58,9%	28,8%	5,7%
Kurze Röhrenknochen der UE	86,8%	53,4%	27,6%
Kurze Röhrenknochen der OE	75%	100%	78%

Tab. 3: Relative 5-JÜR (Fünfjahresüberlebensrate) in Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors und der Altersgruppe (1).

Sowohl die Lokalisation des Tumors als auch das Alter der Patient*innen beeinflussen die 5-JÜR. Die Beteiligung der kurzen und langen Röhrenknochen geht mit einer höheren 5-JÜR einher, wobei die Prognose der Patient*innen der Altersgruppe 0-25 J. deutlich besser ist als die der Altersgruppe 60+ ist. Die 5-JÜR der Patient*innen über 60 J. scheint dabei aufgrund der höheren Komorbidität und der prozentual höheren Beteiligung des Achselskeletts geringer zu sein.

Zu einer schlechteren Prognose führt des Weiteren eine Fernmetastasierung, die etwa 20% der Patient*innen zum Diagnosezeitpunkt betrifft (5). Zusätzlich wird angenommen,

dass ein Großteil (bis zu 80%) der Patient*innen mit zum Diagnosezeitpunkt lokalisiertem Stadium okkulte Mikrometastasen aufweist (3, 5). Zwar gelingt in 30 bis 50% der Fälle von pulmonaler Metastasierung eine Ausheilung, dennoch stellt insbesondere die selbige mit konsekutiver respiratorischer Insuffizienz den limitierenden Faktor der Erkrankung dar (7).

Sowohl die Tumorlokalisierung als auch das Tumorstadium sind somit prognostisch entscheidend. Dementsprechend ist die frühe Diagnosestellung für die weitere Prognose essentiell (5, 7). Die frühzeitige Sicherung der Diagnose stellt allerdings aufgrund der zu Beginn unspezifischen Symptomatik, wie Gelenkbeschwerden unter Belastung, weiterhin eine Herausforderung dar. Hinzu kommt, dass die Beschwerden wegen des jungen Alters der Patient*innen oft fälschlicherweise für Wachstumsschmerzen gehalten werden und die Einleitung der Diagnostik verzögert erfolgt (5). Durchschnittlich vergehen somit bis zur Sicherung der Diagnose 3-4 Monate (7).

Ist die Verdachtsdiagnose gestellt, lässt sich diese anhand der Periostreaktion im Rahmen des raschen und aggressiven ossären Wachstums, des Verlusts der Trabekelstruktur und der Inhomogenität im Rahmen der osteoplastischen und osteoklastischen Prozesse in der konventionellen Röntgenaufnahme bekräftigen. Klassische radiologische Merkmale sind das Codman-Dreieck und das „sunburst pattern“ (Abb.1) (5, 7).



Abb. 1: „sunburst pattern“ eines Osteosarkoms. Aufgrund des raschen Wachstums kommt es zu einer ungeordneten Knochen- und Periostreaktion. Diese ist im Bereich der Spongiosa und Kortikalis an der unscharfen verwaschenen Struktur und im Bereich des Periosts durch eine inhomogene Reaktion, die hier an Sonnenstrahlen erinnert, erkennbar (7).

Zum Staging und zur weiteren Verifizierung der Verdachtsdiagnose, die sich aus der klinischen Präsentation und dem initialen Nativröntgen ergeben hat, gehört die Magnetresonanztomographie (MRT) der Primärtumorregion (5, 8). Die MRT ist der Computertomographie (CT) aufgrund der besseren Weichteilbeurteilung überlegen, wobei die Spiral-CT des Thorax zur Detektion pulmonaler Metastasen bevorzugt wird (8). Ebenfalls zum Standard gehört die 3-Phasen-Skelettszintigraphie mit Technetium zur

Beurteilung weiterer Knochenläsionen, sowie ein PET-Scan (Positronen-Emissions-Tomographie) (5, 7, 8). Letzteres kann als Ausgangsuntersuchung zur weiteren Beurteilung des Therapieansprechens herangezogen werden (5, 8). Ergänzend erfolgt standardmäßig die apparative Diagnostik mittels Echokardiographie, Lungenfunktionsdiagnostik und Audiometrie (7, 8).

Neben der apparativen Diagnostik ist eine Biopsie zur histopathologischen Auswertung und definitiven Sicherung der Diagnose erforderlich (5). Zur Fehlervermeidung und um ausreichend Material zu gewinnen, wird hierzu in vielen Zentren die chirurgische Inzisionsbiopsie bevorzugt (5, 8). Die Schwierigkeit der histologischen Auswertung ist dem pleomorphen Erscheinungsbild sowie den unterschiedlichen Subtypen des Tumors geschuldet und eine weitere Erklärung für die verzögerte Diagnosestellung (7).

Als Charakteristikum zeigt sich in der Histopathologie das Bild eines pleomorphen, hochmalignen Tumors mesenchymalen Ursprungs, der üblicherweise ein äußerst destruierendes Wachstum und eine starke Vaskularisierung zeigt (7). In der „WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone“ von 2002 unterscheidet die WHO zehn Subtypen (9). Zu den drei klassischen Subtypen zählen das osteoblastische, das chondroblastische und das fibroblastische Osteosarkom (Tab. 4). Zusätzlich werden das teleangiektatische, das kleinzellige, das niedrigmaligne zentrale, das sekundäre, das parossale, das periostale Osteosarkom und das hochmaligne Oberflächenosteosarkom unterschieden (7-9).

Diese Einteilung ist in der 2013 erschienen Neuauflage unverändert, wobei nochmals auf die fehlende Evidenz bezüglich eines Zusammenhangs zwischen Subtyp und Prognose hingewiesen wird (10). Das gemeinsame Merkmal aller Subtypen ist die Synthese von Osteoid und/oder Knochen (5), als Unterscheidungskriterium zu anderen Sarkomen, wobei der Anteil des Osteoids inter- und intraindividuell variiert (7). Eine weitere Besonderheit des Osteosarkoms ist das gemeinsame Auftreten unterschiedlicher Subtypen innerhalb eines Tumors und stellt eine weitere Herausforderung bei der Diagnosefindung dar (7, 10).

Subtypen (WHO)	vorherrschende Matrix	vorherrschende Zellenbild
osteoplastisch	Osteoid o. Knochen	buntes Bild aus malignen plasmatischen bis epitheloiden Osteoblasten, rund-ovale Zellen, Spindelzellen, anaplastischen mono- oder multinukleären Riesenzellen
chondroblastisch	meist hyaliner Knorpel	intralacunär liegende maligne Zellen
fibroblastisch	wenig Osteoid	v. a. Spindelzellen

Tab. 4: Besonderheiten der wichtigsten von der WHO anerkannten Subtypen des Osteosarkoms (7, 9).

Das Osteosarkom lässt sich anhand der vorherrschenden Matrix und des dominierenden Zellbildes in zehn von der WHO aktuell anerkannte Subtypen unterteilen, wobei das osteoplastische, das chondroblastische und das fibroblastische Osteosarkom am häufigsten vorkommen.

Die Zuordnung zu den einzelnen Subtypen erfolgt anhand der vorherrschenden Matrix und des dominierenden Zellbildes.

Die Zusammenschau der Befunde, der histopathologischen Begutachtung und der bildgebenden Verfahren ermöglicht letztendlich die Festlegung des Tumorstadiums. Diese erfolgt anhand des Staging-Systems nach Enneking für muskuloskeletale Tumoren (Tab. 5a/Tab. 5b), wobei eine Einteilung nach der TMN-Klassifikation ebenfalls möglich ist (5).

Grading = G			
G0	= benigne Läsion		
G1	= I	= niedrigmaligen Läsion = low grade	
G2	= II	= hochmaligne Läsion = high grade	
Lokalisation und Ausdehnung = T			
T0		= benigne Läsion	echte Kapsel, auf ein Kompartiment begrenzt
T1	= A	= aggressiv-benigne o. maligne	auf ein Kompartiment begrenzt
T2	= B	= maligne	das Kompartiment überschreitend
Metastasen = M			
M0	keine Metastasen		
M1	regionale Metastasen oder Fernmetastasen, einschließlich Lymphknotenmetastasen		

Tab. 5a: Definitionen des Enneking-Staging-Systems (11).

Das Staging-System nach Enneking berücksichtigt die klinischen und radiologischen Befunde in Integration zur Histologie. G steht für Grading, wobei G1 dem histopathologischen Grading G1 der TNM-Klassifikation und somit einem gut differenzierten Gewebe entspricht, während G2 den histologischen Differenzierungsgraden G2-G4 der TNM-Klassifikation entspricht und die Differenzierungsgrade mäßig, schlecht und undifferenziert umfasst. T bezieht sich auf die Ausdehnung des Primarius, wobei T1 = A auf das Kompartiment begrenzt ist und im Falle des klassischen Osteosarkoms die Kortikalis nicht durchbrochen hat, während T2 = B eine Infiltration jenseits der Kortikalis beschreibt. M beschreibt in der Formel M0 das Fehlen oder in M1 das Vorhandensein von Fernmetastasen, vergleichbar mit der TNM-Klassifikation.

Stadium	Grading	Lokalisation	Metastase	Kommentar
IA	G1	T1	M0	low grade, auf ein Kompartiment begrenzt*
IB	G1	T2	M0	low grade, das Kompartiment überschreitend**
IIA	G2	T1	M0	high grade, auf ein Kompartiment begrenzt°
IIB	G2	T2	M0	high grade, das Kompartiment überschreitend°°
III	G1/G2	T1/T2	M1	Regionale Metastasen oder Fernmetastasen

Tab. 5b: Enneking-Staging-System für maligne Tumoren (*hier nicht berücksichtigt ist die Einteilung benigner Läsionen aufgrund der fehlenden Relevanz für das Osteosarkom*) (11).

Das Enneking-Staging-System unterscheidet benigne von malignen muskuloskelettalen Sarkomen und wird u. a. für die Klassifikation des Osteosarkoms verwendet. Dabei werden „low grade“ (niedrigmaligne) und somit gut differenzierte (G1) Sarkome von „high grade“ (hochmalignen) Osteosarkomen (mäßig bis undifferenziert (G2-G4)) unterschieden und in die Stadien I und II klassifiziert.

Die Einteilung der niedrigmalignen Tumore erfolgt in die Stadien IA: entspricht einen *intrakompartimentären Tumor und IB: entspricht einem **extrakompartimentären Tumor.

Anhand der Ausdehnung des Primarius (auf das Kompartiment begrenzt° versus das Kompartiment überschreitend°°) und des Fehlens oder Vorhandenseins von Fernmetastasen erfolgt die Einteilung der high-grade Sarkome in die Stadien IIA (auf das Kompartiment begrenzt°, Kortikalis intakt), IIB (das Kompartiment überschreitend°, die Kortikalis ist durchbrochen) oder III (Lymphknoten und Fernmetastasen vorhanden).

Das Staging-System nach Enneking unterscheidet drei Stadien maligner Entartung, wobei die Stadien I und II lokalisierte Befunde beschreiben, während das Stadium III den metastasierten Befund klassifiziert. Die Stadien I und II werden weiterhin, anhand ihres intra- oder extrakompartimentären Erscheinungsbildes, in jeweils zwei Subtypen (A und B) unterteilt. Zusätzlich wird zwischen niedrigmalignen und hochmalignen Läsionen unterschieden (5, 8).

Diese Einteilung ist insofern von Bedeutung, da insbesondere Kinder und Jugendliche häufig „high grade“ und somit hochmaligne Osteosarkome aufweisen, die bei Diagnosestellung häufig die Kortikalis des Knochens durchbrochen oder in bis zu 20% der Fälle bereits zu radiologisch detektierbaren pulmonalen Metastasen geführt haben (5, 7). Dementsprechend fällt ein Großteil der Patient*innen (bis zu 80%) bei Diagnosestellung in eines der beiden fortgeschrittenen Stadien IIB oder III (7, 11).

Therapie und Überlebensrate

Die Therapie des Osteosarkoms erfolgt standardisiert und setzt sich aus der neoadjuvanten und adjuvanten Chemotherapie sowie der Resektion des Primarius und aller resektablen Makrometastasen zusammen. Maßgebend für diesen Therapiestandard waren die Publikationen von Rosen et al., Link et al. und Eilber et al., die im Folgenden genannt sind (5, 7).

Rosen et al. zeigten, dass Patient*innen mit Osteosarkom von einer neoadjuvanten Chemotherapie profitierten. Einerseits konnte durch selbige das Operationsfeld verkleinert, die Chance auf eine R0-Resektion erhöht und somit die Überlebensrate und die Lebensqualität gesteigert werden. Andererseits ließ sich das Ansprechen des Tumors abschätzen, was wiederum eine Aussage über die Prognose ermöglichte (12, 13).

Ein weiterer Meilenstein in der Therapie des Osteosarkoms war die Einführung der adjuvanten Chemotherapie. Sowohl Link et al. (14, 15) als auch Eilber et al. (16) beschrieben in den Jahren 1986, 1987 und 1991 ein deutlich verlängertes rezidivfreies Überleben und ein verlängertes Gesamtüberleben unter adjuvanter Therapie. So betrug die von Link et al. im Jahre 1986 beschriebene rezidivfreie Zweijahresüberlebensrate 66% unter adjuvanter Therapie im Vergleich zu 17% in der Beobachtungsgruppe (14). Die 1991 ebenfalls von Link et al. publizierte Sechsjahresüberlebensrate betrug 61% in der Gruppe, die eine adjuvante Therapie erhalten hatte, im Vergleich zu 11% in der Vergleichsgruppe mit alleiniger operativer Therapie (15).

Zwar hat die Einführung der Chemotherapie zu einer verbesserten Überlebensrate geführt, dennoch bleibt eine R0-en-bloc-Resektion des Primarius mit weiten Resektionsgrenzen, einschließlich des Biopsiekanals und der Biopsienarbe, für einen dauerhaften Therapieerfolg unerlässlich (7). Dementsprechend orientiert sich die Auswahl des operativen Verfahrens an der Größe und Lokalisation des Primarius. Das extremitätenerhaltende Verfahren hat mit Einführung der neoadjuvanten Chemotherapie deutlich an Bedeutung gewonnen und führte zu einem deutlichen Rückgang der Amputationsrate (7, 8). Aktuell wird das extremitätenerhaltende Verfahren bei bis zu 80% der Patient*innen durchgeführt (5). Dennoch muss hierbei das erhöhte Risiko für Lokalrezidive unter steter Abwägung bezüglich des zu verwendenden Verfahrens berücksichtigt werden (5).

Die Belastungen durch die Diagnosestellung und die folgende multimodale Therapie, insb. auch die Folgen der operativen Eingriffe (7), scheinen die Lebensqualität (Quality of Life = QoL) zu limitieren (17). Die Ergebnisse bezüglich der QoL sind jedoch aufgrund unterschiedlicher Assessments schwer zu vergleichen, sodass zur besseren

Interpretation standardisierte Fragebogen erforderlich wären (18). Calaminus et al. sahen Potential in der Auswertung der Daten der Euramos-1-Studie bezüglich der QoL. Dahingehend sind die endgültigen Ergebnisse abzuwarten (17). Die Ergebnisse einer retrospektiven Studie von Holzer et al. (19) sowie die Ergebnisse der Meta-Analyse von Stokke et al. (18) stimmen bezüglich der reduzierten Lebensqualität nach malignen Knochentumoren überein.

Insgesamt konnte mit Einführung dieses multimodalen Therapieansatzes, bestehend aus neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie, Resektion des Primarius sowie bestehender resektabler Metastasen, das Gesamtüberleben von maximal 20% (1980) auf aktuell bis zu 70% verbessert werden (2, 4). Allerdings gelten die Erfolge in Bezug auf die Überlebensrate lediglich für Patient*innen mit primär lokalisiertem Befund.

Die Fünfjahresüberlebensrate bei metastasiertem Ausgangsbefund liegt bei 20% (1, 4). Weiterhin liegt die Rezidivrate bei 30-40% nach primär lokalisiertem Befund (5) und 25-35% der Patient*innen mit primär lokalisiertem Befund entwickeln Fernmetastasen (20). Im Falle eines Rezidivs verschlechtert sich die 5-JÜR deutlich auf 23-29% (5). Ausschlaggebend hierfür scheinen das beobachtete schlechtere Ansprechen auf die Standardchemotherapie im Rezidivfall und das Fehlen effizienter Therapiealternativen zu sein (20).

Die Versorgung sogenannter Non-Responder, die auf die Standardtherapie nicht adäquat ansprechen, stellte und stellt nach wie vor aufgrund unzureichender Alternativen ein großes Problem dar (3, 20).

Die Versorgung sehr junger Patient*innen (acht Jahre oder jünger), bei denen das Osteosarkom oft mit einem wesentlich aggressiveren Verlauf einhergeht (21), scheint sich jedoch verbessert zu haben, wie aus den Daten von Wu et al. hervorgeht (10-JÜR von 48,2% auf 65,8% verbessert) (6). Jedoch wurde, wie bereits erwähnt, als ausschlaggebender Faktor für der Verbesserung der Überlebensrate eine schnellere Bestätigung der Verdachtsdiagnose und nicht eine optimierte Therapiestrategie angegeben (6).

Auch die Prognose älterer Patient*innen ist aufgrund von Komorbiditäten sowie der höheren Beteiligung des Achsenskeletts und der Beckenregion, die mit einer höheren Mortalität einhergeht, schlechter. Auch hier sind fehlende Alternativen initiierend für die Suche nach weiteren Therapieoptionen (1).

In der Behandlung des Osteosarkoms scheint die MAP-Kombination (Cisplatin, Doxorubicin, Methotrexat) weiterhin der Standard der Erstlinientherapie, auch im Falle eines schlechten Ansprechens auf die neoadjuvante Therapie, zu sein. Die Euramos-1-Studie, in der das MAP-Regime mit dem MAPIE-Regime (MAP+Ifosamid+Etoposid) verglichen wurde, zeigte keinen Benefit bezüglich der Überlebensrate bei höherer Toxizität unter MAPIE und sprach sich weiterhin für die Verwendung des MAP-Regimes aus (22). Auch die Metaanalyse von Yu et al., die die Ergebnisse von neun Studien zu MAP und diversen MAP(+)-Alternativen verglich, führte zu dem Ergebnis, dass MAP bei vergleichbarer Überlebensrate und geringerer Toxizität zu bevorzugen ist (23).

Aufgrund fehlender Therapiealternativen zur Standardtherapie sind neue Therapieansätze zur besseren Versorgung zuvor beschriebener Patient*innengruppen, die von der Standardtherapie nicht profitieren, erforderlich. Einige Phase-II-Studien zur Second-Line-Therapie scheinen zumindest zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens zu führen.

So untersuchten Grignani et al. bspw. den Effekt von Sorafenib und Everolimus als Second-Line-Therapie im Anschluss an die Standardtherapie (MAP) bei Patient*innen mit nicht resezierbaren Osteosarkomen oder Rezidivbefunden und progressiver Situation. Insgesamt 45% (17/38) der in die Phase-II-Studie eingeschlossenen Patient*innen erreichten das vorgegebene Ziel von sechs Monaten progressionsfreiem Überleben (progression free survival = PFS). Die Autoren zeigten somit eine Wirkung dieser Kombination in der Osteosarkomtherapie, verfehlten jedoch ihr vorgegebenes Ziel mindestens 50% der Patient*innen sechs Monate lang progressionsfrei zu halten (24).

In einer weiteren Phase-II-Studie über die Wirksamkeit von Gemcitabin und Sirolimus, ebenfalls bei Rezidivpatient*innen und Patient*innen mit progressivem Befund nach Standardtherapie, kamen Martin-Broto et al. zu einem ähnlichen Ergebnis. Hier erreichten 44% der initial 35 eingeschlossenen Patient*innen das gesetzte Ziel von vier Monaten PFS (25).

Zuletzt berichteten Xie et al. über den Einfluss Apatinibs im fortgeschrittenen Osteosarkom (ebenfalls in einer Phase-II-Studie mit 37 Patient*innen) und beschrieben eine viermonatige progressionsfreie Überlebensrate von 56,7% (26).

Zusammenfassend zeigen alle drei genannten Studien Potential, jedoch ist der Vorteil bezüglich der Langzeitüberlebensrate aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraums unklar.

Nebenwirkungen der Kombinationstherapie

Weiterhin scheint der therapeutische Nutzen neuer Therapieregime begrenzt zu sein, bei gleichzeitig zu berücksichtigenden relevanten Nebenwirkungen.

So hat die Ergänzung der Standardtherapie (MAP) um weitere Chemotherapeutika bisher zu einer erhöhten Toxizität, bei ausbleibendem Effekt auf die Überlebensrate geführt (22, 23). Auch in allen drei genannten Phase-II-Studien wurden relevante Nebenwirkungen, die zur Dosisreduktion und in einigen Fällen zum Pausieren der Chemotherapie führten, genannt (24-26).

Als vorrangige akute Nebenwirkungen der aktuellen Standardchemotherapie gelten: Neutropenie, neutropenisches Fieber, Thrombozytopenie, Anämie, Hypophosphatämie, Mukositis, Infektionen und Kardiotoxizität (23). Die Kardiotoxizität spielt in Form einer resultierenden Kardiomyopathie insbesondere in Hinblick auf das junge Alter der Patient*innen als Langzeitfolge eine entscheidende Rolle (7). Daneben sind unter Verwendung von Cisplatin irreversible Nieren-, Gehör- und Nervenschädigungen als mögliche Langzeitschäden zu berücksichtigen. Die Beeinträchtigung der Fertilität spielt ebenfalls angesichts des oft jungen Alters der Patient*innen eine wichtige Rolle und muss diskutiert werden (5, 7).

Ausblick

Es bleibt somit festzuhalten, dass es in den letzten vier Jahrzehnten kaum zufriedenstellende Fortschritte in der Osteosarkomtherapie gab (4, 20) bei weiterhin unzureichender Versorgung von Patient*innen mit disseminiertem Befund, unzureichendem Ansprechen auf die Standardtherapie (Non-Responder), nicht resektablen Befunden und fortgeschrittenem Lebensalter bzw. bestehender Komorbidität, die eine Verwendung der Standardtherapie einschränkt (1, 4, 5, 20). Ergänzend zu den Schwachstellen der aktuellen Standardtherapie machen die genannten akuten Nebenwirkungen sowie Früh- und Spätfolgen der Behandlung eine weitere Optimierung der bestehenden Therapie erforderlich (6).

Eine Ergänzung der Polychemotherapie mit einem geeigneten Wirkstoff, der eine Dosisreduktion der klassischen Chemotherapeutika ermöglicht, damit die Nebenwirkungsrate verringert und gleichzeitig die Toxizität der bestehenden Standardtherapie nicht erhöht, wäre ein möglicher Ansatz. Insbesondere erscheinen hier antiangiogene Wirkstoffe aufgrund der hohen Vaskularisierung des Osteosarkoms als erfolgversprechende Option.

Taurolidin

Taurolidin [bis(1,1-dioxoperhydro-1,2,4-thiadiazinyl4)methane (TRD)] ist ein synthetisch hergestelltes Derivat der ubiquitär im Körper vorkommenden Aminosäure Taurin (27) und besteht aus zwei Taurinamidringen, die über eine Methylgruppe verbunden sind (28). Es hat ein Molekulargewicht von 284,37 g/mol (27, 28) und wird nach intraperitonealer Applikation rasch resorbiert (29). Laut Herstellerinformation wird der maximale Wirkspiegel im Blut 15 Minuten nach intraperitonealer Injektion erreicht (29). Der Abbau Taurolidins erfolgt, soweit bekannt, über die aktiven Metabolite Taurultam und Methyl-Taurinamid zu Taurin und Kohlendioxid, wobei die Ausscheidung größtenteils über die Nieren und zu einem geringeren Teil über die Atmung erfolgt (27, 29, 30).

Die Wirkung Taurolidins wird seit 1970 in präklinischen und klinischen Studien erforscht (28). Eine gute antibakterielle und antiadhärente Wirkung bei gleichzeitig ausbleibender Resistenzbildung machten es für die septische Abdominalchirurgie interessant (31). Primäre Anwendung fand Taurolidin in ersten klinischen Studien bereits 1976 in der septischen Abdominalchirurgie, zur lokalen additiven Behandlung schwerer Peritonitis (28) sowie aufgrund seiner antiendotoxinen Wirkung in der Behandlung des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) (27, 28). Dabei zeichnet sich Taurolidin durch ein breites antimikrobielles Spektrum aus, dass sowohl gram-positive und gram-negative, aerobe und anaerobe Bakterien als auch Pilze erfasst (28, 29). Der Wirkmechanismus beruht auf der Freisetzung reaktiver Methylgruppen aus den aktiven Metaboliten des Taurolidins, die mit Oberflächenproteinen der bakteriellen Zellwände und Zellmembranen interagieren (28). Über diesen Mechanismus führt Taurolidin zu einer Degeneration der Zellwände (27), einer verminderten Endotoxinfreisetzung (28) und einer verminderten Adhärenz an Epithelzellen (32, 33).

Zusätzlich zur verminderten Endotoxinfreisetzung bedingt die Bindung der Methylgruppen an bereits freigesetzte Endo-(Lipopolysaccharide) und Exotoxine (Polypeptide) deren Inaktivierung (27, 28). Die Freisetzung von Endo- und Exotoxinen beeinflusst wiederum die Freisetzung unterschiedlicher Zytokine, u. a. Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-a) und die Interleukine (IL) 1beta, 6 und 8 (27, 28). Zytokine führen, bspw. im Rahmen eines SIRS, zu vielfältigen Organdysfunktionen (27). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Taurolidin nicht nur zu einer Suppression o. g. Toxine führt, sondern auch die Synthese von TNF-a und IL-1b, 6 und 8 hemmt (Tab. 6) (27, 28, 34).

Zellen/Zelllinie	Versuchssituation	Zytokinsuppression unter TRD	in vitro/ in vivo	Ref.
periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)	Inkubation von LPS (Lipopolysaccharide) mit TRD, anschließende Inkubation der PBMS mit (den mit TRD vorbehandelten) LPS	80-90% reduzierte IL-1- und TNF-a-Synthese	in vitro	(34)
periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)	Stimulation mit Staphylokokkus aureus-Toxin-1	reduzierte IL-1- und TNF-a-Synthese	in vitro	(34)
Makrophagen in vivo, nach Zökalligatur und Punktion (Peritonitismodell)	TRD-Therapie in einem Mausmodell zur Erfassung des Einflusses auf peritoneale Makrophagen	erhöhte Phagozytose in der TRD-Gruppe, Priming der Makrophagen durch TRD annehmbar	in vivo	(35)
glomeruläre Mesangiumzellen (Ratte)	LPS-Stimulation der Mesangiumzellen	inhibierte TNF-a Produktion	in vitro	(36)
Peritonitismodell (Ratte)	Intraperitoneale bakterielle Induktion mit anschließender topischer TRD-Injektion	verringerte TNF-a-Konzentration	in vivo	(37)
humane peritoneale Mesothelzellen (HPMC)	Stimulation der HPMC mit TNF-a, anschließende Inkubation mit TRD	verminderte IL-8-Konzentration	in vitro	(38)

Tab. 6: Einfluss Taurolidins auf die Zytokinfreisetzung.

Sowohl in vitro an verschiedenen Zellreihen als auch in vivo in Peritonitismodellen ließ sich unter Verwendung von TRD eine Zytokinsuppression nachweisen und eine antiinflammatorische Wirkung bestätigen (28).

Weiter hat die These einer inflammatorisch bedingten Tumorentwicklung eine entscheidende Rolle in der Tumorforschung eingenommen und führte in Bezug auf Taurolidin zu der Überlegung, ob Taurolidin über seine antiinflammatorische Wirkung hinaus eine antitumoröse Wirkkomponente besitzt (28).

Diese Annahme ließ sich anhand zahlreicher in vitro-Studien bestätigen. So lassen sich über ein Dutzend Publikationen zum Einfluss Taurolidins auf unterschiedliche Kolonkarzinomzelllinien (HCT-8/-15/-19/-29, CC531, DHD/K12/TRb) mit durchgehender Wachstumsinhibition in vitro finden (32, 39-48). Aus dem Bereich des proximalen Verdauungstraktes ist eine hemmende in vitro-Wirkung Taurolidins auf

Plattenepithelzellkarzinomzellen der Mundhöhle (49) und Ösophaguskarzinomzellen (50) dokumentiert. Darüber hinaus war eine in vitro-Wachstumsinhibition an Gallengangskarzinomzellen (40), Leberzellkarzinomzellen (46, 48, 51) und Pankreaskarzinomzellen (46, 48, 52) feststellbar. Im Bereich der männlichen und weiblichen Fortpflanzungsorgane wurde in vitro eine hemmende Wirkung Taurolidins auf Ovarialkarzinomzellen (32, 53) und Prostatakarzinomzellen (32, 54) in jeweils zwei Publikationen sowie im Bereich der ableitenden Harnwege an Blasenkarzinomzellen (55) beschrieben. Bezüglich der in vitro-Wirksamkeit auf Zellen maligner thorakaler Neoplasien konnte eine Wachstumsinhibition an Lungenkarzinomzellen (32) und malignen pleuralen Mesotheliomzellen (56-58) nachgewiesen werden. In vitro zeigte sich weiterhin eine antiproliferative Wirkung Taurolidins auf Melanomzellen (32, 59). Tumorzellen des Nervensystems wiesen ebenfalls eine Sensibilität gegenüber Taurolidin in vitro auf. Die Wirksamkeit auf Glioblastomzellen (32, 60-63) und Neuroblastomzellen (64-66) wurde in diversen Publikationen bestätigt. Weiterhin scheint eine Sensibilität von Leukämiezellen in vitro gegenüber Taurolidin zu bestehen (53, 67, 68). Die Literaturrecherche deutet auf eine durchgehend wachstumsinhibierende Wirkung Taurolidins auf Tumorzellen unterschiedlichster Ursprungsorgane hin.

Einige dieser genannten Studien zielten auf die weitere Abklärung des Wirkmechanismus Taurolidins ab. So betonten beispielsweise Neary et al. in ihrem Review die antiinflammatorische Wirkung Taurolidins auf Tumorzellen und beriefen sich v. a. auf die Publikation von Daigeler et al. (28). Daigeler et al. beschrieben demnach eine Verstärkung des NF-kappaB-Inhibitors (Nuclear Factor kappaB) in Fibrosarkom- und Ösophaguskarzinomzellen. Daraus könnte sich eine Inhibition der NF-kappaB-Aktivität ableiten. Eine NF-kappaB-Aktivierung führt im Gegenzug zu einer Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Colony Stimulating Factor-1 (CSF-1), Cyclooxygenase-2 (COX-2), IL-6, IL-1, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und TNF- α . Eine Aktivierung des NF-kappaB-Inhibitors liefert somit eine Erklärung für die beobachtete antiinflammatorische Wirkung Taurolidins (28, 50, 69).

Auch die initial an Eukaryonten beobachtete Verminderung der Adhäsionseigenschaften unter Taurolidin führte zu der Überlegung, ob sich diese Wirkung in Tumormodellen reproduzieren ließe (28). Dieser These entsprechend berichteten Nestler et al. über eine deutlich verminderte Adhäsion von Kolonkarzinomzellen (CC531) in vitro unter Taurolidin und Bobrich et al. über eine reduzierte Tumorlast und eine verminderte Cadherin-E-Expression in einem Kolonkarzinommodell der Ratte (44, 70). In Bezug auf unsere eigene

Studie war relevant, dass auch die Adhäsionseigenschaften von Osteosarkomzellen in vivo supprimierbar waren (71).

Neben der Beeinträchtigung der Adhäsion scheint Taurolidin über unterschiedliche Mechanismen die Apoptose in zahlreichen Tumorzelllinien zu induzieren (28).

Zum einen scheint Taurolidin einen direkten zytotoxischen Einfluss auf Tumorzellen zu haben. So beschrieben Rodak et al. an malignen Gliomzellen und Opitz et al. an Mesotheliomzellen eine direkte zytotoxische Komponente Taurolidins durch freigesetzte Sauerstoffradikale und eine dadurch bedingte erhöhte mitochondriale Membranpermeabilität (57, 63).

Zum anderen gibt es Hinweise auf eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosemechanismus. So berichteten Han et al. (Leukämiezellen: HL-60) und Darnowski et al. (Prostatakarzinomzellen: DU 145) über eine vermehrte Freisetzung von Cytochrom c und folglich über eine vermehrte Aktivierung der Procaspasen 8 und 9 (54, 67). Als weiterer Angriffspunkt Taurolidins auf den intrinsischen Apoptosemechanismus deutet die vermehrte Expression des proapoptotischen Bax-Proteins (68) sowie verminderte Expression der Caspase-Inhibitoren Bcl-2, Mcl-1 und Survivin hin (57, 68).

Weiterhin scheint Taurolidin, wie von Stendel et al. beschrieben, durch Verstärkung des Fas-Liganden vermittelten Zelltodes zu interagieren (60). Dies scheint ein Hinweis auf die Aktivierung extrinsischer Apoptosemechanismen durch Taurolidin zu sein (28).

Zudem scheint Taurolidin über die erhöhte mitochondriale Freisetzung von AIF (= apoptosis inducing factor) über einen Caspase-unabhängigen Mechanismus zum Zelltod zu führen und zusätzlich eine erhöhte Expression des Tumorsuppressorproteins p53 zu bedingen (57).

Neben der genannten antiinflammatorischen, antiadhärenten und Apoptose induzierenden Wirkung wird Taurolidin eine antiangiogenetische Wirkung zugesprochen. Im Rahmen maligner Entartung kommt es, nach einer initialen Wachstumsphase bis zu einer Tumorgöße von wenigen mm³, zum sogenannten „angiogenetic switch“ der malignen Zellen, der zu einer verstärkten Expression proangiogenetischer Faktoren führt. Über die Expression proangiogenetischer Faktoren, zu denen u. a. VEGF zählt, kommt es zur Aktivierung von Endothelzellen und Proteasen und darüber hinaus zur Gefäßeinsprossung (20, 72).

In vitro gelang an verschiedenen Tumorzelllinien der Nachweis einer verminderten VEGF-Konzentration sowie einer verminderten VEGF-Produktion unter Taurolidin (43, 63). Die beobachtete VEGF-Suppression führte zu der Annahme einer Beeinflussung der Angiogenese durch Taurolidin. Diese mögliche Angiogenese-Inhibition ist insofern von

Bedeutung, da lokale Tumorprogression und Metastasierung fundamental von der Gefäßneubildung abhängen (20, 27).

In Bezug auf das Osteosarkom sahen Kaya et al. einen Zusammenhang zwischen der starken Vaskularisierung des Osteosarkoms und der Tumorprogression, der frühzeitigen Metastasierung, der hohen Rezidivrate und der schlechten Prognose (73).

VEGF, einer der bekanntesten Wachstumsfaktoren, scheint bei der Gefäßneubildung im Allgemeinen, aber auch bei der Angiogenese des Osteosarkoms im Speziellen eine entscheidende Rolle einzunehmen (20). So wiesen Osteosarkompatient*innen im Vergleich zu gesunden Proband*innen bis zu 5-fach erhöhte VEGF-Serumlevel auf. Weiterhin gibt es Hinweise, dass die erhöhte Expression dieser VEGF-Isoformen nicht nur mit einer signifikant höheren Mikrogefäßdichte und einer höheren Metastasierungsrate, sondern auch mit einer schlechteren Prognose für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben korreliert (20, 73, 74).

Die Ergebnisse der zuvor genannten Phase-II-Studie von Grignani et al. (Abschnitt: Therapie und Überlebensrate) deuten ebenfalls auf einen möglichen antiangiogenetischen Angriffspunkt in der Osteosarkomtherapie hin (24).

Bezüglich eines antiangiogenetischen Einflusses Taurolidins auf das Osteosarkom liegen aktuell keine Daten vor. Aufgrund der o. g. anzunehmenden antiangiogenetischen Wirkung Taurolidins und der Bedeutung der Angiogenese für das Osteosarkom, scheint eine Wirkung Taurolidins auf die Angiogenese im Osteosarkom plausibel.

Insgesamt gilt Taurolidin über die Suppression proinflammatorischer Prozesse, die Verminderung der Adhäsionseigenschaften, die Verstärkung der Apoptosemechanismen und die Inhibition der Angiogenese in der experimentellen Tumorthherapie als vielversprechend.

Zusammenfassung und Zielsetzung

Aufgrund eingangs aufgeführter Grenzen der aktuellen Osteosarkomtherapie soll in dieser Arbeit die Wirkung Taurolidins auf das Osteosarkom untersucht werden. Taurolidin scheint dabei als Adjuvans zur bisherigen Therapie wegen seiner vielfältigen antitumorösen Eigenschaften und seines geringen Nebenwirkungsspektrums vielversprechend zu sein.

Hierzu soll zunächst der Einfluss Taurolidins auf das Wachstum und die Ausbreitung des Osteosarkoms in einem Tiermodell erfasst werden. Weiterhin sollen aufgrund der einerseits beobachteten Suppression des VEGFs unter Taurolidin und der andererseits hohen Bedeutung der Angiogenese für das Osteosarkom die möglichen Effekte auf die Gefäßentwicklung im Tumor immunhistologisch untersucht werden.

Material und Methodik

Materialien

Zellen:

Osteosarkomzelllinie K7M2 (ATCC-CRL-2836)

Lösungen und Reagenzien:

Vollmedium Dulbeccos MEM mit L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin)
Penicillin/Streptomycin 100.000 U/ml (Biochrom AG, Berlin)
10%igen FCS Kälberserum (Biochrom AG, Berlin)
PBS, Dulbecco´s PBS, w/o Ca²⁺, Mg²⁺, (Biochrom AG, Berlin)
0,25% EDTA Trypsin (Biochrom AG, Berlin)
Taurolidin (Taurolin® 2%) (Geistlich Pharma, Schweiz)
Ringer-Elektrolyt-Lösung (Braun Melsungen AG, Germany)
0,9% NaCl (Braun Melsungen AG, Germany)
Zinkfixierlösung (BD Pharmigen, USA)
Formalin-Lösung 10% (SIGMA-ALDRICH, USA)
Ethanol 70 Vol-% (Herbeta Arzneimittel, Berlin)
Ethanol 80 Vol-% (Herbeta Arzneimittel, Berlin)
Ethanol 90 Vol-% (Herbeta Arzneimittel, Berlin)
Ethanol 96 Vol-% (Herbeta Arzneimittel, Berlin)
Ethanol 100 Vol-% (Herbeta Arzneimittel, Berlin)
ProTaqS Clear® (= xylene-free histological clearing agent) (quartett, Berlin)
PARAPAST PLUS® (= Paraffin) (McCormick SCIENTIFIC, USA)
Ampuwa® Spüllösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg)
Xylol (MERCK, Darmstadt)
Milli-Q® Wasseraufbereitungssystem (= Millipore) (MERCK, Darmstadt)
Aqua bidestillata (Braun, Melsungen AG, Germany)
Hämalaun (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Eosin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Kaisers Glyceringelatine (MERCK, Darmstadt)
Citratpufferlösung (10 milimolar, ph = 6) (angesetzt)

Avidin	(Dako, USA)
Biotin	(Dako, USA)
Dako antibody diluent (= Tris-HCL-Puffer: stabilisiertes Protein und 0,015 mol/l Natriumazid)	(Dako, USA)
ABC Vectastain AK 5004 (= Streptavidin- Alkalische Phosphatase)	(Vector Laboratories inc, USA)
PBS	(BIOCHROM AG, Berlin)
Tween 20	(Sigma-Aldrich, USA)
Fast Red: (1Tbl. Tris-Puffer, 1Tbl. Fast Red)	(Dako, USA)

Antikörper:

Anti-CD31 rat anti mouse	(BD Pharmingen)
Anti BrdU (OBT 0030G BrdU)	(AbD Serotec, UK)
Anti rat biotiny. (0468)	(Dako, USA)

Geräte:

Messzange	(VWR International GmbH, Darmstadt)
Kompressorpumpe	(Eppendorf, Wesseling Berzdorf)
CO ₂ -Brutschrank	(Heraeus, Berlin)
Zentrifuge	(Heraeus, Berlin)
Präzisionswaage	(Sartorius, Göttingen)
Kühlschrank	(Liebherr Premium)
Gewebeeinbettautomat (Hypercenter XP)	(Shandon GmbH, Frankfurt)
Gefrierschrank	(Bosch)
Rotationmicrotom HM 355 S	(MICROM International GmbH, Walldorf)
Wasserbad	(Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot)	(Zeiss, Deutschland)

Laborgeräte, Behältnisse und Einwegprodukte:

Zellkulturflasche (75 ml, 175 ml)	(BD Falcon, USA)
Konisches Röhrchen (50 ml) [blue cap]	(BD Falcon, USA)
Glaspipettenspitzen (5 ml, 10 ml, 25 ml)	(BD Falcon, USA)

Superfrost® Plus Objektträger	(R. Langenbrinck, Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen)
MICROTOME BLADE N35	(Feather, USA)
Eindeckgläser	(Menzel Gläser, Braunschweig)
Glasküvette	(Douran Group GmbH, Wertheim/Main)
Einmalkanülen	(Braun Melsungen AG, Germany)
Butterfly	(Braun Melsungen AG, Germany)

Herkunft der Tiere

Die Versuche wurden mit Antrag 0181-09 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin genehmigt. Die Unterbringung und Versorgung der von Charles River (Germany) bezogenen sechzig Balb/c Mäuse erfolgte nach Genehmigung und unter den Regularien der lokalen Tierschutzkommission (75). Die Unterbringung der fünf Wochen alten, durchschnittlich 25 g wiegenden männliche Mäuse erfolgte unter standardisierten Laborbedingungen, in einem klimakontrollierten, für Kleintiere vorgesehenen Raum (ca. 24°C, 60% Luftfeuchtigkeit, 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus) mit freiem Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Die Tierpflege wurde durch geschultes, erfahrenes Fachpersonal gewährleistet. Zur Beurteilung des Allgemeinzustandes der Tiere wurden regelmäßige Gewichtskontrollen sowie die Dokumentation des Erscheinungsbildes in Anlehnung an die UKCCCR-Richtlinien und den Score Sheet „Humane Endpoints“ (siehe Anhang) vorgenommen (76).

Randomisierung

Untersucht werden sollte der Einfluss steigender Taurolidin-Konzentrationen auf das Wachstum eines Osteosarkoms nach intravenöser (i. v.) versus intraperitonealer (i. p.) Applikation. Entsprechend wurden die Tiere in sechs Gruppen randomisiert (Tab. 7). Dreißig Tiere hatten einen zentralvenösen Katheter (ZVK) und wurden dem intravenösen Therapiearm zugeordnet. Die Implantation der Katheter erfolgte vor Lieferung der Tiere durch Charles River (Germany). Die verbliebenen Tiere wurden dem intraperitonealen Therapiearm zugeordnet.

Nach einer einwöchigen Eingewöhnungszeit erfolgte zunächst die Randomisierung der einzelnen Versuchstiere unmittelbar vor der Implantation der Tumorzellen. Die Kennzeichnung erfolgte in Inhalationsnarkose (Isofluran) durch Ohrlöcher nach festem Markierungsschema, um eine genaue Identifizierung zu ermöglichen.

Therapiearm	Therapiegruppe	Wirksubstanz	Tieranzahl = n
intravenöse Applikation	Gruppe 1.0	Kontrolle (NaCl)	n = 10
	Gruppe 1.1	1%iges Taurolidin (1% TRD)	n = 10
	Gruppe 1.2	2%iges Taurolidin (2% TRD)	n = 10
intraperitoneale Applikation	Gruppe 2.0	Kontrolle (NaCl)	n = 10
	Gruppe 2.1	1%iges Taurolidin (1% TRD)	n = 10
	Gruppe 2.2	2%iges Taurolidin (2% TRD)	n = 10

Tab. 7: Darstellung der Randomisierung.

Die insgesamt 60 Versuchstiere wurden in sechs Gruppen mit jeweils 10 Tieren randomisiert. Die Gruppen 1.0-1.2 erhielten NaCl oder TRD 1% oder TRD 2% i. v. über einen zentralvenösen Katheter.

Die Gruppen 2.0-2.2 erhielten NaCl oder TRD 1% oder TRD 2% i. p. über eine Punktion der Abdominalhöhle.

Zelllinie und Zellkultivierung

Verwendet wurde die murine Osteosarkomzelllinie K7M2, die ein hohes Metastasierungspotential aufweist.

Die Tumorzellen wurden zunächst in Kulturflaschen mit Vollmedium (Dulbeccos MEM mit L-Glutamin), Penicillin/Streptomycin (5 ml/500 ml) und 10%igen fetalem Kälberserum (= FCS) (50 ml/500 ml) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Anteil kultiviert.

Im Rahmen der Passage erfolgten zunächst das Absaugen des Vollmediums und die Spülung der Kulturflasche mit einfacher PBS-Lösung (Phosphatgepufferter Salzlösung). Anschließend erfolgte das Lösen der Zellen durch Zugabe von EDTA-Trypsin (Ethyldiamintetraacetat-Trypsin), gefolgt von fünfminütiger Inkubation im CO₂-Brutschrank. Anschließend wurde 10 ml reines Vollmedium hinzugegeben und die Zellen re-suspendiert. Zur Entfernung des Trypsins wurde die Zellsuspension sieben Minuten bei 900 Umdrehungen/min und 12°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die gewonnenen Zellpellets wurden mit Vollmedium ohne FCS (zum Entfernen von

Fremdantigenen) re-suspendiert. Die Re-Suspension ohne FCS diente der Vorbereitung zur Zellimplantation in die Versuchstiere.

Die Zellzahlbestimmung und Vitalitätseinschätzung erfolgte in der Neubauer-Zählkammer (0,1 µl) nach der Trypan-Blau-Methode (Verhältnis Zellsuspension: Trypan-Blau = 1:1). Die Zellsuspension wurde bis zum Erreichen der geplanten Zellanzahl mit Vollmedium (ohne FCS) verdünnt, anschließend in Eppendorf-Gefäße (0,5 ml mit $2,5 \cdot 10^5$ Zellen) gefüllt und den Versuchstieren unmittelbar injiziert. Alle Versuchstiere erhielten Osteosarkomzellen der vierten Passage.

Studiendesign



Tag -7	Tag X	Tag 1-7	Tag 8-35
Ankunft der Tiere und Eingewöhnung über 7 d.	Tumorzell-implantation i. p. und i. m.	Therapiezeitraum über 7 d. i. v. bzw. i. p. je nach Therapiegruppe	Therapiefreies Intervall, Obduktion und Gewebekonservierung an Tag 35

Nach einer Eingewöhnungszeit von sieben Tagen wurden die Tumorzellen bei allen Versuchstieren in die Bauchhöhle (intraperitoneal = i. p.) und in den Musculus gastrocnemius (intramuskulär = i. m.) eingebracht, jeweils $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Injektion, mit einem Injektionsvolumen von 0,5 ml pro Applikationsstelle. Es wurde unmittelbar danach mit der Therapie begonnen. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Tiere für weitere 28 Tage beobachtet und am 35. postoperativen Tag mittels CO₂-Narkose getötet und obduziert.

Intravenöse und intraperitoneale Therapie

Für den Versuch wurden Taurolidin-Lösungen in den Konzentrationen 1% und 2% verwendet. Als Kontrolle diente eine 0,9%ige NaCl-Lösung (Natriumchlorid). Die 1%ige Taurolidin-Lösung wurde durch Verdünnung der 2%igen Taurolidin-Lösung mit Ringer-Elektrolyt-Lösung hergestellt. Allen Lösungen wurden jeweils 10 internationale Einheiten (IE) Heparin/ml zugesetzt.

Die intravenöse Behandlung (Gruppe 1.0-1.2) erfolgte über die zentralvenösen Katheter (Abb. 2-8). Die Verabreichung der Therapie im intraperitonealen Therapiearm (Gruppe

2.0-2.2) erfolgte durch Punktion des Abdomens und anschließender intraperitonealer Injektion (Abb. 9).

Der Therapiemodus beinhaltete die regelmäßige Applikation im Abstand von 12 Stunden über insgesamt sieben Tage (jeweils 0,5 ml, entsprechend der Gruppenzugehörigkeit, Tab. 7). 1 ml 1%iges Taurolidin entspricht dabei einer Konzentration von 400 mg/kg KG und Tag; 1 ml 2%iges Taurolidin dementsprechend 800 mg/kg KG und Tag.



Abb. 2: Abbildung der Austrittsstelle des zentralvenösen Katheters (ZVK). Der Katheter verlief über die rechte V. subclavia und die V. cava zum rechten Vorhof. Zum Schutz vor einer Katheterinfektion und vor Manipulation durch das Versuchstier wurde der ZVK subkutan getunnelt und am Rücken des Tieres durch eine Einzelknopfnaht fixiert.

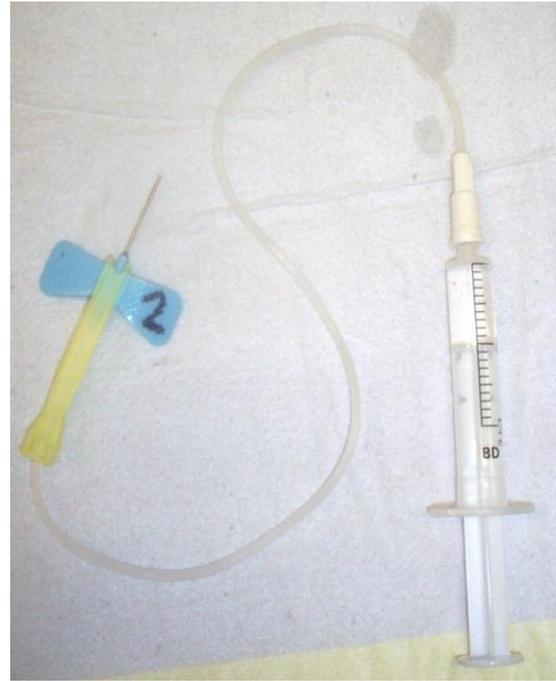


Abb. 3: Injektionsbesteck zur Applikation der intravenösen Therapie bestehend aus „Butterfly“ und 2ml-Spritze. Der Vorteil des 23-Gauge-„Butterflys“ gegenüber einer herkömmlichen 23-Gauge-Kanüle lag in dem Zugewinn an Flexibilität durch die Leitung.



Abb. 4: Verschlussmechanismus des verwendeten Kathetersystems. Der abgebildete Metallstift diente dem sicheren Verschluss des zentralvenösen Katheters.



Abb. 5: Vermeiden einer Luftembolisierung. Vor Entfernung des Metallstiftes erfolgte das Abklemmen des Katheters, um die Entstehung einer Luftembolie zu verhindern.



Abb. 6: Handhabung des Katheters. Anschließend wurde der Metallstift entfernt. Dabei war darauf zu achten, eine Dislokation des Katheters zu vermeiden.



Abb. 7: Aufsetzen der Kanüle. Nach Entfernung des Metallstiftes folgte das Einführen der Butterflykanüle. Hierzu wurden abgerundete Kanülen verwendet, um eine Beschädigung des Katheters zu verhindern.

	
<p>Abb. 8: Injektion der Lösung. Nach Aufsetzen der Kanüle wurde die Klemme entfernt und die Therapielösung (je nach Gruppe: 1% TRD, 2% TRD oder NaCl) appliziert. Anschließend wurden die Schritte 6-9 in umgekehrter Reihenfolge erneut durchlaufen.</p>	<p>Abb. 9: Intraperitoneale Injektion. Die intraperitoneale Therapie erfolgte durch einfache Punktion des Unterbauchs mittels Einmalkanülen (0,4mm*19mm). Dazu wurden die Versuchstiere in Rücken- und Kopftieflage gebracht. Hierdurch sollte das Risiko für die akzidentelle Perforation des Darms oder die Punktion von Leber/Milz minimiert werden.</p>

Obduktion und Dokumentation

Die Studie wurde für jedes Tier, unmittelbar vor der Obduktion der Versuchstiere durch zwei geblindete erfahrene Untersucher, durch eine CO₂-Narkose beendet. Nach der Bestimmung des Obduktionsgewichts erfolgte die Freilegung des intramuskulär gewachsenen Tumors anhand einer medianen Schnittführung an der Unterschenkelvorderseite. Anschließend wurde die Ausdehnung des Tumors durch Messung entlang der Längsachse, der Breite und der Tiefe mit einer Messzange bestimmt. Zur Ermittlung des Tumorgewichts wurde die makroskopisch sichtbare Tumormasse reseziert und das Gewicht mit einer Präzisionswaage erfasst. Für weitere histologische Untersuchungen wurde das Tumorgewebe zu gleichen Teilen in Zinkfixierlösung und Formalin fixiert.

Zur Beurteilung des intraabdominellen Tumorwachstums wurde der Bauchraum mit einer medianen Laparotomie eröffnet. Die einzelnen Strukturen (Bauchwand, Zwerchfell, Omentum majus, Mesenterium, kleines Becken, Nieren, Leber, Pankreas, Milz, Magen

und Darm) wurden auf Tumorabsiedlungen untersucht und sofern durchführbar exzidiert und gewogen. Anschließend wurde der Thorax median eröffnet und auf Pleura- und Lungenmetastasen inspiziert.

Die erhobenen Daten wurden auf standardisierten Obduktionsprotokollen festgehalten. Zusätzlich wurden Auffälligkeiten wie Aszites oder Ikterus notiert.

Nach abgeschlossener Obduktion wurden die Kadaver bis zur Abholung durch die Tierkörperverwertung (Saria Bio-Industries GmbH, Mützel, Deutschland) bei -21°C gelagert.

Fixierung, Gewebeeinbettung und Schnitthanfertigung

Fixierung der Gewebeproben

Die entnommenen Gewebeproben wurden zu gleichen Teilen in 10%iger, gepufferter Formalin-Lösung (24 h unter Rühren im Kühlraum; Temp. 4°C) oder in Zinkfixierlösung (24 h unter Rühren bei Raumtemperatur) zum Erhalt der natürlichen Gewebestruktur und in Vorbereitung auf die immunhistochemischen Färbungen inkubiert. Daraufhin folgten zwei jeweils 45 Minuten dauernde Waschschrte mit PBS, bevor die Gewebeproben in 70%igem Ethanol im Kühlschrank bei fünf Grad Celsius zwischengelagert wurden.

Die in Formalin fixierten Gewebeproben wurden für die BrdU-Färbungen (Bromdesoxyuridin) verwendet, während die zinkfixierten Präparate auf die CD31-Färbungen (Cluster of Differentiation) vorbereitet wurden.

Gewebeeinbettung

In Vorbereitung auf die Einbettung der Gewebeproben wurde die Dehydrierung dieser in einem geschlossenen Gewebeeinbettautomaten vorgenommen. Die Dehydrierungsreihe setzte sich wie folgt zusammen:

Ethanol	70%	60 min	(Umgebungstemperatur)
Ethanol	80%	60 min	(Umgebungstemperatur)
Ethanol 1	96%	60 min	(Umgebungstemperatur)
Ethanol 2	96%	60 min	(Umgebungstemperatur)
Ethanol 3	96%	60 min	(Umgebungstemperatur)
Ethanol 1	100%	60 min	(Umgebungstemperatur)
Ethanol 2	100%	60 min	(Umgebungstemperatur)
ProTaq Clear 1		90 min	(Umgebungstemperatur)
ProTaq Clear 2		90 min	(Umgebungstemperatur)

Paraffin 1	180 min	(60°C)
Paraffin 2	180 min	(60°C)

Anschließend wurden die Gewebeproben in Paraffinblöcke eingegossen. Nach dem Erkalten wurden die Blöcke bis zur weiteren Verarbeitung im Gefrierschrank aufbewahrt.

Anfertigen der Paraffinschnitte

Die Paraffinblöcke wurden an einem Rotationsmikrotom in 1,5 µm dicke Präparate geschnitten. Die Schnittpräparate wurden in einem ca. 45°C warmen Wasserbad aufgefangen, gestreckt und anschließend glatt auf Superfrost-Objektträger aufgezogen. Daraufhin wurden die Präparate über Nacht zum Trocknen in einen Inkubator bei 37°C gelagert.

Färbungen

Zur besseren Einschätzung der Tumormorphologie wurden folgende Färbungen angelegt:

- eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zur groben Beurteilung der Tumorzellmorphologie, der Nekrosen und der Tumurvitalität (77),
- um des Weiteren die Mikrogefäßdichte der Gewebeproben bestimmen zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung des u. a. ubiquitär auf Endothelzellen vorkommenden CD31 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 = PECAM 1 = Thrombozyten-Endothel-Adhäsionsmolekül) durchgeführt (78),
- zur Bestimmung der Mitoserate wurde den Versuchstieren 2 Stunden vor Tötung und Obduktion Bromdesoxyuridin (= BrdU; 50mM; 0,1 mg/g = 6,5 µl/g) in die Bauchhöhle injiziert, welches in der S-Phase der Mitose in die neu synthetisierte Desoxyribonukleinsäure eingebaut wird. Somit können in der Zellteilung befindliche Zellen mittels immunhistochemischer Färbung sichtbar gemacht werden.

HE-Färbung

Um die HE-Färbung durchführen zu können, wurden die Schnittpräparate zunächst durch dreimaliges Einbringen in Xylol (jeweils 10 min) entparaffiniert. Die Rehydrierung der Schnitte erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe wie folgt:

Ethanol 1	100%	10 min	(Umgebungstemperatur)
Ethanol 2	96%	10 min	(Umgebungstemperatur)
Ethanol 3	90%	5 min	(Umgebungstemperatur)
Ethanol 4	80%	5 min	(Umgebungstemperatur)
Ethanol 5	70%	5 min	(Umgebungstemperatur)

Anschließend folgten zwei Waschschriffe, von jeweils fünf Minuten, unter Verwendung von Millipore (= Reinstwasser).

Die Schnittpräparate konnten mit dem verwendeten Hämalaun progressiv gefärbt werden, sodass die Färbung mit Erreichen des gewünschten Färbeergebnisses abgebrochen wurde (nach ca. 6 min). In einem weiteren Schritt erfolgte das Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser (für 10 min), gefolgt von einer Eosin-Färbung, die nach 15 Sekunden durch einen Waschschriff mit aqua bidest. gestoppt wurde.

Anschließend wurden die Schnitte unter Verwendung von Glyceringelatine eingedeckt.

CD31+-Färbung/BrdU-Färbung

Zusätzlich zu den CD31-/BrdU-Färbungen wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Das Entparaffinieren und Rehydrieren der Präparate erfolgte nach der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Methode (siehe HE-Färbung), gefolgt von drei Waschschriffen mit PBS-Tween 1% (PBST) für jeweils fünf Minuten. Die ersten zwei Waschschriffe wurden in einer Glasküvette durchgeführt, während der letzte Waschvorgang und die folgenden Arbeitsschriffe bis auf Weiteres in einer feuchten Kammer ausgeführt wurden. Vor dem letzten Waschschriff wurden mit einem PAP-Pen Randbegrenzungen auf den Objektträgern gezogen.

Die Präparate, die für die BrdU-Färbung vorgesehen waren, wurden nach dem dritten Waschschriff in einer Citratpufferlösung (Citratpuffer: Aqua bidest = 1:10) für fünf Minuten gekocht.

Zur Vorbereitung der Präparate auf die Inkubation mit den Primär-Antikörpern wurde das endogene Biotin unter Verwendung von Avidin (Inkubationszeit: 10 min, gefolgt von zwei Waschschriffen mit PBST für jeweils 5 min) blockiert. Anschließend wurde Biotin (Einwirkzeit: 10 min) zur Sättigung der verbliebenen freien Bindungsstellen des Avidins hinzugegeben (gefollt von drei Waschschriffen mit PBST für jeweils 5 min).

Der anschließend eingesetzte Primär-Antikörper (Tab. 8a) wurde mit einer Tris-HCL-Pufferlösung (Tris-HCL-Puffer: stabilisiertes Protein und 0,015 mol/l Natriumazid) verdünnt und bei 4°C über Nacht (20 h) inkubiert. Zur Beurteilung der Mikrogefäßdichte

wurde Anti-CD31 verwendet. Die Einschätzung der Mitoserate erfolgte unter Verwendung von BrdU-Antikörpern. Zwei Stunden vor der Obduktion war den Versuchstieren BrdU injiziert worden, welches an in der Mitose befindliche Zellen bindet. Die Negativkontrollen wurde ausschließlich mit der Tris-HCL-Pufferlösung behandelt.

Primär-Antikörper	Firma	Spezies	Klonalität	Verdünnung
Anti-CD31	Dako	rat	monoklonal	1:50
Anti-BrdU	Serotec	rat		1:100

Tab. 8a: Übersicht über die verwendeten Primär-Antikörper.

Zur Beurteilung der Gefäßdichte wurden CD31-Primär-Antikörper verwendet, die an das ubiquitär auf Endothelzellen vorkommenden CD31-Antigen binden.

Vor Anwendung des Sekundär-Antikörpers wurden drei Waschschritte (PBST, jeweils 5 min) durchgeführt. Der verwendete biotinylierte Sekundär-Antikörper (Tab. 8b) wurde ebenfalls mit Tris-HCL-Pufferlösung verdünnt und die Reaktion nach 30 Minuten durch dreimaliges Waschen (PBST, jeweils für 5 min) gestoppt.

Sekundär-Antikörper	Firma	Spezies	Klonalität	Verdünnung
Anti-rat biotinyli.	Dako	Mouse	monoklonal	1:200

Tab. 8b: Übersicht über den verwendeten Sekundär-Antikörper.

Sowohl die CD31-Antikörper als auch die BrdU-Antikörper wurden in einem weiteren Schritt mit dem biotinylierten „Anti-rat“-Sekundär-Antikörper inkubiert.

Der zuvor für 30 Minuten im Dunkeln vorinkubierte Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Ansatz (ABC-Vectastain; Verhältnis: 1:1, Verdünnung mit PBS: 1:50) wirkte anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur ein. Die Inkubation wurde durch dreimaliges Waschen (PBST, jeweils 5 min) gestoppt.

Das Naphthol enthaltende Substrat führte bei der anschließenden Enzymreaktion zu einem roten Farbton (1Tbl. Tris-Puffer; 1Tbl. Fast Red (desolve set) auf 1 ml Millipore). Die Farbreaktion wurde nach 30 Minuten (CD31) bzw. 18 Minuten (BrdU) mit aqua bidest. gestoppt.

Das zur Gegenfärbung verwendete Hämalun wurde nach zweiminütiger Einwirkzeit für weitere zehn Minuten gebläut.

Die Eindeckung erfolgte ebenfalls unter Verwendung von Glyceringelatine.

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Bestimmung der Gefäßdichte (CD31) und der Mitoserate (BrdU)

Grundlage für die Auswertung der histologischen Färbungen war die Studie von Weidner et al. In dieser Studie wurde zunächst in histologischen Gefäßfärbungen von Mammakarzinompatient*innen bei niedriger Vergrößerung (10-100fach) die Bereiche des Tumors mit der höchsten Gefäßdichte ausgesucht, sog. „hot spots“, und diese einem subjektiven Grading (Grad 1-4) unterzogen. Dabei stand Grad 1 für einen schwach vaskularisierten Tumor, während Grad 4 für eine sehr starke Vaskularisierung stand (79). In einem weiteren Schritt wurde die Gefäßanzahl in diesen „hot spot“-Arealen bei 200- und 400facher Vergrößerung bestimmt (79).

Nach der immunhistochemischen Färbung wurde die Auswertung der Tumorpräparate an einem Lichtmikroskop vorgenommen. Zunächst wurden die Präparate einem subjektiven Grading bei einer 40- und 100fachen Vergrößerung unterzogen (Okular: 10fach, Objektiv: 4,0 und 10), wobei dieses abweichend von Weidners Verfahren nicht die „hot spots“ beurteilte, sondern den gesamten Tumor in Anlehnung an Vermeulens Standard zur Eruiierung der Mikrogefäßdichte (80).

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Gefäßdichte (CD31-Färbung) durch Auszählen der „hot spots“ bei 400-facher Vergrößerung. Pro Präparat wurden 20 Gesichtsfelder ausgezählt. Dabei konnte nach Ermittlung des Objektfeldes [= Durchmesser (d) des Sichtfeldes in mm = Sehfeldzahl des Okulars (= 25): Maßstabszahl des Objektivs (= 40)] die Sichtfeldfläche in mm² (= 0,31 mm²) unter Verwendung der Kreisformel $[A = r^2 \cdot \pi = (1/2d)^2 \cdot \pi]$ berechnet werden. Das Ergebnis der Auszählung des Sichtfeldes (= 0,31 mm²) wurde auf 1 mm² hochgerechnet.

Die Auswertung der Zellteilungsrate/1 mm² (BrdU-Färbung) folgte demselben Schema.

Statistische Auswertung

Die Daten für die statistische Auswertung wurden mit Microsoft Access erfasst und anschließend zur Auswertung in das Statistikprogramm SPSS (Version 19.0) exportiert. Zunächst wurde geprüft, ob die gewonnenen Daten normalverteilt sind (Normalverteilungsdiagramm, Kolmogorov-Smirnov-Test). Aufgrund der niedrigen Fallzahlen ergab sich keine Normalverteilung, sodass die Daten mit nichtparametrischen Verfahren weiter analysiert wurden. Zur Orientierung wurde der Kruskal-Wallis-Test für k

unabhängig Stichproben durchgeführt, um Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu erfassen. Für den direkten Vergleich zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen der Mikrogefäßdichte, der Mitoserate und dem Tumorgewicht besteht, wurde der Pearson-Test durchgeführt. Die Graphiken wurden mittels Box-Whisker-Plots dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Erfassung der Wirkung Taurolidins in vivo auf das Osteosarkom. Es sollte einerseits die Wirkung auf den intramuskulären Primarius und andererseits auf die simulierte intraperitoneale Metastasierung erfasst werden. Die Auswertung berücksichtigte die Tumormasse, Mitoserate und die Gefäßdichte. Weiterhin erfolgte die Dokumentation von festgestellten Nebenwirkungen und Mortalitätsraten der einzelnen Untersuchungsgruppen.

Einschlusskriterien

Therapiegruppe \ Therapiearm	0 = Kontrolle	1 = 1% TRD	2 = 2% TRD
1 = i. v.-Applikation	13	9	6
2 = i. p.-Applikation		10	4

Tab. 9: Anzahl und Verteilung der Tiere, die für die Auswertung herangezogen wurden. Insgesamt 42 Tiere erfüllten die Einschlusskriterien, um in die Auswertung aufgenommen zu werden, davon in den Kontrollgruppen insgesamt 13 Tiere. Im intravenösen Therapiearm wurden 9 Tiere aus der 1% TRD-Gruppe und 6 Tiere aus der 2% TRD-Gruppe eingeschlossen. Im intraperitonealen Therapiearm konnten 10 Tiere der 1% TRD-Gruppe und 4 Tiere der 2% TRD-Gruppe in der Auswertung berücksichtigt werden.

In die statistische Auswertung wurden 42 der ursprünglich 60 genehmigten Tiere eingeschlossen. Eingeschlossen wurden die Tiere, die die Therapie komplett abgeschlossen hatten und sich im weiteren Verlauf in stabilem Zustand präsentierten. Die Anzahl und Verteilung der Versuchstiere, die für die Auswertung herangezogen wurden, sind in Tab. 9 dargestellt. Anzahl und Ausschlusskriterien der Tiere, die nicht in die Wertung gingen, zeigt Tab. 10.

Ausschlusskriterium	Anzahl der Tiere
vagotone Reaktion mit Atemdepression und Exitus	3
vorzeitiger Therapieabbruch aufgrund einer Katheterdysfunktion	4
vorzeitige Tötung aufgrund eines reduzierten AZ/EZ*	7
Exitus aufgrund intraperitonealer Blutung	1
Übungstiere zur Handhabung der zentralvenösen Katheter	3
gesamt	18

Tab. 10: Ausschlusskriterien für die Auswertung.

Auflistung der Ereignisse, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Therapie oder zu einem vorzeitigen Exitus und somit zu einem Ausschluss aus der Auswertung führten. Die Letalität lag insgesamt bei ca. 18%. Insgesamt konnten 7 der 18 Tiere aufgrund der Katheter-Handhabung (Erlernen der Handhabung und Dysfunktion im Verlauf) nicht eingeschlossen werden. 4 der 18 Versuchstieren schieden vorzeitig aufgrund eines Exitus periinterventionell aus. Weitere 7 Tiere mussten vorzeitig aufgrund eines reduzierten Allgemeinzustandes ausgeschlossen werden.

*AZ = Allgemeinzustand; EZ = Ernährungszustand

Mortalitätsrate

Insgesamt wurde der Versuch in 30% der Fälle vorzeitig beendet, wobei die Gesamtmortalität mit 18,333% um ca. 1/3 geringer war. Die Differenz ist durch die Versuchstiere mit Katheterdysfunktion (Katheterobstruktion und Dislokation) und die zur Einübung der Handhabung gedachten Tiere zu erklären.

Die weitere Differenzierung der Mortalitätsrate ergab in den intraperitonealen Therapiegruppen folgende Verteilung: keine Mortalität in der Gruppe mit 1%iger intraperitonealer Therapie, hingegen zeigte sich eine Sterblichkeit von 60% in der Gruppe mit 2%iger intraperitonealer Therapie. Die Mortalität war somit in der Gruppe, die 2%iges Taurolidin intraperitoneal erhielt, deutlich höher. Das vorrangige Abbruchkriterium in dieser Gruppe (2% i. p.) lag in einem reduzierten Allgemeinzustand (50%), weitere 10% schieden aufgrund einer akzidentiellen arteriellen Blutung (peri-interventionelle Perforation der Aorta abdominalis) aus. In der intraperitonealen Kontrollgruppe gab es keine Ausfälle (Mortalitätsrate von 0%).

Im intravenösen Therapiearm ergab sich folgende Mortalitätsverteilung: 10% in der Gruppe mit 1%iger Taurolidin-Infusion (Exitus während der i. v.-Injektion) und 20% in der Gruppe, die 2%iges Taurolidin erhielt (ebenfalls Exitus während der i. v.-Injektion). Aufgrund von Katheterdysfunktionen konnten weiterhin 20% der Tiere nicht in die Endauswertung eingeschlossen werden. Diese wurden in der Mortalitätsrechnung nicht

berücksichtigt. Abweichend zur intraperitonealen Kontrollgruppe war die Mortalität in der intravenösen Kontrollgruppe mit insgesamt 40% deutlich erhöht, wobei 10% aufgrund eines Exitus während der i. v.-Injektion und 30% aufgrund eines reduzierten Allgemeinzustandes ausschieden.

Anzahl und Lokalisation der Tumorabsiedlungen

Die Obduktion der Versuchstiere ergab Tumorwachstum im Bereich des linken Hinterlaufs (Abb. 10-12) sowie intraperitoneal (Abb. 13-14) an folgenden Organen: Leber, Pankreas, Milz, Darm, Omentum majus, Mesenterium, Nieren, paraaortal und den Organen des kleinen Beckens (Tab. 11). Weiterhin wurde eine Infiltration der abdominalen Seite des Zwerchfells sowie der Bauchwand und des subkutanen Fettgewebes festgestellt. Intrathorakale Tumorherde konnten zumindest makroskopisch nicht festgestellt werden.

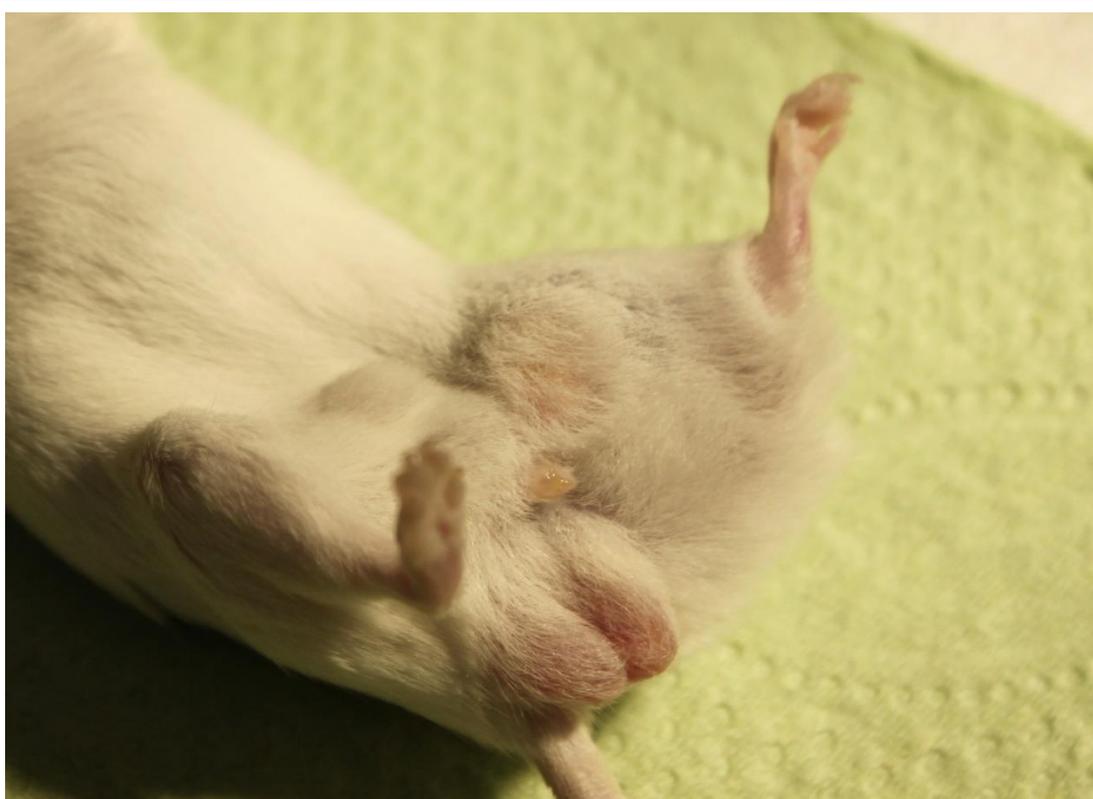


Abb. 10: Intramuskulärer Tumor.

Deutlich erkennbare Seitendifferenz zwischen dem rechten tumorfreien Unterschenkel und dem linken, durch das Osteosarkom deformierten Unterschenkel, einhergehend mit deutlichen Bewegungseinschränkungen.



Abb. 11: Präparation des intramuskulären Tumors.
Nach Entfernen von Kutis und Subkutis zeigte sich das Bild eines soliden Tumors, der das ursprüngliche Gewebe zu verdrängen scheint.

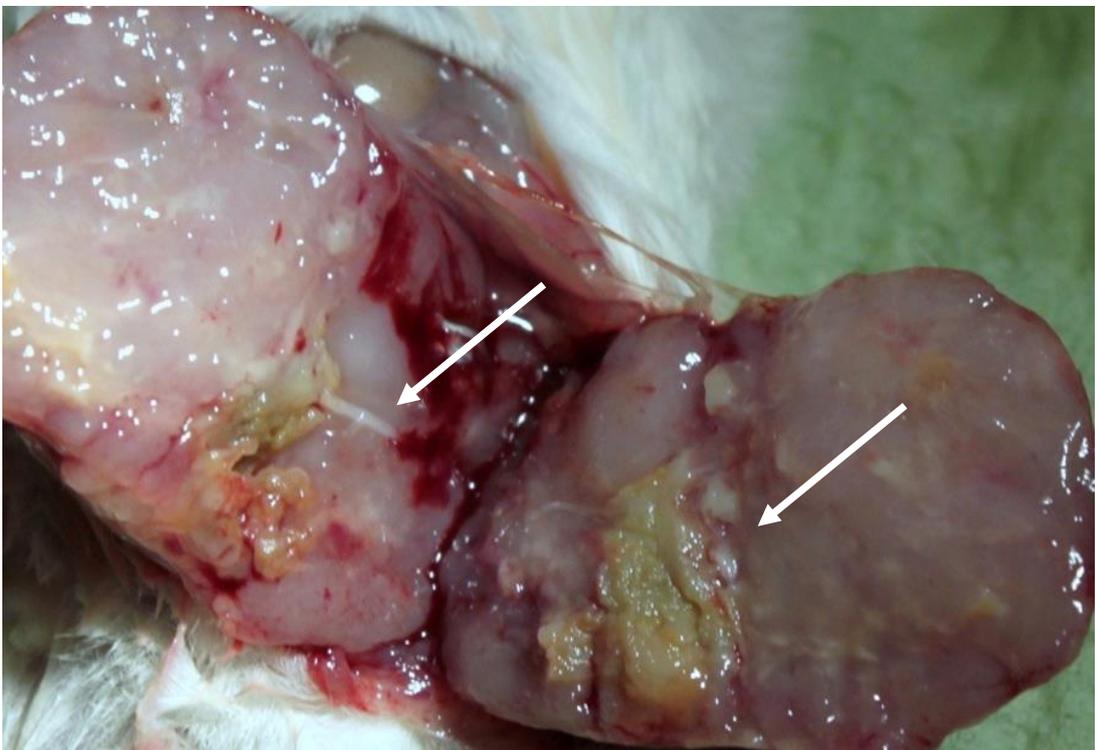


Abb. 12: Querschnitt des parossären, intramuskulären Osteosarkoms.
Makroskopisch zu erkennen ist ein fleischartig-glasiger Tumor mit osteoid-/knorpelähnlichen Anteilen und eine große zentralen Nekrose (Pfeil).

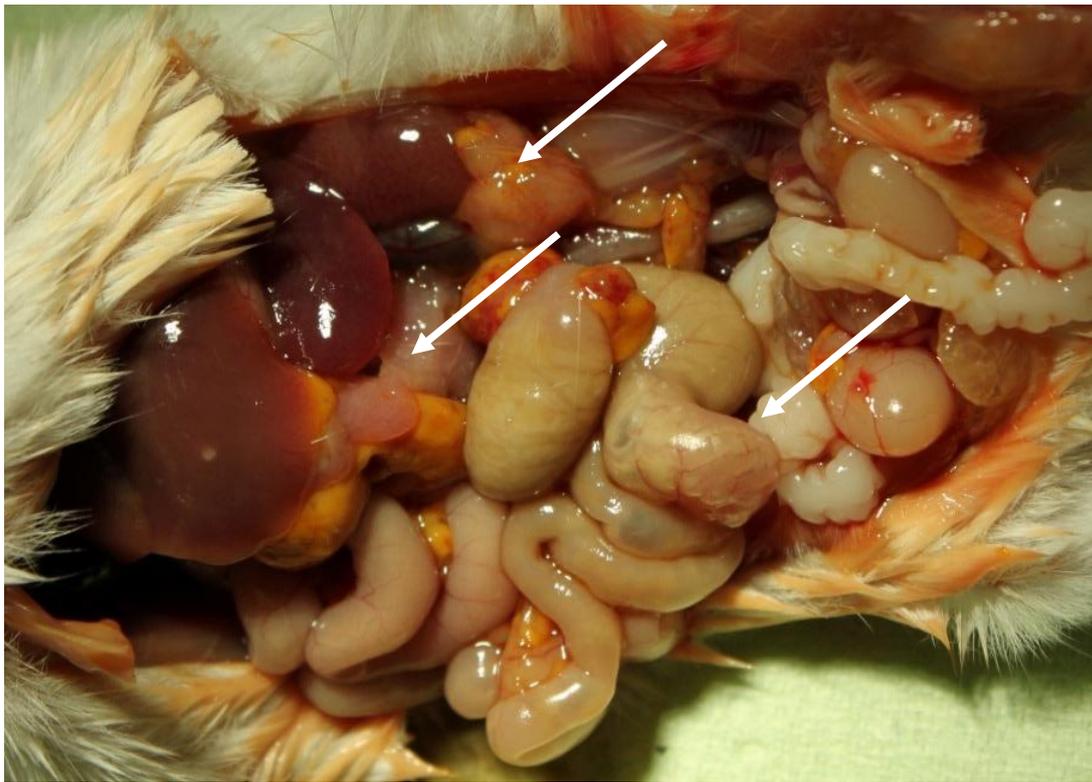


Abb. 13: Mittels Längslaparotomie eröffnetes Abdomen. Tumorabsiedlung sind an Leber, Niere und Darm erkennbar (Pfeile).



Abb. 14: Vergrößerung einer das Mesenterium und den Dünndarm infiltrierenden Metastase (Pfeil).

Mit einer Ausnahme zeigte sich bei allen Versuchstieren ein Anwachsen des Tumors intramuskulär. Während der Obduktion präsentierte sich dieser Tumor makroskopisch als solide, fleischig-glasig und invasiv-destruierend wachsend (Abb. 11, Abb. 12). Zudem fielen osteoid-/knorpelartige Regionen sowie nekrotische Areale im Tumor auf.

Die intraperitoneale Tumorlast (Tab. 11) variierte in Abhängigkeit von der Therapiegruppe.

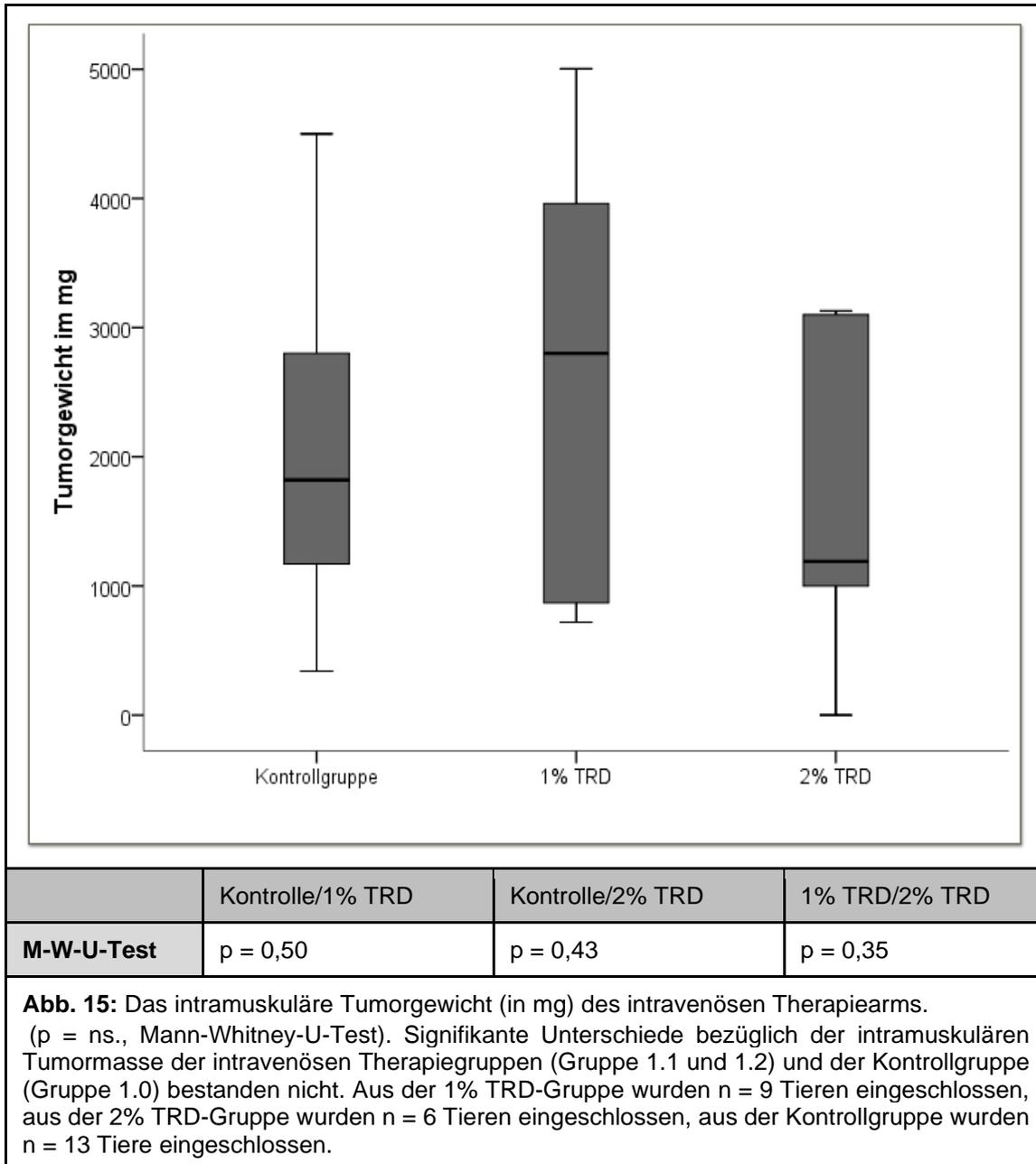
Verteilung Lokalisation	gesamt (42 Tiere)	1% TRD i. v. (9 Tiere)	2% TRD i. v. (6 Tiere)	1% TRD i. p. (10 Tiere)	2% TRD i. p. (4 Tiere)	NaCl (13 Tiere)
kleines Becken	15/36%	4/44%	2/33%	2/20%	0	7/54%
paraaortal	10/24%	4/44%	1/17%	1/10%	0	4/30%
Niere (li)	9/21%	2/22%	4/66%	0	0	3/23%
Niere (re)	5/12%	2/22%	0	0	0	3/23%
Netz/Omentum	10/24%	2/22%	3/50%	1/10%	0	4/30%
Pankreas	10/24%	2/22%	2/33%	1/10%	0	5/38%
Milz	7/17%	0	1/17%	1/10%	0	5/38%
Darm	5/12%	1/11%	1/17%	0	0	3/23%
Mesenterium	14/33%	4/44%	2/33%	1/10%	0	7/54%
Zwerchfell	11/26%	3/33%	2/33%	0	0	6/46%
Bauchwand	11/26%	1/11%	1/17%	1/10%	0	7/54%
Leber/Leberhilus	11/26%	4/44%	2/33%	0	0	5/38%
subkutan	14/33%	3/33%	4/66%	1/10%	0	6/46%

Tab. 11: Absolute und relative Häufigkeit (X/Y%) des Befalls der einzelnen abdominalen Organe.

Tabelle 11 verschafft einen Überblick über die absolute und die relative Häufigkeit des intraabdominalen Organbefalls. Makroskopisch ließen sich in der Gruppe unter 2%igem intraperitoneal appliziertem TRD keine intraperitonealen Tumorabsiedlungen finden. Weiterhin zeigte sich in der Gruppe, die 1% TRD intraperitoneal erhielt, ein geringerer Organbefall im Vergleich zu den Kontrollgruppen und der intravenösen Therapiegruppen.

Tumorgewicht des intravenösen Therapiearms

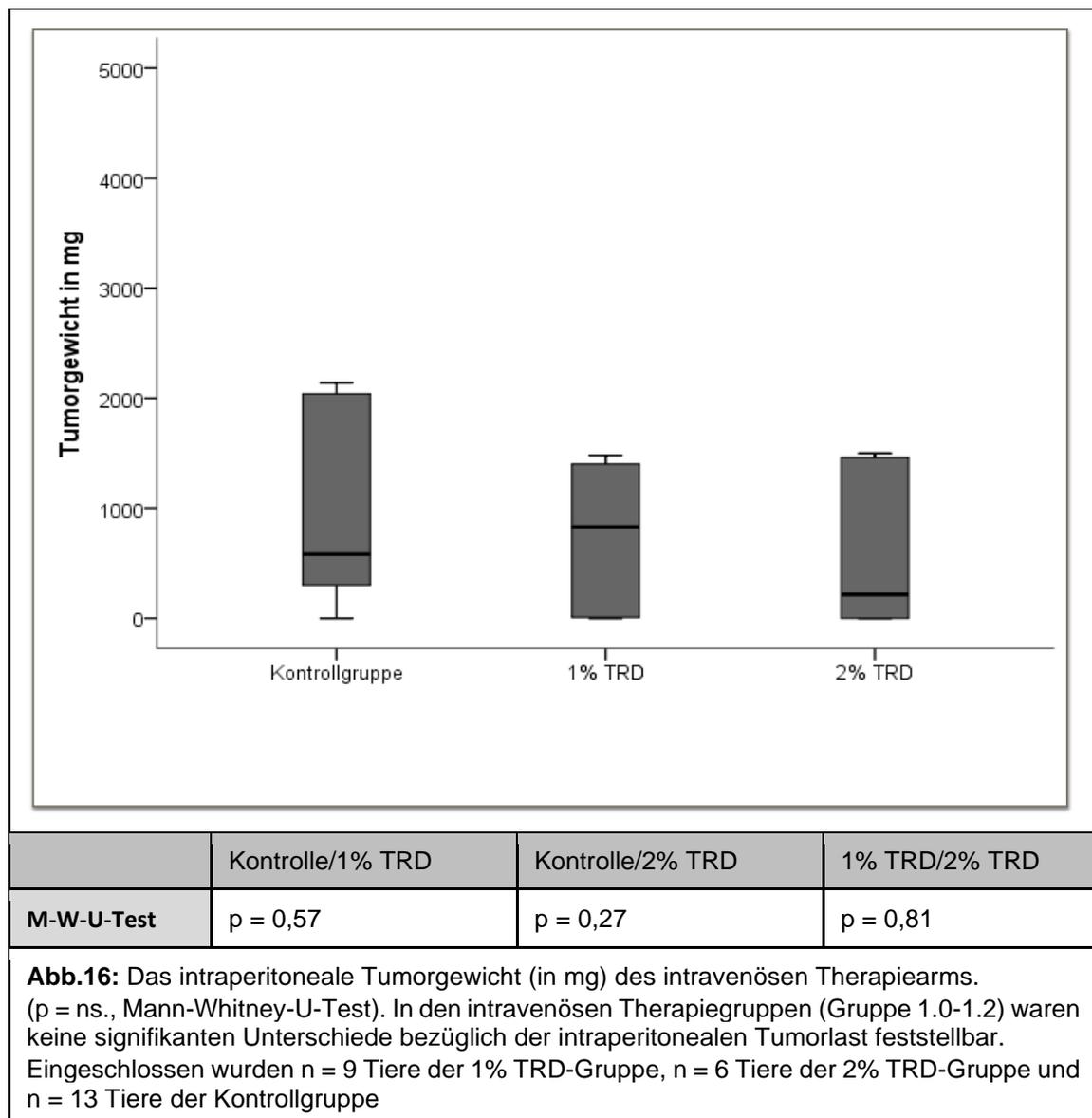
Intramuskuläres Tumorwachstum der intravenösen Therapiegruppen



Das Gewicht des intramuskulär gewachsenen Tumors in den intravenösen Therapiegruppen betrug im Median in der 1% Taurolidin-Gruppe 2.800 mg (Interquartilsbereich: 3.220, Spannweite: 4.285), in der 2% Taurolidin-Gruppe 1.190 mg (Interquartilsbereich: 2.358, Spannweite: 3.130) und in der Kontrollgruppe 1.820 mg (Interquartilsbereich: 2.055, Spannweite: 4.160). Signifikante Unterschiede bezüglich des intramuskulär gewachsenen Tumors ließen sich im Direktvergleich der einzelnen

Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test nicht feststellen. Weder in der Gruppe, die mit 1%igem Taurolidin behandelt wurde, noch in der Gruppe, die 2%iges Taurolidin erhielt, konnte eine signifikante Reduktion der Tumormasse im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 15).

Intraperitoneales Tumorwachstum der intravenösen Therapiegruppen

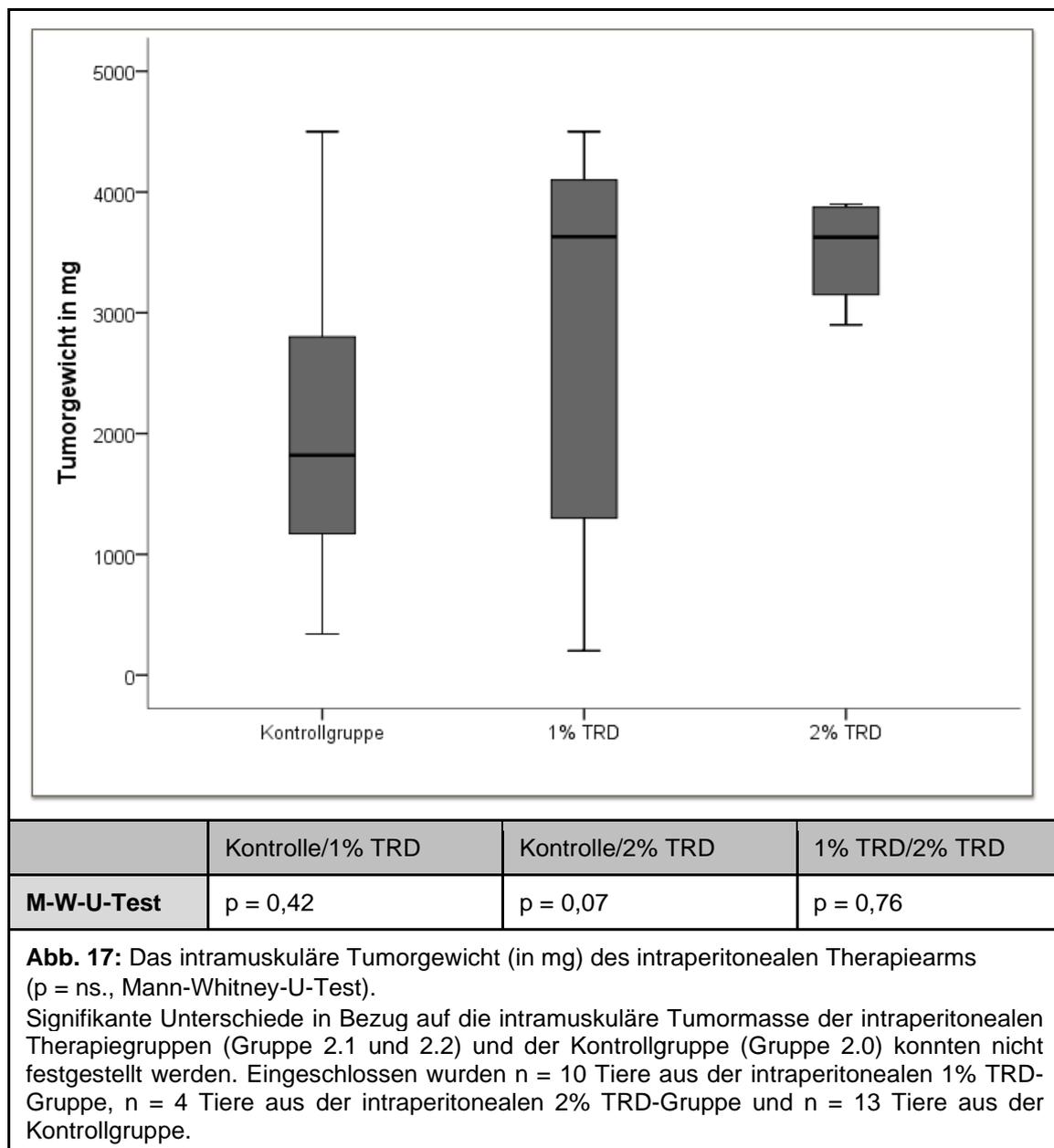


Die Auswertung des intraperitoneal gewachsenen Tumors des intravenösen Therapiearms ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb. 16). Das Tumorgewicht betrug im Median in der 1% Taurolidin-Gruppe 830 mg (Interquartilsbereich: 1.417, Spannweite: 1.480), in der 2% Taurolidin-Gruppe 215 mg (Interquartilsbereich: 1.470, Spannweite: 1.500) und in der Kontrollgruppe 580 mg

(Interquartilsbereich: 1.920, Spannweite: 2.140). Jedoch scheint sich in der Gruppe, die 2%iges Taurolidin intravenös erhielt, eine tendenziell geringere Tumorlast abzuzeichnen. Im Vergleich zum intramuskulär gewachsenen Tumor des ebenfalls intravenösen Therapiearms zeigte sich, dass die intraperitoneal festgestellte Tumormasse trotz gleicher Ausgangsbelastung mit $2,5 \times 10^5$ Tumorzellen geringer war, als die intramuskuläre Tumormasse.

Tumorgewicht des intraperitonealen Therapiearms

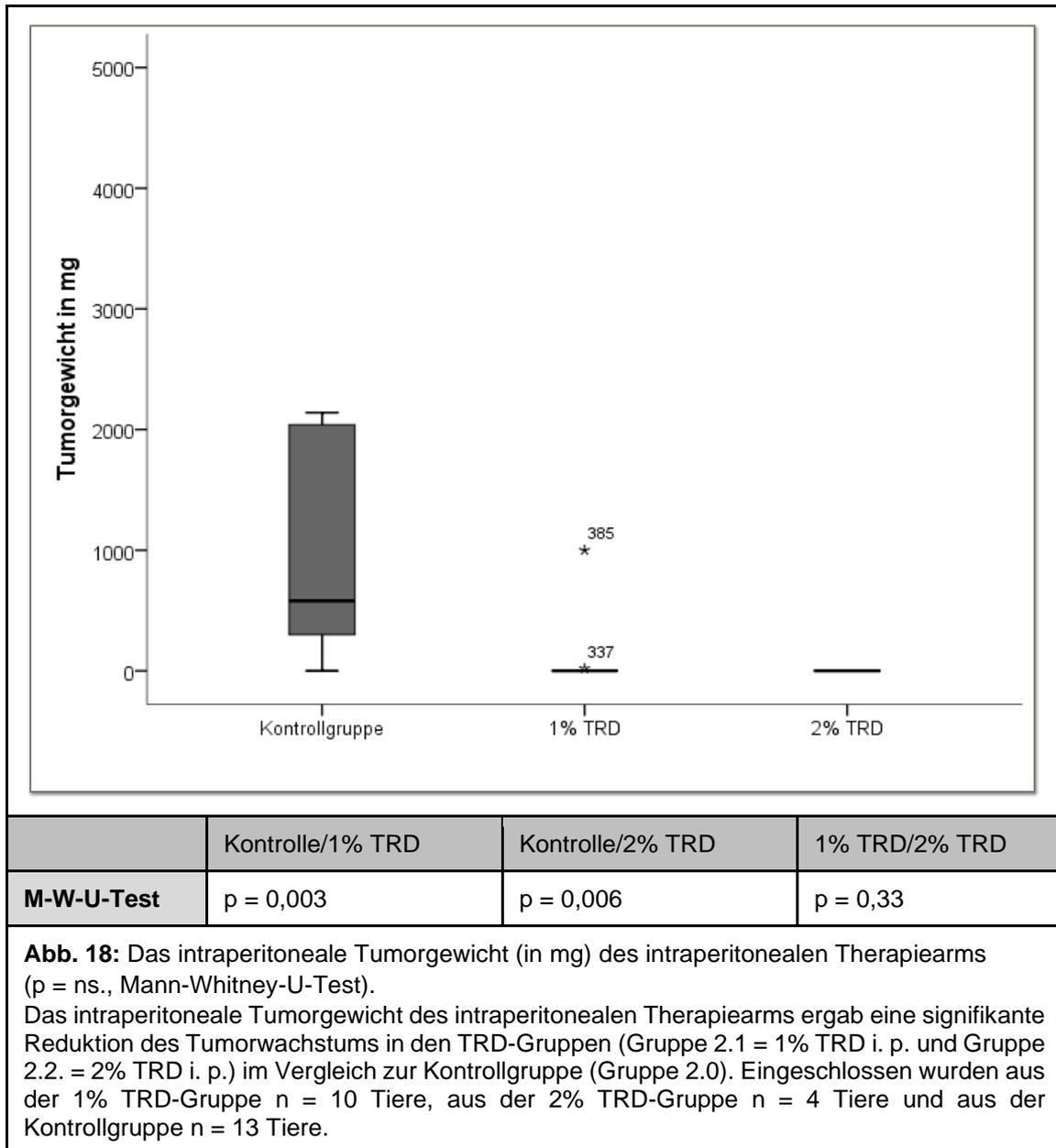
Intramuskuläres Tumorwachstum der intraperitonealen Therapiegruppen



Das intramuskuläre Tumorwachstum der Taurolidin-Gruppen unterschied sich nicht vom Tumorwachstum der Kontrollgruppe. Die asymptotische Signifikanz im Direktvergleich der einzelnen Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test lag bei $p > 0,05$ (Abb. 17). Jedoch zeichnete sich in den Gruppen, die Taurolidin i. p. verabreicht bekamen, eine nicht-signifikant höhere Tumormasse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das intramuskuläre Tumorgewicht betrug im Median 3.630 mg in der 1% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 3.050, Spannweite: 4.300), 3.625 mg in der 2% Taurolidin-Gruppe

(Interquartilsbereich: 863, Spannweite: 1.000) und 1.820 mg in der Kontrollgruppe (Interquartilsbereich: 2.055, Spannweite: 4.160).

Intraperitoneales Tumorgewicht der intraperitonealen Therapiegruppen



Signifikante Unterschiede zeigten sich im Wachstum des intraperitonealen Tumors. Durch die intraperitoneale Applikation von Taurolidin ließ sich die Tumormasse sowohl in der 1%igen (Median: 0, Interquartilsbereich: 10, Spannweite: 1.000) als auch in der 2%igen Taurolidin-Gruppe (Median: 0, Interquartilsbereich: 0, Spannweite: 0) in Vergleich zur Kontrollgruppe (Median: 580, Interquartilsbereich: 1.920, Spannweite: 2.140) hochsignifikant ($p < 0,05$) reduzieren (Abb. 18). In der 2%igen Taurolidin-Gruppe konnte

makroskopisch kein Tumorwachstum festgestellt werden. Dennoch besteht kein signifikanter Unterschied in der Anwendung von 1%igem und 2%igem Taurolidin.

Entwicklung des Gewichts der Tiere im Verlauf

Die in die Studie eingeschlossenen Tiere zeigten im Median ein Ausgangsgewicht von 25,5g (22,7g-29,1g). Im direkten Vergleich des Ausgangsgewichts der einzelnen Gruppen (Kontrolle, 1% Taurolidin, 2% Taurolidin) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) (Tab. 12).

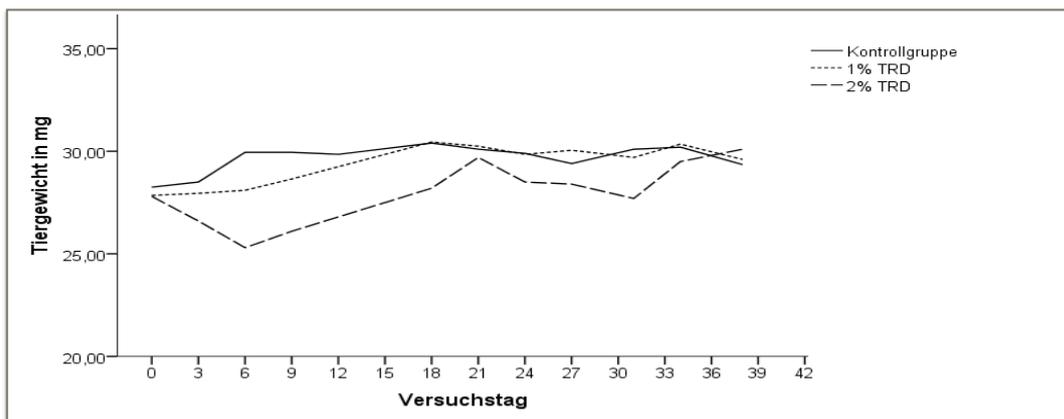
	Kontrolle/1% TRD	Kontrolle/2% TRD	1% TRD/2% TRD
M-W-U-Test	$p = 0,07$	$p = 0,79$	$p = 0,11$
	Kontrolle	1% TRD	2% TRD
Median	25,5	27,7	26,5
Interquartilsbereich	2,95	2,43	3,15
Spannweite	6,4	7,9	7,1

Tab. 12: Vergleich des Ausgangsgewichts der Versuchstiere der einzelnen Therapiegruppen (i. v. und i. p.).

Direktvergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, Angaben zur deskriptiven Statistik (Median, Interquartilsbereich, Spannweite). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Ausgangsgewichts der Tiere der einzelnen Gruppen (Kontrollgruppe, 1% TRD-Gruppe, 2% TRD-Gruppe) unabhängig von der Applikationsform (gesamt; i. v. und i. p. zusammen).

Gewichtsverlauf der Tiere der intravenösen Gruppen

Die Auswertung der Gewichtsentwicklung der Gruppen (Kontrolle, 1% Taurolidin, 2% Taurolidin) des intravenösen Therapiearms ergab einen vorübergehenden Gewichtsverlust in den Gruppen, die 1%iges und 2%iges Taurolidin erhielten, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 19). Die signifikanten Gewichtsunterschiede bestanden während des Therapiezeitraums und waren zum Ende des Therapiezeitraums am größten. Im weiteren Verlauf kam es zu einem Ausgleich des Wachstumsrückstandes, sodass zum Obduktionszeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu verzeichnen waren. Die Ergebnisse des Direktvergleichs der einzelnen Gruppen sind in Abb. 19 ebenfalls zusammengefasst (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$).



Tag	Kontrolle/1% TRD (M-W-U-Test; p)	Kontrolle/2% TRD (M-W-U-Test; p)	1% TRD/2% TRD (M-W-U-Test; p)
0*	1,0	0,56	0,38
3*	1,0	0,12	0,01
6*	0,04	0,05	0,01
9	0,12	0,12	0,08
12	0,69	0,12	0,04
15	-	-	-
18	0,89	0,25	0,14
21	1,0	0,44	0,19
24	1,0	0,44	0,18
27	0,60	0,44	0,06
31	0,80	0,25	0,11
34	0,60	0,67	0,46

Abb. 19: Darstellung des Gewichtsverlaufs der intravenösen Therapiegruppen während des gesamten Beobachtungszeitraums (Tag 0-35).

Dargestellt ist das mediane Gewicht der einzelnen intravenösen Therapiegruppen (Kontrolle, TRD 1%, TRD 2%) zum jeweiligen Messzeitpunkt. In den Gruppen, die TRD i. v. erhielten, zeigte sich während des Therapiezeitraums (Tag 1-7) eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei waren die Gewichtsverluste in der 2% TRD-Gruppe höher als in der Gruppe, die mit 1%igem TRD behandelt wurde. Zum Obduktionszeitpunkt bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gewichts.

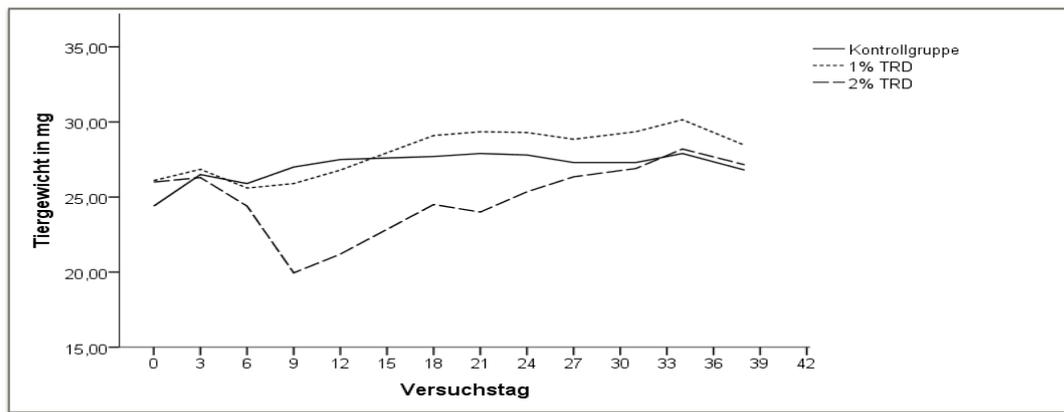
*markiert den Therapiezeitraum

Gewichtsverlauf der Tiere der intraperitonealen Gruppen

Bei der Beurteilung der Gewichtsentwicklung zeigte sich unter intraperitonealer Taurolidin-Applikation in der 2% Taurolidin-Gruppe eine signifikante Reduktion des Ausgangsgewichts und eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur 1% Taurolidin-Gruppe (Abb. 20). Dabei erreichten die Versuchstiere im Median ein minimales Gewicht von 20 Gramm, entsprechend einem Gewichtsverlust von fünf Gramm (20%). Der Gewichtsunterschied war im Anschluss an den Therapiezeitraum (Tag 9) am größten und setzte somit später ein als in den intravenösen Therapiegruppen. Die signifikanten Unterschiede bestanden mit 12 Tagen im Vergleich zur den intravenösen Therapiegruppen über einen deutlich längeren Zeitraum. Im weiteren Verlauf zeigte sich, vergleichbar mit den Beobachtungen der intravenösen Gruppen, eine Zunahme des Gewichts.

Die in der 2% Taurolidin-Gruppe beobachtete Gewichtsentwicklung ließ sich in der Gruppe, die 1%iges Taurolidin intraperitoneal erhielt, nicht feststellen. In der 1% Taurolidin-Gruppe kam es zu keiner signifikanten Gewichtsreduktion in Vergleich zur Kontrollgruppe.

Wie der Direktvergleich der Gruppen zeigt, bestanden zum Zeitpunkt der Obduktion keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Körpergewichts zwischen den einzelnen Gruppen.



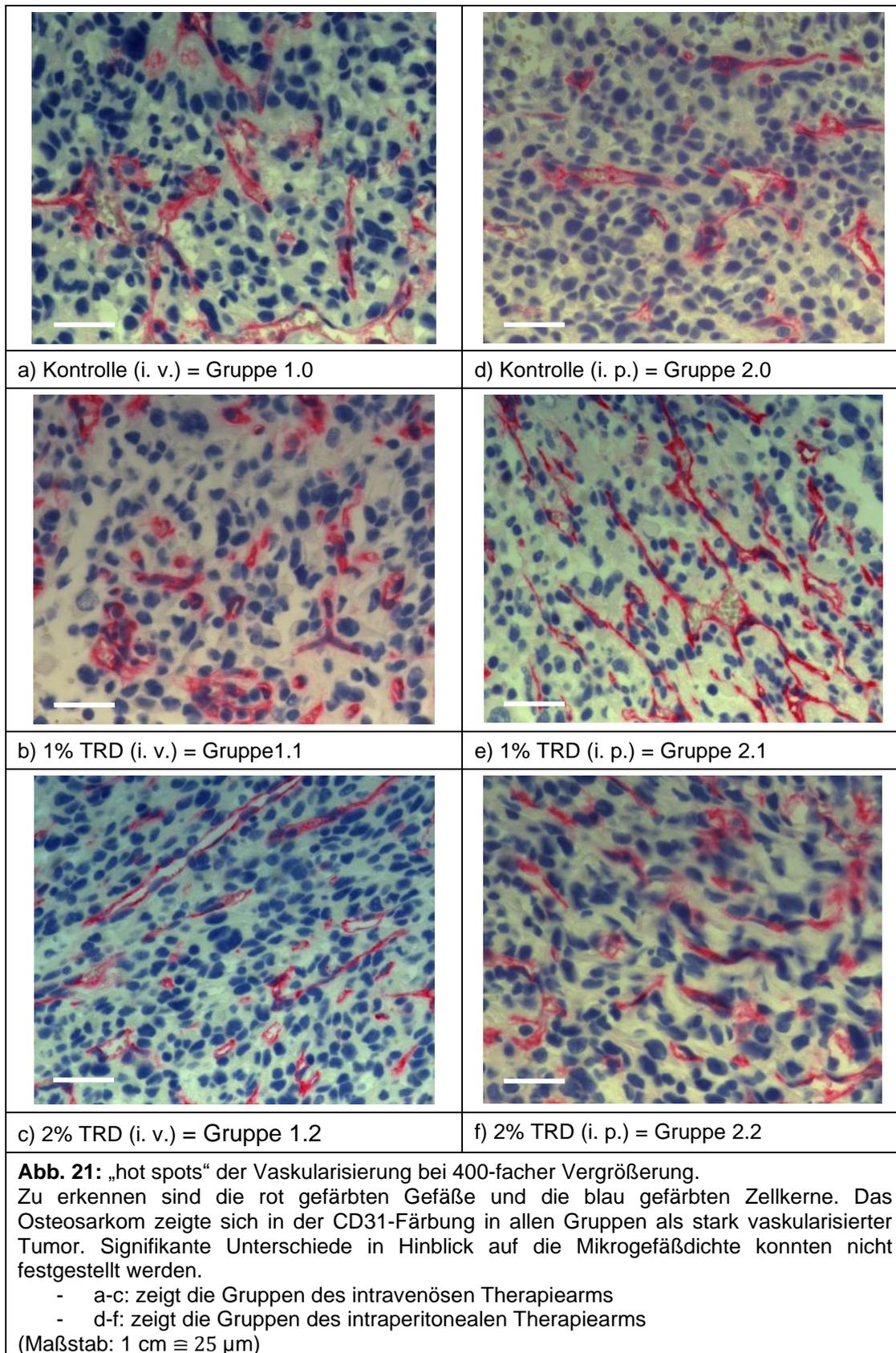
Tag	Kontrolle/1% TRD (M-W-U-Test; p)	Kontrolle/2% TRD (M-W-U-Test; p)	1% TRD/2% TRD (M-W-U-Test; p)
0*	0,21	0,07	0,83
3*	0,62	0,85	0,57
6*	0,35	0,15	0,20
9	0,08	0,01	0,01
12	0,26	0,01	0,01
15	-	-	-
18	0,62	0,01	0,01
21	0,63	0,04	0,01
24	0,49	0,09	0,05
27	0,46	0,45	0,12
31	0,26	0,71	0,14
34	0,06	0,57	0,12

Abb. 20: Darstellung des Gewichtsverlaufs der intraperitonealen Therapiegruppen während des gesamten Beobachtungszeitraums (Tag 0-35).

Dargestellt ist das mediane Gewicht der einzelnen intraperitonealen Therapiegruppen (Kontrolle, 1% TRD, 2% TRD) zum jeweiligen Messzeitpunkt. Im Gegensatz zur Kontrolle und zur 1% TRD-Gruppe zeigte sich in der Gruppe, die 2%iges TRD intraperitoneal erhielt, ein signifikanter Gewichtsverlust während des Therapiezeitraums, mit einem Maximum kurz nach Beendigung der Therapie. Dieser signifikante Gewichtsverlust (der in der 2% TRD-Gruppe beobachtet wurde) war zum Obduktionszeitpunkt nicht weiter feststellbar.

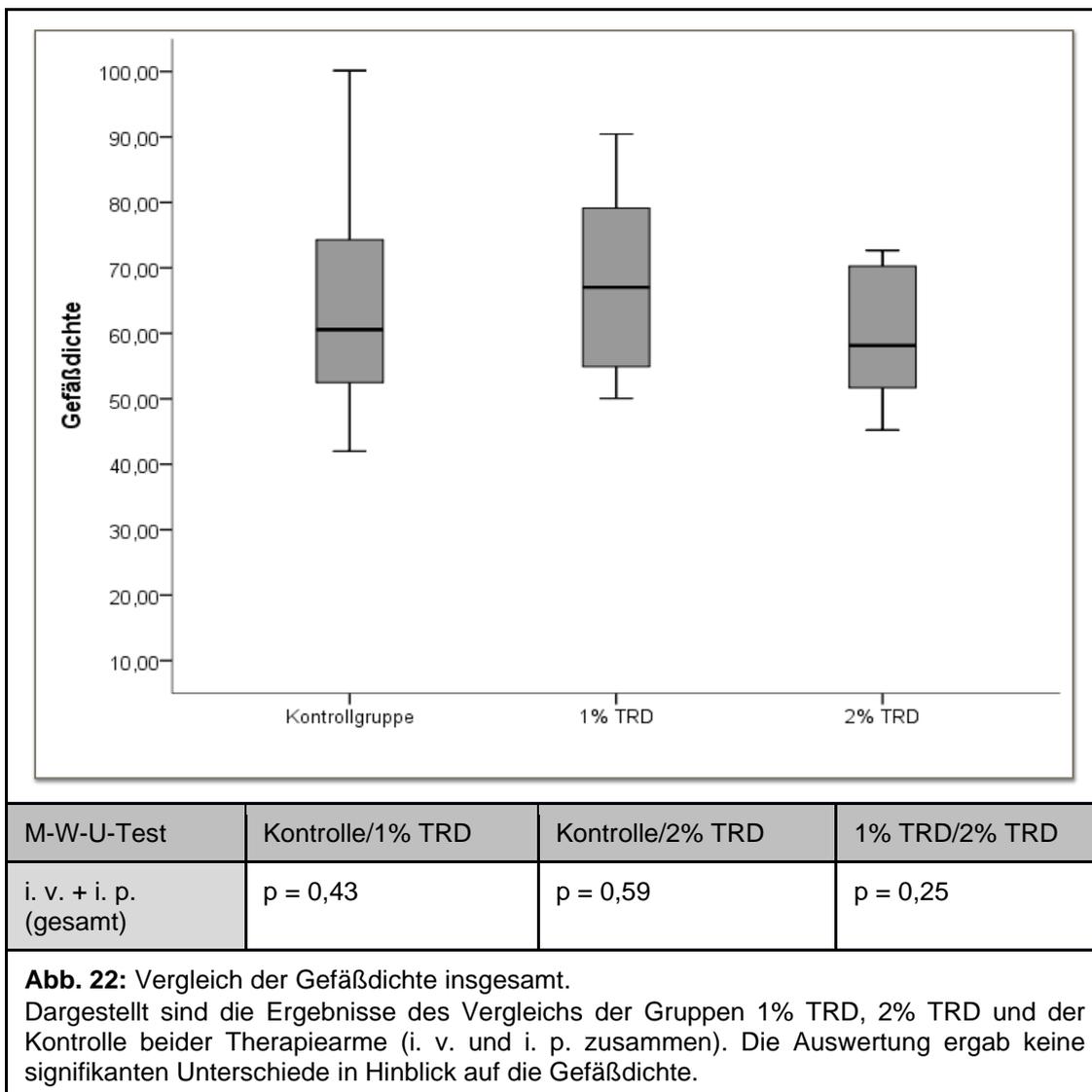
Mikrogefäßdichte des intramuskulär gewachsenen Tumors

Bei der mikroskopischen Auswertung der CD31-Färbung zeigte sich insgesamt eine hohe Gefäßdichte des Tumors (Abb. 21).



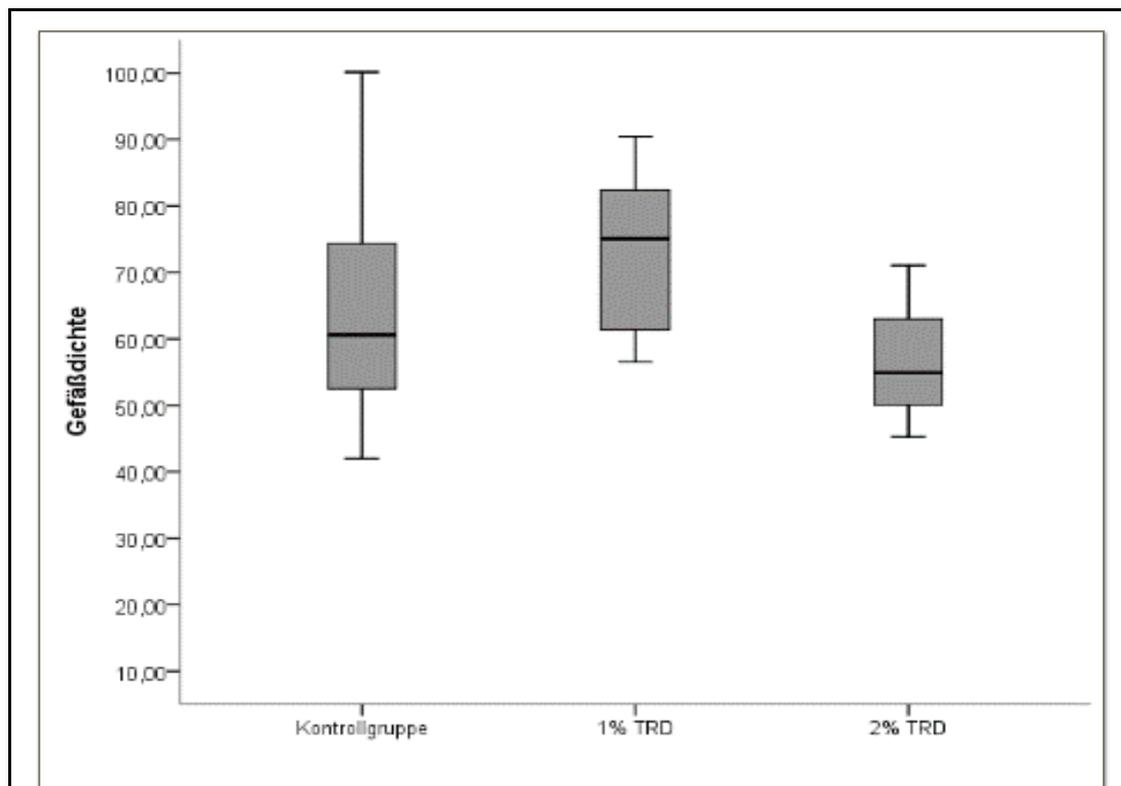
Auswertung der Mikrogefäßdichte insgesamt

Dabei ergab die Auswertung der Mikrogefäßdichte insgesamt (i. v. und i. p.) im Median eine Gefäßanzahl von 60,6/mm² in der Kontrollgruppe (Interquartilsbereich: 23,0; Spannweite: 58,1), 67,1/mm² in der 1% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 25,8; Spannweite: 40,4) und 58,1/mm² in der 2% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 22,6; Spannweite: 27,4). Der Direktvergleich der Gruppen (Kontrolle, 1% Taurolidin und 2% Taurolidin) unabhängig vom Therapiearm (i. v. und i. p.) erbrachte keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Gefäßanzahl/mm² (Abb. 22).



Auswertung der Mikrogefäßdichte der intravenösen Gruppen

Die Auswertung der Mikrogefäßdichte der intravenösen Therapiegruppen ergab im Median eine Gefäßanzahl von 60,6/mm² in der Kontrollgruppe (Interquartilsbereich: 23,1; Spannweite: 58,1), 75,1/mm² in der 1% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 24,2; Spannweite: 33,9) und 54,9/mm² in der 2% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 13,7; Spannweite: 25,8). Der Direktvergleich der intravenösen Gruppen (Kontrolle, 1% Taurolidin und 2% Taurolidin) ergab keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Gefäßanzahl/mm² (Abb. 23).



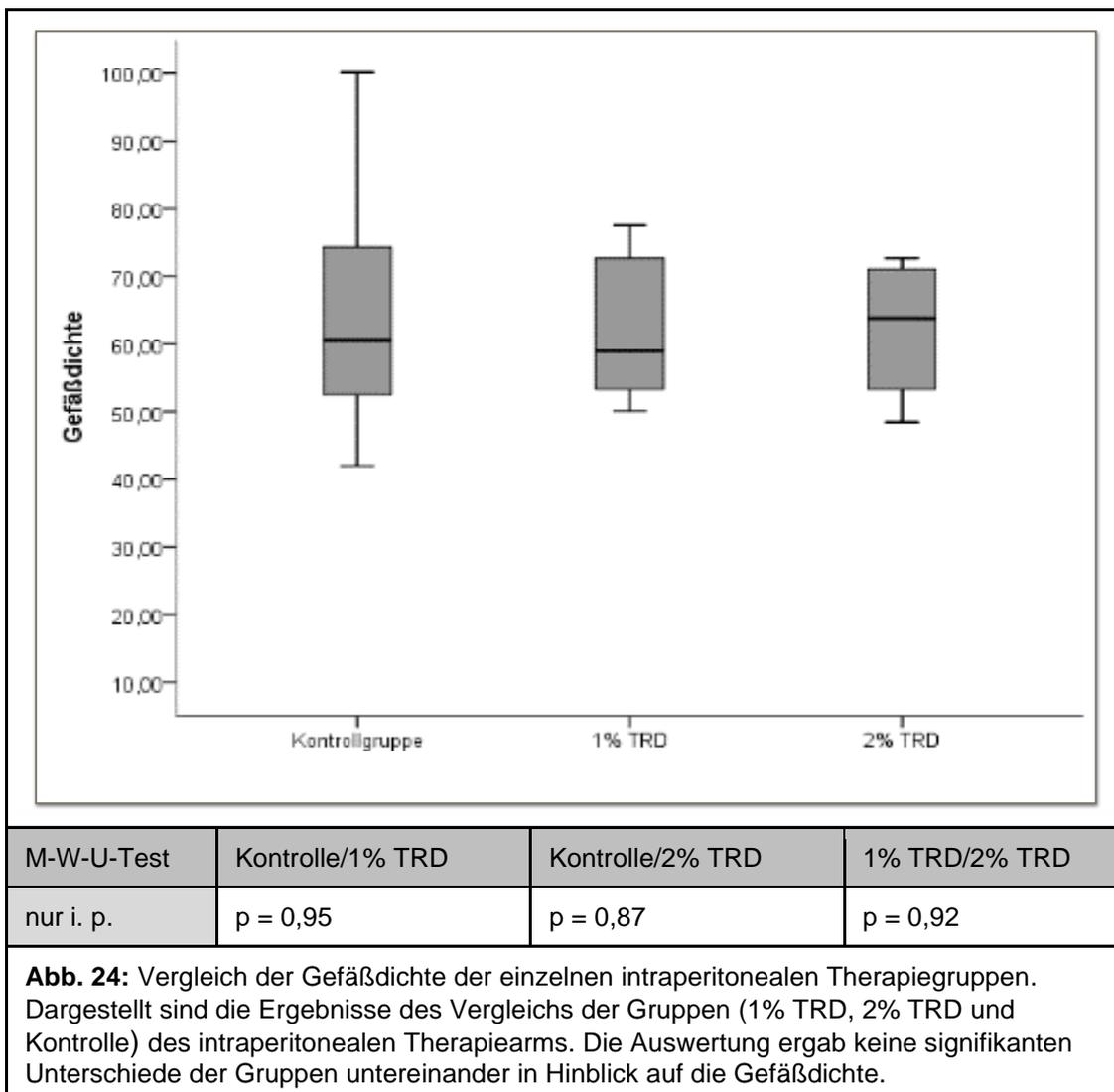
M-W-U-Test	Kontrolle/1% TRD	Kontrolle/2% TRD	1% TRD/2% TRD
nur i. v.	p = 0,25	p = 0,54	p = 0,12

Abb. 23: Vergleich der Gefäßdichte der einzelnen intravenösen Therapiegruppen: 1% TRD, 2% TRD und Kontrolle.

Dargestellt sind die Ergebnisse des Vergleichs der Gruppen des intravenösen Therapiearms. Die Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede der Gruppen untereinander in Hinblick auf die Gefäßdichte, jedoch einen Trend in der 2% Therapiegruppe.

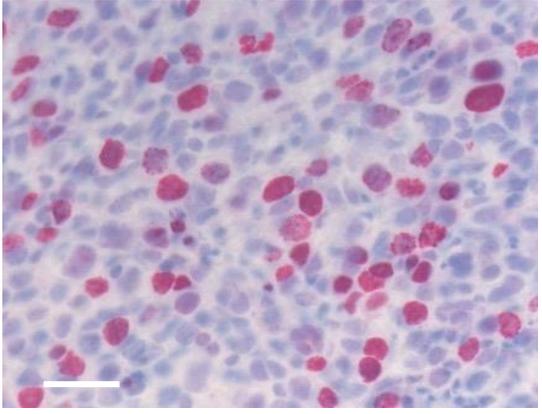
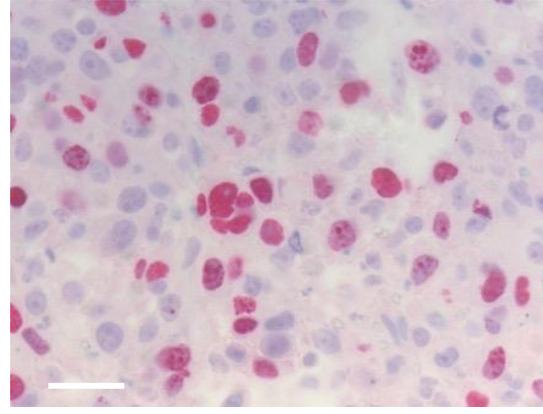
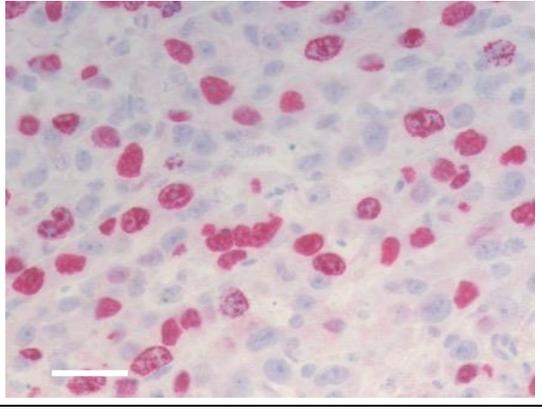
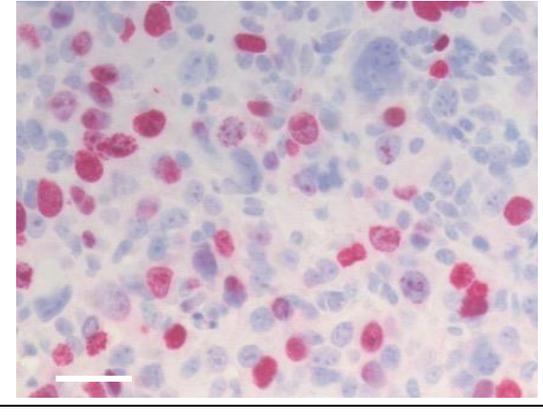
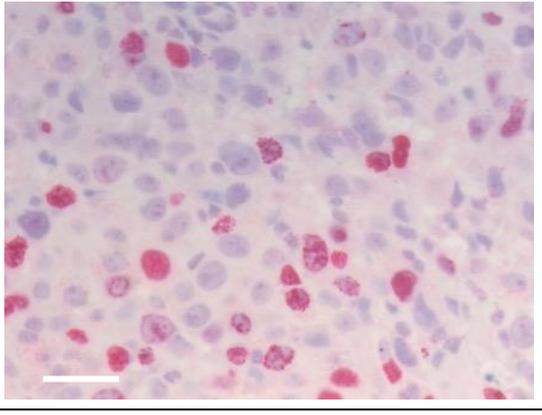
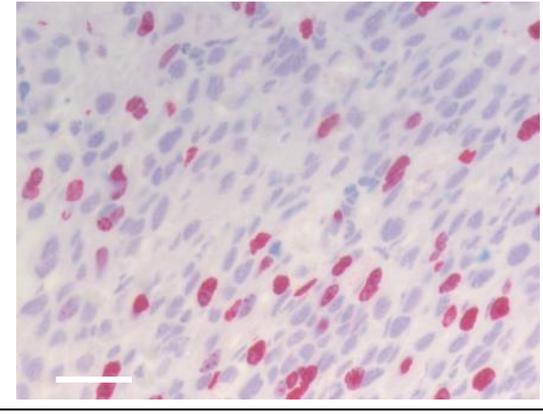
Auswertung der Mikrogefäßdichte der intraperitonealen Gruppen

Die Auswertung der Mikrogefäßdichte der intraperitonealen Therapiegruppen ergab im Median eine Gefäßanzahl von 60,6/mm² in der Kontrollgruppe (Interquartilsbereich: 23,0; Spannweite: 58,1), 58,9/mm² in der 1% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 21,4; Spannweite: 27,5) und 63,8/mm² in der 2% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 21,0; Spannweite: 24,2). Der Direktvergleich der intraperitonealen Gruppen (Kontrolle, 1% Taurolidin und 2% Taurolidin) ergab keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Gefäßanzahl/mm² (Abb. 24).



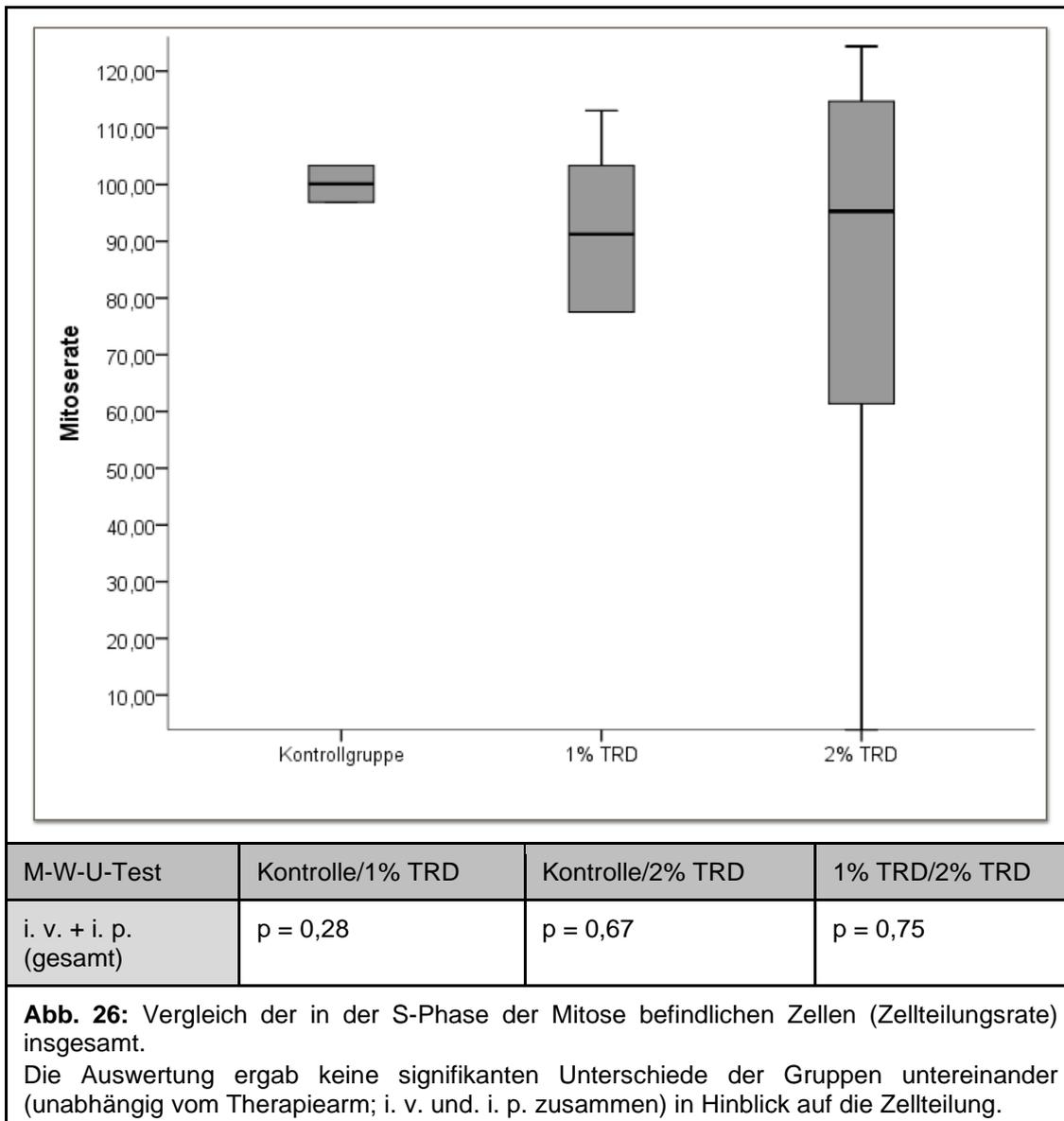
Mitoserate des intramuskulär gewachsenen Tumors

Mikroskopisch zeigte sich insgesamt ein hochproliferativer Tumor (Abb. 25).

	
a) Kontrolle (i. v.) = Gruppe 1.0	d) Kontrolle (i. p.) = Gruppe 2.0
	
b) 1% TRD (i. v.) = Gruppe 1.1	e) 1% TRD (i. p.) = Gruppe 2.1
	
c) 2% TRD (i. v.) = Gruppe 1.2	f) 2% TRD (i. p.) = Gruppe 2.2
<p>Abb.25: „hot spots“ der Mitoserate bei 400-facher Vergrößerung. Die Zellkerne, die sich in der S-Phase der Mitose befinden, sind rot, Zellkerne außerhalb der S-Phase der Mitose sind blau gefärbt. Signifikante Unterschiede in Hinblick auf die Zellteilungsrate konnten nicht festgestellt werden.</p> <ul style="list-style-type: none"> - a-c: = Gruppen des intravenösen Therapiearms - d-f: = Gruppen des intraperitonealen Therapiearms <p>(Maßstab: 1 cm \cong 25 μm)</p>	

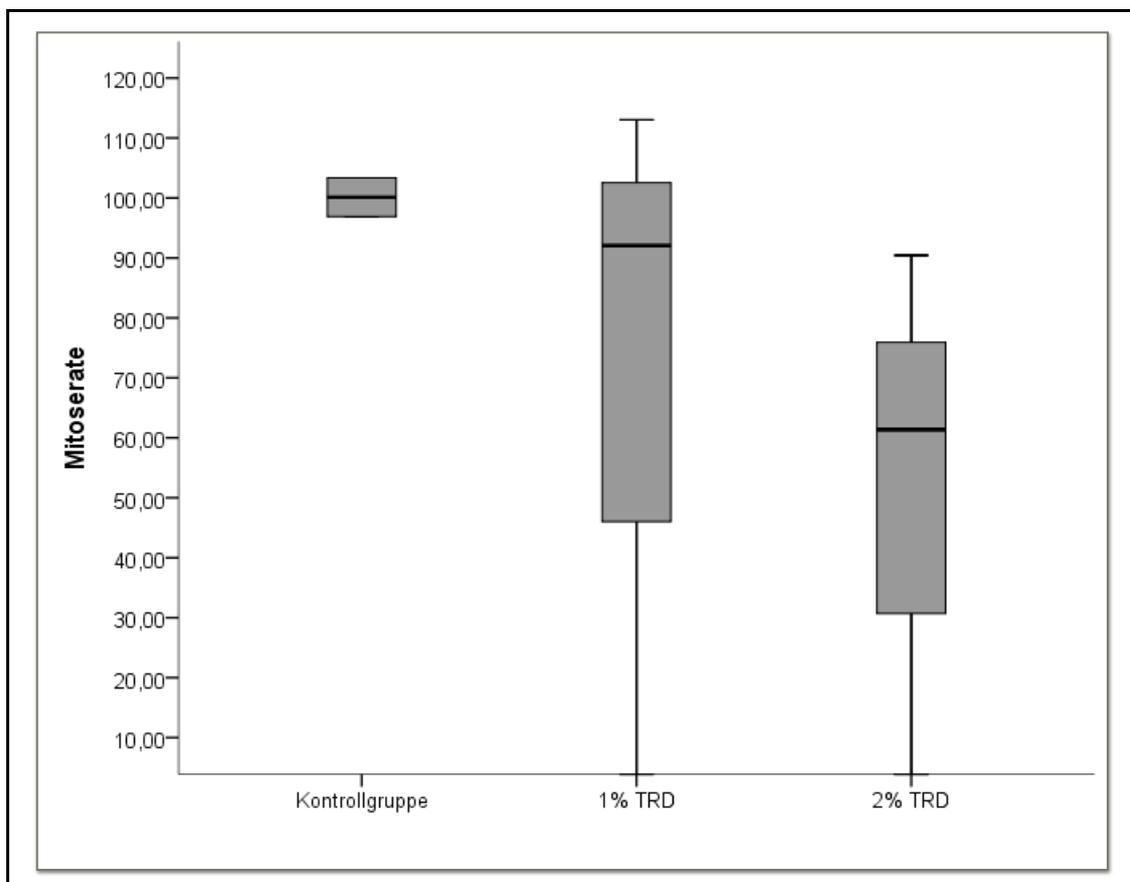
Auswertung der Mitoserate insgesamt

Die Auswertung der Mitoserate insgesamt (i. v. und i. p.) ergab im Median 100,1 Mitosen/mm² in der Kontrollgruppe (Interquartilsbereich: 6,5; Spannweite: 6.5), 91,2 Mitosen/mm² in der 1% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 47,6; Spannweite: 113,1) und 95,3 Mitosen/mm² in der 2% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 71,1; Spannweite: 124,4). Der Direktvergleich der Gruppen (Kontrolle, 1% Taurolidin und 2% Taurolidin) unabhängig vom Therapiearm (i. v. und i. p.) erbrachte keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Mitoseanzahl/mm² (Abb.26).



Auswertung der Mitoserate der intravenösen Gruppen

Die Auswertung der Mitoserate der intravenösen Gruppen ergab im Median 100,1 Mitosen/mm² in der Kontrollgruppe (Interquartilsbereich: 6,5; Spannweite: 6.5), 91,2 Mitosen/mm² in der 1% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 57; Spannweite: 113,1) und 61,4 Mitosen/mm² in der 2% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 46; Spannweite: 90,4) (Abb. 27). Der Direktvergleich der intravenösen Gruppen (Kontrolle, 1% Taurolidin und 2% Taurolidin) erbrachte keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Mitoseanzahl/mm². Tendenziell zeichnete sich eine geringer Mitoserate in der 2% Taurolidin-Gruppe ab.

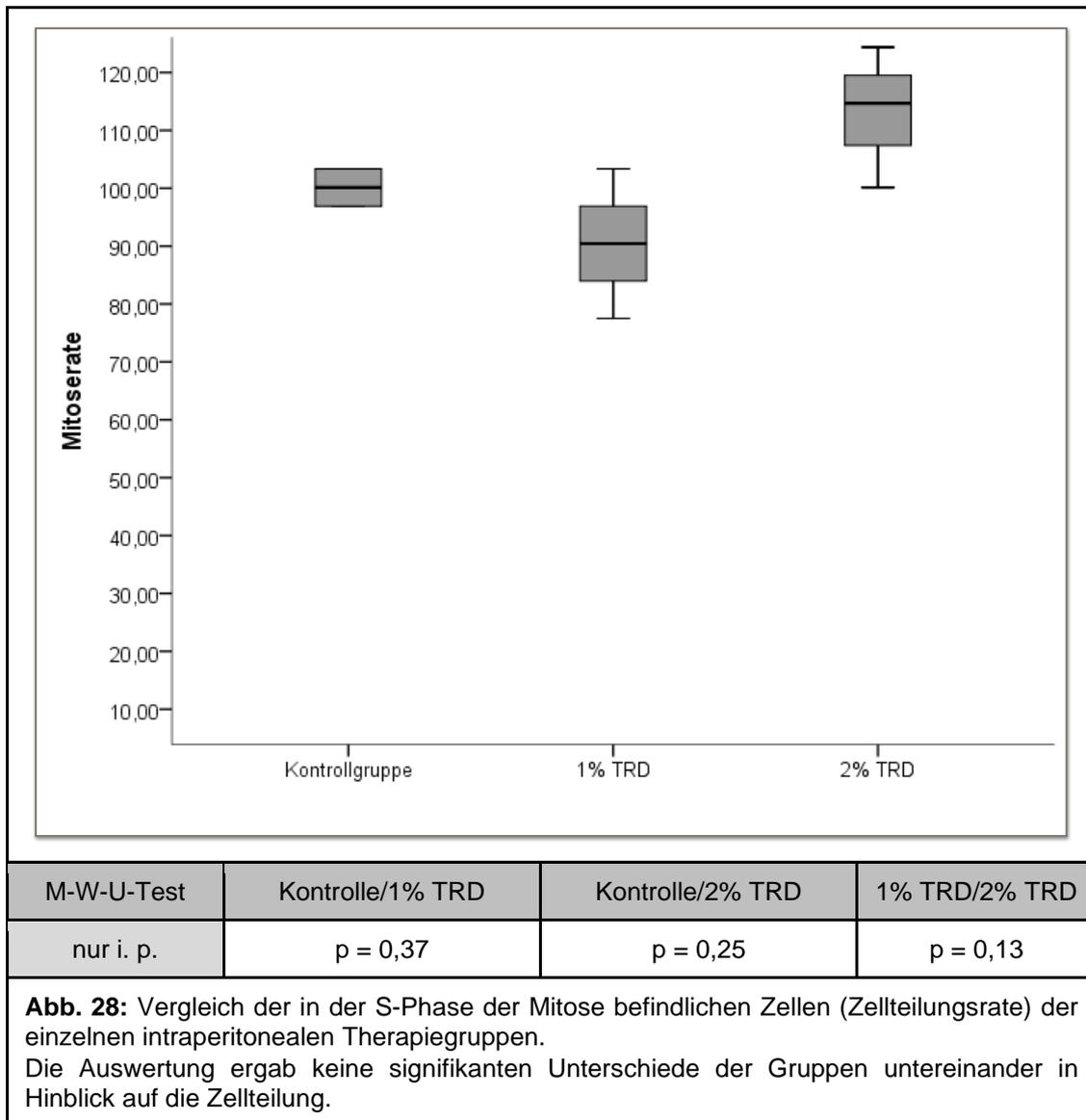


M-W-U-Test	Kontrolle/1% TRD	Kontrolle/2% TRD	1% TRD/2% TRD
nur i. v.	p = 0,56	p = 0,08	p = 0,38

Abb. 27: Vergleich der in der S-Phase der Mitose befindlichen Zellen (Zellteilungsrate) der intravenösen Therapiegruppen. Die Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede der Gruppen untereinander in Hinblick auf die Zellteilung. Ein Trend hin zu einer geringeren Zellteilung zeigte sich in der 2% TRD-Gruppe des intravenösen Therapiearms.

Auswertung der Mitoserate der intraperitonealen Gruppen

Die Auswertung der Mitoserate der intraperitonealen Therapiegruppen ergab im Median 100,1 Mitosen/mm² in der Kontrollgruppe (Interquartilsbereich: 6,5; Spannweite: 6,5), 90,5 Mitosen/mm² in der 1% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 12,6; Spannweite: 25,8) und 114,7 Mitosen/mm² in der 2% Taurolidin-Gruppe (Interquartilsbereich: 11,9; Spannweite: 24,2). Der Direktvergleich der intraperitonealen Gruppen (Kontrolle, 1% Taurolidin und 2% Taurolidin) erbrachte keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Mitoseanzahl/mm² (Abb. 28).



Beobachtete Nebenwirkungen während des Versuchszeitraums

Im gesamten Versuchszeitraum fielen, insbesondere während des Therapiezeitraums, zwei als Nebenwirkung der Therapie mit Taurolidin zu bewertende Phänomene ins Gewicht.

Zum einen zeigten einige Tiere während der intravenösen Applikation von Taurolidin gelegentlich vagotone Reaktionen, die sich in einer leichten Atemdepression oder einem „Taumeln“ der Tiere (a. e. aufgrund einer zerebralen Minderperfusion im Rahmen einer Hypotonie) bemerkbar machten und in der Regel rasch reversibel waren. Bei drei Versuchstieren stellte sich ein letaler Verlauf ein.

Zum anderen zeigte sich in den Taurolidin-Gruppen eine von der Dosierung und der Applikationsform abhängige passagere Gewichtsreduktion. Diese war in der Gruppe, die 2%iges Taurolidin intraperitoneal erhielt, am deutlichsten. Weiterhin bestanden in dieser Gruppe begleitende Diarrhöen.

Nach Beendigung der Therapieapplikation kam es zu einem Sistieren der Diarrhöen und zu einer Gewichtszunahme der Tiere, sodass zum Obduktionszeitpunkt keine signifikanten Unterschiede bestanden.

Diskussion

Ziel dieser Studie war die Beurteilung des antineoplastischen und antiangiogenetischen Einflusses Taurolidins auf das Wachstum intramuskulärer und intraperitonealer muriner Osteosarkome (K7M2). Weiterhin sollte in diesem Mausmodell der Einfluss unterschiedlicher Applikationsformen (i. v. versus i. p.) und unterschiedlicher Dosierungen (1%ig und 2%ig konzentrierte Taurolidin-Lösung) auf den Therapieerfolg dokumentiert werden.

Der intramuskuläre Tumor wurde aufgrund des destruierenden, Kompartiment-übergreifenden Wachstums des Osteosarkoms, als Lokalbefund angesehen, während der intraperitoneale Tumor einen disseminierten Befund simulieren sollte.

Initiierend für diese Studie war die bereits eingangs beschriebene unzureichende Versorgung von Osteosarkompatient*innen mit metastasiertem Befund, Rezidiv oder Therapieversagen der Standard-Polychemotherapie. Dies kommt insbesondere vor dem Kontext der sehr jungen oder gerade mitten im Leben stehenden Patient*innen zum Tragen. Die Indikation zur Erstellung ergänzender Therapiekonzepte bei ausbleibendem Erfolg der Standardtherapie ist gegeben, wie eingangs ausführlich erörtert (1, 17).

Die in vitro-Studien zur Wirksamkeit Taurolidins auf maligne Zellen mesodermalen Ursprungs scheinen die vermutete antiproliferative Wirkung Taurolidins auf Sarkome zu bestätigen. Der antiproliferative Effekt konnte für Fibrosarkomzellen (46, 48, 69, 81, 82), Rhabdomyosarkomzellen (83), Leiomyosarkomzellen (83) und Epitheloidzell-sarkomzellen (83), aber auch für unterschiedliche Osteosarkomzelllinien erfasst werden. Marley et al. (84), Walters et al. (71) und Arlt et al. (85) konnten die vermutete antiproliferative Wirkung Taurolidins an insgesamt 16 verschiedenen Osteosarkomzelllinien in vitro bestätigen. Von besonderer Bedeutung für unsere Arbeit war die bestätigte Sensitivität der Zelllinie K7M2, die in unserer Arbeit verwendet wurde. Die in vitro-Ergebnisse eben genannter Arbeitsgruppen voraussetzend, erfolgte in unserer Arbeit die unmittelbare Erfassung des Einflusses Taurolidins auf Osteosarkomzellen in vivo in einem validierten Tiermodell (32, 42, 86-89).

Zur weiteren Einordnung unserer Ergebnisse erfolgte zunächst der Vergleich mit weiteren in vivo-Studien zum Einfluss Taurolidins auf das Osteosarkom. Hierzu konnte eine, aus zwei Teilstudien bestehende Publikation von Arlt et al. herangezogen werden (85).

Arlt et al. verwendeten für ihre Studien die Zelllinie LM8 und ebenso wie in unserer Studie die Zelllinie K7M2, die bereits in den in vitro-Studien verwendet wurden und eine Sensitivität gegenüber Taurolidin in vitro aufwiesen (85). Die in vitro beobachtete suppressive Wirkung Taurolidins auf Osteosarkomzellen ließ sich in unserem Versuch zumindest teilweise bestätigen. Wir konnten eine effektive Suppression der intraperitonealen Tumorlast unter intraperitonealer Taurolidin-Therapie und eine nicht-signifikante Reduktion der intraperitonealen Tumorlast unter 2%iger intravenöser Taurolidin-Therapie nachweisen. Zusätzlich zeigte sich in unserem Modell unter 2%iger intravenöser Taurolidin-Therapie eine Tendenz hin zu einer geringeren Mitoserate des intramuskulären Primarius, die als Hinweis auf eine antiproliferative Wirkung Taurolidins auf das Osteosarkom gewertet werden kann. Die Ergebnisse von Arlt et al. stehen zumindest teilweise im Gegensatz zu unseren eigenen. Arlt et al. stellten nicht nur eine fehlende Suppression des Lokalbefundes in vivo, sondern auch eine signifikant erhöhte Metastasierungsrate unter Taurolidin im Vergleich zur Kontrollgruppe fest (85). Um die gegensätzlichen Untersuchungsergebnisse besser einordnen zu können, sollen daher im Folgenden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Modelle diskutiert werden.

Im ersten Modell der Arbeitsgruppe um Arlt wurde zunächst der Einfluss Taurolidins auf die Entstehung von Lungenmetastasen erfasst. Im Rahmen des ersten Versuchs erfolgte die Applikation von $5 \cdot 10^5$ Osteosarkomzellen der Linie K7M2 intravenös über die Schwanzvene (85). Wir verwendeten die gleiche Zelllinie und injizierten $2,5 \cdot 10^5$ Osteosarkomzellen intramuskulär sowie $2,5 \cdot 10^5$ Tumorzellen intraperitoneal, sodass insgesamt eine vergleichbare Tumorlast vorlag, die im Gegensatz zu Arlt et al. nicht primär systemisch induziert wurde. Die Tumorlokalisierung wurde somit komplett unterschiedlich gewählt. Anschließend wurde bei Arlt et al. die Taurolidin-Therapie unmittelbar nach Tumorzellapplikation beginnend, alternierend alle zwei Tage, für insgesamt zehn Tage eingeleitet. Die Applikation erfolgte in einer Einzeldosis intraperitoneal zunächst für zwei Tage in einer Konzentration von 1.000 mg/kg KG und Tag (20 mg/Maus) und anschließend, aufgrund inakzeptabler Nebenwirkungen, in einer Dosierung von 500 mg/kg KG und Tag (10 mg/Maus). Die Therapie wurde bis zur Obduktion der Tiere an Tag zehn fortgeführt (85). In unserem Versuch begannen wir ebenfalls unmittelbar nach Tumorzellimplantation mit der Therapie. Ein Teil der Tiere wurde vergleichbar mit dem Versuch von Arlt et al. ebenfalls intraperitoneal behandelt, der andere Teil abweichend davon intravenös. Weiterhin wurde die Tagesdosis in unserem Versuch auf zwei Applikationen im Abstand von 12 Stunden aufgeteilt und stellte somit für die Tiere eine deutlich eine höhere Stressbelastung im Vergleich zu dem von

Arlt et al. gewählten Applikationsmodus dar. Arlt et al. kamen unter Berücksichtigung oben beschriebener Dosisreduktion auf eine Gesamtdosis von 3.500 mg/kg KG am Ende des Versuches, während wir je nach Versuchsgruppe bei 2.800 mg/kg KG (1% TRD) oder 5.600 mg/kg KG (2% TRD) zum Ende des Therapiezeitraum lagen. Die von Arlt et al. gewählte Dosierung lag somit zwischen unserer minimalen und maximalen Gesamtdosis, sodass eine Unterdosierung oder Überdosierung mit konsekutiver Schwächung des Versuchstiers zumindest nicht stärker als in unserem Versuch ins Gewicht fallen sollte. Aufgrund der im ersten Modell von Arlt et al. beobachteten verstärkten Metastasierungsrate, die unter systemischer Tumorinduktion (i. v.-Tumorzellinjektion) auftrat, wurde in einem weiteren Tiermodell mit acht Wochen alten C3H/HeNCrI-Mäusen und der Tumorzelllinie LM8 der Einfluss Taurolidins auf das Wachstum und die Metastasierung des Osteosarkoms erneut untersucht. Die LM8-Osteosarkomzellen (insgesamt 10^7) wurden abweichend vom ersten Modell subkutan injiziert (85). Hiermit lagen im zweiten Teil des Versuchs von Arlt et al. eine höhere Ausgangstumorlast und eine andere Zelllinie vor, bei ebenfalls zu unserem Modell abweichender Tumorlokalisierung. Die Taurolidin-Therapie wurde im zweiten Versuchsteil in einer Dosierung von 750 mg/kg KG und Tag in einer Einzeldosis (85), und somit ebenfalls abweichend zu unserem Applikationsmodus, intraperitoneal durchgeführt. Die Taurolidin-Applikation erfolgte in der einen Gruppe umgehend nach Tumorzellimplantation, in der anderen Gruppe ab dem 7. Tag nach Tumorzellimplantation und wurde für beide Gruppen alle zwei Tage bis zur Obduktion durchgeführt. Die Obduktion beendete den Versuch für beide Gruppen an Tag 25 (85). Damit lag die Gesamtkonzentration zum Zeitpunkt der Obduktion bei 6.750 mg/kg KG bzw. bei 9.750 mg/kg KG und somit aufgrund des längeren Therapiezeitraums deutlich über unserer maximalen Konzentration. Die Einzeldosis pro Tag lag jedoch unter unserer maximalen Tageskonzentration (750 mg/kg bei Arlt et al. vs. 800 mg/kg KG in unseren 2% TRD-Gruppen). Aufgrund der alternierenden Applikation bei Arlt et al. (Injektionen alle 2 d) lag die Konzentration pro Woche bei 3.000 mg/kg KG und somit vergleichbar mit der wöchentlichen Taurolidin-Konzentration des ersten Versuchs von Arlt et al. und unseres niedrig dosierten Therapiearms (1% Taurolidin: 400 mg/kg KG pro Tag = 2.800 mg/kg KG pro Woche). Trotz der hohen Gesamtdosis im zweiten Teil des Versuchs von Arlt et al. ergab sich letztendlich eine niedrige wöchentliche Konzentration. Da diese in unserem Versuch gut toleriert wurde, scheint somit eine Überdosierung unwahrscheinlich. Arlt et al. stellten auch im zweiten Teilversuch keine Suppression des Primarius, sondern sogar eine höhere Tumorlast des subkutanen Tumors bei gleichzeitig beobachteter

verstärkter Metastasierungsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe fest (85). Vergleichend damit erzielten wir unter intravenöser hochdosierter Anwendung Taurolidins zumindest eine Tendenz zu einer reduzierten intraperitonealen Tumorlast und eine tendenziell reduzierte Mitoserate des intramuskulären Tumors. Dementsprechend ist die Frage berechtigt, ob die Dosierung Taurolidins in den Versuchen von Arlt et al. ausreichend hoch gewählt war. Bezüglich einer ausreichenden Dosierung Taurolidins könnte weiterhin argumentiert werden, dass dann in unserem niedrig dosierten Therapiearm (400 mg/kg KG täglich unserer 1% TRD-Gruppen vs. 750 mg/kg KG alle 2 d bei Arlt et al.) zumindest unter intraperitonealer Anwendung ebenfalls ein Progress des intramuskulären Tumors zu erwarten gewesen wäre. Signifikante Unterschiede konnten wir diesbezüglich nicht feststellen, wohl aber eine Tendenz hin zu einer höheren Tumorlast. Möglicherweise scheint an dieser Stelle die intramuskuläre und somit besser durchblutete Lokalisation, im Gegensatz zu der von Arlt et al. gewählten subkutanen Lokalisation, von Vorteil gewesen zu sein sowie die Tatsache, dass die Tumorzellen in unserem Modell in ein mesenchymales Milieu injiziert wurden, was bekanntlich dem der Zelllinie entspricht.

Diese Frage nach einer ausreichenden Dosierung Taurolidins gewinnt insbesondere vor den Ergebnissen der Studie von Holz et al. an Bedeutung, die die Vermutung nahelegt, dass Taurolidin in einer niedrigen Dosierung eine Metastasierung begünstigen könnte. Holz et al. beschrieben in ihren in vitro-Studien zur Wirksamkeit Taurolidins auf Pankreaskarzinomzellen eine vermehrte Expression von SNAIL-factor (Zinc finger protein SNAI1) unter niedriger Taurolidin-Konzentration. SNAIL-factor gilt als Regulator der epithelialen/mesenchymalen Transition und könnte somit eine Metastasierung fördern (52). Sicher können die Ergebnisse nicht direkt übertragen werden und vergleichbare Ergebnisse, die diese These unterstützen bzw. Studien zur vermehrten SNAIL-factor-Expression unter Taurolidin an Osteosarkomzellen, liegen nicht vor. Vor dem Hintergrund o. g. erhöhter Metastasierungsrate unter Taurolidin wäre eine gezielte weitere Abklärung eines möglichen Zusammenhangs unserer Ansicht nach sinnvoll.

Weiterhin stellte sich uns die Frage, ob eine erhöhte Metastasierung bzw. Tumorprogression unter Taurolidin auch in anderen Studien beschrieben wurden. Wir stellten in unserer Arbeit trotz deutlich längerem „follow up“ (28 Tage posttherapeutischer Beobachtungszeitraum im Gegensatz zur unmittelbaren Obduktion in den Versuchen von Arlt et al.) keine erhöhte pulmonale Metastasierungsrate, wie von Arlt et al. beschrieben, fest. Zumindest das erste Versuchsmodell von Art et al. simulierte die hämatogene Streuung unmittelbar durch intravenöse Injektion der Tumorzellen (85). Bei einer Ziellinie, wie der Zelllinie K7M2, die eine hohe pulmonale Metastasierungsrate aufweist, scheint

die Ausbildung pulmonaler Rundherde nach diesem Versuchsmodell logische Konsequenz zu sein und ist sicher ein Grund für die Ausbildung pulmonaler Metastasen, jedoch nicht für die höhere Metastasierungsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Letzteres trifft jedoch nicht für den zweiten Teilbereich des Versuches von Arlt et al. zu, in dem die Tumorzellen subkutan und nicht intravenös appliziert wurden. Auch in diesem Bereich stellten Arlt et al. eine erhöhte Metastasierungsrate, vergleichbar mit den Ergebnissen des ersten Teilversuchs und im Gegensatz zu unseren Ergebnissen fest (85). Somit wäre auch bei der von uns gewählten intramuskulären Tumorlokalisierung eine pulmonale Metastasierung zu erwarten gewesen. Hier ist anzumerken, dass die von uns durchgeführte makroskopische Beurteilung des Lungengewebes zum sicheren Ausschluss pulmonale Metastasen in ihrer Sensitivität der mikroskopischen Auswertung, wie bei Arlt et al., deutlich unterlegen ist. Der endgültige Vergleich mit den Ergebnissen von Arlt et al. bezüglich der pulmonalen Metastasierung fällt daher ohne mikroskopische Auswertung schwer, sollte allerdings für zukünftige Studien unbedingt berücksichtigt werden.

Der These folgend, dass Taurolidin in niedriger Dosierung eine Metastasierung fördert, wäre eine Dosiserhöhung die logische Konsequenz. Jedoch beschrieben Arlt et al. bereits unter der initial verwendeten Dosierung von 1.000 mg/kg KG alle zwei Tage schwere Nebenwirkungen, die zu einer Dosisreduktion führten. So betonten sie den Anstieg der Leberparameter und beschrieben einen fibrotischen Umbau der Leber mit Kapselverdickung. Weiterhin wird von Arlt et al. eine erhöhte Mortalität angegeben (85). In unserem Versuch zeigte sich, möglicherweise aufgrund des langen posttherapeutischen Beobachtungszeitraums („follow up“), dass der von uns beobachtete Gewichtsverlust passager war und zum Obduktionszeitpunkt keine Unterschiede mehr bestanden, sodass er von uns zunächst im Rahmen der höheren Belastungen durch die zweimal tägliche Applikation gewertet wurde. Aufgrund der von Arlt et al. geäußerten Bedenken bezüglich der Verträglichkeit (85), scheint die weitere Beurteilung der Nebenwirkungsrate und Mortalitätsrate jedoch erneut indiziert und wird aufgrund der aktuellen Relevanz weiter unten gesondert diskutiert.

Interessanterweise erfolgte die Therapieapplikation in den Versuchen von Arlt et al. unabhängig von der Tumorlokalisierung (i. v./s. c.) intraperitoneal (85). Anhand unserer eigenen Versuche, in denen die Therapie entweder intravenös oder intraperitoneal erfolgte, fiel auf, dass Taurolidin insbesondere in höherer Konzentration unter intravenöser Applikation deutlich besser vertragen wurde. Somit wäre auch vor dem

Hintergrund einer möglicherweise erforderlichen Dosiserhöhung interessant, ob die Verträglichkeit und auch die Bioverfügbarkeit bei intravenöser Applikation der intraperitonealen Anwendung überlegen ist.

Laut Herstellerinformation soll die Bioverfügbarkeit durch die intraperitoneale Applikation nicht wesentlich eingeschränkt sein (29). Eine Studie von Knight et al. beschrieb das Erreichen der maximalen Plasmakonzentration 10-15 Minuten nach intraperitonealer Injektion (90) und scheint die Grundlage für die Angaben des Herstellers zu sein (15 min nach intraperitonealer Injektion) (29). Es wäre jedoch denkbar, dass durch die intraperitoneale Injektion auch bei rascher Resorption die Boluswirkung wie nach intravenöser Injektion entfällt, sodass Auswirkungen auf die Wirksamkeit nicht sicher ausgeschlossen werden können. Unsere eigenen Ergebnisse erbrachten bezüglich des Applikationsmodus zwar keine signifikanten Unterschiede des intramuskulären Tumorstwachstums, was durchaus mit der geringen Fallzahl zu erklären ist, deuteten aber tendenziell widersprüchliche Entwicklungen an. So beobachteten wir in der Gruppe mit hochdosierter intravenöser Anwendung eine tendenziell reduzierte Mitoserate des intramuskulären Tumors. Im Gegensatz dazu steht die tendenziell erhöhte intramuskuläre Tumormasse unter intraperitonealer Taurolidin-Therapie. Dies könnte ein Hinweis auf einen Einfluss der Applikationsform auf das Therapieergebnis sein.

Weiterhin wird bisher zwar angenommen, dass die Ausscheidung Taurolidins in erster Linie über die Nieren und die Atmung erfolgt (29). Gerade aufgrund des von Arlt et al. beschriebenen Anstiegs der Leberparameter und des fibrotischen Umbaus unter Taurolidin (85), müsste die Bedeutung der Leber bezüglich der Verstoffwechslung erneut erfasst werden. Im Zuge dessen sollten dann auch die Auswirkungen einer möglichen Metabolisierung auf den maximalen Wirkspiegel nach intraperitonealer Applikation erneut untersucht werden, da die aktuellen Studien Anlass geben, den bisherigen Stand der Forschung zum Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil Taurolidins in Frage zu stellen. Zudem wäre interessant, ob der beschriebene fibrotische Umbau der Leberkapsel unter intravenöser Taurolidin-Therapie ebenfalls auftritt, was für Umbauprozesse im Rahmen einer Verstoffwechslung spräche, oder nur unter intraperitonealer Applikation auftritt, was möglicherweise als direkte Reaktion im Rahmen einer durch Taurolidin getriggerten chemischen Peritonitis zu erklären wäre. Sollte letzteres der Fall sein, könnte es eine Erklärung für die von Arlt et al. beobachteten Leberveränderungen sein.

Anhand der Studien von Arlt et al. und unserer eigenen Beobachtungen wäre somit von Interesse, ob eine Änderung der Therapieapplikation (von i. p. zu i. v.) Auswirkungen auf die Verträglichkeit und das Ergebnis hat.

Zusammenfassend ergab der Vergleich unserer Ergebnisse mit denen von Art et al. eine Reihe offener Fragen, die der Übersicht wegen im Folgenden aufgelistet sind und auf deren Klärung die folgende Diskussion abzielt:

- Welchen Einfluss hat der Zeitpunkt des Therapiebeginns und der Obduktion auf das Ergebnis?
- Welchen Einfluss hat die Therapiedauer?
- Hat die Applikationsform (i. v./i. p.) Einfluss auf das Ergebnis?
- Ist Taurolidin unter intravenöser Anwendung besser verträglich?
- Liegen weitere Studien mit einer beschriebenen Tumorprogression unter Taurolidin vor?
- Könnte es einen Zusammenhang zwischen einer zu geringen Dosierung Taurolidins und einer Progression geben?
- Welche Ursachen liegen der beobachteten erhöhten Mortalität zugrunde?
- Wie sieht die aktuelle Studienlage bezüglich des Nebenwirkungsspektrums Taurolidins aus?

Aufgrund der genannten Punkte wären weitere Studien zur Wirkung Taurolidins auf das Osteosarkom sinnvoll. Bedingt durch das Fehlen ausreichender Vergleichsstudien zur Wirkung Taurolidins auf Osteosarkome, wurden weitere Publikationen zur Wirkung Taurolidins auf unterschiedlichste Tumorentitäten herangezogen und im Folgenden zusammengefasst.

Durch Erweiterung der Literaturrecherche auf weitere Tumorentitäten konnten zusätzliche 28 Studien zu Tumorzellen unter Taurolidin-Therapie eingeschlossen werden. 50% der eingeschlossenen Studien befassten sich mit der Wirkung Taurolidins auf das Kolonkarzinom. Über 2/3 der Studien zur Wirkung Taurolidins auf das Kolonkarzinom folgten dem Prinzip der intraperitonealen Tumorzellimplantation, gefolgt von einer intraperitonealen Taurolidin-Therapie (39-41, 43, 44, 70, 86-88, 91-96), vergleichbar mit einem Teilbereich (intraperitoneal implantiertes Osteosarkom unter intraperitonealer Taurolidin-Therapie) unseres eigenen Versuchs. In dieser Konstellation wiesen wir in unserer Arbeit eine hochsignifikante Suppression der Tumorlast nach. Das deckt sich mit den Ergebnissen zuvor erwähnter Studien, die eine nahezu durchgehend suppressive

Wirkung Taurolidins auf die intraperitonealen Kolonkarzinome, zum überwiegenden Teil unter einmaliger intraperitonealer Taurolidin-Injektion, zeigten (39-41, 43, 44, 70, 86-88, 91-96).

Vergleichbar dazu sind die Studien von da Costa et al. (Melanomzellen) (97) und Nici et al. (Mesotheliomzellen) (56), die ebenfalls eine intraperitoneale Taurolidin-Therapie der intraperitoneal implantierten Tumorzellen durchführten. Da Costa et al. nannten als Indikator für einen Therapieerfolg eine verlängerte Überlebensrate unter einmaliger Taurolidin-Therapie (97), während Nici et al. eine signifikante Reduktion der intraperitonealen Tumorlast, ähnlich unserer eigenen Ergebnisse, feststellten (56).

Davon abweichend untersuchten Opitz et al. den Einfluss einer subpleuralen Taurolidin-Applikation nach Entfernung eines subpleuralen Mesothelioms und stellten eine signifikante Suppression des Rezidivs fest (98). Da die Taurolidin-Therapie in diesem Modell unmittelbar nach kompletter Entfernung des Primarius eingeleitet wurde, die Cavitas pleuralis ähnliche Bedingungen wie die Cavitas abdominalis bietet und die Applikation im Sinne einer Lavage erfolgte, wurde dieses Modell trotz extraperitonealer Lokalisation mit den intraperitonealen Studien genannt (98).

Zusammenfassend liegen die Parallelen eben genannter Studien in der intraperitonealen Tumorlokalisierung, der intraperitonealen Therapieapplikation und dem Zeitpunkt des Therapiebeginns, der in allen Studien unmittelbar nach Tumorzellimplantation erfolgte. Retrospektiv scheint die Kombination dieser drei Faktoren entscheidend für die guten Ergebnisse zu sein und deckt sich mit unseren eigenen Erfahrungen. So bildet der Intraperitonealraum einen Hohlraum, der aufgrund des Peritoneums parietale und viszerale zumindest teilweise eine antiadhäsive Barriere für Tumorzellen darstellt. Zusätzlich könnten die einleitend beschriebenen antiadhäsiven Eigenschaften Taurolidins das Anwachsen der Tumorzellen und die Ausbildung solider Formationen beeinflusst haben (44, 70). Weiter bedingt der unmittelbare Therapiebeginn mit Taurolidin eine unmittelbare Interaktion zwischen Agens und frisch implantierten Tumorzellen, die aufgrund des unmittelbaren Therapiebeginns noch keinen soliden Tumorzellverbund ausbilden konnten und somit deutlich vulnerabler gegenüber toxischen Substanzen sind. Da der Wirkmechanismus Taurolidins nicht abschließend geklärt ist und auch die Gewichtung der beschriebenen Mechanismen nicht bekannt ist, bleibt letztlich unklar, welche Rolle den einzelnen Komponenten (Hemmung der Adhäsion, direkte zytotoxische Wirkung, Induktion der Apoptose) oder deren Gesamtheit zukommt. Es ist jedoch anzunehmen, dass diese Konstellation, denen von in vitro-Bedingungen sehr nahekommt (intraperitonealer Hohlraum mit frisch injizierten Tumorzellen und unmittelbarer

Therapiebeginn), dem Einfluss der direkten zytotoxischen Wirkung Taurolidins dienlich war und auch in unserem Versuch zum Tragen gekommen ist.

Die Studien von Calabresi et al. (32) und Volz et al. (99) zum Ovarialkarzinom deuten jedoch darauf hin, dass die Wirkung Taurolidins auf intraperitoneale Tumorzellen nicht ausschließlich auf seiner zytotoxischen Wirkkomponente, sondern auch auf seiner antiadhäsiven und Apoptose induzierenden Wirkung beruht. Im Gegensatz zu unserem Versuch und zu o. g. Modellen zum Kolonkarzinom, Melanom und Mesotheliom unterschied sich der Versuchsaufbau in einem zur intraperitonealen Tumorzellimplantation verzögerten Therapiebeginn. Bei Calabresi et al. erfolgte die Taurolidin-Applikation zum einen unmittelbar und in zwei weiteren Gruppen drei Tage und fünf Tage nach Tumorimplantation (32), während bei Volz et al. sieben bzw. neun Tage zwischen Tumorzellimplantation und Therapiebeginn lagen (99). Trotz des verzögerten Therapiebeginns und bei insgesamt kurzer Therapiedauer (3 d oder 2 d) wurde in beiden Studien ein signifikanter Vorteil (signifikante Suppression bei Calabresi et al. und verlängerte Überlebensrate bei Volz et al.) unter intraperitonealer Taurolidin-Therapie festgestellt (32, 99). Als Gegenargument könnte an dieser Stelle aufgeführt werden, dass in beiden Versuchen ein sicheres Anwachsen der Tumorzellen nach intraperitonealer Zellinjektion zwar angenommen, jedoch nicht mit absoluter Sicherheit vorausgesetzt werden kann. Um dieses Gegenargument zu entkräften, sind die Ergebnisse der Studien von Wenger et al. (100) und Kilian et al. (101) von Bedeutung. In beiden Modellen erfolgte die Untersuchung der Wirksamkeit Taurolidins auf zuvor über zehn Wochen induzierte Pankreaskarzinome. Die Einleitung der Therapie mit Taurolidin folgte sechs Wochen nach Beendigung der Induktion mit N-nitrosobis-2-oxopropylamin. In beiden Studien wurde eine Reduktion der Tumorlast und der Lebermetastasen beschrieben (100, 101). Da in beiden Studien ein solider Tumor die Ausgangssituation darstellte, scheint die antiproliferative Wirkung Taurolidins über die antiadhäsive und die unmittelbar-toxische Wirkung hinaus gegeben zu sein.

Die genannten Studien zum Einfluss Taurolidins auf das Kolonkarzinom, Melanom, Mesotheliom, Ovarialkarzinom und Pankreaskarzinom verfolgten v. a. die Prävention peri- und postoperativer Absiedlungen. Die Verwendung Taurolidins als perioperative Spüllösung stand im Fokus, sodass die genannten Tumormodelle für diese Fragestellung gut gewählt waren. Bezüglich unserer Ergebnisse wäre eine perioperative Anwendung aufgrund der signifikanten Suppression der Osteosarkomzellen zur Prävention eines Lokalrezidivs ebenfalls denkbar und könnte in weiteren, auf das Osteosarkom ausgelegten Modellen verifiziert werden.

Da in unserem Modell darüber hinaus der Einfluss Taurolidins auf einen soliden extraperitonealen Tumor (intramuskulärer Lokalbefund) untersucht wurde und die einzigen Studien zur Wirkung Taurolidins auf das Osteosarkom von Arlt et al. diesbezüglich nicht nur eine fehlende Suppression, sondern auch eine Progression unter Taurolidin beschrieben (85), wurden weitere Studien mit extraperitonealer Tumorlokalisierung herangezogen. Die Literaturrecherche bezüglich extraperitonealer Tumorlokalisationen zeigte, dass in erster Linie Modelle mit subkutanem Primarius gewählt wurden. Modelle mit intramuskulärem Lokalbefund standen nicht zum Vergleich. Weiterhin stellten sich bei der Gegenüberstellung unserer Ergebnisse mit denen von Arlt et al. eine Reihe Fragen bezüglich des Einflusses von Therapiebeginn, Applikationsform, Dosierung und Anwendungsdauer auf das Therapieergebnis. Aus zuvor genannten Studien zur intraperitonealen Taurolidin-Anwendung bei intraperitonealem Primarius geht hervor, dass diese Konstellation zuverlässig zu einer Tumorsuppression führte. Im Weiteren sollen daher die Ergebnisse zu Modellen mit abweichender Tumorlokalisierung und Therapieapplikationsform diesbezüglich beurteilt werden.

In unserem Versuch erfassten wir u. a. den Einfluss intravenös injizierten Taurolidins auf den intramuskulären Primarius und konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Tumormasse im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. In der Auswertung der Mitoserate zeichnete sich in der hochdosierten Taurolidin-Gruppe (800 mg/kg KG und Tag) jedoch eine Tendenz zu einer verringerten Mitoserate ab. Wie der Vergleich mit zwei Studien von Braumann et al. zur Wirkung Taurolidins auf subkutan implantierte Kolonkarzinomzellen zeigte, konnten Braumann et al. ebenfalls in keiner der Studien eine signifikante Suppression der Tumormasse feststellen (86, 87). Vergleichbar zu unserer Studie wurde in beiden Modellen ebenfalls unmittelbar nach Tumorimplantation mit der intravenösen Taurolidin-Therapie begonnen. Im Unterschied zu unserem Modell erfolgte die Therapie jedoch als „single shot“ und nicht wie bei uns über eine Woche, sodass sich die Frage stellte, ob eine Verlängerung des Therapiezeitraums in anderen Studien zu einer signifikanten Tumorsuppression führte.

Diesbezüglich fanden wir zwei weitere Studien von Braumann et al. mit subkutaner Tumorlokalisierung und intravenöser Therapie, aber verlängertem Therapiezeitraum. Zum einen ein Melanommodell der Maus (89), bei dem der Therapiezeitraum nur wenig verlängert war (2*täglich für 2 d) und somit deutlich kürzer als in unserer Studie (2*täglich für 7 d) war. Trotz des kürzeren Therapieintervalls stellten Braumann et al. im Gegensatz zu unseren Ergebnissen eine signifikante antiproliferative Wirkung auf den subkutanen

Primarius unter intravenöser Anwendung Taurolidins fest. Diese trat interessanterweise bei niedrigerer Dosierung als der von uns verwendeten auf (0,25 ml 2% TRD bei Braumann et al. vs. 0,5 ml 2% TRD in unserem Versuch), was möglicherweise mit den unterschiedlichen Tumorentitäten zusammenhängt. In einer anderen Studie wurden die Auswirkungen einer Langzeitanwendung (3* täglich/für 7 d) Taurolidins auf subkutan implantierte Kolonkarzinomzellen unter intravenöser Therapie erfasst (43). In diesem Modell betrug das Therapieintervall wie in unserem Versuch sieben Tage und es ließ sich in der Therapiegruppe, die Taurolidin hochdosiert (3%ige Lösung) intravenös erhielt, eine signifikante Reduktion der Tumorlast feststellen. Dies steht teilweise im Gegensatz zu unseren Ergebnissen. Allerdings traten die signifikanten Unterschiede in diesem Modell nur unter hochkonzentrierter (3% TRD) Anwendung auf. Unter niedriger konzentrierter Lösung (1%, 2%), vergleichbar mit der von uns gewählten Konzentration, konnte keine tumorsuppressive Wirkung erzielt werden. Da wir jedoch eine Tendenz hin zu einer reduzierten Mitoserate sahen, könnte unter einer weiteren Steigerung der Dosis eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums zu erwarten sein.

Die Ergebnisse zur intravenösen Therapie subkutan implantierter Malignome epithelialen Ursprungs zusammenfassend ergibt sich eine antiproliferative Wirkung Taurolidins unter der Voraussetzung einer ausreichenden therapeutische Konzentration und einer ausreichenden Anwendungsdauer. Ob sich diese Schlussfolgerung gänzlich auf Malignome mesodermalen Ursprungs übertragen lässt, bleibt unklar.

Neben der Erfassung des Einflusses intravenös injizierten Taurolidins auf einen subkutanen Primarius, beurteilten wir die Wirkung Taurolidins auf intraperitoneale Tumorzellen unter intravenöser Anwendung. Signifikante Unterschiede konnten wir nicht feststellen, lediglich eine Tendenz zu einer reduzierten Tumorlast zeichnete sich ab.

In den o. g. Studien von Braumann et al. aus den Jahren 2000 und 2003 wurde ebenfalls der Einfluss einmaliger intravenöser Taurolidin-Therapie auf intraperitoneale Kolonkarzinomzellen untersucht (86, 87). Eine antiproliferative Wirkung unter einmaliger intravenöser Anwendung Taurolidins war, vergleichbar zu unseren Ergebnissen, nicht feststellbar. Hingegen ließ sich das intraperitoneale Tumorwachstum unter intravenöser hochkonzentrierter Langzeitanwendung Taurolidins in einem anderen Modell von Braumann et al. signifikant reduzieren (88). Mit einer 3%ig konzentrierten Lösung (1 ml 3% TRD) lag die Konzentration auch in dieser Arbeit über der von uns gewählten, sodass sich gerade vor dem Hintergrund der von uns beobachteten Tendenz die gleiche Schlussfolgerung, mit den gleichen Einschränkungen bezüglich der Übertragbarkeit,

ergab (88). Im Gegensatz zu zuvor genannten Studien wurde in Letztgenannter von Braumann et al. (88) die Taurolidin-Therapie 28 Tage versetzt zur Tumorimplantation begonnen, was für die Qualität der Studie spricht und für den antiproliferativen Effekt Taurolidins.

Ein wesentlicher Unterschied unserer Studie zu der eingangs genannten von Arlt et al. lag in der Simulation einer hämatogenen Metastasierung durch direkte intravenöse Tumorzellinjektion (85). Diese wurde von uns nicht simuliert, und somit scheint die Diskussion der Ergebnisse einer solchen Simulation für unsere Arbeit zunächst weniger relevant. Dennoch halten wir eine kurze Diskussion der Ergebnisse anderer Studien mit hämatogen simulierter Metastasierung zu der von Arlt et al., aufgrund der von uns kritisierten Therapieapplikation und der Vollständigkeit wegen, für relevant.

Wir hinterfragten an der Studie von Arlt et al. die intraperitoneale Taurolidin-Applikation und stellten die Frage, ob eine intravenöse Therapie bei intravenöser Streuung möglicherweise eher eine antiproliferative Wirkung gehabt hätte (85). Vergleichend ließen sich zwei Studien finden. Da Costa et al. simulierten in einem Melanommodell eine hämatogene Metastasierung durch direkte intravenöse Tumorzellinjektion und Injektion der Melanomzellen in die Milz. Die Taurolidin-Therapie erfolgte unmittelbar sowie eine, zwei und 24 Stunden nach Tumorzellimplantation durch eine intraperitoneale Injektion. Unter diesen Voraussetzungen nannten Da Costa et al. eine signifikante Reduktion pulmonaler Metastasen (97). Hingegen wählten Hokscho et al. in ihrem Kolonkarzinommodell zur hämatogenen Metastasierung eine intravenöse Taurolidin-Therapie und beschrieben darunter eine signifikante Reduktion pulmonaler Metastasen. Die Therapie wurde über eine osmotische Pumpe für sieben Tage durchgeführt, zum einen unmittelbar nach Tumorimplantation, zum anderen 14 Tage versetzt zur Tumorimplantation (95). Die signifikante Reduktion pulmonaler Metastasen zeigte sich in beiden Versionen, war aber unter unmittelbarem Therapiebeginn tendenziell größer als bei zeitlich versetztem Therapiebeginn, was die Bedeutung des Therapiebeginns für den Therapieerfolg verdeutlicht. Der Vergleich der Ergebnisse intraperitonealer versus intravenöser Anwendung Taurolidins bei intravenöser Tumorzellinjektion lässt zusammenfassend keine eindeutigen Rückschlüsse auf einen Vorteil unter intravenöser Anwendung zu. Insbesondere vor dem Hintergrund der Arbeit von Hokscho et al., die einen Therapieerfolg auch noch bei zeitlich versetztem Therapiebeginn feststellten (95), liegt die Vermutung nahe, dass bei intravenöser Tumorzellinjektion die kontinuierliche intravenöse Therapie von Vorteil ist. Dementsprechend sollte, auch weil die Ergebnisse an Kolonkarzinomen nicht direkt auf Osteosarkome übertragen werden können und die

Erfassung pulmonaler Metastasen in unserem Versuch nur makroskopisch erfolgte, nach wie vor abgeklärt werden, ob die pulmonale Tumorlast, wie im ersten Osteosarkommodell von Arlt et al. (intravenöse Tumordinjektion mit nachfolgender intraperitonealer Therapie), durch intravenöse Taurolidin-Therapie hätte beeinflusst werden können.

Die intravenöse Anwendung Taurolidins scheint unabhängig von der primären Tumorlokalisation zusammenfassend zur Therapie maligner Erkrankungen geeignet, sofern die Voraussetzungen einer ausreichenden Anwendungsdauer und Dosierung gegeben sind. Unklar bleibt, warum in unseren Versuchen trotz intravenöser Langzeitanwendung keine Suppression des intramuskulären Befundes erreicht werden konnte. Eine mögliche Erklärung könnte in der Entität des Osteosarkoms liegen. So setzte sich, abgesehen von der Studie von Arlt et al., keine der genannten Studien mit intravenöser Therapieapplikation mit Malignomen mesenchymalen Ursprungs auseinander. Weiterhin ist denkbar, dass die gewählte Dosierung für das Osteosarkom nicht ausreichend hoch gewählt war. Wir orientierten uns bei der Bestimmung der anzunehmenden therapeutischen Dosis an den zuvor genannten in vitro-Studien und an der gewählten Dosierung der Arbeit zum Melanom aus der Arbeitsgruppe um Braumann (89). Dennoch ist denkbar, dass das Osteosarkom eine geringere Sensitivität gegenüber Taurolidin aufweist als die Melanomzellen und somit die therapeutische Dosierung verfehlt wurde. Hier könnten ergänzende in vitro-Studien zum Vergleich der Sensibilität verschiedener Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs Klarheit schaffen.

Eine Tumorprogression war, abgesehen von der Studie von Arlt et al., in keiner der bisher genannten Studien beschrieben. Unter intraperitonealer Anwendung stellten wir jedoch eine Tendenz des intramuskulären Osteosarkoms hin zu einer erhöhten Tumormasse fest. Dies könnte auf Parallelen zu den Ergebnissen von Arlt et al., die unter intraperitonealer Therapie eine signifikante Progression des subkutanen Osteosarkoms feststellten (85), hindeuten. Zur weiteren Abklärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Applikationsform und Progress wurden im Folgenden Studien mit subkutanem Primarius und intraperitonealer Taurolidin-Injektion beurteilt.

Braumann et al. beschrieben hierzu den Einfluss einer Kurzzeitanwendung intraperitoneal applizierten Taurolidins (einmalig und unmittelbar) auf subkutane Kolonkarzinome und konnten keine signifikante Wachstumshemmung, aber auch keinen Progress feststellen (86, 87). Ein wesentlicher Unterschied zu unserem Modell lag in der kurzen Therapiedauer (Einmalgabe). Zu anderen Tumorentitäten ließen sich intraperitoneale Langzeitanwendungen Taurolidins bei extraperitonealer Lokalisation des

Primarius finden, die der von uns gewählten Therapiedauer näher kamen. Braumann et al. untersuchen den Einfluss Taurolidins unter intraperitonealer Injektion auf subkutan implantierte Melanomzellen (89). Die Therapiedauer betrug, wie in unserem Versuch, eine Woche. Eine antiproliferative Wirkung konnte in diesem Modell, vergleichbar mit unserem Versuch, nicht festgestellt werden. Hinweise auf einen Progress gab es ebenfalls nicht. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen stellten Darnowski et al. unter intraperitonealer Langzeitanwendung (die Therapie verlief über drei Zyklen, wobei ein Zyklus eine Woche dauerte und aus drei Injektionen/Woche bestand) ein signifikant reduziertes Tumorwachstum der zuvor etablierten subkutanen Prostatakarzinome fest (54). Ähnlich stellen sich die Ergebnisse von Sun et al. dar und stehen somit ebenfalls im Widerspruch zu unseren. (68). Sun et al. erfassten den Einfluss Taurolidins in einem Melanommodell und beschrieben sowohl unter unmittelbar nach Tumorzellimplantation eingeleiteter Therapie, als auch bei zeitlich verzögertem Therapiebeginn (eine Woche nach Tumorzellimplantation) eine signifikante Tumorsuppression. Der beobachtete antiproliferative Effekt war jedoch unter unmittelbarem Therapiebeginn größer als unter verzögertem Therapiebeginn. Die Ergebnisse von Sun et al. verdeutlichen somit ebenfalls die Bedeutung des Therapiebeginns für den Therapieerfolg (68). Weiterhin liegt eine Studie zum subkutan implantierten Fibrosarkom vor, in der Harati et al. Taurolidin allerdings in Kombination mit TRAIL verwendeten (102). Unter dieser Kombination war eine signifikante Hemmung des Fibrosarkoms festzustellen. Ob die alleinige Anwendung Taurolidins ebenfalls zu einer Wachstumsinhibition geführt hätte, geht aus der Arbeit nicht hervor. Hervorzuheben ist jedoch, dass Harati et al. (102), vergleichbar mit Arlt et al. (85), eine erhöhte Mortalität beschrieben, was die Relevanz der Abklärung der Mortalitätsrate verdeutlicht.

Zusammenfassend lässt sich auch für die Konstellation aus subkutanem Primarius und intraperitonealer Taurolidin-Therapie das Prinzip der erfolgreichen Tumorsuppression unter ausreichend langer Anwendungsdauer und ausreichender Dosierung anwenden. Letztlich bleibt somit unklar, warum wir keine Suppression unseres intramuskulären Primarius feststellen konnten. Ein Progress, wie bei Arlt et al., wurde bisher aber auch nicht beschrieben.

Neben der von Arlt et al. genannten Studien, ergab die Literaturrecherche eine weitere Studie, in der ebenfalls eine Tumorprogression unter Taurolidin auftrat. Abramjuk et al. untersuchten den Einfluss einer intravesikalen Taurolidin-Therapie auf einen intravesikalen Tumor der Harnblase. Die Therapie wurde zwei Tage nach Tumorzellimplantation begonnen und für fünf Wochen fortgesetzt. Eine Gruppe wurde

1*/Woche, die andere Gruppe 3*/Woche behandelt (55). Vergleichsstudien zur intravesikalen Anwendung Taurolidins liegen nicht vor. In der Gesamtheit aller in vivo-Studien machen die Genannten, in denen ein Progress festgestellt wurde, nur einen geringen Anteil aus, fallen aber aufgrund der negativen Auswirkungen eines ungewollt getriggerten Progresses besonders ins Gewicht und bedürfen unserer Ansicht nach einer weiteren Abklärung.

Die Ergebnisse aller in vivo-Studien zusammenfassend, scheint ein Zusammenhang zwischen Tumorlokalisierung, Therapieapplikationsform, Anwendungsdauer und Dosierung in Bezug auf die Wirksamkeit Taurolidins zu bestehen. Somit wäre zu überprüfen, ob eine Anpassung der Applikationsform, des Therapiemodus, der Anwendungsdauer und der Konzentration in den Studien mit ausbleibendem Therapieerfolg das Outcome verändert hätte.

In unserem Versuch erfolgte die Taurolidin-Injektion sowohl intravenös als auch intraperitoneal. Dennoch stellten wir in Hinblick auf den subkutanen Tumor keine signifikante Inhibition, sondern im Gegenteil z. T. (unter intraperitonealer Applikation) eine Tendenz zu einer erhöhten Tumormasse fest. Da wir in unserem Versuch beide Applikationsformen verwendeten, bleibt die Überlegung, ob eine verlängerte Therapiedauer oder eine höhere Dosierung zu einer Tumorsuppression geführt hätten. Weiterhin ist denkbar, dass unser Ergebnis aufgrund des langen posttherapeutischen Beobachtungszeitraums möglicherweise verzerrt wurde. Auch dies wäre ein Ansatzpunkt für eine Optimierung des von uns gewählten Modells.

Gegen eine weitere Erhöhung der Dosierung sprach in unserem Modell jedoch die bereits unter 2%iger Taurolidin-Lösung beobachteten Nebenwirkungen, die auch im Falle der ersten Studie von Arlt et al. zu einer Dosisreduktion geführt haben (85), sodass die Rolle des Nebenwirkungsspektrum weiter berücksichtigt werden muss. Aufgrund der aktuellen Relevanz erfolgt die Diskussion der Mortalitätsrate und der beobachteten Nebenwirkungen gesondert an dieser Stelle, wir bereits zuvor angekündigt.

Zunächst die erhöhte Mortalitätsrate betreffend, die von Arlt et al. mit 40% angegeben wurde (85): Die Gesamtmortalität in unserem Versuch lag bei unverändert fortgesetzter Dosierung mit 18% zwar unter der von Arlt et al., machte aber dennoch 1/4 aller Versuchstiere aus. Berücksichtigt werden muss, dass aufgrund der geringen Tieranzahl der Ausfall eines Versuchstiers mit 10 % ins Gewicht fiel. Weiter erschien relevant, ob die Applikationsform, neben der Dosierung, Einfluss auf die Mortalität hat, sodass die

Mortalitätsraten der einzelnen Therapiegruppen im Weiteren dargestellt wurden. Dabei zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung der Mortalitätsraten und Ursachen. In der Gruppe, die Taurolidin intraperitoneal in 2%iger Konzentration erhielt, war die Mortalität am höchsten und lag mit 60% der Tiere über der von Arlt et al. angegebenen. Zum überwiegenden Teil war ein deutlich reduzierter Allgemeinzustand ausschlaggebend für das vorzeitige Ausscheiden. Lediglich ein Versuchstier verstarb an einer akzidentiellen arteriellen Blutung. Keine Verluste gab es hingegen in der intraperitonealen Kontrollgruppe und der 1%igen Taurolidin-Gruppe unter intraperitonealer Anwendung. Diese Fallzahlen verdeutlichen die Bedeutung der Konzentration für die Mortalität, die in unseren Versuchen unter 2%iger Taurolidin-Lösung, vergleichbar mit den Ergebnissen von Arlt et al., signifikant erhöht war.

Interessant war zudem der Vergleich mit der Mortalitätsrate der intravenösen Gruppen, insbesondere vor dem Hintergrund einer angenommenen besseren Verträglichkeit unter intravenöser Anwendung. Die Mortalitätsverteilung der intravenösen Gruppen sah wie folgt aus: 10% (ein Tier) in der Gruppe mit 1%iger Taurolidin-Infusion und 20% (zwei Tiere) in der Gruppe, die 2%iges Taurolidin erhielt, und somit deutlich niedriger als in der Gruppe, die Taurolidin (2%) intraperitoneal erhielt. Ein ebenfalls entscheidender Unterschied lag in der Ursache des vorzeitigen Ausscheidens. Alle drei Versuchstiere verstarben während der i. v.-Infusion. Als Ursache für den periinterventionellen Exitus kommen eine vagotone Reaktion mit Atemsuppression (wie weiter unten beschrieben) oder eine Thromboembolie, aufgrund des bekannt erhöhten Risikos thromboembolischer Ereignisse nach Katheterimplantation und eines z. T. beobachteten erhöhten Injektionswiderstands, in Betracht (103). Die Therapie wurde somit nicht aufgrund eines reduzierten Allgemeinzustandes vorzeitig beendet, wie in der 2%igen intraperitonealen Therapiegruppe.

Weiterhin muss der Vollständigkeit wegen die Mortalitätsrate der intravenösen Kontrollgruppe (NaCl) diskutiert werden, die mit 40% über der der intravenösen Taurolidin-Gruppen lag. In dieser Gruppe verstarb jedoch im Vergleich zu den intravenösen Taurolidin-Gruppen nur ein Tier periinterventionell (a. e. aufgrund eines thromboembolischen Ereignisses, da eine vagotone Reaktion unter NaCl unwahrscheinlich erscheint). Die übrigen drei Tiere zeigten im Verlauf einen deutlich reduzierten Allgemeinzustand, der zum vorzeitigen Beenden des Versuchs führte. Eine mögliche naheliegende Ursache für diese Beobachtung in der Kontrollgruppe könnte eine Katheter-assoziierte Sepsis sein. Im Gegenzug scheint Taurolidin über seine antibakterielle Wirkkomponente die Ausbildung einer Sepsis in den anderen intravenösen

Gruppen (1% und 2%), in denen wir keine relevante Verschlechterung des Allgemeinzustandes feststellten, verhindert zu haben. Belegend dafür sind die Ergebnisse zur Anwendung Taurolidins als Katheter-Lock-Solution zur Prävention Katheter-assoziiertes Infektionen (104).

Je nach Applikationsform waren die Ursachen für das vorzeitige Ausscheiden unterschiedlich, was einen Zusammenhang zwischen Applikationsform und Nebenwirkung nahelegt. Interessant war weiterhin, dass die Mortalität unter intravenöser Taurolidin-Therapie geringer war, was uns in der Annahme bestärkt, dass die Verträglichkeit unter intravenöser Verabreichung besser ist. An dieser Stelle scheint relevant, wie von Arlt et al. hervorgehoben (85), dass die LD50 für 2%iges Taurolidin mit >4g/kg KG unter intravenöser Anwendung angegeben wird, Angaben zur LD50 unter intraperitonealer Anwendung in der Herstellerinformation jedoch fehlen (105).

Weiterhin erfolgt an dieser Stelle, wie bereits angekündigt, die gesonderte Diskussion des Nebenwirkungsspektrums Taurolidins. Bezüglich der von uns genutzten intravenösen Anwendung Taurolidins scheint relevant, dass es unter rascher intravenöser Injektion zu einer vagotonen Reaktion mit konsultierender Atemdepression kommen kann (43). Daher wird empfohlen, auf eine langsame intravenöse Applikation zu achten. Diese beschriebene Nebenwirkung scheint auch in unseren Versuchen unter intravenöser Anwendung, trotz umsichtiger Handhabung, teilweise zum Tragen gekommen zu sein. Ansonsten scheint die intravenöse Anwendung, laut Herstellerinformation, zu einer vorübergehenden Reizung peripherer Venen zu führen (29). Diese Nebenwirkung fiel aufgrund der von uns verwendeten zentralen Katheter nicht weiter ins Gewicht. Wichtig ist aber, dass eine höhergradige Schädigung zentraler Venen auch nach längerer intravenöser Anwendung nicht aufzutreten scheint (88).

Bezüglich des von uns beobachteten passageren Gewichtsverlust, konnten wir eine Arbeit finden, die eine vorübergehende Wachstumsinhibition unter intravenöser Taurolidin-Anwendung schilderte (43). Da die reversible Wachstumsinhibition in unserem Versuch unter intraperitonealer Applikation deutlich ausgeprägter war, wäre eine Vergleichsstudie mit ebenfalls intraperitonealer Anwendung diesbezüglich von Interesse, stand jedoch nicht zur Verfügung. An dieser Stelle sehen wir Nachholbedarf.

Vor dem Hintergrund der bereits zuvor erwähnten und von Arlt et al. beschriebenen Hepatotoxizität, scheint die genauere Beurteilung einer solchen von Bedeutung. Arlt et al. sahen unter intraperitonealer Anwendung Taurolidins makroskopisch eine Leberdeformierung, die sich histologisch in einer Verdickung der Leberkapsel und einer Leberläppchenatrophie widerspiegelte (85). Weiterhin wurde ein Anstieg der

Leberenzyme AST (Aspartat-Aminotransferase = ASAT = GOT), ALT (Alanin-Aminotransferase = ALAT = GPT) und GLDH (Glutamatdehydrogenase) erfasst (85). Einen weiteren Hinweis auf eine hepatotoxische Komponente Taurolidins lieferten die Studien von Fahrner et al., die in vitro eine verminderte Adhäsion und einen vermehrten Untergang der Leberzellen, bei gleichzeitigem Anstieg der Leberenzyme und IL-6 im Überstand benannten und in vivo unter hochdosierter intraperitonealer Anwendung Taurolidins ebenfalls einen Anstieg der Leberenzyme GLDH und ASAT feststellten (106). Gegensätzlich dazu stehen die Ergebnisse von Braumann et al., die in vivo unter intravenöser Anwendung keine Beeinträchtigung der Nierenfunktion feststellten (88). Ein möglicherweise entscheidender Unterschied zwischen der Studie von Braumann et al. und den zuvor genannten liegt in der verwendeten Applikationsform (intravenös), sodass unsere zuvor gestellte These einer besseren Verträglichkeit unter intravenöser Anwendung an Bedeutung zu gewinnen scheint.

Ein Teil der Studien zur Nebenwirkungsrate Taurolidins befasste sich mit einer möglichen Knochenmarkssuppression und schloss diese sowohl in vitro als auch in vivo aus (53, 71, 107). Dies scheint vor dem Hintergrund einer Kombinationstherapie Taurolidins mit anderen Chemotherapeutika interessant. Für unsere Studie waren weiter die Ergebnisse der Arbeit von Marley et al. von Bedeutung (108). Marley et al. untersuchten zum einen die Nebenwirkungsrate Taurolidins an gesunden Hunden und stellten keine systematische Toxizität fest. Zum anderen wurde die Kombination Taurolidins mit Carboplatin oder Doxorubicin an Hunden mit Osteosarkomen untersucht. Wichtig für weitere Untersuchungen zur Wirksamkeit Taurolidins auf Osteosarkome war, dass Marley et al. keine Verstärkung der bekannten Nebenwirkungen genannter gängiger Chemotherapeutika durch Taurolidin feststellen konnten. Weiter schlussfolgerten Marley et al., dass eine Kombinationstherapie Carboplatins mit Taurolidin sinnvoll sei und für weitere Untersuchungen empfohlen werde (84, 108). Die aktuelle Studie von Marley et al. bestätigt zunächst unsere Annahme, dass Taurolidin in der Kombinationstherapie des Osteosarkoms von Nutzen sein könnte.

Weiterhin sprechen die ersten klinischen Studien zur Anwendung Taurolidins vorerst für eine anzunehmende ausreichende Arzneimittelsicherheit. Diesbezüglich ist die Erfassung von Nebenwirkungen an gesunden Proband*innen zu nennen. Gong et al. untersuchten die pharmakokinetischen Eigenschaften und möglichen Nebenwirkungen Taurolidins während einer Infusion von 5 g Taurolidin bei 18 gesunden Proband*innen. Abgesehen von Irritationen im Bereich der Einstichstelle, die bei allen 18 Proband*innen beobachtet wurden, wurden keine weiteren schwerwiegenderen Komplikationen

beschrieben (109). Weiterhin fand Taurolidin in der Behandlung eines re-rezidierten und metastasierten Magenkarzinoms Anwendung. Die Therapie wurde für 39 Zyklen (7 d/Mo. und 300 mg/kg KG) aufrechterhalten, ohne dass nennenswerte Nebenwirkungen auftraten. Dokumentiert ist eine ungestörte Leukopoese und Thrombopoese (110). Darüber hinaus beschrieben Stendel et al. im Rahmen der Taurolidin-Therapie zweier Patient*innen mit progressivem Glioblastom unter konventioneller Therapie neben einer partiellen Remission eine verbesserte Lebensqualität unter Taurolidin (111).

Zusammenfassend scheint die Anwendung beim Menschen zu keinen schwerwiegenden Nebenwirkungen zu führen, wobei berücksichtigt werden muss, dass nur einzelne kleinere Fallstudien vorliegen.

Da die Nebenwirkungen Taurolidins, hier insbesondere die von einigen Autoren beschriebene Hepatotoxizität, in erster Linie mit hohen therapeutischen Konzentrationen korrelierten, musste der Blickwinkel bezüglich eingangs formulierter These erweitert werden. Initial stellten wir die These auf, dass Taurolidin aufgrund seines günstigen Nebenwirkungsprofils und seiner vielfältig antiproliferativen Wirkung als Kombinationspartner vielversprechend sei. Hintergedanke war, dass durch eine Kombination mit Taurolidin die Dosierung der gängigen Chemotherapeutika reduziert und somit deren Nebenwirkungsrate günstig beeinflusst werden könnte.

Angesichts der aktuellen Studien bezüglich einer angenommenen hepatotoxischen Wirkung Taurolidins stellt sich somit die Frage, ob eine Kombination Taurolidins mit anderen Chemotherapeutika möglicherweise für das Nebenwirkungsprofil aller Substanzen von Vorteil sein könnte, oder ob die Kombination zu einer Verstärkung bekannter Nebenwirkungen führt.

Wie bereits erwähnt, schlussfolgerten Marley et al. aus ihrem Versuch, dass eine Kombination Taurolidins mit Cisplatin zu empfehlen sei (108). Bezüglich des Osteosarkoms sahen Marley et al. weiter eine Amplifikation der Wirkung der Chemotherapeutika Doxorubicin und Carboplatin auf verschiedene Osteosarkomzelllinien (D17, Clone 4, COS, HMPOS, SAOS-2) durch Taurolidin (84). Weitere Studien scheinen ebenfalls darauf hinzudeuten, dass Taurolidin durchaus für eine Kombinationstherapie geeignet ist. So wiesen Stendel et al. an Gliomzellen (LN-18 und LN-229) eine Verstärkung des proapoptotischen Einflusses des Fas-Liganden durch eine kombinierte Anwendung mit Taurolidin nach (60). Chromik et al. (Kolonkarzinomzellen HCT 15), Daigeler et al. (Plattenepithelzellen KYSE 270, Fibrosarkomzellen HT 1080) und Karlisch et al. (Rhabdomyosarkomzellen A204,

Leiomyosarkomzellen SK-LMS-1) untersuchten die Wirkung Taurolidins in Kombination mit TRAIL (TNF related apoptosis inducing factor) und stellten durchweg in der Kombination beider Substanzen ein Amplifikation der antiproliferativen Wirkung im Vergleich zur Verwendung als Einzelsubstanz fest (45, 50, 69, 83). Für die Therapie des Osteosarkoms sind neben den o. g. Schlussfolgerungen von Marley et al. die im Folgenden genannten Erkenntnisse zu den ebenfalls in der Osteosarkomtherapie verwendeten Chemotherapeutika Cisplatin und Doxorubicin relevant. Opitz et al. stellten fest, dass Taurolidin nicht nur die Apoptose in Mesotheliumzellen induziert, sondern diese auch für Cisplatin sensibilisiert (57). Des Weiteren zeigten Harati et al. eine Wirkverstärkung in der Kombination der Chemotherapeutika Doxorubicin, Trabectedin, TRAIL und Taurolidin auf Fibrosarkomzellen (HT1080) (82).

Zusammenfassend scheint Taurolidin weiter als Adjuvanz/Kombinationspartner zu anderen Chemotherapeutika in der Tumorthherapie im Allgemeinen und in der Osteosarkomtherapie im Speziellen vielversprechend zu sein, eine vorherige Abklärung der beobachteten hepatotoxischen unerwünschten Arzneimittelwirkung Taurolidins vorausgesetzt.

Neben einer weiteren Abklärung möglicher Nebenwirkungen Taurolidins, ist der genaue Wirkmechanismus ebenfalls nicht vollständig entschlüsselt. Eines der Ziele unserer Arbeit war die Überprüfung einer von einigen Autoren postulierten antiangiogenetischen Wirkkomponente Taurolidins. Wie bereits eingangs erwähnt, beschrieben sowohl Braumann et al. als auch Rodak et al. eine Hemmung der VEGF-Synthese unter Taurolidin. Braumann et al. wiesen dabei in vitro an Kolonkarzinomzellen eine Reduktion der Proteine VEGF und TNF- α im Überstand nach (43), während Rodak et al. an Gliomzelllinien mittels rPCR und „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) eine Inhibition der VEGF-Synthese auf Protein- und mRNA-Ebene nachwies (63). Auf die Bedeutung des VEGFs und der Angiogenese für das Osteosarkom hatten wir ebenfalls einleitend hingewiesen. Ziel unserer Arbeit war die Erfassung eines möglichen antiangiogenetischen Einflusses Taurolidins in vivo im Osteosarkom. Hierzu erfolgte die Auswertung der Mikrogefäßdichte nach CD-31-Färbung. In unserer Arbeit konnten wir jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Vaskularisierung in den einzelnen Therapiegruppen feststellen.

Als mögliche Ursachen dieses Ergebnisses kommen in Frage,

- dass die von Braumann et al. und Rodak et al. beschriebene VEGF-Inhibition nicht auf Osteosarkomzellen übertragbar ist,

- dass die alleinige VEGF-Inhibition aufgrund der Komplexität der Angiogenese nicht ausreichend ist, um in einer reduzierten Gefäßdichte zu resultieren,
- dass das von uns gewählte Tumormodell für die Erfassung einer Beeinflussung der Mikrogefäßdichte nicht optimal gewählt ist.

Dementsprechend erscheint der Vergleich mit anderen Studien zur antiangiogenetischen Therapie sinnvoll.

Bezüglich des erstgenannten Punktes stehen aktuell keine Studien zur Verfügung, die eine VEGF-Inhibition in Osteosarkomzellen *in vitro* unter Taurolidin-Therapie nachweisen. Dementsprechend kann die Diskussion der These einer VEGF-Inhibition unter Taurolidin in Osteosarkomzellen nicht erfolgen. Weitere Studien hierzu sind erforderlich und abzuwarten.

Den zweiten Punkt betreffend konnten einige Arbeitsgruppen zeigen, dass unter Verwendung antiangiogenetischer Substanzen im Osteosarkom die VEGF-Synthese, die Mikrogefäßdichte und die Tumormasse gleichermaßen reduziert werden konnten. So untersuchten bspw. Wang et al. den Einfluss von „Ad-VEGF-siRNA“ auf das Wachstum von Osteosarkomen *in vivo* (Mausmodell, MG63) und stellten eine signifikante Reduktion der VEGF-Expression, der Mikrogefäßdichte und der Tumormasse fest (112). Weiter gelang Tanaka et al. unter Verwendung von Pazopanib, einem VEGF-Rezeptor-Inhibitor, der Nachweis einer geringeren Größe und Anzahl pulmonaler Metastasen in einem Osteosarkommodell (113). Dutour et al. wiesen ein signifikant langsames Wachstum und eine spätere Metastasierung unter Verwendung des Angiogenese-Inhibitors Endostatin cDNA in einem orthotopen Osteosarkommodell der Ratte nach (114). Die genannten Forschungsgruppen kamen zu dem Schluss, dass eine Therapie, die VEGF bzw. die Angiogenese inhibiert, eine mögliche und vielversprechende Therapieoption in der Behandlung des Osteosarkoms darstellt und scheinen zu belegen, dass eine gezielte VEGF-Inhibition in einer Wachstumsinhibition resultiert.

Weiterhin sahen Rossi et al. zunächst in einer klinischen retrospektiven Untersuchung eine Verminderung der VEGF-Synthese im Osteosarkom als Therapieansatz. Zu dieser Schlussfolgerung kamen Rossi et al. durch die beobachtete verminderte VEGF-Synthese unter HD-MTX (Hochdosis-Methotrexat) enthaltender Multichemotherapie und sahen darin einen Ansatzpunkt für eine antiangiogenetische Therapie des Osteosarkoms. Im Weiteren konnten Rossi et al. jedoch keine Auswirkung der verminderten VEGF-Synthese auf die CD31-Mikrogefäßdichte der Osteosarkome feststellen (115). Aufgrund ihrer Ergebnisse sprechen sich Rossi et al. gegen einen Zusammenhang zwischen einer verminderten VEGF-Synthese und einer verminderten Mikrogefäßdichte aus. Eine

Erklärung für den ausbleibenden Effekt sahen sie in einer endogenen Induktion anderer proangiogenetischer Mediatoren, wie bspw. FGF-1 (Fibroblast Growth Factor-1), IL-8 (Interleukin-8), EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor) und TGF (Transforming Growth Factor) (115). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Zhao et al., die einen bestehenden Zusammenhang zwischen der VEGF-Expression und der Vaskularisierung des Osteosarkoms sahen. Zhao et al. erfassten ebenfalls in einer retrospektiven Analyse, dass eine verstärkte VEGF-Expression mit einer erhöhten Mikrogefäßdichte einherging, während eine verminderte VEGF-Expression zu einer niedrigeren Gefäßdichte führte (116). Die Ergebnisse verdeutlichen die Schwierigkeiten einer gezielten effektiven Inhibition der Angiogenese, zeigen aber auch das Potential einer solchen.

Die Analyse der zuvor genannten in vivo-Studien führte zu der kritischen Beurteilung des von uns gewählten Tumormodells und zu letztgenanntem Punkt. Unser Modell unterschied sich grundlegend im Abstand zwischen Therapieende und Obduktion zu den Modellen anderer Forschungsgruppen zur Antiangiogenese, die eine Obduktion unmittelbar nach Beendigung der Therapie vornahm. Der lange Abstand zwischen Therapieende und Obduktion könnte somit zu einem Verschleiern einer möglichen Wirkung Taurolidins auf die Mikrogefäßdichte geführt haben. Zusätzlich begannen wir unmittelbar nach Implantation der Tumorzellen mit der Chemotherapie. Dies hatte zur Folge, dass Taurolidin auf ein sehr frühes Tumorstadium wirkte, in dem die Ausbildung der Mikrogefäße von untergeordneter Rolle gewesen sein könnte. Zu guter Letzt zeigen die Studien zu Bevacizumab (einem monoklonalen VEGF-Antikörper), dass dieser nur in der Kombination mit anderen Chemotherapeutika zugelassen ist und eingesetzt wird (117). In der Kombinationstherapie wird Bevacizumab bei anderen Tumorentitäten sowohl in der Kombination mit Cisplatin eingesetzt (Phase-1-Studie), als auch in Kombination mit Doxorubicin (Mausmodell) erprobt (118, 119). Somit könnte eine Kombinationstherapie, beispielweise aus Taurolidin und Cisplatin in einem Osteosarkommodell, aufgrund der additiven Effekte durch eine antiangiogenetische Wirkung Taurolidins und dadurch verstärkte antiproliferative Wirkung Cisplatins, wie in gängigen Antiangiogenesemodellen, von Vorteil sein.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass wir trotz des von einigen Forschungsgruppen beschriebenen Zusammenhangs zwischen einer verminderten/reduzierten VEGF-Expression, einer verminderten Mikrogefäßdichte und einer reduzierten Tumorlast in unserer Studie keine Verminderung der Mikrogefäßdichte unter Taurolidin feststellen konnten. Welcher der initial genannten Punkte ursächlich für dieses Ergebnis ist, lässt

sich nicht eindeutig beantworten. Eine gezielte Abklärung unter optimierten Bedingungen scheint weiterhin angebracht und somit sollte die Wirksamkeit Taurolidins auf die VEGF-Synthese in Osteosarkomzellen (in vitro) und die erneute Erfassung der Mikrogefäßdichte im Osteosarkom (in vivo) in einem für die Angiogeneseinhibition optimierten Modell und in Kombinationstherapie beinhalten.

Zusammenfassung

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass wir einen Zusammenhang zwischen Therapiebeginn, Applikationsform, Tumorlokalisierung, Therapiedauer und Therapieerfolg sahen. Als zuverlässigstes Therapiemodell stellte sich die Kombination aus unmittelbarem Therapiebeginn bei intraperitonealer Tumorlokalisierung und intraperitonealer Therapieapplikationsform in ausreichender Dosierung heraus.

Weiterhin sehen wir in unserer Arbeit Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Nebenwirkungsprofil, Mortalität und Applikationsform. Die intraperitoneale hochkonzentrierte Anwendung führte zur höchsten Mortalitätsrate. Unklar bleibt die Ursache der beobachteten erhöhten Mortalität, insbesondere ob diese auf eine Leberschädigung zurückzuführen ist. Ebenfalls offen ist, ob die von einigen Autoren beschriebene Hepatotoxizität v. a. unter intraperitonealer Langzeitanwendung auftritt oder unabhängig von der Applikationsmethodik. Zumindest scheint in unserem Versuch die Verträglichkeit unter intravenöser Anwendung besser zu sein. Dementsprechend scheint die gezielte Abklärung einer Hepatotoxizität Taurolidins in zwei Gruppen (i. v. vs. i. p.) sinnvoll.

Die aktuelle Diskussion zum Nebenwirkungsprofil Taurolidins verdeutlicht, dass sowohl die Studien zur Klärung des Wirkmechanismus als auch des Nebenwirkungsspektrums nicht umfassend genug sind und einer weiteren umfassenden Forschung bedürfen. Besonderes Augenmerk sollte dabei auch auf die weitere Abklärung der von zwei Forschungsgruppen (Arlt et al. und Abramjuk et al.) beschriebenen Tumorprogression unter Taurolidin gelegt werden.

Bezüglich unserer Arbeit sehen wir insbesondere zur Erfassung des Einflusses Taurolidins auf die Angiogenese Optimierungsmöglichkeiten. So könnte die Qualität und Aussagekraft durch einen zur Tumorzellimplantation verzögerten Therapiebeginn verbessert werden. Im Gegenzug scheint ein unmittelbar nach Therapieende gewählter Obduktionszeitpunkt zur Erfassung eines Einflusses Taurolidins auf die Mikrogefäßdichte sinnvoll.

Zuletzt wäre die Erfassung des Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrums Taurolidins in der Kombinationstherapie mit traditionellen Chemotherapeutika im Osteosarkommodell

sinnvoll, um den angenommenen Nutzen überprüfen und die Arzneimittelsicherheit auch in der Kombinationstherapie gewährleisten zu können.

Abschließend sehen wir trotz der noch offenen Fragen bezüglich des Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrums Taurolidins weiter Potenzial in der Anwendung in der experimentellen Tumorthherapie.

Anhang

Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung eines infizierten Tieres (Score Sheet „Humane Endpoints“)

Tiernummer: Versuchsbeginn: Ausgangsgewicht:		Datum/ Uhrzeit							
Tag seit Versuchsbeginn:									
Symptome	Kat.								
<u>Keine Symptome</u>	A								
<u>Beobachtung in Ruhe im Käfig</u>									
Tier isoliert sich	A								
Struppiges Fell	A								
Atmung*	A/B								
Krämpfe, Torkeln	B								
Schmerzen (gekrümmte Haltung oder Leib aufgezogen Laufen auf Zehenspitzen)	B								
Blässe (Augen, Ohren)	B								
Krustige Belege am Augenrand	B								
Atemnot (schwerfällig, stark pumpend)	C								
<u>Beim Umsetzen</u>									
Tier vermeidet Bewegung	A								
Reaktionsminderung auf äußere Reize	A								
Schmerzen beim Anfassen	A/B								
Leib hart oder gespannt	A/B								
Hautfalten bleiben stehen	B								
Leib hart und aufgetrieben	C								
<u>Körpermasse/-temperatur Bestimmung</u>	[g/ [°C]								
Ungewöhnliche Zunahme	A/B								
Abnahme von 20% od. mehr der ursprünglichen Körpermasse	C								
<u>Unterschrift</u>									

Literaturverzeichnis

1. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*. 2009;115(7):1531-43.
2. Kager L, Tamamyan G, Bielack S. Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma. *Future Oncol*. 2017;13(4):357-68.
3. Quan GM, Choong PF. Anti-angiogenic therapy for osteosarcoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(4):707-13.
4. Fan TM, Roberts RD, Lizardo MM. Understanding and Modeling Metastasis Biology to Improve Therapeutic Strategies for Combating Osteosarcoma Progression. *Front Oncol*. 2020;10:13.
5. Simpson E, Brown HL. Understanding osteosarcomas. *JAAPA*. 2018;31(8):15-9.
6. Wu J, Sun H, Li J, Guo Y, Zhang K, Lang C, Zou C, Ma H. Increased survival of patients aged 0-29 years with osteosarcoma: A period analysis, 1984-2013. *Cancer Med*. 2018;7(8):3652-61.
7. Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist*. 2004;9(4):422-41.
8. AWMF. Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, erstellt 06/2008. aktualisiert 12/2010. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-0051_S1_Osteosarkome_2011-abgelaufen.pdf/ Accessed April 14, 2021.
9. Raymond A, Ayala A, Knuutila S. Conventional osteosarcoma. In: Kleihues P, Sobin L, Fletcher C, editors. *WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*: IARC Press, Lyon, France 2002. p. 264-70.
10. Al Saanna G, Bovée J, Hornick J, Lazar A. (2013) A Review of the WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone, researchers say. Retrieved 2021 April 14 from <https://www.sarcomahelp.org/reviews/who-classification-sarcomas.html>.
11. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 1980(153):106-20.
12. Rosen G, Marcove RC, Caparros B, Nirenberg A, Kosloff C, Huvos AG. Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer*. 1979;43(6):2163-77.
13. Rosen G, Murphy ML, Huvos AG, Gutierrez M, Marcove RC. Chemotherapy, en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer*. 1976;37(1):1-11.
14. Link MP, Goorin AM, Miser AW, Green AA, Pratt CB, Belasco JB, Pritchard J, Malpas JS, Baker AR, Kirkpatrick JA. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med*. 1986;314(25):1600-6.
15. Link MP, Goorin AM, Horowitz M, Meyer WH, Belasco J, Baker A, Ayala A, Shuster J. Adjuvant chemotherapy of high-grade osteosarcoma of the extremity. Updated results of the Multi-Institutional Osteosarcoma Study. *Clin Orthop Relat Res*. 1991(270):8-14.
16. Eilber F, Giuliano A, Eckardt J, Patterson K, Moseley S, Goodnight J. Adjuvant chemotherapy for osteosarcoma: a randomized prospective trial. *J Clin Oncol*. 1987;5(1):21-6.
17. Calaminus G, Jenney M, Hjorth L, Baust K, Bernstein M, Bielack S, Vos P, Hogendoorn PCW, Jovic G, Krailo M, Kreitz K, Marina N, Popoola BO, Sauerland C, Smeland S, Teske C, Schweinitz CV, Whelan J, Wiener A, Sydes MR, Nagarajan R. Quality of Life of Patients With Osteosarcoma in the European American Osteosarcoma Study-1 (EURAMOS-1): Development and Implementation of a Questionnaire Substudy. *JMIR Res Protoc*. 2019;8(8):e14406.

18. Stokke J, Sung L, Gupta A, Lindberg A, Rosenberg AR. Systematic review and meta-analysis of objective and subjective quality of life among pediatric, adolescent, and young adult bone tumor survivors. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(9):1616-29.
19. Holzer LA, Huyer N, Friesenbichler J, Leithner A. Body image, self-esteem, and quality of life in patients with primary malignant bone tumors. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2020;140(1):1-10.
20. Xie L, Ji T, Guo W. Anti-angiogenesis target therapy for advanced osteosarcoma (Review). *Oncol Rep*. 2017;38(2):625-36.
21. Guillon MA, Mary PM, Brugière L, Marec-Bérard P, Pacquement HD, Schmitt C, Guinebretière JM, Tabone MD. Clinical characteristics and prognosis of osteosarcoma in young children: a retrospective series of 15 cases. *BMC Cancer*. 2011;11:407.
22. Marina NM, Smeland S, Bielack SS, Bernstein M, Jovic G, Krailo MD, Hook JM, Arndt C, van den Berg H, Brennan B, Brichard B, Brown KLB, Butterfass-Bahloul T, Calaminus G, Daldrup-Link HE, Eriksson M, Gebhardt MC, Gelderblom H, Gerss J, Goldsby R, Goorin A, Gorlick R, Grier HE, Hale JP, Hall KS, Hards J, Hawkins DS, Helmke K, Hogendoorn PCW, Isakoff MS, Janeway KA, Jurgens H, Kager L, Kuhne T, Lau CC, Leavey PJ, Lessnick SL, Mascarenhas L, Meyers PA, Mottl H, Nathrath M, Papai Z, Randall RL, Reichardt P, Renard M, Safwat AA, Schwartz CL, Stevens MCG, Strauss SJ, Teot L, Werner M, Sydes MR, Whelan JS. Comparison of MAPIE versus MAP in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(10):1396-408.
23. Yu D, Zhang S, Feng A, Xu D, Zhu Q, Mao Y, Zhao Y, Lv Y, Han C, Liu R, Tian Y. Methotrexate, doxorubicin, and cisplatin regimen is still the preferred option for osteosarcoma chemotherapy: A meta-analysis and clinical observation. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(19):e15582.
24. Grignani G, Palmerini E, Ferraresi V, D'Ambrosio L, Bertulli R, Asaftei SD, Tamburini A, Pignochino Y, Sangiolo D, Marchesi E, Capozzi F, Biagini R, Gambarotti M, Fagioli F, Casali PG, Picci P, Ferrari S, Aglietta M, Italian Sarcoma G. Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progressing after standard treatment: a non-randomised phase 2 clinical trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(1):98-107.
25. Martin-Broto J, Redondo A, Valverde C, Vaz MA, Mora J, Garcia Del Muro X, Gutierrez A, Tous C, Carnero A, Marcilla D, Carranza A, Sancho P, Martinez-Trufero J, Diaz-Beveridge R, Cruz J, Encinas V, Taron M, Moura DS, Luna P, Hindi N, Lopez-Pousa A. Gemcitabine plus sirolimus for relapsed and progressing osteosarcoma patients after standard chemotherapy: a multicenter, single-arm phase II trial of Spanish Group for Research on Sarcoma (GEIS). *Ann Oncol*. 2017;28(12):2994-9.
26. Xie L, Xu J, Sun X, Tang X, Yan T, Yang R, Guo W. Apatinib for Advanced Osteosarcoma after Failure of Standard Multimodal Therapy: An Open Label Phase II Clinical Trial. *Oncologist*. 2019;24(7):e542-e50.
27. Jacobi CA, Menenakos C, Braumann C. Taurolidine--a new drug with anti-tumor and anti-angiogenic effects. *Anticancer Drugs*. 2005;16(9):917-21.
28. Neary PM, Hallihan P, Wang JH, Pfirrmann RW, Bouchier-Hayes DJ, Redmond HP. The evolving role of taurolidine in cancer therapy. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(4):1135-43.
29. Taurolin 2012. <http://www.pharmazie.com/graphic/A/59/1-18259.pdf> /Accessed April 14, 2021.
30. Steinbach-Lebbin C, Ganz AJ, Chang A, Waser PG. [Pharmacokinetics of Taurolin]. *Arzneimittelforschung*. 1982;32(12):1542-6.
31. Wesch G, Petermann C, Linder MM. [Drug therapy of peritonitis. 6-year experience with the chemotherapeutic agent and anti-endotoxin taurolin]. *Fortschr Med*. 1983;101(12):545-50.

32. Calabresi P, Goulette FA, Darnowski JW. Taurolidine: cytotoxic and mechanistic evaluation of a novel antineoplastic agent. *Cancer Res.* 2001;61(18):6816-21.
33. Blenkarn JJ. Sustained anti-adherence activity of taurolidine (Taurolin) and noxythiolin (Noxyflex S) solutions. *J Pharm Pharmacol.* 1988;40(7):509-11.
34. Bedrosian I, Sofia RD, Wolff SM, Dinarello CA. Taurolidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine.* 1991;3(6):568-75.
35. Watson RW, Redmond HP, Mc Carthy J, Bouchier-Hayes D. Taurolidine, an antilipopolsaccharide agent, has immunoregulatory properties that are mediated by the amino acid taurine. *J Leukoc Biol.* 1995;58(3):299-306.
36. Leithauser ML, Rob PM, Sack K. Pentoxifylline, cyclosporine A and taurolidine inhibit endotoxin-stimulated tumor necrosis factor-alpha production in rat mesangial cell cultures. *Exp Nephrol.* 1997;5(1):100-4.
37. Rosman C, Westerveld GJ, van Oeveren W, Kooi K, Bleichrodt RP. Effect of intraperitoneal antimicrobials on the concentration of bacteria, endotoxin, and tumor necrosis factor in abdominal fluid and plasma in rats. *Eur Surg Res.* 1996;28(5):351-60.
38. Sendt W, Mansouri E, Schmitt-Graeff A, Wolff-Vorbeck G, Schoffel U. Influence of antiseptic agents on interleukin-8 release and transmigration of polymorphonuclear neutrophils in a human in vitro model of peritonitis. *Surg Infect (Larchmt).* 2002;3(3):235-44.
39. Jacobi CA, Ordemann J, Bohm B, Zieren HU, Sabat R, Muller JM. Inhibition of peritoneal tumor cell growth and implantation in laparoscopic surgery in a rat model. *Am J Surg.* 1997;174(3):359-63.
40. Jacobi CA, Peter FJ, Wenger FA, Ordemann J, Muller JM. New therapeutic strategies to avoid intra- and extraperitoneal metastases during laparoscopy: results of a tumor model in the rat. *Dig Surg.* 1999;16(5):393-9.
41. McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP. Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo. *Ann Surg Oncol.* 2000;7(9):685-91.
42. Braumann C, Henke W, Jacobi CA, Dubiel W. The tumor-suppressive reagent taurolidine is an inhibitor of protein biosynthesis. *Int J Cancer.* 2004;112(2):225-30.
43. Braumann C, Schoenbeck M, Menenakos C, Kilian M, Jacobi CA. Effects of increasing doses of a bolus injection and an intravenous long-term therapy of taurolidine on subcutaneous (metastatic) tumor growth in rats. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22(1):77-83.
44. Nestler G, Schulz HU, Schubert D, Kruger S, Lippert H, Pross M. Impact of taurolidine on the growth of CC531 coloncarcinoma cells in vitro and in a laparoscopic animal model in rats. *Surg Endosc.* 2005;19(2):280-4.
45. Chromik AM, Daigeler A, Hilgert C, Bulut D, Geisler A, Liu V, Otte JM, Uhl W, Mittelkotter U. Synergistic effects in apoptosis induction by taurolidine and TRAIL in HCT-15 colon carcinoma cells. *J Invest Surg.* 2007;20(6):339-48.
46. Chromik AM, Daigeler A, Bulut D, Flier A, May C, Harati K, Roschinsky J, Sulberg D, Ritter PR, Mittelkotter U, Hahn SA, Uhl W. Comparative analysis of cell death induction by Taurolidine in different malignant human cancer cell lines. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29:21.
47. Schubert J, Khosrawipour V, Chaudhry H, Arafkas M, Knoefel WT, Pigazzi A, Khosrawipour T. Comparing the cytotoxicity of taurolidine, mitomycin C, and oxaliplatin on the proliferation of in vitro colon carcinoma cells following pressurized intra-peritoneal aerosol chemotherapy (PIPAC). *World J Surg Oncol.* 2019;17(1):93.
48. Chromik AM, Hahn SA, Daigeler A, Flier A, Bulut D, May C, Harati K, Roschinsky J, Sulberg D, Weyhe D, Mittelkotter U, Uhl W. Gene expression analysis of cell death induction by taurolidine in different malignant cell lines. *BMC Cancer.* 2010;10:595.

49. Petrovic L, Schlegel KA, Ries J, Park J, Diebel E, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J. [In vitro effect of taurolidine on squamous cell carcinoma in the oral cavity]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2003;7(2):102-7.
50. Daigeler A, Chromik AM, Geisler A, Bulut D, Hilgert C, Krieg A, Klein-Hitpass L, Lehnhardt M, Uhl W, Mittelkötter U. Synergistic apoptotic effects of taurolidine and TRAIL on squamous carcinoma cells of the esophagus. *Int J Oncol.* 2008;32(6):1205-20.
51. Li F, Qi J, Qin C, Fu Z, Ren W. Taurolidine promotes cell apoptosis by enhancing GRIM19 expression in liver cancer. *Oncol Rep.* 2018;40(6):3743-51.
52. Hotz B, Erben U, Arndt M, Buhr HJ, Hotz HG. Taurolidine induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of the transcription factor Snail in human pancreatic cancer cell lines. *Int J Colorectal Dis.* 2014;29(11):1339-48.
53. Ribizzi I, Darnowski JW, Goulette FA, Akhtar MS, Chatterjee D, Calabresi P. Taurolidine: preclinical evaluation of a novel, highly selective, agent for bone marrow purging. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29(4):313-9.
54. Darnowski JW, Goulette FA, Cousens LP, Chatterjee D, Calabresi P. Mechanistic and antineoplastic evaluation of taurolidine in the DU145 model of human prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;54(3):249-58.
55. Abramjuk C, Bueschges M, Schnorr J, Jung K, Staack A, Lein M. Divergent effects of taurolidine as potential anti-neoplastic agent: inhibition of bladder carcinoma cells in vitro and promotion of bladder tumor in vivo. *Oncol Rep.* 2009;22(2):409-14.
56. Nici L, Monfils B, Calabresi P. The effects of taurolidine, a novel antineoplastic agent, on human malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(22):7655-61.
57. Opitz I, Sigrist B, Hillinger S, Lardinois D, Stahel R, Weder W, Hopkins-Donaldson S. Taurolidine and povidone-iodine induce different types of cell death in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* 2007;56(3):327-36.
58. Martinotti S, Ranzato E, Burlando B. In vitro screening of synergistic ascorbate-drug combinations for the treatment of malignant mesothelioma. *Toxicol In Vitro.* 2011;25(8):1568-74.
59. Shryer DP, Lukoff H, King T, Calabresi P. The effect of Taurolidine on adherent and floating subpopulations of melanoma cells. *Anticancer Drugs.* 2003;14(4):295-303.
60. Stendel R, Scheurer L, Stoltenburg-Didinger G, Brock M, Mohler H. Enhancement of Fas-ligand-mediated programmed cell death by taurolidine. *Anticancer Res.* 2003;23(3b):2309-14.
61. Stendel R, Stoltenburg-Didinger G, Al Keikh CL, Wattrodt M, Brock M. The effect of taurolidine on brain tumor cells. *Anticancer Res.* 2002;22(2a):809-14.
62. Stendel R, Bieffer HR, Dekany GM, Kubota H, Munz C, Wang S, Mohler H, Yonekawa Y, Frei K. The antibacterial substance taurolidine exhibits anti-neoplastic action based on a mixed type of programmed cell death. *Autophagy.* 2009;5(2):194-210.
63. Rodak R, Kubota H, Ishihara H, Eugster HP, Konu D, Mohler H, Yonekawa Y, Frei K. Induction of reactive oxygen intermediates-dependent programmed cell death in human malignant ex vivo glioma cells and inhibition of the vascular endothelial growth factor production by taurolidine. *J Neurosurg.* 2005;102(6):1055-68.
64. Eschenburg G, Luckert C, Reinshagen K, Bergholz R. Taurolidine cooperates with antineoplastic drugs in neuroblastoma cells. *Genes Cancer.* 2014;5(11-12):460-9.
65. Swift L, Zhang C, Kovalchuk O, Boklan J, Trippett T, Narendran A. Dual functionality of the antimicrobial agent taurolidine which demonstrates effective anti-tumor properties in pediatric neuroblastoma. *Invest New Drugs.* 2020;38(3):690-9.
66. Luckert C, Eschenburg G, Roth B, Appl B, Reinshagen K, Bergholz R. Taurolidine specifically inhibits growth of neuroblastoma cell lines in vitro. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2014;36(4):e219-23.

67. Han Z, Ribbizi I, Pantazis P, Wyche J, Darnowski J, Calabresi P. The antibacterial drug taurolidine induces apoptosis by a mitochondrial cytochrome c-dependent mechanism. *Anticancer Res.* 2002;22(4):1959-64.
68. Sun BS, Wang JH, Liu LL, Gong SL, Redmond HP. Taurolidine induces apoptosis of murine melanoma cells in vitro and in vivo by modulation of the Bcl-2 family proteins. *J Surg Oncol.* 2007;96(3):241-8.
69. Daigeler A, Brenzel C, Bulut D, Geisler A, Hilgert C, Lehnhardt M, Steinau HU, Flier A, Steintraesser L, Klein-Hitpass L, Mittelkotter U, Uhl W, Chromik AM. TRAIL and Taurolidine induce apoptosis and decrease proliferation in human fibrosarcoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008;27:82.
70. Bobrich E, Braumann C, Opitz I, Menenakos C, Kristiansen G, Jacobi CA. Influence of intraperitoneal application of taurolidine/heparin on expression of adhesion molecules and colon cancer in rats undergoing laparoscopy. *J Surg Res.* 2007;137(1):75-82.
71. Walters DK, Muff R, Langsam B, Gruber P, Born W, Fuchs B. Taurolidine: a novel anti-neoplastic agent induces apoptosis of osteosarcoma cell lines. *Invest New Drugs.* 2007;25(4):305-12.
72. Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *Apmis.* 1997;105(6):417-37.
73. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, Shindoh M, Higashino F, Mezawa F, Okada F, Ishii S. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000;6(2):572-7.
74. Han G, Wang Y, Bi W, Jia J, Wang W, Xu M. Effects of vascular endothelial growth factor expression on pathological characteristics and prognosis of osteosarcoma. *Clin Exp Med.* 2016;16(4):577-84.
75. Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragter. Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere. 2009 http://www.charite.de/tierschutz/download/Abbruchkriterien-Berliner-TSchB_2Auflage2009.pdf /Accessed Februar 15, 2010.
76. Workman P, Balmain A, Hickman JA, McNally NJ, Rohas AM, Mitchison NA, Pierrepont CG, Raymond R, Rowlatt C, Stephens TC. UKCCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. *Lab Anim.* 1988;22(3):195-201.
77. Avwioro G, Histochemical uses of haematoxylin - a review, researchers say 2011 https://www.researchgate.net/publication/268436386_Histochemical_Uses_of_Haematoxylin_-_A_Review. Accessed April 14, 2021.
78. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today.* 1994;15(10):490-5.
79. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324(1):1-8.
80. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer.* 1996;32A(14):2474-84.
81. Daigeler A, Chromik AM, Haendschke K, Emmelmann S, Siepmann M, Hensel K, Schmitz G, Klein-Hitpass L, Steinau HU, Lehnhardt M, Hauser J. Synergistic effects of sonoporation and taurolidin/TRAIL on apoptosis in human fibrosarcoma. *Ultrasound Med Biol.* 2010;36(11):1893-906.
82. Harati K, Chromik AM, Bulut D, Goertz O, Hahn S, Hirsch T, Klein-Hitpass L, Lehnhardt M, Uhl W, Daigeler A. TRAIL and taurolidine enhance the anticancer activity of doxorubicin, trabectedin and mafosfamide in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Anticancer Res.* 2012;32(7):2967-84.

83. Karlisch C, Harati K, Chromik AM, Bulut D, Klein-Hitpass L, Goertz O, Hirsch T, Lehnhardt M, Uhl W, Daigeler A. Effects of TRAIL and taurolidine on apoptosis and proliferation in human rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma and epithelioid cell sarcoma. *Int J Oncol.* 2013;42(3):945-56.
84. Marley K, Helfand SC, Edris WA, Mata JE, Gitelman AI, Medlock J, Seguin B. The effects of taurolidine alone and in combination with doxorubicin or carboplatin in canine osteosarcoma in vitro. *BMC Vet Res.* 2013;9:15.
85. Arlt MJ, Walters DK, Banke IJ, Steinmann P, Puskas GJ, Bertz J, Rentsch KM, Ehrensperger F, Born W, Fuchs B. The antineoplastic antibiotic taurolidine promotes lung and liver metastasis in two syngeneic osteosarcoma mouse models and exhibits severe liver toxicity. *Int J Cancer.* 2012;131(5):E804-12.
86. Braumann C, Ordemann J, Kilian M, Wenger FA, Jacobi CA. Local and systemic chemotherapy with taurolidine and taurolidine/heparin in colon cancer-bearing rats undergoing laparotomy. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20(5):387-94.
87. Braumann C, Ordemann J, Wildbrett P, Jacobi CA. Influence of intraperitoneal and systemic application of taurolidine and taurolidine/heparin during laparoscopy on intraperitoneal and subcutaneous tumour growth in rats. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18(7):547-52.
88. Braumann C, Stuhldreier B, Bobrich E, Menenakos C, Rogalla S, Jacobi CA. High doses of taurolidine inhibit advanced intraperitoneal tumor growth in rats. *J Surg Res.* 2005;129(1):129-35.
89. Braumann C, Jacobi CA, Rogalla S, Menenakos C, Fuehrer K, Trefzer U, Hofmann M. The tumor suppressive reagent taurolidine inhibits growth of malignant melanoma--a mouse model. *J Surg Res.* 2007;143(2):372-8.
90. Knight BI, Skellern GG, Browne MK, Pfirrmann RW. Peritoneal absorption of the antibacterial and antiendotoxin taurolin in peritonitis. *Br J Clin Pharmacol.* 1981;12(5):695-9.
91. Jacobi CA, Ordemann J, Bohm B, Zieren HU, Liebenthal C, Volk HD, Muller JM. The influence of laparotomy and laparoscopy on tumor growth in a rat model. *Surg Endosc.* 1997;11(6):618-21.
92. Opitz I, van der Veen HC, Braumann C, Ablassmaier B, Fuhrer K, Jacobi CA. The influence of adhesion prophylactic substances and taurolidine/heparin on local recurrence and intraperitoneal tumor growth after laparoscopic-assisted bowel resection of colon carcinoma in a rat model. *Surg Endosc.* 2003;17(7):1098-104.
93. Wittich P, Mearadji A, Marquet RL, Bonjer HJ. Irrigation of port sites: prevention of port site metastases? *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2004;14(3):125-9.
94. Opitz I, Van der Veen H, Witte N, Braumann C, Mueller JM, Jacobi CA. Instillation of taurolidine/heparin after laparotomy reduces intraperitoneal tumour growth in a colon cancer rat model. *Eur Surg Res.* 2007;39(3):129-35.
95. Hokschi B, Rufer B, Gazdhar A, Bilici M, Beshay M, Gugger M, Schmid RA. Taurolidine in the prevention and therapy of lung metastases. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009;36(6):1058-63.
96. Raue W, Kilian M, Braumann C, Atanassow V, Makareinis A, Caldenas S, Schwenk W, Hartmann J. Multimodal approach for treatment of peritoneal surface malignancies in a tumour-bearing rat model. *Int J Colorectal Dis.* 2010;25(2):245-50.
97. Da Costa ML, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Taurolidine improves survival by abrogating the accelerated development and proliferation of solid tumors and development of organ metastases from circulating tumor cells released following surgery. *J Surg Res.* 2001;101(2):111-9.
98. Opitz I, Lardinois D, Arni S, Hillinger S, Vogt P, Odermatt B, Rousson V, Weder W. Local recurrence model of malignant pleural mesothelioma for investigation of intrapleural treatment. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007;31(5):773-8.

99. Volz J, Volz-Koster S, Kanis S, Klee D, Ahlert C, Melchert F. Modulation of tumor-induced lethality after pneumoperitoneum in a mouse model. *Cancer*. 2000;89(2):262-6.
100. Wenger FA, Kilian M, Braumann C, Neumann A, Ridders J, Peter FJ, Guski H, Jacobi CA. Effects of taurolidine and octreotide on port site and liver metastasis after laparoscopy in an animal model of pancreatic cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(2):169-73.
101. Kilian M, Mautsch I, Braumann C, Schimke I, Guski H, Jacobi CA, Wenger FA. Effects of taurolidine and octreotide on tumor growth and lipid peroxidation after staging-laparoscopy in ductal pancreatic cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003;69(4):261-7.
102. Harati K, Emmelmann S, Behr B, Goertz O, Hirsch T, Kapalschinski N, Kolbensschlag J, Stricker I, Tannapfel A, Lehnhardt M, Daigeler A. Evaluation of the safety and efficacy of TRAIL and taurolidine use on human fibrosarcoma xenografts in vivo. *Oncol Lett*. 2016;11(3):1955-61.
103. Terry CM, He Y, Cheung AK. Rivaroxaban improves patency and decreases inflammation in a mouse model of catheter thrombosis. *Thromb Res*. 2016;144:106-12.
104. Wouters Y, Causevic E, Klek S, Groenewoud H, Wanten GJA. Use of Catheter Lock Solutions in Patients Receiving Home Parenteral Nutrition: A Systematic Review and Individual-Patient Data Meta-analysis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2020.
105. Arlt MJ, Born W, Fuchs B. Taurolidine: Mode of administration in mouse tumor models. *Int J Cancer*. 2012;131(6):E1053-4.
106. Fahrner R, Moller A, Press AT, Kortgen A, Kiehntopf M, Rauchfuss F, Settmacher U, Mosig AS. Short-term treatment with taurolidine is associated with liver injury. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2017;18(1):61.
107. Braumann C, Menenakos C, Atanassov V, Pffirmann RW, Guenther N, Jacobi CA. Leukopoiesis is not affected after intravenous treatment with the novel antineoplastic agent taurolidine. Results of an experimental study in rats. *Eur Surg Res*. 2008;40(4):341-6.
108. Marley K, Helfand SC, Simpson J, Mata JE, Tracewell WG, Brownlee L, Bracha S, Seguin B. Pharmacokinetic study and evaluation of the safety of taurolidine for dogs with osteosarcoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013;32:74.
109. Gong L, Greenberg HE, Perhach JL, Waldman SA, Kraft WK. The pharmacokinetics of taurolidine metabolites in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2007;47(6):697-703.
110. Braumann C, Winkler G, Rogalla P, Menenakos C, Jacobi CA. Prevention of disease progression in a patient with a gastric cancer-re-recurrence. Outcome after intravenous treatment with the novel antineoplastic agent taurolidine. Report of a case. *World J Surg Oncol*. 2006;4:34.
111. Stendel R, Picht T, Schilling A, Heidenreich J, Loddenkemper C, Janisch W, Brock M. Treatment of glioblastoma with intravenous taurolidine. First clinical experience. *Anticancer Res*. 2004;24(2c):1143-7.
112. Wang JQ, Gao YS, Mei J, Xue HM, Wang SQ, Cai XS. [Morphological changes in osteosarcoma xenografts in nude mice after inhibiting angiogenesis by Ad-VEGF-siRNA]. *Ai Zheng*. 2009;28(6):581-6.
113. Tanaka T, Yui Y, Naka N, Wakamatsu T, Yoshioka K, Araki N, Yoshikawa H, Itoh K. Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma LM8: VEGF is a candidate for anti-metastasis therapy. *Clin Exp Metastasis*. 2013;30(4):369-79.
114. Dutour A, Monteil J, Paraf F, Charissoux JL, Kaletta C, Sauer B, Naujoks K, Rigaud M. Endostatin cDNA/cationic liposome complexes as a promising therapy to prevent lung metastases in osteosarcoma: study in a human-like rat orthotopic tumor. *Mol Ther*. 2005;11(2):311-9.
115. Rossi B, Schinzari G, Maccauro G, Scaramuzzo L, Signorelli D, Rosa MA, Fabbriani C, Carlo B. Neoadjuvant multidrug chemotherapy including high-dose methotrexate modifies VEGF expression in osteosarcoma: an immunohistochemical analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010;11:34.
116. Zhao Y, Qiu GX. [Relationship between vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in osteosarcoma]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2001;23(6):619-22.

117. Haunschild CE, Tewari KS. Bevacizumab use in the frontline, maintenance and recurrent settings for ovarian cancer. *Future Oncol.* 2020;16(7):225-46.
118. Nyflot MJ, Kruser TJ, Traynor AM, Khuntia D, Yang DT, Hartig GK, McCulloch TM, Wiederholt PA, Gentry LR, Hoang T, Jeraj R, Harari PM. Phase 1 trial of bevacizumab with concurrent chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck with exploratory functional imaging of tumor hypoxia, proliferation, and perfusion. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015;91(5):942-51.
119. Ishikura N, Yorozu K, Kurasawa M, Yanagisawa M, Sugimoto M, Yamamoto K. Sustained effect of continuous treatment with bevacizumab following bevacizumab in combination with chemotherapy in a human ovarian clear cell carcinoma xenograft model. *Oncol Rep.* 2019;42(3):1057-65.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Leuta Larissa Naumann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Der Einfluss des Antiangiogenetikums Taurolidin auf das Wachstum des Osteosarkoms - ein Mausmodell** [The influence of the anti-angiogenetic drug Taurolidine on the growth of osteosarcoma – a mouse model] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben, meinen großen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Stephan Rogalla, und meinem Doktorvater, PD Dr. med. Maik Kilian, für die ausgezeichnete Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Nadine Rowher bedanken, die mich auf meinem Weg mit Rat, Anregungen und lieben Worten begleitet hat.

Meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Kathrin K., danke ich für ihre Unterstützung und Ermutigungen während der Arbeit an dieser Dissertation.