

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von Taurolidin auf das Wachstum maligner  
Melanome – Eine experimentelle Arbeit in vitro und in vivo

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Rogalla

aus Berlin

**Datum der Promotion: 26.06.2022**

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

*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.*

Die entsprechenden Anteile finden sich im in vivo Anteil dieser Dissertation.

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>4</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>5</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>10</b>
1.1 DAS MALIGNNE MELANOM .....	10
1.2 DIE APOPTOSE.....	14
1.3 TAUROLIDIN .....	16
<b>2 ZIELSTELLUNG</b> .....	<b>19</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODIK</b> .....	<b>21</b>
3.1 IN VITRO – DIE UNTERSUCHUNG AN ZELLKULTUREN.....	21
3.1.1 <i>Die Zelllinien</i> .....	21
3.1.2 <i>Kultivierung der Zellen</i> .....	21
3.1.3 <i>Behandlung und quantitative Auswertung zu Versuche mittels Trypanblau</i> .....	23
3.1.4 <i>Behandlung und qualitative Analyse mittels Annexin-Assay</i> .....	23
3.1.5 <i>Herstellung und Kombination Zytostatika – Die Versuchsprotokolle</i> .....	24
3.2 IN VIVO – DIE WIRKUNG IM ORGANISMUS .....	25
3.2.1 <i>Die Tiere</i> .....	25
3.2.2 <i>Die Zelllinie</i> .....	26
3.2.3 <i>Das Studiendesign und Übersicht über die Therapiegruppen</i> .....	26
3.2.4 <i>Die Wirkstoffe</i> .....	28
3.2.5 <i>Die Operationsmethodik</i> .....	28
3.2.6 <i>Die Obduktion</i> .....	29
3.3 DIE DOKUMENTATION UND DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	29
3.3.1 <i>In Vitro</i> .....	29
3.3.2 <i>In Vivo</i> .....	30
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>31</b>
4.1 UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON TAUROLIDIN SOWIE VERSCHIEDENER ZYTOKINE AUF DAS MALIGNNE MELANOM IN VITRO.....	31
4.1.1 <i>Behandlung verschiedener Zelllinien des malignen Melanoms mit Taurolidin als         Monotherapie</i> .....	31
4.1.2 <i>Behandlung verschiedener Zelllinien des malignen Melanoms mit Taurolidin und         ausgesuchten Zytokinen als Kombinationstherapie</i> .....	34
4.1.3 <i>Untersuchung der Induktion der Apoptose durch die Therapie von Taurolidin sowie         verschiedener Zytokine</i> .....	37
4.2 DER EINFLUSS TAUROLIDINS AUF DAS MALIGNNE MELANOM IM MAUSMODELL .....	40
4.2.1 <i>Das subkutane Tumorgewicht</i> .....	41
4.2.2 <i>Das intraperitoneale Tumorgewicht</i> .....	43
4.2.3 <i>Das gesamte Tumorgewicht</i> .....	44
4.2.4 <i>Die Anzahl der Metastasen</i> .....	45
4.2.5 <i>Das Körpergewicht der Tiere</i> .....	46
<b>5 DISKUSSION</b> .....	<b>47</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>55</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>56</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Inzidenz des malignen Melanoms in Norwegen	Seite 10
Abb. 2:	Der Ablauf der Apoptose	Seite 16
Abb. 3:	Dissoziation von Taurolidin durch Hydrolyse	Seite 17
Abb. 4:	Prozentuale Avitalität in vitro	Seite 32
Abb. 5:	Standardabweichung des Mittelwertes des Zelltodes in vitro	Seite 33
Abb. 6:	Einfluss von Taurolidin und Zytokinen auf MEWO in vitro	Seite 35
Abb. 7:	Einfluss von Taurolidin und Zytokinen auf SKMEL in vitro	Seite 36
Abb. 8:	Standardabweichung des Mittelwertes vitaler Zellen nach Therapie mit Taurolidin und Zytokinen in vitro	Seite 38
Abb. 9:	Standardabweichung des Mittelwertes apoptotischer Zellen nach Therapie mit Taurolidin und Zytokinen in vitro	Seite 39
Abb. 10:	Standardabweichung des Mittelwertes nekrotischer Zellen nach Therapie mit Taurolidin und Zytokinen in vitro	Seite 40
Abb. 11:	Das subkutane Tumorgewicht	Seite 42
Abb. 12:	Das intraperitoneale Tumorgewicht	Seite 43
Abb. 13:	Das gesamte Tumorgewicht	Seite 44
Abb. 14:	Die Metastasenanzahl	Seite 45

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1:	Wechselwirkung von Therapie und Inkubationszeit	Seite 33
Tab. 2:	Tumorgewichte und Gewichte der Tiere nach intraperitonealer Therapie	Seite 41
Tab. 3:	Tumorgewichte und Gewichte der Tiere nach intravenöser Therapie	Seite 41

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Das maligne Melanom ist eines der häufigsten Malignome weltweit. Obwohl sich die Therapie in den vergangenen Jahren durch neue Medikamente deutlich verbessert hat, ist die Lebenserwartung im fortgeschrittenen Stadium weiter schlecht. Taurolidin, ein Derivat der Aminosäure Taurin, hat in verschiedenen präklinischen aber auch klinischen Studien seine Wirksamkeit bei gleichzeitig überschaubaren Nebenwirkungen unter Beweis gestellt. In dieser Studie wurde der Einfluss von Taurolidin auf das maligne Melanom *in vitro* und *in vivo* untersucht.

**Methodik:** Die kommerziell erwerblichen Melanomzelllinien, MEWO und SKMEL28, sowie 8 Patientenzelllinien wurde zunächst *in vitro* mit steigenden Konzentrationen, 50 bis 1000  $\mu\text{M}$ , Taurolidin behandelt. Danach wurde der Einfluss Taurolidins in den Konzentrationen 100 und 500  $\mu\text{M}$  mit 100 U/ml Interferon-alpha oder Tumornekrose-Faktor-alpha oder der Kombination auf MEWO und SKMEL28 untersucht. Abschließend wurde mittels eines Annexin-V-Assays die prozentuale Rate induzierter Apoptose auf MEWO und SKMEL28 sowie auf die Patientenzelllinien evaluiert. Im zweiten Schritt erhielten C57/BL6 Mäuse ( $n=80$ )  $1 \times 10^6$  Zellen der Linie B16 B78 D14 subkutan in die Nackenfalte sowie  $1.5 \times 10^6$  in die Milz. Nach einer Woche Inkubation wurden die Tiere in zwei Therapieäste, intravenös versus intraperitoneal, a vier Therapiegruppen randomisiert. Die vier Therapiearme waren: Ringerlaktat, 1%, 2% und 3% Taurolidin. Die Behandlung erfolgte intraperitoneal zweimal täglich für sieben Tage und intravenös mittels vier Bolusinjektionen in die Schwanzvene in sieben Tagen. Zwei Wochen nach Therapieende wurden die Versuche beendet und die Tiere obduziert.

**Ergebnisse:** In vitro: Steigende Dosierungen und längere Inkubationszeiten von Taurolidin als Monotherapie induzierten steigende Zytotoxizität in allen Zelllinien. Die Apoptoserate stieg simultan bis zu einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$ . Bei weiterer Steigerung stieg der Anteil der nekrotischen Zellen. Die Kombination mit den Zytokinen änderte die Apoptoserate nicht, jedoch verbesserte die Kombinationstherapie mit Interferon-alpha die Zytotoxizität signifikant. In vivo: Die intraperitoneale Therapie verursachte eine dosisabhängige Reduktion des intraperitonealen ( $p=0,001$ ) und Gesamttumorgewichts ( $p=0,003$ ). Das subkutane Tumorgewicht wurde nicht signifikant reduziert ( $p=0,132$ ). Die intravenöse Therapie reduzierte das subkutane Tumorgewicht ( $p=0,016$ ) und das Gesamttumorgewicht ( $p=0,013$ ) signifikant. Das intraperitoneale Gewicht wurde nicht signifikant reduziert ( $p=0,122$ ). Die Anzahl der Metastasen konnte

in beiden Applikationsformen nur in der höchsten Konzentration 3% signifikant reduziert werden.

**Zusammenfassung:** Taurolidin hat eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung auf Melanomzellen in vitro und in vivo. Die Apoptoserate ist ebenfalls dosisabhängig und steigt bis zu einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  in vitro. Eine Kombination mit Interferon-alpha steigert den zytotoxischen, aber nicht den apoptotischen Effekt. Weitere Studien sind notwendig um den genauen Vorteil einer Therapie mit Taurolidin zu evaluieren.

## Abstract

**Background:** Malignant melanoma is one of the most common malignancies world-wide. Despite therapeutic advancement due to new drug developments, the overall survival in advanced stages remains poor. Taurolidine, a derivate of the amino acid taurine, has proven its usefulness including mild adverse effects in several preclinical and clinical trials. This study is investigating the effect of Taurolidine on malignant melanoma in vitro and in vivo.

**Materials and Methods:** Well established melanoma cell lines MEWO and SKMEL28 as well as eight patient derived cell lines have been treated with increasing concentrations of Taurolidine, 50 to 1000  $\mu$ M. Subsequently, Taurolidine in concentrations 100 and 500  $\mu$ M has been combined with 100 U/ml Interferone-alfa or Tumornecrose-factor-alfa or the combination of such. Lastly, an Annexin-V-Assay has been used to determine apoptosis rate on all cell lines. In an additional in vivo experiment, C57/BL6 mice (n=80) received  $1 \times 10^6$  B16 B78 D14 subcutaneously in the neck as well as  $1.5 \times 10^6$  cells intrasplenically. Following one week of incubation, mice were randomized in 2 treatment arms, intraperitoneally versus intravenously, containing four treatment groups: Ringer's solution, 1%, 2% und 3% Taurolidine. Animals were treated twice daily for 7 days intraperitoneally or four bolus injections in seven days into the tail vein. Two weeks after therapy end the animals were euthanized and underwent an autopsy.

**Results:** In vitro: Increasing doses and incubation times of Taurolidine increased cell death in all cell lines tested. Apoptosis rate increased up to a concentration up of 500  $\mu$ M Taurolidine with subsequent increase of necrosis rate. The combination with both cytokines did not change the apoptotic pattern but a combination with interferone-alfa increased the cytotoxic effect significantly. In vivo: Intraperitoneal (p=0,001) and total tumor growth (p=0,003) have been reduced significantly subsequent to an intraperitoneal treatment whereas subcutaneous tumor growth has not been reduced significantly (p=0,132). Intravenous treatment caused significant reduction of the subcutaneous (p=0,016) and total tumor growth (p=0,013). Intraperitoneal tumor weight has not been reduced significantly (p=0,122). The highest concentration of Taurolidine reduced the number of tumorous lesions significantly.

**Conclusion:** Taurolidine prompts a cytotoxic effect on melanoma cells both in vitro and in vivo. Apoptosis rate is dose dependent and increases up to a concentration of 500  $\mu$ M in

vitro. A combination with Interferone-alfa increases cell death but does not affect apoptosis. Follow up studies are needed to further evaluate the effect of Taurolidine on malignant melanoma.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist eine maligne Erkrankung der Haut, die sich aus einer neoplastischen Transformation der pigmentproduzierenden Melanozyten entwickelt (1-3). Ein Risikofaktor ist die Exposition mit UV-Licht. Nahezu weltweit ist seit Jahrzehnten eine steigende Inzidenz zu verzeichnen. Insbesondere in Ländern mit hellhäutiger Bevölkerung weist das maligne Melanom die am stärksten steigende Inzidenz aller Malignome auf (4, 5). In Europa liegt die Inzidenz bei etwa 10 bis 20 Erkrankten pro 100.000 Einwohner, in den USA bei 20 bis 30 und in Australien sogar bei 50 bis 60 (6). Somit repräsentiert das maligne Melanom in den USA 5% aller Neuerkrankungen an malignen Entitäten bei Männern, dies entspricht der fünfthäufigsten malignen Erkrankung überhaupt. Alarmierend ist zudem die Tatsache, dass es sich beim malignen Melanom in einigen Ländern um die am schnellsten wachsende maligne Erkrankung handelt (7-11).

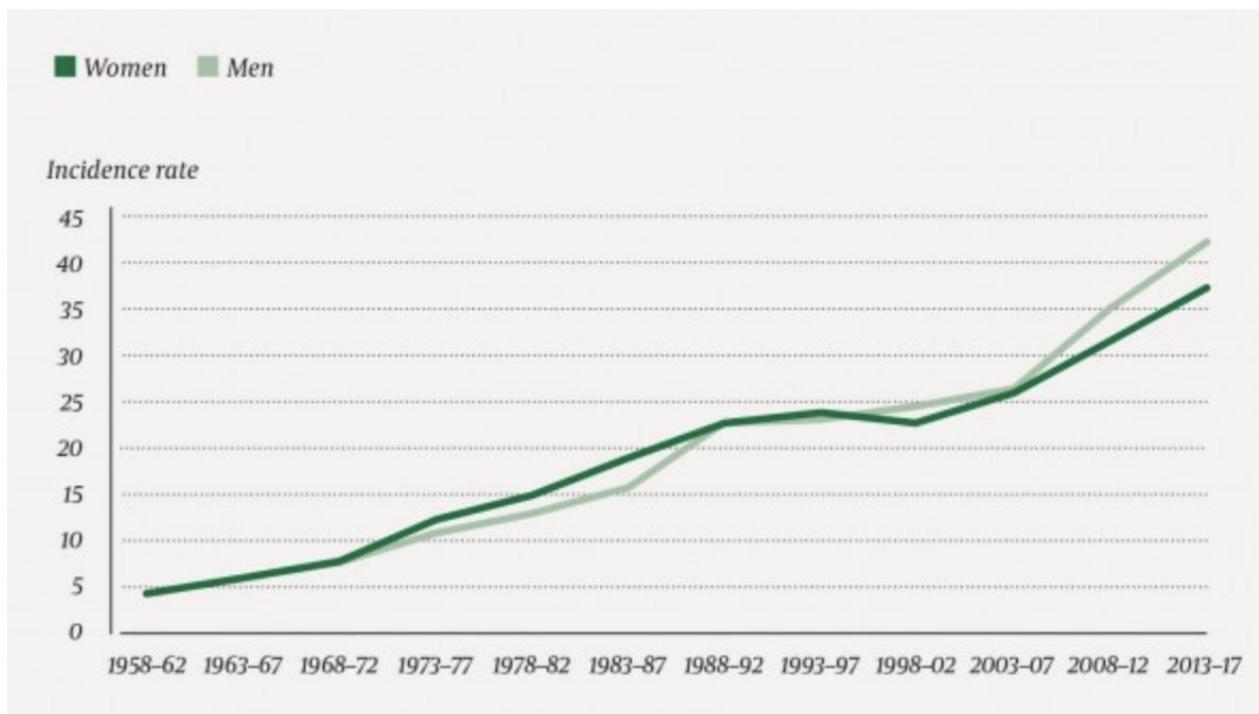


Abb. 1: Inzidenz des malignen Melanoms in Norwegen bezogen auf 100 000 EW. Bei standardisierten Altersgruppen zeigt sich eine konstante Steigerung der Inzidenz in den abgebildeten Jahren von 1958 bis 2017 in beiden Geschlechtern (12).

Beispielhaft für die steigende Inzidenz des malignen Melanoms steht die oben abgebildete Grafik aus einem Artikel von Gunnar Hasle erschienen in Norwegen im Jahr 2019 (**Abb. 1**). Es ist deutlich zu erkennen, dass sich in den abgebildeten 60 Jahren die Erkrankungshäufigkeit über alle Altersgruppen in Norwegen nahezu verzehnfacht hat. Ähnliche Statistiken sind in anderen Ländern zu finden, wo lediglich bei jungen Menschen zwischen 15 und 34 eine nahezu konstante Inzidenz besteht, was den Verdacht erhärtet, dass vor allem die Exposition mit UV-Licht ursächlich für die Erkrankung ist (13, 14). Bis in die frühen 1990er Jahre zeigte sich ein nahezu paralleler Anstieg von Inzidenz und Mortalität. Erst seit Beginn des neuen Jahrtausends sind eine Stagnation und zuletzt sogar ein leichter Rückgang der Mortalitätsrate in den meisten westlichen Staaten im Verhältnis zur Inzidenz zu beobachten (9, 15, 16). Diese zwei auf den ersten Blick gegensätzlichen Trends sind durch eine Diagnosestellung in früheren Tumorstadien gut zu erklären. Dies gelang unter anderem durch verbesserte Techniken sowohl in der klassischen und computergesteuerten Dermatoskopie. Hierdurch sind aufgrund frühzeitiger Diagnosestellung die therapeutischen Ergebnisse und somit die Prognose des Patienten verbessert. Letztlich bedeutet eine steigende Inzidenz jedoch trotz der verbesserten Früherkennung auch unweigerlich einen Anstieg an durch diese Erkrankungen bedingter Todesfälle, auch wenn die Mortalität im Verhältnis zur Inzidenz fällt. So starben allein in den USA im Jahr 2016 etwa 10.000 Menschen an den Folgen eines malignen Melanoms (17). Zudem ist die Prognose im metastasierten Stadium bei allen Altersgruppen vergleichbar schlecht (18). So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 78%, 59% und 40% bei den Stadien IIIA, IIIB und IIIC. Die 1-Jahresüberlebensrate in den metastasierten Stadien M1a, M1b und M1c ist mit 62, 53 beziehungsweise 33% dramatisch schlechter (2). Anders als andere solide Malignome, weist das Melanom rein oberflächlich gelegene Metastasen, so genannten in-transit-, Satelliten- oder kutan auftretende hämatogene Metastasen auf. Diese Art Metastasen verursachen neben den potentiell letalen Komplikationen „regulärer“ Metastasen oft schwere Missbildungen, Schmerzen und Behinderungen neben der infausten Prognose. Zusätzlich kommt es nicht selten zu sozialer Ausgliederung durch ihr offensichtliches Erscheinen, was die Erkrankten psychisch und sozial schwer belastet. Erschwerend wirkt, dass Aussagen über den Erfolg einer Therapie und die Prognose noch schwerer zu treffen sind als bei anderen malignen Entitäten.

Der entscheidende Prognosefaktor des malignen Melanoms ist aktuell die Tumordicke, die mit der Breslow Skala erfasst wird. So ist ein Melanom mit großer Tumordicke

prognostisch ungünstig. Wenn man nun die Statistik der Inzidenz genauer unterteilt wird ersichtlich, dass die Erkrankungen an fortgeschrittenen tief infiltrierenden Melanomen seit den 1980er Jahren konstant blieben. Wohingegen die Inzidenz flacher prognostisch günstiger Tumore dramatisch anstieg (19, 20). Die aktuell gängigste Klassifikation, die auch die Prognose mit einschließt ist die Klassifikation des American Joint Committee on Cancer (AJCC) (21). Dies beurteilt neben der Tumordicke auch den prognostischen Wert von Tumorulzeration und die Anzahl befallener Lymphknoten als besseren Indikator für die Prognose im Vergleich zur Größe befallener Lymphknoten allein. Als gleichwertig werden Lymphknoten- und In-transit-Metastasen sowie Lokalrezidive betrachtet. Zudem wurde auch eine hohe Mitoserate als negativ für die Prognose bewertet, was in den 2009er AJCC Staging Kriterien eingearbeitet wurde, aber in der AJCC Klassifikation von 2107 nicht mehr mitaufgenommen wurde (6, 22). Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt durchschnittlich 30 bis 70% für Patienten mit Mikrometastasen, 30 bis 50 % für Patienten mit Satelliten- sowie In-Transit-Metastasen und nur 20 bis 40% für klinisch auffällige Lymphknotenmetastasen. Fernmetastasen führen zu einem dramatischen Abfall mit einem Überleben von etwa 6 bis 9 Monaten (6). Es zeigt sich auch hier, dass eine für den Patienten positive Prognose bei fehlenden sicheren Therapieoptionen sehr vom Tumorstadium und damit von einer frühzeitigen Diagnosestellung abhängt. Festzuhalten ist, dass über die Heilung aktuell fast ausschließlich die chirurgische Resektion in sano - also Therapie in frühen Tumorstadien - entscheidet. Bestrahlung oder Chemotherapie spielen bisher keine Rolle in kurativen Therapieansätzen, sondern allein in der Palliativsituation. Zusammenfassend sind verschiedene Optionen der Behandlung zu differenzieren. Diese richten sich vor allem nach dem bereits oben beschriebenen Tumorstadien. So ist im klinisch gesicherten Stadium I die operative Therapie in primär kurativer Absicht indiziert. Hier wird eine radikale Exzision mit anschließender histopathologischer Auswertung der Tumorränder angestrebt (6). Die Radikalität der Exzision richtet sich auch hier nach der Tumordicke, in diesem Falle definiert als die Eindringtiefe des Melanoms. Leitliniengerecht sollte ein in situ Melanom mit einem Exzisionsrand von 0,5 cm entfernt werden. Ein Tumor mit einer Dicke von über 2 mm nach der Breslow-Skala sollte mit einem Sicherheitsabstand von 2 cm entfernt werden (6). Bei sehr tief wachsenden Primärtumoren bleibt auch ein radikales Vorgehen ohne Einfluss auf die Fernmetastasierung. Hier muss zusätzlich nach bereits statt gefundener lymphogener Metastasierung gesucht werden. Bei fehlendem Nachweis einer Metastase im Wächterlymphknoten sind keine weiteren operativen Maßnahmen indiziert. Sofern der

„Sentinel“-Lymphknoten jedoch eine Mikrometastasierung aufweist wird eine radikale regionale Lymphadenektomie empfohlen. Allerdings gibt es hier bis dato keinen Nachweis eines prognostischen Vorteils auf das Gesamtüberleben. Dasselbe gilt für den Versuch geringe Anzahlen an Tumorzellen im Blut durch den Nachweis der melanomtypischen Tyrosinkinase oder MART-1 mittels Polymerase-Kettenreaktion zu detektieren. Auch hier blieb das Gesamtüberleben unbeeinflusst, so dass diese Technik keinen Einzug in die Routineuntersuchung beim malignen Melanom fand (23, 24). Satelliten- oder In-transit-Metastasen sollten möglichst mit allen Filiae im Gesunden entfernt werden. Bei multiplen Metastasen im Extremitätenbereich ist eine hypertherme Zytostatikaperfusion zu erwägen.(25, 26) Falls regionäre Lymphknotenmetastasen nicht in sano reseziert werden können, wird nach S3 Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft eine Radiatio empfohlen.(27) Bei den Stadien II, und III, lokoregionäre Metastasierung, ist aktuell eine adjuvante unspezifische Immuno- oder Interferontherapie empfohlen. Jedoch zeigt keine Studie über den Gebrauch von Alkylantien oder anderen klassischen Chemotherapeutika einen Vorteil für den Patienten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, aus diesem Grund ist eine adjuvante Chemotherapie nicht empfehlenswert (28). Dieses Ergebnis zeigten auch Studien mit einer Vakzination durch Bazillus Calmette-Guérin oder eine unspezifische immunstimulatorische Ansätze. Vorteile zeigte lediglich eine Therapie mit Interferon-alpha ( $IFN\alpha$ ). Die stark nebenwirkungsbehafteten Therapien zeigen lediglich in zwei Studien einen Überlebensvorteil in Stadium III und nur eine Studie zeigt einen Vorteil in Verlängerung des rezidivfreien Intervalles (28). Seit kurzer Zeit existieren neuartige Therapien basierend auf Inhibierung der mitogen-activaed protein (MAP) Kinase und von Immune-Checkpoint-Inhibitoren durch Blockade von BRAF, einem Gen, das das Protein B-Raf kodiert, und MEK, der mitogen-aktivierten Proteinkinasekinase (29). Beide haben das Gesamtüberleben von Patienten, die am metastasierten malignen Melanom leiden, signifikant verbessert. Weitere neue und erfolgreiche Therapien basieren auf selektiver Blockade von zytotoxischen T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) und Programmed-Death 1 (PD-1) wie den neueren Wirkstoff Nivolumab. Durch diese Therapien konnte das mediane Gesamtüberleben verdoppelt werden und liegt heute bei etwa 24 Monaten verglichen mit einer Standardtherapie basierend auf Dacarbazin, die zudem eine geringe Ansprechrate aufweist (30). Die Therapie mit BRAF Inhibitoren sind nur für Patienten mit BRAF-V600-Mutation geeignet, welche im Vorfeld getestet werden müssen. Prospektive adjuvante Studien dieser neuen Therapien fehlen bislang, so dass viele Daten nur auf

Kaplan-Meier-Analysen basieren (30, 31). Daher wird noch empfohlen allen Patienten mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko eine adjuvante  $\text{IFN}\alpha$ -Therapie oder eine Behandlung mit dem Checkpoint-Inhibitor Nivolumab anzubieten. Die Therapie mit  $\text{IFN}\alpha$  weist eine hohe Toxizität und nur moderate Ansprechrate auf und wird zunehmend durch die neuen Therapieformen ersetzt. Die Therapie mit den CTLA-4 Antikörpern und ODI Inhibitoren zeigen eine hohe Wirksamkeit, haben aber ein erhöhtes Risiko für Autoimmunreaktionen (31-33). In den letzten Jahren haben sich deutliche Verbesserung im Gesamtüberleben aufgrund der Zulassung neuer Therapieoptionen im metastasierenden Stadium des Melanoms gezeigt. Jedoch ist weiterhin unklar, wann eine Tumorprogression stattfindet und weshalb (18, 34). Somit stellt das maligne Melanom weiterhin ein zunehmendes gesundheitliches aber auch sozioökonomisches Problem in westlichen Ländern wie auch Deutschland dar. Die aktuellen Tumortherapien basieren zum Großteil durch Tumorzerfall durch Nekrose und Apoptose (35). Jedoch verursacht Nekrose eine starke begleitende Entzündungsreaktion, die für den Patienten gefährlicher sein kann. Folglich könnte ein interessanter Ansatz aus molekularbiologischer Sicht auch sein, den kontrollierten Zelltod durch Apoptose und nicht Nekrose induzierende Therapien zu verwenden (36, 37).

## **1.2 Die Apoptose**

Die Apoptose wird durch verschiedene äußere Faktoren beeinflusst und ist ein natürlicher Prozess, der zur beständigen Erneuerung im menschlichen Körper führt (38). Durch verschiedene Signale wird ein intrazellulärer Prozess ausgelöst, bei dem die genomische DNA fragmentiert und das Chromatin kondensiert wird, woraufhin die Zelle schrumpft. Die Zellmembran wird ständig in Fragmenten abgeschnürt, so dass die Zelle in kleine Apotosekörperchen zerlegt wird, die dann phagozytiert werden können. Eine zentrale Rolle bei der Aktivierung spielen Endonucleasen, die Caspasen. Caspasen sind Proteasen mit Cystein in ihrem aktiven Zentrum, sie spalten ihre Substrate immer nach der Aminosäure Asparaginsäure, daher der Name CASPasen. Oft findet man auch den Ausdruck ICE-like Proteasen aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Interleukin-1- $\beta$ -converting enzyme (38). Diese werden als inaktive Präenzyme synthetisiert und durch Proteolyse schließlich aktiviert. Einmal aktiviert, wirkt diese Kaskade als ein Signalverstärker, der schließlich die Endonucleasen aktiviert. Es gibt verschiedene Auslöser der Caspasen Kaskade. Hierzu gehören CD95, Granzyme, B/Perforin, Apaf1-

CytochromeC-ATP-Komplexe. CD95, auch als Fas oder Apo-1 bezeichnet, ist ein transmembranes Protein und gehört der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Familie an. Es wird von den meisten Zellen exprimiert. Der CD95 Ligand ist überwiegend auf natürlichen Killerzellen und aktivierten T-Zellen exprimiert, weshalb die CD95 Induktion der Apoptose meist bei antiviralen Immunantworten, aber auch bei Tumorbekämpfung zu finden ist (38) und (Abb. 2). Auch Hypoxie, freie Sauerstoffradikale, Zytostatika und radioaktive Strahlung können Apoptose auslösen und zum Beispiel Malignome bekämpfen, da hier überhöhte Proliferation und zu wenig Apoptose eine wichtige Rolle spielen (39). Die bei Tumoren vorhandenen Genmutationen würden normalerweise in den Tumorzellen das Suizidprogramm aktivieren. Dem entziehen sich diese Zellen allerdings durch die Inaktivierung des proapoptotischen Proteins p53. In über der Hälfte aller kolorektalen Karzinome, malignen Neoplasien der Lunge und der Brust wird in den Tumorzellen kein oder nur unzureichendes p53 produziert. Krebszellen schützen sich des Weiteren auch durch Überproduktion von Bcl-2 und CD 95 Liganden. In wenig oder nicht regenerierbaren Zellen findet sich eine besonders hohe Konzentration von Bcl-2, so kann man bei Melanozyten, die ja eine Schutzfunktion für die Haut übernehmen, sehr viel Bcl-2 finden. Man vermutet, dass diese vermehrte Produktion von Bcl-2 mit der Bösartigkeit des malignen Melanoms eng korreliert ist (40). Die Substanz Taurolidin ist in der Lage über verschiedene Mechanismen die Konzentration von sowohl p53 als auch Bcl-2 und damit die Apoptoseaktivität in Malignomzellen hoch zu regulieren und kommt damit als potentielle Therapie von Malignomen in Frage (40-42).

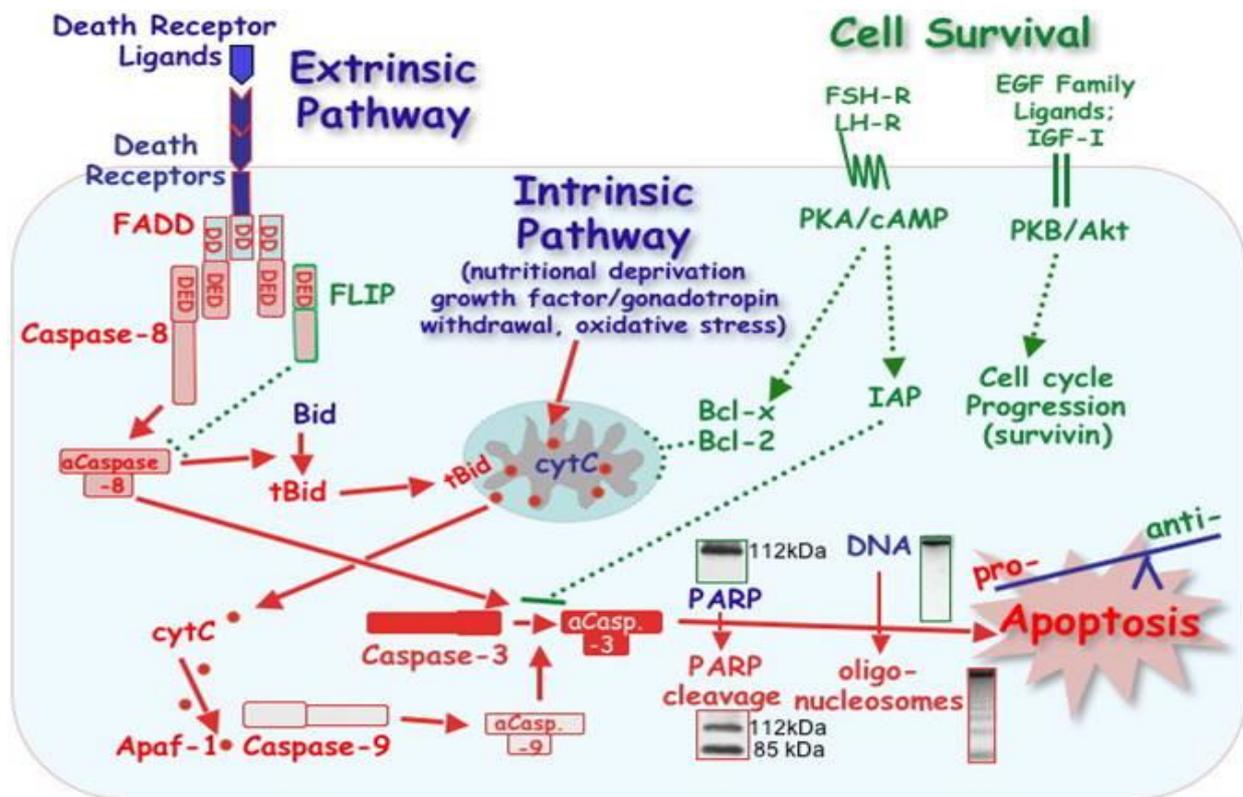


Abb. 2 Der Ablauf der Apoptose, Grafik mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. rer. nat. W. Dubiel, Charité, Berlin

### 1.3 Taurolidin

Taurolidin (Bis-(1,1-Dioxoperhydro-1,2,4-thiadiziny-4)Methan), wird aus der semiessentiellen Aminosäure Taurin synthetisiert. In der Klinik wird es seit 1975 als Antiseptikum bei schweren chirurgischen Infektionen wie der Peritonitis verwandt (43, 44). Einige Studien zeigen zudem die Effektivität von Taurolidin in der Therapie von katheterassoziierten Infektionen (45-47). Taurolidin ist ein kleines unpolares Molekül mit einem Molekulargewicht von 284,37 g/mol. Es kann dadurch aufgrund der geringen Polarität Zellwände ohne aktive Transportkanäle permeieren und intrazelluläre Effekte bewirken. Eine peritoneale Resorption ist aufgrund der großen Fläche des einschichtigen Epithels sehr gut. Taurolidin dissoziiert in die Methylgruppendonatoren Taurultam, Methyltaurultam sowie Taurinamid (Abb. 3).

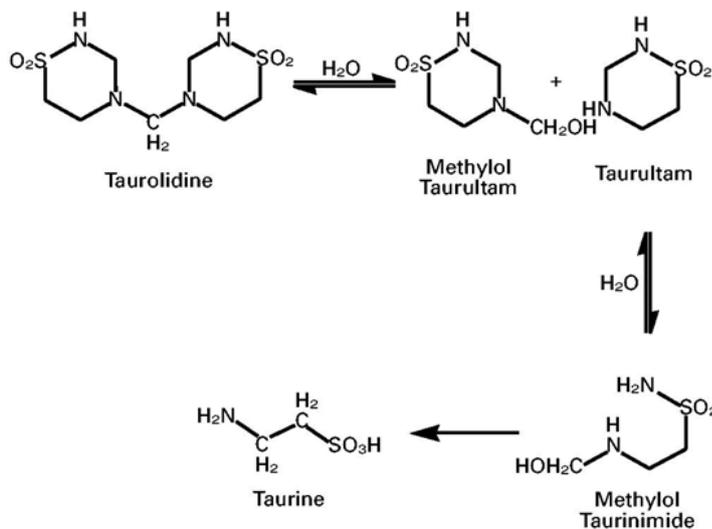


Abb. 3 Dissoziation von Taurolidin durch Hydrolyse (41).

Methylgruppen können irreversibel an Proteinen der Zellwand von Bakterien vernetzen und Endo- und Exotoxine binden, aber auch die Adhäsion von Bakterien reduzieren (41). Seit 1990 eröffnete sich ein weiteres interessantes Feld für die Anwendung von Taurolidin. Es zeigte sich, dass Taurolidin antineoplastische Effekte besitzt und auf verschiedenste Tumorentitäten wirkt (48). Es konnte neben antiadhärenten und zytotoxischen Eigenschaften auch gezeigt werden, dass Taurolidin, die Produktion von Zytokinen senkt. Dies ist insbesondere in Hinblick auf die Wirkung von Interleukin-1 $\beta$ , was das Metastasenwachstum stimuliert, entscheidend. Es zeigte sich, dass Taurolidin die überhöhte Ausschüttung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) aus Makrophagen reduziert (41). Da es aufgrund chemischer Eigenschaften der Substanz fundierte Hinweise hinsichtlich der potentiell guten peritonealen Aufnahme von Taurolidin gab, wurden das antineoplastische Potential Taurolidins nach intravenöser (i.v.) und intraperitonealer (i.p) Gabe unter anderem auf das Kolonkarzinom untersucht (49). Es zeigte sich in einem Rattenmodell, dass das Wachstum des Kolonkarzinomes gut unterdrückt werden konnte, ohne dass relevante Nebeneffekte auf die Hämatopoese, Leukopoese oder das Wachstum der Tiere nach Laparoskopie und Laparotomie aufgetreten sind (50, 51). Weitere Untersuchungen von Wenger et. al. zeigten eine deutliche Reduktion der Leber- und Port-Site-Metastasen bei Hamster nach chemisch induziertem duktalem Pankreaskarzinom (52). Taurolidin wurde in vitro Untersuchungen an unterschiedlichen Tumoren untersucht. So berichteten Nici et. al. von antineoplastischen Effekten auf das maligne Mesotheliom in vitro und in vivo. Shroyer et. al. untersuchten den Einfluss Taurolidins auf das maligne Melanom und in vitro. Eine

leichte Reduktion der Vitalität der Tumorzellen konnte gezeigt werden. Volz et. al. zeigten ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben in einem Ovarialkarzinommodell der Maus mit 18-fach niedrigeren Dosierungen als Braumann et. al. (53-57). Besonders stark war die proapoptotische Wirkung bei nicht adhärennten Melanomzellen ausgeprägt, was besonders nach chirurgischer Resektion von Metastasen von entscheidender Bedeutung sein kann. Ebenso zeigten Sun et. al., dass Taurolidin eine Apoptose beim Melanom im Mausmodell hervorruft. Sie postulieren eine Hemmung der Proteine der Bcl-2-Familie, die im Rahmen der Apoptose eine Rolle spielen (40). Diese Ergebnisse unterstützen die Erkenntnisse von Braumann et. al., die eine Hemmung der Initiation der Translation unter Taurolidingabe beobachteten (58).

Heute wird Taurolidin in klinischen Studien i.v. (Phase II-Studien) und i.p. (multizentrische randomisierte Placebokontrollierte Studie) appliziert, um den Einfluss auf verschiedene maligne Prozesse des Gastrointestinaltraktes beim Menschen zu evaluieren (59). Die Erfahrungen über den Einsatz beim malignen Melanom hingegen sind gering und zumeist in vitro. Es liegt lediglich eine klinische Studie von O'Brien et. al. aus dem Jahre 2006 vor, die eine Co-immunotherapie mit Interleukin-2 und Taurolidin untersucht. Hier zeigte sich, dass die starken Nebenwirkungen der Interleukintherapie reduziert werden konnten. Ein additiver Effekt auf die antineoplastische Therapie, wurde nicht beschrieben (60).

## 2 Zielstellung

Aufgrund der apoptotischen und allgemein zytotoxischen vorbeschriebenen Wirkung des Taurolidins bei anderen Tumorarten, war das Ziel dieser Arbeit, die apoptotische und zytotoxische Wirkung des Taurolidins auf Melanomzellen *in vitro* und anschließend *in vivo* zu untersuchen.

Die Experimente wurden konsekutiv geplant. In einem ersten Schritt wurde der Einfluss von Taurolidin auf das maligne Melanom *in vitro* untersucht. Hierbei wurde die Wirkung steigender Konzentrationen von Taurolidin allein und in Kombination mit Zytokinen auf verschiedene Melanomzellen *in vitro* evaluiert.

Folgend untersuchten wir die Wirkung steigender Konzentrationen von Taurolidin gegenüber einer Kontrolle mit Ringerlaktat nach *i.v.*- und *i.p.*-Applikation auf das maligne Melanom im Mausmodell.

*In vitro* stellten sich die Fragen:

- 1) Haben steigende Konzentrationen von Taurolidin unterschiedlichen Einfluss auf das Wachstum verschiedener humaner maligner Melanome *in vitro*?
- 2) Haben verlängerte Inkubationszeiten mit dem Medikament einen tumorsuppressorischen Effekt?
- 3) Welche Wirkung haben unterschiedliche in der Therapie genutzte Zytokine auf das Wachstum maligner Melanome?
- 4) Hat eine Kombination mit Taurolidin und Zytokinen einen additiven zytotoxischen Effekt?
- 5) Welchen Zelltod, Nekrose oder Apoptose, rufen steigende Konzentrationen und Inkubationen von Taurolidin auch in Kombination mit Zytokinen beim malignen Melanom aus?
- 6) Kommt es zu additiven Effekten der Wirkungen von Taurolidin und den Zytokinen?
- 7) Können die Konzentrationen der hochtoxischen Zytokine reduziert werden?

In dem zweiten Schritt, der *in vivo* Untersuchung, sollte gezeigt werden inwieweit die Ergebnisse einer Monotherapie mit Taurolidin auf das Wachstum maligner Melanome im Organismus übertragbar sind. Hierzu wurde ein bewährtes und validiertes Mausmodell im fortgeschrittenen Tumorstadium verwendet.

- 1) Kann das Tumorwachstum im Modell mit einer C57BL6-Maus und einer hoch aggressiven Zelllinie im simulierten metastasierten Stadium reduziert werden?
- 2) Verändert sich die Anzahl der Tumorimplantate und wird dadurch eine chirurgische Resektion ermöglicht?
- 3) Gibt es Unterschiede nach i.v. und i.p. Applikation?
- 4) Welchen Einfluss hat die systemische Therapie auf das Tiergewicht?
- 5) Welche Nebeneffekte werden beobachtet?

### **3 Material und Methodik**

Ziel der Untersuchung war der Einfluss der Substanz Taurolidin auf das maligne Melanom.

In einem ersten Schritt wurde der Einfluss von Taurolidin in steigenden Konzentrationen allein und in Kombination mit therapeutisch gegen das Melanom angewandten Zytokinen *in vitro* an verschiedenen Melanomzelllinien untersucht. Hierbei wurde auch differenziert, inwieweit die eingesetzten Stoffe Apoptose einleiteten.

Nach Auswertung und Interpretation dieser Ergebnisse wurde die Untersuchung des Einflusses steigender Taurolidindosierungen auf eine Melanomzelllinie und deren Wachstum im Organismus in einem Mausmodell durchgeführt.

#### **3.1 In Vitro – Die Untersuchung an Zellkulturen**

##### **3.1.1 Die Zelllinien**

Es wurden die zwei gängigen, humanen Zelllinien, MEWO und SKMEL-28 (61) (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. J. Becker, Dermatologische Klinik, Universitätsklinikum Würzburg, Deutschland erhalten), sowie acht primären Zelllinien (Charité Universitätsmedizin Berlin, Deutschland), die aus frisch operativ exzidierten Melanomen von Patienten der Charité - Universitätsmedizin Berlin gewonnen wurden und zu Vakzinationszwecken isoliert wurden, verwandt. Eine schriftliche Zustimmung der Patienten zur weiteren Untersuchung des entnommenen Materials und eine Einhaltung der datenschutzrechtlichen Bestimmungen lag vor.

##### **3.1.2 Kultivierung der Zellen**

Die Zelllinien wurden unter Standardbedingungen, 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator (Jonan IG 150, Jonan GmbH, Unterhaching, Deutschland) bei 37°C in Kulturflaschen von 25 bis 125 cm<sup>2</sup> (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) angezüchtet. Als Nährmedium wurde RPMI-Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 10% Volumenanteil fetalem Kälberserum (FBS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 2,5% Volumenanteil antibiotischer Therapeutika, bestehend aus 10.000 u/ml Penicillin G, 10.000 µg/ml Streptomycin und 25 µg/ml Amphotericin B, (Gibco, Auckland, Neuseeland) verwandt.

Das Zellwachstum als adhärenente Monolayerschicht wurde täglich makroskopisch und mikroskopisch mit einem Phasenkontrastmikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) beurteilt. Bei Erreichen einer vollständigen Konfluenz erfolgte die Passage der Kulturen. Zur Passage wurde der Überstand, bestehend aus nicht adhärenenten Zellen und Nährmedium, unter den sterilen Bedingungen einer Laminar-Flow-Werkbank (Antares 48, Biohit, Köln, Deutschland) entnommen. Anschließend wurden fünf bis zehn ml autoklavierte 10:1-verdünnte PBS-Dulbeccos Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) zur Spülung in die Kulturflasche instilliert und abgesaugt. Dieser „Waschvorgang“ wurde mehrfach wiederholt. Der Überstand wurde stets abgesaugt. Nun wurden die Zellen mit ein bis zwei ml 0,05%-Trypsin-0,02% EDTA-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) versetzt. Die Kulturflaschen wurden dann für 5 bis 10 Minuten (min) im Brutschrank inkubiert. Die Lösung der Zellen wurde durch kurzes Klopfen an der Wachstumsseite der Kulturflasche unterstützt. Nach Ablösung der Zellen versetzten wir diese erneut mit Nährmedium. Die in dem Medium suspendierten Zellen wurden mit einer automatischen Pipettierhilfe (Pipetboy, Hirschmann-Laborgeräte, Heilbronn, Deutschland) und einem fünf ml Pipettenaufsatz (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) aufgenommen, in größere Kulturflaschen etwa 1:3 passagiert, mit 10 bis 15 ml Volumen RPMI versetzt und zum Kultivieren in den Inkubator gegeben. Die neue Zellpassage wurde entsprechend registriert und wie beschrieben mit der Anzucht fortgefahren.

Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen in der Kulturflasche wie beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst und anschließend in Nährmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde mit dem Pipetboy aufgenommen und in ein 15 ml „Falcon“ Reagenzröhrchen (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Die Suspension wurde bei 2.000 Umdrehungen/min und 25°C für fünf min mit einer Zentrifuge (Jonan GR 422, Jonan, Unterhaching, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und mit zwei ml Nährmedium in das Falcon gegeben. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Schwenken sowie langsames auf und ab pipettieren resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden mit einer Mikropipette mit Aufsatz (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) entnommen und in 190 µl Trypanblau (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), befindlich in einem Well einer 96-Well-Platte (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland), gegeben und vermischt. Hiervon wurden 10 µl entnommen, in einen Zählbereich einer Neubauer Zählkammer (Brandt GmbH, Wertheim, Deutschland)

gegeben und die Zellen in mindestens zwei Großquadraten gezählt. Die abgebildeten Zellen wurden auf die in dem Falcon befindliche Volumenmenge proportional berechnet. Die Zelldichte wird durch folgende Formel ermittelt:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Zellzahl/Zahl der Großquadrate}) \times 2 \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$$

Durch die Trypanblaufärbung erscheinen vitale Zellen mit einer dunkelblau gefärbten Zellwand und avitale Zellen durch Defekte in der Membran homogen dunkelblau.(62) Aus der in dem Falcon befindlichen Zellsuspension wurden je 500.000 Zellen entnommen und in einem Volumen von 5 ml Nährmedium in jedes Well einer 6-Well-Platte (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gegeben und für 24 Stunden wie beschrieben inkubiert. Der Inkubator wurde entsprechend der Leitlinien mittels Badstabil-Lösung (NeoLab Migge, Heidelberg, Deutschland) keimarm gehalten.

### **3.1.3 Behandlung und quantitative Auswertung zu Versuchende mittels Trypanblau**

24 h vor jedem Versuch wurden die Zellen wie beschrieben angesetzt und inkubiert, um den Zellen die Möglichkeit zur Adhärenz zu geben. Zusätzlich wurde davon ausgegangen, dass nach der Passage avitale Zellen über Zellteilung ca. 1:1 ersetzt wurden, so dass bei Zugabe der Wirkstoffe 500.000 Zellen pro Well der 6-Well-Platte vorliegen. Unmittelbar bei Versuchsbeginn wurden die Überstände abpipetiert und damit die in Suspension befindlichen avitalen Zellen entfernt und durch neues Nährmedium ersetzt. Danach wurden die Zellen im Well mit dem zugeordneten Wirkstoff oder der Kontrolllösung versetzt und für die nach Protokoll vorgegebene Versuchsdauer von 24 h oder 48 h inkubiert. Am Ende der vorgegebenen Versuchsdauer wurden die Überstände entfernt, zentrifugiert und die verbliebenen Zellen mittels Trypanblau gefärbt und mikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die adhärennten Zellen wurden wie beschrieben abgelöst und ebenso quantitativ ausgewertet.

### **3.1.4 Behandlung und qualitative Analyse mittels Annexin-Assay**

Eine Annexin-V-Untersuchung erlaubt die Differenzierung avitaler Zellen. Apoptotische Zellen weisen frühzeitig eine Translokation des an der Innenseite der Zellmembran ständig lokalisierten Phospholipides Phosphatidylserin (PS) auf.(63) Bei dem angewendeten Annexin-V-Test werden die Zellen mit Annexin-V und einer

Propidiumjodid-Lösung (PI) inkubiert. Annexin bindet aufgrund seiner starken Affinität PS. Apoptotische Zellen lassen sich nun mittels flowzytometrischer Zweiparameteranalyse, Dotplot, als PI-negative und Annexin-V-positive Zellen mittels eines Annexin-V-Assays (Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland) wie in der Literatur und durch den Hersteller beschreiben detektieren (64). Die Auswertung der Durchflußzytometrie-Analyse erfolgte mittels dem Gerät Facscalibur (Franklin-Lakes, New Jersey, USA) und der Software Cell-Quest (BD Biosciences, Rockville, New Jersey, USA).

### **3.1.5 Herstellung und Kombination Zytostatika – Die Versuchsprotokolle**

Bei den Linien MeWo und SKMEL-28 wurde die Wirkung von Taurolidin allein und in Kombination mit in der klinischen Therapie gängigen Zytokinen untersucht. Bei den Zelllinien, die aus frisch exzidierten Melanomen von Patienten der Charité - Universitätsmedizin Berlin stammten, wurde lediglich die Wirkung von Taurolidin in steigenden Konzentrationen untersucht. Die Auswertung erfolgte quantitativ mittels Trypanblau und qualitativ über den Annexin-V-Assay.

#### **3.1.5.1 Taurolidin in steigenden Dosierungen**

Aus einer Taurolidin-Trockensubstanz (Geistlich Pharma, Wohlhusen, Schweiz) wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn eine 70 mM Stock Solution hergestellt. Die Lösung diente zur Herstellung verschiedener Konzentrationen. 19,9 mg Taurolidin wurde mit 1 ml destilliertem Wasser versetzt und aufgrund der geringen Löslichkeit 10 min bei 60°C in einem Wasserbad auf einem Thermoschüttler (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) vermengt. Anschließend wurde die Lösung durch einen Bakterienfilter (Braun, Melsungen, Deutschland) mit einer Porenweite von 0,22 µm gegeben und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Stock Solution wurde 1:10 verdünnt. Der Ansatz wurde nach jeder Versuchsreihe verworfen. Getestet werden sollten Taurolidinkonzentrationen von 50 bis 1.000 µM bei MeWo und SKMEL-28, sowie von 50 bis 1.500 µM bei den gewonnenen Patientenzelllinien.

#### **3.1.5.2 Taurolidin in Kombination mit therapeutisch genutzten Zytokinen**

Die Taurolidinlösung wurde, wie oben beschrieben, hergestellt. Es wurden Kombinationen von Taurolidin mit Interferon Alpha (IFN $\alpha$ ), Tumornekrosefaktor Alpha

(TNF $\alpha$ ), Interferon Gamma (IFN $\gamma$ ), Interleukin-1 Alpha (IL-1 $\alpha$ ) und Beta (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Transforming-Growth-Factor (TGF) untersucht. Sämtliche Zytokine wurden von der Firma PromoKine (Heidelberg, Deutschland) erworben. Die Herstellung für den Versuch erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die zur Überprüfung einer antineoplastischen Wirksamkeit verwendeten Dosierungen sind klinisch relevant und entsprechen ebenfalls klinisch angewandten Dosierungen. Da die Kombination von Taurolidin mit Zytokinen eine ausgesprochen große Versuchsvariation bedeutete, wurden Vorversuche durchgeführt. Hier zeigten sich unterschiedliche Ansprechraten der Melanomzellen auf die Zytokine. Für die Kombinationsuntersuchungen mit Taurolidin wurde lediglich die Zytokine mit der größten Ansprechrate ausgewählt.

## **3.2 In Vivo – Die Wirkung im Organismus**

### **3.2.1 Die Tiere**

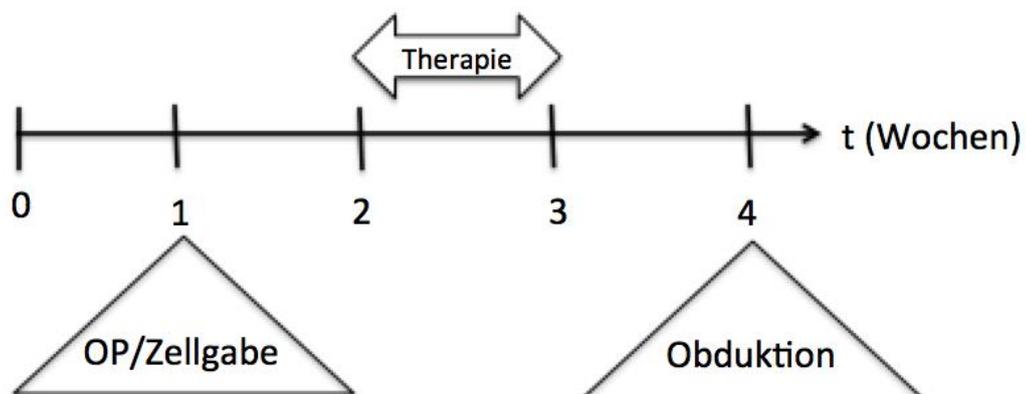
Nach Genehmigung des Versuchsvorhabens (Reg 0145/03) durch das Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo), wurden für die Versuche insgesamt 80, sechs Wochen alte weibliche Mäuse der Rasse C57BL6 (BFR, Berlin, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden zur Akklimatisierung sieben Tage vor dem geplanten Versuchsbeginn in einem für Kleinnager vorgesehenen Raum standardisiert untergebracht. Dort herrschten Temperaturen von 22° bis 24°C, 50 bis 60% Luftfeuchtigkeit und ein automatisierter zwölfstündiger Tag-Nach-Rhythmus. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und standardisiertem Laborfutter und wurden durch ausgebildetes Tierpflegepersonal betreut.

24 h vor der OP wurden die Tiere bei weiterhin freiem Wasserzugang nüchtern belassen. Die Operationen erfolgten in Vollnarkose. Die Sedierung und Analgesie erfolgten durch eine Mischung aus 75 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketanest (Serumwerk, Bernburg, Deutschland) und 10 mg/kg KG Rompun (Bayer, Leverkusen, Deutschland) die gewichtsadaptiert intraperitoneal injiziert wurden. Postoperativ wurden die Tiere für bis zu sechs Stunden engmaschig überwacht. Zudem wurden die Tiere über eine subkutane (s.c.) Injektion von 4 mg/kg KG Rimadyl (Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) analgetisch versorgt. Alle Eingriffe erfolgten nach dem Protokoll des LaGeSo und den Empfehlungen der UKCCR-Richtlinien (65).

### 3.2.2 Die Zelllinie

Als Tumorzelllinie wurde die syngenetische Melanomzelllinie B16 B78 D14 (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. J. Becker, Dermatologische Klinik, Universitätsklinikum Würzburg, Deutschland erhalten) verwandt. B78 D14 entstand aus der B16 Melanomzelllinie über Transfektion der Gene, die für  $\beta$ -1,4-N-Acetylgalactosaminyltransferase und  $\alpha$ -2,8-Sialyltransferase codieren. Hierdurch kommt es zur Expression der Ganglioside  $G_{D2}$  und  $G_{D3}$ . Die entstandene Melanomzelllinie wächst aggressiv (66). Die Zellen wurden mit RPMI-Medium versetzt und mit 0,5% Penicillin-Streptomycin und 10% FCS kultiviert. Um die gewünschte Anzahl an Tumorzellen für die Versuche zu erhalten, wurden die Zellsuspensionen zweimal mit PBS-Puffer gespült, anschließend mit Trypsin/EDTA versetzt und für zwei Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Neutralisierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe von ca. fünf ml RPMI ohne FCS, um Fremdantigene zu vermeiden. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 2.000 Umdrehungen pro min fünf min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das verbliebene Zellpellet in einem definierten Volumen resuspendiert. Die Prüfung der Vitalität der Tumorzellen sowie die Zellzählung erfolgten erneut in der Neubauer Zählkammer nach der Trypanblau-Methode. Nach Auszählung der Zellen erfolgte die Verteilung der Zellen in 1,0 ml Eppendorfgefäße. Die Gefäße verblieben bis unmittelbar vor ihrer Nutzung im Brutschrank. Davor wurden sie durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert (67).

### 3.2.3 Das Studiendesign und Übersicht über die Therapiegruppen



Die Anlieferung der Tiere erfolgte am Tag 0 (Erst am nächsten Tag ist der Tag 1). Die Mäuse hatten 7 Tage Akklimatisierungszeit. Am Tag 7 wurden die Tiere in Narkose versetzt. Hierbei erfolgte gleichzeitig die Randomisierung und die erste Körpergewichtsbestimmung. Die Therapie begann am 14. Tag und endete am 21. Tag. Am 28. Tag wurden die Tiere mittels Narkose und CO<sub>2</sub>-Überdosierung erlöst, das Körpergewicht bestimmt und von einem „geblindeten“ Untersucher in Hinblick auf Tumorausbreitung und -wachstum obduziert.

Um die Abhängigkeit des Tumorwachstums von der Dosierung und der Applikationsform von Taurolidin zu untersuchen, wurden die Versuchsgruppen wie folgt aufgebaut:

**Gruppe A (intraperitoneale (i.p.) Infusionstherapie; 2 x täglich 7 Tage):**

1	Kontrollgruppe	Therapie mit Ringerlaktat (n=10)
2	Taurolidin 1%	entspricht 100 mg/kg KG (n=10)
3	Taurolidin 2%	entspricht 200 mg/kg KG (n=10)
4	Taurolidin 3%	entspricht 300 mg/kg KG (n=10)

**Gruppe B (intravenöse (i.v.) Infusionstherapie; 4 x Bolusinjektion innerhalb von 7 Tagen):**

5	Kontrollgruppe	Therapie mit Ringerlaktat (n=10)
6	Taurolidin 1%	entspricht 100 mg/kg KG (n=10)
7	Taurolidin 2%	entspricht 200 mg/kg KG (n=10)
8	Taurolidin 3%	entspricht 300 mg/kg KG (n=10)

Die gewünschten zu applizierenden Konzentrationen von Taurolidin ergaben entsprechend des Gewichtes der Mäuse von 25 g ein Injektionsvolumen von 0,25 ml. Dieses geringe Volumen konnte durch eine „Insulinspritze“ sicher appliziert werden. Um eine systemische Erkrankung am effektivsten zu behandeln, wäre die i.v. Injektion die ideale Therapie. Hier hätte man eine Aufnahme der Wirksubstanz von nahe 100% im Verteilungsraum. Da sich die i.v. Injektion aufgrund der Größe der Tiere als technisch äußerst schwierig erwies, musste von der 2 x täglichen Therapie (7 Tage) Abstand genommen werden. Es wurde nach Genehmigung des LaGeSo viermal durch Bolusapplikation injiziert. Die Injektion erfolgte über die Schwanzvene der Tiere. Diese Injektion erfolgte sehr langsam über etwa 60 Sekunden um vagotone Effekte und Dyspnoe der Tiere zu verhindern.(67) Bei der i.p. Injektion kann aufgrund der uns

vorliegenden kinetischen Untersuchungen von einer vollständigen Resorption der Substanz über das Peritoneum ausgegangen werden. Die Dokumentation erfolgte auf standardisierten und jedem einzelnen Tier zugeordneten Dokumentationsbögen.

#### **3.2.4 Die Wirkstoffe**

Als Kontrollgruppe diente isotone 0,9%ige Ringerlaktatlösung (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) Es wurden verschiedene Konzentrationen von Taurolidin entsprechend der Therapiegruppen, siehe oben, angewandt. Die 2%ige Lösung (Geistlich Pharma, Schweiz) wurde direkt vom Hersteller bezogen. Um eine 1%ige Lösung herzustellen wurde die 2%ige Lösung mit Ringerlaktatlösung 1:1 verdünnt. Die 3%ige Lösung wurde aus der pulverisierten Reinsubstanz (Geistlich Pharma, Schweiz) und Polyvinylpyrrolidone (PVP-17) steril nach Herstellerangaben hergestellt. So wurde die Reinsubstanz in destilliertem Wasser suspendiert und für 10 min in einem Wasserbad bei 60°C geschüttelt. Nachdem die Lösung durch einen Bakterienfilter von 0,22 µm (Braun, Melsungen, Deutschland) gespült wurde. Die Lösungen wurden vor jeder Behandlung hergestellt, da sich zum Beispiel die die 3%ige Lösung als instabil erwies und auskristallisierte. Die Beobachtungen sind regelrecht, da 3% die Löslichkeitsgrenze darstellt.(68)

#### **3.2.5 Die Operationsmethodik**

Ziel war es, den Einfluss einer intravenösen versus intraperitonealen Therapie mit steigenden Konzentrationen von Taurolidin (1%, 2%, 3%) auf das subkutane und intraperitoneale Tumorwachstum an der C57BL6 Maus zu untersuchen.

Alle operativen Eingriffe erfolgten, wie beschrieben, unter gewichtsabhängiger Allgemeinnarkose von Ketamin und Rompun, wie von den Herstellern empfohlen.

Nachdem die Tiere narkotisiert wurden, wurde das Operationsfeld rasiert und mit Braunol (Braun, Melsungen, Deutschland) steril abgewaschen. Die Tiere wurden auf einer Wärmematte gelagert und steril abgedeckt, um eine Auskühlung zu verhindern. Eine fetthaltige Augensalbe (Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland) wurde zum Schutz auf die während der Narkose geöffneten Augen der Tiere appliziert. Im Anschluss wurde über eine etwa 1 cm lange mediane Laparotomie das Abdomen eröffnet und die Milz mobilisiert. Nachdem selbige hervorluxiert wurde, injizierten wir 1,5 Millionen Zellen in

100 µl purerem RPMI Nährmediums mittels einer 27-Gauge Nadel (Braun, Melsungen, Deutschland) unter die Milzkapsel über eine Zeitdauer von 60 Sekunden (69). Die Bauchwand wurde anschließend mittels einer fortlaufenden 4/0 Vicryl-Naht und einem Flüssigpflaster (Johnson&Johnson, Neuss, Deutschland) verschlossen. Im Anschluss injizierten wir eine  $10^6$  Tumorzellen s.c. in die Nackenfalte der Tiere, um Fernmetastasen zu simulieren (69). Der postoperative Schmerz wie beschrieben mit einer errechneten und adäquaten s.c. Injektion von Rimadyl abgedeckt. Die Tiere wurden drei Stunden postoperativ engmaschig überwacht und ein Verlust der Körperwärme durch Abdecken und eine Wärmematte verhindert.

### **3.2.6 Die Obduktion**

Am 21. postoperativen Tag wurden alle Tiere mittels Kohlendioxidnarkose getötet und von einem geblindeten Untersucher obduziert. Das Gewicht der Tiere wurde zuvor bestimmt. Danach wurde das Gebiet um den Nackentumor untersucht. Hierzu wurde nach Palpation der Region ein Kreuzschnitt am Nacken und in Höhe der Schulterblätter durchgeführt. Auch für die Untersuchung der Bauchhöhle wurde ein Kreuzschnitt (paramediane und quere Laparotomie) benötigt. Nach Exploration des Bauchraumes wurde der Thorax durch eine Sternotomie untersucht. Bei der Obduktion wurde die Anzahl der s.c. und i.p. Metastasen untersucht und diese entfernt. Das Gesamtgewicht der Metastasen i.p. und s.c. wurde ebenso wie die Anzahl der Metastasen erfasst. Weiterhin wurde auf Ulzerationen, besonders der s.c. Metastasen, aber auch auf Aszites, Nekrose und Organzerfall geachtet.

## **3.3 Die Dokumentation und die statistische Auswertung**

### **3.3.1 In Vitro**

Für die einzelnen Versuche wurden standardisierte Dokumentationsbögen erstellt, in denen neben Zellzahl, Inkubationszeit auch Zelltod in Überstand, der adhären Zellen und der Gesamtzellzahl sowie bei der qualitativen Auswertung auch der Prozentsatz apoptotischer Zellen erfasst wurde. Die Rohdaten wurden von einer Person in das Statistikprogramm SPSS 19.0 (IBM, USA) eingegeben. Die Untersuchung erfolgte mittels Post-hoc-Test nach Scheffé sowie univariater Varianzanalyse. Als statistisch signifikant

galt ein Wert  $p < 0,05$ . Für die Analyse der komplexen Vergleiche von Taurolidin und den Zytokinen, Interferon-alpha ( $IFN\alpha$ ) und Tumornekrosefaktor-alpha ( $TNF\alpha$ ), sowie deren Kombination wurde 95% Konfidenzintervalle für die Unterschiede zwischen den Gruppen in Excel 16.4 (Microsoft, USA) errechnet. Hierzu wurde ein zweiseitiges Konfidenzintervall berechnet aus dem Student-T Test benutzt.

### **3.3.2 In Vivo**

Die Tiere wurden nach der Zellapplikation (Tag 7) in die einzelnen Behandlungsgruppen randomisiert und durch allgemein akzeptierte Ohrmuschelstanzen während der Allgemeinnarkose gekennzeichnet. Für jedes Tier wurde ein Protokoll erstellt, in dem der Identifikationsnummer des Tieres, Aufnahme- und OP-Datum, Tumorlokalisierung und Tumorgroße erfasst wurden.

Die statistische Auswertung mittels SPSS 19.0 erfolgte daher nicht parametrisch. Zunächst wurde mittels Kruskal-Wallis-Test für  $k$  unabhängige Stichproben auf Unterschiede zwischen den Gruppen geprüft. Der direkte Vergleich nicht normalverteilter Daten einzelner Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Eine Bonferroni-Korrektur wurde durchgeführt. Für kategorische Daten verwandten wir den Fisher`s-exakt-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p = 0,05$  festgesetzt. Die Daten wurden grafisch mittels Box-Whisker-Plots dargestellt.

Die Literaturrecherche erfolgte über PubMed, Uptodate-Online und Google. Die statistische Auswertung der In Vitro und In Vivo Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie der Charité - Universitätsmedizin, Campus Mitte.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Untersuchung des Einflusses von Taurolidin sowie verschiedener Zytokine auf das Maligne Melanom in vitro**

Initial war das Ziel die Wirkung von Taurolidin als Mono- und Kombinationstherapie mit gängigen, in der Melanomtherapie erprobten, Zytokinen zu untersuchen. Die Kombinationstherapie, da es sich um eine Pilotstudie handelt, wurde zu diesem Zeitpunkt nur in vitro untersucht. Des Weiteren wurde in vitro untersucht, ob der Zelltod durch Apoptose induziert wurde, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass Taurolidin proapoptisch wirken soll.

#### **4.1.1 Behandlung verschiedener Zelllinien des malignen Melanoms mit Taurolidin als Monotherapie**

Es wurde zunächst der Einfluss von steigenden Konzentrationen von Taurolidin auf die Vitalität der Zelllinien SKMEL und MeWo untersucht.

Dies geschah sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Inkubationszeit. Untersucht wurde die Gesamtavitalität in Prozent (avgespro), welche als Summe der avitalen Zellen des Überstandes und der adhärenenten Zellen definiert wurde.

Vergleicht man innerhalb der Inkubationszeiten die steigenden Konzentrationen paarweise miteinander und untersucht dies statistisch mit dem Post-hoc-Test nach Scheffé, zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Avitalität zwischen jeder Konzentration sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Inkubation (Abb. 4). Dies wird graphisch auch durch die Darstellung des Mittelwertes der Gesamtavitalität plus Standardabweichung noch deutlicher (Abb. 5).

Mittels einer Univarianzanalyse wurde zudem der Einfluss von Konzentration und Inkubationszeit sowie der wechselseitige Einfluss untersucht (Tab. 1). Hier zeigte sich ebenfalls, dass sowohl die Konzentration als auch die Inkubationszeit und deren gegenseitige Wechselwirkung signifikanten Einfluss auf den Anstieg des Zelltodes in Prozent hatten.

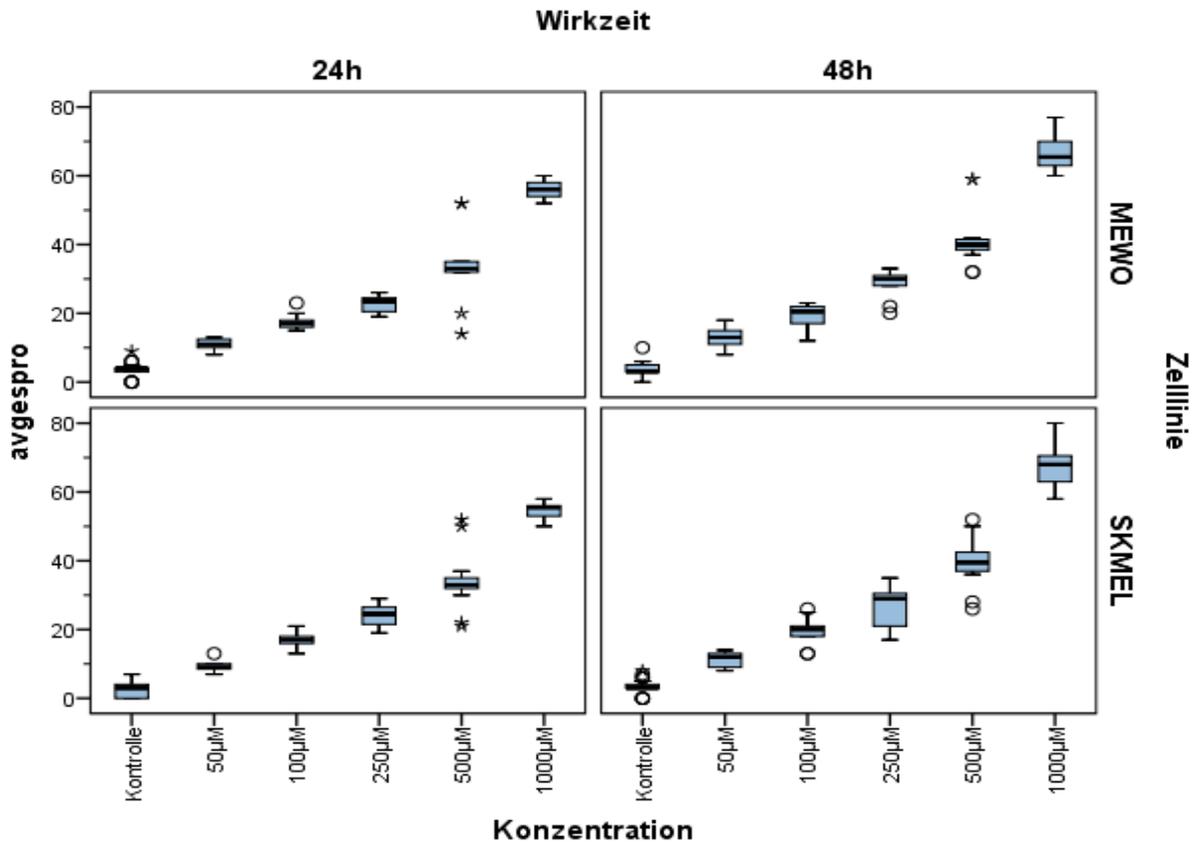


Abb. 4: Der prozentuale Anteil avitaler Zellen insgesamt (avgespro) unterteilt in Inkubationszeit 24 (linke Spalte) versus 48 Stunden (rechte Spalte) sowie für die jeweilige Zelllinie (oben MEWO, unten SKMEL). In beiden Gruppen der Inkubationszeit steigt der prozentuale Anteil avitaler Zellen signifikant mit steigender Konzentration von Taurolidin. Dies gilt für beide Zelllinien. Die Sterne zeigen Ausreißer aus der festgelegten Standarddeviation an. Die Kreise zeigen Werte die gerade noch in der Standarddeviation befindlich waren.

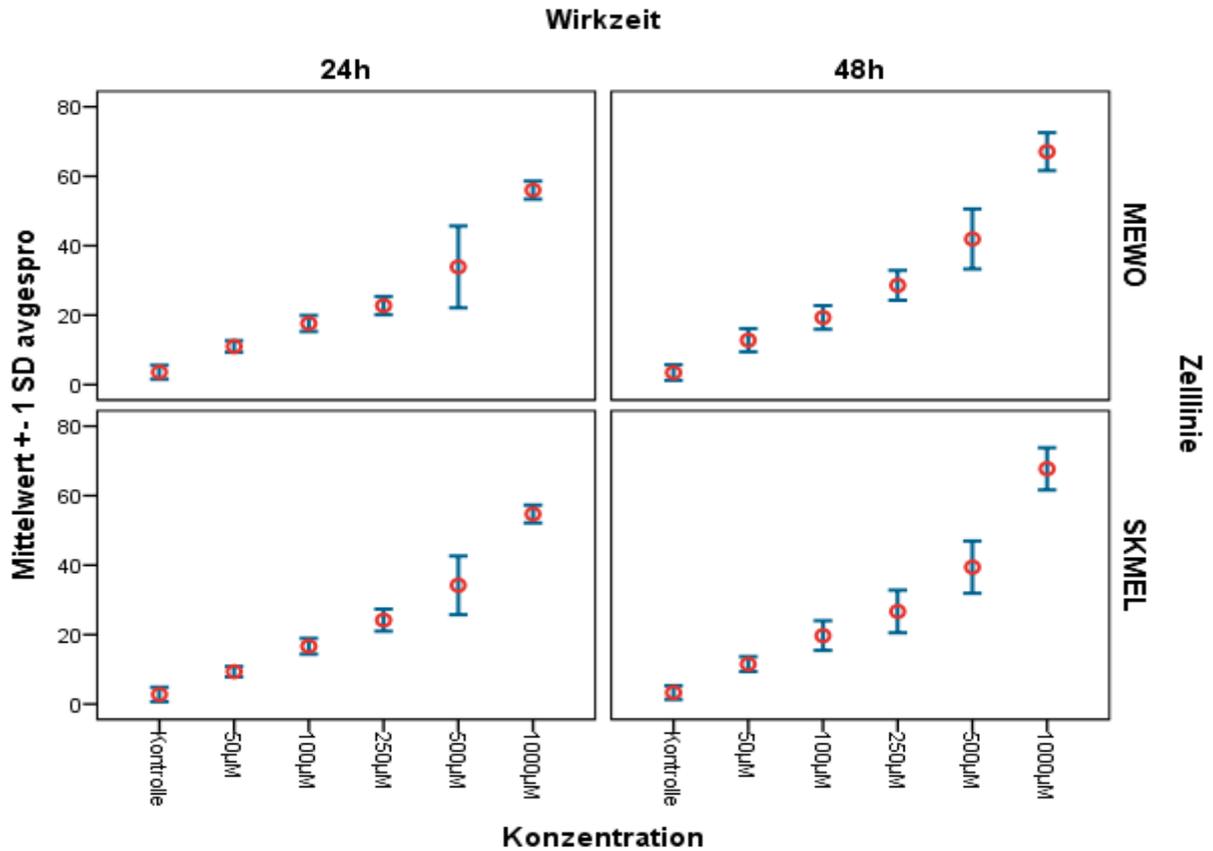


Abb. 5: Darstellung der Standardabweichung des Mittelwertes der gesamten avitalen Zellen in Prozent. Auch hier wird die Signifikanz unter den Gruppen der steigenden Konzentration innerhalb der Inkubationszeit deutlich.

				Quadratsumme vom Typ						
Zelltyp				III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.		
in vitro	500000	Tauroidin	MEWO	Korrigiertes Modell	62362,516 <sup>a</sup>	11	5669,320	251,254	.000	
				Konstanter Term	93913,729	1	93913,729	4162,079	.000	
				konz	59699,718	5	11939,944	529,156	.000	
				wz	747,259	1	747,259	33,117	.000	
				konz * wz	645,360	5	129,072	5,720	.000	
				Fehler	3204,108	142	22,564			
				Gesamt	144296,000	154				
				Korrigierte Gesamtvariation	65566,623	153				
			SKMEL	Korrigiertes Modell	68234,490 <sup>b</sup>	11	6203,135	326,975	.000	
				Konstanter Term	105975,635	1	105975,635	5586,106	.000	
				konz	67568,591	5	13513,718	712,325	.000	
				wz	773,531	1	773,531	40,774	.000	
				konz * wz	729,417	5	145,883	7,690	.000	
				Fehler	3073,349	162	18,971			
Gesamt	161250,000	174								
Korrigierte Gesamtvariation	71307,839	173								

Tab. 1: Univarianzanalyse des Einflusses von Inkubationszeit, Konzentration von Tauroidin und der gegenseitigen Wechselwirkung. Alle drei Faktoren hatten einen signifikanten Einfluss auf die Avitalität der Zellen in beiden Zelllinien ( $p < 0.001$ ). Dies ist rot unterlegt.

#### **4.1.2 Behandlung verschiedener Zelllinien des malignen Melanoms mit Taurolidin und ausgesuchten Zytokinen als Kombinationstherapie**

In einem weiteren Schritt wurde die Wirkung von Taurolidin sowie der in der Klinik benutzten Zytokine,  $\text{IFN}\alpha$  und  $\text{TNF}\alpha$ , als Monotherapie und in Kombination nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit gegen die kommerziell erwerblichen Zelllinien MEWO und SKMEL untersucht. Die Dosierung von Taurolidin war mit 100 und 500  $\mu\text{M}$  steigend. Die Dosen von  $\text{IFN}\alpha$  und  $\text{TNF}\alpha$  waren auf 100 U/ml festgelegt.

Aufgrund der Komplexität und der teils geringen Testgröße von  $n=4$  in einigen Zytokingruppen erfolgte die Darstellung als Mittelwert plus Standarddeviation (SD) der prozentualen Anzahl aller avitalen Zellen (avgespro) nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit (Abb. 6 und 7). Darüber hinaus wurde die statistische Signifikanz mittels zweiseitigem Konfidenzintervall (95%) über einen Student-t-Test untersucht. Es wurden alle Gruppen untereinander im Komplex jeweils einer Inkubationszeit, 24 oder 48 Stunden, untersucht.

Es zeigte sich, dass die Monotherapie von Taurolidin der Monotherapie beider Zytokine,  $\text{IFN}\alpha$  und  $\text{TNF}\alpha$ , und deren Kombination signifikant überlegen war. Insgesamt war jedoch die Kombination von Taurolidin und  $\text{IFN}\alpha$  allen anderen Gruppen signifikant überlegen. Hingegen war eine Kombination von Taurolidin mit  $\text{TNF}\alpha$  nur der Monotherapie von Taurolidin und nur in der Kombination der Dosis von 500  $\mu\text{M}$  Taurolidin nach 48 Stunden der Monotherapie mit Taurolidin überlegen. Sie war jedoch signifikant schlechter als die Kombination von Taurolidin und  $\text{IFN}\alpha$ . Eine Kombination mit beiden Zytokinen war zwar der Monotherapie mit Taurolidin signifikant überlegen, jedoch der Therapie mit Taurolidin und  $\text{IFN}\alpha$  unterlegen. Ein zeitlicher Vorteil, 24 versus 48 Stunden, für den Therapieerfolg gab es nur bei der Kombination von 500  $\mu\text{M}$  Taurolidin und 100 U/ml  $\text{TNF}\alpha$ . Alle anderen Therapien zeigten keinen Vorteil durch verlängerte Inkubation.

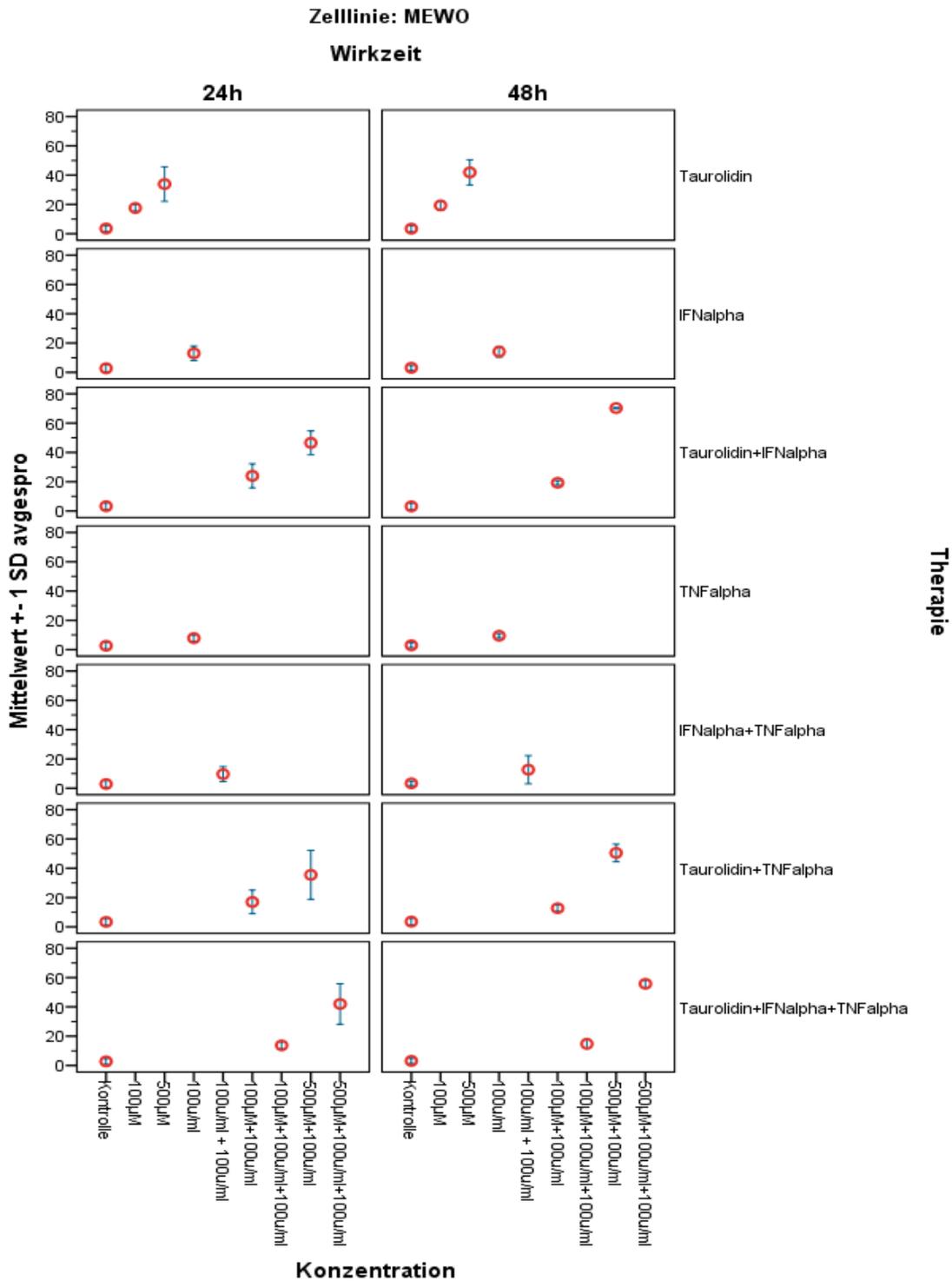


Abb. 6 Der Einfluss von Taurolidin,  $IFN\alpha$  und  $TNF\alpha$  als Mono- und Kombinationstherapien auf die Zelllinie MEWO. Der dargestellte Mittelwert plus Standarddeviation der Avitalität in Prozent verdeutlicht klar, dass die Kombination von Taurolidin und  $IFN\alpha$  allen anderen Gruppen sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden

klar überlegen war. Dies wurde auch mittels zweiseitiger Konfidenzintervall Analyse gezeigt.

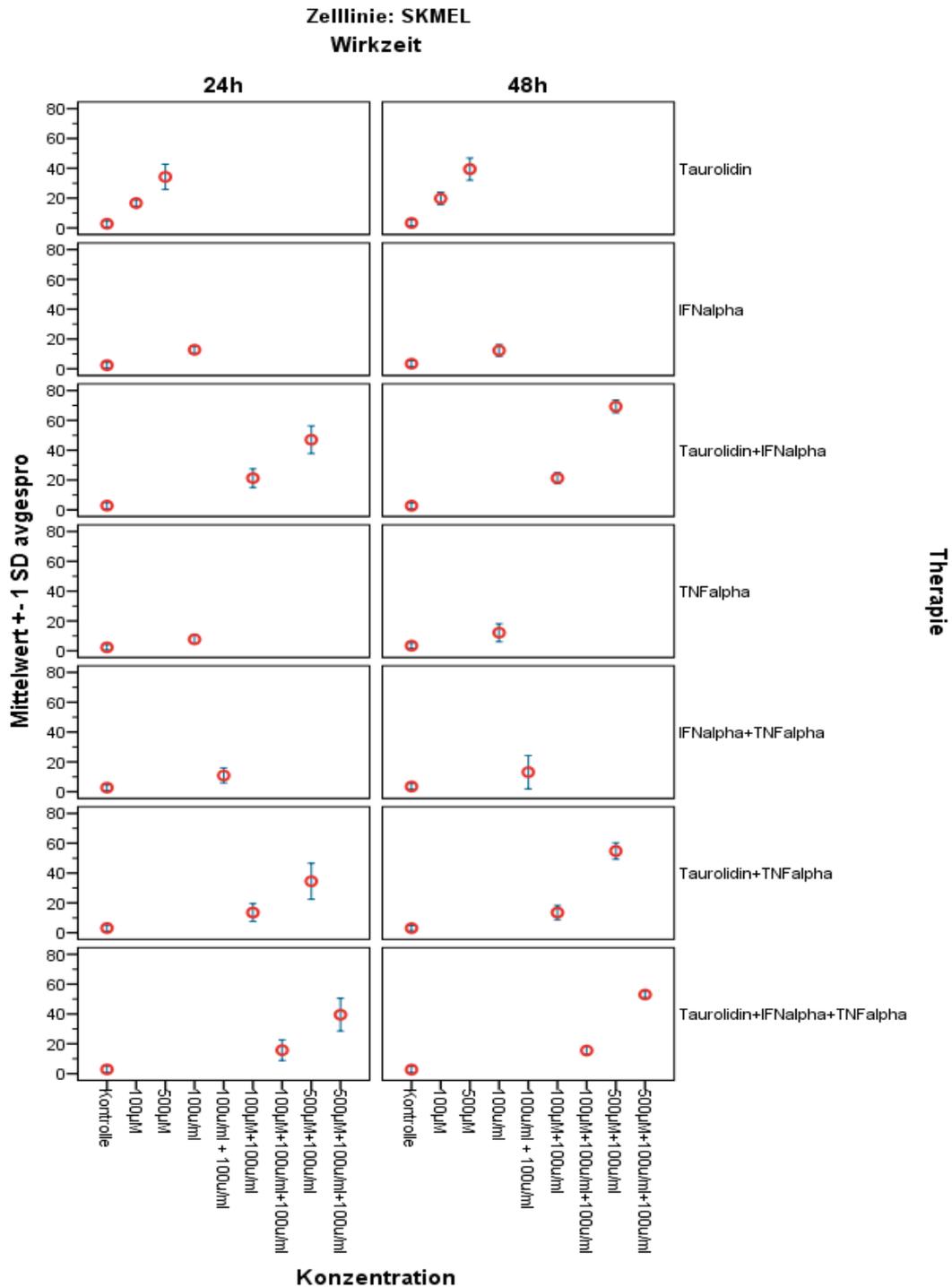


Abb. 7: Der Einfluss von Taurolidin,  $IFN\alpha$  und  $TNF\alpha$  als Mono- und Kombinationstherapien auf die Zelllinie SKMEL. Der dargestellte Mittelwert plus Standarddeviation der Avitalität in Prozent verdeutlicht klar, dass die Kombination von

*Taurolidin und IFN $\alpha$  allen anderen Gruppen sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden klar überlegen war. Dies wurde auch mittels zweiseitiger Konfidenzintervall Analyse gezeigt.*

#### **4.1.3 Untersuchung der Induktion der Apoptose durch die Therapie von Taurolidin sowie verschiedener Zytokine**

Als Abschluss der in vitro Versuche stellte sich die Frage, ob Taurolidin, wie in der Literatur angegeben vornehmlich Apoptose induziert. Dies wurde mittels Flowzytometrie unter Benutzung des Annexin-V Assays untersucht. Zusätzlich wurden neben den kommerziellen Zelllinien, MEWO und SKMEL, auch 8 Zelllinien von frisch operierten Patienten der Charité untersucht. Sowohl die Zelllinien der Patienten (Patientenzelllinien) als auch die Zelllinien MEWO und SKMEL (kommerzielle Zelllinien) wurden zusammengefasst und als Gruppe evaluiert, um die Anzahl untersuchter Proben zu erhöhen. Die Signifikanzanalyse erfolgte vergleichbar zu 4.1.2 mittels zweiseitigem Konfidenzintervall (95%) über einen Student-t-Test. Die Therapiegruppen waren Taurolidin Monotherapie 50, 100, 250, 500, 1000 und 2000  $\mu\text{M}$  sowie in Kombination mit 100 U/ml IFN $\alpha$  und TNF $\alpha$ .

Es zeigte sich auch in unserem Annexin-V Assay, dass mit steigenden Dosen von Taurolidin die Vitalität abnimmt und ab einer Dosis von 1000  $\mu\text{M}$  gegen null tendiert (Abb. 8). Die Kombination mit IFN $\alpha$  und TNF $\alpha$  verlief nahezu symmetrisch und zeigte insgesamt keinen signifikanten Vorteil in dem Assay in Hinblick auf die Vitalität der Zellen (Abb. 8). Des Weiteren hatte die Inkubationszeit einen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Insofern war eine Zeit von 48 Stunden Inkubation am stärksten zytotoxisch bei der Therapie mit Taurolidin. Bei den Zytokinkombinationen erwies sich dieser Effekt als weniger stark und war nur bei Taurolidin 250 und 500  $\mu\text{M}$  plus IFN $\alpha$  signifikant. TNF $\alpha$  wurde nur in den Zeiten 12 und 24 Stunden untersucht und zeigte nur bei 2000  $\mu\text{M}$  plus TNF $\alpha$  eine Signifikanz (Abb 8). Die Patientenzelllinien waren allgemein deutlich sensibler gegenüber einer Monotherapie von Taurolidin. Sie wurden nur mit 12 und 24 Stunden Inkubationszeit und ohne Zytokine untersucht. Bereits nach 12 Stunden und einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  tendierte die Vitalität gegen null.

Es ist somit festzuhalten, dass auch in diesem Assay die Zytotoxizität der Monotherapie signifikant dosis- und zeitabhängig ist und eine Kombination nur mit IFN $\alpha$  supportiv erscheint.

In Abbildung neun (Abb. 9) wird darüber hinaus die Apoptose als Teil der avitalen Zellen dargestellt. Die Aufteilung ist ähnlich derer der Vitalität. Es zeigt sich, dass der Anteil apoptotischer Zellen initial steigt und bei 500  $\mu\text{M}$  Monotherapie Taurolidin die Spitze erreicht und dann abfällt. Die Zeit spielt nur bedingt einer Rolle in diesem Unterschied, da sie nahezu simultan in den verschiedenen Dosen verläuft (Abb. 9). Die Kombination mit Zytokinen flacht die Kurve durchgehend ab, was als grundsätzliche Abnahme der Apoptose als Art des Zelltodes zu sehen ist (Abb. 9).

Abbildung zehn (Abb. 10), die den Anteil der Nekrose als zweiter Art des Zelltodes untersucht, zeigt, dass die Rate nach einer Dosis von 500  $\mu\text{M}$  Taurolidin steil ansteigt. Die Zeit spielt ebenfalls nur bedingt eine Rolle und ist nur in höheren Dosen für eine Signifikanz verantwortlich. Die Kombination mit Zytokinen sorgt für einen konstanten Anteil von Nekrose als Art des Zelltodes mit nur geringer Dosisabhängigkeit (Abb. 10). Somit bleibt festzuhalten, dass eine höhere Dosis und längere Inkubationszeit mit Taurolidin als Monotherapie Nekrose als Zelltod induziert und die Kombination mit Zytokinen die Apoptose als Art des Zelltodes verdrängt.

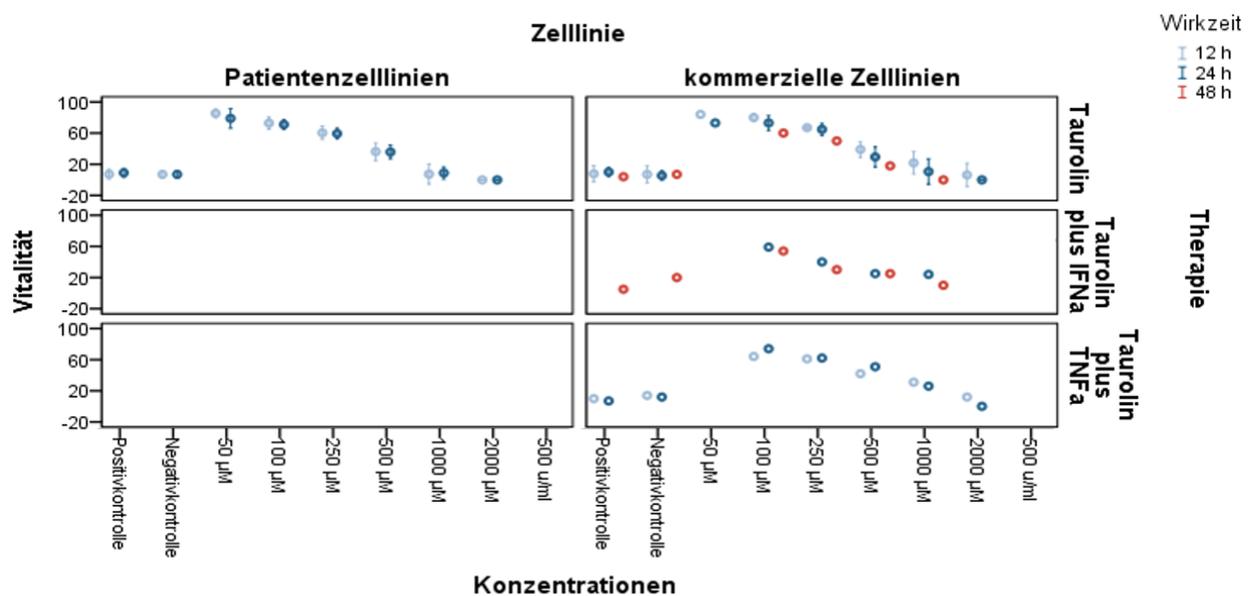


Abb. 8: Darstellung der Mittelwerte und Standarddeviation der prozentualen Anteile vitaler Zellen anhand des Annexin-V Assays. Die linke Spalte zeigt die Ergebnisse der Patientenzelllinien, die rechte den Mittelwert und Standarddeviation der Zelllinien MEWO und SKMEL. Die oberste Reihe zeigt die Monotherapie mit Taurolidin in nach recht steigenden Dosen, die mittlere Reihe die Kombination einiger Dosen mit IFN $\alpha$  und die unterste die Kombination mit TNF $\alpha$ . Die Inkubationszeiten waren 12, 24 und 48 Stunden

in der Monotherapie mit Taurolidin. Es zeigt sich eine dosis- und inkubationszeitabhängige Abnahme der Vitalität sowie ein nur in einer Kombination mit  $IFN\alpha$  eine signifikante Abnahme der Vitalität, wobei die Inkubationszeit nur bei 1000  $\mu M$  und  $IFN\alpha$  eine signifikante Rolle in der Kombinationstherapie spielte. Die Kombination mit  $TNF\alpha$  war nur minimal supportiv.

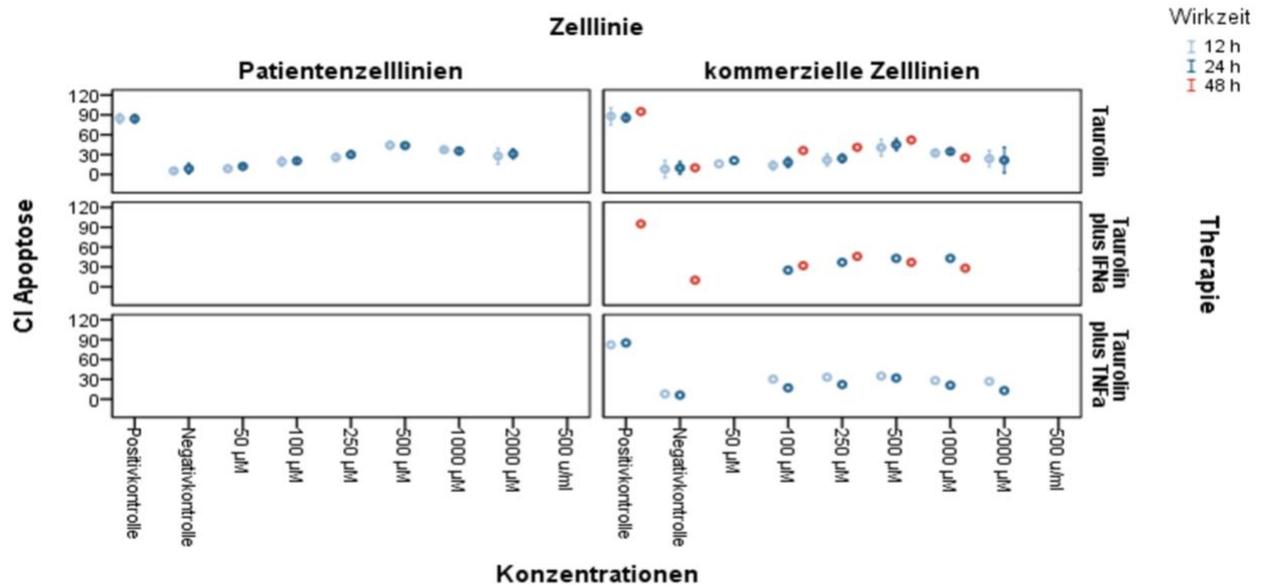


Abb. 9: Darstellung der Mittelwerte und Standarddeviation der prozentualen Anteile apoptotischer Zellen anhand des Annexin-V Assays. Die linke Spalte zeigt die Ergebnisse der Patientenzelllinien, die rechte den Mittelwert und Standarddeviation der Zelllinien MEWO und SKMEL. Die oberste Reihe zeigt die Monotherapie mit Taurolidin in nach recht steigenden Dosen, die mittlere Reihe die Kombination einiger Dosen mit  $IFN\alpha$  und die unterste die Kombination mit  $TNF\alpha$ . Die Inkubationszeiten waren 12, 24 und 48 Stunden in der Monotherapie mit Taurolidin. Es zeigt sich eine initiale Zunahme der Apoptose bis zu einer Dosis von 500  $\mu M$  Taurolidin, wonach die Apoptoserate absank. Die Kombination mit beiden Zytokinen hatte ebenso wie die Inkubationszeit nur einen geringen Einfluss, da die Apoptoserate nahezu konstant niedriger als bei der Monotherapie mit Taurolidin blieb.

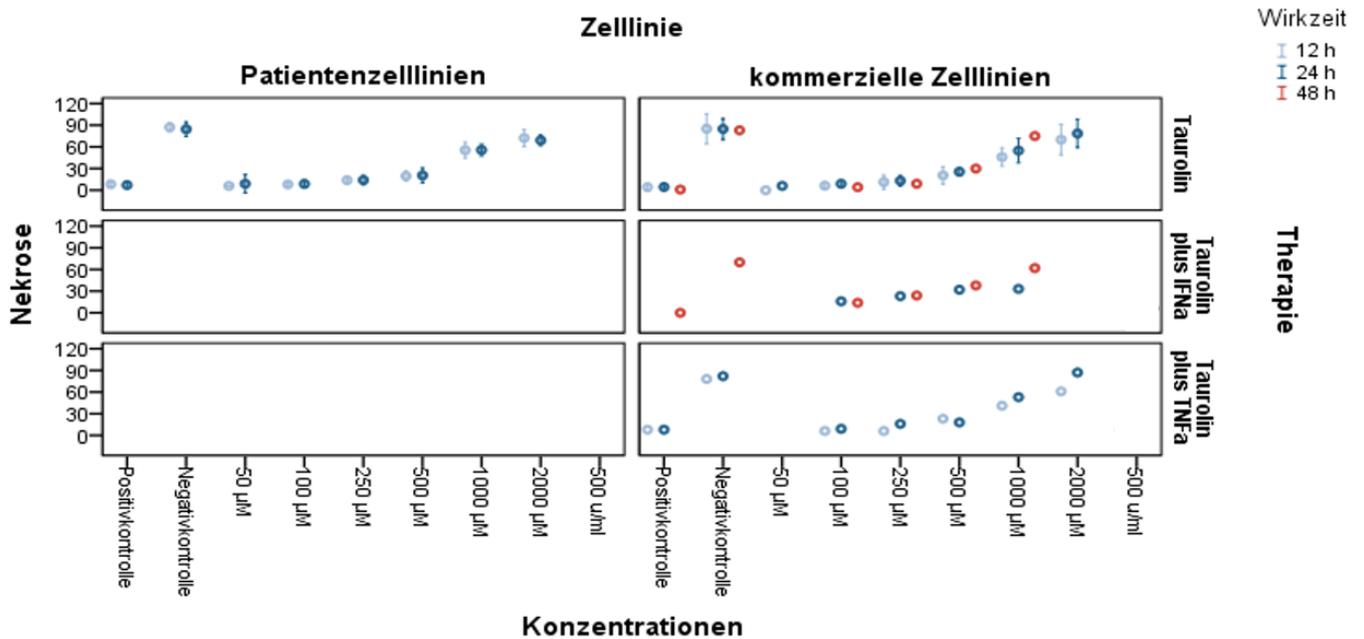


Abb. 10: Darstellung der Mittelwerte und Standarddeviation der prozentualen Anteile nekrotischer Zellen anhand des Annexin-V Assays. Die linke Spalte zeigt die Ergebnisse der Patientenzelllinien, die rechte den Mittelwert und Standarddeviation der Zelllinien MEWO und SKMEL. Die oberste Reihe zeigt die Monotherapie mit Taurolidin in nach rechts steigenden Dosen, die mittlere Reihe die Kombination einiger Dosen mit IFN $\alpha$  und die unterste die Kombination mit TNF $\alpha$ . Die Inkubationszeiten waren 12, 24 und 48 Stunden in der Monotherapie mit Taurolidin. Es zeigt sich eine initiale Zunahme der Nekrose ab einer Dosis von 500  $\mu$ M Taurolidin. Die Kombination mit beiden Zytokinen hatte ebenso wie die Inkubationszeit einen geringeren Einfluss.

#### 4.2 Der Einfluss Taurolidins auf das maligne Melanom im Mausmodell

Im finalen Schritt dieser Studie wurde der Einfluss steigender Dosen Taurolidins nach intravenöser (i.v.) sowie intraperitonealer (i.p.) Therapie auf das subkutane und intraperitoneale Tumorwachstum untersucht und gegenübergestellt. Die Tabellen 2 und 3 geben eine Übersicht über die Ergebnisse und beschreiben deskriptiv das Tumorgesamtgewicht, das intraperitoneal sowie subkutane Tumorgewicht, aber auch die Anzahl der Metastasen und die Körpergewichte der Tiere zu Beginn des Versuches und am Ende für die intraperitoneale Applikation der Wirkstoffe (Tab. 2) und für die intravenöse Applikation (Tab. 3). Dargestellt sind die Medianwerte und ihre Spannweiten.

In den weiteren Kapiteln von 4.2 werden wir detailliert und graphisch auf die Ergebnisse und deren potentielle Signifikanz eingehen. Die Ergebnisse wurden bereits partiell publiziert (67).

Therapie i.p.	Tumorgesamtgewicht	Intraperitoneales Tumorgewicht	Subkutanes Tumorgewicht	Metastasenanzahl	Ausgangsgewicht	Autopsiegewicht
Kontrollgruppe (Ringerlaktat)	2.17 (1.74-2.9)	1.48 (1.1-2.02)	0.62 (0.04-1.8)	12 (5-27)	21.2 (16.7-22.4)	21.4 (19.9-22.0)
1% TRD	1.10 (0.64-2.03)	0.68 (0.24-1.34)	0.40 (0.1-0.71)	3.5 (2-30)	20.0 (19.5-25.3)	21.8 (21.1-25.8)
2% TRD	1.15 (0.27-2.55)	0.97 (0.19-1.47)	0.05 (0.0-1.5)	2.5 (2-3)	20.3 (19.2-21.6)	20.4 (19.5-22.4)
3% TRD	0.37 (0.09-2.1)	0.11 (0.0-0.87)	0.28 (0.0-1.24)	2 (1-2)	21.3 (19.7-22.2)	20.8 (18.7-22.8)

*Tab 2: Intraperitoneale Applikation. Dargestellt sind die einzelnen Tumorgewichte gruppiert nach gesamt, i.p. und s.c. sowie Metastasenanzahl und das Tiergewicht zu Beginn und zur Obduktion. Die Werte sind als Median und Spannweite angegeben. Die Gewichte sind in Gramm (g) angegeben.*

Therapie i.v.	Tumorgesamtgewicht	Intraperitoneales Tumorgewicht	Subkutanes Tumorgewicht	Metastasenanzahl	Ausgangsgewicht	Autopsiegewicht
Kontrollgruppe (Ringerlaktat)	2.66 (1.3-3.87)	1.02 (0.5-2.04)	1.69 (0.6-2.20)	19.5 (5-25)	19.0 (17.0-22.0)	18.8 (13.9-22.9)
1% TRD	1.29 (0.57-2.7)	0.44 (0.07-2.25)	0.63 (0.37-1.64)	19 (2-36)	19.2 (16.5-21.1)	19.0 (16.3-22.0)
2% TRD	1.41 (0.53-2.65)	0.90 (0.53-1.75)	0.65 (0.12-0.9)	12.5 (4-34)	20.2 (18.6-21.3)	19.9 (18.6-22.0)
3% TRD	1.02 (0.45-2.0)	0.40 (0.02-1.20)	0.64 (0.39-0.85)	9.5 (4-13)	20.4 (18.1-21.2)	19.2 (16.7-24.0)

*Tab 3: Intravenöse Applikation. Dargestellt sind die einzelnen Tumorgewichte gruppiert nach gesamt, i.p. und s.c. sowie Metastasenanzahl und das Tiergewicht zu Beginn und zur Obduktion. Die Werte sind als Median und Spannweite angegeben. Die Gewichte sind in Gramm (g) angegeben.*

#### **4.2.1 Das subkutane Tumorgewicht**

Die Therapie erfolgte in zwei verschiedenen Armen. In der Gruppe der intraperitonealen Therapie zeigte sich lediglich in der Gruppe des 2%igen Taurolidins ein signifikanter

Effekt auf das Tumorstadium im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Ringerlaktat ( $p=0,048$ ) (Abb. 11). Die Gruppen des 1%igen Taurolidins ( $p=0,485$ ) und des 3%igen Taurolidins ( $p=0,368$ ) reduzierten das subkutane Tumorgewicht nach intraperitonealer Applikation nicht signifikant.

In der Gruppe der intravenösen Therapie zeigte sich bei allen drei Therapiegruppen eine signifikante Reduktion der Tumormasse im Vergleich zur Kontrolle. Die Signifikanzwerte lagen bei  $p=0,028$  bei 1%,  $p=0,006$  bei 2% und  $p=0,005$  bei 3% Taurolidin. Somit war die intravenöse Therapie der intraperitonealen überlegen (Abb. 11).

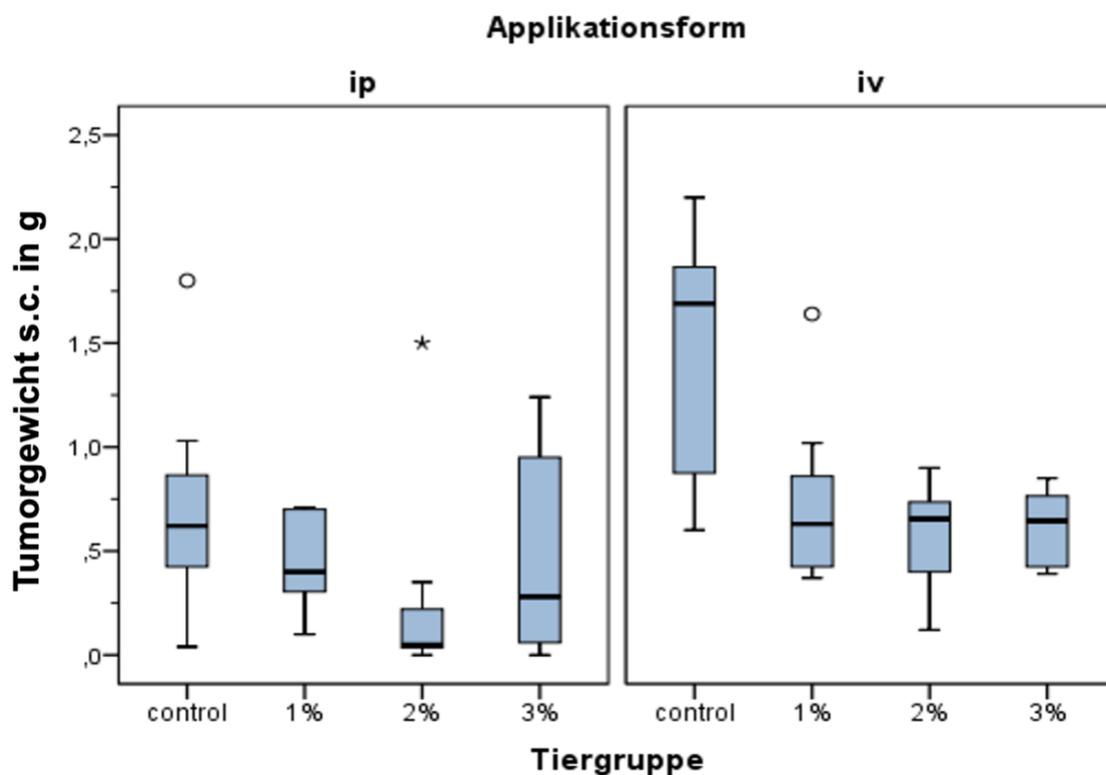


Abb. 11: Das subkutane Tumorgewicht nach i.p.(links) und i.v. Therapie (rechts) in Gramm (g). Bei der i.p. Applikation zeigte lediglich die Gruppe von 2% TRD eine signifikante Reduktion ( $p=0,048$ ) der Tumormasse. In der i.v. Therapiegruppe verminderten alle Therapiegruppen das Tumorstadium signifikant im Vergleich zur Kontrolle ( $p=0,028$  bei 1%,  $p=0,006$  bei 2% und  $p=0,005$  bei 3% Taurolidin).

#### 4.2.2 Das intraperitoneale Tumorgewicht

In der Gruppe der intraperitonealen Therapie zeigte sich in allen Gruppen eine signifikante Reduktion des intraperitonealen Tumorgewichtes im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Ringerlaktat: Taurolidin 1% ( $p=0,005$ ), Taurolidin 2% ( $p=0,005$ ) und Taurolidin 3% ( $p=0,001$ ) (Abb. 12).

Lediglich die höchste Konzentration von 3% vermochte es das intraperitoneale Tumorwachstum nach intravenöser Gabe signifikant zu senken ( $p=0,028$ ). Sowohl die 1%ige ( $p=0,132$ ) und 2%ige ( $p=0,636$ ) Lösung von Taurolidin waren intravenös nicht signifikant erfolgreich, zeigten jedoch einen Trend (Abb. 12).

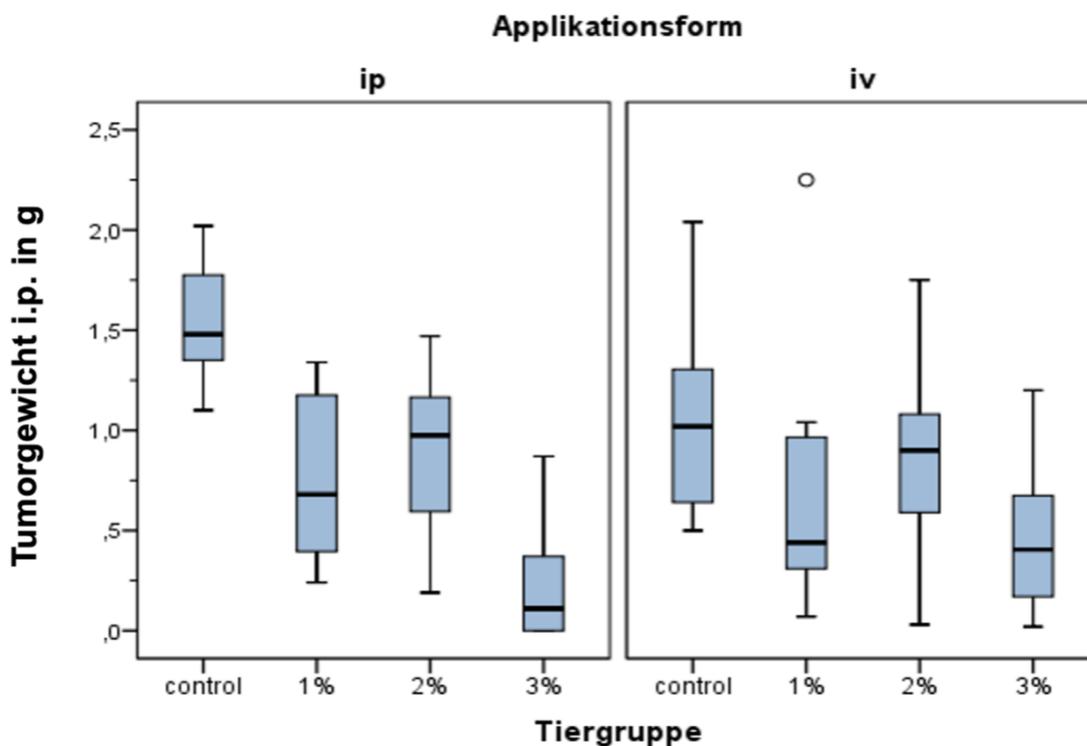


Abb. 12: Das intraperitoneale Tumorgewicht nach i.p.(links) und i.v Therapie (rechts) in Gramm. Bei der i.p. Applikation zeigte sich in allen Dosierungen eine signifikante Reduktion der Tumorlast (Taurolidin 1% ( $p=0,005$ ), Taurolidin 2% ( $p=0,005$ ) und Taurolidin 3% ( $p=0,001$ )). In der i.v. Therapiegruppe verminderte lediglich die höchste Konzentration von 3% Taurolidin das Tumorwachstum signifikant ( $p=0,028$ ). Die Tumorlast verminderte sich nur im Trend nach Therapie mit 1%iger ( $p=0,132$ ) und 2%iger ( $p=0,636$ ) Lösung von Taurolidin, was jedoch nicht signifikant war.

### 4.2.3 Das gesamte Tumorgewicht

In Betrachtung der gesamten Tumormasse zeigte sich, dass die intraperitoneale Applikation das gesamte Tumorgewicht in allen Therapiegruppen signifikant verminderte: 1% ( $p=0,003$ ), 2% ( $p=0,009$ ) und 3% ( $p=0,003$ ) Taurolidin im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 13). Im Gegensatz zur intraperitonealen Tumorthherapie vermochten nur die intravenös verabreichte 1%ige Lösung ( $p=0,028$ ) und die 3%ige Lösung ( $p=0,003$ ) Taurolidins das Tumorgewicht signifikant zu senken. Die mittlere Konzentration von 2% verfehlte die Signifikanzschwelle knapp ( $p=0,059$ ), zeigte jedoch einen guten Trend (Abb. 13).

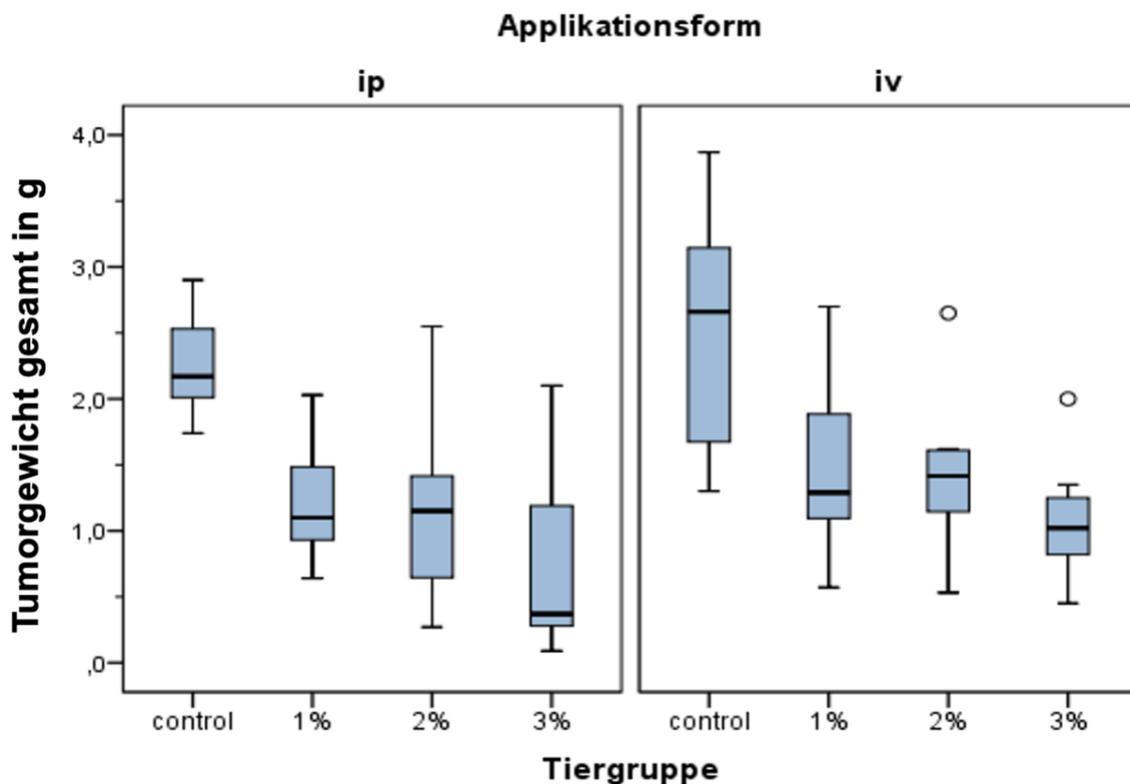


Abb. 13: Das Gesamttumorgewicht nach i.p.(links) und i.v Therapie (rechts) in Gramm. Bei der i.p. Applikation zeigte sich in allen Dosierungen eine signifikante Reduktion der Tumorlast durch Taurolidin (1% ( $p=0,003$ ), 2% ( $p=0,009$ ) und 3% ( $p=0,003$ )). In der i.v. Therapiegruppe verminderten lediglich die Konzentration 1% ( $p=0,028$ ) von 3% Taurolidin ( $p=0,003$ ) das Tumorwachstum signifikant. Die Tumorlast verminderte sich nur im Trend nach Therapie mit ( $p=0,059$ ) Lösung von Taurolidin.

#### 4.2.4 Die Anzahl der Metastasen

Die Anzahl der Metastasen wurde nur durch die intraperitoneale Applikation der höheren Konzentrationen von Taurolidin, 2% ( $p=0,001$ ) und 3% ( $p=0,001$ ), signifikant reduziert. Die niedrigste Dosierung von 1% Taurolidin reduzierte die Metastasenanzahl nicht signifikant ( $p=0,63$ ) (Abb. 14). Vergleichbar mit dem intraperitonealen Tumorgewicht, verminderte nur die intravenöse Therapie mit Taurolidin 3% die Metastasenanzahl signifikant ( $p=0,007$ ) gegenüber der Kontrollgruppe. Die 1%ige ( $p=0,772$ ) und 2%ige Lösung ( $p=0,293$ ) hatten keinen Einfluss auf die Reduktion der Anzahl von Metastasen (Abb. 14).

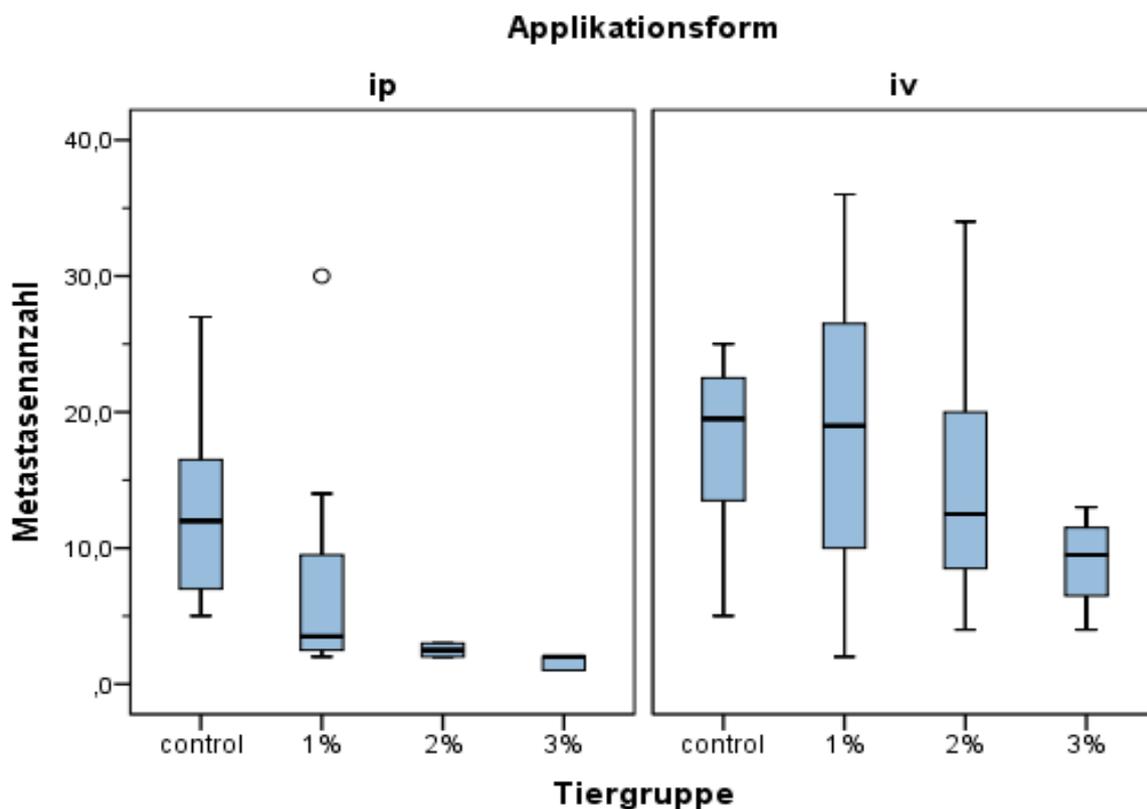


Abb. 14: Anzahl der Metastasen nach i.p. (links) und i.v. Therapie (rechts). Es zeigt sich, dass bei i.p. Applikation nur die niedrigste Konzentration von 1%igen Taurolidin ( $p=0,63$ ) keinen Einfluss hatte. Die höheren Konzentrationen von 2% ( $p=0,001$ ) und 3% ( $p=0,001$ ) Taurolidin verminderten die Metastasenanzahl signifikant. Nur nach intravenöser Therapie mit 3% Taurolidin waren die Metastasen signifikant reduziert ( $p=0,007$ ). Die Konzentrationen von 1% ( $p=0,772$ ) und 2% Taurolidin ( $p=0,293$ ) hatten keinen Einfluss.

#### **4.2.5 Das Körpergewicht der Tiere**

Das Körpergewicht der Tiere war in keiner der Gruppen von intraperitoneal appliziertem Taurolidin, 1% ( $p=0,082$ ), 2% ( $p=0,297$ ) und 3% ( $p=0,367$ ), signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenso war das Körpergewicht der Tiere nach intravenöser Therapie war in keiner der Gruppen signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe: 1% ( $p=0,954$ ), 2% ( $p=0,14$ ) und 3% ( $p=0,574$ ). Die exakten Werte können den Tabelle 2 und 3 entnommen werden.

## 5 Diskussion

Die rasch steigende Inzidenz des malignen Melanoms weltweit stellt ein großes medizinisches Problem dar. In einigen Ländern handelt es sich hierbei zudem um die am schnellsten wachsende maligne Entität (2-4). Zwar sind in den vergangenen Jahren neue Therapieoptionen hinzugekommen, die das Gesamtüberleben deutlich verbessert haben, jedoch bleibt die Prognose des metastasierten malignen Melanoms weiterhin desaströs. Diese Therapien umfassen Immune-Checkpoint Inhibitoren, zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 Antikörper sowie BRAF und MEK Inhibitoren. Trotzdem liegt die mediane Gesamtüberlebensrate im Stadium 4 bei nur bei etwa 24 Monaten (30, 32, 33, 70, 71). Da die Datenlage trotz allem noch recht dünn ist, wird auch weiterhin eine Therapie mit IFN $\alpha$  bei hohem Metastasierungspotential empfohlen, jedoch zeichnet sich zunehmend der Einsatz der neuen Therapieformen auch in der adjuvanten Therapie ab (28). IFN $\alpha$  weist jedoch ein hohes Nebenwirkungsrisiko auf, so dass weiterhin ein Bedarf an neuen, effektiven und auch kostengünstigen Therapien besteht.

Taurolidin, ein Derivat der Aminosäure Taurin, hat in vielen präklinischen und klinischen Studien sein Potential zur nebenwirkungsarmen Therapie verschiedenster Malignome sowie in der septischen Chirurgie bewiesen (41). Sein anti-angiogenetisches, aber auch pro-apoptotisches Potential scheinen hier sehr vielversprechend zu sein (48, 49, 72). Es ist nicht abschließend geklärt, auf welchem Prozess oder welchen Prozessen die Wirkung von Taurolidin aufbaut. Es scheint jedoch geklärt, dass neben einer Hemmung der Proteinbiosynthese auch antiangiogenetische Effekte sowie die Induktion der Apoptose eine Rolle spielen (40, 41, 58, 73-75).

So konnten Shraye et. al. in einer großen in vitro Studie den proapoptotischen Einfluss Taurolidins auf verschiedene Melanomzellen nachweisen (55). Sie beschrieben eine dosis- und zeitabhängige Induktion der Apoptose mit einer Effektivität bis zu 97%. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten wir nur eine Apoptoserate bis etwas über 60% bei einer Dosierung von 500  $\mu$ M nachweisen. Dies war sowohl bei den kommerziell erwerblichen Zelllinien MEWO und SKMEL als auch bei unseren Patientenzelllinien der Fall. Der Unterschied ist möglicherweise in der längeren Inkubationszeit von 72 Stunden bei einer Dosierung von 75 und 100  $\mu$ M von Shraye et. al. zu suchen, wohingegen wir nach 12, 24 und 48 Stunden abgebrochen haben und höhere Dosierungen gewählt haben. Darüber hinaus konnten sie unterschiedliche Ansprechraten in den

verschiedenen Zelllinien nachweisen, was weiterhin die Unterschiede erklären mag (55). In weiteren Studien konnten Walters et. al. einen ähnlichen Effekt auf zehn verschiedene Osteosarkomzelllinien nachweisen (76). Auch hier wurde die maximale Konzentration deutlich unter unserer gewählt und lag bei 200  $\mu\text{M}$ . Die Apoptose wurde jedoch qualitativ mit Annexin-V-FITC dargestellt und somit liegen keine quantitativen Vergleichsdaten vor. Interessant an dieser Studie ist jedoch, dass nur Zellen mit Metastasierungspotential auf Taurolidin ansprachen und gesunde Knochenzellen nicht im Wachstum beeinflusst waren (76). Ähnliche selektive Daten auf die Zellart wurde auch bei Studien mit Zellen vom Typ malignes Mesotheliom beschrieben (77). Darüber hinaus wurden weitere unserer Ergebnisse bestätigt. Denn auch hier wurde eine Nekroseinduktion durch Taurolidin beschrieben, die sich insbesondere ab einer Dosis über 500  $\mu\text{M}$  wie in unseren Studien herauskristallisierte und bei allen untersuchten Zelllinien vergleichbar ausfiel. Braumann et. al. beschrieben darüber hinaus ebenfalls eine dosisabhängige Blockade der Synthese verschiedener Proteine. So beschrieben sie unter anderem eine Reduktion von c-Jun, p53 und p105 nach Behandlung von Adenokarzinomzellen von Ratte und Mensch mit dem finalen Resultat des Zelltodes. Sie schlossen aufgrund der Vielfalt der blockierten Protein darauf, dass Taurolidin die Translation hemmt und dadurch den Zelltod initiiert (58). Dies kann die Erklärung sein, warum der Zelltod bei geringerer Dosierung von Taurolidin durch Apoptose und bei höherer durch Nekrose geschieht, falls es so sein sollte, dass breitflächig die Biosynthese blockiert wird. Unsere Studie kann das nur deskriptiv, aber nicht kausal zeigen, jedoch haben wir die dosisabhängige Änderung des Zelltodes, zuerst Apoptose und später Nekrose, in vitro bei zehn verschiedenen Melanomzelllinien beobachtet.

Die Gruppe um Sun et. al. zeigt jedoch einen anderen Mechanismus für den zytotoxischen Effekt durch Apoptose bei Melanomzellen (40). Auch hier wurde entgegen unserer Studie die Dosis deutlich niedriger gewählt. So wurden zwei murine Melanomzelllinien, B16 4A5 und B16 F10, mit bis zu 100  $\mu\text{M}$  Taurolidin für 12 und 24 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse zeigen Apoptoseraten um 20% bei 100  $\mu\text{M}$  und 24 Stunden Inkubation und sind somit durchaus vergleichbar mit unseren Daten. Als ursächlich wurde eine erhöhte Expression des proapoptotischen Bax Proteins ausgemacht, wohingegen das antiapoptotische Bcl-2 Protein inhibiert wurde und so zur Apoptoseinduktion beitrug.(40)

Durch die oben beschriebene Selektivität von Taurolidin auf Tumorzellen in der Induktion von Apoptose (Knochenzellen bleiben unbehelligt, aber Osteosarkomzellen werden

apoptotisch beeinflusst) stellt sich nun die Frage nach einer möglichen Kombination mit anderen Substanzen, um den Wirkmechanismus des Taurolidins zu verstärken oder um Nebenwirkungen anderer Substanzen zu senken. Eschenburg et. al. untersuchten die Wirkung Taurolidins auf das Neuroblastom als Monotherapie und in Kombination mit Vincristin und Doxorubicin. Auch hier wurde eine dosis- und zeitabhängige Apoptoseinduktion gezeigt. Zudem wurde jedoch die Wirkung der Therapie mit Vincristin und Doxorubicin potenziert (78).

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass Taurolidin selbständig Zytokinmodulationen hervorrufen kann. So wurde gezeigt, dass Taurolidin die Produktion Interleukin-1-beta (IL-1b) blockiert und eine negative Wechselwirkung mit  $TNF\alpha$  aufweist (79, 80). Unter anderem wird somit die Angiogenese von Tumoren, die durch verschiedene Zytokine positiv beeinflusst wird, gehemmt. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da selbige nicht nur für den Wachstum des Primarius, aber auch für die Metastasierung verantwortlich ist (81-85).  $TNF\alpha$  spielt eine äußerst ambivalente Rolle, die sowohl als anti- als auch als protumoral beschrieben werden muss (86). Harald Wajant beschreibt es als ein Zytokin mit nahezu allumfassender Rolle, das „je nach zellulärem Kontext diverse Effekte wie Apoptose, Nekrose, Angiogenese, Aktivierung von Immunzellen, Zellmigration und anderes“ hervorrufen kann (86). Dies bedeutet auch, dass immunomodulierende Effekte wie über Taurolidin berichtet, potenziierende Wirkung haben kann (80).

Insofern war es auch ein Teil unserer Experimente, zu sehen, ob eine Wirkungsverstärkung von Taurolidin mit verschiedenen Zytokinen erreicht werden kann. Taurolidin wurde in vitro mit verschiedenen Zytokinen kombiniert:  $IFN\alpha$ , das in der adjuvanten Therapie des Melanoms angewendet wird, sowie das potentiell auf Tumore wachstumsfördernde  $TNF\alpha$ . Interessanterweise konnten wir eine verstärkte Wirkung von Taurolidin mit  $IFN\alpha$  nachweisen. Dieser Effekt könnte klinisch zwei positive Auswirkungen haben. Zum einen könnte die eher schlechte Wirksamkeit der  $IFN\alpha$  Monotherapie durch eine weitere Substanz verbessert werden. Zum anderen könnte ggf. die hohe Nebenwirkungsrate des  $IFN\alpha$  durch eine Dosisreduktion vermindert werden. Eine ähnliche Fragestellung wird von O'Brien et. al. aufgeworfen, die Taurolidin mit Interleukin-2 (IL-2) in einer klinischen Studie angewandt haben (60). Sie beschrieben in einer Patientenkohorte von 11 Patienten eine deutlich verbesserte Verträglichkeit von IL-

2 durch die Kombination mit Taurolidin ohne Wirkungsverlust, was eine massive Verbesserung der Versorgung darstellt. Es gilt somit zu prüfen, ob ein solcher Effekt der optimierten Verträglichkeit auch bei anderen Zytokinen, wie zum Beispiel dem hier getesteten  $\text{IFN}\alpha$  auftritt, da selbiges in einer Monotherapie häufig durch toxische Nebenwirkungen in der Dosierung limitiert werden muss (87, 88). Ob und in wie weit Taurolidin auch bei neueren Therapien wie zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 Antikörper sowie BRAF und MEK Inhibitoren eine Optimierung der Nebenwirkung erzeugen kann, ist reine Spekulation. Jedoch erscheint insbesondere ein Verhindern der durch die monoklonalen Antikörper potentiell induzierten Autoimmunerkrankungen sinnvoll zu sein (89). Dies erscheint durch die von Taurolidin reduzierte Produktion verschiedener Zytokine durchaus möglich (80). Eine multizentrische klinische Studie hat festgestellt, dass Taurolidin das auf Malignomzellen stimulierende Interleukin-1-beta ( $\text{IL-1}\beta$ ), Interleukin-6 ( $\text{IL-6}$ ) und Interleukin-10 ( $\text{IL-10}$ ) in der Peritonealflüssigkeit reduziert. Es wurde postuliert, dass dieser Effekt möglicherweise den antitumorösen Effekt nach abdominaler Lavage mit Taurolidin erklärt (59). Darüber hinaus ist es jedoch auch möglich, dass die Blockade verschiedener Zytokine auch die Häufigkeit von Autoimmunreaktionen, auch induziert durch Checkpointinhibitoren, vermindern könnte, da insbesondere Typ 1 Interferone an der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind (90, 91). Versuche Therapien zu optimieren und Nebenwirkungen zu senken, wurden unter anderem durch die Kombination von  $\text{IFN}\alpha$  und zytotoxischen T-Lymphozyten Antigen 4 Antikörpern evaluiert. Eine Studie von Rafique et. al. hat hier erste Erfolge beschrieben, die durchaus als Hinweis von Überlegenheit von Kombinationstherapien zu bewerten sind (92).

In unserer in vitro Studie konnten wir ebenfalls eine deutliche Verstärkung der Wirkung von Taurolidin durch die Kombination mit  $\text{IFN}\alpha$  aufzeigen (Abb. 6 und 7). Interessanterweise wurden die prozentualen Anteile von Apoptose und Nekrose kaum beeinflusst (Abb. 9 und 10). Die Kombination mit dem potentiell auf Tumore wachstumsfördernden  $\text{TNF}\alpha$  zeigte keine oder kaum eine Veränderung der Wirksamkeit. Dies kann durch den fehlenden Einfluss von  $\text{TNF}\alpha$  stimulierten Immunzellen erklärt werden. Dies war jedoch nicht Ziel unserer Untersuchungen könnte aber durchaus eine weitere interessante Fragestellung sein.

Taurolidin hat somit auf die verschiedensten Malignomzellen antiproliferative Effekte gezeigt – sowohl Karzinomzellen als auch Zellen mesenchymalen Ursprungs wurden im Wachstum *in vitro* beeinträchtigt und normale Zellen, wie die oben beschriebenen Knochenzellen, nicht beeinflusst. Ähnliche Effekte beschrieben Luckert et. al. Hier wurden Neuroblastomzellen und Endothelzellen der Vena umbilicalis mit Taurolidin versetzt. Es zeigte sich auch hier, dass die malignen Zellen signifikant stärker sensitiv auf die Therapie mit Taurolidin reagierten (93). Diese Ergebnisse können als positiv hinsichtlich weniger starker Nebenwirkung verglichen mit Standardchemotherapien gewertet werden.

Unsere *in vitro* Ergebnisse sind komplex und vielversprechend. Sie sind motivierend für weitere Studien in der Melanomtherapie, allein und mit  $IFN\alpha$ , um möglicherweise Wirkungen zu verstärken und Nebenwirkungen zu vermindern.

Es stellte sich nun jedoch die Frage, ob die *in vitro* Ergebnisse auch *in vivo* übertragen werden können. Es war daher die naheliegende Konsequenz die Wirkung von Taurolidin auf das maligne Melanom *in vivo* im Tiermodell zu untersuchen. Da Costa et. al. beschrieben bereits 2001 eine gute Wirksamkeit gegen B16 Melanomzellen, die auch in unserem Experiment verwendet wurden (94). In der Studie von Da Costa et al wurde eine Metastasierung durch direkte intravenöse Injektion in die Schwanzvene sowie in die Milz simuliert. Die Therapie mit Taurolidin 100 mg/kg KG wurde unmittelbar nach Tumorzellimplantation sowie nach einer, fünf und 24 Stunden intraperitoneal durchgeführt. Durch die Applikation der Tumorzellen kam es zu einer hepatischen und pulmonalen Metastasierung, dies sind auch bei dem malignen Melanom die häufigsten Metastasierungsorte. Die Anzahl hepatischer Metastasen wurde signifikant reduziert Die pulmonalen Läsionen waren stark aber nicht signifikant reduziert (94). Verglichen mit unseren Ergebnissen, die bereits 2007 publiziert, entspricht die Dosierung unserer niedrigsten von 1% Taurolidin (67).

Die Ergebnisse waren vergleichbar, obwohl zwei Hauptunterschiede bestanden. Da Costa et. al. injizierten Taurolidin viermal intraperitoneal, wohingegen hier zweimal täglich über den Zeitraum von sieben Tagen therapiert wurde. Zudem erlaubten wir unseren Zellen eine Woche zur Adhärenz, um der Situation eines fortgeschrittenen Melamons Rechnung zu tragen, wohingegen Da Costa et. al. primär sich in Suspension befindliche und verteilende Zellen therapierten. Da im klinischen Alltag eine *i.p.* Applikation beim Melanom nicht praktikabel ist, wurde in unserem Versuchsaufbau eine *i.v.* Applikation

gewählt. Die intravenöse Therapie wurde mit vier Bolusinjektion über sieben Tage durchgeführt. Zudem begannen unsere Studie eine Woche nach Tumorzellimplantation in die Nackenfalte und in die Milz. Dies wurde so gewählt, dass die Zellen Zeit hatten zu adhären und gegebenenfalls ein Gefäßnetz aufzubauen. Der unterschiedliche Ansatz ist mit den verschiedenen Zielen zu erklären. Da Costa et. al. wollten die Tumorzellstreuung intraoperativ simulieren, wohingegen wir den Ansatz einer Therapie solider Tumor verfolgten. Trotzdem waren die Ergebnisse vergleichbar und auch unsere viermalige Bolusinjektion reduzierte das Tumorgewicht signifikant. Die intraperitoneale Therapie hatte unserer Studie bessere Ergebnisse in der Verminderung der lokalen, intraabdominellen Läsionen, wohingegen die systemische intravenöse Therapie den subkutanen „Ferntumor“ stärker reduzierte. In weiteren Studien wird zu klären sein, inwieweit eine intraperitoneale Gabe von Taurolidin den Wirkstoff systemisch verfügbar macht und wie die systemischen Konzentrationen der verschiedenen Applikationsarten zu vergleich sind, um die Ergebnisse besser zu interpretieren. Die oben bereits beschriebene Studie von Sun et. al. hat nicht nur versucht die Wirkweise von Taurolidin zu evaluieren, sondern auch die Wirkung in vivo in einem murinen Melanommodell evaluiert.(40) Hier wurden C57/BL6 Mäuse, die auch in unserer Studie verwendetet wurde, für sieben aufeinanderfolgende Tage mit einer einmal täglichen Bolusinjektion von 5, 10, 15 und 20 mg Taurolidin behandelt, um die potentielle Toxizität zu untersuchen. Diese wurde anhand des Gewichtes der Tiere festgemacht. Dosen bis 15 mg pro Maus galten als gut verträglich und zeigten einen Gewichtsverlust von weniger als 10 %. Die Ergebnisse sind schwer mit unseren zu vergleichen, da wir die Tiere intraperitoneal zweimal täglich behandelten und so der Stress der Tiere größer war. Trotzdem zeigte sich in unserer Studie kein relevanter Verlust des Gewichtes zwischen den Dosierungen Therapiegruppen und im Vergleich zum Ausgangsgewicht (siehe 4.25). Die von einigen Autoren beschriebene potentiell vorhandene Hepatotoxizität bei sehr hohen Dosierungen konnten wir in unserer Studie nicht sehen (95). Diese ginge laut Arlt et. al. mit morphologischen Veränderungen und Blutbildveränderungen der Leber einher. Bei der Obduktion unserer Tiere fielen keine makroskopischen Veränderungen der Leber auf und auch das Gewicht, wie oben beschrieben, wies keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

Des Weiteren untersuchten Sun et. al. die Wirksamkeit von Taurolidin auf das maligne Melanom. So wurden  $5 \times 10^5$  Melanomzellen der Sorte B16 4A5 subkutan in die Flanke

der Tiere injiziert. Die Therapie wurde in einer Gruppe am Tag der Injektion mit einer Dosis von 15 mg pro Maus für 14 Tage an alternierenden Tagen begonnen. In der zweiten Gruppe wurde nach sieben Tagen mit dem gleichen Therapieschema begonnen. Drei Wochen nach Therapiebeginn wurden die Tiere obduziert. Es zeigte sich, dass ein Beginn der intraperitonealen Bolus-Therapie am Tage der Injektion der Tumorzellen hoch effektiv war. So wurde in dieser Gruppe ein um mehr als die Hälfte geringeres Tumorwachstum beschrieben, was als signifikant berechnet wurde ( $p < 0,05$ ). Die verspätete Initiierung der Therapie reduzierte ebenfalls signifikant das Wachstum des subkutanen Tumors ( $p < 0,005$ ), jedoch weniger intensiv als der sofortige Therapiebeginn. Es zeigt sich also, dass die Ergebnisse auch wenn nur bedingt vergleichbar, denen unserer Studie sehr ähneln. Zum einen haben wir eine deutliche höhere Tumorzelllast in unseren Studien induziert. Darüber hinaus gab es in unserem Modell zwei Tumorlokalisationen – subkutan und die sehr immunologisch aktive Abdominalhöhle. Zum anderen wurden die Tiere zweimal täglich intraperitoneal oder viermal intravenös behandelt. Die Ergebnisse sind jedoch sehr vielversprechend, da sich zeigt, dass trotz sehr verschiedener Modelle ein signifikanter antitumoraler Effekt erzielt werden kann. (40, 67, 94) Wir haben in unserer Studie einen signifikanten Effekt auf die Reduktion des subkutanen und intraperitonealen Tumorwachstums nach Therapie mit der höchsten Konzentration von 3% Taurolidin gezeigt. Es ist jedoch anzumerken, dass die 2%ige Lösung Taurolidins aufgrund der weniger toxischen Eigenschaften zu bevorzugen ist. Auch diese Dosierung hat das Tumorwachstum reduziert und insbesondere auf das subkutane Wachstum nach intraperitonealer Therapie den stärksten und signifikanten Effekt gehabt. Wir konnten feststellen, dass die intraperitoneale Applikation den stärksten Effekt auf das lokale Tumorwachstum in der Bauchhöhle aufwies, jedoch die intravenöse Applikation, den Ferntumor stärker beeinflusste. Wir sehen dies als Zeichen für die verminderte Bioverfügbarkeit im gesamten System der Maus nach intraperitonealer Gabe gegenüber der systemischen intravenösen Applikation. Der stärkere Effekt auf die intraabdominellen Tumore nach intraperitonealer Gabe ist klar durch die nahezu schon *in vitro* ähnlichen Bedingungen in der geschlossenen Höhle zu erklären, da dort ein klarer Zell-Substanz-Kontakt gewährleistet wird. Des Weiteren sind unsere Ergebnisse konsistent mit den Resultaten von Shryer et. al., die wie bereits oben beschrieben den Effekt auf adhärente und schwimmende Melanomzellen untersucht hatten. (55) Dies ist letztlich, wie oben angemerkt, vergleichbar mit nicht-adhärenenten Zellen in der Bauchhöhle wie sie in unserem Modell vorkommen mussten. Dies ist insbesondere von Interesse, da

die es oft zu einer Tumorzellstreuung nach intraoperativ kommt. So ist Taurolidin zumindest als topische Spüllösung ein Kandidat für die Melanomchirurgie. Darüber hinaus deuten die Studien von Da Costa et. Al. und O'Brien et. al. auf einen positiven immunomodulatorischen Effekt hin, um das überbordende Immunsystem perioperativ oder durch zytokinbasierte Chemotherapie zu optimieren.(60, 94) Unsere in vitro Daten zeigen zudem, dass eine Kombination mit IFN $\alpha$  eine gute Kombination für die Therapie des Melanoms sein kann. Genauere Daten müssen in Tierstudien erworben werden. Die modernen Therapien wie zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 Antikörper sowie BRAF und MEK Inhibitoren haben die Resultate und die Nebenwirkungen der Therapie des fortgeschrittenen Melanoms verbessert. Es erscheint jedoch weiterhin sinnvoll Kombinationstherapien, zum Beispiel mit Taurolidin zu erproben, um die Nebenwirkungen weiter zu senken und so die Lebensqualität der Patienten zu erhöhen.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Taurolidin ist eine apoptoseinduzierende, nebenwirkungsarme Substanz, die das Wachstum verschiedener Malignomzellen *in vitro* und auch *in vivo* vermindert. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass dies auch auf das Wachstum verschiedener Melanomzelllinien zutrifft. Es zeigte sich ebenso, dass Taurolidin eine dosisabhängige Induktion der Apoptose erreichen kann. Eine Kombination mit Zytokinen, hier vornehmlich  $\text{IFN}\alpha$ , erscheint sinnvoll, da eine prozentuale Verstärkung des zytotoxischen Effektes erreicht wurde. Die Kombination mit  $\text{TNF}\alpha$  erschien zumindest *in vitro* als nicht supportiv. In den angeschlossenen Tierstudien konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion des Tumorgesamtgewichtes und der Anzahl der Metastasen erreicht werden, bei subjektiv geringen Nebenwirkungen. Es gab jedoch Unterschiede zwischen der intraperitonealen und der intravenösen Applikation. Die topische intraperitoneale Therapie hatte einen starken Einfluss auf die intraabdominell induzierte Tumorlast, zeigte jedoch reduzierten Einfluss auf den als Fernmetastase agierenden subkutanen Tumor. Entgegengesetzt wirkte die intravenöse Bolustherapie verstärkt auf den subkutanen, aber abgeschwächt auf das intraperitoneale Tumorstadium. Die Anzahl der Metastasen war in beiden Gruppen signifikant reduziert. Diese Ergebnisse können als Hinweis auf unterschiedliche Bioverfügbarkeit von Taurolidin gewertet werden.

Weitere, optimierte Studien sind notwendig, um die Wirksamkeit von Taurolidin zu optimieren. Es erscheint darüber hinaus sinnvoll verstärkt Kombinationstherapien mit  $\text{IFN}\alpha$ , aber auch mit neueren Substanzen wie zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 Antikörper sowie BRAF und MEK Inhibitoren zu erproben.

## 7 Literaturverzeichnis

1. MacKie RM, Bray C, Vestey J, Doherty V, Evans A, Thomson D, Nicolson M, Scottish Melanoma G. Melanoma incidence and mortality in Scotland 1979-2003. *British journal of cancer*. 2007;96(11):1772-7.
2. Spagnolo F, Queirolo P. Upcoming strategies for the treatment of metastatic melanoma. *Archives of dermatological research*. 2012;304(3):177-84.
3. McCourt C, Dolan O, Gormley G. Malignant melanoma: a pictorial review. *Ulster Med J*. 2014;83(2):103-10.
4. Berwick M, Buller DB, Cust A, Gallagher R, Lee TK, Meyskens F, Pandey S, Thomas NE, Veierod MB, Ward S. Melanoma Epidemiology and Prevention. *Cancer Treat Res*. 2016;167:17-49.
5. Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14(5):280-90.
6. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvehy J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont AM, European Dermatology F, European Association of D-O, European Organization of R, Treatment of C. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline--Update 2012. *Eur J Cancer*. 2012;48(15):2375-90.
7. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006;56(2):106-30.
8. Crocetti E, Carli P, Miccinesi G. Melanoma incidence in central Italy will go on increasing also in the near future: a registry-based, age-period-cohort analysis. *Eur J Cancer Prev*. 2007;16(1):50-4.
9. Geller AC, Miller DR, Annas GD, Demierre MF, Gilchrest BA, Koh HK. Melanoma incidence and mortality among US whites, 1969-1999. *JAMA*. 2002;288(14):1719-20.
10. Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40(1):35-42.
11. Mansson-Brahme E, Johansson H, Larsson O, Rutqvist LE, Ringborg U. Trends in incidence of cutaneous malignant melanoma in a Swedish population 1976-1994. *Acta Oncol*. 2002;41(2):138-46.
12. Hasle G. Sunscreen and malignant melanoma. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2019;139(17).
13. Bulliard JL, De Weck D, Fisch T, Bordoni A, Levi F. Detailed site distribution of melanoma and sunlight exposure: aetiological patterns from a Swiss series. *Ann Oncol*. 2007;18(4):789-94.
14. Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol*. 1994;130(8):1018-21.
15. Bosetti C, La Vecchia C, Naldi L, Lucchini F, Negri E, Levi F. Mortality from cutaneous malignant melanoma in Europe. Has the epidemic levelled off? *Melanoma Res*. 2004;14(4):301-9.
16. de Vries E, Bray FI, Coebergh JW, Parkin DM. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer*. 2003;107(1):119-26.
17. Johnson MM, Leachman SA, Aspinwall LG, Cranmer LD, Curiel-Lewandrowski C, Sondak VK, Stemwedel CE, Swetter SM, Vetto J, Bowles T, Dellavalle RP, Geskin LJ, Grossman D, Grossmann KF, Hawkes JE, Jeter JM, Kim CC, Kirkwood JM, Mangold AR, Meyskens F, Ming ME, Nelson KC, Piepkorn M, Pollack BP, Robinson JK,

- Sober AJ, Trotter S, Venna SS, Agarwala S, Alani R, Averbook B, Bar A, Becevic M, Box N, E. Carson W r, Cassidy PB, Chen SC, Chu EY, Ellis DL, Ferris LK, Fisher DE, Kendra K, Lawson DH, Leming PD, Margolin KA, Markovic S, Martini MC, Miller D, Sahni D, Sharfman WH, Stein J, Stratigos AJ, Tarhini A, Taylor MH, Wisco OJ, Wong MK. Skin cancer screening: recommendations for data-driven screening guidelines and a review of the US Preventive Services Task Force controversy. *Melanoma Manag.* 2017;4(1):13-37.
18. Ross MI. New American Joint Commission on Cancer staging system for melanoma: prognostic impact and future directions. *Surg Oncol Clin N Am.* 2006;15(2):341-52.
19. MacKie RM, Bray CA, Hole DJ, Morris A, Nicolson M, Evans A, Doherty V, Vestey J. Incidence of and survival from malignant melanoma in Scotland: an epidemiological study. *The Lancet.* 2002;360(9333):587-91.
20. Garbe C, McLeod GR, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer.* 2000;89(6):1269-78.
21. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, Grob JJ, Malvey J, Newton-Bishop J, Stratigos AJ, Pehamberger H, Eggermont AM, European Dermatology F, European Association of D-O, European Organisation for R, Treatment of C. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer.* 2016;63:201-17.
22. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, Lazar AJ, Faries MB, Kirkwood JM, McArthur GA, Haydu LE, Eggermont AMM, Flaherty KT, Balch CM, Thompson JF, for members of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Expert P, the International Melanoma D, Discovery P. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(6):472-92.
23. Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R. [Brief guidelines: malignant melanoma of the skin]. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2006;4(4):344-9.
24. Podlipnik S, Carrera C, Sanchez M, Arguis P, Olondo ML, Vilana R, Rull R, Vidal-Sicart S, Vilalta A, Conill C, Malvey J, Puig S. Performance of diagnostic tests in an intensive follow-up protocol for patients with American Joint Committee on Cancer (AJCC) stage IIB, IIC, and III localized primary melanoma: A prospective cohort study. *J Am Acad Dermatol.* 2016;75(3):516-24.
25. Grunhagen DJ, Brunstein F, ten Hagen TL, van Geel AN, de Wilt JH, Eggermont AM. TNF-based isolated limb perfusion: a decade of experience with antivasular therapy in the management of locally advanced extremity soft tissue sarcomas. *Cancer Treat Res.* 2004;120:65-79.
26. Lienard D, Eggermont AM, Koops HS, Kroon B, Towse G, Hiemstra S, Schmitz P, Clarke J, Steinmann G, Rosenkaimer F, Lejeune FJ. Isolated limb perfusion with tumour necrosis factor-alpha and melphalan with or without interferon-gamma for the treatment of in-transit melanoma metastases: a multicentre randomized phase II study. *Melanoma Res.* 1999;9(5):491-502.
27. Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, Dill D, Dippel E, Eigentler T, Feyer P, Follmann M, Frerich B, Ganten MK, Gartner J, Gutzmer R, Hassel J, Hauschild A, Hohenberger P, Hubner J, Kaatz M, Kleeberg UR, Kolbl O, Kortmann RD, Krause-Bergmann A, Kurschat P, Leiter U, Link H, Loquai C, Loser C, Mackensen A, Meier F, Mohr P, Mohrle M, Nashan D, Reske S, Rose C, Sander C, Satzger I, Schiller M, Schlemmer HP, Strittmatter G, Sunderkotter C, Swoboda L,

- Trefzer U, Voltz R, Vordermark D, Weichenthal M, Werner A, Wesselmann S, Weyergraf AJ, Wick W, Garbe C, Schadendorf D, German Society of D. S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma" -- short version. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2013;11(6):563-602.
28. Garbe C, Eigentler TK. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma Res.* 2007;17(2):117-27.
  29. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(8):463-82.
  30. Ugurel S, Rohmel J, Ascierto PA, Flaherty KT, Grob JJ, Hauschild A, Larkin J, Long GV, Lorigan P, McArthur GA, Ribas A, Robert C, Schadendorf D, Garbe C. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies-update 2017. *Eur J Cancer.* 2017;83:247-57.
  31. Garbe C, Schadendorf D, Stolz W, Volkenandt M, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R, Hauschild A. Short German guidelines: malignant melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2008;6 Suppl 1:S9-S14.
  32. Ascierto PA, Del Vecchio M, Mandala M, Gogas H, Arance AM, Dalle S, Cowey CL, Schenker M, Grob JJ, Chiarion-Sileni V, Marquez-Rodas I, Butler MO, Maio M, Middleton MR, de la Cruz-Merino L, Arenberger P, Atkinson V, Hill A, Fecher LA, Millward M, Khushalani NI, Queirolo P, Lobo M, de Pril V, Loffredo J, Larkin J, Weber J. Adjuvant nivolumab versus ipilimumab in resected stage IIIB-C and stage IV melanoma (CheckMate 238): 4-year results from a multicentre, double-blind, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(11):1465-77.
  33. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas H, Arance AM, Cowey CL, Dalle S, Schenker M, Chiarion-Sileni V, Marquez-Rodas I, Grob JJ, Butler MO, Middleton MR, Maio M, Atkinson V, Queirolo P, Gonzalez R, Kudchadkar RR, Smylie M, Meyer N, Mortier L, Atkins MB, Long GV, Bhatia S, Lebbe C, Rutkowski P, Yokota K, Yamazaki N, Kim TM, de Pril V, Sabater J, Qureshi A, Larkin J, Ascierto PA, CheckMate C. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med.* 2017;377(19):1824-35.
  34. Bauer S, Schmidberger H, Trefzer U. [Individualized tumor therapy and status quo in melanoma]. *Onkologie.* 2012;35 Suppl 2:2-6.
  35. Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist.* 2006;11(4):342-57.
  36. Alberts BJ, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells. *Molecular Biology of the Cell.* 5. Garland Science 2008. p. 1115.
  37. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(6):663-9.
  38. Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Sci Am.* 1996;275(6):80-7.
  39. Costa V, Moradas-Ferreira P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med.* 2001;22(4-5):217-46.
  40. 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.
  41. Jacobi CA, Menenakos C, Braumann C. Taurolidine--a new drug with anti-tumor and anti-angiogenic effects. *Anticancer Drugs.* 2005;16(9):917-21.

42. 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.
43. Browne MK, Leslie GB, Pfirrmann RW. Taurolin, a new chemotherapeutic agent. *J Appl Bacteriol.* 1976;41(3):363-8.
44. 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.
45. Jurewitsch B, Jeejeebhoy KN. Taurolidine lock: the key to prevention of recurrent catheter-related bloodstream infections. *Clin Nutr.* 2005;24(3):462-5.
46. Jurewitsch B, Lee T, Park J, Jeejeebhoy K. Taurolidine 2% as an antimicrobial lock solution for prevention of recurrent catheter-related bloodstream infections. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1998;22(4):242-4.
47. Koldehoff M, Zakrzewski JL. Taurolidine is effective in the treatment of central venous catheter-related bloodstream infections in cancer patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24(5):491-5.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. Braumann C, Menenakos C, Atanassov V, Pfirrmann 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. Shraye 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.

59. Braumann C, Gutt CN, Scheele J, Menenakos C, Willems W, Mueller JM, Jacobi CA. Taurolidine reduces the tumor stimulating cytokine interleukin-1beta in patients with resectable gastrointestinal cancer: a multicentre prospective randomized trial. *World J Surg Oncol.* 2009;7:32.
60. O'Brien GC, Cahill RA, Bouchier-Hayes DJ, Redmond HP. Co-immunotherapy with interleukin-2 and taurolidine for progressive metastatic melanoma. *Ir J Med Sci.* 2006;175(1):10-4.
61. Carey TE, Lloyd KO, Takahashi T, Travassos LR, Old LJ. AU cell-surface antigen of human malignant melanoma: solubilization and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(6):2898-902.
62. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol.* 2011;740:7-12.
63. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995;182(5):1545-56.
64. Zhang X, Li P, Bao J, Nicosia SV, Wang H, Enkemann SA, Bai W. Suppression of death receptor-mediated apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 revealed by microarray analysis. *J Biol Chem.* 2005;280(42):35458-68.
65. Workman P, Balmain A, Hickman JA, McNally NJ, Rohas AM, Mitchison NA, Pierrepont CG, Raymond R, Rowlatt C, Stephens TC, et al. UKCCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. *Lab Anim.* 1988;22(3):195-201.
66. Haraguchi M, Yamashiro S, Yamamoto A, Furukawa K, Takamiya K, Lloyd KO, Shiku H, Furukawa K. Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(22):10455-9.
67. 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.
68. Pfirrmann RW, Leslie GB. The anti-endotoxin activity of Taurolin in experimental animals. *J Appl Bacteriol.* 1979;46(1):97-102.
69. Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K, Reisfeld RA. Long-lived and transferable tumor immunity in mice after targeted interleukin-2 therapy. *J Clin Invest.* 1996;98(12):2801-4.
70. Hauschild A, Ascierto PA, Schadendorf D, Grob JJ, Ribas A, Kiecker F, Dutriaux C, Demidov LV, Lebbe C, Rutkowski P, Blank CU, Gutzmer R, Millward M, Kefford R, Haas T, D'Amelio A, Jr., Gasal E, Mookerjee B, Chapman PB. Long-term outcomes in patients with BRAF V600-mutant metastatic melanoma receiving dabrafenib monotherapy: Analysis from phase 2 and 3 clinical trials. *Eur J Cancer.* 2020;125:114-20.
71. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JM, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martin AM, Patel K, Schadendorf D, Group MS. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 2012;367(2):107-14.
72. 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.

73. 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.
74. Braumann C, Tangermann J, Jacobi CA, Muller JM, Dubiel W. Novel anti-angiogenic compounds for application in tumor therapy - COP9 signalosome-associated kinases as possible targets. *Mini Rev Med Chem*. 2008;8(5):421-8.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. Eschenburg G, Luckert C, Reinshagen K, Bergholz R. Taurolidine cooperates with antineoplastic drugs in neuroblastoma cells. *Genes Cancer*. 2014;5(11-12):460-9.
79. 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.
80. 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.
81. Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS*. 1997;105(6):417-37.
82. Norrby K. Interleukin-1-alpha and de novo mammalian angiogenesis. *Microvasc Res*. 1997;54(1):58-64.
83. Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *Int J Cancer*. 2000;85(2):182-8.
84. Lanfranccone L, Boraschi D, Ghiara P, Falini B, Grignani F, Peri G, Mantovani A, Pelicci PG. Human peritoneal mesothelial cells produce many cytokines (granulocyte colony-stimulating factor [CSF], granulocyte-monocyte-CSF, macrophage-CSF, interleukin-1 [IL-1], and IL-6) and are activated and stimulated to grow by IL-1. *Blood*. 1992;80(11):2835-42.
85. Chen Z, Colon I, Ortiz N, Callister M, Dong G, Pegram MY, Arosarena O, Strome S, Nicholson JC, Van Waes C. Effects of interleukin-1alpha, interleukin-1 receptor antagonist, and neutralizing antibody on proinflammatory cytokine expression by human squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res*. 1998;58(16):3668-76.
86. Wajant H. The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ*. 2009;49:1-15.
87. Hauschild A, Gogas H, Tarhini A, Middleton MR, Testori A, Dreno B, Kirkwood JM. Practical guidelines for the management of interferon-alpha-2b side effects in patients receiving adjuvant treatment for melanoma: expert opinion. *Cancer*. 2008;112(5):982-94.
88. Sleijfer S, Bannink M, Van Gool AR, Kruit WH, Stoter G. Side effects of interferon-alpha therapy. *Pharm World Sci*. 2005;27(6):423-31.
89. Yang S, Yu KH, Palmer N, Fox K, Kou SC, Kohane IS. Autoimmune Effects of Lung Cancer Immunotherapy Revealed by Data-Driven Analysis on a Nationwide Cohort. *Clin Pharmacol Ther*. 2020;107(2):388-96.

90. Guan Q, Gao X, Wang J, Sun Y, Shekhar S. Cytokines in Autoimmune Disease. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:5089815.
91. Crow MK, Olfieriev M, Kirou KA. Type I Interferons in Autoimmune Disease. *Annu Rev Pathol.* 2019;14:369-93.
92. Rafique I, Kirkwood JM, Tarhini AA. Immune checkpoint blockade and interferon-alpha in melanoma. *Semin Oncol.* 2015;42(3):436-47.
93. 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.
94. 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.
95. 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.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stephan Rogalla, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Der Einfluss von Taurolidin auf das Wachstum maligner Melanome – Eine experimentelle Arbeit in vitro und in vivo“* 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.

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](http://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

### **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Stephan Rogalla hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** 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.

Beitrag im Einzelnen (bitte detailliert ausführen):

- Einholung der Genehmigung des Tierversuchsvorhabens in Zusammenarbeit mit den Profs. Drs. C. Jacobi und C. Braumann
- Durchführung der Tierversuche (siehe 4.2) mit Prof. C. Braumann
- Auswertung der Ergebnisse mit Prof. Dr. C. Braumann
- Anteiliges Verfassen von allen Teilen des Manuskripts

---

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

1. J. Gubatan, D. R. Holman, C. J. Puntascca, D. Polevoi, S. J. Rubin, **S. Rogalla** „Antimicrobial peptides and the gut microbiome in inflammatory bowel disease“ *World J Gastroenterol.* November 21, 2021; 27(43):7402-7422. doi: 10.3748/wjg.v27.i43.7402
2. S. Sachindra, T. Hellberg, S. Exner, S. Prasad, N. Beindorff, **S. Rogalla**, R. Kimura, S. S. Gambhir, B. Wiedenmann, C. Grötzinger „SPECT/CT Imaging, Biodistribution and Radiation Dosimetry of a <sup>177</sup>Lu-DOTA-Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 Cystine Knot Peptide in a Pancreatic Cancer Xenograft Model“ *Front. Oncol.* May 31, 2021; 11:684713. doi: 10.3389/fonc.2021.684713. eCollection 2021
3. J. Yim, S. Harmsen, K. Flisikowski, D. Gopras, A. Schnieke, V. Ntziachristos, S. S. Gambhir, M. Bogyo, **S. Rogalla** “An immune targeting peptide for early cancer detection in the colon of high-risk patients” *PNAS* January 5, 2021 118 (1) e2008072118; doi: 10.1073/pnas.2008072118
4. J. C. Widen, M. Tholen, J. J. Yim, A. Antaris, K. M. Casey, **S. Rogalla**, A. Klaassen, J. Sorger, M. Bogyo; “AND-gate contrast agents for enhanced fluorescence-guided surgery” *Nat Biomed Eng.* 2020 Sep 28. doi: 10.1038/s41551-020-00616-6. Online ahead of print. PMID: 32989286
5. **S. Rogalla**, K. Flisikowski, D. Gorpas, A. T. Mayer, T. Flisikowska, M. J. Mandella, X. Ma, K. M. Casey, S. A. Felt, D. Saur, V. Ntziachristos, A. Schnieke, C. H. Contag, S. S. Gambhir and S. Harmsen; “Biodegradable fluorescent nanoparticles for endoscopic detection of premalignant lesions in preclinical models of colorectal carcinogenesis” *Adv. Funct. Mater.* 2019 Oct. doi: 10.1002/adfm.201904992
6. **S. Rogalla**, A Fernandez, SS Gambhir, M Vendrell; “Sa1718—A Near-Infrared Probe for in Vivo Imaging of Colorectal Lesions in High-Risk Patients” *Gastroenterology* 2019 156 (6), S-376-S-377
7. **S. Rogalla\***, S. Harmsen\*, R. Huang, M. Spaliviero, J. M. Samii, V. Neuschmelting, M. A. Wall, TY. Hayakawa, Y. Lee, Y. Tailor, J. R. White, T.C. Wang, S. S. Gambhir, C. H. Contag, M.F. Kircher “Detection of Pre-malignant Gastrointestinal Lesions using SERRS Nanoparticles and Raman Endoscopes.” *ACS Nano.* 2019 Feb 4. doi: 10.1021/acsnano.8b06808.
8. I. S. Alam, I. Steinberg, S. Hernot, O. Vermesh, G. van Dam, V. Ntziachristos, S. S. Gambhir, **S. Rogalla** “Emerging Technologies to Improve Surgical Precision.” *Mol Imaging Biol.* 2018 Oct;20(5):705-715. doi: 10.1007/s11307-018-1227-6.
9. **S. Rogalla**, S. C. M. Joosten, I. S. Alam, S. S. Gambhir, O. Vermesh; “Intraoperative Molecular Imaging in Lung Cancer: The State of the Art and Future.” *Mol Ther.* 2018 Feb 7;26(2):338-341. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.01.013.
10. C. Brauman, G. Koplín, C. F. Geier, P. Hoehn, J. Polenz, W. Dubiel, **S. Rogalla** “Dose dependent role of novel agents Emodin and BTB14431 in colon cancer

treatment in rats” *Acta Chir Belg.* 2017 Jul 3:1-9. doi: 10.1080/00015458.2017.1341145.

11. L. L. Reber, P. Starkl, R. Sibilano, **S. Rogalla**, S. Sensarn, D. Kang, J. Sokolove, W. H. Robinson, C. H. Contag, M. Tsai, S. J. Galli; “The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate suppresses uric acid crystal-induced acute gouty arthritis in mice” *PLoS One.* 2017 Oct 5;12(10):e0185704. doi: 10.1371/journal.pone.0185704.
12. L. L. Reber, C. M. Gillis, P. Starkl, F. Jönsson, R. Sibilano, T. Marichal, N. Gaudenzio, M. Bérard, **S. Rogalla**, C. H. Contag, P. Bruhns, S. J. Galli; “Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide” *J Exp Med.* 2017 May 1;214(5):1249-1258. doi: 10.1084/jem.20161238.
13. J. Park, J. Park, **S. Rogalla**, D. Woo, D. Lee, H. Park, C. H. Contag, T. Suh “SU-E-J-274: Responses of Medulloblastoma Cells to Radiation Dosimetric Parameters in Intensity-Modulated Radiation Therapy” *Med. Phys.* 2015 Jun;42(6):3330. doi: 10.1118/1.4924360
14. **S. Rogalla** and C. H. Contag “Early Cancer Detection at the Epithelial Surface” *Cancer J.* 2015 May-Jun;21(3):179-87. doi: 10.1097/PPO.0000000000000122.
15. E. Garai, Steven Sensarn, C. L. Zavaleta, N. O. Loewke, **S. Rogalla**, M. J. Mandella, S. A. Felt, S. Friedland, J. T.C. Liui, S. S. Gambhir, C. H. Contag “A Real-Time Clinical Endoscopic System for Intraluminal, Multiplexed Imaging of Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticles” *PLoS One.* 2015 Apr 29;10(4):e0123185. doi: 10.1371/journal.pone.0123185.
16. M. Lobatto, C. Calcagno, A. Millon, M. Senders, F. Fay, P. Robson, S. Ramachandran, T. Binderup, M. Paridaans, S. Sensarn, **S. Rogalla**, R. Gordon, L. Cardoso, G. Storm, J. Metselaar, C. H. Contag, E. Stroes, Z. Fayad, W. Mulder “Atherosclerotic Plaque Targeting Mechanism of Long-Circulating Nanoparticles Established by Multimodal Imaging” *ACS Nano.* 2015 Feb 24;9(2):1837-47. doi: 10.1021/nn506750r.
17. C. Braumann, **S. Rogalla**, C. Menenakos, K. Fuehrer, M. Hofmann, U. Trefzer, C. A. Jacobi “The tumor suppressive reagent taurolidine inhibits tumor growth of malignant melanoma – a mice model” *J Surg Res.* 2007 Dec;143(2):372-8.
18. B. Stuhldreier, E. Bobrich, C. Menenakos, **S. Rogalla**, C. A. Jacobi, Chris Braumann. “High doses of the antineoplastic agent taurolidine inhibit advanced intraperitoneal colonic tumor growth and does not impair liver and kidneys in rats” *J Surg Res.* 2005 Nov;129(1):129-35.

#### Buch Kapitel

**S. Rogalla**, S. Sensarn, B. King, T. Schmidt, H. Ra, E. Garai, D. Rimm, D. Ostrov, Md. J. Uddin, L. Marnett, C. Zavaleta, S. S. Gambhir, J. Crawford, J. Van Dam, S.

Friedland, O. Solgaard, M. Mandella, and C. H. Contag, "Using Optics to Reduce the Time and Distance between the Patient and the Diagnostic Event," Chapter 8 in *Research in Translational Biophotonics: Four Case Studies*, R. J. Nordstrom, Editor, SPIE Press, Bellingham, WA (2014).

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich besonderen Personen meinen großen Dank aussprechen, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, PD Dr. med. Maja Hofmann, aus der Klinik für Venerologie und Allergologie für die ausgezeichnete langfristige Betreuung und Geduld bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Des Weiteren den Prof. Dr. med Christoph A. Jacobi und Prof. Dr. med. Chris Braumann, die mich in die Welt des Taurolidin und der klinisch-translationalen Forschung gebracht haben.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen der tierexperimentellen Einrichtung, Kirsten Führer und Frau Bettina Müller, bedanken, die mich auf meinem Weg durch die Tierversuche mit Rat und Tat unterstützt haben und die Tiere in besonderer Weise versorgt haben. Des Weiteren den Mitarbeiterinnen im dermatologischen Labor von Dr. Hofmann. Hier ist insbesondere Nilgün Neziroglu hervorzuheben.

Der herzlichste Dank gilt **zu guter Letzt und als wichtigstes** meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme, sowie meiner gesamten Familie und meinen Freunden für ihre Liebe, stete Unterstützung und Ermutigung vor, nach und während der Arbeit an dieser Dissertation.