

Aus dem
CharitéCentrum für Chirurgische Medizin
Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
Direktor: Professor Dr. med. Joachim M. Müller

Habilitationsschrift

Antineoplastische und antiangiogene Effekte von Taurolidin - vom molekularbiologischen Experiment zum klinischen Einsatz

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Chris Braumann
geboren am 31.12.1969 in Torgau

Eingereicht: November 2007

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. C.-D. Heidecke/Greifswald
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. E. A. M. Neugebauer/Köln

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung.....	5
3. Verzeichnis der zur kumulativen Habilitationsschrift zusammengefassten Anlagen	7
4. Studienergebnisse	8
4.1. Antineoplastische Effekte von Taurolidin und Heparin bei der offenen Behandlung eines disseminierten Kolonkarzinoms. Ein Rattenmodell.....	8
4.2. Tumorwachstum nach Behandlung mit Taurolidin und Heparin unter den Bedingungen eines Pneumoperitoneums mit Kohlendioxid bei der Ratte	17
4.3. Dosissteigerung bei Bolusinjektion oder Langzeitbehandlung mit Taurolidin auf das Tumorwachstum. Ein Rattenmodell.....	24
4.4. Hohe Taurolidindosen inhibieren fortgeschrittenes Tumorwachstum. Ein Rattenexperiment.....	32
4.5. Taurolidin blockiert die Proteinbiosynthese.....	40
4.6. Taurolidin inhibiert das Wachstum eines malignen Melanoms. Ein Mausmodell.	47
4.7. Intravenöse Behandlung mit Taurolidin – Progressprävention bei einem Magenkarzinom-Re-Rezidiv. Eine Falldarstellung	55
5. Diskussion	62
5.1. Molekularbiologische Untersuchungen	62
5.1.1. Angiogenese und Inhibitionsmöglichkeiten.....	62
5.1.2. Analyse neuer taurolidinähnlicher Substanzen	63
5.1.3. In silico screening zur Detektierung von Angiogenesehemmstoffen	63
5.1.4. In vitro Untersuchungen mit neuen Antiangiogenetika	65
5.2. Tierexperimentelle Forschungen	66
5.3. Klinischer Einsatz unter Studienbedingungen.....	71
6. Abkürzungsverzeichnis.....	77
7. Literaturverzeichnis	78
8. Eidesstattliche Erklärung	90

1. Zusammenfassung

Neue antiangiogene Wirkstoffe könnten in Zukunft bei der Therapie von gastrointestinalen Karzinomen von elementarer Bedeutung sein.

Taurolidin ist eine antineoplastische Substanz, welche an über 30 Tumorzelllinien *in vitro* eine Wachstumshemmung bewirkt. Es hemmt zusätzlich die Freisetzung tumorproliferativer Interleukine (TNF α und IL-1 β) aus Makrophagen. Der Mechanismus, der zur Inhibition des Tumorwachstums führt, war zu Beginn der Experimente noch nicht bekannt und daher das Ziel eigener molekularbiologischer, tierexperimenteller und klinischer Forschungen.

In ersten *in vitro* Experimenten wurde an Zellen eines malignen Melanoms eine vergleichbar hohe Apoptoserate gegenüber einer üblichen Interleukin- oder Interferontherapie gemessen. *Ex vivo* Untersuchungen an Zellverbänden von Melanompatienten zeigten sogar eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Taurolidin. In molekularbiologischen Studien wurde unter Verwendung klinisch relevanter Dosierungen der spezifische Feinmechanismus untersucht. Taurolidin führte zur Reduktion intrazellulärer Proteinspiegel von Zellzyklusregulatoren und Transkriptionsfaktoren. Der Signalosom/Proteasom Komplex, welcher intrazelluläre Interaktionen reguliert, sowie der Transkriptionsprozess wurden hierbei jedoch unwesentlich beeinträchtigt. Unsere Experimente wiesen darauf hin, dass der Translationsvorgang durch Taurolidin in humanen und Rattenkolonkarzinomzellen gehemmt wird. Hierbei wird die Präinitiationsphase gehemmt, welches auf eine Inhibition der ribosomalen Komplexbildung (Dichtegradientenbestimmung) schließen lässt. Damit wird die Proteinbiosynthese blockiert, was die pleiotrope Wirksamkeit erklären könnte. Die Mechanismen könnten sogar für Pro- und Eukaryonten ähnlich sein, da die endogene Proteinexpression bei Bakterien (*E. coli*) ebenfalls verhindert wurde. Unsere Daten ließen die Schlussfolgerung zu, dass Taurolidin einen maßgeblichen Schritt in einer frühen Translationsphase hemmt. Dadurch werden proangiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF und TNF α nicht mehr synthetisiert.

Fortführende tierexperimentelle Untersuchungen wiesen nach, dass einmalige intraperitoneale Applikationen das intra- und extraperitoneale Tumorwachstum bei der Ratte hemmen. Unabhängig von der Operationsmethode (Insufflation mit Kohlendioxid oder Laparotomie) führte der direkte Kontakt des Taurolidin mit Tumorzellen zu einem stärkeren antineoplastischen Effekt als eine einmalige intravenöse Behandlung. Längere

Behandlungszeiträume und Dosissteigerungen führten zu ausgeprägteren Tumorreduktionen bei der Ratte. Hierbei wurden Änderungen der Respirationstiefe beobachtet, welche durch langsamere Applikation vermieden werden konnten. Die Hämatopoese wurde nicht beeinträchtigt. Daher wurde in weiteren Tierstudien der Einfluss intravenöser und intraperitonealer Dosissteigerungen auf das Wachstum fortgeschrittener Kolonkarzinome untersucht. Es fand sich eine antineoplastische Dosisabhängigkeit. Zum Ausschluss von Zellschädigungen der Hauptstoffwechselorgane Leber und Niere wurden pathohistochemische Untersuchungen durchgeführt. Die Hochdosistherapie führte zu keinen nachweisbaren Veränderungen mikroskopischer Organstrukturen.

Folgend wurde in einer klinischen, prospektiv randomisierten Multizenterstudie der Effekt einer intraoperativen, intraperitonealen Instillation von 0,5 % Taurolidin versus einer 0,25 % PVP-Jod-Spülung nach kurativen Resektionen von Kolon-, Magen- und Pankreaskarzinomen untersucht. Der Anstieg des zellstimulierenden Interleukin-1 β wurde gegenüber PVP-Jod deutlich reduziert. Es wurden keine relevanten Nebenwirkungen festgestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass die intraperitoneale Applikation von Taurolidin bei der Prävention von Lokalrezidiven und Metastasen in der onkologischen Chirurgie sinnvoll sein könnte – diese ist jedoch kostenintensiver. Daher wurde eine prospektiv randomisierte Multizenterstudie begonnen, welche beim kurablen kolorektalen Karzinom die Rate von Metastasen und Lokalrezidiven nach intraoperativer Instillation mit Taurolidin (2 %) versus einer üblichen Bauchspülung (0,9 % NaCl) vergleichen soll.

Eine intravenöse Kombinationstherapie von bisher schlecht behandelbaren Tumorentitäten ist ebenfalls denkbar. Eine intravenöse Behandlung mit 2 %igem Taurolidin wird derzeit an unserer Klinik im Rahmen einer Phase III-Studie beim Magen-/Pankreaskarzinomrezidiv durchgeführt. Die gewichtskorrelierte, zentralvenöse Injektion führte zu keinen relevanten, klinischen oder laborchemischen Nebenwirkungen (300 mg/kg Kilogramm/Tag). Bei Magenkarzinomrezidiven konnte bei 3/24 Patienten eine Tumorverkleinerung, ein „stable disease“ (konstantes CT-morphologisches Bild) und eine vollständige Remission beobachtet werden. Neben einer Monotherapie könnte einer Kombinationstherapie mit anderen antineoplastisch wirksamen Medikamenten eine entscheidende Rolle zukommen, um mögliche Synergieeffekte mit bewährten Chemotherapeutika zu nutzen und Nebenwirkungen zu reduzieren.

2. Einleitung

Die chirurgische Resektion maligner abdominalen Tumoren kann zu lokaler oder systemischer Dissemination von vitalen Tumorzellen führen. Neben lokoregionären Rezidiven scheint die Implantation von Tumorzellen in Wundbereichen für das Auftreten von Fernmetastasen eine Rolle zu spielen. Die Untersuchung der Prozesse, die für eine Metastasierung verantwortlich sind, ist Gegenstand zahlreicher aktueller Studien [1-4]. Die Tumorzellkonglomerate befinden sich oft lokoregional und im Bereich der Subkutis [5-8]. Damit ist der Chirurg trotz Einhaltung onkologischer Resektionskriterien sowohl in der laparoskopischen als auch in der konventionellen Chirurgie ein wesentlicher Einflussfaktor [9]. Die alleinige Existenz maligner Zellen in der Abdominalhöhle führt jedoch noch nicht zu einem Tumorwachstum oder gar einer Peritonealkarzinose [10;11].

Der Prozess der Angiogenese wird hierfür mit verantwortlich gemacht. Die Regulation erfolgt unter anderem durch Interleukin-1beta (IL-1 β) und Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) [12-14], Wachstumsfaktoren oder eine gesteigerte perioperative Stressreaktion [9;10;15;16]. Im Abdomen kann die Verletzung der Peritonealoberfläche zu einer lokal vermehrten Adhärenz von Tumorzellen führen und konsekutiv als Inzisionsmetastase klinische Relevanz erlangen [17]. Die Wahrscheinlichkeit von Inzisionsmetastasen korreliert jedoch nicht mit der Wundgröße und ist daher multifaktoriell bedingt [6;9].

Ein potentes wachstumsstimulierendes Zytokin ist IL-1 β , welches sowohl in Monozyten als auch in Peritonealmakrophagen synthetisiert wird [18-20]. IL-1 β könnte einen direkten Einfluss auf vitale abdominale Tumorzellen haben und perioperativ aufgrund hoher lokaler Zytokinspiegel das Wachstum exzessiv stimulieren [13]. Therapeutisch wäre eine Suppression der Zytokinproduktion oder eine Neutralisierung der bereits exprimierten Zytokine denkbar. Viele Tumorzelllinien produzieren TNF α , welches in einem komplexen autokrinen Prozess die Tumorzelle erneut beeinflusst [21]. TNF α aktiviert den Nuclear factor-kappaB (NF- κ B) und verhindert Apoptose [22]. In Tumorzellen schützen höhere Proteinkonzentrationen von NF- κ B vor Apoptose, wodurch das Zellwachstum gefördert wird [22-24]. Folglich stimuliert TNF α die Tumorangio-genese, einen essentiellen Schritt in der Metastasenbildung [12]. Aufgrund der bedeutungsvollen molekularbiologischen Effekte sollte in gesonderten Experimenten die Assoziation von Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusregulatoren untersucht werden.

Eine Substanz, welche antineoplastisch wirkt und die Produktion von IL-1 β signifikant vermindert, ist Taurolidin. Es ist ein Produkt der Aminosäure Taurin. In mehreren tierexperimentellen Studien wurden bei zahlreichen Tumorentitäten antineoplastische Effekte ohne relevante klinische Nebenwirkungen nachgewiesen [19;25;26]. Taurolidin schien daher eine interessante Behandlungsoption zu sein [19;27;28]. Der Pathomechanismus, der zu einer Suppression des Wachstums von Tumorzellen führt, war bisher noch nicht vollständig geklärt. Denkbar schien zunächst, dass sich die Mechanismen bei Eukaryonten und bei Prokaryonten gleichen könnten. Möglich war entweder, dass eine intraperitoneale Wachstumshemmung durch direkten Kontakt mit den Tumorzellen erzielt wird oder eine Verminderung der Synthese von Interleukinen, also indirekt resultiert. Die Besonderheit der neuartigen antineoplastischen Behandlung mit Taurolidin schien gerade in den unterschiedlichen Wirkungsmechanismen zu liegen, welche unabhängig von der zugrundeliegenden Tumorentität zu einer Wachstumssuppression der Tumorzellen beziehungsweise von Metastasen führen [14;29-51]. Es war durchaus denkbar, dass Taurolidin selbst bei lokaler Applikation hauptsächlich systemisch wirkt und hierdurch das Tumorwachstum gehemmt wird. Die Pharmakokinetik war bekannt und wurde sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen überprüft [52-54]. Es lagen Daten vor, welche nach intravenöser Applikation zytotoxisch wirksamer Plasmakonzentrationen wenig unerwünschte Wirkungen beschrieben [19]. Es blieb demzufolge unklar, ob Taurolidin einen Tumorprogress verhindern kann.

Durch die Entwicklung neuer chirurgischer Instrumente und Operationstechniken werden nun auch onkologische Patienten neben offenen Resektionen laparoskopisch operiert [9;16;55]. Es war aber durchaus denkbar, dass das bei Laparoskopien oft verwendete Insufflationsgas Kohlendioxid stimulierende Effekte auf das Tumorwachstum haben könnte. Der Einfluss des intraabdominellen Milieus (Azidose durch Kohlendioxid) auf die Wirksamkeit antineoplastischer Substanzen ist jedoch weiterhin ungeklärt [26;41;56-58].

Die Einflüsse wurden beispielhaft anhand von Taurolidin analysiert. Die intrazellulären Wirkmechanismen von strukturanalogen Substanzen werden derzeit erforscht, um die zytotoxische Wirksamkeit zu erhöhen, Behandlungsspektren zu erweitern sowie Nebenwirkungen und Kosten zu reduzieren.

Basierend auf den experimentellen und klinischen Daten sollen neue antiangiogene Substanzen identifiziert und eingesetzt werden.

3. Verzeichnis der zur kumulativen Habilitationsschrift zusammengefassten Anlagen

Anlage 1

Braumann C, Ordemann J, Kilian M, Wenger FA, Jacobi CA
Local and systemic chemotherapy with taurolidine and taurolidine/heparin in colon cancer bearing rats undergoing laparotomy
Clin Exp Metastasis 20 (2003): 387-394

Anlage 2

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. 18 (2001): 547-52

Anlage 3

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. 22 (2005): 77-83

Anlage 4

Braumann C, Stuhldreier B, Bobrich E, Menenakos C, Rogalla S, Jacobi CA
High doses of taurolidine inhibit advanced intraperitoneal tumor growth in rats
Journal of Surgical Research 129 (2005): 129-35

Anlage 5

Braumann C, Henke W, Jacobi CA, Dubiel W
The tumour suppressive reagent taurolidine is an inhibitor of protein biosynthesis
Int J Cancer 112 (2004): 225-30

Anlage 6

Braumann C, Jacobi CA, Rogalla S, Menenakos C, Fuehrer K, Trefzer K, Hofmann M
The tumor suppressive reagent taurolidine inhibits growth of malignant melanoma—a mice model
Journal of Surgical Research, (2007), in press

Anlage 7

Braumann C, Winkler G, Rogalla S, Menenakos C, Jacobi CA
Prevention of disease progression in a patient with a gastric cancer-re-recurrence. Outcome after intravenous treatment with the novel antineoplastic agent taurolidine. Report of a case
World Journal of Surgical Oncology, 4 (2006): 34-39

4. Studienergebnisse

4.1. Antineoplastische Effekte von Taurolidin und Heparin bei der offenen Behandlung eines disseminierten Kolonkarzinoms. Ein Rattenmodell

Braumann C, Ordemann J, Kilian M, Wenger FA, Jacobi CA

Hintergrund: Für disseminierende und vitale Kolonkarzinomzellen lagen bisher keine tierexperimentellen Daten vor. Taurolidin und Heparin stellten aufgrund der vorliegenden Daten eine interessante Therapieoption dar. Von größerer Bedeutung für die Suppression von lokalen Rezidiven könnte die direkte Wirkung der Substanzen auf Peritonealmakrophagen sein, da diese für die intraperitoneale unspezifisch-zelluläre Abwehr (IL-1 β). Da IL-1 β ein Wachstum stimuliert, war unklar, ob dieser Effekt auf das intraperitoneale oder subkutane Tumorwachstum messbar ist oder in Umkehrung durch den Einsatz der Substanzen inhibiert werden konnte.

Methodik: Daher wurden in einem Rattenmodell 10⁴ syngenetische Adenokarzinomzellen nach medianer Laparotomie intraperitoneal und am Rücken der Tiere (n=105; 7 Gruppen) subkutan appliziert. Es sollte untersucht werden, ob bereits geringe Dosen einmaliger intraperitonealer oder intravenöser Kombinationen von Taurolidin/Heparin oder die alleinige Behandlung mit Taurolidin das Tumorwachstum beeinflusst. Die Kontrollgruppe wurde mit Ringerlösung behandelt. Nach 28 Tagen erfolgte die Bestimmung des Tumorwachstums in den einzelnen Kompartimenten.

Ergebnisse: Das intraperitoneale Tumorwachstum wurde durch eine lokale Therapie mit Taurolidin deutlich reduziert (Taurolidin Median 7,0 mg, p=0,05) und durch Heparin inhibiert (Taurolidin/Heparin 0,0 mg; p=0,02; Kontrollgruppe 185 mg). Die intravenöse Applikation hatte keinen messbaren Einfluss auf das intraperitoneale Tumorwachstum. Die in der Literatur mehrfach beschriebenen Metastasen im Bereich der Wunde wurden nicht beobachtet. Das subkutane Tumorwachstum wurde jedoch durch keine Behandlungsform beeinflusst. Die Applikation der Substanzen führte zu keinen Änderungen der peripheren Leukozytenwerte.

Zusammenfassung: Taurolidin oder die Kombination mit Heparin wirken bei der Ratte intraperitoneal antineoplastisch.

PMID: 14524527

4.2. Tumorwachstum nach Behandlung mit Taurolidin und Heparin unter den Bedingungen eines Pneumoperitoneums mit Kohlendioxid bei der Ratte

Braumann C, Ordemann J, Wildbrett P, Jacobi CA

Hintergrund: Der Pathomechanismus bei der Entstehung von Trokarmetastasen nach laparoskopischen Resektionen maligner Tumoren ist noch nicht eindeutig geklärt und daher Gegenstand neuerer klinischer und experimenteller Forschungen. Bisher existiert kein Standard zur Prävention von Trokarmetastasen.

Methodik: Es wurden 105 Ratten laparoskopiert (Kohlendioxid). Es wurden 10^4 Adenokarzinomzellen des Kolons (DHD/K12/TRb) subkutan (sc) und intraperitoneal (ip) injiziert und der Einfluss von Taurolidin oder Taurolidin/Heparin auf das sc und ip Tumorwachstum untersucht. Die Tiere wurden in sieben Gruppen randomisiert (n=15). Ein Pneumoperitoneum mit 8 mmHg wurde über 30 Minuten angelegt. Drei Trokarinzisionen wurden benötigt: median für das Endoskop; im linken und rechten Unterbauch für die Arbeitstrokare. Es erfolgten ip, intravenöse (iv) oder kombinierte (ipiv) Applikationen. Die Anzahl und das Gewicht der Tumore wurden 28 Tage nach der Intervention bestimmt. Es erfolgten perioperativ 5 peripher venöse Blutentnahmen, um Auswirkungen auf die Leukopoese zu untersuchen.

Ergebnisse: Nach ip Behandlung wurde das lokale Tumorgewicht durch Taurolidin (Median 7mg) und Taurolin/Heparin (0mg) versus der Kontrollgruppe (isotones Kochsalz; 52mg) signifikant reduziert ($p=0,001$). Im Gegensatz dazu wurden keine Effekte auf das subkutane Tumorgewicht festgestellt ($p=0,4$). Tumorwachstum an den ehemaligen Trokarinzisionen konnte nach ip und ipiv Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert werden. Eine Leukopenie wurde ausschließlich am Operationstag in allen Gruppen festgestellt.

Zusammenfassung: Die ip Behandlung mit Taurolidin oder Taurolidin/Heparin reduziert das ip Tumorwachstum und die Rate an Trokarmetastasen. Weder die ip noch die iv Applikation beeinflussten das subkutane Tumorwachstum. Eine kurzzeitige Leukopenie wurde hauptsächlich durch Reduktion der Lymphozytenzahlen bewirkt und wird nicht durch die Therapeutika induziert.

PMID: 11688959

4.3. Dosissteigerung bei Bolusinjektion oder Langzeitbehandlung mit Taurolidin auf das Tumorwachstum. Ein Rattenmodell

Braumann, C., Schoenbeck, M., Menenakos, C., Kilian, M., Jacobi, C.A.

Hintergrund: Lokale Therapien mit Taurolidin können zu intraperitonealen (ip) Tumorsuppressionen bei Ratten führen. Eine einmalige intravenöse (iv) Behandlung hatte jedoch keinen antineoplastischen Effekt. Deshalb sollten Langzeitbehandlungen und Dosissteigerungen Auskunft darüber geben, ob antineoplastische Effekte resultieren. Inkrine VEGF- und TNFalpha Level beeinflussen parallel das Tumorwachstum. Die Synthese sollte bei Adenokarzinomzellen des Kolons *in vitro* bestimmt werden.

Methodik: DHD/K12/TRb Zellen wurden mit verschiedenen Dosierungen *in vitro* behandelt und die Interleukinspiegel im Überstand photometrisch mittels ELISA bestimmt.

Zu Beginn der Operation wurden 10^4 Adenokarzinomzellen des Kolon (DHD/K12/TRb) subkutan (sc) am Rücken der Tiere appliziert. Es erfolgte eine Randomisierung (n=80, BD IX Ratten) in acht Gruppen, welche median laparotomiert wurden. Am Ende der 30minütigen Operation wurde entweder eine Bolustherapie oder eine Langzeitbehandlung (7 Tage) durchgeführt: Ringer (Kontrollgruppe) versus 1%, 2% oder 3% Taurolidin. Für die Langzeitbehandlung wurden Port-Systeme in die rechte V. jugularis interna platziert, über die dreimal täglich Kurzinfusionen erfolgten. Die Effekte auf Tumorgewicht, Tiergewicht, Leukopoese sowie unerwünschte Wirkungen wurden analysiert.

Ergebnisse: Tumorzellen stellen nach Kontakt mit geringen Dosen von Taurolidin die VEGF und TNFalpha Sekretionen sofort ein. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Tumorformationen ($p=0,04$) am Rücken der Tiere. Langzeitbehandlung bewirkte ein gering verzögertes Wachstum. Unabhängig von der Therapie und der Applikationsform resultierte eine kurzzeitige postoperative Leukopenie, welche nach 2 Tagen auch nach hohen Dosen kompensiert wurde. Eine Änderung der Atemfrequenz konnte auf eine zu schnelle Infusion zurückgeführt werden.

Zusammenfassung: Die tumoreigene, inkrine VEGF und TNFalpha Synthese wird durch Taurolidin effektiv inhibiert. Nur eine intravenöse Langzeittherapie mit 3% Taurolidin inhibierte sc Tumorwachstum bei der Ratte. Die Leukopoese wird nicht beeinflusst.

PMID: 16132581

4.4. Hohe Taurolidindosen inhibieren fortgeschrittenes

Tumorwachstum. Ein Rattenexperiment

Braumann, C., Stuhldreier, B., Bobrich, E., Menenakos, C., Rogalla, S., Jacobi, C.A.

Einleitung: Die antineoplastische Wirkung von Taurolidin auf fortgeschrittene Tumorstadien wurde noch nicht im Tierexperiment untersucht. Bislang liegen keine tierexperimentellen Daten zur Toxizität vor.

Methodik: Im Experiment A sollte die Toxizität auf Leber- und Nierengewebe untersucht werden. Zur Beurteilung der lokalen Toxizität wurde die Vene am Applikationsort histologisch untersucht. In einem zweiten Experiment (B) wurden bei 80 Ratten jeweils 20,000 Kolonadenokarzinomzellen (DHD/K12/TRb) intraperitoneal appliziert. Nach 28 Tagen liegen solide Tumorformationen vor. Dann wurde ein Portsystem in die rechte Vena jugularis interna platziert. Die Tiere wurden in 8 Gruppen randomisiert und 7 Tage (dreimal täglich 1 ml Ringerlösung [Kontrollgruppe], 1%, 2% oder 3% Taurolidin) intraperitoneal oder intravenös behandelt. Das Tumorgewicht wurde nach weiteren 28 Tagen bestimmt. Das Differentialblutbild und das Körpergewicht wurden ebenfalls registriert.

Ergebnisse: Die verwendeten Konzentrationen führten aus pathohistologischer Sicht zu keinen detektierbaren Effekten auf Leber, Niere oder Vena Cava superior. Die intravenöse Therapie mit 2% Taurolidin ($p=0,034$) und 3% Taurolidin ($p=0,05$) sowie die lokale Behandlung mit 2% Taurolidin ($p=0,05$) wirkten antineoplastisch. Das Wachstum der Tiere wurde nicht beeinträchtigt. Das Differentialblutbild änderte sich nicht. Es wurden 3 Portinfektionen beobachtet.

Zusammenfassung: Taurolidin wirkt auf Leber, Niere, den Injektionsort oder auf die Leukopoese bei Ratten nicht toxisch. Die intravenöse 2%ige Therapie wirkt am effektivsten im fortgeschrittenen Tumorstadium bei Ratten. Häufige Portpunktionen erhöhen die Infektionsrate.

PMID: 15916768

4.5. Taurolidin blockiert die Proteinbiosynthese

Braumann, C., Henke, W., Jacobi, C.A., Dubiel, W.

Einleitung: Taurolidin ist antiseptisch und inhibiert das Wachstum vitaler, disseminierender Tumorzellen nach chirurgischen Eingriffen am Tier. Der molekularbiologische Mechanismus ist bisher jedoch ungeklärt. Es sollte nun an DHD/K12/TRb Zellen der molekularbiologische Effekt und deren Auswirkungen auf Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusregulatoren analysiert werden.

Methodik und Ergebnisse: Die endogenen (intrazellulären) Level von p53 und p27 sowie I κ B α , p105 und c-Jun werden reduziert. Hier zeigte sich eine Dosisabhängigkeit auf die endogene Proteinexpression. Daher wurde das Transkriptions-/Translationssystem von Eukaryonten (maligne Tumoren) mit Taurolidin untersucht. Die IC₅₀ ist 1,4mMol und daher für fortführende *in vivo* Studien interessant, weil diese ca. 1000fach unter der antiseptischen Wirksamkeit liegt. Die Transkription wurde nicht beeinträchtigt. Jedoch wurde die Translation vollständig inhibiert (c-Jun oder p53 mRNA). In einer Dichtegradientenzentrifugation wurde die Translation nun detailliert untersucht. Bei Kontakt mit Taurolidin wurden keine ribosomalen Präinitiationskomplexe gebildet. Die Proteinexpression von Bakterien wurde ebenfalls gehemmt.

Zusammenfassung: Es wurde daher geschlussfolgert, dass Taurolidin einen grundlegenden Schritt in einer frühen Phase der Translation inhibiert und damit antineoplastische Effekte erklärt werden könnten.

PMID: 15352034

4.6 Taurolidin inhibiert das Wachstum eines malignen Melanoms. Ein Mausmodell.

Braumann, C., Jacobi, C.A., Rogalla, S., Menenakos, C., Fuehrer, K., Trefzer, U., Hofmann, M.

Hintergrund: Taurolidin supprimiert *in vitro* das Wachstum von mehr als 30 verschiedenen Zelllinien und reduziert in Tierexperimenten das Tumorstadium in frühen und fortgeschrittenen Tumorstadien. *In vitro* führte der Kontakt mit Melanomzellen zur Apoptose. In einem Melanommodell soll nun der Einfluss von Taurolidin an der Maus untersucht werden.

Methodik: An Mäusen (n=80) wurde in Allgemeinnarkose eine mediane Laparotomie durchgeführt und $1,5 \times 10^6$ syngenetische Melanomzellen (B78-D14) in die Milz appliziert. 1×10^6 Zellen wurden am Rücken der Tiere injiziert. Die Tiere wurden randomisiert und entweder intraperitoneal oder intravenös behandelt (Ringerlösung = Kontrollgruppe oder 1%, 2%, 3% Taurolidin). Nach 28 Tagen wurden das Tumorgewicht und die Anzahl an Tumorformationen (-knoten) durch zwei unabhängige Untersucher bestimmt.

Ergebnisse: Die intraperitoneale Behandlung führte zu einer dosisabhängigen Reduktion des Gesamttumorgewichtes ($p=0,003$) und des lokalen Tumorstadiums ($p<0,001$). Das subkutane Tumorgewicht wurde nicht beeinflusst. Nach intravenöser Behandlung wurde das Gesamttumorgewicht ($p=0,013$) und das subkutane Tumorgewicht ($p=0,016$) inhibiert. Nur die Behandlung mit Taurolidin 3% verringerte die Anzahl der Tumoren. Das Wachstum der Tiere veränderte sich durch die Therapie nicht.

Zusammenfassung: Intravenöse und intraperitoneale Applikationen von Taurolidin reduzieren dosisabhängig das Wachstum eines malignen Melanoms im disseminierten Stadium in Mäusen. Der klinische Einsatz von Taurolidin wäre nun unter Studienbedingungen beim malignen Melanom auch denkbar.

PMID: 17612567

4.7. Intravenöse Behandlung mit Taurolidin – Progressprävention bei einem Magenkarzinom-Re-Rezidiv. Eine Falldarstellung.

Braumann, C., Winkler, G., Rogalla, P., Menenakos, C., Jacobi, C.A.

Hintergrund: Taurolidin wirkt bei einigen Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* antineoplastisch. Bei einem Patienten wurde eine intravenöse Behandlung eines Magenkarzinom-Re-Rezidives im Rahmen einer Studie durchgeführt.

Fallbeschreibung: Ein 58jähriger Patient wurde bei einem Adenokarzinom des Magenantrums partiell magen- und leberteilereseziert (pT2, pN1, pM1_{Lebersegment 2}). Nach 24 Monaten wurde ein umschriebenes Lokalrezidiv festgestellt und der Patient reoperiert (ohne Residuum). Postoperativ unterzog er sich einer Chemotherapie mit Eloxatin, FU und Leukovorin. In der Tumornachsorge wurde folgend eine Lebermetastase festgestellt und erfolgreich radiofrequenzabladiert. Es wurde nun unter Studienbedingungen eine Behandlung mit Taurolidin 2% (300 mg/kg KG/Tag) begonnen. Relevante klinische oder laborchemische Nebenwirkungen konnten nicht festgestellt werden. Morphologische Kontrollen erfolgten mit CT-Untersuchungen in zweimonatigen Abständen. Nach 39 Behandlungseinheiten (1 Zyklus 5 Tage und 3 Wochen Pause) lag weiterhin CT-morphologisch ein „stable disease“ im Bereich des Ligamentum hepatoduodenale vor. Aufgrund eines Urothelkarzinoms wurde eine linksseitige Nephrektomie durchgeführt. Am 2. postoperativen Tag erlitt der Patient jedoch einen fulminanten Myokardinfarkt und verstarb. Die Autopsie konnte kein Residuum des bekannten Magenkarzinoms mehr nachweisen. Die Lebensqualität wurde mit einem EORTC QLQ C30 Fragebogen jeweils am ersten und letzten Behandlungstag erhoben.

Zusammenfassung: Die intravenöse Behandlung mit Taurolidin 2% könnte zu einer Remission des Magenkarzinom-Re-Rezidives geführt haben. Relevante klinische Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Die Lebensqualität des Patienten war sehr gut und wurde durch die Behandlungseinheiten nicht reduziert.

PMID: 16796759

5. Diskussion

5.1. Molekularbiologische Untersuchungen

5.1.1. Angiogenese und Inhibitionsmöglichkeiten

Die Angiogenese spielt in physiologischen Prozessen wie Embryogenese, Reproduktionszyklus, Wundheilung und Wachstum, wie auch im Rahmen chronischer Erkrankungen, beispielsweise der diabetischen Retinopathie, der chronischen Polyarthritiden und bei allen Tumorerkrankungen eine entscheidende Rolle. Die Weiterentwicklung von Angiogenese-Hemmstoffen gilt in der Tumorthherapie als aussichtsreich [59].

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der sich aus mehreren Einzelschritten zusammensetzt. Zunächst wird die Basalmembran proteolytisch aufgelöst und Endothelzellen migrieren und proliferieren in Richtung des angiogenen Stimulus. Es findet eine Umstrukturierung der extrazellulären Matrix und die Bildung neuer dreidimensionaler Tubuli zu einem abgedichteten Blutgefäßbaum statt [60]. Anders als bisher angenommen entstehen die Gefäßstrukturen nicht nur aus Kapillaren, sondern aus Endothelstammzellen. Diese sind stetig in der Lage durch Blutzirkulation an jeder beliebigen Körperstelle aktiviert zu werden [61]. Zur experimentellen Erfassung der Angiogenese dienen zwei Zelltypen [62]. Beide sind Zellreihen endothelialer Herkunft: Endothelien der Rinderaorta oder der menschlichen Nabelvene. Für unsere Experimente wurden letztere gewählt: sogenannte HUVEC-Zellen (human vein endothelial cells). Endothelzellen sind metabolisch aktiv und produzieren Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und vasoaktive Proteine. So nehmen sie Einfluss auf die angeborene und zelluläre Immunantwort, die Reparatur von Organ- und Bindegewebe sowie auf kardiovaskuläre, renale und pulmonale Funktionen [15].

Ein entscheidender angiogener Promotor ist der endotheliale Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF). Er wird von den Tumorzellen selbst produziert, um die Blutversorgung der Neoplasie zu sichern. So findet sich im Gewebe von hochmalignen Glioblastomen erhöhtes VEGF, während es im gesunden Gehirn-Parenchym nicht detektierbar ist [38]. VEGF stimuliert die Freisetzung von Substanzen, die die extrazelluläre Matrix umbauen. Eigene Untersuchungen konnten belegen, dass Taurolidin VEGF *in vitro* reduziert [32;37]. Folglich könnten Endothelproliferation, -migration und Neuorganisation sowie die Permeabilitätssteigerung tumorassoziierter Kapillaren reduziert werden. Die Endothelproliferation bestehender Gefäße wird mit der Tubulogenese

beschrieben. Ungeachtet der Komplexität der Vorgänge ist die Tubulogenese in Matrigel quantifizierbar [15]. Matrigel ist eine aus Kollagenfasern bestehende gallertige Masse, die die extrazelluläre Matrix in der Nähe von Gefäßen simuliert und *in vivo* Bedingungen modellartig abbilden kann. In Matrigel bilden HUVEC physiologischerweise Tubuli. Antiangiogen wirksame Substanzen verhindern sichtbar und quantifizierbar die Tubulusbildung und sind potentielle Hemmstoffe der Tumorangiogenese.

5.1.2. Analyse neuer tauroolidinähnlicher Substanzen

Die intrazelluläre Konzentration des Transkriptionsfaktors c-Jun hat Einfluss auf die Produktion von VEGF und somit auch auf die Tumorangiogenese. *In vitro* Studien mit Tauroolidin haben gezeigt, dass c-Jun und die Konzentration von VEGF im Überstand von Zellkulturen deutlich reduziert werden [37]. Aus der Literatur sind Hemmstoffe der CSN-assoziiierenden Kinasen wie Emodin, Curcumin und Resveratrol bekannt, die ebenfalls intrazelluläre c-Jun Spiegel absenken und die VEGF Produktion blockieren [63-65]. Curcumin ist *in vitro* und *in vivo* antineoplastisch wirksam. Es ist als Nahrungsmittel nahezu unbegrenzt verfügbar [66]. Ähnliche molekularbiologische Daten wurden auch für Tauroolidin erhoben. Es kann wie Curcumin als nutritive Substanz (aber aus der Aminosäure Taurin) oral mit der Nahrung aufgenommen werden. So wird Taurin in zahlreichen Produkten verwendet, welche als „energizer“ im Handel angeboten werden. Wir haben untersucht, ob Strukturanaloga vergleichbare Effekte erzielen. Als Vorlage bei der Suche ähnlicher Substanzen diente das Tauroolidin-Molekül. Es wurde in einer speziellen mathematischen Form digital (dual) kodiert und mit einer Charité-eigenen Datenbank verglichen [59].

5.1.3. In silico screening zur Detektierung von Angiogenesehemmstoffen

In silico screening ist ein revolutionäres, mathematisch-vergleichendes Verfahren basierend auf dualen Strukturdaten, welches biochemische Prüfzeiten, Kosten und personellen Aufwand bei der Suche nach neuen Substanzen erheblich verkürzt.

Mit Hilfe der bereits bekannten Hemmstoffe wurden durch dreidimensional-strukturelle und chemische Vergleiche (*in silico screening*) neue Substanzen gefunden. Das *in silico screening* wurde mit einer internen Datenbank (des Instituts für Biochemie, Frau Dr. Melanie Füllbeck) durchgeführt, die zur Zeit mehr als vier Millionen Substanzen aufweist, welche für molekularbiologische Experimente theoretisch sofort zur Verfügung

stehen [59]. Die Suche wird durch bestimmte Eigenschaftsfiter (Lipinski's Rule-of-Five) spezifiziert [67]. Bei der 3D Suche werden strukturelle Eigenschaften bekannter Stoffe mit denen der Datenbank verglichen und Substanzen, welche höchstwahrscheinlich toxisch sind sofort ausgeschlossen. Chemische Ähnlichkeiten werden bei einer 2D Suche berücksichtigt [68].

Durch *in silico screening* wurden Taurultam-verwandte Substanzen detektiert, die wir erwarben und testeten. Davon waren fünf 2D und drei 3D Vergleiche gefunden worden. Die Substanz 5X-0835 wurde in beiden Verfahren detektiert [69].

Der Effekt der Substanzen auf die Proteinbiosynthese bei humanen Zellen wurde zunächst im Westernblot getestet. Die intrazelluläre Konzentration von ID1, I κ B α , c-Jun und p27 fielen durch die Behandlung der HeLa mit 5X-0835 ab. Dies entsprach der Wirkung des Taurolidin-Metaboliten Taurultam auf die gleiche Zellreihe. Auch AMB-3543 bewirkte eine Abnahme der intrazellulären c-Jun Konzentration und ist damit ein potentieller Hemmstoff der Tumorangiogenese.

Im Zellviabilitäts-Assay (MTT-Test) zeigte 5X-0835 eine stärkere Wirkung als Taurolidin in vergleichbaren Konzentrationen.

Im Matrigel-Tubulogenese-Assay konnte eine deutliche Abnahme der Tubulogenese bei fast allen Substanzen gezeigt werden. Eine Ausnahme bildeten hier die Substanzen 12P-0027 und 5W-0902, für die kein hemmender Effekt der Tubulogenese beobachtet werden konnte. Beide Substanzen wurden ausschließlich durch 3D screening entdeckt. Die Substanzen, die durch 2D screening detektiert wurden, zeigten vollständig tubulogenese-blockierende Effekte, wenn sie in ihrer Molsimilarity über 61 % lagen und schwächere tubulogenese-hemmende Effekte, wenn diese unter 60 % lag.

Die experimentellen Ergebnisse zeigten zunächst anhand eines *in vitro* Invasionsassays, dass Taurolidin in allen angewandten Dosierungen (5 μ l, 10 μ l und 20 μ l) hoch wirksam ist. Dies führte zu einer entscheidenden Hemmung der Invasion durch eine simulierte Basalmembran. Ein Proliferationstest ergab zudem, dass zweiprozentiges Taurolidin die Proliferation der Tumorzellen auch in den beschriebenen Konzentrationen vermindert. Hierfür wird hauptsächlich eine Apoptose-induzierende Wirkung der Substanz verantwortlich gemacht.

5.1.4. *In vitro* Untersuchungen mit neuen Antiangiogenetika

Die antineoplastische, lösliche Substanz Taurolidin stellte eine interessante Therapieform dar, da die Nebenwirkungen auf physiologische Zellen gering waren und die Tumorzellen überwiegend in Apoptose übergangen [56]. Bereits 1990 führten erste Beobachtungen *in vitro* und am Tiermodell zu der These, dass Taurolidin auch die Adhärenz freier Tumorzellen hemmen und das Auftreten von Lokal-Rezidiven verringern kann. Daraufhin erfolgten umfangreiche Forschungen sowohl *in vitro* [25;48;70] als auch *in vivo* am Modell der Ratte [56;71], der Maus [72;73] und am syrischen Goldhamster [46].

In vitro Versuche belegten, dass Tumorzellen sich nach Behandlung mit Taurolidin von der Unterlage ablösen und ihre Adhärenz verlieren. Nach einer 72 stündigen Inkubation mit Konzentrationen von 50-100 μM Taurolidin, verloren 50-80 % der Zellen ihre Fähigkeit zur Adhärenz. In eigenen Vorarbeiten wurden zunächst humane Kolonkarzinomzellen und Karzinomzellen der Ratte *in vitro* mit den entsprechenden Substanzen zwei Stunden lang inkubiert und eine Zellkinetik über 4 Tage durchgeführt [25]. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte die Inkubation mit Heparin hier keine Änderung. Hingegen führte neben PVP-Jod, Taurolidin und die Kombination Heparin/Taurolidin zu einer hoch signifikanten Suppression des Tumorzellwachstums. Die genannten Versuche sind durch die Gruppe um Calabresi bestätigt worden [72]. Dort wurden tumor-suppressive Effekte von Taurolidin durch die Inkubation von 26 weiteren unterschiedlichen Tumorzelllinien nachgewiesen.

In einem weiteren *in vitro* Experiment wurde das Adhäsions- und Migrationsverhalten von Tumorzellen an einer simulierten Basalmembran analysiert. Als Basalmembran wurde ein Polycarbonfilter (100 μg Matrigelwachstumsoberfläche mit 8 μm Porengröße) zur Erkennung des Tumorzellmigrations-Potentials eingesetzt [34]. Die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen durch die Basalmembran konnte hierbei reduziert werden.

Neben molekularbiologischen Arbeiten wurden von einigen Forschergruppen tierexperimentelle Daten publiziert. Diese wiesen jedoch eine große Varianz wirksamer Taurolidinkonzentration auf. So wurde eine IC₅₀ von 10 μM bis 126 μM angegeben [43;44;47;72].

5.2. Tierexperimentelle Forschungen

Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen von Taurolidin variierten erheblich (0,1 μM - 14 mM) und sind daher schwer vergleichbar. Zum Nachweis der Einleitung einer Apoptose waren die Differenzen zwischen den Tumorzelllinien jedoch ähnlich hoch. Einige Arbeiten beschreiben einen maximal-apoptoseeinleitenden Prozess, wenn 18 μM verwendet werden [71]. Andere Publikationen wiesen bei humanen Zellen einer Leukämiezelllinie (HL-60) eine 90 prozentige Apoptoseinduktion bei einer Konzentration von 150 μM , 704 μM bis 1,76 mM nach [43;45;48]. Die Gründe sind in verschiedenen Untersuchungsmodellen zu suchen. So wurde keine einheitliche Inkubationszeit beschrieben. Desweiteren sind unterschiedliche Zelllinien und ungleiche Apoptosemarker verwendet worden. Vergleicht man die mittleren Hemmkonzentrationen von Tumorzellen mit denen für Bakterien oder Pilzen, so liegen diese bei Eukaryonten bis um den Faktor 10^3 niedriger (200-1024 mg/dl) [53]. In den ersten Tierexperimenten, welche Verteilungsvolumen und Toxizität überprüften führten intraperitoneale Applikationen von Taurolidin in klinisch sinnvollen Konzentrationen nach ungefähr 15 Minuten zu einer vollständigen systemischen Resorption ohne relevante Nebenwirkungen. Erhöht man die Konzentrationen exzessiv, so wurden vagotone Nebenwirkungen beschrieben [53]. Das Verteilungsvolumen konnte aufgrund einer nicht bestimmbaren Diffusion für das Molekül nicht berechnet werden. Da dies neben lokal-intraperitonealen Effekten auch zu einer systemischen antineoplastischen Wirkung führen kann, lag unseren Tiermodellen bei intravenöser Applikation folgende Rechnung zugrunde: das Verteilungsvolumen beträgt circa 70 % des Körpergewichtes, daher sind bei 250 g Ratten 1 ml 0,5 % Taurolidin in 175 ml etwa 28 $\mu\text{g/ml}$ (99 μM). Werden die Konzentrationen gesteigert, dann sind in 1 ml 1 % Taurolidin in 175 ml etwa 57 $\mu\text{g/ml}$ (201 μM) und in 1 ml 3 % Taurolidin in 175 ml etwa 171 $\mu\text{g/ml}$ (602 μM). Dieses sind nur Näherungswerte. Sie verdeutlichen jedoch die Schwierigkeiten bei der Vergleichbarkeit der Daten und begründen die Verwendung komplizierter Dosisangaben.

Zur Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht bei Taurolidin ebenfalls eine uneinheitliche Datenlage. Der Vergleich der vorliegenden Studien war schwierig, da stark voneinander abweichende Angaben publiziert wurden. Entweder wurden Dosis pro Körpergewicht, oder Dosis pro Tier sowie die Konzentration der applizierten Lösung angegeben. Die Arbeiten ließen aufgrund der gewählten Formulierungen und begrenzten Angaben keinen Rückschluss auf die Rohdaten zu. Teilweise fehlten die Angaben für das Tiergewicht.

Somit können therapeutische Konzentrationen nicht oder nur indirekt errechnet werden. In den *in vitro* Studien erfolgten die Angaben der Konzentrationen in µg/ml (Microgramm pro Milliliter) oder in µM (Micromolar). Alle publizierten Daten wurden vor Durchführung der Experimente aufgearbeitet und die fehlenden Angaben - soweit durch die Manuskriptdaten reproduzierbar – errechnet oder von uns ergänzt.

Im Unterschied zu *in vitro* Experimenten wird Taurolidin nach circa 15 Minuten aus dem Abdominalraum resorbiert [52;54]. Es war ein Modell nötig, um die *in vitro* Bedingungen auf neue *in vivo* Experimente übertragen zu können.

Es lagen nur wenige *in vivo* Modelle vor, die die antineoplastische Wirkung von Taurolidin belegten. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einem früheren Experiment zeigen, dass Kolonkarzinom Zellen der Linie DHD/K12/TRb durch Taurolidin am Wachstum gehindert werden [56]. Forschungsergebnisse wiesen am Modell der Maus nach, dass eine frühe peritoneale Instillation mit der Kombination aus 0,5 % Taurolidin und Heparin zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führt (Ovarialkarzinom) [74]. Andere Studien unterstützten die Daten [71]. Es wurde eine signifikante Reduktion der Tumormetastasen (Tumorknoten) und der Inzidenz von Port-site Metastasen beschrieben. Die Reduktion von Port-site Metastasen konnte darüber hinaus auch in einem Pankreaskarzinommodell am syrischen Goldhamster gezeigt werden [41;46]. In einem Mausmodell wurde ein verlängertes Überleben und eine geringere Inzidenz von Metastasen der eingesetzten B16 Melanomzelllinie nach intraperitonealer Taurolidintherapie (2 %) gegenüber der Kontrollgruppe (NaCl intraperitoneal) nachgewiesen [73]. Die Tumorzellen wurden subkutan (sc), intralial und intravenös (iv) appliziert und das gesamte Tumorgewicht nach kurzer Zeit bestimmt. In dem Modell sind die Beobachtungszeiten jedoch sehr kurz. Außerdem existieren 10 verschiedene Aggressivitätsgrade der Melanomzelllinien (F1 bis F10). Daher ist das Modell schwer vergleichbar. In einem anderen Modell führte die lokale Therapie mit Taurolidin bei einem intraperitonealen Ovarialzelltumor zu einer Verminderung der Tumorinzidenz und des Tumorgewichtes bei der Maus [72].

Die vielversprechenden Daten führten zur Planung und Durchführung mehrerer eigener Studien am Kleinnager (Ratte). Es wurden zunächst die Effekte einer intraperitonealen Behandlung von Taurolidin nach einer offenen chirurgischen Behandlung [40] oder nach Insufflation des Peritoneums mit Kohlendioxid im Sinne einer Laparoskopie untersucht [57]. Zusätzlich wurden intraperitoneale und intravenöse Instillationen mit steigenden Konzentrationen und längeren Therapiezeiträumen vorgenommen [32;33]. Es wurde eine

konzentrationsabhängige antineoplastische Wirkung wie bei den meisten publizierten Studien beobachtet. Unsere Behandlungen waren erfolgreicher, wenn lokale Applikationen und steigende Dosierungen verwendet wurden. Die Gründe sind bisher unklar, könnten jedoch auch über eine systemische Zytokinmodulation reguliert werden [75]. Zusätzlich ließ sich aus den Tierversuchen ableiten, dass die Insufflation des Abdomens mit Kohlendioxid zu keiner Stimulation des Tumorwachstums führt, auch wenn die Oberfläche des Viscerum verletzt (angetrocknet und eventeriert) wird [57]. Es ist jedoch auch davon auszugehen, dass die antineoplastische Wirksamkeit Taurolidins unter Insufflationsbedingungen mit Kohlendioxid nicht inhibiert wird. Ein Anstieg der Inzidenz von Trokar-Metastasen wie sie in einigen frühen Arbeiten zur Laparoskopie beschrieben wurde [2;3;9] konnte im Tierversuch nicht nachvollzogen werden [57]. In den Experimenten wurden Trokar- oder Inzisionsmetastasen seltener beobachtet, wenn die Wunden in direkten Kontakt mit Taurolidin kamen [40]. Da zusätzlich Heparin eingesetzt wurde, könnte der additive Effekt beider Substanzen eine Modulation von Oberflächenrezeptoren bewirkt haben. Unterstützt wurde die Hypothese durch vorliegende Studien, die die Inaktivierung von Adhäsionsmolekülen beschrieben [25;76-78]. Heparin hat synergistische antiadhärente Effekte und bewirkt durch Bindung oberflächlicher Rezeptoren eine Reduktion der Zellhaftung [25;72;74]. Die Daten wurden in verschiedenen Tiermodellen verifiziert und an mehreren Tumorzelllinien geprüft. Sieben Tage nach intraperitonealer Induktion eines Ovarialzellkarzinoms wurde bei Mäusen eine Insufflation mit Kohlendioxid (Laparoskopie) vorgenommen [74]. Am ersten und am zweiten postoperativen Tag wurden die Tiere intraperitoneal mit antineoplastischen Substanzen behandelt. Die Operation und das damit verbundene Trauma führten zu einer Verkürzung der Überlebenszeit. In den Gruppen bei denen eine Behandlung mit Taurolidin/Heparin durchgeführt wurde, ist eine verlängerte Überlebenszeit festgestellt worden. Die Autoren beschrieben die Bindung freier Domänen der Extrazellulärmatrix durch Taurolidin/Heparin und bestätigten die Hypothese. Frühere Arbeiten beschrieben im Rattenexperiment (BD-IX, DHD/K12/TRb Zellen) nach Etablierung eines Pneumoperitoneums und Therapie mit Taurolidin und Heparin eine Hemmung des Tumorwachstums [25;56]. Hierbei wurde durch Heparin ($p < 0,01$) und Taurolidin ($p < 0,001$) ein signifikant inhibierender Einfluss auf ein lokales Tumorzellwachstum festgestellt. Eine Kombination führte zu einem additiven Effekt ($p < 0,0001$). Hier wurde ebenfalls die Hemmung der Bindungsfähigkeit von Tumorzellen durch Blockierung der Extrazellulärmatrix beschrieben. In einem fortführenden

Experiment wurde der Einfluss mehrerer Insufflationsgase auf das intraperitoneale Tumorwachstum untersucht. Die Behandlung der Tumoren wurde mit Taurolidin, Taurolidin/Heparin, PVP-Jod und Ringer-Lösung durchgeführt. Taurolidin sowie Taurolidin/Heparin bewirkten im Vergleich zu den anderen gebräuchlichen Substanzen eine deutlichere Reduktion des Tumorwachstums [79]. Die Autoren vermuteten, dass ein integrierender Teil der antineoplastischen Wirksamkeit von Taurolidin über die Methylierung freier Domänen der Extrazellulärmatrix, insbesondere an Stellen mit verletzter Membran vermittelt wird. Hierzu schien ein direkter Kontakt von Tumorzellen mit Taurolidin notwendig zu sein [41;42;46;71-73]. Es schien zunächst unwahrscheinlich, dass eine intravenöse Injektion eine intraperitoneale tumorinhibierende Wirkung erzielen könnte. Eine intravenöse Therapie konnte nach einmaligem Einsatz geringer Dosen das Tumorwachstum nicht beeinflussen [40;57]. Nach intravenöser Applikation bedingt die Pharmakokinetik von Taurolidin bei einmaligem Einsatz wahrscheinlich eine begrenzte intraperitoneale Konzentration [53]. Es schien denkbar, dass Metabolisierung, Hydrolyse oder Bindungen an Plasmaproteine die Wirkung der Substanz abschwächen. Es liegen jedoch bisher keine Studien vor, welche die intraperitoneale Konzentration nach einer intravenösen Applikation untersucht haben. Hingegen wurde die abdominale Resorptionsrate sowie die Veränderung der Resorption bei Peritonitis in frühen Studien sehr gut untersucht [54].

In späteren Experimenten wurde nachgewiesen, dass eine einwöchige intravenöse Therapie mit Taurolidin/Heparin in einem späten Stadium das intraperitoneale Tumorgewicht dosisabhängig reduzieren kann [33]. Die Gefäßversorgung fortgeschrittener Tumoren ist jedoch durch die Tumorangio-genese bereits so gut ausgeprägt (nach einem angiogenic switch), dass die aktiven Substanzen offensichtlich direkt an den Wirkort transportiert werden können. Lokale Konzentrationen könnten damit rein rechnerisch die 4,0 mM Konzentration überschreiten und liegen damit deutlich über der mittleren Hemmkonzentration von 1,4 mM, welche für *in vitro* Experimente ermittelt wurde [37].

Aus den Tierexperimenten ließ sich ableiten, dass eine perioperative Lavage zur Prophylaxe lokoregionärer Rezidiverkrankungen sinnvoll sein könnte. Damit ließen sich jedoch nicht die späteren Ergebnisse erklären, welche zeigten, dass hohe Konzentrationen in einer längeren Behandlungszeit Tumorwachstum reduzieren [33]. Beim Menschen wurden zur Behandlung der Peritonitis bereits niedrige Dosierungen eingehend untersucht [49-51;54;80]. Hohe Dosierungen von Taurolidin ließen im Tierversuch bei adäquater

Infusionsgeschwindigkeit keine relevanten Nebenwirkungen erkennen [32;33]. Daher schien es denkbar, dass ein intraperitonealer Einsatz (Lavage, Applikation) bei Tumorerkrankungen des Menschen möglich ist. Im Rahmen einer klinischen, prospektiv randomisierten Multizenterstudie wurde der lokale Einfluss validiert [31].

5.3. Klinischer Einsatz unter Studienbedingungen

Während der Resektion gastrointestinaler Tumoren können freie und vitale Tumorzellen disseminieren, adhären und die Ursache für Lokalrezidive bilden [81-83]. Neben der chirurgisch-onkologischen Resektion maligner Tumoren des Gastrointestinaltraktes ist die Ermittlung potenter, nebenwirkungsarmer Behandlungsoptionen ein zentrales Thema der onkologischen Forschung. Hier könnten intraoperative Lavagen mit antineoplastisch-aktiven Substanzen eine neue Behandlungsmöglichkeit darstellen.

Trokarmetastasen wurden am Anfang der laparoskopischen Onko-Chirurgie oder bei unerwarteten Malignomen häufiger beschrieben [1;2;9;84]. Da seit circa zwölf Jahren auch Karzinome laparoskopisch reseziert werden, stellte sich die Frage, ob die Operationsmethodik dafür verantwortlich sein könnte [6;25;55;56]. Das zur Insufflation benutzte Kohlendioxid bewirkt eine intra- und extrazelluläre Azidose. Intraperitoneale Makrophagen reagieren besonders sensibel mit einer Funktionsänderung [16;21;85]. Kohlendioxid führt zu einer gesteigerten Produktion des wachstumstimulierenden IL-1 β [85]. Vitale Tumorzellen können perioperativ stimuliert werden, wenn die lokalen Spiegel von IL-1 β durch gestörte Makrophagenaktivität erhöht sind [19]. Pathogenetisch wird dieser Prozess zusätzlich durch Adhäsionsvorgänge zwischen Tumorzellen und dem Peritoneum sowie dem Lymph- und Gefäßsystem beeinflusst [17;86]. Da Kohlendioxid die Funktion intraperitonealer Makrophagen beeinflusst, können das verwendete Insufflationsgas und der Insufflationsdruck ebenfalls als Ursache für eine Veränderung des Tumorwachstums und der damit verbundenen lokalen Immunabwehr diskutiert werden [1;6-8]. Es wurde der Einsatz von Taurolidin bei kolorektalen,

Pankreas-, Magen- und kolorektale Resektionen wurden im Rahmen einer multizentrischen Studie an drei deutschen Universitätskliniken aufgrund eines Karzinomleidens durchgeführt und eine intraoperative, intraperitoneale Instillation von Taurolidin vorgenommen. Die in der Literatur beschriebene Apoptose-induzierende Wirkung von Taurolidin schien in adäquaten Dosierungen ausreichend zu sein, um das Wachstum eines fortgeschrittenen gastrointestinalen Tumors zu begrenzen (oder zu hemmen) [14;35;36;39;43]. Bisherige tierexperimentelle Untersuchungen [33;34;40-42;46;57;71;72] und erste klinische Einsätze [35;38] beschrieben keine relevanten Nebenwirkungen.

Im Gegensatz dazu ist wasserlösliches PVP-Jod im Abdominalraum eine in Deutschland sehr häufig eingesetzte Lösung [87]. Momentan gibt es keine klinischen Studien, welche die Relevanz von PVP-Jod bei der intraperitonealen Therapie evaluiert. In einer *in vivo* Studie wurde nachgewiesen, dass 0,16 % PVP-Jod antineoplastisch gegen Tumorzellen wirkt [88]. Die Substanz wird durch Proteinreaktion schnell verbraucht (Farbumschlag). Damit nimmt die Wirksamkeit ab, ohne dass der Anwender eine Aussage über die noch verbleibende Aktivität machen kann. Außerdem sind die Resorption und der weitere Leber-Metabolismus der lösungsvermittelnden Grundsubstanz Polyvinylpyrrolidon weitgehend unbekannt. Somit scheint der Einsatz bei Leber- oder Nierenfunktionsstörungen problematisch. PVP-Jod zerstört peritoneale Makrophagen und Mesothelzellen und bewirkt im Gegensatz zu Taurolidin ein Anstieg der Fibrinproduktion auf der Leberoberfläche und induziert damit Adhäsionen [56].

Einer Umfrage zufolge wurde PVP-Jod ohne Evidenz in vielen Krankenhäusern routinemäßig bei Resektionen maligner Tumoren und der intraoperativen Lavage des Abdomens verwendet [87]. In tierexperimentellen Studien führt PVP-Jod bei intraperitonealer Applikation zu erheblichen Nebenwirkungen [56]. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass PVP-Jod die lokale Erhöhung des Wachstums promotors IL-1 β nicht verhindern kann [31]. Taurolidin inhibiert die Mechanismen, welche das Zellwachstum stimulieren [40;71]. Obwohl die Zytokine schon lange beforscht werden, war die immunologische Reaktion der Interleukine auf Taurolidin oder PVP-Jod, welche durch IL-1 β , IL-6 oder IL-10 exemplarisch gemessen wurden, bisher unbekannt [89]. Es wurde die Beziehung IL-1 Polymorphismen zusammen mit einem erhöhten Risiko einer Tumorentstehung von Magenkarzinomen mit einer odds ratio von 2,7 bei Existenz des Gens 1B-511T beschrieben [90]. Ähnliche Daten wurden für Interaktionen von IL-1 β Polymorphismen und Helicobacter Pylori Infektionen und dem Entstehen von Magenkarzinomen formuliert [91;92]. Homozygote Patienten (2 Allele) für das IL-1 Gen hatten geringere Überlebensraten als die Vergleichsgruppen, bei denen sogar höhere Entzündungswerte (CRP) nach Pankreasresektionen vorlagen [93]. Die Studien zeigen die Relevanz und den Zusammenhang von IL-1 β und Karzinogenese. In unserer klinischen Studie wurden nach Resektion von kolorektalen Tumoren, Magen- oder Pankreaskarzinomen geringere abdominale Spiegel von IL-1 β nach Taurolidin-Therapie ($p < 0,001$) im Vergleich zu PVP-Jod festgestellt. Diese Daten könnten als immunmodulatorischer Effekt von Taurolidin in verschiedenen Tumorentitäten gewertet werden. Es wurde jedoch kein Effekt auf die Überlebensrate festgestellt [31]. Eine

Aussage über einen möglichen systemischen Effekt kann aus unserer Studie nicht getroffen werden, da die Sensitivität unseres Reaktionsansatzes im Gegensatz zu dem von Leung et al. geringfügiger war [89]. Es konnte jedoch kein systemischer Effekt auf die Leukozytenzahlen oder das CRP nach Taurolidinbehandlung abgeleitet werden. Als Parameter für die immunologische Kompetenz wurde der HLA-DR-Status herangezogen. Hier wiesen die Patienten nach Taurolidintherapie am ersten und zweiten postoperativen Tag höhere Werte auf als die Vergleichsgruppe, welche mit PVP-Jod behandelt wurde. Die Daten könnten als bessere Abwehrlage durch Taurolidin Stimulation nach Tumorresektionen interpretiert werden und unterstützen frühere tierexperimentelle Daten [73].

Der Krankheitsverlauf nach möglicher Tumorzell dissemination ist erheblich von der immunologischen Kompetenz, der Tumorentität und der Zellzahl abhängig. In unserer Studie wurden nach Tumorresektion mit onkologischem Standard bei einem Patienten je Gruppe (1/60) freie Tumorzellen in der Bauchhöhle detektiert. Die Rate ist mit denen in der Literatur vergleichbar, wenn eine kurative Resektion durchgeführt wird [94]. Es ist bekannt, dass durch vitale Tumorzellen lokoregionale Rezidive induziert werden können. Die Gesamtüberlebensrate (kolorektales Karzinom, Magen- und Pankreaskarzinom) war 35,5 Monate nach Taurolidin- und 22,1 Monate nach PVP-Jod Behandlung ($p=0,34$). Die geringe Patientenzahl scheint für den fehlenden Unterschied verantwortlich zu sein. Besonders deutlich wird dies, da die UICC Stadien und die ASA Klassifizierungen in der Taurolidin-Gruppe höher waren als in der Kontrollgruppe.

Die „Holländische Studie“ und die „British Medical Research Cancer“ Studie sind die bekanntesten europäischen Studien, welche den Benefit einer systematischen D1- versus einer D2-Lymphknotendissektion beim Magenkarzinom untersuchten [95-98]. Bisher ist kein Vorteil für eine D2-Dissektion nachgewiesen worden. Daher wurde die Magenresektion in unserer Studie mit einer D1- Dissektion durchgeführt. Obwohl die adjuvante Chemotherapie nach R0-Resektion kontrovers diskutiert wird [99;100], sind ein Patient der Taurolidin-Gruppe und sieben Patienten der Kontrollgruppe chemotherapiert worden ($p=0,02$). Die mediane Überlebenszeit war mit 12,8 Monaten in der Taurolidin-Gruppe und 12,4 Monaten in der Kontrollgruppe jedoch nicht verschieden ($p=0,65$).

Die Pankreaskarzinompatienten hatten eine schlechte Prognose. Diese ist mit den Angaben der Literatur vergleichbar [101;102]. Die medianen Überlebenszeiten waren 15,6 Monate in der Taurolidin-Gruppe und 10,5 Monate in der Kontrollgruppe.

Möglicherweise war auch hier die geringe Patientenzahl der Grund dafür, dass statistisch kein Unterschied festgestellt wurde ($p=0,66$).

PVP-Jod wird häufig zur Hautdesinfektion benutzt, um Wundheilungsstörungen vorzubeugen. Die subkutanen Wundinfektionen waren nach abdominaler Lavage mit PVP-Jod jedoch höher als nach Taurolidin-Behandlung. In der Literatur sind analoge Angaben darüber beschrieben worden [87]. Insgesamt scheint daher die intraoperative Instillation mit Taurolidin eine sinnvolle Alternative für eine begleitende nebenwirkungsarme intraperitoneale Therapie zu sein.

Das Ziel weiterer klinischer Forschungsleistungen war es, die Sicherheit eines intravenösen Einsatzes von Taurolidin zu prüfen. In einer Studie wird momentan das Medikament bei Rezidiven oder fortgeschrittenen Stadien eines Magen- oder Pankreaskarzinoms auf Verträglichkeit geprüft. Eine wirksame palliative Therapie, ist trotz der bekannten und bei einer Ersterkrankung eingesetzten Zytostatika, bei Rezidiven eines Magenkarzinoms bisher noch nicht bekannt [103-108]. Der Entschluss zur Durchführung unserer Studie wurde aufgrund der vielversprechenden molekularbiologischen Forschungen und der geringen Toxizität gefasst. Die ermittelte fünfzigprozentige Hemmkonzentration von c-Jun (spezifisch für Angiogenese) wurde mit 1,4 mM bestimmt. Zunächst wurde die erreichbare Konzentration bei kontinuierlicher intravenöser Infusion von 2 % Taurolidin errechnet: für einen 69 kg schweren Patienten wird bei 300mg/kg Körpergewicht und Tag (gesamt 20,7 g) bei einem Blutvolumen von 6 % Körpergewicht (4,14 l) und einem Molekulargewicht von 286 g/mol in einer Stunde eine Konzentration von circa 0,73 mM erreicht. Wenn stetig 862,5 mg pro Stunde infundiert werden, ist nach 2,2 Stunden (mittlere intravenöse Halbwertszeit) eine Konzentration von 1,60 mM erreicht. Die Substanz wird hydrolytisch abgebaut [53], aber bei kontinuierlicher Therapie stetig zugeführt. Damit bleibt die Konzentration stabil. Die klinisch erreichbare Konzentration (1,60 mM) liegt also über der mittleren Hemmkonzentration (1,4 mM) für Tumorzellen [37]. Damit schien ein intravenöser Einsatz bei fortgeschrittenen Tumoren schlecht behandelbarer Entitäten theoretisch erfolgversprechend.

Das Ziel der weiteren Forschung sind neben der klinischen Überprüfung weiterhin molekularbiologische Untersuchungen. Eigene Experimente verweisen auf mögliche anti-angiogene Effekte durch Hemmung der Proteinbiosynthese [37]. Ferner scheint bei

bekannter molekularer Struktur die Suche nach analogen oder ähnlichen Substanzen gerechtfertigt, welche mittels *in silico screening* ermittelt werden können [59].

Ausblick

Taurolidin ist eine antiadhärente Substanz, welche antibiotisch wirkt und antineoplastische Eigenschaften besitzt. Prokaryonten und eukaryontische Tumorzellen werden nach Kontakt am Wachstum gehemmt. Taurolidin bindet Fimbrien von Bakterien, neutralisiert deren Lipopolysaccharide und Exotoxine, reduziert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, blockiert Adhäsionsmoleküle auf Tumorzelloberflächen, leitet Apoptose ein, begrenzt das Wachstum von Tumoren im Tierexperiment und reduziert proinflammatorische Zytokinspiegel des Abdomens nach konventionellen Resektionen gastrointestinaler Tumoren beim Menschen. Die antineoplastische Wirkung wurde bisher bei mehr als 30 Tumorzelllinien nachgewiesen. Der entscheidende Wirkmechanismus ist identifiziert und scheint in der Blockierung der Proteinbiosynthese zu liegen. In einer frühen Phase der Translationsformation inhibiert Taurolidin die Bildung des Komplexes und blockiert damit die Proteinsynthese. Wahrscheinlich reagieren Tumorzellen durch höhere Proliferationsleistung und einen höheren Bedarf an Proteinen sensibler als physiologische Zellen. Die Substanz inhibiert die Tubulogenese, einen bedeutenden Schritt der Angiogenese, in klinisch anwendbaren Dosierungen. Taurolidin kann unter *in vitro* Bedingungen den „angiogenen switch“ verhindern und die nutritive Versorgung von Tumoren hemmen.

In einer aktuellen Studie wird die Toxizität des intravenösen Einsatzes von 2 % Taurolidin bei fortgeschrittenen Krankheitsstadien des Rezidivs eines Magen- oder Pankreaskarzinoms analysiert.

Die Daten aus der Studie zur Sicherheit/Toxizität von Taurolidin werden in Kürze publiziert werden. Bei entsprechender Datenlage ist ein kombinierter, primärer intravenöser und intraperitonealer, perioperativer Einsatz bei Resektion von Magen- oder Pankreaskarzinomen denkbar. Die klinische Bedeutung antineoplastischer Effekte wird derzeit in einer neuen nationalen Multizenterstudie untersucht, welche die Rate von Metastasen und Lokalrezidiven nach intraoperativer Instillation und Lavage mit Taurolidin (2 %) mit der gebräuchlichsten Bauchspülung (0,9 % NaCl) vergleichen soll (n=2000).

Neue struktur- und wirkungsähnliche Substanzen werden durch *in silico screening* und durch molekularbiologische Experimente identifiziert und *in vitro* sowie *in vivo* getestet, um eine bessere Verträglichkeit und Effektivität zu erzielen. Der Einsatz ist auch in Kombination mit anderen Medikamenten denkbar.

Aufgrund ausbleibender Beobachtungen klinisch relevanter Nebenwirkungen stellt die Substanz möglicherweise eine wirkungsvolle Option bei der operationsbegleitenden intraperitonealen Applikation während der Resektion gastrointestinaler Karzinome oder der intravenösen Behandlung fortgeschrittener Malignome bei Ausschöpfung bekannter Standardverfahren dar. Der klinische Nutzen wird in prospektiven Studien untersucht, um die antineoplastische Wirksamkeit dieser nebenwirkungsarmen Substanz in Zukunft zu analysieren.

6. Abkürzungsverzeichnis

ASA - American Society of Anesthesiologists

CSN - COP9 Signalosom

HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cell

ELISA - enzyme linked immunosorbent assay

I κ B α - IkappaB alpha

IFN α - Interferon alpha

IFN γ - Interferon gamma

IKK - IkappaB Kinase Komplex

IL-1 α/β Interleukin alpha/beta

IL-6 - Interleukin 6

KG - Körpergewicht

μ M - micro Molar

ml – milli Liter

mM – milli Molar

NF- κ B - nuclear factor kappaB

PI - Propidiumjodid-Lösung

PS - Phosphatidylserin

PVP-Jod – Polyvinylpyrrolidon Jod

TGF β - Tissue Growth Factor beta

TNF α - Tumor Nekrose Faktor alpha

TRD - Taurolidin

Ub/26S Proteasom System - ubiquitin/26S Proteasom System

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor

7. Literaturverzeichnis

1. Jacobi CA, Ordemann J, Zieren HU, Muller JM. [Effect of intra-abdominal pressure in laparoscopy on intraperitoneal tumor growth and development of trocar metastases. An animal experiment study in the rat model]. *Langenbecks Arch.Chir Suppl Kongressbd.* 1998; 115:529-33.
2. Zmora O, Gervaz P, Wexner SD. Trocar site recurrence in laparoscopic surgery for colorectal cancer. *Surg.Endosc.* 2001; 15:788-93.
3. Jacobi CA, Keller H, Monig S, Said S. Implantation metastasis of unsuspected gallbladder carcinoma after laparoscopy. *Surg.Endosc.* 1995; 9:351-2.
4. Clair DG, Lautz DB, Brooks DC. Rapid development of umbilical metastases after laparoscopic cholecystectomy for unsuspected gallbladder carcinoma. *Surgery* 1993; 113:355-8.
5. Cava A, Roman J, Gonzalez QA, Martin F, Aramburo P. Subcutaneous metastasis following laparoscopy in gastric adenocarcinoma. *Eur.J Surg.Oncol.* 1990; 16:63-7.
6. Jacobi CA, Wenger FA, Ordemann J, Gutt C, Sabat R, Muller JM. Experimental study of the effect of intra-abdominal pressure during laparoscopy on tumour growth and port site metastasis. *Br.J Surg.* 1998; 85:1419-22.
7. Ordemann J, Hoflich C, Braumann C, Hartmann J, Jacobi CA. [Impact of pneumoperitoneum on expression of E-cadherin, CD44v6 and CD54 (ICAM-1) on HT-29 colon-carcinoma cells]. *Zentralbl.Chir* 2005; 130:405-9.
8. Ordemann J, Jakob J, Braumann C, Kilian M, Bachmann S, Jacobi CA. Morphology of the rat peritoneum after carbon dioxide and helium pneumoperitoneum: a scanning electron microscopic study. *Surg.Endosc.* 2004; 18:1389-93.
9. Whelan RL, Allendorf JD, Gutt CN *et al.* General oncologic effects of the laparoscopic surgical approach. 1997 Frankfurt international meeting of animal laparoscopic researchers. *Surg.Endosc.* 1998; 12:1092-5.

10. Gutt CN, Riemer V, Kim ZG, Erceg J, Lorenz M. Impact of laparoscopic surgery on experimental hepatic metastases. *Br.J Surg.* 2001; 88:371-5.
11. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; 238:491-7.
12. Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 1997; 105:417-37.
13. Torisu H, Ono M, Kiryu H *et al.* Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *Int.J.Cancer* 2000; 85:182-8.
14. Jacobi CA, Menenakos C, Braumann C. Taurolidine--a new drug with anti-tumor and anti-angiogenic effects. *Anticancer Drugs.* 2005; 16:917-21.
15. Ismail M, Henklein P, Huang X, Braumann C, Ruckert RI, Dubiel W. Identification of HIV-1 Tat peptides for future therapeutic angiogenesis. *Eur.J.Haematol.* 2006; 77:157-65.
16. Carter JJ, Whelan RL. The immunologic consequences of laparoscopy in oncology. *Surg.Oncol.Clin.N.Am.* 2001; 10:655-77.
17. Goldstein DS, Lu ML, Hattori T, Ratliff TL, Loughlin KR, Kavoussi LR. Inhibition of Peritoneal Tumor-Cell Implantation: Model for laparoscopic cancer surgery. *J Endourology* 1993; 7:237-41.
18. Yanagisawa M, Imai H, Fukushima Y, Yasuda T, Miura AB, Nakamoto Y. Effects of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta on the proliferation of cultured glomerular epithelial cells. *Virchows Arch.* 1994; 424:581-6.
19. 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; 3:568-75.
20. Lanfrancone L, Boraschi D, Ghiara P *et al.* 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; 80:2835-42.

21. Wordemann M, Fandrey J, Jelkmann W. Tumor necrosis factor-alpha production by human hepatoma cell lines is resistant to drugs that are inhibitory to macrophages. *J Interferon Cytokine Res.* 1998; 18:1069-75.
22. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol.* 1998; 8:107-11.
23. Maniatis T. Catalysis by a multiprotein IkappaB kinase complex. *Science.* 1997; 278:818-9.
24. Suzuki H, Chiba T, Kobayashi M, Takeuchi M, Furuichi K, Tanaka K. In vivo and in vitro recruitment of an IkappaBalpha-ubiquitin ligase to IkappaBalpha phosphorylated by IKK, leading to ubiquitination. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1999; 256:121-6.
25. 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; 174:359-63.
26. Neuhaus SJ, Watson DI, Ellis T, Dodd T, Rofe AM, Jamieson GG. Efficacy of cytotoxic agents for the prevention of laparoscopic port-site metastases. *Arch.Surg.* 1998; 133:762-6.
27. Teschner M. *Taurolidin in der septischen Chirurgie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart 1996.
28. Blenkham JI. Sustained anti-adherence activity of taurolidine (Taurolin) and noxythiolin (Noxyflex S) solutions. *J.Pharm.Pharmacol.* 1988; 40:509-11.
29. 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; 175:10-4.
30. Braumann C, Winkler G, Rogalla P, Menenakos C, Jacobi CA. Prevention of disease progression in a patient with a gastric cancer-re-recurrence. Outcome after intravenous treatment with the novel antineoplastic agent taurolidine. Report of a case. *World J.Surg.Oncol.* 2006; 4:34.:34.

31. Braumann C, Gutt CN, Scheele J, Mueller JM, Jacobi CA. Taurolidine reduces the tumor stimulating cytokine Interleukin-1beta in patients with resectable colon, gastric and pancreatic cancer. Results of a multicentre prospective randomised controlled trial. submitted 2008.
32. 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: 77-83.
33. 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: 129-135.
34. Nestler G, Schulz HU, Schubert D, Kruger S, Lippert H, Pross M. Impact of taurolidine on the growth of CC531 coloncarcinoma cells in vitro and in a laparoscopic animal model in rats. *Surg.Endosc.* 2005; 19:280-4.
35. Rodak R, Kubota H, Ishihara H *et al.* Induction of reactive oxygen intermediates-dependent programmed cell death in human malignant ex vivo glioma cells and inhibition of the vascular endothelial growth factor production by taurolidine. *J Neurosurg.* 2005; 102:1055-68.
36. Nici L, Monfils B, Calabresi P. The effects of taurolidine, a novel antineoplastic agent, on human malignant mesothelioma. *Clin.Cancer Res.* 2004; 10:7655-61.
37. Braumann C, Henke W, Jacobi CA, Dubiel W. The tumor-suppressive reagent taurolidine is an inhibitor of protein biosynthesis. *Int.J.Cancer* 2004; 112:225-30.
38. Stendel R, Picht T, Schilling A *et al.* Treatment of glioblastoma with intravenous taurolidine. First clinical experience. *Anticancer Res.* 2004; 24:1143-7.
39. 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; 54:249-58.

40. Braumann C, Ordemann J, Kilian M, Wenger FA, Jacobi CA. Local and systemic chemotherapy with taurolidine and taurolidine/heparin in colon cancer-bearing rats undergoing laparotomy. *Clin.Exp.Metastasis* 2003; 20:387-94.
41. Kilian M, Mautsch I, Braumann C *et al.* Effects of taurolidine and octreotide on tumor growth and lipid peroxidation after staging-laparoscopy in ductal pancreatic cancer. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 2003; 69:261-7.
42. Opitz I, van der Veen HC, Braumann C, Ablassmaier B, Fuhrer K, Jacobi CA. The influence of adhesion prophylactic substances and taurolidine/heparin on local recurrence and intraperitoneal tumor growth after laparoscopic-assisted bowel resection of colon carcinoma in a rat model. *Surg.Endosc.* 2003; 17:1098-104.
43. Stendel R, Scheurer L, Stoltenburg-Didinger G, Brock M, Mohler H. Enhancement of Fas-ligand-mediated programmed cell death by taurolidine. *Anticancer Res.* 2003; 23:2309-14.
44. Shrayder DP, Lukoff H, King T, Calabresi P. The effect of Taurolidine on adherent and floating subpopulations of melanoma cells. *Anticancer Drugs* 2003; 14:295-303.
45. Petrovic L, Schlegel KA, Ries J *et al.* [In vitro effect of taurolidine on squamous cell carcinoma in the oral cavity]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2003; 7:102-7.
46. Wenger FA, Kilian M, Braumann C *et al.* Effects of taurolidine and octreotide on port site and liver metastasis after laparoscopy in an animal model of pancreatic cancer. *Clin.Exp.Metastasis* 2002; 19:169-73.
47. Stendel R, Stoltenburg-Didinger G, Al Keikh CL, Wattrudt M, Brock M. The effect of taurolidine on brain tumor cells. *Anticancer Res.* 2002; 22:809-14.
48. Han Z, Ribbizi I, Pantazis P, Wyche J, Darnowski J, Calabresi P. The antibacterial drug taurolidine induces apoptosis by a mitochondrial cytochrome c-dependent mechanism. *Anticancer Res.* 2002; 22:1959-64.

49. Akkus A, Gulmen M, Cevik A *et al.* Effect of Peritoneal Lavage with Taurolidine on Primary Colonic Anastomosis in a Rat Model of Secondary Peritonitis. *Surg.Today.* 2006; 36:436-40.
50. Billing A, Frohlich D, Ruckdeschel G. [The effect of taurolin on endogenous immunity and pathogen elimination in human peritonitis]. *Langenbecks Arch.Chir* 1992; 377:180-5.
51. Rosman C, Westerveld GJ, van Oeveren W, Kooi K, Bleichrodt RP. Effect of intraperitoneal antimicrobials on the concentration of bacteria, endotoxin, and tumor necrosis factor in abdominal fluid and plasma in rats. *Eur.Surg.Res.* 1996; 28:351-60.
52. Pffirmann RW. Taurolin in der Anwendung bei chirurgischen Infektionen. *Chir.Gastroenterologie* 1991;131-42.
53. Pffirmann RW. Einführung und Übersicht. Taurolin - Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen. Urban & Schwarzenberg. 1985:3-23.
54. Knight BI, Skellern GG, Browne MK, Pffirmann RW. Peritoneal absorption of the antibacterial and antiendotoxin taurolin in peritonitis. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 1981; 12:695-9.
55. Schwenk W, Haase O, Neudecker J, Muller JM. Short term benefits for laparoscopic colorectal resection. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2005;CD003145.
56. 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; 16:393-9.
57. 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; 18:547-52.
58. Balague C, Braumann C, Fuhrer K, Guski H, Jacobi CA. Validation of a new experimental model of colon cancer. *Surg.Endosc.* 2001; 15:833-6.

59. Fullbeck M, Huang X, Dumdey R, Frommel C, Dubiel W, Preissner R. Novel curcumin- and emodin-related compounds identified by in silico 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells. *BMC.Cancer* 2005; 5:97.:97.
60. Martinez-Poveda B, Quesada AR, Medina MA. Hyperforin, a bio-active compound of St. John's Wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *Int.J Cancer*. 2005; 117:775-80.
61. Ishikawa M, Asahara T. Endothelial progenitor cell culture for vascular regeneration. *Stem Cells Dev*. 2004; 13:344-9.
62. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview
73. *Clin.Chem* 2003; 49:32-40.
63. De Moliner E, Moro S, Sarno S *et al*. Inhibition of protein kinase CK2 by anthraquinone-related compounds. A structural insight. *J.Biol.Chem*. 2003; 278:1831-6.
64. Uhle S, Medalia O, Waldron R *et al*. Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *EMBO J*. 2003; 22:1302-12.
65. Yoon SH, Kim YS, Ghim SY, Song BH, Bae YS. Inhibition of protein kinase CKII activity by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *Life Sci*. 2002; 20;71:2145-52.
66. Pollmann C, Huang X, Mall J, Bech-Otschir D, Naumann M, Dubiel W. The constitutive photomorphogenesis 9 signalosome directs vascular endothelial growth factor production in tumor cells. *Cancer Res*. 2001; 61:8416-21.
67. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* 2000; 44:235-49.
68. Thimm M, Goede A, Hougardy S, Preissner R. Comparison of 2D similarity and 3D superposition. Application to searching a conformational drug database. *J.Chem.Inf.Comput.Sci*. 2004; 44:1816-22.

69. Braumann C, Tangermann J, Jacobi CA, Mueller JM, Dubiel W. Novel anti-angiogenic compounds for application in tumor therapy - COP9 signalosome-associated kinases as possible targets. *Mini Rev Med Chem* 2007; 8: 421-28
70. Ribizzi I, Darnowski JW, Goulette FA, Akhtar MS, Chatterjee D, Calabresi P. Taurolidine: preclinical evaluation of a novel, highly selective, agent for bone marrow purging. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29:313-9.
71. McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP. Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo. *Ann.Surg.Oncol.* 2000; 7:685-91.
72. Calabresi P, Goulette FA, Darnowski JW. Taurolidine: cytotoxic and mechanistic evaluation of a novel antineoplastic agent. *Cancer Res.* 2001; 61:6816-21.
73. 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; 101:111-9.
74. 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; 89:262-6.
75. van den Tol PM, van Rossen EE, van Eijck CH, Bonthuis F, Marquet RL, Jeekel H. Reduction of peritoneal trauma by using nonsurgical gauze leads to less implantation metastasis of spilled tumor cells. *Ann.Surg.* 1998; 227:242-8.
76. Gill WB, Jones KW, Ruggiero KJ. Protective effects of heparin and other sulfated glycosaminoglycans on crystal adhesion to injured urothelium. *J.Urol.* 1982; 127:152-4.
77. Loo BM, Kreuger J, Jalkanen M, Lindahl U, Salmivirta M. Binding of heparin/heparan sulfate to fibroblast growth factor receptor 4. *J Biol.Chem.* 2001; 276:16868-76.
78. Solberg R, Scholz T, Videm V, Okkenhaug C, Aasen AO. Heparin coating reduces cell activation and mediator release in an in vitro venovenous bypass model for liver transplantation. *Transpl.Int.* 1998; 11:252-8.

79. Jacobi CA, Wildbrett P, Volk T, Muller JM. Influence of different gases and intraperitoneal instillation of antiadherent or cytotoxic agents on peritoneal tumor cell growth and implantation with laparoscopic surgery in a rat model. *Surg.Endosc.* 1999; 13:1021-5.
80. Staubach KH. [Adjuvant therapy of peritonitis with taurolidine. Modulation of mediator liberation]. *Langenbecks Arch.Chir* 1997; 382:S26-S30.
81. HADFIELD G. The dormant cancer cell. *Br.Med.J.* 1954; 4888:607-10.:607-10.
82. Sugarbaker PH, Mora JT, Carmignani P, Stuart OA, Yoo D. Update on chemotherapeutic agents utilized for perioperative intraperitoneal chemotherapy. *Oncologist.* 2005; 10:112-22.
83. Diaz-Rubio E. New chemotherapeutic advances in pancreatic, colorectal, and gastric cancers. *Oncologist.* 2004; 9:282-94.
84. Lee SW, Whelan RL, Southall JC, Bessler M. Abdominal wound tumor recurrence after open and laparoscopic-assisted splenectomy in a murine model. *Dis.Colon Rectum* 1998; 41:824-31.
85. Watson RW, Redmond HP, Mc CJ, Bouchier-Hayes D. Taurolidine, an antilipopolsaccharide agent, has immunoregulatory properties that are mediated by the amino acid taurine. *J.Leukoc.Biol.* 1995; 58:299-306.
86. Gorman SP, McCafferty DF, Woolfson AD, Jones DS. Reduced adherence of micro-organisms to human mucosal epithelial cells following treatment with Taurolin, a novel antimicrobial agent. *J Appl.Bacteriol.* 1987; 62:315-20.
87. Galland RB, Saunders JH, Mosley JG, Darrell JH. Prevention of wound infection in abdominal operations by peroperative antibiotics or povidone-iodine. A controlled trial. *Lancet.* 1977; %19;2:1043-5.
88. Tsunoda A, Shibusawa M, Tsunoda Y, Choh H, Takata M, Kusano M. Implantation on the suture material and efficacy of povidone-iodine solution. *Eur.Surg.Res.* 1997; 29:473-80.

89. Leung KL, Lai PB, Ho RL *et al.* Systemic cytokine response after laparoscopic-assisted resection of rectosigmoid carcinoma: A prospective randomized trial. *Ann.Surg.* 2000; 231:506-11.
90. Machado JC, Pharoah P, Sousa S *et al.* Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2001; 121:823-9.
91. Gatti LL, Burbano RR, de Assumpcao PP, Smith MA, Payao SL. Interleukin-1beta polymorphisms, Helicobacter pylori infection in individuals from Northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Clin.Exp.Med.* 2004; 4:93-8.
92. Lu W, Pan K, Zhang L, Lin D, Miao X, You W. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor {alpha} and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2005; 26:631-6.
93. Barber MD, Powell JJ, Lynch SF, Fearon KC, Ross JA. A polymorphism of the interleukin-1 beta gene influences survival in pancreatic cancer. *Br.J.Cancer* 2000; 83:1443-7.
94. Kim SH, Milsom JW, Gramlich TL *et al.* Does laparoscopic vs. conventional surgery increase exfoliated cancer cells in the peritoneal cavity during resection of colorectal cancer? *Dis.Colon Rectum.* 1998; 41:971-8.
95. Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M, Van de Velde CJ. Extended lymph-node dissection for gastric cancer. Dutch Gastric Cancer Group. *N.Engl.J.Med.* 1999; 340:908-14.
96. Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J *et al.* Randomised comparison of morbidity after D1 and D2 dissection for gastric cancer in 996 Dutch patients. *Lancet* 1995; 345:745-8.
97. Cuschieri A, Fayers P, Fielding J *et al.* Postoperative morbidity and mortality after D1 and D2 resections for gastric cancer: preliminary results of the MRC randomised controlled surgical trial.The Surgical Cooperative Group. *Lancet* 1996; 347:995-9.

98. Hartgrink HH, Van d, V, Putter H *et al.* Extended lymph node dissection for gastric cancer: who may benefit? Final results of the randomized Dutch gastric cancer group trial. *J.Clin.Oncol.* 2004; 22:2069-77.
99. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Winchester DP, Fremgen A, Stewart AK. Gastric carcinoma: does lymph node dissection alter survival? *J.Am.Coll.Surg.* 1996; 183:616-24.
100. Hermans J, Bonenkamp JJ, Boon MC *et al.* Adjuvant therapy after curative resection for gastric cancer: meta-analysis of randomized trials. *J.Clin.Oncol.* 1993; 11:1441-7.
101. Ghaneh P, Kawesha A, Evans JD, Neoptolemos JP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *J.Hepatobiliary.Pancreat.Surg.* 2002; 9:1-11.
102. Alexakis N, Halloran C, Raraty M, Ghaneh P, Sutton R, Neoptolemos JP. Current standards of surgery for pancreatic cancer. *Br.J.Surg.* 2004; 91:1410-27.
103. Wagner AD, Schneider PM, Fleig WE. The role of chemotherapy in patients with established gastric cancer. *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 2006; 20:789-99.
104. Lee J, Kang WK, Kwon JM *et al.* Phase II trial of irinotecan plus oxaliplatin and 5-fluorouracil/leucovorin in patients with untreated metastatic gastric adenocarcinoma. *Ann.Oncol.* 2006.
105. Lagarde SM, ten Kate FJ, Reitsma JB, Busch OR, van Lanschot JJ. Prognostic factors in adenocarcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction. *J Clin.Oncol.* 2006; 24:4347-55.
106. Rojo F, Taberero J, Albanell J *et al.* Pharmacodynamic studies of gefitinib in tumor biopsy specimens from patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin.Oncol.* 2006; 24:4309-16.
107. Ueda S, Hironaka S, Boku N, Fukutomi A, Yoshino T, Onozawa Y. Combination chemotherapy with irinotecan and cisplatin in pretreated patients with unresectable or recurrent gastric cancer. *Gastric.Cancer* 2006; 9:203-7.
108. Nakayama N, Koizumi W, Tanabe S, Sasaki T, Saigenji K. A phase II study of combined chemotherapy with methotrexate, 5-fluorouracil, and low-dose cisplatin

(MFP) for histologically diffuse-type advanced and recurrent gastric cancer (KDOG9501). *Gastric.Cancer* 2006; 9:185-91.

8. Eidesstattliche Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité erkläre ich:

- dass keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 05.12.2007

Datum

.....

Dr. med. Chris Braumann