

Aus der Klinik für Urologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Jocham

**INTRAVESIKALE
GEMCITABIN-INSTILLATION
ZUR
THERAPIE DES
HARNBLASENKARZINOMS**

**PRÄKLINISCHE UNTERSUCHUNGEN
AM MURINEN ORTHOTOPEN TUMORMODELL MB49**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Universität zu Lübeck.

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Carsten Philipp Brocks
aus Bergisch Gladbach
Lübeck 2004

Meinen Eltern

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Böhle
2. Berichterstatter: PD Dr. med. Stefan Krüger

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2004

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.12.2004

INHALT

	Seite
I EINLEITUNG	
1.1 Einführung	1
1.2 Das Harnblasenkarzinom	2
1.2.1 Epidemiologie und Inzidenz	2
1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren	3
1.2.3 Pathologie, Tumorentstehung, Stadieneinteilung und Prognose	4
1.2.4 Klinik und Symptomatik	7
1.2.5 Diagnostik des Harnblasenkarzinom	8
1.3 Therapie des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms	8
1.3.1 Transurethrale Elektro - Resektion TUR	8
1.3.2 Indikation zur adjuvanten Therapie	9
1.3.3 Intravesikale Prophylaxe mit dem Immunmodulator BCG	10
1.3.4 Intravesikale zytostatische Frühinstillation	11
1.3.5 Gemcitabin: Struktur und Wirkmechanismus	12
1.4 Hypothese der Implantationsinhibition	14
1.5 Topische Applikation von Gemcitabin zur Therapie von Tumorfrühformen	14
1.6 Fragestellung	15

II MATERIAL UND METHODEN

	Seite
2.1 Materialien	16
2.1.1 Versuchstiere	16
2.1.2 Tumorzellen	17
2.1.3 Blasenkatheter	19
2.1.4 Koagulationsgerät und Koagulationselektroden	19
2.1.5 Sonstige Materialien	19
2.1.6 Medikamente	20
2.1.6.1 Anästhetika	20
2.1.6.2 anästhesierendes Gleitmittel zur Katheterisierung	21
2.1.7 Instillationstherapeutika	21
2.1.7.1 PBS	21
2.1.7.2 HEPES	21
2.1.7.3 Gemcitabin	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Anästhesie	22
2.2.2 Kennzeichnung der Tiere	23
2.2.3 Rasur	23
2.2.4 Katheterisierung	24
2.2.5 Elektrokoagulation	25
2.2.6 Tumorzellinstillation	25
2.2.7 Versuchsaufbau	26
2.2.7.1 Versuch 1 zur Implantationsinhibition	26
2.2.7.2 Versuch 2 zur Therapie einer Tumorfrühform	27
2.2.8 Visitieren der Tiere	29
2.2.9 Verhalten der Tiere	30
2.2.10 Dokumentation	30
2.2.11 Fotografie	30
2.2.12 Archivierung der Befunde	30
2.2.13 Opferung der Mäuse	30
2.2.14 Sektion	31
2.2.15 Histologie	32
2.2.16 Statistik	32

III ERGEBNISSE

	Seite
3.1 Versuch: Implantationsinhibition	33
3.1.1 Tumoranwachsrate	33
3.1.2 Überleben	36
3.1.3 Makrohämaturie	38
3.1.4 Identifikation tumortragender Tiere durch Palpation	39
3.1.5 Gewichtsverlauf	40
3.1.6 Blasengewicht	42
3.1.7 Statistik	43
3.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse des Versuchs zur Implantationsinhibition	44
3.2 Versuch: Therapie des Tumorfrühstadiums	45
3.2.1 Tumoranwachsrate	45
3.2.2 Überleben	47
3.2.3 Makrohämaturie	47
3.2.4 Identifikation tumortragender Tiere durch Palpation	48
3.2.5 Gewichtsverlauf	49
3.2.6 Blasengewicht	51
3.2.7 Statistik	51
3.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse: Versuch zur Therapie einer Tumorfrühform	53
IV DISKUSSION	54
4.1 Versuch zur Implantationsinhibition	54
4.1.1 Modifikation des etablierten Tiermodells	55
4.2 Versuch zur Behandlung einer Tumorfrühform	56
4.3 Mögliche Fehlerursachen	56
4.4 Literaturvergleich	58
4.5 Klinische Studien und bisherige (systemische) Anwendung von Gemcitabin	59
4.6 Ausblick	62
V ZUSAMMENFASSUNG	63
VI LITERATURVERZEICHNIS	65
VII ABKÜRZUNGEN	74
VIII DANKSAGUNG	76
IX LEBENS LAUF	77
X PUBLIKATIONEN	79

I EINLEITUNG

1.1 Einführung

Jedes Jahr erkranken in Deutschland ca. 16.000 Menschen neu an einem oberflächlichen Harnblasenkarzinom. Der Weltstandard der Inzidenz beträgt bei Männern 20,8/100.000 und bei Frauen 5,1/100.000 ^[1].

Das Therapieziel beim oberflächlichen Blasenkarzinom ist daher neben der primären operativen Heilung mittels transurethraler Elektroresektion (TUR) eine effiziente Rezidivprophylaxe.

Die Therapieoptionen der Rezidivprophylaxe umfassen nach operativer Behandlung mittels TUR verschiedene adjuvante Modalitäten einer topischen Therapie.

Neben dem gegenwärtigen Goldstandard in der intravesikalen Rezidivprophylaxe, der intravesikalen Immunprophylaxe mit BCG (Bacillus Calmette-Guérin), werden verschiedene Zytostastika in unterschiedlichen Therapieschemata postoperativ intravesikal appliziert.

Gemcitabin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Pyrimidin-Analoga. Die systemische Applikation von Gemcitabin zur Behandlung des Harnblasenkarzinoms, sei es als Monotherapeutikum oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, ist in klinischen Phase I, Phase II und Phase III Studien bereits erfolgreich durchgeführt worden [2, 3].

In dieser Dissertation soll im Tiermodell die Effizienz einer unmittelbar postoperativen Instillation von Gemcitabin in Form einer Einmalinstillation, als sogenannte Single Shot Therapy, in die Harnblase untersucht werden.

Weiterhin soll die intravesikale Mehrfachinstillation von Gemcitabin zur Therapie des frühen Stadiums des Harnblasenkarzinoms im Tiermodell überprüft werden.

1.2 Das Harnblasenkarzinom

1.2.1 Epidemiologie und Inzidenz

3% aller bösartigen Tumoren sind Harnblasenkarzinome. In etwa 90-95% der Fälle handelt es sich um Urothelkarzinome. 70% der Patienten kommen initial mit einem papillären oder flachen (in situ) Tumor (Ta, Tis, T1) zur Untersuchung, während 30% primär einen bereits in die Muskulatur eingewachsenen Tumor (T2-T4) aufweisen ^[4, 5].

Das Urothelkarzinom ist in seiner relativen Häufigkeit der fünfthäufigste maligne Tumor in Deutschland und damit nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste urologische Tumor beim Mann. Bei der Frau ist das Urothelkarzinom an sechster Stelle der malignen Neoplasien verzeichnet ^[4, 5]. Das Harnblasenkarzinom macht beim Mann etwa 8% und bei der Frau etwa 3% aller bösartigen Neubildungen in Deutschland aus ^[6, 7]. Es erkranken jährlich in der Bundesrepublik ungefähr 10.500 Männer und 5.200 Frauen. Der Altersgipfel liegt für Männer bei ca. 69 Jahren und für Frauen bei ca. 74 Jahren. Die Inzidenz lässt eine steigende Tendenz erkennen, wobei man einschränkend erwähnen muss, dass sich die internationalen Kodierungsvorschriften geändert haben. Die Mortalität ist, sowohl für ganz Deutschland, als auch im speziellen für das Bundesland Schleswig-Holstein, in den letzten Jahrzehnten für beide Geschlechter nur geringfügig gestiegen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Männer bei ca. 78% und für Frauen bei ca. 63% ^[1].

Für das Jahr 2001 ergab sich in Schleswig-Holstein eine Geschlechterverteilung der Neuerkrankung von 2,6 : 1 (Männer : Frauen). 38,8/100.000 Männer gegenüber 12,0/100.000 Frauen erkrankten hier im Jahr 2001 in an einer malignen Neoplasie der Harnblase. 71,3% der männlichen Patienten wiesen bei Diagnosestellung einen Tumor im Stadium pTa (Frauen 68,0%) auf; 13,5% (4,9%) das Stadium pT1 und 5,3% (10,7%) im Stadium pT2 ^[1].

97,7% (93,0%) der Histologien zeigten ein Urothelkarzinom.

149 Todesfälle der männlichen und 58 der weiblichen Patienten machten 3,9% (1,6 % der Frauen) der Gesamtkrebsmortalität in Schleswig Holstein aus (der Weltstandard der Mortalität lag bei 5,4/100.000 der Männer und 1,0/100.000 der Frauen), bei einem durchschnittlichen Sterbealter von 74,5 Jahren (80,6 Jahre).

Hier ergab sich die Verteilung von 1,6 : 1 (Männer : Frauen). Innerhalb der verschiedenen Altersgruppen variiert sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität sehr stark ^[1].

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Für die Entstehung von Urothelkarzinomen wird ein multifaktorieller, mehrstufiger Prozess angenommen, bei dem sogenannte Karzinogene die maligne Transformation der Urothelzelle verursachen (Initiation) und proliferationsstimulierende Kokarzinogene in einem / mehreren weiteren Schritten das Tumorstadium realisieren (Promotion) ^[8].

Mit genetischen Untersuchungen wurden verschiedene chromosomale Veränderungen nachgewiesen. Danach stellt der Verlust von Chromosom 9 ein frühes genetisches Ereignis in der Tumorentstehung dar, weshalb auf diesem Chromosom die Lokalisation eines nicht näher charakterisierten Tumorsuppressorgens diskutiert wird ^[8].

Alterationen des p53-Tumorsuppressorgens (Codon 72 Alterationen und Polymorphismen) auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p) und des Retinoblastom(Rb)-Gens auf Chromosom 13 sind mit einem Tumorstadium assoziiert, jedoch kein sicherer Marker für eine Invasivität des Tumors ^[9].

Bedeutend für die Urothelkarzinogenese sind berufliche und außerberufliche Umwelteinflüsse sowie bestimmte Lebensgewohnheiten.

Für einige Substanzen ist die karzinogene Wirkung auf die Blase eindeutig belegt. Bereits Ende des vergangenen Jahrhunderts beschrieb REHN die Häufung von Blasen Tumoren bei Chemikararbeitern, die Anilinfarbstoffen ausgesetzt waren ^[10]. Heute gelten insbesondere aromatische Amine als typische Blasenkarzinogene ^[11]. KUNZE / HELPAP unterscheidet zwischen exogenen Karzinogenen (aromatische Amine, phenacetinhaltige Medikamente, Nikotin, Koffein, Opium, Zytostatika), endogenen Karzinogenen (Tryptophanmetabolite, Nitrosamine) sowie einer Tumorentstehung durch Entzündungen (Blasenkonkremente, Parasiten) ^[12]. Für das Zigarettenrauchen wird ein dreifach erhöhtes relatives Risiko für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms beschrieben. Man schätzt, dass bis zu 60 % aller Blasenkarzinome Folge von Nikotinabusus sind ^[13, 14]. Als erwiesen gilt schließlich die Assoziation zwischen der Schistosomiasis (Bilharziose) der Harnblase und der Genese von Harnblasentumoren ^[15].

Außerdem scheinen Rasse, sowie geographische Einflüsse bezüglich der Häufigkeit von Harnblasenkarzinomen eine Rolle zu spielen^[11]. Männliches Geschlecht sowie hohes Alter sind weitere Risikofaktoren für das Harnblasenkarzinom^[11, 16, 17]. Anstelle einer einzigen kausalen Noxe muss von einem multifaktoriellen Geschehen im Sinne einer Plurikarzinogenese ausgegangen werden^[14].

1.2.3 Pathologie, Tumorentstehung, Stadieneinteilung und Prognose

Etwa 95% der Blasentumore (94,4 % der Männer und 92,3 % der Frauen) sind Karzinome des Urothels^[4, 18].

Durch Proliferation kann es zu unterschiedlichen Wachstumsmustern des Urothels im Sinne von Hyperplasien kommen. Die einfache Hyperplasie kann fokal oder diffus zu einer Verbreiterung des Transitionalzellepithels führen und teilweise Atypien aufzeigen. Durch papilläre Hyperplasien ist oft eine Abgrenzung zu den sogenannten gutartigen Papillomen bzw. gutdifferenzierten Karzinomen schwierig. Bei zunehmenden Atypien kommt es zum Bild der Dysplasie des Urothels (die Dysplasien selber werden in 3 Stadien DI bis DIII eingeteilt). Mit zunehmender Manifestation der Dysplasien (DII und DIII) bleiben die Veränderungen in Bezug auf Kernvergrößerung, Anisomorphie und Hyperchromasie der Zellkerne bestehen.

Zur formalen Pathogenese des Transitionalzellkarzinoms wird ein multifaktorielles Geschehen diskutiert^[15, 16].

Nach Einwirkung bestimmter Noxen^[14, 19] kommt es zu chromosomalen Veränderungen einzelner Zellen, die nach gewisser Latenzzeit in Abhängigkeit von der Potenz des einwirkenden Karzinogens entsprechende Transformationsstadien des Urothels durchlaufen^[16].

Eine Sonderform des Blasenkarzinoms stellt das Carcinoma in situ (CIS)^[4] mit hochgradiger Polymorphie der Kerne und Desquamation einzelner Zellen^[8, 20] dar. Es infiltriert nicht in die Lamina propria mucosae. Typische Zellveränderungen sind große Kerne mit hohem Chromatingehalt, prominente Nucleoli und erhöhte mitotische Aktivität. Weiter findet sich eine unregelmäßige Zellanordnung in der Schleimhaut. Makroskopisch weist das CIS nur uncharakteristische Veränderungen der Mucosa wie Rötung und lachsfarbene Verfärbung auf. Das CIS kann sowohl als einzige Tumorentität als auch gleichzeitig in Kombination (assoziiertes CIS) mit einem anderen Blasentumor vorkommen^[16, 19].

In 38-83% der Fälle führt das CIS innerhalb von 5 Jahren zu den eigentlichen Karzinomen [16, 17], welche nach der TNM-Klassifikation (TNM: tumor, nodes, metastases) der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) in der überarbeiteten Version von 2002 eingeteilt werden.

Zur Charakterisierung des Tumorstadiums des Primärtumors werden in der prätherapeutischen klinischen Klassifikation (TNM) und in der postoperativen, histopathologischen Klassifikation (pTNM) Ausdehnung des Primärtumors (T), Status der drainierenden Lymphknoten (N) und Vorhandensein oder Fehlen von Fernmetastasen (M) beschrieben [21, 23].

Mit ca. 90% aller Harnblasenkarzinome besteht die Mehrzahl der Karzinome aus Transitionalzellen [1, 6, 22].

Eine Darstellung der TNM-Klassifikation findet sich in den nachfolgenden Abbildungen.

<p>T-Primärtumor TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden T0 Kein Anhalt für Primärtumor Tis Carcinoma in situ Ta Nichtinvasives papilläres Karzinom T1 Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe T2 Tumor infiltriert oberflächliche Muskelschicht (innere Hälfte) T3a Tumor infiltriert tiefe Muskulatur (äußere Hälfte) T3b Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe T4a Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina T4b Tumor infiltriert Becken oder Bauchwand</p> <p>N-Regionäre Lymphknoten NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen N1 Metastase in solitärem Lymphknoten, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung N2 Metastase(n) in solitärem Lymphknoten, mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung, oder in multiplen Lymphknoten, keine mehr als 5 cm in Ausdehnung N3 Metastasen in Lymphknoten, mehr als 5 cm in größter Ausdehnung</p> <p>M-Fernmetastasen MX Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden M0 Keine Fernmetastasen M1 Fernmetastasen</p>
--

Abbildung 1: TNM-Klassifikation des Blasenkarzinoms (UICC 2002)

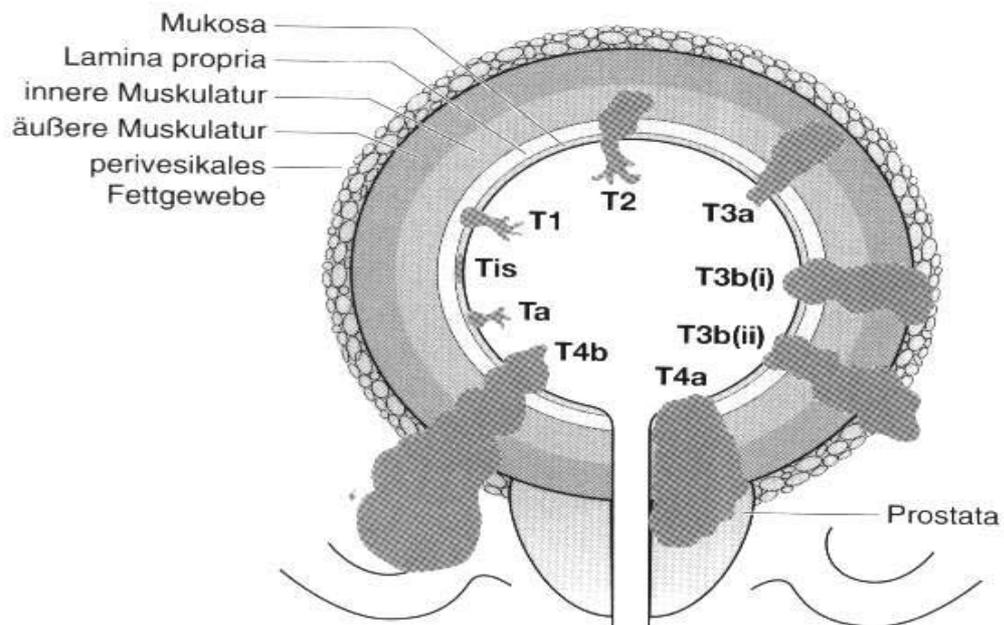


Abbildung 2: T-Stadieneinteilung von Blasen Tumoren

aus: <http://www.urologie.lammpi.de/alteuro/blasentu.htm>

Urotheliale Harnblasenkarzinome werden entsprechend ihres Tumorstadiums und ihres histologischen Verhaltens in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Die Gruppe der oberflächlichen Blasenkarzinome beinhaltet Tumoren der Stadien CIS, pTa und pT1 [16, 21]. Diesen Stadien ist gemein, dass die Blasenmuskulatur noch nicht vom Tumor befallen ist.

Ab Stadium pT2 liegt eine Infiltration der Blasenmuskulatur vor, womit alle Stadien \geq pT2 definitionsgemäß zu den infiltrierenden Karzinomen gezählt werden. Zusätzlich zur TNM-Stadieneinteilung wird ein histopathologisches Grading des Tumors nach erfolgter Resektion durchgeführt. Je nach Differenzierungsgrad werden die Tumoren den Stadien G1-G4 zugeordnet. Der Grad G1 umfasst gut differenzierte, G2 mäßig differenzierte, G3 schlecht differenzierte und G4 undifferenziert-anaplastische Karzinome [23].

Die Unterscheidung von oberflächlichen und infiltrierenden Karzinomen ist bedeutsam, da sich Therapie und Prognose in beiden Gruppen deutlich unterscheiden (siehe Stadieneinteilung TNM) [8].

Im Gegensatz zu den invasiven Karzinomen, die, sofern sie operabel sind, durch die radikale Zystektomie behandelt werden, ist bei den oberflächlichen Karzinomen zunächst die organerhaltende, transurethrale (Elektro-) Resektion des Primärtumors indiziert [24, 25].

Mit einem Anteil von 70-80% finden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vorwiegend oberflächliche, nichtinfiltrierende Karzinome [19]. Jedoch treten je nach Tumorstadium und Differenzierungsgrad (G1-3) des Tumors nach durchgeführter TUR des oberflächlichen Primärtumors in bis zu 70% der Fälle Rezidive auf [19, 26].

Bei etwa 25% der Rezidive kommt es zur Verschlechterung des Tumorstadiums oder zur zunehmenden Entdifferenzierung des Tumors [20, 27]. Für das Tumorstadium pTa werden 5-Jahres-Überlebensraten von 95%, für das Stadium pT1 G1-2 von 81% angegeben. Mit nur 64% ist die 5-Jahresüberlebensrate für das Stadium pT1 G3-4 bereits deutlich schlechter [22, 25]. Nach initialer TUR zeigen nur 0-6% der G1-Karzinome eine Tumorprogression mit Invasion der Muskulatur, während die Rate auf 22-52% bei G2 und 50-82% bei G3-Tumoren ansteigt [22, 28].

In der Gruppe der oberflächlichen Blasenkarzinome stellen die pT1-Tumoren, und innerhalb dieser Gruppe insbesondere die pT1G3 Tumoren aufgrund ihres invasiven biologischen Potentials eine besondere Risikogruppe dar [16, 22]. Weiterhin sind primär multifokales Wachstum, Tumorgröße (> 5 cm), begleitende Urotheldysplasien und begleitendes Carcinoma in situ (CIS) als prognostisch ungünstig einzustufen [16, 19].

1.2.4 Klinik und Symptomatik

Das häufigste Symptom (Leitsymptom) des Harnblasenkarzinoms ist in etwa 80% der Fälle die schmerzlose Makrohämaturie [29]. In 30% der Fälle sind Blasenkarzinome mit zystitischen Beschwerden wie Dysurie, Pollakisurie, und Urgesympptomatik (starker Harndrang) vergesellschaftet („maligne Zystitis“) [26]. Bei ca. 20 Prozent wird die Diagnose mehr oder weniger zufällig bei Aufdecken einer Mikrohämaturie gestellt. Als allgemeiner Grundsatz kann gelten, dass jede Hämaturie bis zum Beweis des Gegenteils als tumorverdächtig einzustufen ist. Suprasymphysäre oder zystische Symptome sind unspezifisch. Im Spätstadium deuten Flankenschmerzen auf eine Harnabflussstörung der oberen Harnwege hin (Harnstauungsniere durch Ostieninfiltration). Typisch für das fortgeschrittene Stadium ist die Gewichtsabnahme und die Anämie. Hinzukommen können Restharnbildung oder Harnverhalt, Lymphödeme der unteren Extremität (lymphogene Metastasierung im kleinen Becken) sowie Knochenschmerzen, Husten mit Auswurf,

Veränderung der Leberenzyme (hämatogene Metastasierung). Differentialdiagnostisch kommen eine hämorrhagische oder interstitielle Zystitis, Steine, Morbus Crohn, Rektum- oder Sigmakarzinome sowie gynäkologische Tumoren mit Infiltration der Blasenwand in Betracht.

Da die Makrohämaturie unabhängig von der Tumorgröße ist, können schon beim ersten Auftreten einer Hämaturie fortgeschrittene Stadien eines Harnblasenkarzinoms vorliegen. Anamnestisch sind unbedingt frühere Blasentumorerkrankungen sowie eine eventuelle Karzinogenexposition zu klären ^[16, 19, 29].

1.2.5 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Die Ureterozystoskopie ist zur Abklärung einer Makrohämaturie unverzichtbar ^[30]. Neben Inspektion der Blase können unter Narkose Probiopsien verdächtiger Areale entnommen werden, die Hinweise über den Tumor geben können. Gegebenenfalls kann in gleicher Sitzung der Eingriff zu einer diagnostisch-therapeutischen transurethralen Elektroresektion (TUR) ausgedehnt werden. Weiterhin ist die zytologische Untersuchung von Urin bzw. Blasenspülflüssigkeit von diagnostischer Bedeutung. Durch die bimanuelle Palpation in Narkose kann eine Fixation eines fortgeschrittenen Tumors im kleinen Becken erfasst werden. Als bildgebende Verfahren kommen Infusionsurogramm, Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie (MRT) sowie Röntgenaufnahmen des Thorax in Betracht. Die drei letztgenannten Verfahren werden vor allem zur Metastasensuche eingesetzt, so auch die Knochenszintigraphie ^[4, 5, 8].

1.3 Therapie des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms

1.3.1 Transurethrale Elektro - Resektion TUR

Die transurethrale Resektion ist ein diagnostisch-therapeutischer Eingriff, der bei Vorliegen oberflächlicher Harnblasenkarzinome eine kurative Zielsetzung hat ^[4, 5, 27]. Die TUR sollte als differenzierende TUR durchgeführt werden, da sich durch dieses Vorgehen das lokale Tumorstadium relativ genau erfassen lässt ^[8, 17]. Bei diesem Verfahren wird zunächst der exophytische Teil des Tumors (fraktioniert) reseziert und asserviert, vom Pathologen beurteilt und klassifiziert. Insgesamt werden 6 Proben („6er Schema“) dem Pathologen eingesandt. Die erste Probe ist der exophytische Tumorteil, danach werden auf 3, 6, 8 und 12 Uhr 4 Proben (Probe 2-5) von makroskopisch unverdächtigen Randbezirken des Tumors reseziert ^[8].

Zuletzt erfolgt die Resektion der Tumorbasis (Probe 6). Die Proben werden voneinander getrennt asserviert und dem Pathologen mit einer Dokumentation der Tumorgeographie übergeben.

Gegebenenfalls muss eine gezielte Perforation der Blasenwand vorgenommen werden, um bei der Resektion der 6. Probe (Tumorbasis) die Infiltrationstiefe bestimmen zu können. Auf diese Weise erhält man durch das „6er-Schema“ Informationen zur zentripetalen Ausbreitung des Tumors („Eisbergphänomen“), zur Infiltrationstiefe als auch Hinweise auf die in den Tumor einbezogenen Lymphbahnen und arrodierten Gefäße ^[8].

Häufig kann ein oberflächlicher Tumor durch den initialen Eingriff nicht vollständig im Gesunden entfernt werden, meist ist eine Nachresektion erforderlich ^[4, 17].

1.3.2 Indikation zur adjuvanten Therapie

Sofern sich durch die histologische Untersuchung der Resektate die vollständige Entfernung eines oberflächlichen Tumors nachweisen lässt, sollte je nach Tumorstadium und Grading eine Rezidivprophylaxe durchgeführt werden ^[4, 8]. Die bereits erwähnte Rezidivrate oberflächlicher Blasentumoren von bis zu 70 % ^[19] nach alleiniger TUR sowie die Progressionsneigung im Rezidiv zeigen die Notwendigkeit einer wirkungsvollen Rezidivprophylaxe. Da monofokale Primärtumoren im Stadium pTaG1 nur eine geringe Rezidiv- und Progressionsneigung zeigen, kann auf eine intravesikale Rezidivprophylaxe verzichtet werden. Bei pT1G3 Tumoren zeigt sich eine ausgeprägten Progressionsneigung mit der Gefahr der Metastasierung, so dass einige Autoren die radikale Zystektomie anstelle einer organerhaltenden Therapie mit anschließender Rezidivprophylaxe empfehlen ^[19, 31, 32]. Umstritten ist, ob bei einem pT1G3 Primärtumor eine TUR mit anschließender Rezidivprophylaxe eine Alternative zur Zystektomie sein kann. Bei allen übrigen, zwischen den genannten Extremen liegenden Stadien des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms kann eine intravesikale Rezidivprophylaxe mit BCG durchgeführt werden ^[8, 33, 34].

Prinzipiell wird heute eine derartige intravesikale Therapie durch Instillation sowohl von verschiedenen Zytostatika als auch mit BCG durchgeführt ^[19, 31, 34].

Bei oberflächlichen Blasenepithelneoplasien konnte gezeigt werden, dass sie einer topischen Behandlung zugänglich sind. Remissionen wurden bis zu 80% durch lokale Chemotherapie (Doxorubicin, Epirubicin oder Mitomycin C) erzielt, wobei ein erneutes Tumorwachstum nach Therapieende in bis zu 45 % der Fälle auftrat^[5]. Eine Übersicht über die Indikationen für eine intravesikale Instillationstherapie zur Rezidivprophylaxe mit Zytostatika bzw. Immunmodulatoren (BCG) gibt folgende Tabelle.

Stadium	Grading	Staging		Empfehlung
pTis		Prim.	Rez.	intravesikale Therapie
pTa	G1	Prim.		keine Prophylaxe
	G1 G2, G3	Prim.	Rez. Rez.	intravesikale Prophylaxe intravesikale Prophylaxe
pT1	G1, G2 G3	Prim. Prim.	Rez.	intravesikale Prophylaxe intravesikale Prophylaxe

Tabelle 1: Indikationen für eine intravesikale Rezidivprophylaxe nach^[5, 35]

Weiterhin wird zwischen Tumoren mit niedrigem, mittlerem und hohem Rezidivrisiko unterschieden. Dementsprechend findet sich eine risikoadaptierte Therapie: Für Tumoren mit geringem Rezidivrisiko (nach TNM Klassifikation und Grading) wird eine intravesikale Zytostatikatherapie empfohlen, für Tumoren mit mittlerem Risiko eine intravesikale BCG-Therapie^[35].

1.3.3 Intravesikale Prophylaxe mit dem Immunmodulator BCG

Als Goldstandard ist in der Rezidivprophylaxe des Harnblasenkarzinoms, sowie in der intravesikalen Therapie des Carcinoma in situ, die postoperative intravesikale Applikation mit attenuierten Stämmen des Mycobacterium bovis (BCG) im Sinne einer Immunstimulation zu nennen^[35, 36]. Der Wirkmechanismus beruht darauf, durch die erzeugte Entzündung aktivierte Killerzellen (Lymphozyten) zur Zerstörung und Phagozytose von Tumorzellen zu initiieren^[8, 19].

In einer Vielzahl von Studien zeigte BCG seine therapeutische Überlegenheit gegenüber verschiedenen Zytostatika, wie Mitomycin C und Adriamycin^[31, 34].

Unabhängig von Stamm und Dosierung wird derzeit eine Instillation mit BCG (Bacillus Calmette-Guérin) frühestens 14 Tage post-TUR empfohlen, um eine Abheilung von TUR-Wunden zu gewährleisten, da es sonst zum Auftreten von Komplikationen kommen kann [19, 35]. Die bekanntesten in Deutschland erhältlichen Stämme sind Connaught, Tice und RIVM. Die Menge der Keime beträgt 1,6 bis $5 \cdot 10^8$ CFU (Colony Forming Units).

Wichtigste Komplikationen dieser Therapie sind Fieber, Dysurie, granulomatöse Prostatitis, sowie Pneumonie, Hepatitis und Entzündungen des Urogenitaltraktes. Die begleitende Zystitis mit Pollakissurie („BCG-itis“) kann schwerlich als Nebenwirkung aufgezählt werden, da diese die Grundlage des Wirkmechanismus darstellt. Jedoch führt die BCG-itis je nach Ausprägung im Verlaufe der Prophylaxetherapie immer wieder zu Therapieabbrüchen [8].

1.3.4 Intravesikale zytostatische Frühinstillation

Die am häufigsten gebräuchlichen Substanzen zur intravesikalen Instillationsprophylaxe sind Thiotepa, Mitomycin C und Doxorubicin/Epirubicin. Es handelt sich hierbei um alkylierende Substanzen, die zu Crosslinks von Nukleinsäuren führen können, oder antibiotischen Agentien, die in einer DNA-Synthesehemmung resultieren können [8].

Neuere vorliegende Studien, inklusive der EORTC-Studien (European Organisation for Research and Treatment of Cancer), konnten zeigen, dass eine möglichst frühe Instillation anzustreben ist [33, 37].

Aus mehreren Untersuchungen geht hervor, dass durch eine alleinige zytostatische Frühinstillation die Häufigkeit eines Rezidivs nach TUR signifikant gesenkt werden kann:

MILONAS et al. zeigten, dass eine intravesikale zytostatische Frühinstillation von Doxorubicin nach TUR im Bezug auf das zeitliche Auftreten eines Rezidivtumors einer alleinigen TUR deutlich überlegen ist ^[28].

IMAMOGLU (2001) und OOSTERLINCK (1993) et al. zeigten die Wirksamkeit der Rezidivprophylaxe nach TUR bei tolerablen Nebenwirkungen für Epirubicin ^[38, 39].

Ebenso senken Mitomycin C und Doxorubicin die Rezidivrate bei topischer Applikation ^[31, 35, 40, 45].

1.3.5 Gemcitabin: Struktur und Wirkmechanismus

Gemcitabin ist als Analogsubstanz des natürlichen Desoxycytidins ein Zytostatikum aus der Gruppe der Pyrimidin-Antimetabolite. Gemcitabin (2-Desoxy-2,2-difluorodeoxycytidine, dFdC) enthält als Base Cytosin, hat aber als abnormen Zucker eine Fluor-substituierte Desoxyribose eingefügt. Die Desoxycytidinkinase wandelt den Diphosphatzucker durch Phosphorylierung in die Triphosphatform um und bewirkt so eine Aktivierung (dFdCDP und dFdCTP).

Das Diphosphat (dFdCDP) hemmt dann (neben anderen) die Ribonucleotid-Reduktase, wobei besonders die Bildung von Desoxycytidin betroffen ist. Die Triphosphatform von Gemcitabin kann dann in die DNA eingebaut werden. Nachdem der DNA-Strang um ein weiteres Nukleotid verlängert wurde, bricht die Synthese der DNA jedoch ab. Diese Form des Kettenabbruchs verhindert das Greifen der Reparaturmechanismen durch die zelleigene Exonukleasen ^[41]. Die DNA-Polymerase Epsilon ist in hohem Maße nicht in der Lage, Gemcitabin zu entfernen und die wachsenden DNA-Stränge zu reparieren. Nach dem Einbau in die DNA scheint das Gemcitabin-Triphosphat einen programmierten Zelltod (Apoptose) einzuleiten ^[42, 43, 44].

Gemcitabin wirkt in zahlreichen Kulturen von menschlichen und murinen Zellen deutlich zytotoxisch. Es wirkt zellphasenspezifisch, wobei hauptsächlich Zellen während der Synthesephase der DNA (S-Phase) abgetötet werden; unter bestimmten Bedingungen wird die Zellprogression am Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus blockiert ^[44].

Die zytotoxische Wirkung von Gemcitabin in vitro ist sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig. Die Gemcitabinwirkungen auf den zellulären Stoffwechsel umfassen somit:

- a) Hemmung der Ribonucleotid-Reduktase mit Verminderung / Unterbrechung der de novo Synthese von Desoxynucleotiden (vor allem dCTP), zellzyklusspezifisch in der G1 / S- Phase.
- b) Wirkungssteigerung der Desoxycytidinkinase durch Hemmung des negativen Feedback-Mechanismus des Enzyms, wodurch es zur verstärkten Phosphorylierung von Gemcitabin kommt.
- c) Hemmung der Desoxycytidin-Monophosphat-Desaminase, des für die Elimination von Gemcitabin verantwortlichen Enzyms. Durch Entleerung des dCTP-Pools und Steigerung der intrazellulären Konzentration von dFdCTP wird zudem der positive Feedback-Mechanismus des Enzyms gehemmt.
- d) Hemmung der Cytidin-Triphosphat-Synthetase (CTP-Synthetase) mit der Folge zusätzlicher Entleerung des dCTP-Pools und der RNA-Synthese.

Nochmals hervorgehoben werden soll der Effekt der intrazellulären „Selbstpotenzierung“, der eine bei vergleichbar hoher Wirksamkeit eine niedrige Dosierung von Gemcitabin mit geringeren einhergehenden Nebenwirkungen erlaubt.

Die Antitumor-Aktivität in präklinischen Modellen von Gemcitabin in Modellen am Tier ist vom Versuchsplan abhängig. Wird Gemcitabin täglich verabreicht, ist die Letalität unter den Versuchstieren bei relativ geringer Antitumor-Aktivität deutlich erhöht. Wenn dagegen Gemcitabin jeden dritten oder vierten Tag verabreicht wird, können Mäusen nicht-letale Dosen bei gleichzeitig hervorragender Aktivität gegen eine Reihe von Tumoren verabreicht werden ^[42, 43, 44].

Gemcitabin wird durch die Cytidindesaminase rasch in der Leber, den Nieren, im Blut und in weiteren Organen metabolisiert. Durch intrazellulären Metabolismus entstehen Gemcitabinmono-, di- und -triphosphat (dFdCMP, dFdCDP, dFdCTP), von denen dFdCDP und dFdCTP als aktive Metaboliten angesehen werden. Diese intrazellulären Metabolite wurden nicht in Urin und Plasma gefunden. Der primäre Metabolit 2'-desoxy-2',2'-difluoruridin (dFdU) ist inaktiv und kommt in Urin und Plasma vor ^[42].

1.4 Hypothese der Implantationsinhibition

Die Rezidivhäufigkeit des oberflächlichen Urothelkarzinoms der Harnblase nach transurethraler Resektion (TUR) ist wie eingangs beschrieben ein erhebliches Problem in der urologischen Onkologie ^[25, 55, 56]. Die genetische Alteration urothelialer Zellen oder die Reaktion auf extrinsische Karzinogene sind als Ursachen hierfür anerkannt (field changes) ^[57, 58]. Die Reimplantation viabler Tumorzellen nach transurethraler Resektion TUR an die lädierte Blasenwand ist eine weitere Hypothese ^[38], um die hohe Rezidivneigung zu erklären. So kann sowohl das atypische Auftreten von Rezidivtumoren im Blasendach nach TUR ^[59] als auch der erfolgte genetische Nachweis der Monoklonalität multifokaler Blasentumoren ^[60] als ein Hinweis für die Implantation herangezogen werden. So zeigten in-vitro-Studien von PODE et al., dass Tumorzellen schneller und besser an eine nicht-intakte Oberfläche adhären (entsprechend der klinischen Situation einer lädierten Blasenwand durch TUR), als an eine intakte endotheliale Oberfläche ^[61].

Die also durch TUR abgelösten, jedoch noch in der Blase befindlichen, freien viablen Tumorzellen ^[38] können durch intravesikale Chemotherapie, in Form einer Einmalinstillation, an einer Reimplantation in die lädierte Blasenwand gehindert werden ^[38].

1.5 Topische Applikation von Gemcitabin zur Therapie von Tumorfrühformen

Da Gemcitabin bei Harnblasentumoren als systemisches Therapeutikum etabliert ist ^[49], untersuchte ich die Wirksamkeit von Gemcitabin bei wiederholter topischer Applikation gegenüber einer systemischen alleinigen Therapieoption bei einer manifesten Tumorfrühform.

Gemcitabin wurde dazu als Monotherapeutikum in die Harnblase mittels Katheter instilliert. Verwendet wurde das von der Arbeitsgruppe BÖHLE et al. etablierte orthotope Tumormodell MB49 ^[62, 63] in einer modifizierten Form.

1.6 Fragestellung

Vor dem Hintergrund der bisher etablierten Therapieformen und Therapiemöglichkeiten des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms, sowie dem erläuterten Potential des Zytostatikums Gemcitabin (aufgrund des selbstpotenzierenden Mechanismus), wurden folgende Fragestellungen entwickelt:

- 1) Wirkt Gemcitabin als sogenanntes Single-Shot-Therapeutikum in Form einer intravesikalen Einmalinstillation beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom? Ist Gemcitabin wirksam zur Implantationsinhibition freier Tumorzellen in der Blase nach TUR?
- 2) Ist Gemcitabin auch als alleiniges Therapeutikum bei etablierten Tumorfrühformen des Harnblasenkarzinoms bei topischer Anwendung wirksam?

II MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden insgesamt 180 weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57/BL6 (CHARLES RIVER DEUTSCHLAND, SULZFELD) verwendet. Die Tiere im Alter von 6-8 Wochen hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 17,805g (SD 0,3677). Die Mäuse waren in der konventionellen Kleintierhaltung der Medizinischen Universität am Campus Lübeck in Polycarbonkäfigen (Makrolon®) mit einer Größe von 38x22x15 cm (Typ III) auf Weichholzgranulat (ALTROMIN GMBH, LAGE) untergebracht. Um Aggressionsverhalten zu vermeiden, welches eventuell die Kennzeichnung der Tiere (Ohrlochung) beeinträchtigen könnte, wurde die Anzahl der Mäuse pro Käfig auf fünf Tiere beschränkt.

Die Tiere wurden kontinuierlich mit einer pelletierten Standarddiät für Mäuse (ALTROMIN GMBH, LAGE) gefüttert und erhielten Leitungswasser über Tränkeflaschen. Das Futtermittel enthielt folgende Inhaltsstoffe:

Rohprotein 22.5%, Lysin 1.2%, Rohfett 5.0%, Rohfaser 4.5%, Rohasche 6.5%, Calcium 0.9% sowie Phosphat 0.7%. Als Zusatzstoffe sind 15000 IE Vitamin A, 600 IE Vitamin D₃, 75mg Vitamin E und 5mg Kupfer je Kilogramm Futtermittel beigelegt. Die Mäuse wurden bei einer Raumtemperatur von $19 \pm 1^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$ und einem Belichtungszyklus von 5:00 bis 17:30 Uhr gehalten.

Gemäss dem Tierschutzgesetz wurden alle tierexperimentellen Untersuchungen der Dissertationsarbeit vom Ministerium für Umweltschutz, Natur und Forsten des Landes SCHLESWIG-HOLSTEIN, als zuständige Behörde, genehmigt.

2.1.2 Tumorzellen

Als Tumorzellen kam die syngene murine Blasenkarzinomzelllinie MB49 zur Anwendung. Ursprünglich wurde diese Zelllinie von SUMMERHAYES ^[64] durch eine 24stündige Behandlung von Zellkulturen aus Blasenepithelien von C57/BL6 Mäusen mit 7,12-Dimethylbenzanthracen erzeugt.

Jeweils 3 Wochen vor den Versuchen wurde die Blasentumorzelllinie MB49 zweimal wöchentlich (montags und freitags), jeweils 1×10^6 Zellen in 10ml Kulturmedium (Dxx 10+), in Gewebekulturflaschen (75cm^2) passagiert. Jeweils zur Mitte einer Woche erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums.

Zum Passagieren der Zellen wurden folgende Reagenzien verwendet:

- 5ml Trypsin/EDTA (Biochrom AG seromed) 100ml 10 x Trypsin / EDTA Lösung (0,5%/0,2% in 10xPBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}) + 900ml aqua dest.
- 1 ml DMEM (niedriger Glucosegehalt, 1 g/l, Firma PAA Laboratories GmbH, D-35091 Cölbe)
- 190 μl Tryptanblau (Lösung 0,4%, Firma Sigma)
- Kulturmedium Dxx10+, bestehend aus:
 - 10% inaktivem (30 min bei 56°C) fötalem Kälberserum (Linaris)
 - 1% 200mM (100x) L- Glutamin (Invitrogen/Gibco)
 - 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen/Gibco) \rightarrow 500U/ml Penicillin u. $500\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, als Penicillin G (Natriumsalz) und Streptomycin- Sulfat in physiologischer NaCl-Lösung
 - 1% 100mM Natriumpyruvat (Biochrom AG seromed)
 - ad DMEM (PAA Laboratories) \rightarrow Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium mit L-Glutamin, Low Glucose (1000mg/L)
 - durch Bottle Top Filter (Millipore) steril filtrieren

Angewandte Material und Geräte:

- Vakuumpumpe (Firma Eco Vac) mit Abfallflasche und Schlauchsystem
- 37°C Wasserbad (Firma GFL)
- Tischzentrifuge Universal 32R (Firma Hettich)
- Firma Neubauer „improve Zählkammer“
- 50 + 15ml Zentrifugenröhrchen (Firma Sarstedt)
- 5, 10, 25 ml serologische Pipetten (gestopft), (Firma Sarstedt)
- Pipettus junior (Firma Hirschmann)
- Pasteurpipetten (Firma Magazin)
- 0,5ml Reaktionsgefäße (Firma Sarstedt)
- Pipetten P10, P20, P100, P200, P1000 (Firma Gilson)
- Pipettenspitzen 1000 + 200 (Firma MBP)
- CO₂ Inkubator (Firma Nunc)
- Sterile Werkbank (MircoFlow, Firma Nunc)
- Bunsenbrenner Flammy S (Firma Schütt)
- Zellkulturflaschen 75T (75cm² Wachstumsfläche) (Firma Sarstedt)
- MS1 Minishaker (Firma IHK)

Zur Passage saugt man das Medium von adhärennten Zellen ab. Um die Zellen abzulösen, wird anschließend das Zellpellet mit 1ml DMEM resuspendiert. In ein 0,5ml Reaktionsgefäß werden 190µl Trypitanblau und 10µl der Zellsuspension gemischt im Verhältnis 1:20 und von der Suspension ca. 10µl auf eine Neubauer Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop gezählt. Anhand der ermittelten Zellzahl wird das Volumen der Zellen errechnet und in Medium pipettiert. Um eine ausreichende Viabilität der Tumorzellen zu gewährleisten, werden die Zellen erst unmittelbar vor der geplanten Instillation präpariert und bis zur Instillation auf Eis inkubiert.

Anstelle von PBS, welches in den initialen Experimenten Verwendung als Lösungsmittel fand, wurden die Tumorzellen für das optimierte Modell in DMEM ohne FKS und Antibiotika gelöst.

Durch die Trypitanblaufärbung, in der sich tote Zellen intensiv blau anfärben, konnte die Viabilität der Tumorzellsuspension ermittelt werden. Für die Instillation wurden nur Suspensionen mit mindestens 95% lebenden Zellen verwendet.

Für die Aufarbeitung der Tumorzellen danke ich Frau Kirsten Bruderek.

2.1.3 Blasenkatheter

Die Katheterisierung der Harnblase der Mäuse führte ich mit peripheren Venenverweilkanülen vom Typ INSYTE-W® (BECTON-DICKINSON, HEIDELBERG) durch. Die Punktionsnadeln wurden vor der Katheterisierung entfernt und lediglich die Kunststoffkanüle wurde transurethral (am narkotisierten Tier) in die Harnblase eingeführt. Die aus dem Kunststoff VIALON® bestehende Kanüle hatte einen Außendurchmesser von 0.7mm (24 G) bei einer Länge von 19mm. Der Totraum dieser Kunststoffkanüle betrug 0.05ml und musste bei der Instillationsbehandlung unbedingt berücksichtigt werden. Nachfolgend beziehen sich daher Angaben über instillierte Volumina auf das effektiv intravesikal verabreichte Volumen. Die Katheter verschloss ich nach der Instillation mit einem handelsüblichen Verschlusskonus aus Kunststoff (BRAUN, MELSUNGEN).

2.1.4 Koagulationsgerät und Koagulationselektroden

Die Elektrokoagulation der Blase führte ich mit einem Hochfrequenzdiathermiegerät vom Typ Elektrotom 500 / Modulsystem 2000 (GEBRÜDER MARTIN, TUTTLINGEN) durch. Als Neutralelektrode wurde die der Firma BRAUN, MELSUNGEN, gewählt. Ein flexibler Führungsdraht eines zentralen Venenkatheters (ARROW GMBH, ERDING), der über die bereits in der Blase einliegenden Verweilkanüle eingeführt wurde, wurde als Koagulationselektrode verwendet. Der Außendurchmesser des Führungsdrahtes betrug 0.5mm, entsprechend 25 G.

2.1.5 Sonstige Materialien

Zur Applikation des Injektionsnarkotikums sowie zur intravesikalen Instillation von Tumorzellsuspension, Immuntherapeutika und PBS wurden 1 ml Feindosierungsspritzen vom Typ Omnifix®-F (BRAUN, MELSUNGEN) verwendet. Durch die Graduierung der Spritzen war es mir möglich, Volumina auf 0,01 ml genau zu dosieren.

Zur intraperitonealen Barbituratapplikation und zur subkutanen Injektion der Tumorzellsuspension wurden Injektionsnadeln vom Typ Sterican® mit einer Länge von 12 mm bei einem Außendurchmesser von 0,45 mm (26G) eingesetzt (BRAUN, MELSUNGEN).

Die Ohrlochung zur Kennzeichnung der Mäuse erfolgte mit einer LUX® Revolverlochzange.

Ein Bartschneider Typ PHILLIPS Zoom Trimmer HS wurde zur Rasur der Mäuse verwendet.

Um einen optimalen Kontakt zwischen dem rasierten Hautareal auf dem Rücken der Mäuse und der Neutralelektrode des Diathermiegerätes herzustellen, wurde EKG-Elektrodengel (TÜSHAUS GMBH, VELEN-RAMSDORF) eingesetzt.

Das Körpergewicht der Mäuse, wie auch die Masse der entnommenen Harnblasen bestimmte ich mit einer Sartorius MP8-2 Laborwaage (STERNKOPF, LÜBECK). Mit der Waage konnte ich das Blasengewicht bis auf 1 mg genau bestimmen.

Zur fotografischen Dokumentation der bei der Sektion der Mäuse erhobenen Befunde wählte ich eine NIKON Coolpix5000 Digitalkamera mit 5,0 MegaPixel mit einem integrierten Blitzgerät. Für die digitale Fotografie der histologischen Befunde verwendete ich eine Camediac C4040 Digitalkamera der Firma OLYMPUS mit 4,1 MegaPixel, einen ADL-Adapter der Firma OLYMPUS sowie ein C-Mount Mikroskopaufsatz der Firma LEICA. Zur Datenverarbeitung wendete ich die mitgelieferte Software der Firma NIKON (FOTOSTATION EASY) und den ADOBE® FOTOSHOPEDITOR® auf einem COMPAQ®ARMADA 110® Laptop an.

Entnommene Blasen und andere Organe asservierte ich in Eppendorf Reaktionsgefäßen (EPPENDORF GMBH, HAMBURG) sowie in 4,5 prozentige gepufferter Formalinlösung (MERCK, DARMSTADT) bis zur histologischen Aufbereitung.

2.1.6 Medikamente

2.1.6.1 Anästhetika: Pentobarbital Natrium 1,8ml

Als Injektionsnarkotikum wurde eine 1,8ml wäßrige Lösung mit 96 mg Pentobarbital-Natrium angesetzt. Als Hilfsstoff war der Lösung Benzylalkohol beigesetzt. Die Injektionslösung wird in der Krankenhausapotheke der Medizinischen Universität zu Lübeck hergestellt und steril unter der Ch.-B.-Nummer 220102 abgefüllt.

2.1.6.2 Anästhesierendes Gleitmittel zur Katheterisierung: Instillagel®

Zur Erleichterung der Katheterisierung wurde das Präparat Instillagel® benutzt (FARCO-PHARMA, KÖLN). Das sterile Gel hat aufgrund seiner Inhaltsstoffe Chlorhexidingluconat und Lidocainhydrochlorid eine sowohl desinfizierende als auch anästhesierende Wirkung.

2.1.7 Instillationstherapeutika

2.1.7.1 PBS

PBS wurde durch Lösen von 9 g NaCl, 0,27 g KH₂PO₄ und 1,43 g Na₂HPO₄•2H₂O in 1000 ml aqua ad injectabilia hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

2.1.7.2 HEPES

50ml 20mM Hepes (Pufferan) (Firma Carl Roth & Co.KG)

→N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure nach Good

→Molmasse=2381,31g/mol

→0,02mol/L x 238,31g/mol x 0,05L =0,238g

- 0,238g HEPES einwiegen (Waage 510-23 von Kern)
- mit ca. 25ml aqua dest. lösen
- mit 1N NaOH auf pH 7,0-7,4 einstellen (pH-Meter pH530 der Firma WTW)
- mit aqua dest. auf 50ml auffüllen

PBS (im ersten Versuch) und HEPES (im zweiten Versuch) instillierte ich den narkotisierten Versuchstieren intravesikal. PBS (im ersten Versuch) und HEPES (im zweiten Versuch) wurden auch als Trägerlösungen verwendet.

Für die Anleitung bei der Anfertigung der Lösungen danke ich Frau Kirsten Bruderek.

2.1.7.3 Gemcitabin

Für die zytostatische Therapie mit dem Arzneistoff Gemcitabin (Firma LILLY, GEMZAR®) wurden Trockensubstanzampullen (Durchsteckflaschen) verwendet und mit 0,9% NaCl gemäss Bestimmung des Herstellers gelöst bzw. verdünnt.

Gemzar® wurde freundlicherweise von der Firma LILLY zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Anästhesie

Die intraperitoneale Barbituratinjektion wurde in einer gewichtsorientierten Dosierung von 0,06 mg/g Körpergewicht verabreicht. Zuvor wurden die Tiere gewogen. Zur Injektion wurden die Mäuse mit Daumen, Zeige- und Mittelfinger an einer Hautfalte im Nacken gefasst. Um Verletzungen von Darmschlingen, Leber und Leistengefäßen zu vermeiden, wurde den Mäusen das Narkotikum im medialen Bereich des unteren Abdomens in Kopftieflagerung intraperitoneal injiziert. Die Wirkungsdauer des Barbiturats bis zum vollständigen Erwachen und Bewegungen der Mäuse dauerte durchschnittlich 3 h. Vereinzelt konnte mit der Initialdosis nicht die gewünschte Narkosedauer und Narkosetiefe erreicht werden, sodass in diesen Fällen ein Drittel der Initialdosierung des Barbiturats intraperitoneal nachinjiziert wurde.

Nach Wirkungsbeginn des Barbiturats wurden die Mäuse auf den Rücken gelagert, da in dieser Position die Atmung weniger beeinträchtigt wurde und außerdem eine bessere Überwachung der Vitalfunktionen möglich war.

2.2.2 Kennzeichnung der Tiere

Im Anschluss an die Tumorzellinstillation wurden die Mäuse durch Ohrlochung mit einer Revolverlochzange gekennzeichnet. Die in Abbildung 6 auf der folgenden Seite schematisch dargestellte Methode ermöglichte eine einfache, mit geringem technischem Aufwand durchführbare Markierung, durch die eine individuelle Verlaufsbeobachtung realisiert wurde.

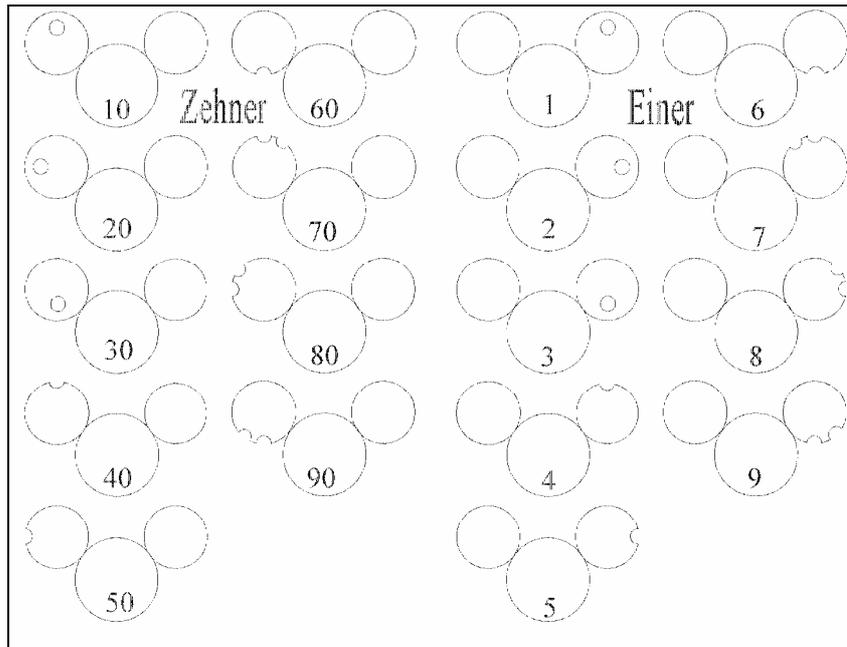


Abbildung 3: Markierung von Mäusen: Mittels Ohrlochung mit Hilfe einer Lochzange wurden Kreise bzw. Halbkreise aus den Ohren der narkotisierten Mäuse gestanzt. Die Markierung der Zehner erfolgte am linken, die der Einer am rechten Ohr. Nach diesem Schema können bis zu 99 Tiere eindeutig gekennzeichnet werden. Gezeigt ist die Ansicht der Mäuse von dorsal. Nach: Siegfried Jung^[66].

2.2.3 Rasur

Um eine geeignete Kontaktstelle für die Neutralelektrode des Koagulationsgerätes zu schaffen, rasierte ich nach Narkoseeintritt mit Hilfe eines Bartschneiders ein etwa 1 cm² großes Areal auf dem Rücken der Mäuse. Durch behutsames Vorgehen konnten dabei Hautverletzungen der Tiere vermieden werden.

2.2.4 Katheterisierung

Die Katheterisierung wurde in Rückenlage der Mäuse durchgeführt. Um die Katheterisierung der Harnblase zu erleichtern, wurden die als Katheter verwendeten Venenverweilkanülen zunächst in ein Gleitmittel eingetaucht. In einem Winkel von etwa 60° wurde dann die mit Gleitmittel benetzte Katheterspitze in das Orifizium urethrae eingeführt. Nach Absenken des Katheters auf etwa 20-30° wurde versucht, den Katheter mit sanften Druck vorzuschieben. Dabei durfte allenfalls ein minimaler Widerstand spürbar werden. Bei eindeutigem Widerstand musste die Führungsrichtung des Katheters solange verändert werden, bis der Katheter sich nahezu ohne Widerstand vorschieben ließ. Der Katheter wurde dann etwa 1,5 cm weit vorgeschoben. Bei korrekter intravesikaler Lage tropfte je nach Füllungszustand der Harnblase entweder spontan Urin über den Katheter ab oder aber nach Ausübung von leichtem Druck auf das untere Abdomen beziehungsweise bei Absaugung des Katheters mittels eines saugfähigen sterilen Papiers. Für die nachfolgenden Instillationen wurden die Blasen auf diese Weise zuverlässig und vollständig entleert.



Abbildung 4: Katheterisierungstechnik

Die Abbildung zeigt eine narkotisierte Maus nach Katheterisierung und Tumorzellinstillation. Der mit einem Kunststoffkonus versehene Katheter verbleibt bis zum Erwachen der Maus intravesikal.

2.2.5 Elektrokoagulation

Die katheterisierten Mäuse wurden mit dem rasierten Hautareal auf die mit Elektrodengel versehene Neutralelektrode des Koagulationsgerätes gelegt. Über den liegenden Katheter führte ich die flexible und an der Spitze atraumatisch abgerundete Koagulationselektrode langsam ein. Zur besseren Orientierung über die Einführungstiefe, wurde zuvor an der Elektrode der Punkt bestimmt und markiert, an dem die Elektrode 2mm aus der Katheterspitze herausragt. Wenn beim Einführen der Elektrode diese Markierung den Ansatzkonus des Katheters erreichte, so wurde beim weiteren Vorschieben langsam und mit äußerster Vorsicht vorgegangen um Perforationen zu vermeiden. Sobald ein leichter Widerstand spürbar wurde, hatte die Elektrode die Blasenwand erreicht. In dieser Elektrodenposition wurde eine monopolare Koagulation mit einem Hochfrequenzdiathermiegerät durchgeführt. Die Blasen wurden mit der gerätetechnisch geringstmöglichen Intensität, entsprechend einer Leistung von etwa 5 Watt, für die Dauer von 5 s koaguliert.

2.2.6 Tumorzellinstillation (Technik nach BÖHLE et al. ^[62])

Nach Entfernen der Koagulationselektrode wurde zunächst leichter Druck auf das Abdomen der Mäuse ausgeübt, um die Blase möglichst vollständig zu entleeren. Mit Zellstoff wurde der Urin aus dem Ansatzkonus des Katheters entfernt, so dass dieser bei Instillation der Tumorzellen nicht wieder in die Blase zurückgespritzt wurde. Danach wurden 0,1 ml der unmittelbar zuvor gründlich durchmischten Tumorzellsuspension instilliert. Aufgrund des Totraums des Katheters erreichten nur 0,05 ml die Blase.

Um eine reflektorische Blasenentleerung zu vermeiden, wurden die Blasen vor Instillation entleert und die Instillation sehr langsam durchgeführt.

Der Katheter wurde unmittelbar nach Tumorzellinstillation abgeklemmt, mit einem Kunststoffkonus verschlossen und nach Entfernen der Klemme bis zum Erwachen der Mäuse in situ belassen.

Die Mäuse verloren den Katheter mit den ersten Bewegungen nach dem Erwachen. Hierdurch konnte ein Verbleib des Instillats und damit die gewünschte Kontaktzeit von Blasenepithel und instillierten Tumorzellen bzw. Therapeutika erzielt werden.

2.2.7 Versuchsaufbau

Die Untersuchungen gliedern sich, wie schon kurz erwähnt, in zwei Hauptversuchsteile: Versuch 1 zur Implantationsinhibition und Versuch 2 zur Therapie einer Tumorfürhform.

2.2.7.1 Versuch 1 zur Implantationsinhibition

Zur Überprüfung der Frage, ob Gemcitabin eine Implantationsinhibition zu vermitteln mag, wurde das orthotope Tumormodell MB49^[62] modifiziert.

Durch Setzen einer Koagulationsnekrose in die Blasenwand wurde der klinische Zustand postoperativ nach TUR imitiert. Zusätzlich stellt eine Koagulationsnekrose einen Implantationsvorteil dar, wie bereits in früheren Studien belegt^[62].

Nach Entfernen der Koagulationselektrode wurden die Tumorzellen instilliert und durch Verschließen des Katheters für 30 min in der Blase belassen. Aufgrund der kurzen Verweilzeit der Tumorzellen in der Blase applizierte ich 100.000 Tumorzellen.

Anschließend wurde das Zytostatikum Gemcitabin (Gemzar®) intravesikal durch einen in der Harnröhre liegenden Kindervenvenverweilkatheter appliziert (0,05 ml) und zwar wie eingangs erwähnt als sogenannte Single-Shot-Therapie.

In diesem Versuch wurden 90 Mäuse eingesetzt, die, randomisiert in 9 Gruppen á 10 Mäuse (Stamm C57/B16) mit unterschiedlichen Dosierungen (5mg/ml und 10mg/ml Gemcitabin) und Einwirkzeiten (10, 30, 60 und 120 min), behandelt wurden. Nachfolgende Tabellen (Tabelle 2 und Tabelle 3) geben eine Übersicht über die Gruppenzusammensetzung.

Der Katheter wurde abgeklemmt über die gesamte Schlafzeit der Tiere belassen. Die Schlafzeit betrug im Mittel 120 min. Um exakte Zeitpunkte zu erreichen und um die klinisch übliche postoperative Spülung zu imitieren, wurde bei liegendem Katheter gemäß den in der Tabelle aufgeführten Zeiten die Blase mit PBS gespült. Die erste Blasenspülung erfolgte nach 30 min zum Ausspülen nicht implantierter Tumorzellen bei allen Tieren. Sofort darauf erfolgte die Instillationstherapie. Die Kontrollgruppe erhielt nach 60 min ebenfalls eine Blasenspülung (PBS statt Gemcitabin). Danach wurden die Katheter wieder mit einem Verschlusskonus abgeklemmt und es erfolgte in den Verumgruppen eine abschließende Spülung nach Erreichen der jeweiligen Verweildauer des Therapeutikums.

Anzahl der Tiere	Tumorzellen	Therapeutikum	Dosierung	Verweildauer
10	100.000	PBS	0,05ml	60min
10	100.000	Gemcitabine	5mg /ml	10min
10	100.000	Gemcitabine	5mg /ml	30min
10	100.000	Gemcitabine	5mg /ml	60min
10	100.000	Gemcitabine	5mg /ml	120min
10	100.000	Gemcitabine	10mg /ml	10min
10	100.000	Gemcitabine	10mg /ml	30min
10	100.000	Gemcitabine	10mg /ml	60min
10	100.000	Gemcitabine	10mg /ml	120min

Tabelle 2: Dosierungen und Verweilzeiten der Gruppen im ersten Versuch zur Implantationsinhibition.

Woche	Tag	Behandlung
1	0	Implantation der Tumoren
1	0	Therapie (60 min nach Implantation)
1-8	2-50	Beobachtung und Befunderhebung
8	50	Opferung

Tabelle 3: zeitlicher Überblick des Versuchsaufbaus zur Implantationsinhibition.

Im Verlauf wurde täglich die Viabilität der Tiere erfasst, 2-tägig auf palpable Tumoren und Makrohämaturie untersucht und dreimal wöchentlich das Körpergewicht bestimmt. Eine Opferung mit Sektion führte ich am 50. postoperativen Tag. An diesem Tag zeigten Tiere der Kontrollgruppe (PBS) eine Makrohämaturie als Zeichen eines Tumorwachstums.

Alle noch lebenden Mäuse wurden getötet, komplett sezziert, die Blasen auf das Vorhandensein von Tumoren untersucht, das Blasengewicht ermittelt sowie nach Zeichen einer systemischen Tumorausssaat gesucht.

2.2.7.2 Versuch 2 zur Therapie einer Tumorfrühform

Im zweiten Versuch wurden 80 Tiere mit Gemcitabin nach Tumorimplantation behandelt. Ich wählte jedoch eine Implantationszeit für die Tumorzellen von 24 Stunden aus, um ein bereits manifestes Tumorleiden in seiner frühen Form therapieren zu können, entsprechend der Erfahrungen bei früheren Versuchen aus der Arbeitsgruppe ^[62]. Wieder wurde mittels eines flexiblen Drahtes eine Koagulationsnekrose in der Blasenwand erzeugt. Das Erzeugen einer Koagulationsnekrose in der Blasenwand diente in diesem Versuch nicht wie im vorangegangenen Versuch der Imitation einer lädierten Blase im postoperativen Zustand nach TUR. Vielmehr wird, wie in früheren Studien der Arbeitsgruppe belegt ^[62], dadurch ein Implantationsvorteil für die in die Blase eingebrachten Tumorzellen erreicht. Dieses Vorgehen erleichtert ein Auswachsen eines Tumors in der Blase der Versuchstiere ^[62].

Die Tiere wurden wiederum mit verschiedenen Konzentrationen und Einwirkzeiten therapiert (Tabelle 4 und 5). Dazu wurden die narkotisierten Tiere katheterisiert. In diesem Versuch spülte ich die Blasen der Tiere am Tag der Tumorimplantation nicht, um einen eventuell therapeutischen Spüleffekt zu verhindern. Die Tumorzellen konnten so innerhalb von 24 Stunden zu einem Tumorzellverband auswachsen. Die Tiere verloren den abgeklemmten Katheter beim Erwachen aus der Narkose nach ca. 120 min.

Jeweils am Tag 1 einer Woche führte ich die anschließende Therapie durch, erstmalig 24 Stunden nach Koagulation der Blasenwand mit dem anschließendem Einbringen der Tumorzellsuspension.

So therapierte ich über einen Gesamtzeitraum von 4 Wochen.

Um die exakten Verweilzeiten des Therapeutikums (HEPES oder Gemcitabin) zu gewährleisten, spülte ich die Blasen analog zum 1. Versuch.

Auch die Kontrollgruppe wurde an jedem Therapietag narkotisiert, katheterisiert und mit HEPES behandelt, sowie nach 60 min einer Blasenspülung mit HEPES unterzogen.

Anzahl der Tiere	Tumorzellen	Therapeutikum	Dosierung	Verweildauer
10	20.000	HEPES	0,05ml	60min
10	20.000	Gemcitabine	5mg /ml	30min
10	20.000	Gemcitabine	5mg /ml	60min
10	20.000	Gemcitabine	5mg /ml	120min
10	20.000	Gemcitabine	10mg /ml	10min
10	20.000	Gemcitabine	10mg /ml	30min
10	20.000	Gemcitabine	10mg /ml	60min
10	20.000	Gemcitabine	10mg /ml	120min

Tabelle 4: Dosierungen und Verweilzeiten der Gruppen im zweiten Versuch zur Therapie eines frühen Stadiums.

Woche	Tag	Behandlung
1	0	Implantation der Tumoren
1	1	1. Therapie (24 h nach Implantation)
2	8	2. Therapie
3	15	3. Therapie
4	22	4. Therapie
4-15	23-100	Beobachtung und Befunderhebung
15	100	Opferung

Tabelle 5: zeitlicher Überblick des Versuchsaufbaus im Versuch zur Therapie eines frühen Stadiums.

In der Kontrollgruppe befanden sich am Tag 0 ursprünglich 10 Tiere. Da ein Tier aus der Narkose nicht wieder aufgewacht ist (17g Gewicht) und sich hier keine pathologischen

Befunde feststellen ließen, wurde von einer Unverträglichkeit des Anästhetikums ausgegangen.

In der Kontrollgruppe befanden sich daher ab Tag 1 nur 9 Tiere.

An den 4-wöchigen Therapiezeitraum schloss sich eine 10-wöchige Beobachtungszeit an, so dass ich am ersten Tag der 15. Woche (= Tag 100 nach Tumorimplantation) bei signifikant vorliegender Makrohämaturie der Kontrollgruppe, die Opferrung und Sektion der Tiere durchführte.

2.2.8 Visitieren der Tiere

Im Verlauf beider Versuche erfasste ich täglich die Viabilität der Tiere, ich untersuchte die Tiere 2-tägig auf palpable Tumoren und Makrohämaturie und dreimal wöchentlich bestimmte ich das Körpergewicht aller Tiere. Nach 100 Tagen wurden alle noch lebenden Mäuse geopfert, ich führte eine komplette Sektion der Tiere durch. Die entnommenen Blasen untersuchte ich auf das Vorhandensein von Tumoren, ich ermittelte das Blasengewicht und suchte nach Zeichen einer systemischen Tumorausbreitung.

Bei der täglichen Visite der Tiere registrierte ich ihr Verhalten mit den anderen Tieren in einem Käfig, die Tiere wurden jeden 2. Tag ausführlich untersucht per Palpation im Unterbauch-/ Symphysenbereich. Hierbei ließ sich ein Tumorwachstum anhand des Palpationsergebnisses und an der durch den Palpationsreiz ausgelösten Miktion (Makrohämaturie) abschätzen. Ebenfalls erfolgte eine tägliche Gewichtskontrolle der Tiere. Die gesammelten Befunde archivierte ich. Die tägliche Versorgung ad libitum mit Futter, Trinkwasser, sowie die Käfigpflege, wurde von den Tierpflegern übernommen. Durch das tägliche Visitieren stellte ich auch eine adäquate Versorgung und Beobachtung der Tiere an den Wochenenden sicher.

Im Versuchszeitraum verstorbene Tiere wurden sofort aus den Käfigen entfernt, um ein Auffressen der Kadaver von den Artgenossen zu vermeiden. Nach Inspektion und Identifizierung der Ohrlochkennung wurden verstorbene Tiere bis zur Sektionierung bei minus 20°C in der Tiefkühlereinrichtung des Tierlabors verwahrt.

Bei Sektion der Tiere ergaben sich in den Gruppen 1-8 in beiden Versuchen an Leber, pelvinen und paraortalen Lymphknoten unauffällige Sektionsbefunde. Auffällige Sektionsbefunde sind exemplarisch im Abschnitt III ERGEBNISSE in den Abbildungen gezeigt.

2.2.9 Verhalten der Tiere

Auch allgemeines Aussehen und Verhalten, insbesondere Aktivität der Tiere als Hinweis auf Schmerzen oder Lethargie und das Aussehen des Fells (Farbe, Glätte) wurde beurteilt.

2.2.10 Dokumentation

Bei beiden Versuchen wurden die Befunde makroskopisch begutachtet, histologisch verifiziert und fotografisch dokumentiert.

2.2.11 Fotografie

Bei der Sektion fotografierte ich die Präparate und die eröffneten Tierkörper exemplarisch (siehe auch Abschnitt III ERGEBNISSE).

2.2.12 Archivierung der Befunde

Ich legte ein Tierbuch an, in dem die täglichen Befunde der Visiten erfasst und vermerkt wurden. Dies betraf insbesondere die Gewichtsentwicklung der Tiere, die Palpation des Unterbauch auf eventuelle Resistenzen als Hinweis auf einen Tumor sowie die Registrierung der Makrohämaturie.

2.2.13 Opferung der Mäuse

Überlebende Mäuse wurden je nach Dauer der unterschiedlichen Experimente in einem Zeitraum zwischen 50 und 100 Tagen nach Tumorzellimplantation getötet. Die Tötung der Mäuse erfolgte mit Hilfe von Kohlendioxid. Hierzu wurden die Mäuse in einen speziellen Käfig gebracht, der dann für etwa 3 Minuten mit CO₂ begast wurde. In diesem Käfig wurden die Mäuse bis zum Eintritt sicherer Todeszeichen (Pulslosigkeit, Atemstillstand, völlige Atonie und deutlicher Verlust der Körpertemperatur) belassen.

2.2.14 Sektion

Unmittelbar nach Tötung der Tiere führte ich die Sektion der Mäuse durch. Bei der Sektion wurden die 2 großen Körperhöhlen eröffnet: zunächst das Abdomen und später den Thorax. Zur Sektion wurde zunächst ein Längsschnitt von Symphyse bis Sternum vorgenommen. Anschließend wurde das Peritoneum dargestellt und eröffnet. Zuerst wurde die Blase aufgesucht und das perivesikale Fett und Bindegewebe entfernt. Danach wurde die Blase am Übergang zur Urethra abgetrennt und entnommen. Die Blase wurde nun in 2 Hälften zerschnitten und enthaltener Urin abgetupft. Im Anschluss daran wurde das Blasengewicht bestimmt und die Blase makroskopisch auf das Vorhandensein von Tumoren untersucht. Die entnommenen Blasen wurden in Formalinlösung asserviert.

Im weiteren Verlauf wurden iliakale und periaortalen Lymphknoten, welche die Blase drainieren dargestellt und bei verdächtiger Vergrößerung asserviert und mit Formalin fixiert. Weiterhin wurden Leber, Niere und Harnleiter auf neoplastische Veränderungen hin untersucht. Dazu wurden die genannten Organe zunächst in situ betrachtet und anschließend entfernt. Makroskopisch verdächtige Befunde wurden zur histologischen Abklärung asserviert und mit Formalin fixiert. Abschließend wurde die Milz sowie das Peritoneum auf Anzeichen einer Tumorausbreitung untersucht. Nach Eröffnen des Thorax wurden Herz und Lunge nach den gleichen Prinzipien untersucht und ggf. asserviert. Da in früheren Versuchsreihen der Klinik mit demselben Modell Schädelhöhleneröffnungen mit stets negativem Filialisierungsstatus durchgeführt wurden, konnte auf die Untersuchung des Gehirns verzichtet werden.

Die Sektionsbefunde aller entnommenen Blasen sowie Auffälligkeiten an anderen untersuchten Organen wurden fotografisch dokumentiert.

2.2.15 Histologie

Um makroskopisch tumorverdächtige Veränderungen an Niere und Lunge hinsichtlich ihrer Dignität abzuklären, wurden von einigen Proben Schnittpräparate hergestellt.

Die histologischen Schnitte wurden freundlicherweise im Institut für Pathologie von Herrn PD Dr. Stefan Krüger angefertigt.

Unmittelbar nach der Entnahme bei der Sektion wurden die Präparate in Formalin eingelegt und dann mit der bekannten Hämalaun-Erythrosin-Technik (H.E.) gefärbt. Bei dieser Färbemethode stellen sich insbesondere die Zellkerne (Chromatin) dunkelblau dar.

Um nachzuweisen, dass es sich bei den makroskopisch sichtbaren intravesikalen Raumforderungen tatsächlich um Tumoren handelt, wurden von einzelnen Blasen exemplarisch Schnittpräparate angefertigt. Die Formalin-fixierten Präparate wurden entwässert und in Paraffin eingebettet.

2.2.16 Statistik

Zur Auswahl geeigneter statistischer Testverfahren wurde die Beratung des Instituts für medizinische Statistik und Dokumentation in Anspruch genommen. Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Vorhersagewert der Makrohämaturie und der Palpation von Tumoren durch die Bauchdecke als Parameter für Tumorstadium wurden mit Hilfe der Vierfeldertafel bestimmt. Das Überleben der Mäuse wurde statistisch durch die Kaplan-Meier-Methodik und den log-rank Test berechnet. Die Analyse des Blasen- und Körpergewichtes, sowie der Tumoranwachstumsrate (Tumortake) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. p-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant festgelegt. Die Blasengewichte wurden in Boxplots angegeben, wobei die untere und obere Begrenzung der Kästchen jeweils die unteren und oberen Quartilen darstellen. Die Kästchenlänge wurde durch die interquartile Distanz bestimmt, so dass ein Kästchen 50% der Werte innerhalb der 25. und 75. Perzentile einer Gruppe beinhaltet. Die schwarze Linie in einer Box zeigt den Gruppenmedian, während die äußeren Begrenzungslinien jeder Box zu der kleinsten und größten beobachteten Größe wiesen. Zur statistischen Analyse wurde das Programm SPSS® für Windows®, sowie das Programm PRIMER® (ANOVA BIOSTATISTICS), verwendet.

III ERGEBNISSE

3.1 Versuch: Implantationsinhibition

3.1.1 Tumoranwachsrates

In diesem Versuch zur Implantationsinhibition konnte gezeigt werden, dass mit einer Zellzahl von 100.000 Tumorzellen ein Tumortake von 90% erreicht wird (Abb. 5).

Das Anwachsen eines Tumors konnte mit unterschiedlichen Dosierungen und Einwirkzeiten des Zytostatikums Gemcitabin in den verschiedenen Therapiegruppen unterschiedlich deutlich inhibiert werden.

Mit einer Dosierung von 5mg/ml und einer Einwirkzeit von 10min wurde eine Tumoranwachsrates von noch 70% erreicht ($p=0,576$). Mit derselben Dosierung (5mg/ml) und einer Gemcitabin-Einwirkzeit von 30min wurde diese Rate auf 60% ($p=0,302$) gesenkt.

Eine Verlängerung der Einwirkzeit auf 60min bei gleichbleibender Dosierung von 5mg/ml ergab eine Tumoranwachsrates von 70%, $p=0,576$.

Eine sehr lange Einwirkzeit von 120min bei einer Dosierung von 5 mg/ml führte zu einer deutlich reduzierten Tumoranwachsrates von 50% ($p=0,143$). Im Bezug auf die Kontrollgruppe zeigte sich jedoch keine signifikante Reduktion der Tumorimplantation.

In den folgenden Gruppen wurde die Dosis auf 10 mg/ml erhöht. Die mit 10 mg/ml therapierte Gruppe bei einer Gemcitabin-Verweilzeit in der Blase von 10min senkte die Tumorimplantationsrate auf 40%, $p=0,061$. In der nächsten Gruppe zeigte eine verlängerte Einwirkzeit auf 30min und der Dosierung von 10 mg/ml eine signifikante Reduktion. Die Anwachsrate der Tumoren betrug nur noch 30%, $p=0,022$.

Eine weitere Verlängerung der Einwirkzeit bei hoher Dosierung brachte keine weitere Verringerung der Tumoranwachsrates. Bei einer 60-minütigen Einwirkzeit und einer Dosierung von 10 mg/ml wurde fast keine Reduktion erreicht (80%, $p=1,000$).

Auch mit der längsten Einwirkzeit von 120min und 10 mg/ml wurde eine nur geringe Wirkung erzielt, die Implantation der Tumoren betrug 60% ($p=0,302$).

Es zeichnete sich also vor allen anderen Gruppen die Therapiegruppe aus, die mit einer hohen Dosierung und mittellanger Einwirkzeit therapiert wurde.

Nachfolgende Abbildung (Abb. 5) zeigt die Tumoranwachsrate (Anzahl der tumortragenden Tiere) am Tag 50.

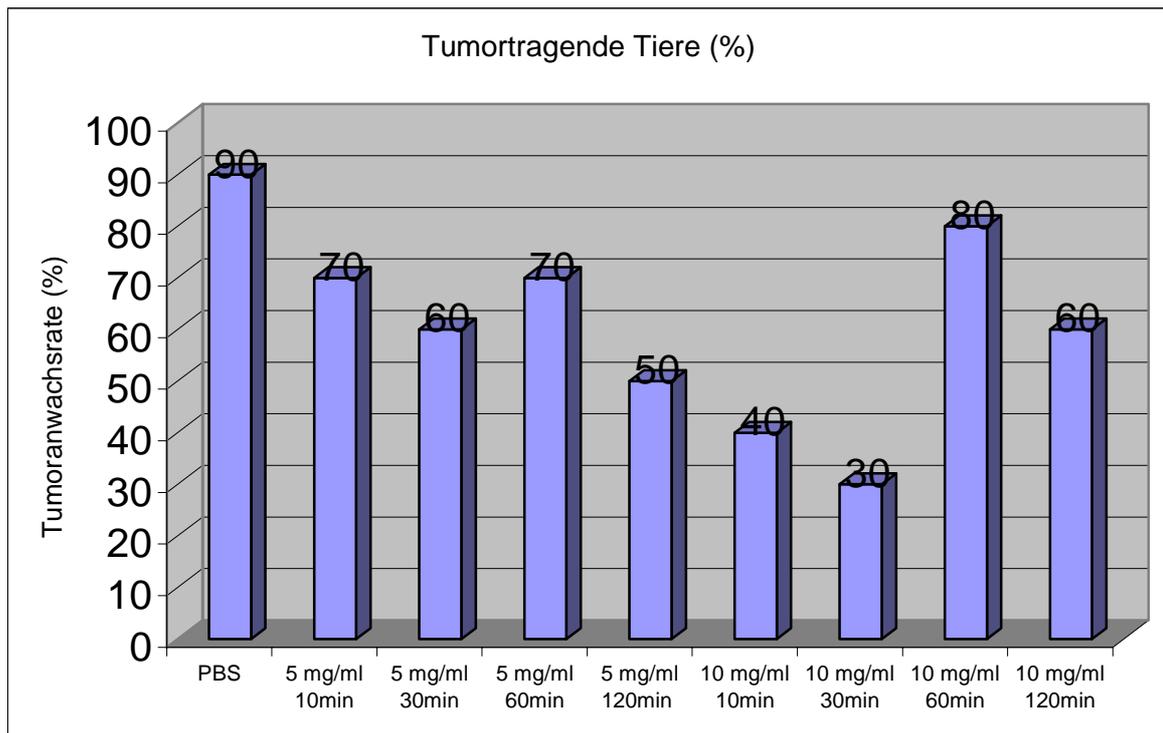


Abb. 5.: Tumortragende Mäuse in % in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration am Tag 50 im Versuch zur Implantationsinhibition.

Nach Berechnung der Signifikanzwerte der einzelnen Gruppen innerhalb des Versuchs zur Rezidivprophylaxe (Tab. 6) zeigte sich, dass sich in der Gruppe 6 (10 mg/ml und 10 min, $p= 0,061$) ein Rezidivtumor in 60% der Fälle verhindern lässt. Den deutlichsten Einfluss von Gemcitabin auf das Auswachsen eines Tumors stellte ich in der Gruppe 7 (10 mg/ml und 30 min, $p= 0,022$) fest, in der lediglich 30% der Tiere ein Tumorwachstum aufwiesen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) war Gemcitabin stets wirksam.

Gruppe	Tumoranwachsrate in %	Signifikanz p
Kontrollgruppe PBS	90	
10min mit 5mg/ml	70	0,576
30min mit 5mg/ml	60	0,302
60min mit 5mg/ml	70	0,576
120min mit 5mg/ml	50	0,143
10min mit 10mg/ml	40	0,061
30min mit 10mg/ml	30	0,022
60min mit 10mg/ml	80	1,000
120min mit 10mg/ml	60	0,302

Tab. 6: Die Signifikanzniveaus ergeben sich nach Berechnung der Varianzanalysen mit dem Chi-Quadrat Test und der Varianzanalyse nach ANOVA (Primer Biostatistics).

Die Verifizierung der Tumoren erfolgte auf der Basis der makroskopischen und der histologischen Auswertung und des bei der Sektionierung (Abb. 6 und Abb. 7) ermittelten Blasengewichtes.

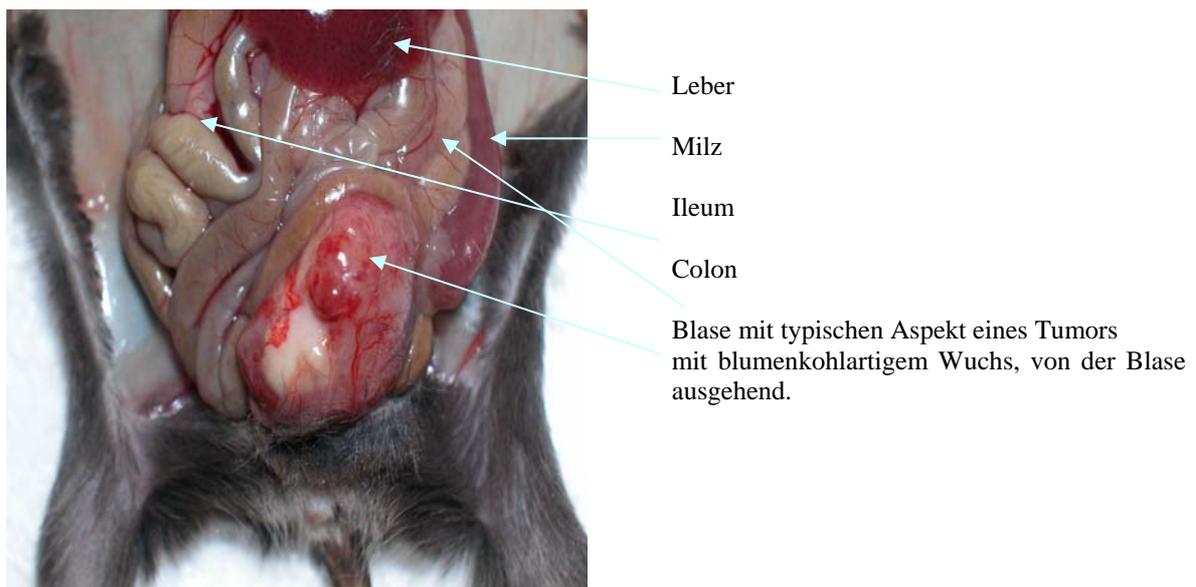


Abb. 6: Deutlich zu erkennender großer Tumor der Blase.

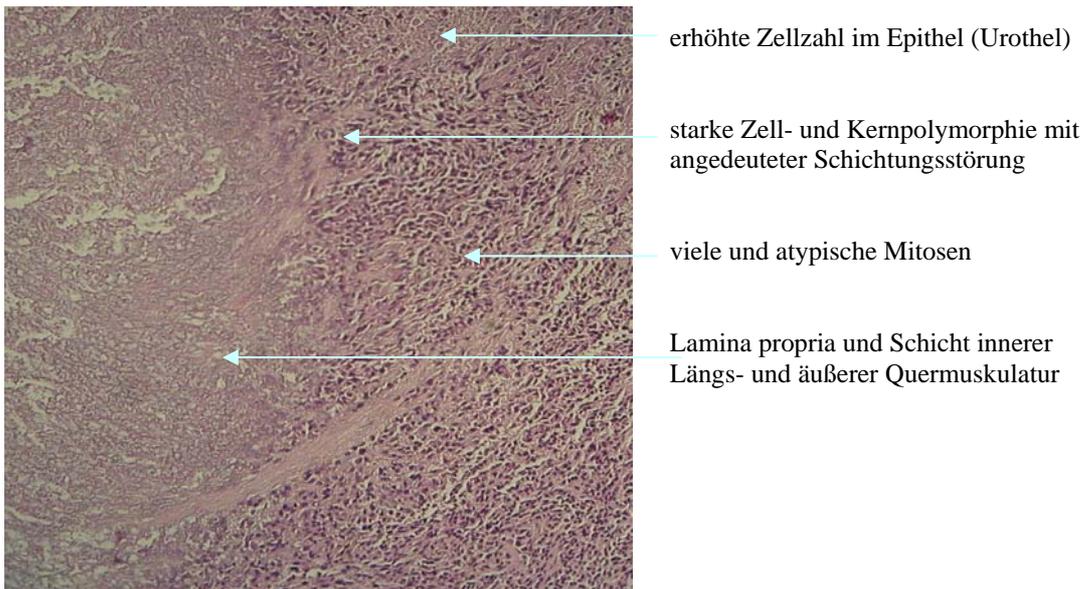


Abb. 7: Histologischer Schnitt des Präparates aus Abb. 6; Vergrößerung 200-fach, H.E. gefärbt.

3.1.2 Überleben

5 von insgesamt 90 Tieren verstarben vor Ablauf der ersten 3 Tage. Bei diesen Tieren ergab die Sektion keinen pathologischen Befund, alle anderen vorzeitig verstorbenen Tiere zeigten ein ausgedehntes Tumorwachstum sowie Kachexie, so dass der Tod der Tiere hier als Tumorfolge anzusehen war:

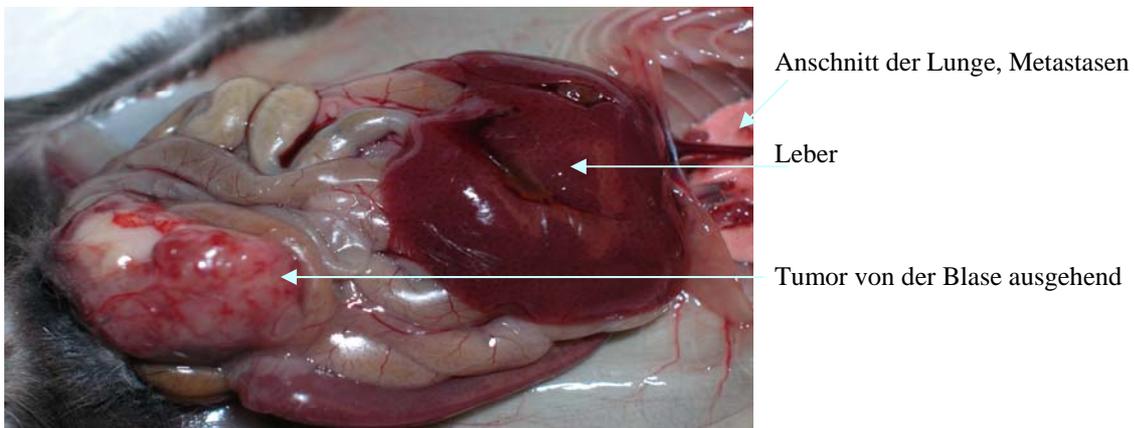


Abb. 8: Tumor der Blase und pulmonale Metastasen.



Abb. 9: Präparate von Blase, Lunge und Niere (von links nach rechts). Blase und Niere aufgeschnitten, aus der Lunge wurde ein Areal mit Metastasen asserviert. Zum Größenvergleich liegen die Präparate an einem Lineal mit Zentimeterskalierung an.

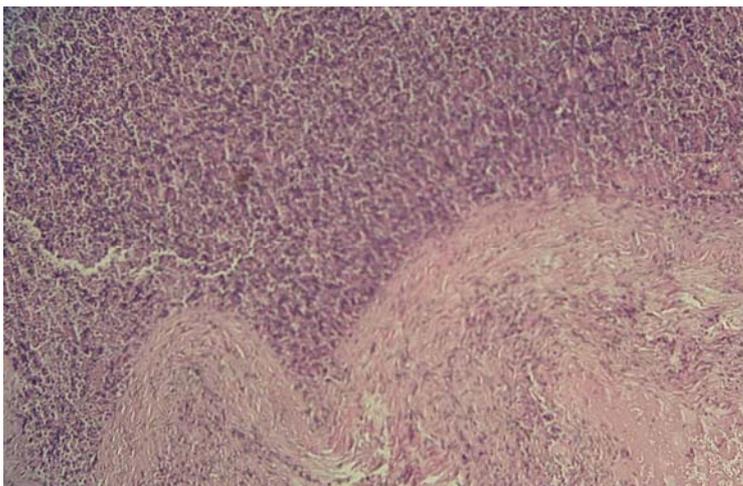


Abb. 10: Histologischer Schnitt durch die Wand einer tumortragenden Blase. Vergrößerung 200-fach, Färbung H.E. Deutlich zu erkennen die typische Schichtung der Blase mit stark erhöhter Zellzahl und Kernatypie in der Epithelzone über der Lamina propria. Histologischer Schnitt des Präparates aus Abb. 8 bzw. Abb. 9.

Zwei der Tiere zeigten bei der Sektion (beide innerhalb der ersten 3 Tage verstorben) kein intravesikales Tumorwachstum, sondern eine Perforation der Harnblase sowie Verklebungen und entzündliche Veränderungen des Peritoneums. Der Tod der Tiere war nicht auf Tumorwachstum, sondern auf eine Blasenperforation im Rahmen von Katheterisierung und Koagulation zurückzuführen.



Abb. 11: Ballonierte Blase mit blutigem Hydrops durch Tumorverlegung des Trigonum vesicae.

Bei weiteren 3 vorzeitig verstorbenen Tieren musste aufgrund des normalen Sektionsbefundes von einer Unverträglichkeit des Anästhetikums ausgegangen werden.

3.1.3 Makrohämaturie

Um den Zustand der Tiere im Verlauf des Versuchs registrieren und festhalten zu können, untersuchte ich die Tiere regelmäßig, wie im Versuchsaufbau beschrieben.

Die nachfolgenden Abbildung (Abb. 12) zeigt das Auftreten von Makrohämaturie im Versuch zur Implantationsinhibition. Mit Hilfe einer Vierfeldertafel habe ich die Sensitivität und die Spezifität des Untersuchungsparameters „Makrohämaturie“ berechnet.

Durch die hohe Spezifität (90%) und durch die hohe Sensitivität (80%), sowie von dem positiven (89%) und dem negativen (82%) Vorhersagewert, habe ich eine auftretende Makrohämaturie als relativ sicheres Zeichen eines vorliegenden Tumorwachstums werten können (siehe 3.1.7 Statistik).

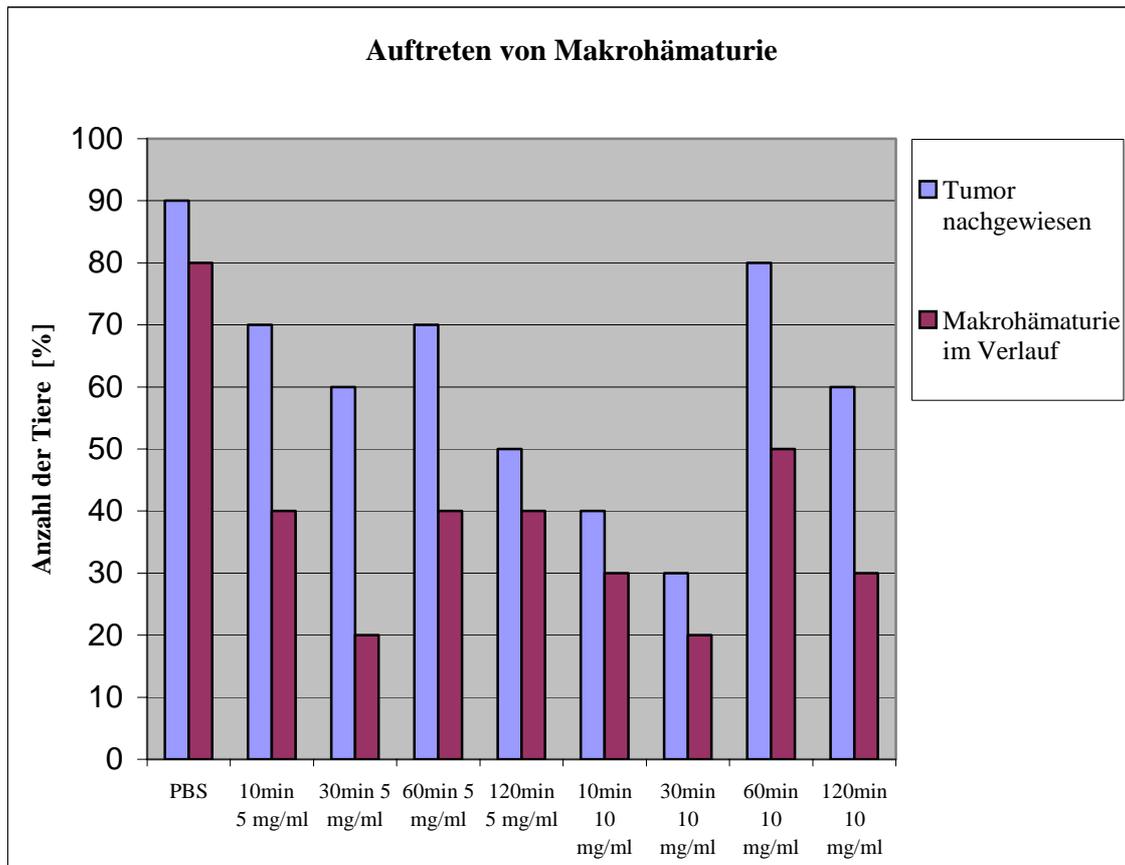


Abb. 12 : Makrohämaturie im Versuch zur Implantationsinhibition.

3.1.4 Identifikation tumortragender Tiere durch Palpation

Als einen weiteren Parameter für die Verlaufsbeobachtung hinsichtlich eines auftretenden Tumorwachstums habe ich mittels Palpation der Bauchdecke im Symphysenbereich der Tiere folgende Daten und Verteilungen ermittelt. Die nachfolgenden Abbildungen (Abb. 13) zeigt das Auftreten von palpierbaren Tumoren durch die Bauchdecke im Symphysenbereich. Wiederum zeigen die Berechnungen von Spezifität, Sensitivität, sowie positivem und negativem Vorhersagewert die hohe Bedeutung dieser Untersuchung während des Versuchs.

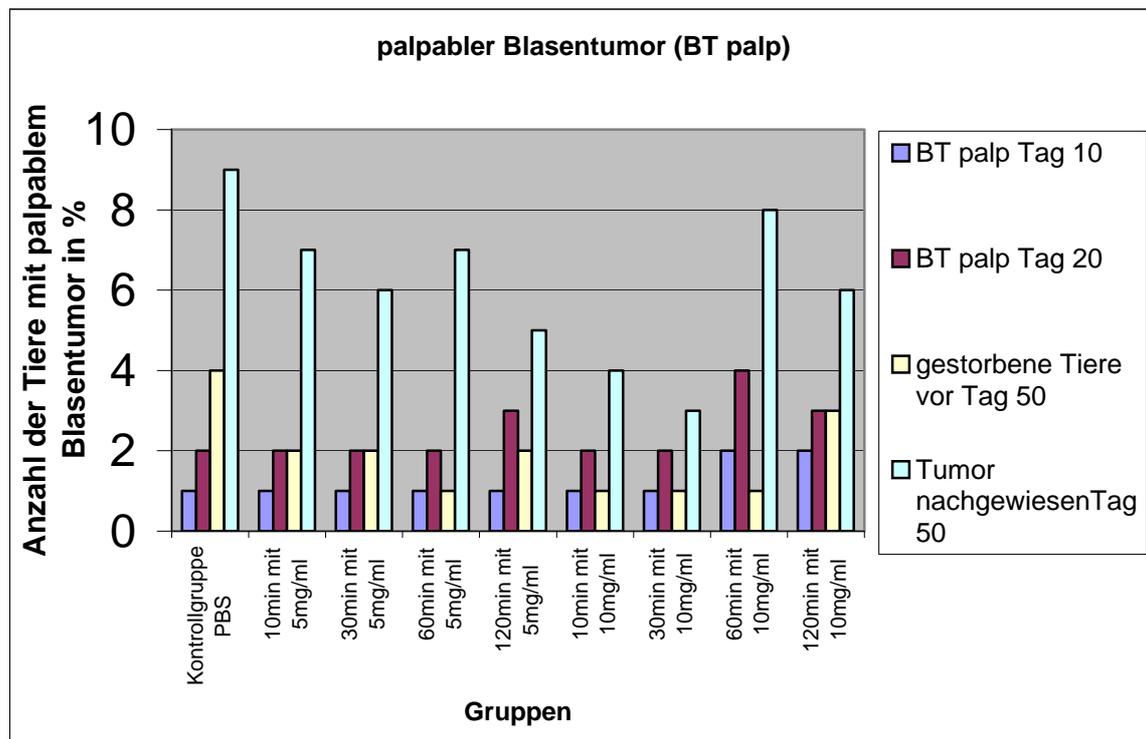


Abb. 13: Palpable Tumoren durch die Bauchdecke im ersten Versuch zur Implantationsinhibition bis zum Tag 50.

Die alleinige Palpation intravesikaler Tumoren erwies sich als wenig aussagekräftig. Nur durchschnittlich 2 von insgesamt 5 Tumoren in allen Gruppen konnten durch die Palpation erfasst werden.

Ausschließlich Tumoren mit einem Blasengewicht von mehr als 200 mg waren durch die Palpation sicher zu erfassen (normales Gewicht einer tumorfreien Blase bei ca. 28 mg). Kleinere Tumoren mit Gewichten zwischen 100 mg und 180 mg entgingen so dem palpatorischen Nachweis.

3.1.5 Gewichtsverlauf

Als Zeichen eines eventuellen allgemeinen Missergehens der Tiere bestimmte ich täglich das Körpergewicht. Bei den Tieren der Gruppen 1-9 stieg das Körpergewicht von durchschnittlich 18 g (MW 17,805, STD 0,367) am Tag 0 auf durchschnittlich 19g (MW 19,201, STD 0,268) am Tag 50 an. Die Entwicklung des Körpergewichts der nicht tumortragenden Mäuse der Gruppen 1-9 war nicht abweichend. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 14) zeigt die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere im Verlauf. Die Gewichtswerte der einzelnen Tiere wurden für die Gesamtgruppe (1-9; 10 Tiere pro Gruppe) gemittelt (Mittelwert, Standardabweichung).

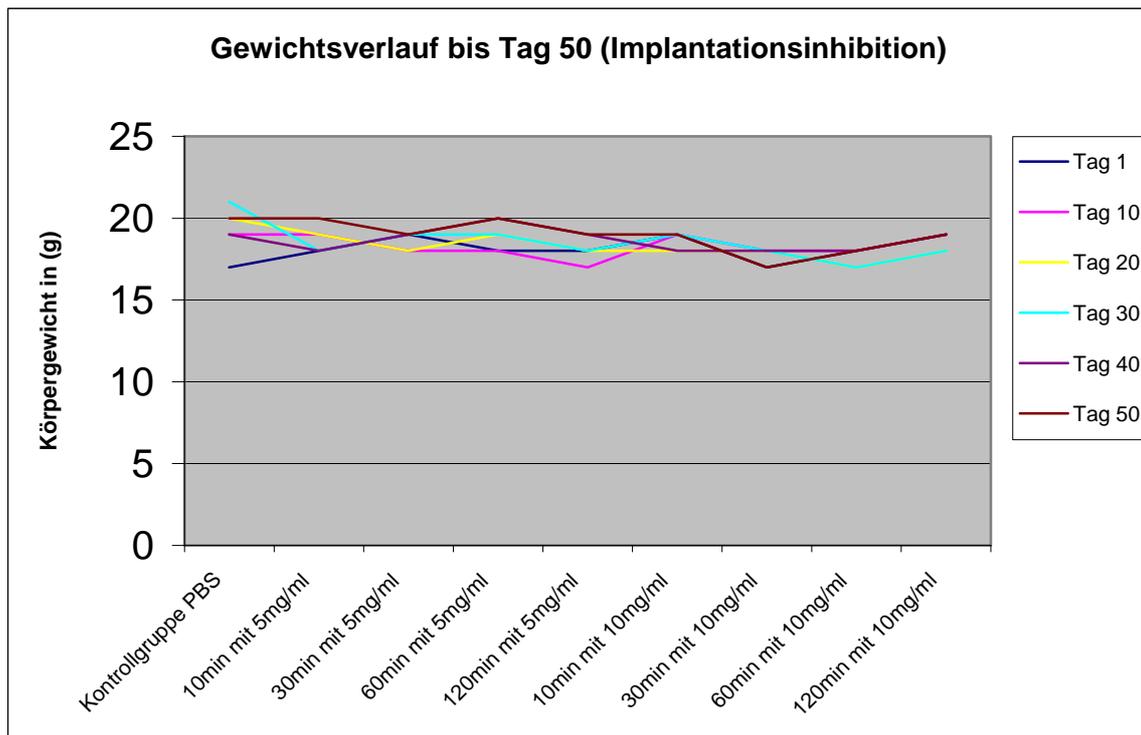


Abb. 14: Gewichtsentwicklung im Verlauf.

Die Abbildung zeigt, dass die intravesikale Behandlung der Tiere keinen Einfluss auf den Gesamtzustand der Tiere, unabhängig von Dosierung und Einwirkdauer, hat. Ein Auftreten von starken Nebenwirkungen, die eventuell zu einem Therapieabbruch geführt hätten, wie z.B. starker Gewichtsverlust, oder gar toxische Wirkungen, wie hoher Blutverlust durch Makrohämaturie, konnte ich nicht verzeichnen.

3.1.6 Blasengewicht

Zur Identifikation eines Tumorwachstums wurden die Organgewichte der extirpierten Blasen bei der Sektionierung am 50. Tag des Versuches ermittelt. In folgenden Darstellungen (Tab. 7 und Abb. 15) sind die Gewichte der Blasen aufgeführt. Es handelt sich um die Mittelwerte der Gruppen und deren Standardabweichung.

Implantationsinhibition	Blasengewichte [mg]	Mittelwert [mg]	Standardabweichung [mg]
Kontrollgruppe PBS	22-766	341,87	230,703
10min mit 5mg/ml	103-1554	388,5	451,223
30min mit 5mg/ml	20-1598	456,57	550,974
60min mit 5mg/ml	18-395	202,3	172,589
120min mit 5mg/ml	21-427	246,4	147,361
10min mit 10mg/ml	14-404	156,1	158,032
30min mit 10mg/ml	14-578	165,15	202,843
60min mit 10mg/ml	32-1130	310,1	313,595
120min mit 10mg/ml	33-704	347,43	234,585

Tab. 7: Versuch zur Implantationsinhibition. Mittelwerte und Standardabweichung der Organgewichte in [mg]

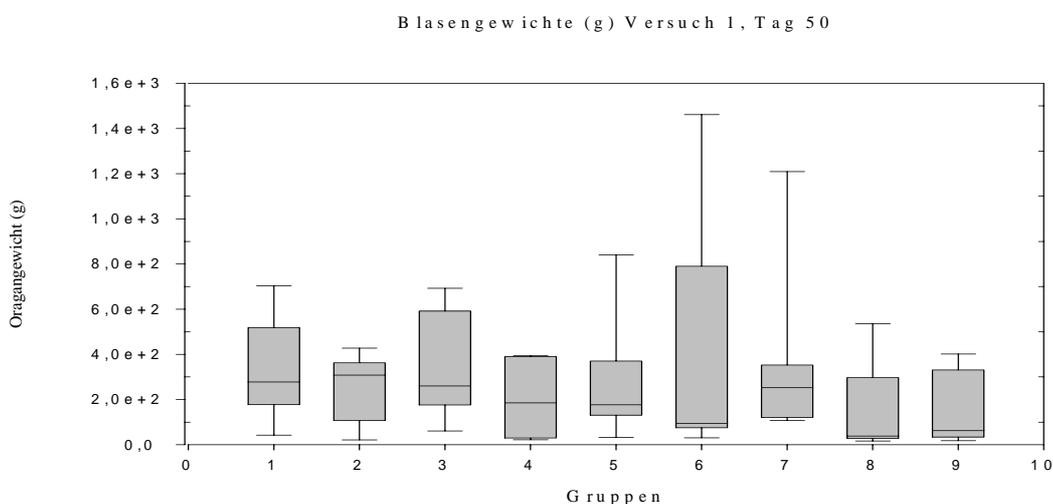


Abb. 15: Boxplots Darstellung der Blasengewichte aus Abb. 17 mit Median im Versuch zur Implantationsinhibition:

- Gruppe 1 = PBS Kontrollgruppe
- Gruppe 2 = GEM 5mg/ml 120min
- Gruppe 3 = GEM 10mg/ml 120min
- Gruppe 4 = GEM 5mg/ml 60min
- Gruppe 5 = GEM 10mg/ml 60min
- Gruppe 6 = GEM 5mg/ml 30min
- Gruppe 7 = GEM 5mg/ml 10min
- Gruppe 8 = GEM 10mg/ml 30min
- Gruppe 9 = GEM 10mg/ml 10min

3.1.7 Statistik

Tabelle 8 zeigt die Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensivität und der Spezifität, sowie dem positiven und dem negativen Vorhersagewert für die Variable Makrohämaturie.

Berechnet sind die Werte für die Kontrollgruppe. Die Anzahl der Tiere sind in Klammern gesetzt: Gesamtzahl der Tiere = 10, davon zeigten 9 Tiere einen Tumor, ein Tier jedoch keinen.

Acht der tumortragenden Tiere zeigten Makrohämaturie (a), zwei tumortragende Tiere nicht (b).

Ein Tier zeigte eine Makrohämaturie, trug jedoch keinen Tumor (c).

Daraus ergibt sich, dass wenn 9 von 10 Tieren keinen Tumor tragen, diese 9 Tiere auch keine Makrohämaturie aufweisen (d).

Kontrollgruppe (10)	Makrohämaturie	keine Makrohämaturie
Tumorwachstum (9)	8 (a)	2 (b)
kein Tumorwachstum (1)	1 (c)	9 (d)

Tab. 8:

Vierfeldertafel zur Berechnung für den Parameter Makrohämaturie hinsichtlich intravesikalen Tumorwachstums bis zum Tag 50, von

Sensitivität (a/a+b) = 80%

Spezifität (d/c+d) = 90%

positivem Vorhersagewert (a/a+c) = 89%

negativem Vorhersagewert (d/b+d) = 82%

Tabelle 9 zeigt die Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensivität und der Spezifität, sowie dem positiven und dem negativen Vorraussagewert für die Variable palpabler Blasentumor.

Kontrollgruppe (10)	BT palpabel	BT nicht palpabel
Tumorwachstum (9)	4 (a)	6 (b)
ein Tumorwachstum (1)	0 (c)	10 (d)

Tab. 9:

Vierfeldertafel zur Berechnung für den Parameter palpabler Blasentumor (BT) hinsichtlich intravesikalen Tumorwachstums bis zum Tag 50, von

Sensitivität (a/a+b) = 40%

Spezifität (d/c+d) = 100%

positivem Vorhersagewert (a/a+c) = 100%

negativem Vorhersagewert (d/b+d) = 63%

3.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse des Versuchs zur Implantationsinhibition

Werden Mäusen vom Stamm B7/C26 nach Elektrokoagulation der Blasenwand mittels Katheter 100.000 Tumorzellen der Zelllinie MB49 implantiert, so wird in der Kontrollgruppe ein Tumortake von 90% erreicht.

Wird diesen Mäusen nach einer Implantationszeit von 30 min die Blase gespült und im Anschluss an die Spülung für 30 min Dauer das Zytostatikum Gemcitabine in einer Dosierung von 10 mg/ml intravesikal verabreicht, so lässt sich das Auswachsen eines Tumors nach Implantation frei flottierender Tumorzellen signifikant senken: Nur 30% der Tumoren wachsen an der lädierten Blase an ($p=0,022$). Dabei zeigen sich durch die gewählten Therapiemodalitäten keine schwerwiegende unerwünschte Wirkungen.

3.2 Therapie des Tumorfrühstadiums

3.2.1 Tumoranwachsrates

In diesem Teil des Versuchs wurden die Tiere 100 Tage (bis zum Auftreten von Makrohämaturie in der Kontrollgruppe) beobachtet. Nach Instillation von 20.000 Tumorzellen und einer Implantationszeit von 24h konnte gezeigt werden, dass in der Kontrollgruppe, die ebenfalls wie im ersten Versuch eine metabolisch inerte Spüllösung erhielt (HEPES), zu 89% die Tumoren anwachsen.

In der zweiten Gruppe, die zum Vergleich mit dem Goldstandard-Therapeutikum BCG therapiert wurde (für 60min), wurde ein Auswachsen des Tumors bei 78% ($p=1,000$) der Tiere ermittelt. (Dieser Wert ist auf den zeitlichen Wirkmechanismus von BCG zu beziehen (siehe hierzu im Abschnitt DISKUSSION)).

In der ersten mit Gemcitabin therapierten Gruppe wurde ein Tumorwachstum auf 44% ($p=0,061$) bei einer Einwirkzeit von 30min mit einer Dosierung von 5 mg/ml reduziert. Bei einer Einwirkzeit von 60min und gleicher Dosierung wurde ein Tumorwachstum auf 55% der Tiere ($p=0,302$) reduziert.

Für eine verlängerte Einwirkzeit von 120 min bei gleicher Dosierung wurde eine signifikante Reduktion der Tumorauswachsrate ermittelt. Nur 11% der Tiere ($p=0,002$) zeigten ein Tumorwachstum, dieser Unterschied zur Kontrollgruppe ist statistisch signifikant.

Ein Erhöhung der Dosis auf 10 mg/ml brachte zunächst bei einer Einwirkzeit von 10min keine wesentliche Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. 80% der Tiere ($p=1,000$) trugen einen Tumor.

Eine Verlängerung der Einwirkzeit auf 30min bei dieser Dosierung brachte eine deutliche Reduktion der Tumorauswachsrate. Nur 30% der Tiere zeigten einen Tumor ($p=0,022$). Eine weitere Verlängerung der Einwirkzeit auf 60 min bei 10 mg/ml hatte 50% tumortragende Tiere zur Folge ($p=0,143$).

Eine nochmalige Verlängerung auf 120 min bei der Dosierung 10 mg/ml senkte wiederum die Tumorrage. Nur noch 33% der Tiere zeigte einen Tumor ($p=0,022$).

In der nachfolgenden Abbildung ist ebenso erkennbar, dass eine höhere Dosierung bei gleichen Einwirkzeiten (bei den Einwirkzeiten 30 min und 60 min) und eine längere Einwirkzeit bei gleicher Dosierung (jeweils bei den Gruppen verglichen, die 60 min auf 120 min verlängert wurden) effektiv ist.

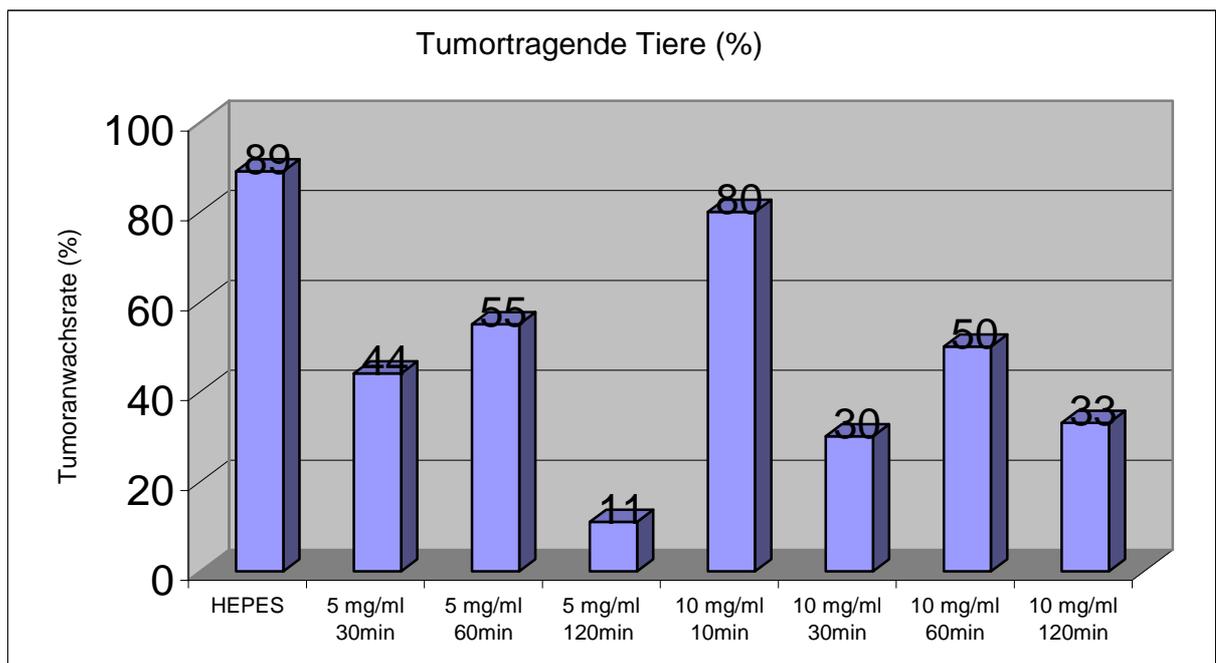


Abb. 16: Tumortragende Mäuse in %, Versuch zur Therapie des Tumorfürstadiums, Tag 100.

Wie bereits im Versuch zur Implantationsinhibition im Abschnitt 3.1, erfolgte die Verifizierung der Tumoren auf der Basis der makroskopischen und der histologischen Auswertung und des bei der Sektionierung ermittelten Blasengewichtes.

Nach Berechnung der Signifikanzwerte (Tab. 10) zeigt sich, dass sich mit Gemcitabin eine frühe Form eines induzierten Blasen tumors unterhalb die Nachweisgrenze reduzieren lässt (mit den hier angelegten Methoden: Prüfung auf Makrohämaturie, Palpation, Gewichtsbestimmung und nach Sektion Bestimmung des Blasengewichtes und makroskopische und histologische Auswertung).

Dieses konnte ich besonders in den Gruppen 6 und 8 (Gruppe 6 = 30min mit 10 mg/ml und Gruppe 8 = 120min mit 10 mg/ml) registrieren.

Vor allem aber in der Gruppe 4 (5 mg/ml bei einer Einwirkzeit von 120min) zeigte sich eine deutliche Reduktion der Tumoranwachsrate auf 11% (p= 0,002).

Gruppe	Tumoranwachsrate in %	Signifikanz p
Kontrollgruppe HEPES	89	
30min mit 5mg/ml	44	0,061
60min mit 5mg/ml	55	0,302
120min mit 5mg/ml	11	0,002
10min mit 10mg/ml	80	1,000
30min mit 10mg/ml	30	0,022
60min mit 10mg/ml	50	0,143
120min mit 10mg/ml	33	0,022

Tab. 10 : Tumoranwachsrate und Signifikanzwerte im zweiten Versuch zur Therapie einer Tumorfrühform.

3.2.2 Überleben

In diesem Versuch zeigte das Anästhetikum eine wesentlich höhere Toxizität. 9 Tiere erwachten nicht aus der ersten Narkose. Nach der Tumorimplantation bei den Tieren der Gruppen 2-8 tauschte ich einige Tiere innerhalb der Gruppen 2-8 um. Dadurch erhielt ich gleich große Gruppen als Ausgangspunkt. Mit dem Beginn der Therapie wurden die Gruppen belassen. Bezüglich des Überlebens zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Therapiegruppen.

3.2.3 Makrohämaturie

Um den Zustand der Tiere im Verlauf des Versuchs registrieren und festhalten zu können, untersuchte ich die Tiere regelmäßig, wie im Versuchsaufbau beschrieben.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 17) zeigt das Auftreten von Makrohämaturie im Versuch zur Therapie einer Tumorfrühform. Mit Hilfe einer Vierfeldertafel habe ich die Sensitivität und die Spezifität des Untersuchungsparameters „Makrohämaturie“ berechnet.

Durch die hohe Spezifität (100%) und durch die Sensitivität (78%), sowie von dem positiven (100%) und dem negativen (81%) Vorhersagewert, habe ich eine auftretende Makrohämaturie als relativ sicheres Zeichen eines vorliegenden Tumorwachstums während des Versuches bis zum Tag 100 werten können.

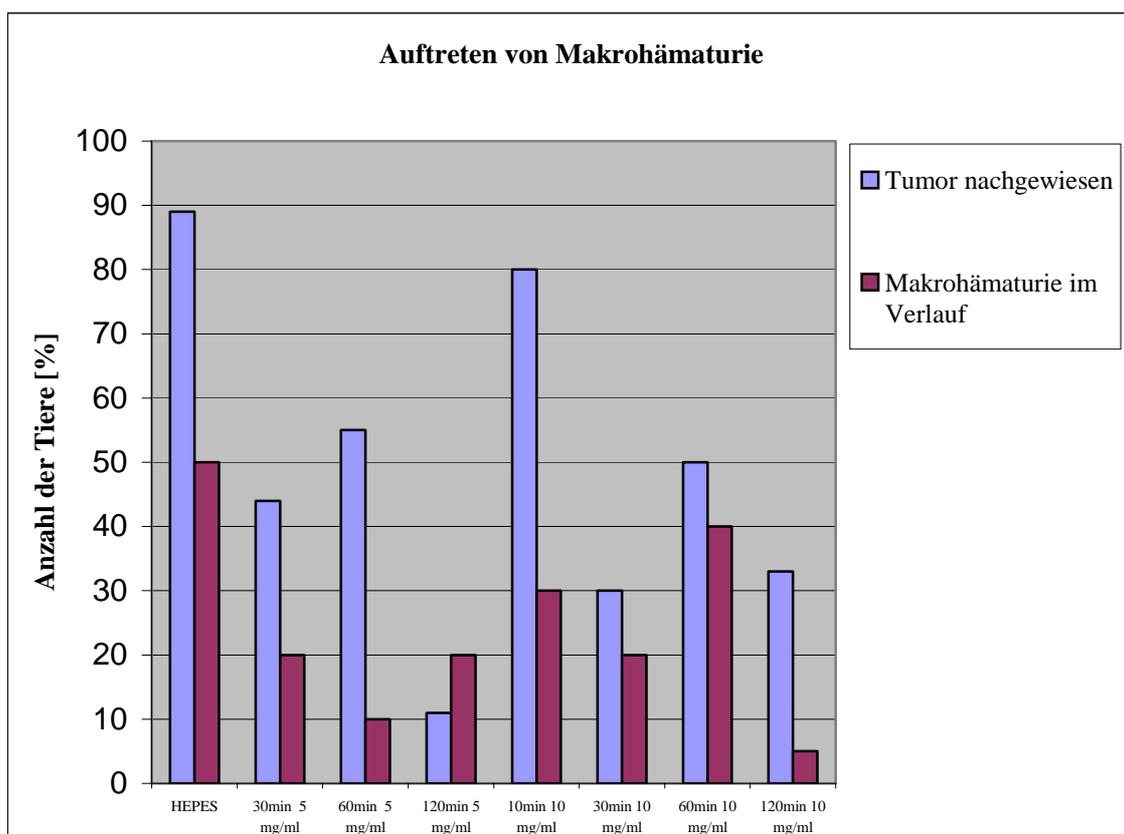


Abb. 17: Tiere mit Makrohämaturie bis zum Tag 100.

3.2.4 Identifikation tumortragender Tiere durch Palpation

Als einen weiteren Parameter für die Verlaufsbeobachtung hinsichtlich eines auftretenden Tumorwachstums habe ich mittels Palpation der Bauchdecke im Symphysenbereich der Tiere folgende Daten und Verteilungen ermittelt. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 18) zeigt das Auftreten von palpierbaren Tumoren durch die Bauchdecke im Symphysenbereich. Wiederum zeigen die Berechnungen von Spezifität, Sensitivität, sowie positivem und negativem Vorhersagewert die hohe Bedeutung dieser Untersuchung während des Versuchs.

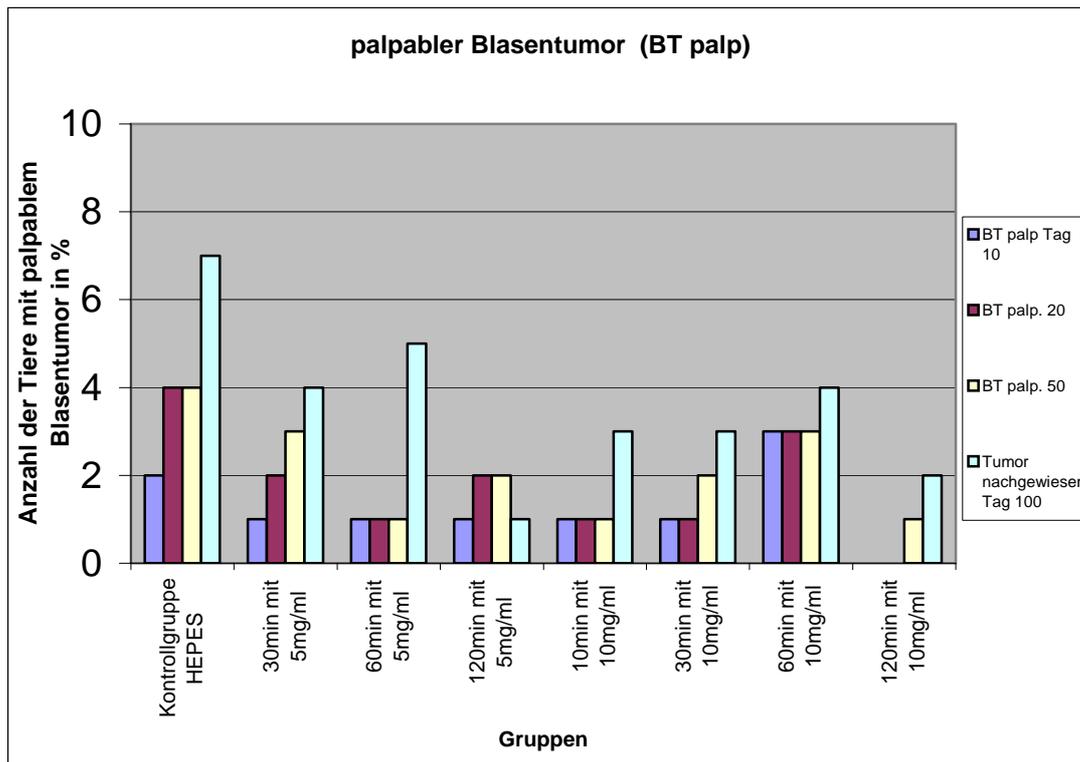


Abb. 18: Palpable Tumoren durch die Bauchdecke im zweiten Versuch zur Therapie einer Tumorfrühform bis zum Tag 100.

Die alleinige Palpation intravesikaler Tumoren erwies sich als wenig aussagekräftig. Nur durchschnittlich 2,5 von insgesamt 5 Tumoren in allen Gruppen konnten durch die Palpation erfasst werden.

Ausschließlich Tumoren mit einem Blasengewicht von mehr als 200 mg waren durch die Palpation sicher zu erfassen (normales Gewicht einer tumorfreien Blase bei ca. 28mg). Kleinere Tumoren mit Gewichten zwischen 100 mg und 180 mg entgingen so dem palpatorischen Nachweis.

3.2.5 Gewichtsverlauf

Als Zeichen eines eventuellen allgemeinen Missempfindens der Tiere bestimmte ich täglich das Körpergewicht. Bei den tumortragenden Tieren der Gruppen 1-8 stieg das Körpergewicht von durchschnittlich 18 g (MW 17,102; STD 0,258) am Tag 0 auf durchschnittlich 20g (MW 19,829; STD 0,136) am Tag 100 an. Die Entwicklung des Körpergewichts der nicht tumortragenden Mäuse der Gruppen 1-8 war im Mittel nicht abweichend. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 19) zeigt die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere im Verlauf.

Die Gewichte der einzelnen Tiere wurden für die Gesamtgruppe (1-8; 10 Tiere pro Gruppe) gemittelt (Mittelwert, Standardabweichung).

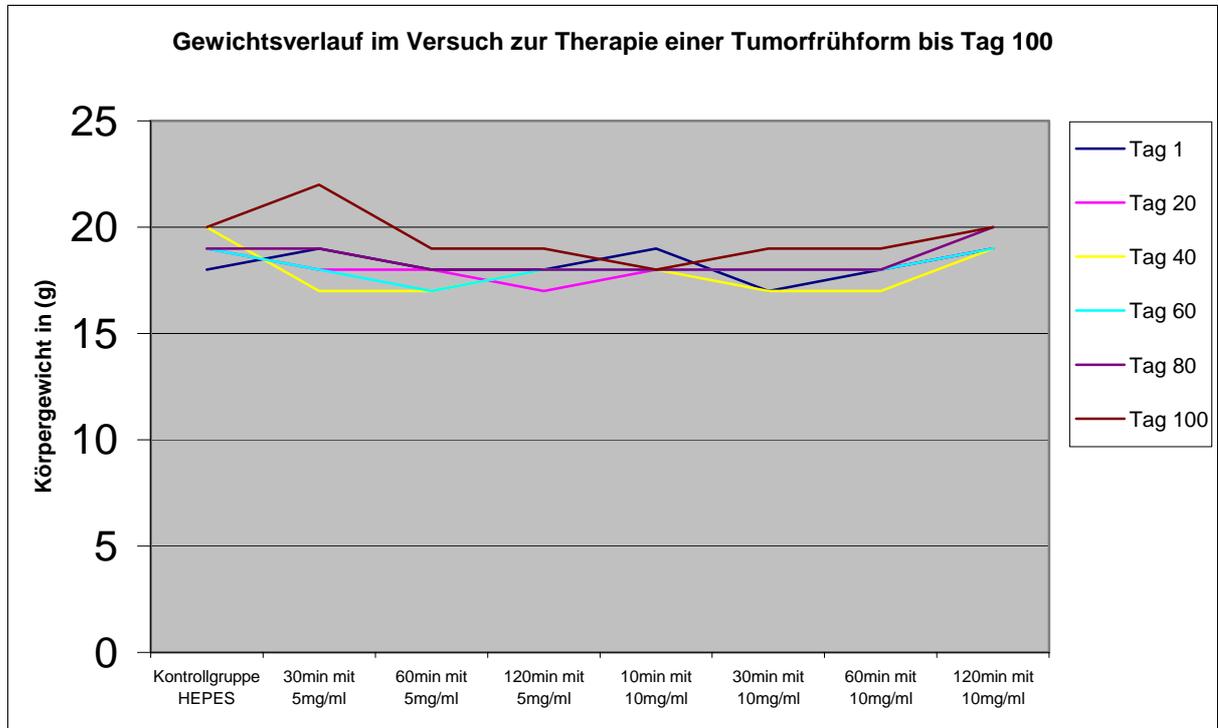


Abb. 19: Gewichtsentwicklung im Verlauf.

Die Abbildung 19 zeigt, dass die intravesikale Behandlung der Tiere keinen Einfluss auf den Gesamtzustand der Tiere, unabhängig von Dosierung und Einwirkdauer, hat. Ein Auftreten von starken Nebenwirkungen, die eventuell zu einem Therapieabbruch geführt hätten, wie z.B. starker Gewichtsverlust, oder gar toxische Wirkungen, wie hoher Blutverlust durch Makrohämaturie, konnte ich nicht verzeichnen.

3.2.6 Blasengewicht

Zur Identifikation eines Tumorwachstums wurden die Organgewichte der extirpierten Blasen bei der Sektionierung am 100. Tag nach Tumorzellimplantation ermittelt. In folgender Darstellung (Tab. 11) sind die Gewichte der Blasen aufgeführt.

Therapie Tumorfrühstadium	Blasengewichte [mg]	Mittelwert [mg]	Standardabweichung [mg]
Kontrollgruppe HEPES	25-735	303,5	255,811
30min mit 5mg/ml	28-912	218,89	272,707
60min mit 5mg/ml	28-461	173,84	164,64
120min mit 5mg/ml	37-460	163,9	144,937
10min mit 10mg/ml	264-743	483	197,688
30min mit 10mg/ml	29-463	266	161,212
60min mit 10mg/ml	562	562	0
120min mit 10mg/ml	26-39	28	2,769

Tab. 11: Versuch 2 zur Therapie einer Tumorfrühform. Mittelwerte und Standardabweichung der Organgewichte in (mg).

3.2.7 Statistik

Tabelle 12 zeigt die Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensivität und der Spezifität, sowie dem positiven und dem negativen Vorhersagewert für die Variable Makrohämaturie.

Berechnet sind die Werte für die Kontrollgruppe. Die Anzahl der Tiere sind in Klammern gesetzt: Gesamtzahl der Tiere = 9, davon zeigten 8 Tiere einen Tumor, ein Tier jedoch keinen.

Sieben der tumortragenden Tiere zeigten Makrohämaturie (a), zwei tumortragende Tiere nicht (b).

Kein Tier zeigte Makrohämaturie ohne gleichzeitig einen Tumor aufzuweisen (c).

Daraus ergibt sich, dass wenn von 9 Tieren keines ein Tumorwachstum zeigte, diese 9 Tiere auch keine Makrohämaturie aufwiesen (d).

Kontrollgruppe (9)	Makrohämaturie	keine Makrohämaturie
Tumorwachstum (8)	7 (a)	2 (b)
Kein Tumorwachstum (1)	0 (c)	9 (d)

Tab. 12:

Vierfeldertafel zur Berechnung für den Parameter Makrohämaturie hinsichtlich intravesikalen Tumorwachstums bis zum Tag 100, von

Sensitivität $(a/a+b) = 78\%$

Spezifität $(d/c+d) = 100\%$

positivem Vorhersagewert $(a/a+c) = 100\%$

negativem Vorhersagewert $(d/b+d) = 81\%$

Tabelle 13 zeigt die Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensivität und der Spezifität, sowie dem positiven und dem negativen Vorraussagewert für die Variable palpabler Blasentumor.

Kontrollgruppe (9)	BT palpabel	BT nicht palpabel
Tumorwachstum (8)	5 (a)	4 (b)
Kein Tumorwachstum (1)	0 (c)	9 (d)

Tab. 13:

Vierfeldertafel zur Berechnung für den Parameter palpabler Blasentumor (BT) hinsichtlich intravesikalen Tumorwachstums bis zum Tag 100, von

Sensitivität $(a/a+b) = 56\%$

Spezifität $(d/c+d) = 100\%$

positivem Vorhersagewert $(a/a+c) = 100\%$

negativem Vorhersagewert $(d/b+d) = 69\%$

3.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse des Versuchs zur Therapie einer Tumorfrühform

Werden Mäusen vom Stamm B7/C26 nach Elektrokoagulation der Blasenwand mittels Katheter 20.000 Tumorzellen der Zelllinie MB49 implantiert, so wird in der Kontrollgruppe ein Tumortake von 89% erreicht.

Wird diesen Mäusen nach einer Implantationszeit von 24h das Zytostatikum Gemcitabin intravesikal verabreicht, so lässt sich ein frühes Harnblasenkarzinom behandeln, indem ein Auswachsen des Tumors signifikant inhibiert wird.

Besonders mit zwei Therapiekonzepten konnte ich ein Tumorwachstum signifikant verhindern. Eine sehr lange Einwirkzeit von 120 min bei geringer Dosierung von 5 mg/ml ($p=0,002$, Überlebensrate 88%), eine mittlere Einwirkzeit von 30min und einer hohen Dosierung von 10 mg/ml ($p=0,022$, Überlebensrate 77%), erwiesen sich als wirksam. Eine sehr lange Einwirkzeit von 120min kombiniert mit einer hohen Dosis von 10 mg/ml zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion des Tumortakes, jedoch keine gute Überlebensrate ($p=0,022$, Überlebensrate 67%).

IV DISKUSSION

Das hier verwendete und verbesserte ^[62] orthotope Blasentumormodell MB49 eignet sich für die wissenschaftlichen Zielsetzung dieser Dissertation hervorragend, da bereits die Wirksamkeit von intravesikal appliziertem BCG, als auch von implantationsinhibierenden Peptiden, in diesem Tiermodell in verschiedenen vorangehenden Studien dargelegt werden konnte ^[62, 63].

4.1 Versuch zur Implantationsinhibition

Die Rezidivhäufigkeit des oberflächlichen Urothelkarzinoms der Harnblase nach transurethraler Resektion (TUR) ist wie eingangs beschrieben ein erhebliches Problem in der urologischen Onkologie ^[25, 55, 56]. Die genetische Alteration urothelialer Zellen oder die Reaktion auf extrinsische Karzinogene sind als Ursachen hierfür anerkannt (field changes) ^[57, 58]. Die Reimplantation viabler Tumorzellen nach transurethraler Resektion TUR an die lädierte Blasenwand ist eine weitere Hypothese ^[38], um die hohe Rezidivneigung zu erklären. So kann sowohl das atypische Auftreten von Rezidivtumoren im Blasendach nach TUR ^[59] als auch der erfolgte genetische Nachweis der Monoklonalität multifokaler Blasentumoren ^[60] als ein Hinweis für die Implantation herangezogen werden. So zeigten in-vitro-Studien von PODE et al., dass Tumorzellen schneller und besser an eine nicht-intakte Oberfläche adhären (entsprechend der klinischen Situation einer lädierten Blasenwand durch TUR), als an eine intakte endotheliale Oberfläche ^[61].

Die also durch TUR abgelösten, jedoch noch in der Blase befindlichen, freien viablen Tumorzellen ^[38] können durch die frühe intravesikale Chemotherapie, in Form einer Einmalinstillation, an einer Reimplantation in die lädierte Blasenwand gehindert werden ^[38].

In der ersten Untersuchung sollte nun die klinische Situation nach einer TUR-B simuliert werden. Es wurde davon ausgegangen, dass eine höhere Zellzahl auch zu einer höheren Tumoranwachsrate führt. Dies bestätigte sich im ersten Versuch. In der nur mit einer Kontrolllösung therapierten Gruppe (PBS) wurde eine Tumoranwachsrate von 90% erzielt. Dieses wurde in der Literatur bisher nur mit geringerer Zellzahl erreicht, bzw. es wurde eine geringere Tumoranwachsrate erzielt ^[63, 67].

Es ließ sich feststellen, dass Gemcitabin als intravesikal verabreichtes Zytostatikum freie viable Tumorzellen in der Blase an deren Implantation in die lädierte Blasenwand hindert, und zwar unterschiedlich stark je nach Einwirkzeit des Zytostatikums und Dosierung.

4.1.1 Modifikation des etablierten Tiermodells

Für beide Versuche (Versuch 1 zur Implantationsinhibition und Versuch 2 zur Behandlung einer Tumorfrühform, s.u.) wurde das durch die Arbeitsgruppe BÖHLE et al. optimierte und etablierte Tumormodell MB49 ^[62] verwendet.

Im Versuch 1 zur Implantationsinhibition wurde das Modell nochmals modifiziert. Das von BÖHLE et al. etablierte Modell sieht eine Zellzahl für die intravesikale Applikation von 20.000 Tumorzellen der Zelllinie MB49 vor, bei einer Einwirk- bzw. Implantationszeit von 24 Stunden.

In der vorliegenden Untersuchung ließ ich im Versuch 1 zur Implantationsinhibition, um die klinische Situation direkt nach TUR-B zu simulieren, die Tumorzellsuspension exakt 30 min in der Blase verweilen. Somit hatte ich die Implantationszeit auf 30 min verkürzt.

Um dennoch in der Kontrollgruppe (PBS Gruppe in Versuch 1) eine hohe Tumoranwachsrate zu erhalten, erhöhte ich die intravesikal applizierte Tumorzellzahl auf 100.000 Tumorzellen der Linie MB49.

Es konnte bei einer Verweilzeit der Tumorzellen in der Blase (=Implantationszeit von 30 min) eine Tumoranwachsrate von 90% erreicht werden (versus einer Tumoranwachsrate von 100% bei dem etablierten Modell von BÖHLE et al. ^[62]). Diese dennoch hohe Tumoranwachsrate darf aufgrund der Modifikation des Modells als guter Erfolg gewertet werden.

Mit einer Tumoranwachsrate von 90% in der Kontroll- bzw. PBS-Gruppe im ersten Versuch ist somit eine valide Grundlage für die klinische Aussagekraft der weiteren Ergebnisse im ersten Versuch geschaffen worden.

4.2 Versuch zur Behandlung einer Tumorfrühform

Für den zweiten Versuch, in dem ein frühes Stadium eines oberflächlichen Harnblasentumors therapiert wurde, (Versuch 2 zur Behandlung einer Tumorfrühform) wurde wieder das auf das von BÖHLE et al. ^[62] optimierte und etablierte Modell zurückgegriffen. Es wurden 20.000 Tumorzellen appliziert. Durch einen Zeitraum von 24 Stunden zwischen Instillation der Tumorzellen und dem Therapiebeginn mit den Gemcitabin-Instillationen wurde eine Implantationszeit von 24 Stunden gewährt.

Die Blasen der Tiere dieses Versuchs wurden nicht wie im ersten Versuch nach 30 min gespült. Vielmehr wurde der Katheter in situ belassen bis zum Aufwachen der Tiere (nach ca. 120 min). Erst am darauffolgenden Tag (Implantationszeit also 120 min und 24 h ohne Therapie) wurden die Tiere erneut narkotisiert katheterisiert und behandelt.

Nach der Implantationszeit war von einem vollständigen Anwachsen der instillierten Tumorzellen in die lädierte Blasenwand der Tiere auszugehen, was durch eine Tumoranwachsrate von 89% in der Kontrollgruppe gezeigt werden konnte.

4.3 Mögliche Fehlerursachen

Der klinischen Situation entsprechend (postoperative Spülung der Blase) wurden die Blasen der Tiere im ersten Versuch gespült:

- zu einem Zeitpunkt a) nach 30 min nach der Tumorimplantation im Versuch 1 zur Rezidivprophylaxe, und
- zu einem Zeitpunkt b), der eine exakte Einwirkzeit des Zytostatikums garantiert (in beiden Versuchen).

Es erfolgte zum Beispiel eine Spülung nach 60 min in der Gruppe, die eine Einwirkzeit von 60 min mit der Dosierung 5 bzw. 10 mg/ml des Zytostatikums erhielt.

Aufgrund des Spüleffektes erscheint es möglich, dass nach nur 30 min Implantationszeit noch nicht alle instillierten Tumorzellen vollständig in die durch Elektrokoagulation lädierte Blasenwand der Tiere eingewachsen waren und es dadurch zu einem Auswaschen von Tumorzellen gekommen sein könnte.

Auf die therapeutische Wirkung durch den rein mechanischen Effekt eines Auswaschens von frei flottierenden Krebszellen durch postoperative Blasenspülungen ist in der Literatur hingewiesen worden ^[38].

Dieser Tatsache wurde Rechnung getragen, indem auch die Tiere der Kontrollgruppe nach 30-minütiger Implantationszeit im ersten Versuch zur Implantationsinhibition einer Blasenspülung unterzogen wurden. Durch diese Vergleichsmöglichkeit ist ein bloßer Spüleffekt jedoch als gering zu betrachten und zeigte auch im Hinblick auf die Ergebnisse des zweiten Versuchs keinen bedeutsamen Einfluss.

Die im etablierten MB49 Tumormodell von BÖHLE et al. ^[62] erreichte Tumoranwachsrate von 100% konnte mit immerhin 90% in der Kontrollgruppe im ersten Versuch zur Implantationsinhibition vergleichend erreicht werden. Durch eine Tumoranwachsrate von 90% in der Kontrollgruppe ist zwar ein möglicher Therapieeffekt durch die Blasenspülungen anzunehmen, jedoch mit relativ geringen Einfluss zu bewerten.

Im zweiten Versuch spielte die Spülung der Blasen keine wesentliche Rolle, da nach einer Implantationszeit von 24 Stunden von einem vollständigen Anwachsen der Tumorzellen ausgegangen werden konnte. Nach Einbringen der Tumorzellen durch den Katheter in die Blase der Tiere wurde der Katheter abgeklemmt und bis zum Aufwachen der Tiere belassen.

Da die Tiere sofort nach dem Erwachen die Blasen entleert haben, ist von einer mindestens 120 minütigen Implantationszeit auszugehen, was der Schlafzeit der Tiere nach Narkose entspricht ^[62].

Es zeigten 8 von 9 Tieren in der unbehandelten Gruppe einen Tumor. Diese Tumoranwachsrate kann als gleich der Tumoranwachsrate von 90% der Kontrollgruppe im ersten Versuch betrachtet werden.

4.4 Literaturvergleich

Im Rahmen des Versuchsaufbaus zum von BÖHLE et al. ^[62] optimierten und etablierten Tumormodell MB49 wird die Blasenwand vor der Instillation der Tumorzellen mittels Elektrokoagulation geschädigt. Auf diese Weise wird eine der klinischen Situation entsprechende Läsion nach TUR der Blasenwand simuliert.

In vitro Untersuchungen von PODE et al. zeigten eine wesentlich schnellere und bessere Adhäsion von Tumorzellen an die subendotheliale extrazelluläre Matrix im Vergleich zur intakten endothelialen Oberfläche ^[61].

Diese Experimente zeigten die Fähigkeit neoplastischer Zellen, auf lädierten Oberflächen zu implantieren, während intakte Oberflächen als ungeeignete Implantationsorte erschienen.

Für den ersten Versuch zur Implantationsinhibition wählte ich eine kurze Implantationszeit von 100.000 Zellen und ging davon aus, dass auf diese Weise eine klinisch entsprechende Situation post-TUR geschaffen wurde, in der trotz Spülung der Blase sich noch restliche frei flottierende viable (und somit (re-) implantationsfähige) Tumorzellen in der Blase befanden.

Die wiederholt in klinischen Studien untersuchte Strategie, unmittelbar postoperativ durch Zytostatikainstillation die Implantation und Viabilität flottierender Tumorzellen zu inhibieren führte zu eindrucksvollen Ergebnissen, welche die Effektivität einer typischen verlängerten intravesikalen Zytostatikatherapie übertraf ^[38, 68,].

So war die einmalige Instillation von Epirubicin (80 mg) unmittelbar nach der transurethralen Resektion doppelt so effektiv wie die alleinige Instillation von Wasser bezüglich der postoperativen Rezidivrate des Harnblasenkarzinoms. Es deuten einige Studien darauf hin, dass durch die nur einmalige Instillation eines Zytostatikums die Rezidivrate des oberflächlichen Blasenkarzinoms um ca. 50% gesenkt werden kann ^[38, 68, 69].

Daten vom Einsatz von Gemcitabin als intravesikales Einzeltherapeutikum in anderen Tierversuchen wurden, z.B. beim Hund (COZZI 1999 ^[70]) oder beim Schwein (WITJES et al. 2003 ^[71]) gewonnen:

COZZI et al. untersuchten 1999 ^[70] die intravesikale Gemcitabin-Instillation an Hunden, um pharmakokinetische und toxikologische Erkenntnisse für klinische Studien zu gewinnen. Insgesamt 6 Hunde bekamen Gemcitabin intravesikal verabreicht, in Dosierungen von 100mg, 350mg (entsprechend der humanen Dosierung 1000 mg/m²) und 1 g an 3 Tagen pro Woche über einen Gesamtzeitraum von 4 Wochen. Die Dosierungen 100 mg und 350 mg wurden sehr gut vertragen, typische Nebenwirkungen einer intravesikalen Zytostatika-Therapie wie Knochenmarksdepression und lokale Zellschäden an der Blaseschleimhaut, konnten dabei nicht beobachtet werden. Eine signifikante systemische Resorption wurde verzeichnet, die Plasma-Halbwertszeit im Vergleich zur intravenösen Verabreichung wurde mit 320 min (100 min bei intravenöser Applikation) angegeben. Bis zu einer Dosis von 1000 mg/m² konnte Gemcitabin nebenwirkungsarm intravesikal verabreicht werden, erst bei höheren Dosen kam es zur Knochenmarksdepression, Zystitis und gastrointestinalen Nekrosen ^[70].

Wie KILANI et al. 2002 zeigten, hat Gemcitabin eine selektive Wirkung auf Zellen einer Blasenkarzinom-Zelllinie ^[72].

Der Vorteil einer intravesikalen Anwendung von Gemcitabin scheint darin begründet, dass eine lokale Dosierung so hoch gewählt werden kann, dass Karzinomzellen in der Blase selektiv abgetötet werden, ohne dass es bei systemischer Resorption zu signifikanten Nebenwirkungen kommt (LAUFER et al. 2003 ^[31]).

4.5 Klinische Studien und bisherige (systemische) Anwendung von Gemcitabin beim Harnblasenkarzinom

In den Jahren 1998 und 2000 führten LORUSSO ^[73, 74] und auch RYAN ^[49] mit Gemcitabin Phase I/II Studien zur Therapie des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Blasenkarzinoms durch.

STADLER (1997) ^[76] und GEBBIA (1999) ^[75] zeigten die systemischen Behandlungsmöglichkeiten mit Gemcitabin beim metastasierten Urothelkarzinom auf.

Zusammenfassend zeigen die Daten der genannten Studien, so auch die von STERNBERG (2000) ^[77], dass Gemcitabin eine Option für Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasierendem Harnblasenkarzinom darstellen kann, auch bei solchen Patienten, die unter einer MVAC Chemotherapie progredient sind oder rezidiert haben. Alle Studien zeigen darüber hinaus eine niedrigere Toxizität als MVAC.

Auch Untersuchungen in Tiermodellen zeigten die Bedeutung der Tumorimplantation insbesondere beim Harnblasenkarzinom. SOLOWAY et al. simulierten die klinische Situation, indem sie die murine Harnblasenwand vor transurethraler Instillation von Blasenkarzinomzellen elektrokoagulierten ^[56]. In den traumatisierten Harnblasen entwickelten sich in 54 – 94 % Urothelkarzinome, während nur in 12 % Tumoren nachweisbar waren, wenn die Tumorzellen in nicht vorbehandelte Blasen instilliert worden waren ^[78]. In dem in der Arbeitsgruppe BÖHLE et al. optimierten Modell mit verlängerter Kontaktzeit von Tumorzellen und Blasenwand konnte regelmäßig eine Implantationsrate von 100% auch bei geringer Tumorzellzahl erzielt werden ^[62].

Ein Jahr später zeigten KILANI et al. 2002 die selektive Zelltoxizität von Gemcitabin in Blasenkarzinomzelllinien und (humanen und tierischen) Fibroblastenkulturen in vitro und untersuchten somit die Wirkung Gemcitabins für die intravesikale Therapie ^[72].

LAUFER et al. untersuchten 2003 in einer Phase I Studie und einer pharmakokinetischen Studie die maximal-tolerierte Dosis von Gemcitabin, intravesikal appliziert, die Pharmakokinetik und die Toxizität. Hierzu wurde Patienten mit einem superfizialen Harnblasenkrebs nach kompletter transurethraler Resektion der Blasenschleimhaut 2 bis 4 Wochen nach dem invasiven Eingriff Gemcitabin intravesikal verabreicht ^[3].

Bei einer jeweiligen Blasenverweildauer von 2 Stunden (120 min) wurde Gemcitabin einmal pro Woche über einen Zeitraum von insgesamt 6 Wochen intravesikal angewandt. Es konnte festgestellt werden, dass

- a) Gemcitabin gut verträglich ist bis zu einer Dosierung von 2 g/Woche
- b) sich für die intravesikale Anwendung beim superfizialen Karzinom der Harnblase gut eignet, da Gemcitabin nur minimal systemisch absorbiert wird und somit eine niedrige Toxizität bei geringen Nebenwirkungen zeigt ^[3].

Basierend auf Single-Agent-Studien mit Gemcitabin wurde von mehreren Autoren die gute Verträglichkeit und die hohe Anti-Tumor-Aktivität bei niedriger Dosierung (bis 1000 mg/m² i.v. wöchentlich) bestätigt ^[70, 75, 76].

Eine große randomisierte Multicenterstudie wurde im Jahr 2000 von VON DER MAASE et al. angelegt, um die Kombination von Gemcitabin und Cisplatin (GC) mit dem Standard MVAC bei Patienten mit fortgeschrittenem Blasenkarzinom zu vergleichen ^[79]. Die Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin wurde als erfolgreicher im Hinblick auf Nutzen/Risiko/Abwägung beurteilt und von den Patienten als tolerierbarer als die MVAC Therapie empfunden. In dieser Phase III Studie erlitten mehr Patienten, welche das MVAC Schema erhielten, schwere Nebenwirkungen wie Transfusionspflichtigkeit bedingt durch Anämie, Neutropenie, neutropenische Sepsis, febrile Neutropenie und systemische Infektionen als Patienten, welche mit der Gemcitabin-Cisplatin Kombination behandelt wurden (es wurde mit Gemcitabin 1000mg/m² an den Tagen 1, 8, 15 und Cisplatin 70 mg/m² an Tag 2 oder MVAC alle 28 Tage verabreicht).

In Bezug zu der großen Phase III Studie von VON DER MAASE (2000) ^[79] wurden mehrere Phase II mit der Gemcitabine-Cisplatin Kombination durchgeführt (LORUSSO, 2000 und zuvor 1999 VON DER MAASE und auch MOORE) ^[73, 80, 81]. Der Nutzen von Gemcitabin gegenüber anderen Zytostatika-Kombinationen wurde in allen Studien ähnlich bewertet: Im Schnitt konnte Gemcitabin so niedrig dosiert werden, dass das Auftreten von sowohl schweren therapielimitierenden, als auch von subjektiv empfundenen (Übelkeit, Unwohlsein, „Fatigue-Syndrom“) Nebenwirkungen gesenkt werden konnte, bei vergleichbar guter Anti-Tumor-Aktivität (MOOR 1997) ^[82].

Die bisher beschriebenen Ergebnisse in vorangegangenen Studien und die dabei erkannten Vorzüge von Gemcitabin bei der Behandlung von Urothelkarzinomen, nämlich die gute Verträglichkeit durch geringe Dosierung bei weiterhin guter Anti-Tumor-Aktivität, insbesondere im Vergleich als Kombinationspartner von Cisplatin gegenüber dem MVAC Schema (ALBERS, 2000) ^[83] jedoch ebenso als Einzeltherapeutikum eingesetzt, konnte in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls bestätigt werden.

4.6 Ausblick

Die Ergebnisse in dieser Untersuchung legen die Wirksamkeit von intravesikal angewandtem Gemcitabin bei Tumorfrühstadien dar, insbesondere beim CIS der Harnblase. Die Standardtherapie bei CIS der Blase ist die intravesikale Applikation von BCG nach TUR (LIBRENJAK, 2003 ^[86] und GEE, 2002 ^[87]) (siehe auch im Abschnitt EINLEITUNG). Diese Therapieform ist jedoch von einer hohen Nebenwirkungsrate behaftet. Aufgrund der hier dargestellten Wirkung von Gemcitabin lässt sich durch die Inhibition der Tumorzellimplantation eine gute Therapieoption erwarten.

Ein klinisches Problem bei der Anwendung intravesikal verabreichter Zytostatika ist die starke Blutung post-TUR und der damit verbundene rein mechanische Spüleffekt, der auch das Zytostatikum schnell aus der Blase spült. Für eine ideale Wirkung müsste der Therapeut die Blase des operierten Patienten für ca. 2 Stunden abklemmen ^[3, 4, 5]. Dies ist im klinischen Alltag schwer durchführbar, da dieses aufgrund der Schmerzhaftigkeit vom Patienten über eine lange Zeitspanne nicht toleriert wird.

Gemcitabin hat in den vorliegenden Tierversuchen eine gute Wirkung gezeigt, wenn es bei hoher Dosierung für 30 min in der Blase belassen wird. Ein Abklemmen des Blasenkatheters am Patienten für ca. 30 min ist klinisch leicht durchführbar und kann vom Patienten toleriert werden.

Gemcitabin könnte so den Effekt auf Rest-Tumorzellen nach TUR in der Blase innerhalb von 30 min in einem klinisch durchführbaren Setting bewirken.

Ebenso können die Ergebnisse für weitere klinische Studien (sowohl zur Rezidivprophylaxe als auch für die intravesikale Therapie einer Tumorfrühform) Anstoß geben.

V ZUSAMMENFASSUNG

Im Vergleich mit der Literatur ist aufgrund der gesammelten und interpretierten Ergebnisse festzustellen, dass Gemcitabin ein potentes Zytostatikum in der intravesikalen Therapie des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms ist. Dies gilt sowohl für die postoperative (TUR-B) Anwendung zur Implantationsinhibition, als auch für die Behandlung eines frühen Tumors des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms.

Vor dem Hintergrund der bisher etablierten Therapieformen und Therapiemöglichkeiten des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms sowie dem erläuterten Potential des Zytostatikums Gemcitabin, wurden folgende Fragestellungen entwickelt:

- 1) Wirkt Gemcitabin als sogenanntes single shot Therapeutikum in Form einer intravesikale Einmalinstillation zur Rezidivprophylaxe beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom direkt nach TUR der Blase aufgrund seines Wirkmechanismus besser und schneller als andere bereits etablierte Zytostatika?

Als eindeutig wirksam im Sinne einer Implantationsinhibition von freien Tumorzellen nach TUR-B erwies sich die intravesikale Einmalinstillation von Gemcitabin im Tierversuch. Die hohe Dosierung (10 mg/ml) bei mittellanger Einwirkzeit von 30 min erwies sich dabei als die effektivste Kombination aus Verweildauer in der Blase und Dosierung des Medikaments.

- 2) Kann Gemcitabin als alleiniges Therapeutikum aufgrund seines Wirkmechanismus besser und schneller als andere bereits etablierte Zytostatika bei Tumorfrühformen des Harnblasenkarzinoms eingesetzt werden?

Als wirksam erwies sich die intravesikale Applikation von Gemcitabin als Monotherapeutikum zur Behandlung einer Tumorfrühform des Harnblasenkarzinoms, welches in dieser Untersuchung durch eine Implantationszeit von 24h von Tumorzellen der Zelllinie MB49, induzierten wurde.

Ich konnte zeigen, dass sich Gemcitabin sehr gut zur intravesikalen Monotherapie einer Tumorfrühform des Harnblasenkarzinoms eignet.

In den Therapiegruppen mit einer Verweilzeit von 120 min in der Blase und einer Dosierung von 5 mg/ml, sowie bei der Kombination von 30 min bzw. 120 min und bei einer Dosierung von 10 mg/ml konnten die meisten tumorfreien Tiere gezählt werden.

Schlussfolgerung und klinischer Nutzen

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können dazu ermutigen, Gemcitabin als wirksames Therapeutikum bei guter Verträglichkeit in einem klinisch leicht durchführbaren Therapieschema zur der Behandlung des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms zu etablieren, insbesondere zur Implantationsinhibition in Form einer Single-Shot Therapie.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Das Krebsregister für Schleswig Holstein**
www.krebsregister-sh.de
2003
- [2] **Gemcitabine plus Epi-doxorubicin as first-line chemotherapy for bladder cancer in advanced or metastatic stage: a phase II**
Neri, B., Doni, L., Fulignati, C., Gemelli, M.T., Turrini, M., Di, Cello, V, Dominici, A., Motolla, A., Raugei, A., Ponchiatti, R., and Cini, G.
AntiCancer Research 22, 2981-2984; 2002
- [3] **Intravesical gemcitabine therapy for superficial transitional cell carcinoma of the bladder: a phase I and pharmakokinetic study**
Laufer, M., Ramalingam, S., Schoenberg, M.P., Haisfield-Wolf, M.E., Zuhowski, E.G., Trueheart, I.N., Eisenberger, M.A., Nativ, O., and Ergolin, M.J.
J.Clin.Oncol. 21, 697-703; 2003
- [4] **Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms.**
DGU im Auftrag der Deutschen Krebsgesellschaft.
Nummer 37, 440-457; 1998
- [5] **AWMF Leitlinien**
Interdisziplinäre kurzgefasste Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Urologie.
Leitlinienregisternummer 032-038; 2002
- [6] **Die Daten des Krebsregisters. Krebsinzidenzschätzungen für Deutschland.**
Robert Koch Institut
www.rki.de/servlet/deutrends
1998
- [7] **Pathologie**
Böcker / Denk / Heitz
Urban & Schwarzenberg, 2. Auflage, 163-210; 2001
- [8] **Interdisziplinäres Tumorzentrum der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**
Empfehlungen zu Diagnose, Therapie und Nachsorge
Bichler et al.
2001
- [9] **Distributions of p53 codon 72 polymorphism in bladder cancer – proline form is prominent in invasive tumor**
Chen, W.C., Tsai, F.J., Wu, J.Y., Wu, H.C., Lu, H.F., and Li, C.W.
UrolResearch 28, 293-296; 2000
- [10] **Über Blasentumoren bei Fuchsinarbeitern.**
Rehn, L.
Arch.Kind.Chir. 50, 588; 1895
- [11] **Harnblasenkarzinome**
Rübben H. und Otto, T.
In: Rübben, Uro-Onkologie, Springer Verlag, 79-147; 1993

- [12] **Pathologie der ableitenden Harnwege und der Prostata.**
Helpap, B.
Springer Verlag, 1989
- [13] **An international study of smoking and bladder cancer**
Morrison, A.S., Buring, J.E., Verhoek, W.G., Aoki, K., Leck, I., Ohno, Y. and Obata, K.
J.Urol. 131, 650-654; 1984
- [14] **Cigar, pipe, and cigarette smoking and bladder cancer risk in European men**
Pitard, A., Brennan, P., Clavel, J., Greiser, E., Lopez-Abente, G., Chang-Claude, J., Wahrendorf, J., Serra, C., Kogevinas, M., and Boffetta, P.
Cancer Causes Control 12, 551-556: 2001
- [15] **Ethiopathology, risk factors, environmental influences and epidemiology of bladder cancer**
Kalbe, T.
Urologe A 40, 447-450; 2001
- [16] **Maligne Tumoren der Harnblase**
Jocham, D.
In: Jocham/Miller: Praxis der Urologie, Thieme Verlag, 49-115; 1994
- [17] **Harnblasenkarzinom.**
Block, T., Kriegmair, M., Schmeller, N.
Tumorzentrum München, Urologische Klinik und Poliklinik Grosshadern, Klinikum der Universität München.
2. Auflage, 1997
- [18] **Bladder cancer clinical guidelines panel summary report on the management of nonmuscle invasive bladder cancer**
Smith, J.A., Jr., Labasky, R.F., Cockett, A.T., Fracchia, J.A., Montie, J.E. and Rowland, R.G.
J.Urol. 162, 1697-1701; 1999
- [19] **Das Harnblasenkarzinom. Diagnostik, organerhaltende Therapie, Rezidivprophylaxe.**
Böhle, A.
Urologe B 37, 400-413; 1997
- [20] **The natural history of papillary transitional cell carcinoma of the bladder and its treatment in an unselected population of the basis of histologic grading**
Gilbert, H.A., Logan, J.L., Kagan, A.R., Friedman, H.A., Cove, J.K., Fox, M., Muldoon, T.M., Lonni, Y.W., Rowe, J.H., Cooper, J.F., Nussbaum, H., Chan, P., Rao, A. and Starr, A.
J.Urol. 119, 488-492, 2003-12-21
- [21] **UICC TNM Classification of malignant tumors.**
Hermanek, P. and Sobin, L.H.
Springer Verlag, 2002

- [22] **[pT1G3 bladder carcinoma: Our experience] – Carcinoma vesicale pT1G3: nostra esperienza**
Dell’Orto, P., Trinchieri, A., D’Addezio, F., Bernardini, P., Mangiarotti, B., Del Nero, A. and Pisani, E.
 Arch.Ital.Urol.Androl 68, 9-11; 1996
- [23] **Grading in superficial bladder cancer. Morphological criteria.**
Pauwels, R.P., Schapers, R.F., Smeets, A.W., Debruyne, F.M. and Geraedts, J.P.
 Br.J.Urol. 61, 129-134; 1998
- [24] **Cystectomy: The treatment of choice in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder**
Jakse, G., Putz, A. and Feichtinger, J.
 Eur.J.Surg.Oncol. 15, 211-216; 1989
- [25] **Prognostic parameters in superficial bladder cancer: An analysis of 315 cases**
Lutzeyer, W., Rübben, H. and Dahm, H.
 2001
- [26] **Long term follow-up of superficial invasive bladder carcinoma with or without concomitant epithelia atypia—recurrence and progression**
Ziegler, K., Olsen, P.R., Wolf, H. and Hojgaard, K.
 Scand.J.Urol.Nephrol., 52-59; 2002
- [27] **Fortschritte der transurethralen Elektresektion des Harnblasenkarzinoms**
Bichler, K.H., Harzmann, R., Flüchter, S.H., Ergin, M.T.
 2001
- [28] **[Treatment of superficial transitional cell bladder carcinoma. Long-term results of trial comparing transurethral resection alone and adjuvant chemotherapy with Doxorubicin]**
“Pavirsiniu slapimo pusles pereinamojo epitelio lasteliu naviku gydymas (...)”
Milonas, D., Mickevicius, J., Mickevicius, R., Motiejunas, A., Sukys, D. and Gudinavience, I.
 Medicina (Kaunas.) 38 Suppl 1, 79-83; 2002
- [29] **Newly diagnosed bladder cancer: The relationship of initial symptoms, degree of microhematuria and tumor marker status**
Boman, H., Hedelin, H., Jacobsson, S. and Holmang, S.
 J.Urol. 168, 1955-1959; 2002
- [30] **Urologie: Verstehen – Lernen – Anwenden.**
Sökeland, J. et al.
 Thieme Verlag, 12. Auflage, 267-269; 2002
- [31] **Prospective randomized study of adjuvant therapy after complete resection of superficial bladder cancer. Mitomycin C vs. BCG Connaught vs. TUR alone.**
Rübben, H., Graf Dobberstein, C., Ostwald, R. et al.
 In: deKernion J.B.: Immunotherapy of urologic tumors, 27-36.
 Churchill Livingstone, New York, 1990
- [32] **Radical cystectomy – often too late?**
Stöcle, M., Alken, P., Engelmann, U. et al.
 Eur.Urol. 13, 361-367; 1987

- [33] **Intravesical therapy of superficial bladder cancer**
Melekos, M.D. and Moutzouris, G.D.
 Curr.Pharm.Des 6, 345-359; 2000
- [34] **A randomized prospective study comparing long-term intravesical instillations of Mitomycin C and BCG in patients with superficial bladder carcinoma**
Lundholm, C., Norlen, B.J., Ekman, P., Jahnsen, S., Lagerkvist, M., Lindeborg, T., Olsson, J.L., Tveter, K., Wikstrom, H., Westberg, R. and Malmstrom, P.U.
 J.Urol. 156, 372-376; 1996
- [35] **Die intravesikale Immuntherapie mit BCG. Fakten, Vergleiche, Ergebnisse.**
Böhle, A. und Jocham, D.
 Gustav Fischer Verlag, 1988
- [36] **Intravesical BCG vs. Mitomycin C for superficial bladder cancer: A formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity.**
Böhle, A., Jocham, D. and Bock, P.R.
 J.Urol. 169, 90-95; 2003
- [37] **Treatment of superficial bladder tumors: Achievements and needs. The EORTC Genitourinary Group.**
Kurth, K.H., Bouffieux, C., Sylvester, R., van der Meijden, A.P., Oosterlinck, W. and Brausi, M.
 Eur.Urol. 37, Suppl 3, 1-9; 2000
- [38] **A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomised trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of Epirubicin or water in a single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder**
Oosterlinck, W., Kurth, K.H., Schroder, F., Bultinck, J., Hammond, B and Sylvester, R.
 J.Urol. 149, 749-752; 1993
- [39] **Intravesical Epirubicin treatment following TUR in superficial bladder tumours**
Imamoglu, M.A., Bakirtas, H., Yigitbasi, O., Ersoy, H. and Sertcelik, A.N.
 Srch.Esp.Urol. 54, 1147-1153; 2001
- [40] **The present and future of combination chemotherapy in bladder cancer**
Culine, S.
 Semin.Onkol. 29, 32-39; 2002
- [41] **Pharmakologie und Toxikologie.**
Lüllmann, H., Mohr, K.
 Georg Thieme Verlag, 14. Auflage, 1999
- [42] **Preclinical studies of gemcitabine and trastuzumab in breast and lung cancer cells**
Hirsch, F.R., Helfrich, B., Franklin, W.A., Varella-Garcia, M., Chan, D.C. and Bunn, P.A., Jr.
 Clin.BreastCancer, 3 Suppl 1, 12-12; 2002

- [43] **Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes.**
Shi, X., Liu, S., Kleeff, J., Friess, H. and Buchler, M.W.
Oncology 62, 354-362; 2002
- [44] **Expression of a non-functional p53 affects the sensitivity of cancer cells to gemcitabine**
Galmari, C.M., Clarke, M.L., Falette, N., Puisieux, A., Mackey, J.R. and Dumontet, C.
Int.J.Cancer 97, 439-445; 2002
- [45] **A systemic overview of chemotherapy effects in urothelial bladder cancer**
Nilsson, S., Ragnhammar, P., Glimelius, B. and Nygren, P.
Acta Oncol. 40, 371-390; 2001
- [46] **Neoadjuvant chemotherapy with sequential methotrexate and 5-fluorouracil scheduling, Epirubicin and cisplatin for locally advanced bladder cancer**
Nishiyama, T., Tanikawa, T., Tomita, Y. and Takahasi, K.
Oncology 63, 1-5; 2002
- [47] **Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand mediated apoptosis by cisplatin and carboplatin**
Mizutani, Y., Nakao, M., Ogawa, O., Yoshida, O., Bonavida, B. and Miki, T.
J.Urol. 165, 263-270; 2001
- [48] **Comparative study of sequential combinations of paclitaxel and methotrexate on a human bladder cancer cell line**
Cos, J., Bellmunt, J., Soler, C., Ribas, A., Lluís, J.M., Murio, J.E. and Margarit, C.
Cancer Invest 18, 429-435; 2000
- [49] **Gemcitabine in the treatment of bladder cancer**
Ryan, C.W. and Vogelzang, N.J.
Expert.Opin.Pharmacother.1, 547-553; 2000
- [50] **[Bladder cancer chemotherapy practice study]**
Etude de pratique de la chimiothérapie dans le cancer de vessie
Clippe, C., Clippe, S., Yzebe, D., Flechon, A. and Droz, J.P.
Prog.Urol. 12, 609-614; 2002
- [51] **DNA ploidy and S-phase fraction as predictive factors of response and outcome following neoadjuvant methotrexate, vinblastine, epirubicin and cisplatin (M-VEC) chemotherapy for invasive bladder cancer**
Turkolmez, K., Baltaci, S., Beduk, Y., Muftuoglu, Y.Z. and Gogus, O.
Scand.J.Urol.Nephrol. 36, 46-51; 2002
- [52] **Current and future perspectives in advanced bladder cancer: Is there a new standard?**
von der Maase, H.
Semin.Oncol. 29, 3-14; 2002

- [53] **Epirubicin: A review of its intravesical use in superficial bladder cancer**
Onrust, S.V., Wiseman, L.R. and Goa, K.L.
 Drugs Aging 15, 307-333; 1999
- [54] **Treatment of metastatic urothelial cancer in the post MVAC era**
Cohen, E.E. and Stadler, W.M.
 Worl J.Urol. 19, 126-132; 2001
- [55] **Analysis of prognostic factors related to primary superficial bladder cancer tumor recurrence in prophylactic intravesical Epirubicin therapy**
Kondo, T., Onitsuka, S., Ryoji, O., Kihara, T., Goto, Y., Satoh, T., Nakazawa, H. and Toma, H.
 Int.J.Urol. 6, 178-183; 1999
- [56] **Diagnosis and management of superficial bladder cancer**
Soloway, M.S.
 Semin.Surg.Oncol. 5, 247-254; 1989
- [57] **Nonpapillary carcinoma in situ and atypical hyperplasia in cancerous bladders: Further studies of surgically removed bladders by mapping**
Koss, L.G., Nakanishi, I. and Freed, S.Z.
 Urology, 442-455; 1977
- [58] **Bladder cancer as seen in giant histologic sections**
Soto, E.A., Friedell, G.H. and Tiltman, A.J.
 Cancer, 447-455; 1977
- [59] **Site of bladder-tumor recurrence**
Boyd, P.J. and Burnand, K.G.
 Lancet, 1290-1292; 1974
- [60] **Performance characteristics of multiple urinary tumor markers and sample collection techniques in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder**
Bhuiyan, J., Akhter, J. and O’Kane, D.J.
 Clin.Chim.Acta, 69-77; 2003
- [61] **The mechanism of human bladder tumor implantation in an in vitro model**
Pode, D., Alon, Y., Horowitz, A.T., Vlodaysky, I. and Biran, S.
 J.Urol., 482-486; 1986
- [62] **Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49)**
Günther, J.H., Jurczok, A., Wulf, T., Brandau, S., Deinert, I., Jocham, D. and Böhle, A.
 Cancer Research, 2864-2837; 1999
- [63] **Optimal treatment of systemic bacillus Calmette-Guerin infection: Investigations in an animal model**
Durek, C., Jurczok, A., Werner, H., Jocham, D. and Böhle, A.
 J.Urol., 826-831; 2002

- [64] **Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium in vitro.**
Summerhayes, I.C. and Franks, L.M.
 J.Natl.CancerInst 62, 1017-1023; 1979
- [65] **Intravesical and systemic chemotherapy for primary murine bladder cancer**
Soloway, M. et al.
 Cancer Research 37, 2918-2929; 1977
- [66] **Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere**
Jung, Siegfried
 Gustav Fischer Verlag, S. 241, Abb. 193; 1962
- [67] **Inhibition of bladder carcinoma cell adhesion by oligopeptide combinations in vitro and in vivo**
Böhle, A., Jurczok, A., Ardelt, P., Wulf, T., Ulmer, A.J., Jocham, D. and Brandau, S.
 J.Urol. 167 (1), 357-363; 2002
- [68] **Single dose intravesical Thiotepa as an adjuvant to cystodiathermy in the treatment of transitional cell carcinoma**
Burnand, K.G. et al.
 Br.J.Urol. 48.1, 55-59; 1976
- [69] **Perioperative single dose instillation of Epirubicin or interferon alpha after transurethral resection for the prophylaxis of primary superficial bladder cancer recurrence: A prospective randomised multicenter study – FinnBladder III long term results**
Rajala, P. et al.
 J.Urol. 168.3, 981-985; 2002
- [70] **Toxicology and pharmacokinetics of intravesical gemcitabine: A preclinical study in dogs**
Cozzi, P.J., Bajorin, D.F., Tong, W., Nguyen, H., Scott, J., Heston, W.D. and Dalbagni, G.
 Clin Cancer Res, 5(9), 2629-2637; 1999
- [71] **Pharmacokinetics of intravesical Gemcitabin: A preclinical study in pigs**
 [in progress citation]
Witjes, J.A. et al.
 Eur Urol 44(5), 615-619; 2003
- [72] **Selective cytotoxicity of gemcitabine in bladder cancer cell lines**
Kilani, R.T. et al.
 Anticancer Drugs 13.6, 557-566; 2002
- [73] **Gemcitabine plus cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urinary tract: A phase II multicenter trial**
Lorusso, V. et al.
 J.Urol. 164.1, 53-56; 2000

- [74] **A phase II study of gemcitabine in patients with transitional cell carcinoma of the urinary tract previously treated with platinum. Italian co-operative Group on Bladder Cancer**
Lorusso, V. et al.
Eur.J.Cancer 34.8, 1208-1212; 1998
- [75] **Single agent 2',2'-difluorodeoxycytidine in treatment of metastatic urothelial carcinoma: A phase II study**
Gebbia, V. et al.
Clin.Ter. 150.1, 11-15; 1999
- [76] **Phase II study of single agent gemcitabine in previously untreated patients with metastatic urothelial cancer**
Stadler, W.M. et al.
J.Clin.Oncol. 15.11, 3394-3398; 1997
- [77] **Gemcitabine in bladder cancer**
Sternberg, C.N.
Semin.Oncol. 27.1, 31-39; 2000
- [78] **Technical factors affecting the reproducibility of intravesical mouse bladder tumor implantation during therapy with BCG**
Shapiro, A. et al.
Cancer Research 44.7, 3051-3054; 1984
- [79] **Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: Results of a large, randomized, multinational, multicenter phase III study**
von der Maase, H., Hansen, S., Roberts, T. et al.
J.Clin.Oncol. 17, 3068-3077; 2000
- [80] **Weekly gemcitabine and cisplatin combination therapy in patients with transitional cell carcinoma of the urothelium: A phase II clinical trial**
von der Maase, H., Andersen, L., Crino, L. et al.
Ann Oncol 10, 1461-1465; 1999
- [81] **Gemcitabine plus cisplatin, an active regimen in advanced urothelial cancer: A phase II trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group**
Moore, M.J., Winkvist, E.W., Murray, N. et al.
J Clin Oncol 17, 2876-2881; 1999
- [82] **Gemcitabine: A promising new agent in the treatment of advanced urothelial cancer**
Moore, M.J., Tannok, I.F., Ernst, D.S. et al.
J Clin Oncol 15, 3441-3445; 1997
- [83] **Gemcitabine monotherapy as 2nd line treatment in cisplatin refractory transitional cell carcinoma**
Albers, P., Siener, R., Perabo, F. et al.
Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol 19, A1360; 2000

- [84] **[Gemcitabine: A new chemotherapy agent for solid cancers]**
La gemcitabine: un nouvel agent pour la chimiothérapie des cancers solides
Klastersky, J. and Awada, A.
Rev Med Brux 18, 328-334; 1997
- [85] **Gemcitabine containing regimens in bladder cancer: A new standard of care.**
von der Maase, H.
SeminOncol 28, 1-3; 2001
- [86] **Imunoprophylactic intravesical application of bacillus Calmette-Guerin after transurethral resection of superficial bladder cancer**
Librenjak, D., Situm, M., Eterovic, D., Dogas, Z. and Gotovac, J.
Croat.Med.J. 44, 187-192; 2003
- [87] **Chemoprevention of superficial bladder cancer**
Gee, J., Sabichi, A.L. and Grossmann, H.B.
Crit Rev Oncol Hematol 43, 277-286; 2002
- [88] **Effects of local bacillus Calmette-Guérin therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall.**
Böhle A., Gerdes J., Ulmer AJ, Hofstetter AJ and Flad HD
J Urol.; 144 (1); 53-8; 1990

VII ABKÜRZUNGEN

BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CFU	Colony Forming Units (Kolonie Bildende Einheit, KBE)
CIS	Carcinoma In Situ
CT	Computer Tomographie
CTP	Cytosin Tri Phosphat
dCTP	2-(di)-Cytosin-3-(tri)-Phosphat
dFdC	2-(di)-Flour-2-(di)-Cytosin
dFdCDP	2-(di)-Flour-2-(di)-Cytosin-2-(di)-Phosphat
dFdCTP	2-(di)-Flour-2-(di)- Cytosin-3-(tri)-Phosphat
dFdU	2-(di)-Flour-2-(di)-Uracil
DGU	Deutsche Gesellschaft für Urologie
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DNA	DeoxyriboNucleotid Acid (Desoxyribonucleinsäure, DNS)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FKS	fetales Kälberserum
G	Differenzierungsgrad eines Tumors
GEM	Gemcitabin, Gemzar®
G-Phase	Gap (Lücke)- Phase des Zellzyklus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; "Good" buffer; HEPES, Free Acid
I.E.	internationale Einheiten

MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MVAC	Methotrexat Vinblastin Adriamycin Cisplatin
MVEC	Methotrexat Vinblastin Epirubin Cisplatin
MW	Mittelwert
MW	Molecular Weight (molekulares Gewicht)
PBS	phosphate buffered saline
RIVM	BCG-Stamm aus dem Reihgs Institute voor Medizin (Niederlande)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure, RNS)
SD	Standardabweichung
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
TNM	Tumor Nodes Metastases
pTNM	(histo-)pathologisch bestimmtes TNM
TUR	Transurethrale Resektion
TUR-B	Transurethrale Resektion (Blase)
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
U/ml	Units (Einheiten) per/pro Milliliter

VIII DANKSAGUNG

Frau Kirsten Brudereck, geb. Sellmann, aus der Urologischen Klinik der Universität Lübeck danke ich sehr für die Präparation der Tumorzellen, die Herstellung der Kulturmedien (PBS und HEPES) und für die Hilfe bei der mikroskopischen Fotografie.

Herrn PD Dr. med. Stefan Krüger vom Institut für Pathologie der Universität Lübeck möchte ich herzlich danken für die Herstellung der histologischen Schnitte der Präparate, sowie für die Hilfe bei der Befundung der Schnitte.

Herrn Dr. med. Andreas Jurczok (ehemals Facharzt für Urologie in der Klinik für Urologie in Lübeck) und Frau Caroline Blietz (Assistenzärztin der Urologischen Klinik der Universität Lübeck) danke ich für die Betreuung und Hilfe im Labor und für die gesamte Unterstützung während der Arbeit im Tierlabor, der Auswertung der Daten und dem Erstellen dieser Dissertation.

Ich danke Herrn Dr. med. Christoph Durek und Herrn Dr. med. Hartwig Büttner, ehemals Oberärzte der Urologischen Klinik der Universität Lübeck, für die Betreuung und Hilfe bei der Planung des Gesamtprojektes, der Auswertung der Daten und Erstellung dieser Dissertation.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. med. Andreas Böhle, ehemals leitender Oberarzt der Urologischen Klinik der Universität Lübeck, für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit, seinen Rat und seine Unterstützung und die Möglichkeit, die Ergebnisse dieser Untersuchung als Erstautor publizieren zu können.

Der größte Dank geht an meine Eltern!

IX LEBENS LAUF

Name

CARSTEN PHILIPP BROCKS

Geburtsdatum und Ort

03. Oktober 1975 in Bergisch Gladbach

Familienstand

ledig



Schulbildung

1982-1986	Grundschule GGS Bergisch Gladbach - Moitzfeld
1986-1987	Albertus Magnus Gymnasium (AMG), Bensberg
1987-1995	Walddörfer Gymnasium (WDG) Hamburg – Volksdorf
1995	Abitur
1995-1998	Ausbildung zum Krankenpfleger am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), Abschluss mit dem Examen

Hochschulbildung

1998-2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg (vorklinischer Studienabschnitt)
2000	Ärztliche Vorprüfung
seit 2000	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck (klinischer Studienabschnitt)
5/2001	Beginn der Promotionsarbeit in der Urologischen Klinik der Universität Lübeck unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Andreas Böhle. Beendigung des experimentellen Teils 10/2002. Mitarbeit an verschiedenen Projekten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. A. Böhle.
2001	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)
2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)
2003-2004	Praktisches Jahr (PJ) in Lübeck (Chirurgie), in Olten, Schweiz (Innere Medizin) und in Lübeck (Wahlfach Hals- Nasen-Ohren Heilkunde).
Oktober 2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)
25. Oktober 2004	Approbation als Arzt
seit November 2004	tätig als Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

X PUBLIKATIONEN

1. Poster-Publikationen

Effektivität von Ki-67 Antisense-Oligonukleotiden im orthotopen Nierenkarzinom – Modell.

[Ingo Kausch, Carsten Brocks et al.], *VNU-Kongress in Hamburg, 2003*

Bladder cancer Early-State treatment with Gemcitabine in the orthotopic murine tumor-model MB49.

[Brocks C, Büttner H, Durek C, Blietz C, Böhle A], *expu 2004, Kongress in Lübeck, 2004*

Intravesikale Gemcitabin – Instillation im orthotopen murinen Tumormodel MB49: Hoch effektive Inhibition der Tumorzellimplantation.

[Brocks C, Büttner H, Durek C, Blietz C, Böhle A], *dgu 2004, Kongress in Wiesbaden, 2004*

2. Paper-Publikationen

Ki-67-directed antisense therapy in an orthotopic renal cell carcinoma model [In Process Citation].

[Kausch I; Jiang H; Brocks C; Bruderek K; Kruger S; Sczakiel G; Jocham D; Bohle A] *Eur Urol 2004 Jul;46(1):118-25 (ISSN: 0302-2838).*

Intravesical gemcitabine for the treatment of superficial bladder cancer in the orthotopic mouse model MB49

[Brocks C et al.]

- 1) *Der Urologe A*, September 2004
- 2) Submitted to *Journal of Urology*