

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

**Modulation der Tumorzelladhäsion beim Blasenkarzinom durch
Oligopeptide: Untersuchungen am orthotopen murinen
Harnblasenkarzinommodell**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Tina Maghsoudi
aus Lübeck

Lübeck 2007

1. Berichterstatter : Professor Dr. med. Andreas Böhle

2. Berichterstatter/-in : Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Krüger

Tag der mündlichen Prüfung : 14.04.2008

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 14.04.2008

Gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	
1.1	Das Harnblasenkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	1
1.1.3	Pathologie, Stadieneinteilung und Prognose	2
1.1.4	Symptome und Diagnose	5
1.1.5	Therapie des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms	6
1.2	Molekularbiologischer Hintergrund	6
1.2.1	Die Extrazelluläre Matrix	7
1.2.2	Kollagen	7
1.2.3	Laminin	8
1.2.4	Fibronectin	8
1.2.5	Fibrinogen	9
1.2.6	Integrine	9
II	Fragestellung	14
III	Material und Methoden	15
	Material	
3.1	Orthotopes Tumormodel	15
3.2	Sonstige Geräte, Materialien und Hilfsmittel	17
3.3	Medikamente	18
3.3.1	Diethylether	18
3.3.2	Natrium-Pentobarbital	18
3.4	Instillationstherapeutika	19
3.4.1	PBS	19
3.4.2	Purisole	19
3.4.3	Oligopeptide	19
	Methoden	
3.5	Anästhesie	22
3.6	Rasur	23
3.7	Kennzeichnung der Tiere	23
3.8	Katheterisierung	24
3.9	Elektrokoagulation	25
3.10	Instillation	25
3.11	Gruppeneinteilung	25
3.12	Opferung der Mäuse	27
3.13	Sektion	27
3.14	Histologie	28
3.15	Statistik	28

IV	Ergebnisse	29
V	Diskussion	41
VI	Zusammenfassung	45
VII	Literaturverzeichnis	46
VIII	Danksagungen	56
IX	Lebenslauf	57
X	Veröffentlichungen	59

Abkürzungen

BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CIS	Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle medium
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	fetales Kälberserum
G	Gauge
IE	internationale Einheiten
PBS	phosphate buffered saline/ phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
TNM	Tumor nodes metastases
TUR	transurethrale Resektion
UICC	Union internationale contre le cancer

I Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Maligne Neoplasien der Harnblase stehen bezüglich der Häufigkeit von Tumorleiden bei Männern an vierter, bei Frauen an sechster Stelle. Nach dem Prostatakarzinom ist das Harnblasenkarzinom der zweithäufigste Tumor des Urogenitalsystems (34). Derzeit sind etwa 6,27 % aller Krebstodesfälle in Deutschland auf das Harnblasenkarzinom zurückzuführen. Die Krebsinzidenzschätzung des ROBERT KOCH INSTITUTES liegt für das Jahr 2000 bei 435,1 Männern und 322,7 Frauen auf 100000 Einwohnern (61). Für das Harnblasenkarzinom liegt die Krebsinzidenzschätzung bei 38,4 Männern und 10,5 Frauen. Hieraus ergibt sich ein deutlich höheres Risiko für Männer an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken (65). Weniger als 20% der Erkrankungsfälle bei Männern und 10-15% der Fälle bei Frauen treten vor Erreichen des 60. Lebensjahres auf. Die altersspezifische Mortalitätsrate für das Harnblasenkarzinom verdoppelt sich bei Männern ab dem 60. Lebensjahr zu dem vorausgegangenen 5-Jahres-Zeitraum und liegt für 80-84 jährige bei 125,79 pro 100000 Einwohnern.

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Das Urothelkarzinom der Harnblase gilt als Umweltkrebs, karzinogene Substanzen sind ubiquitär verbreitet. HELPAW unterscheidet zwischen exogenen Karzinogenen (aromatische Amine, phenacetinhaltige Medikamente, Nikotin, Koffein, Opium, Zytostatika), endogenen Karzinogenen (Tryptophanmetabolite, Nitrosamine) sowie einer Tumorentstehung durch Entzündungen (Blasenkonkremente, Parasiten) (23). Bereits Ende des 19. Jahrhunderts beschrieb REHN die Häufung von Blasentumoren bei Chemikararbeitern, die Anilinfarbstoffen ausgesetzt waren (59). Heute gelten insbesondere aromatische Amine als typische Blasenkarzinogene (65). 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 (44).

Außerdem scheinen geographische Unterschiede sowie ethnische Zugehörigkeit bezüglich der Häufigkeit von Harnblasenkarzinomen eine Rolle zu spielen. Anstelle einer einzigen kausalen Noxe

muß von einem multifaktoriellen Geschehen im Sinne einer Plurikarzinogenese ausgegangen werden (34) .

1.1.3 Pathologie, Stadieneinteilung und Prognose

Die epithelialen Tumoren stellen mit 96 % den Hauptteil der Harnwegstumoren dar. Von diesen steht mit 95% das Urothelkarzinom im Vordergrund. Platten- und Adenokarzinome sind selten. Sie bilden einen Anteil von 3% bzw. 2%. Auf das Carcinoma in situ entfällt ein Anteil von 3% (56).

Die Stadieneinteilung der Blasenkarzinome erfolgt nach der TNM-Klassifikation (Tumor, Nodus, Metastasen) der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) in der überarbeiteten Version von 1992. 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 (28). Eine Darstellung der TNM-Klassifikation findet sich in Tabelle 1. Eine grafische Darstellung der T-Stadien zeigt Abbildung 1.

<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>

Tabelle I.1 : TNM-Klassifikation des Blasenkarzinoms (UICC 1992)

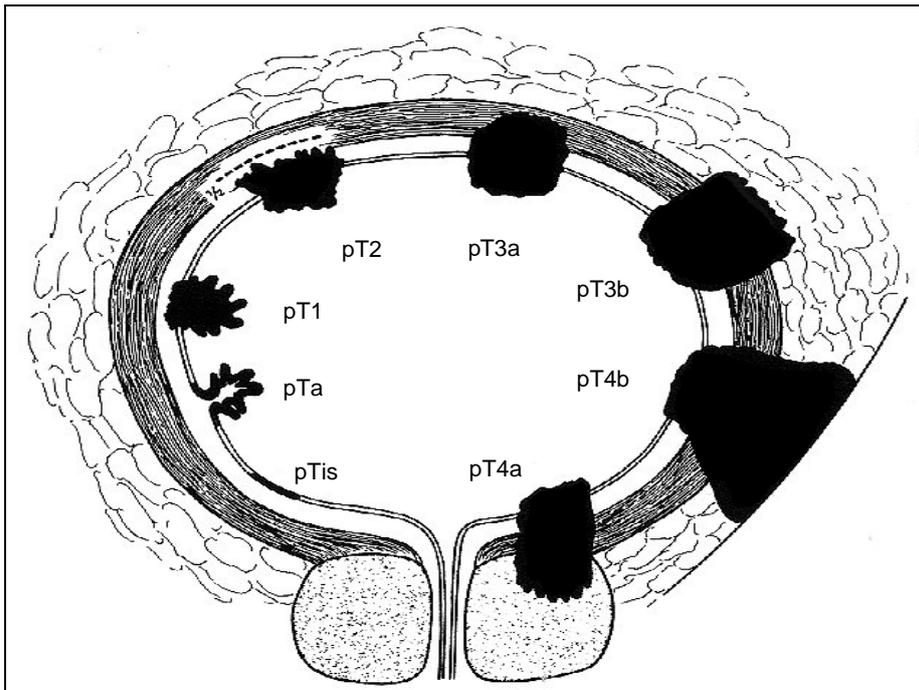


Abbildung I.1 : Darstellung der T-Stadien des Blasenkarzinoms nach der TNM-Klassifikation der UICC 1992

Wie aus der Abbildung I.1 ersichtlich ist, lassen sich urotheliale Harnblasenkarzinome in oberflächlich oder infiltrierend wachsende Tumoren einteilen. Oberflächliche Blasenkarzinome beinhalten Tumoren der Stadien pTis, pTa und pT1. Diesen Stadien ist gemeinsam, daß die Blasenmuskulatur noch nicht vom Tumor befallen ist. Bereits ab Stadium pT2 liegt eine Infiltration der Blasenmuskulatur vor, womit alle Stadien \geq pT2 definitionsgemäß zu den infiltrierenden Karzinomen gezählt werden (34). Die postoperative TNM-Klassifikation wird durch eine histopathologische Graduierung ergänzt. Nach dem führenden mikroskopisch faßbaren 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 (28).

Die Einteilung in oberflächliche und infiltrierende Tumoren hat vor allem klinische Bedeutung. Therapie und Prognose hängen entscheidend von der Ausdehnung des Karzinoms ab. Bei infiltrierenden Tumoren wird, sofern sie operabel sind, radikal mit Zystektomie behandelt werden.

Bei den oberflächlichen Karzinomen ist zunächst die organerhaltende, transurethrale Resektion (TUR) des entarteten Gewebes und benachbarter Areale indiziert.

Urotheliale Harnblasenkarzinome sind bei Diagnosestellung zu 70-80% als oberflächlich einzustufen. Jedoch ist die Rezidivhäufigkeit des oberflächlichen Urothelkarzinoms nach transurethraler Resektion (TUR) erheblich. Die Angaben liegen in unterschiedlichen klinischen Studien bei 50-70%. Abhängig sind diese Rezidivraten vom Tumorstadium und Differenzierungsgrad (G) des Tumors (42). Auch die Koinzidenz oberflächlicher Karzinome mit Präneoplasien (Dysplasien, CIS) ist als Ursache für die hohe Rezidivneigung anerkannt. Eine weitere Hypothese, um die hohe Rezidivneigung zu erklären, ist die Reimplantation viabler Tumorzellen an die verletzte Blasenwand nach transurethraler Resektion. Bereits 1962 postulierten WEYRAUCH und CROSSFIELD eine ortho- und heterotope Implantation der bei transurethraler Resektion ausgeschwemmten Tumorzellen an die traumatisierte Blasenwand mit nachfolgendem Tumorwachstum (87). Als wesentliches Argument hiefür galt die Tatsache, daß Tumoren im Blasendach primär äußerst selten sind, nach transurethraler Resektion hier jedoch in einer Häufigkeit von bis zu 20% angetroffen werden. Dieses Phänomen wurde mit der vermehrten Aussaat von Tumorzellen im Bereich der Luftblase am Blasendach bei transurethraler Resektion erklärt (11, 49). Ein weiterer wichtiger Hinweis ist die Tatsache, daß nach erfolgter transurethraler Resektion über einen längeren Zeitraum hinweg maligne Zellen in der Blasen-spülflüssigkeit nachweisbar sind. SOLOWAY und MASTERS vermuteten 1980 die Ursache der Reimplantation von Tumorzellen in der Verletzung der Blasenwand (77). Kommt es bei einer therapeutischen TUR zur Verletzung des Endothels, was beim Abtragen von exophytischen Tumoren durchaus gewollt ist, liegt die subendotheliale extrazelluläre Matrix frei. Gleichzeitig befinden sich die abgetragenen Tumoranteile frei flottierend in der Spülflüssigkeit der Harnblase und können sofort an die verletzte Blasenwand adhären (86, 87). In-vitro Untersuchungen von VLODAVSKY et al zeigten eine wesentlich schnellere und bessere Adhäsion von Tumorzellen an die subendotheliale extrazelluläre Matrix im Vergleich zur intakten endothelialen Oberfläche (85).

Zur genaueren Untersuchung der Reimplantationstheorie wurde ein Tierversuchsmodell etabliert (77). Die klinische Situation wurde simuliert, indem die murine Harnblasenwand vor Instillation von Blasenkarzinomzellen elektrokoagulierte wurde. So konnte ein Tumorwachstum instillierter syngener Tumorzellen in über 80% der Fälle erzielt werden, während die Implantationsrate in nicht elektrokoagulierten Mausblasen um 2 Zehnerpotenzen niedriger lag (67, 77). Dieses Modell wurde in der Folgezeit mehrfach überprüft. Eine Optimierung mit verlängerter Kontaktzeit von Tumorzellen und Blasenwand konnte regelmäßig eine Implantationsrate von 100% auch bei verringerter Tumorzellzahl erzielen (21). Somit ist dieses Tierversuchsmodell heute als ein

etabliertes Modell der lokalen Tumorimplantation anzusehen (57, 73, 74) . Die Implantation der Tumorzellen ist dabei abhängig vom Ausmaß der Verletzung der urothelialen Oberfläche sowie der Anzahl freigesetzter Tumorzellen (69).

1992 konnten SIDRANSKY et al die Hypothese der Reimplantation mit dem genetischen Nachweis der Monoklonalität multifokaler Blasen Tumoren weiter untermauern (75).

Aufgrund dieser klinischen und experimentellen Datenlage ist die Tumorreimplantation als ein relevanter Faktor der Rezidivhäufigkeit des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms anzusehen.

Bei etwa 25 % der Rezidive kommt es zur Verschlechterung des Tumorstadiums oder zur zunehmenden Entdifferenzierung des Tumors (19, 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 (34). 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 (36, 51). Diese Zahlen verdeutlichen die biologische Heterogenität des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms.

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 (64). Weiterhin sind primär multifokales Wachstum (15, 38), Tumorgröße (> 5 cm), begleitende Urotheldysplasien (41) und begleitendes Carcinoma in situ (CIS) (83) als prognostisch ungünstig einzustufen.

1.1.4 Symptome und Diagnose

Die schmerzlose Makrohämaturie ist häufig (75 %) das erste Symptom des Blasenkarzinoms, aber nicht immer ein Frühsymptom, da sie unabhängig von der Tumorgröße auftritt. Schon beim ersten Auftreten von Hämaturie können fortgeschrittene Tumoren vorhanden sein. Dysurische Beschwerden, die meist früher einsetzen, werden vom Patienten oft nicht beachtet. Ebenso werden Pollakisurie und/oder Algurie als Zystitis fehlgedeutet, sind aber Zeichen einer tumorbegleitenden Infektion oder Blasenkapazitätsverminderung. Weitere klinische Zeichen die auf ein Blasenkarzinom hindeuten sind Schmerzen über der Blasen- und Dammregion. Abgeschlagenheit, Anämie, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust deuten auf ein bereits fortgeschrittenes Tumorleiden hin.

Anamnestisch sind frühere Blasenmorerkrankungen sowie eine eventuelle Karzinogenexposition zu erfragen. Basis der Blasenmordiagnostik ist die Urethrozystoskopie. So kann die gesamte Blase endoskopisch beurteilt werden und durch Biopsie verdächtiger Veränderungen die Diagnose gesichert werden. Der Eingriff kann gegebenenfalls zu einer diagnostisch-therapeutischen Elektroresektion erweitert werden.

Zum Screening bei Risikogruppen und zur Nachsorge urothelialer Tumoren werden vor allem urinzytologische Untersuchungen eingesetzt. Durch bimanuelle Palpation in Narkose wird die Beweglichkeit der Blase beurteilt und organüberschreitendes Wachstum erfaßt. Als bildgebende Verfahren kommen Infusionsurogramm, Sonographie, Computertomographie sowie Röntgenaufnahmen des Thorax in Betracht. Die drei letztgenannten Verfahren werden vor allem zur Metastasensuche eingesetzt (34).

1.1.5 Therapie des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms

Die transurethrale Resektion (TUR) ist ein diagnostisch-therapeutischer Eingriff, der bei Vorliegen oberflächlicher Harnblasenkarzinome eine kurative Zielsetzung hat (34). Die TUR sollte als differenzierte TUR durchgeführt werden, da sich durch dieses Vorgehen das lokale Tumorstadium relativ genau erfassen läßt (7). Bei diesem Verfahren wird zunächst der exophytische Teil des Tumors reseziert und asserviert. Danach werden Proben von makroskopisch unverdächtigen Randbezirken des Tumors reseziert. Zuletzt erfolgt die Resektion der Tumorbasis. Die Proben werden voneinander getrennt asserviert und dem Pathologen mit einer Dokumentation der Tumorgeographie übergeben. Konnte ein oberflächlicher Tumor durch den initialen Eingriff nicht vollständig im Gesunden entfernt werden, so sind Nachresektionen erforderlich (8).

1.2 Molekularbiologischer Hintergrund der Tumorzellimplantation

Die Hypothese der Reimplantation viabler Tumorzellen an die verletzte Blasenwand nach transurethraler Resektion gilt als bestätigt. Dabei wird besonders die Traumatisierung der Harnblasenwand in ihrer Wichtigkeit unterstrichen, da eine wesentlich schnellere und bessere Adhäsion von Tumorzellen an die subendotheliale extrazelluläre Matrix im Vergleich zur intakten endothelialen Oberfläche stattfindet (85). Dies liegt darin begründet, daß das Endothel eine Schutz- und Barrierefunktion für das darunter liegende Gewebe erfüllt. Ist das Endothel nicht mehr vorhanden, können ungehindert die Vorgänge der Zell-Matrix-Interaktion beginnen. Um auf diese

näher eingehen zu können, ist eine kurze Darstellung der entsprechenden Strukturen und Moleküle notwendig.

1.2.1 Die Extrazelluläre Matrix:

Die extrazelluläre Matrix (EZM) besteht aus Makromolekülen der folgenden 3 Klassen: Kollagene, Proteoglykane und multiadhäsive Matrixmoleküle und übernimmt verschiedenste Funktionen. Sie verbindet Zellen zu Geweben und koordiniert ihre zellulären Funktionen. Moleküle der EZM aktivieren klassische Wege der Signaltransduktion. Die vielfältigen Funktionen der EZM beinhalten auch die Bindung mit membrangebundenen Zelladhäsionsmolekülen, von denen 5 Klassen bekannt sind: Integrine, Mucine, Selectine, die Immunglobulin-Superfamilie und Cadherine, die als Mediatoren für Zell-Matrix Interaktionen identifiziert wurden. So kontrolliert die EZM mit ihren Komponenten das Wachstum, die Differenzierung, die Entwicklung und metabolische Antwort einer Zelle (4, 29, 40, 52, 80).

Im folgenden soll auf Kollagene und Glykoproteine der EZM und Integrine näher eingegangen werden, da sie von großer Bedeutung für die Tumorzelladhäsion an der subendothelialen EZM der Harnblase sind.

1.2.2 Kollagen:

Das Kollagen ist ein zu den Gerüsteiweißen gehörendes fibrilläres Protein. Es wird unterteilt in 16 durchnummerierte Typen. Das Kollagen Typ IV bildet den Hauptbestandteil der fibrillären Proteine der EZM (84).

Es bildet das fibrilläre zweidimensionale Netzwerk aller Basalmembranen. Drei Polypeptidketten formen eine 400nm lange Triplehelix (16). Besonderen Stellenwert in der Aminosäuresequenz hat das Glycin, weil sein Wasserstoffatom das einzige ist, was in das Zentrum der dreisträngigen Helix passt. Jedoch sind die Glycin-x-y-Sequenzen ca. 24 mal mit Segmenten, die keine Triplehelix bilden können, unterbrochen. Diese Regionen sind verantwortlich für die Flexibilität des Moleküls. Durch laterale Assoziation von triplehelikalen Segmenten und Interaktionen zwischen den C-terminalen Enden wird das zweidimensionale Netzwerk ausgebildet (90).

Typ IV Kollagen beeinflusst die Adhäsion und Migration von verschiedenen Zelltypen. Die Zellen interagieren mit dem Typ IV Kollagen via Integrinrezeptoren $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ (33, 60, 91) und mit der RGD Sequenz via Integrinrezeptoren $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ (53).

1.2.3 Laminin:

Laminin ist ein großes multiadhäsives Matrixprotein. Nach dem Collagen IV kommt es am häufigsten in der EZM vor. Laminin ist ein heterotrimeres Glykoprotein bestehend aus drei verschiedenen Genprodukten, den α -, β - und γ -Ketten. Bisher wurden 5 α (α 1-5), 3 β (β 1-3) und 2 γ (γ 1-2) identifiziert. Die β - und γ - Ketten bestehen aus Globulardomänen an einem Ende und aus einer anschließenden Polypeptidkette. Die α -Kette besitzt an beiden Enden der Polypeptidkette Globulardomänen. Ein Laminin Molekül setzt sich aus jeweils einer der drei verschiedenen Ketten zusammen. Dabei bilden die jeweiligen Polypeptidketten eine Helix, so dass ein kreuzförmiges Molekül entsteht (5).

Mehrere Lamininmoleküle ordnen sich in der Basalmembran netzförmig an, indem Bindungen zwischen den kurzen Molekülenden ausgebildet werden (50).

Laminin hat hoch affine Bindungsstellen für Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche zahlreicher Zellen. Wie bei Kollagen Typ IV ist auch bei Laminin die RGD – Sequenz existent, die eine Interaktion zwischen Zelle und EZM über Integrinrezeptoren ermöglicht (3). Mehrere Integrinrezeptoren auf einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen binden Laminin: α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1, α 6 β 1, α 7 β 1 (6, 91).

1.2.4 Fibronectin:

Wie Laminin ist auch Fibronectin ein multiadhäsives Matrixprotein. Es ist ein sekretionelles Produkt von den meisten mesenchymalen und epithelialen Zellen.

Fibronectine sind Dimere aus zwei ähnlichen Polipeptidketten, verbunden am C-terminalen Ende. Jede Kette ist ca. 60-70nm lang und ca. 2-3 nm dick. Die einzelne Polipeptidkette ist unterteilt in Domänen, die für die Bindungsfunktionen des Fibronectins verantwortlich sind. Fibronectin bindet Kollagen, Fibrin und Heparan Sulfate.

Jede Domäne besitzt sich wiederholende Aminosäuresequenzen, die in drei Klassen aufgeteilt werden können (Typ I,II und III) (32).

Fibronectin vermag Kollagen und Fibrin mit der Zelloberfläche zu verkoppeln. Daher muß es auch eine Domäne besitzen, die sich an Zellen binden kann (43). Eine einzelne Wiederholung der Aminosäuresequenz Typ III dient als funktionelles Zentrum der zellbindenden Domäne. Die minimal aktive Aminosäuresequenz für die zentrale Zellbindungsdomäne für Integrine ist das Tripeptid RGD (Arg-Gly-Asp) (22, 62, 89).

Zusätzlich zur oben genannten zentralen Zellbindungsdomäne existiert eine weitere Zellbindungsdomäne, die im alternatively spliced type III connecting segment (IIICS) lokalisiert ist. Das für die Bindung verantwortliche Peptid wird CS1 (connecting segment) genannt. Die minimal aktive Aminosäuresequenz für CS1 ist Leu-Asp-Val. Es gibt zwei aktive Peptide, die eine Bindung vermitteln. Diese sind EILDV und LDVPS (37).

1.2.5 Fibrinogen:

Fibrinogen ist kein fester Bestandteil der EZM, aber in unserem Zusammenhang mit der Tumorzelladhäsion nach TUR sehr wichtig. Während der Operation findet eine Denudierung von Urothel statt, es entsteht also eine blutende Wunde. Die Gerinnungskaskade wird aktiviert, Fibrinogen aggregiert mittels Thrombin zu unlöslichen Fibrin-Polymeren und bildet zusammen mit den Thrombozyten den endgültigen Thrombus. Hierbei gelangt Fibrinogen auch in den Urin. Wie von TRANQUI 1989 beschrieben bindet Fibrinogen neben Thrombozyten auch endotheliale Zellen (82). Fibrinogen besitzt neben dem Tripeptid RGD die Aminosäuresequenz Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV). Während KQAGDV in der γ -Kette des Fibrinogens lokalisiert ist, liegen gleich zwei RGD Sequenzen in der α -Kette. Fibrinogen besitzt also 2 verschiedene Liganden für das Integrin α IIb β 3 (2,13). So initiiert das Fibrinogen in Wunden nicht nur die Thrombusbildung sondern verhilft auch den im Urin frei flottierenden Tumorzellen zur Adhäsion im Thrombus, indem eine Bindung des Fibrinogens mit dem Integrinrezeptor der Tumorzelle entsteht (45, 68). Selbst in nicht denudierten Arealen kann die eintretende Fibrindeposition auf intaktem Urothel eine hervorragende Adhäsionsmatrix bilden wie SEE und Mitarbeiter zeigen konnten (71, 72).

1.2.6 Integrine:

Integrine sind Rezeptormoleküle an der Zelloberfläche, die als Mediatoren für Zell-Matrix-Interaktionen dienen.

Integrine sind Heterodimere aus α - und β - Untereinheiten und wurden in allen tierischen und einigen pflanzlichen Spezies gefunden. Die Integrinfamilie, soweit heute bekannt, beinhaltet zumindest 17 unterschiedliche α - und 8 unterschiedliche β -Einheiten, die sich zu Komplexen von Heterodimeren zusammenlagern. Eine β -Einheit kann mit verschiedenen α -Einheiten interagieren und so Bindungsstellen für verschiedene Liganden bilden. Auf diese Weise entsteht eine große Diversität der Integrine. Die meisten Zellen exprimieren wiederum verschiedene Integrine, so dass Bindungsmöglichkeiten zu mehreren Matrixproteinen bestehen.

Integrine bilden typischerweise nur eine geringe Bindungsaffinität zu ihren Liganden. Die Dissoziationskonstante K_D liegt zwischen 10^6 und 10^8 mol/Liter. Jedoch erlauben zahlreiche schwache Bindungen zwischen Integrinen und der EZM eine feste Verankerung der Moleküle mit der EZM. Gleichzeitig ist aber auch eine sehr feine Abstimmung der Interaktion mit der EZM möglich, was einen wichtigen Aspekt für die Zellmigration darstellt.

HYNES beschrieb 7 unterschiedliche Fibronectinrezeptoren, 4 unterschiedliche Lamininrezeptoren, 3 Kollagenrezeptoren und 3 Fibrinogenrezeptoren (33). Eine erhebliche Redundanz in der Integrin-Ligand Interaktion ist bekannt. Unterschiedliche Rezeptoren werden von verschiedenen Zelltypen exprimiert. Integrine, die an dasselbe Matrixprotein binden, binden häufig an unterschiedliche Epitope oder können an dasselbe Epitop mit unterschiedlicher Bindungsavidität adhären (26).

Wie aus der Tabelle, modifiziert nach HYNES 1992, ersichtlich ist, konnten den Ligand-Rezeptor-Interaktionen minimal aktive Aminosäuresequenzen zugeordnet werden (33). Diese müssen mindestens drei Aminosäuren lang sein, um noch eine adhäsionsvermittelnde Funktion zu haben. Durch Voranstellen oder Anhängen von einzelnen oder mehreren Aminosäuren kann die zellbindende Aktivität verstärkt werden. Das Grundgerüst der Aminosäuren RGD kann zum Beispiel zu GRGDS, RGDV und GRGDTP verlängert werden (62). Gleiches gilt für die Aminosäuresequenz LDV, welche sich durch die Verlängerung zu den Molekülen EILDV oder LDVPS unter Aktivitätssteigerung vergrößern läßt.

Im Gegensatz zu RGD und LDV ist das Hexapeptid KQAGDV allerdings in seiner Länge von 6 Aminosäuren schon die minimal aktive Sequenz, die eine zellbindende Aktivität aufweist (82).

Integrine spielen insbesondere für maligne Zellen eine außerordentlich wichtige Rolle bei der Tumorzelladhäsion, dem Wachstum, der Migration und der Invasion. Eine gynäkologische Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß bei Ovarialkarzinom Zelllinien eine signifikant höhere Expression der Integrinuntereinheiten α_3 , α_6 , α_v und β_1 als bei nicht entarteten Ovarialzellen stattfand. Gab man den Ovarialkarzinomzellen Antikörper gegen die Integrinuntereinheiten α_3 , α_6 , α_v und β_1 hinzu, konnte die EZM induzierte Proliferation der Zellen inhibiert werden. Die EZM induzierte Adhäsion konnte durch einen Antikörper gegen die β_1 Integrinuntereinheit gehemmt werden (1). Letzteres konnte auch bei T24 Humanen Blasenkarzinomzellen beobachtet werden (25).

Integrin			bindungsvermittelnde Aminosäuresequenz
Rezeptor		Ligand	
β 1	α 1	Kollagen, Laminin	
	α 2	Kollagen, Laminin	DGEA
	α 3	Fibronectin, Laminin, Kollagen	RGD
	α 4	Fibronectin	EILDV
	α 5	Fibronectin	RGD
	α 6	Laminin	
	α 7	Laminin	
β 3	α IIb	Fibrinogen, Fibronectin	RGD, KQAGDV
	α v	Vitronectin, Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen	RGD
β 6	α v	Fibronectin	RGD
β 7	α 4	Fibronectin	EILDV

Tabelle I.2 : Die Integrinrezeptoren (nach Hynes, 1992)

Um die Reimplantation viabler Tumorzellen während oder kurz nach der TUR zu verhindern gibt es zwei Hypothesen: Die Tumorzellen so schnell wie möglich abzutöten oder die Adhäsion der Tumorzellen zu verhindern.

Die wiederholt in klinischen Studien untersuchte Strategie, unmittelbar postoperativ durch Zytostatikainstillation die Viabilität flottierender Tumorzellen zu beeinflussen, führte zu eindrucksvollen Ergebnissen. So war die einmalige Instillation von Epirubicin unmittelbar nach der transurethralen Resektion doppelt so effektiv wie die alleinige Instillation von Wasser bezüglich der postoperativen Rezidivrate des Harnblasenkarzinoms (48, 55). Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß die unmittelbar postoperativ begonnene Instillation der Zytostatika Mitomycin C oder Doxorubicin die der Effektivität einer typischen 7 bis 15 Tage postoperativ begonnenen aber verlängerten intravesikalen Rezidivprophylaxe mit Zytostatika ebenbürtig war (10). Die 5-Jahres rezidivfreie Rate betrug in der Kontrollgruppe ohne Behandlung 40% und konnte durch die einmalige Gabe von Mitomycin C 24 Stunden postoperativ auf 55% gesteigert werden. Das Gesamtüberleben sowie die Tumorprogression blieben allerdings unbeeinflusst (81). Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt der intravesikalen Pharmakotherapie sind die Nebenwirkungen. Nach Verabreichung von Doxorubicin trat bei 25% der Patienten eine chemische Zystitis auf. Bei

Mitomycin C liegen die Angaben zwischen 5% und 25%. Zusätzlich kommt eine Kontaktdermatitis der perineal Region in 5%-15% hinzu. Systemische Nebenwirkungen sind bei dem Zytostatikum Thiotepa mit Leukopenie und Thrombopenie in 2%-40% der Patienten beschrieben (41).

Abgesehen von der zytostatischen Rezidivprophylaxe ist auch die intravesikale Instillationsbehandlung mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) als Metaphylaxe beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom anerkannt. Hierbei verhindert eine Immunmodulation in der Harnblasenwand die Rezidiventstehung des Karzinoms nach TUR (9). In einer Studie von SAROSDY und LAMM konnte Rezidivfreiheit bei 78% der Patienten noch 5 Jahre nach nur einem Zyklus BCG erzielt werden (66). COPLEN et al berichteten über 64% Rezidivfreiheit in einer Patientengruppe mit hohem Rezidivrisiko durchschnittlich 4 Jahre nach einem oder zwei Zyklen BCG (14). Um einen Vergleich zwischen intravesikaler Chemotherapie und Immuntherapie in nicht direkt vergleichenden Studien zu ermöglichen, berechneten HERR et al unter Berücksichtigung der Rezidivrate der unbehandelten Kontrollgruppe in jeder Studie den sogenannten potentiellen Nutzen eines Instillationstherapeutikums. Der derart durchgeführte Vergleich einer größeren Anzahl randomisierter Studien zur Rezidivprophylaxe des Blasenkarzinoms mit unterschiedlichen Medikamenten zeigte sowohl einzeln jeweils für Thiotepa, Doxorubicin und Mitomycin C berechnet, als auch kollektiv für alle Chemotherapeutika zusammen berechnet einen Behandlungsvorteil für BCG (24). Aber auch die BCG-Therapie ist nicht nebenwirkungsfrei. In eine Übersichtsarbeit von LAMM et al wurden 2602 Patienten eingeschlossen. In 3% der Patienten trat als häufigste systemische Nebenwirkung Fieber auf. Andere toxische Effekte waren granulomatöse Prostatitis (1%), Pneumonitis/Hepatitis (0,7%) und Arthralgien (0,5%) (39). Einzelne Fälle einer systemischen Infektion und Sepsis sind beschrieben (58).

Um die Adhäsion der Tumorzellen zu verhindern macht man sich das Prinzip der kompetitiven Bindung zu nutze. Hierbei gilt es die Bindungsstellen der Tumorzellen zur Adhäsion an der subendothelialen extrazellulären Matrix vorab zu besetzen. Dieses geschieht durch hinzugefügte kompatible Fragmente zu den in der extrazellulären Matrix (EZM) enthaltenen Makromoleküle, so daß eine bereits stattgefundenene Bindung der Tumorzelle an die EZM vorgetäuscht wird und anschließend keine freien Bindungsstellen mehr vorhanden sind.

SEE et al, sowie Oharazawa et al konnten zeigen, dass in-vitro die Tumorzelladhärenz auf einer Fibronectin-Oberfläche durch das Oligopeptid GRGDS in einer konzentrationsabhängigen Weise inhibiert werden konnte. In-vivo konnte hingegen kein signifikanter Effekt auf die Zelladhäsion in der Blasenwand dargestellt werden (47, 71).

In der Extrazellulärmatrix der Blasenwand sind jedoch zumindest 3 Matrixmoleküle für die zelluläre Adhäsion verantwortlich (18, 35). Diese sind die bereits beschriebenen Makromoleküle Kollagen, Laminin und Fibronectin, die jeweils Zellbindungsdomänen mit verschiedenen minimal aktiven Aminosäuresequenzen besitzen.

Kollagen	RGD
Laminin	RGD
Fibronectin	RGD, EILDV

Berücksichtigt man die Aktivierung der Gerinnungskaskade bei transurethraler Resektion, müssen die Liganden des Fibrinogens mit den Peptiden RGD und KQAGDV mit einbezogen werden. Wenn man also das Prinzip der kompetitiven Bindung nutzen will um die Tumorzelladhäsion zu vermeiden, müssen alle Integrinrezeptoren der Tumorzellen blockiert werden, die an diese 3 Matrixmoleküle plus Fibrinogen adhären können. Es braucht also eine Kombination der Oligopeptide RGD, EILDV und KQAGDV. Das Versagen monospezifischer Oligopeptide in-vivo mag sich somit erklären.

II Fragestellung

1. Können die Oligopeptide GRGDS, KQAGDV und EILDV in löslicher Form monospezifisch eine Tumorzelladhäsion in-vivo inhibieren ?
2. Kann die Kombination der Oligopeptide GRGDS, KQAGDV und EILDV eine Tumorzelladhäsion in-vivo inhibieren ?
3. Gibt es eine Dosis-Wirkungs-Beziehung der Kombination der Oligopeptide GRGDS, KQAGDV und EILDV bezüglich der Tumorzelladhäsion in-vivo?
4. Gibt es einen Unterschied in der Wirkung bezüglich der Tumorzelladhäsion in-vivo zwischen der Kombination der Oligopeptide GRGDS, KQAGDV und EILDV und des Chemotherapeutikums Epirubicin ?

III Material und Methoden

3.1 Orthotopes Tumormodell

Als Versuchstiere dienten weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57/BL6 (CHARLES RIVER DEUTSCHLAND, SULZFELD) im Alter von 6-8 Wochen. Die Mäuse hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 17,6 g (SD 0,8). Die Tiere wurden in der konventionellen Kleintierhaltung des Universitätsklinikums Lübeck in Polycarbonatkäfigen (Makrolon®) mit einer Größe von 38×22×15 cm (Typ III) auf Weichholzgranulat (ALTROMIN GMBH, LAGE) gehalten. Die Anzahl der Mäuse pro Käfig wurde auf fünf Tiere beschränkt, um Aggressionsverhalten, welches eventuell die Kennzeichnung der Tiere (Ohrlochung) beeinträchtigen könnte, zu reduzieren.

Die Tiere wurden kontinuierlich mit einer pelletierte Standarddiät für Mäuse (ALTROMIN GMBH, LAGE) mit folgenden Inhaltsstoffen gefüttert:

Rohprotein 22,5% , Lysin 1,2% , Rohfett 5,0%, Rohfaser 4,5%, Rohasche 6,5% Calcium 0,9%, sowie Phosphor 0,7%. Als Zusatzstoffe sind 15000 IE Vitamin A, 600 IE Vitamin D₃, 75 mg Vitamin E und 5 mg Kupfer je Kilogramm Futtermittel. Leitungswasser war in Tränkeflaschen kontinuierlich verfügbar. Die Mäuse wurden bei einer Raumtemperatur von $19 \pm 1^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$ und einem Belichtungszyklus von 5⁰⁰-17³⁰ gehalten.

Die Experimente wurden durch das Ministerium für Umwelt, Gesundheit und Forsten von Schleswig-Holstein, als zuständige Behörde, bewilligt.

Zur Tumorimplantation die syngene murine Blasenkarzinomzelllinie MB49 gewählt. Diese Zelllinie wurde ursprünglich von SUMMERHAYES durch eine 24stündige Behandlung von Zellkulturen aus Blasenepithelien von C57/BL6 Mäusen mit 7,12-Dimethylbenzanthrazen erzeugt. Die unter dem Einfluß des chemischen Karzinogens transformierten Zellen bildeten bei subkutaner Injektion in syngene Mäuse Karzinome, welche sich bei histologischer Untersuchung als gering- bis undifferenzierte Karzinome darstellten (79).

Die Blasentumorzelllinie wurde in Kulturflaschen (Gewebekulturflaschen 260 cm², NUNC, ROSKILDE, DÄNEMARK) in 25 ml Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM) (BIOCHROM, BERLIN) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) (BIOCHROM, BERLIN) und 1 % Antibiotikallösung (Penicillin (10⁴ E/ml) / Streptomycin (10⁴ µg/ml) , BIOCHROM, BERLIN) angezüchtet. Die Zellen wurden bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert und zweimal wöchentlich passagiert. Zwischen den Passagen wurde einmal das Kulturmedium gewechselt. Zur Passage wurde das Medium von adhärennten Zellen abgesaugt und

anschließend 5 ml Trypsinlösung (SERVA, HEIDELBERG; 2,5 g Trypsin, 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1150 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 200 mg KH_2PO_4 ad 1000 ml aqua ad injectabilia) hinzupipettiert. Nach Inkubation (5 min, 37°C, 5 % CO_2) wurde das Trypsin durch Zugabe von 0,5 ml FKS (fetales Kälberserum) inaktiviert, die abgelösten Zellen geerntet, zentrifugiert (5 min, 1200 U/min) und in 2 ml neuen Kulturmediums aufgenommen. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde eine Probe der Tumorzellsuspension mit Trypanblau (FLUKA, BUCHS, SCHWEIZ) im Verhältnis 1:20 gemischt und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch ausgezählt. Zuletzt wurden 1×10^6 Zellen/25 ml in einer neuen Kulturflasche ausgesät.

Zur Herstellung der instillationsfertigen Tumorzelllösung wurde das Medium von adhären Zellen abgesaugt und anschließend 6 ml nichtenzymatische Zelldissoziationslösung (SIGMA CHEMICALS, DEISENHOFEN) hinzupipettiert. Nach Inkubation (15 min, 37°C, 5 % CO_2) wurden die abgelösten Zellen geerntet, zentrifugiert (5 min, 1200 U/min) und in 2 ml DMEM ohne FKS und Antibiotika aufgenommen. Nach Trypanblaufärbung wurde die Konzentration auf 2×10^5 / ml eingestellt. Um eine ausreichende Viabilität der Tumorzellen zu gewährleisten, wurden die Zellen erst unmittelbar vor der geplanten Instillation präpariert und bis zur Instillation auf Eis gekühlt. Durch die Trypanblaufärbung, in der sich tote Zellen intensiv blau anfärben, konnte die Viabilität der Tumorzellsuspension ermittelt werden. Für die Instillation wurden nur Suspensionen mit mindestens 90% lebenden Zellen verwendet.

Die Zellkultur sowie die Vorbereitung der Tumorzellen für die Instillation wurden freundlicherweise von Frau I. Deinert und Frau J. Arnold, Forschungszentrum Borstel, durchgeführt.

Die Katheterisierung der Harnblase wurde mit peripheren Venenverweilkanülen vom Typ Insyte-W® (BECTON-DICKINSON, HEIDELBERG) durchgeführt. Die Punktionsnadeln wurden vor der Katheterisierung entfernt und nur die Kunststoffkanüle wurde transurethral in die Harnblase eingeführt. Die aus dem Kunststoff Vialon® bestehende Kanüle hatte einen Außendurchmesser von 0,7 mm (24 G) bei einer Länge von 19 mm. Der Totraum der Kunststoffkanüle betrug 0,05 ml und mußte bei der Instillationsbehandlung unbedingt berücksichtigt werden. Nachfolgend beziehen sich daher Angaben über instillierte Volumina auf das effektiv intravesikal verabreichte Volumen. Nach der Instillation wurden die Katheter mit einem handelsüblichen Verschlußkonus aus Kunststoff (BRAUN, MELSUNGEN) verschlossen und intravesikal bis zum Erwachen der Tiere belassen (18).

Die Elektrokoagulation der Blase wurde mit einem Hochfrequenzdiathermiegerät vom Typ Elektrotom 500 / Modulsystem 2000 (GEBRÜDER MARTIN, TUTTLINGEN) durchgeführt. Als Neutralelektroden dienten Klebeelektroden der Marke Europlate® Typ 447 (DAHLHAUSEN, KÖLN). Als Koagulationselektrode wurde ein Führungsdraht eines zentralen Venenkatheters (ARROW GMBH, ERDING), der über die bereits in der Blase liegende Verweilkanüle eingeführt wurde, verwendet. Der Außendurchmesser des Führungsdrahtes betrug 0,5 mm entsprechend 25 G.

3.2 Sonstige Geräte, Materialien und Hilfsmittel:

Die Etherinhalationsnarkose wurde mit Hilfe einer Etherglocke (Glaswerk Wertheim, Wertheim) durchgeführt.

Zur Applikation des Injektionsnarkotikums sowie zur intravesikalen Instillation von Tumorzellsuspension, PBS und Oligopeptiden wurden 1 ml Feindosierungsspritzen vom Typ Omnifix®-F (BRAUN, MELSUNGEN) verwendet. Durch die Graduierung der Spritzen war es 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 Philips 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.

Als Gleitmittel 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.

Zur Sektion der Mäuse benutzte ich einen herkömmlichen Präparierkasten der Firma Aesculap / Inox (BMTL, LÜBECK) und Feather Einmalskalpelle (FIRMA PFM, KÖLN).

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 das Blasengewicht bis auf 1 mg genau bestimmt werden.

Zur Asservierung von entnommenen Blasen und anderen Organen verwendete ich Eppendorf Reaktionsgefäße (EPPENDORF GMBH, HAMBURG) sowie eine 4,5 prozentige gepufferte Formalinlösung (MERCK, DARMSTADT).

3.3 Medikamente:

3.3.1 Diethylether:

Um die intraperitoneale Applikation des Injektionsnarkotikums zu vereinfachen, erhielten die Mäuse unmittelbar vor der Injektion eine Inhalationsnarkose mit Diethylether (MERCK, DARMSTADT).

3.3.2 Natrium-Pentobarbital:

Als Injektionsnarkotikum verwendete ich das Präparat Nembutal® mit dem Wirkstoff Natrium-Pentobarbital (SANOFI CEVA, Vertrieb: Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, HANNOVER). Die Pentobarbitallösung mit einem Wirkstoffgehalt von 60 mg pro ml wurde mit Wasser für Injektionszwecke (BRAUN, MELSUNGEN) auf eine Konzentration von 6 mg Pentobarbital je ml verdünnt.

3.4 Instillationstherapeutika:

3.4.1 PBS:

Handelsübliches PBS (9 g NaCl, 0,27 g KH₂PO₄ und 1,43 g Na₂HPO₄•2H₂O in 1000 ml aqua ad injectabilia) (pH-Wert von 7,2) wurde den Tieren in der Kontrollgruppe intravesikal instilliert.

3.4.2 Purisole:

Die Oligopeptide wurden in handelsüblicher urologischer Spüllösung, Purisole[®], Fresenius, Bad Homburg (27g Sorbit, 5,4 g Mannit in 1000ml destilliertes Wasser) zur Instillation gelöst. Eine der Kontrollgruppen erhielt nur Spüllösung, ohne gelöste Oligopeptide, instilliert.

3.4.3 Oligopeptide:

Die Oligopeptide GRGDS, EILDV und KQAGDV wurden als Integrin-Rezeptor Antagonisten bezüglich der extrazellulären Matrixproteine Fibronectin (GRGDS und EILDV), Kollagen (GRGDS), Laminin (GRGDS) und Fibrinogen (KQAGDV, GRGDS) verwendet. Weiterhin wurden hinsichtlich der Integrinbindung unspezifische Kontroll-Pentapeptide als Kontrollen eingesetzt (DRVYI, Angiotensin I/II Aminosäuren 1-5; YIHPI, Angiotensin I/II, Aminosäuren 4-8; und RYLPT, Proctolin). Alle Oligopeptide wurden als Lyophilisate von Bachem, Heidelberg, Deutschland bezogen.

Die Oligopeptide setzten sich wie folgt zusammen:

GRGDS: H – Gly – Arg – Gly – Asp – Ser – OH

EILDV: H – Glu – Ile – Leu – Asp – Val – OH

KQAGDV: H – Lys – Gln – Ala – Gly – Asp – Val – OH

DRVYI: H – Asp – Arg – Val – Tyr – Ile – OH

YIHPI: H – Tyr – Ile – His – Pro – Phe – OH

RYLPT: H – Arg – Tyr – Leu – Pro – Thr – OH

Die Oligopeptide wurden nach folgendem Schema durch Zugabe urologischer Spüllösung (Purisole, Fresenius, Bad Homburg) bei Raumtemperatur gelöst.

Zunächst wurden Stocklösungen dem jeweiligen Umfang der Gruppe entsprechend angelegt und bis zur Verwertung bei -20°C eingefroren.

A. GRGDS Stocklösung (2x25mg)

Jeweils 25mg Stocklösung wurden in $500\mu\text{l}$ Purisole-Lösung gelöst und anschließend in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vermengt = 50mg/ml

B. EILDV Stocklösung (2x25mg)

Jeweils 25mg Stocklösung wurden in $50\mu\text{l}$ 50% CH_3COOH gelöst (ca. 10min stehengelassen und gelegentlich geschüttelt), mit $450\mu\text{l}$ Purisole-Lösung aufgefüllt und anschließend in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vermengt = 50mg/ml

C. KQAGDV Stocklösung (2x25mg)

Jeweils 25mg Stocklösung wurden in $500\mu\text{l}$ Purisole-Lösung gelöst und anschließend in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vermengt = 50mg/ml

Bei Versuchsbeginn wurde die gewünschte Konzentration der Oligopeptide als 10 mM Lösung eingestellt.

GRGDS (5mg/ml)

30 Mäuse a $100\mu\text{l}$ = 3ml

= $3,1\text{ml}$ Ansatz

50mg/ml Stocklsg. (10fach) $310\mu\text{l}$ + $2790\mu\text{l}$ Purisole-Lsg. = **5mg/ml**

EILDV (5mg/ml)

10 Mäuse a $100\mu\text{l}$ = 1ml

= $1,5\text{ml}$ Ansatz

50mg/ml Stocklsg. (10fach) $150\mu\text{l}$ + $1350\mu\text{l}$ Purisole-Lsg. = **5mg/ml**

KQAGDV (5mg/ml)

10 Mäuse a $100\mu\text{l}$ = 1ml

= $1,5\text{ml}$ Ansatz

50mg/ml Stocklsg. (10fach) 150 μ l + 1350 μ l Purisole-Lsg. = **5mg/ml**

Bei der Kombination von Oligopeptiden in einer Lösung ist zu beachten, dass bei einer 3er Kombination die einzelne Substanz 3fach verdünnt wird. Es ergibt sich ein Ansatz nach folgendem Schema:

Kombination aus GRGDS+EILDV+KQAGDV (jeweils **5mg/ml** → 15mg/ml ansetzen)

30 Mäuse a 100 μ l = 3ml

= 3,1ml Ansatz | /3 Peptide

= 1033 μ l pro Peptid

von GRGDS+EILDV+KQAGDV 50mg/ml Stocklsg. (3,3fach) jeweils 313 μ l + 720 μ l Purisole = 1033 μ l

Alle drei Oligopeptide in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mischen = **3,1ml einer 5mg/ml Lsg.**
(jedes Peptid liegt 5mg/ml vor)

Kombination aus GRGDS+EILDV+KQAGDV (jeweils **3mg/ml** → 9mg/ml ansetzen)

10 Mäuse a 100 μ l = 1ml

= 1,5ml Ansatz | /3 Peptide

= 500 μ l pro Peptid

von GRGDS+EILDV+KQAGDV 50mg/ml Stocklsg. (5,5fach) jeweils 90,9 μ l + 409,1 μ l Purisole = 500 μ l

Alle drei Oligopeptide in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mischen = **1,5ml einer 3mg/ml Lsg.**
(jedes Peptid liegt 3mg/ml vor)

Kombination aus GRGDS+EILDV+KQAGDV (jeweils **1mg/ml** → 3mg/ml ansetzen)

10 Mäuse a 100 μ l = 1ml

= 1,5ml Ansatz | /3 Peptide

= 500 μ l pro Peptid

von GRGDS+EILDV+KQAGDV 50mg/ml Stocklsg. (16fach) jeweils 31,25 μ l + 468,75 μ l Purisole = 500 μ l

Alle drei Oligopeptide in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mischen = **1,5ml einer 1mg/ml Lsg.**
(jedes Peptid liegt 1mg/ml vor)

Entsprechendes gilt für die Lösung der Kombination aus unspezifischen Oligopeptiden.

Kontrolle aus unspezifischen Peptiden (Kombination von 3 unspez. Peptiden zu je **5mg/ml**)

- a) Angiotensin I/II (1-5) (human) 15mg
- b) Angiotensin I/II (4-8) (human) 15mg
- c) Proctolin 15mg

10 Mäuse a 100µl = 1ml

= 1,5 ml Ansatz

Die unspezifischen Peptide wurden jeweils in 1ml Purisole-Lösung gelöst = 15mg/ml.

Von jedem gelösten unspezifischen Peptid wurden nun 500µl entnommen und zusammen in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vermischt = 1,5ml einer 5mg/ml Mischung (jedes Peptid liegt 5mg/ml vor).

Epirubicin

handelsübliche Farmorubicin® Trockensubstanz wurde mit dem dazugehörigen Lösungsmittel angesetzt

50mg Farmorubicin® in 10ml Lösungsmittel

0,5 mg = 0,1ml

Die für den Menschen empfohlene Mindestkonzentration liegt bei 1mg/ml.

3.5 Anästhesie:

Initial erhielten die Mäuse eine Inhalationsanästhesie mit Diethylether, welche mit Hilfe einer Etherglocke durchgeführt wurde. Nach einer durchschnittlichen Verweildauer in der Etherglocke von zirka 30 s waren die Mäuse für etwa 30 s ausreichend betäubt. In diesem Zeitraum wurden die Mäuse gewogen, und es erfolgte die intraperitoneale Barbituratinjektion, in einer gewichtsorientierten Dosierung von 0,06 mg/g Körpergewicht. Zur Injektion wurden die Mäuse mit Daumen, Zeige- und Mittelfinger an einer Hautfalte im Nacken gefaßt. Um Verletzungen von

inneren Organen zu vermeiden, wurde den Mäusen das Narkotikum im medialen Bereich des unteren Abdomens in Kopftieflagerung intraperitoneal injiziert. Durch die vorherige Ethernarkose konnten Abwehrbewegungen der Mäuse verhindert werden. Die Wirkungsdauer des Barbiturats bis zum vollständigen Erwachen dauerte durchschnittlich 3 h. Vereinzelt konnte mit der Initialdosis nicht die gewünschte Narkosedauer und Narkosetiefe erreicht werden, so daß in diesen Fällen ein Drittel der Initialdosierung des Barbiturats intraperitoneal nachinjiziert wurde.

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

3.6 Rasur:

Nach dem Beginn der Narkosewirkung wurde ein ca. 1 cm² großes Areal auf dem Rücken der Mäuse rasiert, um eine Kontaktstelle für die Neutralelektrode des Koagulationsgerätes zu schaffen.

3.7 Kennzeichnung der Tiere:

Im Anschluß an die Rasur wurden die Mäuse durch Ohrlochung mit einer Revolverlochzange gekennzeichnet. Die in Abbildung 4 schematisch dargestellte Methode ermöglichte eine einfache, mit geringem technischem Aufwand durchführbare Markierung, durch die eine individuelle Verlaufsbeobachtung realisiert wurde.

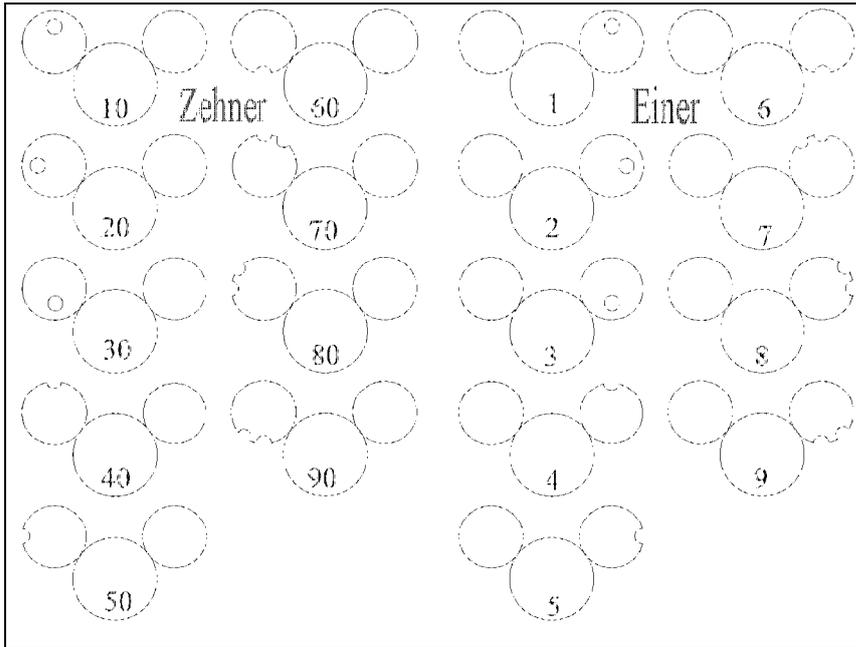


Abbildung III.1: Markierung von Mäusen mittels Ohrlochung

Mit Hilfe einer Lochzange wurden Kreise bzw. Halbkreise aus den Ohren der 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.

3.8 Katheterisierung:

Zur Katheterisierung wurden die Mäuse auf den Rücken gelegt.

Die als Katheter verwendeten Venenverweilkanülen wurden zunächst in ein Gleitmittel eingetaucht, um den Vorgang des Katheterisierens zu erleichtern. Anschließend wurde die mit Gleitmittel benetzte Katheterspitze in das Orifizium urethrae eingeführt und vorsichtig vorgeschoben. Dabei durfte allenfalls ein minimaler Widerstand spürbar werden. 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.

3.9 Elektrokoagulation:

Die katheterisierten Mäuse wurden mit dem rasierten Hautareal auf die mit Elektrodengel versehene Neutralelektrode des Koagulationsgerätes gelegt. Über den liegenden Katheter wurde die Koagulationselektrode eingeführt. Eine Markierung an der Elektrode zeigte an, wenn die Elektrode 2 mm aus der Katheterspitze herausragte. Wenn diese Markierung beim Einführen der Elektrode den Ansatzkonus des Katheters erreichte, erfolgte das weitere Vorschieben sehr vorsichtig, 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 einer Leistung von etwa 5 Watt, für die Dauer von 5 s koaguliert.

3.10 Instillation:

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 der Instillationsbehandlung nicht wieder in die Blase zurückgespritzt wurde. 0,1ml der Oligopeptidlösung bzw. der Kontrolllösung wurden in die Blase instilliert, und der Katheter verschlossen. Nach 5 Minuten wurden 0,1 ml der zuvor gründlich durchmischten Tumorzellsuspension (2×10^5 Zellen/ml) zusätzlich instilliert, der Katheter erneut verschlossen und bis zum Erwachen der Mäuse in der Blase belassen.

Die Mäuse verloren den Katheter mit den ersten Bewegungen nach dem Erwachen. Durch diese Methode konnte ein Verbleib des Instillats und damit eine Kontaktzeit von Blasenepithel und instillierten Oligopeptiden sowie Tumorzellen von durchschnittlich 3 h erzielt werden (18).

3.11 Gruppeneinteilung:

Es wurden 2 Versuchsreihen durchgeführt, wobei in der ersten Versuchsreihe das Prinzip der Kombination der Oligopeptide getestet wurde und in der zweiten Versuchsreihe eine Dosis-Wirkungs-Beziehung und der Vergleich zur Chemotherapie untersucht wurden.

In der ersten Versuchsreihe wurden die Mäuse in 4 Gruppen mit je 20 Tieren eingeteilt. Den Versuchstieren der Kontrollgruppe wurde nach Elektrokoagulation der Harnblase die Tumorzellsuspension instilliert. Allen weiteren Tieren wurde nach der Elektrokoagulation zunächst die unten genannte Substanz, 5 Minuten später die Tumorzellsuspension instilliert.

Gruppe 1 : Kontrolle

Gruppe 2 : Spüllösung (Purisole)

Gruppe 3 : GRGDS

Gruppe 4 : Kombination 5mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV, jeweils 5 mg/ml)

Die Gruppe 2 fungiert hierbei als zweite Kontrollgruppe, da den Versuchstieren lediglich unspezifische Spüllösung als Testsubstanz verabreicht wurde, entsprechend der operativen Situation im Menschen.

Um eine Reaktion von Oligopeptiden per se ausschließen zu können, wurden unspezifische Oligopeptide als weitere Kontrollgruppe getestet.

Als Vergleich der Wirksamkeit zur aktuellen Therapie, wurde Epirubicin als anerkanntes Chemotherapeutikum in den Versuch mit aufgenommen.

Daraus ergibt sich die Gruppeneinteilung der zweiten Versuchsreihe mit je 10 Mäusen pro Gruppe wie folgt:

Gruppe 1 , Kontrolle (PBS-Instillation);

Gruppe 2 , unspezifische Kontroll-Peptide (DRVYI, YIHPI, RYLPT je 5 mg/ml);

Gruppe 3 , GRGDS 5 mg/ml;

Gruppe 4 , KQAGDV 5 mg/ml;

Gruppe 5 , EILDV 5 mg/ml;

Gruppe 6 , Kombination 5mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV, jeweils 5 mg/ml) ;

Gruppe 7 , Kombination 3mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV, jeweils 3 mg/ml) ;

Gruppe 8 , Kombination 1mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV, jeweils 1 mg/ml) ;

Gruppe 9 , Epirubicin 5 mg/ml.

Aufgrund des gleichen Versuchsaufbaues und der gleichen Durchführung, konnten beide Versuche zusammengefasst werden. Das ergibt insgesamt 10 Gruppen mit unterschiedlicher Größe:

Gruppe 1 (n=30), Kontrolle (PBS-Instillation)

Gruppe 2 (n=20), Spüllösung (Purisole);

Gruppe 3 (n=10), unspezifische Kontroll-Peptide (DRVYI, YIHPI, RYLPT je 5 mg/ml)

Gruppe 4 (n=30), GRGDS 5 mg/ml;

Gruppe 5 (n=10), KQAGDV 5 mg/ml;

Gruppe 6 (n=10), EILDV 5 mg/ml;

Gruppe 7 (n=30) Kombination 5mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV, jeweils 5 mg/ml) ;

Gruppe 8 (n=10) Kombination 3mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV, jeweils 3 mg/ml) ;
Gruppe 9 (n=10) Kombination 1mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV, jeweils 1 mg/ml) ;
Gruppe 10 (n=10) Epirubicin 5 mg/ml.

Die Mäuse wurden täglich hinsichtlich Viabilität und Gesundheitsstatus untersucht.

3.12 Opferung der Mäuse:

Überlebende Mäuse wurden am Tag 28 des Versuches getötet. Hierzu wurden die Mäuse in einen speziellen Käfig gebracht, der dann für etwa 3 Minuten mit Kohlendioxyd begast wurde. In diesem Käfig wurden die Mäuse bis zum Eintritt sicherer Todeszeichen belassen.

3.13 Sektion:

Unmittelbar nach Tötung wurde die Sektion der Mäuse durchgeführt. Bei Mäusen, die vor Ablauf des Experiments verstarben, wurde die Sektion direkt nach dem Auffinden des toten Tieres durchgeführt. Zur Sektion wurde ein Längsschnitt von Symphyse bis Sternum vorgenommen. Anschließend wurde das Peritoneum dargestellt und eröffnet. Die Blase wurde aufgesucht und das perivesikale Fett und Bindegewebe entfernt. Danach wurde die Blase an der Urethra abgetrennt und entnommen. Sie wurde in 2 Hälften zerteilt und enthaltener Urin abgetupft. Das Blasengewicht wurde als Parameter für Tumorwachstum bestimmt und die Blase makroskopisch auf das Vorhandensein von Tumoren untersucht. Die entnommenen Blasen wurden in Formalinlösung asserviert.

Die regionalen Lymphknotenstationen (iliakal und periaortal) der Blase wurden dargestellt und bei Vergrößerung der Lymphknoten wurden diese asserviert. Leber, Niere und Harnleiter wurden makroskopisch auf neoplastische Veränderungen hin untersucht. Dazu wurden die genannten Organe zunächst in situ betrachtet, anschließend entfernt und in Scheiben geschnitten. Verdächtige Befunde wurden zur histologischen Abklärung asserviert und mit Formalin fixiert. Abschließend wurden Milz und Peritoneum auf Anzeichen einer Tumoraussaat untersucht. Nach Eröffnen des Thorax wurden Herz und Lunge nach den gleichen Prinzipien untersucht und ggfs. asserviert.

3.14 Histologie:

Um auszuschließen, daß ein mikroskopisch kleiner Tumor bei der Sektion übersehen wurde, wurden alle makroskopisch tumorfreien Blasen einer histologischen Untersuchung zugefügt. Die Präparate wurden in Formalin fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurde eine Hämatoxyllin – Eosin – Färbung durchgeführt.

Die histologischen Untersuchungen wie auch die Vorbereitung der Präparate wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Professor Kühnel und Frau Brummert in der Anatomie der Universität Lübeck durchgeführt.

3.15 Statistik:

Zur Auswahl geeigneter statistischer Testverfahren wurde die Beratung des Instituts für medizinische Statistik und Dokumentation in Anspruch genommen. Die Tumorwachstumsrate sowie die Metastasierung wurden mit dem χ^2 -Test verglichen. Das zeitliche Auftreten der Makrohämaturie wurde mit dem Mann-Whitney-Test statistisch analysiert. Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer Vorhersagewert der Makrohämaturie als Parameter für Tumorwachstum wurden mit Hilfe der Vierfeldertafel bestimmt. Die Analyse des Blasengewichtes wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant festgelegt. Die Blasen- bzw. Tumorgewichte 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 weisen. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung der Kombinationstherapie wurde mit Konfidenzintervallen für Binominalverteilungen bestimmt. Zur statistischen Analyse wurde das Programm SPSS® für Windows® verwendet.

IV Ergebnisse

Als Ergebnis des ersten Versuches mit je 20 Tieren pro Gruppe zeigten in Gruppe 1, Kontrollgruppe, 20 Versuchstiere einen Harnblasentumor. In Gruppe 2, Spüllösung, waren es 18, in Gruppe 3, GRGDS, waren es 17 und in Gruppe 4, Kombination 5mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV) 7 Versuchstiere.

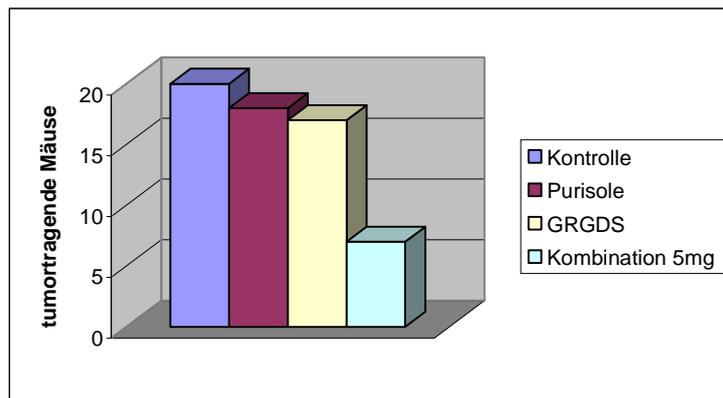


Abbildung IV.1: Versuch 1; tumortragende Mäuse (absolut)

Im zweiten Versuch mit je 10 Versuchstieren pro Gruppe zeigten alle 10 Tiere der Gruppe 1, Kontrollgruppe, Harnblasentumoren. In Gruppe 2, unspezifische Kontrollpeptide, waren es 9, in Gruppe 3, GRGDS, waren es 9, in Gruppe 4, KQAGDV, waren es 10 und in Gruppe 5, EILDV, waren es 7 Versuchstiere. Aus der Gruppe 6, Kombination 5mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV), wiesen 2 Tiere Harnblasentumoren auf, während in Gruppe 7, Kombination 3mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV), 1 Tier und in Gruppe 8, Kombination 1mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV), 5 Tiere von Tumoren der Harnblase betroffen waren. Gruppe 9, Epirubicin, zeigte 4 Versuchstiere mit Harnblasentumoren.

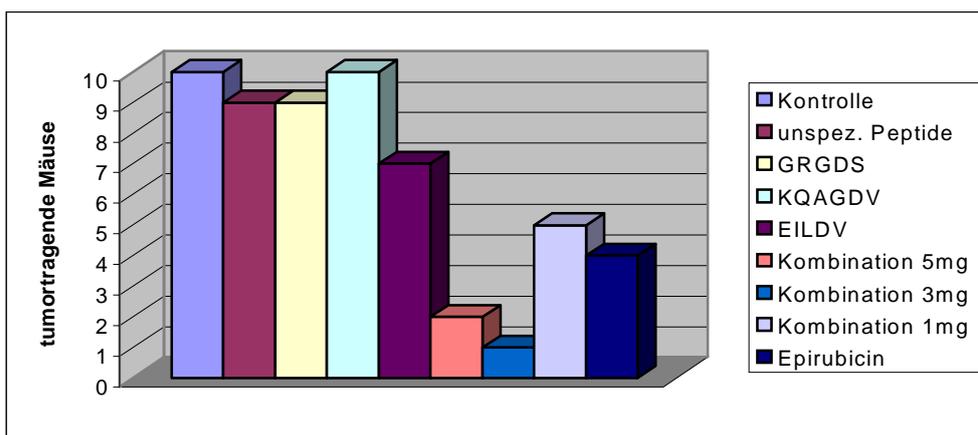


Abbildung IV.2: Versuch 2; tumortragende Mäuse (absolut)

Aufgrund des gleichen Versuchsaufbaues und der gleichen Durchführung, konnten die Ergebnisse beider Versuche zusammengefasst werden:

Das orthotope murine Harnblasenkarzinommodell zeigte in der mittels PBS behandelten Kontrollgruppe eine Tumoranwachsrate von 100%. Die mittels Purisole irrigierte Kontrollgruppe wies eine Tumoranwachsrate von 90% auf. Tiere, die mit unspezifischen Kontrollpeptiden behandelt worden waren bekamen in 90% einen Tumor. Bei Gabe von GRGDS waren es 87%, bei Gabe von KQAGDV 100% und bei Gabe von EILDV 70%. In den Kombinationsgruppen (GRGDS, KQAGDV, EILDV) von 5 mg je Oligopeptid traten zu 30% Blasen Tumoren auf, bei 3 mg 10% und bei 1 mg 50%. Eine intravesikale Gabe von Epirubicin führte zu einer Tumoranwachsrate von 40%.

	Gruppengröße	Anwachsrate von Tumoren	%
Kontrolle	30	30	100%
Purisole	20	18	90%
unspez. Peptide	10	9	90%
GRGDS	30	26	87%
KQAGDV	10	10	100%
EILDV	10	7	70%
Kombination 5mg	30	9	30%
Kombination 3mg	10	1	10%
Kombination 1mg	10	5	50%
Epirubicin	10	4	40%

Tabelle IV.1: Zusammenfassung von Versuch 1 und 2; Anwachsrate von Tumoren (absolut und in Prozent)

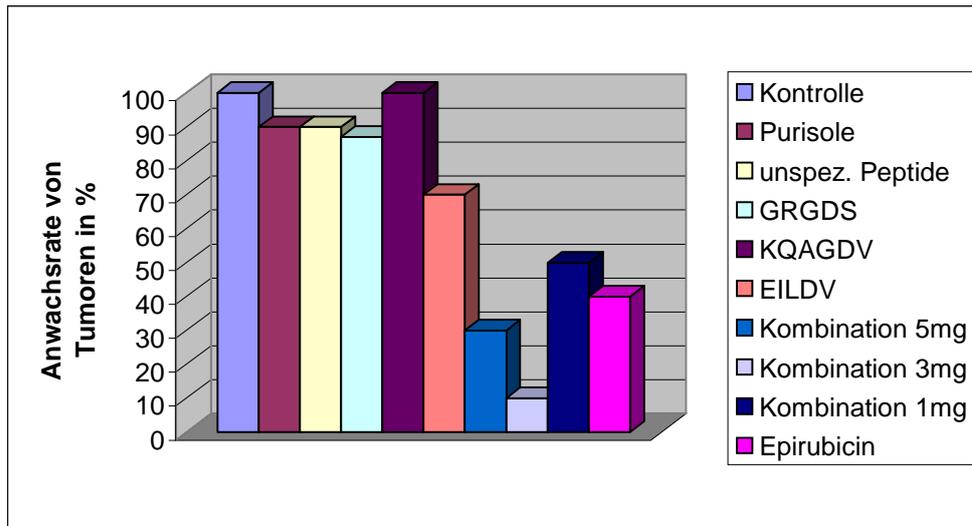


Abbildung IV.3: Zusammenfassung von Versuch 1 und 2; Anwachsrate von Tumoren (tumor take)

Die Tumoranwachsraten der Kombinationsgruppen sowie der mit Epirubicin behandelten Gruppe waren signifikant niedriger verglichen mit der Kontrollgruppe ($p < 0.001$). Innerhalb der Kombinationsgruppen lässt sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ableiten, jedoch nicht statistisch belegen.



Abbildung IV.4 a

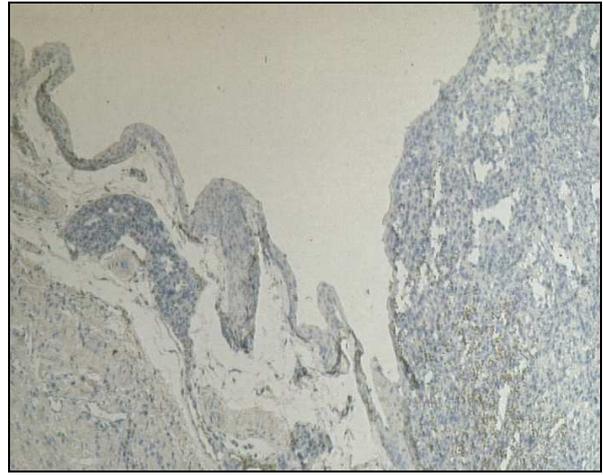


Abbildung IV.4 b

Abbildung IV.4 a und b: Makroskopische (a) und mikroskopische (b) Darstellung eines soliden Harnblasentumors (Hämalaun-Färbung, Vergrößerung 40fach)

Die Mäuse innerhalb der Gruppen mit Tumorstadium zeigten signifikante Unterschiede hinsichtlich des Blasengewichtes. Während das Blasengewicht bei den mit PBS, Purisole, unspezifischen Kontrollpeptiden, GRGDS, KQAGDV, und Kombination 1 mg behandelten Tieren jeweils ≥ 136 mg lag (178 mg, 140 mg, 187 mg, 136 mg, 151 mg und 144 mg, respektive), war in den Gruppen Epirubicin, Kombination 3mg und Kombination 5mg das Blasengewicht mindestens halbiert bei ≤ 70 mg (nämlich bei 48 mg, 67 mg, und 70 mg, respektive) ($p < 0,01$). Tumortragende Mäuse der mit EILDV irrigierten Gruppe hatten ein Blasengewicht bei 98 mg und lagen somit zwischen den vorgenannten Gruppen, was auf eine gewisse Wirkung hindeutet ($p < 0,05$).

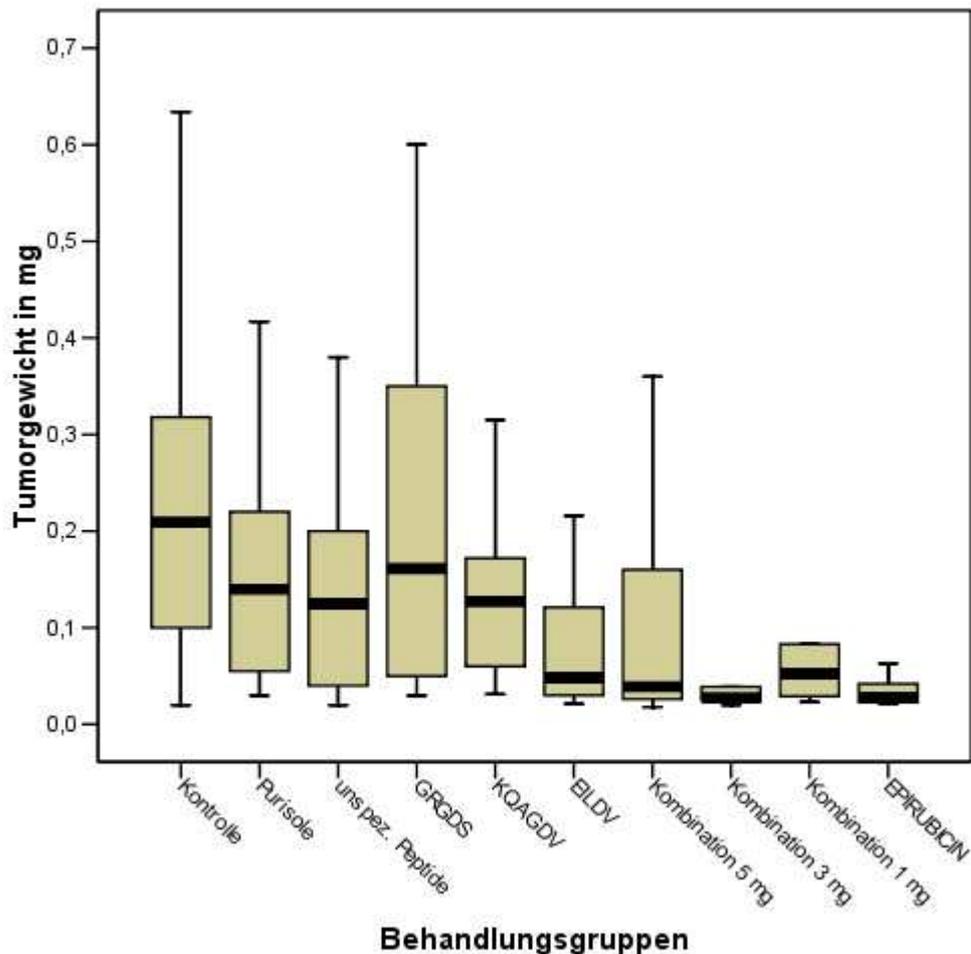


Abbildung IV.5: Tumorgewicht in mg dargestellt als Box-plot je Behandlungsgruppe

Das Körpergewicht der Mäuse zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Die makroskopische Untersuchung der inneren Organe zeigte folgende Rate an Lungenmetastasierung: PBS-Kontrolle 50% (15 Mäuse, Gruppengröße 30); Purisole 35% (7 Mäuse, Gruppengröße 20); unspezifische Kontroll-Peptide 30% (3 Mäuse, Gruppengröße 10); GRGDS 30% (9 Mäuse, Gruppengröße 30); KQAGDV 30% (3 Mäuse, Gruppengröße 10); EILDV 30% (3 Mäuse, Gruppengröße 10); Kombination 5 mg 10% (3 Mäuse, Gruppengröße 30); Kombination 3 mg 10% (1 Mäuse, Gruppengröße 10); Kombination 1 mg 20% (2 Mäuse, Gruppengröße 10); Epirubicin 0% (0 Mäuse, Gruppengröße 10). Somit zeigte sich ein Hinweis auf Reduktion der Metastasierungsrate per se. Bezogen auf die tumortragenden Tiere war jedoch kein statistisch

signifikanter Unterschied zwischen Behandlungsgruppen und Kontrollgruppe hinsichtlich der pulmonalen Metastasierungsrate feststellbar.

	Gruppengröße	Tiere mit Lungenmetastasierung	%
Kontrolle	30	15	50%
Purisole	20	7	35%
unspez. Peptide	10	3	30%
GRGDS	30	9	30%
KQAGDV	10	3	30%
EILDV	10	3	30%
Kombination 5mg	30	3	10%
Kombination 3mg	10	1	10%
Kombination 1mg	10	2	20%
Epirubicin	10	0	0%

Tabelle IV.2: Zusammenfassung von Versuch 1 und 2; Mäuse mit Lungenmetastasierung (absolut und in Prozent)

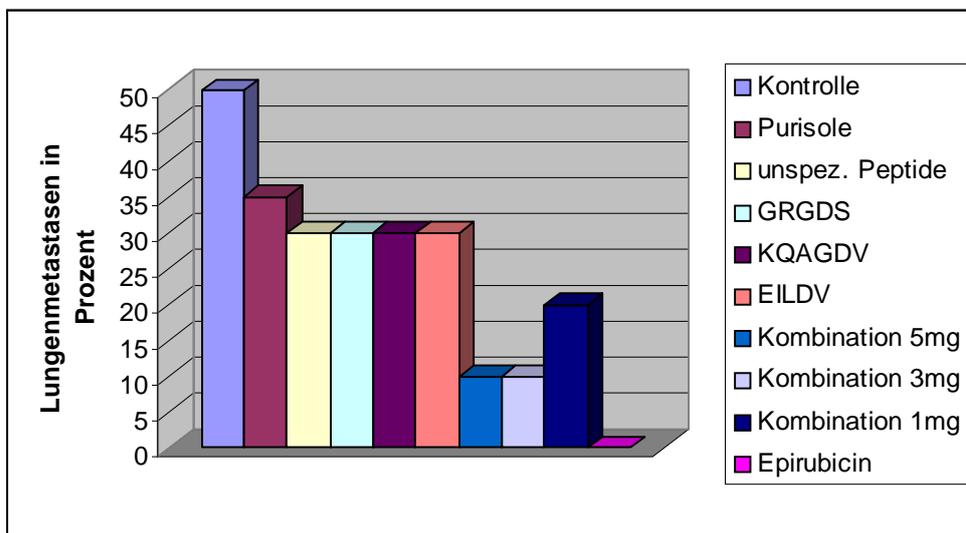


Abbildung IV.6: Zusammenfassung von Versuch 1 und 2; Mäuse mit Lungenmetastasierung (in Prozent)



Abbildung IV.7 a

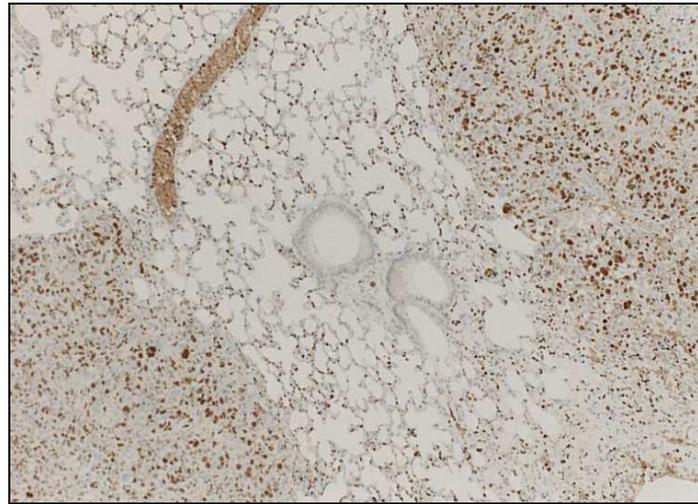


Abbildung IV.7 b

Abbildung IV.7 a und b: Makroskopischer (a) und mikroskopischer (b) Aspekt von Lungenmetastasen (Immunhistochemische Färbung gegen Ki-67 mit dem Antikörper MIB-5, Gegenfärbung Hämalan, Vergrößerung 100fach)

Beim zweiten Versuch (Gruppengröße 10) wurden zusätzlich die regionalen Lymphknoten und die Nieren auf Tumorbefall untersucht. In der Kontrollgruppe fanden sich in 7 Fällen Lymphknotenmetastasen, in der Gruppe der mit unspezifischen Kontrollpeptiden behandelten Mäuse 6. Nach Gabe von GRGDS traten 4 Fälle von Lymphknotenmetastasen auf, nach Gabe von KQAGDV 8 Fälle und nach Gabe von EILDV 4 Fälle. Durch Kombination der Oligopeptide wurde das Auftreten von Lymphknotenmetastasen reduziert, in der 5 mg Kombinationsgruppe auf 1 Fall und in der 3 mg Kombinationsgruppe auf 0 Fälle. In der 1 mg Kombinationsgruppe traten 4 Fälle von Lymphknotenmetastasen auf. Die mit Epirubicin behandelten Mäuse zeigten in 2 Fällen Lymphknotenmetastasen.

Bezogen auf die tumortragenden Tiere war jedoch auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Behandlungsgruppen und Kontrollgruppe hinsichtlich der Lymphknotenmetastasen feststellbar.

	Gruppengröße	Tiere mit Lymphknoten metastasierung
Kontrolle	10	7
unspez. Peptide	10	6
GRGDS	10	4
KQAGDV	10	8
EILDV	10	4
Kombination 5mg	10	1
Kombination 3mg	10	0
Kombination 1mg	10	4
Epirubicin	10	2

Tabelle IV.3: Versuch 2; Lymphknotenmetastasierung (absolut)

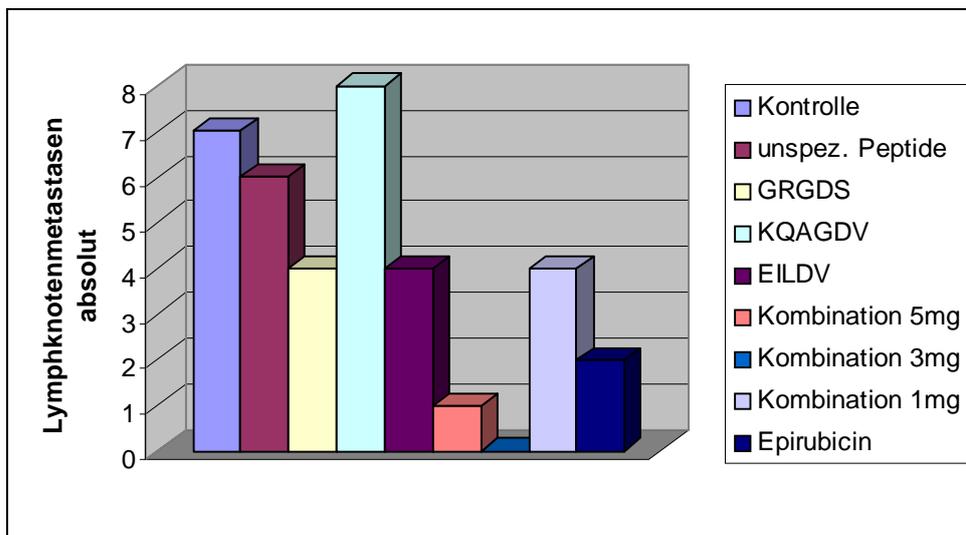


Abbildung IV.8: Versuch 2; Lymphknotenmetastasierung (absolut)



Abbildung IV.9 a

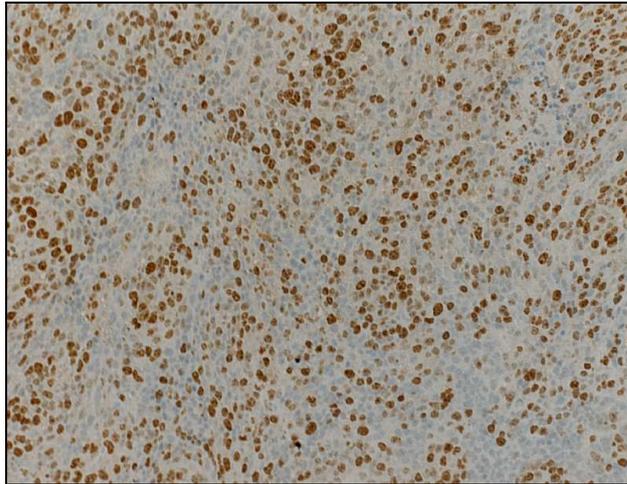


Abbildung IV.9 b

Abbildung IV.9 a und b : Makroskopischer (a) und mikroskopischer (b) Aspekt von Lymphknotenmetastasen (Immunhistochemische Färbung gegen Ki-67 mit dem Antikörper MIB-5, Vergrößerung 250fach)

Das Auftreten von Nierenmetastasen konnte in der Kontrollgruppe in 4 Fällen und in der Gruppe der unspezifischen Peptide in 3 Fällen festgestellt werden. Die Gabe von Einzelsubstanzen der Oligopeptide zeigte bei GRGDS 1 Fall von Nierenmetastasen, bei KQAGDV keinen und bei EILDV 1 Fall. Bei der Gabe von Kombinationen der Oligopeptide, sowie bei der Gabe von Epirubicin konnten keine Fälle von Nierenmetastasen festgestellt werden.

Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Behandlungsgruppen und Kontrollgruppe bezogen auf die tumortragenden Tiere hinsichtlich der Nierenmetastasen feststellbar.

	Gruppengröße	Tiere mit Nieren metastasierung
Kontrolle	10	4
unspez. Peptide	10	3
GRGDS	10	1
KQAGDV	10	0
EILDV	10	1
Kombination 5mg	10	0
Kombination 3mg	10	0
Kombination 1mg	10	0
Epirubicin	10	0

Tabelle IV.4: Versuch 2; Nierenmetastasierung (absolut)

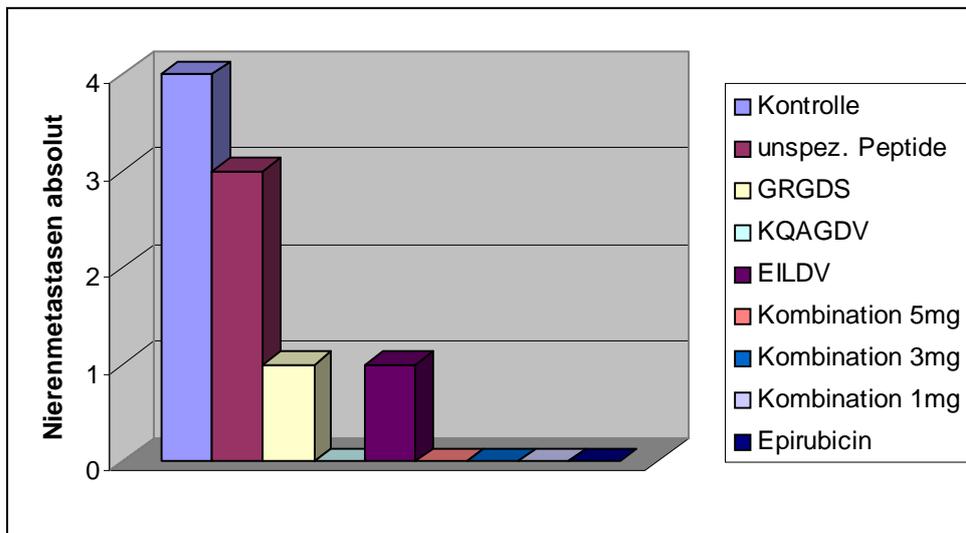


Abbildung IV.10: Versuch 2; Nierenmetastasierung (absolut)



Abbildung IV.11 a

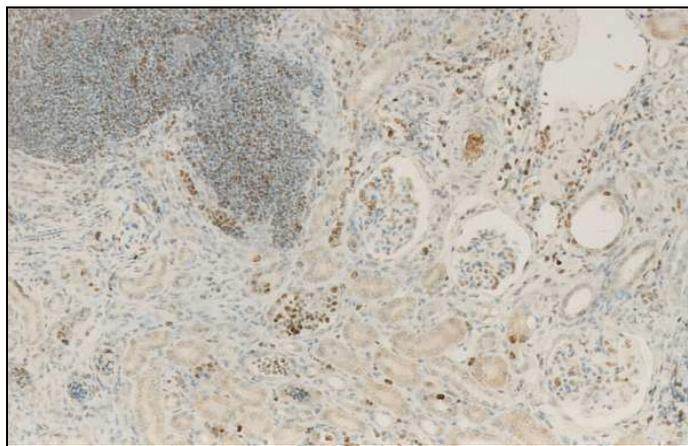


Abbildung IV.11 b

Abbildung IV.11 a und b : Makroskopischer (a) und mikroskopischer (b) Aspekt von Nierenmetastasen (Hämalaunfärbung, Vergrößerung 100fach)

Die kontinuierliche makroskopische Untersuchung des Urins der Versuchstiere ergab ein erstes Auftreten von Makrohämaturie 6 Tage nach Instillationsbehandlung. Nur die Kontrollgruppe, die

KQAGDV behandelten Mäuse, die EILDV behandelten Mäuse und die mit der Kombination 1 mg behandelten Mäuse zeigten dieses Phänomen. Der Urin der Mäuse aus anderen Versuchsgruppen hatte zu diesem Zeitpunkt keine Anzeichen einer Makrohämaturie. Dieses ändert sich schon am 7. Tag nach Instillation, als in der Purisole behandelten Gruppe Makrohämaturie auftrat. Am 8. Tag folgten die Gruppen GRGDS und Epirubicin. Am 10. Tag nach Instillation zeigte die Gruppe Kombination 5 mg erste Zeichen von Makrohämaturie, gefolgt von der Gruppe der unspezifischen Peptide am 13. Tag. Zuletzt wurde in der Gruppe Kombination 3 mg das Auftreten von Makrohämaturie festgestellt, nämlich am 20. Tag.

Für den Zeitpunkt des Einsetzens von Makrohämaturie läßt sich für die Gruppen der Kombinationstherapie (5 mg, 3 mg, 1 mg) gegen die Gruppen der einzeln verabreichten Peptide (GRGDS, KQAGDV, EILDV) ein statistisch signifikanter Zusammenhang feststellen ($p=0,000$).

Behandlungsgruppen	Mittelwert	N	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Kontrolle	15,00	30	7,120	13,00	6	28
Purisole	13,75	20	6,390	13,00	7	28
unspez. Peptide	17,60	10	4,904	18,00	13	28
GRGDS	18,03	30	7,064	18,00	8	28
KQAGDV	7,60	10	1,838	8,00	6	12
EILDV	16,20	10	8,509	12,00	6	28
Kombination 5 mg	25,43	30	5,270	28,00	10	28
Kombination 3 mg	27,20	10	2,530	28,00	20	28
Kombination 1 mg	19,00	10	10,209	24,00	6	28
EPIRUBICIN	20,60	10	9,571	28,00	8	28
Insgesamt	18,30	170	8,260	18,00	6	28

Tabelle IV.5: Zeitpunkt des Auftretens von Makrohämaturie

Ein signifikanter Zusammenhang läßt sich zwischen Tumorwachstum und Makrohämaturie feststellen ($p=0,000$). Die Sensitivität der Hämaturie als Parameter des Tumorwachstums betrug 95%, die Spezifität 88%, der positive Vorhersagewert 95% und der negative Vorhersagewert 88%.

	Hämaturie	keine Hämaturie
Tumorwachstum	113 (a)	6 (b)
kein Tumorwachstum	6 (c)	45 (d)

Tabelle IV.6: Vierfeldertafel zur Berechnung von Sensitivität ($a/a+b$), Spezifität ($d/c+d$), positivem Vorhersagewert ($a/a+c$) und negativem Vorhersagewert ($d/b+d$) für den Parameter Hämaturie bezogen auf das Tumorwachstum.

Bei nachgewiesenem Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und Makrohämaturie kann aus dem Zeitpunkt des Auftretens der Makrohämaturie auf den Beginn des Tumorwachstums rückgeschlossen werden. So fällt auf, daß das Tumorwachstum in den Gruppen Kombination 5mg und Kombination 3mg nicht nur geringer als in der Kontrollgruppe ausfällt, sondern auch später einsetzt. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht –wie oben erwähnt- nur zwischen den Gruppen der Kombinationstherapie (5 mg, 3 mg, 1 mg) gegen die Gruppen der einzeln verabreichten Peptide (GRGDS, KQAGDV, EILDV) ($p=0,000$).

V Diskussion

Verschiedene Hypothesen existieren, um die hohe Rate von Tumorrezidiven nach transurethraler Resektion von Harnblasenkarzinomen zu erklären. Die Implantationstheorie von Harnblasentumoren wurde bereits 1903 durch Albarran und Imbert vorgeschlagen (2). Obwohl die Möglichkeit der Implantation von Karzinomzellen auf eine intakte Mukosa meist abgelehnt wurde, erschien eine Tumorzellimplantation auf denudierte Oberflächen oder in operativen Wunden weitgehend akzeptiert (54, 87). SOLOWAY und MASTERS argumentierten, dass flottierende Tumorzellen während einer Elektroresektion an das vorgeschädigte Gewebe adhären, anwachsen und somit ein Rezidiv an der Resektionsstelle induzieren können (77). Weitere klinische Hinweise für die Implantationshypothese erhielt man aus der atypischen Lokalisation von Rezidivtumoren im Vergleich zum Primärtumor im Bereich des Blasendaches und der hinteren Blasenwand, die inzidentellen Verletzungen während der transurethralen Resektion zuzuschreiben sind. (11, 49). In einer prospektiven Untersuchung konnten MÜLLER et. al. bei 23 % der Patienten nach klinisch vollständiger transurethraler Resektion von Harnblasentumoren Tumorzellen in der Spüllösung feststellen (46). 75% dieser Patienten entwickelten einen Rezidivtumor innerhalb von 3-6 Monaten. Auch der Nachweis der klonalen Herkunft primärer und sekundärer Harnblasentumoren durch SIDRANSKY et al kann als ein molekularbiologisches Argument für diese Hypothese gewertet werden (75).

Weitere indirekte Unterstützung kam von klinischen Studien aus der jüngeren Vergangenheit. Diese Studien untersuchten die Möglichkeit, Tumorzellimplantation und Rezidivhäufigkeit des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms durch einmalige intravesikale Zytostatikagabe unmittelbar nach der transurethralen Resektion zu verhindern. Burnand et. al. instillierten 90 mg Thiotepa unmittelbar nach TUR in die Harnblase. Daraufhin zeigte sich eine signifikante Reduktion der Rezidive innerhalb eines Jahres (12). Ähnliche Resultate wurden auch durch ZINCKE et. al. und weitere Arbeitsgruppen berichtet (11, 48, 55, 92). In einer großen klinischen Studie mit 431 Patienten aus der EORTC wurde gezeigt, dass eine einmalige Instillation von Epirubicin (80 mg) unmittelbar nach der transurethralen Resektion des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms die Rezidivrate im Vergleich zur nur mit Instillation von Wasser behandelten Kontrollgruppe um nahezu die Hälfte reduzierte (48). Zwei Jahre später wurde ebenfalls von der EORTC die direkt postoperative Gabe eines Zytostatikums mit einer verzögerten Gabe (zwischen 7. und 15. postoperativem Tag) verglichen. Dabei stellte sich die frühe Behandlung der verzögerten Behandlung bezüglich der Rezidivrate als überlegen heraus (10). RAJALA et al aus der

Finnbladder Group konnten ebenfalls die Bedeutung der postoperativen Instillation eines Zytostatikums, nicht jedoch eines Immunmodulators zeigen (55), wobei auch hier der Zeitpunkt der Instillation herausgestellt wurde. Es wurden unmittelbar postoperativ entweder Interferon- α oder Epirubicin instilliert und mit den Ergebnissen der transurethralen Therapie allein verglichen. Die Rezidivfreiheit nach 2 Jahren war in den mit TUR ohne zusätzliche Instillation und Interferon behandelten Gruppen etwa gleich hoch (40 %). Die einmalige postoperative Instillation von Epirubicin zeigte jedoch eine Rezidivfreiheit bei 66 % der Patienten und damit einen statistisch signifikanten Unterschied zu den vorgenannten Gruppen.

Somit konnte aus klinischer Sicht mehrfach gezeigt werden, dass die Tumorimplantation eine wichtige Rolle beim Rezidivverhalten des oberflächlichen Harnblasenkarzinom spielt und dass sich die Tumorimplantation durch die unmittelbar postoperative einmalige Gabe von Zytostatika reduzieren lässt.

Zytostatika inhibieren jedoch nicht direkt die zelluläre Adhäsion, sondern wirken über eine Proliferationsinhibition oder Abtötung von Tumorzellen, d.h. sekundär. In verschiedenen experimentellen Ansätzen wurde deshalb versucht, primär und spezifisch die Interaktion zwischen maligner Zelle und Adhäsionsmatrix zu inhibieren. Durch Gabe von Oligopeptiden, die direkt mit adhäsionsvermittelnden Integrinen interagieren, kann die Adhäsion von Tumorzellen an freiliegende subepitheliale Oberflächen inhibiert werden.

SEE et al zeigten in-vitro, dass eine Blockade von Integrinen mittels Oligopeptiden der Sequenz GRGDS zu einer signifikant verminderten Tumorzelladhärenz an eine Fibronektinmatrix in Abhängigkeit von Oligopeptid-Konzentration, Tumorzellzahl und Viabilität führte (71). In-vivo jedoch konnte keine effektive Reduktion der Tumorzelladhäsion und des Tumorwachstums festgestellt werden. HYACINTHE et. al. verwendeten einen in-vitro Zelladhäsionsassay mit gemischten Matrices, welches der natürlichen Situation in-vivo erheblich näher kommt (31). GRGDS inhibierte dosisabhängig die zelluläre Adhäsion. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte in-vivo in einem Harnblasentumormodell eine Reduktion der Zelladhäsion durch GRGDS im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu SEE et. al. (72) verwendeten die Autoren jedoch eine 10fach höhere Konzentration von GRGDS.

PODE et al. verwendeten eine natürliche extrazelluläre Matrix zur Adhäsion von oberflächlich hoch differenzierten humanen Blasen Tumoren in-vitro. Stabile Adhäsion der Tumorzellen lag bereits innerhalb der ersten Stunde vor und erreichte ein Maximum innerhalb von 24 Stunden, gefolgt von

Abflachung und Proliferation der ausgesäten Zellen. Diese Ergebnisse legten nahe, dass eine Prävention der Tumorimplantation innerhalb der ersten Stunde nach transurethraler Resektion von Blasen Tumoren erfolgen muss (54), was durch jüngste klinische Untersuchungen bestätigt wurde (55).

Die Implantation von Tumorzellen, die während der TUR freigesetzt werden, ist durch das operative Trauma mit Läsion und Denudierung von Urothel wesentlich erleichtert, da hierdurch Basalmembran und unterliegende Matrix exponiert werden (18, 20, 54, 77). Selbst in nicht denudierten Arealen kann die eintretende Fibrindeposition auf intaktem Urothel eine hervorragende Adhäsionsmatrix bilden (71, 72). Die genannten biologischen Ansätze anderer Gruppen zur Implantationsinhibition bezogen sich jedoch in-vitro auf einfache Matrizes, während komplexe Matrizes nicht untersucht wurden. Zumindest im Tierversuch waren somit die bisher verfolgten Strategien wenig erfolgreich (71). Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass auf der Zelloberfläche mehr als eine Bindungsstelle an extrazelluläre Matrix vorliegt und dass die Implantationsmatrix überwiegend aus den Bestandteilen Fibronectin, Laminin und Kollagen besteht (18, 35). Die monospezifische Blockierung nur einer Adhäsionsdeterminante konnte somit nicht zur erhofften effektiven Inhibition der Tumorzelladhäsion führen.

Aus diesem Grunde untersuchten wir verschiedene Oligopeptide, die mit mehreren Komponenten der extrazellulären Matrix interagieren. Hierzu wurden Fibronectin-spezifische Oligopeptide (GRGDS und EILDV), ein Laminin-spezifisches Oligopeptid (GRGDS) und ein Fibrinogen-spezifisches Peptid (KQAGDV) eingesetzt. Die Hypothese nur mit einer Kombination aus diesen Oligopeptiden eine Adhäsion an eine komplexe extrazelluläre Matrix inhibieren zu können, konnte in unserem Versuchsansatz in-vivo bestätigt werden. Während sich wiederum keine signifikante Verminderung der Tumorzellimplantation und des konsekutiven Tumorwachstums nach Instillation monospezifischer Oligopeptiden zeigte, konnten Kombinationen aus den 3 Oligopeptiden gegen die Hauptkomponenten der suburothelialen Matrix zu einer signifikanten Inhibition der Zelladhäsion und des konsekutiven Tumorwachstums führen. Weiterhin kann eine Dosis-Wirkungs-Beziehung dieses Therapieansatzes angenommen werden, da bei niedrigen Konzentrationen (1mg/ml) eine Reduktion der Effizienz, allerdings ohne statistische Signifikanz, zu verzeichnen war.

Selbst innerhalb der Gruppe der tumortragenden Mäuse ließ sich ein weiterer Hinweis auf die Effektivität der verwendeten Therapeutika ablesen. Da in unserem Modell das Blasengewicht zum Zeitpunkt der Opferung von der initial instillierten Tumorzellzahl abhängig ist, zeigt eine Reduktion der zur Implantation verfügbaren viablen Zellen ein reduziertes Blasengewicht (21). Selbst bei

erfolgreicher Implantation führte die Instillation von Epirubicin, Oligopeptid-Kombination 3mg oder Oligopeptid-Kombination 5mg zu einer statistisch signifikanten Verringerung des Blasengewichtes im Vergleich zur Instillation mit Kontrollpeptiden, monospezifischen Peptiden oder geringer Konzentration der Kombination. Auch das Auftreten von Makrohämaturie als Symptom eines Blasen Tumors setzte bei Behandlung mit Epirubicin, Kombination 5 mg und 3 mg im zeitlichen Verlauf später ein. Dieses Phänomen kann durch die deutlich verringerte Anzahl implantierender Tumorzellen erklärt werden, die letztlich zu einer verringerten Tumormasse führte.

Unser Ansatz zeigt mehrere klinisch wichtige Aspekte: Durch spezifische Blockade der Tumorzelladhäsion während endoskopischer Operationen könnte es offensichtlich möglich sein, die Rezidivrate des Harnblasenkarzinoms spezifisch zu senken. Wenn man die klinische Effektivität der postoperativen Zytostatikainstillation aus mehreren klinischen Studien in Betracht zieht (48, 55, 92) und mit unseren in-vivo Daten vergleicht, so kann die Effektivität unseres biologischen Ansatzes zu einer 50%igen Reduktion der Rezidive oberflächlicher Harnblasenkarzinome führen. Mit diesem Therapieansatz würden genetisch bedingte, biologisch aggressivere Tumoren als die wichtigste Ursache für auftretende Harnblasenkarzinomrezidive verbleiben. Längere intravesikale Therapiemaßnahmen wären somit nur für diese Tumorentität in Betracht zu ziehen. Weiterhin könnte der von uns verfolgte biologische Ansatz der Interferenz der zellulären Adhäsion nebenwirkungsarm durchgeführt werden, da der gleichzeitige Einsatz während der transurethralen Resektion möglich wäre. Eine systemische Resorption bei größeren Resektionswunden würde nicht zu toxischen Reaktionen wie bei Zytostatika führen (17, 76), da systemische hohe Dosen von Oligopeptiden im Tierversuch unproblematisch waren (30, 88). Auch eine Beeinträchtigung der Blutgerinnung konnte in unseren Untersuchungen nicht festgestellt werden, obwohl Thrombozyten und von Willebrand Faktor ebenfalls die RGD-Sequenz zur Adhäsion benutzen (63). HYACINTHE et al. zeigten im Tiermodell keinen Einfluss von GRGDS auf die Wundheilung (31) und auch in unserem Modell konnten toxische Effekte weitgehend ausgeschlossen werden, da klinischer Verlauf und Körpergewicht der Mäuse keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zeigte.

VI Zusammenfassung

Derzeit sind etwa 6,27% aller Krebstodesfälle in Deutschland auf das Harnblasenkarzinom zurückzuführen. Bei Diagnosestellung liegt in 70–80% ein oberflächliches Stadium vor, dessen Besonderheit eine hohe Rezidivhäufigkeit nach transurethraler Resektion darstellt. Bereits 1980 wurde als Ursache die Reimplantationstheorie entwickelt und im Tierversuch bestätigt. Das heißt, dass während einer transurethralen Resektion die frei flottierenden Tumorzellen sofort wieder an die verletzte Blasenwand adhären. Molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zelladhäsion über membranboundene Moleküle, Integrine, vermittelt wird. Diese Integrine der Tumorzelle interagieren mit der extrazellulären Matrix der verletzten Harnblasenwand. Dabei müssen die Matrixbestandteile Kollagen, Laminin, Fibronectin und Fibrinogen als Bestandteil der Gerinnungskaskade berücksichtigt werden, da über verschiedene Aminosäuresequenzen die Adhäsion zur Tumorzelle stattfindet.

Mit dieser Doktorarbeit sollte im Tierversuch gezeigt werden, ob durch kompetitive Hemmung der adhäsionsvermittelnden Aminosäuresequenzen durch Oligopeptide die Tumorentstehung an der verletzten Harnblasenwand verhindert werden kann. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass aufgrund der verschiedenen Matrixbestandteile nur das Gemisch der verschiedenen Oligopeptide eine Adhäsion an der extrazellulären Matrix inhibieren kann.

Hierzu wurden 170 Mäuse mit einem Harnblasenkatheter versehen, über den mittels Elektrokoagulation eine Denudierung der Blasenwand erfolgte. Anschließend wurde der Kontrollgruppe Spüllösung und den Behandlungsgruppen Oligopeptide für die einzelnen Matrixbestandteile, sowie ein Gemisch aller Oligopeptide verschiedener Konzentrationen instilliert. Eine weitere Behandlungsgruppe wurde mit einem Chemotherapeutikum behandelt. Nach 5 Minuten wurde allen Mäusen eine Tumorzellsuspension in die Harnblase verabreicht. Nach 28 Tagen erfolgte die Opferrung und Sektion der Tiere.

Unter anderem waren die Tumoranwachsraten bei Behandlung mit dem Gemisch aller Oligopeptide, sowie bei Gabe des Chemotherapeutikums signifikant niedriger verglichen mit der Kontrollgruppe. Ferner war das Blasengewicht der genannten Behandlungsgruppen signifikant niedriger. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bei verschiedenen Konzentrationen der Oligopeptidgemische ließ sich ableiten, war aber nicht signifikant.

Somit konnte unsere Hypothese bestätigt und gezeigt werden, dass durch Hinzugabe des Oligopeptidgemisches zur Spüllösung die Tumorzelladhäsion während der transurethralen Resektion deutlich reduziert und somit die Rezidivrate des Harnblasenkarzinoms spezifisch gesenkt werden könnte.

VII Literaturverzeichnis

1. **Ahmed N, Riley C, Rice G, Quinn M:** Role of Integrin Receptors for Fibronectin, Collagen and Laminin in the Regulation of Ovarian Carcinoma Functions in Response to a Matrix Microenvironment.
Clin Exp Metastasis 2005;22(5):391-402.
2. **Andrieux A, Hudry-Clergeon G, Ryckewaert JJ, Chapel A, Ginsberg MH, Plow EF and Marguerie G:** Amino Acid Sequences in Fibrinogen Mediating Its Interaction With Its Platelet Receptor, GPIIb/IIIa.
Journal of Biological Chemistry 5-6, 1989;264(16):9258-65.
3. **Aumailley M and Smyth N:** The Role of Laminins in Basement Membrane Function.
J Anat Jul 1998;193 (Pt 1):1-21.
4. **Baronas-Lowell D, Lauer-Fields JL, Borgia JA, Sferrazza GF, Al-Ghoul M, Minond D, Fields GB:** Differential modulation of human melanoma cell metalloproteinase expression by alpha2 beta1 integrin and CD44 triple-helical ligands derived from type IV collagen.
J Biol Chem 2004 Oct 15; 279 (42): 43503-13.
5. **Beck K, Hunter I and Engel J:** Structure and Function of Laminin: Anatomy of a Multidomain Glycoprotein
FASEB J, Feb 1990; 4: 148.
6. **Belkin AM and Stepp MA:** Integrins As Receptors for Laminins.
Microsc Res Tech Nov 2000;51(3):280-301.
7. **Bichler KH, Harzmann R, Flüchter S H and Ergin M T:** Fortschritte der Transurethralen Elektroresektion des Harnblasenkarzinoms.
Urologe(A) 1982;21:12-9.
8. **Bichler K H, Strohmaier W L:** Operative Therapie des Harnblasenkarzinoms. In: Bichler KH, Flüchter SH and Strohmaier WL: Therapie des Harnblasenkarzinoms. Heidelberg: Springer Verlag; 1988. pp.24-36.

9. **Böhle A, Jocham D:** Mode of Action of Intravesical BCG Immunotherapy. In: Böhle A, Jocham D: Intravesical Immunotherapy with Bacillus Calmette-Guérin. München, Jena: Urban und Fischer Verlag; 2000 pp. 16-29

10. **Bouffioux C, Kurth K-H, Bono A, Oosterlinck W, Kruger CB, Pauw M and Sylvester R:** Intravesical Adjuvant Chemotherapy for Superficial Transitional Cell Bladder Carcinoma: Results of 2 European Organization for Research and Treatment of Cancer Randomized Trials With Mitomycin C and Doxorubicin Comparing Early Versus Delayed Instillations and Short-Term Versus Long-Term Treatment. Journal of Urology 1995;153:934-41.

11. **Boyd PJ and Burnand KG:** Site of Bladder-Tumour Recurrence. Lancet 1974;2:1290-2.

12. **Burnand KG, Boyd PJR, Mayo ME, Shuttleworth KED and LLOYD-Davies RW:** Single Dose Intravesical Thiotepa As an Adjuvant to Cystodiathermy in the Treatment of Transitional Cell Bladder Carcinoma. British Journal of Urology 1976;48:55-9.

13. **Calvete JJ, Schafer W, Mann K, Henschen A and Gonzalez-Rodriguez J:** TI - Localization of the Cross-Linking Sites of RGD and KQAGDV Peptides to the Isolated Fibrinogen Receptor, the Human Platelet Integrin Glycoprotein IIb/IIIa. Influence of Peptide Length. Eur. J. Biochem., Jun 1992; 206: 759

14. **Coplen DE, Marcus MD, Myers JA, Ratliff TL, Catalona WJ:** Long-term Follow Up of Patients Treated with 1 or 2, 6-week Courses of Intravesical Bacillus Calmette-Guérin: Analysis of Possible Predictors of Response Free of Tumor. Journal of Urology 1990; 144: 652-657

15. **Cutler SJ, Heney NM, Friedell GW:** Longitudinal study of patients with bladder cancer: Factors associated with disease recurrence and progression. In: Bonney W and Prout DR: Bladder Cancer. Baltimore: Williams and Wilkins; 1982. pp.35-46.

16. **Dolz R, Engel J and Kuhn K:** Folding of Collagen IV. Eur. J. Biochem., Dec 1988; 178: 357.

17. **Flüchter SH, Hlobil H, Harzmann R, Rothe K and Bichler KH:** Serum- und Gewebe-Mitomycin-C-Spiegel nach Intravesikaler Instillation. Urologia internationalis 1983;38:321.

18. **Gardiner RA, Seymour GJ, Lavin MF, Strutton GM, Gemmell E and Hazan G:**
Immunohistochemical Analysis of the Human Bladder.
British Journal of Urology 1986;58:19-25.

19. **Gilbert HA, Logan JL, Kagan AR, Friedman HA, Cove JK, Fox M, Muldoon TM, Lonni YW and Rowe JH:** The Natural History of Papillary Transitional Cell Carcinoma of the Bladder and Its Treatment in an Unselected Population on the Basis of Histological Grading.
Journal of Urology 1978;119:488-92.

20. **Grossman HB, Liebert M, Wedemeyer G, Wilson G and Flint A:** Fibronectin Distribution in Normal and Malignant Urothelium.
Journal of Urology 1990;143:418.

21. **Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D and Böhle A:**
Optimizing Syngeneic Orthotopic Murine Bladder Cancer (MB49).
Cancer Cancer Research 1999;59:2834-7.

22. **Hautanen A, Gailit J, Mann DM and Ruoslahti E:** Effects of Modifications of the RGD Sequence and Its Context on Recognition by the Fibronectin Receptor.
Journal of Biological Chemistry 25-1-1989;264(3):1437-42.

23. **Helpap B:** Pathologie der ableitenden Harnwege und der Prostata.
Berlin: Springer; 1989.

24. **Herr HW, Laudone VP, Whitmore WF:** An Overview of Intravesical Therapy for Superficial Bladder Tumors.
Journal of Urology 1987; 138:1363-68

25. **HeyderC, Gloria-Maercker E, Hatzmann W, Niggemann B, Zanker KS, Dittmar T:** Role of the beta1-integrin subunit in the adhesion, extravasation and migration of T24 human bladder carcinoma cells.
Clin Exp Metastasis 2005; 22(2): 99-106.

26. **Hemler ME, Elices MJ, Chan BM, Zetter B, Matsuura N and Takada Y:** Multiple Ligand Binding Functions for VLA-2 (Alpha 2 Beta 1) and VLA-3 (Alpha 3 Beta 1) in the Integrin Family.
Cell Differ.Dev. 1990;32:229-38.

27. **Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann MD, Hawkins IR and National bladder cancer collaborative group A:** Superficial Bladder Cancer: Progression and Recurrence.
Journal of Urology 1983;130:1083-6.

28. **Hermanek P and Sobin LH:** UICC TNM Classification of malignant tumours.
4. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1992

29. **Hoffmann S, He S, Jin M, Ehren M, Wiedemann P, Ryan SJ, Hinton DR:** A selective cyclic integrin antagonist blocks the integrin receptors $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ and inhibits retinal pigment epithelium cell attachment, migration and invasion.
BMC Ophthalmol. 2005 Jun 29; 5:16.

30. **Humphries MJ, Olden K and Yamada KM:** A Synthetic Peptide From Fibronectin Inhibits Experimental Metastasis of Murine Melanoma Cells.
Science 1986;233:467-70.

31. **Hyacinthe LM, Jarrett TW, Gordon CS, Vaughan ED and Whalen GF:** Inhibition of Bladder Tumor Cell Implantation in Cauterized Urothelium without Inhibition of Healing by a Fibronectin-Related Peptide (GRGDS).
Ann.Surg.Oncol. 1995;2:450-6.

32. **Hynes RO:** Fibronectine.
Spektrum der Wissenschaft 1986;8:80-90.

33. **Hynes RO:** Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion.
Cell 1992;69:11-25.

34. **Jocham D:** Maligne Tumoren der Harnblase. In: Jocham D and Miller K: Praxis der Urologie.
Stuttgart: Thieme Verlag; 1994. pp.49-115.

35. **Jost SP, Gosling JA and Dixon JS:** The Morphology of Normal Human Bladder Urothelium.
J.Anat. 1989;167:103-15.

36. **Kaubisch S, Lum BL, Reese J, Freiha F and Torti FM:** Stage T1 Bladder Cancer: Grade Is the Primary Determinant for Risk of Muscle Invasion.
Journal of Urology 1991;146:28-31.

37. **Komoriya A, Green LJ, Mervic M, Yamada SS, Yamada KM and Humphries MJ:** The Minimal Essential Sequence for a Major Cell Type-Specific Adhesion Site (CS1) Within the Alternatively Spliced Type III Connecting Segment Domain of Fibronectin Is Leucine-Aspartic Acid- Valine. *Journal of Biological Chemistry* 1991;266:15075-9.

38. **Kurth K-H, Schroeder FH, Debruyne FMJ, Senge T, Pavone-Macaluso M, de Pauw M, Ten Kate FJW, Sylvester R:** Long-term follow-up in superficial transitional cell carcinoma of the bladder: Prognostic factors for time to first recurrence, recurrence rate and survival. In: Alan R. Liss: Therapeutic progress in urological cancers. New York: 1989. pp.481-90.

39. **Lamm DL, Steg A, Boccon-Gibod L:** Complications of Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy: Review of 2602 Patients and Comparison of Chemotherapy Complications. *Prog Clin Biol Res* 1989; 310: 335-355

40. **Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J:** Integrating Cells into Tissues. In: *Molecular Cell Biology*. New York: W.H. Freeman and Company; 4th Edition, 2000. pp.968-89.

41. **Lum BL and Torti FM:** Adjuvant Intravesicular Pharmacotherapy for Superficial Bladder Cancer. *Journal National Cancer Institute* 1991;83:682-94.

42. **Lutzeyer W, Rübber H and Dahm H:** Prognostic Parameters in Superficial Bladder Cancer: An Analysis of 315 Cases. *Journal of Urology* 1982;127:250-2.

43. **McKeown-Longo PJ:** Fibronectin-Cell Surface Interactions. *Rev. Infect. Dis.* 1987;9:322-34.

44. **Morrison AS, Buring JE and Verhoek WG:** An International Study of Smoking and Bladder Cancer. *Journal of Urology* 1984;131:650-64.

45. **Murthy MS, Summaria LJ, Miller RJ, Wyse TB, Goldschmidt RA and Scanlon EF:** Inhibition of Tumor Implantation at Sites of Trauma by Plasminogen Activators. *Cancer Oct* 1991;68(8):1724-30.

46. **Müller F, Kraft R and Zingg EJ:** Exfoliative Cytology After Transurethral Resection of Superficial Bladder Tumours.
British Journal of Urology 1985;57:530-4.
47. **Oharazawa H, Ibaraki N, Ohara K, Reddy VN:** Inhibitory effects of Arg-Gly-Asp (RGD) peptide on cell attachment and migration in a human lens epithelial cell line.
Ophthalmic Res 2005 Jul-Aug; 37(4):191-6
48. **Oosterlinck W, Kurth K-H, Schröder F, Bultinck J, Hammond B, Sylvester R and members of the european organization for research on treatment of cancer:** A Prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group Randomized Trial Comparing Transurethral Resection Followed by a Single Intravesical Instillation of Epirubicin or Water in Single Stage Ta, T1 Papillary Carcinoma of the Bladder.
Journal of Urology 1993;149:749-52.
49. **Page BH, Levison VB and Curwen MP:** The Site of Recurrence of Non-Infiltrating Bladder Tumours.
British Journal of Urology 1978;50:237-42.
50. **Paulsson M:** Basement Membrane Proteins: Structure, Assembly, and Cellular Interactions.
Crit Rev Biochem Mol Biol Jan 1992;27(1-2):93-127.
51. **Pauwels RBE, Scheepers RFM and Smeets AWG:** Grading in Superficial Bladder Cancer. Morphological Criteria.
British Journal of Urology 1988;61:129-34.
52. **Pedchenko VK, Chetyrkin SV, Chuang P, Ham AJ, Saleem MA, Mathieson PW, Hudson BG, Voziyan PA:** Mechanism of perturbation of integrin-mediated cell-matrix interactions by reactive carbonyl compounds and its implication for pathogenesis of diabetic nephropathy.
Diabetes 2005 Oct; 54(10): 2952-60.
53. **Pedchenko V, Zent R, Hudson BG:** Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrins bind both the proximal RGD site and non-RGD motifs within noncollagenous (NC1) domain of the alpha3 chain of type IV collagen: implication for the mechanism of endothelial cell adhesion.
J Biol Chem. 2004 Jan 23;279(4):2772-80
54. **Pode D, Alon Y, Horowitz AT, Vlodaysky I, and Biran S:** The Mechanism of Human Bladder Tumor Implantation in an in Vitro Model.
Journal of Urology 1986;136:482-6.

55. **Rajala P, Liukkonen T, Raitanen M, Rintala E, Kaasinen E, Heise M, Lukkarinen O and The Finnbladder Group:** Transurethral Resection With Perioperative Instillation of Interferon-(Alpha) or Epirubicin for the Prophylaxis of Recurrent Primary Superficial Bladder Cancer: a Prospective Randomized Multicenter Study - Finnbladder III.
Journal of Urology 1999;161:1133-6.

56. **Rassweiler J, Eisenberger F:** Tumoren der Urogenitalorgane. In: Hofstetter AG: Urologie für die Praxis.
München: J.F. Bergmann Verlag; 1986. pp.119-38.

57. **Ratliff TL, Palmer JO, McGarr JA, Brown EJ:** Intravesical BCG therapy for murine bladder tumors: Initiation of the response by fibronectin-mediated attachment of BCG. Cancer Res. 1987, 47:1762-1766

58. **Rawls WH, Lamm DL, Eyolfson MF:** Systemic Complications in the Use of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) for non-invasive Transitional Cell Carcinoma.
Journal of Urology 1988; 139:300A

59. **Rehn L:** Ueber Blasentumoren Bei Fachsinarbeitern.
Arch.Kind.Chir. 1895;50:588-91.

60. **Renner C, Sacca B, Moroder L:** Synthetic heterotrimeric collagen peptides as mimics of cell adhesion sites of the basement membrane.
Biopolymers 2004;76(1):34-47.

61. **Robert Koch Institut:** Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie.
www.rki.de

62. **Ruoslahti E and Pierschbacher MD:** Arg-Gly-Asp: a Versatile Cell Recognition Signal.
Cell 1986;44:517-8.

63. **Ruoslahti E and Pierschbacher MD:** New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins. Science 1987;238:491-7.

64. **Rübben H, Graf-Dobberstein C, Ostwald R, Stauffenberg A, Jaeger N, Deutz FJ, Steffens L, Gianni G:** Prospective randomized study of adjuvant therapy after complete resection of superficial bladder cancer after complete resection of superficial bladder cancer; Mitomycin C vs. BCG Connaught vs. TUR alone. In: deKernion JB: Immunotherapy of urologic tumours.
New York: Churchill Livingstone; 1990. pp.27-36.

65. **Rübben H, Otto T:** Harnblasenkarzinome. In: Rübben H: Uro-Onkologie. Berlin: Springer Verlag; 1993. pp.79-147.
66. **Sarosdy MF, Lamm DL:** Long-term Results of Intravesical Bacillus Calmette-Guérin Therapy for Superficial Bladder Cancer. Journal of Urology 1989; 142: 719-22
67. **See WA and Chapman WH:** Tumor Cell Implantation Following Neodymium-YAG Bladder Injury: a Comparison to Electrocautery Injury. Journal of Urology 1987; 137:1266-9.
68. **See WA and Chapman WH:** Heparin Prevention of Tumor Cell Adherence and Implantation on Injured Urothelial Surfaces. Journal of Urology. 138:182-186, 1987
69. **See WA, Chapman WH, Williams RD:** Kinetics of transitional tumor cell line 4909 adherence to injured urothelial surfaces in F-344 rats. Cancer Research 1990, 50:2499-2504
70. **See WA, Miller,JS and Williams RD:** Pathophysiology of Transitional Tumor Cell Adherence to Sites of Urothelial Injury in Rats: Mechanisms Mediating Intravesical Recurrence Due to Implantation. Cancer Research 1989; 49:5414-5418
71. **See WA, Rohlf DP and Crist SA:** In Vitro Particulate Adherence to Fibronectin: Correlation With in Vivo Particulate Adherence to Sites of Bladder Injury. Journal of Urology 1992;147:1416-23.
72. **See WA and Williams RD:** Urothelial Injury and Clotting Cascade Activation: Common Denominators in Particulate Adherence to Urothelial Surfaces. Journal of Urology 1992;147:541-8.
73. **Shapiro A, Kelley DR, Oakley DM, Catalona WJ and Ratliff TL:** Technical Factors Affecting the Reproducibility of Intravesical Mouse Bladder Tumor Implantation During Therapy With Bacillus Calmette-Guerin. Cancer Research 1984;44:3051-4.

74. **Shapiro A, Ratliff TL, Oakley DM, Catalona WJ:** Reduction of bladder tumor growth in mice treated with intravesical bacillus Calmette-Guerin and its correlation with bacillus Calmette-Guerin viability and natural killer cell activity. *Cancer Res* 1983; 43:1611-1615
75. **Sidransky D, Frost P, Von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger AC and Vogelstein B:** Clonal Origin Bladder Cancer. *New England Journal of Medicine* Mar 1992;326:737-40.
76. **Soloway MS and Ford KS:** Thiotepa-Induced Myelosuppression: a Review of 670 Bladder Instillations. *Journal of Urology* 1983;130:889-91.
77. **Soloway MS and Masters S:** Urothelial Susceptibility to Tumor Cell Implantation. Influence of Cauterization. *Cancer* 1980;46:1158-62.
78. **Steg A, Leleu C, Debre B:** Systemic Bacillus Calmette-Guérin Infection in Patients treated by Intravesical BCG Therapy for Superficial Bladder Cancer. *Prog Clin Biol Res* 1989; 310:325-34
79. **Summerhayes IC and Franks LM:** Effects of Donor Age on Neoplastic Transformation of Adult Mouse Bladder. *Journal National Cancer Institute* 1979;62:1017-23.
80. **Tian B, Li Y, Ji XN, Chen J, Xue Q, Ye SL, Liu YK, Tang ZY:** Basement membrane proteins play an active role in the invasive process of human hepatocellular carcinoma cells with high metastasis potential. *Cancer Res Clin Oncol* 2005 Feb; 131 (2): 80-6
81. **Tolley DA, Parmar MKB, Grigor KM, Lallemand G and the medical research council superficial bladder cancer working party:** The effect of intravesical Mitomycin C on Recurrence of Newly Diagnosed Superficial Bladder Cancer: A Further Report With 7 Years of Followup. *Journal of Urology*, 1996; 155:1233-1238
82. **Tranqui L, Andrieux A, Hudry-Clergeon G, Ryckewaert JJ, Soyez S, Chapel A, Ginsberg MH, Plow EF and Marguerie G:** Differential Structural Requirements for Fibrinogen Binding to Platelets and to Endothelial Cells. *The Journal of Cell Biology* Jun 1989;108(6):2519-27.

83. **Utz DC, Farrow GH, Rife CC, Segura JW, and Zincke M:** Carcinoma in Situ of the Bladder. *Cancer* 1980;45:1842-8.

84. **van der Rest M and Garrone R:** Collagen Family of Proteins.

85. **Vlodavsky I, Lui GM, and Gospodarowicz D:** Morphological Appearance, Growth Behaviors and Migratory Activity of Human Cells Maintained on Extracellular Matrix Versus Plastic. *Cell* 1980;19:607.

86. **Weldon TE and Soloway MS:** Susceptibility of Urothelium to Neoplastic Cellular Implantation. *Urology* 1975;5:824-7.

87. **Weyrauch HM and Crossfield JH:** Dissemination of Bladder Neoplasms by Endoscopic Electroresection. *Journal of Urology* 1962;87:391-5.

88. **Whalen GF and Ingber DE:** Inhibition of Tumor-Cell Attachment to Extracellular Matrix As a Method for Preventing Tumor Recurrence in a Surgical Wound. *Ann.Surg* 1989;210:758-64.

89. **Yamada KM:** Adhesive Recognition Sequences. *Journal of Biological Chemistry* 1991;266:12809-12.

90. **Yurchenco PD and Ruben GC:** Basement Membrane Structure in Situ: Evidence for Lateral Associations in the Type IV Collagen Network. *The Journal of Cell Biology* Dec 1987;105(6):2559-68.

91. **Zetter BR:** Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol.* 1993 Aug; 4 (4): 215-8

92. **Zincke H, Utz DC, Taylor WF, Myers RP and Leary FJ:** Influence of Thiotepa and Doxorubicin Instillation at Time of Transurethral Surgical Treatment of Bladder Cancer on Tumor Recurrence: a Prospective Randomized Double-Blind Controlled Trial. *J Urol* 1983;129:505-9.

VIII Danksagungen

Frau Irina Deinert und Frau Judith Arnold (Forschungszentrum Borstel) danke ich für die Kultur und Präparation der verwendeten Tumorzellen.

Herrn Prof. Dr. med. W. Kühnel (em. Direktor des Instituts für Anatomie der Medizinischen Universität zu Lübeck) und seiner Mitarbeiterin H. Brummert danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung und Färbung von Schnittpräparaten.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. physiol. H.-J. Friedrich vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Medizinischen Universität zu Lübeck danke ich für die ausführliche Beratung in statistischen Fragen.

Herrn Dr. med. M. Frambach und Dr. med. A. Jurczok ehemalige Oberärzte der Klinik für Urologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei Planung und Durchführung der Versuche.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. med. A. Böhle, ehemaliger Oberarzt der Klinik für Urologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und für seinen Rat und seine Unterstützung, die er mir bei der Anfertigung der Dissertation gewährte. Außerdem danke ich für die Koautorenschaft zweier Veröffentlichungen.

IX Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Maghsoudi (geborene Wulf)
Vorname: Tina
Geburtsdatum/-ort: 03.12.1974, Lübeck
Anschrift: Hummelsbüttler Hauptstraße 38a
22339 Hamburg
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1981-1985 Grundschule Scharbeutz
1985-1994 Ostseegymnasium Timmendorfer-Strand
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

ab 1994 Studium der Medizin an der Universität zu Lübeck
1996 Ärztliche Vorprüfung
1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999-2000 Praktisches Jahr:
University of Natal, Addington Hospital, Südafrika (Chirurgie, Innere
Medizin)
Harvard University, Children's Hospital, USA (Wahlfach: Urologie)
Universitätsklinik Lübeck (Innere Medizin)
2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote:Gut)

Famulaturen: Universitätsklinik Lübeck (Abteilung für Urologie)
Wycombe General Hospital, High Wycombe, England (chirurgische
Notaufnahme)
Dres. Keßeböhmer, Meiners, Münch (Radiologische Praxis)
Städtisches Krankenhaus Süd (Viszeralchirurgie)

Dissertation: Modulation der Tumorzelladhäsion beim Blasenkarzinom durch
Oligopeptide: Untersuchungen am orthotopen murinen
Harnblasenkarzinommodell
Experimenteller Teil 1998 - 2000

Berufliche Tätigkeit:

Juli 2001-Jan. 2003 AIP in der Abteilung für Chirurgie, Asklepios Klinik Bad Oldesloe
seit Feb. 2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie und
Viszerale Transplantation,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Publikationen:

T. Wulf, J.-H. Günther, M. Frambach, D. Jocham, A. Böhle
„The Syngeneic Orthotopic Murine Bladder Cancer Modell (MB49):
Optimization Of Technique And Extension To Further Applications“ Poster
ESUOE-Kongress, Innsbruck, 1998

Spitzbarth-Preis 1999

J.-H.Günther, A. Jurczok, T. Wulf, S. Brandau, I. Deinert, D. Jocham, A.
Böhle
„Optimizing Syngeneic Orthotopic Murine Bladder Cancer“
Cancer Research 59, 2834-2837, June 15, 1999

Nitze-Preis 2000

A. Böhle, A. Jurczok, P. Ardelt, T. Wulf, A. J. Ulmer, D. Jocham, S.
Brandau
„Inhibition Of Bladder Carcinoma Cell Adhesion By Oligopeptide
Combinations In Vitro And In Vivo“
Journal Of Urology, 2002 Jan; 167(1):357-63

J.Y. Lai, C.Y.Yoon, J.J. Yoo, T.Wulf, A. Atala
“Phenotypic and functional characterization of in vivo tissue engineered
smooth muscle from normal and pathological bladders.”
Journal Of Urology, 2002 Oct.; 168 (4Pt2):1853-7; discussion 1858

T. Wulf, G. Fröschele
„Kurioses vom Meckel'schen Divertikel“
Falldemonstration, Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen

T. Wulf, G. Fröschele
„Die Rache des Sushi?!“
Falldemonstration, Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen

T.Wulf, D. Bröring, X. Rogiers
“Management von zusätzlichen iatrogenen Gefäßverletzungen im Rahmen
der Cholezystektomie”
Falldemonstration, Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen

T.Wulf, D. Bröring, X. Rogiers
„Bedeutung und Management von zusätzlichen Gefäßverletzungen bei
iatrogenen Gallengangsverletzungen“
Präsentation 122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

U.M. Gehling, M. Willems, M. Dandri, J. Petersen, M. Berna, M. Thill, T.
Wulf, L. Müller, J.M. Pollok, C. Faltz, D.K. Hossfeld, X. Rogiers
„Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of
haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors“
Journal of Hepatology 43 (2005) 845-853

X Veröffentlichungen

Teilergebnisse der Arbeit wurden unter den nachfolgend aufgeführten Literaturangaben veröffentlicht.

Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D and Böhle A

Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49).

Cancer Res. 59: 2834-2837, 1999

Böhle A, Jurczok A, Ardelit P, Wulf T, Ulmer AJ, Jocham D and Brandau S

Inhibition of bladder carcinoma cell adhesion by oligopeptide combinations in vitro and in vivo.

Journal of Urology 167:357-363, 2002