

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß und Thoraxchirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

**DISSERTATION**

**Der Einfluss der intraperitonealen und intravenösen Applikation von Taurolidin und  
der Kombination von Taurolidin/Heparin in der laparoskopischen und  
konventionellen Chirurgie auf das intra- und extraperitoneale Tumorwachstum bei  
Ratten.**

**Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Chris Braumann  
aus Torgau

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter:       1. PD Dr. med. C.A. Jacobi  
                      2. Prof. Dr. med. B. Reith  
                      3. PD Dr. med. L. Krähenbühl

Datum der Promotion: 08.07.02

## **Zusammenfassung**

Experimentelle Studien zeigten, dass durch die perioperative, intraperitoneale Therapie antiadhärenter und zytotoxischer Substanzen das intra- und extraperitoneale Tumorwachstum nach Operationen vermindert werden kann.

Nach intraperitonealen und subkutanen Applikationen von 104 Tumorzellen (DHD/K12/TRb) wurden BD IX Ratten in 14 Gruppen randomisiert: 7 Gruppen wurden mit CO<sub>2</sub> laparoskopiert und 7 konventionell operiert. Die Operationszeiten betragen 30 Minuten. Am Ende der Intervention wurde Ringerlösung, Taurolidin oder Taurolidin/Heparin intraperitoneal oder in die V. femoralis appliziert. Die Veränderungen des Differentialblutbildes auf das Operationstrauma und auf die Applikation der therapeutischen Substanzen wurden ermittelt.

Taurolidin und die zusätzliche Therapie mit Heparin reduzierten im Tierexperiment nach intraperitonealer sowie simultaner intraperitonealer und intravenöser Therapie das intraperitoneale Tumorwachstum und die Inzidenz von Trokar- beziehungsweise Inzisionsmetastasen. Die intravenöse Therapie von Taurolidin und der Kombination aus Taurolidin/Heparin hatte keinen tumorsupprimierenden Effekt. Die Verschiebungen der Leukozytenzahlen des Differentialblutbildes wurden hauptsächlich durch das Operationstrauma bewirkt. In diesem Tierversuch wurden nach der Therapie mit Taurolidin und der Kombination mit Heparin keine Nebenwirkungen beobachtet.

## **Abstract**

Following subcutaneous and intraperitoneal injection of 104 colon adenocarcinoma cells (DHD/K12/TRb) the influences of both taurolidine or taurolidine/heparin on intraperitoneal and subcutaneous tumor growth was investigated in 210 rats undergoing midline laparotomy or insufflation with carbon dioxide. The animals were randomized into 14 groups. To investigate the intraperitoneal (local) influence of either taurolidine or heparin on tumor growth the substances were applied intraperitoneally. Systemic and intraperitoneal effects were evaluated after intravenous injection of the substances. Both application forms were also combined to analyze synergistic effects. Tumor weights, as well as the incidence of abdominal wound metastases were determined four weeks after the intervention. In order to evaluate the effects of the agents blood was taken to determine the peripheral leukocytes counts.

Intraperitoneal therapy of either taurolidine or in combination with heparin inhibits local tumor growth and abdominal wound recurrences in rats undergoing midline laparotomy or insufflation with carbon dioxide. Neither the intraperitoneal nor the intravenous application or the combination of the two agents did influence the subcutaneous tumor growth. The substances did not alter the changes of peripheral leukocytes.

Schlagwörter:

Taurolidin, Heparin, Tumorwachstum, Leukozyten, Ratten

Keywords:

taurolidine, heparin, tumor growth, leukocytes, rats

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielstellung	4
3	Methodik	6
3.1	Die Tierhaltung und die Tierpflege	6
3.2	Die Zelllinie	6
3.3	Das Studiendesign	7
3.4	Taurolidin und Heparin zur Verhinderung von Tumormetastasen in der Laparoskopie mit Kohlendioxid	7
3.5	Taurolidin und Heparin zur Verhinderung von Tumormetastasen in der offenen Chirurgie	8
3.6	Das Differentialblutbild unter der Therapie	9
3.7	Die Bestimmung des intraperitonealen und subkutanen Tumorgewichtes	9
3.8	Die Dokumentation der Daten und die statistische Auswertung	10
4	Ergebnisse	11
4.1	Taurolidin und Heparin zur Verhinderung von Tumormetastasen in der Laparoskopie mit Kohlendioxid	11
4.1.1	intraperitoneale Tumorwachstum	11
4.1.2	Das subkutane Tumorwachstum	13
4.1.3	Die Inzidenz von Trokarmetastasen	15
4.1.4	Die perioperativen Leukozyten	15
4.1.5	Die perioperativen Lymphozyten	17
4.1.6	Die perioperativen Granulozyten	19
4.2	Taurolidin und Heparin zur Verhinderung von Tumormetastasen in der offenen Chirurgie	21
4.2.1	Das intraperitoneale Tumorwachstum	21
4.2.2	Das subkutane Tumorwachstum	23
4.2.3	Inzisionsmetastasen in der offenen Chirurgie	24
4.2.4	Die perioperativen Leukozyten	25
4.2.5	Die perioperativen Lymphozyten	27
4.2.6	Die perioperativen Granulozyten	29

4.3	Direkter Vergleich des Tumorwachstums nach der Therapie mit Taurolidin und Heparin nach der Laparoskopie und der offenen Operation	31
4.3.1	Das intraperitoneale Tumorwachstum	31
4.3.2	Das subkutane Tumorwachstum	32
4.3.3	Das Tumorwachstum an den Inzisionen	32
5	Diskussion	33
6	Zusammenfassung und Ausblick	46
7	Abkürzungsverzeichnis	49
8	Literatur	50
8.1	Eidesstattliche Erklärung	59
8.2	Danksagungen	60
8.3	Lebenslauf	61
8.4	Publikationsverzeichnis	62

#### Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Intraperitoneales Tumorgewicht nach Kohlendioxidinsufflation und Therapie mit Taurolidin, * $p < 0,05$ ip, simultan ipiv versus laparoskopischer Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	11
Abb. 2:	Intraperitoneales Tumorgewicht nach Kohlendioxidinsufflation und Therapie mit der Kombination aus Taurolidin/Heparin im Vergleich zur laparoskopischen Kontrollgruppe, * $p < 0,05$ ip, ipiv versus laparoskopischer Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	13
Abb. 3:	Subkutanes Tumorgewicht nach Kohlendioxidinsufflation und Therapie mit Taurolidin im Vergleich zur laparoskopischen Kontrollgruppe, $p = ns$ , NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	13
Abb. 4:	Subkutanes Tumorgewicht nach Kohlendioxidinsufflation und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin im Vergleich zur laparoskopischen Kontrollgruppe, $p = ns$ , NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	14
Abb. 5:	Perioperative Leukozyten nach Kohlendioxidinsufflation und alleiniger Therapie mit Taurolidin, $p = ns$ , NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	16
Abb. 6:	Perioperative Leukozyten nach Kohlendioxidinsufflation und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, * $p = 0.01$ ip versus Kontrolle, ** $p < 0.01$ ip	

	versus iv, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	17
Abb. 7:	Perioperative Lymphozytenverläufe nach Insufflation mit Kohlendioxid und Therapie mit Taurolidin, * $p < 0.05$ alle Gruppen 2 Stunden postop. versus präop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	18
Abb. 8:	Perioperative Lymphozytenverläufe nach Insufflation mit Kohlendioxid und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, * $p < 0.05$ alle Gruppen 2 Stunden postop. versus präop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	19
Abb. 9:	Perioperative Granulozyten nach Kohlendioxidinsufflation und alleiniger Therapie mit Taurolidin, * $p = 0.02$ ip versus Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	20
Abb. 10:	Perioperative Granulozyten nach Kohlendioxidinsufflation und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, * $p < 0.01$ Therapiegruppen versus Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	21
Abb. 11:	Intraperitoneales Tumorgewicht nach medianer Laparotomie und Therapie mit Taurolidin, * $p < 0.05$ ip, ipiv versus konventioneller Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	22
Abb. 12:	Intraperitoneales Tumorgewicht nach medianer Laparotomie und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, * $p < 0.05$ ip, ipiv versus konventioneller Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	22
Abb. 13:	Subkutanes Tumorgewicht nach medianer Laparotomie und Therapie mit Taurolidin im Vergleich zur konventionellen Kontrollgruppe, $p = ns$ , NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	23
Abb. 14:	Subkutanes Tumorgewicht nach medianer Laparotomie und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin im Vergleich zur konventionellen Kontrollgruppe, $p = ns$ , NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	24
Abb. 15:	Perioperative Leukozyten nach medianer Laparotomie und alleiniger Therapie mit Taurolidin, * $p < 0.05$ Kontrollgruppe und Therapiegruppen präop. versus allen Messzeitpunkten ab 2. postop. Tag, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	26
Abb. 16:	Perioperative Leukozyten nach medianer Laparotomie und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, * $p < 0.05$ Kontrollgruppe und Therapiegruppen präop. versus allen Meßzeitpunkten ab 2. postop. Tag, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	27
Abb. 17:	Perioperative Lymphozytenverläufe nach medianer Laparotomie und alleiniger Therapie mit Taurolidin, * $p < 0.05$ Therapiegruppen 2 Stunden postop. versus	

	präop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	28
Abb. 18:	Perioperative Lymphozytenverläufe nach medianer Laparotomie und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, * p<0.05 Kontrolle, iv und ipiv 2 Stunden postop. versus präop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	28
Abb. 19:	Perioperative Granulozyten nach medianer Laparotomie und Therapie mit Taurolidin, * p<0.05 Kontrollgruppe, ip und ipiv präop. versus 2 h postop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	29
Abb. 20:	Perioperative Granulozyten nach medianer Laparotomie und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, * p<0.05 Kontrollgruppe, ip und ipiv präop. versus 2 h postop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)	30

#### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Inzidenz von Trokarmetastasen nach intraperitonealer und subkutaner Tumorzellapplikation und Pneumoperitoneum mit CO <sub>2</sub> (30 Minuten, 8 mmHg) 28 Tage nach dem Eingriff (n = 15)	15
Tabelle 2:	Inzidenz von Metastasen der ehemaligen Laparotomiewunde nach intraperitonealer und subkutaner Tumorzellapplikation 28 Tage nach dem Eingriff (n = 15)	25

# 1 Einleitung

Die Pathogenese lokoregionärer Rezidive und Bauchwandmetastasen nach Resektionen maligner, abdominaler Tumoren ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Unabhängig von den unterschiedlichen chirurgischen Fachdisziplinen wurden Rezidive oder Fernmetastasen nach Resektionen von malignen abdominalen Tumoren beschrieben. Neben den lokoregionären Rezidiven, scheint die Tumorzeldissimination mit anschließender Implantation von Tumorzellen in ehemaligen Wundbereichen für das Auftreten von Fernmetastasen eine wesentliche Rolle zu spielen.

Besonders nach der Einführung der Laparoskopie wurden vermehrt sogenannte Trokarmetastasen, Tumorabsiedlungen in den Inzisionsstellen der eingebrachten Trokare beschrieben. Obwohl zunächst angenommen wurde, dass hierfür hauptsächlich die Laparoskopie, die Verwendung von Kohlendioxid und ein erhöhter intraabdomineller Druck verantwortlich gemacht werden können, ist in der klinischen Situation hauptsächlich die chirurgische Manipulation und eine hierdurch bedingte Tumorzellverschleppung auslösender Faktor [16-18,22,42,95]. Somit ist der Chirurg sowohl in der laparoskopischen als auch konventionellen Resektion maligner Tumoren der Haupteinflussfaktor für die Entstehung von Metastasen und bestimmt damit auch maßgeblich die Prognose des Patienten. Insgesamt muss jedoch festgehalten werden, dass die alleinige Anwesenheit von malignen Zellen in der Abdominalhöhle noch nicht zu einer unumgänglichen Metastasierung oder gar einer Peritonealkarzinose führt. Vielmehr haben freie, vitale Tumorzellen die Potenz zu adhären, zu wachsen, zu emigrieren und wiederum Metastasen zu bilden [30]. Überschreitet hierbei das Wachstum eine Tumorknotengröße von  $2-3 \text{ mm}^3$  so spielt zusätzlich die Neovaskularisation eine wesentliche Rolle in der Versorgung und Ernährung der gebildeten Metastase [77]. Diese Prozesse können bei chirurgischen Interventionen von unterschiedlichsten Faktoren, wie der vermehrten Ausschüttung und Bildung von Interleukinen und Wachstumsfaktoren nach Gewebetraumata, erhöhte Stressreaktion während und nach Operationen, einer Adzidose durch Kohlendioxidinsufflation, einem erhöhten intraabdominellen Druck und anderen Faktoren beeinflusst werden [14,29]. Im Abdomen führt besonders die Verletzung der Peritonealoberfläche zu einer vermehrten Adhärenz von Tumorzellen und konsekutiv zu einer erhöhten Metastasierung [25,26,77]. Die erhöhte Adhäsionsbereitschaft von Tumorzellen auf verletztem Peritoneum wird im Vergleich zu unverletztem Peritoneum

durch eine vermehrte Expression extrazellulärer Proteine, wie Laminin, Fibronectin und Vitronectin, auf der Zellmembran erklärt [15,31,77]. In verschiedenen Tierexperimenten wurde deshalb Heparin zur Verhinderung von Tumormetastasen eingesetzt. Die antiadhärente Wirkung wurde durch die unspezifische Bindung von Heparin, einem sulfatierten Glukosaminoglykan, an Rezeptoren erklärt [26,44]. Hierbei führte die alleinige intraperitoneale Applikation von Heparin zu einer signifikanten Reduktion des Tumorgewichtes unterschiedlicher Tumorzellen [65]. Die antitumoröse Wirkung wurde in beiden Studien durch eine Verminderung der Adhäsion und der Implantation freier Tumorzellen erklärt, ein wachstumssupprimierender Einfluss von Heparin wurde in vitro nicht gefunden und scheint auch eher unwahrscheinlich [46]. Durch die Kombination von Heparin mit anderen zytotoxischen Substanzen konnte zudem bei lokaler Anwendung in Zellexperimenten und in unterschiedlichen Tierversuchen eine Wirkungsverstärkung beobachtet werden [44].

Wie bereits erwähnt, stellt die Entstehung von Metastasen ein multifaktorielles Geschehen dar und wird durch eine Vielzahl von Faktoren, wie beispielweise der Expression von Zytokinen, beeinflusst. Ein potenter, physiologischer Wachstumsfaktor ist Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), welches sowohl in Monozyten als auch in Peritonealmakrophagen synthetisiert wird [4,55,102]. Bei der Entstehung von Metastasen könnte IL-1 $\beta$  einen direkten Einfluss auf die freien Tumorzellen haben und das Wachstum stimulieren. Therapeutisch wäre bei diesem Pathomechanismus die Supprimierung der Zytokinproduktion oder eine direkte Blockung der bereits exprimierten Zytokine denkbar. Eine Substanz, welche sowohl antiadhärent und zytotoxisch wirkt sowie die Produktion von IL-1 $\beta$  signifikant vermindert, ist Taurolidin, ein Derivat der Aminosäure Taurin. In mehrere tierexperimentellen Studien konnte bereits der tumorsupprimierende Effekt dieser Substanz nachgewiesen werden [4,46,67]. Taurolidin wird bereits seit 1975 in der septischen Abdominalchirurgie und seit 1980 in der Traumatologie erfolgreich als chirurgische Spüllösung zur Behandlung von Infektionen angewandt. Es wird aufgrund der in-vitro bestimmten Abtötungszeit für Bakterien nicht zu den Antiseptika, sondern zu den lokal und systemisch wirksamen Chemotherapeutika gezählt [6,87]. Die Bildung von Taurolidin erfolgt durch Kondensation zweier Moleküle Taurin mit drei Molekülen Formaldehyd. Es unterliegt in Lösung der Hydrolyse und befindet sich im Gleichgewicht mit Taurultam und Methylo-Taurultam. In-vivo führten proteinhaltige, biologische Flüssigkeiten (Peritonealflüssigkeit, Wundsekret oder Pus) aufgrund vorhandener Enzyme nach dem Kontakt mit Taurolidin sogar zu einer

Verstärkung seiner antibakteriellen Wirkung um den Faktor vier bis acht [4]. Bei Bakterien wurde nachgewiesen, dass Taurolidin durch eine Übertragung von Hydroxymethyl-Gruppen an der Zellwand zu einer Hemmung der Teilung des Bakteriums führt [4,87]. Der Pathomechanismus, der bei Taurolidin, beziehungsweise seinen Mediatoren, zu einer Suppression des Tumorwachstums führt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Denkbar ist jedoch ein ähnlicher Wirkmechanismus, wie er an Bakterien nachgewiesen wurde. Möglich ist weiterhin, dass eine intraperitoneale Wachstumshemmung der Tumorzellen direkt an den Zellen selbst, oder durch eine verminderte, lokale Synthese von Interleukinen erzielt wird. Die Besonderheit dieser neuartigen Therapie scheint gerade in den unterschiedlichen Wirkungsmechanismen zu liegen, welche scheinbar unabhängig von der zugrundeliegenden Tumorart zu einer Wachstumssuppression der Tumorzellen beziehungsweise der Tumormetastasen führen [44,46]. Hierbei wurde Taurolidin zunächst lokal im Abdomen therapeutisch eingesetzt. Intraperitoneal instillierte, lösliche Substanzen können allerdings auch resorbiert werden und hierdurch systemisch wirksam werden. Es ist durchaus denkbar, dass Taurolidin und Heparin selbst bei lokaler Applikation hauptsächlich systemisch wirken und hierdurch das Tumorwachstum hemmen. Die Pharmakokinetik ist allerdings noch nicht bekannt und wurde im Tierversuch noch nicht auf ihre Wirksamkeit überprüft. Beim Menschen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass intraperitoneale Instillationen von Taurolidin und seinen Metaboliten bis zu 20 Stunden im Kreislauf messbar waren.

Zusätzlich wurden die Medikamente durch eine direkte intravenöse Injektion auf ihre systemischen Nebenwirkungen untersucht. Hierbei sind selbst bei hohen Dosierungen außerordentlich geringe unerwünschte Wirkungen beschrieben worden [52]. Bisher ist jedoch nicht geklärt, ob die Plasmakonzentrationen zytotoxisch wirksam sind und unerwünschte Wirkungen nach längerer Therapie zunehmen können [4]. Es ist demzufolge unklar, ob metastatische Tumorprogressionen sowohl durch lokale, intraperitoneale oder intravenöse Applikationen von Taurolidin, Heparin oder der Kombination aus Taurolidin und Heparin vermindert werden können.

Ebenfalls ungeklärt ist der Einfluss des intraabdominellen Milieus bei verschiedenen Operationstechniken auf die Wirksamkeit der Substanzen. So ist es durchaus denkbar, dass die Insufflation von Kohlendioxid bei der Laparoskopie im Vergleich zur konventionellen Laparotomie zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Tumorsupprimierung führt. Experimentelle Daten oder gar klinische Ergebnisse, die den Effekt der antiadhärenten und

zytotoxischen Substanzen Taurolidin und Heparin bei unterschiedlichen Operationsbedingungen untersuchen, liegen zur Zeit nicht vor. Allerdings ist aus Zellexperimenten bekannt, dass die Inkubation von Tumorzellen mit Kohlendioxid eine Zunahme des Zellwachstums zur Folge hat [45]. Maligne Zellen wachsen optimal in Zellzuchtinkubatoren. Hier liegt die Temperatur bei 37°C und der Kohlendioxidanteil beträgt im Gegensatz zur Umgebungsluft 5%. Das ist gegenüber der Atmosphäre 125fach erhöht. Das Kohlendioxid wird über die Zellen, beziehungsweise Nährmedien, aufgenommen und führt zu einer milden Azidose. Unter diesen Bedingungen kommt es zu kürzeren Proliferationszeiten, was aufgrund der höheren Zellteilungsraten ein vermehrtes Tumorwachstum bedeutet. In der Klinik hat sich jedoch Kohlendioxid als Insufflationsgas für laparoskopische Operationen durchgesetzt und wird am häufigsten verwendet. Da die Körpertemperatur ebenfalls bei 37°C liegt, scheint es denkbar, dass eine temporäre Stimulation vitaler, durch die Operation mobilisierter Tumorzellen durch das Insufflationsgas des angelegten Pneumoperitoneums möglich ist. Bisher konnten die experimentellen Ergebnisse jedoch nicht in klinischen Studien bestätigt werden. Trotzdem ist bei intraoperativen intraperitonealen Applikationen von Taurolidin oder Heparin eine Beeinflussung des antitumorösen Effektes möglich. Gleichzeitig könnte eine solche Beeinflussung durch die systemische Gabe der Substanzen verhindert werden.

## **2 Zielstellung**

In einem Tierexperiment sollen die beiden Substanzen Taurolidin und Heparin hinsichtlich ihrer tumorsupprimierenden Eigenschaften beim Colonkarzinom untersucht werden. Hierbei soll sowohl die Applikationsform (intraperitoneal versus systemisch versus der Kombination aus intraperitoneal und systemisch) als auch der Wirkungsort (lokale intraperitoneale Metastasen versus subkutaner Fernmetastasen) analysiert werden. Da im klinischen Alltag Tumoroperationen sowohl konventionell (Laparotomie) als auch laparoskopisch (Insufflation von Kohlendioxid) durchgeführt werden, sollen in diesem Experiment zusätzlich in zwei Armen beide Operationstechniken in Kombination mit der Therapie aus Taurolidin beziehungsweise der Kombination aus Taurolidin und Heparin analysiert und verglichen werden.

Hierzu wurde ein Rattenmodell (BD IX Ratte) verwendet, welches in mehreren Vorexperimenten validiert wurde und sich für die Untersuchung von Tumorwachstum und

möglichen Therapien eignet [43,44,46,47]. Alle Ratten erhielten eine sterile Injektion von  $10^4$  Colonkarzinonzellen (DHD/K12/TRb) intraperitoneal sowie subkutan am Rücken, um lokales intraperitoneales Tumorwachstum und das Wachstum einer Fernmetastase im Subkutangewebe untersuchen zu können. Anschließend wurden die Tiere zunächst in zwei Operationsgruppen unterteilt: Laparoskopie unter Verwendung von Kohlendioxid (30 min., 8 mmHg) versus medianer Laparotomie und Verschuß nach 30 Minuten. In jeder Operationsgruppe wurden nun die unterschiedlichen Kombinationen und Applikationsformen der Substanzen getestet und verglichen. Hierdurch sollten sowohl der Einfluss der Applikationsart, der Substanzenkombination sowie mögliche synergistische Effekte analysiert werden.

## **3 Methodik**

### **3.1 Die Tierhaltung und die Tierpflege**

Alle Tiere (210 BD IX-Ratten, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden 14 Tage vor dem geplanten Eingriff in einem eigens für Kleintiere vorgesehenen und klimatisiertem Raum (Temperatur 22-24 °C, Luftfeuchtigkeit 50-60%) untergebracht. Damit wurde eine Gewöhnung der Tiere untereinander sowie an ihre neue Umgebung gewährleistet. Am Operationstag wurden nur die Tiere nüchtern belassen, welche unmittelbar operiert wurden. Postoperativ wurden die Tiere für drei Stunden engmaschig überwacht. Die Tiere konnten Wasser und Futterpellett (Standardfutter) nach belieben zu sich nehmen. Bei den Blutabnahmen erfolgten Gewichtsbestimmungen, die das regelrechte Wachstum der Tiere ermittelten. Nach 28 Tagen wurden die Tiere durch Pentobarbital getötet und durch einen Untersucher obduziert. Die Lagerung der Kadaver erfolgte bis zur sachgerechten Abholung der Tierkörperverwertung bei -21°C.

### **3.2 Die Zelllinie**

Die verwendeten syngenetischen Zellen (DHD/K12/TRb) (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, United Kingdom) wurden in Dulbeccos MEM (Biochrom, Deutschland) und HAMs F10-Medium (Biochrom, Deutschland) 1:1 mit 10%igem fetalem Rinderserum (Dibco BRL, Deutschland), 2 mmol/l Glutamin (Biochrom, Deutschland) und Penicillin-Streptomycin 1000 IU/ml (Gibco, Deutschland) kultiviert. Zur Herstellung der gewünschten Tumorzellkonzentration erfolgte eine fünfminütige Passagierung (Trypsinierung) bei 37°C. Nach der anschließenden Neutralisation des Trypsins durch Zugabe von 5 ml Vollmedium wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert und die Zellpellets in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellzählung wurde in der Neubauer-Zählkammer (0.1 ?l) nach der Trypan-Blau-Methode durchgeführt. Dabei wurde die Zellsuspension sowie das Trypan-Blau in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, und unter dem Mikroskop ausgezählt. Gleichzeitig waren Einschätzungen der Rate an avitalen Zellen möglich. Entsprechend der Zellzahl erfolgte die Verdünnung der Suspension mit Fertigmedium ohne fetalem Rinderserum und die Abfüllung von jeweils 1 ml in Eppendorfgefäße. Die Gefäße verblieben im Inkubator und wurden vor der Applikation geschwenkt, um abgesunkene Tumorzellen erneut in Suspension zu bringen.

### 3.3 Das Studiendesign



Nach Narkoseeintritt wurden die Tiere am Bauch und am Rücken rasiert und steril abgewaschen. In Bauchlage erfolgte standardisiert die subkutane Injektion der Tumorzellsuspension ( $10^4$ , DHD/K12/TRb Zellen) am Rücken der Tiere. Dann wurden die Tiere auf den Rücken gelagert und nach erneuter Desinfektion die Bauchdecke entsprechend der Randomisierung eröffnet. Zunächst erfolgte die intraperitoneale Applikation der Tumorzellsuspension ( $10^4$ , DHD/K12/TRb Zellen). Am offenen Abdomen wurden die Tumorzellen über das Peritoneum verteilt, wohingegen bei der Laparoskopie die Tumorzellen mit einer Injektionsnadel durch die Bauchdecke appliziert und im Abdomen verteilt wurden.

Am Ende der Operation wurde 1 ml Ringerlösung in das Abdomen der Kontrolltiere instilliert. Bei den Therapiegruppen erfolgte die Behandlung des Abdomens mit Taurolidin oder der Kombination aus Taurolidin und Heparin durch die intraperitoneale Instillation. Die intravenöse Injektion der Substanzen erfolgte über die linke Vena femoralis nach deren Präparation. Zusätzlich wurden die intraperitoneale und die intravenöse Applikation kombiniert.

Die Operationszeiten begannen mit dem Hautschnitt, beziehungsweise der ersten Inzision für die Trokare und betragen in allen Gruppen 30 Minuten bis zum Beginn der Hautnaht.

### 3.4 Taurolidin und Heparin zur Verhinderung von Tumormetastasen in der Laparoskopie mit Kohlendioxid

Die Insufflation von Kohlendioxid erfolgte über 30 Minuten mit einem Druck von 8 mmHg. Am Ende der Operation wurden in die Bauchhöhle, entsprechend der Randomisierung, Ringerlösung, Taurolidin oder Heparin instilliert. Die intravenösen Applikationen wurden mit einer Injektionsnadel durchgeführt (n=15):

Gruppe 1: intraperitoneale Applikation von 1 ml isotoner Ringerlösung

- Gruppe 2: 1 ml 0,5% Taurolidin intraperitoneal (ip)
- Gruppe 3: 1 ml 0,5% Taurolidin intravenös (iv)
- Gruppe 4: 1 ml 0,5% Taurolidin simultan intraperitoneal und intravenös (ipiv)
- Gruppe 5: 1 ml 0,5% Taurolidin/10 IE Heparin ip
- Gruppe 6: 1 ml 0,5% Taurolidin/10 IE Heparin iv
- Gruppe 7: 1 ml 0,5% Taurolidin/10 IE Heparin simultan ipiv

In den Gruppen 1-7 wurden neben der Inzision für die Insufflationskanüle im Mittelbauch (Ø 3 mm) zwei weitere Trokare (Ø 3 mm) in den rechten und linken Unterbauch platziert. Am Operationsende erfolgten die Verschlüsse der Inzisionen zweischichtig: Einzelknopfnah der Bauchwandmuskulatur mit Vicryl 4/0 sowie Einzelknopfnah der Haut mit Prolene 4/0.

### **3.5 Taurolidin und Heparin zur Verhinderung von Tumormetastasen in der offenen Chirurgie**

Die Länge der medianen Laparotomie betrug bei allen konventionell operierten Tieren 4 cm. Um realitätsnahe Bedingungen zu schaffen, erfolgte in der Hälfte der Operationszeit (15 Minuten) eine Eventeration des Darmes für 5 Minuten. Am Ende der Operation erfolgten die intraperitonealen oder intravenösen Applikationen der Substanzen entsprechend der randomisierten Gruppen:

- Gruppe 8: intraperitoneale Injektion von 1 ml isotoner Ringerlösung
- Gruppe 9: 1 ml 0,5% Taurolidin intraperitoneal (ip)
- Gruppe 10: 1 ml 0,5% Taurolidin intravenös (iv)
- Gruppe 11: 1 ml 0,5% Taurolidin simultan intraperitoneal und intravenös (ipiv)
- Gruppe 12: 1 ml 0,5% Taurolidin/10 IE Heparin ip
- Gruppe 13: 1 ml 0,5% Taurolidin/10 IE Heparin iv
- Gruppe 14: 1 ml 0,5% Taurolidin/10 IE Heparin simultan ipiv

Der Wundverschluß der medianen Laparotomie erfolgte zweischichtig: Einzelknopfnah der Bauchwandmuskulatur mit Vicryl 4/0 sowie Einzelknopfnah der Haut mit Prolene 4/0.

### **3.6 Das Differentialblutbild unter der Therapie**

Um einen Einfluß von Taurolidin und der Kombination von Taurolidin und Heparin nach intraperitonealer Resorption oder nach intravenöser Injektion auf die Leukozyten zu analysieren, erfolgten 5 peripher-venöse Blutentnahmen: 7 Tage präoperativ, 2 Stunden, 2 Tage, 7 Tage sowie 28 Tage postoperativ. Vor der Blutentnahme wurden die Tiere durch inhaliertes Äther narkotisiert. Das Blut wurde mittels einer Glaskapillare aus dem retrobulbären Plexus entnommen und in Eppendorfgefäßen gesammelt. Zur Bestimmung des Differentialblutbildes wurde für jedes Tier bei allen Blutentnahmen Ausstriche angefertigt und ausgezählt. Der Blutaustriech erfolgte auf einem fettfreien Objektträger. Dann wurden die Präparate nach „Pappenheim“ gefärbt: 2 Minuten Färbebad in konzentrierter May-Grünwald-Lösung, 2 Minuten in verdünnter, gepufferter May-Grünwald-Färbung (1:2) und abschließend 10 Minuten in Giemsa-Lösung. Im Differentialblut wurden Lymphozyten, Monozyten, Eosinophyle und Erythroblasten (je/100 Zellen) bestimmt.

Die Bestimmung der peripheren Leukozytenzahlen erfolgte nach erythrozytärer Lyse mit dreiprozentiger Essigsäure aus dem vorher gemischten Vollblut in der Neubauer Zählkammer. Die Errechnung der Zellzahlen/ $\mu\text{l}$  erfolgte bei bekannten Volumen der Zählkammer (0.1  $\mu\text{l}$ ). Danach wurde das Vollblut 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (10.000 rpm) und der Überstand (ca. 270  $\mu\text{l}$ ) in drei Eppendorfgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

### **3.7 Die Bestimmung des intraperitonealen und subkutanen Tumorgewichtes**

Die Obduktion der Tiere erfolgte 28 Tage nach operativer Intervention. Die Tiere wurden unter einer Äthernarkose mit einer Überdosis Pentobarbital getötet. Für die Inspektion des gesamten Bauchraumes wurde ein Kreuzschnitt (paramediane und quere Laparotomie) angelegt. Durch die Schnittführung konnte eine Inspektion der ehemaligen Inzisionen gewährleistet werden und eine genaue Ermittlung der Inzidenzen von Inzisionsmetastasen erfolgen. Die Lokalisation sowie der Anzahl aller Tumorknötchen wurde bestimmt und auf standardisierten Bögen dokumentiert. Nach sorgfältiger Präparation wurden alle Tumorknötchen des Abdomens gesammelt und deren Gewicht bestimmt. Das Gewicht und die Inzidenz der Tumorknoten an den ehemaligen Inzisionen wurde parallel erfaßt. Bei der Auswertung der Metastasen an den Inzisionen wurde nur die Inzidenz und nicht das Tumorgewicht bewertet. Nachdem das Abdomen untersucht wurde, erfolgte am Rücken der Tiere das Aufsuchen der tastbaren, subkutanen Tumoren. Caudal erfolgte eine quere

Inzision, so dass eine vollständige Präparation der Tumoren möglich war. Die Gewichtsbestimmung der Tumoren der einzelnen Kompartimente (abdominal, subkutan und an den Inzisionen) erfolgte mit einer Präzisionswaage (BP 610) der Firma Sartorius (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Die intraperitonealen Tumoren sowie die Trokarmetastasen wurden in Formaldehyd eingebettet und histologisch gesichert. Die subkutanen Tumoren, wurden für die pathologische Aufarbeitung kryokonserviert (-80°C).

### **3.8 Die Dokumentation der Daten und die statistische Auswertung**

Jedes Tier wurde bei der ersten Untersuchung (präoperative Blutentnahme 7 Tage vor dem geplanten Eingriff) durch eine kleine Lochstanze am Ohr markiert und erhielt einen Dokumentationsbogen. In das Protokoll wurden der Code für das entsprechende Tier, das Aufnahmedatum, das perioperative Gewicht zu den Blutentnahmezeitpunkten, das OP-Datum, die Lokalisation der Tumoren sowie deren Gewicht detailliert erfaßt. Bei kontinuierlichen Daten erfolgte ein Normalitätstest nach Shapiro und Francia. Bei normalverteilten Parametern wurden die Mittelwertvergleiche zwischen den Versuchsgruppen als Einfaktorielle Multivarianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Beim Vorliegen von vergleichbaren Varianzen in den Versuchsgruppen erfolgte die Post-Hoc-Korrektur nach dem Bonferroni-Modell. Lagen hingegen zwischen den Gruppen ungleiche Varianzen vor, wurde als Post-Hoc-Korrektur das Dunnett's T3-Modell gewählt. Bei nicht normalverteilten Parametern erfolgten die Mittelwertvergleiche zwischen den Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test. Die folgenden Einzelvergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni Korrektur zur Vermeidung der alpha-Fehlerkumulierung durchgeführt. Kategorielle Daten wurden mit dem Fisher's exact Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0.05$  festgelegt. Die Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 9.0 for Windows durchgeführt. Die Daten im Text wurden als Median und 95% Konfidenzintervall des Mittelwertes angegeben. Die Grafiken wurden mittels box-whisker-plots dargestellt. Er gibt neben dem Median, die untere und die obere Quartile (box) sowie 1.5 Quartildifferenzen (whisker) an. Ausreißer werden nicht dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Taurolidin und Heparin zur Verhinderung von Tumormetastasen in der Laparoskopie mit Kohlendioxid

Das Körpergewicht der laparoskopisch operierten Gruppen (Gruppen 1-7) unterschied sich im perioperativen Beobachtungszeitraum nicht [ $p=0.28$ ].

#### 4.1.1 intraperitoneale Tumorwachstum

Das intraperitoneale Tumorwachstum unterschied sich zwischen den Gruppen, in denen ein Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid aufgebaut wurde, signifikant [ $p=0.001$ ] (Abb. 1).

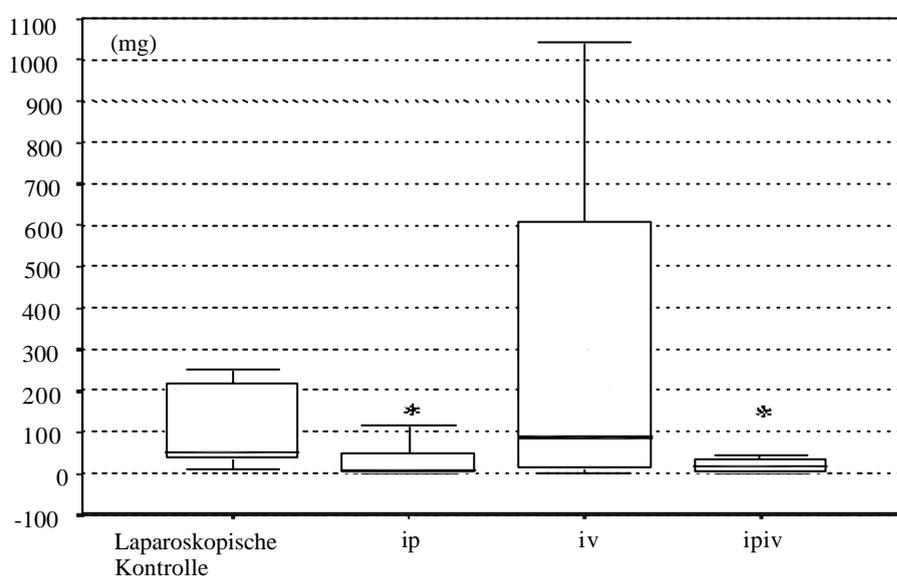


Abbildung 1: Intraperitoneales Tumorgewicht nach Kohlendioxidinsufflation und Therapie mit Taurolidin, \* $p<0,05$  ip, simultan ipiv versus laparoskopischer Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

#### Taurolidin:

Die alleinige intraperitoneale Applikation von Taurolidin (Median 7 mg, 95% Konfidenzintervall: 7-46 mg) sowie die simultane intraperitoneale (ip) und intravenöse Instillation (Median 17 mg, 95% Konfidenzintervall: 8-55 mg) führten im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Reduktion des intraperitonealen Tumorwachstums (Median 52.0 mg, 95% Konfidenzintervall: 0-965 mg) [ $p<0.01$ ]. Die alleinige intravenöse Therapie mit Taurolidin führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner Änderung des

intraperitonealen Tumorgewichts (Median 89.0 mg, 95% Konfidenzintervall 71-767 mg) [p=0.69]. Der Median der intravenös therapierten Gruppe (Gruppe 3) war gegenüber den intraperitoneal behandelten Tieren gering erhöht.

#### Taurolidin und Heparin:

Bei der intraperitonealen, kombinierten Therapie mit Taurolidin und Heparin (Median 0 mg, 95% Konfidenzintervall: 0-104 mg) sowie bei der simultanen intraperitonealen und intravenösen Therapie beider Substanzen (Median 6 mg, 95% Konfidenzintervall: 0-116 mg) wurde ebenfalls eine Reduktion des intraperitonealen Tumorwachstums erreicht [p=0.003] (Abb. 2). Die alleinige intravenöse Applikation zeigte keinen Therapieerfolg (Median 88 mg, 95% Konfidenzintervall: 0-567 mg) [p=0.66]. Ein synergistischer Effekt durch eine zusätzliche Behandlung mit Heparin konnte bei gleichen Applikationsformen nicht beobachtet werden. Obwohl das intraperitoneale Tumorgewicht der lokal mit Taurolidin und Heparin behandelten Tiere (Median 0 mg, 95% Konfidenzintervall: 0-104 mg) etwas niedriger und die Streubreite etwas geringer waren als bei der alleinigen Taurolidinbehandlung (Median 7.0 mg, 95% Konfidenzintervall: 7-46 mg), war der Unterschied nicht signifikant [p=ns]. Bei simultaner intraperitonealer und intravenöser Therapie mit Taurolidin (Median 17.0 mg, 95% Konfidenzintervall: 8-55 mg) war das intraperitoneale Tumorgewicht ebenfalls minimal größer als bei den mit Taurolidin und Heparin behandelten Tieren (Median 6 mg, 95% Konfidenzintervall: 0-116 mg) [p=ns]. Wurden die Tiere intravenös mit Taurolidin behandelt (Median 89.0 mg, 95% Konfidenzintervall 71-767 mg), fand sich wie bei einer kombinierten Therapie mit beiden Substanzen (Median 88 mg, 95% Konfidenzintervall: 0-567 mg) ein unverändertes intraperitoneales Tumorwachstum [p=ns].

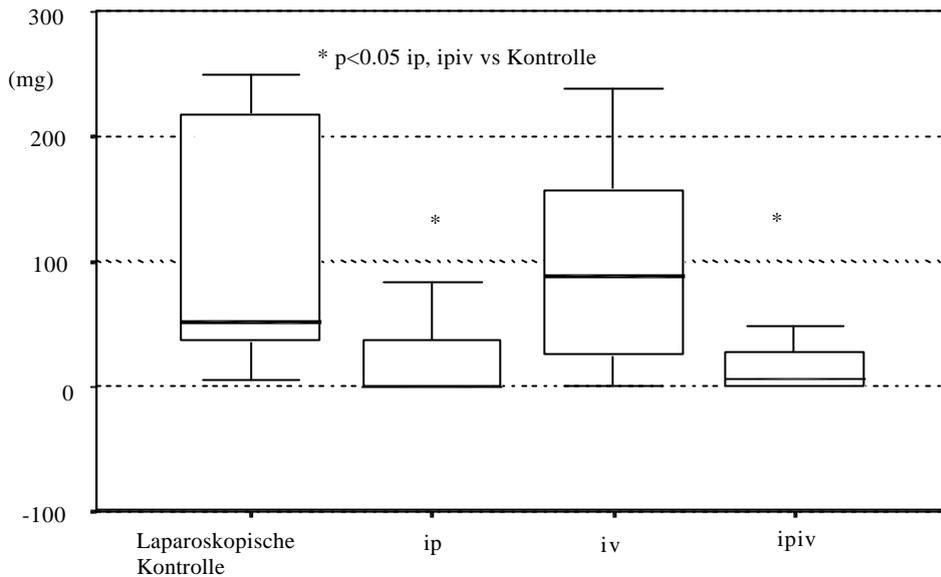


Abbildung 2: Intraperitoneales Tumorgewicht nach Kohlendioxidinsufflation und Therapie mit der Kombination aus Taurolidin/Heparin im Vergleich zur laparoskopischen Kontrollgruppe, \* $p < 0,05$  ip, ipiv versus laparoskopischer Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

#### 4.1.2 Das subkutane Tumorwachstum

Die Therapie mit Taurolidin oder die Kombination mit Heparin beeinflussten das subkutane Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht [ $p = ns$ ].

#### Taurolidin:

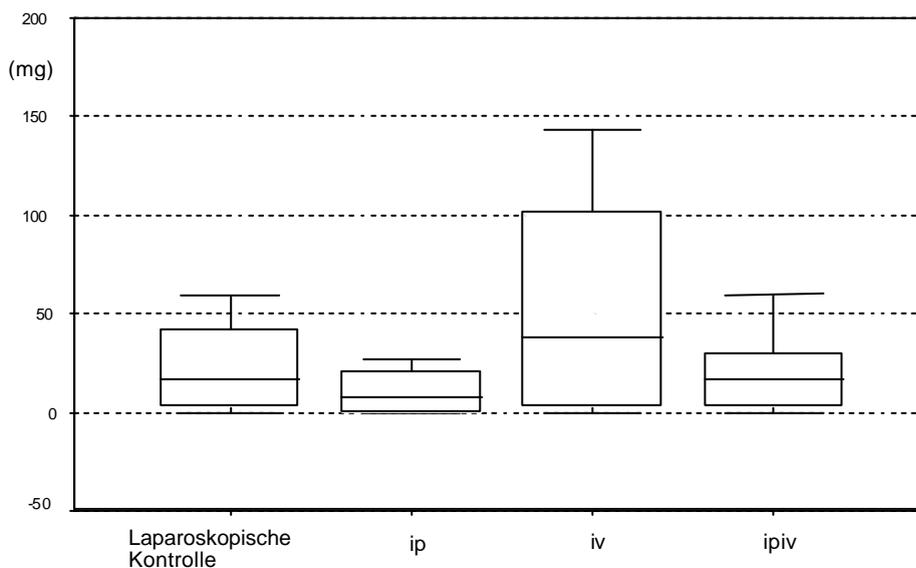


Abbildung 3: Subkutanes Tumorgewicht nach Kohlendioxidinsufflation und Therapie mit Taurolidin im Vergleich zur laparoskopischen Kontrollgruppe,  $p = ns$ , NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

Die alleinige intraperitoneale Applikation von Taurolidin (Median 8 mg, 95% Konfidenzintervall: 3-26 mg) [p=0.2] sowie die simultane intraperitoneale und intravenöse Behandlung (Median 17 mg, 95% Konfidenzintervall: 9-29 mg) [p=0.8] konnten das subkutane Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht reduzieren (Median 17 mg, 95% Konfidenzintervall: 5-56 mg) (Abb. 3). Eine intravenöse Injektion von Taurolidin hatte ebenfalls keinen Einfluß auf den Wachstumsprozeß subkutaner Tumoren (Median 38 mg, 95% Konfidenzintervall: 11-170 mg) [p=0.3].

#### Taurolidin und Heparin:

Die Kombinationstherapie mit Taurolidin und Heparin hatte nach intraperitonealer Applikation und Resorption keinen Effekt auf das subkutane Tumorwachstum (Median 23 mg, 95% Konfidenzintervall: 11-36 mg) [p=0.9] (Abb. 4). Durch Kombination der intraperitonealen und intravenösen Therapie kam es ebenfalls zu keiner Inhibition des Wachstums (Median 25 mg, 95% Konfidenzintervall: 32-176 mg) [p=0.9].

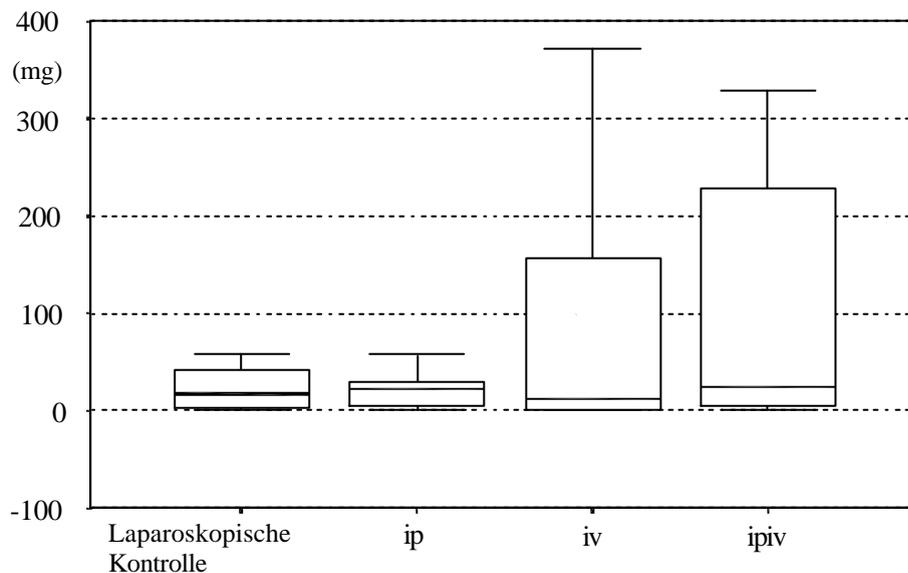


Abbildung 4: Subkutanes Tumorgewicht nach Kohlendioxidinsufflation und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin im Vergleich zur laparoskopischen Kontrollgruppe, p=ns, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

Auch die alleinige intravenöse Injektion von Taurolidin und Heparin (Median 12 mg, 95% Konfidenzintervall: 19-185 mg) hatte keinen Einfluß [p=0.9].

#### 4.1.3 Die Inzidenz von Trokarmetastasen

Im Vergleich zu der mit Ringerlösung behandelten Kontrollgruppe (Inzidenz: 10\15) wurde das Auftreten von Trokarmetastasen nach intraperitonealer Behandlung mit den therapeutischen Substanzen reduziert (Tab. 1).

##### Taurolidin:

Die simultane intraperitoneale und intravenöse Applikation von Taurolidin führte ebenfalls zu einer Reduktion des Tumorwachstums (4\15) [p<0.05]. Im Gegensatz dazu hatte die alleinige intravenöse Injektion keinen Einfluß (9\15) [p=0.7].

##### Taurolidin und Heparin:

Die intraperitoneale Therapie mit der Kombination aus Taurolidin und Heparin reduzierte ebenfalls das Wachstum von Trokarmetastasen (4\15) [p=0.02] (Tab. 1). Obwohl die Kombination beider Substanzen nach simultaner intraperitonealer und intravenöser Instillation weniger Trokarmetastasen als die Kontrollgruppe aufwies, war diese nicht signifikant (5\10) [p=0.07]. Die alleinige intravenöse Therapie von Taurolidin und Heparin führte zu einer minimalen Erhöhung der Inzidenz der Metastasen an den ehemaligen Inzisionen (13\15) [p=0.6].

Tabelle 1: Inzidenz von Trokarmetastasen nach intraperitonealer und subkutaner Tumorzellapplikation und Pneumoperitoneum mit CO<sub>2</sub> (30 Minuten, 8 mmHg) 28 Tage nach dem Eingriff (n = 15)

	Kontrolle	Taurolidin	Taurolidin/Heparin	Signifikanz [p]
ip	10/15	3/15	4/15	0.02
iv		9/15	13/15	0.7
ipiv		4/15	5/15	<0.05
Signifikanz [p]		<0.05	0.002	

#### 4.1.4 Die perioperativen Leukozyten

Im perioperativen Beobachtungszeitraum waren bei den laparoskopisch operierten Tieren die Leukozytenpopulationen der Kontrollgruppe unverändert [p=ns].

### Taurolidin:

Eine intraperitoneale oder intravenöse Taurolidintherapie hatte ebenfalls keine Verschiebungen der Leukozytenzahlen zur Folge [p=ns] (Abb. 5). Unmittelbar nach dem Eingriff zeigten die Tiere der Kontrollgruppe eine minimale Leukozytose, wohingegen die mit Taurolidin behandelten Tiere eine Leukopenie aufwiesen. Die späteren Leukozytenwerte zeigten eine größere Streubreite. Es kam jedoch zu keiner signifikanten Verschiebung der Leukozytenpopulationen durch die unterschiedlichen Applikationsformen [p=ns].

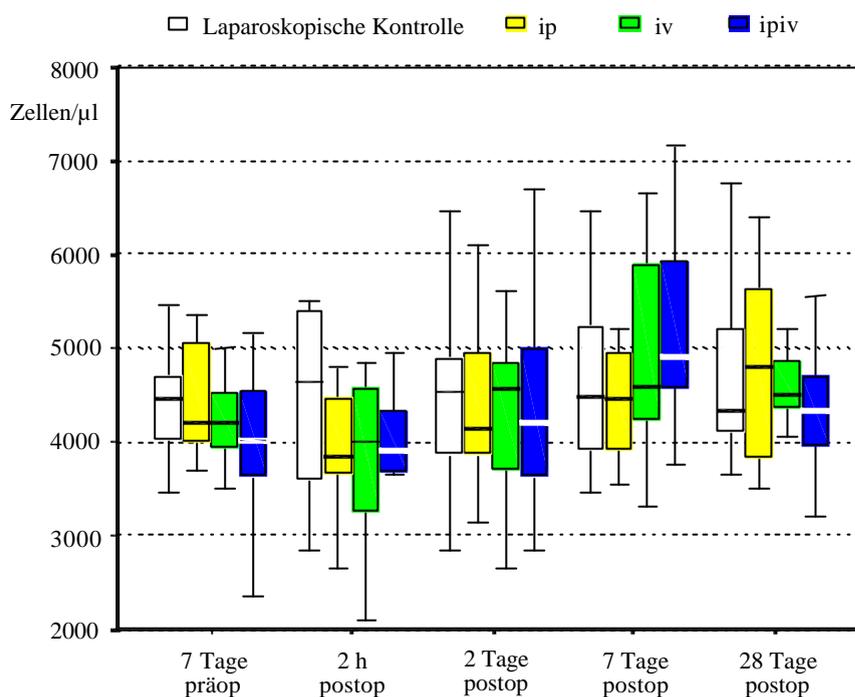


Abbildung 5: Perioperative Leukozyten nach Kohlendioxidinsufflation und alleiniger Therapie mit Taurolidin, p = ns, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

### Taurolidin und Heparin:

Bei der kombinierten Behandlung mit Taurolidin und Heparin kam es unmittelbar nach der Intervention im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Leukopenie, die bei alleiniger intraperitonealer Applikation am ausgeprägtesten war [p=0.01] (Abb. 6). Am 2. postoperativen Tag kam es in dieser Gruppe zu einer reaktiven Leukozytose.

Im Gegensatz dazu verringern sich die Leukozyten nach alleiniger intravenöser Therapie mit Taurolidin und Heparin. Der Unterschied zwischen der intraperitonealen und intravenösen Therapie wurde am 2. postoperativen Tag statistisch signifikant [p<0.01]. Eine simultane intraperitoneale und intravenöse Applikation führte, ähnlich wie die

Kontrollgruppe, nur zu geringen Veränderungen der Leukozyten. Hierbei wurde eine milde postoperative Leukopenie durch eine geringe Leukozytose kompensiert.

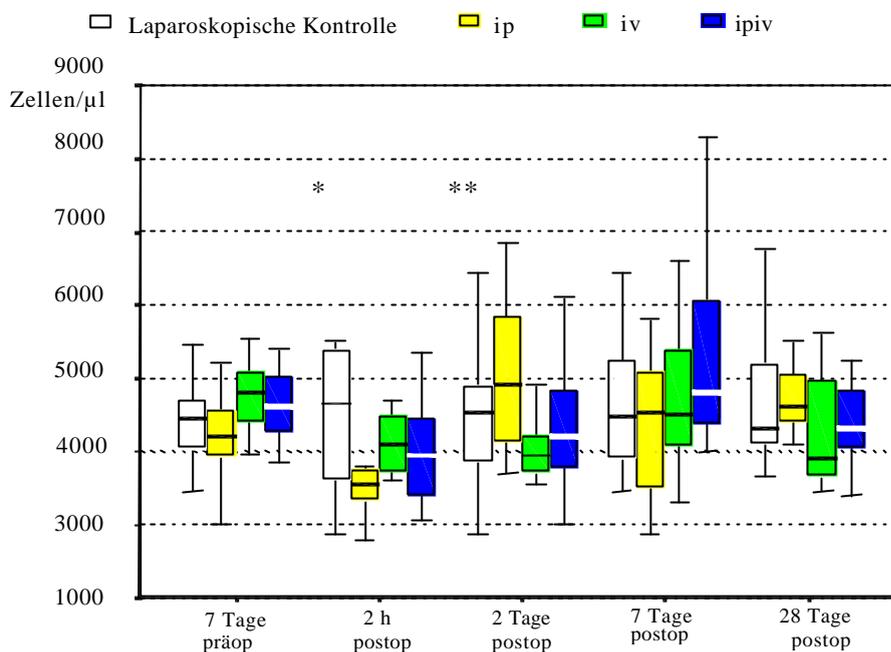


Abbildung 6: Perioperative Leukozyten nach Kohlendioxidinsufflation und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, \* p=0.01 ip versus Kontrolle, \*\* p<0.01 ip versus iv, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

Beim direkten Vergleich der Leukozytenwerte zwischen der alleinigen Therapie mit Taurolidin und der kombinierten Therapie mit Taurolidin und Heparin wurden bis zum 2. postoperativen Tag nur geringe Unterschiede festgestellt. Unmittelbar postoperativ kam es im Gegensatz zu der Kontrollgruppe zu einer milden Leukopenie, die nach der intraperitonealen Applikation von Taurolidin und Heparin am ausgeprägtesten war. Obwohl es am 2. postoperativen Tag zu einer Erholung der peripheren Leukozyten kam, waren die Schwankungen innerhalb der durch Taurolidin und Heparin therapierten Gruppen am ausgeprägtesten. Dabei erholten sich die Leukozytenzahlen nach intravenöser Therapie mit Taurolidin und Heparin zögerlicher, als nach alleiniger Taurolidinapplikation [p=ns].

#### 4.1.5 Die perioperativen Lymphozyten

Die präoperativen Lymphozytenwerte unterschieden sich in den Gruppen nicht [p=ns].

### Taurolidin:

Unmittelbar nach dem Eingriff (2 Stunden postoperativ) kam es in der Kontrollgruppe sowie in den mit Taurolidin behandelten Tieren zu einer Lymphopenie [ $p < 0.05$ ], wobei die Lymphozytenwerte der Kontrollgruppe eine große Streubreite aufwiesen (Abb. 7). Bereits 2 Tage nach der Intervention kam es in allen Gruppen zu einer Erholung der peripheren Lymphozyten, wobei die präoperativen Werte nahezu wieder erreicht wurden. In den späteren Meßzeitpunkten waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen und zu den Ausgangswerten festzustellen.

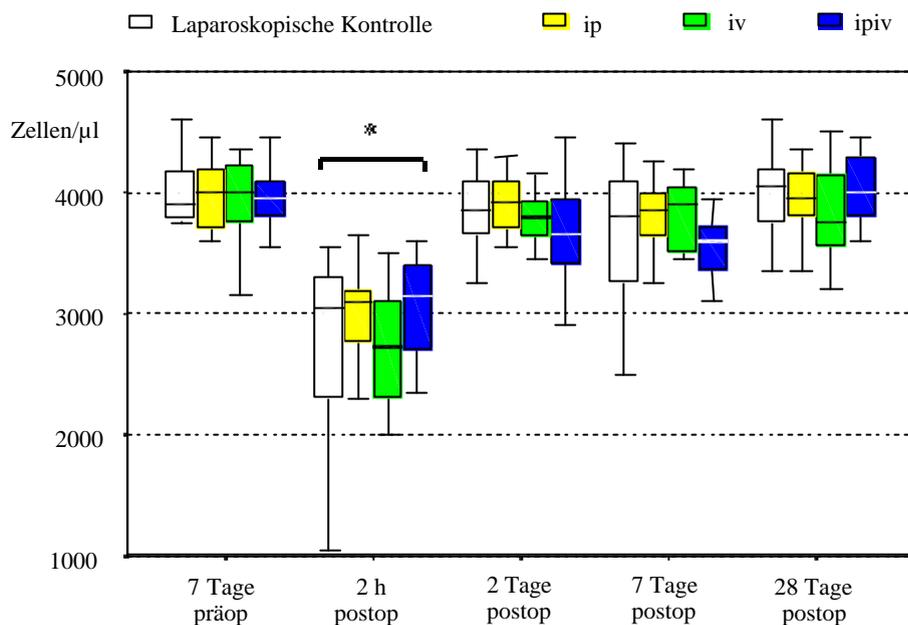


Abbildung 7: Perioperative Lymphozytenverläufe nach Insufflation mit Kohlendioxid und Therapie mit Taurolidin, \*  $p < 0.05$  alle Gruppen 2 Stunden postop. versus präop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

### Taurolidin und Heparin:

Der Vergleich der alleinigen Taurolidintherapie und der kombinierten Behandlung mit Taurolidin und Heparin zeigte ein unterschiedliches Differentialblutbild der Tiere (Abb. 8). Obwohl alle Gruppen unmittelbar postoperativ eine Lymphopenie aufwiesen, (2 Stunden postoperativ), war sie bei der kombinierten Therapie beider Substanzen milder ausgeprägt, als bei alleiniger Applikation von Taurolidin. Am deutlichsten wurde der Unterschied nach intravenöser Injektion. Die kombinierte Therapie von Taurolidin und Heparin führte im Gegensatz zur alleinigen Taurolidininjektion nicht zu einer Lymphopenie [ $p < 0.05$ ]. Diese war jedoch am 2. postoperativen Tag kompensiert. Der weitere Verlauf zeigte keine Unterschiede.

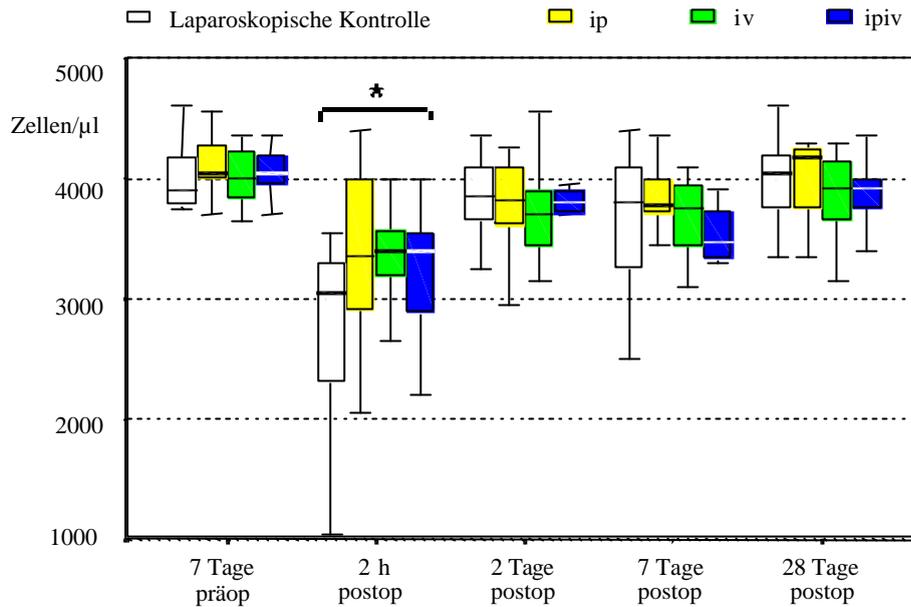


Abbildung 8: Perioperative Lymphozytenverläufe nach Insufflation mit Kohlendioxid und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, \*  $p < 0.05$  alle Gruppen 2 Stunden postop. versus präop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

#### 4.1.6 Die perioperativen Granulozyten

Die präoperativen Granulozytenwerte waren zwischen den Gruppen nicht verschieden [p=ns].

##### Taurolidin:

Bei den Kontrolltieren und den mit Taurolidin behandelten Gruppen kam es nach dem Eingriff zu einer Granulozytose [ $p < 0.01$ ] (Abb. 9). Da alle Tiergruppen diesen Verlauf zeigten, scheint in erster Linie das Operationstrauma dafür verantwortlich zu sein. Hierbei wiesen die Granulozytenwerte der Kontrollgruppe die größte Streubreite auf. Die intraperitoneale Applikation von Taurolidin zeigte jedoch den geringsten peripheren Granulozytenschub [ $p = 0.02$ ].

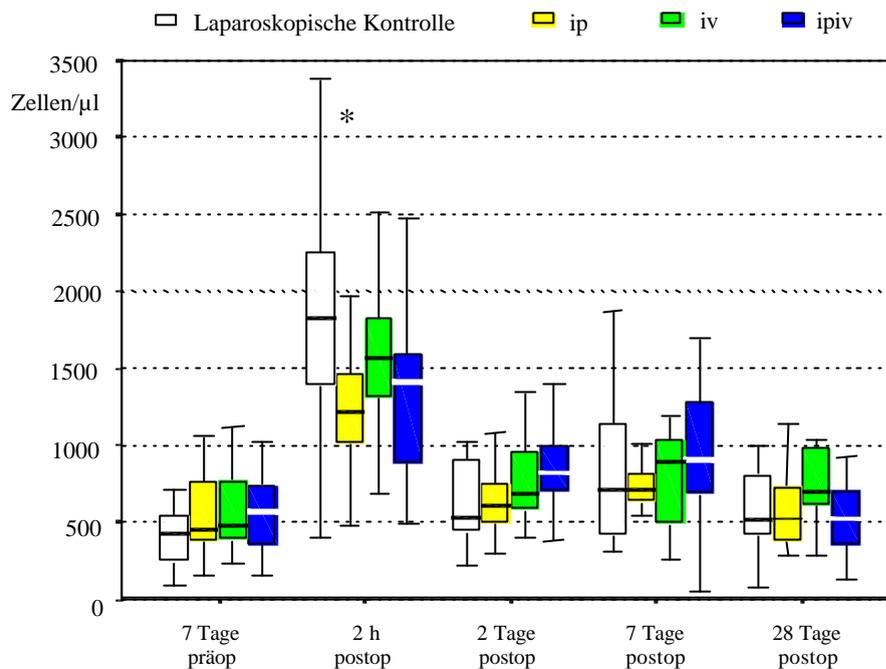


Abbildung 9: Perioperative Granulozyten nach Kohlendioxidsufflation und alleiniger Therapie mit Taurolidin, \*  $p=0.02$  ip versus Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

### Taurolidin und Heparin:

Im Gegensatz dazu waren die Granulozytenwerte bei einer kombinierten Behandlung von Taurolidin und Heparin erniedrigt und homogener (Abb. 10). Die postoperative Granulozytose in der Kontrollgruppe (2 Stunden postoperativ) war bereits am 2. postoperativen Tag regredient. Zu den späteren Meßzeitpunkten waren die Granulozytenzahlen nicht verschieden.

Unterschiedliche Granulozytenwerte beim Vergleich der alleinigen Taurolidinapplikationen und der kombinierten Therapie mit Taurolidin und Heparin wurden nur unmittelbar postoperativ gefunden. Hierbei führten die intravenösen Applikationen von Taurolidin zu einem vermehrten Granulozytenschub. Die Kombination mit Heparin schien diesen zu hemmen [ $p=0.007$ ].

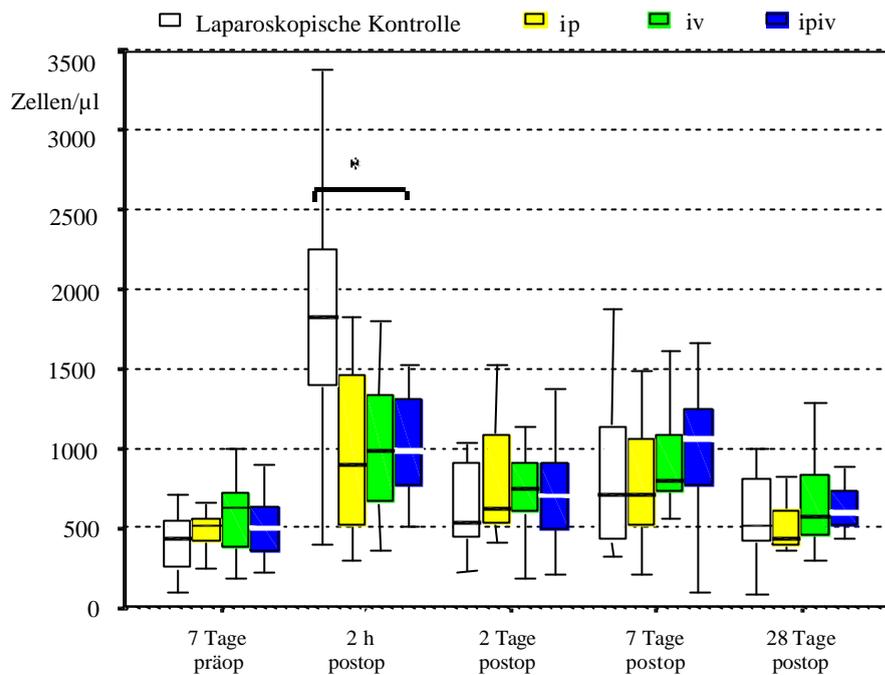


Abbildung 10: Perioperative Granulozyten nach Kohlendioxidinsufflation und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, \*  $p < 0.01$  Therapiegruppen versus Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

## 4.2 Taurolidin und Heparin zur Verhinderung von Tumormetastasen in der offenen Chirurgie

Das Körpergewicht der konventionell operierten Tiere unterschied sich während des Beobachtungszeitraumes nicht [ $p=0.36$ ]. Die Daten werden nicht angeführt.

### 4.2.1 Das intraperitoneale Tumorwachstum

Das intraperitoneale Tumorwachstum unterschied sich zwischen den konventionell operierten Tiergruppen signifikant [ $p=0.01$ ].

#### Taurolidin:

Die intraperitoneale Applikation von Taurolidin (Median 7.0 mg, 95% Konfidenzintervall: 14-92 mg) konnte das intraperitoneale Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzieren (Median 185.0 mg, 95% Konfidenzintervall: 49-786 mg) [ $p=0.05$ ] (Abb. 11). Durch die simultane intraperitoneale und intravenöse Therapie mit Taurolidin (Median 84.5 mg, 95% Konfidenzintervall: 10-300 mg) kam es ebenfalls zu einer Suppression des intraperitonealen Tumorwachstums [ $p=0.1$ ]. Die alleinige intravenöse Injektion führte im

Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch zu keiner Änderung des intraperitonealen Tumorgewichts (Median 114.0 mg, 95% Konfidenzintervall 62-1020 mg) [p=0.8].

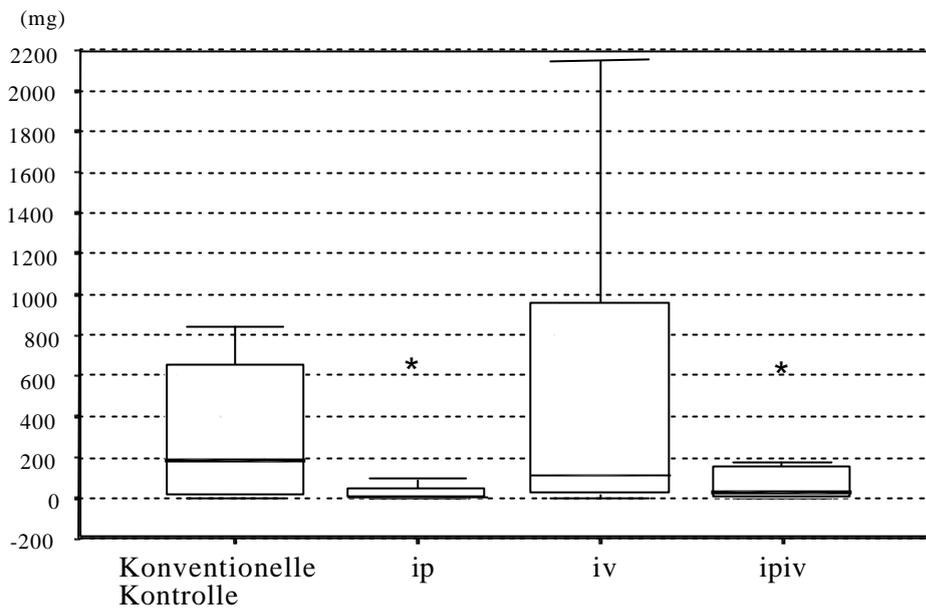


Abbildung 11: Intraperitoneales Tumorgewicht nach medianer Laparotomie und Therapie mit Taurolidin, \* p<0.05 ip, ipiv versus konventioneller Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

### Taurolidin und Heparin:

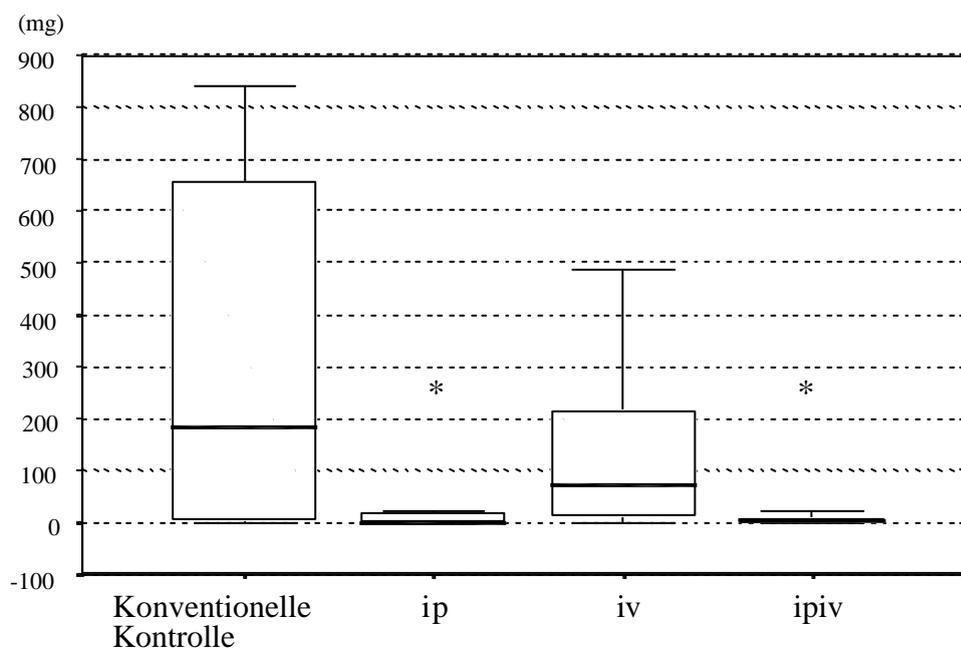


Abbildung 12: Intraperitoneales Tumorgewicht nach medianer Laparotomie und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, \* p<0.05 ip, ipiv versus konventioneller Kontrolle, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

Bei der intraperitonealen Therapie von Taurolidin/Heparin (0 mg, 95% Konfidenzintervall: 0-34 mg) [p=0.02] sowie der simultanen intraperitonealen und intravenösen Applikation beider Substanzen (Median 4 mg, 95% Konfidenzintervall: 0-77 mg) [p=0.04] konnte ebenso das Tumorstadium verringert werden (Abb. 12). Die alleinige intravenöse Injektion hatte hierbei keinen tumorsupprimierenden Effekt (Median 72 mg, 95% Konfidenzintervall: 18-310 mg) [p=0.6].

#### 4.2.2 Das subkutane Tumorstadium

Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten ein geringes subkutanes Tumorstadium (Median 0 mg, 95% Konfidenzintervall: 1-62 mg).

#### Taurolidin:

Sowohl die alleinige intraperitoneale Behandlung mit Taurolidin (Abb. 13) (Median 6 mg, 95% Konfidenzintervall: 4-27 mg) [p=0.9], die intravenöse Injektion (Median 15 mg, 95% Konfidenzintervall: 6-53 mg) [p=0.5], als auch die simultane intraperitoneale und intravenöse Applikation (Median 12.5 mg, 95% Konfidenzintervall: 6-59 mg) [p=0.5] hatten keinen Einfluß auf das Wachstum der subkutanen Tumoren.

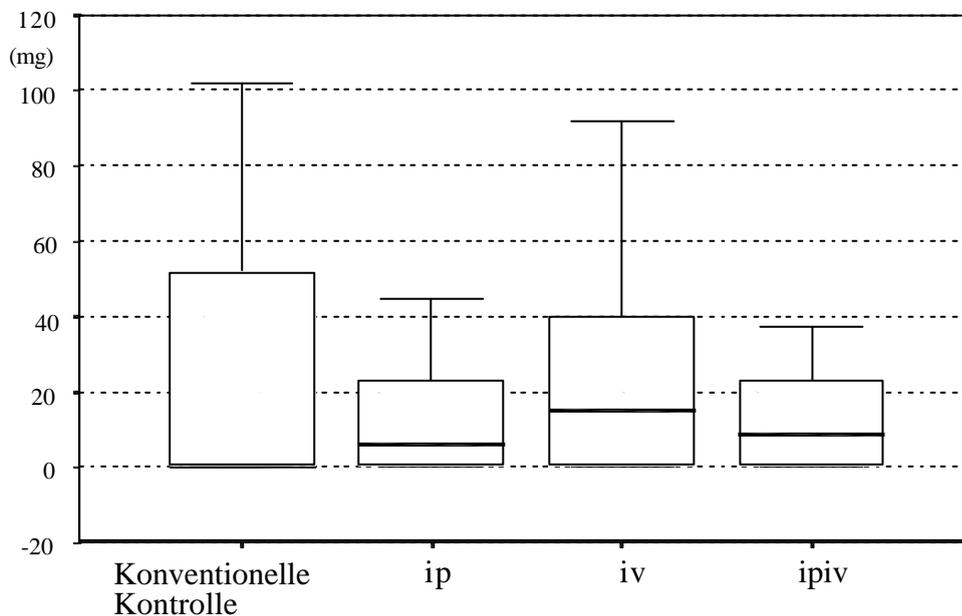


Abbildung 13: Subkutanes Tumorgewicht nach medianer Laparotomie und Therapie mit Taurolidin im Vergleich zur konventionellen Kontrollgruppe, p = ns, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

### Taurolidin und Heparin:

Die kombinierte Therapie mit Taurolidin und Heparin führte nach alleiniger intraperitonealer Applikation und Resorption (Median 26 mg, 95% Konfidenzintervall: 14-29 mg) [p=0.3] sowie nach simultaner intraperitonealer und intravenöser Applikation (Median 26 mg, 95% Konfidenzintervall: 18-139 mg) [p=0.2] zu keiner Änderung des subkutanen Tumorgewichts (Abb. 14).

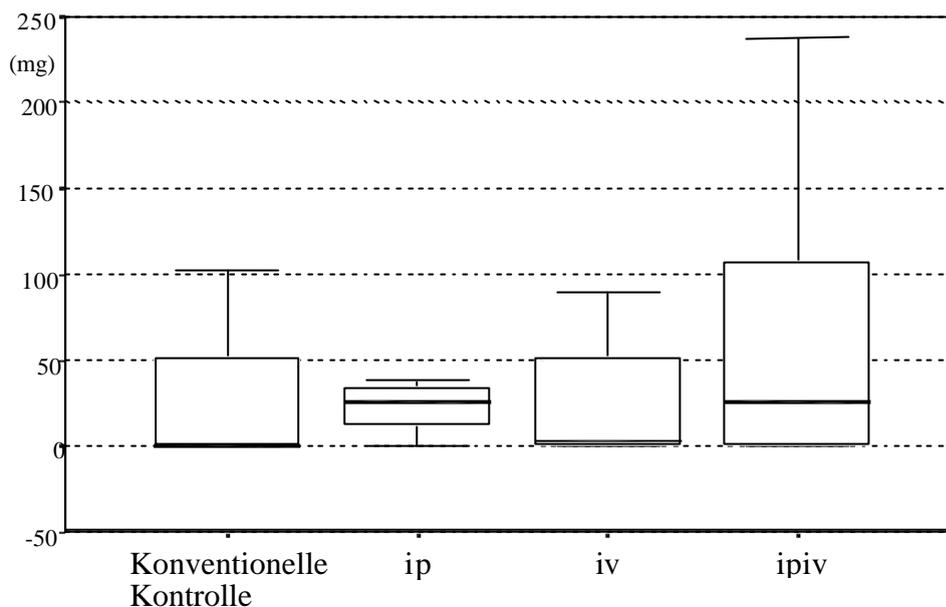


Abbildung 14: Subkutanes Tumorgewicht nach medianer Laparotomie und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin im Vergleich zur konventionellen Kontrollgruppe, p= ns, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

Eine intravenöse Therapie beider Substanzen hatte ebenfalls keinen Effekt (Median 3 mg, 95% Konfidenzintervall: 2-42 mg) [p=0.7].

#### 4.2.3 Inzisionsmetastasen in der offenen Chirurgie

Bei den konventionell operierten Kontrolltieren fiel im Verhältnis zu den laparoskopischen Tieren eine geringere Inzidenz von Metastasen im Bereich der ehemaligen Inzision auf (Tab. 2). Die Suppression des Tumorwachstums durch die Behandlung mit Taurolidin und Heparin führte daher im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner statistischen Signifikanz [p=ns]. Bei zwei Tieren der Kontrollgruppe wurden im Narbengebiet Tumorknoten gefunden, obwohl diese Tiere nur mit Ringerlösung behandelt wurden (Inzidenz: 2/15). Ebenfalls zeigten zwei Tiere nach einer intravenösen Therapie mit Taurolidin (2/15) Tumorknötchen an der Narbe [p=ns]. Erfolgte eine alleinige intraperitoneale Applikation

mit Taurolidin (0/15) [p=0.5], oder eine simultane intraperitoneale und intravenöse Behandlung wurden keine Metastasen gefunden (0/15) [p=0.5].

Nach der alleinigen intraperitonealen Applikation von Taurolidin und Heparin (0/15) [p=0.5] sowie nach einer intraperitonealen Kombinationstherapie (0/15) [p=0.5] wies kein Tier ein Tumorwachstum im Bereich des Inzisionsgebietes auf. Nach einer intravenösen Therapie beider Substanzen wurde bei einem Tier eine Metastase an der Laparotomienarbe indentifiziert [p=0.9].

Tabelle 2: Inzidenz von Metastasen der ehemaligen Laparotomiewunde nach intraperitonealer und subkutaner Tumorzellapplikation 28 Tage nach dem Eingriff (n = 15)

	Kontrolle	Taurolidin	Taurolidin/Heparin	Signifikanz [p]
ip	2/15	0/15	0/15	0.6
iv		2/15	1/15	0.73
ipiv		0/15	0/15	1.0
Signifikanz [p]		0.6	0.85	

#### 4.2.4 Die perioperativen Leukozyten

Die präoperativen Leukozytenwerte waren zwischen den Tieren, die entweder mit Ringerlösung (Kontrollgruppe) oder mit Taurolidin behandelt wurden, nicht verschieden [p=ns].

#### Taurolidin:

Unmittelbar nach der Laparotomie kam es in allen Gruppen zu einer milden Leukopenie [p=ns] (Abb. 15). Hierbei wiesen die Tiere, deren intravenöse Therapie mit Taurolidin erfolgte, die niedrigsten Leukozytenzahlen auf. Am zweiten postoperativen Tag wiesen alle Gruppen eine deutliche Leukozytose auf, die bis zum letzten Meßzeitpunkt anhielt [p<0.05]. Die Streubreite der Leukozytenwerte innerhalb der einzelnen Gruppen nahm hierbei jedoch ab.

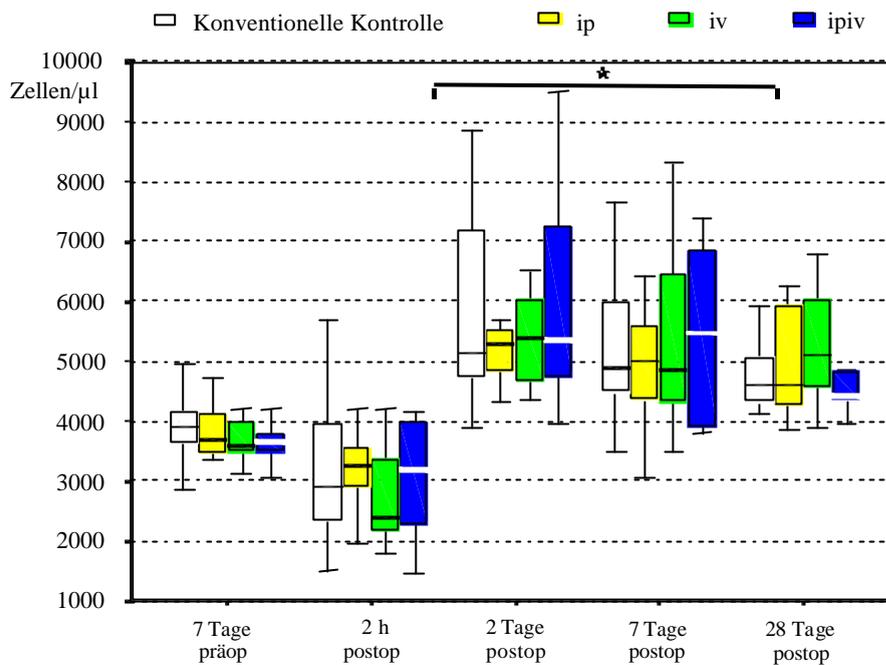


Abbildung 15: Perioperative Leukozyten nach medianer Laparotomie und alleiniger Therapie mit Taurolidin, \*  $p < 0.05$  Kontrollgruppe und Therapiegruppen präop. versus allen Messzeitpunkten ab 2. postop. Tag, NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

### Taurolidin und Heparin:

Bei der kombinierten Behandlung mit Taurolidin und Heparin kam es ähnlich wie bei der alleinigen Therapie mit Taurolidin zu einer milden postoperativen Leukopenie (2 Stunden postoperativ), die nach simultaner intraperitonealer und intravenöser Therapie beider Substanzen am ausgeprägtesten war (Abb. 16). Am 2. postoperativen Tag zeigten alle Tiere eine reaktive Leukozytose. [ $p < 0.05$ ], die sich bis zum letzten Meßzeitpunkt verfolgen ließ. Die Streubreite innerhalb der Gruppen war jedoch geringer.

Die Leukozytenverläufe nach intraperitonealer Applikation von Ringerlösung, alleiniger Therapie mit Taurolidin oder einer zusätzlichen Behandlung mit Heparin waren nicht unterschiedlich.

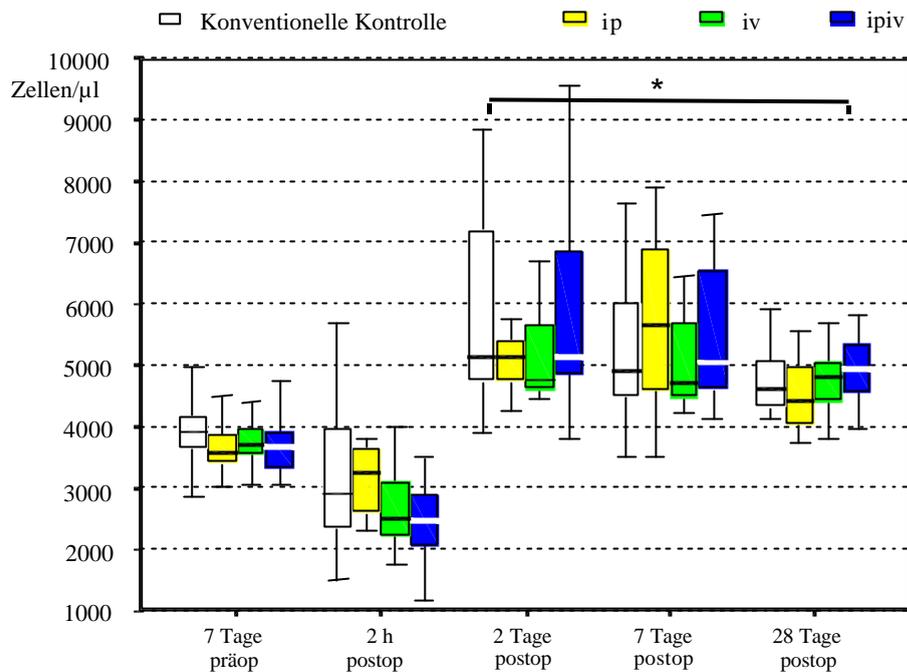


Abbildung 16: Perioperative Leukozyten nach medianer Laparotomie und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, \*  $p < 0.05$  Kontrollgruppe und Therapiegruppen präop. versus allen Meßzeitpunkten ab 2. postop. Tag, NPAR Test Mann Whitney, (n=15)

#### 4.2.5 Die perioperativen Lymphozyten

Die präoperativen, peripheren Lymphozytenwerte waren zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich [ $p=0.6$ ] (Abb. 17).

##### Taurolidin:

Unmittelbar postoperativ (2 Stunden) kam es nach der medianen Laparotomie in allen Gruppen zu einer Lymphopenie [ $p < 0.05$ ], die aufgrund der geringen Streubreite nach intraperitonealer Applikation von Taurolidin am ausgeprägtesten ist. Die Lymphopenie wurde bereits am 2. postoperativen Tag kompensiert, so dass die Ausgangswerte nahezu wieder erreicht wurden.

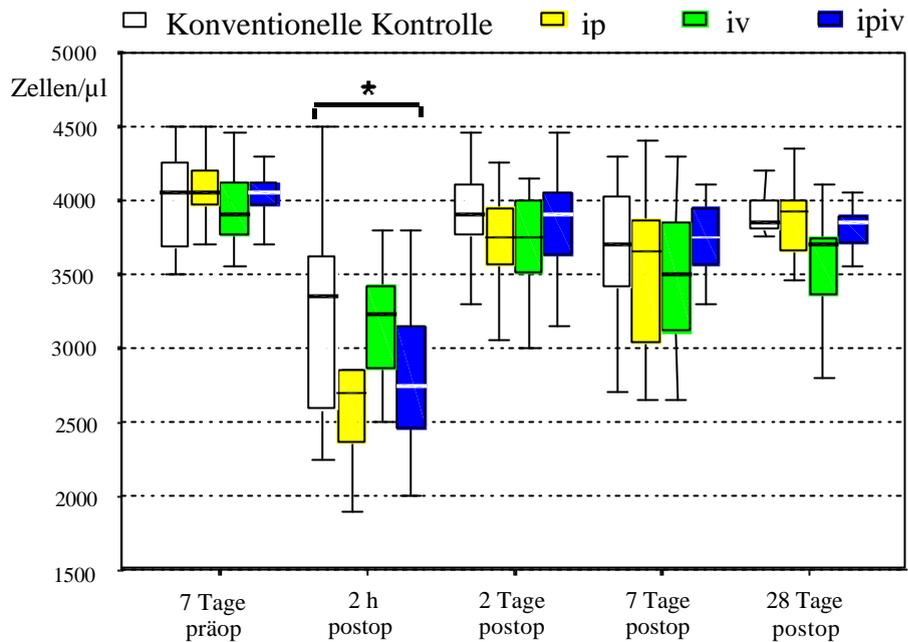


Abbildung 17: Perioperative Lymphozytenverläufe nach medianer Laparotomie und alleiniger Therapie mit Taurolidin, \*  $p < 0.05$  Therapiegruppen 2 Stunden postop. versus präop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

### Taurolidin und Heparin:

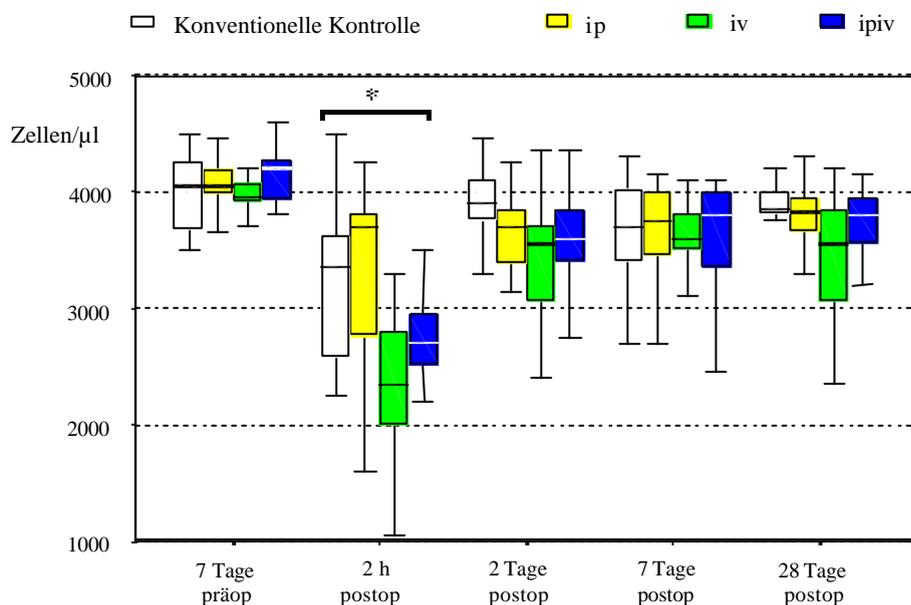


Abbildung 18: Perioperative Lymphozytenverläufe nach medianer Laparotomie und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, \*  $p < 0.05$  Kontrolle, iv und ipiv 2 Stunden postop. versus präop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

Einen ähnlichen Lymphozytenverlauf wiesen die Tiergruppen auf, die mit Taurolidin und Heparin behandelt wurden (Abb. 18). Postoperativ kam es mit Ausnahme der

intraperitoneal behandelten Tiere in allen Gruppen zu einer Lymphopenie, die nach intravenöser Therapie mit den beiden Substanzen am ausgeprägtesten ist. Sie führte zu einer lang anhaltenden, aber diskreten Lymphopenie. Im Gegensatz dazu kam es nach alleiniger intraperitonealer Behandlung mit beiden Substanzen zu einer milden Lymphopenie mit einer raschen Erholung. Der direkte Vergleich der Lymphozytenverläufe zeigte, dass die deutliche Lymphopenie nach alleiniger Taurolidinapplikation (2 Stunden postoperativ) durch die zusätzliche Therapie mit Heparin kompensiert wurde. Hingegen ist die geringe Lymphopenie nach intravenöser Taurolidininjektion (2 Stunden postoperativ) durch die Kombination mit Heparin verstärkt worden. Dieser Unterschied konnte jedoch nur am Operationstag beobachtet werden.

#### 4.2.6 Die perioperativen Granulozyten

Die präoperativen Granulozytenzahlen waren zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und den behandelten Gruppen nicht verschieden [p=ns].

#### Taurolidin:

Unmittelbar nach dem Eingriff (2 Stunden postoperativ) kam es in der Kontrollgruppe, in der intraperitoneal und in der simultan intraperitoneal und intravenös mit Taurolidin behandelten Gruppen zu einem Granulozytenanstieg [p<0.05] (Abb. 19).

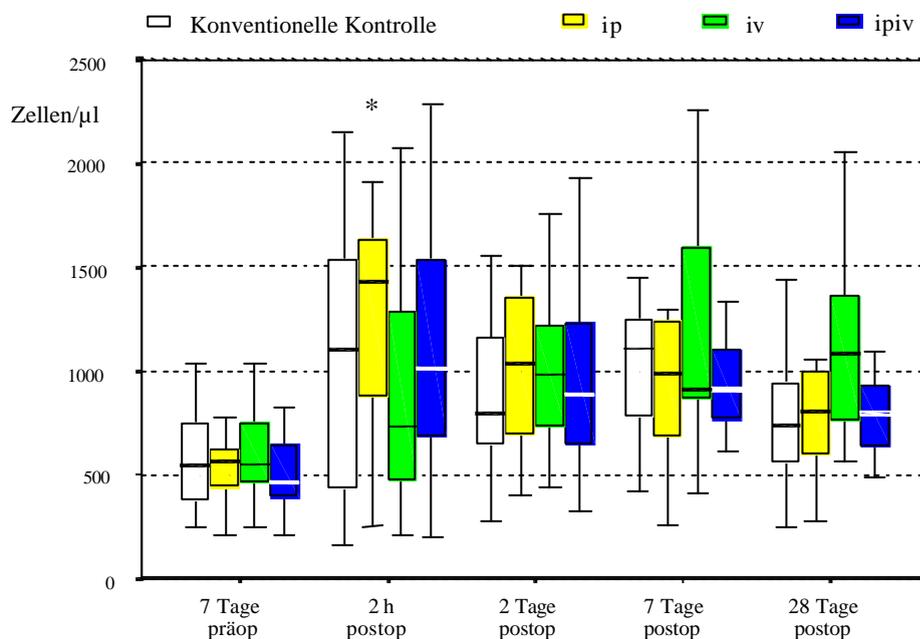


Abbildung 19: Perioperative Granulozyten nach medianer Laparotomie und Therapie mit Taurolidin, \* p<0.05 Kontrollgruppe, ip und ipiv präop. versus 2 h postop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

Dieser blieb nach alleiniger, intravenöser Taurolidininjektion aus [p=ns]. Obwohl die Granulozytenzahlen eine deutliche Streubreite aufwiesen, lagen sie in den folgenden Meßzeitpunkten geringfügig über den präoperativen Werten, welches einem milden Granulozytenschub entsprach.

### Taurolidin und Heparin:

Nach kombinierter Therapie mit Taurolidin und Heparin zeigten die Granulozyten ebenfalls den Kurvenverlauf einer postoperativen Granulozytose (2 Stunden postoperativ) [p=0.01], wobei der Granulozytenschub nach alleiniger intraperitonealer Therapie beider Substanzen ausblieb [p=ns] (Abb. 20). Nach 28 Tagen konnten die präoperativen Werte noch nicht erreicht werden.

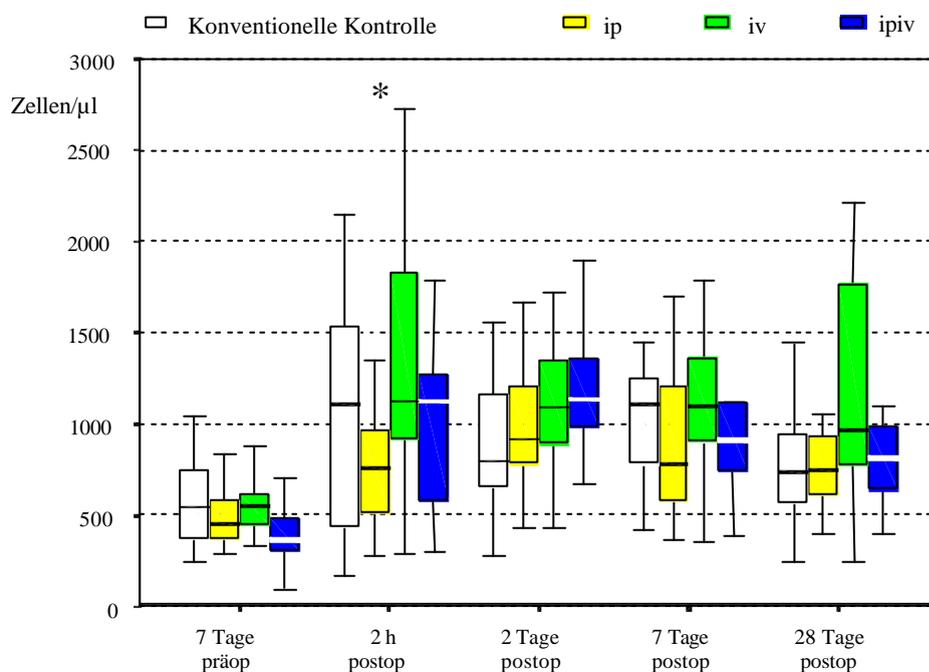


Abbildung 20: Perioperative Granulozyten nach medianer Laparotomie und kombinierter Therapie mit Taurolidin/Heparin, \* p<0.05 Kontrollgruppe, ip und ipiv präop. versus 2 h postop., NPAR Test Mann-Whitney, (n=15)

Beim Vergleich der Granulozytenverläufe nach alleiniger Taurolidinbehandlung sowie nach einer kombinierten Therapie mit Taurolidin und Heparin zeigte sich, dass die ausgeprägte Granulozytose nach intraperitonealer Therapie mit Taurolidin (2 Stunden postoperativ) durch die zusätzliche Applikation von Heparin vermieden wurde. Umgekehrt

verhielt es sich nach intravenöser Injektion. Die Therapie mit beiden Substanzen führte unmittelbar postoperativ (2 Stunden postoperativ) zu einer Granulozytose, welche durch alleinige Injektion von Taurolidin nicht erreicht wurde. Diese unterschiedlichen Verläufe in den Therapiegruppen sind nur am Operationstag beobachtet worden. Bei allen Gruppen trat eine milde, aber langanhaltende postoperative Granulozytose auf.

#### **4.3 Direkter Vergleich des Tumorwachstums nach der Therapie mit Taurolidin und Heparin nach der Laparoskopie und der offenen Operation**

Der direkte Vergleich der beiden Operationstechniken sollte einen möglichen Einfluß der Operationsart auf das intraperitoneale Tumorwachstum, die Inzisionsmetastasen und auf das subkutane Tumorwachstum untersuchen.

##### 4.3.1 Das intraperitoneale Tumorwachstum

###### Taurolidin:

Das intraperitoneale Tumorgewicht bei den laparoskopischen Kontrolltieren (Median 52.0 mg) zeigte im Vergleich zu den konventionellen Kontrolltieren (Median 185.0 mg) ein unterschiedliches intraperitoneales Tumorwachstum [p=0.05]. Hingegen war die alleinige intraperitoneale Therapie mit Taurolidin (Laparoskopie: Median 7.0 mg, Laparotomie: Median 7.0 mg) [p=0.97] als auch die intravenöse Injektion (Laparoskopie: Median 89 mg, Laparotomie: Median 114.0 mg) [p=0.8] nicht unterschiedlich. Das heißt, dass die lokale Therapie mit Taurolidin von der Operationstechnik unabhängig war und zu einer intraperitonealen Tumorreduktion führte. Ebenso zeigte die simultane intraperitoneale und intravenöse Applikation (Laparoskopie: Median 17.0 mg, Laparotomie: Median 84.5 mg) [p=0.4] kein unterschiedliches intraperitoneales Tumorwachstum.

###### Taurolidin und Heparin:

Verglich man jene Gruppen untereinander, die intraperitoneal mit der Kombination aus Taurolidin und Heparin therapiert wurden, so fand man nach intraperitonealer Applikation (Laparoskopie: Median 0 mg, Laparotomie: Median 0 mg) [p=0.7], sowie nach alleiniger intravenöser Injektion (Laparoskopie: Median 88 mg, Laparotomie: Median 72.0 mg) [p=0.7] als auch bei der simultanen intraperitonealen und intravenösen Injektion beider Substanzen (Laparoskopie: Median 6 mg, Laparotomie: Median 4 mg) [p=0.8] keine Unterschiede. Das heißt, dass die zusätzliche lokale Therapie mit Heparin ebenfalls

operationsunabhängig (Laparoskopie mit CO<sub>2</sub> versus Laparotomie) zu einer Reduktion des intraperitonealen Tumorwachstums führte.

#### 4.3.2 Das subkutane Tumorwachstum

Das subkutane Tumorgewicht unterschied sich in den Kontrollgruppen nicht voneinander (Laparoskopie: Median 17 mg, Laparotomie: Median 0 mg) [p=0.3].

##### Taurolidin:

Die intraperitoneale Behandlung mit Taurolidin (Laparoskopie: Median 8 mg, Laparotomie: Median 6 mg) [p=0.9], die alleinige intravenöse Therapie (Laparoskopie: Median 38 mg, Laparotomie: Median 15 mg) [p=0.3] als auch die simultan intraperitoneal und intravenös behandelten Tiere (Laparoskopie: Median 17 mg, Laparotomie: Median 12.5 mg) [p=0.6] wiesen kein unterschiedliches subkutanes Tumorwachstum auf.

##### Taurolidin und Heparin:

Die Kombinationstherapie mit Taurolidin und Heparin zeigte sowohl nach alleiniger intraperitonealer Behandlung (Laparoskopie: Median 23 mg, Laparotomie: Median 26 mg) [p=0.8], nach intravenöser Therapie (Laparoskopie: Median 12 mg, Laparotomie: Median 3 mg) [p=0.5] als auch nach einer simultanen intraperitonealen und intravenösen Applikation (Laparoskopie: Median 25 mg, Laparotomie: Median 26 mg) [p=0.6] keinen Unterschied zwischen beiden Operationstechniken.

#### 4.3.3 Das Tumorwachstum an den Inzisionen

Die Inzidenzen der Metastasen an den ehemaligen Inzisionsstellen waren zwischen der konventionellen Operationstechnik und der Laparoskopie mit Kohlendioxid unterschiedlich (Tab. 3). Hierbei wiesen die beiden (nicht behandelten) Kontrollgruppen eine Differenz auf. Die Tiere, welche mit Kohlendioxid insuffliert wurden, (Inzidenz: 10/15) zeigten mehr Rezidive an den Inzisionen, als die konventionell operierten Ratten (2/15) [p=0.05].

Tabelle 3: Vergleich der Trokarmetastasen nach Kohlendioxidinsufflation und der Inzisionsmetastasen an der Laparotomienarbe der konventionell operierten Tiere

	Laparoskopie mit CO <sub>2</sub>	Konventionell	Signifikanz [p]
Kontrolle	10/15	2/15	0.05
Taurolidin ip	3/15	0/15	0.4
Taurolidin iv	9/15	2/15	0.19
Taurolidin ipiv	4/15	0/15	0.29
Taurolidin/Heparin ip	4/15	0/15	0.28
Taurolidin/Heparin iv	13/15	1/15	0.005
Taurolidin/Heparin ipiv	5/15	0/15	0.17

Die intravenösen Behandlungen führten zu deutlich größeren Unterschieden als die anderen Therapiestrategien. Nach einer Insufflation mit Kohlendioxid und einer intravenösen Therapie mit Taurolidin und Heparin wiesen dreizehn Tiere Rezidive an den Trokarstellen auf (13/15). Wurden die Tiere konventionell durch eine mediane Laparotomie versorgt, zeigte nur ein Tier eine Metastase an der Narbe (1/15) [p=0.005]. Bei allen anderen Tiergruppen waren die Rezidive im ehemaligen Wundbereich beider unterschiedlicher Operationstechniken gleich [p=ns].

## 5 Diskussion

Obwohl die instrumentelle Manipulation am Tumor und die damit verbundene Tumorzellverschleppung als Hauptursache von Trokarmetastasen zu werten ist, wurden auch Trokarmetastasen bei Frühkarzinomen nach laparoskopischer kolorektaler Resektion beschrieben [17,18,22,42,56,83]. Neben den aus der konventionellen Chirurgie bekannten Ursachen für eine Tumorzeldissimination müssen bei der Laparoskopie noch andere Ursachen für Tumorzeldissiminationen könnten bei der Laparoskopie mit Kohlendioxid zusätzliche Faktoren einen Einfluß auf das intra- und extraperitoneale Tumorstadium haben [9,21,23,41,53,57-59,63,74-76,78,82,84,86,88,91,100]. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass Kohlendioxid und ein erhöhter intraperitonealer Druck einen

stimulierenden Effekt auf das Wachstum unterschiedlicher Tumorzellen haben kann [37,38,45,48,93]. Zusätzlich bewirkt die durch das insufflierte Kohlendioxid verursachte intra- und extrazelluläre Azidose bei intraperitonealen Makrophagen eine Funktionsänderung [47]. So konnte nachgewiesen werden, dass Kohlendioxid zu einer gesteigerten Produktion intraperitonealer Zytokine, besonders des wachstumstimulierenden IL-1 $\beta$ , führen kann [90,94]. Die Pathogenese der perioperativen intraperitonealen Zytokinfreisetzung und der Ausbildung von Adhäsionen ist bei malignen Grundleidern von entscheidender Bedeutung, da eine perioperative Metastasierung und ein intraperitoneales Tumorwachstum einerseits durch Adhäsionsvorgänge zwischen Tumorzellen und dem Peritoneum [26,27] beziehungsweise dem Lymph- und Gefäßsystem vermittelt wird und andererseits die intraperitoneale Freisetzung von Zytokinen das Wachstum freier Tumorzellen beeinflussen kann [4,30]. Da Kohlendioxid offensichtlich die Funktion intraperitonealer Makrophagen beeinflusst, können das Insufflationsgas und der Druck ebenfalls als Ursache für eine Veränderung des Tumorwachstums und der damit verbundenen lokalen Immunabwehr diskutiert werden [13,18,29,33,39,70,66,86]. Geht man weiterhin davon aus, dass freie, vitale Tumorzellen erst durch die Adhärenz zum Peritoneum oder den Gefäßen zu einer Metastase beziehungsweise Metastasierung führen können, so scheint auch durch eine verminderte Adhäsion an sich eine Reduktion intraperitonealen Tumorwachstums möglich zu sein [24,25,26,27,44,62,80,97]. Weiterhin könnte eine durch Trokarhülsen verursachte lokale Ischämie die Inzidenz und das Wachstum von Tumoren in Trokarkanälen, das heißt im ehemaligen Inzisionskanal, begünstigen. Ob die lokale Ischämie tatsächlich für Trokarmetastasen verantwortlich ist oder ob das Insufflationsgas Kohlendioxid Inzisionsmetastasen begünstigt, wurde bisher noch nicht geklärt [42,88].

Es wird offensichtlich, dass die Faktoren, die zu einer Tumorzell dissemination, Adhäsion und deren Wachstum führen, zahlreich und komplex sind. Die verschiedenen Pathomechanismen greifen ineinander und sind daher nicht als separate Wirkungssysteme zu betrachten. Geht man jedoch davon aus, dass insbesondere die Tumorzell dissemination und die Adhäsion die Wahrscheinlichkeit intraperitonealer Metastasen erhöhen, so liegt die Vermutung nahe, dass antiadhärente Substanzen eine Bindung vitaler Tumorzellen an Mesothelzellen verhindern und damit die Rate an lokalen Rezidiven minimieren würden. Zusätzlich könnte durch den Einfluß auf intraperitoneale Zellen, einschließlich Makrophagen, die Produktion von IL-1 $\beta$  verringert und somit die Gefahr einer Wachstumsstimulation vermindert werden. Eine Substanz, welche nicht nur die

Interleukin-1 Produktion von menschlichen peripheren mononukleären Zellen (PBMC) hemmt [4], sondern zusätzlich auch eine hoch signifikante anti-adhärenente Wirkung auf verschiedene Mikroorganismen hat [49], ist Taurolidin. Da die Inkubation von Mikroorganismen mit Taurolidin zu einer signifikanten Supprimierung des Wachstums führte [2,512,20] und eine Vielzahl immunologischer Veränderungen induzierte [64,98,99], lag es nahe, zunächst diese direkte Wirkung von Taurolidin bei verschiedenen Tumorzelllinien zu überprüfen [44]. Zur Sicherung der in-vitro Ergebnisse wurde in einem Tier-Modell (BD IX Ratte) der Einfluß einer intraperitonealen Instillation von Heparin, Taurolidin sowie der Kombination beider Substanzen auf die Entwicklung von intraperitonealen Metastasen und Trokarmetastasen bei einer Laparoskopie analysiert [46]. In diesem Experiment wurden die in-vitro Ergebnisse zwar bestätigt, jedoch ausschließlich Tiere untersucht, deren Abdomen mit Kohlendioxid insuffliert wurde. Hierbei ist weiterhin unklar, ob die konventionelle Operation oder eine Insufflation mit Kohlendioxid verschiedene Einflüsse auf das intraperitoneale Tumorwachstum haben, und ob es möglicherweise Unterschiede in der Wirksamkeit der zytotoxischen und antiadhärenenten Substanzen Taurolidin und Heparin gibt, da Kohlendioxid ein saures Milieu erzeugt. Zusätzlich ist nicht überprüft worden, ob eine intraperitoneale Applikation beider Substanzen auch systemisch das Tumorwachstum beeinflussen kann, oder ob eine intravenöse Injektion zytotoxische Effekte am Organismus bewirken könnte. Andere Tierexperimente konnten ebenfalls eine Hemmung eines intraperitonealen Neuroblastoms durch die lokale Applikation von Cyclophosphamid [40] oder einer Inhibition von Trokarmetastasen durch Silbersulfadiazin beobachten [101]. Jedoch ist die Inzidenz abdominaler Neuroblastome sehr gering und die begleitenden Nebenwirkungen beider Substanzen sind im Hinblick auf eine perioperative Therapie nicht realitätsnah.

Aufgrund der kontroversen und unzufriedenstellenden Ergebnisse existiert eine generell anerkannte Therapie zur Verhinderung intraperitonealer Metastasen oder Fernmetastasen bei elektiven Resektionen maligner abdominaler Tumoren bisher noch nicht.

Das Ziel der aktuellen tierexperimentellen Studie war es, die lokale und systemische antiadhärenente und zytotoxische Wirksamkeit von Taurolidin und Heparin bei der Insufflation mit Kohlendioxid versus der konventionellen Chirurgie bei der Ratte zu analysieren. Neben der intraperitonealen Applikation von syngenetischen Tumorzellen wurden zur Simulation von Fernmetastasen zusätzlich Tumorzellen subkutan am Rücken der Tiere appliziert. Taurolidin und Heparin wurden einmalig intraperitoneal instilliert, um

den direkten Einfluß auf das intraperitoneale Tumorwachstum zu untersuchen. Eine intravenöse Injektion analysierte systemische Effekte beider Substanzen auf das intraperitoneale und subkutane Tumorwachstum. Lokale und systemische tumorinhibierende Effekte wurden durch eine simultane intraperitoneale und intravenöse Applikation beider Substanzen untersucht.

In dem aktuellen Experiment wurde, im Gegensatz zur intravenösen Injektion von 1 ml 0.5% Taurolidin, eine Suppression des intraperitonealen Tumorwachstums nach einer intraperitonealen Therapie beobachtet. Hierdurch konnten das lokale (intraperitoneale) Tumorwachstum sowie die Rezidive an den Inzisionen unter laparoskopischen und konventionellen Bedingungen signifikant supprimiert werden. Das intraperitoneale Tumorwachstum korrelierte dabei mit den Metastasen der ehemaligen Inzisionen der Trokare beziehungsweise an der medianen Laparotomie. So führte die Reduktion des intraperitonealen Tumorwachstums auch zu einer Reduktion des Wachstums an den abdominalen Wunden. In früheren tierexperimentellen Untersuchungen sind bereits zytotoxische Substanzen intraperitoneal oder intramuskulär appliziert worden, um einen lokalen und systemischen Einfluß auf das Wachstum injizierter Tumorzellen zu analysieren [3,4,6,40,55,101]. Jacobi et al. untersuchten bereits in einem Rattenexperiment (BD IX) die Wirkung von Taurolidin auf das Tumorwachstum. Dabei wurde die gleiche Tumorzelllinie (DHD/K12/TRb) verwandt [44]. Zuvor wurde der in-vitro Effekt von Taurolidin an Tumorzellen gesichert. Im zweiten Teil des Experimentes konnte eine intraperitoneale Suppression des Tumorwachstums im Abdomen festgestellt werden.

In dem aktuellen Experiment bewirkte eine zusätzliche intraperitoneale Therapie mit Heparin zwar eine weitere Reduktion des intraperitonealen Tumorgewichtes, diese war jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu beobachteten Jacobi et al. in vorherigen Studien eine signifikante, synergistische tumor-supprimierende Wirkung von Taurolin und Heparin [44]. Neuhaus et al. untersuchten gleichfalls den Einfluß von Heparin auf das intraperitoneale Tumorwachstum im Rattenmodell und konnten die Ergebnisse von Jacobi et al. bestätigen [65]. Die Pathogenese der Effekte von Heparin auf das Tumorwachstum wurde insbesondere von Goldstein et al. untersucht [25,26]. Die Autoren schlussfolgerten, dass Heparin an die Rezeptoren der Mesothelzellen des Peritoneums bindet, diese besetzt und somit eine Reduktion der freien Rezeptoren bewirkt. Diese wiederum verhindert eine Adhäsion freier Zellen an den Rezeptoren [25]. Zusätzlich kann Heparin neben dem Fibroblast-growth-factor (FGF) auch den Fibroblast-growth-factor-receptor (FGFR) als

auch den Fibroblast-growth-factor-receptor4 (FGFR4) auf der Zellmembran binden [60]. Durch Besetzung von Rezeptoren wird eine adäquate Versorgung von Tumorzellen mit Nährstoffen erschwert, so dass die zellulären Funktionen reduziert werden oder sogar erliegen können. Dudas et al. konnten sogar einen hemmenden Effekt von Heparin auf nukleäre Transkriptionsfaktoren (wie AP-1, SP-1, ETS-1 sowie NF- $\kappa$ B) maligner Leberzellen (HepG2) nachweisen [19]. Dies führt zu einer Störung der Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und deren korrespondierenden Oligonucleotiden. Heparin scheint demnach über mindestens zwei Wirkungsmechanismen zu wirken: 1. Blockierung der extrazellulären Matrix durch Bindung an Membranrezeptoren [60] sowie 2. Eingriff in die Transkription und Produktion intrazellulärer, regulatorischer Proteine [19].

Eine Reduktion des intraperitonealen Tumorwachstums ist auch durch andere Substanzen, den Chemotherapeutika, im Tierexperiment erreicht worden. So konnten Iwanaka et al. nach intraperitonealer Therapie mit Cyclophosphamid das lokale Wachstum maligner Tumoren in Mäusen reduzieren [40]. Wu et al. beobachteten nach lokaler Applikation von einprozentigem Silbersulfadiazin ebenfalls eine Hemmung von Trokar- und Bauchwandmetastasen [101]. Die hohe Inzidenz der Therapiegruppe (75%) stellte hierbei im Vergleich zur Kontrollgruppe (93%) jedoch keinen eigentlichen Therapieerfolg dar und wurde deshalb vielfach diskutiert. Neuhaus et al. konnten nach einer laparoskopischen Operation eine Reduktion des intraperitonealen Tumorwachstums bei Dark Agouti Ratten nach intraperitonealer Applikation von PVP-Jod nachweisen [67]. Die lokale Instillation von PVP-Jod hatte jedoch neben der Suppression des Tumorwachstums bedeutende Nebenwirkungen. Aufgrund seiner unspezifischen Zytotoxizität durch freiwerdendes Jod werden auch die Peritonealmakrophagen geschädigt, was die lokale, intraperitoneale Immunabwehr herabsetzen und das Tumorwachstum durch eine gesteigerte Zytokinfreisetzung aus den zellulären Vesikeln sogar stimulieren kann [44]. Jacobi et al. wiesen zudem nach, dass PVP-Jod zu vermehrten Fibrinausschwitzungen auf der Leber und der Milz führt. Diese könnten vermehrte Adhäsionen im Oberbauch induzieren und im späteren Krankheitsverlauf Komplikationen im Sinne eines mechanischen Ileus nach sich ziehen. Aufgrund dessen scheint der therapeutische Einsatz von Jod zur Prophylaxe von Tumorrezidiven keine optimale Alternative darzustellen. Die mit erheblichen Nebenwirkungen verbundene intraperitoneale oder intramuskuläre Methotrexatapplikation reduzierte zwar das intraperitoneale Tumorwachstum beim Kleinnager [67], jedoch ist ein Einsatz bei elektiven Operationen nicht tolerabel. Iwanaka et al. untersuchten den Einfluß von lokal (intraperitoneal) appliziertem Cyclophosphamid und konnten ebenfalls eine

Suppression von Neuroblastomrezidiven an Trokarinzisionen nachweisen [40]. Da das Neuroblastom im Gegensatz zu den kolorektalen (Adeno-) Karzinomen ein seltenes Malignom ist und die Therapie elektiver Resektionen maligner Tumoren mit Cyclophosphamid aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen nicht empfohlen werden kann, sind diese Experimente ohne bedeutende klinische Relevanz. Insgesamt scheinen die genannten therapeutischen Strategien aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen und der zum Teil fraglichen Wirksamkeit in ihrer Einsatzmöglichkeit bei elektiven Operationen maligner abdominaler Tumoren sehr begrenzt.

Im Gegensatz dazu scheinen die zahlreichen, validierten Daten früherer tierexperimenteller Studien die Suppression des intraperitonealen Tumorwachstums von Taurolidin und Heparin zu belegen. Hierbei wurden Nebenwirkungen oder gar Komplikation in keinem der Versuche nachgewiesen oder beobachtet [26,46,62]. Damit wäre eine standardisierte, perioperative zytotoxische Therapie bei elektiven Resektionen maligner abdominaler Tumoren durchaus denkbar.

Im Gegensatz zur intraperitonealen Wirksamkeit von Taurolidin sowie der Kombination aus Taurolidin und Heparin konnte in dem aktuellen Experiment keine Suppression des subkutanen Tumorwachstums beobachtet werden. Hierfür könnte nach erfolgter Resorption über das Peritoneum eine sofortige Proteinbindung der Substanzen im Plasma verantwortlich sein. Die fehlende tumorinhibierende Wirkung am Rücken der Tiere könnte sich zusätzlich durch die ungenügende Konzentration der Substanzen am Wirkungsort begründen. Das intraperitoneale und subkutane Tumorwachstum wurde durch die alleinige intravenöse Injektion von 1 ml 0.5% Taurolidin oder 1 ml 0.5% Taurolidin sowie 10 I.E. Heparin ebenfalls nicht beeinflusst. Hierbei könnte auch eine zu niedrige Dosierung von Taurolin als 0,5%ige Lösung eine entscheidende Rolle spielen. So konnten Gutt et al. in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe durch eine Dosiserhöhung auf 2% Taurolinlösung eine Änderung der therapeutischen Wirksamkeit beobachten [29]. Dort erfolgte die Injektion des zweiprozentigen Taurolidin in die Vena portae. Dies führte zu einer Reduktion von Lebermetastasen. Dies könnte bedeuten, dass intravenös appliziertes 0,5% Taurolidin aufgrund der zu geringen Konzentration am Wirkungsort noch keinen tumorsupprimierenden Einfluss hatte. Im Gegensatz dazu könnte zweiprozentiges Taurolidin eine ausreichende systemische Suppression des Tumorwachstums im Tiermodell bewirken und neben Lebermetastasen auch das Wachstum von Tumoren an

anderer Lokalisation reduzieren. Eine Ursache für die Diskrepanz unserer und der Ergebnisse der Arbeitsgruppe Gutt könnte sich mit der direkten Toxizität einer höher konzentrierten Taurolinlösung auf Tumorzellen erklären lassen [44]. Die Quantifizierung der notwendigen Konzentrationen am Wirkort wurde in einem in-vitro Experiment durch McCourt et al. mit Hilfe der Bestimmung von Apoptoseraten vorgenommen [62]. Bei Konzentrationen von 17,6µM (micro molar) konnte durch einen Annexin-V-Assay eine Apoptoserate von bis zu 36% nachgewiesen werden. Bei höheren Konzentrationen (88 µM) wurden die Zellen nekrotisch und konnten mittels einer Trypan blau Färbung demarkiert werden. Dabei zeigten die Zellen eine vierfach höhere Apoptoserate sowie eine vierfach niedrigere Proliferationsrate als die Zellen der Kontrollgruppe, welche nur mit Kulturmedium inkubiert wurden. Die Zellen, welche mit 15 µg/ml Taurolidin behandelt wurden, wiesen eine der Kontrollgruppe vergleichbare Apoptoserate auf. Eine niedrige Dosierung von Taurolidin führte wie bei Jacobi et al. zu einem Anstieg der Apoptose [44]. Die Nekroserate der Tumorzellen (DHD/K12/TRb) stieg hingegen mit zunehmender Dosierung. Parallel zu diesem in-vitro Experiment wurde ein tierexperimenteller Versuch durchgeführt. Bei allen Tieren (n=10, BD IX Ratten) erfolgte eine mediane Laparotomie. Nach der intraperitonealen Applikation von Tumorzellen, erhielt die Kontrollgruppe Taurolidin und PBS (phosphatgepufferte Salinelösung). Die Therapiegruppe wurde intraperitoneal mit Taurolidin behandelt. Ohne PBS wurde das lokale Tumorstadium hochsignifikant supprimiert. Hierbei scheint der puffernde Effekt von PBS die Wirksamkeit von Taurolidin zu hemmen. Die in-vitro und in-vivo Experimente von McCourt et al. zeigen jedoch, dass ein direkter Kontakt von Taurolidin zu Tumorzellen erforderlich ist. Puffernde Substanzen können hingegen die Wirksamkeit von Taurolidin aufheben. Zusätzlich konnte in-vitro eine Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden. Mehrere Arbeiten konnten diese Ergebnisse bestätigen [4,25]. Ein zusätzlicher intrazellulärer Wirkmechanismus, der zu einer Apoptose führen kann, ist aufgrund der geringen Molekülgröße Taurolidins und der Fähigkeit zur Ionisation denkbar [44]. Jedoch sind bei Taurolidin im Gegensatz zu anderen, intrazellulär wirkenden Chemotherapeutika, wie Cyclophosphamid, Methotrexat, Sulfadiazin [3,40,67,101], schwerwiegende Nebenwirkungen auf den Organismus bisher noch nicht beschrieben worden [12]. Die rasche Hydrolyse und Metabolisierung zu Taurultam, Methyltaurultam, Taurinamid und als kleinstes Abbauprodukt Kohlendioxid könnten dafür verantwortlich sein, dass die langsame intravenöse Applikation von Taurolidin nur minimale Nebenwirkungen induzieren kann [12]. Das entstehende Endprodukt Kohlendioxid kann dabei pulmonal

abgeatmet werden und ist deshalb bei regelrechter pulmonaler Funktion unbedenklich. Die Nebenwirkungen von Taurolidin werden wahrscheinlich von den anderen genannten Mediatoren hervorgerufen. Brückner und Pfirrmann beschrieben bei einer Erhöhung der infundierten Menge pro Zeiteinheit, hauptsächlich vagotone Nebenwirkungen, wie Miosis, Tränenfluß mit Erregung gefolgt von Sedation [12]. Die Letalitätsrate ( $LD_{50}$ ) bei Maus, Ratte und Kaninchen ist wegen der geringen Löslichkeit und der damit verbundenen Volumenprobleme nicht genau bestimmbar, sie ist jedoch sehr niedrig. Bei intravenöser Applikation liegt die  $LD_{50}$  bei den genannten Tieren bei über 4 g/kg KG! Intravenöse Dosierungen von 400 mg / kg je 24 Stunden über 30 Tage wurden in klinischen Studien ohne die beschriebenen Nebenwirkungen gut toleriert [20]. Aufgrund der maximalen Löslichkeit Taurolidins von 2% ( $MG = 284$ ) ist eine Erhöhung der Injektionskonzentration jedoch nur mit Kollidon (PVP 16 oder 17, Polyvinylpyrolidon), einem löslichkeitsfördernden Stabilisator, möglich. Bei 3% ist auch mit Kollidon die Löslichkeitsgrenze erreicht, und die Substanz neigt dann zur Kristallisation. Da Taurolidin in höheren Konzentrationen die Venenwand reizen kann, scheint eine weitere Konzentrationssteigerung aber auch nicht sinnvoll. Tierexperimentell kam es nach rascher intravenöser Injektion (von 600 mg/ kg je 24 Stunden) jedoch zu Miosis, Tränensekretion oder Sedation [12]. Das bedeutet, dass der Organismus 300 mg / kg KG in 24 Stunden metabolisieren kann und Infusionsmengen diese Dosierung nicht überschreiten sollten. Möglicherweise ist die hohe Reaktionsbereitschaft der Methylolgruppe des Moleküls für Nebenwirkungen verantwortlich zu machen. Die Übertragung einer Methylolgruppe von Taurolidin auf Aminogruppen der Rezeptoren von Zellen kann zu deren Funktionsverlust führen. Hierdurch ist in der Abdominalhöhle eine Verminderung der Tumorzellelladhäsion denkbar. Aufgrund der geringen Größe des Taurolidinmoleküls sind neben den Mechanismen an den Zelloberflächen jedoch auch zusätzliche intrazelluläre Pathomechanismen denkbar. Diese betreffen die Produktion von TNF- $\alpha$  oder den Signalweg des Interleukins oder anderer Mediatoren [64,102]. Die Produktion findet hauptsächlich in den Monozyten, Makrophagen oder zu einem geringeren Teil in der Tumorzelle selbst statt. TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Interleukin und ist bei inflammatorischen- und malignen Prozessen erhöht. Die Regulation von TNF- $\alpha$  sowie die Auswirkungen der autokrinen Produktion von Tumorzellen sind bisher noch nicht ausreichend bekannt. Wördemann et al. konnten zeigen, dass Taurolidin die Produktion von TNF- $\alpha$  in mit IL-1 $\beta$  stimulierten, humanen Leberkarzinomzellen (HepG2, Hep3B) reduziert [99]. Zusätzlich fördert TNF- $\alpha$  die Tumorangiogenese, eine grundlegende

Voraussetzung für das Wachstum von Metastasen [69]. Durch eine erhöhte Eigenproduktion von TNF- $\alpha$  kommt es zu einer Verminderung der zelleigenen Apoptoserate, die mit einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappaB) verbunden ist [89]. Dieser Prozeß ist von der IKK (IkappaB Kinase Komplex)-spezifischen Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  (IkappaB alpha) [61] und dessen Ubiquitin-Abbau durch das Ubiquitin (Ub)/26S Proteasom System abhängig [85,89]. Zusammen mit erhöhtem c-Jun wird die Produktion von TNF- $\alpha$  stabilisiert. In die Regulation dieser beiden Transkriptionsfaktoren sind das COP9 Signalosom (CSN) und das Ub/26S Proteasom System involviert. CSN phosphoryliert neben anderen Proteinen zusätzlich I $\kappa$ B $\alpha$  [81]. Ob Taurolidin in malignen Zellen durch die Reduktion der TNF- $\alpha$  Produktion einen relevanten Einfluss auf die zelleigene Proliferation oder die Apoptoserate hat, ist bislang allerdings noch nicht bekannt. Aufgrund der geringen Molekülgröße ist auch ein weiterer Pathomechanismus denkbar. Taurolidin permeiert in geladener Form die Zellmembran und kann direkt im Zytoplasma in die Signalwege eingreifen. Da zahlreiche Chemotherapeutika mit der IKK-spezifischen Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  interagieren, kann das für Taurolidin ebenfalls möglich sein. Der gleiche Signalweg wird auch von TNF- $\alpha$  nach einer Bindung an seinen TNF-Rezeptor (TNF-R1) genutzt. Wenn Taurolidin mit dem IKK-System interagieren kann, scheint auch eine direkte intrazelluläre Wirksamkeit denkbar. Gesicherte Experimente liegen dazu jedoch ebenfalls noch nicht vor.

Zusätzlich zu Taurolidin wurde in dem aktuellen Experiment Heparin eingesetzt, um eine synergistische tumorinhibierende Wirkung zu analysieren. Hierbei führte die intraperitoneale Kombination aus Taurolidin und Heparin zu einer geringen, nicht signifikanten Reduktion des intraperitonealen Tumorwachstums im Vergleich zur alleinigen Taurolidintherapie. Trotzdem unterstützen diese Daten die zusätzliche Wirksamkeit des Heparins. Jacobi et al. zeigten bereits, dass die alleinige intraperitoneale Applikation von Heparin das lokale Tumorwachstum hemmen kann [46]. Den synergistischen Effekt aus einer Kombination aus Taurolidin und Heparin erklärten sich die Autoren durch zwei verschiedene Wirkmechanismen und Wirkorte. So vernetzt Taurolidin die Polypeptidkomplexe der Tumorzellmembran auf der Zelloberfläche [27,66] und Heparin besetzt mesotheliale Bindungsstellen [25,26,60]. Im Gegensatz zu Heparin scheint für die Wirksamkeit des Taurolidins der direkte Tumorzellkontakt notwendig zu sein. Es kann dabei konzentrationsabhängig zum apoptotischen oder oder in höheren

Konzentrationen zu einem nekrotischen Zelluntergang kommen. Taurolidin reduziert zusätzlich die IL-1 $\beta$  Produktion in den Peritonealmakrophagen [4]. Es ist durchaus denkbar, dass der Wachstumseffekt der Tumorzellen aufgrund der verminderten Interleukinproduktion ausbleibt oder reduziert wird [44]. Lanfrancone wies nach, dass das durch Peritonealmakrophagen produzierte Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) Zellwachstum in-vivo stimulieren konnte und einen Einfluss auf die Zellteilung hatte [55]. Somit könnte die Hemmung der Produktion von Interleukin-1 $\beta$  durch Taurolidin eine Suppression des lokalen Tumorzellwachstums bewirken. Ob dieser Mechanismus jedoch von klinischer Relevanz ist, wurde noch nicht hinreichend untersucht. Bisherige tierexperimentelle Untersuchungen aus der IL-1 $\beta$ -Produktion von Peritonealmakrophagen bei Ratten zeigten jedoch, dass Taurolidin nach einer fünfständigen Inkubation zu einer signifikanten Reduktion führt [46]. Weiterhin wurde die Produktion von IL-1 $\beta$  trotz LPS-Stimulation der Makrophagen durch Taurolidin vollständig supprimiert. Im Gegensatz hierzu zeigte sich ein signifikanter Anstieg von IL-1 $\beta$  nach Inkubation mit Heparin. Obwohl Heparin zahlreiche Rezeptoren bindet, somit auch an Peritonealmakrophagen, scheint es möglich, dass die Interleukinproduktion hierdurch nicht beeinflusst wird. Jedoch könnte Heparin auf anderen Tumorzellen Interleukinrezeptoren besetzen und damit den Effekt von IL-1 $\beta$  unterbinden.

Da in früheren tierexperimentellen Studien die Wirksamkeit Taurolidins und Heparins nur unter laparoskopischen Bedingungen geprüft wurde, stellte sich die Frage, ob die Insufflation von Kohlendioxid mit einer konsekutiven Azidose einen direkten Einfluss auf die Wirksamkeit der Substanzen haben könnte [1]. Seit der Einführung der laparoskopischen Operationstechnik wurden die Einflüsse einer Laparoskopie mit Kohlendioxid oder einer konventionellen Operation auf das intraperitoneale oder extraperitoneale Tumorzellwachstum im Tiermodell und insbesondere bei elektiven Resektionen maligner abdominaler Tumoren kontrovers diskutiert [3,7-9,10,11,14, 17,32,34,50,53,54,57,63,72,75,79,82,86,92,96]. Zur Evaluierung eines möglichen Einflusses der konventionellen Chirurgie oder des Pneumoperitoneums mit Kohlendioxid auf das Wachstum von malignen Tumoren und deren Metastasierungsrate wurden bisher unterschiedliche Tiermodelle entwickelt [1,84]. Die kontroversen Angaben in der Literatur ließen jedoch eine endgültige Beantwortung der Wertigkeit der Operationstechnik bisher noch nicht zu. Einige Zellexperimente und tierexperimentelle Studien zeigten jedoch ein vermehrtes Tumorzellwachstum nach einer Insufflation mit Kohlendioxid [10,33,37,47].

Andererseits beschrieben einige Autoren, dass ein vermehrtes intraperitoneales Tumorwachstum nach einer konventionellen, medianen Laparotomie häufiger zu beobachten ist [1,84]. Ein direkter Vergleich ist aufgrund der vielfältigen Tiermodelle und deren unterschiedlicher Methodiken oft nur eingeschränkt möglich. Allendorf et al. und Southall et al. konnten in Mausmodellen nachweisen, dass die konventionelle Operationstechnik mittels einer Laparotomie im Vergleich zur laparoskopischen Intervention zu einem vermehrten, intraperitonealen Tumorwachstum führt [1,84]. Da beide Autoren der gleichen Arbeitsgruppe angehören, verwendeten sie auch identische Tiermodelle. Syngenetische Mammakarzinomzellen (MMC) der Maus (C3H/He) wurden intraperitoneal als Tumorsuspension instilliert und das resultierende Wachstum untersucht. Das Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid wurde mit einem Druck von 4-6 mmHg aufgebaut. Die Beobachtungen dieser Arbeitsgruppen stehen jedoch im Gegensatz zur übrigen Literatur. Die Ursache für das vermehrte intraperitoneale Tumorwachstum wurde in der Wahl des (möglicherweise zu) niedrigen Insufflationsdruckes vermutet. Einige klinische Studien bestätigen ebenfalls die Zunahme der Resorption von Kohlendioxid aus dem Bauchraum bei steigendem Insufflationsdruck [35,71,73]. In einem Zellexperiment konnten Jacobi et al. ebenfalls einen wachstumsstimulierenden Effekt von CO<sub>2</sub> nachweisen [47]. In-vivo beobachteten sie in einem weiterführenden Experiment eine Stimulation der subkutan wachsenden Tumoren an den Trokarinzisionen bei Ratten [44]. Die Mechanismen, die in-vitro oder in-vivo zu einer Stimulation des intraperitonealen Tumorwachstums oder des Wachstums von Metastasen in abdominalen Organen führen sollen, sind jedoch verschieden. Kim et al. diskutierten den verminderten portalvenösen Blutstrom während der Laparoskopie [51]. Sie untersuchten den Einfluss der transienten Minderdurchblutung der Leber und die Funktion der Hepatozyten sowie die Inzidenz von Lebermetastasen im Rattenmodell. Sie konnten ein vermehrtes Wachstum von Leberfiliae nach einem Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid im Vergleich zur gaslosen Laparoskopie sowie zur Laparotomie finden und schlussfolgerten, dass der intraperitoneale Druck bei Aufbau eines Pneumoperitoneums reduziert oder vermieden werden sollte. Die Autoren favorisierten damit die gaslose Laparoskopie bei der Resektion maligner abdominaler Tumoren.

Aufgrund der kontroversen Daten der tierexperimentellen und klinischen Literatur wurden in dem aktuellen Experiment beide Operationstechniken in einem Rattenmodell untersucht, da sie einen möglichen Einfluss auf den Effekt von Taurolidin und Heparin haben könnten.

Hierbei wurden zwischen den (unbehandelten) Kontrollgruppen beider Operationstechniken zunächst Unterschiede im Tumorwachstum nachgewiesen. Das intraperitoneale Tumorgewicht laparoskopisch operierter Tiere war deutlich niedriger als das Tumorgewicht konventionell operierter Tiere. Obwohl beschrieben wurde, dass Kohlendioxid einen stimulierenden Effekt auf Tumorzellen hat, konnte in unserem Experiment keine Stimulation des intraperitonealen Tumorwachstums nach Insufflation mit Kohlendioxid beobachtet werden. Obwohl in der Literatur die begleitende Azidose mit sinkendem pH als führende Ursachen verantwortlich gemacht werden [47,72], scheinen die Ursachen vielfältiger zu sein.

Aufgrund der Verhinderung von Tumormetastasen durch die Instillation mit Taurolidin oder der Kombination aus Taurolidin und Heparin war in dem aktuellen Experiment das intraperitoneale Tumorgewicht zwischen beiden Operationstechniken nicht mehr verschieden. Das heißt, dass der Effekt der Behandlung mit Taurolidin und Heparin nicht durch die Operationstechnik beeinflusst wird oder dass die Unterschiede zwischen den Operationstechniken durch die suffiziente anti-tumoröse Behandlung negiert werden. Analog zum intraperitonealen Tumorwachstum waren die Rezidive an den ehemaligen Inzisionen in den (unbehandelten) Kontrollgruppen beider Operationstechniken (Laparoskopie mit Kohlendioxid versus mediane Laparotomie) verschieden. Hierfür könnte die Vermeidung des Kontakts der Tumorzellsuspension mit der Wunde bei der medianen Laparotomie im Vergleich zur Laparoskopie verantwortlich sein. Aufgrund einfacherer technischer Bedingungen konnte, wie unter onkologischen Operationsbedingungen, eine Kontamination der Inzision mit freien Malignomzellen nur bei der konventionellen Operation verhindert werden. Da sich unter den verschiedenen Therapiestrategien in der Laparoskopie mit CO<sub>2</sub> das intraperitoneale Tumorwachstum und die Inzidenz von Trokarmetastasen stets gleichsinnig verhielten, kann in unserem Experiment das Insufflationsgas Kohlendioxid als Ursache nahezu ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint eine Kontamination der Wunden mit der Tumorzellsuspension durch die schwierigere Operationstechnik der Laparoskopie sowie die vermehrten, kleineren Inzisionen verantwortlich zu sein.

Im Gegensatz zur intraperitonealen Wirksamkeit von Taurolidin und Heparin war in dem aktuellen Experiment die singuläre intravenöse Therapie beider Substanzen nicht erfolgreich. Um die Ergebnisse bei intravenösen Injektionen weiter zu überprüfen, müssten in folgenden Experimenten Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt werden, die eine Abhängigkeit

des subkutanen und intraperitonealen Tumorwachstums von der Dosis einer Bolusinjektion oder intermittierender Infusionen von Taurolidin und der Kombination aus Taurolidin und Heparin untersuchen. Zusätzlich sollten steigende Konzentrationen analysiert werden. Dies zu überprüfen, wird das Ziel kommender tierexperimenteller Studien sein.

Obwohl der Pathomechanismus von Taurolidin zum größten Teil zunächst hypothetisch bleibt, konnte durch die intraperitoneale Applikation dieser Substanz die Inzidenz und das Wachstum von intraperitonealen Metastasen signifikant vermindert werden, ohne hierdurch bedeutsame Nebenwirkungen zu verursachen. Die Kombination von Taurolidin mit Heparin bei der intraperitonealen Applikation zeigte zusätzlich einen geringen synergistischen Effekt. Da beide Substanzen bereits im klinischen Alltag verwendet werden, ist die vorgestellte präventive Therapie zur Verhinderung von Metastasen in der onkologischen Chirurgie von malignen Tumoren für eine Anwendung im klinischen Bereich sinnvoll. Aufgrund der Ergebnisse führen wir eine standardisierte postoperative Lavage mit 1500 ml 0,5 % Taurolidin bei Resektionen aller abdominalen Malignome durch. Zur Zeit wird in einer prospektiv randomisierten Multizenterstudie die klinische Relevanz dieser tierexperimentellen Ergebnisse am Menschen überprüft. Hierbei wird neben der Lavage mit 1500 ml Taurolidin 0,5% nach der Resektion des Tumors 500 ml 0,5%iges Taurolidin mit 2500 I.U. Heparin versetzt und in die Bauchhöhle instilliert. In der Vergleichsgruppe wird eine Lavage mit 0,25%iger PVP-Jod-Lösung durchgeführt. Zielkriterien dieser Studie sind neben der Lokalrezidivrate und der Überlebensrate der Patienten auch die intraperitoneale und systemische Zytokinproduktion sowie die Fibrinolyseaktivität bei den Patienten im perioperativen Verlauf.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Experimentelle Studien konnten nachweisen, dass durch die perioperative, intraperitoneale Therapie antiadhärenter und zytotoxischer Substanzen wie Taurolidin und Heparin das intra- und extraperitoneale Tumorwachstum nach laparoskopischen Operationen signifikant vermindert werden kann. Hierbei war allerdings unklar, ob die Supprimierung des Tumorwachstums durch direkte lokale oder systemische Effekte der Substanzen hervorgerufen wurde. Deshalb sollte in der aktuellen tierexperimentellen Studie die intraperitoneale Instillation mit der intravenösen Applikation von Taurolidin und Heparin verglichen werden. Um synergistische Effekte bei der Tumorsupprimierung zu analysieren, wurde eine simultane intraperitoneale und intravenöse Applikation von Taurolidin und Heparin durchgeführt. Da der Einsatz der Laparoskopie mit Kohlendioxid in der Malignom-Therapie und der Einfluss dieser Technik auf das postoperative Tumorwachstum immer noch kontrovers diskutiert wird, wurden die tumorinhibierenden Effekte der Substanzen bei Verwendung der konventionellen Operationstechnik und der Insufflation mit Kohlendioxid an der Ratte zusätzlich verglichen.

Nach der intraperitonealen und subkutanen Applikation von  $10^4$  Tumorzellen (DHD/K12/TRb) wurden die Tiere (BD IX Ratten) in sieben laparoskopische und in sieben konventionelle Operationsgruppen randomisiert. Die Operationszeiten betragen 30 Minuten. Bei der Laparoskopie wurde das Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid aufgebaut (8 mmHg). Neben der Inzision ( $\varnothing$  3 mm) über eine im Mittelbauch platzierte Insufflationskanüle, wurden im rechten und linken Unterbauch zwei weitere Inzisionen ( $\varnothing$  3 mm) für Arbeitstrokare angelegt. Die konventionelle Operation erfolgte über eine mediane Laparotomie (4 cm). Am Ende der Intervention wurde entsprechend der Randomisierung die Applikation in die Abdominalhöhle oder die Injektion von Ringerlösung, Taurolidin oder Taurolidin/Heparin in die V. femoralis durchgeführt. Die Wundverschlüsse erfolgten zweischichtig. Die Veränderungen des Differentialblutbildes auf das Operationstrauma und auf die Applikation der therapeutischen Substanzen wurden ermittelt. Hierfür wurden sieben Tage präoperativ, zwei Stunden-, zwei Tage-, sieben Tage und 28 Tage postoperativ peripher venöse Blutentnahmen durchgeführt.

1 ml 0.5% Taurolidin und die zusätzliche Therapie mit 10 IE Heparin reduzierten im Tierexperiment nach intraperitonealer sowie simultaner intraperitonealer und intravenöser Therapie das intraperitoneale Tumorwachstum und die Inzidenz von Trokar-

beziehungsweise Inzisionsmetastasen. Die zusätzliche intraperitoneale Applikation von Heparin führte zu einer weiteren, geringen Suppression des intraperitonealen Tumorwachstums. Die intravenöse Therapie von Taurolidin und der Kombination aus Taurolidin/Heparin hatte keinen tumorsupprimierenden Effekt. Die Verschiebungen der Leukozytenzahlen des Differentialblutbildes wurden hauptsächlich durch das Operationstrauma bewirkt. Die perioperativen Leukozyten wurden durch Taurolidin und Heparin nicht beeinflusst. Die konventionell operierten Tiere entwickelten im Gegensatz zu den laparoskopisch behandelten Tieren eine postoperative Leukozytose. Diese resultierte aus einer postoperativen Lymphopenie und einer kompensierenden Granulozytose. Im Gegensatz dazu führte die Kombination mit Heparin zu einer verminderten Lymphopenie und einer geringeren Granulozytose. In diesem Tierversuch wurden nach der Therapie mit Taurolidin und der Kombination mit Heparin keine Nebenwirkungen beobachtet.

Die tierexperimentellen Daten dieser Studie bestätigen den tumorsupprimierenden Effekt nach intraperitonealer Therapie von Taurolidin und Heparin. Klinische, kontrollierte, randomisierte Studien könnten mit einem hohem Evidenzgrad die intraperitoneale Therapie mit Taurolidin und Heparin validieren, Langzeitresultate liefern und Aussagen über relevante Nebenwirkungen treffen. Die intravenöse Therapie der Substanzen war in unserem Tierexperiment nicht tumorsuppressiv. Ob eine Dosiserhöhung zu einer Steigerung der systemischen Wirksamkeit führt, wird Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein. Denkbar ist jedoch, dass erhöhte Konzentrationen am Wirkort eine Inhibition der Zellproliferation bewirken könnte oder dass intermittierende Infusionen geringerer Konzentrationen gleicher Dosierung einen ausreichenden Wirkspiegel aufbauen können.

Obwohl die exakten Pathomechanismen von Taurolidin die Kombination mit Heparin bisher nicht eindeutig bekannt sind, so gilt für Taurolidin die Übertragung von Methylol- beziehungsweise Methylolgruppen auf Aminogruppen von Peptiden als gesichert. Im Gegensatz dazu bindet Heparin Oberflächenrezeptoren, welche freie Zellen zur Adhäsion, oder Interleukine zur Signaltransduktion benötigen. Taurolidin vermindert die zelleigene Produktion von TNF- $\alpha$ . Dadurch wird NF- $\kappa$ B reduziert, was eine gesteigerte Apoptose bewirkt. Der Stellenwert dieser Signalkette ist für Taurolidin jedoch noch nicht bewiesen und erfordert weiterführende molekularbiologische Untersuchungen.

Der detaillierte Pathomechanismus erlaubt die Suche nach strukturähnlichen und analogen Substanzen von Taurolidin oder Heparin. Eine Verstärkung des tumorinhibierenden

Effektes sowie die Reduktion unerwünschter Wirkungen bieten neue Perspektiven in der lokalen und systemischen Chemotherapie maligner abdominaler Tumoren.

Aufgrund der überzeugenden experimentellen Daten zur intraperitonealen, tumorinhibierenden Wirksamkeit ist eine klinische Überprüfung sinnvoll. Da beide Substanzen in der Klinik seit vielen Jahren verwandt werden und deren Nebenwirkungen bei einer intraperitonealen Applikation gering sind, wird in einer prospektiv randomisierten Multizenterstudie die klinische Relevanz am Menschen überprüft. Zielkriterien sind neben der Lokalrezidiv- und Überlebensrate auch die intraperitoneale und systemische Zytokinproduktion sowie die Fibrinolyseaktivität im perioperativen Verlauf.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CSN	COP9 Signalosom
FGF	Fibroblast-growth-faktor
FGFR	Fibroblast-growth-factor-receptor
FGFR4	Fibroblast-growth-factor-receptor4
°C	Grad Celsius
IKK	IkappaB Kinase Komplex
IL	Interleukin
IL-1?	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
ip	intraperitoneal
iv	intravenös
ipiv	siultan intraperitoneal und intravenös
LPS	Lipopolysaccharide
µl	Mikroliter
MG	Molekulargewicht
ml	Milliliter
NF-?B	Nuclear Faktor kappaB
NPAR	nonparametrischer Test
ns	nicht signifikant
PBS	phosphatgepufferte Salinelösung
p-Wert	Signifikanzniveau p
Tab.	Tabelle
TNF-?	Tumornekrosefaktor alpha

## 8 Literatur

1. Allendorf JDF, Bessler M, Kayton ML, Oesterling SD, Trear MR, Nowygrod R, Whelan RL (1995) Increased tumor establishment and growth after laparotomy versus laparoscopy in a murine model. *Arch Surg* 130: 649-653
2. Baker DM, Jones JA, Nguyen-Van-Tam JS, Lloyd JH, Morris DL, Bourke JB, Steele RJC, Hardcastle JD (1994) Taurolidine peritoneal lavage as prophylaxis against infection after elective colorectal surgery. *Brit J Surg* 81: 1054-1056
3. Balli (1999) How to prevent port-site metastasis in laparoscopic colorectal surgery. *Surg Endosc* 13: 4
4. Bedrosian I, Sofia RD, Wolff SM, Dinarello CA (1991) Taurolidine. An analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin-1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 3: 568-575
5. Billing A, Fröhlich D, Ruckdeschel G (1992) Der Einfluß von Taurolin auf die körpereigene Abwehr und die Keimelimination bei der menschlichen Peritonitis. *Langenbecks Arch Chir* 377: 180-185
6. Blenkarn JJ (1988) Sustained anti-adherence activity of taurolidine (Taurolin) and noxythiolin (Noxyflex S). *J Pharmacol* 40: 509-511
7. Böhm B, Schwenk W, Jacobi CA, Müller JM (1998) Laparoskopische Resektion kolorektaler Karzinome. *Zentralbl Chir* 123: 469-476
8. Böhm B, Schwenk W, Müller JM (1998) Long-term results after laparoscopic resection of colorectal carcinoma. *Chirurg* 70(4): 453-455
9. Bonjer HJ (2000) COLOR: a randomized clinical trial comparing laparoscopic and open resection for Colon cancer. *Dig Surg* 17(6): 617-622
10. Bouvy ND, Marquet RL, Jeekel H, Bonjer HJ (1996) Impact of gas(less) laparoscopy and laparotomy on peritoneal tumor growth and abdominal wall metastases. *Ann Surg* 224: 694-700
11. Bruch HP, Herold A, Schiedeck THK, Schwandner O (1997) Laparoskopische Chirurgie des Rektumkarzinoms. *Zentralbl Chir* 122: 1134-1141
12. Brückner WL, Pfirrmann RW (1985) Taurolin. Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen. Urban & Schwarzenberg München

13. Canis M, Botchorishvili R, Wattiez A, Mage G, Pouly JL, Bruhat MA (1998) Tumor growth and dissimulation after laparotomy and CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum: a rat ovarian cancer model. *Obstet Gynecol* 92(1): 104-108
14. Carter JJ, Whelan RL (2001) The immunologic consequences of laparotomy in oncology. *Surg Oncol Clin N Am* 10(3): 655-677
15. Castronovo V, Tarabolletti G, Sobel ME (1991) Laminin receptor complementary DNA-deduced synthetic peptide inhibits cancer cell attachment to endothelium. *Cancer Res* 51: 5672-5678
16. Cava A, Roman J, Gonzalez Quintela A, Martin F, Aramburo P (1990) Subcutaneous metastasis following laparoscopy in gastric adenocarcinoma. *Eur J Surg oncol* 16: 63-67
17. Clair DG, Lautz DB, Brooks DC (1993) Rapid development of umbilical metastases after laparoscopic cholecystectomy for unsuspected gallbladder carcinoma. *Surgery* 113: 355-358
18. Drouard F, Dalamarre J, Capron JP (1991) Cutaneous seeding of gallbladder cancer after laparoscopic cholecystectomy. *NEJM* 325: 1316
19. Dudas J, Ramadori G, Knittel T, Neubauer K, Raddatz D, Egedy K, Kovalszky I (2000) Effect of heparin and liver heparan sulphate on interaction of HepG2-derived transcription factors and their cis-acting elements: altered potential of hepatocellular carcinoma heparan sulphate. *Biochem J* 15; 350 Pt 1: 245-251
20. Fa. Thomae (1998) Taurolidin. Chirurgische Spüllösung für die Lokalthherapie von intraabdominellen Infektionen. *Thomae Fachinformationen K* 491: 90
21. Farrell TM, Johnson AB, Metreveli RE, Smith CD, Hunter JG (1999) Fascial closure limits metastasis after pneumoperitoneum. *Surg Endosc* 13: 33
22. Fuscio MA, Paluzi MW (1993) Abdominal wall recurrence after laparoscopic-assisted colectomy for adenocarcinoma of the colon. *Dis Colon Rectum* 36: 858-861
23. Gehring H, Kuhmann K, Klotz KF, Ocklitz E, Roth-Isigkeit A, Sedemund-Adib B, Schmucker P (1998) Effects of propofol vs isoflurane on respiratory gas exchange during laparoscopic cholecystectomy. *Acta Anaesthesiol Scand* 42(2): 189-194
24. Gill WB, Jones KW, Ruggiero KJ (1982) Protective effects of heparin and other sulfated glycosaminoglycans on crystal adhesion to injured urothelium. *J Urol* 127: 151-154
25. Goldstein DS, Lu ML, Hattori T (1993) Inhibition of peritoneal tumor cell implantation: model for laparoscopic cancer surgery. *J Endourol* 7: 237-241

26. Goldstein DS, Lu ML, Hattori T, Ratliff TL, Loughlin KR, Kavoussi LR (1993) Inhibition of Peritoneal Tumor-Cell Implantation: Model for laparoscopic cancer surgery. *J Endourology* 7 (3): 237-241
27. Gorman SP, McCafferty DF, Woolfson AD, Jones DS (1987) Reduced adherence of organisms to human mucosal epithelial cells following treatment with Taurolin, a novel antimicrobial agent. *Journal of Applied Bacteriology* 62: 315-320
28. Gutt CN, Kim ZG, Gessmann T, Lorenz M, Paolucci V (2000) Hepatic tumor spread of colorectal cancer in a laparoscopic animal model. *Surg Endosc* 14(5): 448-451
29. Gutt CN, Kim ZG, Hollander D, Bruttel T, Lorenz M (2001) CO<sub>2</sub> environment influences the growth of cultured human cancer cells dependent on insufflation pressure. *Surg Endosc* 15(3): 314-318
30. Gutt CN, Riemer V, Kim ZG, Jacobi CA, Paolucci V, Lorenz M (1999) Impact of laparoscopic Colonic resection on tumour growth and spread in experimental model. *Brit J Surg* 86(9): 1180-1184
31. Hayman EG, Pierschbacher D, Ruoslathi E (1985) Detachment of cells from culture substrate by soluble fibronectin peptides. *J Cell Biol* 100: 1948-1954
32. Hazebroek EJ, Bonjer HJ (1999) COLOR: a randomized clinical trial comparing laparoscopic and open surgery for Colon cancer. ICEL congress Berlin
33. Hewett PJ, Thomas WM, King G, Eaton M (1996) Intraperitoneal cell movement during abdominal carbon dioxide insufflation and laparoscopy: an in vivo model. *Dis Colon Rectum* 39: 62-66
34. Hewitt PH, Kwok SPY, Somer SS, Li K, Leung KL, Lau WY, Li AKC (1998) Laparoscopic-assisted vs. open surgery for colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 41: 901-909
35. Hirvonen EA, Nuutinen LS, Kauko M (1995) Ventilatory effects, blood gas changes, and oxygen consumption during laparoscopic hysterectomy. *Anesth Anal* 80: 961-966
36. Humphries MJ, Olden K, Yamada KM (1986) A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233: 467-470
37. Ishida H, Murata N, Yamada H, Nakada H, Takeuchi I, Shimomura K, Fujioka M, Idezuki Y (2000) Pneumoperitoneum with carbon dioxide enhances liver metastases of cancer cells implanted into the portal vein in rabbits. *Surg Endosc* 14: 239-242
38. Ishida H, Murata N, Yokoyama M, Ishizuka N, Takeuchi I, Odaka A, Shimomura K, Fujioka M, Idezuki Y (2000) The influence of different insufflation pressures during

- carbon dioxide pneumoperitoneum on the development of pulmonary metastasis in a mouse model. *Surg Endosc* 14(6): 578-581
39. Iuppa A, Petralia GA, Sciuto A, Romeo G (1996) Abdominal wall metastasis of pancreatic adenocarcinoma following laparoscopy. *Ann Ital Chir* 67(2): 265-270
  40. Iwanaka T, Arya G, Ziegler MM (1998) Mechanism and prevention of port-site tumor recurrence after laparoscopy in a murine model. *J Pediatr. Surg* 33: 457-461
  41. Jacobi CA, Junghans T, Peter F, Naundorf D, Ordemann J, Müller JM (2000) Cardiopulmonary changes during laparoscopy and vessel injury: comparison of CO<sub>2</sub> and helium in an animal model. *Langenbecks Arch Surg* 385(7): 459-466
  42. Jacobi CA, Keller H, Mönig S, Said S (1995) Implantation metastasis of unsuspected gallbladder carcinoma after laparoscopy. *Surg Endosc* 9: 351-352
  43. Jacobi CA, Ordemann J, De Cuyper KI, Müller JM (1999) Laparoskopische Chirurgie maligner Tumoren. Experimentelle Ergebnisse zur Pathogenese und Prävention von Trokarmetastasen. *Visceralchirurgie* 34: 182-189
  44. Jacobi CA, Peter FJ, Wenger FA, Ordemann J, Müller JM (1999) New therapeutic strategies to avoid intra- and extraperitoneal metastases during laparoscopy: results of a tumor model in the rat. *Dig Surg* 16(5): 393-399
  45. Jacobi CA, Sabat R, Böhm B, Zieren HU, Volk HD, Müller JM (1997) Pneumoperitoneum with carbon dioxide stimulates growth of malignant colonic cells. *Surgery* 121: 72-78
  46. Jacobi CA, Sabat R, Ordemann J, Wenger F, Volk HD, Müller JM (1997) Peritoneale Instillation von Taurolidin und Heparin zur Verhinderung von intraperitonealem Tumorwachstum und Trokarmetastasen bei laparoskopischen Operationen im Rattenmodell. *Langenbecks Arch Chir* 382: 31-36
  47. Jacobi CA, Wildbrett P, Volk T, Müller JM (1999) Influence of different gases and intraperitoneal instillation of antiadherent or cytotoxic agents on peritoneal tumor cell growth and implantation with laparoscopic surgery in a rat model. *Surg Endosc* 13: 1021-1025
  48. Jones DB, Guo LW, Reinhard MK, Soper NJ, Philpott GW, Connet J, Fleshman JW (1995) Impact of pneumoperitoneum on trocar site implantation of colon cancer in hamster model. *Dis Colon Rectum* 38: 1182-1188
  49. Kaidi AA, Nazzal M, Gurchumelidze T, Ali MA, Dawe EJ, Silva YJ (1995) Preoperative administration of antibodies against tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 and their impact on peritoneal adhesion formation. *Am Surg* 61: 569-572

50. Kim SH, Milsom JW, Gramlich TL, Toddy SM, Shore GI, Okuda J, Fazio VW (1998) Does laparoscopic vs. conventional surgery increase exfoliated cancer cells in the peritoneal cavity during resection of colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 41(8): 971-978
51. Kim ZG, Schmandra T, Krähenbühl L, Gutt CN (2000) Changes in Portal venous blood flow during Laparoscopic CO<sub>2</sub>-insufflation and application of vasomodulatoric agents. ICEI Kongress Berlin
52. Knight BI, Skellern GG, Browne MK, Pfirrmann RW (1981) Peritoneal absorption of the antibacterial and antiendotoxin Taurolidine in peritonitis. *Br J clin Pharmac* 12: 695-699
53. Köckerling F, Reymond MA, Schneider C, Wittekind C, Scheidbach H, Konradt J, Kohler L, Barlehner E, Kuthe A, Bruch HP, Hohenberger W (1998) Prospective multicenter study of the quality of oncologic resections in patients undergoing laparoscopic colorectal surgery for cancer. The Laparoscopic Colorectal Surgery Study Group. *Dis Colon Rectum* 41(8): 963-970
54. Lacy, Delgado S, Garcia-Valdecasas, Castells A, Pique L, Grande J, Fuster, Targarona M Pera Visa (1998) Port site metastases and recurrence after laparoscopic colectomy. *Surg Endosc* 12(8): 1039-1042
55. Lanfrancone L, Boraschi D, Ghiara P (1992) Human peritoneal mesothelial cells produce many cytokines (granulocyte Colony-stimulating factor, granulocyte-monocyte CSF, macrophage CSF, IL-1 and IL-2) and are activated and stimulated to grow by IL-1. *Blood* 80: 2835-2842
56. Lauroy J, Chaumpault G, Risk N, Boutelier P (1994) Metastatic recurrence at cannula site: should digestive cancers still be managed by laparoscopy? *Br J Surg* 81 (Suppl): 31
57. Le Moine MC, Navarro F, Burgel JS, Pelegri A, Khiari AR, Pourquier D, Fabre JM, Domergue J (1998) Experimental assessment of the risk of tumor recurrence after laparoscopic surgery. *Surgery* 123: 427-431
58. Lee SW, Southall JC, Gleason NR, Huang EH, Bessler M, Whelan RL (2000) Lymphocyte proliferation in mice after a full laparotomy is the same whether performed in a sealed carbon dioxide chamber or in room air. *Surg Endosc* 14: 235-238

59. Lee SW, Whelan RL, Southall JC, Bessler M (1998) Abdominal wound tumor recurrence after open and laparoscopic-assisted splenectomy in a murine model. *Dis Colon Rectum* 41: 824-831
60. Loo BM, Kreuger J, Jalkanen M, Lindahl U, Salmivirta M (2001) Binding of heparin/heparan sulfate to fibroblast growth factor receptor 4. *J Biol Chem* 276, ahead of print
61. Maniatis T (1997) Catalysis by a multiprotein I $\beta$ B Kinase Komplex. *Science* 278: 818-819
62. McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP (2000) Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo. *Ann Surg Oncol* 7: 685-691
63. Milsom JW, Böhm B, Hammerhofer KA, Faszio VW, Steiger E, Elson PA (1998) A prospective, randomized trial comparing laparoscopic versus conventional techniques in colorectal cancer surgery: a preliminary report. *J Am Coll Surg.* 187(1):46-54; discussion 54-55.
64. Monson JRT, ramsey PS, Donohue JH (1993) Taurolidine inhibits tumor necrosis factor (TNF) toxicity – new evidence of TNF and endotoxin synergy. *European Journal of Surgical Oncology* 19: 226-231
65. Neuhaus SJ, Ellis T, Jamieson GG, Watson DI (1999) Experimental study of the effect of intraperitoneal heparin on tumour implantation following laparoscopy. *Brit J Surg* 86(3): 400-404
66. Neuhaus SJ, Texler M, Hewett PJ, Watson DI (1998) Port site metastasis following laparoscopic surgery. *Brit J Surg* 85: 735-741
67. Neuhaus SJ, Watson DI, Ellis T, Dodd T, Rofe AM, Jamieson GG (1998) Efficacy of cytotoxic agents for the prevention of laparoscopic port-site metastases. *Arch Surg* 133: 762-766
68. Neuhaus SJ, Watson DI, Ellis T, Rowland R, Rofe AM, Pike GK, Mathew G Jamieson GG (1998) Wound metastasis after laparoscopy with different insufflation gases. *Surgery* 123: 579-583
69. Norrby K (1997) Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 105: 417-437
70. O'Rourke N, Price PM, Kelly S, Sikora K (1993) Tumor inoculation during laparoscopy. *Lancet* 342: 368
71. Obeid F, Saba A, Fath J et al. (1995) Increases in intraabdominal pressure affect pulmonary compliance. *Arch Surg* 130: 544-548

72. Ogihara Y, Isshiki A, Kindscher JD, Goto H(1999) Abdominal wall lift versus carbon dioxide insufflation for laparoscopic resection of ovarian tumors. *J Clin Anesth* 11(5): 406-412
73. Oikonen M, Tallgren M(1995) Changes in respiratory compliance at laparoscopy: measurements using side stream spirometry. *Can J Anaesth* 76: 640-644
74. Paik PS, Misawa T, Chiang M, Towson J, Im S, Ortega A, Beart RW Jr (1998) Abdominal incision tumor implantation following pneumoperitoneum laparoscopic procedure vs. standard open midline incision in a syngeneic rat model. *Dis Colon Rectum*: 419-422
75. Pauwels M, Lauwers P, Hendriks J, Hubens A, Eyskens E, Hubens G (1999) The effect of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum on the growth of a solid colon carcinoma in rats. *Surg Endosc* 13(10): 998-1000
76. Reymond MA, Wittekind C, Jung A, Hohenberger W, Kirchner T, Köckerling F (1997) The incidence of port site metastases might be reduced. *Surg endosc* 11: 902-906
77. Ruoshlathi E, Pierschbacher D(1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238: 491-497
78. Schulze S, Lyng KM, Perner A, Bendtsen A, Thorup J, Nielson HJ, Rasmussen V, Rosenberg J(1999) Cardiovascular and respiratory changes and Convalescence in Laparoscopic Colonic Surgery. Comparison between carbon Dioxide pneumoperitoneum and Gasless Laparoscopy. *Arch Surg* 134(10): 1112-1118
79. Schwenk W, Böhm B, Müller JM (1998) Laparoskopische oder konventionelle kolorektale Resektionen – beeinflusst die Operationstechnik die postoperative Lebensqualität? *Zentralbl Chir* 123: 483-490
80. See WA, Chapman PH (1987) Heparin prevention of tumor cell adherence and implantation on injured urothelial surfaces. *J Urol* 138: 182-187
81. Seeger M, Kraft R, Ferrell K, Bech-Otschir D, Dumdey R, Schade R, Gordon C, Naumann M, Dubiel W (1998) A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J* 12(6): 469-478
82. Shiromizu A, Suematsu T, Yamaguchi K, Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S (2000) Effect of laparotomy and laparoscopy on the establishment of lung metastasis in a murine model. *Surgery* 128(5): 799-805

83. Siriwardena A, Samarji WN (1993) Cutaneous tumor seeding from a previously undiagnosed pancreatic carcinoma after laparoscopic cholecystectomy. *Ann R Coll Surg Engl* 75: 199-200
84. Southall JC, Lee SW, Bessler M, Allendorf JD, Whelan RL (1997) The effect of peritoneal air exposure on postoperative tumor growth. *Surg Endosc* 12: 348-350
85. Suzuki H, Chiba T, Kobayashi M, Takeuchi M, Furuichi K, Tanaka K (1999) In vivo and in vitro recruitment of an IkappaBalpha-ubiquitin ligase to IkappaBalpha phosphorylated by IKK, leading to ubiquitination. *Biochem Biophys Res Comm* 256(1): 121-126
86. Targarona EM, Martinez J, Nadal A, Balagué C, Cardesa A, Pascual S, Trias M (1998) Cancer dissimulation during laparoscopic surgery: Tubes, gas, and cells. *World J Surg* 22: 55-61
87. Teschner M (1996) *Taurolidin in der septischen Chirurgie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart
88. Tseng LN, Berends FJ, Wittich P, Bouvy ND, Marquet RL, Kazemier G, Bonjer HJ (1998) Port-site metastases. Impact of local tissue trauma and gas leakage. *Surg Endosc* 12: 1377-1380
89. van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR (1998) Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Cell Biol* 8: 107-111
90. Vittimberga FJ, Foley DP, Meyers WC, Callery MP (1998) Laparoscopic Surgery and the Systemic Immune Response. *Ann Surg* 227 (3): 326-334
91. Volpino P, Cangemi V, Andrea ND, Cangemi B, Piat G (1998) Hemodynamic and pulmonary changes during and after laparoscopic cholecystectomy. A comparison with traditional surgery. *Surg Endosc* 12: 119-123
92. Wang PH, Yen MS, Yuan CC, Chao KC, NG HT, Lee WL, Chao HT (1997) Port site metastasis after laparoscopic-assisted vaginal hysterectomy for endometrial cancer: possible mechanisms and prevention. *Gynecologic oncology* 66: 151-155
93. Watson DI, Mathew G, Ellis T, Baigrie CF, Rofe AM, Jamieson GG (1997) Gasless laparoscopy may reduce the risk of port-site metastases following laparoscopic tumor surgery. *Arch Surg* 132: 166-168
94. Watson RW, Redmond HP, McCarthy J, Bouchier-Hayes D (1995) Exposure of the peritoneal cavity to air regulates early inflammatory responses to surgery in a murine model. *Br J Surg* 82: 1060-1065

95. Wexner SD, Cohen SM (1995) Port site metastases after laparoscopic colorectal surgery for cure of malignancy. *Br J Surg* 82: 295-298
96. Wexner SD, Latulippe JF (1997) Laparoscopic colorectal surgery and cancer. *Swiss Surg* 3: 266-273
97. Whalen GF, Ingber DE (1989) Inhibition of tumor cell attachment to extracellular matrix as a method for preventing tumor recurrence in a surgical wound. *Ann Surg* 210: 758-764
98. Willats SM, Radford S, Leitermann M (1995) Effect of the antiendotoxic agent, taurolidine, in the treatment of sepsis syndrom: a placebo -controlled, double-blind trial. *Critical Care Medicine* 23(6): 1033-1039
99. Wördemann M, Fandrey J, Jelkmann W (1998) Tumor necrosis factor –alpha production by human hepatoma cell lines is resistant to drugs that are inhibitory to macrophages. *Journal of interferon and cytokine research* 18: 1069-1075
100. Wu JS, Brasfield Earl B, Guo LW, Ruiz M, Connett JM, Philpott G, Jones DBJ, Fleshman JW (1997) Implantation of Colon cancer at trocar sites is increased by low pressure pneumoperitoneum. *Surgery* 122(1): 1-7
101. Wu JS, Pfister SM, Ruiz MB, Connett JM, Fleshman JW (1998) Local treatment of abdominal wound reduces tumor implantation. *J Surg Oncol* 69 (9): 9-14
102. Yanagisawa M, Imai H, Fukushima Y, Miura AB, Nakamoto Y (1994) Effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta on the proliferation of cultured glomerular epithelial cells. *Virchows-Arch* 426: 581-586

## **8.1 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich diese Arbeit selbständig, ohne fremde Hilfe und nur unter der angegebenen Literatur angefertigt habe.

Chris Braumann

Berlin, den 06.11.2001

## 8.2 Danksagungen

Danke,

Herrn PD. Dr. med. C. A. Jacobi, der Klinik für Allgemein-, Visceral, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité Campus Mitte, für sein stets persönliches und freundschaftliches Engagement, seine Anregungen, gewissenhafte Unterstützung zur Planung und Durchführung der tierexperimentellen Versuche, bei der Auswertung der Ergebnisse und bei der Erstellung meiner Dissertation.

den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Tier-OP sowie dem tierexperimentellen- und Zelllabor, Frau Kirsten Führer, Herrn Peer Wildbrett und Frau Bettina Müller, für ihre tatkräftige Unterstützung sowie in der Ausbildung in den notwendigen Labortechniken, der Bereitstellung der chirurgischen Instrumentarien, der Tierpflege sowie bei der Lösung auftretender Probleme.

meiner Frau Antje für die Unterstützung meiner beruflichen Tätigkeit und für das Verständnis, meine wissenschaftlichen und beruflichen Ziele zu realisieren.

meinen Eltern, die meiner Schwester und mir eine umfassende schulische Ausbildung und das Medizinstudium ermöglichten.

### 8.3 Lebenslauf

Name: Chris Braumann

Geburtstag & -ort: 31.12.69 in Torgau

Familienstand: Verheiratet

Schulbildung:  
09/76-08/88 Abschluss des Abiturs in Torgau

Militärdienst:  
01.09.88-25.08.90 Fahrzeugführer

Vorpraktikum:  
01.09.90-30.09.91 Universitätsklinikum Charité, Med. Fak. der HU Berlin, Chirurgie

Universitäre Ausbildung: Studium der Humanmedizin

10/91-09/93 Vorklinik, Martin-Luther-Universität Halle / Saale

10/93-09/95 Freie Universität Berlin

10/95-09/96 Humboldt-Universität zu Berlin

04/97-07/98 Praktisches Jahr; Pädiatrie:  
HU Berlin, Charité, Campus Virchow-Klinikum

Chirurgie, Schwerpunkt kardiothorakale Chirurgie:  
Groote Schuur Hospital, University of Cape Town, Südafrika

Innere Medizin: HU Berlin, Campus Charité Mitte

Berufliche Ausbildung:  
08/98-2001 Klinik für Allgemein-, Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie  
Charité Campus Mitte, Humboldt-Universität zu Berlin

## 8.4 Publikationsverzeichnis

1. Braumann C, Ordemann J, Wildbrett P, Jacobi CA. The influence of intraperitoneal and systemic application of taurolidine and taurolidine/heparin during laparoscopy on intraperitoneal and subcutaneous tumor growth in rats. *Clin Exp Metastasis* 2001, 18(7): 547-552
2. Braumann C, Ordemann J, Wildbrett P, Wenger FA, Jacobi CA. Local and systemic chemotherapy with taurolidine and taurolidine/heparin in colon cancer bearing rats undergoing laparotomy. *Clin Exp. Metastasis* 2000, 18: 547-552
3. Braumann C, Jacobi CA. Das Pneumoperitoneum und die Auswirkungen auf die Respiration. 2001, CAMIC Buchkapitel, in press
4. Jacobi CA, Braumann C. The laparoscopic exposure methods. SAGES book, 2001, Chapter, in press
5. Ordemann J, Jacobi CA, Braumann C, Schwenk W, Volk H, Müller JM. Immunomodulatory changes in patients with colorectal cancer. *International Journal of Int J Colorectal Dis.* 2002, 17(1): 37-41
6. Jacobi CA, Sterzel A, Braumann C, Halle E, Stößlein R, Krähenbühl L, Müller JM. The impact of conventional and laparoscopic colon resection (CO<sub>2</sub> or helium) on intraperitoneal adhesion formation in a rat peritonitis model. *Surg Endosc* 2001, 15(4): 380-386
7. Balague C, Braumann C, Führer K, Guski H, Jacobi CA. Validation of a new experimental model of colon cancer. *Surg Endosc* 2001, 15(8): 833-836