

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Urologie an
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. P. Fornara)

**Das orthotope syngene murine Harnblasentumormodell MB 49
Etablierung, Optimierung und Erweiterung des Modells
unter besonderer Berücksichtigung der Tumorzelladhäsion als
Rezidivursache beim oberflächlichen Harnblasentumor**

Habilitation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med. habil.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. med. Andreas Jurczok
geboren am 19. Februar 1965

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Rübben
Prof. Dr. med. O. Hakenberg
Prof. Dr. med. W.F. Wieland

Datum der Verteidigung: 21.10.2008
Datum der Beschlussfassung: 09.12.2008

Dekane: Prof. Dr. med. S. Zierz
Prof. Dr. med. H. Dralle

urn:nbn:de:gbv:3-000015191

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000015191>]

Meinen lieben Eltern,
meiner Frau Susanne und
meinen Kindern
dankbar zugeschrieben

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	4
1.1 Das oberflächliche Harnblasenkarzinom	4
1.1.1 Klinische Aspekte zum oberflächlichen Harnblasenkarzinom	4
1.1.2 Experimentelle Aspekte zum oberflächlichen Harnblasenkarzinom	5
1.2 Aufgabenstellung	6
1.2.1 Das orthotope murine syngene Harnblasentumormodell	6
1.2.1.1 Optimierung des orthotopen syngen murinen Harnblasentumormodells	7
1.2.1.2 Immuntherapie im orthotopen syngen murinen Harnblasentumormodell	7
1.2.2 Antiinfektiöse Therapie der systemischen BCG-Infektion.....	9
1.2.3 Das Integrinkonzept	10
1.2.3.1 Tumorzellimplantationsinhibition im orthotopen syngen murinen Harnblasentumormodell durch Integrinblockade mit Oligopeptiden	11
1.2.4 Die Portmetastasierung.....	12
1.2.4.1 Klinische und experimentelle Aspekte zur Portmetastasierung	12
1.2.4.2 Tumorzellimplantationsinhibition im syngen murinen Portmetastasenmodell durch Integrinblockade mit Oligopeptiden	13
1.2.5 Biolumineszens in der experimentellen Tumorforschung	14
1.2.5.1 Biolumineszens im orthotopen syngen murinen Harnblasentumormodell	14
2 METHODIK	16
2.1 Tiere	16
2.2 Tumorzellen	16
2.3 Immuntherapeutika: BCG, aBCG, POF, ASS	16
2.4 Antibiotika	17
2.5 Oligopeptide.....	17
2.6 In vitro Untersuchungen	18
2.6.1 Sensibilität von BCG gegen Antibiotika	18
2.6.2 Tumorzelladhäsionsassay.....	18
2.7 In vivo: Tumorzellimplantation	19
2.7.1 Technik der orthotopen Tumorzellimplantation.....	19
2.7.2 Optimierte Implantationstechnik des orthotopen syngen murinen Harnblasentumormodells	20
2.8 Immuntherapie im orthotopen syngen murinen Harnblasentumormodell.....	21
2.8.1 Behandlungsprotokoll.....	21
2.8.2 Statistische Analyse	22
2.9 Antiinfektiöse Therapie unter BCG.....	22
2.9.1 Behandlungsprotokoll des systemischen Infektionsmodells.....	22
2.9.1.1 Bestimmung der LD 50.....	22
2.9.1.2 Systemische primäre BCG-Infektion	22
2.9.1.3 Therapie der systemischen primären BCG-Infektion	23
2.9.1.4 Systemische sekundäre BCG-Infektion.....	23
2.9.1.5 Therapie der systemischen sekundären BCG-Infektion.....	23

2.9.2	Behandlungsprotokoll intravesikale Blasenmorthapie mit BCG unter begleitender Antibiotika-/Steroid-Therapie.....	24
2.10	Orthotope Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische	24
2.10.1	Behandlungsprotokoll	24
2.10.2	Statistische Analyse.....	25
2.11	Biolumineszentes syngenes orthotopes murines Harnblasentumormodell.....	25
2.11.1	Generierung Luciferase exprimierender Zellklone.....	25
2.11.2	Luciferase Assay.....	26
2.11.3	Nachweis der Linearität von Lichtemission zu Tumorzellzahl	26
2.11.4	Die orthotope Tumorzellimplantation im biolumineszenten Harnblasentumormodell	27
2.11.5	Behandlungsprotokoll	28
2.11.6	Biolumineszenz-Imaging im orthotopen Harnblasentumormodell	28
2.11.7	Immunhistochemischer Nachweis Luc-positiver Tumorzellen und Hematoxylin-Eosin (HE) Färbung.....	28
2.11.8	Statistische Analyse.....	29
2.12	Die Tumorzellimplantation im Portmetastasenmodell	29
2.12.1	Behandlungsprotokoll	30
2.12.2	Statistische Analyse.....	31
3	ERGEBNISSE.....	32
3.1	Immuntherapie im orthotopen syngenen murinen Harnblasentumormodell.....	32
3.1.1	Modifikation des MB-49 Harnblasentumormodells	32
3.1.2	Effekte der Instillationstherapie auf das durchschnittliche Blasengewicht:.....	34
3.1.3	Effekte der Instillationstherapie auf das Überleben	35
3.2	Antiinfektiöse Therapie unter BCG.....	36
3.2.1	In vitro.....	36
3.2.2	Das systemische Infektionsmodell.....	37
3.2.2.1	Bestimmung der LD 50 nach systemischer BCG-Infektion.....	37
3.2.2.2	Therapie der systemischen primären BCG-Infektion	38
3.2.2.3	Therapie der systemischen sekundären BCG-Infektion.....	38
3.2.2.4	Intravesikale Blasenmorthapie mit BCG unter begleitender Antibiotika-/Steroid-Therapie	39
3.2.2.5	Post mortem Untersuchung.....	40
3.3	Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische	41
3.3.1	In vitro.....	41
3.3.2	Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im orthotopen syngenen murinen Harnblasentumormodell	44
3.3.2.1	Tumorinzidenz	44
3.3.2.2	Blasengewicht	46
3.3.2.3	Histopathologische Evaluation	47
3.3.3	Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im biolumineszenten syngenen murinen Harnblasentumormodell	47
3.3.3.1	Tumorinzidenz	47
3.3.3.2	Biolumineszens im orthotopen Harnblasentumormodell.....	48
3.3.3.3	Harnblasengewicht	51
3.3.3.4	Histopathologische Evaluation	51
3.3.4	Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im Portmetastasenmodell ...	52
3.3.4.1	Körpergewicht.....	52
3.3.4.2	Tumorinzidenz	52
4	DISKUSSION	54

4.1	Optimierung des orthotopen murinen Harnblasenkarzinom-Modells und Einsatz zur Untersuchung der intravesikalen Bacillus Calmette-Guérin Immuntherapie	54
4.2	Immuntherapie mit BCG beim Blasen tumor in Hinblick auf systemische Infektionskomplikationen und Beeinflussung der lokalen Tumorwirkung durch Antibiotikatherapie	58
4.3	Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische	62
4.3.1	Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im orthotopen syngenem murinen Harnblasentumormodell	62
4.3.2	Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im biolumineszenten orthotopen syngenem murinen Harnblasentumormodell	67
4.3.3	Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im Portmetastasenmodell ...	70
5	LITERATUR	73
6	ANHANG	82
6.1	Thesen	82
6.2	Lebenslauf	84
6.3	Eidesstattliche Erklärung	85
6.4	Danksagung	86
6.5	Abkürzungen	87

Einleitung

1.1 Das oberflächliche Harnblasenkarzinom

Jährlich erkranken etwa 11 Männer und 5 Frauen pro 100 000 Einwohnern neu am Harnblasenkarzinom. Das Urothelkarzinom der Harnblase hat eine Häufigkeit von ca. 10/100000 und verursacht etwa 3,5% aller Krebstodesfälle (1). Die überwiegende Mehrzahl der Tumoren (70-80%) ist bei Diagnosestellung oberflächlich (Tumorstadien pTa, pT1 und carcinoma in situ), d.h. eine Infiltration der Blasenmuskulatur oder tieferer Schichten liegt nicht vor. Die Standardtherapie besteht bei diesen Tumorstadien in der transurethralen Elektroresektion der Tumoren. Hierbei ist das Blasentrauma relativ stark, so dass es nicht nur am Ort der Resektion, sondern auch an anderer Stelle zu Urothelabschürfungen und Blutkoagelauflagerungen kommt. Nach einer derartigen organerhaltenden Behandlung rezidivieren etwa 70% der oberflächlichen Tumoren, teils in Abhängigkeit von Tumorstadium und Differenzierungsgrad (2), teils aber auch abhängig von weiteren Prognosefaktoren wie Tumorgröße, multifokalem Wachstum und begleitenden Urotheldysplasien (3). Etwa 25% der Rezidivtumore zeigen eine Progression, d.h. eine Verschlechterung des Tumorstadiums oder der Tumordifferenzierung beim Rezidiv im Vergleich zum Ersttumor (4).

1.1.1 Klinische Aspekte zum oberflächlichen Harnblasenkarzinom

Eine anerkannte Therapiemaßnahme zur Verhinderung derartiger Tumorrezidive in der Blase ist die postoperative intravesikale Rezidivprophylaxe mit Chemotherapeutika (Doxorubicin, Mitomycin) oder Immuntherapeutika (Bacillus Calmette-Guérin (BCG), wobei die Immuntherapie mit BCG, zumindest bei G3 Tumoren und beim carcinoma in situ die effektivste Maßnahme der topischen Behandlung darstellt (5). Eine Rezidivprophylaxe wird ca. 3 Wochen nach erfolgter Operation begonnen und erstreckt sich auf Zeiträume zwischen 6 Wochen und 2 Jahren. Etwa 50 - 70% der Patienten mit rezidivierenden oberflächlichen Blasen-tumoren erhalten eine derartige Nachbehandlung.

Als Ursache für die hohe Rezidivrate oberflächlicher Harnblasentumoren auch nach vollständiger transurethraler Resektion werden im wesentlichen zwei Mechanismen diskutiert:

1. Disposition: Eine grundsätzliche genetische Veränderung des Urothels (6), welche im Zusammenhang mit exogenen Noxen (Nitrosaminderivate, Rauchen, chronische Irritation) zur malignen Transformation urothelialer Zellen führt (7, 8).

2. Implantation: Bei transurethraler Resektion ausgeschwemmte Tumorzellen implantieren sich in der traumatisierten Blasenwand und führen hier zum erneuten Wachstum von Tumoren (9). Es zeigte sich, dass Tumoren im Blasendach primär äußerst selten sind, nach transurethraler Resektion hier jedoch in einer Häufigkeit von bis zu 20% angetroffen werden (10). Weiterhin sind maligne Zellen nach erfolgter transurethraler Resektion über einen längeren Zeitraum hinweg in der Blasenpflüssigkeit nachweisbar (11).

Ein indirekter Hinweis für die klinische Bedeutung und insbesondere für die Möglichkeit der therapeutischen Beeinflussung der Tumorzellimplantation beim Harnblasenkarzinom konnte durch eine multizentrische EORTC-Studie aufgezeigt werden, in der durch die einmalige Instillation eines Chemotherapeutikums (5-Epirubicin) direkt postoperativ die Rezidivrate um nahezu die Hälfte gesenkt werden konnte (12). Derartige Chemotherapeutika stellen jedoch toxische Substanzen mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen dar, deren Instillation in die Blase insbesondere bei nicht abgeheilter Resektionswunde zum systemischen Übertritt mit konsekutiver Myelosuppression führen kann (10, 13-16).

1.1.2 Experimentelle Aspekte zum oberflächlichen Harnblasenkarzinom

Zur genauen Untersuchung dieses Phänomens wurde ein Tierversuchsmodell etabliert (10, 17). Nur nach vorheriger transurethraler Koagulation der Mausblase konnte ein Tumorzellwachstum instillierter syngener Tumorzellen in über 80% der Fälle erzielt werden, während die Implantationsrate in nicht koagulierten Mausblasen um 2 Zehnerpotenzen niedriger lag (10, 17, 18). Dieses Modell ist heute als ein etabliertes Modell der lokalen Tumorzellimplantation anzusehen (19-22). Die Implantation der Tumorzellen ist abhängig vom Ausmaß der Verlet-

zung der urothelialen Oberfläche sowie von der Anzahl freigesetzter Tumorzellen (23). Das Ausmaß der Tumorzellimplantation variiert ebenfalls in Abhängigkeit vom verwendeten Resektionsverfahren: So konnte gezeigt werden, dass nach Elektrokoagulation 6,2-fach mehr Zellen freigesetzt wurden, als nach Laserbestrahlung von Tumoren derselben Größe (18). Aufgrund dieser klinischen und experimentellen Datenlage ist die Tumorimplantationstheorie somit als ein relevanter Faktor der Rezidivhäufigkeit des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms anzusehen (23).

1.2 Aufgabenstellung

1.2.1 Das orthotope murine syngene Harnblasentumormodell

Tiermodelle des Harnblasenkarzinoms ermöglichen die Untersuchung von Aspekten, die nicht unter klinischen Bedingungen geprüft werden können, wie z.B. die Entwicklung und Evaluation von neuen Chemo- oder Immuntherapeutika, von Behandlungsschemata oder von Begleitmedikationen. Derzeit sind 3 prinzipiell unterschiedliche murine Harnblasentumormodelle etabliert, das chemisch induzierte Blasenkarzinom (24, 25), das Xenograftmodell (Transplantation humaner Blasenkarzinomzellen in immundefiziente Mäuse) (26-28) und das syngene Tumormodell (Transplantation von karzinogen-induzierten Blasenkarzinomen in syngene immunkompetente Mäuse) (29-32). Das syngene murine Harnblasenkarzinommodell scheint am ehesten geeignet, Immuntherapeutika und Immuntherapieverfahren zu evaluieren. Der größte Vorteil dieses Modells ist es, Tumor- und Behandlungsabläufe im autologen System immunkompetenter Mäuse zu untersuchen. Die syngenesischen Blasentumorzellen können entweder subkutan (heterotop) oder intravesikal (orthotop) implantiert werden. Die orthotope Tumorimplantation ist schwieriger, die Möglichkeit Tumorstadium und therapeutische Effekte im Ursprungsorgan zu untersuchen, macht das experimentelle Ergebnis aufgrund der immunologischen Nähe zur realen Situation jedoch verlässlicher.

1.2.1.1 Optimierung des orthotopen syngen murinen Harnblasentumormodells

Die erfolgreiche Tumorimplantation als die Basis des orthotopen Tumormodells versagt jedoch in etwa 25% der Tiere, am ehesten aufgrund technischer und methodologischer Schwierigkeiten (21, 33). Die niedrigen Tumoranwachsraten machen die Interpretation experimenteller Ergebnisse schwierig und führen wegen der erforderlichen Gruppengröße zu unnötig hohen Versuchstierzahlen. Diese Probleme führten uns dazu, nach Verbesserungen des orthotopen Blasentumormodells zu suchen. Die intravesikale Tumorimplantation wurde in einer Modifikation der von Soloway (31) und Shapiro (21) beschriebenen Methodik eingesetzt. Als ein wesentliches Kriterium der bekannten unzuverlässigen Implantationsrate erschien die kurze Retentionszeit in die Blase eingebrachter Lösungen. Bei üblicher Technik entleerten die Mäuse nach Entfernen des Instillationskatheters zu unterschiedlichen Zeiträumen unvorhersehbar reflektorisch die Blase, so dass eine gleichmäßige und insbesondere lange Retentionsdauer nicht gewährleistet war. Dies schien ein geeigneter Ansatzpunkt zur Modifikation des orthotope Modells.

1.2.1.2 Immuntherapie im orthotopen syngen murinen Harnblasentumormodell

Die intravesikale BCG-Therapie wird als die effektivste Behandlung des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms nach transurethraler Resektion angesehen (34). Seit der ersten klinischen Verwendung von BCG beim Menschen 1976 wurde diese Behandlung der Goldstandard der intravesikalen Therapie beim oberflächlichen „high risk“ Harnblasenkarzinom (Ta/1, GIII) (5). Die Instillation lebender attenuierter Mykobakterien ist jedoch mit typischen zystitischen Nebenwirkungen wie Dysurie und Pollakisurie vergesellschaftet. 60-80% der Patienten unter intravesikaler BCG-Therapie berichten über derartige Symptome, was zur vorzeitigen Beendigung der Behandlung führen kann (35). BCG induziert eine entzündliche Reaktion in der Harnblasenwand, die zur Infiltration von mononukleären und granulozytären Zellen führt (36). De Boer u.a. zeigten einen massiven Anstieg von neutrophilen Granulozyten im Urin von Patienten, mit einem Maximum am Tage der BCG-Instillation und an den folgenden zwei Tagen (37). Die Freisetzung von Granulozyten assoziierten Enzymen, wie Myeloperoxi-

dase, Collagenase, Elastase und Lactoferrin (38) konnte ebenfalls nachgewiesen werden und wurde als eine mögliche Ursache der BCG-induzierten Nebenwirkungen gesehen (39). Aus diesem Grunde ist ableitbar, dass die lokalen BCG-induzierten Nebenwirkungen überwiegend durch Granulozyten hervorgerufen werden.

In vitro Untersuchungen zeigten eine Aktivierung von Granulozyten nach direkter Koinkubation mit BCG (40, 41). Zugabe von antiinflammatorischen Medikamenten zeigte eine Verminderung der BCG-induzierten Granulozytenaktivierung in diesen Experimenten. Acetylsalizylsäure (ASS) war jedoch die einzige Substanz, die in parallel durchgeführten Experimenten nicht die BCG-induzierte Zytotoxizität von mononukleären Zellen gegen Blasen-tumorzellen beeinträchtigte (40, 41). Pentoxifyllin, ein Phosphodiesterasehemmer, zeigte ebenfalls eine Hemmung der Granulozytenaktivierung in vitro, jedoch ebenfalls eine Reduktion der BCG-aktivierten Killerzell (BAK)-Zytotoxizität (42). Dieser Effekt auf die BAK-Zytotoxizität jedoch war vorübergehend und nach Erneuerung des Mediums reversibel. Die Koinkubation mit autoklaviertem BCG zeigte eine geringere Granulozytenaktivierung als die Koinkubation mit viablem BCG (43). Aus diesen Gründen und aus den der bekannten klinischen Effektivität von ASS schlussfolgerten wir, dass ASS oder POF vielversprechende Medikamente zur Therapie der lokalen Nebenwirkungen der intravesikalen BCG-Behandlung sein könnten und möglicherweise routinemäßig bei der BCG-Therapie verabreicht werden sollten. Andererseits sind negative Auswirkungen von gerinnungshemmenden Medikamenten wie ASS auf die BCG-Therapie berichtet worden (44). Die Inhibition des Tumornekrosefaktors α (TNF α) durch POF und weitere komplexe Interaktionen mit dem Zytokinnetzwerk könnten auch hier in einer verringerten therapeutischen Effizienz resultieren (45).

Vor diesem Hintergrund führten wir Tierversuche mit dem modifizierten murinen orthotopen MB49 Blasen-tumormodell durch, um negative Effekte o.a. Medikamente auf die Antitumoreffektivität von BCG im lebenden Organismus auszuschließen.

1.2.2 Antinfektiöse Therapie der systemischen BCG-Infektion

Die intravesikale BCG-Therapie ist von einer Reihe von Nebenwirkungen kompromittiert z.B. Dysurie, Pollakisurie, Hämaturie und Fieber. Die schwerste, jedoch seltene Komplikation stellt die systemische BCG-Infektion dar. Die Ursache für eine systemische BCG-Infektion nach lokaler BCG-Gabe liegt in einem ungewollten Übertritt von BCG in das venöse System bei entzündlich oder traumatisch verändertem Urothel der Harnblase (46). Hieraus können langfristig persistierende Infektionen z. B. in der Lunge resultieren (47, 48), die lebensbedrohlich werden können.

Nach lokaler Applikation auftretende systemische BCG-Infektionen werden bisher tuberkulostatisch behandelt. Hierzu werden die Kombination Isoniazid (INH), Rifampicin, Ethambutol und Cycloserin als Standard empfohlen (49).

Eine weitere Komponente der BCG-Toxizität ist die hypersensitive Reaktion bis hin zum Schock bei wiederholter BCG-Verabreichung. Über plötzliche hypotensive Krisen, Fieber und einsetzende intravasale disseminierende Gerinnung (DIC) wurde berichtet (50). In einzelnen Fallberichten konnten diese Erscheinungen mit Hilfe der additiven Gabe von Steroiden (Prednisolon) erfolgreich angegangen werden (50), obgleich allgemein bei der Gabe von Steroiden im Rahmen einer floriden Tbc-Infektion aufgrund der immunsuppressiven Wirkung eher Zurückhaltung empfohlen wird. Hierzu fehlten bisher jedoch notwendige systematische Untersuchungen, die in den nachfolgend berichteten Experimenten durchgeführt wurden.

In in vitro Untersuchungen überprüften wir, welche häufig eingesetzten modernen Antibiotika die Viabilität von BCG beeinflussten. Aus diesen Untersuchungen erschien der Einsatz von Fluorochinolonen zur Therapie der systemischen und lokalen Nebenwirkungen nach BCG Erfolg versprechend, weshalb wir diese Hypothese im Tierexperiment überprüften. Da klinisch die Viabilität von BCG essentiell für die therapeutische Effektivität ist, wurde abschließend der Einfluss von Antibiotika auf die Antitumorwirkung im orthotopen Harnblasentumormodell der Maus überprüft. Die gefundenen Erkenntnisse stellen einen wesentlichen Beitrag zur Therapiesicherheit von BCG und zum erfolgreichen Einsatz dieser hochwirksamen Immuntherapie dar.

1.2.3 Das Integrinkonzept

Die Adhärenz von Zellen an die extrazelluläre Matrix (ECM), wie z.B. an Fibronectin, erfolgt durch sog. Adhäsionsmoleküle (Integrine), die in der Zellmembran verankert sind. Integrine besitzen Adhäsionsfunktion sowohl bei Zell-Zell- als auch bei Zell-Matrix-Interaktionen. Es handelt sich um phylogenetisch sehr alte und im Tierreich weit verbreitete Rezeptoren. Die Integrinfamilie umfasst Rezeptormoleküle, die sich aus einer α - und einer β -Kette aufbauen. Es wurden bisher vielfältige Kombinationen aus α - und β -Ketten beschrieben, welche jeweils charakteristische immunologische Eigenschaften aufweisen und z.T. eigenständige, z.T. kreuzreagierende Adhäsionseigenschaften besitzen (51, 52). Es konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion derartiger zellulärer Integrine an spezifische zellbindende Domänen der Extrazellulärmatrix erfolgt (53). Diese zellbindenden Strukturen sind durch bestimmte kurze Aminosäuresequenzen charakterisiert, d.h. das Integrin "erkennt" diese Aminosäuresequenz auf der ECM und heftet sich dort an (54). Durch Aufbringen derartiger kurz-kettiger Aminosäuresequenzen (Oligopeptide) an nicht haftende Oberflächen lässt sich somit die Adhäsion von Tumorzellen vermitteln und das gesamte ECM-Molekül durch ein bestimmtes zellbindendes Bruchstück ersetzen (55). Die Dauer der Integrin-bezogenen Bindung ist zeitlich begrenzt und nicht mit beständigen Zellkontakten durch Desmosomen oder tight-junctions zu vergleichen.

Andererseits ist es möglich, dass die auf den Tumorzellen befindlichen Integrin-Rezeptoren und damit die Adhäsion durch derartige Oligopeptide blockiert werden.

Die Aminosäuresequenz der zellbindenden Domäne ist für verschiedene Extrazellulärmatrix-Moleküle bekannt. Insbesondere die Bindung an Fibronectin, aber auch die Bindung an Laminin ist durch eine einheitliche Grundstruktur von 3 Aminosäuren charakterisiert, welche die minimale Zelladhäsions-determinierende Domäne darstellen. Diese ist für Fibronectin „RGD“. Durch Gabe dieses Peptids lässt sich die Adhäsion von Zellen an Fibronectin in vitro inhibieren (55). An das Grundgerüst der Aminosäuren RGD können eine oder mehrere Ami-

nosäuren angehängt werden, welche die adhäsionsvermittelnde Funktion verstärken (z.B. GRGDS, RGDV, GRGDTP) - eine Verkleinerung des Oligopeptids auf weniger als 3 Aminosäuren ist wirkungslos.

Gleiches gilt für das Peptid LDV, dessen Wirkung sich durch die Verlängerung zu den Molekülen EILDV oder LDVPS steigern lässt. Weitere bisher bekannte Moleküle im Zusammenhang mit Zelladhäsion sind in Tabelle 1 dargestellt. Es konnte in verschiedenen Versuchen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass durch Gabe derartiger Oligopeptide die Bindung von Tumorzellen an Fibronectin, Laminin, Collagen I-IV, Vitronectin und Fibrinogen verhindert werden kann (52, 53, 56).

1.2.3.1 Tumorzellimplantationsinhibition im orthotopen syngenem murinen Harnblasentumormodell durch Integrinblockade mit Oligopeptiden

Experimentelle Untersuchungen zeigten die Inhibition der Tumorzelladhärenz durch das Oligopeptid GRGDS auf einer Fibronectin-Oberfläche *in vitro* in einer konzentrationsabhängigen Weise. *in vivo* konnte hingegen kein signifikanter Effekt auf die Zelladhäsion in der Blasenwand dargestellt werden (57). In der Extrazellulärmatrix der Blasenwand und in der Basalmembran sind jedoch zumindest 3 Matrixmoleküle für die zelluläre Adhäsion verantwortlich (58, 59). Während monospezifische Oligopeptide in dieser Situation versagen müssen, könnte die Kombination unterschiedlicher rezeptorblockierender Oligopeptide für die effektive Inhibition der Tumorzelladhärenz erforderlich sein. Wir folgerten, dass im Gegensatz zur nicht erfolgreichen Inhibition durch monospezifische Oligopeptide eine Tumorzellimplantation dann effektiv verhindert werden könnte, wenn rezeptorblockierende Oligopeptide verschiedener Spezifität eingesetzt werden. *In vitro* Untersuchungen bestätigten in der Tat die genannte Hypothese und zeigten eine erfolgreiche Inhibition der Tumorzelladhärenz durch die Verwendung von Oligopeptiden mit 3 unterschiedlichen Spezifitäten, während monospezifische Oligopeptide jeweils erfolglos blieben. Auch *in vivo* konnte dieser Ansatz im modifizierten orthotopen Harnblasentumormodell (60) bestätigt werden. Es zeigte sich eine effektive Inhi-

bition der Tumorzellimplantation und des konsekutiven Harnblasenkarzinom-Wachstums durch die Kombination von Oligopeptiden unterschiedlicher Spezifität, welche sogar eine höhere Effektivität als die einmalige Zytostatika-Instillation aufwies. Somit hat dieser Ansatz eine potentiell hohe klinische Bedeutung.

1.2.4 Die Portmetastasierung

1.2.4.1 Klinische und experimentelle Aspekte zur Portmetastasierung

Die Tumorzellverschleppung ist seit langer Zeit ein bekanntes Phänomen bei offen operativen Eingriffen. Im Wundblut viszeralchirurgisch offen operierter Patienten finden sich in 91% aller Fälle vitale Tumorzellen. Diese Tumorzellen sind durchaus in der Lage, ein Tumorrezidiv zu generieren, da 60 –75% davon vital und ca. 60% teilungsfähig sind. Im Tierexperiment lässt sich in 54% aller Fälle ein invasives Wachstumsverhalten nachweisen (61, 62).

Auch in der Laparoskopie ist das beschriebene Phänomen der Tumorzellverschleppung tierexperimentell und klinisch seit langem bekannt und tritt hier als sogenannte Portmetastasierung in Erscheinung, d.h. als Tumorzelladhäsion und konsekutive Metastase im Bereich der Trokardurchtrittsstelle in der Haut/Unterhaut.

Mitte der 90er Jahre erschienen erste Arbeiten, die an kleinen Patientenkollektiven von einem erschreckend hohen Vorkommen von Portmetastasen nach visceralchirurgischen Eingriffen berichteten. Von einigen Autoren wurde eine Inzidenz von über 20% angegeben (63, 64), nach neuerer Literatur sind deutlich niedrigere Inzidenzen anzunehmen (65).

Die meisten Autoren sind sich einig, dass Portmetastasen im Wesentlichen auf die zur Aufrechterhaltung des Pneumoperitoneums erforderliche pulsatile und Turbulenzen verursachende CO₂-Insufflation zurückzuführen sind. Unter laparoskopischen Bedingungen kommt es so zu einer atypischen Zellverschleppung, wobei die Tumorzellen auch immuninkompetente Zwischenräume erreichen, wie beispielsweise das Spatium zwischen Faszie und Muskel bzw. zwischen Muskel und Peritoneum im Bereich der Einstichstellen der Trokare. An

diesen Stellen finden sich optimale Voraussetzungen, die zur Entstehung einer lokalen Metastase führen können, da hier neben der Immuninkompetenz auch eine lokale Gewebstraumatisierung durch die Hebelwirkung der Trokare entsteht (66, 67). Begünstigend scheint sich auch das saure Milieu auszuwirken, welches durch die hohe CO₂-Konzentration verursacht wird. Von einigen Autoren wird eine immundeprimierende, die Entstehung von Portmetastasen fördernde Auswirkung dieser intraabdominellen pH-Verschiebung diskutiert (68-72).

1.2.4.2 Tumorzellimplantationsinhibition im syngenem murinen Portmetastasenmodell durch Integrinblockade mit Oligopeptiden

Bis dato gibt es keine experimentellen Untersuchungen zur Portmetastasierung bei urologischen Tumoren, obgleich mittlerweile im klinischen Alltag laparoskopische Operationen bei urologischen Malignomen eine große Rolle spielen (73). Es sollte jedoch eine Unterscheidung nach der Tumorentität erfolgen, da die Biologie des Prostatakarzinoms hier sicher anders einzuschätzen ist als die des Urothelkarzinoms, welches eine deutlich höhere Potenz zur Portmetastasierung besitzt (74-76). Über Portmetastasierung nach Staging-Lymphadenektomie mit einer Inzidenz von ca. 4% beim Urothelkarzinom der Harnblase und ebenso nach Nephrektomie beim Urothelkarzinom des oberen Harntraktes wurde berichtet (74, 77). Experimentelle Untersuchungen zum Kolonkarzinom haben die Möglichkeit des adjuvanten intraperitonealen Einsatzes von zytotoxischen Substanzen zur Verhinderung von Portmetastasen gezeigt (78), wobei hier jedoch mit nicht unerheblichen systemischen Nebenwirkungen gerechnet werden muss (79). Bis dato liegen keine experimentellen Daten zur Portmetastasierung und intraoperativen Tumorzellaussaat für das Urothelkarzinom vor. Die Verhinderung der Tumorzelladhäsion durch Integrinrezeptorblockade mit spezifischen Oligopeptiden bot auch in diesem Kontext einen modernen und nebenwirkungsarmen Therapieansatz an. In einem murinen Portmetastasenmodell wurde der antitumoröse Effekt der Oligopeptide nach Laparoskopie mit einem konventionellen Zytostatikum verglichen.

1.2.5 Biolumineszenz in der experimentellen Tumorforschung

Biolumineszenz-Imaging (BLI) mithilfe des Luciferase-Reportergens stellt ein hochsensitives Verfahren dar, um nicht invasiv in vivo Tumorwachstum und Metastasierung, aber auch das Ansprechen von Krebszellen auf verschiedene Therapieverfahren studieren zu können (80). Hierbei wird Luciferase entweder stabil in Tumorzellen exprimiert oder die entsprechenden gentherapeutischen Vektoren bzw. Effektorzellen werden mit Luciferase markiert. Die Luciferase des Glühwürmchens *Photinus pyralis* katalysiert die Bildung von angeregtem Oxyluciferin aus D-Luciferin in Anwesenheit von Mg^{2+} und ATP. Bei Rückkehr zum Ausgangszustand wird Licht emittiert, wobei pro Molekül Luciferin fast ein Photon umgesetzt wird (Quantumeffizienz ca. 0,9). Das Spektrum des emittierten Lichts umfasst 510 bis 650 nm; der Bereich oberhalb 600 nm ist wegen guter Gewebepenetration für die in vivo Bildgebung besonders wichtig. Dank äußerst geringer Hintergrundaktivität und einer Luciferase-Halbwertszeit von ca. 3 Stunden ermöglicht BLI ein (auch engmaschiges) serielles Monitoring von Krankheitsverlauf und Therapieerfolg in „real time“. Die optische Bildgebung mit Biolumineszenz besitzt eine aussergewöhnlich hohe Sensitivität, die die Empfindlichkeit einer Röntgenaufnahme oder der Positronenemissionstomographie (PET) um mehrere Größenordnungen übersteigt (81). Die Empfindlichkeit von charged coupled device (CCD)-Kameras, die besonders empfindlich im roten Spektrum sind, wird auf 10^{-15} bis 10^{-18} Mol Luciferase/L geschätzt (81).

1.2.5.1 Biolumineszenz im orthotopen syngenem murinen Harnblasentumormodell

Im Weiteren sollte ein biolumineszentes orthotopes sygenes Harnblasentumormodell zunächst für ein in vivo Monitoring der Tumorimplantation etabliert werden. In diesem Modell sollte die Effektivität der Implantationsinhibition von Tumorzellen in der verletzten Harnblasenwand durch Oligopeptidgemische verifiziert werden. Hierbei gab es bis dato kein in der Literatur erwähntes orthotopes sygenes biolumineszentes Harnblasentumormodell.

Mehrere Vorteile sprachen für ein in vivo Monitoring bei diesem Versuchansatz. Wiederholtes BLI parallel bei verschiedenen Tieren einer Versuchsgruppe ist möglich, wodurch BLI

besonders attraktiv für die Testung antitumoröser Substanzen ist. Hierdurch würden zudem die statistische Variabilität sowie die Anzahl der benötigten Versuchstiere gesenkt.

2 Methodik

2.1 Tiere

6-8 Wochen alte weibliche C57/BL 6 Mäuse mit einem Gewicht von ca. 17g wurden bei regelmäßigen Hell-Dunkel-Zyklen in der Tierversuchseinrichtung gehalten. 5 Mäuse pro Käfig wurden jeweils bei Raumtemperaturen von 20°C und einer Luftfeuchtigkeit von $50 \pm 10\%$ bei artgerechtem Futter und Wasser ad libitum gehalten. Alle Experimente wurden durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten von Schleswig-Holstein bzw. Sachsen-Anhalt, Deutschland, genehmigt.

2.2 Tumorzellen

Tumorzellen für in vivo Studien waren die DMBA (7,12-dimethylbenzanthracen)-induzierten Blasenkarzinomzellen MB 49 (82). Die Zellen wurden in DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, bei 37°C und 5% CO₂ gehalten und propagiert. Die Tumorzellen wurden durch Trypsinierung geerntet und für die jeweiligen Versuche in DMEM ohne Glutamin, FCS oder Antibiotika aufgeschwemmt. Die Viabilität wurde durch Trypanblau-Exklusionstests bestimmt, und nur Tumorzellsuspensionen mit über 90% Viabilität wurden für Tumorimplantationen verwendet. Die Tumorzellsuspension für die Implantation wurde adjustiert auf 2×10^5 Zellen/ml.

2.3 Immuntherapeutika: BCG, aBCG, POF, ASS

Zur intravesikalen BCG-Immuntherapie wurde kommerziell verfügbares BCG Stamm Connaught verwendet (Fa. Cytochemia, Ihringen, Deutschland). Jede Ampulle beinhaltet 81 mg lyophilisiertes BCG mit mindestens $1,8 \times 10^8$ colony forming units (CFU). BCG wurde mit 3 ml Solvens rekonstituiert. Somit betrug die Lösung zur Instillation 27 mg BCG/ml.

Autoklaviertes BCG (aBCG) wurde durch Erhitzen einer rekonstituierten Lösung von viablem BCG für 20 Minuten bei 121°C und einem Druck von 2,05 bar hergestellt. Die Lösung zur Instillation beinhaltete somit ebenfalls 27 mg aBCG/ml.

Acetylsalizylsäure (ASS, Bayer Leverkusen, Deutschland), wurde im Trinkwasser der Tiere in einer Konzentration von 1,33 g/l gelöst. Nimmt man eine tägliche Wasseraufnahme von 3 ml/Tier an, so resultierte dies in einer täglichen Dosis von ca. 4 mg/Maus, entsprechend etwa 200 mg/kg Körpergewicht.

Zur Pentoxifyllin (POF)-Therapie wurde eine kommerziell verfügbare Zubereitung mit 300 mg POF in 15 ml Wasser (Albert-Roussel Pharma, Wiesbaden, Deutschland) verwendet. 1 g POF-Lösung wurde in 1 l Trinkwasser verdünnt, was unter o.a. Bedingungen zu einer täglichen Dosis von 3 mg/Maus führte.

2.4 Antibiotika

Als antibiotisch wirksame Substanzen fanden Ciprofloxacin und/oder Levofloxacin (Fluorochinolone) sowie als unspezifische Kontrolle Trimetoprim /Sulfametoxazol (TMS) Anwendung. Jede Therapiegruppe wurde mit und ohne Prednisolon (10mg/kg) behandelt. Antibiotika wurden gelöst und über das Trinkwasser verabreicht. Die tägliche Wasseraufnahme einer Maus lag bei 3 ml bei einem Körpergewicht (KG) von ca. 20g. Eine Maus von 20g KG erhielt somit täglich 2mg Fluorochinolone oder 0,4mg TMS und/oder 0,2mg Prednisolon in 3ml Trinkwasser. Somit wurden 100mg Fluorochinolone/kg KG, 20mg TMS/kg KG und 10mg Prednisolon/kg KG verabreicht, was einer 20-fach höheren Dosierung als bei humaner Anwendung entspricht.

2.5 Oligopeptide

Die antiadhäsiven Oligopeptide GRGDS, EILDV, DGEA, YIGSR und KQAGDV wurden als Antagonisten bezüglich der extrazellulären Matrixproteine Fibronectin (GRGDS / EILDV),

Kollagen (GRGDS / DGEA / KQAGDV) und Laminin (YIGSR) verwendet. Weiterhin wurden bezüglich der Adhäsionsinhibition unspezifische Pentapeptide als Kontrollen eingesetzt (DRVYI, YIHPI, spezifisch bindend an Angiotensin I/II und RYLPT, spezifisch bindend an Proctolin). Alle Oligopeptide wurden als Lyophilisate von Bachem, Heidelberg, Deutschland bezogen. Die Oligopeptide wurden zu unterschiedlichen Konzentrationen durch Zugabe von PBS bei Raumtemperatur gelöst.

2.6 In vitro Untersuchungen

2.6.1 Sensibilität von BCG gegen Antibiotika

Die minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) gegenüber BCG (Stamm Connaught) wurde mittels der radiometrischen BACTEC 460TB Methode für 31 antibakterielle Chemotherapeutika ermittelt und mit den erreichbaren Serum- und Urinkonzentrationen verglichen.

2.6.2 Tumorzelladhäsionsassay

Um die Adhäsion an extrazellulärer Matrix zu untersuchen, wurde ein zellulärer Adhäsionsassay unter Verwendung von Fibronectin, Laminin oder Kollagen, bzw. Kombinationen hieraus als Adhäsionssubstrat verwendet. 96-Well Mikrotiter-Flachbodenplatten wurden mit genannten Extrazellulärmatrices (30 µg/ml) beschichtet. Die beschichteten Platten wurden weiter verwendet wie zuvor beschrieben (83). Zusammengefasst wurden 50 µl Fibronectin, Kollagen oder Laminin in jedes Well gegeben. Die Platten wurden für 6 Stunden bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert. Unmittelbar vor den jeweiligen Experimenten wurden die Platten mit steriler PBS dreifach gewaschen und entleert. 50 µl Lösungen der entsprechenden Oligopeptide bzw. Oligopeptidgemische wurden vorbereitet und in jedes Well eingegeben. Nach einer Vorinkubation von 0,5 Std. bei 37°C wurden die Zellen in Konzentrationen von 6×10^5 / ml in 50 µl Medium / Well eingegeben. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 70 G herunter zentrifugiert und anschließend für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden die Platten im PBS-Bad mit

Folie bedeckt und kopfüber für 5 Min. bei 70 G zentrifugiert. Die Folie mit den nicht adhären-ten Zellen wurde entfernt, die Platten vorsichtig in PBS gewaschen und die zelluläre Adhäsion in einem modifizierten kolorimetischen MTT Test bestimmt (57). 25 µl/Well von 3-[4,5-imethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT, 10 mg/ml in PBS, Sigma, St. Louis, MO) wurde allen Platten hinzugefügt. Es erfolgte eine Inkubation für 4 Stunden bei 37°C in 5% CO₂. Die Inhalte der Wells wurden durch die Zugabe von 100 µl Lysepuffer (20 % Natrium Dodecyl Sulfat in einer 50%igen Lösung von n,n-dimethylformamid/H₂O) lysiert. Nach 2 Std. Inkubation wurde die Absorption in einem Titertech MR 700 Mikroplatten Reader (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) unter Verwendung einer 2-Kanal-Methode mit einer Testwellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm bestimmt. Die Zellzahl wurde berechnet durch den Vergleich individueller Absorption mit einer Zellzahl/Absorptionsstandardkurve. Alle Daten wurden doppelt bestimmt. Zusätzliche Standardisierungsexperimente zeigten, dass dieser Assay linear im Bereich von 1.250 – 100.000 Zellen / Well war ($R^2 = 0.98$).

2.7 In vivo: Tumorzellimplantation

2.7.1 Technik der orthotopen Tumorzellimplantation

Unter einer kurzen Ätherinhalationsnarkose erhielten die Mäuse eine intraperitoneale Injektion von verdünntem Natriumpentobarbitat (6 mg/ml) zur Allgemeinnarkose. Die Mäuse wurden gewogen und erhielten eine einmalige Dosis von 0,06 mg/g Körpergewicht. Anschließend wurde ein 1 cm² großer Bereich der Mäuserücken rasiert und ein 24 G Teflonvenenkatheter transurethral in die Harnblase unter Verwendung eines Gleitmittels eingeführt. Die Mäuse wurden mit dem Rücken auf eine Erdungsplatte gelegt, die mit dem Elektrokauter verbunden war. Ein Führungsdraht wurde in die Blase über den Teflonkatheter eingeführt und sanft vorgeschoben, bis die Blasenwand in Kontakt stand. Der Führungsdraht wurde mit

der Elektrokaudereinheit verbunden und ein monopolarer Strom für 5 sec. auf der geringsten Koagulationsstufe eingesetzt (Abb. 1a).



Abbildung 1a: Die Abbildung zeigt eine narkotisierte Maus nach Katheterisierung. Ein Führungsdraht wird in die Blase über den Teflonkatheter eingeführt und sanft vorgeschoben, bis die Blasenwand in Kontakt steht. Der Führungsdraht wird mit der Elektrokaudereinheit verbunden und ein monopolarer Strom für 5 sec. auf der geringsten Koagulationsstufe eingesetzt.

Nach Entfernung des Führungsdrahtes wurden 0,05 ml der Tumorzellsuspension (2×10^6 Zellen/ml) instilliert. Die intravesikale Tumorumplantation wurde in einer Modifikation der von Soloway (31) und Shapiro (21) beschriebenen Methodik eingesetzt. Als ein wesentliches Kriterium der bekannten unzuverlässigen Implantationsrate erschien uns die kurze Retentionszeit in die Blase eingebrachter Lösungen.

2.7.2 Optimierte Implantationstechnik des orthotopen syngen murinen Harnblasentumormodells

Bei üblicher Technik entleerten die Mäuse nach Entfernen des Instillationskatheters zu unterschiedlichen Zeiträumen unvorhersehbar reflektorisch die Blase, so dass eine gleichmäßige und insbesondere lange Retentionsdauer nicht gewährleistet war. Aus diesem Grunde modifizierten wir das orthotope Modell: Um die Retentionszeit instillierter Tumorzellen zu verlängern, wurde der Katheter nach Instillation der Lösung in situ belassen und nach Abklemmen mit einem Luer-Lock-Verschluß verschlossen. Der Katheter blieb bis zum Erwachen der Mäuse in situ. Bei der durchgeführten Narkose geschah dies verlässlich nach etwa

3 Stunden, wobei die Mäuse bei ihren ersten Bewegungen den Katheter verloren und das Instillat miktionierten.

Nachdem die hier eingesetzten Modifikationen verlässlich maximalen Tumoranwachsraten führten, setzten wir das modifizierte MB-49 Blasen-tumormodell zur Evaluierung lokaler Therapiemaßnahmen wie der intravesikalen BCG-Immuntherapie ein (84)(Abb. 1b).



Abbildung 1b: Die Abbildung zeigt eine narkotisierte Maus nach Katheterisierung und Tumorzellinstillation. Der mit einem Kunststoffkonus versehene Katheter verbleibt bis zum Erwachen der Maus intravesikal.

2.8 Immuntherapie im orthotopen syngenem murinen Harnblasentumormodell

2.8.1 Behandlungsprotokoll

1 Tag nach Tumorimplantation wurden die Mäuse in 5 Gruppen mit jeweils 15 Tieren randomisiert: Gruppe 1: PBS, Gruppe 2: BCG, Gruppe 3: BCG+ASS, Gruppe 4: BCG+POF, Gruppe 5: aBCG. Die intravesikalen Instillationen mit PBS, viablem BCG und aBCG wurden am Tag 1, 8, 15 und 22 nach Tumorimplantation durchgeführt. Das instillierte Volumen betrug 0,05 ml für alle Gruppen, was zu einer Einzeldosis von 1,35 mg, entsprechend 3×10^6 CFU BCG führte. aBCG wurde in äquivalenter Dosis verabreicht. ASS bzw. POF wurden kontinuierlich über den gesamten Versuchsablauf verabreicht, beginnend am Tag 1 nach Tumorimplantation.

Die Mäuse wurden täglich beobachtet und gewogen und am Tag 28 geopfert, makroskopisch sichtbare Tumoren wurden festgestellt und das Blasengewicht bestimmt. Alle Tiere wurden

disseziert, um extravasikale Tumormanifestationen oder Metastasen zu dokumentieren. Die histologische Verifikation erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt.

2.8.2 Statistische Analyse

Das Überleben der Mäuse wurde statistisch durch die Kaplan-Meier-Methodik und den log-rank Test berechnet. Die Analyse des Blasen- und Körpergewichtes wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Die Resultate wurden in Boxplots angegeben, wobei die untere und obere Begrenzung der Kästchen jeweils die unteren und oberen Quartilen darstellen. Die Kästchenlänge wurde durch die interquartile Distanz bestimmt, so dass ein Kästchen 50% der Werte innerhalb der 25. und 75. Perzentile einer Gruppe beinhaltet. Die schwarze Linie in einer Box zeigt den Gruppenmedian, während die äußeren Begrenzungslinien jeder Box zu der kleinsten und größten beobachteten Größe wiesen. Zur statistischen Analyse wurde das Programm SPSS® für Windows verwendet.

2.9 Antiinfektiöse Therapie unter BCG

2.9.1 Behandlungsprotokoll des systemischen Infektionsmodells

2.9.1.1 Bestimmung der LD 50

Die Mäuse wurden in vier Gruppen randomisiert. Jede Maus erhielt eine intraperitoneale Injektion von 1 ml BCG-Lösung (Stamm Connaught). Die folgenden Dosierungen von BCG wurden verabreicht: 12,5 mg, 25 mg, 35 mg, 50 mg, 80 mg (1mg entspricht 6×10^6 colony-forming units). Das Überleben der Mäuse wurde täglich festgestellt.

2.9.1.2 Systemische primäre BCG-Infektion

35 mg BCG wurde einmal intraperitoneal verabreicht. Die Therapie mit Antibiotika bzw. Steroiden begann zum Zeitpunkt der BCG-Applikation. Endpunkt der Untersuchung war das Überleben an Tag 19. Alle Tiere wurden seziiert und auf Auswirkungen einer systemischen BCG-Infektion untersucht.

2.9.1.3 Therapie der systemischen primären BCG-Infektion

Die Mäuse wurden in 8 Gruppen (n=20) randomisiert und erhielten jeweils 35 mg BCG i.p.. Jede Gruppe erhielt entweder Monotherapie mit Antibiotika bzw. eine Kombination Antibiotika mit Prednisolon unmittelbar nach erfolgter BCG-Injektion fortlaufend über das Trinkwasser über 19 Tage. Folgende Gruppen wurden behandelt: Kontrolle (Wasser), Fluorochinolone 100mg./kg ± Prednisolon, Levofloxacin 100mg/kg. ± Prednisolon, TMS 20mg/kg ± Prednisolon (Tab.2) .

Tabelle 2: Therapie der akuten systemischen BCG-Infektion (35 mg. BCG i.p., Gruppen n= 20))

Gr.1 Kontrolle (Wasser)	Gr.1a: Kontrolle (Wasser) + Prednisolon
Gr.2: Levofloxacin (100mg/kg KG/die)	Gr.2a: Levofloxacin + Prednisolon
Gr.3: Ciprofloxacin (100mg/kg KG/die)	Gr.3a: Ciprofloxacin + Prednisolon
Gr.4: Trimethoprim (20mg/kg KG/die)	Gr.4a: Trimethoprim + Prednisolon

2.9.1.4 Systemische sekundäre BCG-Infektion

BCG wurde i.p. zwei mal im Abstand von einer Woche verabreicht. Die primäre Infektion wurde mit 25 mg BCG vorgenommen, die sekundäre Infektion mit 35 mg BCG. Endpunkt der Untersuchung war das Überleben an Tag 19. Alle Tiere wurden seziiert und auf Auswirkungen einer systemischen BCG-Infektion untersucht.

2.9.1.5 Therapie der systemischen sekundären BCG-Infektion

120 Mäuse wurden in 6 Gruppen (n=20) randomisiert. Zur Untersuchung eines prästimulierten Immunsystems (hypererge Reaktion) erhielten die Tiere primär 25 mg. BCG i.p. Nach einer Woche erfolgte die Restimulation mit 35 mg. Connaught BCG i.p.. Die begleitende Antibiotika-/Steroidtherapie begann mit der Restimulation. Folgende Gruppen wurden behandelt: Kontrolle (Wasser), Fluorochinolone 100mg./kg. ± Prednisolon, TMS 20mg/kg ± Prednisolon (Tab. 3).

Tabelle 3: Therapie der systemischen sekundären BCG-Infektion (35 mg. BCG i.p nach primärer Infektion mit 25 mg BCG, Gruppen n=20)

Gr.1 Kontrolle (Wasser)	Gr.1a: Kontrolle (Wasser) + Prednisolon
Gr.2: Levofloxacin (100mg/kg KG/die)	Gr.2a: Levofloxacin + Prednisolon
Gr.3: Trimethoprim (20mg/kg KG/die)	Gr.3a: Trimethoprim + Prednisolon

2.9.2 Behandlungsprotokoll intravesikale Blasentumorthherapie mit BCG unter begleitender Antibiotika-/Steroid-Therapie

Zur Überprüfung der weiter bestehenden Wirksamkeit einer intravesikalen BCG-Therapie unter begleitender Therapie mit Antibiotika bzw. Steroiden wurden 40 Mäuse in 5 Gruppen randomisiert. Wir wählten folgende Gruppeneinteilung (n=8): Gruppe 1: Kontrolle (Tumorstadium ohne Therapie), Gruppe 2: BCG 1,35 mg (1mg → 6×10^6 colony-forming units), Gruppe 3: BCG + Fluorochinolone (100mg/kg KG/die), Gruppe 4: BCG + Trimethoprim (20mg/kg KG/die), Gruppe 5: BCG + Prednisolon (100mg/kg KG/die). Die erste BCG-Instillation (1,35mg BCG in 0,05 ml Lösungsmittel) erfolgte 24h nach der Blasentumorimplantation (20 000 Tumorzellen). Die orale Gabe von Antibiotika bzw. Steroiden erfolgte synchron mit der ersten BCG-Instillation.

2.10 Orthotope Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische

2.10.1 Behandlungsprotokoll

Zirka 3 – 5 Minuten vor Instillation der Tumorzellsuspension wurden über den liegenden Katheter 0,1 ml der entsprechenden Lösung instilliert und der Katheter kurzzeitig verschlossen. Die Mäuse wurden in 10 Gruppen unterschiedlicher Größe randomisiert und erhielten die folgenden Substanzen intravesikal:

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

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

Gruppe 3 (n=10), unspezifische Kontroll-Peptide;

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

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

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

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

Gruppe 8 (n=10) Kombination 3mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV, jeweils 3 mg/ml) ;

Gruppe 9 (n=10) Kombination 1mg (GRGDS, KQAGDV, EILDV, jeweils 1 mg/ml) ;

Gruppe 10 (n=10) Epirubicin 5 mg/ml.

Die Mäuse wurden täglich hinsichtlich Viabilität und Gesundheitsstatus untersucht. Die überlebenden Tiere wurden am Tag 28 geopfert, makroskopisch sichtbare Tumoren festgestellt und die Blasengewichte als Parameter des Tumorwachstums bestimmt. Die Existenz intravesikaler Tumore wurde histologisch bestätigt. Alle Tiere wurden komplett disseziert, um Manifestationen von extravasikalem Tumorwachstum und Fernmetastasen zu dokumentieren.

2.10.2 Statistische Analyse

Das Blasengewicht, die Tumorraten und das Körpergewicht wurden zwischen den Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch verglichen. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Für die statistische Analyse wurde das SPSS[®] für Windows[®] herangezogen.

2.11 Biolumineszentes syngenes orthotopes murines Harnblasentumormodell

2.11.1 Generierung Luciferase exprimierender Zellklone

Die Tumorzellen werden ca. 1 Tag vor Transfektion auf 3.5 cm Ø Schalen so ausgesät, dass die Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 80% beträgt. Für die Transfektion wird die DNA (Plasmid, das die Luc-cDNA enthält) zusammen mit der Liposomenlösung Transfectin (BioRad) für ca. 30 min unter serumfreien Bedingungen bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Gemisch wird auf die Zellen gegeben und für ca. 6 Stunden dort belassen (37°C/ 5%

CO₂). Anschließend Mediumwechsel und Kultivierung der Zellen für weitere 48 Stunden. Nun erfolgt die Zugabe des „Selektionsantibiotikums“ G418 (Geneticin), das nur transfizierten Zellen ein Überleben ermöglichen sollte, da nur sie G418 durch die auf dem transfizierten Plasmid kodierte Neomycinphosphotransferase inaktivieren können. Nach ca. 7 Tagen Behandlung mit Geneticin erfolgt die Ausplattierung der Zellen auf 96-Well-Mikrotiterplatten (MTP) als „limiting dilution“ (ca. 0.5-1 Zellen/ Well). Die Zellen werden für weitere 2-3 Wochen in G418-haltigem Medium kultiviert, vermehrt und ggf. rekloniert. Die Luc Aktivität einzelner Klone wird luminometrisch im Luciferase Assay überprüft (Victor²/ Perkin-Elmer).

2.11.2 Luciferase Assay

Die Zellen werden in einem Detergens-haltigen Puffer lysiert, der Proteingehalt des Lysats wird photometrisch im Bradford Assay bestimmt. Jeweils 10 µg Protein werden in die Vertiefungen einer schwarzen MTP gegeben. Über einen automatischen Injektor wird eine definierte Menge D-Luciferin dazu pipettiert. Die im Well erzeugte Lichtemission wird über einen Zeitraum von 1 sec gemessen, die Lichtemission wird als cps (counts per second)/ µg Protein angegeben. Der Zellklon mit der höchsten Luciferaseaktivität soll für in vivo Versuche eingesetzt werden.

2.11.3 Nachweis der Linearität von Lichtemission zu Tumorzellzahl

Für gereinigte rekombinante Luciferase konnte gezeigt werden, dass die Lichtemission über 8 Größenordnungen linear ist. Durch Messung einer Verdünnungsreihe von Lysat (entsprechend 1 bis 10¹⁰ Zellen) desjenigen Zellklons, der für die in vivo Imaging Versuche Verwendung findet, soll nachgewiesen werden, dass eine lineare Beziehung zwischen Photonenemission und der Anzahl Luc-exprimierender Zellen besteht, eine Grundvoraussetzung für das in vivo Imaging.

Fünzig Klone wurden luminometrisch vermessen. Von diesen wiesen nur ein Drittel Luc Aktivität auf (bis zu 49.000 cps (counts per second)/ μg Protein). Die Lichtemission einer Verdünnungsreihe intakter Zellen dieses Klons (Quadruplikate) wurde nach D-Luciferin Zugabe mit der CCD Kamera untersucht (Abb. 2). Hierbei zeigte sich, dass die CCD Kamera in vitro mindestens 500 Zellen detektiert, was für eine starke Lichtemission der Zellen spricht und eine sehr gute Voraussetzung für das in vivo Imaging dieser Tumorzellen ist.



Abbildung 2: Biolumineszenz-Imaging intakter muriner Luc-markierter MB49 Blasentumorzellen in einer Mikrotiterplatte (Overlay). 1, 10.000; 2, 5000; 3, 2500; 4, 1000; 5, 500; 6, 250; 7, 100 MB49 Zellen.

2.11.4 Die orthotope Tumorzellimplantation im biolumineszenten Harnblasentumormodell

Die orthotope Tumorzellimplantation mit MB 49^{luc}-Zellen ist genauso zuverlässig möglich wie mit den Wildtyp-Zellen. Ein frühzeitiges Imaging nach Instillation von 2×10^5 Zellen und entsprechend kleinem Tumor ist bereits möglich (Abb. 3), obgleich die dunkle Haut und dunkle Haare das biolumineszente Signal absorbieren und streuen.

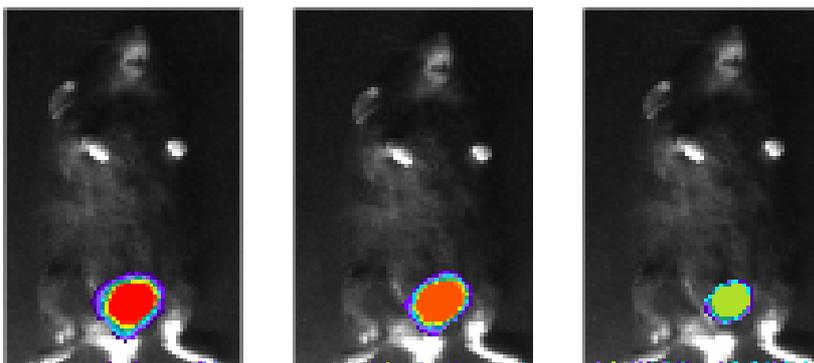


Abbildung 3: Biolumineszenz-Bildgebung bei einem syngenem orthotopen Blasentumormodell (C57/bl6 Maus) an Tag 7 nach Implantation von 2×10^5 MB49 Zellen. Belichtungszeit: A, 10 min; B, 5 min; C, 1 min. Der Tumor ist zu diesem Zeitpunkt nicht palpabel.

2.11.5 Behandlungsprotokoll

Die Mäuse wurden in zwei Gruppen randomisiert: Gruppe 1 (n=15), Kombination von unspezifischen Oligopeptide als Kontrolle (DRVYI, YIHPI, RYLPT jeweils 3 mg/ml pro Peptid); Gruppe 2 (n=15), Kombination von spezifischen Oligopeptiden (GRGDS, YIGSR, EILDV, jeweils 3 mg/ml pro Peptid). Nach Oligopeptid-Instillation und Tumorimplantation wurden die Mäuse täglich gewogen und bezüglich ihres Gesamtstatus kontrolliert. In vivo Biolumineszenz-Imaging wurde wöchentlich durchgeführt. Die Mäuse wurden an Tag 28 getötet, makroskopisch sichtbare Tumore wurden registriert und das Blasengewicht, als Parameter für das Tumorwachstum wurde ermittelt. Die Entwicklung intravesikaler Tumore wurde histologisch verifiziert. Alle Mäuse wurden sezient um die Tumorentwicklung und das Wachstum von Metastasen zu erkennen.

2.11.6 Biolumineszenz-Imaging im orthotopen Harnblasentumormodell

Biolumineszentes Imaging der Mäuse erfolgte am VisiLuxx Imaging-System (Visitron). Dazu wird den Tieren nach Anästhesie mit Ketanest und Xylazin D-Luciferin intraperitoneal verabreicht (150 mg/kg). Zunächst wird ein Grauskala-Referenzbild der gesamten Maus angefertigt. Anschließend werden Bilder mit einer Integrationszeit von jeweils 1 bis 15 min mithilfe der auf -120°C gekühlten CCD-Kamera akquiriert. Ein serielles Imaging bis zu mehrfach am Tag wird unserer Erfahrung nach von den Mäusen gut vertragen. Das serielle BLI erfolgte an Tag 7, 14, 21 und 28 nach Tumorimplantation.

2.11.7 Immunhistochemischer Nachweis Luc-positiver Tumorzellen und Hematoxylin-Eosin (HE) Färbung

Die Tumore wurden nach letztmaligem in vivo BLI explantiert, in Paraffin eingebettet und immunhistochemisch mit einem polyklonalen anti-Luc Antikörper untersucht hinsichtlich der Anwesenheit Luc-positiver Tumorzellen sowie in konventioneller Hematoxylin-Eosin (HE)

Färbung untersucht. Die Stärke der Lichtemission in vivo sollte zum immunhistochemischen Nachweis von Luc-positiven Tumorzellen korrelieren.

2.11.8 Statistische Analyse

Das Blasengewicht, die Tumorrare und das Körpergewicht wurden zwischen den Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch verglichen. Die statistische Analyse des BLI wurde mit ANOVA und der Student's t test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Für die statistische Analyse wurde das SPSS® für Windows® herangezogen.

2.12 Die Tumorzellimplantation im Portmetastasenmodell

Ein 20 G Teflon-Venenkatheter wird in den linken unteren Quadranten des Abdomens eingebracht und dient der Insufflation von CO₂, ein weiterer 20 G Teflon-Venenkatheter wird in den rechten unteren Quadranten eingebracht und dient der intraabdominalen Druckmessung. Tragbare Perfusoren (50 ml) dienen der CO₂-Insufflation. Zur intraabdominalen Druckmessung wird ein mit NaCl-Lösung gefülltes Messsystem für die Zentrale Venendruckmessung (ZVD) verwendet (Abb. 4). Ein kontinuierlicher Druck von 8-10 cm Wassersäule wurde somit erreicht (85).

Konzentration und Art der verwendeten Oligopeptide ergaben sich aus den Erfahrungen mit dem orthotopen Harnblasentumormodell. Das Pneumoperitoneum wurde etabliert und alle Mäuse erhielten eine intraperitoneale Injektion von 2×10^5 MB 49 Tumorzellen in 0,5 ml PBS in die untere Medianlinie des Abdomens. Nach 30 min Pneumoperitoneum wurden jeweils 0,5 ml der „Therapielösung“ injiziert und weiter 5 min das Pneumoperitoneum aufrechterhalten.

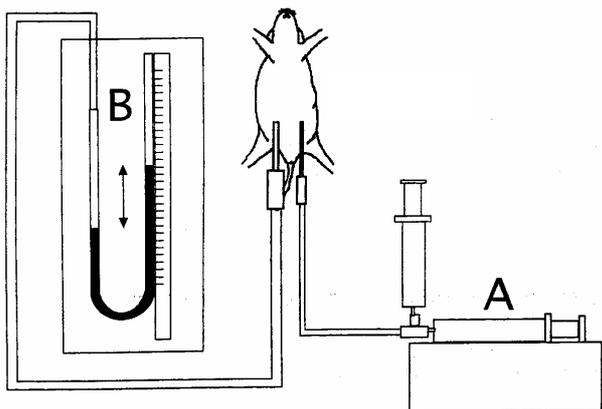


Abbildung 4: Ein 20 G Teflon-Venenkatheter wird in den linken unteren Quadranten des Abdomens eingebracht und dient der Insufflation von CO₂, ein weiterer 20 G Teflon-Venenkatheter wird in den rechten unteren Quadranten eingebracht und dient der intraabdominalen Druckmessung.

2.12.1 Behandlungsprotokoll

Die Mäuse wurden in 5 Gruppen randomisiert (n=10 pro Gruppe), alle Substanzen wurden intraperitoneal injiziert: 1) Kontrolle (PBS), 2) unspezifische Oligopeptide 3 mg/ml, 3) unspezifische Oligopeptide 3 mg/ml, 4) Mitomycin.

Zwei Wochen nach der Behandlung wurden die Tiere geopfert und die Tumorzellaussaat bzw. die Entwicklung von Portmetastasen analysiert. Das Abdomen wurde in 6 Sektoren unterteilt (Abb. 5).

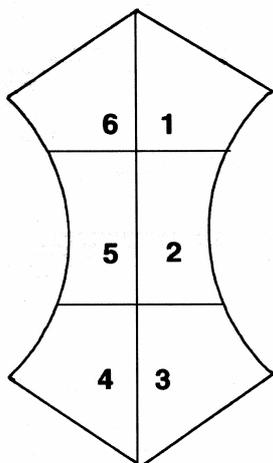


Abbildung 5: Das Abdomen wurde in 6 Sektoren unterteilt. Tumorwachstum in dem jeweiligen Sektor wurde registriert und nach dem „peritoneal cancer index“ nach Eggermont bewertet (86).

Peritoneale Tumorfoki wurden registriert und nach dem "peritoneal cancer index" nach Eggermont et al. bewertet (86): 0, kein intraperitonealer Tumor; I, weniger als 3 kleine Tumorfoki; II, mäßige Tumorentwicklung; III, reichlich oder konfluierender Tumor. Representative Proben wurden histologisch untersucht, um die makroskopischen Ergebnisse abzusichern. Die Entwicklung von Portmetastasen wurde ebenfalls makroskopisch und histologisch evaluiert.

2.12.2 Statistische Analyse

Der Chi-quadrat und Fisher's exact Wahrscheinlichkeitstest wurden für die Datenaufarbeitung verwendet und in Kontingenstabellen dargestellt. Für die Analyse des Mausegewichts wurden one-way Analysen der Varianz angewendet.

3 Ergebnisse

3.1 Immuntherapie im orthotopen syngenem murinen Harnblasentumormodell

3.1.1 Modifikation des MB-49 Harnblasentumormodells

Alle Mäuse entwickelten zu 100% einen Blasen tumor (Tab. 4).

Tabelle 4: Einfluß der Anzahl der instillierten Tumorzellen auf Tumorinzidenz, Überleben und Blasengewicht.

	10.000 MB49	20.000 MB49	50.000 MB49
Tumorinzidenz	15 / 15	10 / 10	10 / 10
% mit Tumoren	100	100	100
mittl. Überleben in Tagen	32,9	30,0	25,9
Blasengewicht in mg	172	202,0	251,6
Standardabweichung	61,9	54,2	39,0

Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit des Blasengewichtes und der Überlebenszeit von der instillierten Tumorzellenmenge (Abb. 6 und Abb. 7).

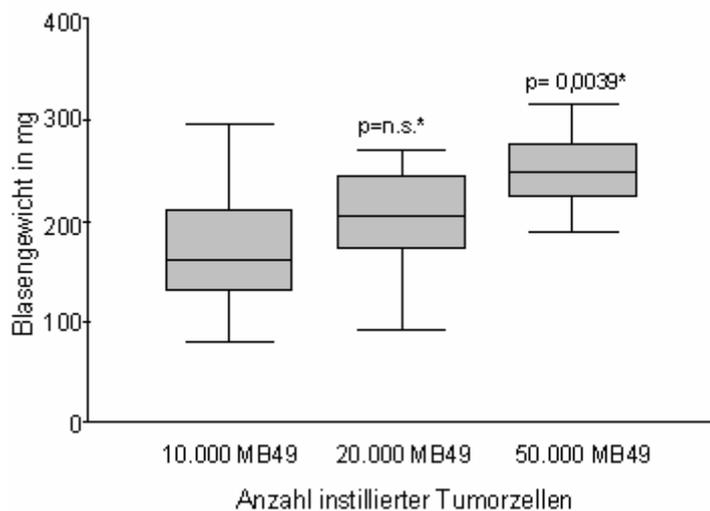


Abbildung 6: Abhängigkeit des Blasengewichtes von der Anzahl instillierter Tumorzellen

Die Instillation von 10.000 MB49-Tumorzellen ergab ein mittleres Blasentumorgewicht von 172 mg, während 20.000 und 50.000 Tumorzellen ein mittleres Blasengewicht von 202 mg bzw. 251,6 mg ergaben. Die Instillation von 10.000 und 20.000 Zellen führte zu einer mittleren Überlebenszeit von 32,9 bzw. 30,0 Tagen, was signifikant höher war als die mittlere Überlebenszeit von 25,9 Tagen nach Instillation von 50.000 Tumorzellen (Abb. 7).

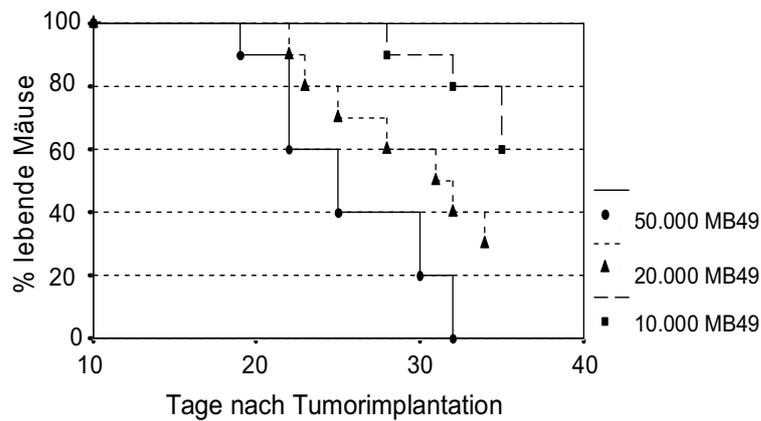


Abbildung 7: Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der intravesikal instillierten Tumorzellzahl

Nach Gabe von 100.000 Tumorzellen und Instillation von Kontrolllösung (PBS) zeigte sich ein mittleres Blasengewicht von 248 mg. Wöchentliche BCG-Instillationen reduzierten das durchschnittliche Blasengewicht auf 140 mg ($p = 0,0009$, Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 7).

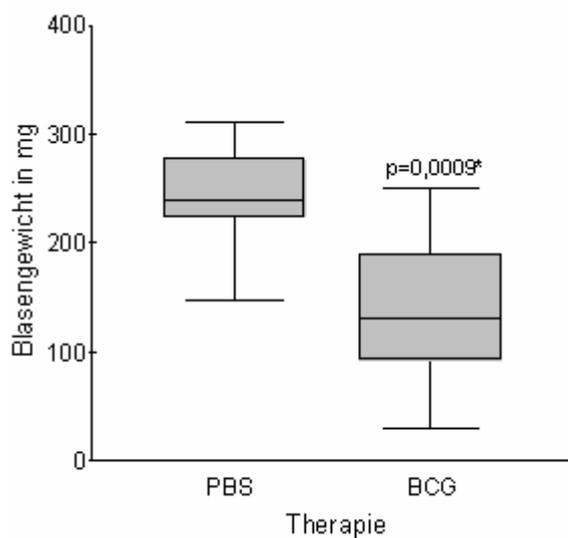


Abbildung 8: Lokale BCG-Therapie nach intravesikaler Gabe von 10^5 Tumorzellen: Auswirkung auf das Blasengewicht

BCG-behandelte Mäuse zeigten eine deutlich verlängerte Überlebenszeit im Vergleich zur PBS-behandelten Gruppe (25,7 vs. 20,8 Tagen) (Abb. 9).

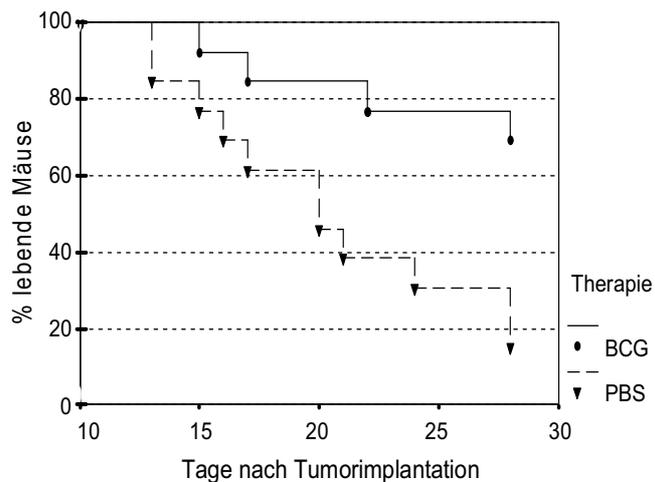


Abbildung 9: Lokale BCG-Therapie nach intravesikaler Gabe von 10^5 Tumorzellen: Auswirkung auf das Überleben der Mäuse

Aufgrund von ministeriellen Auflagen mußte dieses Experiment nach 28 Tagen beendet werden. Nach diesem Zeitraum waren 10 von 15 BCG-therapierten Mäusen lebend, während nur 2 Mäuse der PBS-Gruppe überlebten. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigte eine hochsignifikante Verbesserung des Überlebens BCG-behandelter Mäuse ($p=0,005$, log-rank-Test). Das modifizierte MB-49 Blasentumormodell zeigte somit auch bei Implantation höchster Tumorzellzahlen eine Suszeptibilität gegenüber immuntherapeutischen Maßnahmen und war somit zur weiteren Evaluation der intravesikalen BCG-Immuntherapie geeignet.

3.1.2 Effekte der Instillationstherapie auf das durchschnittliche Blasengewicht:

Mäuse, welche PBS-Instillationen erhielten, hatten ein mittleres Blasengewicht von 248 mg. Das mittlere Blasengewicht von Mäusen, die mit viablem BCG, d.h. BCG, BCG+ASS und BCG+POF, behandelt wurden, lag signifikant niedriger: BCG: 140mg ($p = 0,0009$); BCG+ASS: 123mg ($p = 0,0001$); BCG+POF: 145mg ($p = 0,0004$). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede unter den 3 genannten Behandlungsgruppen mit viablem BCG (BCG vs. BCG+ASS, $p = 0,52$; BCG vs. BCG+POF, $p = 0,81$; BCG+ASS vs. BCG+POF, $p = 0,19$). Die Behandlung mit aBCG führte zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur PBS-Behandlung hinsichtlich des Blasengewichtes (aBCG: 283 mg, $p = 0,21$) (Abb. 10).

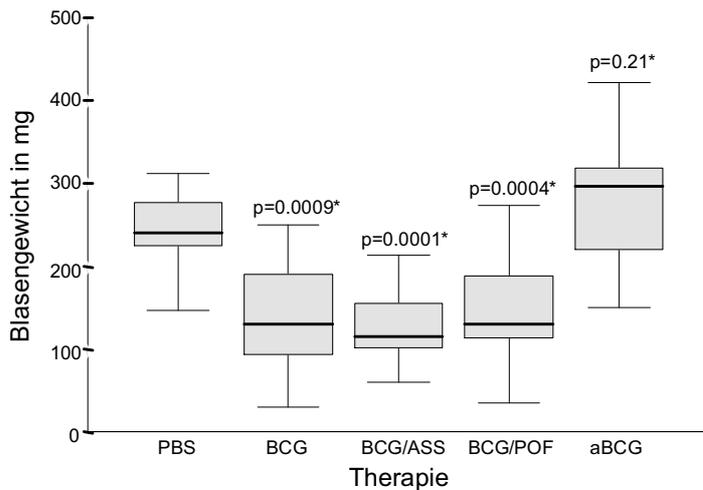


Abbildung 10: Einfluß der antiinflammatorischen Begleittherapie auf die intravesikale BCG-Immuntherapie des MB-49 Blasenkarzinoms: Effekt auf das Blasengewicht

3.1.3 Effekte der Instillationstherapie auf das Überleben

In der PBS, der BCG und der BCG+POF behandelten Gruppe verstarben jeweils 2 Tiere an Narkosekomplikationen, in der BCG+ASS und in der aBCG behandelten Gruppe verstarb jeweils 1 Tier unter der Narkose. Diese Tiere wurden von der Analyse ausgeschlossen. Das Kaplan-Meier Diagramm zeigte ein deutlich längeres Überleben für die mit BCG, BCG+ASS und BCG+POF behandelten Mäuse im Vergleich zu PBS und aBCG behandelten Tieren. Der log-rank Test des Überlebens zeigte einen hochsignifikanten Vorteil gegenüber PBS-Instillation nur für die Gruppen, welche mit viablem BCG behandelt worden waren: BCG, $p=0,0053$; BCG+ASS, $p=0,0044$; BCG+POF, $p=0,0021$, während aBCG keinen Überlebensvorteil auswies (aBCG, $p=0,33$). Es zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den mit BCG, BCG+ASS und BCG+POF behandelten Mäusen (BCG vs. BCG+ASS: $p = 0,83$; BCG vs. BCG+POF: $p = 0,95$; BCG+ASS vs. BCG+POF: $p = 0,73$) (Abb. 11).

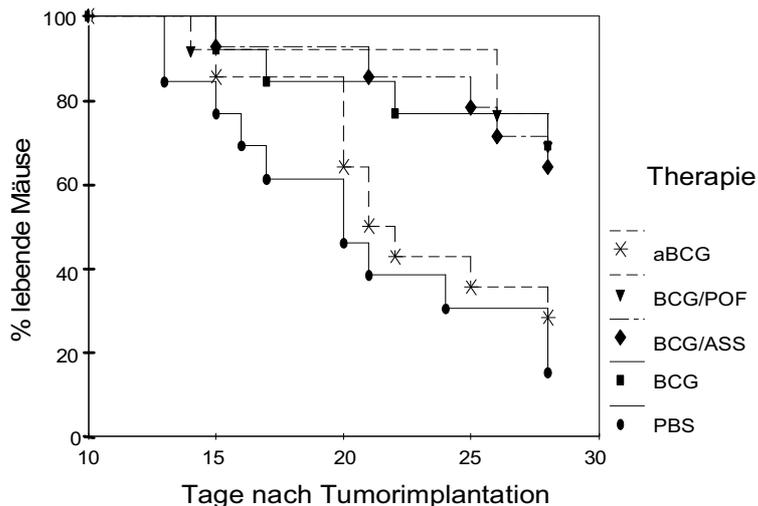


Abbildung 11: Einfluß der antiinflammatorischen Begleittherapie auf die intravesikale BCG-Immuntherapie des MB-49 Blasenkarzinoms: Effekt auf die Überlebenszeiten

3.2 Antiinfektiöse Therapie unter BCG

3.2.1 In vitro

BCG war sensibel für Chinolone (Gyrasehemmer) und alle getesteten Tuberkulostatika bis auf Pyrazinamid (PZA) und Cycloserin. Zudem fand sich eine Empfindlichkeit für Konzentrationen von Doxycyclin und Gentamycin wie sie im Urin bei normaler Dosierung wiedergefunden werden können. Gegen die übrigen Antibiotika fand sich eine BCG-Resistenz (Tab. 5).

Tabelle 5: Empfindlichkeit von BCG gegenüber Chemotherapeutika

Gruppe	Medikament	MHK ($\mu\text{g/ml}$)	Einzeldosis	max. Serumkonz. ($\mu\text{g/ml}$)	max. Urinkonz. ($\mu\text{g/ml}$)	Empfindlichkeit systemisch	Empfindlichkeit lokal
Anti-tuberkulostatika	Capreomycin	0,5	i.v. 1g	30	20	+	+
	Cycloserin	>16	p.o. 0,5g	4	?	-	?
	Ethambutol	2	p.o. 1g	2-4	200	+	+
	Ethionamid	4	p.o. 0,5g	5-8	20	+	+
	Isoniazid	0,125	p.o. 0,3g	3-9	20-80	+	+
	Pyrazinamid	>800	p.o. 2g	20	1-2	-	+
	Rifampicin	<0,031	p.o. 0,6g	7-14	300	+	-
	Rifabutin	0,063	p.o. 0,3g	0,5	50-100	+	+
Aminoglykoside	Amikacin	0,125	i.v. 1g	25	200	+	+
	Gentamycin	4	i.v. 0,16g	6	50	-	+
	Kanamycin	1	i.v. 0,4g	20	200	+	+
	Streptomycin	0,25	i.v. 1g	15	2000	+	+
	Tobramycin	8	i.v. 0,12g	6	50	-	+
Penicilline	Amoxicillin	128	p.o. 0,75g	10	1000	-	+
	Amoxicillin/ Clavulan- säure	32 >256	p.o. 1g p.o. 1g	15 15	>1000 600	- -	+
	Carbenicillin						
Cephalosporine	Cefaclor	256	i.v. 1g	70	1000	-	+
	Cefoxitin	>256	i.v. 1g	70	1000	-	+
	Ceftriaxon	>256	i.v. 1g	150	>1000	-	+
Makrolide	Azithromycin	16	p.o. 0,5g	0,4	0,02	-	-
	Clarithromycin	0,25	p.o. 0,3g	4,5	40	+	+
	Erythromycin	16	p.o. 0,25g	1,4	200	-	+
Tetracycline	Tetracyclin	16	p.o. 0,25g	2,2	200	-	+
	Doxycyclin	4	p.o. 0,1g	2,5	100	-	+
Gyrasehemmer	Ciprofloxacin	0,125	p.o. 0,75g	4	200	+	+
	Norfloxacin	4	p.o. 0,5g	4	200	-	+
	Ofloxacin	<0,031	p.o. 0,4g	6	300	+	+
Andere	Nitrofurantoin	64	p.o. 0,1g	-	50-100	-	-
	Sulfoxazol	32	p.o. 1g	50	1000	-	+
	Trimethoprim	>128	p.o. 0,1g	20	200	-	-
	Trimethoprim- Sulfametho- xazol	>128	p.o. 0,1g	2	200	-	-
	Fosfomycin- Trometamol	>32	p.o. 5g	10	1000	-	+

3.2.2 Das systemische Infektionsmodell

3.2.2.1 Bestimmung der LD 50 nach systemischer BCG-Infektion

Bei einer Dosis von 40 mg bzw. 80 mg BCG starben alle Mäuse einen Tag nach der Infektion. 35 mg BCG führte zu einem Überleben von 2 von 5 Mäusen, während jeweils 4 Mäuse in der 12,5 mg und 25 mg Gruppe überlebten. Somit konnten wir die LD50 für 35 mg BCG in

einem Untersuchungszeitraum von 7 Tagen ermitteln. Diese Dosis wurde in den weiteren Versuchen eingesetzt.

3.2.2.2 Therapie der systemischen primären BCG-Infektion

Die Behandlung mit TMS und TMS und Prednisolon zeigte keine Verbesserung des Überlebens. Die Behandlung mit Fluorochinolonen verursachte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit (Abb. 11, $p=0,041$), zusätzliche Gabe von Prednisolon hatte keinen weiteren Effekt. Die Behandlung mit Steroiden allein (Prednisolon) nach primärer Infektion führte zu einer Aggravierung der Infektion mit verkürzter Überlebenszeit. (Abb.12, $p=0,022$).

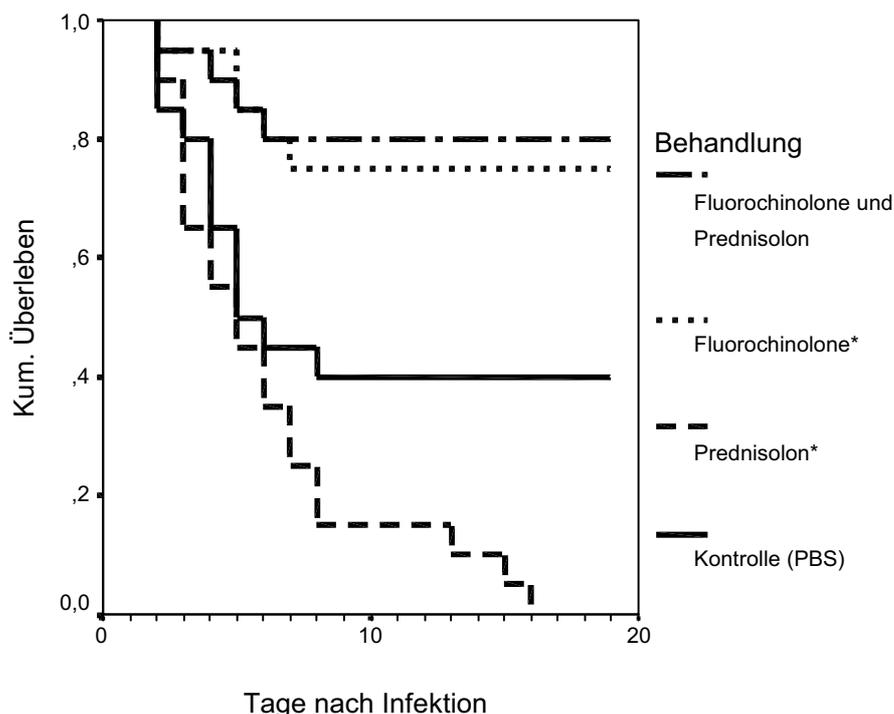


Abbildung 12: Überleben der Mäuse nach primärer BCG-Infektion i.p.. Fluorochinolone führen zu einer signifikanten Überlebensverlängerung ($*p=0,041$, log rank). Prednisolon allein führt zu einer verkürzten Überlebenszeit ($*p=0,022$, log rank)

3.2.2.3 Therapie der systemischen sekundären BCG-Infektion

Um die Wirkung einer antimikrobiellen Mono-Therapie sowie den möglichen Vorteil einer Kombinationstherapie mit Steroiden bei der hyperergenen BCG-Infektion zu überprüfen wurden

die Mäuse primär mit einer subletalen Dosis von 25 mg BCG (Connaught) i.p. infiziert. Nach einer Woche erfolgte eine zweite Infektion mit 35 mg BCG (LD 50), welche eine hypererge Reaktion hervorrufen sollte. Die Monotherapie mit Prednisolon nach Restimulation verursachte eine signifikante Verlängerung des Überlebens (Abb. 13, $p=0,032$), die zusätzliche Behandlung mit einem Antibiotikum hatte keinen signifikanten Effekt.

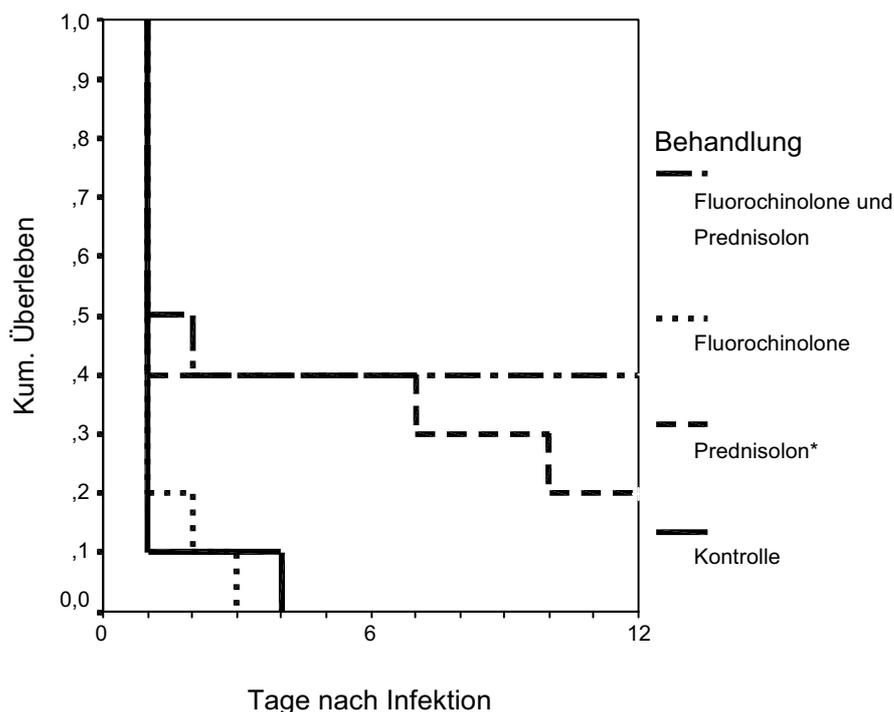


Abbildung13: Überleben der Mäuse nach sekundärer BCG-Infektion i.p.. Prednisolon führt zu einer signifikanten Überlebensverlängerung (* $p=0,032$, log rank). Fluorochinolone allein ohne signifikanten Effekt

3.2.2.4 Intravesikale Blasenmorthherapie mit BCG unter begleitender Antibiotika-

/Steroid-Therapie

Die essentielle Bedeutung der Viabilität von BCG zur Tumorthherapie ist klinisch bekannt. Zum Ausschluss einer inhibitorischen Wirkung der Antibiotika auf den immuntherapeutischen Effekt von BCG führten wir eine intravesikale BCG-Therapie bei orthotopen Blasenmorth unter begleitender Antibiotika-/ Steroidtherapie durch. Die BCG-Therapie führte in unserem Modell zu einem signifikant verringertem Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe

ohne BCG-Therapie ($p=0,001$) (Abb. 14). Das mittlere Blasengewicht der Kontrollgruppe lag bei 357 mg, das der Therapiegruppe BCG bei 58mg.

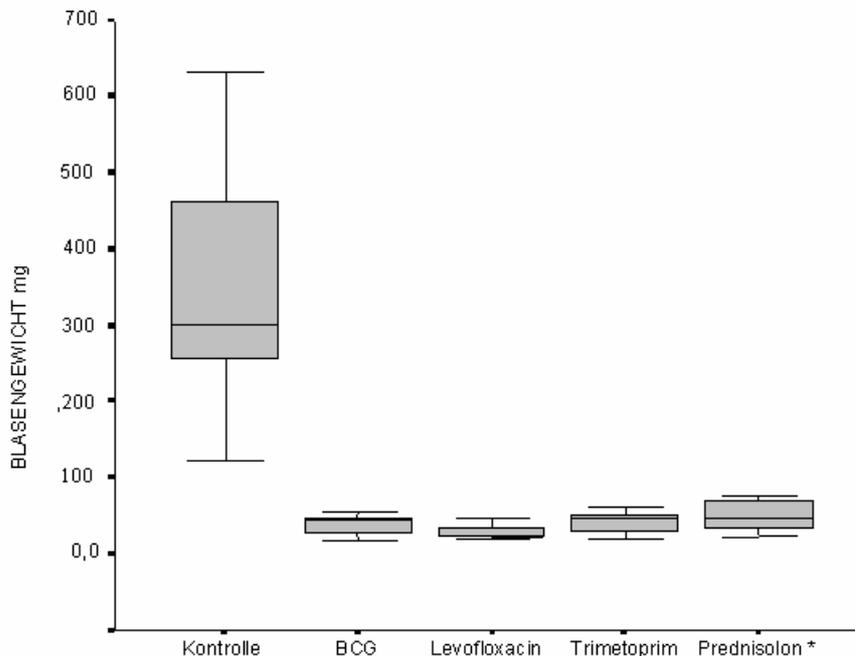


Abbildung 14: Signifikant verringertes Blasentumorgewicht nach Blasentumorimplantation und BCG-Therapie sowie begleitender Therapie mit Antibiotika nach 28 Tagen ($p=0,001$, Wilcoxon). Die Blasengewichte wurden in Boxplots angegeben, wobei die untere und obere Begrenzung der Kästchen jeweils die unteren und oberen Quartile darstellen. Die Kästchenlänge wurde durch die interquartile Distanz bestimmt, so dass ein Kästchen 50% der Werte innerhalb der 25. und 75. Perzentile einer Gruppe beinhaltet. Die schwarze Linie in einer Box zeigt den Gruppenmedian, während die äußeren Begrenzungslinien jeder Box zu der kleinsten und größten beobachteten Größe wiesen.

Die Therapiegruppe mit BCG-Monotherapie zeigte keinen Unterschied bezüglich des Blasengewichts (Abb. 14) und des Überlebens im Vergleich zu den zusätzlich mit Antibiotika behandelten Tieren. Die alleinige Gabe von Steroiden während einer intravesikalen BCG-Therapie führte zu einer signifikant erhöhten Absterberate der Tiere mit einem mittleren Überleben von 13,6 Tagen im Vergleich zu den übrigen Gruppen. Das mittlere Überleben der Kontrollgruppe lag bei 22,3 Tagen ($p=0,001$). **Post mortem Untersuchung**

Die Autopsie der Tiere zeigte normale Verhältnisse bei Herz und Lunge, keine intraperitonealen Hämorrhagien. Diese Beobachtung konnte in allen Gruppen gemacht werden. Alle Mäuse hatten normale Leber und Nieren, keine Lymphadenopathie im Mesenterialbereich, ein vergrößertes, gasgefülltes Kolon und eine Splenomegalie.

3.3 Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische

3.3.1 In vitro

In vitro zeigte GRGDS eine konzentrationsabhängige Inhibition der Tumorzelladhärenz auf Fibronektinmatrix. Die Inhibition war am ausgeprägtesten bei RT4-Zellen mit einer maximalen Reduktion der Adhäsionsrate auf 55%, während bei J82 und bei T24 die Adhäsion auf 72% bzw. 91% der unbeeinflussten Adhäsion zu reduzieren war (Abb. 15).

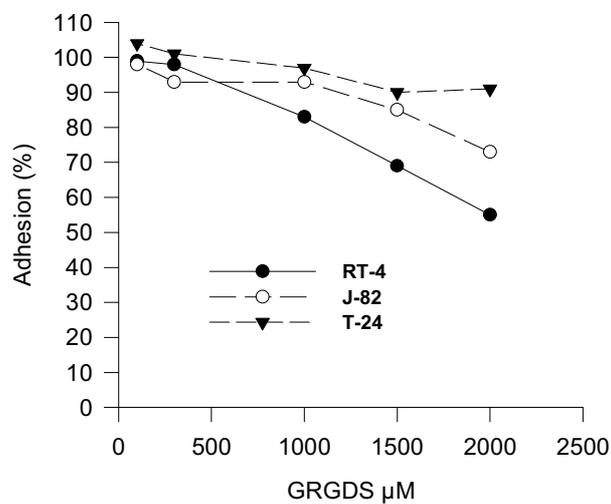


Abbildung 15: Adhäsion verschiedener humaner Urothelkarzinomzellen an Fibronektin in Gegenwart von GRGDS

Auf Kollagen Typ 1 Matrix (Abb. 16) und auf Laminin Matrix (Abb. 17) konnte jeweils keine signifikante Verminderung der Tumorzelladhärenz bei einer der untersuchten Zelllinien dargestellt werden.

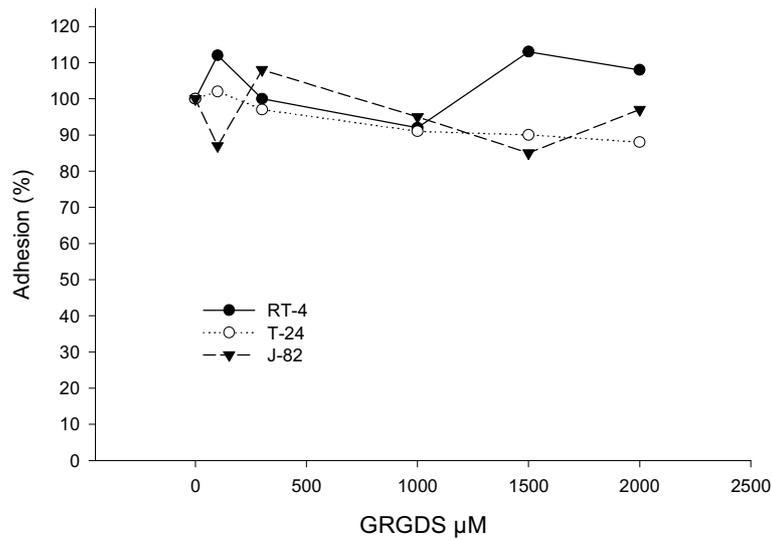


Abbildung 16: Adhäsion verschiedener humaner Urothelkarzinomzellen an Kollagen Typ I in Gegenwart von GRGDS

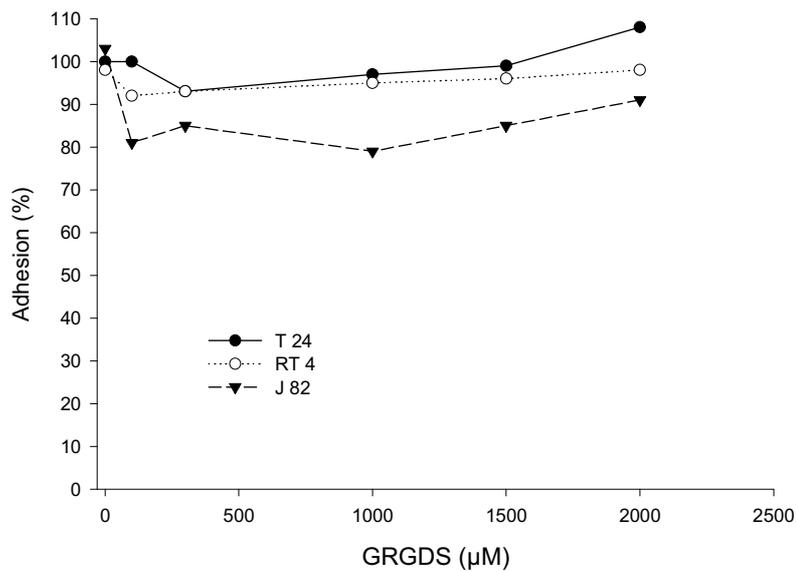


Abbildung 17: Adhäsion verschiedener humaner Urothelkarzinomzellen an Laminin in Gegenwart GRGDS

Weiterhin wurden murine Harnblasenkarzinomzellen MB49 auf Mischmatrizes, bestehend aus Fibronectin, Laminin und Kollagen, untersucht. Es konnte keine signifikante Inhibition der Adhäsion durch GRGDS in Konzentrationen bis zu 2000 μM gefunden werden (Abb. 18).

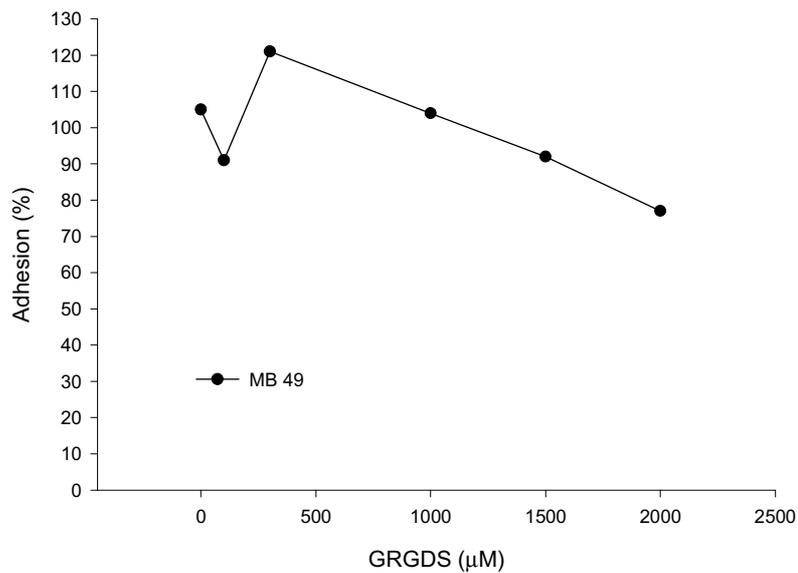


Abbildung 18: Adhäsion muriner Harnblasenkarzinomzellen an Misch-Matrix (Fibronectin, Kollagen, Laminin) in der Gegenwart von GRGDS

Einen ausgeprägten Effekt auf die Tumorzelladhäsion war durch Kombination zweier Fibronectin-spezifischer Oligopeptide GRGDS und EILDV in equimolaren Konzentrationen von 300 µM feststellbar (Abb. 19).

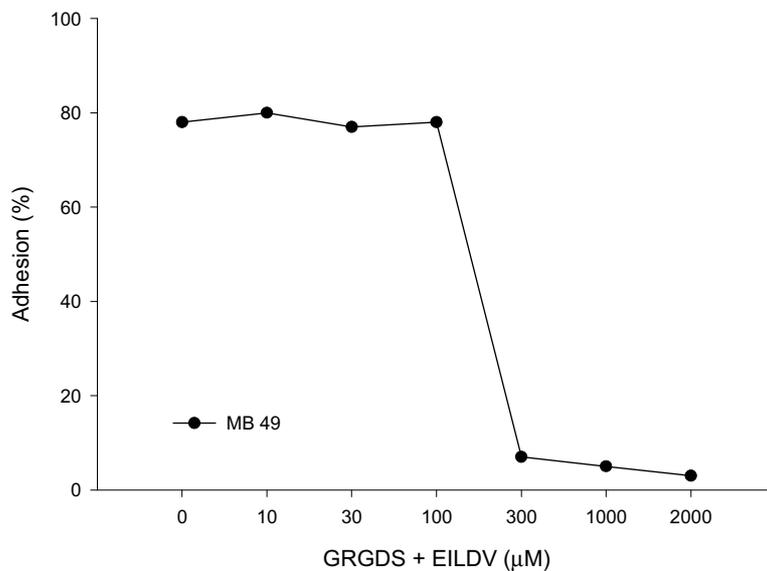


Abbildung 19: Adhäsion muriner Harnblasenkarzinomzellen an Misch-Matrix (Fibronectin, Kollagen, Laminin) in der Gegenwart von GRGDS und EILDV

Die effektivste Inhibition der Tumorzelladhärenz in vitro war durch equimolare Kombinationen von GRGDS, EILDV und DGEA (einem kollagenspezifischen Peptid) zu erzielen. Eine nahezu vollständige Inhibition der Tumorzelladhäsion war hier bereits bei 100 μM feststellbar (Abb. 20).

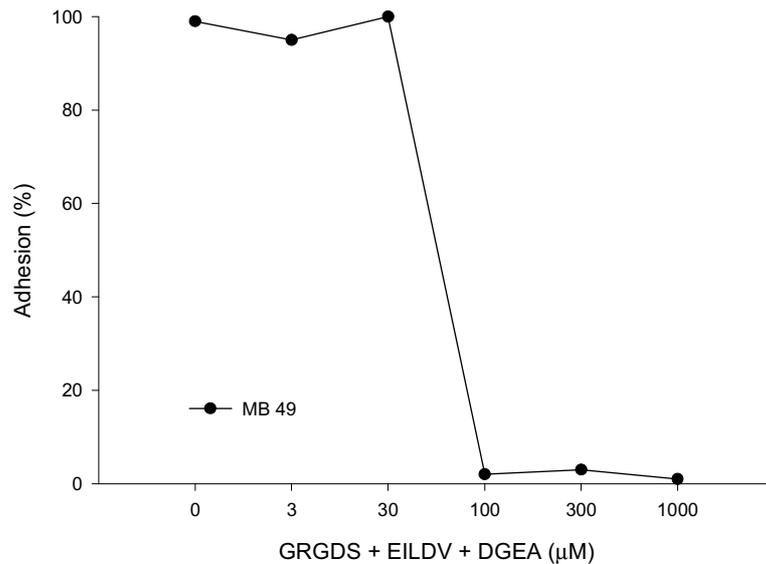


Abbildung 20: Adhäsion muriner Harnblasenkarzinomzellen an Misch-Matrix (Fibronektin, Kollagen, Laminin) in der Gegenwart von GRGDS, EILDV und DGEA

Diese Versuche bestätigten somit, dass zur Inhibition der Zelladhäsion auf naturnahen Mischmatrizes Kombinationen von Oligopeptiden nötig sind, während monospezifische Oligopeptide allein ineffektiv waren.

3.3.2 Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im orthotopen syngenen murinen Harnblasentumormodell

3.3.2.1 Tumorinzidenz

Um die genannten in vitro Ergebnisse zu bestätigen und auszudehnen, wurden Tierversuche im orthotopen murinen Harnblasenkarzinommodell durchgeführt. Die Harnblasen von Mäusen wurden oberflächlich elektrokoaguliert und unmittelbar vor der Tumorzellimplantation mit Lösungen verschiedener Oligopeptide bzw. Kontrolllösungen oder einem Zytostatikum irri-

giert. Die Mäuse wurden nach 28 Tagen geopfert und das Wachstum von Harnblasentumoren festgestellt (Abb. 21a-c).

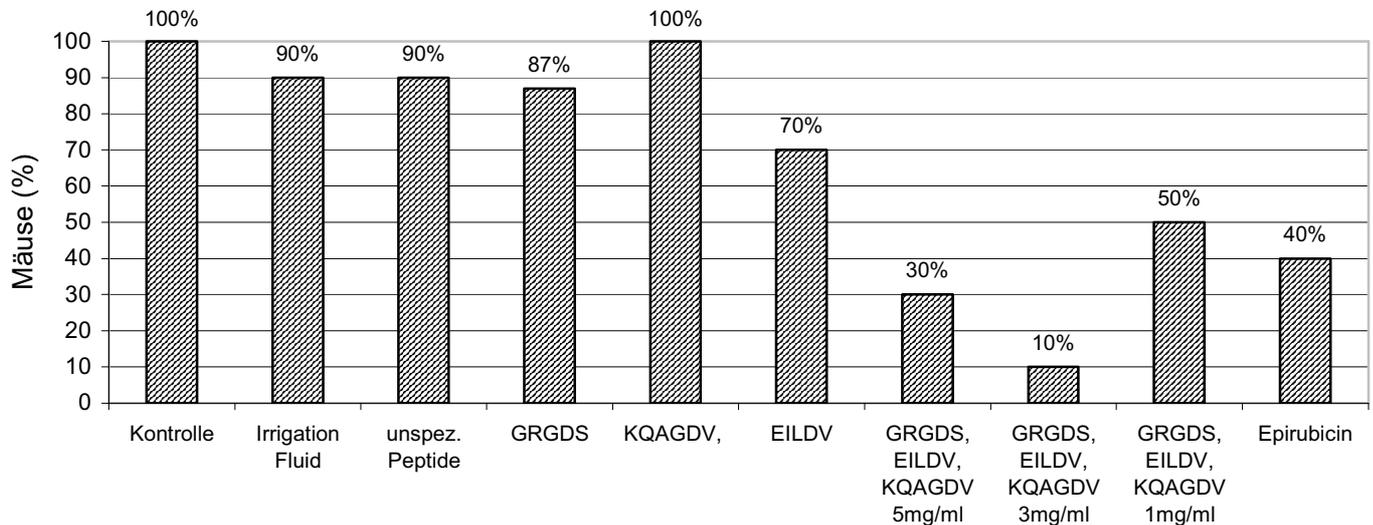


Abbildung 21a: Orthotopes Harnblasentumorwachstum in Mäusen nach Instillation implantationsinhibierender Substanzen



b) c) d)
Abbildung 21b-d: Orthotopes Harnblasentumorwachstum in Mäusen nach Instillation implantationsinhibierender Substanzen: a) ungeöffnete Harnblase, b) geöffnete Harnblase mit makroskopisch sichtbarem Tumor, c) histologisches Bild eines Harnblasentumors (Vergrößerung 40fach, Hämalaun-Färbung)

Die Tumoranwachsrate war 100 % in der nur mittels PBS behandelten Kontrollgruppe (Gruppe 1). Die mit adhäsionsinhibierenden Integrinen irrigierten Gruppen zeigten folgende Tumorimplantationsraten: GRGDS (Gruppe 4) 87 %, KQAGDV (Gruppe 5) 100 %, EILDV (Gruppe 6) 70 %, Kombination 5mg (Gruppe 7) 30 %, Kombination 3mg (Gruppe 8) 10 %, Kombination 1mg (Gruppe 9) 50 %.

Die mit Purisole (Gruppe 2), unspezifischen Kontrollpeptiden (Gruppe 3) bzw. Epirubicin (Gruppe 10) irrigierten Gruppen hatten Implantationsraten von 90%, 90% und 40%, respektive. Die Tumoranwachsrate in Gruppen 7, 8, 9 und 10 war signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$, Gruppen 7 und 8; $p < 0,05$ Gruppen 9 und 10).

3.3.2.2 Harnblasengewicht

Die Bestimmung des Blasengewichtes lag bei durchschnittlich 28 mg in den Gruppen ohne Tumorwachstum und bei 140 mg in den Gruppen mit Tumorwachstum ($p < 0,001$).

Die Mäuse innerhalb der Gruppen mit Tumorwachstum zeigten signifikante Unterschiede hinsichtlich des Blasengewichtes. Während das Blasengewicht bei den mit PBS, Purisole, unspezifischen Kontrollpeptiden, GRGDS, KQAGDV, und Kombination 1 mg behandelten Tieren jeweils ≥ 140 mg lag (178 mg, 140 mg, 187 mg, 136 mg, 151 mg und 144 mg, respektive), war in den Gruppen Epirubicin, Kombination 3mg und Kombination 5mg das Blasengewicht mindestens halbiert bei ≤ 70 mg (nämlich bei 48 mg, 67 mg, und 70 mg, respektive) ($p < 0,05$). Tumortragende Mäuse der mit EILDV irrigierten Gruppe hatten ein Blasengewicht bei 98 mg und lagen somit zwischen den vorgenannten Gruppen ($p < 0,05$) (Tab.6).

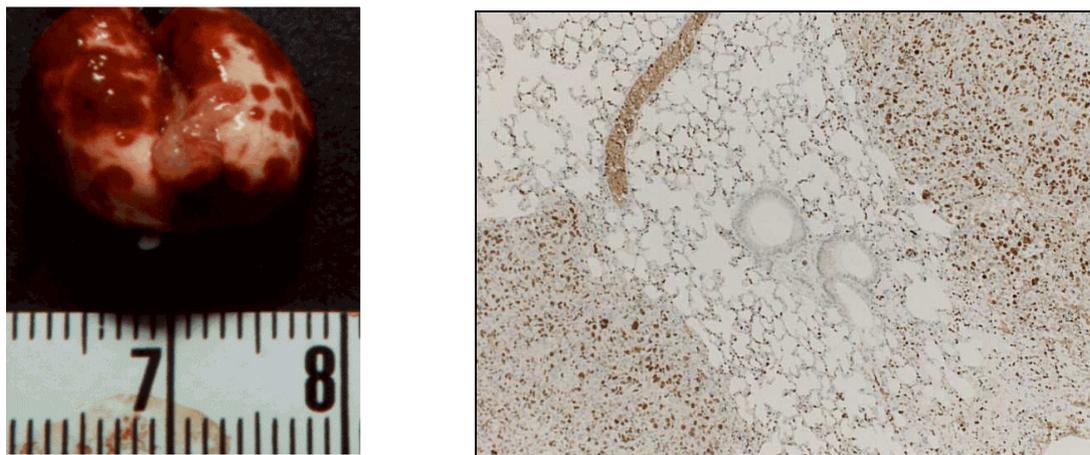
Tabelle 6: Ergebnisse der in vivo Studie im orthotopen Harnblasentumormodell MB 49 (n/a, nicht ansendbar; n.s., nicht signifikant)

Gruppe.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	p Wert
Substanz	PBS	Purisole	unspez. Oligopeptide	GRGDS	KQAGDV	EILDV	combi. 5 mg	combi. 3 mg	combi. 1 mg	epir.	n/a
n=	30	20	10	30	10	10	30	10	10	10	n/a
Tumor-inzidenz (%)	100	90	90	87	100	70	30**	10**	50*	40*	**0.001 *0.05
Blasengewicht (mg)	178	140	187	136	151	98	70*	67*	144	48*	*0.05
Lungen-metastasen (%)	50	35	30	30	30	30	10	10	20	0	n.s.

Das Körpergewicht der Mäuse zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.3.2.3 Histopathologische Evaluation

Die makroskopische Untersuchung der inneren Organe zeigte folgende Rate an Lungenmetastasierung: PBS Kontrolle 50 %; Spüllösung 35 %; unspezifische Kontroll-Peptide 30 %; GRGDS 30 %; KQAGDV 30 %; EILDV 30 %; Kombination 5 mg 30 %; Kombination 3 mg 10 %; Kombination 1 mg 20 %; Epirubicin 0 %; (Daten nicht gezeigt). Bezogen auf die tumortragenden Tiere war jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Behandlungsgruppen und Kontrollgruppe hinsichtlich der pulmonalen Metastasierungsrate feststellbar (Abb. 22).



a)

b)

Abbildungen 22 a-b: a) Makroskopischer Aspekt von Lungenmetastasen. Innerhalb des hellen gesunden Parenchyms erkennt man dunkle Bezirke, die den Metastasen entsprechen. b) mikroskopisches Bild der in 9a gezeigten makroskopischen Veränderungen. (Immunhistochemische Färbung gegen Ki-67 mit dem Antikörper MIB-5, Gegenfärbung Hämalaun, Vergrößerung 100fach)

3.3.3 Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im biolumineszenten syngenem murinen Harnblasentumormodell

3.3.3.1 Tumorinzidenz

In den tierexperimentellen Untersuchungen wurden die Oligopeptide unmittelbar vor der Tumorzellinstillation in die Harnblase der Mäuse eingebracht. Die Tiere wurden am 28. Tag

nach dem Eingriff geopfert und der Tumorbefall der Harnblase wurde ermittelt. BLI wurde an Tag 7, 14, 21, und 28 nach Tumorzellimplantation durchgeführt. Die Tumorinzidenz in der Kontrollgruppe (unspezifische Oligopeptide) betrug 93%. Die Therapiegruppe erhielt ein Oligopeptidgemisch (GRGDS,EILDV, YIGSR), wobei in vorhergehenden Untersuchungen ein Konzentrationsoptimum der Oligopeptidgemische von 3mg/ml ermittelt wurde(87).

Die Tumorinzidenz in der Therapiegruppe lag bei 26% ($p < 0.001$) (Abb. 23).

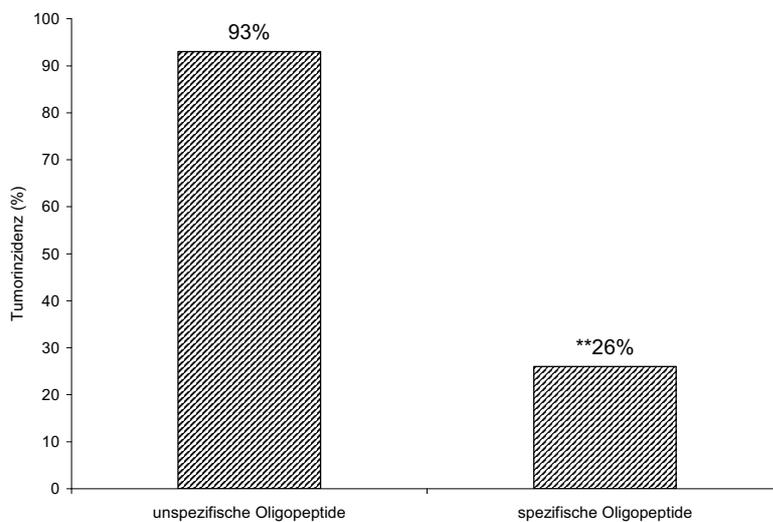


Abbildung 23: Orthotopes Harnblasentumorwachstum in Mäusen nach Instillation implantationsinhibierender Substanzen im biolumineszenten orthotopen Modell.

3.3.3.2 Biolumineszens im orthotopen Harnblasentumormodell

An Tag 7, 14, 21 und 28 nach Tumorimplantation wurde jeweils BLI bei allen Tieren durchgeführt, an Tag 28 wurden sie getötet. 16 von 17 Mäusen mit letztendlichem histologischem Tumornachweis zeigten an Tag 7 ein positives Signal im BLI. An Tag 14 waren es 17/17 Mäusen. Somit fanden wir eine Sensitivität des BLI von 0,92 an Tag 7 und von 1,0 an Tag 14. Die mittlere Anzahl der gemessenen Counts lag an Tag 7 bei 8176,5 und nahm im Mittel bis Tag 28 kontinuierlich ab (Abb. 24)

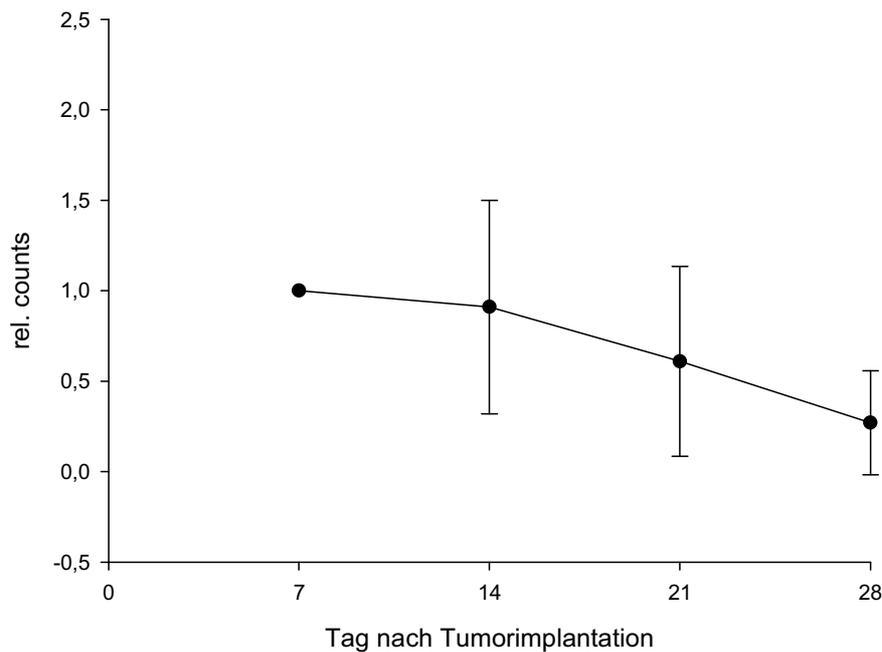


Abbildung 24: Die mittlere Anzahl der gemessenen Counts im orthotopen biolumineszenten Harnblasentumormodell. BLI an Tag 7, 14, 21 und 28 mit tendenzieller Abnahme der gemessenen Counts im Laufe der Messungen.

Abbildung 24 zeigt eine Kontrollmaus im seriellen Ablauf des BLI. An Tag 28 zeigt der Tumor ein deutlich abgeschwächtes Signal verglichen mit Tag 14, dem höchsten Signal in dieser Messreihe (Abb. 25a-d). An Tag 28 zeigte sich bei der Maus ein gut tastbarer Tumor.

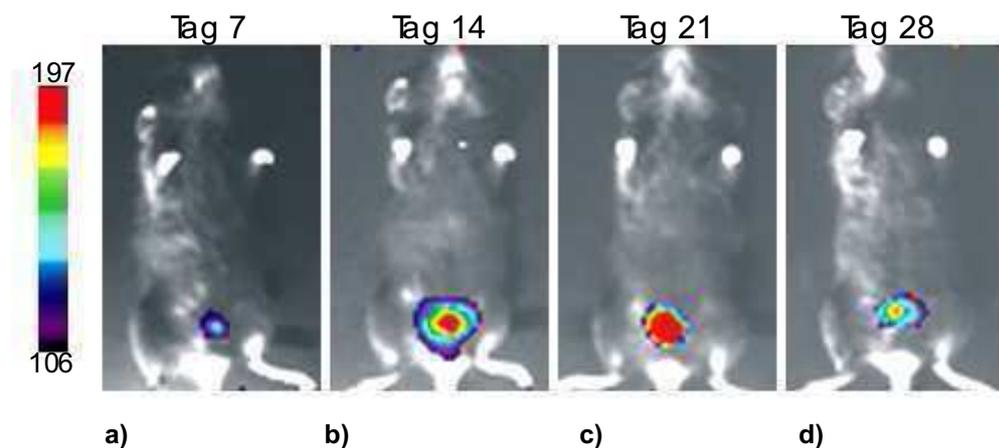


Abbildung 25a-d: Kontrollmaus im seriellen Ablauf des BLI, a) d7, b) d14, c) d21, d) d28

Nach Tötung der Maus wurde der Tumor sofort explantiert (Abb. 26) und unverzüglich geimageret.



Abbildung 26: Großer Harnblasentumor in Situ, d 28 vor der Explantation

BLI bestätigte eine reduzierte Lichtemission durch hämorrhagische und nekrotische Areale in dem großen Tumor (Abb. 27a). HE-Färbung und die immunhistochemische Analyse dieser Tumorregionen mit einem polyclonalen anti-Luc Antikörper zeigten ebenso Anteile mit nekrotischen Arealen neben Arealen mit starkem Luc-Nachweis (Abb. 27b-e)

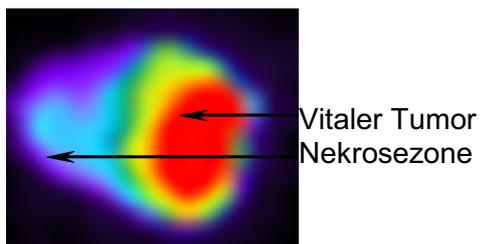


Abbildung 27a

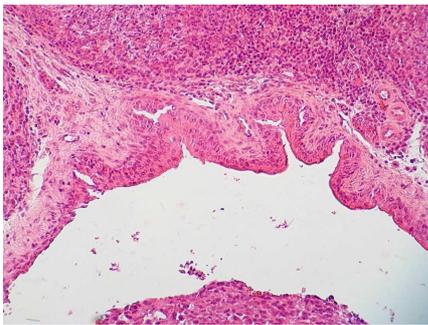


Abbildung 27b

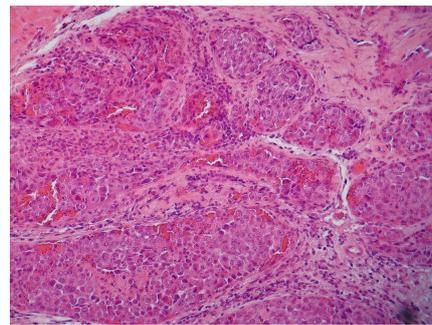


Abbildung 27c

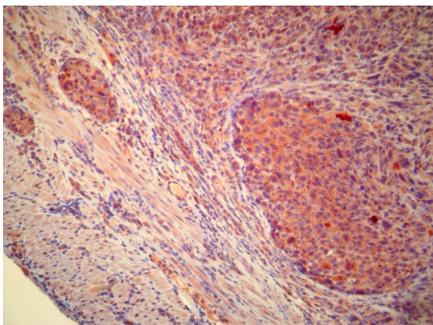


Abbildung 27d

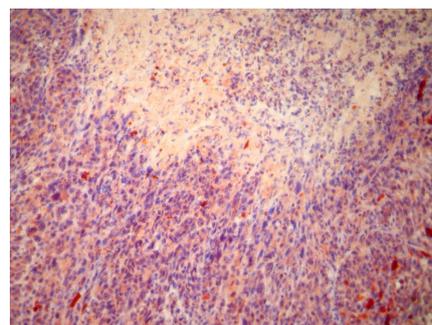


Abbildung 27e

Abbildung 27b-e: Ex vivo BLI und histologische Untersuchung eines MB 49 Harnblasentumors einer Kontrollmaus. (a) Biolumineszenzbild (10 min Aufnahmezeit) eines frisch explantierten Tumors nach D-Luciferininjektion in die Maus vor der Tötung. Der Tumor wurde in der Mitte geteilt und mit der Schnittfläche zur CCD-Kamera platziert. Ein Teil des Tumors war offensichtlich nekrotisch, während der andere Teil vital wirkte. Die Photonenemission in „pseudocolors“ spiegelt präzise die mikroskopischen Gegebenheiten wieder. (b,c) HE-Färbung von Parafinschnitten desselben Tumors zeigen (b) vitale Tumorregionen und (c) die hämorrhagischen und nekrotischen Areale. (d,e) Immunohistochemische Färbung der korrespondierenden Areale unter Verwendung eines polyklonalen anti-Luc Antikörpers im vitalen Tumoranteil (d) und in den hämorrhagischen und nekrotischen Arealen (e). Originalvergrößerung x 400.

3.3.3.3 Harnblasengewicht

Das Harnblasengewicht der Mäuse korreliert eng mit der Tumorentwicklung. Ein hochsignifikanter Unterschied in Bezug auf das Harnblasengewicht konnte zwischen Therapiegruppe und Kontrollgruppe gefunden werden (35 mg versus 186 mg; $p < 0.001$) (Tab.7).

Tabelle 7: Ergebnisse der in vivo Studie im orthotopen biolumineszenten Harnblasentumormodell MB 49 (n/a, nicht ansendbar; n.s., nicht signifikant)

Gruppe	1	2	p Wert
Substanz	unspezifische Oligopeptide	spezifische Oligopeptide	n/a
Gruppengröße	15	15	n/a
Tumorinzidenz n (%)	14/15 (93%)	4/15(26%)	**0.001
Blasengewicht (mg)	186	35	**0.001

3.3.3.4 Histopathologische Evaluation

Es wurden 20 Schnitte (in 40- μ m-Intervallen entnommen) von jeder murinen Harnblase untersucht, um Harnblasenkarzinomzellen nachzuweisen. Tumorzellnachweis gelang in allen Harnblasen, die auch im BLI positiv waren. Die Harnblasenschleimhaut zeigte keinerlei Veränderungen durch die Intillationstherapie, es konnten keine Unterschiede zwischen den Mäusen, die mit spezifischen Oligopeptiden und denen, die mit unspezifischen Oligopeptiden behandelt wurden, gefunden werden.

3.3.4 Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im Portmetastasenmodell

3.3.4.1 Körpergewicht

Das präoperative Körpergewicht der Mäuse war vergleichbar ($p > 0.05$). Mäuse in der Therapiegruppe „Spezifische Oligopeptide“ haben verglichen mit den anderen Gruppen prozentual mehr Gewicht zugenommen ($p < 0.001$) (Tab. 8).

Tabelle 8: Mausgewicht vor und nach Therapie (Abbildungen sind Mediane und Ranges in Gramm)

	Kontrolle (PBS)	unspezifische Oligopeptide	spezifische Oligopeptide	Mitomycin
Gewicht zur OP	19.8 (17.2-20.4)	18.7 (17.0-20.9)	18.5 (17.1-20.7)	19.2 (17.5-20.0)
Gewicht an Tag 14	19.6 (18.2-20.1)	18.4 (17.9-19.9)	20.7 (19.9-21.2)	18.1 (17.1-19.3)
% Anstieg des Gewichts (median)	-1%	-1.6%	11.9%	-5.7%

3.3.4.2 Tumorinzidenz

Die Tumorzellaussaat ist in Tabellen 2 und 3 zusammengefasst. Acht Mäuse der Gruppe „spezifische Oligopeptide“ und 7 Mäuse der Gruppe „Mitomycin“ waren komplett tumorfrei. Alle übrigen Mäuse entwickelten peritoneale Tumoren. Eine Verringerung der Tumorzellaussaat konnte in beiden Therapiegruppen beobachtet werden ($p < 0.0001$; chi quadrat) (Tab. 9).

Tabelle 9: Peritonealer Tumor-Index (Gruppengröße n=10)

Grade	Kontrolle (PBS)	unspezifische Oligopeptide	spezifische Oligopeptide	Mitomycin
0 (kein Tumor)	7	5	52	50
I	14	15	5	6
II	22	21	2	2
III	17	19	1	2
Anzahl der Sektoren mit Tumor (alle Grade)	53/60 (88%)	55/60 (92%)	8/60 (13%)	10/60 (17%)

In der Gruppe „spezifische Oligopeptide“ hatten 87% der Sektoren keinen sichtbaren Tumor verglichen mit 12% in der Kontrollgruppe ($p < 0.0001$; Fisher's exact test). Die Mäuse der Mitomycin-Gruppe hatten ebenso deutlich mehr tumorfreie Sektoren verglichen mit der Kontrollgruppe (83%; $p < 0.0001$). In der Gruppe „unspezifische Oligopeptide“ gab es ähnlich wenige tumorfreie Sektoren wie in der Kontrollgruppe (8% vs. 12%, $p > 0,05$). Es konnte keine bevorzugten Orte für die Tumorzellaussaat beobachtet werden im Bereich der Tumorzell-Injektionsstelle. Es erfolgte eine gleichmäßig Verteilung über alle Sektoren (Tab. 10)

Tabelle 10: Sector-Analyse der Tumorentwicklung

Sector	Kontrolle (PBS)	unspezifische Oligopeptide	spezifische Oligopeptide	Mitomycin	Gesamt
1	10	9	2	2	23
2	8	11	1	1	21
3	12	5	1	3	21
4	7	8	2	1	18
5	11	10	1	2	24
6	5	12	1	1	19
Total	53/60 (88%)	55/60 (92%)	8/60 (13%)	10/60 (17%)	126/240 (52%)

Die Entwicklung von Portmetastasen erfolgte in den Therapiegruppen in deutlich geringerem Ausmaß als in der Kontrollgruppen ($p < 0.0001$; chi squared) (Table 11).

Tabelle 11: Anzahl der Trokarinsertionsstellen mit Tumorentwicklung (Portmetastasen)

Kontrolle (PBS)	unspezifische Oligopeptide	spezifische Oligopeptide	Mitomycin
19/20	18/20	2/20	3/20

4 Diskussion

4.1 Optimierung des orthotopen murinen Harnblasenkarzinom-Modells und Einsatz zur Untersuchung der intravesikalen Bacillus Calmette-Guérin Immuntherapie

Das orthotope syngene Harnblasenkarzinommodell der Maus ist erfolgreich zur Evaluation von Chemotherapien und intravesikalen Immuntherapieverfahren wie BCG, KLH eingesetzt worden (33, 88). Andere Tiermodelle wie chemische Blasentumorinduktion, Xenograft-Transplantationen und subkutane Implantation von syngenesischen Blasentumorzellen sind ebenfalls eingesetzt worden, sind jedoch für die Untersuchung insbesondere von Immuntherapieverfahren von untergeordneter Bedeutung. Die Zahl instillierter Tumorzellen variiert in der Literatur von 10^4 bis 5×10^5 Zellen (21, 31, 33, 89-91). Shapiro et al. untersuchten die zur Tumorimplantation benötigte Zellzahl im MBT-2-Modell und zeigten, dass eine maximale Tumoranwachstumsrate von über 90% nach Instillation von 10^6 Zellen vorhanden war, während die Instillation von $2,5 \times 10^5$ Zellen zu einer Anwachsrate von nur 30% führte (21, 33). Somit kann eine hohe Anzahl von instillierten Tumorzellen allein nicht hohe Anwachsrate garantieren. Weitere Autoren zeigten Anwachsrate von nur 70%, auch nach Instillation von 5×10^5 MBT-2-Zellen (31, 33). Im MB-49 Tumormodell ist die Zahl instillierter Zellen kleiner und variiert zwischen 10^4 und 10^5 (89, 91). In unseren Untersuchungen zeigten wir, dass eine maximale Tumoranwachstumsrate von 100% unabhängig von der Zahl instillierter Zellen ist. Essentiell in unseren Untersuchungen war ausschließlich die Verlängerung der Kontaktzeit zwischen kauterisierter Blasenwand und instillierten Tumorzellen. Durch Belassen und Verschließen des Instillationskatheters konnte die vorzeitige Blasenentleerung erfolgreich verhindert und eine Kontaktzeit von 3 Stunden aufrechterhalten werden. Um sicherzustellen, dass auch bei hohen Tumorzellzahlen weiterhin ein Immuntherapie-sensitives System vorliegt, wurde die Immuntherapie mit BCG im modifizierten Tumormodell eingesetzt. Im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit PBS zeigte sich auch in der höchsten Dosierung von Tumorzellen ein deutlicher Einfluss von BCG auf Blasentumorgewicht und Überleben der Mäuse.

In weiteren Experimenten konnten wir nunmehr das modifizierte System zur Evaluation intravesikaler Therapiemaßnahmen einsetzen.

Die intravesikale BCG-Therapie wird derzeit als der Goldstandard der Therapie des Carcinoma in situ und zur Vermeidung von Harnblasenkarzinomrezidiven nach transurethraler Resektion angesehen. BCG-Instillationen sind jedoch mit typischen Nebenwirkungen wie Dysurie, Pollakisurie und anderen zystitischen Beschwerden begleitet (92), während schwere systemische Nebenwirkungen selten sind.

Eine ausgeprägte Infiltration der Blasenwand mit Granulozyten und ein Anstieg von Neutrophilen im Urin (93) war bei den Patienten nachweisbar, die ausgeprägte Nebenwirkungen hatten (37, 94, 95). Somit kann geschlossen werden, dass die lokalen zystitischen Nebenwirkungen überwiegend durch eine Einwanderung von Granulozyten und ihre Aktivierung durch BCG hervorgerufen wird.

In vitro Untersuchungen konnten zeigen, dass ASS und POF wirksame Medikamente zur Behandlung BCG-induzierter zystitischer Symptome sein könnten. ASS und POF reduzierten die BCG-induzierte Granulozytenaktivierung in vitro signifikant (40, 41, 96). Um mögliche unerwünschte Wirkungen der o.a. antiinflammatorischen Medikamente auf die immuntherapeutische Wirksamkeit von BCG in vivo auszuschließen, wurde eine Untersuchung im modifizierten orthotopen murinen Blasentumormodell durchgeführt. Um die Wirksamkeit der BCG-Behandlung kritisch beurteilen zu können, wurden als Hauptzielkriterien „harte“ Parameter wie Überlebenszeit und Blasengewicht bewertet. Im Vergleich zu anderen Arbeiten (21, 33, 91) wurden die Blasenpalpation und die Reduktion der Tumoranwachsrate nicht als verlässliche Parameter herangezogen.

Der Zykllooxygenasehemmer ASS wurde als antiinflammatorische und analgetische Substanz seit über 100 Jahren klinisch eingesetzt. ASS inhibiert die Plättchenaggregation und wird klinisch zur Verhinderung der arteriellen Thrombose, des Myokardinfarktes und des apoplektischen Insultes eingesetzt. Der exakte Mechanismus der Zykllooxygenaseinhibition ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, es gibt jedoch Anzeichen dafür, dass die Hemmung der Zykllooxygenase nicht der einzige Mechanismus, der antiinflammatorischen Wirkung von

ASS und anderen nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten (NSAID) ist (97). Weitere mögliche Mechanismen von ASS wie Reduktion der Synthese von Zylo-AMP, NF- κ B, Superoxidanionen und Reduktion der Freisetzung lysosomaler Enzyme in Granulozyten wurden kürzlich zusammenfassend dargestellt (97). Die klinischen Effekte von ASS auf die immuntherapeutische Wirkung von BCG sind unklar, da verschiedene retrospektive Studien widersprüchliche Ergebnisse zeigten. Hudson et al. zeigten einen negativen Einfluss von Gerinnungsinhibitoren wie ASS auf die BCG-Wirkung (44), während Witjes et al. einen derartigen Effekt ausschließen konnten (98). Die Interpretation dieser Daten ist jedoch schwierig, da unterschiedliche Studiendesigns, unterschiedliche Patientenpopulationen und geringe Patientenzahlen vorlagen. In unseren Experimenten zeigte weder das Blasengewicht noch das Überleben der Tiere, welche mit BCG+ASS behandelt worden waren, einen signifikanten Unterschied zu den nur mit BCG behandelten Tieren. Somit konnte ein negativer Effekt von ASS auf die BCG-Wirkung ausgeschlossen werden. Andere NSAID wie Sulindac und Ketoprofen, die signifikante inhibitorische Effekte auf die Karzinogenese in der murinen Harnblase gezeigt hatten, könnten sich ebenfalls als nützliche Medikamente der BCG-induzierten Nebenwirkungen erweisen, die zusätzlich beschriebenen chemopräventiven Effekte könnten hier ebenfalls wirksam sein (99). Die inhibitorischen Effekte von ASS auf die Karzinogenese hingegen sind widersprüchlich. In Mäusen konnte ASS die Karzinogenese in der Harnblase nicht inhibieren, während in Ratten sich ASS als effektives chemopräventives Medikament zeigte (100).

Der Phosphodiesterasehemmer POF ist seit langem aufgrund seiner vorteilhaften hämorrhologischen Eigenschaften bekannt. POF erhöht die Erythrozytenverformbarkeit und verbessert damit den kapillaren Blutfluß. Klinisch wurde POF eingesetzt, um Symptome der Claudicatio intermittens bei Patienten mit peripherer Verschlusskrankheit zu verbessern (101). Erneutes Interesse fand das Medikament aufgrund seiner immunmodulatorischen Eigenschaften auf das Zytokin-Netzwerk und auf die Granulozytenfunktion (102, 103). POF supprimiert die endotoxininduzierte Synthese von TNF- α und IL-1 in vitro und in vivo und inhibiert hiermit auch die Granulozytenaktivierung und Degranulierung (103). Weitere Experimente konn-

ten POF als Inhibitor der Degranulation und der Superoxydproduktion von BCG-stimulierten Granulozyten zeigen (96). Eine reversible Beeinträchtigung der BCG-induzierten Killerzell-Zytotoxizität *in vitro* (96), die als ein wesentlicher Bestandteil des Wirkmechanismus von BCG angesehen wird und die komplexe Interaktion von POF mit dem Zytokin-Netzwerk weisen jedoch auf das Potential von POF hin, mit der Wirksamkeit von BCG zu interferieren. In unseren *in vivo* Versuchen jedoch zeigte sich jedoch kein derartiger negativer Effekt auf die BCG-Wirkung. Die mit BCG und POF behandelten Tiere zeigten keine Unterschiede hinsichtlich Überleben und Blasengewicht im Vergleich zu den mit BCG allein behandelten Tieren.

Nicht viable BCG-Präparationen hatten in verschiedenen experimentellen Serien Antitumorwirkung gezeigt. Akaza et al. injizierten eine Mischung von MBT-2 Zellen und aBCG bzw. lyophilisiertem BCG subcutan in C3H/He Mäuse. Die wachstumsinhibierende Aktivität von aBCG war nahezu der von lyophilisiertem BCG vergleichbar (104). Andere Autoren beschrieben einen mäßigen inhibitorischen Effekt von intratumoral verabreichtem, ultraviolett-abgetöteten BCG, welches mit Fibrinogen in subcutane MBT-2 Tumoren injiziert wurde (90). Im orthotopen Harnblasenkarzinommodell der Maus konnten Instillationen mit mykobakteriellen Zellwandbestandteilen zu einer signifikanten Wachstumsinhibition von Tumoren führen, der Antitumoreffekt war jedoch weniger stark ausgeprägt als bei Instillationen mit viablem BCG (89). *In vitro*-Experimente zeigten, dass autoklavierte mykobakterielle Präparationen eine geringere Aktivierung von Granulozyten hervorriefen als viable Präparationen (43, 105, 106). In unseren Tierversuchen jedoch zeigte sich kein signifikanter therapeutischer Effekt von aBCG auf das Überleben und das Blasengewicht von Mäusen im Vergleich zu viablem BCG.

Es ist somit zu schlussfolgern, dass aBCG keine antitumorale Aktivität in diesem Tiermodell hat. Die Unterschiede zwischen unseren Ergebnissen und denen anderer Gruppen können durch den unterschiedlichen experimentellen Ansatz erklärt werden, wo jeweils eine direkte Interferenz mit der Tumorzellimplantation möglich war. Unser Tiermodell hingegen steht der klinischen Situation erheblich näher als die o.a. experimentellen Ansätze. Wir können somit

folgern, dass aBCG keine ausreichende Antitumorwirkung hat, um weitere klinische Untersuchungen zu rechtfertigen.

Das murine orthotope autologe MB-49 Blasentumormodell wurde erfolgreich modifiziert, so dass eine verlässliche Tumorimplantation bei 100% der Tiere resultiert. Das Modell ist weiterhin sensitiv für lokale Immuntherapieverfahren und wurde zu deren präklinischen Überprüfung eingesetzt.

Die Behandlung mit autoklaviertem BCG ist keine geeignete Alternative zur Behandlung mit viablem BCG. Acetylsalicylsäure und Pentoxifyllin zeigten keine Beeinträchtigung der intravesikalen BCG-Immuntherapie murinen Harnblasenkarzinommodell. Somit können die genannten Medikamente als geeignete Adjuvantien angesehen werden, um die BCG-induzierten Nebenwirkungen zu reduzieren. Die klinische Evaluation von ASS und POF im Rahmen der BCG-Therapie beim Menschen sollte in prospektiven Untersuchungen durchgeführt werden.

4.2 Immuntherapie mit BCG beim Blasentumor in Hinblick auf systemische Infektionskomplikationen und Beeinflussung der lokalen Tumorwirkung durch Antibiotikatherapie

Die BCG-Instillationstherapie hat sich als das effektivste Verfahren zur Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Blasenkarzinoms und zur Therapie des carcinoma in situ etabliert (107-109). Begleiterscheinungen während der intravesikalen Instillationstherapie mit BCG sind häufig und führen gelegentlich zum vorzeitigen Abbruch der Therapie (110). Lokale Nebenwirkungen wie Dysurie, Pollakisurie und Hämaturie finden sich bei 60-80% aller behandelten Patienten, sind jedoch als normale Reaktion der intravesikalen Therapie zu betrachten (111). Eine medikamentöse spasmolytische oder analgetische Therapie ist in den meisten Fällen zur symptomatischen Beherrschung der Beschwerden ausreichend. Selten treten systemische Nebenwirkungen auf. Bei ca. 2% ist deshalb eine stationäre Behandlung erforderlich. Besonders gefürchtet sind schwere septische Verläufe (ca. 0,1%) die einer raschen und

adäquaten Therapie bedürfen (110). Aufgrund der Nebenwirkungen enthalten viele Urologen diese klinisch etablierte und hoch effektive adjuvante Behandlung ihren Patienten vor oder verordnen prophylaktisch Antibiotika. Allerdings treten bakterielle Harnwegsinfekte unter einer Instillationstherapie allein schon aufgrund der wiederholten Katheterisierungen auf, so dass häufig Gyrasehemmer oder moderne Cephalosporine der dritten Generation verordnet werden. Inwieweit diese Antibiotika mit BCG, den viablen Mykobakterien interferieren und die Wirkung der Immuntherapie dabei kompromittieren ist nicht bekannt.

Plötzlicher Blutdruckabfall, Fieber und disseminierte Gerinnung sind nach mehrfacher intrakutaner BCG-Injektion bei der Behandlung von kutanen Melanomen berichtet worden (50). Diese Reaktionen, wie auch die nach intravesikaler BCG-Instillation erfolgten nur nach mehrmaliger BCG-Exposition. Aus den klinischen Verläufen der wenigen beobachteten Fälle einer fulminanten BCG-Sepsis erscheint als wesentliche Komponente eine Hypersensitivitäts-Reaktion bis hin zum allergischen Schock (111). Vor diesem Hintergrund ist theoretisch die zusätzliche Gabe eines Steroids erforderlich. Obwohl Steroide eine mykobakterielle Infektion aggravieren können, zeigten einige klinische Erfahrungen, dass die Kombination von Tuberkulostatika und Steroiden für den Krankheitsverlauf einer Sepsis günstig war (50, 112-114).

Die therapeutische Empfehlung bei systemischer BCG-Infektion lag in der Verabreichung der klassischen Tuberkulostatika Isoniazid, Rifampizin, Ethambutol und Cycloserin (111). Tuberkulostatika haben eine relativ lange Latenz von zwei bis sieben Tagen bis zum Wirkeintritt und ein nicht unerhebliches Nebenwirkungsspektrum (115). Insbesondere Cycloserin war aufgrund von in vitro Untersuchungen, die einen schnellen Wirkungseintritt innerhalb von 24h und eine Wirkung auch gegen BCG aufzeigten, bis dato in der Therapie der systemischen BCG-Infektion ein Standard-Therapeutikum (115). Allerdings existieren in der Literatur unterschiedliche Berichte zur Suszeptibilität von BCG gegenüber Cycloserin. Auf der Suche nach therapeutischen Alternativen gab es aus jüngeren in vitro Untersuchungen Hinweise auf die Wirksamkeit von Fluorochinolonen gegen BCG (116). Da Chinolone sich bei Infektionen bis

hin zur Urosepsis bewährt haben, war eine Überprüfung in vivo zur Behandlung der systemischen BCG-Infektion notwendig.

Sehr viele Antibiotika, die von uns in vitro untersucht wurden, erreichten kurzzeitig, ca. 2-4 h nach Applikation, hohe Urinspiegel und sind damit auch potentiell wirksam gegen BCG. Ausnahmen davon sind Trimethoprim-Sulfamethoxazol oder Nitrofurantoin. Erwartungsgemäß sind die Tuberkulostatika mit Ausnahme von Pyrazinamid und insbesondere auch Cycloserin, gut wirksam gegen BCG. Genauso wichtig erscheinen die Befunde bezüglich Fluorochinolonen: Diese sind hoch wirksam gegenüber BCG.

Der Mausstamm C57/BL 6 ist für eine BCG Infektion suszeptibel. Daher kann in diesem Modell in idealer Weise die Wirksamkeit einer antimikrobiellen Therapie und wie auch einer Steroidtherapie gegen eine BCG-Infektion überprüft werden.

Unsere Ergebnisse zeigen nach primärer systemischer BCG-Infektion einen signifikanten therapeutischen Effekt von Fluorochinolonen, während andere Antibiotika, wie TMS keinen Effekt hatten. Prednisolon allein aggravierte die primäre BCG-Infektion. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit in vitro Studien und klinischen Berichten, in denen eine erfolgreiche Anwendung von Fluorochinolonen in Kombination mit anderen Tuberkulostatika beschrieben werden (117).

Als nächsten Schritt etablierten wir das Modell der BCG Re-Stimulation, entsprechend der klinischen Situation, die typischerweise PPD-positiven Patienten, oder nach mehrfacher z.T. traumatischer BCG Instillation einbezieht, um die klinisch relevante hypererge Reaktion zu simulieren. Hierbei konnte lediglich durch die hochdosierte Prednisolon-Gabe und nicht durch Fluorochinolone allein die Überlebenszeit signifikant verlängert werden. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von anderen Studien. Koukol und Mitarbeiter fanden in einer in vivo Untersuchung nach Re-Stimulation mit BCG und einer alleinigen Steroid-Therapie eine verkürzte Überlebenszeit der Tiere (118). Dies könnte mit einer zu geringen Steroid-Dosis in diesen Experimenten zusammenhängen. Wir verwendeten erfolgreich eine 20ig-fach höhere Dosierung (20 mg/kg KG), wie sie auch in der Literatur zur Bekämpfung der hyperergen Schock-Reaktion empfohlen wird (119). Diese kurzfristige hochdosierte Prednisolon-Gabe

(1-2g/d) ist ohne das Risiko einer sekundären Nebenniereninsuffizienz oder anderer Nebenwirkungen, die von der langfristigen Steroidtherapie bekannt sind (120).

Wiederholte transurethrale Katheterisierung während einer BCG Instillations-Therapie ist mit bakteriellen Infekten wie z.B. Zystitis und Epididymitis assoziiert (121). Weiterhin kann eine BCG-induzierte Zystitis nach der zweiten oder dritten Instillation entstehen. Als Folge hiervon werden häufig Antibiotika wie TMS oder Fluorochinolone während einer BCG-Instillationstherapie verordnet. Wie gezeigt werden konnte, sind Fluorochinolone hoch effektiv gegen Mykobakterien in vitro und erreichen hohe Ausscheidungskonzentrationen im Urin. Hiernach wäre es vorstellbar, dass Fluorochinolone die Viabilität von Mykobakterien in der Blase beeinflussen. Zbar und Mitarbeiter konnten in einem Tiermodell zeigen, dass die Viabilität von BCG für die antitumorale Wirksamkeit bedeutsam ist (122). Diese Ergebnisse konnten von uns im orthotopen murinen Tumormodell bei immunkompetenten Mäusen bestätigt werden (60). Somit könnten Fluorochinolone die Effektivität von BCG beeinflussen. In unseren Untersuchungen wurde jedoch die antitumorale Wirkung von BCG im orthotopen Tumormodell durch Fluorochinolone nicht signifikant reduziert. Dieses könnte mit der kurzen Halbwertszeit, mit der BCG in der Blase verbleibt, zusammenhängen. Da die Verdopplungszeit von BCG länger als 24 h beträgt, ist eine wesentliche Beeinflussung der Viabilität der Bakterien unwahrscheinlich. In dieser Untersuchung bewirkt die dauerhafte begleitende Therapie mit Prednisolon während der BCG Instillationstherapie ein vorzeitiges Versterben der Tiere. In vorhergehenden Versuchen wurde eine wesentliche medikamenteninduzierte Toxizität über den genannten Behandlungszeitraum ausgeschlossen. Ein überschießendes Tumorstadium konnte bei der Sektion der Tiere in dieser Untersuchung ebenfalls nicht beobachtet werden. Somit könnte die Ursache für das vorzeitige Versterben in einer Immunsuppression durch Langzeit-Steroidtherapie mit konsekutiver BCG-Sepsis begründet liegen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine systemische BCG-Infektion nach intravesikaler Therapie je nach Schweregrad zunächst mit Fluorochinolonen oder mit einer Dreifach-Kombination von Tuberkulostatika anbehandelt werden sollte. Im kurzfristigen Intervall ist die zusätzliche Gabe von Steroiden unabdingbar.

In unserem Modell wurde die Effektivität von BCG zur Behandlung von Blasen Tumoren durch die zusätzliche Gabe von Chinolonen nicht beeinträchtigt, obgleich in vitro eine gute Wirksamkeit gegen Mykobakterien nachgewiesen wurde.

4.3 Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische

4.3.1 Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im orthotopen syngenem murinen Harnblasentumormodell

Verschiedene Hypothesen existieren, um die hohe Rate von Tumorrezidiven nach transurethraler Resektion von Harnblasenkarzinomen zu erklären. Die Implantationstheorie von Harnblasentumoren wurde bereits 1903 durch Albarran und Imbert vorgeschlagen (123). Obwohl die Möglichkeit der Implantation von Karzinomzellen auf eine intakte Mukosa meist abgelehnt wurde, erschien eine Tumorzellimplantation auf denudierte Oberflächen oder in operativen Wunden weitgehend akzeptiert (9, 124). Soloway und Masters argumentierten, dass flottierende Tumorzellen während einer Elektroresektion an das vorgeschädigte Gewebe adhären, anwachsen und somit ein Rezidiv an der Resektionsstelle induzieren können (10). Weitere klinische Hinweise für die Implantationshypothese erhielt man aus der atypischen Lokalisation von Rezidivtumoren im Vergleich zum Primärtumor im Bereich des Blasendaches (123, 125). In einer prospektiven Untersuchung konnten Müller et. al. bei 23 % der Patienten nach klinisch vollständiger transurethraler Resektion von Harnblasentumoren Tumorzellen in der Spüllösung feststellen (11). 75% dieser Patienten entwickelten einen Rezidivtumor innerhalb von 3-6 Monaten. Auch der Nachweis der klonalen Herkunft primärer und sekundärer Harnblasentumoren durch Sidransky und Mitarbeiter kann als ein molekularbiologisches Argument für diese Hypothese gewertet werden (126).

Weitere indirekte Unterstützung kam von klinischen Studien aus der jüngeren Vergangenheit. Diese Studien untersuchten die Möglichkeit, Tumorzellimplantation und Rezidivhäufigkeit des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms durch einmalige intravesikale Zytostatikagabe

unmittelbar nach der transurethralen Resektion zu verhindern. Burnand et. al. instillierten 90mg Thiotepa in die Harnblase unmittelbar nach TUR. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Rezidive innerhalb eines Jahres (125). Ähnliche Resultate wurden durch Zincke et. al. berichtet (127). Die Autoren schlussfolgerten, dass eine weitere Behandlung zu späteren Zeitpunkten nicht zu einer Verbesserung der Ergebnisse führte. In einer großen klinischen Studie mit 431 Patienten aus der EORTC wurde gezeigt, dass eine einmalige Instillation von Epirubicin (80 mg) unmittelbar nach der transurethralen Resektion des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms die Rezidivrate im Vergleich zur nur mit Instillation von Wasser behandelten Kontrollgruppe um nahezu die Hälfte reduzierte (12). Rajala und Mitarbeiter aus der Finnbladder Group konnten ebenfalls die Bedeutung der postoperativen Instillation eines Zytostatikums, nicht jedoch eines Immunmodulators zeigen (128), wobei auch hier der Zeitpunkt der Instillation herausgestellt wurde. Es wurden unmittelbar postoperativ entweder Interferon- α oder Epirubicin instilliert und mit den Ergebnissen der transurethralen Therapie alleine verglichen. Die Rezidivfreiheit nach 2 Jahren war in den mit TUR und Interferon behandelten Gruppen etwa gleich hoch (40 %). Die einmalige postoperative Instillation von Epirubicin zeigte jedoch eine Rezidivfreiheit bei 66 % der Patienten und damit einen statistisch signifikanten Unterschied zu den vorgenannten Gruppen.

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

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

See und Mitarbeiter zeigten *in vitro*, dass eine Blockade von Integrinrezeptoren mittels GRGDS Oligopeptiden zu einer signifikant verminderten Tumorzelladhärenz an Fibronectinmatrix in Abhängigkeit von Oligopeptid-Konzentration, Tumorzellzahl und Viabilität führte (57). *in vivo* jedoch konnte keine effektive Reduktion der Tumorzelladhäsion und des Tumorstwachstums festgestellt werden. Hyacinthe et. al. verwendeten einen *in vitro* Zelladhäsionsassay mit gemischten Matrices, welches der natürlichen Situation *in vivo* erheblich näher kommt. GRGDS, Mannose-6-Phosphat and Heparin inhibierten alle dosisabhängig die zelluläre Adhäsion. YIGSR, ein Lamininspezifisches Peptid, konnte jedoch *in vitro* keine Adhäsionsinhibition zeigen (129). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte *in vivo* in einem Harnblasentumormodell eine deutliche Reduktion der Zelladhäsion durch GRGDS im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu See et. al. verwendeten die Autoren jedoch eine 10fach höhere Konzentration von GRGDS. Pode et al. verwendeten eine natürliche extrazelluläre Matrix zur Adhäsion von oberflächlich hoch differenzierten humanen Blasen Tumoren *in vitro*. Stabile Adhäsion der Tumorzellen lag bereits innerhalb der ersten Stunde vor und erreichte ein Maximum innerhalb von 24 Stunden, gefolgt von Abflachung und Proliferation der ausgesäten Zellen. Diese Ergebnisse legten nahe, dass eine Prävention der Tumorimplantation innerhalb der ersten Stunde nach transurethraler Resektion von Blasen Tumoren erfolgen muss (124), was durch neuere klinische Untersuchungen bestätigt wurde (128).

Die Implantation von Tumorzellen, die während der TUR freigesetzt werden, ist durch das operative Trauma mit Läsion und Denudierung von Urothel wesentlich erleichtert, da hierdurch Basalmembran und unterliegende Matrix exponiert werden (10, 59, 124, 130). Selbst in nicht denudierten Arealen kann die eintretende Fibrindeposition auf intaktem Urothel eine hervorragende Adhäsionsmatrix bilden (57, 57). Die genannten biologischen Ansätze anderer Gruppen zur Implantationsinhibition bezogen sich jedoch *in vitro* auf einfache Matrices, während komplexe Matrices nicht untersucht wurden. Zumindest im Tierversuch waren somit die bisher verfolgten Strategien wenig erfolgreich. Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass auf der Zelloberfläche mehr als eine Bindungsstelle an extrazelluläre Matrix vorliegt und dass die Implantationsmatrix überwiegend aus den Bestandteilen Fibronectin, La-

minin und Kollagen besteht (58, 59). Die monospezifische Blockierung nur einer Adhäsionsdeterminante konnte somit nicht zur erhofften effektiven Inhibition der Tumorzelladhäsion führen.

Aus diesem Grunde untersuchten wir Oligopeptide, die mit mehreren Komponenten der extrazellulären Matrix interagieren. Hierzu wurde Fibronectin-spezifische Oligopeptide (GRGDS/EILDV), ein Laminin-spezifisches Oligopeptide (YIGSR) und Kollagen-spezifische Peptide (DGEA/KQAGDV/GRGDS) eingesetzt..

Diese Hypothese konnte in unserem Versuchsansatz in vivo bestätigt werden. Während sich wiederum keine signifikante Verminderung der Tumorzellimplantation und des konsekutiven Tumorwachstums nach Instillation monospezifischer Oligopeptide zeigte, konnten Kombinationen aus den 3 Oligopeptiden gegen die Hauptkomponenten der suburothelialen Matrix zu einer signifikanten Inhibition der Zelladhäsion und des konsekutiven Tumorwachstums führen. Weiterhin konnte eine Konzentrationsabhängigkeit dieses Therapieansatzes nachgewiesen werden, da bei niedrigen Konzentrationen (1mg/ml) eine Reduktion der Effizienz zu verzeichnen war.

Selbst in der Gruppe der tumortragenden Mäuse ließ sich ein weiterer Hinweis auf die Effektivität der verwendeten Therapeutika ablesen. Da in unserem Modell das Blasengewicht zum Zeitpunkt der Opferung von der initial instillierten Tumorzellzahl abhängig ist, zeigt eine Reduktion der zur Implantation verfügbaren viablen Zellen ein reduziertes Blasengewicht (60). Selbst bei erfolgter Implantation führte die Irrigation mit Epirubicin, Kombination 3mg oder Kombination 5mg zu einer statistisch signifikanten Verringerung des Blasengewichtes im Vergleich zur Instillation mit Kontrollpeptiden, monospezifischen Peptiden oder geringer Konzentration der Kombination. Dieses Phänomen kann durch die deutlich verringerte Anzahl implantierender Tumorzellen erklärt werden, die letztlich zu einer verringerten Tumormasse führte.

Unser Ansatz zeigt mehrere klinisch wichtige Aspekte: Durch spezifische Blockade der Tumorzelladhäsion während endoskopischer Operationen ist es offensichtlich möglich, die Rezidivrate des Harnblasenkarzinoms spezifisch zu senken. Wenn man die klinische Effektivität

der postoperativen Zytostatikainstillation aus mehreren klinischen Studien in Betracht zieht (12, 125, 127, 128) und mit unseren *in vivo* Daten vergleicht, so kann die Effektivität unseres biologischen Ansatzes zu einer 50%igen Reduktion der Rezidive oberflächlicher Harnblasenkarzinome führen. Mit diesem Therapieansatz würden genetisch bedingte, biologisch aggressivere Tumoren als die wichtigste Ursache für auftretende Harnblasenkarzinomrezidive verbleiben. Längere intravesikale Therapiemaßnahmen wären somit nur für diese Tumor-entität in Betracht zu ziehen. Weiterhin könnte der von uns verfolgte biologische Ansatz der Interferenz mit zellulärer Adhäsion nebenwirkungsfrei auch im Vergleich zur Zytostatikainstillation durchgeführt werden, da der gleichzeitige Einsatz während der transurethralen Resektion möglich wäre. Eine systemische Resorption bei größeren Resektionswunden würde nicht zu toxischen Reaktionen wie bei Zytostatika führen, da systemische hohe Dosen von Oligopeptiden im Tierversuch unproblematisch waren (131, 132). Auch eine Beeinträchtigung der Gerinnung konnte in unseren Untersuchungen nicht festgestellt werden, obwohl Thrombozyten und von Willebrand Faktor ebenfalls die RGD Sequenz zur Adhäsion benutzen (53). Hyacinthe et. al. zeigten im Tiermodell keinen Einfluss von GRGDS auf die Wundheilung (129) und auch in unserem Modell konnten toxische Effekte weitgehend ausgeschlossen werden, da das Körpergewicht der Mäuse keine signifikanten Unterschiede aufwies.

Zusammenfassend kann aus den oben genannten Ergebnissen gezeigt werden, dass die Inhibition der zellulären Adhäsion durch Verwendung polyvalenter Oligopeptide eine höchst effektive therapeutische Maßnahme darstellt, die ein großes Potential in der Behandlung des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms, aber auch anderer Karzinome mit Implantationspotential eröffnet.

4.3.2 Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im biolumineszenten orthotopen syngenem murinen Harnblasentumormodell

Basierend auf den Ergebnissen der vorgenannten Experimente wurden zur Evaluation des biolumineszenten Harnblasentumormodells in vivo primär Kombinationen von Oligopeptiden eingesetzt: Es wurden in dieser Untersuchung ein polyvalentes (Fibronectin / Kollagen / Laminin) Peptid (GRGDS), ein fibronectin-spezifisches Peptid (EILDV) und ein laminin-spezifisches Peptid (YIGSR) eingesetzt. Fibronectin scheint die wichtigste Substanz für die Zelladhäsion in der ECM zu sein (133). Zwei verschiedene fibronectin-spezifische Oligopeptide fanden daher Anwendung um verschiedene Epitope des Fibronectinrezeptors der Zelle zu blockieren (GRGDS und EILDV). In unseren in vitro Experimenten konnte eine konzentrationsabhängige Inhibition der MB49^{LUC} Harnblasentumorzellen durch GRGDS bzw. EILDV an eine Fibronectinmatrix gefunden werden, für GRGDS – wenn auch in geringerem Ausmaß – ebenfalls für Kollagen IV, jedoch kein Effekt an einer Lamininmatrix.

Die Ergebnisse von See et al. und Hyacithe et al. zu Untersuchungen zu GRGDS sind bereits im vorhergehenden Abschnitt diskutiert (57, 129). Die in vitro Ergebnisse zu EILDV sind ebenfalls im vorhergehenden Abschnitt erwähnt und konnten für MB49^{LUC} nachvollzogen werden. Zudem konnte Yamamoto et al. in einem in vivo Modell einen signifikanten antimetastatischen Effekt von YIGSR und effektiver noch von EILDV zeigen (134). Singleton and Menino untersuchten die endodermale Zellmigration und fanden eine signifikante Inhibition durch Integrinrezeptor-Blockade durch EILDV und/oder RGD (56).

YIGSR allein zeigte in dieser Untersuchung keinen adhäsions-inhibierenden Effekt an einer Lamininmatrix (Abb. 2a), war jedoch in größerem Maße effektiv in Kombination mit GRGDS als GRGDS allein was einen gewissen synergistischen Effekt der Peptide nahe legt, sowie die Mehr-Rezeptor-Theorie auch für Laminin unterstützt (135).

Matsuoka et al. zeigten eine adhäsionsinhibierende Wirkung von YIGSR und RGD auf eine humane Magenkarziom-Zelllinie in einem in vitro Assay und ein verlängertes Überleben in einem murinen Karzinommodell (136).

Iwamoto et al. konnte eine Hemmung der Invasion einer humanen Lungenkarzinom-Zelllinie durch YIGSR in einen in vitro Assay nachweisen und eine Reduktion von Lungenmetastasen in einem murinen Modell (137).

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein biolumineszentes orthotopes syngenes Harnblasentumormodell etabliert für ein in vivo Monitoring der Tumorimplantation. Auch in diesem Modell konnten wir eine effektive Implantationsinhibition von Tumorzellen in der verletzten Harnblasenwand durch Oligopeptidgemische verifizieren. Hierbei handelt es sich um das erste in der Literatur erwähnte orthotope syngene biolumineszente Harnblasentumormodell. Mehrere Vorteile sprechen für ein in vivo Monitoring bei unserem Versuchsansatz. Wiederholtes BLI parallel bei verschiedenen Tieren einer Versuchsgruppe ist möglich, wodurch BLI besonders attraktiv für die Testung antitumoröser Substanzen ist. Hierdurch werden zudem die statistische Variabilität sowie die Anzahl der benötigten Versuchstiere gesenkt.

An Tag 7, 14, 21 und 28 nach Tumorimplantation wurde jeweils BLI bei allen Tieren durchgeführt, an Tag 28 wurden sie getötet. 16 von 17 Mäusen mit letztentlichem histologischem Tumornachweis zeigten an Tag 7 ein positives Signal im BLI. An Tag 14 waren es 17/17 Mäusen. Somit fanden wir eine Sensitivität des BLI von 0,92 an Tag 7 und von 1,0 an Tag 14. Die mittlere Anzahl der gemessenen Counts lag an Tag 7 bei 8176,5 und nahm ab Tag 14 bis Tag 28 im Mittel kontinuierlich ab (Abb. 24)

Die Sensitivität, ein schwaches Lichtsignal ausgehend von Tumorzellen in einem lebenden Organismus zu detektieren, hängt im Wesentlichen von zwei Faktoren ab: dem Level der Luc-Aktivität in den entsprechenden Zellen und der Lokalisation dieser Zellen im Körper. Tanaka et al. etablierte ein orthotopes murines Harnblasentumormodell mit Green-Fluorescence-Protein (GFP) exprimierenden humanen Tumorzellen. Die Autoren bestimmten die mit dem Urin ausgeschiedenen GFP-positiven Tumorzellen und fanden eine Sensitivität von 0-63% bezüglich der intravesikalen Tumorentstehung. Um ein signifikantes Fluoreszenzsignal von dem orthotopen Tumor in vivo zu erhalten, musste die Harnblase chirurgisch freigelegt werden (138).

Nogawa et al. etablierten ein orthotopes murines Harnblasentumormodell und verwendeten eine Luc-markierte humane Harnblasentumorzelllinie. In diesem Modell wurde eine Untersuchung mit siRNA gegen Polo-like-Kinase durchgeführt. Nach Tumorzellimplantation fand hier eine Präselektion von Mäusen mit besonders starkem biolumineszentem Signal statt, bevor sie in die einzelnen Gruppen randomisiert wurden. Die Autoren fanden hiernach einen histologischen Tumornachweis in allen Mäusen mit biolumineszenten Signal. Auch in diesem Modell musste jedoch die Harnblase zur Messung chirurgisch freigelegt werden (139). Zur biolumineszenten Erfassung einer orthotopen Tumorzellimplantationsinhibition ist eine Präselektion der Mäuse nicht möglich. In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine hohe Sensitivität für das Tumorwachstum bereits an Tag 7 nach Implantation nachgewiesen werden, was eine valide Kontrolle der Therapie an einem frühen Zeitpunkt des Experiments darstellt.

Die nicht-invasive Quantifizierung der Tumorlast durch BLI und ansprechen auf eine Therapie setzt voraus, dass die Anzahl der emittierten Photonen linear mit der Anzahl der viablen Tumorzellen korreliert.

Das größte Hindernis einer zuverlässigen Quantifizierung der emittierten Photonen ist die starke und unvorhersagbare Absorption und Streuung des Lichts durch das umgebende Gewebe. In der vorliegenden Untersuchung lag im Mittel der höchste Wert der emittierten Photonen an Tag 7 nach Tumorimplantation. An Tag 14, 21 und 28 kam es zu einem Rückgang der Lichtemission. Verschiedene Faktoren können für dieses Phänomen verantwortlich sein. Schätzungen nach wird das Licht pro cm Gewebetiefe um ein 10-faches abgeschwächt (140). Insbesondere Hämoglobin in seinen verschiedenen Formen (z.B. O₂Hb und MetHb) ist bekannt für eine starke Interferenz mit der biolumineszenten Lichtemission, da es sehr stark Licht im blau-grün Spektrum absorbiert und sich damit mit dem Spektrum der Luc-Lichtemission überschneidet (141).

Die intratumorale Verteilung von Blutgefäßen, Sauerstoff und Luciferin wird mit zunehmender Tumorgöße heterogener, wodurch eine Quantifizierung durch Photonenmessung erschwert

wird. Somit kann fälschlicherweise eine verringerte Luc-Aktivität als therapeutischer Erfolg gewertet werden.

Dieses Phänomen hängt wahrscheinlich von der reduzierten Substrat- und/oder Sauerstoffverteilung ab, sowie von der höheren Lichtstreuung und -absorption in großen Tumoren. Mendel et al. untersuchte den Therapieerfolg in subcutan implantierten Prostatakarzinomen in Nacktmäusen (142). Wenn die Therapie bei einem Tumolvolumen von 200–300 mm³ begonnen wurde, kam es während der Therapie zu einem Stillstand des Tumorwachstums. Während dieser Zeit konnte ein Abnehmen der Lichtemission beobachtet werden, was als Untergang von Tumorzellen gewertet werden kann. Wurde die Therapie hingegen bei einem Tumolvolumen von <100mm³ begonnen, konnte eine Reduktion von Tumorgröße und Lichtemission beobachtet werden.

Im vorliegenden Modell reduzieren initial das umgebende Gewebe, der intravesikale Urin und das schwarze Fell die Lichtemission. An Tag 7 bzw.14 wurde der höchste Grad der Lichtemission gemessen. Bei zunehmender Tumorgröße hat wahrscheinlich Tumornekrose und Ödem die weitere Zunahme der Lichtemission verhindert. Nichtsdestotrotz konnte die entscheidende Frage in diesem Versuchsansatz – konnte die Tumorzellimplantation verhindert werden- mit Hilfe des BLI zu einem frühen Versuchszeitpunkt und mit hoher Sensitivität beantwortet werden.

Die effektive Inhibition der Zellimplantation in die verletzte Harnblasenwand durch ein Oligopeptidgemisch wurde mit diesem weiterentwickelten orthotopen murinen Harnblasentumormodell verifiziert. In folgenden Untersuchungen sollten die Möglichkeiten einer Quantifizierung des Tumorwachstums in diesem Modell weiter evaluiert werden.

4.3.3 Tumorzellimplantationsinhibition durch Oligopeptidgemische im Portmetastasenmodell

Die genaue Inzidenz von Portmetastasen nach laparoskopischen Eingriffen ist unbekannt. Im Hinblick auf urologische Eingriffe zeigte Micali in einer internationalen Befragung, dass die

Inzidenz von Tumorimplantationsmetastasen nach laparoskopisch durchgeführten onkologischen Eingriffen gering ist und nicht größer erscheint, als nach offen operativen Eingriffen. Tumorzellaussaat scheint hauptsächlich im Rahmen der Entfernung entdifferenzierter Tumore und bei Abweichung von onkologischen Standards aufzutreten (65). Bemerkenswerter Weise wurden 50 Zentren zu dieser Befragung kontaktiert und lediglich 19 Zentren kamen in die Auswertung. Das Risiko einer Tumorzellaussaat beim Urothelkarzinom ist gut bekannt und stellt aufgrund seines biologischen Verhaltens ein weitaus höheres Risiko dar, als beispielsweise beim Nierenzell- oder Prostatakarzinom (74-76). Viabele Tumorzellen können die Wunden im Rahmen einer laparoskopischen Operation auf direktem Weg über die Instrumente oder durch Aufwirbelung durch den Gasstrom erreichen (143). Unter diesem Aspekt ist die intraperitoneale Gabe von Chemotherapeutica intraperitoneal nach laparoskopischer Resektion von Malignomen experimentell untersucht worden (78). Die intraperitoneale Gabe von Chemotherapeutica direkt nach laparoskopischen Eingriffen könnte intraabdominale viabele Tumorzellen abtöten und verhindern, dass diese an prädestinierten Orten, wie z.B. den Trokarinsertionswunden, implantieren (144). Da bereits eine kleine Anzahl an viablen Tumorzellen ausreicht, eine Implantationsmetastase im Bereich der Trokarinsertionswunden zu erzeugen (145), ist der Zeitpunkt und die Dosierung potentieller Substanzen genau zu untersuchen. Vorteil der intraperitonealen Chemotherapeutica-Gabe ist der direkte Kontakt zu den Tumorzellen und die günstige Veränderung der Zellkinetik (146). Zusätzlich führt die intraperitoneale Applikation zu einer Verteilung der Substanz in der gesamten Bauchhöhle und zu einer verlängerten Exposition zu den Tumorzellen aufgrund einer langsameren Clearance verglichen mit der systemischen Gabe (78). Andererseits kann auch die lokale Applikation chemotherapeutisch wirksamer Substanzen zu ernsthaften unerwünschten Wirkungen führen (79). Aus diesem Grund wurde in einem murinen Portmetastasenmodell die Wirksamkeit antiadhäsiver Oligopeptidgemische im Vergleich einer üblicherweise lokal gegen das Urothelkarzinom angewendeten zytotoxischen Substanz, dem Mitomycin, untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eine signifikante Reduktion intraperitonealer Tumorzellaussaat und von Portmetastasen durch Oligopeptidgemische und durch Mitomycin. Bemerkenswerterweise wurde dieses Ergebnis erreicht, obgleich die therapeutisch wirksamen Substanzen erst 30 min nach der Tumorzellsuspension appliziert wurden. Somit können die Substanzen adäquater Dosierung die Anzahl viabler Tumorzellen in der Peritonealhöhle reduzieren und die Tumorzellimplantation verhindern, insbesondere wenn während einer laparoskopischen Operation unerwartet ein Urothelkarzinom entdeckt wird und die Gefahr einer Tumorzellaussaat besteht.

Eine potentielle Gefahr schwerwiegender Nebenwirkungen bzw. negativer Einfluss auf Wundheilung und ggf. Anastomosenheilung ist bei der lokalen Anwendung von zytotoxischen Substanzen nicht auszuschließen. Diese sind für die lokale Therapie des Harnblasentumor mit Mitomycin bereits beschrieben (14, 87). Im Gegensatz zu den mit Oligopeptiden therapierten Mäusen, zeigten die mit Mitomycin therapierten Mäuse einen deutlichen Gewichtsverlust, u.U. als Hinweis für eine stärkere systemische Beeinträchtigung der Tiere durch die zytotoxisch wirksame Substanz. Dieser Sachverhalt muss sorgfältig erwogen werden, bevor experimentelle Ansätze in klinischen Studien Anwendung finden. Obgleich beide Therapie-strategien die laparoskopisch assoziierte Tumorzellaussaat mit konsekutiven Implantationsmetastasen im Experiment reduzieren können, müssen Expositionszeit und Dosis in weiteren Untersuchungen evaluiert werden, um eventuelle unerwünschte Wirkungen zu vermeiden.

Die Hemmung der Tumorzelladhäsion durch spezifische Oligopeptidgemische ist eine hoch effektive Methode mit einem großen Potential nicht nur in der Verhinderung von Portmetastasen oder Harnblasentumorrezidiven, sondern kann Anwendung finden bei allen Malignomen mit einem potentiellen Risiko der Tumorzellaussaat.

5 Literatur

- 1 Amling,C.L. Diagnosis and management of superficial bladder cancer, *Curr.Probl.Cancer*, 25: 219-278, 2001.
- 2 Hisataki,T., Miyao,N., Masumori,N., Takahashi,A., Yanase,M., Itoh,N. and Tsukamoto,T. Risk factors for multiple intravesical recurrences of superficial bladder cancer, *Urology*, 58: 935-939, 2001.
- 3 Lamm,D.L. The challenge of improved diagnostic and prognostic indicators of superficial bladder cancer, *J.Urol.*, 164: 690-691, 2000.
- 4 Yamada,T., Tsuchiya,T., Kamei,S., Yoh,M., Nishino,Y., Nishida,Y., Taniguchi,M., Nagai,T., Takeuchi,T., Ehara,H., Takahashi,Y. and Deguchi,T. [Analysis of factors affecting recurrence and prognosis of superficial bladder cancer--study of 800 patients--], *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 97: 33-41, 2006.
- 5 Lamm,D.L., McGee,W.R. and Hale,K. Bladder cancer: current optimal intravesical treatment, *Urol.Nurs.*, 25: 323-2, 2005.
- 6 Wich,H., Franke,G., Grimm,U. and Siegmund,W. Zum Acetylierungsphänotyp bei Harnblasenkarzinompatienten, *Z.Urol.Nephrol.*, 82: 597-600, 1989.
- 7 Rübben,H. and Jocham,D. Therapie des oberflächlichen Blasenkarzinoms, *Urologe A*, 30: 2-9, 1991.
- 8 Otto,T., Goepel,M., Krege,S. and Rübben,H. Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Biologie des Harnblasenkarzinoms, *Akt.Urol.*, 24: 192-197, 1993.
- 9 Weyrauch,H.M. and Crossfield,J.H. Dissemination of bladder neoplasms by endoscopic electroresection, *J.Urol.*, 87: 391, 1962.
- 10 Soloway,M.S. and Masters,S. Urothelial susceptibility to tumor cell implantation. Influence of cauterization, *C*, 46: 1158, 1980.
- 11 Müller,F., Kraft,R. and Zingg,E.J. Exfoliative cytology after transurethral resection of superficial bladder tumours, *Brit.J.Urol.*, 57: 530-534, 1985.
- 12 Oosterlinck,W., Kurth,K.-H., Schröder,F., Bultinck,J., Hammond,B., Sylvester,R. and members of the european organization for research on treatment of cancer. A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer genitourinary group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder, *J.Urol.*, 149: 749-752, 1993.
- 13 Zein,T.A., Friedberg,N. and Kim,H. Bone marrow suppression after intravesical mitomycin C treatment, *J.Urol.*, 136: 459-460, 1986.
- 14 Neulander,E.Z., Lismer,L. and Kaneti,J. Necrosis of the glans penis: a rare complication of intravesical therapy with mitomycin C, *J Urol*, 164: 1306, 2000.
- 15 Orlin,I. The role of cystography in thio-tepa toxicity, *J.Urol.*, 108: 257-258, 1972.
- 16 Post,J.G., te Poele,J.A.M., Oussoren,Y. and Stewart,F.A. Bladder damage in mice after single and repeated intravesical instillations of mitomycin C or doxorubicin, *J.Urol.*, 150: 1965-1969, 1993.

- 17 Weldon,T.E. and Soloway,M.S. Susceptibility of urothelium to neoplastic cellular implantation, *Urology*, 5: 824-827, 1975.
- 18 See,W.A. and Chapman,W.H. Tumor cell implantation following neodymium-YAG bladder injury: a comparison to electrocautery injury, *J.Urol.*, 137: 1266-1269, 1987.
- 19 Ratliff,T.L., McGarr,J.A., Abou-Zeid,C., Rook,G.A.W., Stanford,J.L., Aslanzadeh,J. and Brown,E.J. Attachment of mycobacteria to fibronectin-coated surfaces, *J.Gen.Microbiol.*, 134: 1307-1313, 1988.
- 20 Ratliff,T.L., Palmer,J.O., McGarr,J.A. and Brown,E.J. Intravesical BCG therapy for murine bladder tumors: Initiation of the response by fibronectin-mediated attachment of BCG, *Cancer Res.*, 47: 1762-1766, 1987.
- 21 Shapiro,A., Kelley,D.R., Oakley,D.M., Catalona,W.J. and Ratliff,T.L. Technical factors affecting the reproducibility of intravesical mouse bladder tumor implantation during therapy with *Bacillus Calmette-Guerin*, *Cancer Res.*, 44: 3051-3054, 1984.
- 22 Shapiro,A., Ratliff,T.L., Oakley,D.M. and Catalona,W.J. Reduction of bladder tumor growth in mice treated with intravesical bacillus Calmette-Guérin and its correlation with bacillus Calmette-Guérin viability and natural killer cell activity, *Cancer Res.*, 43: 1611-1615, 1983.
- 23 See,W.A., Chapman,P.H. and Williams,R.D. Kinetics of transitional tumor cell line 4909 adherence to injured urothelial surfaces in F-344 rats, *Cancer Res.*, 50: 2499-2504, 1990.
- 24 Soloway,M.S. Single and combination chemotherapy for primary murine bladder cancer, *C*, 36: 333-340, 1975.
- 25 Williams,P.D. and Murphy,G.P. Experimental bladder tumor induction, propagation, and therapy, *Urology*, VIII: 39-42, 1976.
- 26 Hubbell,H.R., Kvaives-Krick,K., Carter,W.A. and Strayer,D.R. Antiproliferative and immunomodulatory actions of β -interferon and double-stranded RNA, individually and in combination, on human bladder tumor xenografts in nude mice, *Cancer Res.*, 45: 2481-2486, 1985.
- 27 Huland,H., Otto,U. and v.Paleske,A. Chemotherapy and human bladder carcinoma transplanted into NMRI nu/nu mice, *J.Urol.*, 134: 601-606, 1985.
- 28 Russell,P.J., Raghavan,D., Gregory,P., Philips,J., Wills,E.J., Jelbart,M., Wass,J., Zbroja,R.A. and Vincent,P.C. Bladder cancer xenografts: a model of tumor cell heterogeneity., *Cancer Res.*, 46: 2035-2040, 1986.
- 29 Ratliff,T.L., Gillen,D.P. and Catalona,W.J. Requirement of a thymus-dependent immune response for BCG- mediated antitumor activity, *J.Urol.*, 137: 155-158, 1987.
- 30 Hudson,M.A., Ritchey,J.K., Catalona,W.J., Brown,E.J. and Ratliff,T.L. Comparison of the fibronectin-binding ability and antitumor efficacy of various mycobacteria, *Cancer Res.*, 50: 3843-3847, 1990.
- 31 Soloway,M. Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer, *Cancer Res.*, 37: 2918-2929, 1977.
- 32 Lee,K.-E., Weiss,G.H., O'Donnell,R.W. and Cockett,A.T.K. Reduction of bladder cancer growth in mice treated with intravesical *Bacillus Calmette Guerin* and systemic interleukin 2, *J.Urol.*, 137: 1270-1273, 1987.
- 33 Shapiro,A., Ratliff,T.L., Oakley,D.M. and Catalona,W.J. Comparison of the efficacy of intravesical *Bacillus Calmette-Guérin* with thiotepa, mitomycin C, poly 1:C/poly-L-lysine and Cis platinum in murine bladder cancer, *J.Urol.*, 131: 139-142, 1984.

- 34 Sylvester,R.J., van der Meijden,A.P. and Lamm,D.L. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials, *J.Urol.*, *168*: 1964-1970, 2002.
- 35 Koya,M.P., Simon,M.A. and Soloway,M.S. Complications of intravesical therapy for urothelial cancer of the bladder, *J.Urol.*, *175*: 2004-2010, 2006.
- 36 Böhle,A., Thanhäuser,A., Ulmer,A.J., Mattern,T., Ernst,M., Flad,H.-D. and Jocham,D. On the mode of action of intravesical Bacillus Calmette-Guérin: in-vitro characterization of BCG - activated killer cells, *Urol.Res.*, *22*: 185-190, 1994.
- 37 de Boer,E.C., de Jong,W.H., van der Meijden,A.P.M., Steerenberg,P.A., Witjes,F., Vegt,P.D.J., Debruyne,F.M.J. and Ruitenberg,E.J. Leukocytes in the urine after intravesical BCG treatment for superficial bladder cancer, *Urol.Res.*, *19*: 45-50, 1991.
- 38 Malech,H.L. and Gallin,J.I. Medical intelligence. Current concepts: Immunology - Neutrophils in human diseases, *New Engl.J.Med.*, *117*: 687-694, 1987.
- 39 van der,S.E., Kuster,S., Bohle,A., Braun,J. and Wood,W.G. Towards an understanding of the mode of action of Bacillus Calmette-Guerin-therapy in bladder cancer treatment, especially with regard to the role of fibronectin, *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.*, *30*: 503-511, 1992.
- 40 Brandau,S., Rehbein,P., Durek,C., Flad,H.-D., Ulmer,A.J., Jocham,D. and Böhle,A. BCG-immunotherapy of bladder cancer: which drugs reduce side effects without affecting anti-tumor capacity - an in vitro approach, *British Journal of Urology*, *80* (Suppl.) 1997 35(Abstract)
- 41 Brandau,S., Rehbein,P., Schäfer,I., Durek,C., Jocham,D., Flad,H.-D., Ulmer,A.J. and Böhle,A. Intravesical BCG therapy: salicylic acid reduces side effects without affecting anti-tumor capacity in vitro, *Urological Research*, *25* 1997 94(Abstract)
- 42 Bohle,A., Thanhäuser,A., Ernst,M., Flad,H.-D., Rusch-Gerdes,S., Jocham,D. and Ulmer,A.J. Reduction of side effects of intravesical therapy with bacille Calmette-Guerin by pentoxifylline?--an in vitro approach, *Clin.Infect.Dis.*, *31 Suppl 3*: S101-S105, 2000.
- 43 Brandau,S., Rehbein,P., Schäfer,I., Durek,C., Jocham,D., Flad,H.-D., Ulmer,A.J. and Böhle,A. In vitro testing of different BCG preparations to reduce side effects of intravesical BCG, *Urological Research*, *25* 1997 71-102.(Abstract)
- 44 Hudson,M.A., Yuan,J.J., Catalona,W.J. and Ratliff,T.L. Adverse impact of fibrin clot inhibitors on intravesical Bacillus Calmette-Guérin therapy for superficial bladder tumors, *J.Urol.*, *144*: 1362-1364, 1991.
- 45 Thanhäuser,A., Reiling,N., Böhle,A., Toellner,K.-M., Duchrow,M., Scheel,D., Schlüter,C., Ernst,M., Flad,H.-D. and Ulmer,A.J. Pentoxifylline: a potent inhibitor of IL-2 and IFN- τ biosynthesis and BCG-induced cytotoxicity, *Immunology*, *80*: 151-156, 1993.
- 46 Brosman,S.A. and Lamm,D.L. The preparation, handling and use of intravesical Bacillus Calmette-Guérin for the management of stage Ta, T1, Carcinoma in situ and transitional cell carcinoma, *J.Urol.*, *144*: 313-315, 1990.
- 47 Böhle,A., Kirsten,D., Schröder,K.-H., Knipper,A., Fornara,P., Magnussen,H. and Jocham,D. Clinical evidence of systemic persistence of bacillus Calmette-Guérin: Long-term pulmonary bacillus Calmette-Guérin infection after intravesical therapy for bladder cancer and subsequent cystectomy, *J.Urol.*, *148*: 1894-1897, 1992.
- 48 Bergstermann,H. and Rüchardt,A. Ciprofloxacin once daily versus twice daily for the treatment of pulmonary tuberculosis, *Infection*, *25*: 227-232, 1997.
- 49 Lamm,D.L., van der Meijden,A.P.M., Morales,A., Brosman,S.A., Catalona,W.J., Herr,H.W., Soloway,M.S., Steg,A. and Debruyne,F.M.J. Incidence and treatment of complications of ba-

- cillus Calmette- Guérin intravesical therapy in superficial bladder cancer, *J.Urol.*, 147: 596-600, 1992.
- 50 McKhann,C.F., Hendrickson,C.G., Spidler,L.E., Gunnarsson,A., Banerjee,D. and Nelson,W.R. Immunotherapy of melanoma with BCG: Two fatalities following intralesional injection, *C*, 35: 514-520, 1975.
 - 51 Hynes,R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell*, 110: 673-687, 2002.
 - 52 Hynes,R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell*, 69: 11-25, 1992.
 - 53 Ruoslahti,E. and Pierschbacher,M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins, *S*, 238: 491-497, 1987.
 - 54 Hynes,R.O. Fibronectine, *Spektrum der Wissenschaft*, 8: 80-90, 1986.
 - 55 Pierschbacher,M.D. and Ruoslahti,E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, *Nature*, 309: 30-33, 1984.
 - 56 Singleton,C. and Menino,A.R., Jr. Effects of inhibitors of integrin binding on cellular outgrowth from bovine inner cell masses in vitro, *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim*, 41: 29-37, 2005.
 - 57 See,W.A., Rohlf,D.P. and Crist,S.A. In vitro particulate adherence to fibronectin: correlation with in vivo particulate adherence to sites of bladder injury, *J.Urol.*, 147: 1416-1423, 1992.
 - 58 Jost,S.P., Gosling,J.A. and Dixon,J.S. The morphology of normal human bladder urothelium, *J.Anat.*, 167: 103-115, 1989.
 - 59 Gardiner,R.A., Seymour,G.J., Lavin,M.F., Strutton,G.M., Gemmell,E. and Hazan,G. Immunohistochemical analysis of the human bladder, *Brit.J.Urol.*, 58: 19-25, 1986.
 - 60 Günther,J.H., Jurczok,A., Wulf,T., Brandau,S., Deinert,I., Jocham,D. and Böhle,A. Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49), *Cancer Res.*, 59: 2834-2837, 1999.
 - 61 Aoki,Y., Shimura,H., Li,H., Mizumoto,K., Date,K. and Tanaka,M. A model of port-site metastases of gallbladder cancer: the influence of peritoneal injury and its repair on abdominal wall metastases, *Surgery*, 125: 553-559, 1999.
 - 62 Reymond,M.A., Wittekind,C., Jung,A., Hohenberger,W., Kirchner,T. and Kockerling,F. The incidence of port-site metastases might be reduced, *Surg.Endosc.*, 11: 902-906, 1997.
 - 63 Paolucci,V., Schaeff,B., Schneider,M. and Gutt,C. Tumor seeding following laparoscopy: international survey, *World J.Surg.*, 23: 989-995, 1999.
 - 64 Bonjer,H.J., Gutt,C.N., Hubens,G., Krahenbuhl,L., Kim,S.H., Bouvy,N.D., Tseng,L.N., Paolucci,V., Whelan,R. and Jacobi,C.A. Port site metastases in laparoscopic surgery. First workshop on experimental laparoscopic surgery, Frankfurt 1997, *Surg.Endosc.*, 12: 1102-1103, 1998.
 - 65 Micali,S., Celia,A., Bove,P., De,S.S., Sighinolfi,M.C., Kavoussi,L.R. and Bianchi,G. Tumor seeding in urological laparoscopy: an international survey, *J.Urol.*, 171: 2151-2154, 2004.
 - 66 Wittich,P., Steyerberg,E.W., Simons,S.H., Marquet,R.L. and Bonjer,H.J. Intraperitoneal tumor growth is influenced by pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum, *Surg.Endosc.*, 14: 817-819, 2000.
 - 67 Wittich,P., Marquet,R.L., Kazemier,G. and Bonjer,H.J. Port-site metastases after CO(2) laparoscopy. Is aerosolization of tumor cells a pivotal factor?, *Surg.Endosc.*, 14: 189-192, 2000.

- 68 Cook,T.A. and Dehn,T.C. Port-site metastases in patients undergoing laparoscopy for gastrointestinal malignancy, *Br.J.Surg.*, 83: 1419-1420, 1996.
- 69 Gutt,C.N., Kim,Z.G., Schmandra,T., Paolucci,V. and Lorenz,M. Carbon dioxide pneumoperitoneum is associated with increased liver metastases in a rat model, *Surgery*, 127: 566-570, 2000.
- 70 Paolucci,V., Gutt,C.N., Schaeff,B. and Encke,A. Gasless laparoscopy in abdominal surgery, *Surg.Endosc.*, 9: 497-500, 1995.
- 71 Tseng,L.N., Berends,F.J., Wittich,P., Bouvy,N.D., Marquet,R.L., Kazemier,G. and Bonjer,H.J. Port-site metastases. Impact of local tissue trauma and gas leakage, *Surg.Endosc.*, 12: 1377-1380, 1998.
- 72 Volz,J., Koster,S., Schaeff,B. and Paolucci,V. Laparoscopic surgery: the effects of insufflation gas on tumor-induced lethality in nude mice, *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 178: 793-795, 1998.
- 73 Fenn,N.J. and Gill,I.S. The expanding indications for laparoscopic radical nephrectomy, *BJU.Int.*, 94: 761-765, 2004.
- 74 Otani,M., Irie,S. and Tsuji,Y. Port site metastasis after laparoscopic nephrectomy: unsuspected transitional cell carcinoma within a tuberculous atrophic kidney, *J.Urol.*, 162: 486-487, 1999.
- 75 Tsivian,A. and Sidi,A.A. Port site metastases in urological laparoscopic surgery, *J.Urol.*, 169: 1213-1218, 2003.
- 76 Stolla,V., Rossi,D., Bladou,F., Rattier,C., Ayuso,D. and Serment,G. Subcutaneous metastases after coelioscopic lymphadenectomy for vesical urothelial carcinoma, *Eur.Urol.*, 26: 342-343, 1994.
- 77 Ahmed,I., Shaikh,N.A. and Kapadia,C.R. Track recurrence of renal pelvic transitional cell carcinoma after laparoscopic nephrectomy, *Br.J.Urol.*, 81: 319, 1998.
- 78 Neuhaus,S.J., Watson,D.I., Ellis,T., Rofe,A.M. and Jamieson,G.G. Influence of cytotoxic agents on intraperitoneal tumor implantation after laparoscopy, *Dis.Colon Rectum*, 42: 10-15, 1999.
- 79 Witjes,J.A., Wullink,M., Oosterhof,G.O. and de,M.P. Toxicity and results of MVAC (methotrexate, vinblastine, adriamycin and cisplatin) chemotherapy in advanced urothelial carcinoma, *Eur.Urol.*, 31: 414-419, 1997.
- 80 Soling,A., Simm,A. and Rainov,N. Intracellular localization of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase fused to different fluorescent proteins depends on choice of fluorescent tag, *FEBS Lett.*, 527: 153-158, 2002.
- 81 Massoud,T.F., Paulmurugan,R. and Gambhir,S.S. Molecular imaging of homodimeric protein-protein interactions in living subjects, *FASEB J.*, 18: 1105-1107, 2004.
- 82 Summerhayes,I.C. and Franks,L.M. Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder, *J.Natl.Cancer Inst.*, 62: 1017-1023, 1979.
- 83 Abou-Zeid,C., Ratliff,T.L., Wiker,H.G., Harboe,M., Bennedsen,J. and Rook,G.A.W. Characterization of fibronectin-binding antigens released by mycobacterium tuberculosis and mycobacterium bovis BCG, *Infect.Immun.*, 56: 3046-3051, 1988.
- 84 Jurczok,A., Günther,J.H., Durek,C., Wulf,T., Brandau,S., Jocham,D. and Böhle,A. Optimierung des orthotopen murinen Harnblasenkarzinom-Modells und Einsatz zur Unterstützung der intravesikalen Bacillus Calmette-Guérin Immuntherapie, *Akt Urol*, 31: 424-430, 2000.

- 85 Suematsu,T., Shiromizu,A., Yamaguchi,K., Shiraishi,N., Adachi,Y. and Kitano,S. Convenient murine pneumoperitoneal model for the study of laparoscopic cancer surgery, *Surg.Laparosc.Endosc.Percutan.Tech.*, 9: 279-281, 1999.
- 86 Eggermont,A.M. and Sugarbaker,P.H. Efficacy of chemoimmunotherapy with cyclophosphamide, interleukin-2 and lymphokine activated killer cells in an intraperitoneal murine tumour model, *Br.J.Cancer*, 58: 410-414, 1988.
- 87 Bohle,A., Jurczok,A., Ardelt,P., Wulf,T., Ulmer,A.J., Jocham,D. and Brandau,S. Inhibition of bladder carcinoma cell adhesion by oligopeptide combinations in vitro and in vivo, *J.Urol.*, 167: 357-363, 2002.
- 88 Swerdlow,R.D., Ratliff,T.L., Regina,M.L., Ritchey,J.K. and Ebert,R.F. Immunotherapy with keyhole limpet hemocyanin: efficacy and safety in the MB-49 intravesical murine bladder tumor model, *J.Urol.*, 151: 1718-1722, 1994.
- 89 Chin,J.L., Kadhim,S.A., Batislam,E., Karlik,S.J., Garcia,B.M., Nickel,J.C. and Morales,A. Mycobacterium cell wall: an alternative to intravesical Bacillus Calmette Guerin (BCG) therapy in orthotopic murine bladder cancer, *J.Urol.*, 156: 1189-1193, 1996.
- 90 Mizutani,Y., Nio,Y., Fukumoto,M. and Yoshida,O. Enhanced antitumor effect of Bacillus Calmette-Guerin in combination with fibrinogen on urinary bladder tumor, *J.Urol.*, 151: 1420-1426, 1994.
- 91 Ratliff,T.L., Hudson,M.A. and Catalona,W.J. Strategy for improving therapy of superficial bladder cancer, *World J.Urol.*, 9: 95-98, 1991.
- 92 Nseyo,U.O. and Lamm,D.L. Therapy of superficial bladder cancer, *Curr.Opinion Urol.*, 4: 275-280, 1994.
- 93 Prescott,S., James,K., Hargreave,T.B., Chisholm,G.D. and Smyth,J.F. Intravesical Evans strain BCG therapy: Quantitative immunohistochemical analysis of the immune response within the bladder wall, *J.Urol.*, 147: 1636-1642, 1992.
- 94 Böhle,A., Balck,F., von Wietersheim,J. and Jocham,D. The quality of life during intravesical Bacillus Calmette-Guérin therapy, *J.Urol.*, 155: 1221-1226, 1996.
- 95 Böhle,A., Gerdes,J., Ulmer,A.J., Hofstetter,A.G. and Flad,H.-D. Effects of local bacillus Calmette-Guérin therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall, *J.Urol.*, 144: 53-58, 1990.
- 96 Böhle,A., Thanhäuser,A., Ernst,M., Flad,H.-D., Rüsck-Gerdes,S., Jocham,D. and Ulmer,A.J. Reduction of side-effects of intravesical therapy with Bacillus Calmette-Guérin by Pentoxifylline ? - An in vitro approach, *CID Clin.Infect.Dis.*, 31 (3): 101-105, 2000.
- 97 Diaz-González,F. and Sánchez-Madrid,F. Inhibition of leukocyte adhesion: an alternative mechanism of action for anti-inflammatory drugs, *Immunol Today*, 19: 169-172, 1998.
- 98 Witjes,J.A., van der Meijden,A.P.M., Doesburg,W. and Debruyne,F.M.J. Influence of fibrin clot inhibitors on the efficacy of intravesical Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder cancer. The Dutch Southeast Cooperative Urological Group, *Eur.Urol.*, 23: 366-370, 1993.
- 99 Rao,K.V.N., Detrisac,C.J., Steele,V.E., Hawk,E.T., Kelloff,G.J. and McCormick,D.L. Differential activity of aspirin, ketoprofen and sulindac as cancer chemopreventive agents in the mouse urinary bladder, *Carcinogenesis*, 17: 1435-1438, 1996.
- 100 Sakata,T., Hasegawa,R., Johansson,S.L., Zenser,T.V. and Cohen,S.M. Inhibition by aspirin of N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide initiation and sodium saccharin promotion of urinary bladder carcinogenesis in male F344 rats, *Cancer Res.*, 46: 3903-3906, 1986.

- 101 Ward,A. and Clissold,S.P. Pentoxifylline. A Review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy, *Drugs*, 34: 50-97, 1987.
- 102 Balazs,C. and Erzsebet,K. Immunological aspects of the effect of pentoxifylline (trental) - a brief review, *Acta Microbiol.Immunol.Hung.*, 41: 121-126, 1994.
- 103 Mandell,G.L. Cytokines, phagocytes and pentoxifylline, *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, 25: 20-22, 1995.
- 104 Akaza,H., Iwasaki,A., Ohtani,M., Ikeda,N., Nijjima,K., Toida,I. and Koiso,K. Expression of anti-tumor response. Role of attachment and viability of bacillus Calmette-Guérin to bladder cancer cells, *C*, 72: 558-563, 1993.
- 105 Castro,A.G., Esaguy,N., Macedo,P.M., Aguas,A.P. and Silva,M.T. Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils in vivo and are infested by attracted granulocytes, *Infect.Immun.*, 59: 3009-3014, 1998.
- 106 Launois,P., Maillere,B., Dieye,A., Sarthou,J.L. and Bach,M.A. Human phagocyte oxidative burst activation of BCG, *M. leprae* and atypical mycobacteria: defective activation by *M. leprae* is not reversed by interferon γ , *Cell.Immunol.*, 124: 168-174, 1989.
- 107 Bretton,P.R., Herr,H.W., Kimmel,M., Whitmore,W.F., Jr., Laudone,V.P., Oettgen,H.F. and Fair,W.R. The response of patients with superficial bladder carcinoma to a second course of intravesical bacillus Calmette-Guérin, *J.Urol.*, 143: 710-713, 1990.
- 108 Herr,H.W., Waringer,D.R., Fair,W.F. and Oettgen,H.F. Bacillus Calmette-Guérin therapy for superficial bladder cancer: A 10-year followup, *J.Urol.*, 147: 1020-1023, 1992.
- 109 Schwalb,D.M., Vilweg,J., Herr,H.W., Sogani,P.C., Russo,P., Sheinfeld,J. and Fair,W.R. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) therapy for superficial bladder cancer: 10 year follow-up of a prospective randomized trial, *Journal of Urology*, 149 1993 283A(Abstract)
- 110 Lamm,D.L. Complications of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy, *Urol.Clin.N.Am.*, 19: 565-572, 1992.
- 111 Lamm,D.L., Stogdill,V.D., Stogdill,B.J. and Crispin,R.G. Complications of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in 1278 patients with bladder cancer, *J.Urol.*, 135: 1352-1354, 1986.
- 112 Kesten,S., Title,L., Mullen,B. and Grossman,R. Pulmonary disease following intravesical BCG treatment, *Th*, 45: 709-710, 1990.
- 113 Steg,A., Leleu,C., Debré,B., Boccon-Gibod,L. and Sicard,D. Systemic bacillus Calmette-Guérin infection, 'BCGitis', in patients treated by intravesical BCG therapy for bladder cancer, *Eur.Urol.*, 16: 161-164, 1989.
- 114 Molina,J.M., Rabian,C., D'Agay,M.F. and Modai,J. Hypersensitivity systemic reaction following intravesical bacillus Calmette-Guerin: successful treatment with steroids, *J.Urol.*, 147: 695-697, 1992.
- 115 DeHaven,J.I., Traynelis,C., Riggs,D.R., Ting,E. and Lamm,D.L. Antibiotic and steroid therapy of massive systemic bacillus Calmette-Guérin toxicity, *J.Urol.*, 147: 738-742, 1992.
- 116 Durek,C., Rüscher-Gerdes,S., Jocham,D. and Böhle,A. Interference of modern antibiotics with bacillus Calmette-Guérin (BCG) viability, *Journal of Urology*, 161, No.4 Suppl. 1999 285- --- (Abstract)
- 117 Bering,SE. The role of fluoroquinolones in tuberculosis today. *In: Anonymous* pp. 9-18. 2001.
- 118 Koukol,S.C., DeHaven,J.I., Riggs,D.R. and Lamm,D.L. Drug therapy of bacillus Calmette-Guérin sepsis, *Urol.Res.*, 22: 373-376, 1995.

- 119 Barret,J. Treatment of shock. *In*: L. M. Nyhus (ed.), Philadelphia, 1986.
- 120 Martini,L. Comprehensive Endocrinology. In: (Ed.): The Adrenal Gland. Raven Press. *In*: Anonymous. 332. **James, V.H.T.**: New York, 1980.
- 121 Hansen,C.P. and Mortensen,S. Epididymo-orchitis and Reiter's disease. Two infrequent complications after intravesical Bacillus Calmette Guérin therapy, *Scand.J.Urol.Nephrol.*, 31: 317-318, 1997.
- 122 Zbar,B., Bernstein,I.D. and Rapp,H.J. Suppression of tumor growth at the site of infection with living BCG, *J.Natl.Cancer Inst.*, 46: 831-839, 1971.
- 123 Burnand,K.G., Boyd,P.J.R., Mayo,M.E., Shuttleworth,K.E.D. and Lloyd-Davies,R.W. Single dose intravesical thiotepa as an adjuvant to cystodiathermy in the treatment of transitional cell bladder carcinoma, *Brit.J.Urol.*, 48: 55-59, 1976.
- 124 Pode,D., Alon,Y., Horowitz,A.T., Vlodaysky,I. and Biran,S. The mechanism of human bladder tumor implantation in an in vitro model, *J.Urol.*, 136: 482-486, 1986.
- 125 Boyd,P.J. and Burnand,K.G. Site of bladder-tumour recurrence, *Lancet*, 2: 1290-1292, 1974.
- 126 Halachmi,S., Linn,J.F., Amiel,G.E., Moskovitz,B. and Nativ,O. Urine cytology, tumour markers and bladder cancer, *Br J Urol*, 82 (5): 647-654, 1998.
- 127 Zincke,H., Utz,D.C., Taylor,W.F., Myers,R.P. and Leary,F.J. Influence of thiotepa and doxorubicin instillation at time of transurethral surgical treatment of bladder cancer on tumor recurrence: a prospective randomized double-blind controlled trial, *J Urol*, 129: 505-509, 1983.
- 128 Rajala,P., Liukkonen,T., Raitanen,M., Rintala,E., Kaasinen,E., Heise,M., Lukkarinen,O. and The Finnbladder Group Transurethral resection with perioperative instillation of interferon-(alpha) or epirubicin for the prophylaxis of recurrent primary superficial bladder cancer: a prospective randomized multicenter study - finnbladder III, *J.Urol.*, 161: 1133-1136, 1999.
- 129 Hyacinthe,L.M., Jarrett,T.W., Gordon,C.S., Vaughan,E.D. and Whalen,G.F. Inhibition of bladder tumor cell implantation in cauterized urothelium, without inhibition of healing, by a fibronectin-related peptide (GRGDS), *Ann.Surg.Oncol.*, 2: 450-456, 1995.
- 130 Grossman,H.B., Liebert,M., Wedemeyer,G., Wilson,G. and Flint,A. Fibronectin distribution in normal and malignant urothelium, *J.Urol.*, 143: 418, 1990.
- 131 Humphries,M.J., Olden,K. and Yamada,K.M. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells, *S*, 233: 467-470, 1986.
- 132 Whalen,G.F. and Ingber,D.E. Inhibition of tumor-cell attachment to extracellular matrix as a method for preventing tumor recurrence in a surgical wound, *Ann.Surg.*, 210: 758-764, 1989.
- 133 Litynska,A., Przybylo,M., Pochec,E. and Laidler,P. Adhesion properties of human bladder cell lines with extracellular matrix components: the role of integrins and glycosylation, *Acta Biochim.Pol.*, 49: 643-650, 2002.
- 134 Yamamoto,S., Kaneda,Y., Okada,N., Nakagawa,S., Kubo,K., Inoue,S., Maeda,M., Yamashiro,Y., Kawasaki,K. and Mayumi,T. Antimetastatic effects of synthetic peptides containing the core sequence of the type III connecting segment domain (IIICS) of fibronectin, *Anticancer Drugs*, 5: 424-428, 1994.
- 135 Givant-Horwitz,V., Davidson,B. and Reich,R. Laminin-induced signaling in tumor cells, *Cancer Lett.*, 223: 1-10, 2005.

- 136 Matsuoka,T., Hirakawa,K., Chung,Y.S., Yashiro,M., Nishimura,S., Sawada,T., Saiki,I. and Sowa,M. Adhesion polypeptides are useful for the prevention of peritoneal dissemination of gastric cancer, *Clin.Exp.Metastasis*, *16*: 381-388, 1998.
- 137 Iwamoto,Y., Robey,F.A., Graf,J., Sasaki,M., Kleinman,H.K., Yamada,Y. and Martin,G.R. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation (published erratum appears in *Science* 1988 Jan 15;239(4837):245), *S*, *238*: 1132-1134, 1987.
- 138 Tanaka,M., Gee,J.R., De La,C.J., Rosser,C.J., Zhou,J.H., Benedict,W.F. and Grossman,H.B. Noninvasive detection of bladder cancer in an orthotopic murine model with green fluorescence protein cytology, *J.Urol.*, *170*: 975-978, 2003.
- 139 Nogawa,M., Yuasa,T., Kimura,S., Tanaka,M., Kuroda,J., Sato,K., Yokota,A., Segawa,H., Toda,Y., Kageyama,S., Yoshiki,T., Okada,Y. and Maekawa,T. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer, *J.Clin.Invest.*, *115*: 978-985, 2005.
- 140 Contag,C.H., Contag,P.R., Mullins,J.I., Spilman,S.D., Stevenson,D.K. and Benaron,D.A. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts, *Mol.Microbiol.*, *18*: 593-603, 1995.
- 141 Colin,M., Moritz,S., Schneider,H., Capeau,J., Coutelle,C. and Brahimi-Horn,M.C. Haemoglobin interferes with the ex vivo luciferase luminescence assay: consequence for detection of luciferase reporter gene expression in vivo, *Gene Ther.*, *7*: 1333-1336, 2000.
- 142 Mendel,D.B., Laird,A.D., Xin,X., Louie,S.G., Christensen,J.G., Li,G., Schreck,R.E., Abrams,T.J., Ngai,T.J., Lee,L.B., Murray,L.J., Carver,J., Chan,E., Moss,K.G., Haznedar,J.O., Sukbuntherng,J., Blake,R.A., Sun,L., Tang,C., Miller,T., Shirazian,S., McMahon,G. and Cherrington,J.M. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, *Clin.Cancer Res.*, *9*: 327-337, 2003.
- 143 Bouvy,N.D., Marquet,R.L., Jeekel,H. and Bonjer,H.J. Impact of gas(less) laparoscopy and laparotomy on peritoneal tumor growth and abdominal wall metastases, *Ann.Surg.*, *224*: 694-700, 1996.
- 144 Jacquet,P. and Sugarbaker,P.H. Wound recurrence after laparoscopic colectomy for cancer. New rationale for intraoperative intraperitoneal chemotherapy, *Surg.Endosc.*, *10*: 295-296, 1996.
- 145 Wade,T.P., Comitalo,J.B., Andrus,C.H., Goodwin,M.N., Jr. and Kaminski,D.L. Laparoscopic cancer surgery. Lessons from gallbladder cancer, *Surg.Endosc.*, *8*: 698-701, 1994.
- 146 Fisher,B., Gunduz,N. and Saffer,E.A. Influence of the interval between primary tumor removal and chemotherapy on kinetics and growth of metastases, *Cancer Res.*, *43*: 1488-1492, 1983.

6 Anhang

6.1 Thesen

1. Das orthotope syngene Harnblasenkarzinommodell der Maus ist erfolgreich zur Evaluation von Chemotherapien und intravesikalen Immuntherapieverfahren eingesetzt worden
2. Andere Tiermodelle wie chemische Blasentumorinduktion, Xenograft-Transplantationen und subkutane Implantation von syngenem Blasentumorzellen sind für die Untersuchung insbesondere von Immuntherapieverfahren von untergeordneter Bedeutung.
3. Abgetötetes BCG hat keine antitumorale Aktivität im untersuchten Tiermodell.
4. Das murine orthotope autologe MB-49 Blasentumormodell wurde erfolgreich modifiziert, so dass eine verlässliche Tumorimplantation bei nahezu 100% der Tiere resultiert.
5. Das Modell ist weiterhin sensitiv für lokale Immuntherapieverfahren
6. Acetylsalicylsäure und Pentoxifyllin zeigten keine Beeinträchtigung der intravesikalen BCG-Immuntherapie murinen Harnblasenkarzinommodell.
7. Acetylsalicylsäure und Pentoxifyllin können nach den vorliegenden Untersuchungen als geeignete Adjuvantien angesehen werden, um die BCG-induzierten Nebenwirkungen zu reduzieren.
8. Die BCG-Instillationstherapie hat sich als das effektivste Verfahren zur Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Blasenkarzinoms und zur Therapie des Karzinoma in situ etabliert
9. Begleiterscheinungen während der intravesikalen Instillationstherapie mit BCG sind häufig und führen gelegentlich zum vorzeitigen Abbruch der Therapie.
10. Der Mausstamm C57/BL 6 ist für eine BCG Infektion suszeptibel.
11. Fluorochinolone zeigen nach primärer systemischer BCG-Infektion einen signifikanten therapeutischen Effekt
12. Prednisolon allein aggraviert die primäre BCG-Infektion.
13. Nach BCG Re-Stimulation (hypererge Reaktion) verlängert allein die hochdosierte Prednisolon-Gabe die Überlebenszeit signifikant im untersuchten Modell.
14. In dem untersuchten Modell wurde die Effektivität von BCG zur Behandlung von Blasen-tumoren durch die zusätzliche Gabe von Chinolonen nicht beeinträchtigt
15. Die Inhibition der zellulären Adhäsion durch Verwendung polyvalenter Oligopeptide stellt eine effektive therapeutische Maßnahme zur Verhinderung von Tumorimplantation im untersuchten Modell dar.
16. Im biolumineszenten orthotopen Blasentumormodell verhindert eine zunehmende Tu-morgröße durch Tumornekrose und Ödem die weitere Zunahme der Lichtemission.

17. Im biolumineszenten orthotopen Blasen-tumormodell konnte die Tumorzellimplantation mit Hilfe des BLI zu einem frühen Versuchszeitpunkt und mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden.

18 Die Hemmung der Tumorzelladhäsion durch spezifische Oligopeptidgemische ist eine effektive Methode in der Verhinderung von Portmetastasen im untersuchten Modell.

6.2 Lebenslauf

Name:	Andreas Jurczok
Geburtsdatum:	19.02.1965
Geburtsort:	Bad Segeberg
Wohnung:	Die Mühlbreite 10, 06184 Burgliebenau
Schulbildung:	Grundschule / Freie Waldorfschule / Gymnasium 1971-1984
Wehrdienst:	1984-1985
Studium:	1985-1992 an den Universitäten Freiburg und Lübeck
Promotion:	11.8.1993
Thema:	"Untersuchung zweier Screeningmethoden zur Erfassung von Patienten mit Schlafapnoesyndrom"
Arzt im Praktikum/Assistenzarzt:	01.01.1993 - 31.12.1994 Medizinische Universität zu Lübeck, Klinik für Chirurgie
01.01.1995 - 31.06.1995	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Physiologie der Medizinischen Universität zu Lübeck
01.07.1995 - 30.06.1997:	Assistenzarzt Albert-Ludwig-Universität Freiburg, Klinik für Urologie
01.09.1997	Assistenzarzt medizinische Universität zu Lübeck, Klinik für Urologie
01.03.2002	Assistenzarzt medizinische Universität Halle, Klinik für Urologie
seit 01.11.2002	Oberarzt medizinische Universität Halle, Klinik für Urologie
Wissenschaftliche Projekte:	<ul style="list-style-type: none"> - Induktion einer mucosalen Immunantwort gegen Oberflächenantigene von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> im Tiermodell, - Untersuchung onkologischer Therapiemodalitäten im Blasen-tumormodel MB 49 - Inhibition von Tumorzelladhäsion durch Oligopeptide in urologischen Spüllösungen, Nitzepreis 2000. - Experimentelle Untersuchungen zur Portmetastasierung in der urologischen Laparoskopie - Etablierung eines biolumineszenzgestützten Blasen-tumormodells, (Forschungsförderung NBL3) - Untersuchungen zur Wirkung von Zoledronsäure auf das Urothelkarzinom (Forschungsförderung Norvartis-Oncology)

6.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Habilitationsleistung selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Zugleich erkläre ich, dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Habilitationsverfahren derzeit anhängig ist bzw. jemals anhängig gewesen ist.

Halle, den

Dr. med. Andreas Jurczok

6.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Fornara, für die großzügige Förderung meiner Forschungstätigkeit und meiner urologischen Ausbildung.

Herrn Prof. Dr. A. Böhle verdanke ich die Möglichkeit der Erlernung experimenteller onkologischer Methoden und die Anregung, mich intensiver mit dem Gebiet der tierexperimentellen Krebsforschung zu befassen.

Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. D. Jocham zu großem Dank für dessen umfassende Förderung meiner ersten urologischen Lehrjahre verpflichtet.

Schließlich möchte ich allen Kollegen, wissenschaftlichen Mitarbeitern, Doktoranden und Sekretärinnen der Klinik herzlichst dafür danken, dass sie dazu beigetragen haben, die vorliegende Arbeit zu erstellen.

6.5 Abkürzungen

aBCG	autoklaviertes Bacillus Calmette-Guérin
ASS	Acetylsalicylsäure
BAK-Zellen	BCG-aktivierte Killerzellen
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CFU	colony forming units / koloniebildende Einheiten
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle medium
FKS	fetales Kälberserum
G	Gauge
IE	internationale Einheiten
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LAK-Zellen	lymphokin-aktivierte Killerzellen
MNU	N-methyl-N-Nitrosoharnstoff
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
n.s.	nicht signifikant
PBS	phosphate buffered saline/ phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
POF	Pentoxifyllin
SD	Standardabweichung
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor nodes metastases
TUR	transurethrale Resektion
UICC	Union internationale contre le cancer

Optimizing Syngeneic Orthotopic Murine Bladder Cancer (MB49)¹

Jan H. Günther, Andreas Jurczok, Tina Wulf, Sven Brandau, Irina Deinert, Dieter Jocham, and Andreas Böhle²

Immunotherapy Research Group, Department of Urology, Medical University of Lübeck, D-23538 Lübeck; and Department of Immunology and Cell Biology, Borstel Research Center, D-23845 Borstel, Germany

Abstract

The syngeneic orthotopic murine bladder cancer model MB49 is hampered by unreliable tumor implantation. We optimized this model by a simple modification of the standard implantation technique in three groups of mice. Fifty thousand (group I), 20,000 (group II), or 10,000 (group III) tumor cells were implanted into cauterized bladders by transurethral instillation, and dwell time was prolonged to 3 h. Tumor take, survival, and bladder weights were determined as outcome variables. To verify whether this modification maintained its sensitivity to topical immunotherapy, an initial tumor load of 100,000 MB49 cells was given, and mice were treated intravesically with *Bacillus Calmette-Guérin* or phosphate-buffered saline. The prolonged dwell time of tumor cells resulted in take rates of 100% in all three groups. Survival and bladder weights were significantly correlated with the number of instilled cells. Even with the highest tumor load, *Bacillus Calmette-Guérin* therapy improved survival and reduced bladder weights significantly, as compared to PBS. Thus, the modified model is highly reliable and maintains its susceptibility to topical immunotherapy.

Introduction

Animal models of bladder cancer allow the investigation of aspects of bladder cancer that cannot be studied under clinical conditions, such as evaluation of new chemotherapeutic or immunotherapeutic agents, drug regimens, or other modalities of treatment. Animal models of bladder cancer can also give further insight in basic mechanisms of tumor growth and spread. Currently, three are fundamental murine bladder tumor models: chemically induced bladder cancer (1, 2), the xenograft model (transplantation of human transitional cell carcinoma into immunodeficient mice; Refs. 3–5), and the syngeneic tumor model (transplantation of carcinogen-induced bladder cancer in syngeneic, immunocompetent mice; Refs. 6–9). For the evaluation of immunotherapeutic approaches, the syngeneic murine bladder tumor model seems to be the most appropriate model because of the chance to study the local tumor in an immunocompetent host, which is an absolute necessity for reliable data. Syngeneic tumor cells can be implanted either s.c. (heterotopic tumor) or intravesically (orthotopic). Orthotopic tumor implantation is more difficult; however, the possibility of investigating tumor growth and therapeutic effects in the native organ, where hormonal or immunological processes more closely resemble the clinical situation, making experimental results more reliable, makes this method more attractive. Successful tumor cell implantation of syngeneic MB49 cells, which is the basic principle of the orthotopic bladder tumor model, fails in ~25% of the animals (8–11). Low tumor take rates impair the evaluation of experimental results and lead to higher numbers of animals in the experimental groups. To solve this problem, we developed a modification of

the tumor implantation technique. We hypothesized that a short retention time of instilled cells was a reason for unreliable tumor implantation and tried to increase tumor take rates by prolonging dwell time. Because the orthotopic model is frequently used in the evaluation of intravesical immunotherapy, we confirmed the sensitivity of the modified model to topical BCG³ immunotherapy using an unusually high tumor load.

Materials and Methods

Animals. Sixty 6–8-week-old female C57/BL6 mice, each weighing ~17 g, were purchased from Charles River (Sulzfeld, Germany) and maintained at our animal care facility for 1 week prior to use. The mice were housed five per cage in a limited access area at a room temperature of $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and a humidity of $50 \pm 10\%$, with food and water *ad libitum*. All experiments were approved by the Ministry of Environment, Nature and Forestry of Schleswig-Holstein, Germany.

Tumor. Tumor cells used in this study were derived from the 7,12-dimethylbenzanthracene-induced murine bladder cancer MB49 (12). The cells were maintained in *in vitro* culture (DMEM, 10% FCS, and 1% penicillin/streptomycin at 37°C and 5% CO_2). Tumor cells were harvested by trypsinization and suspended in DMEM without L-glutamine, FCS, and antibiotics. Viability was determined by trypan blue exclusion, and only tumor cell suspensions with >90% viable cells were used for tumor implantation. The concentrations of the tumor cell suspensions that we used for implantation were adjusted to 10^6 , 4×10^5 , and 2×10^5 cells/ml for groups I, II, and III (see below), respectively, in the first experiment and to 2×10^6 cells/ml in the second set of experiments.

Tumor Implantation. Intravesical tumor implantation was performed according to a modification of the methods described by Soloway and Masters (8, 13) and Shapiro *et al.* (14) for the MBT-2 model and by Hudson *et al.* (7) for the MB49 model. Briefly, after a short ether inhalation anesthesia, the mice received an i.p. injection of diluted sodium pentobarbital (6 mg/ml) for general anesthesia of a single dose of 0.06 mg/g body weight. After shaving areas of ~1 cm² on the backs of the mice, we inserted a 24-gauge Teflon i.v. catheter (Insyte-W; Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) transurethraly into the bladder using a lubricant (Instilla Gel; Farco-Pharma, Köln, Germany). Mice were placed with their backs on the ground plate of the cautery unit. To optimize contact, we used electrocardiogram electrode contact gel. The soft-tipped end of a spring-wire guide of a 24-gauge central venous catheter (Arrow, Erding, Germany) was inserted into the bladder via the Teflon catheter and gently pushed forward until it reached the bladder wall. The guide wire was attached to the cautery unit (Elektrotrom 500; Gebrüder Martin, Tuttlingen, Germany), and a monopolar coagulation was applied for 5 s at the lowest setting (5 W). After removal of the guide wire, 0.05 ml of the tumor cell suspension was instilled. Unlike the conventional procedure, in which catheters are removed after instillation, the catheters were pinched off with a clamp, kept locked with a Luer-Lock closing cone, and left in place until the mice awakened. Using this method, we ensured a dwell time of ~3 h. In contrast to others (1, 8, 14), we used DMEM as solvent for instilled tumor cells as a means for improving viability.

Drugs. For intravesical immunotherapy, lyophilized BCG strain Connaught strain was kindly provided by Cytochemia (Ihringen, Germany). Each vial contained 81 mg of lyophilized BCG Connaught with at least 1.8×10^8

Received 3/1/99; accepted 4/28/99.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant SFB 367, project C7-Böhle).

² To whom requests for reprints should be addressed, at Immunotherapy Research Group, Department of Urology, Medical University of Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck, Germany. Phone: 49 451 5006112; Fax: 49 451 5006112.

³ The abbreviation used is: BCG, *Bacillus Calmette-Guérin*.

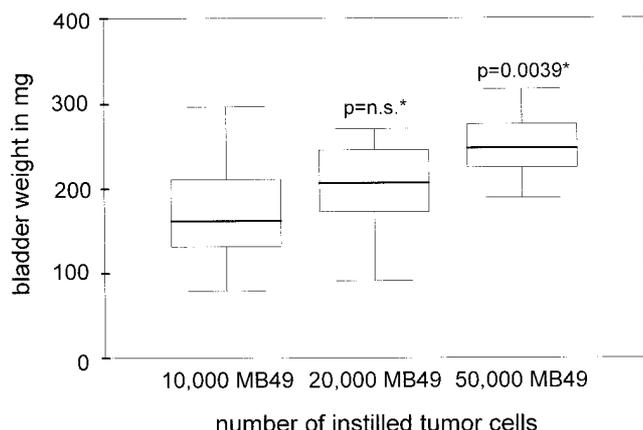


Fig. 1. Effect of number of instilled tumor cells on urinary bladder weight. The distributions of bladder weights are plotted. The upper and lower boundaries of the boxes are the upper and lower quartiles. The length of the box is the interquartile distance, so the box contains 50% of the values falling between the 25th and 75th percentiles in a group. The black line inside the box identifies the group median. The lines extending from each box extend to the smallest and largest observations in a group. *, P s compared to instillation with 10,000 tumor cells, Mann-Whitney U test; *n.s.*, not significant.

colony-forming units. BCG was reconstituted with 3 ml of solvent, according to the manufacturer's recommendation.

Optimization of Intravesical Tumor Implantation. Thirty mice were assigned to three groups, and intravesical bladder tumors were implanted by intravesical instillation of MB49 tumor cells, according to the method described above. Group I mice received 10,000 cells, group II mice received 20,000 cells, and group III mice received 50,000 tumor cells. The animals received no further treatment and were sacrificed after 35 days.

Mice were visited daily to check their viability status and to examine for gross hematuria. Tumor incidence and bladder weights were determined after sacrifice. The presence of intravesical tumors was verified histologically (H&E staining). All animals underwent complete dissection so that manifestations of extravascular tumor growth and pulmonary metastasis could be recorded.

Sensitivity to Intravesical Immunotherapy. Intravesical tumors were implanted into 30 mice using 100,000 tumor cells. The animals were randomized to two groups with 15 animals each: PBS control and BCG therapy. Intravesical instillations were performed on days 1, 8, 15, and 22 after tumor implantation by the technique described above. Considering the catheter's death space, the instilled volume was 0.05 ml in both groups. The BCG dose of a single instillation was 1.35 mg (minimum of 3×10^6 colony-forming units). Due to rapid tumor growth, the animals were sacrificed on day 28 and evaluated in the same way as described for the first experiment.

Statistical Analysis. To compare survival, we used the Kaplan-Meier method and the log-rank test. Comparison of bladder weight and body weight was performed with the Mann-Whitney U test. Statistical significance was determined at $P < 0.05$. Results are given in boxplots, in which the upper and lower boundaries of the boxes represent the upper and lower quartiles, respectively. The box length represents the interquartile distance, so the box contains 50% of the values falling between the 25th and 75th percentile of a group. The black line inside the box identifies the group median, whereas the lines extending from each box extend to the smallest and largest observations in the groups. To compare tumor take rates, the χ^2 test was used. For statistical analysis we used SPSS for Microsoft Windows.

Results

Optimization of Intravesical Tumor Implantation

General Findings. Using a cautious implantation technique, as described above, we observed no transmural bladder injury or bladder perforation. All animals with intravesical tumors showed gross hematuria before day 16. No significant differences with regard to the first onset of hematuria were found (day 12 ± 3). The average body weight of the mice increased from 16.0 g on day 1 to 19.3 g on day 18. Beyond day 18, the animals' body weights decreased. No significant

differences were seen between these groups. Gross internal organ examination revealed pulmonary metastasis in 20, 30, and 70% of the mice instilled with 10,000 (group I), 20,000 (group II), and 50,000 (group III) tumor cells, respectively (group I *versus* group III and group II *versus* group III; each $P < 0.05$, χ^2 test). One group II mouse and two group III mice showed pyelonephritis. Upper urinary tract tumor growth in the kidney could be demonstrated in one animal from group III.

Tumor Outgrowth. All mice developed intravesical tumors, indicating a tumor take rate of 100%, independent of the number of instilled tumor cells.

Bladder Weight. A correlation between number of instilled tumor cells and bladder weight was found. Mice receiving 50,000 MB49 cells had the highest average bladder weight (251.6 ± 39.0 mg), whereas mice instilled with 20,000 and 10,000 tumor cells had average bladder weights of 202 ± 54.2 and 172 ± 61.9 mg, respectively ($P = 0.04$ and 0.0039 , respectively, Mann-Whitney U test; Fig. 1).

Survival. Upon termination of the experiment 35 days after tumor implantation, no group III mouse was alive, whereas three group II mice and six group I mice were still living. The Kaplan-Meier curve further illustrates survival as a function of initial tumor load. Instillation with 50,000 tumor cells led to a mean survival of 25.9 days, whereas animals receiving 20,000 and 10,000 cells had significantly longer mean survivals of 30.0 and 32.9 days ($P = 0.04$ and $P = 0.0006$, log-rank test; Fig. 2), respectively.

Sensitivity to Intravesical Immunotherapy

The second set of experiments was initiated to verify that the modified model maintained its well-known sensitivity to immunotherapy.

General Findings. Gross hematuria was demonstrable before day 8 in 90% of the animals. The average body weight of all mice increased from 17.6 g on day 1 up to 18.9 g on day 12, and a reduction of body weight was observed thereafter. No significant differences were seen between the PBS and BCG therapy groups.

We found pulmonary metastases in 66.6% of the mice receiving PBS and 53.3% of the mice treated with BCG (not significant, χ^2 test). Two mice of the PBS and one mouse of the BCG group had hydro-nephrosis due to extensive intravesical tumor growth. Two mice in each group suffered from suppurative pyelonephritis, which is most probably due to ascending urinary infection.

Tumor Outgrowth. Mice receiving PBS instillations had a tumor take rate of 100%, whereas the animals treated with BCG had tumor outgrowth in 93.3% (not significant, χ^2 test).

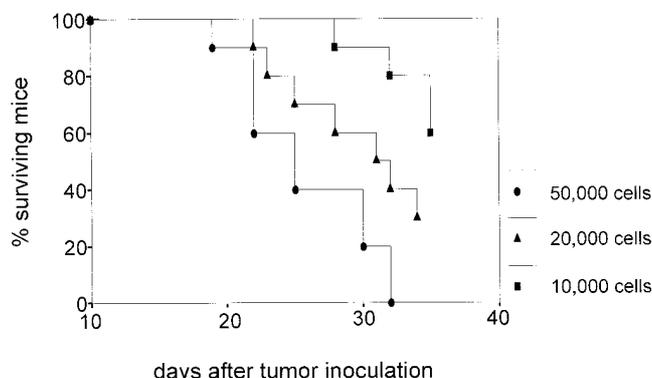


Fig. 2. Kaplan-Meier analysis of murine survival after instillation of different number of MB49 bladder tumor cells. The experiment was terminated at day 35 (10,000 *versus* 50,000 cells, $P = 0.0006$; 20,000 *versus* 50,000 cells, $P = 0.04$, log-rank test).

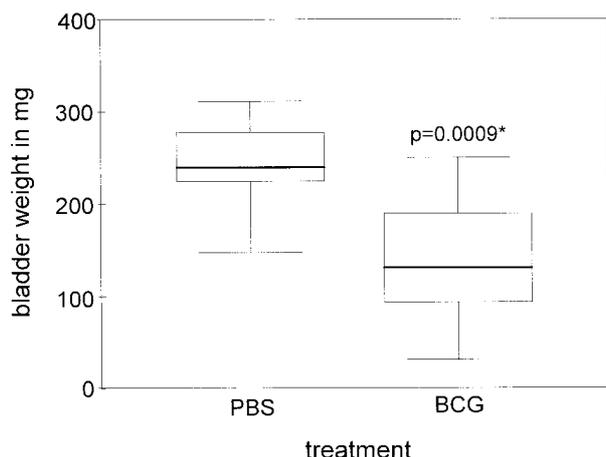


Fig. 3. Effect of intravesical BCG immunotherapy on urinary bladder weights. The distributions of bladder weights are plotted. The upper and lower boundaries of the boxes are the upper and lower quartiles. The length of the box is the interquartile distance, so the box contains 50% of the values falling between the 25th and 75th percentiles in a group. The black line inside the box identifies the group median. The lines extending from each box extend to the smallest and largest observations in a group. *, P compared to PBS treatment, Mann-Whitney- U test.

Effect of BCG Instillations on Average Bladder Weight. The animals of the control group receiving PBS instillations had an average bladder weight of 248 mg. Weekly BCG instillations reduced average bladder weight to 140 mg ($P = 0.0009$, Mann-Whitney U test; Fig. 3).

Effect of BCG Instillations on Survival. Mice treated with BCG showed significantly longer survival as compared to mice receiving PBS (25.7 versus 20.8 days). On day 28, the experiment was terminated due to rapid tumor growth. Ten of 15 mice treated with BCG were alive, whereas only 2 animals of the control group had survived. Kaplan-Meier analysis and log-rank test revealed a significant prolongation of survival in BCG-treated mice ($P = 0.005$, log-rank; Fig. 4).

Discussion

Several animal models of bladder cancer, such as chemically induced bladder cancer (1, 2), the xenograft model (3–5) and s.c. implantation of syngeneic bladder tumor cells, have been used in experimental oncology. For investigation of immunotherapeutic approaches, these tumor models should not be considered. The immunodeficient nude mice used in the xenograft model, for example, are compromised in their ability to develop an adequate immune reaction to an immunological stimulus. Furthermore, the interpretation of experiments using s.c. implanted syngeneic bladder tumors is limited because of different tissue-specific factors. The orthotopic syngeneic bladder tumor model has been successfully used for evaluation of efficacy of intravesical BCG (10, 11), keyhole limpet hemocyanin (15), and chemotherapeutics (11) and for elucidation of the mode of action of intravesical BCG (6, 7). Since the first description of basic features of intravesical tumor implantation by Soloway (8), the orthotopic murine bladder tumor model has undergone several modifications. The common principle behind all modifications is the transurethral intravesical instillation of tumor cells after catheterization and traumatization of the bladder. Tumor cell lines, mice strain, number of instilled tumor cells, technique of bladder traumatization, and response variables are different, however. Currently, the MB49 bladder tumor implanted in C57/BL6 mice and the MBT-2 tumor implanted in C3H/He mice are used for orthotopic tumor implantation. The amount of instilled cells varies from 10^4 cells (7) to 5×10^5 cells (9) using the MBT-2 model. In the MB49 tumor model, the number of instilled

cells is usually smaller and varies between 10^4 and 10^5 cells (7, 16). Shapiro *et al.* (14) investigated the dose response of tumor implantation in the MBT-2 model and found a maximum tumor take of $>90\%$ after instillation of 10^6 tumor cells, whereas instillation with 2.5×10^5 cells led to a take rate of 30%. Therefore, a high number of instilled tumor cells alone cannot guarantee high tumor take rates. Several authors achieved take rates of $\sim 70\%$, even after instillation of 5×10^5 MBT-2 cells (9–11). Such low tumor take rates can compromise the evaluation of experimental results and may increase the number of animals needed for investigation.

Successful tumor implantation is also dependent on adequate traumatization of bladder surface. Instillation of tumor cells in a nontraumatized bladder induces intravesical tumor growth in $<10\%$ of the instilled animals (17). Traumatization of the bladder surface is usually performed with electrocautery after catheterization and transurethral insertion of the cautery wire (7, 10, 15). Traumatization is also achieved by instillations of *N*-methyl-*N*-nitrosourea (8) or hydrochloric acid (18).

Tumor outgrowth, detected by abdominal palpation, tumor take rate, and bladder weight, are the most common used response variables in this tumor model (7, 10, 15). We do not consider mere bladder palpation and tumor take rate to be reliable parameters for assessing treatment effects on tumor growth. Only large tumors (>200 mg) were clearly detectable by abdominal palpation. Using the tumor take as a response variable may give inadequate results because a reduced take rate in one group may be the result of successful treatment or may simply reflect failure of tumor implantation. To overcome these difficulties, other authors tried to monitor intravesical tumor growth and treatment effects by imaging methods like transrectal ultrasound (16) or magnetic resonance (18, 19). These methods proved to be a suitable means for monitoring intravesical tumor growth, but each imaging procedure required anesthesia and catheterization. Almost 20% of the animals died prior to the completion of the treatment protocol due to procedural mishaps (18, 19). Apart from this, imaging methods, especially magnetic resonance imaging, are expensive. Recently a new, invasive technique of intravesical tumor implantation was described, which uses direct submucosal injection of tumor cells after exposing the bladder by a low midline incision. This technique enables tumor take rates of 100% but requires an open surgical procedure and postoperative antibiotic treatment (20). The use of antibiotics might further impair the efficacy of immunotherapies such as BCG.

In our study, we used a different approach and tried to achieve a maximum tumor take rate by a simple modification of the “tradition-

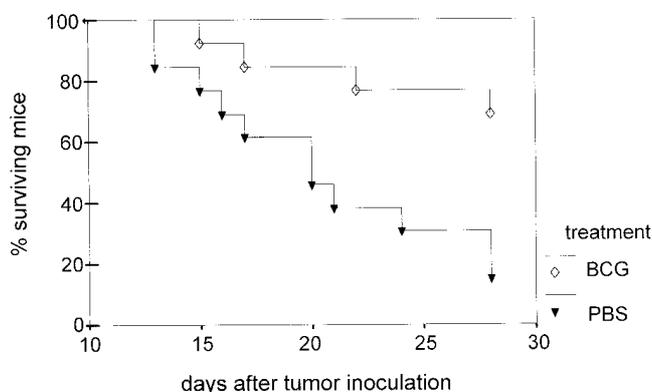


Fig. 4. Kaplan-Meier analysis of murine survival after intravesical BCG immunotherapy. Mice received four intravesical instillation treatments with BCG. The control group received four PBS instillations. The experiment was terminated at day 28 due to rapid tumor growth. $P = 0.005$, log-rank test.

al" procedure. We hypothesized that a prolonged contact time of instilled tumor cells and bladder wall may increase tumor take. This was achieved by leaving locked catheters in the animals' bladder until the animal awakened. Efflux of tumor cells or premature bladder evacuation by voiding could be prevented for ~3 h. We evaluated the response variables survival and bladder weight determined after dissection to describe the treatment effects on existing intravesical tumors.

In our first set of experiments, we investigated whether tumor take was dependent on number of instilled cells or on dwell time. Instillation of 50,000, 20,000, and 10,000 tumor cells each led to tumor take rates of 100%, showing clearly that dwell time was the relevant variable for successful tumor take. On the other hand, the course of the malignant disease was significantly influenced by the number of instilled cells because survival, bladder weight, and rate of pulmonary metastasis were dependent on the number of instilled tumor cells. This opens the possibility of "tailoring" the model to the requirements of different therapeutic approaches. The time slot for therapeutic intervention and the aggressiveness of the disease might be influenced by instillation of different number of tumor cells.

The efficacy of intravesical BCG in murine bladder cancer has been demonstrated in several investigations (8, 10, 11). To confirm that our modified tumor model is still sensitive to BCG, we performed a further set of experiments, using a very high number of tumor cells for instillation. We confirmed the sensitivity of the modified model to intravesical BCG immunotherapy using average bladder weight and survival as response variables. As expected, we saw a rapid progression of tumor growth, indicated by early onset of gross hematuria and early begin of weight loss and death of >85% of the animals of the control group within the observation period. Even with this aggressive course of disease, BCG immunotherapy significantly reduced average bladder weights and could prolong survival as compared to control. Therefore, with these experimental settings, BCG therapy clearly interferes with survival and bladder weight but not with tumor implantation. Our modification is easy to handle and does not need imaging methods or open surgical tumor implantation. Furthermore, the response variables survival and bladder weight are easily determined. Finally, reliably inducing tumor take rates of 100% certainly contributes to a significant reduction in the number of animals per group needed for statistical reliability.

We conclude that our modification is a simple, cheap, and useful method to improve the orthotopic murine bladder cancer model.

Acknowledgments

The helpful cooperation of L. de Boer, D. Schamhart, and B. Molenaar, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands, is gratefully acknowledged.

References

- Soloway, M. S. Single and combination chemotherapy for primary murine bladder cancer. *Cancer (Phila.)*, *36*: 333–340, 1975.
- Williams, P. D., and Murphy, G. P. Experimental bladder tumor induction, propagation and therapy. *Urology*, *8*: 39–42, 1976.
- Hubbell, H. R., Kvalnes-Krick, K., and Carter, W. G. Antiproliferative and immunomodulatory actions of β -interferon and double-stranded RNA, individually and in combination, on human bladder tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res.*, *45*: 2481–2486, 1985.
- Huland, H., Otto, U., and von Paleske, A. Chemotherapy and human bladder carcinoma transplanted into NMRI *nu/nu* mice. *J. Urol.*, *134*: 601–606, 1985.
- Russell, P. J., Raghavan, D., Gregory, P., Philips, J., Wills, E. J., Jelbart, M., Wass, J., Zbroja, R. A., and Vincent, P. C. Bladder cancer xenografts: a model of tumor cell heterogeneity. *Cancer Res.*, *46*: 2035–2040, 1986.
- Ratliff, T. L., Gillen, D. P., and Catalona, W. J. Requirement of a thymus-dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity. *J. Urol.*, *137*: 155–158, 1987.
- Hudson, M. A., Ritchey, J. K., Catalona, W. J., Brown, E. J., and Ratliff, T. L. Comparison of the fibronectin-binding ability and antitumor efficacy of various mycobacteria. *Cancer Res.*, *50*: 3843–3847, 1990.
- Soloway, M. Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer. *Cancer Res.*, *37*: 2918–2929, 1977.
- Lee, K-E., Weiss, G. H., O'Donnell, R. W., and Cockett, A. T. K. Reduction of bladder cancer growth in mice treated with intravesical *Bacillus Calmette-Guérin* and systemic interleukin 2. *J. Urol.*, *137*: 1270–1273, 1987.
- Shapiro, A., Ratliff, T. L., Oakley, D. M., and Catalona, W. J. Reduction of bladder tumor growth in mice treated with intravesical *Bacillus Calmette-Guérin* and its correlation with *Bacillus Calmette-Guérin* viability and natural killer cell activity. *Cancer Res.*, *43*: 1611–1615, 1983.
- Shapiro, A., Ratliff, T. L., Oakley, D. M., and Catalona, W. J. Comparison of the efficacy of intravesical *Bacillus Calmette-Guérin* with thiotepa, mitomycin C, poly 1:C/poly-L-lysine and cisplatin in murine bladder cancer. *J. Urol.*, *131*: 139–142, 1984.
- Summerhayes, I. C., and Franks, L. M. Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium *in vitro*. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, *62*: 1017–1023, 1979.
- Soloway, M. S., and Masters, S. Urothelial susceptibility to tumor cell implantation. Influence of cauterization. *Cancer (Phila.)*, *46*: 1158–1158, 1980.
- Shapiro, A., Kelley, D. R., Oakley, D. M., Catalona, W. J., and Ratliff, T. L. Technical factors affecting the reproducibility of intravesical mouse bladder tumor implantation during therapy with *Bacillus Calmette-Guérin*. *Cancer Res.*, *44*: 3051–3054, 1984.
- Swerdlow, R. D., Ratliff, T. L., Regina, M. L., Ritchey, J. K., and Ebert, R. F. Immunotherapy with keyhole limpet hemocyanin: efficacy and safety in the MB-49 intravesical murine bladder tumor model. *J. Urol.*, *151*: 1718–1722, 1994.
- Alexander, A. A., Liu, J. B., McCue, P., Gomella, L. G., Ross, R. P., and Lattime, E. C. Intravesical growth of murine bladder tumors assessed by transrectal ultrasound. *J. Urol.*, *150*: 525–528, 1993.
- Soloway, M. S., Nissenkorn, I., and McCallum, L. Urothelial susceptibility to tumor cell implantation: comparison of cauterization with *N*-methyl-*N*-nitrosourea. *Urology*, *21*: 159–161, 1983.
- Chin, J. L., Kadhim, S. A., Batislam, E., Karlik, S. J., Garcia, B. M., Nickel, J. C., and Morales, A. *Mycobacterium* cell wall: an alternative to intravesical *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) therapy in orthotopic murine bladder cancer. *J. Urol.*, *156*: 1189–1193, 1996.
- Chin, J., Kadhim, S., Garcia, B., Kim, Y. S., and Karlik, S. Magnetic resonance imaging for detecting and treatment monitoring of orthotopic murine bladder tumor implants. *J. Urol.*, *145*: 1297–1301, 1991.
- Jiang, F., and Zhou, X-M. A model of orthotopic murine bladder (MBT-2) tumor implants. *Urol. Res.*, *25*: 179–182, 1997.

A. Jurczok¹
M. Zacharias¹
A. Böhle²
P. Fornara¹
D. Jocham³

Experimentelle Untersuchungen zur optimalen Therapie der systemischen BCG-Infektion in vivo

Experimental Investigations of the Optimal Therapy of Systemic BCG Infection in Vivo

Zusammenfassung

Fragestellung: Als seltene Folge einer intravesikalen BCG-Gabe sind systemische Infektionen und Hypersensitivitätsreaktionen beschrieben worden. Wir überprüften zur Erweiterung der Therapieoptionen bei schweren BCG-Infektionen die Wirkung von Chinolonen und Steroiden im murinen Tiermodell der akuten und der sekundären BCG-Infektion. Da die Viabilität der Mykobakterien für den Therapieerfolg von BCG essentiell ist, wurde weiterhin der Einfluss der antibiotischen Therapie auf die antitumorale Wirksamkeit von BCG beim orthotopen Blasen-tumor unter begleitender Therapie mit Chinolonen und Steroiden überprüft. **Material und Methode:** Es wurden nach systemischer BCG-Infektion Chinolone bzw. Trimethoprim/Sulfametoxazol (TMS) als Monotherapie oder in Kombination mit einem Steroid oral appliziert. Um den Einfluss der hyperergen Komponente herauszuarbeiten, erfolgte nach primärer systemischer BCG-Infektion eine Re-Stimulation nach 7 Tagen und eine Antibiotikatherapie mit oder ohne Steroiden. Im orthotopen murinen Blasen-tumormodell erfolgte eine intravesikale Tumorthherapie mit BCG bei gleichzeitiger Antibiotikatherapie. **Ergebnisse:** Nach Primärinfektion überlebten die mit Chinolonen behandelten Mäuse signifikant länger als Mäuse der Kontrollgruppe, unabhängig von einer Steroid-Gabe. Nach Re-Stimulation mit BCG hatten nur steroidbehandelte Mäuse einen deutlichen Überlebensvorteil. Die intravesikale Therapie mit BCG beim orthotopen Blasen-tumor führte zu einem signifikant verringertem Tumorgewicht im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dieser Effekt wurde durch zusätzliche Gabe von Antibiotika nicht kompromittiert.

Abstract

Purpose: Hematogenous spread of BCG after intravesical instillation against bladder cancer is rare, but may result in systemic infection and hypersensitivity reaction. We investigated fluoroquinolones and steroids in an animal model to improve the therapeutic options in local and systemic BCG infection. Furthermore, we tested the antitumor effectiveness of intravesical BCG with simultaneous application of fluoroquinolones and/or steroids. **Methods:** After systemic BCG infection, experiments were performed with quinolones as antimicrobial agent. Trimethoprim/sulfamethoxazole (TMS) was also tested in comparison to quinolones as a non-specific antimicrobial agent. To evaluate the hyperergic reaction after repeated BCG infection (hypersensitivity model), re-infection was performed seven days after primary infection with accompanying oral antimicrobial therapy with and without steroids. Intravesical tumor therapy was carried out with BCG in orthotopic murine bladder tumor model MB 49 together with simultaneous antimicrobial therapy. **Results:** After primary infection, quinolones led to a significant prolonged survival independent of steroid administration. Steroids alone after primary BCG infection reduced the survival. In contrast to these experiments, only steroid-treated mice had a significant improvement in survival after a second challenge with BCG. Therapeutic efficacy of BCG was not affected by antibacterial therapy with quinolones. Steroids alone induced a significantly increased death rate during intravesical BCG therapy. **Conclusion:** Quinolones have a positive effect on survival in acute systemic BCG infection in mice. Re-infection with BCG led to severe hyperergic

Institutsangaben

¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther Universität Halle/Wittenberg

²Abteilung für Urologie, HELIOS Agnes Karll Krankenhaus, Bad Schwartau

³Klinik und Poliklinik für Urologie, Medizinische Fakultät, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

Korrespondenzadresse

Dr. A. Jurczok · Klinik und Poliklinik für Urologie · Medizinische Fakultät · Martin-Luther Universität Halle/Wittenberg · Ernst Grube Str. 40 · 06112 Halle/Saale
Tel.: + 49-345-5571415 · E-mail: andreas.jurczok@medizin.uni-halle.de

Bibliografie

Aktuel Urol 2004; 35: 1-7 · © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
DOI 10.1055/s-2004-818541
ISSN 0001-7868

Die alleinige Dauergabe von Steroiden während der intravesikalen BCG-Therapie führte zu einer signifikant erhöhten Absterberate durch chronische Immunsuppression. **Schlussfolgerung:** Bei systemischer BCG-Infektion haben Chinolone einen positiven Effekt auf das Überleben der Mäuse. Nach Re-Infektion konnte nur Steroide die Überlebensrate signifikant verbessern, während Antibiotika eine sekundäre Rolle spielen. Klinisch sind somit Chinolon-Antibiotika in der Therapie primärer systemischer BCG-Infektionen nach topischer Applikation als Alternative zu den etablierten Tuberkulostatika anzusehen. Aufgrund der häufig auftretenden akuten hyperergen Komponente bei wiederholter BCG-Gabe ist die Kombinationstherapie mit einem Steroid unbedingt notwendig. Die antitumorale Wirksamkeit der BCG-Therapie wird in unserem Modell durch die zusätzliche Gabe von Chinolonen offensichtlich nicht beeinflusst.

Schlüsselwörter

Immuntherapie · BCG · Antibiotika · Blasenneoplasien

reaction that can only be influenced by steroids. Thus, quinolones can be used in primary systemic BCG infection after topical application as a sufficient alternative to common tuberculostatics. Repeated BCG instillation may lead to hyperergic reaction, making additional administration of steroids essential. In this animal model, therapeutic efficacy of BCG obviously was not affected by additional administration of antimicrobials.

Key words

Immunotherapy · BCG · antibiotics · bladder neoplasms

Einleitung

Das Harnblasenkarzinom ist der fünfthäufigste maligne Tumor beim Mann und der siebthäufigste der Frau mit einem Altersgipfel um das 70-ste Lebensjahr. Die Inzidenz beträgt ca. 17 – 19 pro 100 000 Einwohner und ist mit ca. 2 – 3% aller malignen Tumorerkrankungen der häufigste Tumor der ableitenden Harnwege [28]. In Abhängigkeit vom Tumorstadium und Differenzierungsgrad rezidivieren jedoch ca. 70% nach ausschließlicher transurethraler Resektion, bis zu 25% der Patienten erleiden einen Progress im Sinne eines höheren Tumorstadiums bzw. schlechteren Differenzierungsgrads im Rezidiv [20].

Lediglich primäre monofokale Tumore im Stadium pT_a G1 bedürfen aufgrund der niedrigen Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeit keiner adjuvanten Therapie. Bei allen anderen oberflächlichen Tumoren wird eine intravesikale Rezidivprophylaxe empfohlen. In Deutschland kommen die intravesikale Zytostatika- sowie die intravesikale BCG-Instillation zur Rezidivprophylaxe zum Einsatz, wobei sich die BCG-Instillation zumindest bei Tumoren mit hohem Risikoprofil als das effektivste Verfahren herausgestellt hat [5,12,23]. Die intravesikale BCG-Therapie ist von einer Reihe von Nebenwirkungen kompromittiert z.B. Dysurie, Pollakisurie, Hämaturie und Fieber. Die schwerste, jedoch seltene Komplikation stellt die systemische BCG-Infektion dar. Die Ursache für eine systemische BCG-Infektion nach lokaler BCG-Gabe liegt in einem ungewollten Übertritt von BCG in das venöse System bei entzündlich oder traumatisch verändertem Urothel der Harnblase [6]. Hieraus können langfristig persistierende Infektionen z.B. in der Lunge resultieren [2,4], die insbesondere im höheren Alter lebensbedrohlich werden können.

Nach lokaler Applikation auftretende systemische BCG-Infektionen werden bisher tuberkulostatisch behandelt. Hierzu wird die Kombination Isoniazid (INH), Rifampicin, Ethambutol und Cycloserin als Standard empfohlen [19].

Eine weitere Komponente der BCG-Toxizität ist die hypersensitive Reaktion bis hin zum Schock bei wiederholter BCG-Verabreichung. Über plötzliche hypotensive Krisen, Fieber und einsetzende intravasale disseminierende Gerinnung (DIC) wurde berichtet [21]. In einzelnen Fallberichten konnten diese Erscheinungen mit Hilfe der additiven Gabe von Steroiden (Prednisolon) erfolgreich angegangen werden [21], obgleich allgemein bei der Gabe von Steroiden im Rahmen einer floriden Tbc-Infektion aufgrund der immunsuppressiven Wirkung eher Zurückhaltung empfohlen wird. Hierzu fehlten bisher jedoch notwendige systematische Untersuchungen, die in den nachfolgend berichteten Experimenten durchgeführt wurden.

In In-vitro-Untersuchungen überprüften wir, welche häufig eingesetzten modernen Antibiotika die Viabilität von BCG beeinflussen [9]. Aus diesen Untersuchungen erschien der Einsatz von Fluorchinolonen zur Therapie der systemischen und lokalen Nebenwirkungen nach BCG erfolgversprechend, weshalb wir diese Hypothese im Tierexperiment überprüften [2,9]. Da klinisch die Viabilität von BCG vermutlich essentiell für die therapeutische Effektivität ist, wurde abschließend der Einfluss von Antibiotika auf die Antitumorwirkung im orthotopen Harnblasentumormodell der Maus überprüft. Die gefundenen Erkenntnisse stellen einen wesentlichen Beitrag zur Therapiesicherheit von BCG und zum erfolgreichen Einsatz dieser hochwirksamen Immuntherapie dar.

Material und Methode

Tiere

Verwendet wurden Mäuse vom Stamm C57/bl 6, weiblich, mit einem Körpergewicht von 17 – 20 g. Die Tiere wurden in Polycarbonatkäfigen (Makrolon®) mit einer Größe von 38 × 22 × 15 cm (Typ III) auf Weichholzgranulat (Altromin GmbH, Lage) gehalten. Die Anzahl der Mäuse pro Käfig wurde auf fünf Tiere beschränkt. Die Tiere wurden kontinuierlich mit einer pelletierten Standarddiät für Mäuse (Altromin GmbH, Lage) gefüttert und erhielten

Leitungswasser über Tränkeflaschen. Es bestand eine Raumtemperatur von 19 ± 1 °C, eine relative Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$ und eine Belichtungszyklus von $5^{00} - 17^{30}$.

Gemäß dem Tierschutzgesetz wurden alle tierexperimentellen Untersuchungen vom Ministerium für Umweltschutz, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein, als zuständige Behörde, genehmigt.

BCG

Als BCG-Therapeutikum wurde der Stamm Connaught (Immuncyst®, CytoChemia, Ihringen), das zur Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms und zur Therapie des Carcinoma in situ der Harnblase zugelassen ist, verwandt. Eine Packung enthält eine Ampulle mit 231 mg Trockensubstanz und eine Ampulle mit 3 ml Lösungsmittel. Arzneilich wirksamer Bestandteil sind 81 mg lyophilisiertes BCG vom Stamm Connaught, die am Ende der Laufzeit mindestens $1,8 \times 10^8$ lebende Keime von Bacillus Calmette-Guérin enthalten. 1 mg Lyophilisat enthält demnach mindestens $2,2 \cdot 10^6$ lebende Keime.

Antibiotika

Als antibiotisch wirksame Substanzen fanden Ciprofloxacin und/oder Levofloxacin (Fluorchinolone) sowie als unspezifische Kontrolle Trimethoprim/Sulfametoxazol (TMS) Anwendung. Jede Therapiegruppe wurde mit und ohne Prednisolon (10 mg/kg) behandelt. Antibiotika wurden gelöst und über das Trinkwasser verabreicht. Die tägliche Wasseraufnahme einer Maus lag bei 3 ml bei einem Körpergewicht (KG) von ca. 20 g. Eine Maus von 20 g KG erhielt somit täglich 2 mg Fluorchinolone oder 0,4 mg TMS und/oder 0,2 mg Prednisolon in 3 ml Trinkwasser. Somit wurden 100 mg Fluorchinolone/kg KG, 20 mg TMS/kg KG und 10 mg Prednisolon/kg KG verabreicht, was einer 20-fach höheren Dosierung als bei humaner Anwendung entspricht.

Infektionsmodell

Bestimmung der LD 50: Die Mäuse wurden in vier Gruppen randomisiert. Jede Maus erhielt eine intraperitoneale Injektion von 1 ml BCG-Lösung. Die folgenden Dosierungen von BCG wurden verabreicht: 12,5 mg, 25 mg, 35 mg, 50 mg, 80 mg (1 mg entspricht 6×10^6 colony-forming units). Das Überleben der Mäuse wurde täglich festgestellt.

Systemische primäre BCG-Infektion: 35 mg BCG wurde einmal intraperitoneal verabreicht. Die Therapie mit Antibiotika bzw. Steroiden begann zum Zeitpunkt der BCG-Applikation. Endpunkt der Untersuchung war das Überleben an Tag 19. Alle Tiere wurden seziert und auf Auswirkungen einer systemischen BCG-Infektion untersucht.

Therapie der systemischen primären BCG-Infektion: Die Mäuse wurden in 8 Gruppen (n = 20) randomisiert und erhielten jeweils 35 mg BCG i. p. Jede Gruppe erhielt entweder Monotherapie mit Antibiotika bzw. eine Kombination Antibiotika mit Prednisolon unmittelbar nach erfolgter BCG-Injektion fortlaufend über das Trinkwasser über 19 Tage. Folgende Gruppen wurden behandelt: Kontrolle (Wasser) \pm Prednisolon, Ciprofloxacin 100 mg/kg \pm Prednisolon, Levofloxacin 100 mg/kg \pm Prednisolon, TMS 20 mg/kg \pm Prednisolon (Tab. 1).

Tab.1 Therapie der akuten systemischen BCG-Infektion (35 mg BCG i. p., Gruppen n = 20)

Gr. 1: Kontrolle (Wasser)	Gr. 1a: Kontrolle (Wasser) + Prednisolon
Gr. 2: Levofloxacin (100 mg/kg KG/die)	Gr. 2a: Levofloxacin + Prednisolon
Gr. 3: Ciprofloxacin (100 mg/kg KG/die)	Gr. 3a: Ciprofloxacin + Prednisolon
Gr. 4: Trimethoprim (20 mg/kg KG/die)	Gr. 4a: Trimethoprim + Prednisolon

Tab.2 Therapie der systemischen sekundären BCG-Infektion (35 mg BCG i.p nach primärer Infektion mit 25 mg BCG, Gruppen n = 20)

Gr. 1 Kontrolle (Wasser)	Gr. 1a: Kontrolle (Wasser) + Prednisolon
Gr. 2: Levofloxacin (100 mg/kg KG/die)	Gr. 2a: Levofloxacin + Prednisolon
Gr. 3: Trimethoprim (20 mg/kg KG/die)	Gr. 3a: Trimethoprim + Prednisolon

Systemische sekundäre BCG-Infektion: BCG wurde i. p. zwei mal im Abstand von einer Woche verabreicht. Die primäre Infektion wurde mit 25 mg BCG vorgenommen, die sekundäre Infektion mit 35 mg BCG. Endpunkt der Untersuchung war das Überleben an Tag 19. Alle Tiere wurden seziert und auf Auswirkungen einer systemischen BCG-Infektion untersucht.

Therapie der systemischen sekundären BCG-Infektion: Die Mäuse wurden in 6 Gruppen (n = 20) randomisiert. Zur Untersuchung eines prästimulierten Immunsystems (hypererge Reaktion) erhielten die Tiere primär 25 mg BCG i. p. Nach einer Woche erfolgte die Restimulation mit 35 mg Connaught BCG i. p. Die begleitende Antibiotika-/Steroidtherapie begann mit der Restimulation. Folgende Gruppen wurden behandelt: Kontrolle (Wasser) \pm Prednisolon, Fluorchinolone 100 mg/kg \pm Prednisolon, TMS 20 mg/kg \pm Prednisolon (Tab. 2).

Murines orthotopes Tumormodell

Tumorzellen: Tumorzellen für die intravesikale Tumorthherapie waren die DMBA (7,12-dimethylbenzanthracen)-induzierten Blasenkarzinomzellen MB 49 [25]. Die Zellen wurden in-vitro in DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, bei 37 °C und 5% CO₂ gehalten und propagiert. Die Tumorzellen wurden durch Trypsinierung geerntet und für die jeweiligen Versuche in DMEM ohne Glutamin, FCS oder Antibiotika aufgeschwemmt. Die Viabilität wurde durch Trypanblau-Exklusionstests bestimmt, und nur Tumorzellsuspensionen mit über 90% Viabilität wurden für Tumorimplantationen verwendet. Die Tumorzellsuspension für die Implantation wurde adjustiert auf 2×10^5 Zellen/ml.

Tumorimplantation: Die intravesikale Tumorimplantation wurde wie kürzlich beschrieben, durchgeführt [10]. Unter kurzer Äthernarkose erhielten die Mäuse intraperitoneale Injektionen von verdünntem Natriumpentobarbital in einer Einzeldosis von 0,06 mg/g Körpergewicht. Anschließend wurde ein 24G intravenöser Katheter (Insyte-W®, Becton-Dickinson, Deutschland) transurethral in die Blase eingebracht. Ein Führungsdraht

wurde über den Teflonkatheter in die entleerte Blase eingeführt und eine monopolare Koagulation für 5 Sekunden bei niedrigster Koagulationsstufe (ca. 5 W) eingeschaltet. Nach Entfernung des Führungsdrahtes wurden 0,1 ml der Tumorzellsuspension (2×10^5 Zellen/ml) instilliert, der Katheter verschlossen und zur Verlängerung der Kontaktzeit bis zum Erwachen der Mäuse in situ belassen.

Intravesikale Blasenmorthotherapie mit BCG unter begleitender Antibiotika-/Steroid-Therapie: Zur Überprüfung der weiterbestehenden Wirksamkeit einer intravesikalen BCG-Therapie unter begleitender Therapie mit Antibiotika bzw. Steroiden wurden 40 Mäuse in 5 Gruppen randomisiert. Wir wählten folgende Gruppeneinteilung (n = 8): Gruppe 1: Kontrolle (Tumorstadium ohne Therapie), Gruppe 2: BCG 1,35 mg (1 mg $\rightarrow 6 \times 10^6$ colony-forming units), Gruppe 3: BCG + Fluorchinolone (100 mg/kg KG/die), Gruppe 4: BCG + Trimetoprim (20 mg/kg KG/die), Gruppe 5: BCG + Prednisolon (100 mg/kg KG/die). Die erste BCG-Instillation (1,35 mg BCG in 0,05 ml Lösungsmittel) erfolgte 24 h nach der Blasenmorthotherapie (20 000 Tumorzellen). Die orale Gabe von Antibiotika bzw. Steroiden erfolgte synchron mit der ersten BCG-Instillation.

Statistik

Das Überleben der Mäuse wurde statistisch durch die Kaplan-Meier-Methodik und den log-rank-Test berechnet. Die Analyse des Blasen- und Körpergewichtes wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

Die Resultate wurden Kaplan-Meier-Kurven angegeben. Zur statistischen Analyse wurde das Programm SPSS für Windows verwendet.

Ergebnisse

Bestimmung der LD 50 nach systemischer BCG-Infektion

Bei einer Dosis von 40 mg bzw. 80 mg BCG starben alle Mäuse einen Tag nach der Infektion. 35 mg BCG führte zu einem Überleben von 2 von 5 Mäusen, während jeweils 4 Mäuse in der 12,5 mg und 25 mg Gruppe überlebten. Somit konnten wir die LD50 für 35 mg BCG in einem Untersuchungszeitraum von 7 Tagen ermitteln. Diese Dosis wurde in den weiteren Versuchen eingesetzt.

Therapie der systemischen primären BCG-Infektion

Die Behandlung mit TMS und TMS und Prednisolon zeigte keine Verbesserung des Überlebens (Daten nicht gezeigt). Die Behandlung mit Fluorchinolonen verursachte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit (Abb. 1, $p = 0,041$), zusätzliche Gabe von Prednisolon hatte keinen weiteren Effekt. Die Behandlung mit Steroiden allein (Prednisolon) nach primärer Infektion führte zu einer Aggravierung der Infektion mit verkürzter Überlebenszeit. (Abb. 1, $p = 0,022$).

Therapie der systemischen sekundären BCG-Infektion

Um die Wirkung einer antimikrobiellen Mono-Therapie sowie den möglichen Vorteil einer Kombinationstherapie mit Steroiden bei der hyperergen BCG-Infektion zu überprüfen wurden

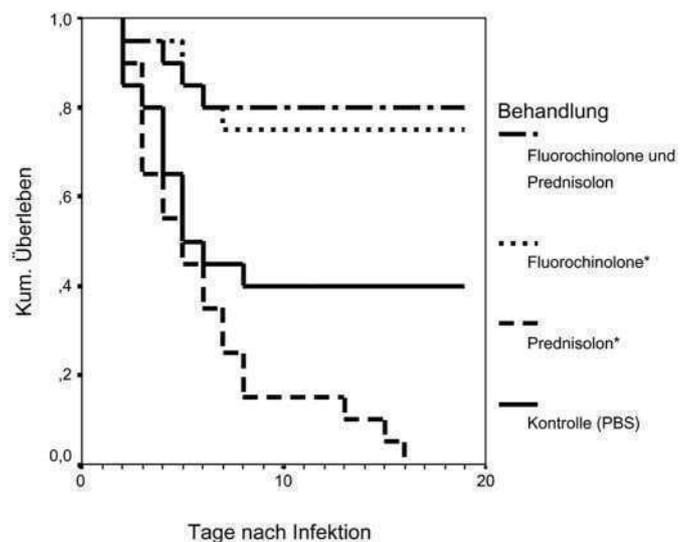


Abb. 1 Überleben der Mäuse nach primärer BCG-Infektion i. p. Fluorchinolone führen zu einer signifikanten Überlebensverlängerung (* $p = 0,041$, log rank). Prednisolon allein führt zu einer verkürzten Überlebenszeit (* $p = 0,022$, log rank).

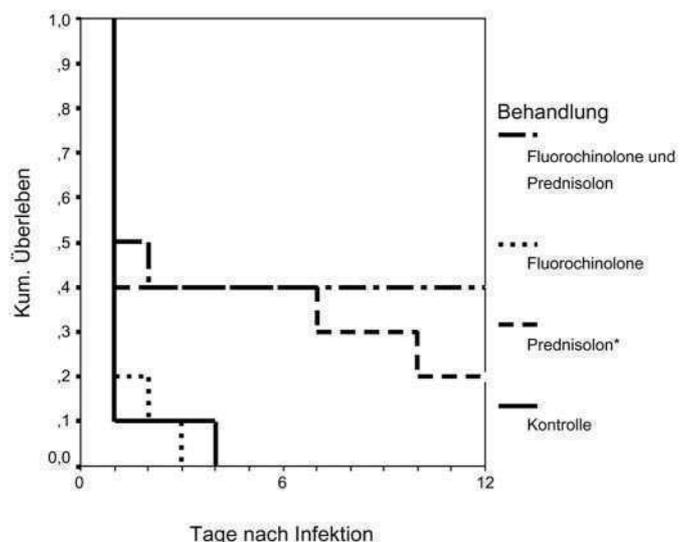


Abb. 2 Überleben der Mäuse nach sekundärer BCG-Infektion i. p. Prednisolon führt zu einer signifikanten Überlebensverlängerung (* $p = 0,0317$, log rank). Fluorchinolone allein ohne signifikanten Effekt.

die Mäuse primär mit einer subletalen Dosis von 25 mg BCG (Connaught) i. p. infiziert. Nach einer Woche erfolgte eine zweite Infektion mit 35 mg BCG (LD 50), welche eine hypererge Reaktion hervorrufen sollte. Die Monotherapie mit Prednisolon nach Restimulation verursachte eine signifikante Verlängerung des Überlebens (Abb. 2, $p = 0,032$), die zusätzliche Behandlung mit einem Antibiotikum hatte keinen signifikanten Effekt.

Intravesikale Blasenmorthotherapie mit BCG unter begleitender Antibiotika-/Steroid-Therapie

Die essentielle Bedeutung der Viabilität von BCG zur Tumorthherapie ist klinisch bekannt. Zum Ausschluss einer inhibitorischen Wirkung der Antibiotika auf den immuntherapeutischen Effekt

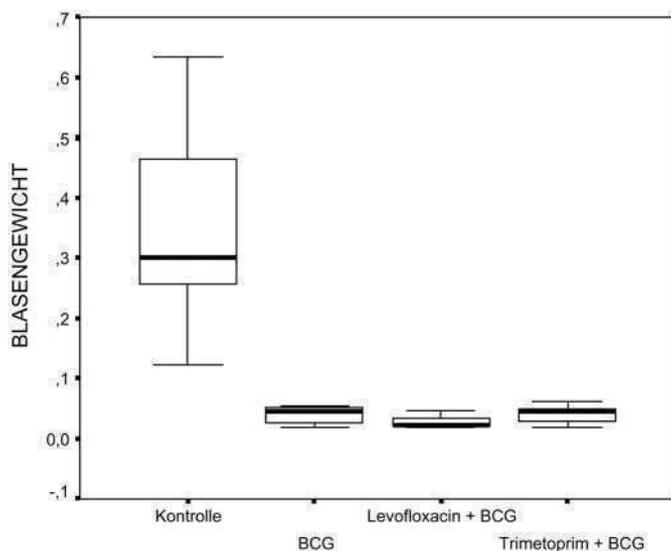


Abb. 3 Signifikant verringertes Blasentumorgewicht nach Blasen-tumorimplantation und BCG-Therapie sowie begleitender Therapie mit Antibiotika nach 28 Tagen ($p = 0,001$, Wilcoxon)

von BCG führten wir eine intravesikale BCG-Therapie bei orthotopen Blasen-tumor unter begleitender Antibiotika-/Steroidtherapie durch. Diese führte in unserem Modell zu einem signifikant verringertem Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne BCG-Therapie ($p = 0,001$) (Abb. 3). Das mittlere Blasengewicht der Kontrollgruppe lag bei 357 mg, das der Therapiegruppe BCG bei 58 mg. Die Therapiegruppe mit BCG-Monotherapie zeigte keinen Unterschied bezüglich des Blasengewichts und des Überlebens im Vergleich zu den zusätzlich mit Antibiotika behandelten Tieren. Die alleinige Gabe von Steroiden während einer intravesikalen BCG-Therapie führte zu einer signifikant erhöhten Absterberate der Tiere mit einem mittleren Überleben von 13,6 Tagen im Vergleich zu den übrigen Gruppen. Das mittlere Überleben der Kontrollgruppe lag bei 22,3 Tagen ($p = 0,001$). Der Vergleich des Blasengewichtes dieser Gruppe war aufgrund der verkürzten Überlebenszeit nicht aussagekräftig und wurde deshalb nicht dargestellt.

Post mortem Untersuchung: Die Autopsie der Tiere zeigte normale Verhältnisse bei Herz und Lunge, keine intraperitonealen Hämorrhagien. Diese Beobachtung konnte in allen Gruppen gemacht werden. Alle Mäuse hatten normale Leber und Nieren, keine Lymphadenopathie im Mesenterialbereich, ein vergrößertes, gasgefülltes Kolon und eine Splenomegalie.

Diskussion

Die BCG-Instillationstherapie hat sich bei bestimmten Tumoren als das effektivste Verfahren zur Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Blasenkarzinoms und zur Therapie des Karzinoma in situ etabliert [5, 12, 23]. Begleiterscheinungen während der intravesikalen Instillationstherapie mit BCG sind häufig und führen gelegentlich zum vorzeitigen Abbruch der Therapie [17]. Lokale Nebenwirkungen wie Dysurie, Pollakisurie und Hämaturie finden sich bei 60–80% aller behandelten Patienten, sind jedoch als normale Reaktion der intravesikalen Therapie zu betrachten

[18]. Eine medikamentöse spasmolytische oder analgetische Therapie ist in den meisten Fällen zur symptomatischen Beherrschung der Beschwerden ausreichend. Selten treten systemische Nebenwirkungen auf. Bei ca. 2% ist deshalb eine stationäre Behandlung erforderlich. Besonders gefürchtet sind schwere septische Verläufe (ca. 0,1%) die einer raschen und adäquaten Therapie bedürfen [17]. Aufgrund der Nebenwirkungen enthalten viele Urologen diese klinisch etablierte und hoch effektive adjuvante Behandlung ihren Patienten vor oder verordnen prophylaktisch Antibiotika. Allerdings treten bakterielle Harnwegsinfekte unter einer Instillationstherapie allein schon aufgrund der wiederholten Katheterisierungen auf, so dass häufig Gyrasehemmer oder moderne Cephalosporine der dritten Generation verordnet werden. Inwieweit diese Antibiotika mit BCG, den viablen Mykobakterien interferieren und die Wirkung der Immuntherapie dabei kompromittieren ist nicht bekannt.

Plötzlicher Blutdruckabfall, Fieber und disseminierte Gerinnung sind nach mehrfacher intrakutaner BCG-Injektion bei der Behandlung von kutanen Melanomen berichtet worden [21]. Diese Reaktionen, wie auch die nach intravesikaler BCG-Instillation erfolgten nur nach mehrmaliger BCG-Exposition. Aus den klinischen Verläufen der wenigen beobachteten Fälle einer fulminanten BCG-Sepsis erscheint als wesentliche Komponente eine Hypersensitivitäts-Reaktion bis hin zum allergischen Schock [18]. Vor diesem Hintergrund ist theoretisch die zusätzliche Gabe eines Steroids erforderlich. Obwohl Steroide eine mykobakterielle Infektion aggravieren können, zeigten einige klinische Erfahrungen, dass die Kombination von Tuberkulostatika und Steroiden für den Krankheitsverlauf einer Sepsis günstig war [15, 21, 22, 24].

Die therapeutische Empfehlung bei systemischer BCG-Infektion lag in der Verabreichung der klassischen Tuberkulostatika Isoniazid, Rifampizin, Ethambutol und Cycloserin [18]. Tuberkulostatika haben eine relativ lange Latenz von 2–7 Tagen bis zum Wirkeintritt und ein nicht unerhebliches Nebenwirkungsspektrum [7]. Insbesondere Cycloserin war aufgrund von In-vitro-Untersuchungen, die einen schnellen Wirkungseintritt innerhalb von 24 h und eine Wirkung auch gegen BCG aufzeigten bis dato in der Therapie der systemischen BCG-Infektion ein Standard-Therapeutikum [7]. Allerdings existieren in der Literatur unterschiedliche Berichte zur Suszeptibilität von BCG gegenüber Cycloserin. Auf der Suche nach therapeutischen Alternativen gab es aus jüngeren In-vitro-Untersuchungen Hinweise auf die Wirksamkeit von Fluorchinolonen gegen BCG [9]. Da Chinolone sich bei Infektionen bis hin zur Urosepsis bewährt haben, war eine Überprüfung in vivo zur Behandlung der systemischen BCG-Infektion notwendig.

Sehr viele Antibiotika, die in vitro untersucht wurden, erreichten kurzzeitig, ca. 2–4 h nach Applikation, hohe Urinspiegel und sind damit auch potenziell wirksam gegen BCG [11]. Ausnahmen davon sind Trimethoprim-Sulfamethoxazol oder Nitrofurantoin. Erwartungsgemäß sind die Tuberkulostatika mit Ausnahme von Pyrazinamid und insbesondere auch Cycloserin gut wirksam gegen BCG. Genauso wichtig erscheinen die Befunde bezüglich Fluorchinolonen: Diese sind hoch wirksam gegenüber BCG [11].

Der Mausstamm C57/BL 6 ist für eine BCG-Infektion suszeptibel [13]. Daher kann in diesem Modell in idealer Weise die Wirksamkeit einer antimikrobiellen Therapie wie auch einer Steroidtherapie gegen eine BCG-Infektion überprüft werden.

Unsere Ergebnisse zeigen nach primärer systemischer BCG-Infektion einen signifikanten therapeutischen Effekt von Fluorchinolonen, während andere Antibiotika, wie TMS keinen Effekt hatten. Prednisolon allein aggravierte die primäre BCG-Infektion. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit In-vitro-Studien und klinischen Berichten, in denen eine erfolgreiche Anwendung von Fluorchinolonen in Kombination mit anderen Tuberkulostatika beschrieben wird [3].

Als nächsten Schritt etablierten wir das Modell der BCG-Re-Stimulation, entsprechend der klinischen Situation, die typischer Weise PPD-positive (purified protein derivative-positive) Patienten, bzw. nach mehrfacher z.T. traumatischer BCG-Instillation einbezieht, um die klinisch relevante hypererge Reaktion zu simulieren. Hierbei konnte lediglich durch die hochdosierte Prednisolon-Gabe und nicht durch Fluorchinolone allein die Überlebenszeit signifikant verlängert werden. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von anderen Studien. Koukol und Mitarb. fanden in einer In-vivo-Untersuchung nach Re-Stimulation mit BCG und einer alleinigen Steroid-Therapie eine verkürzte Überlebenszeit der Tiere [16]. Dies könnte mit einer zu geringen Steroid-Dosis in diesen Experimenten zusammenhängen. Wir verwendeten erfolgreich eine 20-fach höhere Dosierung (20 mg/kg KG), wie sie auch in der Literatur zur Bekämpfung der hyperergen Schock-Reaktion empfohlen wird [1]. Diese kurzfristige hochdosierte Prednisolon-Gabe (1–2 g/d) ist ohne das Risiko einer sekundären Nebenniereninsuffizienz oder anderer Nebenwirkungen, die von der langfristigen Steroidtherapie bekannt sind [8].

Wiederholte transurethrale Katheterisierung während einer BCG-Instillations-Therapie ist mit bakteriellen Infekten wie z. B. Zystitis und Epididymitis assoziiert [11]. Weiterhin kann eine BCG-induzierte Zystitis nach der zweiten oder dritten Instillation entstehen. Als Folge hiervon werden häufig Antibiotika wie TMS oder Fluorchinolone während einer BCG-Instillationstherapie verordnet. Wie gezeigt werden konnte, sind Fluorchinolone hoch effektiv gegen Mykobakterien in vitro und erreichen hohe Ausscheidungskonzentrationen im Urin. Hiernach wäre es vorstellbar, dass Fluorchinolone die Viabilität von Mykobakterien in der Blase beeinflussen. Zbar und Mitarb. konnten in einem Tiermodell zeigen, dass die Viabilität von BCG für die antitumorale Wirksamkeit bedeutsam ist [27]. Kürzlich konnten von unserer Gruppe im orthotopen murinen Tumormodell diese Ergebnisse bei immunkompetenten Mäusen bestätigt werden [10]. Somit könnten Fluorchinolone die Effektivität von BCG beeinflussen. In unseren Untersuchungen wurde jedoch die antitumorale Wirkung von BCG im orthotopen Tumormodell durch Fluorchinolone nicht signifikant reduziert. Dieses könnte mit der kurzen Halbwertszeit, mit der BCG in der Blase verbleibt zusammenhängen. Da die Verdoppelungszeit von BCG länger als 24 h beträgt, ist eine wesentliche Beeinflussung der Viabilität der Bakterien unwahrscheinlich. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine klinische Multicenterstudie der EORTC, in der die prophylaktische Gabe von Isoniacid während einer intravesikalen BCG-Therapie weder die antitumorale Wirksamkeit noch die Nebenwirkungen der Be-

handlung beeinflusste [26]. Weiterhin haben Fluorchinolone eine gewisse intrinsische zytotoxische Wirksamkeit [14], welche die ggf. verminderte Viabilität kompensiert.

In dieser Untersuchung bewirkt die dauerhafte begleitende Therapie mit Prednisolon während der BCG-Instillationstherapie ein vorzeitiges Versterben der Tiere. In vorhergehenden Versuchen wurde eine wesentliche medikamenteninduzierte Toxizität über den genannten Behandlungszeitraum ausgeschlossen. Ein überschießendes Tumorwachstum konnte bei der Sektion der Tiere in dieser Untersuchung ebenfalls nicht beobachtet werden. Somit könnte die Ursache für das vorzeitige Versterben in einer Immunsuppression durch Langzeit-Steroidtherapie mit konsekutiver BCG-Sepsis begründet liegen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine systemische BCG-Infektion nach intravesikaler Therapie je nach Schweregrad zunächst mit Fluorchinolonen oder mit einer Dreifach-Kombination von Tuberkulostatika anbehandelt werden sollte. Im kurzfristigen Intervall ist die zusätzliche Gabe von Steroiden unabdingbar.

In unserem Modell wurde die Effektivität von BCG zur Behandlung von Blasen Tumoren durch die zusätzliche Gabe von Chinolonen nicht beeinträchtigt, obgleich in vitro eine gute Wirksamkeit gegen Mykobakterien nachgewiesen wurde.

Literatur

- Barrett J. Treatment of shock: Principles and Practice. Philadelphia: 1986
- Bergstermann H, Rüchardt A. Ciprofloxacin once daily versus twice daily for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Infection* 1997; 25: 227–232
- Bering SE. The role of fluoroquinolones in tuberculosis today. *Drugs* 2001; 61: 9–18
- Böhle A, Kirsten D, Schröder K-H, Knipper A, Fornara P, Magnussen H, Jocham D. Clinical evidence of systemic persistence of bacillus Calmette-Guérin: Long-term pulmonary bacillus Calmette-Guérin infection after intravesical therapy for bladder cancer and subsequent cystectomy. *J Urol* 1992; 148: 1894–1897
- Bretton PR, Herr HW, Kimmel M, Whitmore WF Jr, Laudone VP, Oettgen HF, Fair WR. The response of patients with superficial bladder carcinoma to a second course of intravesical bacillus Calmette-Guérin. *J Urol* 1990; 143: 710–713
- Brosman SA, Lamm DL. The preparation, handling and use of intravesical Bacillus Calmette-Guérin for the management of stage Ta, T1, Carcinoma in situ and transitional cell carcinoma. *J Urol* 1990; 144: 313–315
- DeHaven JJ, Traynelis C, Riggs DR, Ting E, Lamm DL. Antibiotic and steroid therapy of massive systemic bacillus Calmette-Guérin toxicity. *J Urol* 1992; 147: 738–742
- Dorin RI, Qualls CR, Crapo LM. Diagnosis of adrenal insufficiency. *Annals of Internal Medicine* 2003; 139: 194–204
- Durek C, Rüscher-Gerdes S, Jocham D, Böhle A. Interference of modern antibacterials with Bacillus Calmette Guérin viability. *J Urol* 1999; 162: 1959–1962
- Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, Böhle A. Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res* 1999; 59: 2834–2837
- Hansen CP, Mortensen S. Epididymo-orchitis and Reiter's disease. Two infrequent complications after intravesical Bacillus Calmette Guérin therapy. *Scand J Urol Nephrol* 1997; 31: 317–318
- Herr HW, Wartinger DR, Fair WF, Oettgen HF. Bacillus Calmette-Guérin therapy for superficial bladder cancer: A 10-year follow up. *J Urol* 1992; 147: 1020–1023

- ¹³ Jurczok A, Günther JH, Durek C, Wulf T, Brandau S, Jocham D, Böhle A. Optimierung des orthotopen murinen Harnblasenkarzinom-Modells und Einsatz zur Unterstützung der intravesikalen Bacillus Calmette-Guérin Immuntherapie. *Akt Urol* 2000; 31: 424–430
- ¹⁴ Kamat AM, DeHaven JI, Lamm DL. Quinolone antibiotics: A potential adjunct to intravesical chemotherapy for bladder cancer. *Urology* 1999; 54: 56–61
- ¹⁵ Kesten S, Tittle L, Mullen B, Grossman R. Pulmonary disease following intravesical BCG treatment. *Thorax* 1990; 45: 709–710
- ¹⁶ Koukol SC, DeHaven JI, Riggs DR, Lamm DL. Drug therapy of bacillus Calmette-Guérin sepsis. *Urol Res* 1995; 22: 373–376
- ¹⁷ Lamm DL. Complications of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Urol Clin N Am* 1992; 19: 565–572
- ¹⁸ Lamm DL, Stogdill VD, Stogdill BJ, Crispin RG. Complications of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in 1278 patients with bladder cancer. *J Urol* 1986; 135: 1352–1354
- ¹⁹ Lamm DL, Meijden APM van der, Morales A, Brosman SA, Catalona WJ, Herr HW, Soloway MS, Steg A. Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette-Guérin intravesical therapy in superficial bladder cancer. *J Urol* 1992; 147: 596–600
- ²⁰ Lutzeyer W, Rübber H, Dahm H. Prognostic parameters in superficial bladder cancer: An analysis of 315 cases. *J Urol* 1982; 127: 250–252
- ²¹ McKhann CF, Hendrickson CG, Spittler LE, Gunnarsson A, Banerjee D, Nelson WR. Immunotherapy of melanoma with BCG: Two fatalities following intravesical injection. *Cancer* 1975; 35: 514–520
- ²² Molina JM, Rabian C, D'Agay MF, Modai J. Hypersensitivity systemic reaction following intravesical bacillus Calmette-Guérin: successful treatment with steroids. *J Urol* 1992; 147: 695–697
- ²³ Schwalb DM, Vilweg J, Herr HW et al. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) therapy for superficial bladder cancer: 10 year follow-up of a prospective randomized trial. *J Urol* 1993; 149: 283A (Abstract)
- ²⁴ Steg A, Leleu C, Debré B, Boccon-Gibod L, Sicard D. Systemic bacillus Calmette-Guérin infection, BCGitis', in patients treated by intravesical BCG therapy for bladder cancer. *Eur Urol* 1989; 16: 161–164
- ²⁵ Summerhayes IC, Franks LM. Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder. *J Natl Cancer Inst* 1979; 62: 1017–1023
- ²⁶ Meijden APM van der, Brausi M, Zamboni V, Kirkels W, Balincoort C de, Sylvester R. Intravesical instillation of epirubicin, bacillus Calmette-Guérin and bacillus Calmette-Guérin plus isoniazid for intermediate and high risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: A European organization for research and treatment of cancer genito-urinary group randomized phase III trial. *Journal of Urology* 2001; 166: 476–481
- ²⁷ Zbar B, Bernstein ID, Rapp HJ. Suppression of tumor growth at the site of infection with living BCG. *J Natl Cancer Inst* 1971; 46: 831–839
- ²⁸ Zingg EJ. Maligne Tumoren der Harnblase. In: Hohenfellner R, Zingg EJ (eds.). *Urologie in Klinik und Praxis*. Stuttgart: Thieme, 1982: 520–554

INHIBITION OF BLADDER CARCINOMA CELL ADHESION BY OLIGOPEPTIDE COMBINATIONS IN VITRO AND IN VIVO

A. BÖHLE, A. JURCZOK, P. ARDELT, T. WULF, A. J. ULMER, D. JOCHAM AND S. BRANDAU

From the Department of Urology, Medical University of Lübeck, Lübeck and Department of Immunology and Cell Biology, Borstel Research Center, Borstel, Germany

ABSTRACT

Purpose: A presumed reason for the high recurrence rate of superficial bladder cancer after transurethral tumor resection is the reimplantation of tumor cells. Because tumor cell adhesion to the extracellular matrix is mediated by integrin molecules, we tested specific integrin receptor blocking oligopeptides to prevent this mechanism.

Materials and Methods: An in vitro cell adherence assay with various bladder cancer cell lines and extracellular matrices, including fibronectin, collagen type I, laminin and combinations, was used to analyze the inhibition of tumor cell adhesion by the matrix specific oligopeptides GRGDS, DGEA and EILDV. In therapeutic in vivo experiments the orthotopic murine bladder tumor model MB49 was used. The ability of oligopeptides to interfere with tumor cell adhesion and consecutive tumor outgrowth was evaluated and compared with that of nonspecific peptides, commercially available irrigation fluid and single dose epirubicin chemotherapy.

Results: In vitro fibronectin specific oligopeptides showed a concentration dependent inhibition of tumor cell adherence to fibronectin, whereas adhesion to laminin, collagen and combined matrices was not inhibited. In contrast, combinations of integrin receptor blocking oligopeptides were highly active. In vivo local tumor take was not affected by irrigation fluid, nonspecific peptides or monospecific oligopeptides alone, whereas the combination of the 3 oligopeptides effectively inhibited tumor outgrowth.

Conclusions: Combining oligopeptides with various specificities significantly inhibited tumor cell adhesion and tumor outgrowth. Application of this principle in a clinical setting may be an effective method for reducing the recurrence rate of superficial bladder cancer.

KEY WORDS: bladder, bladder neoplasms, oligopeptides, cell adhesion

Recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder after transurethral resection is a major clinical problem in urological oncology. Several reports indicate that the risk is between 50% and 70%.^{1–4} Genetic alteration of urothelial cells by disposition or extrinsic toxic agents is a current hypothesis, resulting in field changes of the urothelial layer from which recurrence may arise.^{5,6} Since primary therapy for superficial bladder cancer involves endoscopic transurethral electroresection under continuous flow irrigation, large amounts of tumor cells are released.^{7,8} Thus, reimplantation of floating viable tumor cells to the injured bladder wall after transurethral tumor resection is another hypothesis that may explain the high rate of tumor recurrence. Clinically the atypical appearance of recurrent tumor in the bladder dome has been attributed to buoyant tumor cells.⁹ The recent genetic proof of the monoclonality of multifocal^{10,11} and recurrent^{12,13} bladder tumors can be regarded as a further argument to support this hypothesis. In vitro studies demonstrated much more rapid and firm attachment of tumor cells to the subendothelial extracellular matrix than to the intact lining of endothelial cells.¹⁴ Soloway and Masters simulated the clinical situation by cauterizing murine bladders before transurethral instillation of transitional tumor cells.¹⁵ Tumor developed in 54% to 94% of previously cauterized bladders versus only 12% of normal bladders with instilled cells. In an optimized model with prolonged tumor cell-bladder wall contact time a reliable implantation rate of 100% was achieved even with few tumor cells.¹⁶

Such observations suggest that adhesion and cell implantation into the traumatized bladder wall after transurethral resection have an important role in tumor recurrence.^{7,9,17–19}

Clinically several prospective randomized trials involving this initial step of tumor formation used immediately postoperative single instillations of cytotoxic drugs to interfere with viability and implantation after transurethral resection. In these trials there was an impressive reduction in the recurrence rate that matched the results of standard week-long intravesical treatment courses with cytotoxic drugs.^{20–22}

In the early 1980s the importance of extracellular matrix proteins in general and of fibronectin specifically was observed for promoting cellular attachment to and interaction with surrounding tissues.²³ Rapid progress in this field identified a family of cell surface receptors called integrins that mediate adherence by recognizing and binding to specific peptide sequences on extracellular matrix proteins.²⁴ For fibronectin the RGD tripeptide appears to be the crucial sequence for ligand receptor interaction.²⁵ Integrins are heterodimers (α and β subunits) found in almost all animals and some plant species. At least 1 or more different integrins are present in almost all cell types. The integrin family as known today contains at least 11 α and 7 β subunits, which are associated to form at least 15 distinct heterodimers. There are 7 fibronectin receptors, 4 laminin receptors, 3 collagen receptors and 3 fibrinogen receptors.^{26–28} There is some redundancy in integrin-ligand interactions. Different receptors are often expressed on different cell types and, although they sometimes may bind to the same ligand, they bind at different sites or at the same site but with different avidities.^{29–31}

Previous studies have shown the inhibition of tumor cell adherence by the oligopeptide GRGDS on a fibronectin layer in vitro in a concentration dependent manner. However, in vivo no significant effect was seen at the injured bladder wall site.³² In bladder wall extracellular matrix at least 3 macro-

molecules are mainly responsible for cell attachment, namely fibronectin, collagen and laminin.^{33,34} We hypothesized that, in contrast to inhibition with monospecific oligopeptides, tumor cell implantation may be inhibited more effectively by integrin receptor blocking oligopeptides with different binding specificities. In fact, using the modified orthotopic bladder tumor model MB49¹⁶ we observed in this study that effective inhibition of tumor cell implantation to the injured bladder wall by combinations of oligopeptides is feasible and more effective than immediate single dose instillation of cytotoxic drugs. Our data suggest that this approach may be promising in further clinical trials.

MATERIALS AND METHODS

Urothelial carcinoma cell lines. Three clonal human urothelial cell lines of different differentiation were used. The tumor cell line RT4 was originally derived from superficial papillary grades 1 to 2 bladder carcinoma, whereas the T24 and J82 cell lines were derived from poorly differentiated, invasive grade 3 bladder carcinoma.³⁵ Urothelial cells were grown under standard conditions in an incubator with 5% CO₂ in RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Germany), including 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 units per ml. penicillin and 100 µg/ml. streptomycin (Gibco, Eggenstein, Germany). Furthermore, the 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) induced murine bladder cancer cell line MB49 was used.³⁶ Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium under the described conditions.

Oligopeptides. We used GRGDS, EILDV, KQAGDV and DGEA as integrin receptor antagonists duplicating sites of fibronectin (GRGDS), collagen (KQAGDV and DGEA) and laminin (EILDV) (Bachem Biochemica, Heidelberg, Germany). We also used 3 pentapeptides with unrelated specificities, including DRVYI (angiotensin I/II, amino acids 1 to 5), YIHPI (angiotensin I/II, amino acids 4 to 8) and RYLPT (proctolin) as lyophilisates, which served as nonspecific controls (Bachem Biochemica). For in vitro studies GRGDS and DGEA were solubilized in phosphate buffered saline (PBS). EILDV was solubilized in neutralized or nonneutralized acetic acid and then diluted to experimental concentrations by PBS. Because no differences were noted in either approach, only the results of the latter approach are presented.

KQAGDV instead of DGEA became available only when starting our animal experiments. However, this pentapeptide was better comparable to the other 5-mer oligopeptides. A limited number of control experiments performed in vitro using KQAGDV showed results comparable to experiments with DGEA (data not shown). For in vivo studies all oligopeptides were solubilized by adding commercially available irrigation fluid containing 27 gm. sorbitol and 5.4 gm. mannitol per l. distilled water.

Cell adherence assay. An in vitro particulate adherence assay incorporating fibronectin, collagen and laminin as adherence substrates was used to mimic extracellular matrix exposed at the site of urothelial injury. We coated 96-well microtiter flat-bottomed plates with 30 µg/ml. matrix or various combinations of matrices. Coated wells were prepared as described previously.³⁷ Briefly, 50 µl. fibronectin, collagen and/or laminin were added per well. Plates were incubated for 6 hours at 37C in 5% CO₂. Immediately before the experiment plates were washed 3 times with sterile PBS. Solutions (50 µl.) containing the oligopeptides GRGDS, EILDV or/and DGEA were prepared (0.25 to 2 mM. in Hanks balanced salt solution) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) and added to each well. After incubation for 0.5 hour at 37C cells were plated in a concentration of 6 × 10⁵/ml. with 50 µl. per well. Cells were spun down for 5 minutes at 70 × gravity, followed by incubation for 1 hour at 37C. Subsequently the plates were covered by foil in a PBS bath and centrifuged upside down for 5 minutes at 70 × gravity. After removing the foil containing nonadherent cells the per-

cent of adhering cells was determined using a modification of the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, as described previously.³² Earlier experiments demonstrated that this assay is linear from 1,250 to 100,000 adhering cells per well (R² = 0.98). The results of these assays are shown as the percent of initial uninhibited adhesion.

Animals. Six to 8-week-old female C57/BL6 mice (Charles River, Sulzfeld, Germany) weighing approximately 17 gm. were maintained at our animal care facility for 1 week before use. Mice were housed 5 per cage in a limited access area at a mean room temperature of 20 ± 1C and a humidity of 50% ± 10% with free access to food and water. All experiments were approved by the institutional board and by the Ministry of Environment, Nature and Forestry of Schleswig-Holstein, Germany.

Tumor implantation. MB49 cells were harvested by trypsinization and suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium without L-glutamine, fetal calf serum and antibiotics. Viability was determined by trypan blue exclusion and only tumor cell suspensions with more than 90% viable cells were used for tumor implantation. The tumor cell suspension for implantation was adjusted to 2 × 10⁵ cells per ml. Intravesical tumor implantation was done, as previously described.¹⁶

Briefly, under short ether inhalation anesthesia the mice received an intraperitoneal injection of diluted sodium pentobarbital at a single dose of 0.06 mg./gm. body weight. A 24 gauge polytetrafluoroethylene intravenous Insyte-W catheter (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany) was inserted transurethraly into the bladder. A guide wire was inserted into the bladder via the polytetrafluoroethylene catheter and gently pushed forward until it reached the bladder dome. The guide wire was attached to the cautery unit and monopolar coagulation was applied for 5 seconds at the lowest coagulation setting. After guide wire removal 0.1 ml. oligopeptide or control solution was instilled and the catheter was locked. After approximately 5 minutes 0.1 ml. tumor cell suspension (2 × 10⁵ cells per ml.) was instilled. The catheter was locked again and the cell suspension was maintained in the bladder for 2 hours.

Treatment protocol. Mice were randomized into 10 groups, including group 1 (30 animals)—controls, 2 (20 animals)—irrigation fluid, 3 (10 animals)—combination of 5 mg./ml. nonspecific peptides DRVYI, YIHPI and RYLPT each, 4 (30 animals)—5 mg./ml. GRGDS, 5 (10 animals)—5 mg./ml. KQAGDV, 6 (10 animals)—5 mg./ml. EILDV, 7 (30 animals)—combination of 5 mg./ml. (GRGDS, KQAGDV and EILDV each, 8 (10 animals)—combination of 3 mg./ml. GRGDS, KQAGDV and EILDV each, 9 (10 animals)—combination of 1 mg. GRGDS, KQAGDV and EILDV at 1 mg./ml. each and 10 (10 animals)—5 mg./ml. epirubicin. Confirmatory animal experiments were performed in 2 instances with equal results. The results of these experiments are expressed together, leading to the described group sizes.

Mice were evaluated daily to determine their viability status. Surviving animals were sacrificed at day 28. Grossly visible tumors were assessed and bladder weight was measured as a parameter of tumor growth. Intravesical tumors were verified by histologically testing. All mice were completely dissected to document extravesical tumor growth and metastases. Bladder weight, body weight, and tumor rate were compared using the Mann-Whitney U test using SPSS software (SPSS, Erkrath, Germany). Statistical significance was considered at p < 0.05.

RESULTS

Inhibition of tumor cell adhesion to single matrices. The potential of GRGDS to inhibit cell adherence to extracellular matrix components was first tested in vitro on a fibronectin matrix. The inhibitory effect varied considerably in the various cell lines with a mean loss of cell adherence of 55% ±

6.3%, $72\% \pm 6.6\%$ and $91\% \pm 9.2\%$ in RT4, T24 and J82 cells, respectively (fig. 1, A). On collagen type I no significant decrease of tumor cell adherence was observed in any cell line tested (fig. 1, B). On laminin matrix GRGDS failed to inhibit significantly adhesion (fig. 1, C).

We next tested the effects of oligopeptides of other specificities, namely DGEA and EILDV. For clarity only the results of T24 cells are shown. DGEA, which is a collagen specific oligopeptide,²⁶ showed no relevant inhibitory activity on the cellular adhesion to type I collagen or to fibronectin

(fig. 2). In contrast, EILDV, which is a laminin specific oligopeptide,²⁶ had a significant inhibitory activity on the cellular adhesion to laminin as well as to fibronectin (mean $1.2\% \pm 3\%$ at $500 \mu\text{M}$. and $0\% \pm 2\%$ at $300 \mu\text{M}$., respectively, (fig. 3).

Inhibition of tumor cell adhesion to mixed matrixes. Because the extracellular matrix of the urothelium consists of various components,^{33,34} we tested the activity of oligopeptides to inhibit the adhesion of urothelial carcinoma cells to a combined matrix consisting of fibronectin, laminin and collagen. On this combined matrix the inhibitory effect of GRGDS on the adhesion of RT-4 cells was reduced compared with adhesion to fibronectin alone (figs. 1 and 4). When we used combined GRGDS and EILDV in equimolar concentrations of $300 \mu\text{M}$., a strong interference with cell adhesion was evident. The most effective inhibitor of cell adherence in vitro was the combination of GRGDS, EILDV and DGEA. Using this combination almost complete inhibition of tumor cell adhesion was observed at about $100 \mu\text{M}$.

To mimic more realistically the in vivo situation of tumor cell adhesion in the bladder, further experiments were done in a murine orthotopic bladder tumor model. The murine bladder cancer cell line MB49 was tested in similar experiments. Confirming our previous experiments in human cell lines, GRGDS alone did not inhibit the adhesion of murine MB49 cells, whereas combined oligopeptides were again most effective (data not shown).

Inhibition of tumor cell implantation in vivo. In subsequent animal studies oligopeptides were given immediately before tumor cell implantation. Mice were sacrificed after 28 days and bladder tumor outgrowth was determined. Tumor take was 100% in the control group. The tumor outgrowth rate was 90% in group 2 with irrigation fluid, 90% in group 3 with nonspecific peptides, 87% in group 4 with GRGDS, 100% in group 5 with KQAGDV, 70% in group 6 with EILDV, 30% in group 7 with 5 mg. of the combination, 10% in group 8 with 3 mg. of the combination, 50% in group 9 with 1 mg. of the combination and 40% in group 10 with epirubicin. The tumor take rate in groups 7 to 10 was significantly lower than in the control group ($p < 0.001$ versus groups 7 and 8, and $p < 0.05$ versus groups 9 and 10). There was no statistically difference within the combined therapy groups (fig. 5).

When specifically considering animals with bladder tumor outgrowth, 2 patterns were observed (see table). In groups 1 to 5 and 9 high mean bladder weight of 135 mg. or greater (178, 140, 187, 136, 151 and 144 mg., respectively) was noted. However, in groups 7, 8 and 10 mean bladder weight was significantly less than half at 70 mg. or less (70, 67 and 48 mg., respectively, $p < 0.05$). Group 6 mice with tumor out-

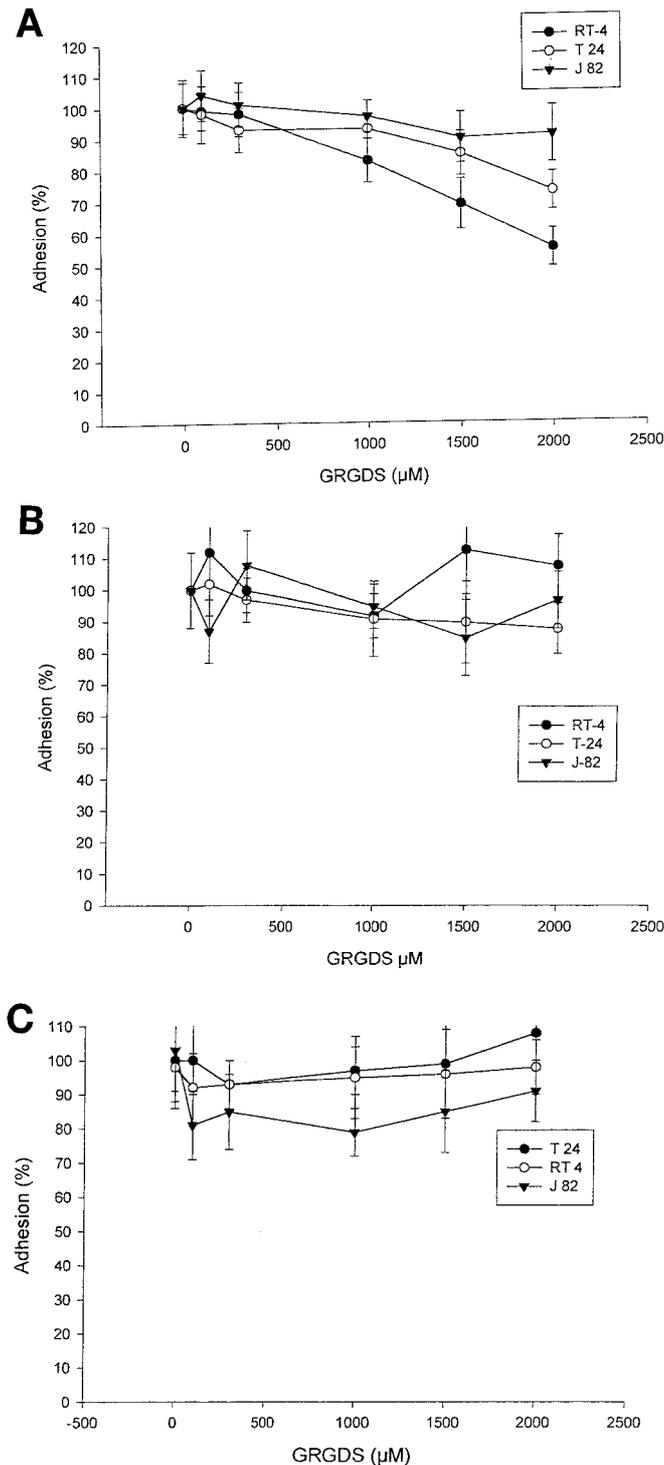


FIG. 1. Cell adhesion of 3 human urothelial cancer cell lines to coated wells in presence of GRGDS. A, fibronectin. B, collagen type I. C, laminin.

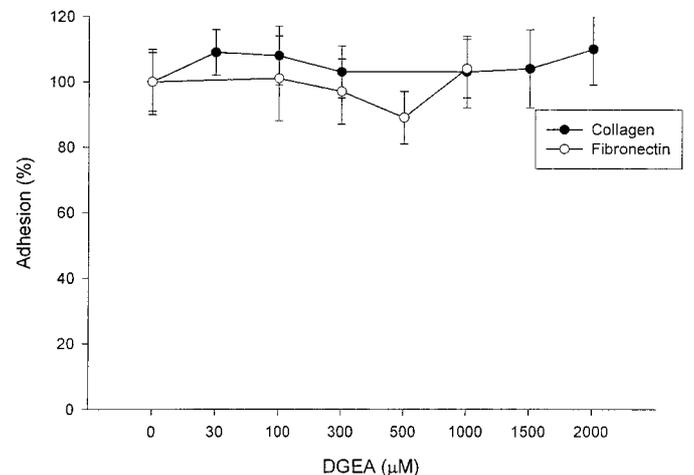


FIG. 2. Adhesion of T24 human urothelial cancer cells to collagen and fibronectin coated wells in presence of DGEA.

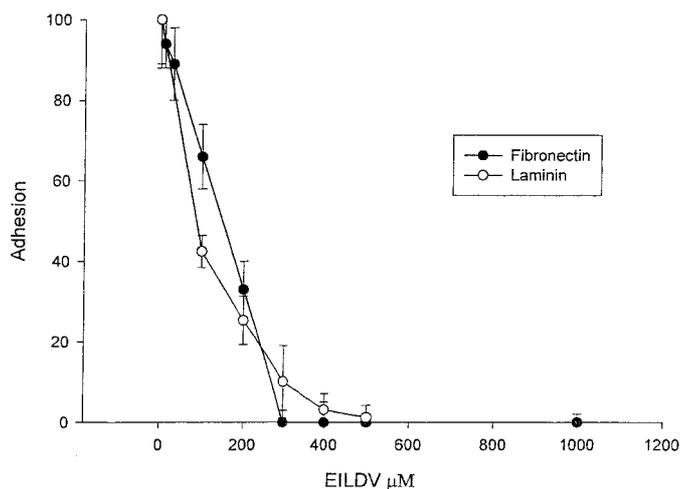


FIG. 3. Adhesion of T24 human urothelial cancer cells to laminin and fibronectin coated wells in presence of EILDV.

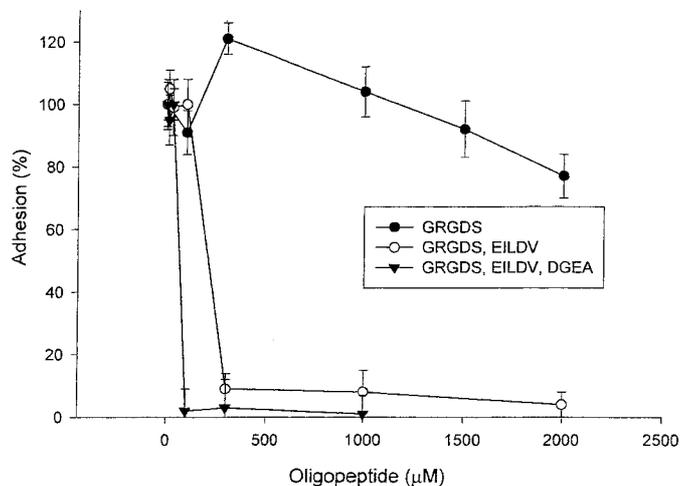


FIG. 4. Adhesion of RT4 human urothelial cancer cells to mixed matrixes from fibronectin, collagen and laminin in presence of various oligopeptides.

growth irrigated with EILDV had a mean bladder weight of 98 mg.

Gross internal organ examination revealed pulmonary metastasis only in mice with intravesical tumors, including 50% in group 1, 35% in group 2, 30% in group 3, 30% in group 4, 30% in group 5, 30% in group 6, 10% in group 7, 10% in group 8, 20% in group 9 and 0% in group 10 (see table). When correlated with intravesical tumor outgrowth, these differences were not significant.

DISCUSSION

Various hypotheses exist to explain the high rate of tumor recurrence after transurethral bladder tumor resection. In 1903 the implantation theory of tumors was first proposed by Albarran and Imbert.³⁸ Although implantation of cancer cells into the intact mucosa has been discounted by most pathologists, the possibility of seeding to raw surfaces or in surgical wounds is widely accepted.^{17,19}

Soloway and Masters argued that floating viable tumor cells adhere to the injured bladder wall after transurethral tumor resection, reimplant and grow to clinically evident recurrences.¹⁵ Further indirect support for this hypothesis came from the atypical localization of recurrent lesions in the bladder dome or at the posterior wall, which has been attributed to buoyant cells in the air bubble after transurethral resection or to inevitable instrumental trauma to the poste-

rior bladder wall, respectively.^{9,39-41} In a prospective investigation Müller et al noted tumor cells in 23% of patients in the irrigation fluid obtained after transurethral resection.⁴² Of these patients 75% had tumor recurrence within 3 to 6 months. Recent proof of the clonal origin of multifocal primary lower¹⁰ and upper^{13,43} urinary tract tumors, and especially of recurrent tumors^{12,44} further supports the hypothesis of reimplantation. Recent clinical trials aimed at preventing tumor cell reimplantation by single dose intravesical chemotherapy immediately after tumor resection showed a significant reduction in recurrence 1 year postoperatively.^{9,20,45-47}

Thus, from the clinical viewpoint several lines of evidence strongly support the hypothesis of tumor cell reimplantation as a major reason for bladder carcinoma recurrence. Several experimental approaches were established to target directly the interaction between malignant cells and extracellular adhesion matrix. See et al showed that in vitro receptor blockade with GRGDS significantly decreased tumor cell adherence to fibronectin, depending on GRGDS concentration, tumor cell number and viability.³² However, in vivo receptor blockade with GRGDS failed to inhibit cell attachment and tumor outgrowth. Hyacinthe et al used an in vitro cell adherence assay with mixed matrices that more closely resembled the situation in vivo.⁴⁸ GRGDS, mannose-6-phosphate and heparin inhibited cell attachment in dose dependent fashion. The laminin related peptide YIGSR failed as an inhibitor of adhesion in vitro. In that study in vivo investigations in a murine bladder tumor model showed a significant reduction in cell attachment by GRGDS compared with the control group. In contrast to See and Williams,⁴⁹ Hyacinthe et al used a 10-fold greater concentration of GRGDS.⁴⁸ Pode et al used a natural extracellular matrix exposed to low grade human bladder tumors in vitro.¹⁷ Firm attachment of tumor cells occurred within 1 hour, reached a maximum within 24 hours and was followed by flattening and proliferation of the seeded cells. These results suggest that interference with tumor implantation should be initiated within the first hour after transurethral resection, a notion that was indirectly confirmed by recent clinical observations.⁴⁶

During transurethral resection the basement membrane and underlying suburothelial stroma become exposed.^{15,17,34,50} Even with an intact epithelial lining fibrin deposition is an excellent adhesion matrix.^{32,49} Competitive targeting in vitro of tumor cell adhesion by oligopeptides in previous studies involved simple matrices, whereas complex matrices or combinations were not investigated. Consequently related animal studies had limited success.^{32,50} Because extracellular matrix consists of several components, such as fibronectin, laminin and collagen,^{34,33} and a multitude of receptors for these components are expressed on the cell surface, this failure can be attributable to incomplete blockage by monospecific oligopeptides, leading to ineffective inhibition of tumor cell adhesion. Therefore, we focused on combinations that may block cell attachment to extracellular matrix more effectively, consisting of the fibronectin related peptide GRGDS, the laminin related peptide EILDV and the collagen related peptides DGEA for in vitro and KQAGDV for in vivo investigations.

We initially investigated the influence of GRGDS, which is probably the best characterized inhibitory peptide in cell adhesion biology, on bladder tumor cell binding to extracellular matrix components in vitro. We observed the ability of GRGDS to inhibit the attachment of certain tumor cell lines to a fibronectin matrix. However, GRGDS failed to prevent attachment of T-24 bladder tumor cells to all matrices tested, including combined matrixes. In contrast, using GRGDS combined with 2 other integrin receptor blocking oligopeptides, effective inhibition of attachment to combined matrixes was also demonstrated for T-24 cells. Typically within certain ranges all cell lines showed comparable results. Further experiments were performed, most with the complete pattern

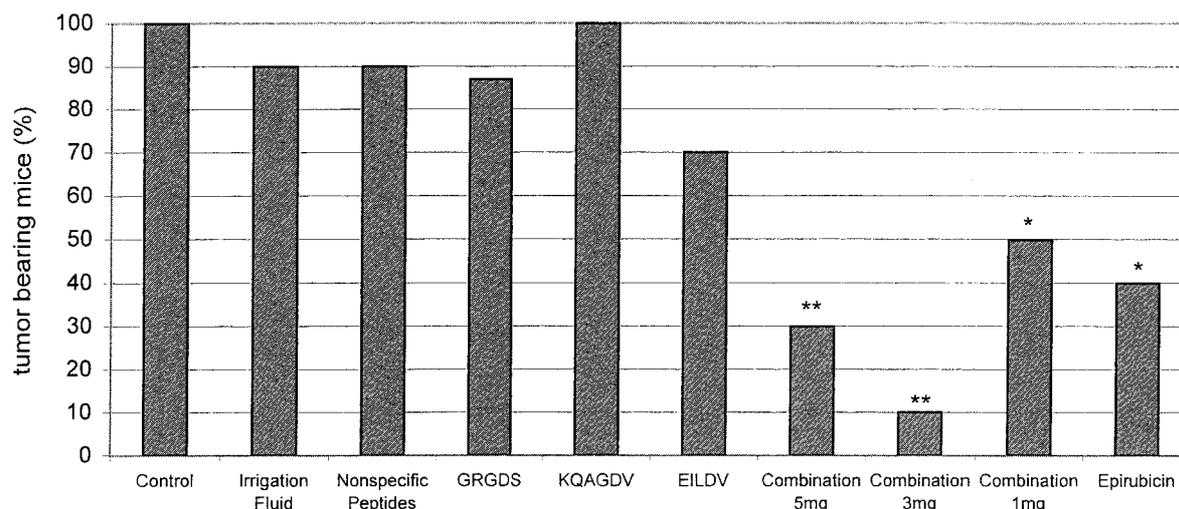


FIG. 5. Percent of mice per study group with intravesical bladder tumor outgrowth after instillation of MB49 cells. Single asterisk indicates Mann-Whitney U test $p < 0.05$. Double asterisks indicate Mann-Whitney U test $p < 0.001$.

Results of in vivo study in MB-49 orthotopic bladder cancer model

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8	Group 9	Group 10
	PBS	Sorbitol-Mannitol	Nonspecific Peptides	GRGDS	KQAGDV	EILDV	5 Mg. Combination	3 Mg. Combination	1 Mg. Combination	Epirubicin
% Tumor take	100	90	90	87	100	70	30*	10*	50†	40†
Bladder wt. (mg.)	178	140	187	136	151	98	70†	67†	144	48†
% Pulmonary metastasis‡	50	35	30	30	30	30	10	10	20	0

* $p = 0.001$.

† $p = 0.05$.

‡ Not statistically significant.

of cell lines used (data not shown). The results showed a representative impression on the emanating pattern without overemphasizing the large amount of background data (figs. 1 to 4).

Furthermore, monospecific oligopeptide instillation and combination therapy were tested in a murine orthotopic bladder cancer model. No significant decrease in implantation or tumor outgrowth was noted after irrigation with monospecific oligopeptides, whereas oligopeptide combinations targeting the major components of the suburothelial stroma significantly inhibited tumor outgrowth. Notably under our experimental conditions solubilized EILDV was effective *in vitro* on the fibronectin and laminin mono-matrix and combined with GRGDS and GRGDS/DGEA in combined matrices. However, in the natural environment of the murine bladder EILDV alone was ineffective for inhibiting tumor outgrowth. In the animal model only combinations of oligopeptides with different specificities were therapeutically effective. A combination of EILDV and KQAGDV alone may be effective for inhibiting cell adhesion and it is planned to be the subject of future investigations. In addition, not only tumor take, but also tumor weight in mice with tumor outgrowth revealed the effectiveness of this approach. In our model bladder weight on the day of sacrifice depends on the number of tumor cells initially instilled. Thus, any reduction in the number of viable cells available for implantation results in decreased bladder weight.¹⁶ Irrigation with epirubicin, or the 3 or 5 mg. combination led to a significant reduction in tumor take rate and bladder weight in contrast to irrigation with control peptides, monospecific peptides or the low concentration oligopeptide combination. This phenomenon can be explained by the reduced number of tumor cells available for implantation in those groups. An optimum dose for inhibiting cell adhesion in the 3 mg. combination may be

suspected, whereas other concentrations seemed less effective. However, the differences in these groups were not statistically significant. The aspect of dose dependence is planned to be studied in further investigations.

Our approach has several clinically important aspects. By specific blockade of tumor cell attachment during endoscopic procedures it may be possible to reduce the recurrence rate of superficial bladder cancer and of other tumors with a potential for implantation seeding. When calculated approximately from the clinical effectiveness of single dose intravesical chemotherapy in several clinical studies,⁵¹⁻⁵⁴ the effectiveness of this biological approach may result in a 50% decrease in superficial bladder tumor recurrences, leaving genetically based field changes as the major cause of recurrences. The strategy of combining cytotoxic chemotherapy and oligopeptides may yield even better results. Extended classic intravesical therapy may be reserved for high grade lesions only. Integrin receptor blockage presumably would be feasible without side effects. Systemic resorption via large resection wounds would probably not lead to toxic reactions, as is known from chemotherapy,^{55,56} because systemic application of oligopeptides has not resulted in any problems in animal studies.⁵⁷⁻⁵⁹ No impaired hemostasis was found in our investigations, although platelets and von Willebrand's factor also use the RGD recognition sequence²⁴ and wound healing was not influenced by GRGDS in an animal model.⁴⁸ Furthermore, gross toxic effects may be largely excluded in our mouse model since body weight and daily examinations did not reveal significant differences in the groups. In conclusion, our data suggest that inhibiting tumor cell adhesion by polyvalent oligopeptides is a highly effective method with great potential not only for superficial bladder carcinoma, but also for other types of carcinoma with an intrinsic risk of tumor cell seeding.

REFERENCES

- Aso, Y., Anderson, L., Soloway, M. S. et al: Prognostic factors in superficial bladder cancer. *Prog Clin Biol Res* **221**: 257, 1986
- Soloway, M. S.: The management of superficial bladder cancer. *Cancer*, **45**: 1865, 1980
- Lutzeyer, W., Rübber, H. and Dahm, H.: Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases. *J Urol*, **127**: 250, 1982
- Heney, N. M., Ahmed, S., Flanagan, M. J. et al: Superficial bladder cancer: progression and recurrence. National Bladder Cancer Collaborative Group A. *J Urol*, **130**: 1083, 1983
- Koss, L. G., Nakanishi, I. and Freed, S. Z.: Nonpapillary carcinoma in situ and atypical hyperplasia in cancerous bladders: further studies of surgically removed bladders by mapping. *Urology*, **9**: 442, 1977
- Soto, E. A., Friedell, G. H. and Tiltman, A. J.: Bladder cancer as seen in giant histologic sections. *Cancer*, **39**: 447, 1977
- See, W. A. and Chapman, W. H.: Tumor cell implantation following neodymium-YAG bladder injury: a comparison to electrocautery injury. *J Urol*, **137**: 1266, 1987
- Beisland, H. O., Sander, S. and Fossberg, S.: Neodymium-YAG-laser irradiation of urinary bladder tumors. *Urology*, **25**: 559, 1985
- Boyd, P. J. and Burnand, K. G.: Site of bladder-tumour recurrence. *Lancet*, **2**: 1290, 1974
- Halachmi, S., Linn, J. F., Amiel, G. E. et al: Urine cytology, tumour markers and bladder cancer. *Br J Urol*, **82**: 647, 1998
- Takahashi, T., Kakehi, Y., Mitsumori, K. et al: Distinct microsatellite alterations in upper urinary tract tumors and subsequent bladder tumors. *J Urol*, **165**: 672, 2001
- Habuchi, T., Takahashi, R., Yamada, H. et al: Metachronous multifocal development of urothelial cancers by intraluminal seeding. *Lancet*, **342**: 1087, 1993
- Takahashi, T., Habuchi, T., Kakehi, Y. et al: Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Canc Res*, **58**: 5835, 1998
- Vlodavsky, I., Lui, G. M. and Gospodarowicz, D.: Morphological appearance, growth behaviors and migratory activity of human cells maintained on extracellular matrix versus plastic. *Cell*, **19**: 607, 1980
- Soloway, M. S. and Masters, S.: Urothelial susceptibility to tumor cell implantation. Influence of cauterization. *Cancer*, **46**: 1158, 1980
- Günther, J. H., Jurczok, A., Wulf, T. et al: Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res*, **59**: 2834, 1999
- Pode, D., Alon, Y., Horowitz, A. T. et al: The mechanism of human bladder tumor implantation in an in vitro model. *J Urol*, **136**: 482, 1986
- Weldon, T. E. and Soloway, M. S.: Susceptibility of urothelium to neoplastic cellular implantation. *Urology*, **5**: 824, 1975
- Weyrauch, H. M. and Crossfield, J. H.: Dissemination of bladder neoplasms by endoscopic electroresection. *J Urol*, **87**: 391, 1962
- Oosterlinck, W., Kurth, K.-H., Schröder, F. et al: A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. European Organization for Research on Treatment of Cancer. *J Urol*, **149**: 749, 1993
- Bouffloux, C., Kurth, K.-H., Bono, A. et al: Intravesical adjuvant chemotherapy for superficial transitional cell bladder carcinoma: results of 2 European Organization for Research and Treatment of Cancer randomized trials with mitomycin C and doxorubicin comparing early versus delayed instillations and short-term versus long-term treatment. *J Urol*, **153**: 934, 1995
- Rintala, E., Jauhiainen, K., Alfthan, O. et al: Intravesical chemotherapy (mitomycin-C) versus immunotherapy (bacillus Calmette-Guérin) in superficial bladder cancer. *Eur Urol*, **20**: 19, 1991
- Ruoslahti, E. and Engvall, E.: Complexing of fibronectin glycosaminoglycans and collagen. *Biochim Biophys Acta*, **631**: 350, 1980
- Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D.: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, **238**: 491, 1987
- Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D.: Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell*, **44**: 517, 1986
- Hynes, R. O.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**: 11, 1992
- Ruoslahti, E.: RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**: 697, 1996
- Ruoslahti, E. and Vaheri, A.: Cell-to-cell contact and extracellular matrix. Editorial overview. *Curr Opin Cell Biol*, **9**: 605, 1997
- Hemler, M. E., Elices, M. J., Chan, B. M. et al: Multiple ligand binding functions for VLA-2 (alpha 2 beta 1) and VLA-3 (alpha 3 beta 1) in the integrin family. *Cell Differ Dev*, **32**: 229, 1990
- Mäenpää, A., Jääskeläinen, J., Carpen, O. et al: Expression of integrins and other adhesion molecules on NK cells: impact of IL-2 on short- and long-term cultures. *Int J Cancer*, **53**: 850, 1998
- Liu, Y. K., Nemoto, A., Feng, Y. et al: The binding ability to matrix proteins and the inhibitory effects on cell adhesion of synthetic peptides derived from a conserved sequence of integrins. *J Biochem*, **121**: 961, 1997
- See, W. A., Rohlf, D. P. and Crist, S. A.: In vitro particulate adherence to fibronectin: correlation with in vivo particulate adherence to sites of bladder injury. *J Urol*, **147**: 1416, 1992
- Jost, S. P., Gosling, J. A. and Dixon, J. S.: The morphology of normal human bladder urothelium. *J Anat*, **167**: 103, 1989
- Gardiner, R. A., Seymour, G. J., Lavin, M. F. et al: Immunohistochemical analysis of the human bladder. *Br J Urol*, **58**: 19, 1986
- Masters, J. R. W., Hepburn, P. J., Walker, L. et al: Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res*, **46**: 3630, 1986
- Summerhayes, I. C. and Franks, L. M.: Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder. *J Natl Cancer Inst*, **62**: 1017, 1979
- Abou-Zeid, C., Ratliff, T. L., Wiker, H. G. et al: Characterization of fibronectin-binding antigens released by mycobacterium tuberculosis and mycobacterium bovis BCG. *Infect Immun*, **56**: 3046, 1988
- Albarran, J. and Imbert, L.: Les Tumeurs du Rein. Paris: Masson et Cie., p. 452, 1903
- Burnand, K. G., Boyd, P. J. R., Mayo, M. E. et al: Single dose intravesical thiotepa as an adjuvant to cystodiathermy in the treatment of transitional cell bladder carcinoma. *Br J Urol*, **48**: 55, 1976
- Page, B. H., Levison, V. B. and Curwen, M. P.: The site of recurrence of non-infiltrating bladder tumours. *Br J Urol*, **50**: 237, 1978
- Heney, N. M., Nocks, B. N., Daly, J. J. et al: Ta and T1 bladder cancer: location, recurrence and progression. *Br J Urol*, **54**: 152, 1982
- Müller, F., Kraft, R. and Zingg, E. J.: Exfoliative cytology after transurethral resection of superficial bladder tumours. *Br J Urol*, **57**: 530, 1985
- Lunec, J., Challen, C., Wright, C. et al: C-erb B-2 amplification and identical P53 mutations in concomitant transitional carcinomas of renal pelvis and urinary bladder. *Lancet*, **339**: 439, 1992
- van Tilborg, A. A. G., de Vries, A., de Bont, M. et al: Molecular evolution of multiple recurrent cancers of the bladder. *Hum Mol Genet*, **9**: 2973, 2000
- Zincke, H., Utz, D. C., Taylor, W. F. et al: Influence of thiotepa and doxorubicin instillation at time of transurethral surgical treatment of bladder cancer on tumor recurrence: a prospective randomized double-blind controlled trial. *J Urol*, **129**: 505, 1983
- Rajala, P., Liukkonen, T., Raitanen, M. et al: Transurethral resection with perioperative instillation of interferon-(alpha) or epirubicin for the prophylaxis of recurrent primary superficial bladder cancer: a prospective randomized multicenter study—Finnbladder III. Finnbladder Group. *J Urol*, **161**: 1133, 1999
- Tolley, D. A., Parmar, M. K. B., Grigor, K. M. et al: The effect of intravesical mitomycin C on recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer: a further report with 7 years of followup. Medical Research Council Superficial Bladder Cancer Working Party. *J Urol*, **155**: 1233, 1996
- Hyacinthe, L. M., Jarrett, T. W., Gordon, C. S. et al: Inhibition of bladder tumor cell implantation in cauterized urothelium, without inhibition of healing, by a fibronectin-related peptide (GRGDS). *Ann Surg Oncol*, **2**: 450, 1995

49. See, W. A. and Williams, R. D.: Urothelial injury and clotting cascade activation: common denominators in particulate adherence to urothelial surfaces. *J Urol*, **147**: 541, 1992
50. Grossman, H. B., Liebert, M., Wedemeyer, G. et al: Fibronectin distribution in normal and malignant urothelium. *J Urol*, **143**: 418, 1990
51. Utz, D. C. and Farrow, G. M.: Carcinoma in situ of the urinary tract. *Urol Clin North Am*, **11**: 735, 1984
52. Tzai, T.-S. and Lin, S.-N.: Interferon- α can alter the lytic susceptibility of murine transitional cell carcinoma (MBT-2) by their original poor specific cytotoxic tumor infiltrating lymphocytes. *J Urol*, **147**: 523, 1992
53. Schandené, L., Vandenbussche, P., Crusiaux, A. et al: Differential effects of pentoxifylline on the production of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and Interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. *Immunology*, **76**: 30, 1992
54. Schellhammer, P. F., Kaplan, M. H., Pinsky, C. M. et al: Study of local and systemic effects of intravesical bacillus Calmette-Guérin. *Urology*, **6**: 562, 1975
55. Soloway, M. S. and Ford, K. S.: Thiotepa-induced myelosuppression: a review of 670 bladder instillations. *J Urol*, **130**: 889, 1983
56. Orlin, I.: The role of cystography in thio-tepa toxicity. *J Urol*, **108**: 257, 1972
57. Humphries, M. J., Olden, K. and Yamada, K. M.: A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science*, **233**: 467, 1986
58. Humphries, M. J., Yamada, K. M. and Olden, K.: Investigation of the biological effects of anti-cell adhesive synthetic peptides that inhibit experimental metastasis of B16-F10 murine melanoma cells. *J Clin Immunol*, **81**: 782, 1988
59. Whalen, G. F. and Ingber, D. E.: Inhibition of tumor-cell attachment to extracellular matrix as a method for preventing tumor recurrence in a surgical wound. *Ann Surg*, **210**: 758, 1989

Bioluminescence imaging to monitor bladder cancer cell adhesion *in vivo*: a new approach to optimize a syngeneic, orthotopic, murine bladder cancer model

Andreas Jurczok, Paolo Fornara and Ariane Söling*

Department of Urology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle, and *Department of Paediatrics 1, Georg August University Göttingen, Göttingen, Germany

Accepted for publication 22 June 2007

Study Type – Aetiology (case control study)
Level of Evidence 3b

OBJECTIVE

To improve the orthotopic murine bladder cancer model by using bioluminescent (BL) MB49 tumour cells for noninvasive *in vivo* monitoring of tumour growth and to examine the efficacy of integrin receptor-blocking oligopeptides on preventing tumour cell adhesion in this improved bladder cancer model.

MATERIALS AND METHODS

The capacity of oligopeptide combinations to interfere with tumour cell adhesion was

assessed *in vivo* in a syngeneic, orthotopic, murine bladder cancer model. Tumour outgrowth was monitored noninvasively by bioluminescence imaging (BLI) after administration of luciferase-expressing MB49^{LUC} bladder cancer cells. The presence of tumour cells was verified histologically and immunohistochemically on paraffin wax-embedded sections of excised bladders.

RESULTS

Anti-adhesive oligopeptides effectively inhibited tumour outgrowth. BLI detected tumour cells at an early stage when there were no clinical signs of cancer in any of the mice. The technique has high sensitivity in detecting tumour cell implantation, but is less

reliable in assessing tumour volume in advanced-stage disease due to light attenuation in large tumours.

CONCLUSIONS

Peptides targeting adhesion molecules prevent attachment of bladder cancer cells to the injured bladder wall. BLI is a sensitive method for detecting luminescent bladder cancer cells in an orthotopic mouse model.

KEYWORDS

bladder cancer, bioluminescence imaging, cell adhesion, integrins, oligopeptides

INTRODUCTION

Recurrences of nonmuscle-invasive urothelial cell carcinoma after transurethral resection (TUR) are a major clinical problem in urological oncology. Several reports have indicated that the risk of recurrence is 50–70% [1,2].

Endoscopic transurethral electroresection under continuous flow irrigation, the primary therapy for nonmuscle-invasive urothelial cell carcinoma, results in release of large numbers of tumour cells [2]. The re-implantation of floating viable tumour cells to the injured bladder wall might account for the high rate of tumour recurrences.

Several trials have investigated this initial step in tumour formation by instilling cytotoxic drugs immediately after TUR to inhibit cell viability and implantation. These trials resulted in impressively reduced recurrence

rates, which matched the results seen with standard intravesical treatment courses with cytotoxic drugs [3]. An alternative treatment method would be to directly interfere with components of the extracellular matrix (ECM).

The importance of ECM proteins, particularly fibronectin, in promoting cellular attachment to the surrounding tissues was recognized in the early 1980s [4]. Several cell-surface receptors, called integrins, were identified, which mediate adhesion by binding to specific peptide epitopes residing on ECM proteins [4]. For fibronectin, the arginine-glycine-aspartic acid (RGD) tripeptide appears to be the crucial sequence for ligand-receptor interaction [5].

In the ECM of the bladder wall fibronectin, collagen, and laminin are the main promoters of cell attachment [6]. Previous studies have shown more effective inhibition of tumour cell adhesion by combining integrin receptor-blocking oligopeptides with different binding

specificities as compared with using single oligopeptides [7]. In the present study, our primary goal was to evaluate a novel mixture of oligopeptides for its anti-adhesive properties. The mixture included GRGDS, which has affinity mainly to the fibronectin receptor, but also to the collagen and laminin receptors [8,9]. Furthermore we administered EILDV, which is known to interact with the fibronectin receptor [10], and YIGSR, which has a high affinity for laminin receptors [11]. Our second objective was to use the sensitive and noninvasive bioluminescence imaging (BLI) technique to measure *in vivo* the efficacy of these oligopeptides in inhibiting adhesion of MB49^{LUC} cells to the injured bladder wall in an orthotopic murine model of bladder cancer.

MATERIALS AND METHODS

The cell cultures of murine MB49^{LUC} cell clones, stably expressing luciferase, were

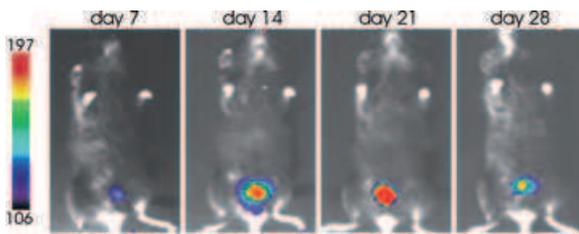
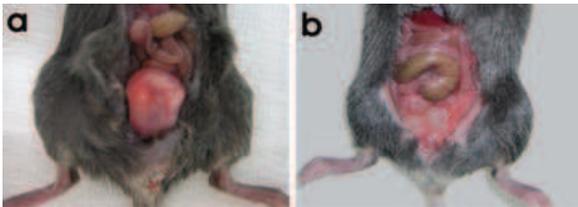


FIG. 1. Serial BL images of a control mouse. Counts on days 7, 14, 21, and 28 were 2054, 6789, 13406, and 6092, respectively. Bladder weight at day 28 was 130 mg. Histology showed extensive necrosis and haemorrhage in the tumour.

Variable	Treatment group	Controls	P
Group size, n	12	10	
Mean light emission on day 7, counts	0	8177	<0.001
Tumour take, %	16.7	90	<0.001
Mean bladder weight at death, mg	35	186	0.005

TABLE 1
Efficacy of anti-adhesive peptides in the murine orthotopic BL MB49^{LUC} bladder cancer model.

FIG. 3. Surgically exposed bladder of a control mouse (a) and a mouse treated with anti-adhesive peptides (b), photographed on day 28 after tumour implantation. Bladder weights at day 28 were 430 mg (a) and 30 mg (b), respectively.



generated by selection with geneticin as described previously [12].

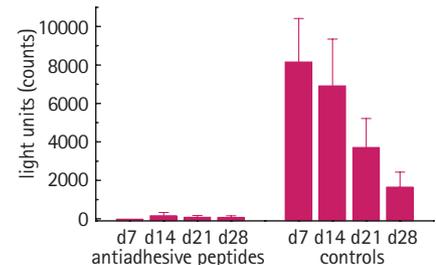
The single letter code of the peptide sequences corresponds to the following amino acids: D, aspartic acid; E, glutamic acid; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; L, leucine; P, proline; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; Y, tyrosine. For the oligopeptide mixture the therapeutic peptides used were GRGDS, EILDV, and YIGSR (Bachem Biochemica, Heidelberg, Germany), which mimicked sites of fibronectin/collagen/laminin, fibronectin, and laminin, respectively [8,9,13]. Three pentapeptides (Bachem) with unrelated specificities, DRVYI (angiotensin I/II), YIHPI (angiotensin I/II), and RYLPT (proctolin) were applied as a control.

All animal protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of Martin Luther University Halle-Wittenberg. After cauterization of the bladder 5 × 10⁴ MB49^{LUC} cells in 100 μL PBS were intravesically instilled into female C57/BL6 mice as

described previously [7], followed by intravesical administration of 100 μL oligopeptide solution. Mice in the treatment group (12 mice) were given the combination of GRGDS, YIGSR, and EILDV (3 mg/mL each) while controls (10) received the nonspecific peptides DRVYI, YIHPI, and RYLPT (3 mg/mL each). Except for three control mice, which had to be killed on days 19, 21, and 24 after tumour implantation, respectively, the mice were killed on day 28 and bladder weights were determined.

In vivo BLI with a VisiLuxe Imager (Visitron, Puchheim, Germany) was done weekly as described previously [12], starting on day 7 after tumour cell instillation. Acquisition time was 10 min and binning 6. Bioluminescent (BL) signals were quantified using Metamorph software (Visitron). All values are reported as the mean (SEM) of the integrated counts (light units) obtained from all mice within one group. In most cases excised bladders were also imaged to verify the origin of light emission.

FIG. 2. Light emission over time in the treatment group (12) and the control group (10) as quantified by BLI. The mean (SEM) values are reported and differed significantly between the groups at all four time points (d, day).



Immunohistochemistry was done on paraffin-wax sections of explanted bladders using a rabbit polyclonal anti-luciferase antibody (CR2029RAP; Europa Bioproducts, Cambridge, UK), following the method described by Lee *et al.* [14]. The haematoxylin and eosin (H&E) staining was done according to standard protocols.

Statistical analysis was done using the ANOVA and the Student's *t*-test, with *P* < 0.05 considered to indicate statistical significance.

RESULTS

Mice from the treatment group and control mice were given intravesically therapeutic or unrelated control peptides, respectively, immediately after instillation of MB49^{LUC} cells (day 0). In a preliminary study we had shown that control mice given saline and mice treated with *unspecific* oligopeptides showed no difference in bladder weight and survival. As we had found previously that no BL signals were detectable immediately after intravesical administration of 5 × 10⁴ MB49^{LUC} cells, mice were first imaged on day 7 after tumour cell implantation (Fig. 1). While no BL signals were detectable in any of the 12 treated mice, 9 of 10 control mice showed photon emission on day 7 (*P* < 0.001). The mean counts (light units) in the control group were 8177 (Table 1, Fig. 2). There were no clinical signs of cancer in any of the mice at this time, underscoring the high sensitivity of BLI in detecting tumours at this early stage of disease.

BL signals, which decreased over time, were detected in one of 12 mice in the treatment group on days 14, 21, and 28 while light emission continued to be negative in the

remaining mice of this group. The bladder weight in this mouse was 80 mg on day 28 while the bladder weights in the remaining mice were 20–50 mg (Fig. 3b). Histology and immunohistochemistry for luciferase on paraffin wax-embedded sections of explanted bladders confirmed the presence of a small tumour in the mouse that had shown light emission. A very small tumour cell nest was also identified by histology and immunohistochemistry in another mouse of the treatment group, that had not had any photon emission throughout the study (bladder weight on day 28 was 30 mg). All the other bladders were histologically tumour-free, indicating that tumour cell implantation was successfully inhibited by anti-adhesive peptides in 10 of the 12 mice in the treatment group.

All control mice with detectable light signals on day 7 (nine mice) showed continuous photon emission from the bladder region at all subsequent imaging time points while signals in the mouse that had not demonstrated light emission on day 7 continued to be negative, suggesting that tumour cell implantation in this mouse had not been successful. The mean counts in the control group on days 14, 21, and 28 were 6973, 3728, and 1670, respectively, and differed significantly from the respective mean counts (178, 101, and 95) in treated mice at all time points ($P = 0.006, 0.009, \text{ and } 0.018$, respectively, Figs 1 and 2). The mean bladder weight in the control group was 186 mg vs 35 mg in the treated mice ($P = 0.005$), and bladder weights ranged from 25 mg (in the mouse with no BL signals) to 430 mg (Fig. 3). Within the control group there was no significant correlation between bladder weight and BL signals, indicating that light emission confirms the presence of viable tumour cells but, especially at later time points, does not necessarily accurately reflect tumour volume. Explanted bladders were cut and re-imaged with the cut-side facing the camera. BLI indicated reduced light emission from necrotic and haemorrhagic areas as compared with vital tumour areas (Fig. 4a). Histological analysis confirmed deep muscle-invasive cancer, extensive necrosis, haemorrhage, and infiltration of host cells in large tumours (Fig. 4b,c); areas which contribute to tumour volume but not to BL. Immunohistochemistry showed scarce staining for luciferase in these regions while vital tumour tissue strongly expressed luciferase (Fig. 4b,c). Luciferase-labelled

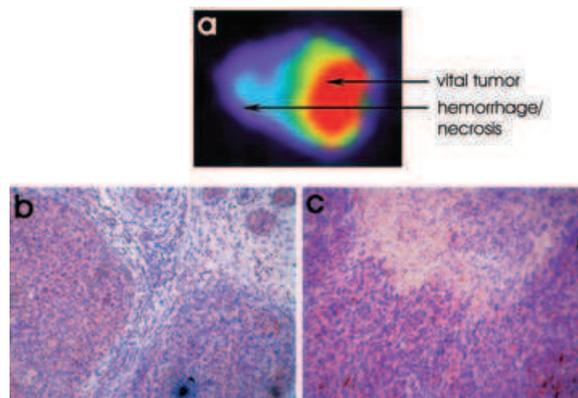


FIG. 4. Ex vivo BLI (a) of the explanted and cut bladder shown also in Fig. 2(a). Obviously necrotic tumour areas emitted less light than vital tumour tissue. Immunohistochemistry for luciferase (b and c) on corresponding paraffin wax-embedded sections show luciferase-positive tumour cells surrounded by infiltrating host cells (b) and large areas of necrosis (c).

tumour cells were identified by immunohistochemistry in all mice showing photon emission by BLI before death.

DISCUSSION

The ECM of the bladder consists of adhesion molecules, such as fibronectin, laminin, and collagen, for which a multitude of receptors are expressed on the cell surface [5,15,16]. Thus, blockage by single *monospecific* anti-adhesive peptides can lead to ineffective inhibition of tumour cell adhesion. Based on our previous findings, showing that combinations of oligopeptides blocked cell attachment to the ECM more effectively [7], we examined a novel polyvalent fibronectin/collagen/laminin-related peptide mixture consisting of GRGDS, EILDV, and YIGSR [8–11,13]. As fibronectin seems to be a key player of the ECM in mediating cell adhesion, we used two different oligopeptides, GRGDS and EILDV, to block different fibronectin receptor epitopes. See *et al.* [16] showed that GRGDS significantly decreased bladder cancer cell adhesion to fibronectin *in vitro*. However, *in vivo*, GRGDS alone failed to inhibit cell attachment and tumour outgrowth. Hyacinthe *et al.* [17] used an adhesion assay with mixed matrices: GRGDS inhibited cell attachment *in vitro* and also significantly reduced cell adhesion in a murine bladder cancer model when given intravesically. These authors administered GRGDS at a 10-fold higher concentration compared with See *et al.* [16].

EILDV had shown efficacy in inhibiting bladder cell adhesion on a fibronectin monomatrix, while in the natural environment of the murine bladder EILDV alone was ineffective in inhibiting tumour

outgrowth [7]. Yamamoto *et al.* [18] reported a significant anti-metastatic effect of YIGSR and an even stronger effect of EILDV in a melanoma model *in vivo*. EILDV and/or RGD also significantly reduced endodermal cell migration [19], while YIGSR and RGD inhibited adhesion of gastric cancer cells to ECM and prolonged survival in a murine i.p. gastric cancer model [20]. YIGSR also reduced the invasive potential of human lung cancer cells *in vitro* and inhibited lung metastasis in a murine model [13]. Altogether, these data prompted us to test a novel combination of the anti-adhesive peptides GRGDS, EILDV, and YIGSR for its potency in inhibiting bladder cancer cell attachment *in vivo*. This peptide mixture successfully inhibited bladder cancer outgrowth in 10 of 12 mice, suggesting that direct blockade of adhesion receptors might be a valuable treatment option for reducing recurrences after TUR.

Due to the impossibility of measuring tumour size by calliper in orthotopic bladder cancer, therapeutic effects are usually assessed by clinical symptoms and 'endpoint variables' such as survival time, bladder weight, and histological analysis of explanted bladders [21]. In the present study, we examined whether BLI is a suitable method for detecting orthotopically implanted bladder cancer cells at an early time point and might be used to monitor tumour growth and therapeutic efficacy noninvasively over time. In the present study there was effective inhibition of tumour cell implantation to the injured bladder wall by anti-adhesive oligopeptides as early as day 7 after tumour implantation. To our knowledge, this is the first syngeneic, BL bladder cancer model to be reported. BLI allows for repetitive imaging of multiple mice in parallel, which reduces statistical variability and the number of mice needed per

experiment. In a previous BLI study we showed that emitted photons tightly correlate with tumour volume up to a certain tumour size, beyond which correlation appears to be much less reliable [12]. Features such as necrosis, haemorrhage, muscle invasion of cancer cells, and tumour infiltration of host cells contribute to tumour size but not to light emission, as we clearly show also in the present study (Fig. 4). In addition, intratumoral distribution of vessels, oxygen, and the luciferase substrate luciferin becomes more heterogeneous with increasing tumour size.

The sensitivity for detecting the weak BL light originating from tumour cells in a living body is mainly influenced by cellular luciferase activity and localization of the luciferase-expressing tumour cells. The MB49^{Luc} cells we used had high luciferase activity as determined luminometrically. In cell culture experiments the lower detection limit for BLI was 1000 MB49^{Luc} cells (data not shown).

The main obstacles for reliably quantifying photon emission *in vivo* are scattering and absorption of light by tissues, predominantly caused by haemoglobin [22]. The histological features described above might explain why in the present study all mice that had BL signals on day 28 also showed the lowest light emission on this day, while photon emission had been up to 10-fold higher on days 7 or 14, respectively (Fig. 2). Light absorption by tissue, dark fur, and dark pigmented skin as seen in the C57/BL6 mice we used might have contributed to the fact that BLI failed to detect tumour cells on day 0. Recently, the use of human BL bladder cancer cells in orthotopic tumour models has been reported [23–25]. Smakman *et al.* [25] administered i.p. a cyclooxygenase-2 inhibitor while intravesically instilled bisphosphonates and polo-like kinase small interfering RNAs, respectively, were tested by Sato *et al.* [24] and Nogawa *et al.* [23].

Although experimental differences limit comparability with the present data, these studies corroborate our main findings: therapeutic efficacy corresponds to significantly less mean photon emission in treated mice as compared with control mice. Both Sato *et al.* [24] and Nogawa *et al.* [23] implanted 2×10^6 (40-fold our dose) UM-UC-3^{Luc} cells. BL signals were first detectable on day 4, underscoring that BLI cannot detect luminescent cells immediately after

intravesical administration. Both studies are terminated at day 21. Nogawa *et al.* [23] show a strong linear increase in light emission from day 12 to day 18, but do not present data thereafter, while Sato *et al.* [24] report a strong increase between days 15 and 18, followed by a plateau phase until day 21. This plateau also suggests that tumour growth and BL signals correlate less well in advanced disease. Thus, BLI loses some of its power as a *quantitative* method for assessing tumour burden as cancer progresses, but still retains its power as a *qualitative* technique.

Smakman *et al.* [25] injected 6×10^5 human BL T24 TCC cells into the bladder dome of nude mice. Notably, T24 cells are thought to have only limited use for *in vivo* experiments as they lack tumorigenicity [26]. Control mice showed a linear increase in mean photon emission until closure of the study on day 56, which differed significantly at all time points from that of the treatment group. BLI was first done on day 28, a time point at which the present study had to be closed for ethical reasons and three of our control mice (bladder weights: 310, 370, and 380 mg) were already dead. Histological analysis did not reveal any invasion of the muscle layer by T24 cells, which indicates that the xenogeneic T24 tumour grows far less aggressively than bladder cancer in humans and the syngeneic model we used and thus allowed for a longer observation period.

In summary, BLI is a valuable tool for assessing therapeutic efficacy in murine models of orthotopic bladder cancer. BLI confirms intravesical implantation of bladder cancer cells at an early stage, which also allows randomization of mice into different groups before starting anticancer therapies. The present data verify that specific combinations of anti-adhesive peptides effectively prevent cell attachment and thus subsequent invasion and growth of bladder cancer cells, indicating that this therapeutic approach might contribute in reducing the recurrence rate of bladder cancer after TUR.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jana Schneider for excellent technical assistance and Helge Taubert and Matthias Kappler for continuous support. This work was supported by the Else Kröner-Fresenius foundation and the NBL3/Wilhelm Roux research programme.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

- 1 Hisataki T, Miyao N, Masumori N *et al.* Risk factors for multiple intravesical recurrences of superficial bladder cancer. *Urology* 2001; **58**: 935–9
- 2 Akagashi K, Tanda H, Kato S *et al.* Recurrence pattern for superficial bladder cancer. *Int J Urol* 2006; **13**: 686–91
- 3 Langbein S, Hacker A, Badawi JK, Michel MS, Alken P. [Early instillation in superficial bladder carcinoma. Current status]. *Urologe A* 2004; **43**: 1531–6
- 4 Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984; **309**: 30–3
- 5 Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 697–715
- 6 Jost SP, Gosling JA, Dixon JS. The morphology of normal human bladder urothelium. *J Anat* 1989; **167**: 103–15
- 7 Bohle A, Jurczok A, Ardelt P *et al.* Inhibition of bladder carcinoma cell adhesion by oligopeptide combinations *in vitro* and *in vivo*. *J Urol* 2002; **167**: 357–63
- 8 Aumailley M, Gerl M, Sonnenberg A, Deutzmann R, Timpl R. Identification of the Arg-Gly-Asp sequence in laminin A chain as a latent cell-binding site being exposed in fragment P1. *FEBS Lett* 1990; **262**: 82–6
- 9 Pfaff M, Aumailley M, Specks U, Knolle J, Zerwes HG, Timpl R. Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI. *Exp Cell Res* 1993; **206**: 167–76
- 10 Litynska A, Przybylo M, Pochec E, Laidler P. Adhesion properties of human bladder cell lines with extracellular matrix components: the role of integrins and glycosylation. *Acta Biochim Pol* 2002; **49**: 643–50
- 11 Graf J, Ogle RC, Robey FA *et al.* A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67,000 laminin receptor. *Biochemistry* 1987; **26**: 6896–900
- 12 Soling A, Theiss C, Jungmichel S, Rainov NG. A dual function fusion

- protein of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and firefly luciferase for noninvasive *in vivo* imaging of gene therapy in malignant glioma. *Genet Vaccines Ther* 2004; **2**: 7
- 13 Iwamoto Y, Robey FA, Graf J *et al*. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science* 1987; **238**: 1132–4
 - 14 Lee SY, Wang Z, Lin CK *et al*. Regulation of intestine-specific spatiotemporal expression by the rat lactase promoter. *J Biol Chem* 2002; **277**: 13099–105
 - 15 Gardiner RA, Seymour GJ, Lavin MF, Strutton GM, Gemmell E, Hazan G. Immunohistochemical analysis of the human bladder. *Br J Urol* 1986; **58**: 19–25
 - 16 See WA, Rohlf DP, Crist SA. *In vitro* particulate adherence to fibronectin. correlation with *in vivo* particulate adherence to sites of bladder injury. *J Urol* 1992; **147**: 1416–23
 - 17 Hyacinthe LM, Jarrett TW, Gordon CS, Vaughan ED, Whalen GF. Inhibition of bladder tumor cell implantation in cauterized urothelium, without inhibition of healing, by a fibronectin-related peptide (GRGDS). *Ann Surg Oncol* 1995; **2**: 450–6
 - 18 Yamamoto S, Kaneda Y, Okada N *et al*. Antimetastatic effects of synthetic peptides containing the core sequence of the type III connecting segment domain (IIICS) of fibronectin. *Anticancer Drugs* 1994; **5**: 424–8
 - 19 Singleton C, Menino AR. Effects of inhibitors of integrin binding on cellular outgrowth from bovine inner cell masses *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2005; **41**: 29–37
 - 20 Matsuoka T, Hirakawa K, Chung YS *et al*. Adhesion polypeptides are useful for the prevention of peritoneal dissemination of gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 1998; **16**: 381–8
 - 21 Günther JH, Jurczok A, Wulf T *et al*. Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res* 1999; **59**: 2834–7
 - 22 Colin M, Moritz S, Schneider H, Capeau J, Coutelle C, Brahim-Horn MC. Haemoglobin interferes with the *ex vivo* luciferase luminescence assay: consequence for detection of luciferase reporter gene expression *in vivo*. *Gene Ther* 2000; **7**: 1333–6
 - 23 Nogawa M, Yuasa T, Kimura S *et al*. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 2005; **115**: 978–85
 - 24 Sato K, Yuasa T, Nogawa M *et al*. A third-generation bisphosphonate, minodronic acid (YM529), successfully prevented the growth of bladder cancer *in vitro* and *in vivo*. *Br J Cancer* 2006; **95**: 1354–61
 - 25 Smakman N, Schaap N, Snijckers CM, Borel RI, Kranenburg O. NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, reduces experimental bladder carcinoma outgrowth by inhibiting tumor cell proliferation. *Urology* 2005; **66**: 434–40
 - 26 Gildea JJ, Golden WL, Harding MA, Theodorescu D. Genetic and phenotypic changes associated with the acquisition of tumorigenicity in human bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; **27**: 252–63
- Correspondence:** Ariane Söling, Department of Paediatrics 1, Georg August University Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, D-37075 Göttingen, Germany.
e-mail: asoeling@med.uni-goettingen.de
- Abbreviations:** TUR, transurethral resection; ECM, extracellular matrix; BL, bioluminescent; BLI, bioluminescence imaging.



From Lab to Clinic

Inhibition of Tumor Implantation after Laparoscopy by Specific Oligopeptides: A Novel Approach to Adjuvant Intraperitoneal Therapy to Prevent Tumor Implantation in an Animal Model

Andreas Jurczok^{*}, Astrid Schneider, Paolo Fornara

Department of Urology, Medical Faculty, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany

Article info

Article history:

Accepted October 23, 2006

Published online ahead of print on November 2, 2006

Keywords:

Adhesion
 Laparoscopy
 Metastasis
 Mitomycin
 Oligopeptides
 Port-site metastasis
 Urothelial cancer

Abstract

Objectives: The development of intra-abdominal tumor spread and port-site metastases in urothelial cancer are still questions regarding the safety of laparoscopic methods for the resection of malignancies. Currently, the actual incidence of intra-abdominal tumor spread and port-site metastasis remains unknown. Herein, we investigated the influence of antiadhesive oligopeptides and cytotoxic agents (administered intraperitoneally) on implantation of a tumor cell suspension after laparoscopic surgery in an experimental model.

Methods: Forty C57 bl6 mice underwent laparoscopy with CO₂ insufflation and instillation of a MB 49 syngenic urothelial tumor cell suspension into the abdominal cavity. Mice were randomly allocated to one of the following groups ($n = 10$ mice per group), and all agents were administered intraperitoneally: (1) control (phosphate-buffered saline); (2) unspecific oligopeptides; (3) specific oligopeptides; (4) mitomycin. The mice were sacrificed 14 d after the procedure, and the peritoneal cavity and port sites examined for the presence of tumor.

Results: A significant reduction in tumor implantation and port-site metastases was observed in all treatment groups (specific oligopeptides and mitomycin). The oligopeptide group showed the best performance regarding body weight.

Conclusions: This study suggests that tumor implantation after laparoscopic surgery and port-site metastases might be prevented by the intraperitoneal administration of specific oligopeptides or cytotoxic agents. Moreover, oligopeptides, in comparison with mitomycin, caused less weight loss of the mice.

© 2006 European Association of Urology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

^{*} Corresponding author. Department of Urology, Medical Faculty, Martin Luther University, Halle-Wittenberg, Ernst-Grube-Str. 40 06120 Halle/Saale, Germany. Tel. +49 345 557 1415; Fax: +49 345 557 1233.

E-mail address: andreas.jurczok@medizin.uni-halle.de (A. Jurczok).

1. Introduction

The role of minimally invasive surgery for the treatment of renal cancer is well established [1]. Nevertheless, the biologic behavior of urothelial cell carcinoma (UCC) is dissimilar, and a higher risk of cell implantation and the development of port-site metastasis exist. Thus, port-site metastases have been reported following staging of bladder carcinoma, with an incidence of almost 4%, and following nephrectomy for UCC [2,3]. To the best of our knowledge, there are no experimental data available regarding port-site metastases and intra-abdominal tumor spread in UCC. Although the mechanism of wound contamination with viable tumor cells remains controversial [4,5], it has been suggested that the use of intraperitoneal cytotoxic agents as adjuvant therapy may prevent tumor implantation by killing tumor cells that have been liberated by laparoscopic manipulation [6]. Previous studies have demonstrated the effective inhibition of tumor cell implantation in the urinary bladder with the use of a combination of peptides that block integrin receptors [7]. This modern approach to prevent tumor implantation in a very specific way is applied to investigate the issue of port-site metastasis in urothelial cancer. To further investigate the role of specific receptor blockade and cytotoxic agents, an experimental laparoscopic model, which entailed an intraperitoneal tumor suspension and intraperitoneal therapeutic agents, was employed to investigate postlaparoscopy tumor dissemination and implantation.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Six- to 8-week-old female C57/BL6 mice, weighing approximately 17 g, were purchased from Charles River, Germany, and maintained at our animal care facility for 1 wk prior to use. The mice were housed, five per cage, in a limited access area at a room temperature of 20 ± 1 °C and a humidity of $50\% \pm 10\%$ with food and water *ad libitum*. All animal protocols were approved by the Animal Care and Use Committee, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Germany.

2.2. Tumor cells

MB49 cells were harvested by trypsination and suspended in DMEM without L-glutamine, FCS, and antibiotics. Viability was determined by trypan blue exclusion, and only tumor cell suspensions with more than 90% viable cells were used for tumor implantation. The tumor cell suspension for implantation was adjusted to 2×10^5 cells per 0.5 ml.

2.3. Treatment agents

Oligopeptides GRGDS, EILDV, and YIGSR, as antiadhesion molecules duplicating sites of fibronectin/collagen (GRGDS), fibronectin (EILDV), and laminin (YIGSR), and three pentapeptides with unrelated specificities (DRVYI, angiotensin I/II, amino acids 1–5; YIHPI, angiotensin I/II, amino acids 4–8; RYLPT, proctolin), as unspecific controls, were purchased as lyophilisates (Bachem Biochemica, Heidelberg, Germany). GRGDS and YIGSR were solubilized in phosphate-buffered saline (PBS). EILDV was solubilized in acetic acid, neutralized, and subsequently diluted to experimental concentrations with the use of PBS. In accordance with results from recent studies concerning local treatment of bladder cancer, a combination of peptides (GRGDS+EILDV+YIGSR/DRVYI+YIHPI+RYLPT) (3 mg of each peptide in 1 ml solvent) was used [7]. Mitomycin, known for local treatment of bladder cancer, was used at a concentration of 2.5 mg/kg with a total dose of 0.05 mg in 200 μ l per mouse [8].

2.4. Animal model

A 20-G intravenous cannula was inserted into the left lower quadrant and used as an insufflation needle. A 20-G intravenous cannula was inserted into the right lower quadrant and used for the measurement of intraperitoneal pressure. Disposable syringes (20 and 50 ml) were used to inject the gas (CO₂). A syringe pump was used for continuous gas insufflation. Intraperitoneal pressure was measured as the distance between the right and left levels of water in the U-shaped tube (Fig. 1). A continuous pressure between 8 and 10 cm H₂O was achieved with this system [9].

2.5. Treatment protocol

The effect of antiadhesive oligopeptides and mitomycin on the development of port-site metastasis was examined in 40 mice. Pneumoperitoneum was established, and all mice received an intraperitoneal injection of 2×10^5 MB 49 cancer cells in 0.5 ml of PBS at the lower midline of the abdomen. After 30 min of pneumoperitoneum, the treatment solution was injected at a volume of 0.5 ml, and pneumoperitoneum was maintained for a further 5 min. The mice were randomized into four groups ($n = 10$ mice per group), and all agents were administered intraperitoneally: (1) control (PBS); (2) unspecific oligopeptides; (3) specific oligopeptides; (4) mitomycin.

Mice were visited daily to check their viability status. Body weight was measured before treatment, after 1 wk, and after 2 wk. Two weeks after the procedures, the mice were killed, the tumor was spread, and development of port-site metastases was measured. The abdomen was divided into six sectors (Fig. 2). Peritoneal tumor deposits in each sector were assessed and scored by using the peritoneal cancer index proposed by Eggermont et al. [10]: 0 = no intraperitoneal tumor; I = less than three minute tumor foci; II = moderate tumor; III = abundant or confluent tumor. Representative samples were examined histologically to confirm the macroscopic assessment. The port sites were also examined specifically for macroscopic evidence of tumor implantation.

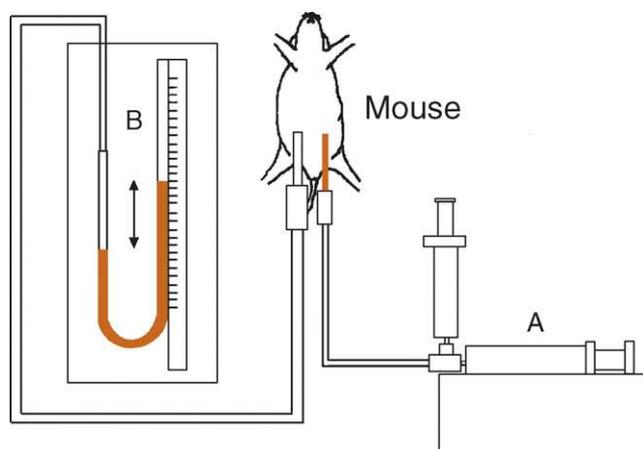


Fig. 1 – A 20-G intravenous cannula was inserted into the left lower quadrant and used as an insufflation needle. A 20-G intravenous cannula was inserted into the right lower quadrant and used for measurement of intraperitoneal pressure. Disposable syringes (20 and 50 ml) were used to inject the gas (CO_2). A syringe pump was used for continuous gas insufflation. Intraperitoneal pressure was measured as the distance between the right and left levels of water in the U-shaped tube. A continuous pressure between 8 and 10 cm H_2O was achieved with this system.

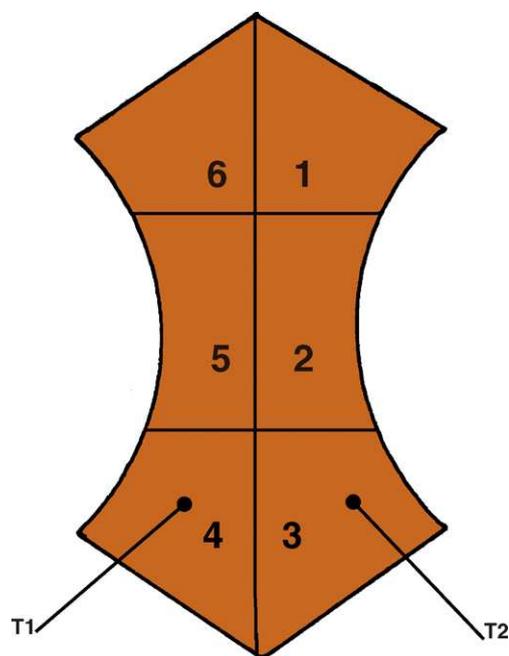


Fig. 2 – The abdomen was divided into six sectors. Peritoneal tumor deposits in each sector were assessed and scored by using the peritoneal cancer index proposed by Eggermont et al. [10]: 0 = no intraperitoneal tumor; I = less than three minute tumor foci; II = moderate tumor; III = abundant or confluent tumor.

2.6. Statistics

The chi-square and Fisher exact probability tests were used for the analysis of the data sets expressed as contingency tables, and a one-way analysis of variance was used for the assessment of mouse weights. On the basis of a power of 0.8 and a significance level of $p < 0.05$, a group size of 8–10 animals in each arm was recommended.

3. Results

3.1. Body weight

The preoperative weights of the mice in each group were similar ($p > 0.05$). Mice in the specific oligopeptide group gained more weight as a percentage compared with the other groups ($p < 0.001$). The mitomycin group lost weight compared with the

control groups ($p < 0.05$) and also compared with the specific oligopeptide group ($p < 0.001$; Table 1).

3.2. Tumor outgrowth

Tumor implantation is summarized in Tables 2 and 3. Eight mice in the specific oligopeptide group and seven mice in the intraperitoneal mitomycin group were totally free of tumors. All mice in the remaining groups developed tumors within the peritoneal cavity. A reduction in tumor growth was observed in all treatment groups: specific oligopeptide and mitomycin ($p < 0.0001$; chi square; Table 2). In the specific oligopeptide group, 87% of sectors had no visible tumor growth compared with 12% in the control group ($p < 0.0001$; Fisher exact test). Mice in the mitomycin group also had significantly more

Table 1 – Mice weight after treatment

	Control (PBS)	Nonspecific peptides	Specific peptides	Mitomycin
Weight at surgery	19.8 (17.2–20.4)	18.7 (17.0–20.9)	18.5 (17.1–20.7)	19.2 (17.5–20.0)
Weight at day 14	19.6 (18.2–20.1)	18.4 (17.9–19.9)	20.7 (19.9–21.2)	18.1 (17.1–19.3)
% increase in weight	–1%	–1.6%	11.9%	–5.7%

PBS = phosphate-buffered saline.

Values are medians (ranges), in grams.

Table 2 – Peritoneal tumor index

Grade	Control (PBS) (n = 10)	Nonspecific peptides (n = 10)	Specific peptides (n = 10)	Mitomycin (n = 10)
0 (no tumor)	7	5	52	50
I	14	15	5	6
II	22	21	2	2
III	17	19	1	2
Total no. of sectors with tumor (all grades)	53/60 (88%)	55/60 (92%)	8/60 (13%)	10/60 (17%)

PBS = phosphate-buffered saline.

Table 3 – Sector analysis of tumor involvement

Sector	PBS (control)	Nonspecific peptides	Specific peptides	Mitomycin	Total
1	10	9	2	2	23
2	8	11	1	1	21
3	12	5	1	3	21
4	7	8	2	1	18
5	11	10	1	2	24
6	5	12	1	1	19
Total	53/60 (88%)	55/60 (92%)	8/60 (13%)	10/60 (17%)	126/240 (52%)

PBS = phosphate-buffered saline.

sectors free of visible tumors compared with controls (83%; $p < 0.0001$). Tumor growth was not significantly reduced in the unspecific oligopeptide group or in the PBS group ($p > 0.05$). There was no predilection for tumor growth to occur around the site of introduction of the tumor cell suspension, and tumor distribution was similar in all sectors (Table 3). Tumor metastasis to the port sites occurred less frequently in the specific oligopeptide and mitomycin group compared with the unspecific oligopeptide and PBS group ($p < 0.0001$; chi square; Table 4). None of the animals showed adhesion formation in the abdomen, ascites, other signs of peritonitis, or delayed healing of the port sites. There were no septic problems observed in any group: The vitality of the mitomycin mice was a little reduced compared with the other groups; however, no mice died during this study.

4. Discussion

The precise incidence of port-site metastases remains uncertain. Regarding urology, Micali et al.

[11] showed that the incidence of tumor seeding after laparoscopic oncologic surgery is rare and appears similar to the historically reported rate for open surgery. Tumor seeding appears to be most commonly related to the removal of high-grade tumors and deviation from oncologic surgical principles [11]. Remarkably, 50 centers were contacted for this survey and 19 sites were elected to participate. Thus, there may be an uncertain number of existing port-site metastases not appearing in this study. An adjuvant therapy option to prevent intraperitoneal tumor spread may be helpful in case of accidental opening of the collecting system.

The risk of tumor implantation after laparoscopic procedures concerning UCC is well-known, with a higher risk of cell implantation associated with UCC compared with, for example, renal or prostate cancer [12–14]. Relative to the biologic behavior of the tumor, hematogenous development of port-site metastases was described [15]. In most cases viable tumor cells may contaminate laparoscopic wounds by direct transfer from laparoscopic instruments or by aerosolization of malignant cells liberated into the peritoneal cavity during the period of pneumoperitoneum [16]. For this reason, the use of intraperitoneal chemotherapy to prevent port-site metastases after laparoscopic resection of malignancy has been suggested [6]. The use of an intraperitoneal chemotherapeutic agent immediately after laparoscopic surgery may achieve optimal

Table 4 – The number of port sites with tumor present

PBS (control)	Nonspecific peptides	Specific peptides	Mitomycin
19/20	18/20	2/20	3/20

PBS = phosphate-buffered saline.

killing of viable intraperitoneal cells, thereby preventing implantation into raw peritoneal surfaces such as port sites [17]. However, since only a small number of viable tumor cells implanting at the port site may result in a metastasis [18], the dose and timing of any agent used is critical. Potential advantages of intraperitoneal chemotherapy include the achievement of direct contact between tumor cells and the tumoricidal agent used as well as beneficial alterations to cell kinetics [19]. In addition, peritoneal administration might achieve an even distribution of the agent throughout the peritoneal cavity and prolonged exposure time owing to slower clearance compared with systemic therapy. Abaza et al. [20] demonstrated a highly effective inhibition of peritoneal urothelial tumor cell implantation by intraperitoneal administration of mitomycin in a murine model for open surgery. Recent clinical studies clearly demonstrated the feasibility and efficacy of intraperitoneal instillation chemotherapy with taxanes in patients with ovarian cancer. Preliminary results of a phase 3 study showed an improved outcome with the addition of intraperitoneal instillation chemotherapy to systemic chemotherapy after optimal primary cytoreductive surgery [21].

The systemic uptake of intraperitoneally administered drugs is dependent on exposure time and, in particular, on intra-abdominal pressure [22]. A high intra-abdominal pressure enhances the systemic drug absorption [23], which is possibly a further advantage of intraperitoneal drug administration during laparoscopy. However, intraperitoneal chemotherapy causes severe side effects comparable to systemic chemotherapy [24]. For this reason, a specific inhibition of tumor cell implantation with receptor-blocking oligopeptides [7] was used in a murine model for laparoscopic-induced port-site metastasis and compared with a commonly used chemotherapeutic agent for local treatment of UCC: mitomycin. There are no published data on the intraperitoneal use of combination of oligopeptides. Several publications exist for experimental intraperitoneal application of single oligopeptides [25]. We transferred our experiences from the orthotopic bladder cancer model [7] to the intraperitoneal use. In the bladder cancer model the combination of different oligopeptides showed the highest effect in inhibition of cell adhesion.

The results of the current study demonstrate a significant reduction in peritoneal tumor implantation after the use of intraperitoneal oligopeptides and mitomycin. In addition, the study also demonstrates a reduction in the incidence of port-site metastases. Notably, this reduction was achieved

even though the agents used were administered 30 min after introducing tumor cells into the peritoneal cavity followed by instillation of the therapeutic solution for 5 min. This approach is an empiric schedule similar to that used in the clinical situation and requires validation in further studies.

In the human situation, port-site metastases are mostly related to laparoscopy; however, local tumor recurrence or intraperitoneal tumor spread may also occur as a result of laparoscopic procedures [26].

The results of this study suggest that the tumoricidal effects of these agents, used at the appropriate dose, may reduce the number of viable tumor cells in the peritoneal cavity and prevent the implantation of viable cells, and that this strategy may be applicable even when unexpected malignancy is encountered during laparoscopic surgery.

The possibility of adverse effects of cytotoxic agents such as mitomycin on wound and anastomotic healing might be questioned, and severe side effects after local therapy of bladder tumors have been previously reported [27-30]. Herein, in contrast to oligopeptide therapy, mitomycin resulted in significant weight loss following intraperitoneal administration, suggesting the possibility of adverse systemic effects. This issue must be carefully considered before similar strategies are applied clinically. An effective inhibition of bladder cancer cell implantation by oligopeptides in an orthotopic murine bladder cancer model was previously shown [7]. Thus, a clinical study in early instillation therapy to prevent bladder cancer recurrences would realistically require an adequate number of patients to perform phase 1 and phase 2 trials. In intraperitoneal drug administration, a phase 1 study based on an empiric transfer of the "bladder data" to the intraperitoneal approach might be possible, too. However, there would probably not be enough patients available for a significant study concerning port metastases.

The results of our study do, however, suggest that both of these strategies can reduce laparoscopy-associated tumor implantation, although the doses administered and the duration of exposure for each agent will need to be investigated further to minimize the risk of adverse outcomes. Mitomycin appears to prevent tumor spread and is equally effective and less costly; however, toxic effects probably would be greater with mitomycin than with oligopeptides regarding mice weight in this study.

Inhibition of tumor cell adhesion by specific oligopeptides is a highly effective method with

great potential not only for preventing port-site metastases, but also for other carcinomas with an intrinsic risk of tumor cell seeding.

Conflicts of interest

The authors have nothing to disclose.

References

- [1] Fenn NJ, Gill IS. The expanding indications for laparoscopic radical nephrectomy. *BJU Int* 2004;94:761–5.
- [2] Ahmed I, Shaikh NA, Kapadia CR. Track recurrence of renal pelvic transitional cell carcinoma after laparoscopic nephrectomy. *Br J Urol* 1998;81:319.
- [3] Otani M, Irie S, Tsuji Y. Port site metastasis after laparoscopic nephrectomy: unsuspected transitional cell carcinoma within a tuberculous atrophic kidney. *J Urol* 1999;162:486–7.
- [4] Brundell S, Tsopelas C, Chatterton B, Touloumtzoglou J, Blefari C, Hewett PJ. Effect of port composition on tumor cell adherence: an in vivo model. *Dis Colon Rectum* 2003;46:637–42.
- [5] Lee SW, Gleason NR, Bessler M, Whelan RL. Port site tumor recurrence rates in a murine model of laparoscopic splenectomy decreased with increased experience. *Surg Endosc* 2000;14:805–11.
- [6] Neuhaus SJ, Watson DI, Ellis T, Rofe AM, Jamieson GG. Influence of cytotoxic agents on intraperitoneal tumor implantation after laparoscopy. *Dis Colon Rectum* 1999;42:10–5.
- [7] Bohle A, Jurczok A, Ardelt P, et al. Inhibition of bladder carcinoma cell adhesion by oligopeptide combinations in vitro and in vivo. *J Urol* 2002;167:357–63.
- [8] Molyneux G, Gibson FM, Gordon-Smith EC, et al. The haemotoxicity of mitomycin in a repeat dose study in the female CD-1 mouse. *Int J Exper Pathol* 2005;86:415–30.
- [9] Suematsu T, Shiromizu A, Yamaguchi K, Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S. Convenient murine pneumoperitoneal model for the study of laparoscopic cancer surgery. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 1999;9:279–81.
- [10] Eggermont AM, Steller EP, Marquet RL, Jeekel J, Sugarbaker PH. Local regional promotion of tumor growth after abdominal surgery is dominant over immunotherapy with interleukin-2 and lymphokine activated killer cells. *Cancer Detect Prev* 1988;12:421–9.
- [11] Micali S, Celia A, Bove P, et al. Tumor seeding in urological laparoscopy: an international survey. *J Urol* 2004;171:2151–4.
- [12] Otani M, Irie S, Tsuji Y. Port site metastasis after laparoscopic nephrectomy: unsuspected transitional cell carcinoma within a tuberculous atrophic kidney. *J Urol* 1999;162:486–7.
- [13] Tsivian A, Sidi AA. Port site metastases in urological laparoscopic surgery. *J Urol* 2003;169:1213–8.
- [14] Stolla V, Rossi D, Bladou F, Rattier C, Ayuso D, Serment G. Subcutaneous metastases after coelioscopic lymphadenectomy for vesical urothelial carcinoma. *Eur Urol* 1994;26:342–3.
- [15] Highshaw RA, Vakar-Lopez F, Jonasch E, Yasko AW, Matin SF. Port-site metastasis: the influence of biology. *Eur Urol* 2005;47:357–60.
- [16] Bouvy ND, Marquet RL, Jeekel H, Bonjer HJ. Impact of gas(less) laparoscopy and laparotomy on peritoneal tumor growth and abdominal wall metastases. *Ann Surg* 1996;224:694–700.
- [17] Jacquet P, Sugarbaker PH. Wound recurrence after laparoscopic colectomy for cancer. New rationale for intraoperative intraperitoneal chemotherapy. *Surg Endosc* 1996;10:295–6.
- [18] Wade TP, Comitalo JB, Andrus CH, Goodwin Jr MN, Kaminski DL. Laparoscopic cancer surgery. Lessons from gallbladder cancer. *Surg Endosc* 1994;8:698–701.
- [19] Fisher B, Gunduz N, Saffer EA. Influence of the interval between primary tumor removal and chemotherapy on kinetics and growth of metastases. *Cancer Res* 1983;43:1488–92.
- [20] Abaza R, Keck RW, Selman SH. Intraperitoneal chemotherapy for the prevention of transitional cell carcinoma implantation. *J Urol* 2006;175:2317–22.
- [21] de BE, Rosing H, Michalakis J, et al. Intraperitoneal chemotherapy with taxanes for ovarian cancer with peritoneal dissemination. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:666–70.
- [22] Raymond MA, Hu B, Garcia A, et al. Feasibility of therapeutic pneumoperitoneum in a large animal model using a microvaporisator. *Surg Endosc* 2000;14:51–5.
- [23] Jacquet P, Stuart OA, Chang D, Sugarbaker PH. Effects of intra-abdominal pressure on pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin after intraperitoneal administration. *Anticancer Drugs* 1996;7:596–603.
- [24] Witjes JA, Wullink M, Oosterhof GO, de MP. Toxicity and results of MVAC (methotrexate, vinblastine, adriamycin and cisplatin) chemotherapy in advanced urothelial carcinoma. *Eur Urol* 1997;31:414–9.
- [25] Matsuoka T, Hirakawa K, Chung YS, et al. Adhesion poly-peptides are useful for the prevention of peritoneal dissemination of gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:381–8.
- [26] Paolucci V, Schaeff B, Schneider M, Gutt C. Tumor seeding following laparoscopy: international survey. *World J Surg* 1999;23:989–95.
- [27] Neulander EZ, Lismer L, Kaneti J. Necrosis of the glans penis: a rare complication of intravesical therapy with mitomycin C. *J Urol* 2000;164:1306.
- [28] Zein TA, Friedberg N, Kim H. Bone marrow suppression after intravesical mitomycin C treatment. *J Urol* 1986;136:459–60.
- [29] Wajzman Z, McGill W, Englander L, Huben RP, Pontes JE. Severely contracted bladder following intravesical mitomycin C therapy. *J Urol* 1983;130:340–1.
- [30] De Groot AC, Conemans JMH. Systemic allergic contact dermatitis from intravesical instillation of the anti-tumor antibiotic mitomycin C. *Contact Dermatitis* 1991;24:201–9.

Editorial Comment

Fredrik Liedberg, Växjö, Sweden
f.liedberg@ltkronoberg.se

The present article describes decreased intraperitoneal urothelial tumour cell growth by administration of antiadhesive oligopeptides or mitomycin intraperitoneally in a laparoscopic mouse model. The effect of intraperitoneal administration of mitomycin on peritoneal tumour growth of urothelial cell carcinoma has recently also been described by Abaza and coworkers [1]. The authors discuss intraperitoneal administration of antitumour substances to prevent port-site metastases after laparoscopic surgery for malignancies such as urothelial cell carcinoma. However, the fear of port-site metastases has decreased in recent years as more data support similar incidences of port-site metastases and metastases in the wound margins (0.5–1.3% and 0.8–1.2%, respectively) [2]. This fact in conjunction with a rather low incidence (19%) of

peritoneal metastases in one large bladder cancer autopsy series [3] limits the clinical potential of the treatment described in this article, at least in bladder cancer. However, in ovarian carcinoma intraperitoneal administration of chemotherapeutic drugs might have a place in the treatment of selected patients [4].

References

- [1] Abaza R, Keck RW, Selman SH. Intraperitoneal chemotherapy for the prevention of transitional cell carcinoma implantation. *J Urol* 2006;175:2317–22.
- [2] Fornara P, Zacharias M, Wagner S. Port-site metastases: fact or fiction? *Urol Int* 2003;71:136–42.
- [3] Wallmeroth A, Wagner U, Moch H, et al. Patterns of metastasis in muscle-invasive bladder cancer (pT2-4): an autopsy study on 367 patients. *Urol Int* 1999;62:69–75.
- [4] Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2006;354:34–43.