

Aus der Klinik für Urologie
Der Medizinischen Universität zu Lübeck

Direktor:

Prof. Dr. med. D. Jocham

**In-vitro Untersuchungen zur
Reduktion der Nebenwirkungen unter BCG Therapie
mit antiinflammatorischen Medikamenten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von

Peter Rehbein

aus Hamm

Lübeck 2000

1. Berichtstatter:

Prof. Dr. med. Andreas Böhle

2. Berichtstatter:

Prof. Dr. med. Stefan Ehlers

Tag der mündlichen Prüfung:

19.04.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 19.04.2006

Gez. Prof. Dr. med. W. Jelkmann
-Dekan der medizinischen Fakultät-

3. Vergleich der verschiedenen BCG-Aufarbeitungen	und Mengen bei
der Induktion zytotoxischer Killer Zellen.....	29
4. Modulation der Chemilumineszenzantwort	von
Granulozyten bei Koinkubation mit antiinflammatorischen	
Medikamenten.....	33
5. Der Einfluß von antiinflammatorischen Medikamenten	auf die BCG-
vermittelte Induktion von BAK-Zellen	36
5. Diskussion.....	38
6.Zusammenfassung.....	47
6. Literaturverzeichnis	48
7. Anhang	
Lebenslauf	
Danksagung	

Abkürzungen

BAK-Zelle	Bacillus-Calmette-Guèrin aktivierte Killer-Zelle
BCG	Bacillus-Calmette-Guèrin
BSA	Bovines Serumalbumin
CFU	koloniebildende Einheiten
CIS	Carcinoma in situ
CL	Chemilumineszenz
E/Z	Effektor/Zielzelle
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
FKS	Fötales Kälber Serum
G	Differenzierungsgrad eines Tumors
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
hi-BCG	hitzeinaktiviertes BCG
HS	Humanserum
IF	Interferon
IL	Interleukin
IPM	Impulse pro Minute
LAK Zelle	Lymphokin-aktivierte-Killer-Zelle
LG	L-Glutamat
MNZ	Mononukleäre Zellen
MR	Mikroplaterereader
MW	Mittelwert
NK Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
POF	Pentoxifyllin (3,7-dimethyl-1-(5-oxo-hexyl)-xanthin
PS	Penicillin-Streptomycin Lösung
pT1	Tumor mit Invasion der Lamina propria
pT2	Tumor mit oberflächlicher Muskelinvasion
pT3	Tumor mit tiefer Muskelinvasion bis Invasion des perivesikalen Fettgewebes
pT4	Tumor mit Invasion umliegender Organe
pTa	papillärer Tumor ohne Invasion

PVA	Polyvinylalkohol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s-BCG	sonifiziertes (in Einzelzellsuspension gelöstes) BCG
SD	Standardabweichung
TNF	Tumornekrosefaktor
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

Einleitung

Mykobakterien gehören zur Gattung der grampositiven Bakterien. Sie treten als säurefeste, unbewegliche Stäbchen auf, die gerade oder leicht gekrümmt sind. Gelegentlich werden auch verzweigte Formen beobachtet. In der Gruppe der Mykobakterien befinden sich einige wenige humanpathogene Arten, wie etwa das *Mycobacterium leprae* und das *Mycobacterium tuberculosis*. Gerade das letztere wurde als Erreger der Tuberkulose in der Geschichte der Medizin durch seine oft verheerende Auswirkung als "schreckliche Plage des Menschengeschlechts" [Koch 1882] beschrieben, und sorgt so für den wahrhaftig schlechten Ruf, den die Mykobakterien auch heute noch besitzen.

Im Jahre 1908 entwickelten Calmette und Guérin einen Impfstoff zur Vorbeugung gegen Tuberkulose. Die beiden arbeiteten mit einem Stamm eines Rindertuberkelbazillus. Durch die Übertragung von Kultur zu Kultur in Gallemedium war der Tuberkelbazillus im Begriff seine malignen Eigenschaften zu verlieren. Es erforderte dreizehn Jahre ununterbrochener Arbeit und 231 Übertragungen bis Calmette und Guérin diesen Rindertuberkelbazillus in einen harmlosen, jedoch unvermindert antigenwirkenden Keim verwandelt hatten, den sie Bacillus-Calmette-Guérin(BCG) nannten.

Mitte der Dreißiger Jahre berichtete Rosenthal, daß die Verabreichung des Impfstoffes auf verschiedene Weise eine lokale und generalisierte Stimulierung des Immunsystems bei Tieren verursachte, was zu einer Regression von Tumoren führte. Die von Zbar geleitete Forschergruppe untersuchte an einem Meerschweinchen-Leberkarzinom die wesentlichen Faktoren für den Erfolg einer unspezifischen Immuntherapie [Zbar B.,1974]. Durch intratumorale BCG-Injektion wurde eine Regression nicht nur des Primärtumors, sondern auch von Metastasen in den regionalen Lymphknoten bewirkt. Außerdem konnte eine Tumormunität dadurch gezeigt werden, daß die durch BCG geheilten Tiere der erneuten Exposition einer Tumorzelle widerstanden.

Es wurden von Zbar et al. vier Richtlinien für eine unspezifische aktive Immuntherapie aufgestellt [Bast R.C.,1974a, 1974b]: Danach muß der Tumor (1) auf das Ausgangsorgan beschränkt sein, (2) eine niedrige Zellzahl aufweisen, (3) ein direkter Kontakt zwischen Tumorzelle und Vaccine erfolgen und (4) eine adäquate Dosis des immunisierenden Antigens Verwendung finden.

BCG wurde in der Immuntherapie am Menschen erstmals von Mathè et al. [Mathè G. 1969] bei der Behandlung einer akuten lymphoblastischen Leukämie angewandt. Die bei der

systemischen Therapie erzielten Anfangserfolge konnten jedoch nicht dauerhaft bestätigt werden.

Die Harnblase wurde 1966 als Zielorgan für eine adjuvante Immuntherapie interessant, als Coe und Feldmann zeigten [Coe J.E.,1966], daß die Blase in ähnlicher Weise stark auf das Antigen BCG reagiert wie die Haut, bei der eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ (Type IV) zu beobachten ist. Durch diese Entdeckung und die Tatsache, daß sich die von Zbar et al. aufgestellten vier Richtlinien zur unspezifischen, aktiven Tumorthherapie für das oberflächliche Urothelkarzinom anwenden lassen, wurde Morales im Jahre 1976 inspiriert, die BCG-Immuntherapie erstmals klinisch beim oberflächlichen Urothelkarzinom anzuwenden.

Daß eine aktive Immuntherapie in der Harnblase nicht nur aus akademischen Gesichtspunkten sinnvoll ist, sondern auch ein konkreter Bedarf für eine adjuvante Therapie besteht, soll in der nun folgenden Betrachtung des Urothelkarzinoms der Harnblase aufgezeigt werden:

Das Blasenkarzinom ist die zweithäufigste Neoplasie im Urogenitalbereich. Über 90% der Neoplasien manifestieren sich als Übergangszellkarzinome. Sarkome des Muskelgewebes oder der Gefäße und gutartige Neoplasien sind vergleichsweise selten. Circa 80% der Übergangszellkarzinome sind oberflächlich, das heißt, sie haben die Lamina propria noch nicht durchbrochen. Das Blasenkarzinom wird eingeteilt nach der TNM-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) von 1990 [Spiess B.; 1990]. Dabei bezeichnet T die Primärausdehnung des Tumors, N den Lymphknotenbefall und M das Auftreten von Fernmetastasen. Durch ein p vor der TNM-Klassifikation wird die postoperative histopathologische Begutachtung kenntlich gemacht. Einen Überblick über die T-Stadien des Harnblasenkarzinoms gibt Abbildung 1.

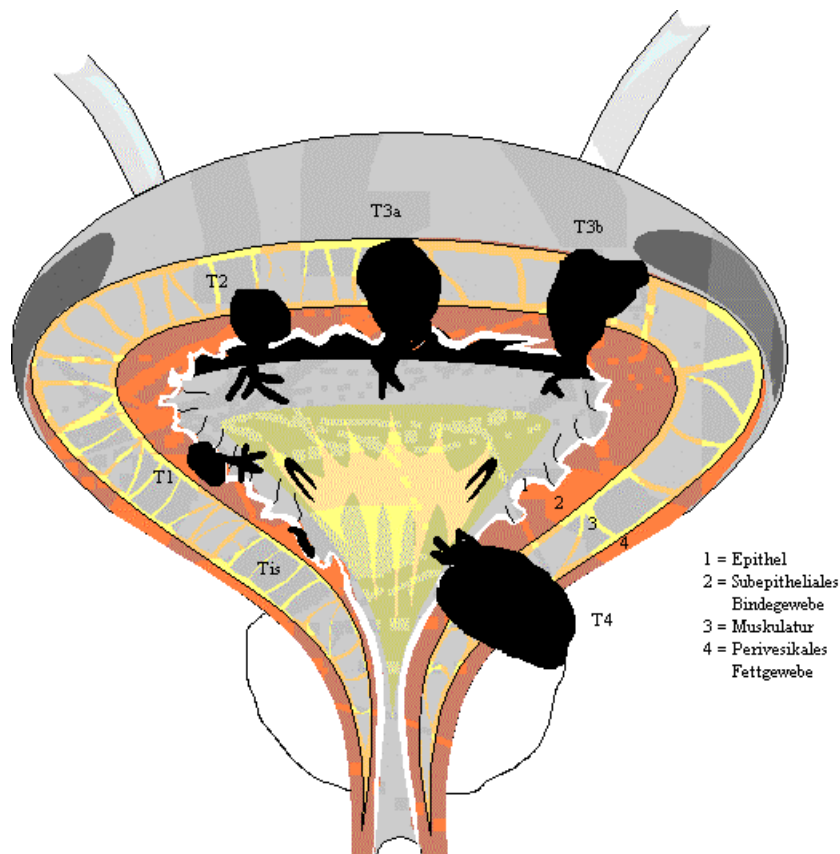


Abbildung 1: T-Stadien der TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms nach UICC 1990

Um den Differenzierungsgrad des Karzinoms mit zu berücksichtigen, wird außerdem ein histologisches Grading in die Stadien G I bis G III durchgeführt, wobei G I dem gut differenzierten Übergangszellkarzinom entspricht und G III einem weitgehend undifferenzierten Tumor.

Die oberflächlichen Übergangszellkarzinome imponieren makroskopisch am häufigsten als papilläre Tumoren, histologisch gelegentlich als Carcinoma in situ [Torti F.M.;1984]. Diese Stadien entsprechen den Stadien Ta und Tcis der TNM-Klassifikation.

Entscheidend für die Prognose des Harnblasenkarzinoms ist die Ausdehnung des Primärtumors, sowie die Lymphknoten - und Fernmetastasierung. In den Tumorstadien T1 (Infiltration der Lamina propria) und T2 (Infiltration der Muskularis) finden sich in bis zu 10% der Fälle regionale Lymphknotenmetastasen [Bauer H.W.; 1984]. Auch bei vollständiger operativer Tumorresektion ist der Verlauf des Harnblasenkarzinoms durch die ausgesprochen hohe Rezidivhäufigkeit geprägt. In früheren Untersuchungen wird die Rezidivhäufigkeit in den ersten drei bis fünf Jahren nach operativer Therapie des Harnblasenkarzinoms mit 60 bis 90% angegeben [Gilbert H.A.; 1978; Rübber H.; 1981]. Lamm beschreibt für das

superfizielle Harnblasenkarzinom eine Rezidivquote von 52% in den ersten 5 Jahren ohne adjuvante Therapie [Lamm D.L.;1985]. Andere Untersucher beziffern die Rezidivhäufigkeit ohne adjuvante Immuntherapie auf bis zu 85% im ersten Jahr nach operativer Therapie, zum Teil sogar bis zu 100%, je nach Risikogruppe [Soloway M.S. 1985; Torti F.M 1984]. Das frühzeitige Auftreten von Rezidiven wird von anderen Untersuchern untermauert [Carl P 1980]. Treten Rezidive auf, so besteht in Abhängigkeit vom histologischen Grading zudem die Tendenz zur Progression der Infiltrationstiefe und histologischen Entdifferenzierung [Adolphs H.D. 1982; Barnes R. 1977; Fitzpatrick J.M. 1986; Greene L.F. 1973], weshalb sich die Prognose zunehmend verschlechtert [Adolphs H.D. 1981; Gilbert 1978]. Diese Befunde machen die Suche nach einer geeigneten Rezidivprophylaxe verständlich.

Superfizielle Harnblasenkarzinome werden transurethral reseziert. Anschließend wird in Gruppen mit hoher Rezidivneigung (pTa multifokal, pT1) eine Rezidivprophylaxe durchgeführt. Hierzu werden verschiedene Substanzen wie Adriamycin, Thiotepa und Mitomycin C verwendet. Die immuntherapeutische Verwendung von BCG gilt heute als eine der wirksamsten adjuvanten Behandlungen des superfiziellen Harnblasenkarzinoms.

Beim infiltrativen Blasenkarzinom der Stadien T 2 und T 3 ist eine radikale Zystektomie bis heute die einzige kurative Therapie

Die adjuvante Immuntherapie mit BCG wird heute im allgemeinen so durchgeführt: Etwa zwei bis drei Wochen nach der transurethralen Tumorsektion, nachdem eine ausreichende Wundheilung erfolgt ist, beginnt der sechswöchige Instillationszyklus. Hierbei werden einmal wöchentlich circa 10^8 lebende BCG-Mykobakterien transurethral in die Harnblase instilliert. Die Verweildauer des BCG in der Harnblase sollte in der Regel 2 h betragen [Böhle A.;1982], um eine ausreichende Adhäsion der Mykobakterien an die Blasenwand zu erzielen. Nach diesem Induktionszyklus sollte in drei-, sechs- und neunmonatigen Abständen jeweils ein BCG Erhaltungszyklus durchgeführt werden [Hudson M.A.; 1987; Badalament R.A.; 1985].

Der Erfolg der so durchgeführten intravesikalen Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Urothelkarzinoms konnte durch diverse Untersuchungen belegt werden [Brosman E. 1984; Lamm D.L. 1985; Haaff E.D. 1985,1986; Catalona W.J. 1987; Melekos M.D. 1993].

Die heute angewandte BCG-Therapie hat ihre Indikationen und Grenzen. Sie hat ihren Platz neben der intravesikalen Chemotherapie, kann diese aber noch nicht ersetzen. Da diese Therapie zwar effektiver ist, aber auch mehr Nebenwirkungen als eine intravesikale Chemotherapie verursacht, muß eine Risiko-Nutzen Analyse für jeden Patienten durchgeführt werden, bevor eine Entscheidung für oder gegen eine BCG-Behandlung getroffen wird.

Diese Nebenwirkungen sind meist lokal begrenzt. Durch die erwünschte granulomatös entzündliche Reaktion werden in der Blase irritative Symptome wie Dysurie, Pollakisurie und Nykturie hervorgerufen, die bei fast allen Patienten in den ersten zwei Tagen nach Instillation vorhanden sind. Ein weiteres häufiges Symptom ist ein etwa 3-4 Stunden nach Instillation auftretender geringgradiger Temperaturanstieg, der bei 2,9% der Patienten eine Höhe über 39,5°C erreicht [Lamm D.L. 1989]. Meist sind sowohl die toxisch-irritativen Symptome wie auch der Temperaturanstieg spontan rückläufig, ggf. kann eine antiinflammatorische oder antipyretische Therapie helfen. Eine in mindestens 40% der Fälle auftretende, immer asymptomatische, granulomatöse Prostatitis kann mittels Stanzbiopsie von einem Prostatakarzinom differentiadiagnostisch abgegrenzt werden und ist normalerweise nicht behandlungsbedürftig [Lamm D.L. 1989; Böhle A. 2000]. Gravierende Nebenwirkungen treten in ca. 5% der Fälle auf und reichen von lokalisierten Infektionen wie Epididymitis bis hin zur Sepsis mit Schocksymptomatik. Diese potentiellen Nebenwirkungen sind sicherlich ein Grund, weshalb einige Urologen die Entscheidung treffen, daß nicht jeder Patient, der eine intravesikale Instillationstherapie benötigt, mit BCG zu behandeln ist. Das heißt, daß die BCG- Therapie nicht in jedem Land als First-line-Therapie beim superfiziellen Blasenkarzinomen anerkannt wird.

Der genaue immunologische Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Eine genaue Kenntnis dieses Wirkmechanismus wäre aber notwendig, um so unerwünschte Nebenwirkungen ohne Modulation des Therapieeffektes zu reduzieren. Dadurch kann die BCG-Therapie wirklich zum „goldenen Standard der intravesikalen Therapie“ werden, als der sie jetzt schon von einigen Autoren beschrieben wird [Ratliff T.L.; 1991].

Aus Untersuchungen zum Wirkmechanismus ist bekannt, daß eine lokale granulomatöse Immunreaktion der Blase durch die intravesikale BCG-Therapie induziert wird [Böhle A. 1990; Prescott S.1992]. Es ließ sich eine vermehrte Lymphozyten- und Makrophagenakkumulation in der Blasenwand nachweisen, welche über einen längeren Zeitraum persistierte [Böhle A. 1992]. Als Zeichen der kurzfristig nach der BCG-Instillation heftigen Immunreaktion konnten im Urin signifikante Titeranstiege der Zytokine Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 2 (IL-2), Interferon-gamma (IF- μ) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) nachgewiesen werden [Böhle A. 1990;de Boer E.C. 1992]. Weiterhin konnten als Parameter der unspezifischen Immunreaktion massenhaft Granulozyten und deren proteolytische inflammatorische Enzyme wie Myeloperoxidase und Elastase im Urin detektiert werden [Van der Sloot E. 1993]. Eine überschießende Aktivierung von Granulozyten könnte somit für die erhöhte Nebenwirkungsrate unter BCG Therapie verantwortlich sein, während für die

Induktion der gewünschten granulomatösen Immunreaktion ein klinisch weit weniger apparentes Ausmaß an lokaler Entzündungsreaktion notwendig wäre.

Vor dem Hintergrund des bisher bekannten Wirkmechanismus läßt sich die Aktivierung von Granulozyten als Mediatoren der Nebenwirkungen, und die Induktion zytotoxischer- Killer-Zellen als eine der Hauptwirkkomponenten vermuten.

Fragestellung

Bei dem Versuch die Nebenwirkungen der intravesikalen BCG-Therapie zu reduzieren kann man so zwei Fragestellungen aufstellen:

1. Kann man die kommerziell erhältliche Vaccine so aufreinigen, daß die Granulozytenaktivierung minimiert wird, ohne die gewünschte zytotoxische Reaktion zu beeinflussen?
2. Gibt es eine antiinflammatorische Substanz, die unter Erhalt der zytotoxischen Reaktion die Granulozytenaktivierung verhindern kann?

Es gibt bisher keine Untersuchung die sich mit der Aktivierung von Granulozyten als Mediatoren der Nebenwirkungen befaßt. Für diese Arbeit wurde deshalb ein Chemilumineszenzassay entwickelt, mit dessen Hilfe Granulozyten mit verschiedenen BCG-Aufarbeitungen stimuliert werden konnten. Diese Stimulation konnte durch verschiedene antiinflammatorische Medikamente moduliert werden, um die wirksamste Präparation zur Reduzierung der Granulozytenaktivierung herauszufinden.

Die Modulation der zellulären Zytotoxizität wurde mit dem Zytotoxizitätstest nach Thanhäuser [Thanhäuser A. 1993] durchgeführt In diesem Test wurden Lymphokin-aktivierte-Killer Zellen (LAK-Zellen) und BCG-aktivierte-Killer-Zellen (BAK-Zellen) in ihrer Zytotoxizität gegen Blasen tumorzellen getestet. Dieser Test wurde so modifiziert, daß bei der Induktion der BAK-Zellen sowohl verschiedene BCG-Präparationen verwendet, als auch antiinflammatorische Medikamente zugefügt wurden. Der Effekt dieser Medikamente auf die Induktion zellulärer Zytotoxizität wurde damit dargestellt.

Material und Methoden

1. Chemikalien, Nährmedien, Puffer und Lösungen

Acetylsalicylsäure (ASS) (Sigma, Deisenhofen)..

ASS-Trockensubstanz wurde in 0,9% NaCl-Lsg gelöst, auf eine Konzentration von 4mg/ml eingestellt und unmittelbar danach verwendet.

Aktinomycin D (Boehringer, Mannheim)...

...eine Stammlösung (400 µg/ml in physiologischer Kochsalzlösung) wurde vor Gebrauch 1:100 mit RPMI 1640 und 5% FKS verdünnt.

Antibiotikallösung: Penicillin/Streptomycin (10^4 E/ml/ 10^4 Mg/ml; Biochrom, Berlin)

Aqua ad injektabilita (Braun, Melsungen)...

...diente zum Ansetzen aller Puffer und Lösungen

Azid-PBS...

...ist eine PBS-Lösung (s.u.), die mit 0,1% NaN_3 (w/v) versehen wurde.

Bovines Serum Albumin (BSA; Sigma, Deisenhofen)

CL-Medium (MEM Dulbecco) (Boehringer, Mannheim GmbH)...

...wurde gebrauchsfertig mit HEPES Puffer, ohne Phenolrot und ohne Glutamin verwendet

Diclofenac (Diclofenac Stada N) (Stadapharm, Bad Vilbel)...

eine Ampulle mit 75mg Diclofenac-Na in 3ml H_2O wurde mit aqua ad injectabilia auf eine Konzentration von 400µg/ml eingestellt und bei 4°C gelagert.

Dilution Puffer: PBS wurde mit 0,05% Tween20, 0,01% Timorosol und 2% BSA versetzt und auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Biochrom, Berlin)

Ficoll-Paque (Pharmacia, Freiburg)

Fetales Kälberserum (FKS; Biochrom, Berlin)...

...wurde zur Komplement-Inaktivierung 30 min auf 56°C erhitzt.

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; Biochrom, Berlin)...

...eine Gebrauchslösung wurde aus Trockensubstanz (Hanks' BSS 9,86 g/l) und NaHCO₃ (0,35 g/l) mit aqua ad injectabilia hergestellt. Diese wurde sterilfiltriert, ein pH-Wert von 7,2 bei 280 bis 290 osm eingestellt und bei 4°C gelagert

Humanserum (HS; Forschungsinstitut Borstel)...

...wurde von gesunden Spendern verschiedener Blutgruppen aus Vollblut gewonnen und bei unterschiedlichen Temperaturen (56°C und 65°C) 30 min hitzeinaktiviert.

Hydrocortison (Hydrocortison Hoechst) (Hoechst AG, Frankfurt)...

eine Ampulle mit 5mg Hydrocortison in 1ml H₂O wurde mit aqua ad injectabilia auf eine Konzentration von 4mg/ml eingestellt und unmittelbar darauf verwendet.

Kochsalzlösung (0,9%; Braun, Melsungen)

L-[H³]-Methionin (Amersham Buchler, Braunschweig)...

...wies eine spezifische Aktivität von 70-85 Ci/mMol auf und wurde in RPMI 1640, methioninfrei, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Luminollösung (Boehringer, Mannheim GmbH)

wurde mit 2mg Luminol und 8µl Triethylamin in 1000µl PBS gelöst, und die gebrauchsfertige Lösung bei -20°C aufbewahrt.

Metamizol (Novalgin) (Hoechst AG, Frankfurt)...

...eine Ampulle mit 1,0g Metamizol-Na in 2ml H₂O wurde mit aqua ad injectabilia auf eine Konzentration von 2mg/ml eingestellt und bei 4°C gelagert.

Pentoxifyllin (POF; Trental, Albert-Roussel Pharma, Wiesbaden)...

...eine Ampulle mit 300mg POF in 15ml 0,9% NaCl-Lsg wurde mit aqua ad injectabilia auf eine Konzentration von 2mg/ml eingestellt und bei 4°C gelagert.

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)...

...besteht aus 0,9 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 2,7 mM KCl , 140 mM NaCl , 1,5 mM KH_2PO_4 und 8,1 mM Na_2HPO_4 , gelöst in aqua ad injectabilia (pH 7,4; 265 osm)

Phytohämagglutinin (PHA; purified; Wellcome, Dartford, Großbritannien)

Polyvinylalkohol (PVA; Biochrom, Berlin)...

...10g PVA Trockensubstanz wurden bei 90°C in 1000ml 0,9% NaCl Lösung aufgelöst und autoklaviert. Es wurde ein pH-Wert von 7,2 eingestellt, und die Lösung bei 4°C gelagert.

RPMI 1640 (Biochrom, Berlin)...

...wurde aus Trockensubstanz (RPMI 1640 10,40 g/l) und NaHCO_3 (2g/l) mit aqua ad injectabilia (2g/l) mit aqua ad injectabilia hergestellt. Diese Lösung wurde sterilfiltriert, ein pH-Wert von 7,2 bei 280-290 osm eingestellt und bei 4°C gelagert.

RPMI 1640 ohne L-Methionin (Biochrom, Berlin)

Scintillationsflüssigkeit...

...für die Bestimmung der Zytotoxizität (Rotiscint eco plus; Carl Roth, Karlsruhe)

Trypanblau (Fluka, Buchs, Schweiz)

Trypsin (Serva, Heidelberg)...

... die Trypsinlösung wurde aus 2,5 g Trypsin, 8 g NaCl , 200 mg KCl , 1150 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, 200 mg KH_2PO_4 ad 1000ml aqua ad injectabilia hergestellt und steril filtriert.

Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin)

2. Aufzucht der BCG-Mykobakterien:

2.1. Kultur der log-Phase Mykobakterien

Mykobakterien der BCG-Stämme Connaught, RIVM und Tice wurden bei 37°C auf Löwenstein-Jensen-Nährboden gehalten. Diese wurden in der logarithmischen Wachstumsphase von 3 Wochen alten Subkulturen geerntet, und in NaCl gewaschen. Dann wurden sie in einem Homogenisator nach Dounce in NaCl resuspendiert, um Aggregation der Bakterien zu lösen.

Die Extinktion der Suspensionen wurde in einem Mikroplaterereader (MR 700, Dynatech, Denkendorf) bei 550 nm gemessen, und mittels der Regressionsgeraden einer Eichkurve die Konzentration ermittelt.

Die Mykobakterien wurden in einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ CFU/ml eingestellt, und bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert (log-Phase Kultur). Die korrekte Einstellung der Konzentration wurde anhand des Koloniebildungsvermögens auf Löwenstein-Jensen-Nährboden kontrolliert.

2.2. Autoklavieren

Zur Herstellung non-viabler Mykobakterien wurde BCG bei 120°C und Überdruck autoklaviert. Mit Hilfe der Koloniebildungsmethode wurde festgestellt, daß keine viablen Keime mehr vorhanden sind.

2.3. Hitzeinaktivieren

BCG wurde im Wasserbad für 30 min auf 100°C erhitzt. Die Koloniebildung zeigte auch hier, daß keine Mykobakterien überlebten.

2.4. Sonifizieren

BCG wurde bei 4°C für 20 min in einem Ultraschallbad (Branson Sonic Power, Heusenstamm) beschallt. In Ausstrichpräparaten ließ sich zeigen, daß dadurch eine Einzellzellsuspension ohne die sonst typische Verklumpung entstand. Die Viabilität zeigte keine Änderung zu den in log-Phase der Kultur befindlichen BCG

2.5 Gemisch viabler und non-viabler BCG

BCG aus der log Phase Kultur wurde mit autoklavierten BCG in verschiedenen Verhältnissen gemischt. 25% viable und 75% non-viable, 50% viable und 50% non-viable und 75% viable und 25% non-viable. Aliquots dieser Mischungen wurden bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.6. Aufarbeitung der kommerziellen BCG-Präparationen:

Bei den hier verwendeten Präparaten handelt es sich um für die Therapie des oberflächlichen Blasenkarzinoms zugelassene Arzneimittel. Kommerziell erhältliches BCG-Lyophilisat vom Stamm Connaught (ImmuCyst, Cytochemia, Ihringen), RIVM (Medac, Hamburg) und Tice (OncoTice, Apogepha, Dresden) wurde nach den Empfehlungen des Herstellers rekonstituiert, auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ CFU/ml eingestellt (s.o.) und umgehend verwendet.

3. Zellkulturen

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten in vitro Studien zur Untersuchung der BCG-induzierten Zytotoxizität wurden verschiedene Tumorzelllinien eingesetzt.

Zelllinie BT-A:

Diese Zelllinie wurde aus der Gewebeprobe eines pT2, G3, also bereits fortgeschrittenen, invasiven Tumors etabliert. Sie wurde freundlicherweise von Dr. J. van der Bosch (Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt.

Zelllinie SBC-7:

Diese Zelllinie wurde dem weniger weit fortgeschrittenen Stadium pTa G1-G2 zugeordnet. Sie wurde von Dr. A. Thanhäuser (Forschungszentrum Borstel) nach der Methode von van der Bosch aus einer malignen Gewebeprobe etabliert.

Aufzucht der Zelllinien:

Die Blasen-tumor-zelllinien wurden in Kulturflaschen (Falcon Gewebekulturflaschen, 75 cm², Becton Dickinson, Heidelberg) in 30 ml RPMI 1640 mit 10% FKS und 2% Antibiotikalösung gehalten. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert, zwischen den Passagen wurde einmal das Kulturmedium gewechselt. Zur Passage wurde das Medium von den adhären-ten Zellen abgesaugt und anschließend 5 ml Trypsinlösung hinzupipettiert. Nach Inkubation (5 min, 37°C, 5% CO₂) wurde das Trypsin durch Zugabe von 0,5 ml FKS inaktiviert, die abgelösten Zellen geerntet, gewaschen (10 min, 400 g, 4°C) und in 1 ml neuen Kulturmediums aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Probe der Zellsuspension mit dem Farbstoff Trypanblau im Verhältnis 1:20 gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Ludwigshafen) lichtmikroskopisch ausgezählt. Anschließend wurden 1 x 10⁶ Zellen/30 ml in einer neuen Kulturflasche ausgesät.

Kontrolle der Zellkulturen:

Die Morphologie der Zellen wurde ständig überprüft und die Zelllinien auf Mykoplasmenbefall getestet. Bei der Zählung in Trypanblau wurde stets die Viabilität der Zellen geprüft. Tote Zellen konnten hierbei aufgrund ihrer intensiven Blaufärbung leicht von lebenden unterschieden werden. Zellsuspensionen mit weniger als 95% lebenden Zellen wurden verworfen. Gegebenenfalls wurden die Stammkulturen der Zelllinien aus einem tiefgefrorenen Zellpool neu angelegt.

4. Isolierung von Zellen

4.1 Gewinnung mononukleärer Zellen

Von freiwilligen gesunden Probanden wurde Vollblut gespendet, welches mit Heparin (20E/ml) versetzt wurde. Humane mononukleäre Zellen (MNZ) wurden aus dem Spenderblut durch eine diskontinuierliche Zentrifugation über einen Dichtegradienten auf Ficoll-Paque gewonnen. Dazu wurde das Vollblut zu gleichen Volumenanteilen mit HBSS gemischt, 20 ml dieses Gemisches auf 5ml Ficoll-Paque geschichtet und für 45 min (180 s Anlaufzeit) bei 400 g und 22°C zentrifugiert. Die auf der Plasma-Ficoll-Trennschicht sedimentierten MNZ wurden mit einer Pipette abgenommen, zweimal in HBSS gewaschen (10 min, 400 g, 4°C) und in RPMI 1640 mit 5% HS und 2% Antibiotikallösung als Kulturmedium aufgenommen.

4.2 Gewinnung polymorphkerniger Zellen

Vollblut von freiwilligen gesunden Probanden wurde mit 3,8% Na-Citrat versetzt, und zu gleichen Volumenanteilen mit PBS-Dulbecco gemischt. Die zusammen mit den Erythrozyten durch die Ficoll-Paque-Trennschicht zentrifugierten Granulozyten wurden mit 2 Teilen Polyvinylalkohol gemischt. Eine Inkubation im schmalen Glaszylinder führte bei Raumtemperatur innerhalb von 25 min zu einer guten Trennung von Erythrozyten (schnelle Sedimentation) und Granulozyten (langsame Sedimentation). Der wenige Erythrozyten enthaltene Überstand wurde abgehoben und mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde mit 1 ml destilliertem Wasser kräftig resuspendiert, und die physiologische Osmolalität nach 30 bis 40 Sekunden durch Zugabe von 1 ml doppelt-osmolaler PBS wieder hergestellt.

Für die Chemilumineszenzmessung wurde die Suspension mit 0,5 ml FKS unterschichtet und zentrifugiert (3 min Anlaufzeit, 400 g, 4°C, 8 min). Die im Pellet enthaltenen Granulozyten wurden in CL-Medium resuspendiert, gezählt und auf eine Zellkonzentration von $0,66 \times 10^6$ /ml eingestellt.

Für die Bestimmung der Laktoferrinfreisetzung im ELISA wurde die Suspension zentrifugiert (400 g, 4°C, 8 min), und die im Pellet enthaltenen Granulozyten in PBS-Dulbecco resuspendiert, gezählt und auf eine Zellkonzentration von 1×10^7 /ml eingestellt.

5. Zytotoxizitätstest mit $^3\text{H-L-Methionin}$

5.1. Präparation der Effektorzellen

Es wurden kultivierte Effektorzellen für den Zytotoxizitätstest verwendet. Die Kultur wurde mit 1×10^6 MNZ/ml in 6-Napf-Flachbodenplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark) bei 37°C und 5% CO_2 durchgeführt. RPMI 1640 mit 5% HS und 1% Antibiotikallösung als Supplement diente als Kulturmedium für die 5 ml Kulturen. Als Stimuli wurden IL-2 und die verschiedenen BCG-Mykobakterienpräparationen verwendet. Nach einer Inkubationsdauer von sieben Tagen wurden die Zellen mittels eines Gummischabers geerntet, gewaschen und auf ihre Viabilität untersucht. Waren die Zellen zu mehr als 95% lebendig, so wurden sie im Zytotoxizitätstest gegen verschiedene Blasentumorzelllinien eingesetzt.

5.2. Zytotoxizitätstest

Der hier angewandte Zytotoxizitätstest beruht im wesentlichen auf dem von Thanhäuser beschriebenen Test. Als Radioisotop wurde hier $^3\text{H-L-Methionin}$ zur Markierung der Zielzellen verwendet. Die Markierung der Zielzellen wurde wie folgt durchgeführt: Nach dem Waschen der Zellen wurde das Zellpellet in RPMI 1640 ohne L-Methionin (10% FKS, 1% Antibiotikallösung) resuspendiert und in diesem Medium ein zweites Mal gewaschen. Danach wurden die Zellen in 1 ml RPMI 1640 ohne L-Methionin aufgenommen, und wie oben beschrieben gezählt. Anschließend wurde die benötigte Menge an Zellen auf eine Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml in Kunststoffröhrchen (Falcon Tubes, 10ml, Becton Dickinson, Heidelberg) eingestellt, und $20\mu\text{Ci/ml}$ $^3\text{H-L-Methionin}$ hinzupipettiert. Dieser Ansatz wurde für 4 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Das Röhrchen wurde anschließend mit methioninhaltigem Kulturmedium aufgefüllt und die Zellen gewaschen. Um die standardmäßig gewählte Zahl von 5000 Zielzellen/Napf einzustellen, wurden die Zellen auf eine Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml eingestellt, und in Mikrotiterplatten (96Napf, F-Form, Falcon 3072, Becton Dickinson, Heidelberg) mit $100 \mu\text{l}$ je Napf ausgesät. Diese Mikrotiterplatten wurden dann für 20 h bebrütet, um das Festwachsen der Blasentumorzellen zu ermöglichen. Dann wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und zunächst 100 ml neuen Mediums und dann die zu testenden Effektorzellen in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Die untersuchten Effektor/Zielzell (E/Z)- Verhältnisse sind bei der Beschreibung der jeweiligen Experimente angegeben. Als Kontrolle wurde die Spontanfreisetzung (F_{spon})

der aufgenommenen Radioaktivität bestimmt, indem die Zielzellen in 200 µl Medium ohne weiteren Zusatz kultiviert wurden. Zur Bestimmung der Maximalfreisetzung (F_{\max}) von Radioaktivität wurden 100 µl Zielzellsuspension durch Zugabe des gleichen Volumenanteiles eines SDS/Triton-X-100 Gemisches vollständig lysiert. Der jeweilige Testansatz wurde dann 16 bis 20 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in den Mikrotiterplatten abzentrifugiert (440 g) und 100 µl des Überstandes aus jedem Napf geerntet, d.h. in mit 2 ml Scintillationsflüssigkeit gefüllte Zählröhrchen (Pony vials, 6 ml, Canberra Packard, Frankfurt a.M.) überführt. Nach dem Durchmischen von Probe und Zählflüssigkeit wurde die freigesetzte Radioaktivität in einem Beta-Counter (Tricarb 460 M, Canberra Packard, Frankfurt a.M.) bestimmt. Mit Hilfe der Meßwerte für F_{\max} und F_{spon} sowie der Werte für die experimentelle Freisetzung (F_{exp}) der durchgeführten Messungen konnte nun die spezifische Lyse der Zielzellen in Prozent berechnet werden. Dazu wurde die folgende Formel angewendet:

$$\text{spezifische Lyse (\%)} = (F_{\text{exp}} - F_{\text{spon}}) \times 100 / (F_{\max} - F_{\text{spon}})$$

In allen Tests wurden für jede Bestimmung der spezifischen Lyse Dreifachansätze durchgeführt, von denen Mittelwert und Standardabweichung berechnet wurden. Es wurden nur Experimente ausgewertet, bei denen F_{spon} weniger als 25 % betrug.

6. Messung der Degranulationsaktivität von Granulozyten mittels Laktoterrin-ELISA

6.1. Ernte der Degranulationsüberstände:

Mikrotiterplatten mit Flachboden wurden mit 300 µl PBS Dulbecco (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$; 0,1% BSA) gefüllt und nach 2 Stunden Inkubationszeit mit dem jeweiligen Degranulationsstimulus (BCG), Hexa-Lsg zur Bestimmung der maximalen Freisetzung oder PBS-Dulbecco für die Spontanfreisetzung gefüllt.

Granulozyten wurden in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in PBS-Dulbecco eingestellt, und nach einer Vorwärmphase von 15 min im 37°C warmen Wasserbad für weitere 15 min bei 37°C gerüttelt. Es wurden 5µg Cytokalsin B je ml Zellsuspension hinzugefügt um die Phagolysosombildung zu verhindern, und die Zellen weitere 10 min gerüttelt. Danach wurde 1µl einer $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -Lösung (1,8 M CaCl-Lsg, 1M MgCl-Lsg) zur Suspension gegeben um ein physiologisches Milieu für die Granulozyten herzustellen, und sofort je 100µl der Granulozytenzellsuspension zu den Proben gegeben. Dieser Ansatz wurde

30 min bei 37°C inkubiert und danach in einer Plattenzentrifuge die festen Bestandteile abzentrifugiert (1550 min⁻¹; 20 min). Der Überstand mit den Enzymen wurde granulozytenfrei abgenommen, und sofort im Lactoferrin-ELISA weiterverarbeitet.

6.2. Durchführung des Lactoferrin-ELISA

Der hier durchgeführte Lactoferrin-ELISA ist ein sogenannter Sandwich-ELISA, der freundlicherweise von Dr. E. Brandt (Forschungszentrum Borstel, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Mikrotiterplatten (Immulon II, Dynatech) mit Rundboden wurden mit einem gegen humanes Lactoferrin gerichteten Kaninchen-mAK in Sensibilisierungspuffer (0,1 M Carbonat/Bicarbonat, pH 7,2) beschichtet. Nach 24 Stunden wurde der Überstand verworfen, und die Platten 5x mit Tris-Waschpuffer gewaschen und mit 200µl/Napf Absättigungspuffer (0,05% Tween 20; 0,01% Timorosol; 2% BSA; pH 7,2) versehen. Nach zwei Stunden wurde der Absättigungspuffer für den Test entfernt, und in die Näpfe der ersten und siebten Spalte wurde je 93,75 µl Verdünnungspuffer und 6,25 µl (d.h. 1:16 Verdünnung) der Lactoferrin enthaltenen Überstände. In die übrigen Näpfe wurden 50ml Verdünnungspuffer gefüllt. Jeweils 50 µl der Probennäpfe wurden über 5 Stufen 1:3 verdünnt. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert, und dann gewaschen. Pro Napf wurden nun 50µl eines Peroxidase-Konjugats des gegen humanen Laktoferrin gerichteten Kaninchen mAK hinzugefügt. Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen, und die Platten 5x gewaschen. Anschließend wurde der Substratpuffer (20mg/5ml Orthophenylendiamin; 2,5µl/5ml H₂O₂) hinzugefügt, und bei beginnender Farbreaktion (20-30 min) die Mikrotiterplatte im Mikroplaterereader bei 450 nm gemessen. Die in Doppelbestimmungen gewonnenen Extinktionswerte wurden in einem Mikrocomputer weiterverarbeitet, und als prozentuale Freisetzung vom Gesamtlactoferringehalt der Granulozyten angegeben.

7. Messung der Granulozyten-Phagozytose durch CL-Bestimmung

Von den Granulozyten wurden je 300µl Aliquots in CL-Meßröhrchen (Lumocuvette, Perstorp Analytical, Holland) eingefüllt, so daß bei der eingestellten Konzentration von $0,66 \cdot 10^6$ /ml jeweils $2 \cdot 10^5$ Granulozyten enthalten waren. Diese Meßröhrchen wurden 45 min bei 37°C

inkubiert, und dann in den Meßkammern des 6-Kanal-Luminometer (Biolumat LB 9505, Berthold, Wildbad) positioniert.

5 min vor Meßbeginn wurden zu allen Proben 10 µl Luminollösung (2 mg/ml) zupipettiert. 2,5 min vor Meßbeginn wurde zu den Proben die antiphlogistische Medikation in verschiedenen Konzentrationen gegeben. Nach Start der Messung wurde vom Luminometer zunächst die CL-Basislinie registriert, und nach 2 min erhielt jede Probe den Stimulus, bestehend aus BCG-Mykobakterien der unterschiedlichen Aufarbeitungen.

Hinter den lichtdichten Meßkammern der Luminometer befinden sich Photomultiplier, deren spektraler Empfindlichkeitsbereich bei 375-620 nm liegt. Ungleichheiten in der Empfindlichkeit der Photomultiplier wurden als Korrekturwerte bezüglich eines Referenzkanals dem Gerät eingegeben und waren u.a. vom chemischen CL-Verstärker abhängig. Die Meßkammern waren auf 37°C temperiert. Die CL-Meßdaten wurden „on line“ einem Mikrocomputer übertragen und auf Disketten gespeichert. Mit Korrekturprogrammen von Dr. M. Ernst, Forschungszentrum Borstel, wurden die Kurven einer Messung an einen gemeinsamen Nullpunkt (Zugabe der Stimuli) verschoben. Es wurden die Flächenintegrale unterhalb der CL-Kurven zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt und ausgewertet.

8. Auswertung und Darstellung der Daten

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders vermerkt, mindestens dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse aus den CL-Bestimmungen resultierten aus Doppelbestimmungen gleicher Proben, die Werte sind die erhaltenen Mittelwerte (MW). Bei den Zytotoxizitätsexperimenten wurden stets 3 parallele Ansätze gemessen und Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) berechnet. Diese Werte finden sich als Symbole und Fehlerbalken in den entsprechenden Graphen wieder. Die dargestellten Meßwerte stammen jeweils aus einem repräsentativen Experiment.

Ergebnisse

1. Vergleich der BCG-induzierten Degranulation und der CL-Freisetzung durch Granulozyten bei Phagozytose von BCG-Mykobakterien

1.1 Zunächst wurde die Vermittlung einer BCG-induzierten Degranulation von Lactoferrin, einem Eisenkomplexbildner in den sekundären Granula neutrophiler Granulozyten untersucht. Dazu wurde ein Lactoferrin-Degranulations ELISA durchgeführt. Frisch isolierte Granulozyten wurden gemeinsam mit BCG in Konzentrationen von $1 \cdot 10^2$ bis $1 \cdot 10^7$ CFU/ml für 50 min inkubiert. Anschließend wurden die Überstände, wie in Abschnitt II.7 beschrieben, geerntet und der spezifische Gehalt an humanen Laktoferrin bestimmt. Es zeigte sich, daß erst bei einer Konzentration von mehr als $1 \cdot 10^5$ CFU/ml die Lactoferrin Freisetzung anstieg, um eine Plateauphase bei $1 \cdot 10^6$ CFU/ml zu erreichen (Abb.2).

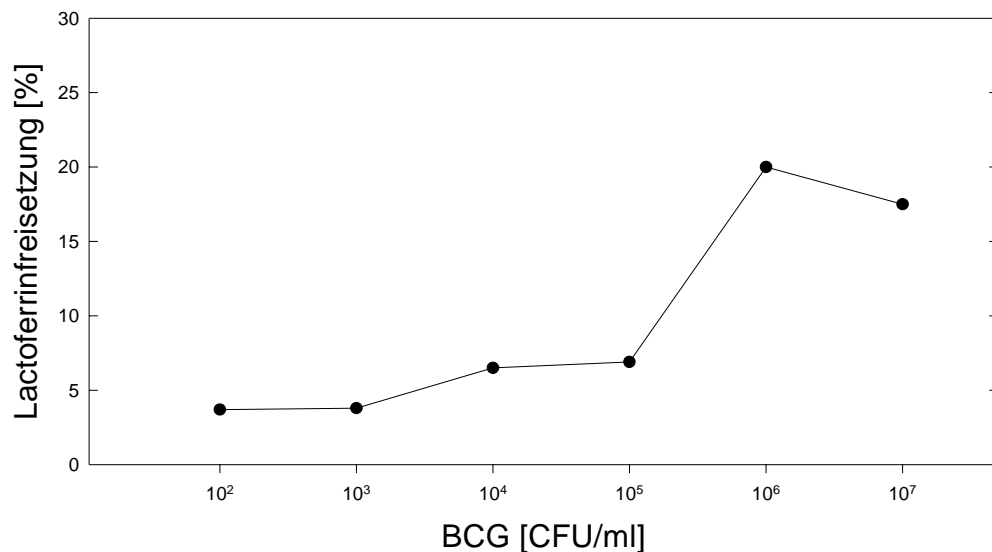


Abb. 2: Freisetzung von Lactoferrin aus Granulozyten nach Stimulation mit BCG:

Granulozyten wurden mit BCG-Tice in den angegebenen Konzentrationen für 50 min stimuliert, und die Freisetzung von Laktoferrin wurde im ELISA bestimmt.

1.2

In den folgenden Experimenten wurde aufgezeigt wie sich das Phagozytoseverhalten von Granulozyten in Abhängigkeit von der BCG-Konzentration ändert. Hierzu wurde die

Phagozytose-assoziierte Freisetzung aktivierter Sauerstoffmoleküle gemessen. Granulozyten wurden in einer Konzentration von $0,66 \cdot 10^6$ /ml in CL-Meßröhrchen eingestellt, und im Luminometer eingebracht. BCG in Konzentrationen von $2 \cdot 10^2$ bis $2 \cdot 10^6$ CFU/ml wurde in die Meßröhrchen gefüllt, und die Freisetzung aktivierter Sauerstoffmetabolite in Form von luminolvermittelter Lichtausbeute bestimmt. Wie in Abschnitt II.8 beschrieben wurden die Daten online auf einen Mikrocomputer übertragen, und einer computergestützten Korrektur und Auswertung unterzogen.

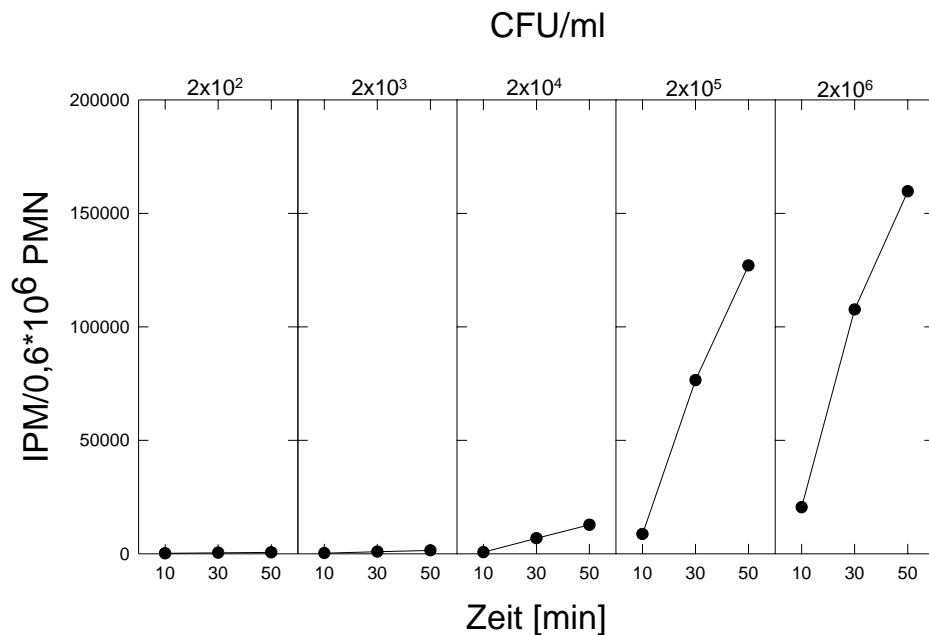


Abb.3: Abhängigkeit der CL-Antwort von der induzierenden Keimzahl: BCG wurde in den angegebenen Konzentrationen zur Stimulation von je $2 \cdot 10^5$ Granulozyten verwendet. Die phagozytose-assoziierte Freisetzung von Sauerstoffradikalen wurde im Luminometer gemessen, und die Höhe der Phagozytoseaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten in Impulsen pro minute (IPM) ausgerechnet.

Zusammenfassung I:

1. Die luminolvermittelte Chemilumineszenzantwort von BCG phagozytierenden Granulozyten ist mit der Freisetzung von Lactoferrin korreliert. Sowohl die CL-Antwort als auch die Lactoferrinfreisetzung können damit als Marker für die BCG-induzierte Aktivierung von Granulozyten eingesetzt werden.
2. Die Anzahl der induzierenden BCG-Mykobakterien bestimmt die Höhe der CL-Antwort zu frühen Meßzeitpunkten. Zu späten Zeitpunkten setzt bei den hohen Konzentrationen (ab $2 \cdot 10^5$ CFU/ml) eine Sättigung ein

3. Die Aktivierung der PMN setzt sprunghaft bei 10^4 bis 10^5 CFU/ml ein. Niedrigdosiertes BCG könnte somit unterhalb der PMN-Aktivierungsschwelle bleiben.

2. Vergleich verschiedener BCG-Präparationen im PMN-Aktivierungspotential

Im Folgenden sollte die Auswirkung verschiedener Aufarbeitungen von BCG-Mykobakterien des Stammes Tice auf die Granulozytenaktivierung anhand der Chemilumineszenzantwort dargestellt werden. Dazu wurden aus log-Phase der Kultur befindlichen BCG Mykobakterien viable, zur Einzelzellsuspension sonifizierte, hitzeinaktivierte, autoklavierte und kommerziell erhältliches BCG-Lyophilisat in einer Konzentration von 1×10^7 CFU/ml eingestellt, und zur Stimulation von Granulozyten eingesetzt. Es wurde je CL-Meßröhrchen eine Menge von $20 \mu\text{l}$ BCG-Zellsuspension zugegeben, was einer Menge von 2×10^5 BCG-Mykobakterien entspricht. Es war festzustellen (Abb.4), daß die Aufarbeitungen, die lebende Keime enthielten, eine durchweg höhere CL-Antwort hervorriefen als die hitzeinaktivierten und autoklavierten Fraktionen. Das kommerziell erhältliche BCG-Lyophilisat stimulierte die Granulozyten zu allen Meßpunkten am stärksten.

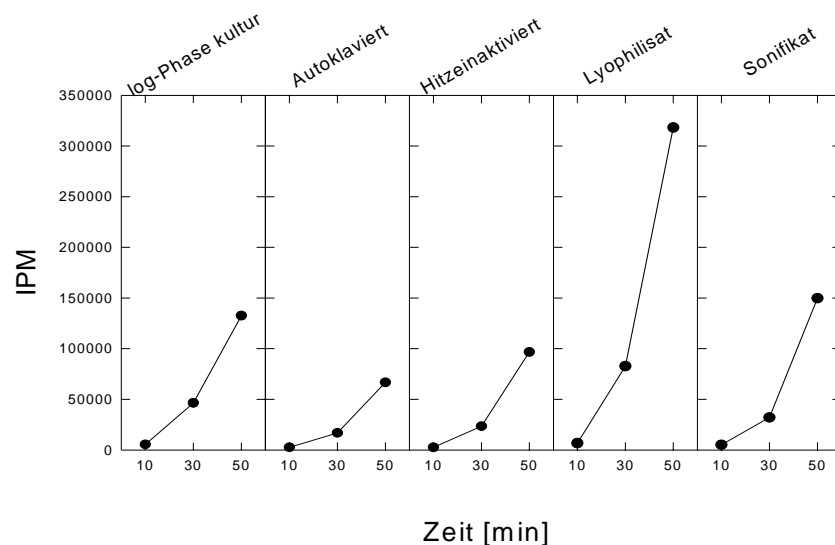


Abb.4: Vergleich des Granulozytenaktivierungspotentials verschiedener BCG-Aufarbeitungen: BCG-Tice Mykobakterien wurden in log-phase der Kultur, autoklaviert, hitzeinaktiviert, sonifiziert und als kommerzielles Lyophilisat mit Granulozyten kokkubiert. Die resultierende Chemilumineszenz zeigte die stärkste Aktivierung beim kommerziellen Lyophilisat.

Zusätzlich wurden BCG-Aufarbeitungen der Stämme RIVM und Connaught in ihrem Phagozytoseverhalten untersucht. Die oben genannten Ergebnisse sind für alle getesteten BCG-Stämme identisch. In Abbildung 5 ist zu sehen, daß auch das kommerzielle Lyophilisat der Stämme Connaught und RIVM ein stärkeres Granulozytenaktivierungspotential hat als

die rein viablen Keime oder die BCG Aufarbeitungen mit autoklavierten, hitzeinaktivierten und sonifizierten Mykobakterien.

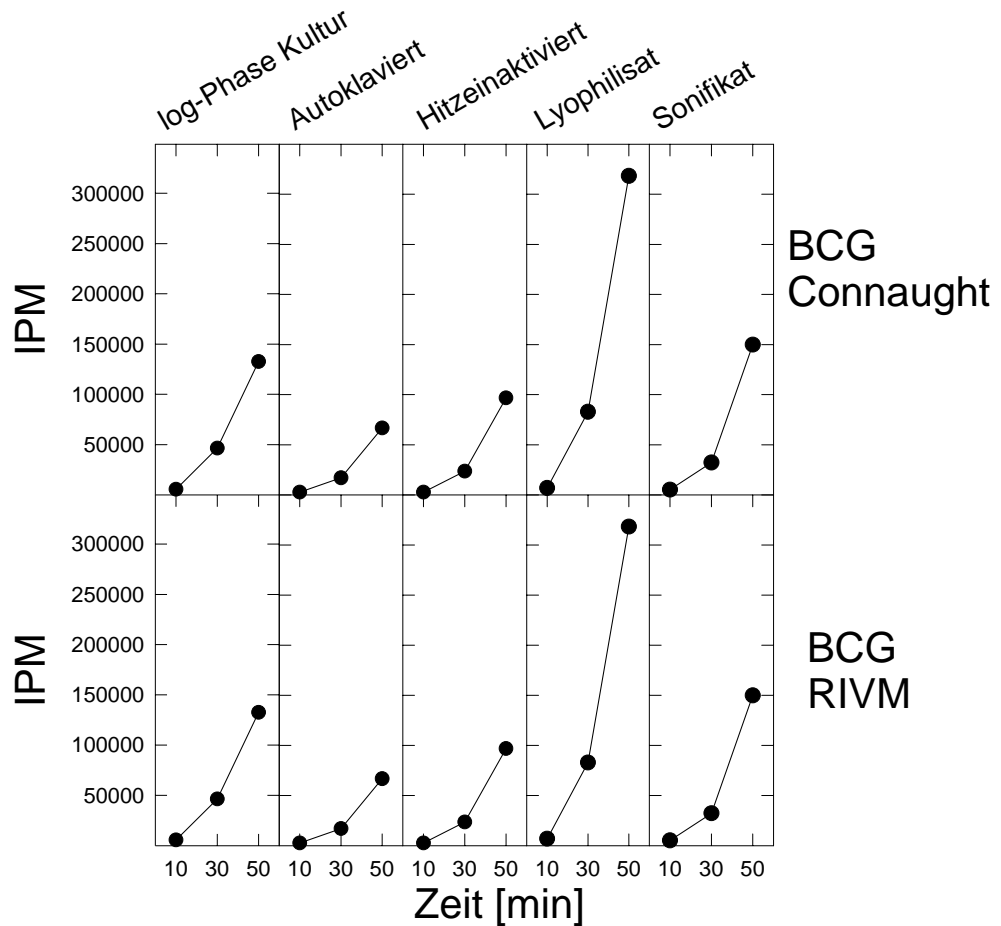


Abb.5: PMN-Aktivierung mit verschiedenen BCG-Stämmen

BCG-Mykobakterien der Stämme Connaught und RIVM wurden in der logarithmischen Wachstumsphase, autoklaviert, hitzeinaktiviert, als Lyophilisat und sonifiziert zur Stimulation von PMN verwendet. Die Chemielumineszenz wurde zu verschiedenen Zeiten bestimmt und zeigte auch bei diesen Stämmen das stärkste Aktivierungspotential beim kommerziell erhältlichen Lyophilisat.

Zur Beantwortung der Frage, ob BCG direkt, oder über ein bakterielles Stoffwechselprodukt an der Granulozytenaktivierung beteiligt ist, wurden ultrazentrifugierte und sterilfiltrierte Überstände aus BCG-Flüssigkultur verschiedener Aufarbeitungen als Stimulans für die Granulozytenaktivierung verwendet. Es wurde festgestellt, daß die BCG-Überstände nicht in der Lage waren, eine Aktivierung von Granulozyten hervorzurufen (Abbildung 6).

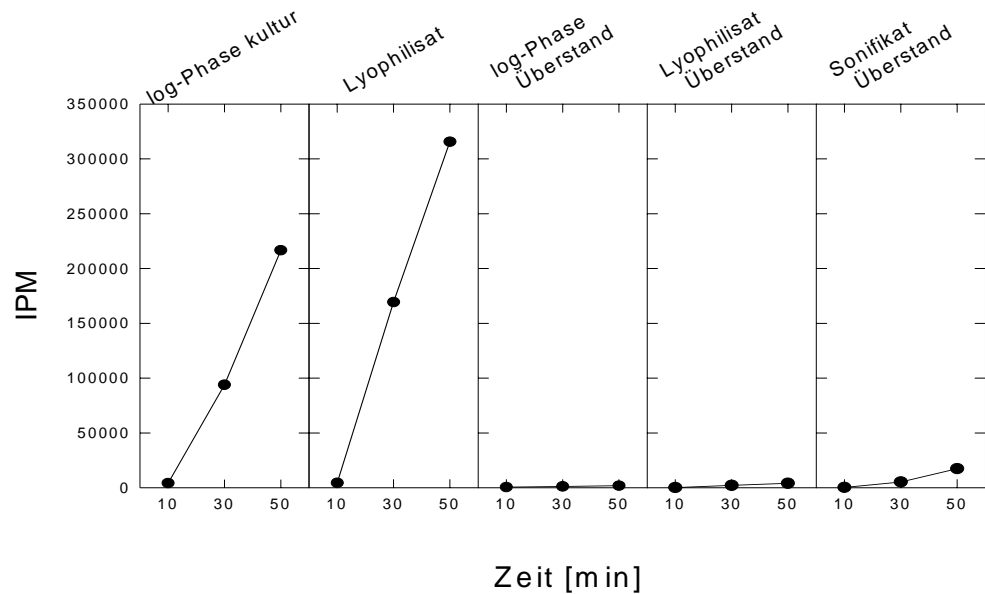


Abb.6: Stimulation von Granulozyten mit BCG-Kulturüberständen. Kulturüberstände von BCG-Mykobakterien in der logarithmischen Wachstumsphase und des Lyophilisats wurden in Ihrem PMN-Aktivierungspotential getestet. Im Vergleich dazu das Aktivierungspotential viabler Mykobakterien.

Es ist bekannt, daß das kommerziell erhältliche Lyophilisat aus einem Gemisch viabler und toter Mykobakterien besteht. Durch Mischungen von non-viablen mit viablen Keimen in den Verhältnissen

1. 25% viable Keime ; 75% non-viable Keime
2. 50% viable Keime ; 50% non-viable Keime
3. 75% viable Keime ; 25% non-viable Keime

wurde versucht, das starke Aktivierungsniveau des kommerziellen Lyophilisats zu erreichen. Die Abbildung 7 zeigt, daß durch keines der verwendeten Mischungsverhältnisse ein vergleichbarer Anstieg der Granulozytenaktivierung erreicht werden konnte.

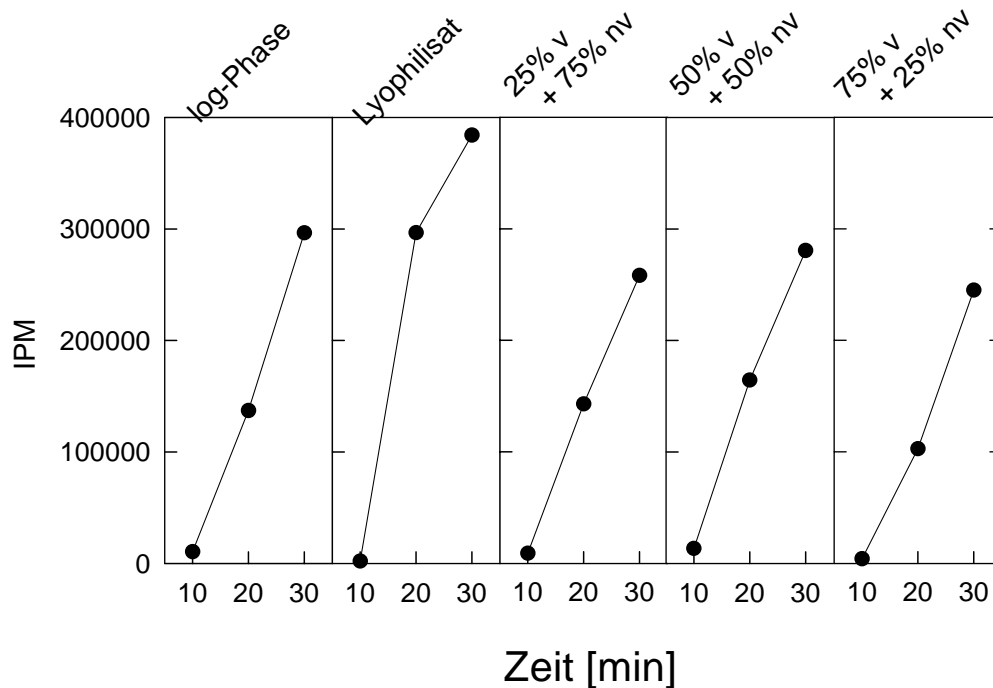


Abb.7: PMN-Aktivierung durch Gemisch aus viablen (v) und non-viablen (nv) BCG-Mykobakterien: BCG-Mykobakterien vom Stamm Connaught wurden in einer Menge von $2 \cdot 10^5$ CFU in verschiedenen Verhältnissen (viabel/non-viabel) zur PMN Aktivierung verwendet.

Zusammenfassung II:

1. Viable BCG-Aufarbeitungen rufen stärkere Granulozytenaktivierung hervor als non-viable Präparationen.
2. Kommerzielles Lyophilisat ist der stärkste Stimulus für Granulozytenaktivierung bei allen getesteten Stämmen.
3. Überstände mit BCG-Stoffwechselprodukten können keine Granulozytenaktivierung induzieren.
4. Gemische aus non-viablen und viablen Mykobakterien sind nicht in der Lage, das starke Aktivierungspotential des kommerziellen Lyophilisats nachzuahmen.

3. Vergleich der verschiedenen BCG-Aufarbeitungen und Mengen bei der Induktion zytotoxischer Killer Zellen

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse zeigen, daß es mit unterschiedlichsten Methoden möglich ist, die Granulozytenaktivierung als Maß für die Stärke der Nebenwirkungen zu modulieren. Im Folgenden soll nun dargestellt werden, wie sich die verschiedenen Aufarbeitungen bei der Induktion zytotoxischer Killerzellen verhalten.

3.1 Es wurde versucht, mit geringen Mengen von Mykobakterien eine zytotoxische Wirkung zu erzielen. Hierzu wurden mit BCG in Konzentrationen von $3,75 * 10^1$ bis $3,75 * 10^4$ CFU/ml aus frisch isolierten mononukleären Zellen zytotoxische Killerzellen (BAK-Zellen) generiert, und nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen der Zytotoxizitätstest nach Thanhäuser (siehe II.6) durchgeführt. Es wurde BCG aus der log-Phase der Kultur, aus autoklavierten und aus kommerziell erhältlichem Lyophilisat verwendet. Die Abbildung 8 zeigt, daß bei der Reduzierung der zur Induktion von BAK-Zellen verwendeten Menge an Mykobakterien auch die erzielte zytotoxische Wirkung sinkt.

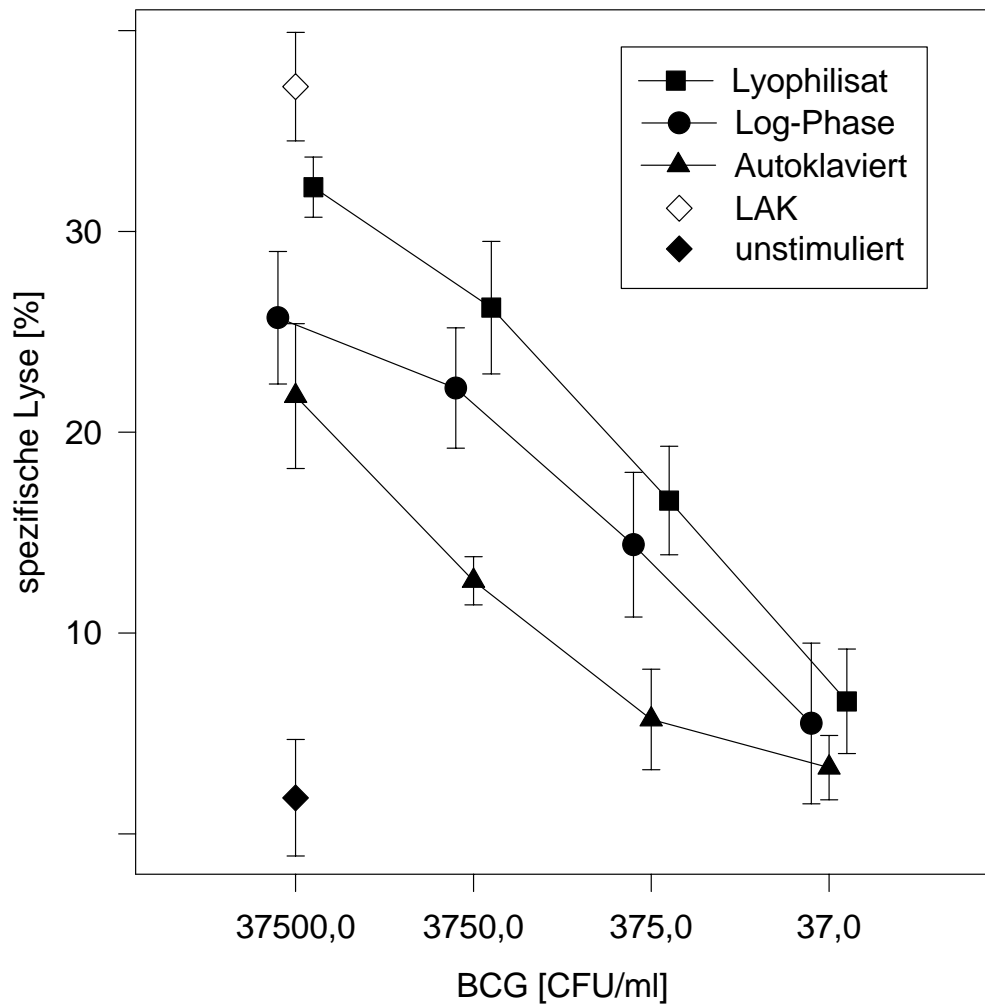


Abb 8: Induktion Zytotoxischer-Killer-Zellen mit verschiedenen BCG-Konzentrationen.

Unterschiedliche BCG-Aufarbeitungen wurden in verschiedenen Konzentrationen als Stimulans für die Effektorzellen verwendet. Zur Kontrolle ist die spezifische Lyse von Lymphokin-aktivierten-Killer Zellen (LAK) und unstimulierten MNZ aufgetragen.

3.2. Es sollte untersucht werden, ob die zytotoxizitätsinduzierende Komponente durch Mischungen viabler und non-viabler BCG zu modulieren ist. Hierzu wurden verschiedene Präparationen im Zytotoxizitätstest in der Idealkonzentration von $3,75 \cdot 10^4$ CFU/ml eingesetzt. Im einzelnen waren dies:

1. 25% viable Keime ; 75% non-viable Keime
2. 50% viable Keime ; 50% non-viable Keime
3. 75% viable Keime ; 25% non-viable Keime
4. BCG-Kulturüberstand

Die Gemische aus non-viablen und viablen Mykobakterien sollten die Konstellation der gefriergetrockneten BCG-Vaccine nachahmen. Doch durch keines der gewählten Mischungsverhältnisse ließ sich eine höhere Zytotoxizität erzielen (Abbildung 9).

Auch BCG-Kulturüberstände sind ein Bestandteil des kommerziellen Lyophilisats. Deshalb wurde sterilfiltrierte und ultrazentrifugierte Kultursuspension zur Induktion von BAK-Zellen eingesetzt. Die so generierten Zellen konnten jedoch keine zytotoxischen Effekte aufweisen (Abbildung 9).

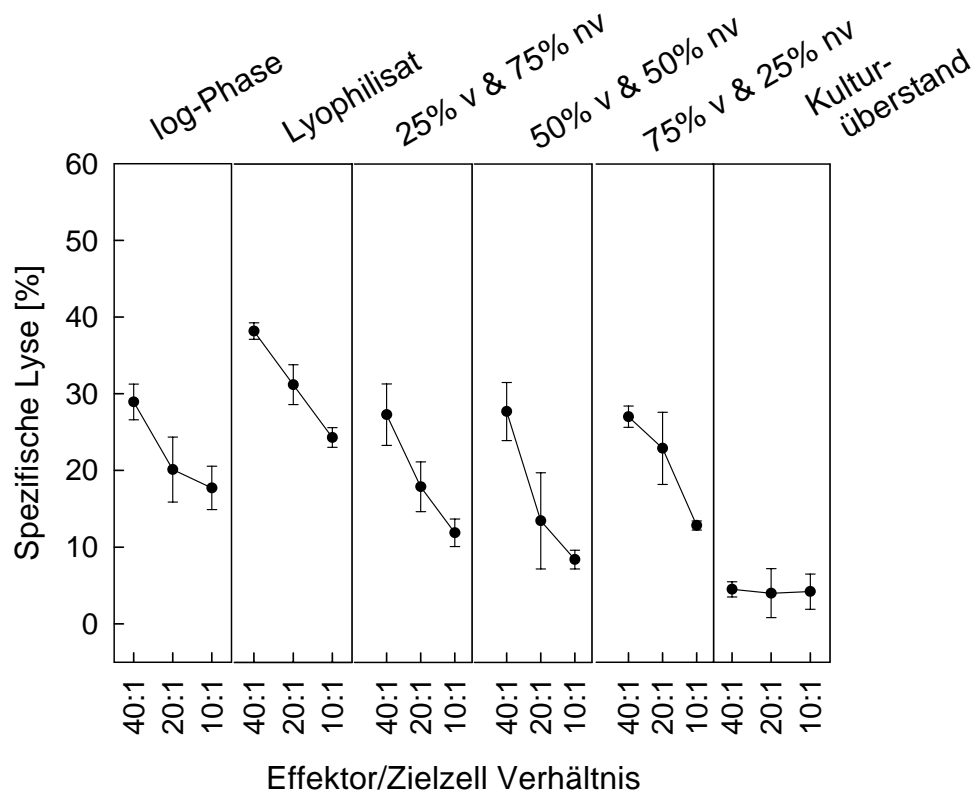


Abb.9: Induktion von BAK-Zellen durch verschiedene BCG-Präparationen: Viable (v) und non-viable (nv) BCG wurden in verschiedenen Verhältnissen zur Induktion von BAK-Zellen verwendet. BCG-Kulturüberstand wurde sterilfiltriert und diente ebenfalls als Stimulus für MNZ

Zusammenfassung III:

1. Mit geringeren Mengen an BCG-Mykobakterien zur Induktion zytotoxischer Killer Zellen sinkt auch die erzielbare zytotoxische Potenz
2. Das kommerzielle Lyophilisat besitzt das stärkste BAK-Zell-Induktionsvermögen
3. Gemische aus viablen und non-viablen Mykobakterien sind nicht in der Lage, die Zytotoxizität gegenüber den rein viablen, bzw den non-viablen Fraktionen zu steigern.
4. Kulturüberstände aus BCG-Flüssigkultur induzieren keine BAK-Zellen

4.:

Modulation der Chemilumineszenzantwort von Granulozyten bei Koinkubation mit antiinflammatorischen Medikamenten

4.1:

Der Einfluß verschiedener antiinflammatorischer Medikamente auf die Aktivierung von Granulozyten wurde untersucht. Im einzelnen wurde die BCG-induzierte CL-Antwort der Granulozyten mit Pentoxifyllin (POF), Indometazin, Metamizol, Cortison und Acetylsalicylsäure betrachtet.

Um den Einfluß des Phosphodiesterase-Inhibitors POF auf die Aktivierbarkeit von Granulozyten zu testen, wurde in die Granulozytensuspension unmittelbar vor der Stimulation mit viablen BCG-Mykobakterien 20, 100 und 200 µg/ml POF gemischt. Dann wurde die CL-Messung gestartet und die Flächenintegrale nach 10 min, 30 min und 50 min bestimmt. Ein deutlicher Abfall der CL-Antwort wurde festgestellt. Diese Hemmung war bereits bei 20µg/ml POF deutlich meßbar. Bei den höheren POF-Konzentrationen trat eine vollständige Hemmung der BCG-induzierten Granulozytenaktivierung ein (Abbildung 11).

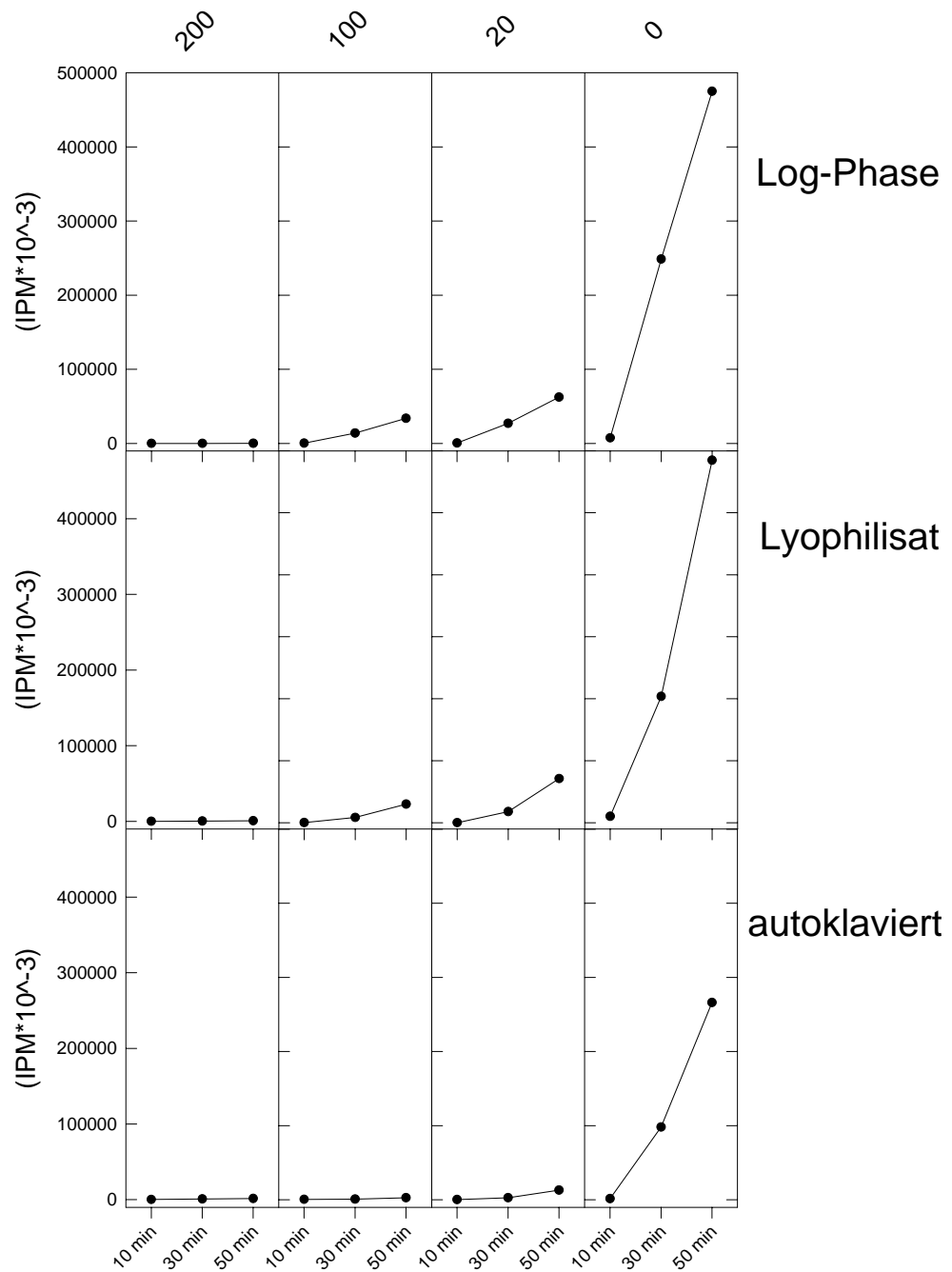


Abb.:11 Hemmung der BCG-induzierten Granulozytenaktivierung mit POF. Granulozyten wurden mit BCG verschiedener Präparationen koinkubiert, und das Maß der POF-abhängigen Hemmung bestimmt, indem mit verschiedenen Konzentrationen POF [µg/ml] koinkubiert wurde.

In weiteren Experimenten wurden Diclofenac, Metamizol, Acetylsalicylsäure und Cortison zur Modulation unterschiedlich stimulierter Granulozytenaktivierungen eingesetzt. Es ließ

sich feststellen, daß mit allen antiinflammatorischen Medikamenten eine Hemmung der Granulozytenstimulation zu erzielen war (Abbildung 12).

Antiphlogistikum	Granulozytenaktivierung
Cortison	↓ sinkt
Acetylsalicylsäure	↓ sinkt
Pentoxifyllin	↓ sinkt
Metamizol	↓ sinkt
Diclofenac	↓ sinkt

Abb 12 (Tabelle): Hemmung der Granulozytenaktivierung mit antiphlogistischer Medikation bei verschiedenen Stimuli

Zusammenfassung IV:

1. Mit den antiphlogistischen Medikamenten POF, Diclofenac, Metamizol, Cortison und Acetylsalicylsäure läßt sich die BCG-induzierte Aktivierbarkeit von Granulozyten dosisabhängig hemmen.
2. Diese Hemmung ist bei kommerziellen Lyophilisat, log-Phase-Kultur-BCG und mit autoklavierten BCG-Präparationen feststellbar.

5.:

Der Einfluß von antiinflammatorischen Medikamenten auf die BCG-vermittelte Induktion von BAK-Zellen.

Mit den bisher dargestellten Daten ließ sich der Einfluß antiinflammatorischer Medikamente auf die Nebenwirkungen der BCG-Therapie in-vitro zeigen. Eine spezifische, nämlich die zytotoxische Reaktion, ist jedoch für die Effektivität der BCG-Therapie notwendig. Deshalb wurde im folgenden der Einfluß der antiinflammatorischen Medikamente POF, Indometacin, Metamizol, Cortison und Acetylsalicylsäure auf die Induktion von BAK-Zellen hin untersucht. Die Medikamente wurden am Anfang der Stimulation in verschiedenen Konzentrationen in die Kultur gegeben. Die maximalen in vitro Konzentrationen wurden so hoch gewählt, daß sie den Blutplasmaspiegel des klinisch angewandten Pharmakons überstiegen (Abbildung 13) [Swan 1995, Simon 1985, Raz 1988, Kuczera 1995, Chandrashekar 1996]

Pharmakon	Zytotoxtest		Plasma- spiegel [µg/ml]	maximale Tagesdosis
	in vitro [µg/ml]	entspricht in vivo [Dosis]		
ASS	100	0,5 g	20	2,0 g
Metamizol	200	1 g	150	1,5 g
POF	200	1 g	100	1,2 g
Cortison	100	0,5 g	20	1 g
Diclofenac	1000	5 g	50	0,15 g

Abb 13: Vergleich der maximalen in-vitro Konzentrationen der im Zytotoxizitätstest verwendeten Pharmaka mit den klinischen Tageshöchstdosierungen. Unter Berücksichtigung des Plasmaspiegel bei klinischer Anwendung wurden die in-vitro verwendeten Dosierungen höher gewählt

Nach 7 Kulturtagen wurden die Zellen geerntet, und zunächst über einen FKS-Gradienten (10 min, 2 min Anlaufzeit, 400g) gewaschen. Danach wurde der Zytotoxizitätstest gegen Blasen tumorzelllinien BT-A und SBC-7 durchgeführt. Es trat ein deutlicher Abfall der nach 7 Tagen gemessenen Zytotoxizität bei den Medikamenten POF, Diclofenac, Metamizol und

Cortison auf. Acetylsalicylsäure hingegen konnte auch in der höchsten angewandten Dosierung die induzierte Zytotoxizität nicht senken (Abbildung 14).

Antiphlogistikum	Zytotoxizität
Cortison	↓sinkt
Acetylsalicylsäure	⇒ konstant
Pentoxifyllin	↓sinkt
Metamizol	↓sinkt
Diclofenac	↓sinkt

Abb14 (Tabelle): Zytotoxizität bei verschiedenen antiinflammatorischen Medikamenten

Zusammenfassung V:

1. Die Induktion von BAK-Zellen läßt sich durch die antiinflammatorischen Substanzen Diclofenac, Metamizol, POF und Cortison hemmen.
2. Auch mit den höchsten verwendeten Konzentrationen Acetylsalicylsäure bei der Induktion von BAK-Zellen wird noch eine ausreichend hohe Zytotoxizität gegen Blasentumorzellen erzielt.

Diskussion

Es ist bekannt, daß die aktive Immuntherapie mit BCG zu einer Infiltration von Granulozyten in die Blasenwand [Böhle A.1990, De-Jong W.H. 1986] führt. Nach der BCG-Instillationstherapie lassen sich massenhaft Granulozyten im Urin [deBoer E.C. 1991a; deBoer E.C. 1991b; deBoer E.C. 1991c] finden. DeBoer vermutet bei dieser Infiltration einen möglichen Wirkmechanismus der BCG-Therapie; gibt jedoch keine Auskunft über den Aktivierungszustand der Granulozyten. Viele Autoren gehen aber davon aus, daß die T-Zell-abhängige [Appelberg R. 1989] Granulozytenproliferation einen Hauptteil der Nebenwirkungen bei aktiven Immuntherapien verursacht [Sagone A.L.Jr. 1991]. Vor diesem Hintergrund, und der zeitlichen Korrelation zwischen Auftreten der Nebenwirkungen [Böhle A. 1996] und maximaler Granulozytenkonzentration im Urin der behandelten Patienten [de Boer E.C. 1991b; deBoer E.C. 1991c] kann man vermuten, daß die Nebenwirkungen der BCG-Therapie beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom tatsächlich durch eine überschießende Akkumulation und Aktivierung von Granulozyten hervorgerufen werden.

Die Quantifizierung der Granulozytenaktivierung durch verschiedene Stimuli ist somit ein sinnvoller Ansatz zur Beschreibung dieser Nebenwirkungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Assays zur Untersuchung der Aktivierung von Granulozyten entwickelt, da sich die Literaturangaben zur Aktivierung von Granulozyten mit BCG widersprechen.

Die Phagozytoseaktivität von Granulozyten mit BCG als Stimulus wurde von einigen Autoren nicht bestätigt [Friedrich A. 1990]. Andere konnten jedoch mit BCG-stimulierten Granulozyten sehr gute Aktivierungsergebnisse erzielen [Launois P. 1989]. Der hier benutzte Chemilumineszenzassay basiert auf der Phagozytose-assoziierten Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Er ist somit ein Nachweis der Phagozytoseaktivität von Granulozyten. Dieser erste Schritt in der Aktivierungskaskade der Granulozyten führt zur Freisetzung proteolytischer, proinflammatorischer Enzyme, welche die eigentlichen Mediatoren toxisch-irritativer Symptome sind [Fritz H. 1986].

Aus diesem Grunde wurde ein Degranulationsassay durchgeführt, bei dem der Überstand BCG-stimulierter Granulozyten auf die Freisetzung von Laktoferrin geprüft wurde. Dieses ist ein Eisenkomplexbildner, der in den sekundären Granula neutrophiler Granulozyten enthalten ist, wo auch die proteolytischen Enzyme Elastase und Myeloperoxidase vorhanden sind.

Durch diese Methode ließ sich direkt die proinflammatorische Aktivität von Granulozyten nachweisen. In den ersten Experimenten ist die Freisetzung von Laktoferrin durch verschiedene Konzentrationen von BCG-Mykobakterien getestet worden. Es ließ sich eine Steigerung der Freisetzung erzielen, bis zu einem Sättigungsgrad bei einer BCG-Konzentration von 1×10^6 CFU/ml. Auch bei der danach durchgeführten Phagozytosemessung zeigte sich eine Sättigung der zu erreichenden Aktivierungsrate bei einer Konzentration von 1×10^6 CFU/ml. Die beiden Experimente korrelierten statistisch signifikant miteinander. Somit zeigten diese Daten, daß BCG-Mykobakterien Granulozyten konzentrationsabhängig bis zur Degranulation proinflammatorischer Enzyme aktivieren können. Dies ist ein weiteres Zeichen für das Vorhandensein granulozytenvermittelter Nebenwirkungen.

Bei der Herstellung der kommerziellen BCG-Vaccine werden viable Mykobakterien gefriergetrocknet, und unter Zugabe von Detergenzien in einer Ampulle luftdicht bis zur Verwendung aufbewahrt [Behr M.A. 1990]. Dabei wird von den Herstellern die Mindestmenge an viablen Mykobakterien angegeben. Die Menge an Bakterien, die bei der Aufbereitung des Lyophilisats getötet wird, bzw die Menge an Bakteriendebris ist jedoch ungleich größer [Olson W.P. 1990]. Um den Einfluß dieser Fraktionen auf die Aktivierung von Granulozyten zu untersuchen, habe ich im Chemilumineszenzassay Granulozyten mit verschiedenen Aufarbeitungen von Mykobakterien getestet. Die lebenden Fraktionen, bestehend aus Mykobakterien der logarrhythmischen Phase der Kultur, sonifizierte Einzelzellsuspensionen und kommerziellen Lyophilisat hatten durchweg ein höheres Aktivierungspotential, als die nicht lebenden, hitzeinaktivierten und autoklavierten Mykobakterien. Castro hat die Chemotaxis und Phagozytoseaktivität von Granulozyten bei mykobakteriellen Infektionen in-vivo untersucht. Er fand im Einklang zu den hier dargestellten Ergebnissen, daß hitzeinaktivierte Keime keine Chemotaxis induzieren und auch weniger phagozytiert werden als viable Mykobakterien [Castro A.G. 1991]. In Erweiterung der Untersuchungen von Castro habe ich diese Experimente mit Mykobakterien anderer BCG-Stämme wiederholt, mit dem Ergebnis, daß auch hier die Viabilität der Hauptfaktor für die Aktivierung von Granulozyten ist. BCG-Kulturüberstände können in den hier durchgeführten Experimenten keine Aktivierung hervorrufen. Die neuesten Ergebnisse der Gruppe um Kurth [Kurth K.H. 1996] widersprechen hier. Kurth et al habe ein 1000 kDa großes, nicht näher beschriebenes Molekül aus dem Überstand von BCG-Flüssigkulturen entdeckt, welches starke chemotaktische Wirkung auf Granulozyten habe. Dabei ist jedoch die BCG-Kultivierungsmethode genauer zu betrachten. In diesen Experimenten wurden die Mykobakterien nicht in speziellen, für Mykobakterien idealen Lockeman-Medium kultiviert,

sondern in RPMI-Zellkulturmedium, welches für Mykobakterien nicht das Kulturmedium der ersten Wahl ist.

Als letzte spezielle Mykobakterienpräparation habe ich Gemische mit verschiedenen Anteilen an lebenden und nicht-viablen Mykobakterien zur Aktivierung von Granulozyten hergestellt. Wir stellten die Arbeitshypothese auf, daß durch ein Gemisch aus toten und lebenden Mykobakterien das hohe Aktivierungspotential des kommerziellen Lyophilisats nachzuahmen sei. Doch es zeigte sich, daß die verwendeten Gemische nicht in der Lage waren, die Granulozyten so stark zu aktivieren, wie es das Lyophilisat tut. Man kann daraus folgern, daß in der speziellen (Gefriertrocknung) Aufarbeitung des Lyophilisats das hohe Aktivierungspotential des kommerziellen Lyophilisats begründet liegt. Möglicherweise „schleichen“ sich dadurch noch nicht näher definierte, nicht therapiewirksame Bestandteile in die Präparation, die zu der hohen Aktivierbarkeit führen.

Die bisher gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß sich mit bestimmten Präparationsmethoden der Mykobakterien die Granulozytenaktivierbarkeit ändert. Die BCG-Therapie ist jedoch als aktive Immuntherapie in ihrer Wirksamkeit von einer Aktivierung des Immunsystems abhängig. Deshalb ist es notwendig, die getesteten Präparationen auch im Hinblick auf die Modulation der gewünschten Wirkung zu untersuchen. Hierzu wurde der Zytotoxizitätstest nach Thanhäuser durchgeführt [Thanhäuser A. 1993]. Humane periphere mononukleäre Blutzellen isoliert wurden und mit verschiedenen Mengen und Aufarbeitungen von BCG-Mykobakterien für 7 Tage koinkubiert. Die so hergestellten BAK-Zellen wurden daraufhin im Zytotoxizitätsassay gegen die Blasen-tumorzelllinien SBC-7 und BT-A eingesetzt.

Zuerst wurde BCG-Tice in der logarithmischen Wachstumsphase in der Konzentration von $3,75 \times 10^4$ CFU/ml und in den geringeren Konzentrationen von $3,75 \times 10^1$ CFU/ml, $3,75 \times 10^2$ CFU/ml und $3,75 \times 10^3$ CFU/ml eingesetzt. Ich habe festgestellt, daß mit der Verringerung der zur BAK-Zell Induktion verwendeten Anzahl an Mykobakterien auch die erzielbare Zytotoxizität sinkt. Diese Daten entsprechen den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Böhle et al [Böhle A. 1993], der auch bei der BAK-Zell Induktion ein Optimum bei einer BCG-Mykobakterienkonzentration von $3,75 \times 10^4$ CFU/ml angibt. Auch der schnelle Abfall der zytotoxischen Potenz der BAK-Zellen bei geringeren Konzentrationen stimmt mit diesen Untersuchungen überein.

Nach diesen Ergebnissen stellt sich die Frage, ob die Konzentrationsabhängigkeit der BAK-Zell Induktion bei allen Mykobakterien gegeben ist. Diese Untersuchung wurde bisher noch nicht durchgeführt. Ich habe festgestellt, daß man auch bei autoklavierten und sonifizierten

BCG-Mykobakterien und beim kommerziellen Lyophilisat den Abfall der induzierbaren Zytotoxizität erkennen kann.

Die BAK-Zell Induktion mit unterschiedlichen BCG-Präparationen ist in Ansätzen schon von Wang und von Thanhäuser untersucht worden. Während Wang aus sonifizierten und zellfrei filtrierten BCG-Zellwandantigenen eine T-Zell abhängige Zytotoxizität aktivieren konnte [Wang M.H. 1993], beschreibt Thanhäuser daß jegliche nicht viable BCG-Aufarbeitung nur zu geringer Zytotoxizität gegen Blasen tumorzelllinien führt [Thanhäuser A. 1993].

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen teilweise im Widerspruch zu den oben angegebenen Daten. Sowohl mit nicht-viablen (autoklavierten) als auch mit sonifizierten BCG-Mykobakterien konnte eine starke BAK-Aktivität erzielt werden. Hierzu ist anzumerken, daß die von den genannten Autoren benutzte Methode der Sonifizierung [Harboe M. 1977] in meinen Experimenten zu keiner Tötung der Mykobakterien geführt hat. Vielmehr ist durch das Sonifizieren eine Einzelzellsuspension hergestellt worden, die sich in ihrer Viabilität nicht von den Mykobakterien in der logarithmischen Wachstumsphase unterschied. Damit ist zu verstehen wie Wang zu T-Zell-aktivierenden Ergebnissen kam. Bei den Versuchen von Thanhäuser sind die noch intakten Bakterien durch die Ultrazentrifugation vom Überstand getrennt worden. Dieser enthielt dann wahrscheinlich eine Suspension mykobakterieller Stoffwechselprodukte, welche auch in meinen Experimenten zu keinerlei Aktivierung führten. Auch die Hitzeinaktivierung die von Thanhäuser durchgeführt wurde [Thanhäuser A. 1993] ist in der benutzten Methode (10 min, 100°C) nicht suffizient. Nach meinen Experimenten ist eine Hitzeinaktivierungsdauer von mindestens 30 min bei 100°C notwendig, um eine vollständige Abtötung aller Keime zu erhalten (Daten nicht gezeigt). Andere Autoren geben hier Zeiten von 120 min Dauer bei 70°C an [Launois P. 1989]. Warum Thanhäuser bei den Experimenten mit hitzeinaktivierten BCG-Mykobakterien dann nicht höhere Aktivierungspotentiale erzielt hat, kann nur eine genauere Analyse seiner Experimente erklären.

Zusammenfassend läßt sich zu diesem Themenkomplex erläutern, daß die Induktion von BAK-Zellen mit viablen und mit nicht-lebenden BCG-Mykobakterien möglich ist. Das Stimulationsoptimum ist für alle verwendeten Präparationen gleich, bei $3,75 \times 10^4$ CFU/ml. Geringere Konzentrationen an Mykobakterien in der Induktionsphase führen zu einer Verringerung der erzielbaren gewünschten Zytotoxizität. Deshalb sollte man nach diesen in-vitro Daten das empirisch etablierte Dosierungsschema nicht zugunsten geringerer Nebenwirkungen ändern ohne dies in weiteren Studien zu prüfen, obwohl die klinische Studie von Pagano [Pagano F. 1991] hierfür eine Argumentationsgrundlage bietet. BCG-

Kulturüberstände können keine zelluläre Zytotoxizität induzieren. Sie sind deshalb nicht geeignet in der BCG-Therapie verwendet zu werden.

Die bisher gewonnenen Daten führten zu der Erkenntnis, daß man mit viablen und mit nicht-lebenden Mykobakterien eine zelluläre Zytotoxizität gegen Blasen-tumorzellen erzielen kann. Die nicht lebenden Fraktionen führen weiterhin nur zu einer geringen Granulozytenstimulation, und scheinen deshalb geeignet in der BCG-Therapie eingesetzt zu werden. Dieses Ergebnis verstößt gegen ein „Dogma“ der BCG-Therapie [Zbar B. 1979, Klein E. 1973] indem für eine suffiziente Immunstimulierung viable Mykobakterien benutzt werden müssen. Möglicherweise treten diese in-vitro Effekte bei der Anwendung im Tiermodell oder beim Menschen hinter einem anderen Mechanismus der BCG-Therapie zurück.

Im letzten Teil dieser Arbeit habe ich den Einfluß verschiedener antiinflammatorischer Medikamente auf die Aktivierung von Granulozyten als Mediatoren der BCG induzierten Nebenwirkungen untersucht. Diese Medikamente wurden in Flüssigmedium gelöst und im Chemilumineszenzassay in Koinkubation mit Granulozyten und BCG-Mykobakterien eingesetzt. Weiterhin wurden diese Medikamente im Zytotoxizitätsassay bei der Induktion von BAK-Zellen zugegeben, um so den modulierenden Effekt auf mononukleäre Zellen des peripheren Blutes zu untersuchen.

Im ersten Experiment dieser Versuchsreihe wurden Granulozyten mit verschiedenen hohen Dosierungen Pentoxifyllin (POF) gemischt, und unmittelbar danach viable BCG-Mykobakterien zugegeben. POF kann in Abhängigkeit von der Dosierung die Granulozytenaktivierung hemmen. Dieser Effekt ließ sich auch mit dem kommerziellen Lyophilisat und autoklavierten BCG nachweisen. Auch andere Autoren haben schon die Interaktion von POF mit Granulozyten untersucht. So haben Yasui und Thiel verschiedene stimulierte Granulozyten mit POF inhibiert, wobei Yasui die Granulozyten mit LPS stimuliert hat, und Thiel direkt den chemotaktischen FMLP-Rezeptor stimuliert. Beide Autoren geben eine dosisabhängige Hemmung der Granulozytenaktivierbarkeit an [Yasui K. 1994; Thiel 1991].

Sowohl Glucocorticoide (Cortison) als auch nicht-steroidale-Antiphlogistika (Diclofenac, ASS, Metamizol) hemmen die BCG-induzierte Granulozytenaktivierbarkeit. Auch dieser Effekt ist von anderen Autoren schon beschrieben worden, wobei diese Aktivierungsstudien bisher noch nicht mit Mykobakterien als stimulierendes Antigen durchgeführt wurden.

Glucocorticoide und die nicht-steroidalen Antirheumatika Diclofenac, Metamizol und POF hemmen in Abhängigkeit von ihrer Dosierung die BAK-Zell Generierung. Acetylsalicylsäure

hingegen modulierte auch in der höchsten angewendeten Dosierung die Induktion von BAK-Zellen nicht. Diese Experimente sind mit Dosierungen durchgeführt worden, die höher als die in-vivo Plasmaspiegel der Medikamente sind. Es ist zu erkennen, daß insbesondere die antiphlogistische Medikation von Acetylsalicylsäure nicht ausreicht um eine Hemmung der BAK-Zell Zytotoxizität zu erzielen. Nach diesen in-vitro Daten kann ASS das Mittel der Wahl bei der Reduktion BCG induzierter Nebenwirkungen sein. Zur weiteren Validierung dieser Aussage sollten diese Experimente im Tiermodell überprüft werden.

Während bei der Modulation der Granulozytenaktivierung mit antiinflammatorischer Medikation ein Konsens unter verschiedenen Autoren herrscht (siehe oben) ist dies bei der Modulation T-Zell abhängiger Mechanismen nicht so. Glucocorticoide sind allgemein anerkannt die stärksten Hemmer immunkompetenter Zellen. Die Wirksamkeit von POF bei der Membranstabilisierung humaner mononukleärer Zellen ist schon von Thanhäuser festgestellt worden, der die Zytokinproduktion durch POF hemmen konnte [Thanhäuser A. 1993]. Die auch bei seinen Untersuchungen stark vorhandene Senkung der zellulären Zytotoxizität war in seinem System reversibel. Damit ist POF für Thanhäuser ein wirksames Medikament um die Nebenwirkungen der BCG-Therapie zu senken. Eine teilweise gegenteilige Wirkung der nicht-steroidalen Antiphlogistika ist auch schon von anderen Autoren beschrieben worden. So ist die Aktivierung immunkompetenter Zellen widersprüchlich. Marcinkiewicz hat mit Aspirin die IL-3 Sekretion steigern können, während die IL-2 Sekretion abnahm, obwohl beide Interleukine durch Prostaglandine vermehrt sezerniert wurden [Marcinkiewicz J. 1992]. Auch die Verstärkung von Immunantworten bei viralen Infektionen wird diskutiert [Rumore M.M. 1987]. Vor dem Hintergrund mehrerer postulierter Reaktionsmechanismen vermutet auch Rumore unterschiedliche Wirkkomponenten von Aspirin. So hat Lewis Cyclooxygenaseinhibitoren, zu denen Aspirin gehört, untersucht. Er hat entdeckt, daß die immunsuppressiven Effekte der Prostaglandine zu einer gegenregulatorischen Steigerung der Lymphokinsekretion führen, und hält so eine chronische Entzündungsreaktion nach Gabe von Cyclooxygenaseinhibitoren für möglich [Lewis G.P. 1986].

In der Arbeitsgruppe um Ratliff wurde die Adhäsion von BCG an Blasen tumorzellen als erster Schritt der BCG-Wirkung beschrieben [Hudson M.A. 1990]. Diese Adhäsion sei Fibronectin vermittelt. Fibronectin als integraler Bestandteil der Fibrinsynthese und somit der Thrombozytenaggregation kann demnach von Hemmern der Thrombozytenaggregation inhibiert werden. Ratliff et al stellte eine stark verminderte Anti-Tumor -Aktivität von BCG bei Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern in vivo (Mausmodell) fest. Er begründete

dies mit dem nicht mehr zur Verfügung stehenden Fibronectin. Auch im Hinblick auf diese Fragestellung sollten weitere Experimente im Tiermodell durchgeführt werden.

Weitere Autoren testeten antiphlogistische Medikamente in ihrer direkten prophylaktischen Wirkung auf Krebserkrankungen. Am genauesten sind hier Zusammenhänge mit dem Kolonkarzinom untersucht. In prospektiven Studien zeigten Thun und Giovannucci, daß das Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken, bei den Personen die ASS regelmäßig einnahmen, um bis zu 40 Prozent geringer war [Thun M.J. 1991, Giovannucci E. 1995]. Es gibt weitere Studien, die darauf hinweisen, daß auch andere bösartige Tumoren günstig beeinflußt werden [Will J.C. 1998, Funkhouser P. 1996, Farrow D.C. 1998].

Verschiedene Autoren führten in vitro Versuche zur Wirkung von antiphlogistischen Medikamenten auf Urothelkarzinome durch. Rao zeigte, daß die tumorinduzierende Wirkung von Nitrosaminen durch Ibuprofen, nicht aber durch ASS inhibiert werden kann [Rao K.V. 1996]. Lambert stellte beim Karzinogen Phenylphenol eine deutliche Verminderung der Zellveränderungen unter Indometazin und ASS fest [Lambert A.C. 1994]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse zeigen die mannigfaltigen Möglichkeiten der Karzinogenese von Blasentumoren. So wirken Nitrosamine direkt karzinogen, während Phenylphenole über Cytochrom-P-450-Oxidase und Prostaglandin-H-Synthase zu den eigentlich toxischen Metaboliten verstoffwechselt werden. Bei den kolorektalen Tumoren ist eine erhöhte zelluläre Prostaglandinsynthese bekannt [Tsuji M. 1998,]. ASS senkt diese Spiegel über eine Hemmung der Cyclooxygenase. Weiterhin erhöht ASS über die Verminderung der wirksamen Cyclooxygenase II die Apoptoserate [Barnes R. 1998, Quiao L. 1998, Shiff S.J. 1996]. Doch auch cyclooxygenaseunabhängige Mechanismen werden diskutiert. Denn ASS hat auch zytostatische Wirkung in Zelllinien, in denen dieses Enzym fehlt [Ruschoff J. 1998].

Man kann nach diesen Daten sehr wohl postulieren, daß ASS keinen modulatorischen Effekt auf die Induktion von BAK-Zellen hat. ASS könnte deshalb bei der BCG-Therapie zur Beseitigung unerwünschter Nebenwirkungen beitragen. Denn nur mit diesem antiinflammatorischen Medikament wird die gewünschte und notwendige zytotoxische Reaktion gegen Blasentumorzellen nicht inhibiert. Wie schon oben erwähnt sind zur weiteren Validierung dieser interessanten in-vitro Zusammenhänge unbedingt weitere in-vivo Experimente erforderlich. So sollte zum Beispiel die Modulation der BCG-induzierten Zytotoxizität mit antiphlogistischer Medikamente im Tiermodell getestet werden.

Wie schon erwähnt, werden Maßnahmen zur Reduktion der Nebenwirkungen der BCG-Therapie dringend benötigt, und die hier vorgestellte Arbeit ist ein erster und wichtiger Ansatz zur Lösung dieses klinisch relevanten Problems.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit galt das Interesse den Nebenwirkungen der klinisch erfolgreich angewandten Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms. Diese Nebenwirkungen wurden auf zellulärer Ebene in Form eines Granulozyten-chemilumineszenzassays in-vitro beschrieben. Im Vergleich dazu wurden die verwendeten BCG-Präparationen in einem Zytotoxizitätsassay gegen Blasentumorzelllinien angewendet. In einem weiteren Schritt wurden beide Assays in Koinkubation mit antiinflammatorischen Medikamenten durchgeführt. Die verwendeten viablen BCG-Präparate erzeugten durchweg hohe Zytotoxizitäts- und Granulozytenaktivierungen. BCG- Kulturüberstände waren nicht in der Lage immunkompetente Zellen zu stimulieren. Nicht-viable, autoklavierte BCG-Präparationen erzeugten eine ähnlich hohe Zytotoxizitätsrate wie die viablen Präparationen, aktivierten die Granulozyten jedoch schwächer. Von den verwendeten antiinflammatorischen Medikamenten hatte nur ASS keinen inhibierenden Effekt auf die BAK-Zell-Induktion, den wesentlichen Effektor in der Zytotoxizität gegen Blasentumorzellen. Diese Experimente zeigen, daß ASS ein wirksames Medikament in der Behandlung der BCG-induzierten Nebenwirkungen sein kann, da es zumindest in-vitro keinen negativen Effekt auf die Wirkung der BCG-Therapie hat. Es sollten weitere Studien in Form von Tierexperimenten durchgeführt werden, welche die hier in-vitro festgestellten Untersuchungen bestätigen könnten.

Literatur

1. Adolphs H.D., Helpap B., Ergebnisse der Chemoimmunprophylaxe bei oberflächlichen Harnblasenkarzinomen. *der Urologe (A)* 1982, 21, 29-33
2. Adolphs H.D., Thiele J., Kiel H., Inhibition of experimental bladder tumor induction by systemic BCG-treatment. *Eur.Urol.* 1981, 7, 35-38
3. Akaza H., Iwasaki A., Ohtani M., Ikeda N., Nijjima K., Toida I., Koiso K., expression of anti-tumor response. Role of attachment and viability of BCG to bladder cancer cells. *Cancer* 1993, 72, 558-563
4. Appelberg R., Silva M.T., T-cell dependent chronic neutrophilia during mycobacterial infections. *Clin. Exp. Immunol.* 1989, 78, 478-483
5. Badalament R.A., Herr H.W., Wong G.Y., Gnecco C., Pinsky C.M., Whitmore W.F., Fair W.R., Oettgen H.F., A prospective randomized trial of maintenance vs. Non-maintenance intravesical BCG-therapy of superficial bladder cancer. *J.clin. Onkol.* 5, 1985, 441-449
6. Barnes C.J.; Cameron I.L.; Hardman W.E.; Lee M.: Non-steroidol anti-inflammatory drug effect on crypt cell proliferation and apoptosis during initiation of rat colon carcinogenesis. *Br. J. Cancer.* 1998, 77, 573-80
7. Barnes R., Hadley H., Dick A., Johnston O., Dexter J., Changes in grade and stage of recurrent bladder tumors. *J.Urolog.* 1977, 118, 177-178
8. Bast R.C., Zbar B., Borsos,T., Rapp,H.J.: BCG and cancer (First of two parts). *N. Engl. J. Med:* 1974, 1413-1420
9. Bast R.C., Zbar B., Borsos,T., Rapp,H.J.: BCG and cancer (Second of two parts). *N. Engl. J. Med:* 1974, 1458-1469
10. Bauer H.W., Mitomycin C-Ergebnisse bei Harnblasentumoren. *Tumordiagnostik und Therapie* 1984, 5, 23-28
11. Böhle A., Balck F., Wietersheim J., Jocham D., The quality of life during intravesical BCG-therapy. *J.Urol.* 1996, 155, 1221-1226
12. Böhle A., Jocham D., Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Urothelkarzinoms und Therapie des carcinoma in situ der Harnblase mit BCG: Eine Übersicht. *W.Zuckschwerdt Verlag GmbH, München, (1992)*

13. Böhle A., Thanhäuser A., Ulmer A.J., Ernst M., Flad H.D., Jocham D., Dissecting the immunobiological effect of BCG in vitro: Evidence of a distinct BCG-activated killer (BAK) cell phenomenon. *J. Urol.* 1993, 150, 1932-1937
14. Böhle A., Busemann E., Gerdes J., Ulmer A.J., Flad H.D., Jocham D., Effects of local BCG-therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall. *J. Urol.* 1990, 144, 53-58
15. Böhle A, Jocham D., Intravesical immunotherapy with Bacillus Calmette-Guérin, facts, figures and results Urban und Fischer Verlag, München, 2000, 113-121
16. Brosman S.A.. BCG in the management of superficial bladder cancer. *Urology* 1984, 23, 82-87
17. Carl P., Therapie und Prognose der Blasenpapillomatose. *Münch. Med. Wochenschr.* 1980, 122, 1601-1602
18. Castro A.G., Esaguy N., Macedo P.M., Aguas A.P., Silva M.T., Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils in vivo and are ingested by the attracted granulocytes. *Infect. Immun.* 1991, 59, 3009-3014
19. Catalona W.J., Hudson M.A., Gillen D.P., Andriole G.L., Ratliff T.L.: Risks and benefits of repeated courses of intravesical Bacillus-Calmette-Guèrin therapy for superficial bladder cancer. *J.Urol.* 1987, 137, 220-224
20. Chandrashekar-G.; Udupa-N.: Biodegradable injectable implant systems for long term drug delivery using poly (lactic-co-glycolic) acid copolymers. *Pharm.-Pharmacol.* 1996 , 48, 669-74
21. Coe J.E., Feldmann J.D., Extracutaneous delayed hypersensitivity, particularly in the guinea-pig bladder. *Immunol.* 1966, 10, 127-136
22. de Jong W.H., Teppema J.S., Wagenaar S.S., Paques M., Steerenberg P.A., Ruitenber, E.J., Histologic evaluation of immunologically mediated tumor regression of the line 10 guinea pig hepatocarcinoma. *virchows Arch. B-Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 1986, 50, 249-269
23. De Boer E.C., De Jong W.H., Steerenberg P.A., Van der Meijden A.P., Aarden L.A., Debruyne F.M., Ruitenber, E.J., Leukocytes and cytokines in the urine of superficial bladder cancer patients after immunotherapy with BCG. *In-vivo.* 1991, 5/6, 671-677
24. De Boer E.C., De Jong W.H., Van der Meijden A.P., Steerenberg P.A., Witjes J.A., Vegt P.D., Debruyne F.M., Ruitenber, E.J., Presence of activated lymphocytes in the urine of patients with superficial bladder cancer after intravesical immunotherapy with BCG. *Cancer-Immunol.-Immunother.* 1991, 33, 411-416

25. De Boer E.C., De Jong W.H., Van der Meijden A.P., Steerenberg P.A., Witjes J.A., Vegt P.D., Debruyne F.M., Ruitenbergh, E.J., Leukocytes in the urine after intravesical BCG treatment for superficial bladder cancer. A flow cytometric analysis. *Urol. Res.* 1991, 19, 45-50
26. Egan K.M., Stampfer M.J., Giovannucci E., Rosner B.A., Colditz G.A., Prospective study of regular aspirin use and the risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, 88, 988-93
27. Farrow D.C., Vaughan T.L., Hansten P.D., Stanford J.L., Risch H.A., Gammon M.D., Chow W.H., Dubrow R., Ahsan H., Mayne S.T., Schoenberg J.B., West A.B., Rotterdam H., Fraumeni J.F. Jr, Blot W.J., Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer-Epidemiol-Biomarkers-Prev.* 1998, 7, 97-102
28. Fitzpatrick J.M., West A.B., Butler M.R., Lane V., O'Flynn J.D., Superficial bladder tumors: The importance of recurrence pattern following initial resection. *J.Urol.* 1986, 135, 920-922
29. Friedrich A., Schaning B., Glass W., Modulation of Granulocyte phagocytosis. *Allerg. Immunol.*, 1990, 36(1), 17-24
30. Fritz H., Jochum M., Geiger R., Duswald K.H., Ditmer H., Kortmann H., Neumann S., Lang H., Granulocyte proteinases as mediators of unspecific proteolysis in inflammation: A review. *Folia Histochem. Cytobiol.* 1986, 24, 99-115
31. Gilbert H.A., Logan J.L. et al, The natural history of papillary transitional cell carcinoma of the bladder and its treatment in an unselected population on the basis of histologic grading. *J.Urol.* 1978, 119, 488-492
32. Giovannucci E., Egan K.-M., Hunter D.J., Stampfer M.J., Colditz G.A., Willett W.C., Speizer F.E., Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N. Engl. J. Med.* 1995, 333, 609-14
33. Haaff E.O., Dresner S.M., Kelley D.R., Ratliff T.L., Shapiro A., Catalona W.J., Role of immunotherapy in the prevention of recurrence and invasion of urothelial bladder tumors: A review. *World J. Urol.* 1985, 3, 76-85
34. Haaff E.O., Dresner S.M., Ratliff T.L., Catalona W.J., Two courses of intravesical Bacillus-Calmette-Guèrin for transitional cell carcinoma of the bladder. *J.Urol.* 1986, 136, 820-824
35. Harboe M., Closs O., Bjovatt B., Kronvall G., Axelsen N.H., Antibody response in rabbits to immunisation with *Mycobacterium leprae*. *Infect.Immun.* 1977, 18, 792-798

- 36.Hudson M.A., Ratliff T.L., Gillen D.P., Haaff E.O., Dresner S.M., Catalona W.J., Single-course vs. Maintenance BCG-therapy for superficial bladder tumors: A prospective randomized trial. *J.Urol.* 1987, 138, 295-298
- 37.Hudson M.A., Brown E.J., Ritchey J.K., Ratliff T.L., Modulation of fibronectin-mediated Bacillus Calmette-Guerin attachment to murine bladder mucosa by drugs influencing the coagulation pathways. *Cancer-Res.* 1991 51, 3726-32
- 38.Hudson M.A., Yuan J.J., Catalona W.J., Ratliff T.L., Adverse impact of fibrin clot inhibitors on intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder tumors. *J. Urol.* 1990, 144, 1362-4
- 39.Klein E., Holtermann O.A., Papermaster B., Milgrom H., Rosner D., Klein L., Walker M.J., Zbar B., Immunologic approaches to various types of cancer with the use of BCG and purified protein derivatives. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1973, 39, 229-42
- 40.Koch,R., Die Aetiologie der Tuberculose(a). *Berl.Klin.Wochenschr.* 1882, 428-445
- 41.Kuczera-M., Kokot-F., Effect of spa therapy on the endocrine system. I. Stress reaction hormones. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1996 , 95, 11-20
- 42.Kurth K.H., deBoer E.C., van Brummelen D., Schamhardt D.H.J., Involvement of chemotactic activity of BCG released products in the BCG-therapy? *Der Urologe*, 1996, 35, 5
- 43.Lambert A.C., Eastmond D.A., Genotoxic effects of the o-phenylphenol metabolites phenylhydroquinone and phenylbenzoquinone in V79 cells. *Mutat-Res.* 1994, 322, 243-56
- 44.Lamm D.L., Steg A., Boccon-Gibod L., Morales A., Hanna M.G. Jr., Pagano F., Alfhan O., Brosman S., Fischer H.A., Jakse G., Complications of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy; review of 2602 patients and comparison of chemotherapy complications. *Progn.Clin.Biol.Res* 1989, Vol 310, 335-355
- 45.Lamm D.L., Bacillus-Calmette-Guèrin-Immunotherapy for bladder cancer. *J.Urol.* 1985,134, 40-47
- 46.Launois P., Maillere B., Dieye A., Sarthou J.L., Bach M.A., Human phagocyte oxidative burst activation by BCG, *M.leprae* and atypical mycobacteria. *Cell. Immunol.* 1989, 124, 168-174
- 47.Lewis G.P., Barrett M.L., Immunosuppressive actions of prostaglandines and the possible increase in chronic inflammation after cyclo-oxygenaseinhibitors. *Agents-Actions* 1986, 19, 59-65

48. Marcinkiewicz J., Radziszewsky W., Chain B.M., Prostaglandin E2 differentially regulates the production of IL-2 and IL-3 by murine immune T-cells. *Folia. Histochem. Cytobiol.* 1992, 30, 1-4
49. Mathè G., Amiel J., Schwartzberg L., Schneider M., Cotton H, Schlumberger J., Hayat M., DeVassal F., Immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1969, 697-699
50. Melekos M.D., Chionis H.S., Paranychianakis G.S., Danaher H.H., Intravesical Epirubicin (Epirubicin) versus Bacillus Calmette-Guèrin. A controlled prospective study on the prophylaxis of superficial bladder cancer. *Cancer* 1993, 72, 1749-1755
51. Olson W.P., Groves M.J., Klegerman M.E., Cell mass of Mycobacterium bovis BCG estimated by gas chromatography. *Biologicals* 1990, 18, 83-8
52. Pagano F., Bassi P., Milani C., Meneghini A., Maruzzi D., Garboglio A., A low dose BCG regimen in superficial bladder cancer therapy: Is it effective? *J.Urol.* 1991, 146, 32-35
53. Perez-Vallina J.R., Cantabrana B., Hidalgo A., Calcium and protein-G-related spasmolytic effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on rat uterus contractions in-vitro. *Pharmacology* 1995, 50, 324-332
54. Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnick G.K., Rane S., Small P.M., Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DANN microarray. *Science*, 1999, 284, 1520-1523
55. Prescott S., James K., Hargreave T.B., Chisholm G.D., Smyth J.F., intravesical Evans strain BCG-therapy, Quantitative immunohistochemical analysis of the immune response within the bladder wall. *J. Urol.* 1992, 147, 1636-1642
56. Qiao L., Hanif R., Sphicas E., Shiff S.J., Rigas B., Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 1998, 55, 53-64
57. Rao K.V., Detrisac C.J., Steele V.E., Hawk E.T., Kelloff G.J., McCormick D.L., Differential activity of aspirin, ketoprofen and sulindac as cancer chemopreventive agents in the mouse urinary bladder. *Carcinogenesis* 1996, 17, 1435-8
58. Ratliff T.L., Hudson M.A., Catalona W.J., Strategy for improving therapy of superficial bladder cancer. *World J. Urol.* 1991, 9, 95-98
59. Raz I., Ben-David J., Hussein Z., Samara E., Comparative pharmacokinetic analysis of novel sustained-release dosage forms of pentoxifylline in healthy subjects. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 1988, 26, 206-8
60. Rübber H., Dahm H.H., Rezidivhäufigkeit und Tumorprogression superficialer Harnblasenkarzinome. *Der Urologe (A)* 1981, 20, 211-214

61. Rumore M.M., Aron S.M., Hiross E.J., A review of mechanisms of action of aspirin and its potential as an immunomodulating agent. *Med. Hypothesis* 1987, 22, 387-400
62. Ruschoff J., Wallinger S., Dietmaier W., Bocker A., Brockhoff G., Hofstaedter F., Fishel R., Aspirin suppresses the mutator phenotype associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer by genetic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, 95, 11301-6
63. Sagone A.L.Jr., Husney R.M., Triozzi P.L., Rinehart J., Interleukin-2 therapy enhances salicylate oxidation by blood granulocytes. *Blood* 1991, 78, 2931-2936
64. Schneider B., Thannhäuser A., Jocham D., Loppnow H., Vollmer E., Galle J., Flad H.D., Ulmer A.J., Böhle A., Specific binding of BCG to urothelial tumor cells in vitro. *World. J. Urol.* 1994, 12, 337-344
65. Shiff S.J., Koutsos M.I., Qiao L., Rigas B., Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Exp Cell Res.* 1996, 222, 179-88
66. Simon H.U., Ortweiler W., Siegert C., Splinter F.K., Balogh A., Traeger A.M., Determination of caffeine and metamizole elimination in men and women with and without hormonal contraceptives as an in vivo method for characterization of various cytochrome P-450 subspecies. *Pharmazie.* 1985, 40, 50-2
67. Soloway M.S., Masters S., Urothelial susceptibility to tumor cell implantation. *Cancer* 1980, 46, 1158-1163
68. Spiesse B., Baehrs O.H., Hermanek P., Hutter R.V.P., Scheibe O., Sobin L.H., Wagner G. (HRSO), Union International Contre le Cancer: TNM-Atlas. Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren. 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1990
69. Swan-S.K., Halstenson C.E., Collins A.J., Colburn W.A., Blue J., Przybelski R.J., Pharmacologic profile of diaspirin cross-linked hemoglobin in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1995, 26, 918-23
70. Thannhäuser A., Böhle A., Flad H.D., Ernst M., Mattern T., Ulmer A.J., Induction of BCG-activated killer cells from human peripheral blood mononuclear cells against bladder carcinoma cells in vitro. *Canc. Immunol. Immunother.* 1993, 37, 105-111
71. Thannhäuser A., Reiling N., Böhle A., Toellner K.M., Duchrow M., Scheel D., Schluter C., Ernst M., Flad H.D., Ulmer A.J., Pentoxifyllene: A potent inhibitor of IL-2 and IFN-gamma biosynthesis and BCG induced cytotoxicity. *Immunol.* 1993, 80, 151-156
72. Thiel M., Bardenheuer H., Poch G., Madel C., Peter K., Pentoxifyllene does not act via adenosine receptors in the inhibition of the superoxide anion production of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 180, 53-58

73. Thun M.J., Namboodiri M.M., Heath C.W. Jr, Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 1991 , 325, 1593-6
74. Torti F.M., Lum B.L., The biology and treatment of superficial bladder cancer. *J. Clin. Oncol.* 1984, 2, 505-531
75. Tsujii M., Kawano M., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., DuBois R.N., Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998, 93, 705-16
76. Van der Sloot E., Kuster S., Böhle A., Braun J., Wood W.G., Towards an understanding of the mode of action of BCG-therapy in bladder cancer treatment, especially with regard to the role of fibronectin. *Eur J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 1993, 30, 503-511
77. Wang M.H., Chen Y.Q., Gerken J., Ernst M., Böhle A., Flad H.D., Ulmer A.J., specific activation of human blood gamma/delta lymphocytes by sonicated antigens of Mycobacterium tuberculosis: role in vitro killing human bladder cancer carcinoma cell lines. *Scand.J.Immunol.* 1993, 38, 239-246
78. Will J.C., Galuska D.A., Vinicor F., Calle E.E., Colorectal cancer: another complication of diabetes mellitus? *Am. J. Epidemiol.* 1998, 147, 816-25
79. Yasui K., Komiyama A., Molski T.F., Shaáfi R.I., Pentoxifylline and CD 14 antibody additively inhibit priming of polymorphonuclear leukocytes for enhanced release of superoxide by lipopolysaccharide: possible mechanisms of these actions. *Infect. Immun.* 1994, 62, 922-927
80. Zbar B., Rapp H.J., Immunotherapy of Guinea pig cancer with BCG *Cancer* 1974, 34, 1532-1540
81. Zbar B., Hunter J., Rapp H.J., Canti G., Safety and efficacy of living BCG or BCG cell walls (CW) in the treatment of guinea pig hepatoma, *Cancer.* 1979, 43, 484-91

Anhang

Lebenslauf

- 02.11.1968 geboren als Sohn des Diplom-Ingenieurs Hans-Jürgen Rehbein und seiner Frau Edith Rehbein, geb. Caro in Hamm
- 1975-1979 Grundschulbesuch in Hamm
- 1979-1988 Besuch des Freiherr-vom-Stein-Gymnasiums in Hamm
- 1988-1989 Wehrdienst bei der Luftwaffe
- 1989-1997 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
- 1995-1996 Aufenthalt am Forschungszentrum Borstel zur Anfertigung einer wissenschaftlich experimentellen Dissertation
- 1996-1997 Praktisches Jahr an der Medizinischen Universität zu Lübeck (Wahlfach Urologie)
- 6/1997 III. Staatsexamen
- 7/1997-1/1998 AiP Chirurgie Marienkrankenhaus Lübeck
- 2/1998-6/1999 AiP Chirurgie und Assistenzarzt Wilhelm-Augusta-Krankenhaus des DRK, Ratzeburg
- 7/1999-6/2000 Assistenzarzt Innere Abteilung Ostholstein Kliniken-Eutin
- 06/2000-02/2001 Assistenzarzt Allgemeinarztpraxis Frauenschuh, Bad Schwartau
- seit 5/2001 zunächst Assistenzarzt Allgemeinarztpraxis Dres Heber, Schönberg/Meckl., seit 02/2002 Übernahme der Praxis und niedergelassener Allgemeinarzt

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Andreas Böhle für die Überlassung des interessanten Themas und die dauernde Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. rer.nat. A.J. Ulmer für den Arbeitsplatz am Forschungszentrum Borstel und die Einführung in wissenschaftlich experimentelles Arbeiten.

Maike, Helena Philipp und Fridtjof

vor allem meinen Eltern

Erklärung

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde unter Aufsicht von Prof. Dr. med. A. Böhle in der Klinik für Urologie der Med Universität Lübeck angefertigt

Die Dissertation wurde ohne fremde Hilfe angefertigt und es wurden keine anderen, als in der Arbeit angegeben Hilfsmittel benutzt.

Es wurde nicht vorher oder gleichzeitig ein Zulassungsantrag gestellt oder die Dissertation anderorts vorgelegt.

Ich habe mich bisher keinem anderem Promotionsverfahren unterzogen.

Meine während des Promotionsverfahrens gültige Adresse ist folgende:

**Peter Rehbein
Hauptstraße 14
23923 Palingen**

