

Aus dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin,
Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

eingereicht durch:
Das Institut für Tierschutz, Verhaltensmedizin
und Verhaltenskunde
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Einfluß der laserinduzierten Thermotherapie (LITT)
auf residuales Tumorgewebe
im Vergleich zur Leberresektion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anke Boerner, geb. Lehmann
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2000

Journal-Nr.: 2408

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Prodekan für die Lehre:	Univ.-Prof. Dr. G. Hildebrandt
Erster Gutachter:	Prof. Dr. N.-C. Juhr
Zweiter Gutachter:	PD Dr. C.-T. Germer

Tag der Promotion: 28. August 2000

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	8
2. Literaturübersicht	9
2.1 Kolorektalkarzinom des Menschen	9
2.2 Kolorektale Lebermetastasen	9
2.3 Chirurgische Leberresektion	10
2.4 Laserinduzierte Thermotherapie (LITT)	12
3. Fragestellung	14
4. Material und Methoden	15
4.1 Materialien	15
4.1.1 Laser	15
4.1.1.1 Nd:YAG-Laser	16
4.1.1.2 Lichtübertragungssystem (Applikationssystem)	16
4.1.1.2.1 Lichtwellenleiter	16
4.1.1.2.2 Einkopplung	17
4.1.1.2.3 Streukörper (Diffuser-Tip Applikator)	17
4.1.2 Punktionsset	18
4.1.3 Applikatorhalterung	18
4.1.4 Leistungsmeßgerät	18
4.1.5 Temperaturmeßeinheit	19
4.1.6 Versuchstiere	19
4.1.6.1 Anatomie der Rattenleber	19
4.1.7 Tumorzellen	21
4.1.8 5-Brom-2-deoxy-uridin (BrdU)	22
4.2 Methoden	22
4.2.1 Referenztumormodell	22
4.2.2 Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation	24
4.2.2.1 Tumorsuspensionsherstellung	24
4.2.3 Operationsvorbereitung	25

	Seite	
4.2.3.1	Narkose	25
4.2.3.2	Rasur und Lagerung	25
4.2.4	Operative Eingriffe	25
4.2.4.1	Tumorzellimplantation	25
4.2.4.1.1	Durchführung der Tumorzellimplantation	25
4.2.4.1.2	Beendigung der Tumorzellimplantation	26
4.2.4.1.3	Haltung der Tiere nach Tumorzellimplantation	26
4.2.4.2	Tumorbehandlung	27
4.2.4.2.1	Laserinduzierte Thermotherapie (LITT)	27
4.2.4.2.1.1	Plazierung des Applikators	27
4.2.4.2.1.2	Laserapplikation und Applikator-test	28
4.2.4.2.1.3	Beendigung der Operation	28
4.2.4.2.1.4	Haltung der Tiere nach LITT	29
4.2.4.2.2	Leberresektion	29
4.2.4.2.2.1	Durchführung der Leberresektion	29
4.2.4.2.2.2	Beendigung der Operation	30
4.2.4.2.2.3	Haltung der Tiere nach Leberresektion	30
4.2.4.2.3	„Scheinbehandlung“ der Kontroll-tiere	30
4.2.4.2.3.1	Haltung der Tiere nach „Scheinbe-handlung“	30
4.2.4.3	Tötung der Tiere und Entnahme der Leber	30
4.2.5	Versuchstiergruppen	31
4.2.5.1	Gruppe A	33
4.2.5.2	Gruppe B	33
4.2.5.3	Gruppe C	33
4.2.6	Histologische Aufarbeitung	34
4.2.6.1	Herstellung der Gefrierschnitte	34
4.2.6.1.1	Fixierung	34
4.2.6.2	Färbemethoden	35
4.2.6.2.1	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phospha-tase-Färbung (APAAP-Färbung)	35
4.2.6.2.1.1	Durchführung der APAAP-Färbung	35
4.2.6.2.1.2	Eindecken	37

	Seite	
4.2.6.2.2	Brom-deoxy-uridin-Färbung (BrdU-Färbung, BrdU-Reaktion)	37
4.2.6.2.2.1	Durchführung der BrdU-Färbung	37
4.2.6.2.2.2	Eindecken	38
4.2.7	Verarbeitung der Formalinpräparate	38
4.2.7.1	Fixierung	38
4.2.7.2	Herstellung der Gewebeblöcke	38
4.2.7.3	Paraplasteinbettung	39
4.2.7.4	Herstellung der Schnittpräparate	39
4.2.7.5	Entparaffinierung	39
4.2.7.6	Hydrierung	40
4.2.7.7	Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	40
4.2.7.7.1	Dehydrierung und Entalkoholisierung	40
4.2.7.7.2	Eindecken	40
4.2.8	Auswertkriterien	41
4.2.8.1	Makroskopische Beurteilung	41
4.2.8.1.1	Makroskopische Beurteilung der Referenztumoren	41
4.2.8.1.2	Makroskopische Beurteilung der Behandlungstumoren	41
4.2.8.2	Histologische Beurteilung der Schnittpräparate	41
4.2.8.2.1	Qualitative Beurteilung der Schnittpräparate nach APAAP-Färbung und BrdU-Reaktion	42
4.2.8.2.2	Semiquantitative Beurteilung der Referenztumoren nach APAAP-Färbung und BrdU-Färbung	42
4.2.8.2.3	Histologische Beurteilung der Behandlungstumoren nach LITT nach HE-Färbung und BrdU-Reaktion	43
4.2.9	Statistische Analyse	43
5.	Ergebnisse	46
5.1.	Makroskopische Ergebnisse	46
5.1.1	Makroskopie der Referenztumoren	46

	Seite	
5.1.2	Makroskopische Vermessung der Referenztumoren	46
5.1.3	Statistische Analyse der Ergebnisse	52
5.1.3.1	Paarweiser Gruppenvergleich der relativen Radienzunahmen	53
5.1.3.1.1	Vergleich der relativen Radienzunahmen der Referenztumoren zwischen dem Behandlungs- und 1. Tag (Gruppe A1, B1 und C1)	53
5.1.3.1.2	Vergleich der relativen Radienzunahmen der Referenztumoren zwischen dem Behandlungs- und 2. Tag (Gruppe A2, B2 und C2)	54
5.1.3.1.3	Vergleich der relativen Radienzunahmen der Referenztumoren zwischen dem Behandlungs- und 4. Tag (Gruppe A3, B3 und C3)	54
5.1.3.1.4	Vergleich der relativen Radienzunahmen der Referenztumoren zwischen dem Behandlungs- und 7. Tag (Gruppe A4, B4 und C4)	55
5.1.3.1.5	Vergleich der relativen Radienzunahmen der Referenztumoren zwischen dem Behandlungs- und 10. Tag (Gruppe A5, B5 und C5)	55
5.1.3.1.6	Vergleich der relativen Radienzunahmen der Referenztumoren zwischen dem Behandlungs- und 21. Tag (Gruppe A6, B6 und C6)	56
5.1.3.2	Signifikanz der relativen Radienzunahmen der Referenztumoren innerhalb jeder Gruppe	57
5.1.3.2.1	Periode der Wachstumsstagnation der Referenztumoren der Kontrollgruppe	58
5.1.3.2.2	Periode der Wachstumsstagnation der Referenztumoren der Lasergruppe	58
5.1.3.2.3	Periode der Wachstumsstagnation der Referenztumoren der Resektionsgruppe	58
5.1.3.2.4	Zeitlicher Beginn der Zunahme der relativen Radien der Referenztumoren der Kontrollgruppe	58

	Seite	
5.1.3.2.5	Zeitlicher Beginn der Zunahme der relativen Radien der Referenztumoren der Lasergruppe	58
5.1.3.2.6	Zeitlicher Beginn der Zunahme der relativen Radien der Referenztumoren der Resektionsgruppe	58
5.1.3.3	Vergleich der Referenz- und Behandlungstumoren der Kontrollgruppe (C1 bis C6)	59
5.1.4	Peritonealkarzinose	60
5.1.4.1	Peritonealkarzinose in der Kontrollgruppe	60
5.1.4.2	Peritonealkarzinose in der Lasergruppe	60
5.1.4.3	Peritonealkarzinose in der Resektionsgruppe	60
5.1.5	Todesfälle vor Erreichen des Tötungszeitpunkts	61
5.1.6	Temperaturentwicklung während der Laserapplikation	61
5.1.6.1	Temperatur am Behandlungstumor	61
5.1.6.2	Temperatur am Referenztumor	61
5.2	Histologische Ergebnisse	63
5.2.1	Auswertung der Schnittpräparate der Referenztumoren	63
5.2.1.1	Histologische Morphologie der vitalen Referenztumoren nach HE-Färbung	63
5.2.1.2	Histologische Auswertung der Referenztumoren nach APAAP-Färbung	63
5.2.1.2.1	Qualitative Expression der Referenztumoren	63
5.2.1.2.1.1	Qualitative CD8-Expression der Referenztumoren	63
5.2.1.2.1.2	Qualitative CD54-Expression der Referenztumoren	64
5.2.1.2.1.3	Qualitative MHC I-Expression der Referenztumoren	64
5.2.1.2.1.4	Qualitative MHC II-Expression der Referenztumoren	64
5.2.1.2.2	Semiquantitative Expression der Referenztumoren	64
5.2.1.2.2.1	Semiquantitative CD8-Expression der Referenztumoren	69

	Seite	
5.2.1.2.2.2	Semiquantitative CD54-Expression der Referenz- tumoren	69
5.2.1.2.2.3	Semiquantitative MHC I-Expression der Referenz- tumoren	70
5.2.1.2.2.4	Semiquantitative MHC II-Expression der Referenz- tumoren	70
5.2.1.3	Histologische Auswertung der Referenztumoren nach BrdU-Reaktion	71
5.2.1.3.1	Qualitatives BrdU-Anfärbeverhalten der Referenz- tumoren	71
5.2.1.3.2	Semiquantitatives BrdU-Anfärbeverhalten der Re- ferenztumoren	71
5.2.1.3.2.1	Semiquantitative Proliferationsrate der Referenz- tumoren	73
5.2.2	Auswertung der Schnittpräparate der Behandlungs- tumoren nach LITT	74
5.2.2.1	Histologische Auswertung der Behandlungs- tumoren nach LITT nach BrdU-Reaktion und HE- Färbung	74
5.2.2.1.1	Qualitative Proliferation der Behandlungstumoren nach LITT	74
5.2.2.1.2	Semiquantitative Proliferation und Morphologie der Behandlungstumoren nach LITT	74
6.	Diskussion	75
6.1	Begründung der Methoden	75
6.2	Wachstumsverhalten des Residualtumorgewebes	78
6.3	Extrahepatische Tumormanifestation	81
6.4	Expression immunologisch relevanter Moleküle	83
6.5	Proliferationsrate der Residualtumorzellen	86
6.6	Schlußfolgerung	87
6.7	Ausblick	88

	Seite
7.	Zusammenfassung 89
8.	Literaturverzeichnis 91
9.	Materialienliste 103
10.	Anhang 106
10.1	Klassifizierungen 106
10.1.1	Klassifizierung der CD-Moleküle 106
10.1.2	Klassifizierung der MHC-Moleküle 106
10.2	Funktion und Verteilung 107
10.3	Praeoperative Tumorgrößen 109
10.4	Postoperative Tumor- bzw. Nekrosegrößen 112
10.5	Paarweiser Gruppenvergleich der relativen postoperativen Radienzunahmen 115
10.6	Signifikanz der relativen postoperativen Radienzunahmen innerhalb jeder Gruppe 116
10.7	Makroskopie der Referenztumoren 117
10.8	Histologie der Referenztumoren 118
10.9	Temperaturentwicklung während der Laserapplikation (Lasergruppe B1 bis B6) 119
11.	Danksagung 125
12.	Lebenslauf 127

11. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. J. Buhr, Leiter der Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Chirurgische Klinik I und Poliklinik des Universitätsklinikum Benjamin Franklin des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin, danke ich für sein Einverständnis zur Einreichung meiner Dissertation des Fachbereichs Veterinärmedizin in seiner Abteilung.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. C.-T. Germer, Oberarzt der Chirurgischen Klinik I und Poliklinik des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, für die freundliche Überlassung des Themas, die vorbildliche Leitung bei der Erstellung meiner Arbeit sowie seine engagierte Betreuung.

Daneben gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. N.-C. Juhr, Fach Versuchstierkunde, für die spontane Bereiterklärung, mich von Seiten der Veterinärmedizin in freundlicher Weise zu unterstützen.

Weiter möchte ich Herrn Dr. C. Isbert der chirurgischen Abteilung des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin für die freundliche und motivierende Unterstützung bei der Betreuung meiner Arbeit danken.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. D. Albrecht, während meiner experimentellen Arbeit der chirurgischen Abteilung des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin angehörig, danken sowie Herrn Dr. J.-P. Ritz aus der gleichen Abteilung, die mir mit freundlichem Rat zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. ing. Prof. h.c. Dr. h.c. G. Müller, Direktor des Instituts für medizinische/technische Physik und Lasermedizin am Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin und Geschäftsführer der Laser- und Medizin-Technologie gGmbH Berlin, danke ich für die Überlassung der technischen Mittel zur Durchführung der experimentellen Untersuchungen. Mein Dank gilt den Mitarbeitern Herrn Dr. A. Roggan und Frau V. Knappe, die mir bei der Beschaffung der technischen Materialien behilflich waren.

Weiter danke ich Prof. Dr. D. Schuppan, Leiter der gastrologischen Abteilung der Klinik in Erlangen, der die Räumlichkeiten des gastroenterologischen Labors im Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin für meine histologischen Untersuchungen zur Verfügung stellte.

Frau K. Thomsen-Mund, Medizinisch-Technische Assistentin des chirurgischen Forschungslabors im Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin gilt mein Dank für die freundliche Einweisung zur Anfertigung und Anfärbung der histologischen Gewebepräparate.

Weiterhin danke ich Herrn J. Pelz, zur gleichen Zeit Doktorand der chirurgischen Abteilung des Klinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, der mir als ein freundlicher Begleiter stets hilfsbereit zur Seite stand.

Bei den Mitarbeiter des chirurgischen Forschungslabors im Klinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, insbesondere bei Frau A. Panhorst und Frau R. Gruber, bedanke ich mich für die Hilfe bei der Durchführung meiner Experimente.

Frau Dr. G. Arndt, Mitarbeiterin des Instituts für Biometrie und Informationsverarbeitung der Freien Universität Berlin, danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der statistischen Berechnungen und Auswertung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinem Ehemann Patrik, und bei meinen Freunden bedanken, die mich mit Geduld, Nachsicht und Unterstützung während meiner Arbeit begleiteten.

12. Lebenslauf

Name: Boerner, geb. Lehmann

Vorname: Anke

Geburtsdatum: 7. Dezember 1972

Geburtsort: Berlin

Eltern: Dieter Lehmann
Brigitte Lehmann

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: von August 1977 bis Juli 1985 Clemens-Brentano-
Grundschule in Berlin

von August 1986 bis Juni 1992 Droste-Hülshoff-
Gymnasium in Berlin

Berufsausbildung: von Oktober 1992 bis Dezember 1997 Veterinärmedizin-
studium an der Freien Universität Berlin

Berufserfahrung: seit April 2000 Beschäftigung als Veterinärmedizinerin bei
dem Biotechnologie-Unternehmen „GenPat77 Pharmaco-
genetics AG“

Selbständigkeitserklärung

Hiemit versichere ich, Anke Boerner, geb. Lehmann, daß ich auf der Grundlage der Hilfsmittel und Hilfen wie im Inhalts- und Literaturverzeichnis sowie in der Danksagung meiner Doktorarbeit deklariert meine Dissertationsarbeit selbständig verfaßt habe.

Die Arbeit wurde nicht schon einmal in einem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt.

Berlin, den 14. April 2000