

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

### **Der Einfluss der intraperitonealen Applikation von Intergel, Interceed und Taurolidin/Heparin auf das lokale Tumorwachstum und dessen Expression von Adhäsionsmolekülen nach chirurgischer Intervention eines Kolonkarzinomes in Ratten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Eva Bobrich  
aus Halberstadt

- Gutachter:
1. Prof. Dr. med. C.A. Jacobi
  2. PD Dr. med. M. Pross
  3. Prof. Dr. med. L. Krähenbühl

Datum der Promotion: 29.05.2006

## **Zusammenfassung**

Ein wesentliches Problem der laparoskopischen Chirurgie maligner Tumoren stellt das Auftreten von Trokarmetastasen und lokoregionären Rezidiven dar. Die perioperative, intraperitoneale Therapie antiadhärenter und zytotoxischer Substanzen dient der Verhinderung der Tumormetastasierung eines Kolonkarzinoms beim Einsatz minimal invasiver Techniken in einem standardisierten Rattenmodell. Nach intraperitonealer Applikation von  $10^4$  Tumorzellen (DHD/K12/TRb) wurden nach einer Zökumresektion mittels Laparoskopie 60 BD IX Ratten in 4 Gruppen randomisiert. Die Darmnaht sowie ein präparierter Peritonealdefekt wurden mit Interceed, Intergel, Taurolidin/Heparin oder Ringerlösung bedeckt. Die Obduktion und Resektion der Metastasen sowie deren immunhistochemische Aufarbeitung erfolgte 4 Wochen nach der Intervention.

Taurolidin/Heparin reduzierten nach intraperitonealer Applikation das intraperitoneale Tumorwachstum sowie die Expression tumor-assoziiertes Adhäsionsmoleküle. Die intraperitoneale Therapie mit Interceed und Intergel wies keinen tumorsupprimierenden Effekt auf.

## **Abstract**

In addition to port site metastases, the local recurrence rate has been a common problem after laparoscopic intervention in malignant tumours. Intraoperative, intraperitoneal instillation of anti-adherent and cytotoxic substances causes a reduction of intraperitoneal tumour growth after laparoscopic-assisted bowel resection of colon carcinoma in a rat model.

After intraperitoneal application of  $10^4$  colon adenocarcinoma cells (DHD/K12/TRb) a laparoscopic-assisted cecum resection was performed in 60 BD IX rats. Following randomization of the rats in 4 groups, the cecum suture and a peritoneal defect were either covered with Interceed, Intergel, taurolidine/heparin or NaCl solution. After 4 weeks the animals were

euthanized, intraperitoneal tumour growth was determined and metastases were detected immunohistochemically. Intraperitoneal therapy with taurolidine/heparin inhibits intraperitoneal tumour growth as well as the expression of tumour-associated adhesion molecules. Interceed and Intergel did not have a suppressive effect on intraperitoneal tumour growth.

Schlagwörter:

Interceed, Intergel, Taurolidin, Heparin, Tumorwachstum, E-Cadherin, CD44,  $\beta$ 1-Integrin, Ratten

Keywords:

Interceed, Intergel, taurolidine, heparin, tumour growth, E-Cadherin, CD44,  $\beta$ 1-Integrin, rats

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
1.1	Kolorektale Karzinome	9
1.2	Einfluss der laparoskopischen Chirurgie auf das Tumorwachstum	10
1.3	Therapeutische Substanzen zur Verhinderung von intra- und extraperitonealem Tumorwachstum in der Laparoskopie	15
<b>2</b>	<b>ZIELSTELLUNG</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>20</b>
3.1	Tierexperiment	20
3.1.1	Tumormodell der Ratte	20
3.1.2	Tierhaltung und Tierpflege	20
3.1.3	Tumorzelllinie	21
3.1.4	Einteilung der Gruppen	21
3.1.5	Operationsmethodik	22
3.1.6	Obduktion	23
3.2	Immunhistologie	24
3.2.1	Histologische Präparate	24
3.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	24
3.2.3	Immunhistologische Nachweismethoden	25
3.2.3.1	Biotin- Streptavidin- Amplified- Methode	25
3.2.3.2	Immuno- Peroxidase- Polymerkonjugate- Methode	25
3.2.4	Inkubation	27
3.2.5	Histologische Auswertung	30
3.3	Statistische Auswertung	30
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
4.1	Der Einfluss von Interceed, Intergel und Taurolidin/Heparin auf das	

Tumorwachstum	32
4.1.1    Inzidenz von Lokalrezidiven	32
4.1.2    Intraperitoneales Tumorwachstum – Anzahl der Metastasen	33
4.1.3    Intraperitoneales Tumorwachstum – Tumorgewicht	34
4.1.4    Intraperitoneales Tumorwachstum – Lokalisation der Metastasen	36
4.2    Der Einfluss von Interceed, Intergel und Taurolidin/Heparin auf die Expression von Adhäsionsmolekülen	38
4.2.1    E-Cadherin	38
4.2.2    CD44	43
4.2.3    β1-Integrin	48
<b>5    DISKUSSION</b>	<b>53</b>
5.1    Allgemeines	53
5.2    Interceed	53
5.3    Intergel	55
5.4    Taurolidin/Heparin	57
<b>6    ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>65</b>
<b>7    ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>68</b>
<b>8    LITERATUR</b>	<b>69</b>
<b>9    ANHANG</b>	<b>91</b>
9.1    Eidesstattliche Erklärung	91
9.2    Danksagungen	92
9.3    Lebenslauf	93
9.4    Publikationsverzeichnis	94

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Darstellung der Rezeptoren, die mit dem Wachstum und der Progression des kolorektalen Karzinoms assoziiert sind	13
Abb. 2:	Die BSA- Methode	25
Abb. 3a:	Peroxidase- Polymerkonjugate	26
Abb. 3b:	Immuno- Peroxidase- Polymerkonjugate- Methode	26
Abb. 4:	Anzahl der Metastasen nach Therapie mit Interceed, Intergel und Taurolidin/Heparin im Vergleich zur Kontrollgruppe, $p=0.001$ Taurolidin/Heparin versus Kontrolle, Mann-Whitney U-Test, (n=15)	34
Abb. 5:	Tumorgewicht nach Therapie mit Interceed, Intergel und Taurolidin/Heparin im Vergleich zur Kontrollgruppe, $p=0.045$ Taurolidin/Heparin versus Kontrolle, Mann-Whitney U-Test, (n=15)	35
Abb. 6:	Lokalisation der Metastasen nach Therapie mit Interceed, Intergel und Taurolidin/Heparin im Vergleich zur Kontrollgruppe, $*p=0.002$ ; $**p=0.005$ , Mann-Whitney U-Test, (n=15)	37
Abb. 7:	Fehlende Expression von E-Cadherin unter dem Einfluß von Taurolidin/Heparin; Färbemethode: BSA; Originalvergrößerung: 100x.	40
Abb. 8:	Mäßig positive Expression von E-Cadherin der Kontrollgruppe; Färbemethode: BSA; Originalvergrößerung: 100x.	41
Abb. 9:	Stark positive Expression von E-Cadherin der Kontrollgruppe; Färbemethode: BSA; Originalvergrößerung: 200x.	42
Abb. 10:	Schwach positive Expression von CD44 unter dem Einfluß von Taurolidin/Heparin; Färbemethode: Polymerkonjugate; Originalvergrößerung: 100x.	45

Abb. 11:	Mäßig positive Expression von CD44 unter dem Einfluß von Taurolidin/Heparin; Färbemethode: Polymerkonjugate; Originalvergrößerung: 100x.	46
Abb. 12:	Stark positive Expression von CD44 der Kontrollgruppe; Färbemethode: Polymerkonjugate; Originalvergrößerung: 100x.	47
Abb. 13:	Schwach positive Expression von $\beta$ 1-Integrin unter dem Einfluß von Taurolidin/Heparin; Färbemethode: Polymerkonjugate; Originalvergrößerung: 200x.	50
Abb. 14:	Mäßig positive Expression von $\beta$ 1-Integrin unter dem Einfluß von Taurolidin/Heparin; Färbemethode: Polymerkonjugate; Originalvergrößerung: 100x.	51
Abb. 15:	Stark positive Expression von $\beta$ 1-Integrin der Kontrollgruppe; Färbemethode: Polymerkonjugate; Originalvergrößerung: 100x.	52

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Einteilung der Gruppen	22
Tabelle 2:	Übersicht über verwendete Antikörper und zugehörige Detektionssysteme	28
Tabelle 3 :	Inzidenz von Lokalrezidiven nach intraperitonealer Tumorzellapplikation und laparoskopischer Zökumresektion, 28 Tage nach der Intervention (n=15)	32
Tabelle 4:	Immunhistologischer Nachweis von E-Cadherin (n=15)	39
Tabelle 5:	Immunhistologischer Nachweis von CD44 (n=15)	44
Tabelle 6:	Immunhistologischer Nachweis von $\beta$ 1-Integrin (n=15)	49