

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Nd: YAG- Laser**

Bei dem Nd: YAG- Laser (Neodymium- Yttrium- Aluminium- Granat) handelt es sich um einen Festkörperlaser, der bei einer Wellenlänge von 1064nm Licht emittiert. Dreiwertige Ionen des Neodymiums (Nd) sind in Yttrium- Aluminium- Granat eingebettet. Je nachdem, ob die Pumpenergie von Blitzlampen oder von einem Dauerstrahler resultiert, kann er im Puls- oder Dauerbetrieb Laserstrahlung abgeben. Zur Anwendung kam der Medilas 2 (MBB- Medizintechnik, München) der Wellenlänge von 1064nm mit einer Laserenergie von 2 Watt im Dauerbetrieb. Der Nd: YAG- Laser fand in allen Versuchen Verwendung, da seine Laserstrahlung im Bereich des nahen Infrarot im so genannten optischen Fenster biologischen Gewebes (800 bis 1100nm) liegt. Aufgrund der großen optischen Eindringtiefe in biologischem Weichgewebe können ausgedehnte Volumina bei moderater Temperaturentwicklung therapiert werden.

##### **2.1.1.1 Lichtübertragungssystem (Applikationssystem)**

Bei der laserinduzierten Thermotherapie (LITT) erfolgt die Induktion der thermischen Koagulation über ein direkt in das Zielorgan eingeführtes Applikationssystem, welches sich aus dem Lichtwellenleiter, der Einkopplung und dem Streukörper zusammensetzt.

##### **2.1.1.2 Lichtwellenleiter**

Die Transmission des Laserlichts für die interstitielle Applikation erfolgt über einen flexiblen Lichtwellenleiter. Dieser setzt sich innen aus einem Kern und einem diesen umhüllenden optischen Mantel, dem so genannten Cladding, zusammen. Umschlossen werden diese von einem dünnen Kunststoffmantel, dem Coating, der

bei einem Faserbruch das unkontrollierte Austreten des Lichtstrahls verhindert. Der Kern besteht aus einer Quarzfaser mit einem Durchmesser von 400 bis 600µm. Für den Mantel findet Quarz ebenfalls Verwendung, jedoch zeichnet sich dieser durch einen kleineren Brechungsindex aus. Infolgedessen wird Licht, welches genau auf den Kern zentriert auftrifft, beständig von dem Kern zur Mantelfaser und umgekehrt reflektiert, wodurch es zu einer reflektionsbedingten Ausbreitung der Strahlung in der Längsachse der Faser kommt. Dies ist auch bei einer Biegung der Faser gewährleistet, wenn der Biegungsradius einen Zentimeter nicht unterschreitet.

### **2.1.1.3 Einkopplung**

Die Einkopplung gewährleistet eine genaue Fokussierung des Laserstrahls auf den Quarzkern des Lichtwellenleiters, um den Energieverlust so gering wie möglich zu halten. Für die Verbindung von Laser und Laserfaser wird auf das proximale Ende des Lichtwellenleiters eine Metallfassung geklebt, die die Fixierung des Lichtwellenleiters im optischen Strahlengang des Lasers ermöglicht. In den durchgeführten Versuchsreihen kam ein axiales Einkopplungssystem zur Anwendung, bei dem der vom Laser emittierte Lichtstrahl in axialer Richtung auf die Eingangsfläche des Lichtwellenleiters auftrifft.

### **2.1.1.4 Streukörper (Diffuser- Tip Applikator)**

Der Streukörper befindet sich am distalen Ende des Lichtwellenleiters. Durch seine spezielle technische Präparation wird das gebündelte Laserlicht in der Weise aufgespalten, dass eine diffuse gleichmäßige Lichtabstrahlung resultiert. Um diesen Effekt zu erzielen, besteht der Diffuser- Tip Applikator aus dem am distalen Ende des Lichtwellenleiters nach Entfernung des Coating und Cladding mattierten Quarzkern und einer der Laserfaser aufgeklebten, an der Innenseite ebenfalls mattierten Quarzkappe. Das Verfahren zur Mattierung der beiden Komponenten wird als Frostung bezeichnet. Dabei erfolgt unter Verwendung handelsüblicher Diamantschleifpaste und Flusssäure während einer 15-minütigen Kontaktzeit eine Ätzung der zu behandelnden Oberflächen. Die Abstrahlungscharakteristik des

Diffuser- Tip Applikators ergibt sich bei einer axialen Laserfasereinkopplung durch Brechung des Laserlichts an der Kappeninnenseite und der Quarzkernoberfläche. Daraus resultiert eine diffuse, gleichmäßige Lichtabstrahlung. In den durchgeführten Versuchsreihen wurde in Kooperation mit der Lasermedizin gGmbH Berlin ein speziell entwickelter Diffuser- Tip Applikator verwendet. Dessen Glasdomlänge beträgt 23mm, bei einem Außendurchmesser von 1,4mm, und der Faserkerndurchmesser beträgt 400µm.

### **2.1.2 Applikatorhalterung**

Eine spezielle Applikatorhalterung diene dazu, eine Dislokation des Applikators während der Laserapplikation zu verhindern. Die Applikatorhalterung fixierte außerdem die Thermosonden in einem parallelen Abstand zum Applikationssystem. Aus diesem Grunde wurden die Thermoelemente sowie der Laserapplikator in die Haltevorrichtung eingebracht.

### **2.1.3 Leistungsmessgerät**

Vor jeder Laserapplikation wurde die distale Applikatorleistung mittels eines Leistungsmessgeräts (Hüttinger, München) ermittelt, um die faserbedingten Energieverluste bei der Applikation zu quantifizieren.

Das Leistungsmessgerät funktioniert nach dem Prinzip der Ulbricht-Kugel. Dabei wird das distale Ende der Laserfaser in die Kugel eingebracht. Bei der Applikation von Laserlicht entsteht ein leistungsfähiges Strahlungsfeld, welches sich durch vielfache Reflektion an der hochreflektiven Innenwand mit einer BaSO<sub>4</sub>-Beschichtung aufbaut und mittels einer Photodiode gemessen wird.

### **2.1.4 Temperaturmesseinheit**

Zur Temperaturmessung während der Laserapplikation im Gewebe wurden zwei flexible Standardthermoelemente des Typs K mit Inconel- Legierung (Thermocoax UB der Panta Electronics Vertriebs- GmbH, Hamburg) verwendet. Über ein

Temperaturanzeigegerät (Thermocoax UB der Panta Electronics Vertriebs-GmbH, Hamburg) wurde die jeweilige Temperaturentwicklung aufgenommen. Sämtliche Versuche wurden mit den gleichen Thermoelementen und mit gleichen Temperaturanzeigegeräten durchgeführt.

### **2.1.5 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche WAG- Ratten aus der Zucht der Zentralen Tierlaboratorien (ZTL) der Freien Universität Berlin mit einem initialen Körpergewicht von 200 bis 280g und einem entsprechenden Lebensalter von vier bis sechs Monaten. Ihre Ernährung erfolgte mit Altromin Standard-Diät-Haltung für Ratten und Wasser ad libitum aus der automatischen Tränkanlage.

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20°C, einer relativen Luftfeuchte von 55% und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

### **2.1.6 Tumorzellen**

Bei den verwendeten Tumorzellen handelte es sich um ein chemisch induziertes Adenokarzinom des Colon sigmoideum der Reihe CC 531 aus der Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg. Der Tumor wurde durch das Tumorzellsuspensionsverfahren implantiert. Die Angehrate des Tumors lag bei Vorversuchen der Arbeitsgruppe bei 90%, ohne die Ausbildung weiterer extrahepatischer Tumoren, und die Proliferationsrate betrug 60%.

## **2.2 Methoden**

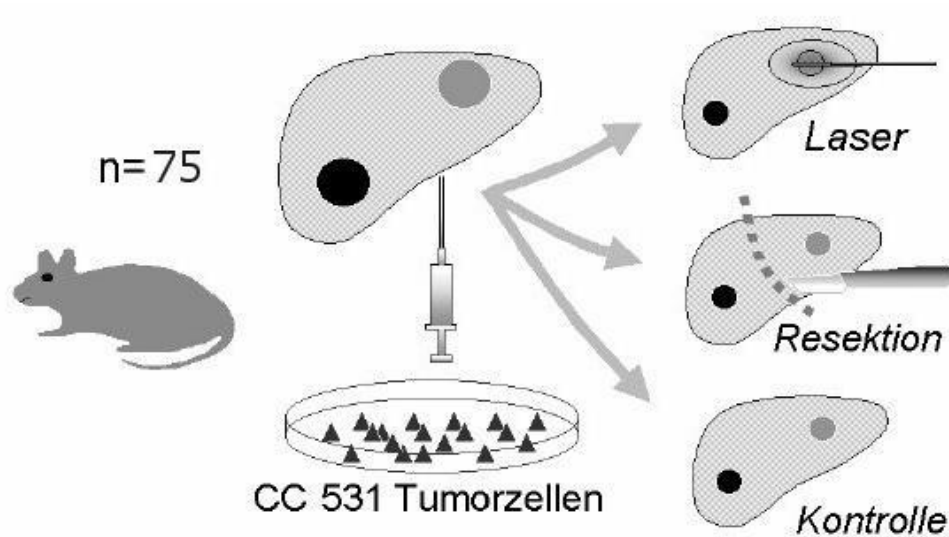
### **2.2.1 Referenztumormodell**

Den 75 Ratten wurden einheitlich je eine Millionen CC 531 Tumorzellen sowohl in den linken als auch in den rechten Leberlappen, wie unter Punkt 2.2.4.1 beschrieben, implantiert. Jede Ratte wies somit im Anschluss an den Tumorimplantationstag einen angehenden Tumor im linken Leberlappen und einen angehenden Tumor im rechten

Leberlappen auf. Der in den linken Leberlappen implantierte Tumor wurde als Behandlungstumor bezeichnet, da je eine definierte Anzahl ( $n = 25$ ) dieser Tumoren mit einer von drei unterschiedlichen Therapieformen therapiert wurde: Eine dieser Therapieformen war die thermische Koagulation des Behandlungstumors mittels laserinduzierter Thermotheapie, folglich wurden die Tiere als Lasergruppe bezeichnet. Eine weitere Therapiemethode war die anatomiegerechte Tumorresektion als Hemihepatektomie links, die Tiere wurden als Resektionsgruppe bezeichnet. Bei der letzten „Therapieform im weiteren Sinne“ handelte es sich um keine Therapie mit potentiell kurativer Zielsetzung, da die Tiere mit diesen Behandlungstumoren lediglich einer „Scheinoperation“ unterzogen wurden und als Kontrollgruppe zusammengefasst wurden. Die Auswahl der jeweiligen Therapieform jedes Behandlungstumors erfolgte nach dem Zufallsprinzip und wurde einheitlich am Behandlungstag, mit einer Latenzzeit von 7 Tagen nach der Tumorimplantation, durchgeführt.

Der in den rechten Leberlappen implantierte Tumor wurde nachfolgend als Referenz tumor betitelt, da er bei allen 75 Ratten, ohne Rücksicht auf die angewandte Therapieform des dazugehörigen Behandlungstumors und die entsprechende Therapiegruppe, in keinem der Fälle therapiert wurde. Folglich verblieb dieser unbehandelt bis zum Tötungszeitpunkt der Ratte in-situ und diente den dargestellten späteren Untersuchungen.

Um standardisierte und folglich vergleichbare Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurde bei allen Tieren einheitlich der Tumor im linken Leberlappen als Behandlungstumor und der Tumor im rechten Leberlappen als Referenz tumor gewählt (Abb. 1).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Referenztumormodells: Tumorentimplantation in den linken und rechten Leberlappen (Behandlungs- bzw. Referenztumor) und Therapie des Behandlungstumors mittels laserinduzierter Thermotherapie, Leberresektion oder „Scheinbehandlung“ nach 7 Tagen Latenzzeit. Der Referenztumor blieb unbehandelt und diente späteren Untersuchungen.

## 2.2.2 Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation

### 2.2.2.1 Tumorsuspensionsherstellung

Die CC 531 Tumorzellen wurden in RPMI 1640 Medium (Gibco, Eggenstein), welches mit 10% fötalem Kälberserum (Seromed, Berlin) und 1% Penicillin/Streptomycin (Seromed, Berlin) komplettiert wurde, kultiviert. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit 20ml des Komplettmediums versetzt und in einer liegenden  $80\text{cm}^3$  Kulturflasche für 3 bis 4 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  bebrütet. Die entstehenden Zellverbände haften auf dem Flaschenboden an.

Für die Herstellung der Tumorsuspension wurde das Medium aus der Kulturflasche abgossen und die verbleibenden Tumorzellen 2-mal mit Phosphatpuffer (PBS, Seromed, Berlin) gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 3ml Trypsin (Seromed,

Berlin), einem proteinspaltenden Enzym, und die Inkubation für 3 bis 5 min im Brutschrank, da bei dieser Temperatur das Trypsin seine größte Wirkung entfaltet und die Zellen enzymatisch von dem Flaschenboden und aus dem Zellverband herauslösen kann. Anschließend wurden 6ml des Kompletmediums in die Kulturflasche zugegeben. Das darin enthaltene fötale Kälberserum inhibiert die Reaktion und verhindert, dass das Trypsin die Zellen schädigt. Die Zellen wurden 10-mal mit einer 10ml Pipette resuspendiert, damit sich vereinzelt Zellklumpen lösen, in eine 50ml Falcontuben umgefüllt und mit PBS (Seromed, Berlin) auf 50ml komplementiert. Die Suspension wurde 10 min bei 8000 Umdrehungen pro min zentrifugiert, das Zentrifugat abgegossen und der Rückstand noch einmal mit PBS (Seromed, Berlin) aufgefüllt und resuspendiert. Für die Zellzählung wurden 100µl von dieser Suspension mit 100µl Trypanblau (Merck, Darmstadt) versetzt, 2 min geschüttelt und in die Neubauerkammer pipettiert. Anschließend wurden alle Zellen in den 4 großen Eckquadraten ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl wurde dividiert durch 2, da die Verdünnung mit dem Trypanblau 1:1 war. Das Ergebnis wurde multipliziert mit 50 (entspricht dem Volumen der 50ml Falcontube) und abschließend mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert. Letzterer ist der Faktor der Neubauerkammer, um die Zellzahl für 1ml zu bestimmen. Nach der Errechnung der Zellzahl pro Milliliter wurde die Zellsuspension in der Falcontube noch einmal zentrifugiert und das Zentrifugat abgegossen. Der Rückstand wurde mit soviel PBS (Seromed, Berlin) aufgefüllt, dass sich eine Endkonzentration von einer Million Zellen pro 0,1ml ergab.

### **2.2.3 Operationsvorbereitung**

#### **2.2.3.1 Narkose**

Die Tumorzellimplantation, die Laserapplikation, die Leberresektion und die Tötung der Tiere erfolgten in Allgemeinnarkose. Hierfür wurde nach Feststellen des Körpergewichts Xylazin (Rompun 2%, Bayer AG, Leverkusen) in einer Dosierung von 0,5mg pro kg Körpergewicht und Ketamin (Ketanest<sup>®</sup> 50, Parke-Davis, Berlin) in einer Dosierung von 1mg pro kg Körpergewicht intramuskulär injiziert.

### **2.2.3.2 Rasur und Lagerung**

Den narkotisierten Tieren wurde der gesamte Ober- und Unterbauch rasiert. Die Tiere wurden in Rückenlage, an den Vorder- und Hinterbeinen mit Haltegummis fixiert, auf dem Operationstisch gelagert. Es folgte die Desinfektion der Haut und des Bauches mit einer Jodlösung (B. Braun, Melsungen).

### **2.2.4 Operative Eingriffe**

Sämtliche nachfolgend beschriebenen operativen Eingriffe erfolgten unter aseptischen Kautelen.

#### **2.2.4.1 Tumorzellimplantation**

##### **2.2.4.1.1 Durchführung der Tumorzellimplantation**

Als Zugang erfolgte bei der Tumorzellimplantation die Laparotomie 0,5cm unterhalb des rechten Rippenbogens. Nach der schichtweisen Durchtrennung der Bauchdecke und Eröffnung des Peritoneums, wurden der rechte und linke Leberlappen mobilisiert und auf eine sterile Gazekompressen vor die Bauchdecke gelagert. Anschließend wurden je 0,1ml der unter Punkt 2.2.2.1 hergestellten Tumorzellsuspension (entspricht einer Million Tumorzellen) unter die Leberkapsel des rechten und linken Leberlappens injiziert. Um ein retrogrades Zurückfließen der Zellen zu verhindern, wurde dabei die Kanüle im Lebergewebe mäanderförmig vorgeschoben und nach dem Implantieren der Tumorzellen die Einstichstelle der Kanüle in die Leber mit Acrylkleber (B. Braun, Melsungen) verschlossen.

Nach Abschluss der Tumorzellimplantation wurden die Leberlappen in die Abdominalhöhle zurückverlagert. Das Peritoneum und die Bauchmuskulatur wurden mit einer fortlaufenden Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Vicryl Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Suturamid Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) mit Einzelknopfnähten vernäht.



#### **2.2.4.1.2 Haltung der Tiere nach Tumorzellimplantation**

Die Tiere wurden zu zweit in ausreichend großen Käfigen untergebracht, welche bis zum 2. Tag nach der Operationsdurchführung mit Zellstoff ausgelegt waren. Nach dieser Latenzzeit wurde die Einstreu auf Sägespäne umgestellt. Die Ernährung der Ratten erfolgte wiederum mit Altromin Standard-Diät-Haltung für Ratten und Wasser ad libitum aus der automatischen Tränkanlage.

Die Tiere wurden während der 7-tägigen Latenzzeit bis zum Behandlungstermin bei einer Raumtemperatur von 20°C, einer relativen Luftfeuchte von 55% und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

#### **2.2.4.2 Experimentelle Prozeduren**

##### **2.2.4.2.1 Laserinduzierte Thermotherapie (LITT)**

Der Zugang erfolgte über eine obere Medianlaparotomie, welche vom Processus xiphoideus bis zum Nabel durchgeführt wurde. Nach der schichtweisen Durchtrennung der Bauchdecke und Eröffnung des Peritoneums wurden der linke und rechte Leberlappen mobilisiert und auf eine sterile Gazekompressen vor die Bauchdecke gelagert.

Sowohl der Behandlungstumor im linken Leberlappen, als auch der Referenz tumor im rechten Leberlappen wurden in ihren axialen und radialen Durchmessern mit einem Mikrometer vermessen und die Daten dokumentiert.

Zur Durchführung der Laserapplikation wurde zunächst das Zentrum des Tumors im linken Leberlappen mit einer Punktionsnadel (4 Fr/Ch, B. Braun, Melsungen) punktiert. Anschließend wurde das Applikationssystem über den Punktionskanal in den Tumor eingebracht. Ein Thermoelement wurde parallel zum Applikationssystem am makroskopisch erkennbaren peripheren Behandlungstumorrund und ein weiteres am zugewandten Tumorrund des Referenz tumors intrahepatisch plziert.

Nach der intrahepatischen Plzierung des Laserapplikationssystems und der Thermoelemente erfolgte die Messung der Ausgangstemperatur. Anschließend wurde die Laserapplikation mit 2 Watt für 800 sek, entsprechend einer Energieleistung von 1600 Joule, durchgeführt (124). Vor und während der

Laserapplikation erfolgte die kontinuierliche Registrierung der Temperaturen an den peripheren Tumorrändern des Behandlungs- und Referenztumors mittels der unter (Punkt 2.1.4) beschriebenen Temperaturmesseinheiten.

Zur Quantifizierung der faserbedingten Energieverluste wurde vor jeder Laserapplikation die distale Applikatorleistung mit einem Leistungsmessgerät (Hüttinger, München) (Punkt 2.1.3) ermittelt.

Nach Abschluss der Laserapplikation wurde der Diffuser- Tip Applikator aus dem linken Leberlappen entfernt, und die Leberlappen wurden in die Abdominalhöhle zurückverlagert. Anschließend wurde erst das Peritoneum mit einer fortlaufenden Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Vicryl, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) und dann die Aponeurose der Linea alba mit einer fortlaufenden Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Vicryl, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Suturamid, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) in Einzelknopfnähten vernäht.

#### **2.2.4.2.2 Leberresektion**

Der Zugang erfolgte über eine obere Medianlaparotomie vom Processus xiphoideus bis zum Nabel. Es erfolgte die schichtweise Durchtrennung der Bauchdecke und Eröffnung des Peritoneums. Zunächst erfolgte die Mobilisation der Leberlappen, daraufhin wurden sowohl der Behandlungstumor im linken Leberlappen als auch der Referenztumor im rechten Leberlappen in ihren axialen und radialen Durchmessern mit einem Mikrometer vermessen und die Daten dokumentiert. Anschließend erfolgte die Durchtrennung des ligamentären Halteapparats der Leber. Nach der schichtweisen Abklemmung der zu resezierenden Leberlappen dicht an der Leberpforte wurde unterhalb der Klemme eine Ligatur aus 5/0 Prolene (Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) gelegt. Der Leberlappen wurde mit einem Skalpell abgetrennt, die Klemme entfernt und der verbleibende Parenchymstumpf vorsichtig mit einer fortlaufenden U-Naht aus 5/0 Prolene (Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) verschlossen. Darüber wurde eine zweite fortlaufende U-Naht gesetzt, und abschließend wurde der Parenchymstumpf fortlaufend, ebenfalls mit 5/0 Prolene (Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt), abermals vernäht. In dieser Weise wurde mit

dem Lobus sinister lateralis und medialis, der Pars intermedia und dem Processus caudatus verfahren. Dieses Vorgehen entspricht bei den vorliegenden Tumorgößen einer anatomiegerechten Hemihepatektomie humaner Lebermetastasen.

Der verbleibende rechte Leberlappen wurde in die Bauchhöhle zurückverlagert, das Peritoneum und die Aponeurose der Linea alba einzeln mit einer fortlaufenden Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Vicryl, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Suturamid, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) mit Einzelknopfnähten vernäht.

#### **2.2.4.2.3 „Scheinbehandlung“ der Kontrolltiere**

Es erfolgte wiederum eine Medianlaparotomie und die Vermessung des Behandlungs- und Referenztumors. Das Abdomen wurde als „Scheinbehandlung“ für die Dauer der operativen Durchführung der Laserung bzw. der Resektion geöffnet belassen. Das Peritoneum und die Aponeurose der Linea alba wurden einzeln mit einer fortlaufenden Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Vicryl, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Suturamid, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) mit Einzelknopfnähten vernäht.

#### **2.2.4.3 Tötung der Tiere und Entnahme der Leber**

Nach der angegebenen Latenzzeit wurden die Tiere, wie unter Punkt 2.2.3.1 erläutert, narkotisiert und mittels einer intrakardialen Injektion mit Embutramid (T 61, Hoechst, Unterschleißheim) in einer Dosierung von 0,3ml pro kg Körpergewicht getötet. Über eine Medianlaparotomie wurde die Abdominalhöhle eröffnet und zur Entnahme der Leber der ligamentäre Halteapparat, insoweit er noch nicht bei der Leberresektion entfernt wurde, und die Vena cava inferior durchtrennt. Der Referenztumor wurde unmittelbar nach Entnahme der Leber in radialer und axialer Achse aufgeschnitten, mit einem Mikrometer in seinem axialen und radialen Durchmesser vermessen, und die Daten wurden dokumentiert. Die eine Hälfte der Tumorprobe wurde mit dem angrenzenden Lebergewebe in einer 10%igen Formalinlösung (August Hedinger

GmbH & Co, Stuttgart) konserviert, die andere wurde in einer Phosphatpuffer-Lösung (PBS, Seromed, Berlin) in flüssigem Stickstoff bei 196°C eingefroren und bei -80°C gelagert. Der Behandlungstumor der Kontrollgruppe bzw. die Nekrose der Lasergruppe wurde entsprechend dem Referenztumor vermessen und unterlagen denselben Konservierungsverfahren.

### **2.2.5 Versuchstiergruppen**

Es wurden drei Gruppen mit je 25 Tieren gebildet, deren Behandlungstumor unterschiedlich behandelt wurde (Gruppe I, II und III): Gruppe I diente als Kontrollgruppe und die Tiere wurden lediglich einer „Scheinoperation“ unterzogen. In der Gruppe II wurde eine laserinduzierte Thermotherapie des Behandlungstumors durchgeführt und in der Gruppe III erfolgte eine anatomiegerechte Tumorresektion als Hemihepatektomie links. Je 5 Tiere aus jeder Gruppe wurden 1, 2, 3, 4, sowie 14 Tage nach Therapiedurchführung (Gruppe Ia bis Ie, IIa bis IIe und IIIa bis IIIe) zur Bestimmung der Tumorgrößen und zur Gewebeentnahme für die histologische Auswertung getötet.

Die Tiere wurden im Zufallsprinzip den Therapiegruppen und den Tötungszeitpunkten zugeordnet. Die Tabelle 2 zeigt den Behandlungsplan der Gruppen.

<b><u>Gruppe I</u></b>	<b>Anzahl(n)</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Histologie nach</b>
Ia	5	LITT	24 Stunden
Ib	5	LITT	48 Stunden
Ic	5	LITT	72 Stunden
Id	5	LITT	96 Stunden
Ie	5	LITT	14 Tagen

<b><u>Gruppe II</u></b>	<b>Anzahl(n)</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Histologie nach</b>
IIa	5	Resektion	24 Stunden
IIb	5	Resektion	48 Stunden
IIc	5	Resektion	72 Stunden
IId	5	Resektion	96 Stunden
IIE	5	Resektion	14 Tagen

<b><u>Gruppe III</u></b>	<b>Anzahl(n)</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Histologie nach</b>
IIIa	5	Kontrolle	24 Stunden
IIIb	5	Kontrolle	48 Stunden
IIIc	5	Kontrolle	72 Stunden
IIId	5	Kontrolle	96 Stunden
IIIe	5	Kontrolle	14 Tagen

**Tabelle 2:** Behandlungsplan der Gruppen I, II und III

#### **2.2.5.1 Gruppe I**

Die Tiere der Gruppe I wurden einer laserinduzierten Thermotherapie unterzogen. Folglich wurden 7 Tage nach der Tumorimplantation der Referenz- und Behandlungstumor in ihren Größen vermessen, und nachfolgend wurde der Behandlungstumor der Tiere laserkoaguliert. Je 5 Tiere wurden 1 Tag (Gruppe Ia), 2 Tage (Gruppe Ib), 3 Tage (Gruppe Ic), 4 Tage (Gruppe Id), und 14 Tage (Gruppe Ie) nach Therapiedurchführung getötet, hepatektomiert und wie dargestellt weiterbehandelt.

#### **2.2.5.2 Gruppe II**

Bei den Tieren der Gruppe II erfolgte eine anatomiegerechte Tumorresektion als Hemihepatektomie links. Folglich wurden 7 Tage nach der Tumorimplantation der

Referenz- und Behandlungstumor in ihren Größen vermessen, und nachfolgend wurde der Behandlungstumor der Tiere mit den angrenzenden Leberlappen reseziert. Je 5 Tiere wurden 1 Tag (Gruppe IIa), 2 Tage (Gruppe IIb), 3 Tage (Gruppe IIc), 4 Tage (Gruppe IId), und 14 Tage (Gruppe IIe) nach Therapiedurchführung getötet, hepatektomiert und wie dargestellt weiterbehandelt.

### **2.2.5.3 Gruppe III**

Die Tiere der Gruppe III dienten als Kontrollgruppe. Folglich wurde der Behandlungstumor der Tiere 7 Tage nach der Tumorimplantation nur „scheinbehandelt“. Die Abdominalhöhle wurde für die zeitgleiche Dauer der Durchführung der Laser- bzw. der Resektionstherapie eröffnet belassen, und der Referenz- sowie der Behandlungstumor wurden in ihren Größen vermessen. Je 5 Tiere wurden 1 Tag (Gruppe IIIa), 2 Tage (Gruppe IIIb), 3 Tage (Gruppe IIIc), 4 Tage (Gruppe IIId) und 14 Tage (Gruppe IIIe) nach Therapiedurchführung getötet, hepatektomiert und wie dargestellt weiterbehandelt.

### **2.2.6 Vermessung der Referenztumoren**

Um den Wachstumsunterschied der Tumoren zwischen den Behandlungsmethoden interpretieren zu können, wurde von allen 75 Referenztumoren, 5 Ratten für den jeweiligen Tag für jede Behandlungsmethode, das Tumolvolumen und daraus der Mittelwert der Volumina und der Standardfehler des Mittelwert (SEM) bestimmt. Das Volumen (V) des Referenztumors zur Zeit der Behandlung sowie zum Tötungszeitpunkt wurde mit Hilfe der Formel für Rotationsellipsoide berechnet, dabei entsprechen a, b, und c den Radien der Längsachsen in der Länge, Breite und Höhe:

$$v = \frac{4\pi \times abc}{3}$$

## **2.2.7 Histologische Aufarbeitung**

### **2.2.7.1 Herstellung der Paraffinschnitte**

Für konventionelle HE- Färbungen wurde Tumorgewebe mit angrenzenden Leberparenchym in 10%iger Formalinlösung über Nacht fixiert, in Paraffin eingebettet und 3µm dicke Schnitte hergestellt.

### **2.2.7.2 Herstellung der Gefrierschnitte**

Die Herstellung der Kryostatschnitte erfolgte mit dem Kryostaten Microm HM500 OM, bestehend aus einer Kryostatkammer und einem thermovariablen Mikrotom. Die Gewebeproben wurden in kryoasserviertem Zustand im Kryostatraum bei 17°C weiterverarbeitet, ohne dass die Präparate antauten. Die Gewebeproben wurden vorsichtig mit einem Skalpell von dem Phosphatpuffer (PBS, Seromed, Berlin) befreit und so präpariert, dass eine Schnittfläche entstand, die neben der Tumorinvasionsfront (Grenze zwischen Tumor- und Lebergewebe) auch Tumorgewebe und einen Anteil nicht geschädigten Lebergewebes enthielt. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer tiefgekühlten Pinzette mit der Schnittfläche nach oben auf einen mit thermodynamischen Gel (Cryoembedding compound, Microm Laborgeräte GmbH) beschichteten Aluminiumblock gelegt.

Durch das Gefrieren des Gels erfolgte eine Fixierung der Gewebeprobe auf dem Aluminiumblock. Der Aluminiumblock wurde mit dem Mikrotom verbunden und die Temperatur auf 17°C eingestellt. Es wurden Schnittpräparate von 7µm Dicke hergestellt und mit einem zimmerwarmen Objektträger zur Weiterverarbeitung abgenommen.

#### **2.2.7.2.1 Fixierung**

Die fertigen Schnitte wurden in Acetonchloroform (Baker, Deventer/Holland) bei Raumtemperatur für 10 min fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie bis zum Färben bei -80°C gelagert.

#### **2.2.7.2.2 Plasmide zur Herstellung der RNA-Sonden**

Zur Erzeugung von RNA-Sonden standen zwei Plasmide zur Verfügung. Das eine Plasmid bestand aus dem Vector pCR3, in dem ein HGF- cDNA (952 Basenpaare) einkloniert wurde und das andere aus einem Vector PZERO- 1, wo ein CTGF- cDNA (480 Basenpaare) Fragment einkloniert wurde.

#### **2.2.7.2.3 Chemikalien**

NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaAc, NaOH, Trinatriumcitrat, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Paraformaldehyd, Polyvinylpyrrolidon, Essigsäureanhydrid, Ethanol abs., Formamid, Propanolol, Dimethylformamid, NaNO<sub>2</sub>, HCl 2 n, Aceton, Chloroform, Essigsäure, Hämatoxylin, Hämalaun (alle von E. Merck, Darmstadt), Diethylpyrogencarbonat (DEPC), Trisma- HCl, Trisma-Base, Triethanolamin (TEA), Heparin, (alle von Sigma Chemical Co. St. Louis, USA), Glycin, EDTA, Silikonlösung (alle von Serva, Heidelberg), ATP, CTP, GTP, Ficoll, Dextransulfat (alle von Pharmacia Fine Chemical AB, Uppsala, Schweden), [<sup>35</sup>S]- UTP mit einer Aktivität von 1000Ci/μmol (New England Nuclear- Du Pont, Dreieich), Dithiotreitol (DTT), Pronase (alle von Boehringer Mannheim Biochemica GmbH, Mannheim), BSA-Rinderserum (Behringwerke, Berlin, BRD), SP6-Polymerase, T7- Polymerase, Transkriptionspuffer, XbaI, Hind III (alle von BRL Gibco), RNasin, Hefe-tRNA (Promega, Heidelberg).

#### **2.2.7.2.4 Fotochemikalien**

Als Fotoemulsion diente eine Autoradiographie- Photoemulsion mittlerer Korngröße (LM- 1) von Amersham, Braunschweig.

Zur Entwicklung bzw. Fixierung wurde von Kodak, Hemel Hempstead, UK, der Entwickler D 19 und der Schnellfixierer verwendet. Zum Stoppen der Entwicklungsreaktion diente Essigsäure der Firma E. Merck, Darmstadt.



#### **2.2.7.2.5 Präparation von Objektträgern und Deckgläsern**

Handelsübliche Objektträger wurden in 0,2 mol/l HCl gereinigt, mit reinem Ethanol entfettet und bei 250°C sterilisiert. Anschließend wurden sie mit 2% Amino-propyltriethoxysilan (APES, Sigma, München) beschichtet.

Deckgläser (21× 26mm) wurden in 0,2 N Salzsäure gereinigt, mit reinem Ethanol entfettet, luftgetrocknet und dann bei 250°C sterilisiert. Nach dem Abkühlen erfolgte die Beschichtung mit einer Silikonlösung (Serva, Heidelberg) und deren Einbrennung bei 115°C über 2 h.

#### **2.2.7.2.6 Herstellung der Gewebeschnitte**

Auf die APES beschichteten Objektträger wurden 5-7µm dicke Kryostatschnitte aufgezogen und 3 min auf einer Heizplatte bei 80°C getrocknet. Fixiert wurden die Schnitte in Aceton, für 10 min. bei Raumtemperatur. Danach wurden sie für 5-10 min luftgetrocknet. Die Gewebeschnitte wurden entweder sofort verwendet oder in staubfreien Kunststoffboxen (Kartell, Italien) mit Calciumchlorid bei -80°C gelagert.

#### **2.2.7.2.7 Linearisierung und Transkription der Gensonden**

Für die Herstellung der Antisense-Sonde wurde das HGF- Plasmid mit Xba1 linearisiert und das HGF- Insert mit der T7- Polymerase transkribiert. Entsprechend wurde für die negativ Kontrolle die Sense- Sonde mit BamH1 und der SP6 Polymerase hergestellt. Für das CTGF- Plasmid dienten EcoR1 und T7 Polymerase der Herstellung der Antisense- Sonde und Xho1 sowie die Sp6- Polymerase der Herstellung der Sense- Sonde.

Für die Linearisierung wurde verwendet: DEPC-H<sub>2</sub>O

1µg Plasmid- DNA

Restriktionsenzym

5µl (10 fach) Restriktionspuffer

ad 50µl DEPC- H<sub>2</sub>O

Es wurde alles vorsichtig gemischt und zentrifugiert (13.00rpm, RT, 10 sek.). Der Restriktionsansatz wurde über Nacht bei 37°C stehengelassen. Dann erfolgte eine

Ethanol- Präzipitation: Es wurden 2 Volumina 100%iges Ethanol dazugegeben sowie 5µl 3M Na- Acetat ph 6,0, 1 h bei -80°C inkubiert und daraufhin mit 13000rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 700µl kaltem 70% Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000rpm, 4°C, 5 min). Dann wurde der Überstand völlig abpipettiert. Das Pellet wurde 10 min bei 50°C im Brutschrank oder im Speedvac getrocknet und in 10µl DEPC- H<sub>2</sub>O gelöst. Mittels Gelelektrophorese wurde anhand der Größe des linearisierten Plasmids der vollständige Verdau überprüft. 1µl linearisiertes Plasmid, 5µl Elektrophoresepuffer und 9,5µl DEPC- H<sub>2</sub>O wurden neben eines DANN- Größenstandard auf einem 1%igen Agarosegel 60 min einem elektrischen Feld bei einer Spannung von 80 V ausgesetzt. Nach Färbung in Ethidiumbromidhaltiger TAE- Lösung wurde das Ergebnis unter UV- Licht dokumentiert.

Nach Sicherstellung des vollständigen Verdau wurden die linearisierten Plasmide mittels einer T7- bzw. SP6-Polymerase transkribiert. Die Sonden wurden in Antisense- Richtung, also vom nicht kodierenden c- DNA- Strang im Plasmid transkribiert, so dass sie komplementär zu den gesuchten RNA- Transkripten in der Gewebeprobe vorlagen. Entsprechend stellte eine „Sense“- Sonde die entgegengesetzt zur „Antisense“- Sonde transkribierte RNA-Sonde dar. Eine „Sense“- Sonde kann nicht an das gesuchte RNA- Transkript im Gewebe binden und wurde als Negativkontrolle benutzt. Durch den Einbau von <sup>35</sup>S-UTP-Nukleotiden bei der Transkription wurde die Sonde radioaktiv markiert.

20µl Transkriptionsansatz bestand aus: 4µl 5x Transkriptionspuffer

1µl 100mM DTT

1µl RNase- Inhibitor

1µl 3xNTP

xµl mit insgesamt 1µg DNA linearisiertes Plasmid

4,5µl [<sup>35</sup>S] UTP

ad 19µl DEPC- H<sub>2</sub>O

1µl Polymerase

Der Ansatz wurde 60 min lang bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Anschließend wurde nochmals die gleiche Menge an Polymerase zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Die Plasmid- DNA wurde dann abgebaut mittels DNase: 5µl Hefe tRNA, 1µl RNase- Inhibitor, 1µl DNase wurden dem Transkriptionsansatz zugefügt. Dieser wurde bei 37°C 8 min lang inkubiert. Dann wurden die Enzyme mittels 10µl 3M Na-Acetat, 62µl DEPC- H<sub>2</sub>O, 100µl PCI (Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol) pH 8,0 (25:24:1, v:v:v) extrahiert. Dann wurde 30 sec gevortext und zentrifugiert (13.000rpm, RT, 5 min). Die klare Oberphase, die die RNA- Sonde enthielt, wurde abpipettiert und in ein frisches Eppi gegeben.

#### 2.2.7.2.8 Alkalische Hydrolyse

Um ein besseres Eindringen der <sup>35</sup>S-markierten Sonden in das Gewebe zu erreichen, war es notwendig, die Gesamtlänge der Transkripte auf durchschnittlich 150 Nukleotide zu reduzieren.

Dazu wurde die RNA bei 60 C kontrolliert alkalisch hydrolysiert. Die Hydrolysezeit berechnet sich aus der Insertlänge und der durchschnittlichen Endlänge der Transkripte nach folgender Formel:

$$t = \frac{L_0 - L_f}{k \times L_0 \times L_f},$$

wobei t für die Hydrolysezeit steht, L<sub>0</sub> für die Anfangslänge und L<sub>f</sub> für die Endlänge des Transkripts in Nukleotiden (k: 0,11 kb<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>).

Das in 50µl gelöste Transkript wurde mit 50µl Hydrolysepuffer (80mM NaHCO<sub>3</sub>, 120mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10mM Dithiotreitol) versetzt und bei 60°C 53 min für HGF und 41 min. für CTGF inkubiert. Durch den Zusatz von 100µl Neutralisationspuffer (200mM Na-Acetat, pH 6,0; 1% Essigsäure; 10mM Dithiotreitol) wurde die Hydrolyse beendet. Nach Ethanolpräzipitation wurde das pelletierte Transkript in 30µl 0,1mM Dithiotreitol gelöst und bei -80°C gelagert. 1µl wurde für die Messung abgenommen und in ein mit 4ml Szintiflüssigkeit gefülltes Szintiröhrchen gegeben. Die durchschnittlich erreichte Aktivität der Transkripte lag zwischen 1,3 und 2 x 10<sup>6</sup>cpm/µl.

#### **2.2.7.2.9 In-situ-Hybridisierung**

Die Schnitte wurden zuerst 1 h an die Raumtemperatur angeglichen. Dann wurden sie 20 min mit 4% PFA/PBS auf Eis lichtgeschützt fixiert, und 30 sec in PBS gespült. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Objektträger für 15 min in 0,2N Salzsäure getaucht und im Anschluss mit 1 × PBS kurz gespült, bevor sie für 7 min mit Pronase (0,125mg/ml in 1 × PBS) zum Abbau der Proteine behandelt wurden. Die Blockierung der Pronase erfolgte 30 sec lang mit 0,1mol/l Glycin, pH 7,4. Nach Spülung mit 1 × PBS und erneuter Fixierung in 4% PFA / 1× PBS pH 7,0 bei 4°C wurden die Objektträger mit 1 × PBS gespült und mit frisch angesetzter Essigsäureanhydrid-Lösung (verdünnt 1:400 in 0,1mol/l Triethanolamin, pH 8,0) für 10 min acetyliert. Nach einem letzten Waschen mit 1 × PBS wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 70%, 90%, 100%) dehydriert und für 2 h luftgetrocknet.

25µl eines Hybridisierungsgemisches, das  $2 \times 10^5$  cpm/µl der <sup>35</sup>S-markierten Sonde in einer Lösung aus 50% Formamid, 12,5% Dextransulfat, 10mM Dithiothreitol, 10mM Tris HCl (pH 7,5), 10mM NaPO<sub>4</sub>, 0,3M NaCl, 5mM EDTA pH 7,5, 0,002% Ficoll 400, 0,002% Polyvinylpyrrolidon, 0,002% Rinderalbumin, 0,2% w/v Hefe- tRNA enthielt, wurden auf den Gewebsschnitt aufgetragen und nach Abdeckung mit silikonisierten Deckgläsern 16 bis 18 h in einer feuchten Kammer bei 52 C hybridisiert.

Es folgte ein Waschprozess über 5 h bei 54°C, zur Entfernung von Deckgläsern, Dextransulfat, tRNA und überschüssiger RNA Transkripte. Die Waschlösung wurde nach 1 h gewechselt. Um nicht gebundene einzelsträngige Sonden abzubauen, wurden die Objektträger mit 0,02 mg/ml RNase A in 10mmol Tris HCl, 1mM EDTA, 0,5M NaCl, pH 7,5 bei 37°C 30 min gewaschen, gefolgt von einem weiteren Waschschrift bei gleicher Temperatur mit der gleichen Pufferlösung. Danach wurden die Schnitte jeweils 20 min in 2 × SSC und 0,1 × SSC gewaschen. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte 2 h luftgetrocknet.

#### **2.2.7.2.10 Autoradiographie**

Die dehydrierten, luftgetrockneten Schnitte wurden in eine 1:1 mit Aqua dest. verdünnte, auf 42 C erwärmten Amersham IL-5 Autoradiographielösung eingetaucht. Nach 30 min Lufttrocknung wurden sie bis zur Entwicklung in mit Calciumchlorid trocken gehaltenen Kartellboxen gelagert.

Die autoradiographierten Objektträger wurden bei Raumtemperatur in Küvetten mit Kodak D 19 Entwicklerlösung 3 min, 1%iger Essigsäure 30 sec und mit dem Kodakfixierbad für weitere 3 min entwickelt.

#### **2.2.7.2.11 HE- Färbung**

Danach wurden die Schnitte ausgiebig mit Leitungswasser gespült und in die Küvette mit deionisiertem Wasser getaucht. Danach wurde sie für 1 min in die Küvette mit dem filtrierten Hämalaun getaucht und etwas geschüttelt. Nach diesem Vorgang noch 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und in deionisiertes Wasser getaucht. Nachdem dieser Vorgang abgeschlossen war, ging es weiter mit der Eosin Gegenfärbung. Aus dem deionisiertem Wasser wurde die Schnitten jeweils für 30 sec in Ethanol (30%, 70%, 90%) getaucht. Dann 8-10 sec in das Eosin getaucht. Dann für 5 sec in Ethanol (90%, 70%) geschwenkt und 30 sec in 30% prozentigem Ethanol getaucht. Dann wurden die Schnitte noch einmal in deionisiertes Wasser getaucht und in 50°C warmen Kaisers- Glycin- Gelatin eingedeckelt.

### **2.2.8 Auswertekriterien**

#### **2.2.8.1 Makroskopische Beurteilung**

##### **2.2.8.1.1 Makroskopische Beurteilung der Referenztumoren**

Die makroskopische Beurteilung der Referenztumoren zur Zeit der Behandlung sowie zum Tötungszeitpunkt, unmittelbar nach Entnahme der Leber und vor der Konservierung, erfolgte nach folgenden Methoden:

Makroskopische Vermessung des Referenztumors in seinem axialen und radialen Durchmesser zum Behandlungs- und Tötungszeitpunkt mit Hilfe eines Mikrometers. Aus diesen Daten wurde das Volumen des Referenztumors wie folgend berechnet. Berechnung des Volumens ( $V$ ) des Referenztumors zur Zeit der Behandlung sowie zum Tötungszeitpunkt. Dabei entsprechen  $a$ ,  $b$ , und  $c$  den Radien der Längsachsen in der Länge, Breite und Höhe.

#### **2.2.8.1.2 Makroskopische Beurteilung der Behandlungstumoren**

Die Behandlungstumoren wurden zum Behandlungs- sowie zum Tötungszeitpunkt unmittelbar nach Entnahme der Leber und vor der Konservierung, wie unter 2.2.8.1.1 angegeben, vermessen und die Volumina berechnet.

#### **2.2.8.2 Auswertung der Autoradiographien**

Die Autoradiographien wurden von zwei unterschiedlichen, in der Beurteilung erfahrenen Untersuchern ohne Kenntnis des Behandlungsmodus und Ergebnis unter einem Binokularmikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena) bei 100-, 200- und 400- facher Vergrößerung beurteilt (Blindauswertung) und die Beobachtungen abgeglichen.

Es wurden je Gewebeschnitt 3 repräsentative intrahepatische Areale (im Leberparenchym) bei 400- facher Vergrößerung analysiert, wobei die markierten Zellen ausgezählt und durch 3 dividiert wurden. Die quantitativen Angaben beziehen sich auf positive Zellzahl/400- facher Vergrößerung (Zellen pro Mikroskopierfeld, z/mf).

#### **2.2.9 Statistische Auswertung**

Die Parameter Volumina der Referenztumoren und die Stärke der mRNA-Expression von HGF und CTGF wurden einer statistischen Analyse unterzogen. Der Einfluss des Faktors der Operationsmethode wurde in den 3 Stufen LITT, Resektion und Kontrolle mit dem Kruskal-Wallis-Test untersucht (125). Der Kruskal-Wallis-Test ist ein nicht parametrischer Test, der eine stetige Testvariable auf mehrere Gruppen

vergleicht. Als Signifikanzniveau wurde  $p=0,05$  gewählt. Werte die kleiner als  $p=0,05$  waren, zeigten einen signifikanten Unterschied der vergleichbaren Parameter. Zur Berechnung des Kruskal-Wallis-Test wurde das Statistikprogramm SPSS, Version 11.5 benutzt.