

## 4. Diskussion

### 4.1 Begründung der Methoden

Naturgemäß konnten die zur Überprüfung der aufgestellten Fragestellungen notwendigen experimentellen Untersuchungen nicht an menschlichen Lebertumoren durchgeführt werden, so dass ein in-vivo Tumormodell gewählt wurde.

Ein geeignetes Lebermetastasenmodell sollte ermöglichen, einerseits Tumorgewebe durch eine laserinduzierte Thermotherapie (LITT) zu zerstören bzw. durch chirurgische Resektion zu entfernen, und andererseits vitales Tumorgewebe im Organismus zu belassen. Im Rahmen von Vorversuchen ist hierzu ein Lebermetastasenmodell der Ratte entwickelt und etabliert worden, das diese Voraussetzungen erfüllt. Dieses von uns als Referenztumormodell bezeichnete Tiermodell (Material und Methoden, Punkt 2.2.1) ermöglichte die Untersuchung indirekter, sekundärer Effekte von an Behandlungstumoren durchgeführten Therapieverfahren auf unbehandelte intrahepatische Referenztumoren. Die Wahl der verwendeten CC 531 Tumorzellen basierte einerseits auf Erfahrungen über die Reproduzierbarkeit und die Zuverlässigkeit im Lebermetastasenmodell aus früheren Projekten der Arbeitsgruppe, und andererseits auf dem vergleichbaren tumorbiologischen Verhalten dieses Tumors zu Lebermetastasen eines humanen kolorektalen Karzinoms: Die Angehrate dieser Tumoren liegt bei der Implantation in die Leber mittels Tumorzellsuspensionsverfahren bei 90% ohne die Ausbildung weiterer extrahepatischer Tumoren. Die Proliferationsrate von 40 bis 60% entspricht der Proliferationsrate humaner kolorektaler Karzinome.

Die Wahl des Tumorimplantationsverfahren fiel auf das Tumorzellsuspensionsverfahren, da das Fragmenttumorimplantationsverfahren aufgrund der Transplantation großer Tumorgewebestücke (ein Millimeter im Durchmesser) starke Gewebereizungen in der Leber verursacht und folglich immunologische Abwehrmechanismen induzieren könnte (65). Andererseits hätte die intraportale Injektion von Tumorzellen (53) die entscheidende Voraussetzung nicht gewährleisten können, dass es sich bei dem zu untersuchenden Tumorgewebe um bereits solide Residualtumoren handeln sollte.

Die Tumorzellimplantation im Referenztumormodell musste in Vorversuchen optimiert werden. Daraus folgend wurde bei der Tumorzellimplantation die Laparotomie unterhalb des rechten Rippenbogens angelegt, um einen ausreichenden Zugang zum weiter kranial gelegenen rechten Leberlappen zu erlangen. Für den weiteren Verlauf musste gewährleistet sein, dass es weder zur Ausbildung eines einzigen großen Tumors noch zur Verwachsung der Leber am Zwerchfell kam.

Zur Durchführung der laserinduzierten Thermotherapie war ein Laser notwendig, dessen Wellenlänge im so genannten optischen Fenster biologischen Gewebes (800 bis 1100nm) liegt, so dass aufgrund der optischen Eindringtiefe in biologisches Weichgewebe ausgedehnte Volumina bei moderater Temperaturentwicklung therapiert werden konnten (126, 127). Für die experimentellen Versuche wurde ein Nd- YAG Laser verwendet, der Laserlicht mit einer Wellenlänge von 1064nm emittiert. Grundvoraussetzung zur sicheren interstitiellen Applikation tumorvolumenadaptierter Energiedosen von Laserlicht war die Verwendung temperaturstabiler Applikationssysteme. Der Bau eines Streuapplikators (Diffuser-Tip Applikator), der die Größe der vorliegenden Tumoren in dem gewählten Tiermodell berücksichtigt, war notwendig, um eine Vergleichbarkeit der experimentellen Befunde mit klinischen Daten zu gewährleisten (126, 56).

Aus experimentellen Erfahrungen der eigenen Arbeitsgruppe war bekannt, dass mittels der laserinduzierten Thermotherapie mit den Parametern 2 Watt über eine Applikationszeit von 800 sek, Tumorgrößen von 10mm im Durchmesser vollständig ablatiert werden (126, 57).

Demzufolge wurde unter Verwendung der entsprechenden Laserparametern eine vollständige Tumorablation des Therapietumors mittels LITT durchgeführt und die histologischen Ergebnisse von HGF und CTGF erworben. Entsprechend den onkologischen Grundsätzen der Therapie beim Menschen erfolgte eine anatomiegerechte Resektion des Therapietumors als Hemihepatektomie (128, 17). In unterschiedlichen multivarianten Analysen zur chirurgischen Resektion von Lebermetastasen zeigte sich, dass die R0- Resektion und der Sicherheitsabstand bei der Resektion für das Überleben der Patienten Prognosefaktoren darstellen (15, 33). Diese Grundvoraussetzungen, vollständige Tumorentfernung und Einhalten eines

Sicherheitsabstands, wurden durch eine anatomiegerechte Hemihepatektomie gewährleistet.

Die „Scheinbehandlung“ der Kontrolltiere sollte den natürlichen Verlauf und das Wachstumsverhalten der gewählten Tumoren aufzeigen. Da maligne Tumoren im Wachstum eine spontane Nekroserate aufweisen, musste zur Evaluierung der experimentellen Behandlungsergebnisse ein Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren erfolgen.

Die Dedektion von Früh- und Späteffekten nach der Laserapplikation bzw. der chirurgischen Leberresektion auf residuales Tumorgewebe machte die makroskopische und histologische Auswertungen nach 24, 48, 72, 96 h und 14 Tagen notwendig.

#### **4.2 Wachstumsverhalten des Residualtumorgewebes**

Die Referenztumoren und scheinbehandelten Tumoren der Kontrollgruppe zeigten im Beobachtungszeitraum eine Zunahme ihres Volumens. Es fanden sich nur kleine Unterschiede der Volumina innerhalb der ersten 48 h postoperativ zwischen Kontroll-, Laser- und Resektionsgruppe im Vergleich zur präoperativen Ausgangssituation. Der Vergleich zwischen der Kontroll- und der Resektionsgruppe ergab nach 72 h einen kleineren Unterschied in den Volumina als zwischen der Resektionsgruppe und der LITT- Gruppe, wo der Unterschied schon signifikant war ( $p=0,009$ ). Der Vergleich zwischen der Kontroll- und der Resektionsgruppe ergab nach 14 Tagen einen kleineren Unterschied in den Volumina als zwischen der Resektionsgruppe und der LITT- Gruppe, der Unterschied war signifikant ( $p=0,008$ ).

Wir kommen zu der Schlussfolgerung, dass sowohl die chirurgische Leberresektion als auch die laserinduzierte Thermoerapie einen Einfluss auf das Wachstum intrahepatischer Residualtumoren innerhalb der definierten Zeitintervalle haben. Die Leberresektion ist mit einer Wachstumsbeschleunigung von intrahepatischem Residualtumorgewebe im Lebermetastasenmodell der Ratte assoziiert. Demgegenüber resultiert nach in-situ Ablation intrahepatischer Tumoren mittels laserinduzierter Thermoerapie eine deutliche Wachstumsverzögerung der Referenztumoren im Vergleich zur chirurgischen Resektion und zur

„Scheinbehandlung“. Anders verhält es sich mit der vermehrten und beschleunigten Wachstumsrate der Tumoren nach Leberresektion. Dieses Ergebnis wurde bereits in anderen tierexperimentellen Untersuchungen zur chirurgischen Resektion in ähnlicher Weise gezeigt. PANIS und MORIMOTO et al. konnten tierexperimentell zeigen, dass die chirurgische Resektion zu einer höheren Angehrate (50) und einem schnelleren Wachstum von Tumorzellen in der Leber der Ratte bzw. der Maus führt (48). Die Autoren fanden nach 70%iger Hepatektomie bei BD IX-Ratten in 62% der Fälle Metastasen in der Restleber, denen 12 Wochen zuvor intraportal Tumorzellen der Kolonkarzinomzell-Linie DHDK 12 injiziert wurden. Das gleiche Vorgehen ohne vorausgegangene Hemihepatektomie führte nur bei 20% der Versuchstiere zur Ausbildung von Lebermetastasen (50). MIZUTANI et al. berichten über das vermehrte Auftreten von Lebermetastasen nach intraportaler Injektion einer Zellsuspension ( $10^5$  Zellen pro 0,2ml) der Hepatomzell-Linie AH130 bei Ratten, die 24 Stunden zuvor einer Leberresektion unterzogen wurden. Dabei fand sich eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Resektion und der Ausbildung der Metastasen. Dagegen führte die intraportale Injektion der gleichen Zellsuspension 2 Wochen nach der Leberresektion nicht zur vermehrten Metastasenbildung (53). MORIMOTO et al. inokulierten den mittleren Leberlappen von DS-Mäusen mit einer Zellsuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen pro 0,02ml) der Karzinomzell-Linie SC 42, nachdem zuvor 40% der Leber reseziert worden war. In der Kontrollgruppe erfolgte das gleiche Vorgehen ohne vorausgegangene Leberresektion. Als Ergebnis fanden sich bei den Tieren mit Leberresektion signifikant größere Lungen- und Lebermetastasen im Vergleich zu den nicht resezierten Kontrolltieren (49). Im Gegensatz dazu hat Möller et al. beobachtet, dass das Wachstum des residualen Tumors sich nicht signifikant unterscheidet nach Resektion des medianen tumorfreien Leberlappens, nach Einführung des Laserapplikators ins Tumorgewebe ohne Thermo-therapie oder nach Scheinoperation (65). Möglicherweise ist die Resektion nur des medianen Leberlappens nicht ausreichend, um einen Effekt auf das Wachstum residualem Tumorgewebes feststellen zu können.

Als eine weitere mögliche pathophysiologische Ursache für das vermehrte Auftreten von Rezidivmetastasen nach chirurgischer Leberresektion wird eine durch das chirurgische Trauma induzierte temporäre Immunsuppression diskutiert (129, 52, 49,

50, 130). So fanden MORIMOTO et al. in der bereits zitierten tierexperimentellen Untersuchung bei DS-Mäusen eine verminderte B- und T- Zellfunktion nach Leberresektion (49). Als weiterer pathophysiologischer Faktor des Rezidivmetastasenwachstums wird eine vermehrte Freisetzung von Wachstumsfaktoren im Rahmen der Leberregeneration nach ausgedehnten Parenchymresektionen diskutiert (51, 131, 132). Die Synthese und Freisetzung der Wachstumsfaktoren zur Leberregeneration korreliert dabei mit dem Ausmaß des Verlusts an funktionellem Leberparenchym (133, 134). Von besonderer Bedeutung scheint die Freisetzung von hepatocyte growth factor- scatter factor (HGF- SF) zu sein, da HGF- SF nicht nur das Wachstum von Hepatozyten stimuliert, sondern auch Einfluss auf die Proliferation und Motilität von Tumorzellen hat (135, 136). ZARNEGAR et al. fanden deutlich erhöhte HGF mRNA Spiegel in Rattenlebern 3 bis 6 Stunden nach Hemihepatektomie bis zu einem Höchststand bei 12 Stunden (137), und PANIS et al. konnten eine biphasische HGF- Expression 1 Stunde und 12 Stunden nach 80%iger Hepatektomie bei Wistar- Ratten nachweisen (133). Auch beim Menschen führt die Leberresektion zu einem zu temporär erhöhten HGF- SF-Spiegeln (138, 139, 140). Im Tiermodell förderte eine ca. 70%ige Hepatektomie das Wachstum von Lebermetastasen aus „dormant cells“ (50). HGF könnte also, durch die Leberresektion stimuliert, für die Entstehung von Rezidivmetastasen aus bis dahin ruhenden Mikrometastasen verantwortlich sein, vorausgesetzt diese besitzen den Rezeptor für HGF. Fazekas et al. fanden den Rezeptor von HGF, c- MET, in primären humanen Kolonkarzinomen signifikant höher exprimiert in metastasierenden Tumoren im Duke- C- Stadium als in nicht- metastasierenden Tumoren im Stadium Duke- B (141). Eine Herabregulation von c- Met in humanen Kolonkarzinomzelllinien führte an orthotoper Stelle im Tiermodell zu geringer Tumorinzidenz (142).

Die Besonderheit der laserinduzierten Thermotheapie liegt in der Tatsache begründet, dass auf eine ausgedehnte Entfernung von gesundem Leberparenchym verzichtet werden kann und somit im Vergleich zur chirurgischen Resektion mehr funktionelles Lebergewebe erhalten bleibt (56, 60, 61). Somit ist vorstellbar, dass postinterventionell nach laserinduzierter Thermotheapie im Gegensatz zur Leberresektion, aufgrund des geringeren Trauma und dem Verzicht auf eine

ausgedehnte Entfernung von gesundem Leberparenchym, immunsuppressive Effekte sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (z.B. HGF) geringer ausgeprägt sind. Damit unmittelbar verbunden wäre der verminderte Effekt auf das Wachstum residualen Tumorgewebes im Vergleich zur chirurgischen Resektion.

Wir kommen zu der Schlussfolgerung, dass es nach LITT, mit Zunahme der Organisation des thermisch abladierten Tumors, zu einem verminderten Wachstum des Referenztumors im Vergleich zu der chirurgischen Resektion kommt. Des weiteren konnten MÖLLER et al. zeigen, dass selbst eine suboptimale laserinduzierte Thermotherapie (44°C über 30 min) im Vergleich zur „Scheindurchführung“ zu einer etwa 50%igen Reduzierung des Tumolvolumens und der Häufigkeit und Ausdehnung intraperitonealer Metastasenstreuung führt (65).

#### **4.3 HGF- Expression**

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass HGF einen wichtigen Wachstumsfaktor mit mitogenen, motogenen und morphogenen Eigenschaften für unterschiedliche Zelltypen in verschiedenen Geweben und Organen darstellt (94, 143). In Zellkulturen von Hepatozyten (84), Hauptzellen der Magenschleimhaut (97), duktalem Pankreasepithelzellen (98) u.v.a. führt der Zusatz von HGF zur verstärkten DNA-Synthese. Fibroblasten und Endothelzellen reagieren nach Applikation von HGF mit einer Zunahme ihrer Beweglichkeit in der Kultur (105). Letztlich kann HGF ein komplexes morphogenetisches Programm in bestimmten Zelltypen in Gang setzen, wie zum Beispiel die Ausbildung eines vielfach verzweigten Gangsystems in Mamma- und Nierenepithelzellen (106). Die Bedeutung des HGF für die Leber wird insbesondere unterstützt durch die Beobachtung, dass erhöhte HGF- Serumspiegel (erreicht durch exogene Zuführung des Proteins) (144) einen hepatoprotektiven Effekt hinsichtlich verschiedener Noxen zur Folge haben.

Die hepatischen Stellatzellen stellen den Hauptort der HGF- Expression in der gesunden Leber dar, da dieser Zelltyp in der Zellkultur als auch in-vivo hohe HGF- Transkriptionsspiegel aufweist (145, 146). Nach der Umwandlung hepatischer Stellatzellen zu Myofibroblasten nach Untergang von Leberparenchymzellen in der Fibrogenese wird die HGF- Expression eingestellt und vermehrt TGF-  $\beta$  sowie CTGF

exprimiert (146, 147). Die koordinierte Interaktion zwischen parenchymatösen und mesenchymalen Zellen ist entscheidend für ein breites Spektrum an physiologischen und auch pathophysiologischen Prozessen in der Leber (70). Dabei erweisen sich hepatische Stellatzellen als wichtige Regulatoren hepatozellulärer Funktionen.

#### **4.4 Unterschiedliche Expression von HGF und CTGF**

Der histologische Nachweis von HGF und CTGF ergab ein unterschiedliches Expressionsverhalten innerhalb der Referenztumoren postinterventionell nach laserinduzierter Thermotherapie, Leberresektion oder „Scheinbehandlung“: Die Referenztumoren der Kontrollgruppe zeigten innerhalb der Tumordinvasionsfront während der gesamten Zeitperiode vom 1. bis zu dem 14. postoperativen Tag kontinuierlich eine geringe, zum 14. Tag ansteigende Expression von CTGF. HGF dagegen stieg auf den höchsten Wert nach 48 h und sank nur gering ab bis zum 14. postoperativen Tag. Abweichend davon konnte in der Lasergruppe nach 96 h eine stärker aufsteigende Expression von CTGF beobachtet werden, und eine unter den Werten der Kontrolle liegende Expression von HGF, welche vom 2. postoperativen Tag bis zum 14. postoperativen Tag nahezu konstant blieb.

Demgegenüber zeigte sich in der Resektionsgruppe ein Peak in der Expression von HGF nach 48 h, der signifikant über dem der Kontrolle und LITT lag ( $p=0,047$ ) und sich nach 96 h wieder den Werten der Kontrolle näherte.

Wir kommen zu der Schlussfolgerung, dass die chirurgische Resektion an den ersten 4 Tagen, mit einem Peak nach 48 h, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine erhöhte Synthese von intrahepatischer mRNA HGF induziert. Die Expression von CTGF dagegen war fast identisch mit der Kontrolle und blieb somit unter der Steigung der CTGF- Expression in der LITT- Gruppe. Nach LITT kam es, mit Zunahme der Organisation des thermisch abladierten Tumors im Bereich des unbehandelten residualen intrahepatischen Tumorgewebes, zu einer deutlichen Erhöhung der mRNA Expression von CTGF im Vergleich zur chirurgischen Resektion. Die erhöhte CTGF Expression deutet darauf hin, dass die extrazelluläre Matrix um residuale Tumore nach LITT anders reguliert wird als nach Resektion. Ob die gesteigerte CTGF- Expression für das verminderte Tumorwachstum nach LITT

verantwortlich ist, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass nach laserinduzierter Thermotheapie im Gegensatz zur chirurgischen Resektion es zu keiner Erhöhung, sondern im Gegenteil zu einer niedrigeren HGF- Expression als bei der Kontrolle kommt. Die verminderte Expressionsrate von HGF bei LITT im Vergleich zu der Resektion und Kontrolle könnte zu dem verminderten Wachstum residualer Tumore nach LITT verantwortlich sein. Dagegen wird CTGF zum 14. Tag hin signifikant stärker als nach der Resektion oder Kontrolle exprimiert ( $p=0,009$ ).

#### **4.5 Extrahepatische Tumormanifestation**

Am 14. Tag wiesen 60% der Tiere der Kontrollgruppe, aber nur 20% der Tiere der Lasergruppe, extrahepatische Tumormanifestationen auf. Bei der Resektionsgruppe hingegen wiesen 80% der Ratten nach 14 Tagen eine extrahepatische Tumormanifestation auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass die peritoneale Metastasenaussaat nach Leberresektion im Vergleich zur „Scheinbehandlung“ tendenziell erhöht und nach laserinduzierter Thermotheapie verringert ist. Diese Beobachtungen werden durch ähnliche Beobachtungen von der Arbeitsgruppe MÖLLER et al. bestätigt (65). Im Unterschied zur eigenen Arbeit verwendeten die Autoren jedoch einerseits kein Referenztumormodell und andererseits transplantierten sie ein chemisch induziertes Adenokarzinom des Rattenkolons mittels Fragmenttumorimplantationsverfahren männlichen Wistar-Ratten in die Leber. Nach einer Latenzzeit von 8 Tagen wurden die Tiere einer laserinduzierten Thermotheapie mittels Nd- YAG Laser ( $46^{\circ}\text{C}$  an der Tumorgrenze über 30 min), einer Resektion des tumortragenden Leberlappens oder einer „Scheintherapie“ unterzogen. Als Ergebnis konnte beobachtet werden, dass die Häufigkeit und die Ausdehnung der intraperitonealen Metastasenstreuung im beobachteten Zeitraum geringer nach laserinduzierter Thermotheapie im Vergleich zur Leberresektion ausgeprägt war. 75% aller Ratten nach laserinduzierter Thermotheapie zeigten postinterventionell keine Anzeichen einer Metastasierung. Demgegenüber zeigten nur 46% der Ratten nach Leberresektion kein intraperitoneales Tumorstwachstum. Dabei wurde während des



Beobachtungszeitraums ein kontinuierlicher Anstieg der Häufigkeit einer Peritonealkarzinose nach Leberresektion und Scheinbehandlung, nicht jedoch nach laserinduzierter Thermotherapie, festgestellt (65). In weiterführenden Versuchen verwendeten MÖLLER et al. das Tumorzell- Suspensionsverfahren ( $1,0 \times 10^6$  Zellen). Nach einer Latenzzeit von 6 Tagen wiesen die Tiere nach laserinduzierter Thermotherapie keine bzw. maximal 3 intraperitoneale Tumoren auf, während die Tiere nach Resektion und „Scheintherapie“ zwischen 4 und über 10 intraperitoneale Tumoren aufwiesen. Demzufolge war die laserinduzierte Thermotherapie auch in dieser Versuchsdurchführung mit einer geringeren intraperitonealen Metastasenstreuung im Vergleich zur Resektion des tumortragenden Leberlappens assoziiert (65).

Als eine weitere mögliche pathophysiologische Ursache für die unterschiedliche extrahepatische Rezidiventstehung nach laserinduzierter Thermotherapie im Vergleich zur Resektion vermuten NAMIENO et al., dass die chirurgische Leberresektion promovierend auf extrahepatisches Tumorgewebe wirken könnte (149). In diesem Zusammenhang konnten EGGERMONT et al. in einem intraperitonealen Tumormodell zeigen, dass der chirurgische Eingriff der Laparotomie ein verstärktes Tumorwachstum in der gesamten Peritonealhöhle induziert. Der immuntherapeutische Effekt von Interleukin- 2 und natürlichen Killerzellen wurde nach dem chirurgischen Eingriff signifikant reduziert. Aus diesem immunsuppressiven Effekt resultiert einerseits die Bereitschaft für postoperative Infektionen und andererseits die Wachstumsförderung von peritonealen Residualtumoren (128).

Als weiterer Erklärungsansatz wird diskutiert, dass das chirurgische Trauma oder die Gewebemanipulation die Verbreitung von Tumorzellen in die Blutzirkulation und somit in umliegendes Gewebe induziert (149, 150, 151, 48). MÖLLER et al. stellen jedoch aufgrund ihrer Ergebnisse eine Gegenhypothese auf, denn das starke Auftreten von intraperitonealen Metastasen bei Ratten, die einer „Scheindurchführung“ der laserinduzierten Thermotherapie unterzogen wurden, zeigte, dass eine stärkere Manipulation des Tumors während der Lasertherapie als während der Leberresektion stattgefunden haben muss. Als Erklärung für die geringere Häufigkeit und Verbreitung der Metastasen nach laserinduzierter Thermotherapie im Vergleich

zur Resektion erscheint die chirurgische Manipulation mit Verbreitung der Tumorzellen in die Zirkulation während der Behandlung somit relativ unwahrscheinlich (65). Als Hauptursache für das verringerte Auftreten extrahepatischer Metastasierung nach laserinduzierter Thermotherapie vermuten MÖLLER et al. immunologische Mechanismen. Die Autoren sind der Überzeugung, dass selbst im Anschluss an die suboptimal durchgeführte LITT eine Aktivierung immunologischer Reaktionen ausschlaggebend für eine verminderte Häufigkeit und Ausdehnung peritonealer Metastasenstreuung sei (65). Diese Hypothese bedarf der Überprüfung in weiterführenden experimentellen Studien.