

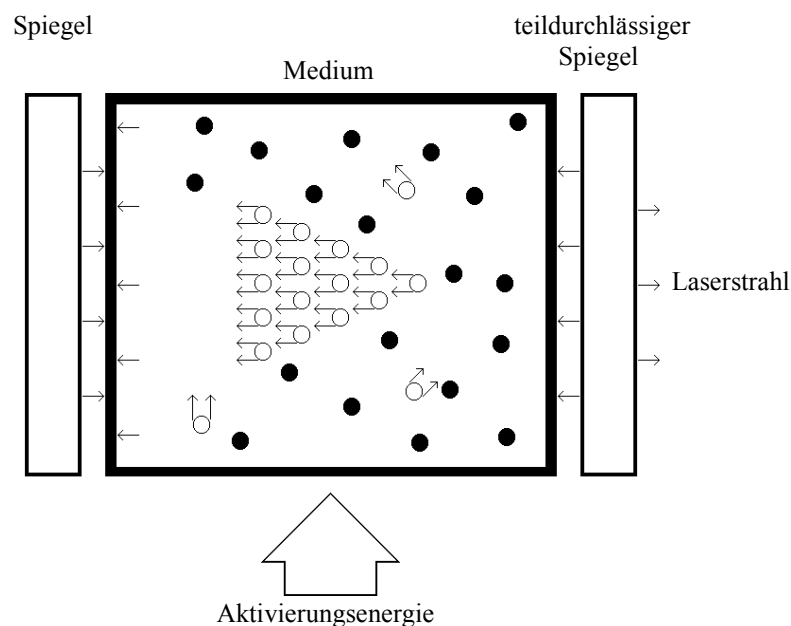
## 4. Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Laser

Das Wort Laser setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der englischen Wörter light amplification by stimulated emission of radiation zusammen.

Die Arbeitsweise eines Lasers beruht auf der stimulierten Emission. Die Laserleistung wird in Watt oder Joule angegeben. Laserlicht zeichnet sich durch Kohärenz, d.h. identische räumliche und zeitliche Phasen-Beziehung sämtlicher emittierter elektromagnetischer Wellen, und Monochromasie, d.h. identische Wellenlänge der Laserstrahlung in einem sehr schmalen spektralen Bereich von nur einer oder sehr wenigen Wellenlängen, aus. Weiterhin charakteristisch sind seine Kollimation, d.h. nahezu richtungsparallele Ausbreitung der Strahlung.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Entstehungsweise des Laserstrahls: Das aktive Medium wird durch Energiezufuhr zur stimulierten Emission von Photonen gezwungen, und die Photonen werden zwischen zwei Spiegeln reflektiert, um einen parallel ausgerichteten Laserstrahl zu erzeugen.

#### 4.1.1.1 Nd:YAG-Laser

Bei dem Nd:YAG-Laser (Neodymium-Ytrium-Aluminium-Granat) handelt es sich um einen Festkörperlaser, der bei einer Wellenlänge von 1064 nm 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 1064 nm 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 sogenannten optischen Fenster biologischen Gewebes (800 bis 1100 nm) liegt. Aufgrund der großen optischen Eindringtiefe in biologischem Weichgewebe können ausgedehnte Volumina bei moderater Temperaturentwicklung therapiert werden.

#### 4.1.1.2 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.

##### 4.1.1.2.1 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 sogenannten 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 600 µm. 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.

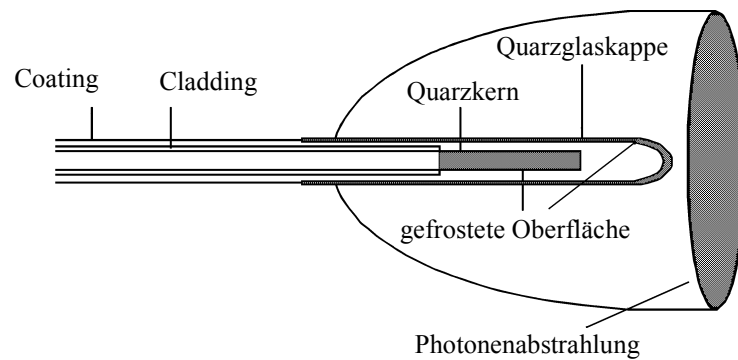
#### **4.1.1.2.2 Einkopplung**

Die Einkopplung gewährleistet eine genaue Fokussierung des Laserstrahls auf den Quarkern 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.

#### **4.1.1.2.3 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 Quarkern und einer der Laserfaser aufgeklebten, an der Innenseite ebenfalls mattierten Quarkappe. 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 Quarkernoberfläche. 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 23 mm, bei einem Außendurchmesser von 1,4 mm, und der Faserkerndurchmesser beträgt 400 µm.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung eines Diffuser-Tip Applikators mit der charakteristischen diffusen Photonenausstrahlung. Dargestellt ist das distale Ende des Lichtwellenleiters und der präparierte Streukörper.

#### 4.1.2 Punktionsset

Um das Einbringen des Laserapplikators in den Lebertumor zu erleichtern, erfolgte die Punktions des Tumors an der gewünschten Stelle mit Hilfe einer Punktionsnadel (4 Fr/Ch, B. Braun, Melsungen).

#### 4.1.3 Applikatorhalterung

Eine spezielle Applikatorhalterung diente 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.

#### 4.1.4 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.

#### **4.1.5 Temperaturmeßeinheit**

Zur Temperaturmessung während der Laserapplikation im Gewebe wurden zwei flexible Standardthermoelemente des Typs K mit Inconel<sup>®</sup>-Legierung (Thermocoax UB der Panta Electronics Vertriebs-GmbH, Hamburg) verwendet. Über ein Temperaturanzeigergerät (Thermocoax UB der Panta Electronics Vertriebs-GmbH, Hamburg) wurde die jeweilige Temperaturentwicklung aufgenommen. Sämtliche Versuche wurden mit den gleichen Thermoelementen und mit gleichen Temperaturanzeigergeräten durchgeführt.

#### **4.1.6 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 280 g und einem entsprechenden Lebensalter von vier bis sechs Monaten. Ihre Ernährung erfolgte mit Altromin<sup>®</sup> Standard-Diät-Haltung für Ratten und Wasser ad libitum aus der automatischen Tränkanlage.

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20 °C ( $\pm 2$  °C), einer relativen Luftfeuchte von 55 % ( $\pm 5$  %) und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

Die Tierversuchsgenehmigungsnummer lautet G0037/97.

##### **4.1.6.1 Anatomie der Rattenleber**

Der größte Anteil der Leber liegt innerhalb der rippengestützten Bauchhöhle, lediglich ventral erstrecken sich die Leberränder über den Rippenbogen hinaus. Im Bereich des Zwerchfells (Diaphragma) ist die Oberfläche stark konvex gekrümmt. Die Visceralfläche (Facies visceralis) berührt den Magen, Teile des Duodenum und des Colon, das Jejunum sowie die Milz.

Die Leber ist in einen linken, mittleren und rechten Leberlappen (Lobi) gegliedert: Der linke Leberlappen (Lobus sinister) besteht aus einem großen lateralen Anteil (Lobus sinister lateralis), der lediglich durch interstitielles Gewebe und Gefäße mit den anderen Leberlappen verbunden ist, und einem kleineren, weiter kranial gelegenen medialen Anteil (Lobus sinister medialis). Die Pars intermedia wird in einen kranial gelegenen supraportalen Teil (Pars supraportalis) und einen infraportalen Teil (Pars infraportalis) unterteilt. Der rechte Leberlappen (Lobus dexter) wird nicht weiter unterteilt. Er berührt die rechte Niere. Der spitze

Processus caudatus ragt aus der visceralen Oberfläche nach dorsal und zur rechten Seite. Seine dorale Oberfläche (Impressio renalis) grenzt an die ventrale Seite der rechten Niere. Zwei flache Processus papillare entspringen ebenfalls der Facies visceralis. Der dorsal gelegene Processus zieht entlang der rechten Seite der Speiseröhre (Oesophagus) über die kleine Krümmung (Curvatura ventriculi minor) zum Kaudalrand des Magens. Der ventrale Processus papillaris erreicht den kranialen Magenrand.

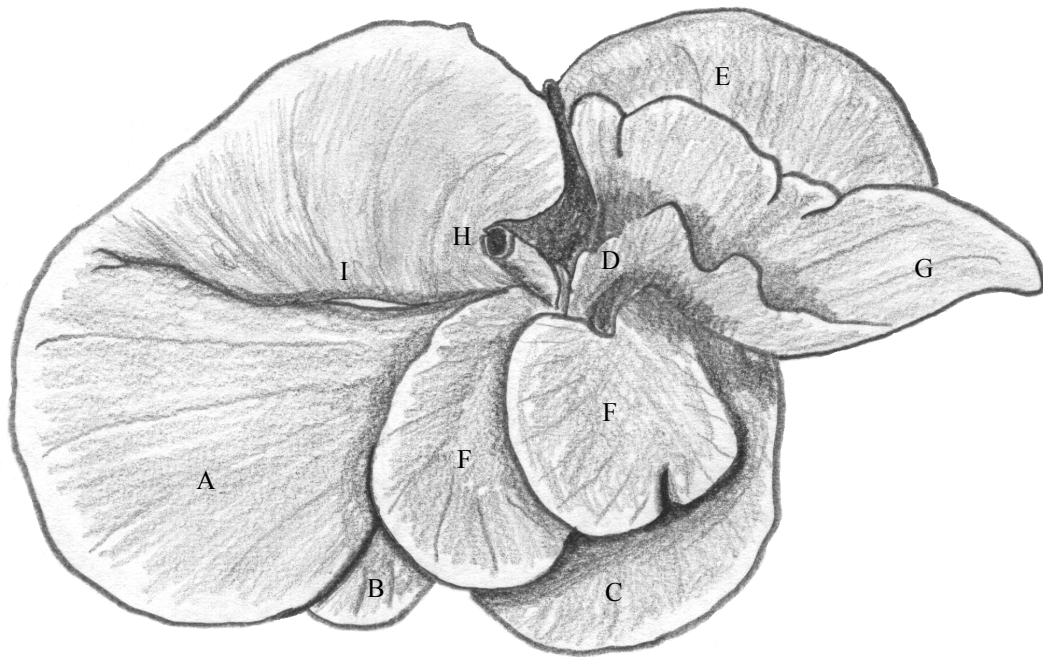
Die Bänder der Leber sind sehr fein ausgeprägt. Das kleine Netz (Omentum minus) zieht von der kleinen Krümmung des Magens kaudal zur Visceralfläche der Leber und wird entlang einer schräg verlaufenden Linie über den Lobus sinister lateralis und zwischen den beiden Processus papillare an der Leberpforte befestigt. Die Insertio des Ligamentum falciforme, welches die Leber an der ventralen Bauchwand und dem Diaphragma befestigt, erfolgt im Einschnitt zwischen dem Lobus sinister lateralis und dem Lobus sinister medialis. In seinem Verlauf trifft es auf das Ligamentum coronarium, welches am Austritt der Vena cava caudalis aus der Leber entspringt. Von dort ziehen beide Plicae triangulare nach dorso-lateral.

Die hintere Hohlvene (Vena cava caudalis) tritt am kaudomedianen Rand des Processus caudatus in die Leber ein und findet ihren Ausgang kraniodorsal des Supraportallappens. Die A. hepatica und die Pfortader (Vena porta) treten ventral der Vena cava in die Leberpforte (Porta hepatis).

Die Ratte besitzt keine Gallenblase. Gallengänge aus allen Leberlappen vereinigen sich zum Ductus choledochus. Dieser 12 bis 45 mm lange und im Durchmesser ein Millimeter große Gang kreuzt dorsal das Duodenum, zieht unter der Bauchspeicheldrüse (Pankreas), von der er Zufluß erhält, entlang und mündet etwa 20 mm distal vom Pylorus in einer ein Millimeter hohen Papille im Duodenum.

Die Speiseröhre (Oesopagus) zieht über den dorsalen stumpfen Rand (Impressio oesophagica) des Processus caudatus (41).

Die Leber erreicht 4,15 % des Gesamtkörpergewichts der Ratte (16).



**Abbildung 3:** Anatomische Darstellung der Rattenleber mit Blick auf die Facies visceralis (modifiziert nach 41).

- |                            |                               |
|----------------------------|-------------------------------|
| A Lobus sinister lateralis | E Lobus dexter                |
| B Lobus sinister medialis  | F Processus papillaris        |
| C Pars infraportalis und   | G Processus caudatus          |
| D Pars supraportalis der   | H Oesophagus                  |
| Pars intermedia            | I Insertio des kleinen Netzes |

#### 4.1.7 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 Krebsforschungszentrum 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 %.

#### 4.1.8 5-Brom-2-deoxy-uridin (BrdU)

Das 5-Brom-2-deoxy-uridin (LaRoche, Mannheim) diente zur Bestimmung der Proliferationsrate der Tumoren. Hierzu wurde der Marker in einer Konzentration von 200 mg pro Kilogramm Körpergewicht in Natriumchlorid gelöst und den Tieren 6 Stunden vor der Tötung in die Schwanzvene appliziert.

Bei dem 5-Brom-2-deoxy-uridin handelt es sich um ein Nukleosidanalogue, welches von den Replikationsenzymen nicht als solches erkannt und somit in die Ribonukleinsäure eingebaut wird. Je höher die Proliferation des Tumors ist und je mehr messenger-RNS synthetisiert wird, desto mehr 5-Brom-2-deoxy-uridin wird von dem Gewebe aufgenommen und in die RNA eingebaut. Die Menge des in vivo aufgenommenen Broms wird mit Hilfe der Antikörper-Antigen-Reaktion mittels monoklonalem Anti-BrdU-Antikörper immunhistochemisch bestimmt. Die Durchführung wurde unter Punkt 4.2.6.2.2.1 aufgeführt. Bei einer hohen Tumorproliferationsrate sind die Signale in der Färbung dementsprechend hoch.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Referenztumormodell

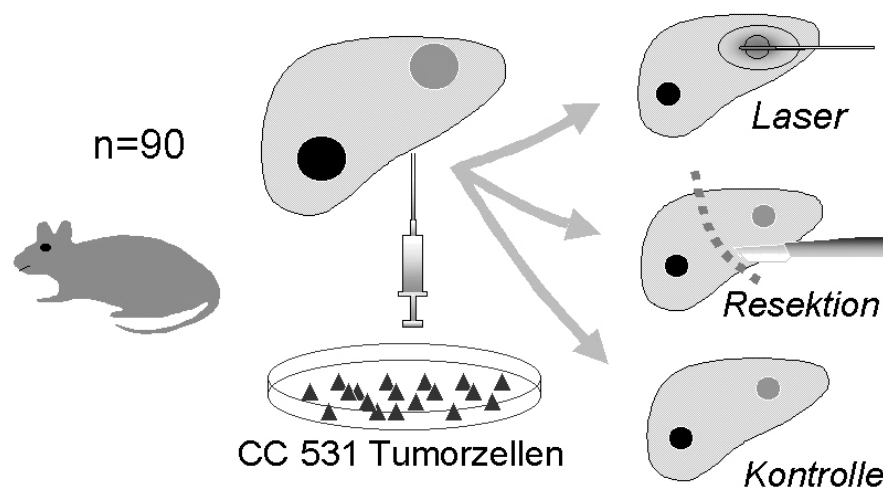
Den 90 Ratten wurden einheitlich je eine Millionen CC 531 Tumorzellen sowohl in den linken als auch in den rechten Leberlappen, wie unter Punkt 4.2.4.1 beschrieben, implantiert. Jede Ratte wies somit im Anschluß an den Tumorimplantationstag einen angehenden Tumor im linken Leberlappen und einen angehenden Tumor im rechten Leberlappen auf. Der in den linken Leberlappen implantierte Tumor wurde als Behandlungstumor bezeichnet, da je eine definierte Anzahl ( $n = 30$ ) dieser Tumoren mittels einer von drei unterschiedlichen Therapieformen therapiert wurde: Eine dieser Therapieformen war die thermische Koagulation des Behandlungstumors mittels laserinduzierter Thermotherapie, und folglich wurden die Tiere als Lasergruppe bezeichnet. Eine weitere Therapiemethode war die anatomiegerechte Tumorsektion als Hemihepatektomie links, und folglich wurden die Tiere 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 Be-



handlungstumors 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 90 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.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Referenztumormodells: Tumorimplantation in den linken und rechten Leberlappen (Behandlungs- bzw. Referenz tumor) und Therapie des Behandlungstumors mittels laserinduzierter Thermotherapie, Leberresektion oder „Scheinbehandlung“ nach 7 Tagen Latenzzeit. Der Referenz tumor bleibt unbehandelt und diente späteren Untersuchungen.

## 4.2.2 Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation

### 4.2.2.1 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 pro Milliliter mit 20 ml 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 abgegossen und die verbleibenden Tumorzellen 2 mal mit Phosphatpuffer (PBS, Seromed, Berlin) gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 3 ml Trypsin (Seromed, Berlin), einem proteinspaltenden Enzym, und die Inkubation für 3 bis 5 Minuten 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 6 ml des Komplettmediums 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 10 ml Pipette resuspendiert, damit sich vereinzelte Zellklumpen lösen, in eine 50 ml Falcontuben umgefüllt und mit PBS (Seromed, Berlin) auf 50 ml komplementiert. Die Suspension wurde 10 Minuten bei 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, das Zentrifugat abgegossen und der Rückstand noch einmal mit PBS (Seromed, Berlin) aufgefüllt und resuspendiert. Für die Zellzählung wurden  $100 \mu\text{l}$  von dieser Suspension mit  $100 \mu\text{l}$  Trypanblau (Merck, Darmstadt) versetzt, 2 Minuten 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 50 ml-Falcontube) und abschließend mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert. Letzterer ist der Faktor der Neubauerkammer, um die Zellzahl für 1 ml 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 0,1 ml ergab.

### **4.2.3 Operationsvorbereitung**

#### **4.2.3.1 Narkose**

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

#### **4.2.3.2 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).

### **4.2.4 Operative Eingriffe**

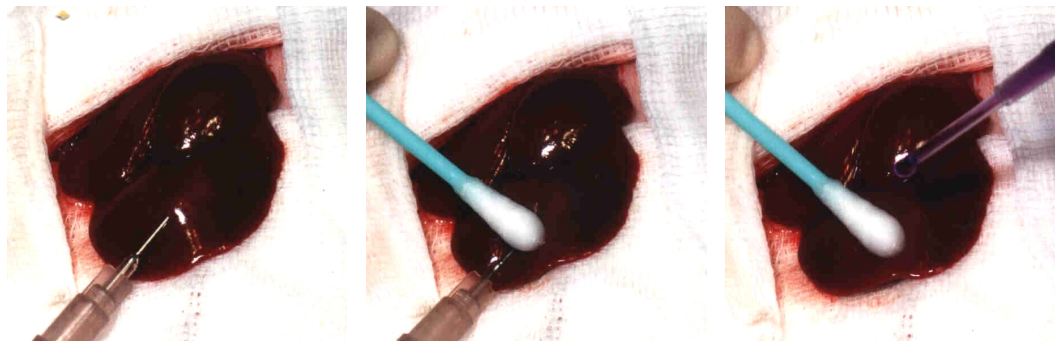
Sämtliche nachfolgend beschriebenen operativen Eingriffe erfolgten unter aseptischen Kautelen:

#### **4.2.4.1 Tumorzellimplantation**

##### **4.2.4.1.1 Durchführung der Tumorzellimplantation**

Als Zugang erfolgte bei der Tumorzellimplantation die Laparotomie 0,5 cm unterhalb des rechten Rippenbogens. Nach schichtweisem Durchtrennen 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 0,1 ml der unter Punkt 4.2.2.1 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.



**Abbildung 5:** Dargestellt sind die Arbeitsschritte der Tumorzellimplantation in die Leber: Injektion der Tumorzellen, Rückzug der Kanüle unter Kompression des Stichkanals und Verschluß der Einstichstelle mit Acrylkleber (B. Braun, Melsungen).

#### 4.2.4.1.2 Beendigung der Tumorzellimplantation

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<sup>®</sup>, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Suturamid<sup>®</sup>, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) mit Einzelknopfnähten vernäht.

#### 4.2.4.1.3 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<sup>®</sup> 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 ( $\pm 2$  °C), einer relativen Luftfeuchte von 55 % ( $\pm 5$  %) und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

## **4.2.4.2 Tumorbehandlung**

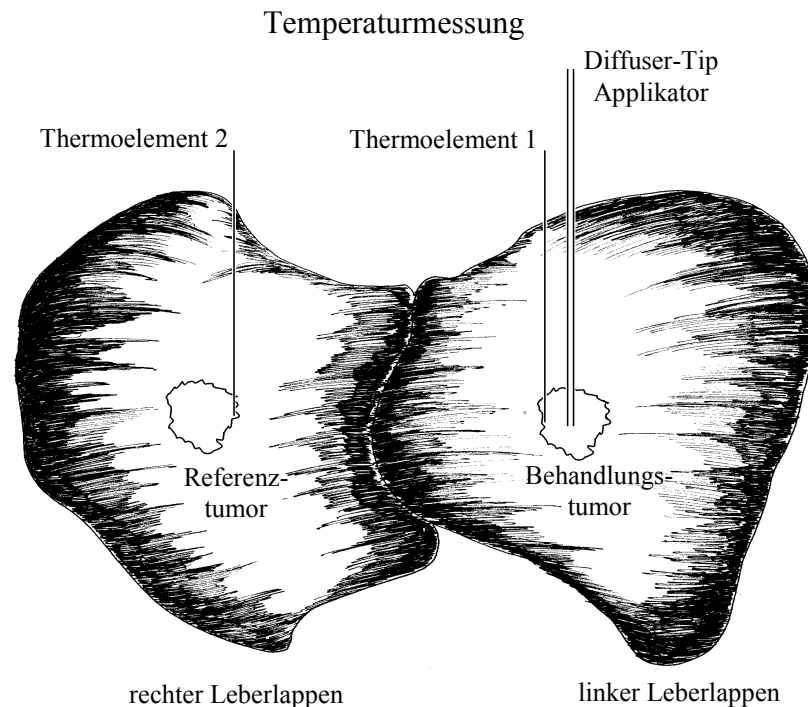
### **4.2.4.2.1 Laserinduzierte Thermotherapie (LITT)**

#### **4.2.4.2.1.1 Platzierung des Applikators**

Der Zugang erfolgte über eine obere Medianlaparotomie, welche vom Processus xiphoideus bis zum Nabel durchgeführt wurde. Nach schichtweisem Durchtrennen 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) (Punkt 4.1.2) 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 platziert. Um eine Dislokation des Applikationssystems und der Thermoelemente zu vermeiden, wurden diese in die unter Punkt 4.1.3 beschriebene spezielle Haltevorrichtung eingebracht.



**Abbildung 6:** Die Skizze zeigt die Lage der beiden Thermoelemente an den einander zugewandten peripheren Tumorrändern des Behandlungs- und Referenz-tumors in paralleler Anordnung zum Applikationssystem.

#### 4.2.4.2.1.2 Laserapplikation und Applikatorstest

Nach der intrahepatischen Platzierung des Laserapplikationssystems und der Thermoelemente erfolgte die Messung der Ausgangstemperatur.

Anschließend wurde die Laserapplikation mit 2 Watt für 800 Sekunden, entsprechend einer Energieleistung von 1600 Joule, durchgeführt.

Vor und während der Laserapplikation erfolgte die kontinuierliche Registrierung der Temperaturen an den peripheren Tumorrändern des Behandlungs- und Referenztumors mittels der unter Punkt 4.1.5 beschriebenen Temperaturmeßeinheiten.

Zur Quantifizierung der faserbedingten Energieverluste wurde vor jeder Laserapplikation die distale Applikatorleistung mit einem Leistungsmeßgerät (Hüttinger, München) (Punkt 4.1.4) ermittelt.

#### 4.2.4.2.1.3 Beendigung der Operation

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<sup>®</sup>, Ethicon GmbH & Co KG,

Norderstedt) und dann die Aponeurose der Linea alba mit einer fortlaufenden Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Vicryl<sup>®</sup>, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Suturamid<sup>®</sup>, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) mit Einzelknopfnähten vernäht.

#### **4.2.4.2.1.4 Haltung der Tiere nach LITT**

Die Haltung nach dem operativen Eingriff entsprach den unter Punkt 4.2.4.1.3 angegebenen Bedingungen.

#### **4.2.4.2.2 Leberresektion**

##### **4.2.4.2.2.1 Durchführung der 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 schichtweisem Abklemmen der zu resezierenden Leberlappen dicht an der Leberpforte wurde unterhalb der Klemme eine Ligatur aus 5/0 Prolene<sup>®</sup> (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<sup>®</sup> (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<sup>®</sup> (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 Tumorgrößen einer anatomiegerechten Hemihepatektomie humaner Lebermetastasen.

#### **4.2.4.2.2.2 Beendigung der Operation**

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<sup>®</sup>, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Suturamid<sup>®</sup>, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) mit Einzelknopfnähten vernäht.

#### **4.2.4.2.2.3 Haltung der Tiere nach Leberresektion**

Die Haltung nach dem operativen Eingriff entsprach den unter Punkt 4.2.4.1.3 angegebenen Bedingungen.

#### **4.2.4.2.3 „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 und anschließend wie unter Punkt 4.2.4.2.2.2 verschlossen.

##### **4.2.4.2.3.1 Haltung der Tiere nach „Scheinbehandlung“**

Auch die Haltung der Kontrolltiere erfolgte standardgemäß nach den unter Punkt 4.2.4.1.3 angegebenen Bedingungen.

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

6 Stunden vor der Tötung zu den unter Punkt 4.2.5 angegebenen Zeitpunkten wurde den Ratten der Marker 5-Brom-2-deoxy-uridin (LaPoche, Mannheim), wie unter Punkt 4.1.8 beschrieben, appliziert. Nach der angegebenen Latenzzeit wurden die Tiere, wie unter Punkt 4.2.3.1 erläutert, narkotisiert und mittels einer intrakardialen Injektion mit Embutramid (T 61<sup>®</sup>, Hoechst, Unterschleißheim) in einer Dosierung von 0,3 ml 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  $-196\text{ °C}$  eingefroren und bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

Der Behandlungstumor der Kontrollgruppe bzw. die Nekrose der Lasergruppe wurde entsprechend dem Referenztumor vermessen und unterlagen den selben Konservierungsverfahren.

#### **4.2.5 Versuchstiergruppen**

Es wurden drei Gruppen mit je 30 Tieren gebildet, deren Behandlungstumor unterschiedlich behandelt wurde (Gruppe A, B und C): Gruppe A diente als Kontrollgruppe und die Tiere wurden lediglich einer „Scheinoperation“ unterzogen. In der Gruppe B wurde eine laserinduzierte Thermotherapie des Behandlungstumors durchgeführt, und in der Gruppe C erfolgte eine anatomiegerechte Tumorsektion als Hemihepatektomie links. Je 5 Tiere aus jeder Gruppe wurden 1, 2, 4, 7, 10 sowie 21 Tage nach Therapiedurchführung (Gruppe A1 bis A6, B1 bis B6 und C1 bis C6) 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 1 zeigt den Behandlungsplan der Gruppen.

<b>Bezeichnung Gruppe A</b>	<b>Anzahl (n)</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Histologie nach</b>
A1	5	Kontrolle	1 Tag
A2	5	Kontrolle	2 Tagen
A3	5	Kontrolle	4 Tagen
A4	5	Kontrolle	7 Tagen
A5	5	Kontrolle	10 Tagen
A6	5	Kontrolle	21 Tagen

<b>Bezeichnung Gruppe B</b>	<b>Anzahl (n)</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Histologie nach</b>
B1	5	LITT	1 Tag
B2	5	LITT	2 Tagen
B3	5	LITT	4 Tagen
B4	5	LITT	7 Tagen
B5	5	LITT	10 Tagen
B6	5	LITT	21 Tagen

<b>Bezeichnung Gruppe C</b>	<b>Anzahl (n)</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Histologie nach</b>
C1	5	Resektion	1 Tag
C2	5	Resektion	2 Tagen
C3	5	Resektion	4 Tagen
C4	5	Resektion	7 Tagen
C5	5	Resektion	10 Tagen
C6	5	Resektion	21 Tagen

**Tabelle 1:** Behandlungsplan der Gruppen A, B und C

#### **4.2.5.1 Gruppe A**

Die Tiere der Gruppe A 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 A1), 2 Tage (Gruppe A2), 4 Tage (Gruppe A3), 7 Tage (Gruppe A4), 10 Tage (Gruppe A5) und 21 Tage (Gruppe A6) nach Therapiedurchführung getötet, hepatektomiert und wie dargestellt weiterbehandelt.

#### **4.2.5.2 Gruppe B**

Die Tiere der Gruppe B 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 B1), 2 Tage (Gruppe B2), 4 Tage (Gruppe B3), 7 Tage (Gruppe B4), 10 Tage (Gruppe B5) und 21 Tage (Gruppe B6) nach Therapiedurchführung getötet, hepatektomiert und wie dargestellt weiterbehandelt.

#### **4.2.5.3 Gruppe C**

Bei den Tieren der Gruppe C 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 C1), 2 Tage (Gruppe C2), 4 Tage (Gruppe C3), 7 Tage (Gruppe C4), 10 Tage (Gruppe C5) und 21 Tage (Gruppe C6) nach Therapiedurchführung getötet, hepatektomiert und wie dargestellt weiterbehandelt.

## **4.2.6 Histologische Aufarbeitung**

### **4.2.6.1 Herstellung der Gefrierschnitte**

Die Herstellung der Kryostatschnitte erfolgte mit dem Kryostaten 2800 Frigocut N (Leica, Nußloch), bestehend aus einer Kryostatkammer und einem thermovariablen Mikrotom. Die Gewebeproben wurden in kryoasserviertem Zustand im Kryostatraum bei  $-23\text{ °C}$  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 Tumordinvasionsfront (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 (Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf) 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  $-23\text{ °C}$  eingestellt. Es wurden Schnittpräparate von  $5\text{ }\mu\text{m}$  Dicke hergestellt und mit einem zimmerwarmen Objektträger zur Weiterverarbeitung abgenommen.

#### **4.2.6.1.1 Fixierung**

Die fertigen Schnitte wurden in Acetonchloroform (Baker, Deventer/Holland) bei  $4\text{ °C}$  für 5 Minuten im Kühlschrank fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie bis zum Färben bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

## 4.2.6.2 Färbemethoden

### 4.2.6.2.1 Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Färbung (APAAP-Färbung)

#### 4.2.6.2.1.1 Durchführung der APAAP-Färbung

Die Objektträger mit den Schnittpräparaten wurden aufgetaut und 10 Minuten in Aceton (Baker, Deventer/Holland) nachfixiert. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit einem PAP-Pen (DAKO, Hamburg) umkreist und die Objektträger präparatcharakterisierend beschriftet. Anschließend erfolgte die Fixierung für 20 Minuten in Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt). Die Schnitte wurden in einer feuchten Inkubationskammer bei Raumtemperatur mit 5%igem Rattennormalserum (Dianova, Hamburg) in Phosphatpuffer (PBS, Seromed, Berlin) inkubiert, und nach 20 Minuten wurde das Rattennormalserum von der Präparatoberfläche abgeklopft. Im Anschluß erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers. Antigenität, Herkunft und Klassen sowie Hersteller und Verdünnungsfaktoren der kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper, welche bei den Versuchen verwendet wurden, sind im folgenden tabellarisch aufgeführt.

Antigen	Herkunft/ Klasse	monoklonal/ polyklonal	Firma, Ort	Faktor
CD8 anti-rat	mouse IgG <sub>1</sub> κ	monoklonal	PharMingen, Heidelberg	1:50
CD54 anti-rat	mouse IgG <sub>1</sub>	monoklonal	Serotec, Eching	1:50
MHC I anti-rat	mouse IgG <sub>1</sub> κ	monoklonal	PharMingen, Heidelberg	1:1500
MHC II anti-rat	mouse IgG <sub>1</sub> κ	monoklonal	PharMingen, Heidelberg	1:1500

**Tabelle 2:** Die Tabelle zeigt die Herstellerangaben der verwendeten Primärantikörper. Nähere Angaben zu den Antigenen befinden sich im Anhang unter den Punkten 10.1 und 10.2.

Die Verdünnung der Primärantikörper erfolgte mit RPMI 1 (RPMI 1640, Gibco, Eggenstein) bei  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Als Negativkontrolle diente ein monoklonaler mouse IgG<sub>1</sub>-Antikörper gerichtet gegen ein irrelevantes Antigen. Zur Antikörperinkubation wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  des verdünnten Antikörpers auf das Schnittpräparat aufgetragen und die Präparate anschließend für 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit TBS-Waschpuffer [0,9 g TRIS-Base (Sigma, Steinheim), 6,85 g TRIS-HCL (Sigma, Steinheim), 8,78 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt) auf 1 Liter Aqua destillata (Millipore GmbH, Eschborn), pH 7,5] mit Hilfe einer Spritzflasche gewaschen. Es erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers entsprechend der Inkubation des Primärantikörpers für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Als Sekundärantikörper diente der sogenannte „Brückenantikörper“ (rabbit anti-mouse IgG<sub>1</sub>, DAKO, Hamburg) gerichtet gegen das konstante Fragment (Fc-Fragment) des Primärantikörpers. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte um den Faktor 1:20 mit 5%igem Rattennormalserum (Dianova, Hamburg) in PBS (Seromed, Berlin). Nach Inkubation und Waschen der Präparate mit TBS-Waschpuffer erfolgte zur Amplifikation des Signals die Inkubation mit dem Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörperkomplex (APAAP-Komplex, DAKO, Hamburg) entsprechend der Inkubation des Primär- und Sekundärantikörpers. Der Verdünnungsfaktor mit RPMI 1 (Gibco, Eggenstein) betrug 1:40. Nach anschließendem Waschen mit TBS-Waschpuffer erfolgte die Zugabe der Farbsubstratlösung. Hierzu wurde zunächst 70 ml Entwicklungspuffer [4,35 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt), 0,75 g TRIS-HCL (Sigma, Steinheim) und 2,45 g TRIS-Base (Sigma, Steinheim) auf 500 ml Aqua destillata (Millipore GmbH, Eschborn)] hergestellt, mit 25 ml 2-Amino-2methyl-1,3propandiol (Merck, Darmstadt) verrührt und der pH-Wert auf 9,75 eingestellt. Hierzu wurden 40 mg Levamisol (Sigma, Steinheim) sowie 50 mg Naphthol AS-BI Phosphat (NABP, Sigma, Steinheim) in 600  $\mu\text{l}$  Dimethylformid (Sigma, Steinheim) zugefügt. Nachdem 20 mg Natriumnitrit (Sigma, Steinheim) gelöst in 500  $\mu\text{l}$  Aqua destillata (Millipore GmbH, Eschborn) mit 200  $\mu\text{l}$  Neufuchsin (Merck, Darmstadt) 1 Minute reagiert hatten, wurde dieses Reagenz gleichfalls zugefügt. Nach Filtration der Lösung wurde deren pH-Wert mit Salzsäure (HCL, Merck, Darmstadt) auf 8,8 eingestellt. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Farb-

substratlösung auf den Schnittpräparaten, erfolgte das Beenden der Reaktion durch Wässern der Präparate für 5 Minuten. Abschließend wurde mit Hämatoxylin (Meyer's Hämalaun-Lösung, Merck, Darmstadt) für 45 Sekunden gegengefärbt.

#### **4.2.6.2.1.2 Eindecken**

Nach dem Trocknen wurden die Präparate mit Kaiser's Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

#### **4.2.6.2.2 Brom-deoxy-uridin-Färbung (BrdU-Färbung, BrdU-Reaktion)**

##### **4.2.6.2.2.1 Durchführung der BrdU-Färbung**

Es wurde der 5-Bromo-2-deoxy-uridine Labeling and Kit II von Boehringer (LaRoche, Mannheim) verwendet.

Die Kryostatschnitte wurden aufgetaut und für 10 Minuten in Aceton (Baker, Deventer/Holland) bei Raumtemperatur nachfixiert. Die Umkreisung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines PAP-Pen (DAKO, Hamburg). Anschließend wurden je 20 Schnitte in einem 150 ml-Ansatz bestehend aus 148,5 ml Methanol (Baker, Deventer/Holland) und 1,5 ml Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ , Merck, Darmstadt) für 10 Minuten fixiert. Die nachfolgende Fixierung erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Inkubationskammer mittels Ethanol-Fixans aus 105 ml 70%igem Ethanol (Baker, Deventer/Holland) und 45 ml Glycin-Puffer [1,876 g Glycin (Merck, Darmstadt) auf 500 ml Aqua destillata (Millipore GmbH, Eschborn), pH 2]. Nach 20 Minuten erfolgte das Waschen mit Phosphatpuffer (PBS, Seromed, Berlin) und im Anschluß wurde der monoklonale Anti-BrdU-Antikörper mit Inkubationspuffer [TRIS-Puffer 66 mM/l,  $MgCl_2$  0,66 mM/l,  $\beta$ -Mercaptoethanol 1 mM/l] 1:10 verdünnt und bei 1300 Umdrehungen pro Minute für 2 Minuten zentrifugiert. Die Negativkontrolle hatte die gleiche Verdünnung. Auf jeden Schnitt wurden 50  $\mu$ l des Zentrifugats aufgetragen, und die Inkubation erfolgte bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer. Nach 30 Minuten wurden die Schnitte mit PBS (Seromed, Berlin) gewaschen und der Anti-Maus-Ig-Alkalische-Phosphatase-Antikörper in einer Phosphatpufferverdünnung (Seromed, Berlin) von 1:10 aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten. Nach dem Waschen mit PBS (Seromed, Berlin) wurden die Schnittpräparate mit frisch

hergestellter Farbsubstratlösung überschichtet, die sich aus nachfolgenden Kit-Reagenzien zusammensetzt: 6,5 µl Nitroblautetrazoliumsalz (NBT) wurden mit 5,0 µl 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-phosphat (BCIP) und 1,5 µl Substratpuffer [0,788 g TRIS-HCL, 0,192 g NaCl und 1,0165 g MgCl<sub>2</sub> auf 50 ml Aqua destillata (Millipore GmbH, Eschborn), pH 7,5] vermischt.

Nach der Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion nach 30 Minuten durch Spülung der Schnittpräparate mit PBS (Seromed, Berlin) beendet. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit einem Hämatoxylin (Meyer's Hämalaun-Lösung, Merck, Darmstadt) - Aqua destillata (Millipore GmbH, Eschborn) - Gemisch im Verhältnis 1:4 für 45 Sekunden und nachfolgender Wässerung.

#### **4.2.6.2.2.2 Eindecken**

Das Eindecken der Schnitte erfolgte wie unter Punkt 4.2.6.2.1.2 beschrieben.

### **4.2.7 Verarbeitung der Formalinpräparate**

#### **4.2.7.1 Fixierung**

Für die histologische Aufarbeitung wurden die Tumor-Leber-Präparate in einer 10%igen Formalinlösung (August Hedinger GmbH & Co., Stuttgart) für mindestens eine Woche fixiert.

#### **4.2.7.2 Herstellung der Gewebelöcke**

Aus jedem fixierten Tumor-Leber-Gewebe wurde ein 15 mm x 15 mm x 4 mm (Länge x Breite x Höhe) messender Gewebelock zur Paraffin-Einbettung gewonnen. Bei der Herstellung der Blöcke wurde darauf geachtet, daß jeder Gewebelock neben der Tumorinvasionsfront auch Tumorgewebe und einen Anteil nicht geschädigten Lebergewebes enthielt. Die Gewebelöcke wurden einzeln in ein mit der jeweiligen Identitätsnummer beschrifteten Plastikgittertäschchen (Tissue Tek<sup>®</sup>, Sakura, Zoeterwoude/Niederlande) plziert, wobei die spätere Schnittfläche mit der Tumorinvasionsfront, dem Tumor- und Lebergewebe der Unterseite des Plastikgittertäschchens anlag.



#### 4.2.7.3 Paraplasteinbettung

Die Entwässerung und Paraffineinbettung der Präparate erfolgte in einer automatischen Einbettvorrichtung (Hypercenter, Shandon, Frankfurt/Main). Folgende Medien wurden dabei durchlaufen:

Aqua destillata	3 Stunden
70%iger Alkohol	1 Stunde
80%iger Alkohol	1 Stunde
96%iger Alkohol	2 Stunden
100%iger Alkohol	2 Stunden
C.68 Intermedium (technocon)	2 Stunden

Die so entwässerten Gewebeblöcke wurden in flüssigem, 60 °C warmen Paraffin für 12 Stunden gelagert. Nachdem die Plastikgittertäschchen bis auf die Plastikunterlagen entfernt worden waren, erfolgte die Paraffineinbettung der Gewebeproben und eine 24-stündige Aushärtung des Paraffins.

#### 4.2.7.4 Herstellung der Schnittpräparate

Die Gewebeblöcke wurden mit der Plastikunterlage in ein Mikrotom (Modell: Hn 40, Leica, Nußloch) eingespannt. Nun wurden histologische Schnittpräparate von 2 µm Dicke hergestellt, mit einem Pinsel vom Mikrotommesser abgenommen und mit diesem zum Strecken in ein ca. 40 °C warmes Wasserbad gelegt. Anschließend wurden die Schnitte auf einen Objektträger aufgezo-gen und zum Trocknen für 24 Stunden in einen 37 °C warmen Wärmeschrank gestellt.

#### 4.2.7.5 Entparaffinierung

Zur Entparaffinierung wurden die Schnittpräparate nacheinander für jeweils 5 Minuten in Xylol-Lösungen (Baker, Deventer/Holland) verbracht.

#### 4.2.7.6 Hydrierung

Die Schnittpräparate wurden mit einer absteigenden Alkoholreihe wie folgt hydriert (Bezugsquellen siehe 9. Materialienliste):

100%iger Alkohol	3 Minuten
96%iger Alkohol	3 Minuten
80%iger Alkohol	3 Minuten
70%iger Alkohol	3 Minuten
Aqua destillata	3 Minuten

#### 4.2.7.7 Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Schnitte wurden folgendem Hämatoxylin-Eosin-Färbeverfahren unterzogen (Bezugsquellen siehe 9. Materialienliste):

Färben in Hämatoxylin	7 Minuten
Spülen in Aqua destillata	
Bläuen in fließendem Leitungswasser	10 Minuten
Färben in 0,5%igem wässrigen Eosin	4 Minuten
Spülen in Aqua destillata	
Entwässern in 70%igem Alkohol	3 Minuten

#### 4.2.7.7.1 Dehydrierung und Entalkoholisierung

Die Präparate wurden zur Dehydrierung und Entalkoholisierung nacheinander in folgende Lösungen eingebracht (Bezugsquellen siehe 9. Materialienliste):

80%iger Alkohol	3 Minuten
96%iger Alkohol	3 Minuten
100%iger Alkohol	3 Minuten
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten

#### 4.2.7.7.2 Eindecken

Jedes Präparat wurde mit einem Tropfen Cordid-Balsam (Hecht-Mertens, Kiel) beträufelt und mit einem Deckgläschen versehen.

## 4.2.8 Auswertkriterien

### 4.2.8.1 Makroskopische Beurteilung

#### 4.2.8.1.1 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:

1. 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 unter 2. berechnet.
2. Berechnung des Volumens (V) des Referenztumors zur Zeit der Behandlung sowie zum Tötungszeitpunkt mit Hilfe der Formel für Rotationsellipsoide, dabei entsprechen a, b, und c den Radien der Längsachsen in der Länge, Breite und Höhe:

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

#### 4.2.8.1.2 Makroskopische Beurteilung der Behandlungstumoren

Die Behandlungstumoren wurden zum Behandlungs- sowie zum Tötungszeitpunkt unmittelbar nach Entnahme der Leber und vor der Konservierung, wie unter 4.2.8.1.1 angegeben, vermessen und die Volumina berechnet.

### 4.2.8.2 Histologische Beurteilung der Schnittpräparate

Die histologischen Schnittpräparate wurden von zwei unterschiedlichen, in der Beurteilung derartiger Histologie 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.

#### **4.2.8.2.1 Qualitative Beurteilung der Schnittpräparate nach APAAP-Färbung und BrdU-Reaktion**

Die immunhistochemischen Präparate (APAAP, BrdU) wurden korrelierend mit den HE-Präparaten ausgewertet, wobei die Morphologie anhand der HE-Präparate und die spezifische Expression der zu untersuchenden Moleküle anhand der immunhistochemischen Präparate bewertet wurde. Bei der APAAP-Färbung wurde die typische Rotfärbung und bei den BrdU-Präparaten die typische Braunfärbung qualitativ als positiv gemessen. Die Intensität der Expression wurde in nicht vorhanden (-), gering (+), mäßig (++) und stark (+++) graduiert.

#### **4.2.8.2.2 Semiquantitative Beurteilung der Referenztumoren nach APAAP-Färbung und BrdU-Reaktion**

Die semiquantitative lichtmikroskopische Auswertung der Gefrierschnitte der Referenztumorpräparate nach APAAP-Färbung mit dem Nachweis der Expression der Oberflächenmoleküle CD8, CD54, MHC I und MHC II sowie nach BrdU-Färbung mit der Dedektion des in-vivo inkorporierten BrdU erfolgte nach folgenden Kriterien:

1. Der Schwerpunkt der Betrachtung wurde bei 400-facher Vergrößerung auf drei verschiedene, repräsentative Areale innerhalb der Tumordinvasionsfront, d.h. der Grenze zwischen Tumorgewebe und angrenzendem Lebergewebe, gelegt.
2. Innerhalb dieser Areale erfolgte für jedes Schnittpräparat die semiquantitative Dokumentation mit Hilfe eines festgelegten Scores, wobei die Intensität der Expression in nicht vorhanden (-), gering (+), mäßig (++) und stark (+++) graduiert wurde.
3. Die Ergebnisse der drei Areale eines Schnittpräparats wurden in ein numerisches System (0, 1, 2 und 3) transformiert, um den Median der drei Einzelwerte zu errechnen.
4. Anschließend wurde aus den Werten einer jeder Gruppe für jeden Zeitpunkt (n = 5) der Median berechnet.
5. Die Ergebnisse wurden rücktransformiert und entsprechend mit oben genannten Score semiquantitativ für jede Gruppe und für jeden Zeitpunkt angegeben.

#### **4.2.8.2.3 Histologische Beurteilung der Behandlungstumoren nach LITT nach HE-Färbung und BrdU-Reaktion**

Die Behandlungstumoren der Gruppe der laserinduzierten Thermotherapie wurden zur Kontrolle der vollständigen Tumorablation histologisch und immunhistochemisch untersucht. Als vollständige Tumorablation wurde dabei gewertet, wenn in den HE-Präparaten keine vitalen Tumorzellen nachweisbar waren und gleichzeitig die BrdU-Reaktion negativ (–) war.

#### **4.2.9 Statistische Analyse**

Für die nachfolgende Darstellung der Ergebnisse wurde die 7-tägige Latenzzeit zwischen dem Tumorimplantationstag und dem Behandlungstag des Behandlungstumors als „praeoperativ“ bezeichnet, die anschließenden Zeitintervalle bis zu den definierten Tötungszeitpunkten gelten entsprechend als „postoperativ“.

Da bei der Dimension „Volumina“ nicht von einer symmetrischen Verteilung ausgegangen werden kann, wurde aus den praeoperativen Volumina der Referenztumoren zum Behandlungszeitpunkt sowie deren Volumina zum Tötungszeitpunkt die dritte Wurzel gezogen. Die Ergebnisse wurde als „relative Radien“ bezeichnet: Demzufolge konnten von jedem Referenztumor die Daten über einen „relativer Radius praeoperativ“ zum Behandlungszeitpunkt sowie einen „relativer Radius postoperativ“ zum Tötungszeitpunkt der Auswertung hinzugezogen werden.

Im Anschluß wurde die „relative Radiuszunahme“ jedes Referenztumors während des Zeitintervalls zwischen dem Behandlungszeitpunkt und dem Tötungszeitpunkt ermittelt. Dafür wurde von jedem einzelnen Tier die Differenz aus dem relativen postoperativen Radius des Referenztumors zum Tötungszeitpunkt und dem relativen praeoperativen Radius zum Behandlungszeitpunkt gebildet.

Aus den jeweils 30 Tieren der Kontroll-, Laser- und Resektionsgruppe wurden das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichung (s) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der praeoperativen Volumina und der relativen Radien der Referenztumoren zum Behandlungszeitpunkt ermittelt.

Des weiteren wurde in jeder Therapiegruppe aus den 5 Tieren, die zum identischen Zeitpunkt getötet wurden, das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichung (s) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der jeweiligen

postoperativen Volumina, der relativen Radien und der relativen Radienzunahmen der Referenztumoren ermittelt.

In einem weiteren Schritt wurde mit der einfaktoriellen Varianzanalyse die Nullhypothese geprüft: ‚Es besteht kein Unterschied zwischen den praeoperativen relativen Radien der Referenztumoren zum Behandlungszeitpunkt‘. Zusätzlich wurde die Homoskedastizität-Hypothese, d.h. das Vorliegen gleicher Varianz der Untergruppen, mit dem Levene-Test geprüft (79).

Der tierexperimentelle Versuch wurde in der Weise angelegt, daß die Variablen „Gruppe“ und „Zeitpunkt“ von Interesse sind. Zur Auswertung der Ergebnisse kam die zweifaktorielle Varianzanalyse, die den Einfluß zweier unabhängiger Variablen, hier „Gruppe“ und „Zeitpunkt“, auf eine abhängige Variable untersucht, zur Anwendung. Signifikante Effekte der Faktoren „Gruppe“ und „Zeitpunkt“ können bei Vorliegen von Wechselwirkungen zwischen den Faktoren unter Umständen nicht sinnvoll interpretiert werden. Deshalb wurde zunächst der Effekt „Wechselwirkung“, d.h. die systemische Auswirkung der Überlagerung der unabhängigen Variablen „Gruppe“ und „Zeitpunkt“ auf die abhängige Variable, interpretiert. Als „starke Wechselwirkungen“ wurden solche angesehen, für die  $p < 0,01$  galt. Im Falle signifikanter ( $\alpha = 0,01$ ) Wechselwirkungen wurden einfaktorielle Varianzanalysen angewandt, in denen jede Untereinheit genau einer Untersuchungsbedingung unterzogen wurde, jede Bedingung mehrere Einheiten enthielt und insgesamt nur eine unabhängige Variable mit mehreren Ausprägungen vorlag:

1. Pro Zeitpunkt wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse die Nullhypothese: ‚Die Behandlungen unterscheiden sich im Mittel nicht‘ überprüft. Bei Signifikanz dieser Globalhypothese ( $\alpha = 0,05$ ) wurden paarweise Vergleiche mit dem Scheffé-Test ( $\alpha = 0,05$ ) durchgeführt (79).
2. Pro Behandlungsgruppe wurde die Nullhypothese: ‚Die Zeitpunkte unterscheiden sich im Mittel nicht‘ überprüft.

Im Falle der Signifikanz der Globalhypothese ( $\alpha = 0,05$ ) wurden die einzelnen Zeitintervalle zwischen dem praeoperativen Behandlungszeitpunkt und dem 2., 4., 7., 10. oder 21. postoperativen Tag alle mit dem Zeitintervall zwischen dem praeoperativen Behandlungszeitpunkt und dem 1. postoperativen Tag verglichen. Zur Anwendung kam der Dunnett-Test als ein

aposteriorisches, nichtorthogonales Verfahren (79). Es galt  $\alpha = 0,05$ . Ziel dieser Analyse war es, den zeitlichen Beginn der relativen Radienzunahme der Referenztumoren in jeder Gruppe zu finden.

Werte von  $p < 0,05$  wurden als signifikante relative Radienzunahmen der Referenztumoren in bezug auf ihre relativen Radienzunahmen zwischen dem praeoperativen Behandlungstag und dem 1. postoperativen Tag gedeutet. In jeder Gruppe wurde der 1. Tötungszeitpunkt, der einen entsprechenden Wert anzeigte, als zeitlicher Beginn der statistischen Zunahme der relativen Radien der Referenztumoren bezeichnet.

Werte von  $p > 0,05$  wurden als nicht signifikante relative Radienzunahmen der Referenztumoren in bezug auf ihre relative Radienzunahmen zwischen dem praeoperativen Behandlungstag und dem 1. postoperativen Tag gedeutet. Das entsprechende Zeitintervall zwischen dem Behandlungstag und dem spezifischen Tötungstag wurde als Periode der Wachstumsstagnation der jeweiligen Gruppe definiert.

Abschließend wurde für jedes Tier der Kontrollgruppe mit Hilfe des T-Tests für abhängige Variablen geprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen dem relativen Radius des Referenztumors und dem des Behandlungstumors zum definierten postoperativen Tötungszeitpunkt bestand. Es galt ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .