

6. Diskussion

6.1 Begründung der Methoden

Naturgemäß konnten die zur Überprüfung der aufgestellten Fragestellungen notwendigen experimentellen Untersuchungen nicht an menschlichen Lebertumoren durchgeführt werden, sodaß 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 4.2.1) 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, 61) starke Gewebereizungen in der Leber verursacht und folglich immunologische Abwehrmechanismen induzieren könnte. Andererseits hätte die intraportale Injektion von Tumorzellen (60) 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 Thermoerapie war ein Laser notwendig, dessen Wellenlänge im sogenannten optischen Fenster biologischen Gewebes (800 bis 1100 nm) liegt, sodaß aufgrund der optischen Eindringtiefe in biologisches Weichgewebe ausgedehnte Volumina bei moderater Temperaturentwicklung therapiert werden können (37, 78). Für die experimentellen Versuche wurde ein Nd-YAG Laser verwendet, der Laserlicht mit einer Wellenlänge von 1064 nm 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 (37, 67).

Aus experimentellen Erfahrungen der eigenen Arbeitsgruppe war bekannt, daß mittels der laserinduzierten Thermoerapie mit den Parametern 2 Watt über eine Applikationszeit von 800 Sekunden, Tumorgrößen von 10 mm im Durchmesser vollständig ablatiert werden (37, 93). Die Tumoren wiesen zum Therapiezeitpunkt einen durchschnittlichen Durchmesser von 7 ± 1 mm x 7 ± 1 mm x 3 ± 1 mm auf. Demzufolge wurde unter Verwendung der entsprechenden Laserparametern eine vollständige Tumorablation des Therapietumors mittels LITT durchgeführt und durch die immunologische Bestimmung der Proliferationsrate der Tumorzellen sowie die histologische Morphologie (Ergebnisse, Punkt 5.2.2.1) kontrolliert.

Entsprechend den onkologischen Grundsätzen beim Menschen erfolgte eine anatomiegerechte Resektion des Therapietumors als Hemihepatektomie (15, 88). In unterschiedlichen multivariaten 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 (42,

81). 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 immunologische Auswertungen nach 1, 2, 4, 7, 10 und 21 Tagen notwendig.

Zur histologischen Auswertung wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung der formalinfixierten Schnittpräparate der Referenztumoren mit dem Ziel gewählt, einen charakteristischen Eindruck über die Morphologie und die vitalen Zellstrukturen des Tumors im gesunden Leberparenchym treffen zu können. Durch die APAAP-Färbung der kryoasservierten Schnittpräparate der Referenztumoren unter Verwendung monoklonaler Primärantikörper sollte die peritumoröse Inflammation untersucht werden. Hierzu wurde einerseits der allgemein entzündlichen Marker CD8, der von zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird, gewählt. T-Lymphozyten gelten sowohl in Tiermodellen als auch in der Humanmedizin als potentielle Effektorzellen bei der zellvermittelten Immunantwort gegen Tumorzellen (30, 50). Die Expression kostimulatorischer Moleküle zur Aktivierung der T-Zellen wurde durch die Dedektion von CD54 (ICAM-1) aufgezeigt. Dieses interzelluläre Adhäsionsmolekül vermittelt die Zell/Zell-Adhäsion durch Bindung an LFA-1 (CD11a/CD18), welches von T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen, Granulozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert wird, und an den Typ 3 Komplementrezeptor MAC-1 (CR3, CD11b/CD18), der auf Monozyten, Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten vorliegt. CD54 befindet sich auf lymphoiden und myeloiden Zellen (50). Liganden für die Rezeptoren der T-Lymphozyten sind die Komplexe aus körpereigenen MHC-Molekülen und Antigenpeptiden. MHC-Klasse I-Moleküle werden auf Zellen myelo- und lymphopoetischen Ursprungs am stärksten exprimiert. Die MHC-Klasse II-Moleküle befinden sich auf antigenpräsentierenden Zellen (dendri-

tischen Zellen), Monozyten, Makrophagen und B-Zellen (50). Die Schnittpräparate der Referenztumoren nach APAAP-Färbung wurden sowohl einer qualitativen als auch semiquantitativen lichtmikroskopischen Analyse unterzogen, um für jedes Therapieverfahren eine repräsentative Aussage über die Intensität der Expression von CD8, CD54, MHC I und MHC II nach 1, 2, 4, 7, 10 und 21 Tagen treffen zu können.

Korrelierend erfolgte die Dedektion der in-vivo 5-Brom-2-deoxy-uridin (BrdU)-Inkorporation unter Verwendung eines monoklonalen Anti-BrdU-Antikörpers und eines Enzym gekoppelten Sekundärantikörpers, um eine Aussage über den Effekt der Therapieverfahren auf die postinterventionelle Proliferationsrate der Referenz-tumorzellen im Bereich der Invasionsfront und intratumorös sowie der Hepatozyten im Leberparenchym treffen zu können.

Um eine vollständige Tumorablation der Behandlungstumoren nach laserinduzierter Thermotherapie als Indiz einer kurativen Therapie bewerten zu können, erfolgte die immunologische Bestimmung der Proliferationsrate mittels BrdU-Antikörperreaktion korrelierend mit der histologischen Beurteilung der Morphologie mittels HE-Färbung.

Im folgenden werden die aufgestellten Fragestellungen anhand der erzielten Ergebnisse einzeln diskutiert:

6.2 Wachstumsverhalten des Residualtumorgewebes

Die Referenztumoren und scheinbehandelten Tumoren der Kontrollgruppe zeigten im gesamten Beobachtungszeitraum eine kontinuierliche Zunahme ihrer relativen Radien. Die Abbildung 13 im Anhang zeigt die Tumoren makroskopisch im zeitlichen Verlauf im Vergleich zur Laser- und Resektionsgruppe. Dabei ergab sich in der Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied zwischen den relativen Radien der Referenztumoren und denen der Behandlungstumoren. Signifikante Abweichungen von der Verlaufskontrolle über die relative Radienzunahmen der Referenztumoren bei „Scheintherapie“ wurden mit Hilfe der paarweisen Gruppenvergleiche der relativen Radienzunahmen der Kontroll-, Laser- und Resektionsgruppe festgestellt. Dabei fanden sich keine Unterschiede der relativen Radienzunahmen innerhalb der ersten 2 postoperativen Tagen zwischen Kontroll-, Laser- und Resektionsgruppe im Vergleich zur praeoperativen Ausgangssituation. Zwischen dem praeoperativen Behandlungstag und

dem 4. postoperativen Tag zeigten sich in der Lasergruppe im Vergleich zur Kontroll- und Resektionsgruppe erstmalig geringere relative Radienzunahmen, und diese konnten fortlaufend bis zum 21. Tag beobachtet werden. Der Vergleich zwischen der Kontroll- und der Resektionsgruppe ergab keinen Unterschied.

Nach einer anfänglichen Wachstumsstagnation der Referenztumoren der Kontrollgruppe zwischen dem Behandlungstag und dem 4. postoperativen Tag zeigte sich eine Zunahme ihrer relativen Radien am 7. postoperativen Tag. Demgegenüber zeigten die Referenztumoren der Resektionsgruppe eine Zunahme ihrer relativen Radien schon ab dem 4. postoperativen Tag. In der Lasergruppe begann eine Zunahme der relativen Radien der Referenztumoren erst ab dem 10. postoperativen Tag.

Aus diesen Daten läßt sich folgern, 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 Wachstumsverzögerung der Referenztumoren im Vergleich zur chirurgischen Resektion und zur „Scheinbehandlung“.

Das Ergebnis über das verzögerte Wachstum von residualem Tumorgewebe nach LITT konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, da es bis heute noch nicht von anderen Gruppen publiziert wurde. 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 (69) und einem schnelleren Wachstum von Tumorzellen in der Leber der Ratte bzw. der Maus führt (62). 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 (69). MIZUTANI et al. berichten über das vermehrte Auftreten von Lebermetastasen nach intraportaler Injektion einer Zellsuspension (10^5 Zellen pro

0,2 ml) 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 (60). MORIMOTO et al. inokkulierte den mittleren Leberlappen von DS-Mäusen mit einer Zellsuspension (2×10^5 Zellen pro 0,02 ml) 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 (62).

Als eine mögliche pathophysiologische Ursache für das vermehrte Auftreten von Rezidivmetastasen nach chirurgischer Leberresektion wird eine durch das chirurgische Trauma induzierte temporäre Immunsuppression diskutiert (25, 55, 62, 69, 72). So fanden MORIMOTO et al. in der bereits zitierten tierexperimentellen Untersuchung bei DS-Mäusen eine verminderte B- und T-Zellfunktion nach Leberresektion (62). Als weiterer pathophysiologischer Faktor des Rezidivmetastasenwachstums wird eine vermehrte Freisetzung von Wachstumsfaktoren im Rahmen der Leberregeneration nach ausgedehnten Parenchymresektionen diskutiert (46, 56, 91). Die Synthese und Freisetzung der Wachstumsfaktoren zur Leberregeneration korreliert dabei mit dem Ausmaß des Verlusts an funktionellem Leberparenchym (70, 83). 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 (46, 49, 53). ZARNEGAR et al. fanden deutlich erhöhte HGF mRNA Spiegel in Rattenlebern 3 bis 6 Stunden nach Hemihepatektomie bis zu einem Höchststand bei 12 Stunden (101), und PANIS et al. konnten eine biphasische HGF-Expression 1 Stunde und 12 Stunden nach 80%iger Hepatektomie bei Wistar-Ratten nachweisen (70). Auch beim Menschen führt die Leberresektion zu temporär erhöhten HGF-SF-Spiegeln (47, 80, 84) und könnte somit für die Entstehung von Rezidivmetastasen durch postoperativ einsetzende Stimulation der Proliferation von bis dahin ruhenden Mikro-metastasen verantwortlich sein (69, 89).

Die Besonderheit der laserinduzierten Thermotherapie 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 (67, 73, 82). Somit ist vorstellbar, daß postinterventionell nach laserinduzierter Thermotherapie 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 geringer ausgeprägt sind. Damit unmittelbar verbunden wäre der verminderte Effekt auf das Wachstum residualen Tumorgewebes im Vergleich zur chirurgischen Resektion. Des weiteren läßt sich als Erklärung für die beobachtete Wachstumsverzögerung der Residualtumoren nach LITT eine weitere Hypothese aufstellen: Der Verzicht auf die Resektion des Tumorgewebes nach dessen Zerstörung birgt die Möglichkeit einer Antigenpräsenz relevanter Tumorantigene, wodurch eine tumorspezifische Immunantwort induziert werden könnte. Diese Hypothese wird im Zusammenhang mit den eigenen Ergebnissen zur postinterventionellen Expression immunologisch relevanter Moleküle nach laserinduzierter Thermotherapie und nach chirurgischer Resektion unter Punkt 6.4 diskutiert.

6.3 Extrahepatische Tumormanifestation

Am 10. Tag wiesen 60 % der Tiere der Kontroll- und auch der Resektionsgruppe, aber keines der Tiere der Lasergruppe, extrahepatische Tumormanifestationen auf. Nach 21 Tagen wurde bei 80 % der Tiere der Kontrollgruppe, 100 % der Tiere der Resektionsgruppe und 20 % der Tiere der Lasergruppe eine Peritonealkarzinose festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen, daß die peritoneale Metastasenaussaat nach Leberresektion im Vergleich zur „Scheinbehandlung“ erhöht und nach laserinduzierter Thermotherapie verringert ist.

Diese Beobachtungen werden durch ähnliche Beobachtungen von der Arbeitsgruppe MÖLLER et al. bestätigt. Im Unterschied zur eigenen Arbeit, verwendeten die Autoren einerseits kein Referenztumormodell und andererseits transplantierten sie ein chemisch induziertes Adenokarzinom des Rattenkolons mittels Fragmentumimplantationsverfahren männlichen Wistar-Ratte in die Leber. Nach einer Latenzzeit von 8 Tagen wurden die Tiere einer laserinduzierten Thermotherapie mittels Nd-YAG Laser (46 °C an der Tumorgrenze über 30 Minuten), einer

Resektion des tumortragenden Leberlappens oder einer „Scheinthherapie“ unterzogen. Als Ergebnis konnte beobachtet werden, daß die Häufigkeit und die Ausdehnung der intraperitonealen Metastasenstreuung im beobachteten Zeitraum geringer nach laserinduzierter Thermotherapie im Vergleich zur Leberresektion ausgeprägt war. 75 % aller Ratten nach laserinduzierter Thermotherapie zeigten postinterventionell keine Anzeichen einer Metastasierung. Demgegenüber zeigten nur 46 % der Ratten nach Leberresektion kein intraperitoneales Tumorwachstum. Dabei wurde während des Beobachtungszeitraums ein kontinuierlicher Anstieg der Häufigkeit einer Peritonealkarzinose nach Leberresektion und „Scheinbehandlung“, nicht jedoch nach laserinduzierter Thermotherapie, festgestellt (61).

In weiterführenden Versuchen verwendeten MÖLLER et al. das Tumorzellsuspensionsverfahren ($1,0 \times 10^6$ 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 (61).

Des weiteren konnten MÖLLER et al. zeigen, daß selbst eine suboptimale laserinduzierte Thermotherapie (44 °C über 30 Minuten) im Vergleich zur „Scheindurchführung“ zu einer etwa 50%igen Reduzierung des Tumolvolumens und der Häufigkeit und Ausdehnung intraperitonealer Metastasenstreuung führt (61).

Als eine 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 (64). 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 (25).

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 (18, 28, 40, 66). 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 (61).

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 (61). Diese Hypothese bedarf weiterer Überprüfung in weiterführenden experimentellen Studien.

6.4 Expression immunologisch relevanter Moleküle

Der immunologische Nachweis der Oberflächenmoleküle CD8, CD54, MHC I und MHC II 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 zum 21. postoperativen Tag kontinuierlich eine geringe Expression von CD8, CD54, MHC I sowie MHC II. Abweichend davon konnte in der Lasergruppe eine mittelgradig gesteigerte Expression von CD8, MHC I und MHC II ab dem 4. postoperativen Tag und von CD54 ab dem 7. Tag innerhalb der Referenztumordinvasionsfront nachgewiesen werden. Des Weiteren war dieses Therapieverfahren mit einer starken CD8- und MHC II-Expression ab dem 7. postoperativen Tag und einer starken Expression von CD54 und MHC I ab dem 10. postoperativen Tag assoziiert. Diese starke

Präsenz der Oberflächenmoleküle CD8, CD54, MHC I und MHC II innerhalb der Tumorinvasionsfront der Referenztumoren bestand ausnahmslos bis zum 21. postoperativen Tag fort. Demgegenüber zeigte sich in der Resektionsgruppe in den überwiegenden Fällen eine geringe Expression von CD8, CD54, MHC I und MHC II. Lediglich vereinzelt, ohne erkennbaren Zusammenhang, wurde ein mittelgradiger Anstieg von MHC II und in einem Fall von CD8 nachgewiesen.

Zusammenfassend konnte immunologisch gezeigt werden, daß nach laserinduzierter Thermotherapie eine erhöhte Expression von CD8, CD54, MHC I und MHC II innerhalb der Tumorinvasionsfront der Referenztumoren resultiert.

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert keine weiterführende Literatur zu den angewandten immunologischen Untersuchungen des intrahepatischen Residualtumorgewebes nach laserinduzierter Thermotherapie versus chirurgischer Resektion. Die Beobachtung, daß die Resektion eines tumorfreien Leberlappens die Häufigkeit und das Ausmaß an extrahepatischer Metastasenstreuung im Vergleich zu den „Scheindurchführungen“ der laserinduzierten Thermotherapie und der Resektion des tumortragenden Leberlappens nicht entscheidend beeinflußt, gaben MÖLLER et al. Anlaß zu der Vermutung, daß die unterschiedliche Häufigkeit der Rezidiventstehung nach Resektion und laserinduzierter Thermotherapie nicht mit dem immunsuppressiven Effekt des chirurgischen Trauma oder der Freisetzung von Wachstumsfaktoren begründet werden kann. Vielmehr wird als Ursache die Auswirkung des in-situ Ablationsverfahrens auf Residualtumorgewebe vermutet (61). DICKSON und SHAH et al. sehen als möglichen Erklärungsansatz, daß die Zerfallsprodukte des Tumorgewebes nach lokaler Tumorzerstörung einen positiven Anstieg immunologischer Abwehrmechanismen induzieren (21). Die Ausbildung von Antikörpern könnte somit zytotoxisch auf eventuell vorhandene Mikrometastasen wirken. Die zugrundeliegenden Mechanismen durch die das Immunsystem in der Lage ist, Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören, wurden von einigen Autoren diskutiert (30, 74). Demnach erfolgt die Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen, die immunogene Peptide auf der Oberfläche in Verbindung mit MHC-Molekülen präsentieren. T-Zellen erkennen die MHC-Antigen-Komplexe über die T-Zellrezeptoren. Zur vollständigen Aktivierung sind sogenannte kostimulatorische Signale notwendig. Die kostimulatorischen Signale beruhen auf der Interaktion bestimmter Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen mit spezifischen Liganden auf der Oberfläche antigen-

präsentierender Zellen. Diese Rezeptor/Liganden-Interaktion verstärkt die Adhäsion zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle und leitet weitere Aktivierungssignale in das Zellinnere. Als Folge wird die Proliferation, die Reifung und Differenzierung der T-Zelle in funktionell aktive Zellen, den Effektorzellen und Gedächtniszellen, angeregt (50, 74). Die klonale Expansion der Effektorzellen ermöglicht antigenspezifischen T-Lymphozyten, bestehende Tumorzellen zu eliminieren und vor einer Tumorausbreitung zu schützen (30). Des weiteren konnten FALO et al. bei C57B/6 Mäusen zeigen, daß die Vakzination mit einem tumorspezifischen Antigen eine Immunisierung gegen Tumoren hervorruft. Die induzierte perkutane Immunisierung hält bis zu 3,5 Monate an. Die Autoren nehmen an, daß eine Immunisierung mit mehreren Antigenen das Phänom eines Tumorescape und eine Rezidiventstehung durch Antigenmodulation verhindern könnte (30). Des weiteren konnten unterschiedliche Arbeitsgruppen zeigen, daß eine Hyperthermie eine Reihe von Vorgängen induziert, die eine immunologische Antwort begünstigen. Hierzu zählen die Erhöhung der Permeabilität von Gefäßen in der Tumorperipherie (51), die erhöhte Expression von Haupthistokompatibilitäts-Komplex-Klasse II-Antigenen (75), die vermehrte Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen (52) und der verzögerte Zelltod (29).

Das Phänomen der induzierten immunologischen Antwort wurde zuvor schon von JACOB et al. als mögliche Erklärung ihrer Ergebnisse zur Cryotherapie postuliert. Sie konnten im Rattenmodell zeigen, daß die Zerstörung von Lebertumorzellen mittels Cryotherapie im Vergleich zur Leberresektion zu einer Reduzierung der Metastasenstreuungsrate führt (43). Die Cryotherapie von Lebermetastasen ist mit einer Aktivierung der Zytotoxizität natürlicher Killerzellen (5) und einer Reduzierung des Serumspiegel der Tumormarker assoziiert (9). In weiterführenden Untersuchungen von MISAO und MIYA et al. wurde die Widerstandsfähigkeit der Ratte nach Cryotherapie subkutan implantierter Mammaadenokarzinome gegenüber einer erneuten Tumorpräsenz demonstriert und dafür ebenfalls immunologische Reaktionen verantwortlich gemacht (57, 58). Somit ist anzunehmen, daß für die eigens beobachtete Wachstumsverzögerung der Residualtumoren nach laserinduzierter Thermotherapie ebenfalls immunologische Mechanismen verantwortlich gemacht werden können.

6.5 Proliferationsrate der Residualtumorzellen

Die Referenztumoren der Kontrollgruppe zeigten innerhalb der Tumorinvasionsfront während der Zeitperiode vom 1. bis zum 21. postoperativen Tag in den überwiegenden Fällen eine mittelgradige Proliferationsrate. In einem Fall ergab der ermittelte Median eine starke Proliferationsrate. Sowohl in der Lasergruppe als auch in der Resektionsgruppe wurde ebenfalls vorwiegend eine mittelgradige Proliferationsrate der Referenztumorzellen innerhalb der Tumorinvasionsfront festgestellt. Jeweils in einem der Fälle ergaben die Mediane stark ausgeprägte Proliferationsraten.

Demzufolge konnten keine Veränderungen der Proliferationsrate der Referenz-tumorzellen nach laserinduzierter Thermo-therapie bzw. Resektion der Behandlungstumoren im Vergleich zur „Scheinbehandlung“ nachgewiesen werden.

Die beobachtete Wachstumsverzögerung des Residualtumorgewebes nach laserinduzierter Thermo-therapie im Referenztumormodell der Ratte kann somit nicht mit dem Einfluß des Therapieverfahrens auf die Proliferationsrate der vitalen Tumorzellen erklärt werden. Mit Hilfe der Hämalaun-Eosin-Färbung der Referenz-tumorschnittpräparate wurde festgestellt, daß die Morphologie der vitalen Tumoren nach Laserkoagulation der Behandlungstumoren mittels laserinduzierter Thermo-therapie bzw. nach chirurgischer Tumorresektion im Vergleich zur „Scheinbehandlung“ keine strukturellen Unterschiede aufwies. Im Zusammenhang mit der unveränderten Proliferationsrate läßt sich daraus schließen, daß postinterventionell nach laserinduzierter Thermo-therapie keine Veränderung des Differenzierungsgrades der residualen Tumorzellen erzielt wurde.

Es erscheint hypothetisch vorstellbar, daß im Falle des in-situ Ablationsverfahrens inhibierende Faktoren das Wachstum residualer Tumorzellen beeinflussen könnten. Des weiteren wäre eine gesteigerte Apoptoserate der Referenz-tumor-zellen nach laserinduzierter Thermo-therapie ein möglicher Ansatz eines Erklärungsversuchs, dem in weiteren Studien nachgegangen werden sollte.

6.6 **Schlußfolgerung**

Zusammenfassend ergeben sich in Beantwortung der initial gestellten Fragestellungen folgende Schlußfolgerungen:

Die tierexperimentelle Untersuchung konnte in Übereinstimmung mit der Literatur zeigen, daß nach chirurgischer Leberresektion eine Wachstumsbeschleunigung intrahepatischen Residualtumorgewebes im Lebermetastasenmodell der Ratte resultiert. Demgegenüber ist die in-situ Ablation intrahepatischer Tumoren mittels laserinduzierter Thermotherapie (LITT) mit einer Wachstumsverzögerung der Referenztumoren im Vergleich zur chirurgischen Resektion und „Scheinbehandlung“ assoziiert.

Des weiteren wurden postinterventionell nach chirurgischer Resektion vermehrt extrahepatische Tumormanifestationen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt, während nach laserinduzierter Thermotherapie die Häufigkeit einer peritonealen Metastasenaussaat vermindert war.

Nach kurativem Therapieabschluß ist die laserinduzierte Thermotherapie mit einer verstärkten Expression immunologisch relevanter Moleküle innerhalb der Invasionsfront des Residualtumorgewebe assoziiert. Es wird diskutiert, daß diese gesteigerte zelluläre Infiltration eine positive Wirkung gegen bestehende vitale intrahepatische Residualtumoren haben könnte.

Die Proliferationsrate der Residualtumorzellen nach laserinduzierter Thermotherapie und nach Leberresektion wies postinterventionell keine Veränderungen zur Proliferationsrate der nicht therapierten Kontrollgruppe auf. Im Zusammenhang mit der unveränderten Morphologie der Residualtumorzellen der Laser- und Resektionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe scheint es, daß weder die laserinduzierte Thermotherapie noch die Tumorresektion postinterventionell genetische Transformationen der vitalen Residualtumorzellen im Referenztumormodell der Ratte induzieren könnten.

Zusammenfassend verdeutlicht die vorliegende Studie an einem in-vivo Tumormodell der Ratte die Vorzüge der laserinduzierten Thermotherapie im Vergleich zur chirurgischen Leberresektion auf makroskopischer und immunologischer Ebene.

6.7 Ausblick

Um die Unterschiede im Wachstumsverhalten der Referenztumoren und in der peritonealen Aussaat von Tumorzellen postinterventionell nach laserinduzierter Thermotherapie und chirurgischer Leberresektion im Vergleich zur „Scheinbehandlung“ weiter zu untersuchen, sollen weitere Untersuchungen mit Erfassung der lokalen und systemischen Immunreaktionen durch Nachweis immunologischer Marker und proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 (Interleukin-1), IL-6, IL-8, TNF- α (tumor necrosis factor- α) und Endotoxin im Serum und im Gewebe sowie hepatischer Wachstumsfaktoren HGF (hepatic growth factor) mittels Analysen wie ELISA und FACS-Scan durchgeführt werden. Unterstützend sollen die Serumkonzentrationen von mRNA-HGF durch RNA-Extraktion und quantitative RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) bestimmt werden. Weitere quantitative und semiquantitative Untersuchungen auf Protein- (Western blot) und mRNA-Ebene (in-situ Hybridisierung) sollen erfolgen.

Neben den allgemein entzündlichen Markern soll insbesondere die Expression kostimulierender Moleküle zur Aktivierung der T-Zellen (B7-1/B7-2, CD28, CTLA-4, LFA-1) untersucht werden.

Des Weiteren sollen Unterschiede in der Apoptose-Rate untersucht werden, und der enzymhistochemische Nachweis der NADPH-Dehydrogenase-Reaktion zur exakten Bestimmung des Ausmaß der thermischen Schädigungszone nach laserinduzierter Thermotherapie soll erfolgen.