

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Nd:YAG-Laser

Bei dem Nd:YAG-Laser (Neodymium-Yttrium-Aluminium-Granat) handelt es sich um einen Festkörperlaser, der bei einer Wellenlänge von 1064 und 1320 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. Laserstab und Lichtquelle sind dabei in den Brennlinsen eines elliptischen Gehäuses untergebracht.

In allen Versuchen kam der Medilas 2 (MBB-Medizintechnik, München) der Wellenlänge 1064 nm mit einer Laserenergie von 2 Watt im Dauerbetrieb zur Anwendung. 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 Gewebe können ausgedehnte Volumina bei moderater Temperaturentwicklung therapiert werden.

2.1.2 Lichtübertragungssystem (Applikationssystem)

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

2.1.2.1 Lichtwellenleiter

Die Übertragung des Laserlichtes durch einen flexiblen Lichtleiter ist die Voraussetzung für die interstitielle Laserapplikation. Um die Transmission der Laserstrahlung zu ermöglichen, hat dieser Lichtleiter einen speziellen Aufbau:

Er setzt sich zusammen aus einem Kern und einem optischen Mantel. Der Kern besteht aus einer Quarzfaser mit einem Durchmesser von 400 - 600 µm. Diese Faser wird von einem Mantel, dem sogenannten Cladding umschlossen, der ebenfalls aus Quarz besteht. Er unterscheidet sich vom Kern durch einen geringeren Brechungsindex. Infolgedessen wird Licht, welches genau auf den

Kern zentriert auftrifft, beständig von der Mantelfaser zurück in den Kern reflektiert, wodurch es zur reflexionsbedingten Ausbreitung der Strahlung in Längsachse der Faser kommt. Dies ist auch bei der Biegung der Faser gewährleistet, wenn der Biegungsradius einen Zentimeter nicht überschreitet. Damit das Laserlicht im Falle eines Faserbruches nicht unkontrolliert austreten kann, wird der Lichtleiter von Außen noch von einem dünnen Kunststoffmantel umschlossen, dem sogenannten Coating.

2.1.2.2 Einkopplung

Um den Energieverlust so gering wie möglich zu halten, muß eine genaue Fokussierung des Laserstrahls auf das Zentrum der Faser (Quarkern) gewährleistet sein. Dies geschieht durch die Einkopplung. Eine Metallfassung, welche auf das proximale Ende des Lichtleiters aufgeklebt wird, ermöglicht die genaue Fixierung des Lichtwellenleiters im optischen Strahlengang, und stellt somit die Verbindung zwischen Laser und Lichtleiter her. In den durchgeführten Versuchen kam ein axiales Einkopplungssystem zur Anwendung, welches den vom Laser emittierten Lichtstrahl in axialer Richtung auf die Eingangsfläche des Lichtwellenleiters lenkt.

2.1.2.3 Streukörper (Diffuser-Tip Applikator)

Der Streukörper befindet sich am distalen Ende des Lichtwellenleiters. In den durchgeführten Versuchsreihen wurde ein in Kooperation mit der Lasermedizinzentrum gGmbH, Berlin, entwickelter Diffuser-Tip Applikator verwendet. Der Diffuser-Tip Applikator besteht aus dem am distalen Ende der Laserfaser nach Entfernen des Coating und Cladding mattierten Quarkern und einer der Laserfaser aufgeklebten, an der Innenseite mattierten Quarzglasplatte. 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 Glasoberfläche. Die Abstrahlungscharakteristik des Diffuser-Tip Applikators ergibt sich bei einer axialen Laserfasereinkopplung durch Brechung des Laserlichtes an der Kappeninnenseite und der Quarkernoberfläche. Es 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 .

Die technischen Daten des Diffuser-Tip Applikators sind in Tabelle 1, der schematische Aufbau in der Abbildung 1 wiedergegeben:

Glasdomlänge	23 mm
Glasdomaußendurchmesser	1,4 mm
Faserkerndurchmesser	400 μm
Laser-Einkopplung	SMA 905

Tabelle 1: Technische Daten des Diffuser-Tip Applikators.

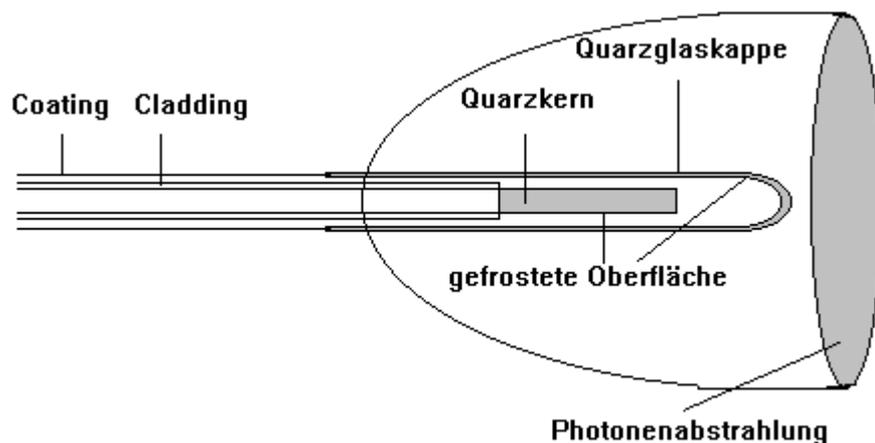


Abbildung 1:

Schematische Darstellung des Diffuser-Tip-Applikators mit der diffusen Photonenabstrahlungscharakteristik. Dargestellt ist der Aufbau des Lichtwellenleiters mit seinem Quarzfaserkern und der Ummantelung, dem sogenannten Cladding und Coating

2.1.3 Punktionsset

Zum Einbringen des Laserapplikators in den Tumor erfolgte die Punktion des Tumors mit einer Punktionsnadel (4 Fr/Ch, B.Braun, Melsungen).

2.1.4 Applikatorhalterung

Um eine Dislokation des Applikators während der Laserapplikation zu verhindern, wurde eine eigens zu diesem Zweck konstruierte Applikatorhalterung verwendet. Die Applikatorhalterung diente außerdem zur Fixierung einer Temperatursonde.

2.1.5 Leistungsmessgerät

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

Das Leistungsmessgerät funktioniert nach dem Prinzip der Ulbricht-Kugel. Dabei wird durch Einbringen der Laserfaser in die Kugel und Applikation von Laserlicht ein leistungsabhängiges Strahlungsfeld, welches sich durch vielfache Reflexion an der hochreflektierenden Innenwand (BaSO₄-Beschichtung) aufbaut, mittels Photodiode gemessen.

2.1.6 Temperaturmesseinheit

Zur Temperaturmessung im Gewebe während der Laserapplikation wurden flexible Standardthermoelemente des Typs K mit Inconel®-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 den gleichen Temperaturanzeigergeräten durchgeführt.

2.1.7 Intraarterieller Katheter

Für die Durchführung der i.a. Applikation von Stärkemikrosphären und isotonischer Kochsalzlösung (0,9%ig) (Punkt 2.2.3.2.3) in die A. hepatica der Ratte wurde eigens ein Katheter aus Polyethylen hergestellt. Dabei wurde ein im Außendurchmesser 2,5 mm messender Polyethylenschlauch über einer Flamme

soweit ausgezogen, dass der Durchmesser des distalen Endes problemlos in die A. hepatica des Tieres eingeführt werden konnte. Die technischen Daten des Katheters sind in der Tabelle 2 wiedergegeben:

Außendurchmesser des distalen Endes	0,8 mm
Innendurchmesser des distalen Endes	0,5 mm
Außendurchmesser des proximalen Endes	2,5 mm
Innendurchmesser des proximalen Endes	2 mm

Tabelle 2: Maße des Katheters zur i.a. Applikation

2.1.8 PC-integrierter Laser-Doppler

Das Messprinzip des Blutflussmessgerätes beruht auf der Frequenzverschiebung von Licht bei der Streuung an beweglichen Teilchen (Erythrozyten) durch den Dopplereffekt. Der Laser-Doppler besteht aus einem handelsüblichen Rechner mit einer zusätzlichen A/D-Wandlerkarte und einer Steuerkarte zum Anschluss des Lasermesskopfes. Ein in Pasqual geschriebenes Programm steuert die Datenaufnahme sowie die Weiterverarbeitung der Messwerte und die Darstellung der Ergebnisse auf dem Bildschirm. Die im Doppler verwendete Laserstrahlung beträgt 670 nm.

Die in der Photoiode gemessene Strahlungsfrequenz kann aufgrund der Streustrahlung nicht einfach in ein Geschwindigkeitsspektrum umgerechnet werden. Unter dem Blutfluss wird deshalb üblicherweise nur das Integral über dem Frequenzspektrum verstanden. Dieses ist eine relative Größe und korreliert mit der Durchblutung im Gewebe. Für eine Blutflussmessung werden insgesamt ca. 20 ms benötigt, so dass die Blutflüsse mit einer Zeitauflösung von ca. 50 Hz beobachtet werden.

2.1.9 Stärkemikrosphären (DSM)

Stärkemikrosphären (Spherex®, Pharmacia; Uppsala, Schweden) ist ein aus Stärke synthetisiertes, nicht immunogen wirksames Material. Durch quellen in wässriger Phase erhalten die Mikrosphären geleeartige Eigenschaften, sind nicht völlig starr, sondern etwas deformierbar und können sich somit der Form der vaskulären Umgebung anpassen. Sowohl durch den Grad der Quervernetzung als

auch durch die Teilchengröße läßt sich die Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaus durch die körpereigene α -Amylase steuern. DSM weist einen mittleren Teilchendurchmesser von $45 \pm 7 \mu\text{m}$ auf. Unter physiologischen Bedingungen zeigen die Mikrosphären in-vitro eine Halbwertszeit von 20 bis 30 Minuten bei 37°C und pH 7.0. Nach etwa einer Stunde sind die Partikel vollständig abgebaut. Die Dauer der Okklusion ist linear von der Dosis abhängig. Hingegen wird sie nur unwesentlich von der Dauer der Applikation (im Bereich von 30-300 sec.) beeinflusst. Aufgrund der Größe der Mikrosphären erfolgt die Okklusion in den Arteriolen nahe am kapillären Bett.

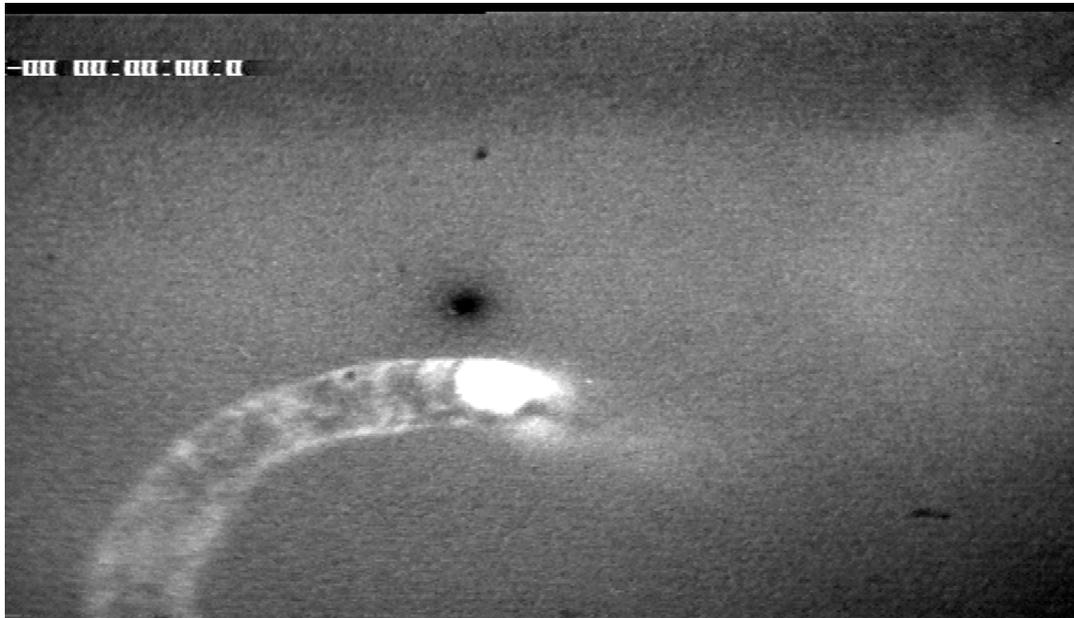


Abbildung 2: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines mit Fluoreszin markierten Stärkepartikels. Es embolisiert das gesamte Gefäß, so dass es sich für die markierten Erythrozyten als Passagehindernis darstellt.

2.1.10 Rotlichtlampe

Um eine Auskühlung des Versuchstieres während der operativen Intervention zu reduzieren, wurden sämtliche Versuchstiere während der gesamten Behandlungsdauer mit einem Rotlicht bestrahlt. In allen Versuchen kam das Rotlicht Infrared R 95 E;100 W, Philips, Germany zur Anwendung.

2.1.11 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche WAG-Ratten aus der Zucht der Zentralen Tierlaboratorien (ZTL) der Freien Universität Berlin mit einem initialen Körpergewicht von 200-280 g (entsprechend ihrem Lebensalter von 4-6 Monaten). Ihre Ernährung erfolgte mit Altromin® Standard-Diät-Haltung für Ratten und uneingeschränktem Wasserangebot aus der automatischen Tränkanlage.

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 18°C (\pm 2°C), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% (\pm 5%) und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

Die Tierversuchsgenehmigungsnummer lautet G0037/97.

2.1.11.1 Anatomie der Rattenleber

Die Leber der Ratte ist in einen linken, einen rechten und einen mittleren Leberlappen (Lobi) gegliedert. Der linke Lappen wird in vier weitere Unterlappen gegliedert, der rechte Lappen wird nicht weiter unterteilt.

Die hintere Hohlvene tritt am caudomedianen Rand in die Leber ein. Die A. hepatica und die Pfortader (V. porta) treten ventral der Vena cava in die Leberpforte (Porta hepatis).

Die Ratte besitzt keine Gallenblase. Gallengänge aus den Leberlappen vereinigen sich zum Ductus choledochus. Dieser 12 bis 45 mm lange und im Durchmesser einen Millimeter große Gang kreuzt dorsal das Duodenum, zieht unter der Bauchspeicheldrüse entlang und mündet etwa 20 mm distal vom Pylorus in die duodenale Papille (38).

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

2.1.12 Tumorzellen

Bei den verwendeten Tumorzellen handelt es sich um ein chemisch induziertes Adenokarzinom des Sigma, der Reihe CC 531 aus der Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg. Der Tumor besitzt eine Proliferationsrate von 40 - 60 %, entsprechend der Proliferationsrate bei humanen kolorektalen Karzinomen. Der Tumor wurde durch ein Tumorzellsuspensionsverfahren implantiert. Die Angehrate des Tumors liegt bei dem Tumorzellsuspensionsverfahren bei 90 %, ohne die Ausbildung weiterer extrahepatischer Tumore.

2.1.13 5-Brom-2-deoxy-uridin

Mit 5-Brom-2-deoxy-uridin (LaRoche, Mannheim) kann die Proliferationsrate von Geweben bestimmt werden.

Es handelt sich bei 5-Brom-2-deoxy-uridin um ein Nukleosidanalogs, welches von den Replikationsenzymen als Nukleosid erkannt und in die Ribonukleinsäure eingebaut wird. Je höher die Proliferation des Tumors ist, und um so mehr messenger-RNA synthetisiert wird, desto mehr 5-Brom-2-deoxy-uridin wird in den Zellkern aufgenommen und in die RNA eingebaut. Mit Hilfe der Antikörper-Antigen-Reaktion kann die Menge des inkorporierten Broms immunhistochemisch bestimmt werden. In Abhängigkeit der Menge des aufgenommenen 5-Brom-2-deoxy-uridin wurden die Signale der Färbung als negativ (-), wenig (+), mäßig (++) oder hoch (+++) eingestuft. Die Substanz wurde 6 Stunden vor der Tötung der Tiere in einer Konzentration von 200 mg/kg Körpergewicht intravenös injiziert (69). Bei einer hohen Tumorproliferationsrate sind die Signale in der Färbung dementsprechend hoch.

2.2 Methoden

2.2.1 Tumorsuspensionsherstellung

Die CC531-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Gibco, Eggenstein), welches mit 10% fötalem Kälberserum (Seromed, Berlin) und 1% Penicillin/Streptomycin (Seromed, Berlin) komplettiert wurde, kultiviert. Es wurden 2×10^6 Zellen/ml mit 20 ml Komplettmedium versetzt und in einer liegenden 80 cm^3 - Kulturflasche für 3-4 Tage bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 bebrütet. Die entstehenden Zellverbände haften auf dem Flaschenboden an.

Für die Zellernte wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgegossen und die Zellen zweimal mit Phosphatpuffer (PBS, Seromed, Berlin) gewaschen. Nach der Zugabe von 3 ml Trypsin (Seromed, Berlin), einem proteinspaltenden Enzym, wurde die Kulturflasche für 2-5 Minuten im Brutschrank belassen. Nach dem „Abschwämmen“ der Zellen 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. Danach wurde die Zellsuspension mit einer 10 ml Pipette 10x resuspendiert. Die Suspension wurde in eine 50 ml Falcontube umgefüllt, mit PBS (Seromed, Berlin) auf 50 ml aufgefüllt und bei 800 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde abgegossen, die Zellen abermals mit PBS (Seromed, Berlin) aufgefüllt, resuspendiert und die Zellzählung durchgeführt.

Für die Zellzählung wurden 100 μl Zellsuspension mit 100 μl Trypanblau (Merck, Darmstadt) versetzt, zentrifugiert und in eine Neubauerkammer pipettiert. Es wurden dann alle Zellen in den vier Feldern der Kammer ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl wurde durch zwei dividiert, da die Verdünnung mit dem Trypanblau 1:1 war. Das Ergebnis wurde entsprechend der 50 ml Falcontube mit 50 multipliziert und abschließend mit dem Faktor 4 multipliziert. Letzterer ist der Faktor der Neubauerkammer. Somit wird die Zellzahl für ein ml bestimmt. Nachdem man die Zellzahl/ml errechnet hat, wurde im Verhältnis soviel PBS (Seromed, Berlin) aufgefüllt, dass sich in 0,1 ml 1×10^6 Zellen befanden.

2.2.2 Operationsvorbereitung

2.2.2.1 Narkose

Die Implantation des Tumors, die Laserbehandlung, sowie die Tötung der Tiere erfolgten in Allgemeinnarkose. Hierfür wurde nach Feststellung des Körpergewichtes Xylazin (Rompun 2 %, Bayer AG, Leverkusen) in einer Dosierung von 0,5 mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal und Ketamin (Ketanest® 50, Parke-Davis, Berlin) in einer Dosierung von 1 mg pro kg Körpergewicht intramuskulär injiziert.

2.2.2.2 Rasur und Lagerung

Den narkotisierten Tiere wurde der Ober- und Unterbauch rasiert. Die Tiere wurden in Rückenlage, an den Vorder- und Hinterbeinen mit Haltefäden fixiert, auf dem Operationstisch gelagert. Es folgte das Desinfizieren der Haut mit Jodlösung (B.Braun, Melsungen).

2.2.3 Operative Eingriffe

Sämtliche operativen Eingriffe wurde unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

2.2.3.1 Tumorimplantation und Randomisierung der Versuchstiere

2.2.3.1.1 Tumorzellimplantation

Der Zugang erfolgte über eine obere Medianlaparatomie, welche vom Processus xiphoideus bis zum Nabel durchgeführt wurde. Nach schichtweisem Durchtrennen der Bauchdecke und Eröffnung des Peritoneums wurde der linke Leberlappen mobilisiert und auf eine sterile Gazekompressen vor die Bauchdecke verlagert. Die Implantation des Tumors erfolgte durch subcapsuläre Injektion der Tumorzellsuspension. Dabei wurden 0,1 ml der in Punkt 2.2.1 beschriebenen Zellsuspension, entsprechend 1×10^6 Zellen unter die Leberkapsel injiziert. Um ein retrogrades Zurückfließen der Zellen zu verhindern, wurde die Kanüle im Lebergewebe mäanderförmig vorgeschoben und die Einstichstelle der Leberkapsel mit Acrylkleber (B.Braun, Melsung) verschlossen, um einen Austritt von Tumorzellen in die Bauchhöhle zu verhindern.

Nach Abschluss der Tumorzellimplantation wurde der linke Leberlappen in die Abdominalhöhle zurückverlagert. Anschließend wurde das Peritoneum und die Aponeurose der Linea alba mit fortlaufender Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Vicryl®, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (3/0 Suturamid®, Ethicon) mit Einzelknopfnähten vernäht.

2.2.3.1.2 Auswahl der Versuchstiere

Nach 10 Tagen wurden die Versuchstiere erneut median laparotomiert, der linke Leberlappen mobilisiert und der Tumor mit einem Mikrometer in seinem axialen und radialen Durchmesser vermessen und dokumentiert. Behandelt wurden nur die Tumore mit einem Durchmesser von mindestens 10 ± 2 mm. Nicht behandelt wurden Tumore, welche die erforderte Größe nicht erreicht hatten. Ebenso nicht behandelt wurden die Tumore der Tiere, bei denen sich schon sichtbare extrahepatische Metastasen, z.B. Peritonealkarzinosen, gebildet hatten.

2.2.3.2 I.a. Applikationen

2.2.3.2.1 Katheterimplantation

Zur i.a. Applikation von DSM und NaCl in die A. hepatica war es notwendig, einen Katheter in diese zu implantieren. Nach der Darstellung des Lig. hepatoduodenale erfolgte unter dem Operationsmikroskop (ZEISS OPMI S-6) in 25-facher Vergrößerung die Darstellung und Präparation der A. hepatica communis mit dem Abgang der A. gastroduodenalis, welche wiederum bis zu ihrer Aufteilung in die Aa. gastroduodenales dexter et sinister präpariert wurde. Nach Fertigstellung der Präparation erfolgte einerseits die Anschlingung der A. hepatica communis vor ihrer Aufteilung mit Prolene 5/0 (Braun-Dexon GmbH), andererseits die Ligatur der Aa. gastroduodenales dexter et sinister distal ihrer Teilungsstelle mit 8/0 Dexon (B.Braun-Dexon GmbH). Anschließend wurde der unter 2.1.7 beschriebene Katheter implantiert und mit 8/0 Dexon (B.Braun, Melsungen) fixiert.

Die Katheterimplantation ist in der Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Katheterimplantation

2.2.3.2.2 Beendigung der Katheterimplantation

Nach Injektion der jeweiligen Substanzen in die Arterie, wurde der Katheter entfernt und das Gefäß mit der Naht, die zur Fixierung des Katheters diente, verschlossen.

2.2.3.2.3 Applikation der Substanzen

In den Versuchsgruppen II und IV sowie in der Vorversuchsgruppe (Punkt 2.2.4.2 und 2.2.4.3) wurden Stärkemikrosphären appliziert. Dazu wurde den Tieren 50 mg/kg Körpergewicht der Substanz i.a. in einem Volumen von 0,4 ml injiziert. In

der Versuchsgruppe III wurde 0,4 ml isotonische Kochsalzlösung (0,9%ig) i.a. injiziert.

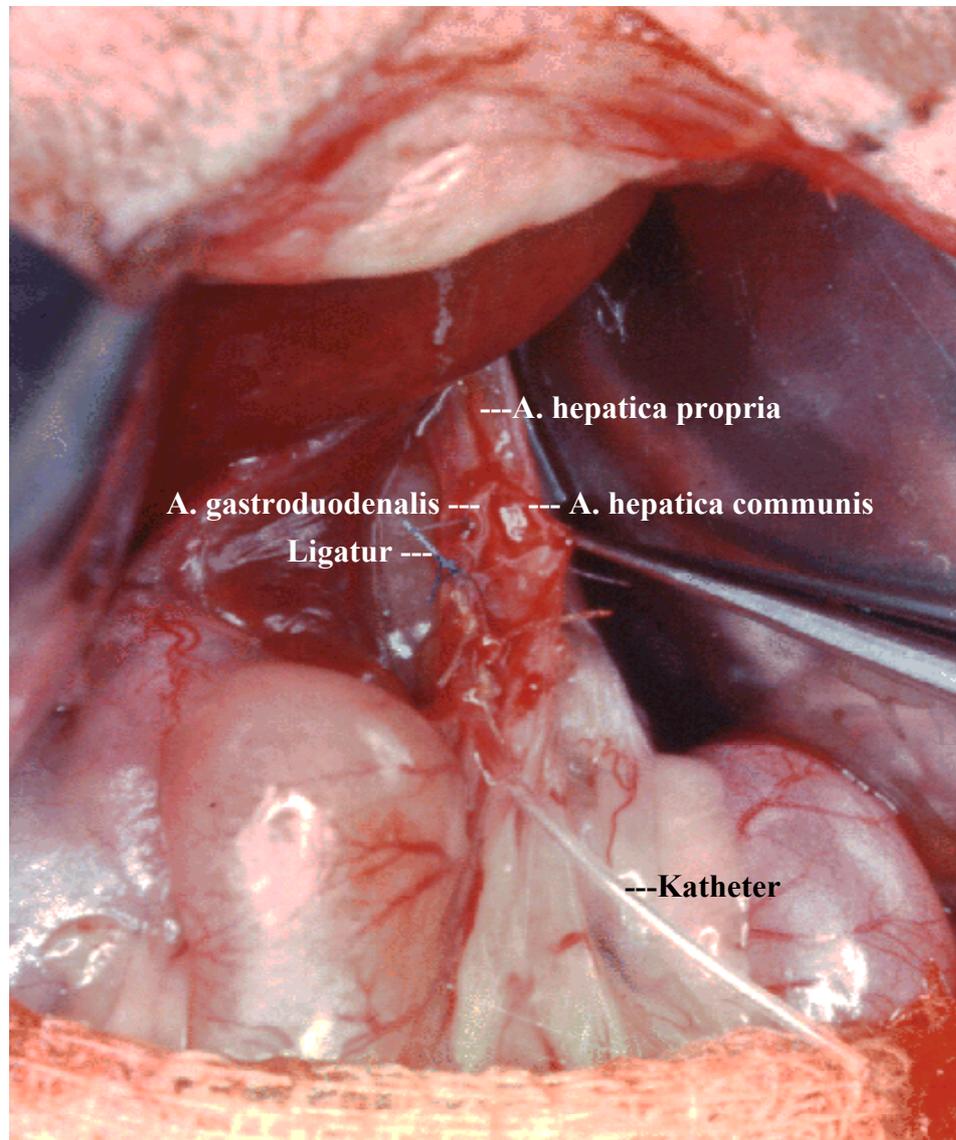


Abbildung 4: Die Katheterimplantation. Erkennbar ist die A. hepatica communis mit ihren beiden Abgängen der A. hepatica propria und der A. gastroduodenalis. Der Katheter ist implantiert und fixiert.

2.2.3.3 Flowmetrische Bestimmung der Leber- und Tumorperfusion

Zur flowmetrischen Bestimmung der Leber- und Tumorperfusion wurde eine erneute Medianlaparatomie durchgeführt und der i.a. Katheter wie unter Punkt 2.2.3.2.1 beschrieben implantiert.

Als Ausgangswert wurden sodann bei 10 tumortragenden Tieren bei normal erhaltener arterieller Blutversorgung die Perfusion im Tumor und im gesunden Lebergewebe gemessen und dokumentiert. Hierfür wurde die Perfusion von dem unter Punkt 2.1.8 beschriebenen Computerprogramm in ml/min/100g Gewebe berechnet.

Anschließend wurden die Stärkemikrosphären wie unter Punkt 2.2.3.2.3 beschrieben i.a. appliziert. Direkt nach der Applikation, sowie 15, 30, 45, 60 und 75 Minuten nach dieser Intervention wurde bei jedem Versuchstier die Perfusion in dem Lebergewebe und in dem Tumorgewebe erneut gemessen, dokumentiert und ausgewertet.

2.2.3.4 Pringle-Manöver

Nach einer Medianlaparatomie erfolgte zunächst die Identifizierung des Lig. hepatoduodenale. Nach der Darstellung der A. hepatica und der Vena portae wurden beide Gefäße mit einer weichen Gefäßklemme vorsichtig unter Schonung des Ductus choledochus ausgeklemmt. Nach einer Latenzzeit von 5 Minuten erfolgte die Lasertherapie. Nach Beendigung der Laserung wurden nach einer weiteren Latenzzeit von 5 Minuten die Klemmen entfernt, so dass wieder ein freier Blutfluß in die Leber gewährleistet war. Anschließend wurde die Wunde wie unter Punkt 2.2.3.1.1 beschrieben verschlossen.

2.2.3.5 Ausklemmung der A. hepatica propria

Nach einer Medianlaparatomie erfolgte zunächst die Darstellung des Lig. hepatoduodenale. Danach wurde die A. hepatica propria von den umliegenden anatomischen Strukturen freipräpariert und mit einer weichen Gefäßklemme abgeklemmt. Nach der Abklemmung des Gefäßes wurde nach einer Latenzzeit von 5 Minuten die Lasertherapie durchgeführt. Nach der Lasertherapie wurde nach weiteren 5 Minuten die Klemme entfernt, so dass der Blutfluss wiederhergestellt war. Anschließend wurde die Wunde wie unter Punkt 2.2.3.1.1 beschrieben verschlossen.

2.2.3.6 Ausklemmung der Vena portae

Nach einer Medianlaparatomie erfolgte zunächst die Darstellung des Lig. hepatoduodenale. Danach wurde die Vena portae von den umliegenden

anatomischen Strukturen freipräpariert und mit einer weichen Gefäßklemme abgeklemmt. Nach der Abklemmung des Gefäßes wurde nach einer Latenzzeit von 5 Minuten die Lasertherapie durchgeführt. Nach der Lasertherapie wurde nach weiteren 5 Minuten die Klemme entfernt, so dass der Blutfluss wiederhergestellt war. Anschließend wurde die Wunde wie unter Punkt 2.2.3.1.1 beschrieben verschlossen.

2.2.3.7 Laserinduzierte Thermoerapie

2.2.3.7.1 Platzierung des Applikators und Laserung

Nach einer Medianlaparatomie erfolgte zunächst die Punktion des Tumors in seinem Zentrum mit der unter Punkt 2.1.3 beschriebenen Punktionsnadel (4 Fr/Ch). Über den Punktionskanal wurde der Laserapplikator eingebracht. Das Thermoelement wurde parallel zum Applikatorsystem am makroskopisch erkennbaren Tumorrand eingebracht. Mit Hilfe des Laserpilotstrahles konnte gewährleistet werden, daß das Photonenfeld im Zentrum des Tumors lag, und diente während der gesamten Laserung als Lagekontrolle.

2.2.3.7.2 Laserapplikation und Applikatorrest

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

Die Laserapplikation erfolgte mit 2 Watt für 600 Sekunden, entsprechend einer Energieleistung von 1200 Joule. Während der Laserapplikation wurde alle 50 Sekunden die Temperatur gemessen. Vor jeder Laserapplikation wurde die distale Applikatorleistung mit Hilfe des unter Punkt 2.1.5 beschriebenen Leistungsmessgerätes (Hüttinger, München) ermittelt.

Nach Abschluss der Laserapplikation wurde der Diffuser-Tip Applikator aus dem linken Leberlappen entfernt und dieser in die Abdominalhöhle rückverlagert. Anschließend wurde die Wunde wie unter Punkt 2.2.3.1.1 beschrieben verschlossen.

2.2.3.8 „Scheinbehandlung“ der Kontrolliere

Bei dieser Tiergruppe erfolgte ebenfalls eine Medianlaparotomie. Das Abdomen wurde als „Scheinbehandlung“ für die Dauer der operativen Durchführung der

Laserung geöffnet belassen und anschließend wie unter Punkt 2.2.3.1.1 beschrieben verschlossen.

2.2.3.9 Haltung der Tiere nach den operativen Eingriffen

Die Tiere wurden nach allen operativen Eingriffen zu zweit in ausreichend großen Käfigen untergebracht, welche bis zum zweiten Tag nach der Operation mit Zellstoff ausgelegt waren. Danach wurde die Einstreu auf Sägespäne umgestellt. Ihre Ernährung erfolgte wiederum mit Altromin® Standard-Diät-Haltung für Ratten und uneingeschränktem Wasserangebot aus der automatischen Tränkanlage. Bis drei Tage postoperativ wurde dem Trinkwasser Metamizol (Novalgin®, Hoechst, Deutschland) (10 Tropfen/100 ml Wasser) als Analgetikum zugeführt.

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 18°C (\pm 2°C), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% (\pm 5%) und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

2.2.3.10 Tötung der Tiere und Entnahme der Leber

Zur Entnahme der Leber und Tötung der Tiere zu den unter Punkt 2.2.4.3 angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere wie unter Punkt 2.2.2.1 beschrieben narkotisiert. Die Tiere wurden danach mittels einer intravenösen Injektion mit Embutramid (T 61®, Hoechst, Unterschleißheim) in einer Dosierung von 0,3 ml/kg Körpergewicht getötet. Über eine erneute Medianlaparotomie wurde die Abdominalhöhle eröffnet. Zur Entnahme des Leberlappens wurde der ligamentäre Halteapparat, die Vena cava inferior und das Lig. hepatoduodenale durchtrennt. Die Leber wurde unmittelbar nach Entnahme entlang des Stichkanals des Applikators in radialer und axialer Achse aufgeschnitten. Die makroskopisch sichtbare Läsion wurde mit einem Mikrometer vermessen, die Maße dokumentiert und die Präparate fotografiert. Die eine Läsionshälfte wurde in einer 10%igen Formalinlösung (August Hedinger GmbH & Co., Stuttgart) konserviert, die andere wurde in Phosphatpuffer-Lösung (PBS, Seromed, Berlin) bei -176°C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Der Transport der tiefgefrorenen Proben in das Zuschnittlabor erfolgte in einer nicht unterbrochenen Kühlkette. Die Zeitspanne zwischen Tötung der Tiere und Fixierung der Proben betrug im Mittel 10 Minuten.

2.2.4 Versuchstiergruppen

2.2.4.1 Versuchstiergruppen zur Evaluierung der suboptimalen Therapie der Behandlungstumore

Zuerst wurde eine Vorversuchsgruppe zur Bestimmung der suboptimalen Therapie für 10 mm (± 2 mm) große Tumoren bei LITT als Monotherapie erstellt. Es wurden in fünf Gruppen jeweils fünf Tiere mit einer Laserleistung von 2 Watt für jeweils 400, 500, 600 700 und 800 Sekunden, entsprechend einer Laserenergie von 800, 1000, 1200 1400 und 1600 Joule behandelt. Die Laserleistung, bei der $>80\%$ des Tumors hyperthermiert, jedoch histologisch vitales Tumorgewebe nachzuweisen war, wurde dann für die Hauptversuche verwendet.

Das Behandlungsschema der Versuchstiergruppen zur Evaluierung der suboptimalen Therapie ist in der Tabelle 3 aufgeführt.

Versuchstiergruppe	Leistung [J]	N	Histologie
LITT _{Mono}	800	5	14 d
LITT _{Mono}	1000	5	14 d
LITT _{Mono}	1200	5	14 d
LITT _{Mono}	1400	5	14 d
LITT _{Mono}	1600	5	14 d

Tabelle 3: Darstellung der Gruppen für die Ermittlung der suboptimalen Thermo-therapie der Behandlungstumore (n=25).

2.2.4.2 Versuchstiergruppe zur Ermittlung der Perfusionsreduktion nach i.a. Applikation von Stärkemikrosphären

Um die Perfusionsreduktion nach i.a. Applikation von Stärkemikrosphären zu evaluieren, wurde in einer Gruppe von 10 tumortragenden Tieren die Perfusion des Tumor- und Lebergewebes mittels des unter Punkt 2.1.8 beschriebenen PC integrierten Laser-Dopplers vor der i.a. Applikation von DSM, sofort postinterventionell sowie 15, 30, 45, 60 und 75 Minuten nach der Applikation gemessen.

2.2.4.3 Versuchstiergruppen der Hauptversuche

Nach Ermittlung der suboptimalen Thermo-therapie als Monotherapie wurden zwei Kontrollgruppen (I und II) sowie fünf Versuchsgruppen (III-VII) erstellt, die in 3 Untergruppen (A-C) mit jeweils 5 Tieren aufgeteilt wurden. Die Tiere wurden im Zufallsprinzip den Therapiegruppen und den Tötungszeitpunkten zugeordnet. Das Behandlungsschema der jeweiligen Versuchstiergruppen ist in der Tabelle 4 aufgeführt.

	Versuchstiergruppe	Index	N	Histologie
Kontroll- gruppe	Scheinbehandlung (Gruppe I)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
	DSM (Gruppe II)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
Versuchs- gruppe	LITT (Gruppe III)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
	LITT+DSM (Gruppe IV)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
	LITT+Pringle (Gruppe V)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
	LITT+Arterie (Gruppe VI)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
	LITT+Vene (Gruppe VII)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d

Tabelle 4: Darstellung der Versuchstiergruppen der Hauptversuche (n=105).

2.2.5 Histologische Aufarbeitung

2.2.5.1 Verarbeitung der Formalinpräparate

2.2.5.1.1 Fixierung

Für die histologische Aufarbeitung wurde jeweils der die eine Tumorthälfte beinhaltende Leberlappen in einer 10%igen Formalinlösung (August Hedinger GmbH & Co, Stuttgart) für mindestens eine Woche fixiert.

2.2.5.1.2 Herstellung der Gewebeblöcke

Aus jedem fixierten Tumor-Leber-Gewebe wurde ein 15 mm x 15 mm x 4 mm (Länge x Breite x Höhe) messender Gewebekblock zur Paraffin-Einbettung gewonnen. Bei der Paraffin-Einbettung der Präparate wurde darauf geachtet, dass der gesamte Tumor und das umliegende Lebergewebe erfasst wurden, so dass das spätere Präparat einen zentralen und einen peripheren Teil der Nekrose enthielt. Die Gewebeblöcke wurden einzeln in ein mit der jeweiligen Identitätsnummer bedruckten Plastikgittertäschchen (Tissue Tek® Sakura, Zoeterwoude/Niederlande) platziert, wobei die Applikationsstelle dem Boden anlag.

2.2.5.1.3 Paraplastineinbettung

Die Entwässerung und Einbettung erfolgte mittels einer automatischen Einbettvorrichtung (Hypercentre XP, Firma Shandon, Frankfurt/Main). Dabei durchliefen die Präparate als erstes 3 Stunden Aqua destillata, danach erst 70 dann 80 %igen Alkohol für jeweils 1 Stunde und 95 und 100 %igen Alkohol für 2 Stunden. Sodann durchliefen die Präparate C-68 Intermedium (Technicon®, USA) für 2 Stunden.

Die auf diese Weise entwässerten Gewebeblöcke wurden anschließend in flüssiges, 60°C warmes Paraffin gegossen. Nach einer mindestens 24-stündigen Aushärtung des Paraffins wurde das Plastikgittertäschchen so entfernt, daß die Paraffingewebeblöcke nur noch an der applikatorfernen Schnittstelle mit einem Plastikteil verbunden blieben, welches zum Einspannen in das Mikrotom diente.

2.2.5.1.4 Herstellung der Schnittpräparate

Die Gewebeblöcke wurden mit der Plastikunterlage so in das Mikrotom gespannt, daß der applikatornahe Teil messerwärts ausgerichtet war. Nun wurden histologische Schnittpräparate von 2 µm Dicke angefertigt. Die Schnittpräparate wurden mit Hilfe zweier feiner Pinsel von dem Mikrotommesser abgenommen und zum Strecken in ein ca. 40°C warmes Wasserbad gelegt. Anschließend wurde das Präparat blasenfrei auf einen Objektträger gestrichen und zum Trocknen 24 Stunden in einen 37°C warmen Wärmeschrank gestellt.

2.2.5.1.5 Färbung der Schnittpräparate

2.2.5.1.5.1 Entparaffinierung, Hydrierung

Zur Entparaffinierung wurden die Schnittpräparate nacheinander für jeweils 5 Minuten in zwei verschiedene Xylol-Lösungen (Baker, Deventer/Holland) eingebracht. Die Schnittpräparate wurden sodann in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert. Die Präparate durchliefen dabei für jeweils 3 Minuten zuerst 100%igen dann 96%, 80% und 70%igen Alkohol und zum Abschluss für ebenfalls 3 Minuten Aqua destillata.

2.2.5.1.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die entparaffinierten und hydrierten Schnittpräparate wurden dann für 5 Minuten in Hämatoxylin (Merck, Darmstadt)gefärbt, danach in Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Die Präparate wurden anschließend in 0,1%igem Eosin (Merck, Darmstadt), welches mit 1-2 Tropfen Eisessig angesäuert wurde, für 4 Minuten gegengefärbt und anschließend für 2 Minuten in Aqua destillata gespült.

2.2.5.1.5.3 Dehydrierung, Entalkoholisierung

Alle gefärbten Präparate wurden sodann dehydriert. Dafür wurden sie für jeweils 3 Minuten einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%, 80%, 96% und 100%igen Alkohol zugeführt. Anschließend wurden die Präparate nacheinander für jeweils 5 Minuten in zwei verschiedenen Xylol-Lösungen (Baker, Deventer/Holland) entalkoholisiert.

2.2.5.1.5.4 Eindecken

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

2.2.5.2 Verarbeitung der Kryo-Präparate

2.2.5.2.1 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°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 einen Anteil nicht geschädigten Lebergewebes enthielt. Anschließend wurde die Probe mit Hilfe einer tiefgekühlten Pinzette mit der Schnittfläche nach oben auf einen mit thermodynamischem Gel (Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf) beschichteten Aluminiumblock gelegt.

Durch das Gefrieren des Gels erfolgte eine Fixierung der Gewebeproben auf dem Aluminiumblock. Der Aluminiumblock wurde mit dem Mikrotom verbunden und die Temperatur auf -23°C eingestellt. Es wurden Schnittpräparate von $5\mu\text{m}$ Dicke hergestellt und mit einem zimmerwarmen Objektträger zur Weiterverarbeitung aufgenommen.

2.2.5.2.2 Fixierung

Die fertigen Schnitte wurden in Acetonchloroform (Baker, Deventer/Holland) bei 4°C 5 Minuten im Kühlschrank fixiert und anschließend bei Raumtemperatur und Raumluft getrocknet. Danach wurden sie bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5.2.3 5-Brom-2-deoxy-uridin-Färbung (BrdU-Färbung)

Die Proliferationsrate der Tumore wurde nach in vivo Inkorporation des 5-Brom-2-deoxy-uridins mittels monoklonalem Anti-BrdU-Antikörper immunhistochemisch ermittelt. Hierfür wurde der 5-Brom-2-deoxy-uridin Labeling and Kit II von Boehringer (LaRoche, Mannheim) verwendet.

2.2.5.2.3.1 Durchführung der BrdU-Färbung

Die Schnittpräparate wurden nach dem Auftauen für 10 Minuten in Aceton (Baker, Deventer/Holland) bei Raumtemperatur nachfixiert. Die Markierung mittels Umkreisung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines PAP-Pen (DAKO, Hamburg). Anschließend wurden jeweils 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 weitere

Fixierung erfolgte bei -20°C in einer feuchten Inkubationskammer mittels Ethanol-Fixans aus 105 ml 70%igen Ethanol (Baker, Deventer/Holland) und 45 ml Glycin-Puffer (1,876 g Glycin Merck, Darmstadt) auf 500 ml Aqua destillata, pH 2). Nach 20 Minuten erfolgte die Rehydrierung mit Phosphatpuffer (PBS, Seromed, Berlin) und im Anschluss wurde der Primärantikörper aufgetragen. Dieser monoklonale BrdU-Antikörper wurde mit Inkubationspuffer (Tris-Puffer 66 mM/l, MgCl_2 0,66 mM/l, β -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 30 bis 50 μl des Zentrifugates aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 30°C in einer feuchten Kammer.

Nach 30 Minuten wurden die Schnitte mit PBS rehydriert und der Sekundärantikörper (Anti-Maus-Ig-Alkalische Phosphatase) in einer Phosphatpufferverdünnung von 1:10 aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 Minuten. Nach dem Waschen mit PBS (Seromed, Berlin) wurden die Schnittpräparate mit frisch hergestellter Farbsubstratlösung überschichtet, die sich aus den folgenden Kit-Reagenzien zusammensetzt: 6,5 μl Nitroblau-tetrazoliumsalz (NBT) wurde 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_2 auf 50 ml Aqua destillata, pH 7,5) vermischt.

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

2.2.5.2.3.2 Eindecken

Das Eindecken der Schnitte erfolgte nach deren Trocknung mit Kaiser's Glycingelatine (Merck, Darmstadt).

2.2.6 Auswertungskriterien

2.2.6.1 Beurteilung der intraoperativen Temperaturmessung

Die Temperatur wurde zu Beginn der Laserung und nach jeweils 50 Sekunden (100 Joule) gemessen, so dass für jede Lasertherapie insgesamt 13 Messdaten dokumentiert wurden.

Bei der Auswertung wurden folgende Kriterien beurteilt:

1. Die Ausgangstemperatur
2. Der Temperaturverlauf während der Lasertherapie
3. Das Temperaturmaximum am Ende der Lasertherapie

2.2.6.2 Beurteilung der makroskopischen Gewebeproben

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

Es erfolgte die Vermessung der gesamten intrahepatischen Läsion, unabhängig davon, ob es sich um die hypertherm induzierte Schädigungszone oder progredientes Tumorwachstum handelte.

Es erfolgte die makroskopische Vermessung der Läsion im Längs-, Quer- und Höhendurchmesser mit dem Mikrometer. Aus diesen Daten wurden die Volumina der Läsionen zum Behandlungs- und Tötungszeitpunkt berechnet.

Die Berechnung des Volumens (V) der Läsionen zum Behandlungs- und Tötungszeitpunkt erfolgte mit Hilfe der Formel für Rotationselipsoide, dabei entsprechen a, b und c den Radien der Achsen in der Länge (a), Breite (b) und Höhe (c):

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

Wurden zonale Gewebsunterschiede innerhalb der gefundenen Läsionen beobachtet, wurden diese beschrieben, vermessen und fotografisch dokumentiert.

2.2.6.3 Auswertung der histologischen Schnittpräparate

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

2.2.6.4 Definition der Tumor/Läsionsvolumina

Da postinterventionell in einigen Fällen zwischen hyperthermierten Tumorgewebe und hyperthermierten Lebergewebe makroskopisch keine Unterscheidung erfolgen konnte, wurde die gesamte intrahepatische Läsion, die nicht dem gesunden Lebergewebe entsprach, als Tumor-/Läsionsvolumen bezeichnet.

2.2.6.5 Beurteilung der Schnittpräparate nach der BrdU-Reaktion

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

2.2.6.6 Histologische Beurteilung der Läsionen nach der HE-Färbung und der BrdU-Reaktion

Die Läsionen aller Behandlungsgruppen wurden zur Frage einer 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.

2.2.7 Statistische Analyse

Aus den jeweils 5 Tieren der 15 Untergruppen wurde das arithmetische Mittel (\bar{x}), der Median (m), die Standardabweichung (s) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der errechneten prä- und postinterventionellen Tumor-/Läsionsvolumina berechnet.

Das Ergebnis der Randomisierung der Tiere vor der Behandlung sowie Unterschiede in der Berechnung der Tumor-/Läsionsvolumina zwischen den verschiedenen Therapiegruppen wurden mittels Vergleich mehrerer unabhängiger nicht normal verteilten Stichproben durch den Kruskal-Wallis-Test verglichen. Die Ergebnisse der durchschnittlichen Temperaturmaxima wurden ebenfalls durch diesen Test auf ihre Signifikanz überprüft.

Als signifikant wurde dabei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen.