

## **1. Einleitung und Problemstellung**

### **1.1. Stand der Forschung – Laparoskopie und Tumorwachstum**

Das Pneumoperitoneum wurde erstmalig von Kelling im Jahre 1901 etabliert und diente zur Inspektion der Bauchhöhle eines Hundes (1). Damit war der Grundstein und der Beginn für die Laparoskopie gelegt. Das Pneumoperitoneum selbst ist ursprünglich definiert als Ansammlung freier Luft in der Bauch- bzw. Peritonealhöhle.

Die in der damaligen Zeit eingesetzten Instrumente zum Aufbau des Pneumoperitoneums erlaubten aber noch keine umfangreichen Operationen. Erst die Weiterentwicklung der technischen Voraussetzungen für die Laparoskopie machten größere laparoskopische Eingriffe möglich. Dazu gehörten Geräte zur Insufflation von Gas in die Bauchhöhle und entsprechende Videoeinrichtungen, welche die operativen Eingriffe auf Monitore übertragen konnten. Seit dieser Zeit haben sich endoskopischen Operationsverfahren sprunghaft weiter entwickelt.

Heute wird die Laparoskopie zur Behandlung zahlreicher allgemein-, visceral- und thoraxchirurgischer Erkrankungen eingesetzt (2-8). Dabei beschränkt sich die Laparoskopie nicht nur auf die Therapie von gutartigen Erkrankungen, wie der Cholecystolithiasis oder der Refluxösophagitis. Die Entwicklung der Laparoskopie führte auch zu einem vermehrten Einsatz der minimal invasiven Technik bei der Resektionen von bösartigen Tumoren (9-14). Die laparoskopische Entfernung von Kolonkarzinomen ist in großen Zentren inzwischen zu einer Standardoperation geworden. Dabei konnten klinische Studien zeigen, dass die laparoskopische kolorektale Chirurgie ohne Zunahme von Morbidität und Letalität durchgeführt werden kann (15-19).

Allerdings wurde die Einführung der laparoskopischen Resektion bösartiger Tumore von der potentiellen Gefahr vermehrten Tumorwachstums überschattet. Berichte über die Entstehung von sogenannten Trokarmetastasen haben zu einer heftigen Diskussion über die Indikation der Laparoskopie in der Tumorchirurgie geführt (20,21,22).

In den 90'iger Jahren häuften sich Veröffentlichungen über Trokarmetastasen nach laparoskopischen Resektion von malignen Tumoren (23-27). Beunruhigt durch diese Berichte setzte die Phase der wissenschaftlichen Analyse ein. Zahlreiche in-vitro und in-vivo Experimente untersuchten den Einfluß der Laparoskopie bzw. des Pneumoperitoneums auf das Tumorzellwachstum.

Inzwischen zeigen Daten, dass unter laparoskopischen Bedingungen die Anzahl der Trokarmetastasen eher rückläufig ist und in der klinischen Praxis kaum eine Rolle spielen (28). Ergebnisse retro- und prospektiver Analysen konnten zeigen, dass die laparoskopische Resektion kolorektaler Karzinome hinsichtlich einer perioperativen Metastasierung vergleichbar mit der konventionellen Resektion ist (29,30,31).

Darüber hinaus wurde im Mai 2004 die erste prospektiv, randomisierte Langzeitstudie in „New England Journal of Medicine“ veröffentlicht, die zeigen konnte, dass nach laparoskopischen kolorektalen Operationen die Rate an Tumorrezidiven im Vergleich zu konventionell operierten Patienten nicht erhöht ist (32). Weitere Langzeitergebnisse prospektiver, randomisierter Studien werden in den nächsten Jahren aus Europa und Australien erwartet.

Unabhängig von den bisher vorliegenden Ergebnissen dieser randomisierten Studie und unabhängig von teilweise widersprüchlichen Resultaten experimenteller Studien bleiben eine Reihe wichtiger Fragen unbeantwortet. Diese Fragen beziehen sich grundsätzlich auf den Einfluß des Operationsverfahrens auf die Tumorzelle und den damit möglichen Veränderungen ihres Wachstumsverhaltens.

Gesichert ist, dass der Chirurg allein durch seine Operationstechnik eine entscheidende Rolle in der Tumormetastasierung spielt (33,34). Um ein möglich geringes Risiko einer Tumormetastasierung während der Operation zu gewährleisten, sollte nicht nur in der konventionellen Chirurgie, sondern auch in der laparoskopischen Chirurgie nach onkologischen Kriterien operiert werden. Dass diese onkologischen Kriterien in der laparoskopischen Chirurgie eingehalten werden können, ist bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen worden (15,16,35,36).

Um die Auswirkungen der laparoskopischen Technik auf Tumorzellen zu verstehen und mögliche Veränderungen des Tumorwachstums zu analysieren, sollte vor allem das für die Laparoskopie erforderliche Pneumoperitoneum und sein möglicher Einfluß auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen untersucht werden.

Da das Pneumoperitoneum durch das Insufflationsgas und durch einen erhöhten intraperitonealen Druck definiert ist, sind gerade diese beiden Faktoren die entscheidenden Größen, welche einen Einfluß auf die Tumorzellen haben könnten.

In den letzten Jahren sind eine ganze Reihe von in-vitro und in-vivo Untersuchungen durchgeführt worden, um den Einfluß des Pneumoperitoneums auf Tumorzellwachstum detailliert zu analysieren und die zugrunde liegenden Pathomechanismen zu verstehen.

Dabei konnten wichtige Daten gewonnen werden, die jedoch teilweise widersprüchlich sind und einer weiteren wissenschaftlichen Evaluatuion bedürfen.

### **1.1.1 Chirurgische Manipulation und Tumorwachstum**

Wie schon erwähnt, spielt die chirurgische Technik eine wesentliche Rolle in der Tumormetastasierung, sowohl in der konventionellen als auch in der laparoskopischen Chirurgie (33,34). Die Inzidenz von sogenannten Trokarmetastasen (0-25%) in der laparoskopischen Chirurgie kolorektaler Karzinome zeigt eine große Streubreite und könnte durch die unterschiedliche Erfahrung der Operationsteams begründet werden.

Allerdings weist die in der Literatur beschriebene Inzidenz von Trokarmetastasen von 1994 bis 2004 einen deutlichen Abfall auf, welcher durch einen Lerneffekt der laparoskopisch tätigen Chirurgen erklärt werden könnte (29,30,32,37).

Bemerkenswert ist allerdings die Beobachtung, dass Trokarmetastasen nicht nur nach der Resektion eines fortgeschrittenen Tumors auftraten, sondern auch bei Patienten mit einem Gallenblasenkarzinom in einem frühen Tumorstadium (38,39).

Somit scheint die Trokarmetastasierung nicht alleine durch die Technik des Chirurgen bedingt zu sein, sondern könnte auch durch andere Faktoren, wie die Etablierung eines Pneumoperitoneums verursacht sein.

### **1.1.2 Einfluß von Insufflationsgas und intraperitonealer Druck auf das Tumorwachstum**

Experimentelle Studien über den Einfluß von unterschiedlichen Insufflationsgasen auf das Tumorwachstum und die Entstehung von Trokarmetastasen zeigen kontroverse Ergebnisse. Jacobi berichtete über eine Stimulation des Wachstum von Kolonkarzinomzellen in-vitro und in-vivo bei der Verwendung von Kohlendioxid (40). Diese Ergebnisse konnten in anderen Studien, die ein erhöhtes Tumorwachstum nach Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen, bestätigt werden (41-45). Neuhaus hingegen fand keinen stimulierenden Effekt von Kohlendioxid auf das Tumorwachstum (46). In allen bislang vorliegenden Untersuchungen konnte aber einheitlich für Helium ein supprimierender Effekt auf das Wachstum von Tumorzellen in-vitro und in-vivo nachgewiesen werden (40,46).

Weiterhin konnte in einem Rattenmodell gezeigt werden, dass ein erhöhter intraabdomineller Druck mit der Zunahme des intraperitonealen und subkutanen Tumorwachstums in der Ratte korreliert (47). Allerdings führte ein erhöhter Druck während der Inkubation von Kolonkarzinomzellen in-vitro zu einer Supprimierung des Tumorzellwachstums, welches durch eine direkte Schädigung der Tumorzellen erklärt

werden könnte (40), während die Stimulation im Tiermodell am ehesten durch eine korrespondierende Immunsupprimierung hervorgerufen scheint.

### **1.1.3 Lokale Wundbedingungen und Tumorwachstum**

Von experimentellen Versuchen in der konventionellen Chirurgie ist bekannt, dass die lokalen Heilungsprozesse an einer Wundfläche die Entwicklung von Metastasen fördern (48).

Bei diesem Phänomen werden die Freisetzung von wachstumsfördernden Faktoren und von Adhäsionsmolekülen als auslösende Ursachen diskutiert. Die lokalen Wundverhältnisse an den Trokarinzisionen sind bisher noch nicht hinreichend untersucht worden, obwohl eine lokale Ischämie bzw. Nekrose mit einer Erhöhung von wachstumsfördernden Faktoren das Tumorwachstum stimulieren könnten. So berichtete Tseng, dass eine lokale Ischämie an der Trokarinzision die Bildung von Tumormetastasen im Rattenmodell signifikant erhöht (49).

Jacobi konnte zudem im Rattenmodell zeigen, dass sich an Inzisionen, die mit dem Elektrokauter durchgeführt wurden, signifikant mehr Metastasen als an Inzisionen, die mittels eines Skalpells erzeugt wurden, bildeten (50). Auch hier könnte eine verstärkte Nekrosenbildung bei dem Elektrokauter für das verstärkte Tumorwachstum verantwortlich sein.

### **1.1.4 Laparoskopie und Peritonealzellen**

Die Verletzung des Peritoneums geht mit einer Freisetzung von intrazellulären Substanzen und einer Unterbrechung der Basalmembran einher und führt somit zu einer erhöhten Adhärenz von Zellen (48,51).

Goldstein konnte in einem Mausmodell zeigen, dass die Verletzung der Peritonealoberfläche auch zu einer erhöhten Adhärenz von Tumorzellen mit anschließender Metastasenbildung führte (51). Die Wiederherstellung der intakten Peritonealoberfläche führte im selben Versuch nach erfolgter Tumorzellapplikation zu einer Abnahme der peritonealen Tumoren. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Farrell und Mitarbeiter (52). Durch den Verschluß der Trokarinzisionen durch zweischichtige Naht nach einer Laparoskopie und Tumorzellapplikation in die Bauchhöhle konnte die Inzidenz von Trokarmetastasen in einem Kolonkarzinom-Modell der Ratte signifikant reduziert werden.

Die Einflüsse unterschiedlicher chirurgischer Techniken auf die Struktur und die Abwehrfunktion des Peritoneums sind bislang allerdings unklar. Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass bei konventionellen und gaslosen laparoskopischen Operationen die Peritonealstruktur nur geringfügig beeinflusst wird, während es bei laparoskopischen Eingriffen mit Insufflation von Kohlendioxid zu einer Verformung der Mesothelzellen und einer beginnenden Unterbrechung der interzellulären Kontakte kommt (53). Hierbei handelt es sich allerdings um Einzelergebnisse eines gesunden Patientengutes ohne standardisierte Probenentnahme und Probenaufarbeitung. Die Schlußfolgerung der Autoren, dass Kohlendioxid eine direkte Schädigung der Mesothelzellen verursacht, die zu einem Verlust von interzellulären Kontakten führt kann so nicht als bewiesen gelten und bedarf weiterer Untersuchungen (54).

Die geschilderten strukturellen und funktionellen Veränderungen des Peritoneums könnten aber möglicherweise eine Tumorzellimplantation während und nach einer Laparoskopie begünstigen und sollten daher in der Diskussion über die laparoskopische Chirurgie bei Malignomen berücksichtigt werden.

### **1.1.5 Laparoskopie und Peritonealmakrophagen**

Veränderungen der Funktion von Peritonealmakrophagen und der damit verbundenen lokalen Immunantwort durch Kohlendioxid werden in der Pathogenese von perioperativen Metastasen ebenfalls diskutiert. Puttnick untersuchte die Lyse von Karzinomzellen durch Makrophagen nach Inkubation mit 100% Helium oder 100% Kohlendioxid (55). Kohlendioxid führte zu einem signifikanten Abfall der Zellyse, während Helium keinen Einfluß zeigte. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde hierbei weder durch das Helium, noch durch das Kohlendioxid beeinträchtigt.

Ein direkter Vergleich zwischen der Laparoskopie und der konventionellen Chirurgie hinsichtlich der lokalen immunologischen Abwehr gegen Tumorzellen wurde von Sietses and Cuesta durchgeführt (56). Sie dokumentierten nach Laparotomie im Vergleich zur Laparoskopie einen signifikanten Abfall der zytotoxischen Reaktion von Monocyten gegen SW 984 Kolonkarzinomzellen. Dies könnte bedeuten, dass die lokale immunologische Abwehr gegen Tumorzellen bei einer Laparoskopie sogar besser erhalten bleibt, als bei der konventionellen Resektion eines malignen Tumors.

### **1.1.6 Laparoskopie und Adhäsionsmoleküle**

Zur Erläuterung von Adhäsionsmolekülen und deren Wirkungsmechanismen ist zu berücksichtigen, dass die evolutionäre Entwicklung zellulärer Adhäsionsmechanismen eine grundlegende Voraussetzung für die Entstehung mehrzelliger Organismen ist. Das Zusammenspiel verschiedener Adhäsionsmoleküle spielt bei einer Vielzahl von biologischen Phänomenen eine entscheidende Rolle. So sind Embryogenese, das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Zellbewegung von Adhäsionsmolekülen bestimmt. Es ist somit auch nicht verwunderlich, dass Adhäsionsmoleküle bei malignen Tumorzellen eine wichtige und entscheidende Rolle spielen.

Obwohl die Pathogenese der Tumormetastasierung Gegenstand intensiver Bemühungen in der Grundlagenforschung ist, sind die Einflüsse der Adhäsionsmoleküle bei der Metastasierung von Tumoren nur partiell verstanden. Voraussetzung für die Entwicklung von Metastasen sind Tumorwachstum, Neovaskularisation, Invasion und Penetration in Lymph- und Blutgefäße. Schließlich müssen zirkulierende Tumorzellen an Gefäßwänden adhären, um in das umgebende Gewebe eindringen zu können.

Während dieser Schritte sind zahlreiche Wechselwirkungen der Tumorzellen mit der umgebenden extrazellulären Matrix notwendig. Dabei spielen sogenannte dynamische Zelladhäsionen in das umgebende Gewebe und bei der Lösung von Tumorzellen aus dem Primärverband eine wichtige Rolle. Adhäsionsmoleküle sind für diese dynamischen Zelladhäsionen verantwortlich und somit entscheidende Faktoren im Metastasierungsverhalten von Tumorzellen.

Für das Verständnis dieser Zelladhäsionen bietet die Molekularbiologie eine wichtige Voraussetzung.

Inzwischen sind zahlreiche Adhäsionsmoleküle bekannt, deren Funktion und Aufgabe im Rahmen von Zellwachstum erst in jüngster Zeit erkannt worden ist. Innerhalb der Gruppe der Adhäsionsmoleküle sind das E-Cadherin, das CD44v6, das CD54 (ICAM-1) und das CD29 ( $\beta$ 1-Integrin) besonders gut erforschte Adhäsionsmoleküle, die im Rahmen der Tumorbiologie entscheidende Funktionen einnehmen.

### **1.1.6.1 E-Cadherin**

Cadherine sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zell-Zell Adhäsionsmoleküle, die über spezifische Bindungen die Adhäsion epithelialer Zellen vermitteln.

E-Cadherin ist ein 120 kDa transmembranäres Glycoprotein und wird auf der Zelloberfläche exprimiert (57,58). Es wird auch als Uvomorulin, L-CAM, Cell-CAM 120/80 oder Arc-1 bezeichnet und sein Genlocus findet sich auf Chromosom 16q22.1 (59,60). Zu der Familie der Cadherine zählen das N-Cadherin, das in Nerven- und Muskelzellen exprimiert wird und das P-Cadherin, welches ursprünglich in der Plazenta der Maus identifiziert wurde, aber auch in menschlichen Epithelgeweben gefunden wurde (58).

E-Cadherin spielt im Rahmen der Metastasierungskaskade von malignen Tumoren eine wichtige Rolle. Seine Funktion wird durch zytoplasmatische Proteine, die sogenannten Catenine, reguliert. Das Fehlen bzw. eine Verringerung der E-Cadherin-Expression wurde häufig in Karzinomzellen und in Tumoren mit aggressiven histopathologischen Charakteristika beobachtet.

So zeigten Prostata Tumoren mit reduziertem oder fehlendem E-Cadherin-Nachweis einen signifikant höheren Anteil von G3-Karzinomen als E-Cadherin positive Tumoren. Becker et al. sieht eine mögliche Ursache für das diffuse Wachstum von vielen Magenkarzinomen in E-Cadherin Genmutationen (61).

Der Verlust epithelialer Differenzierung in Karzinomen, der mit einer höheren Mobilität und Invasivität von Tumorzellen verbunden ist, kann häufig Folge reduzierter interzellulärer Adhäsion sein (62,63). So konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin vermittelte Zell-Zelladhäsionen die Invasivität von menschlichen Karzinomzellen verhindert (64,65).

### **1.1.6.2 CD44v6**

CD44 ist ein Transmembran-Glycoprotein, welches an der Oberfläche vieler Zelltypen exprimiert wird und ebenfalls an Zell-Zell und Zellmatrix-Interaktionen teilnimmt (66). Somit ist es für die Embryogenese, Differenzierung, Tumorinvasion und Metastasierung wichtig (66). Neben der kurzen Standardform (CD44s) entstehen durch alternatives Spleißen von 10 Exons zelltypische Varianten (CD44v). Diese unterscheiden sich von der Standardform durch Einschub von etwa 40 bis 380 Aminosäuren.



Ihre Expression ist in menschlichen Normalgeweben auf epitheliale Gewebe beschränkt, im Gegensatz zur ubiquitären Expression von CD44s (66). Die Genomanalyse zeigt die Existenz von insgesamt 20 Exons mit einer Länge von annähernd 60 Kilobasenpaaren. Der in normalen Geweben streng regulierte Spleißmechanismus scheint in vielen menschlichen Tumoren gestört zu sein (67). Diese Dysregulation könnte in kausalem Zusammenhang mit der Metastasierung stehen (67). Matsamura et al. fanden im Vergleich zu benignen Gewebe eine deutliche Überexpression von CD44 Spleißvarianten in Kolon- und Mammakarzinomgewebe (68). Der Nachweis der Expression von CD44-Isoform könnte ein neuer diagnostischer Parameter sein, um das Metastasierungsrisiko und die Prognose von Tumoren besser einschätzen zu können (69). Für CD44-Varianten, die das Exon v6 enthalten, konnte im Rattenmodell nachgewiesen werden, dass diese Varianten kausal an Metastasierungsgechehen beteiligt sind (70).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei kolorektalen Karzinomen die CD44v6-Expression im wesentlichen auf die fortgeschrittenen Stadien beschränkt ist und häufiger in metasasierten als in nicht metastasierten Karzinomen nachweisbar ist (71). Zusätzlich zeigten Kainz et al. in einer Untersuchung an Zervixkarzinomen, dass Tumore, die das Exon v6 exprimierten, signifikant mehr pelvine Lymphknotenmetastasen aufwiesen und mit einer verminderten Überlebenszeit assoziiert waren (72). Diese Beobachtungen erklären den besonderen Stellenwert der Spleißvariante CD44v6.

### **1.1.6.3 CD54 (ICAM-1)**

Das CD54-Molekül ist mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) gleichzusetzen (73). Das ICAM-1 Adhäsionsmolekül ist ein Glykoprotein mit 76/114 kDa Molekulargewicht. Es besteht aus einer einzigen Kette, deren Proteinkern ein Molekulargewicht von 55 kDa hat (74). Es konnte nachgewiesen werden, dass ICAM-1 ein Ligand für LFA-1 ist (75). LFA-1 (CD11a) wird auf Leukozyten und Endothelzellen exprimiert und vermittelt durch den Liganden ICAM1 die Adhäsion von IFA-1-positiven Zellen und Endothelzellen (76).

Als weiteres spielt es eine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündung und der Immunantwort. ICAM-1 scheint nicht der einzige Ligand für LFA-1 zu sein, da gegen ICAM-1 gerichtete Antikörper in kultivierten Endothelzellen die Passage der

Leukozyten nicht blockieren (73). ICAM-1 ist in nicht entzündlich veränderten Geweben kaum exprimiert, wird aber im Rahmen der Entzündung verstärkt hoch reguliert (75,77).

#### **1.1.6.4 CD29 ( $\beta$ 1-Integrine)**

Die Integrine sind eine Gruppe von Zelloberflächen-Adhäsionsrezeptoren, die neben den Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie, den Selektinen und den Kadherinen ebenfalls eine Funktion in der Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion haben (78-81). Biochemisch ist das Integrinmolekül ein nicht kovalent gebundener  $\alpha\beta$  Heterodimer. Die  $\alpha$  und die  $\beta$  Ketten der Integrine sind zwei Glykoproteinketten, die über die Zellmembran den extrazellulären Raum mit dem intrazellulären Raum der Zellen verbinden. Intrazellulär bindet die gemeinsame  $\beta$ -Kette über verschiedenen Proteine an das Zytoskelett der Zelle (82,83). Integrine spielen eine wesentliche Rolle in der Embryogenese, in der Hämostase, in immunologischen Prozessen, im Rahmen von Entzündung und der Wundheilung sowie der Tumorbilogie (84-88). Es sind mindestens 8  $\beta$ -Ketten und über 14  $\alpha$ -Ketten bekannt, die über 40 Heterodymere bilden (82). Die Integrine werden auf der Basis der verschiedenen  $\beta$ -Ketten in verschiedene Gruppen unterteilt. Die größte Integrin-Familie stellen die  $\beta$ 1-Integrine dar. Sie werden auch unter dem Begriff der VLA-Familie zusammengefasst. VLA steht für „very late antigens“, da einzelne Mitglieder der  $\beta$ 1-Integrin-Familie in späten Aktivierungsphasen auf T-Lymphozyten nachgewiesen wurden (89).

Welchen Einfluß nun die Laparoskopie bzw. das Pneumoperitoneum und somit Gas und Druck auf Adhäsionsmoleküle hat, ist bisher kaum bekannt.

Die Analyse dieser Adhäsionsmoleküle könnte jedoch ein wichtiger und entscheidender Schlüssel im Verständnis von Tumorwachstum während und nach der Laparoskopie sein. Das Insufflationgas und der intraperitoneale Druck könnten zu einer Über- oder auch Unterexpression von Oberflächenmolekülen auf Tumorzellen führen und somit das metastatische Potenzial von Karzinomzellen grundlegend beeinflussen.