

3 Material und Methoden

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden im Tierversuchslabor der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums der Freien Universität Berlin durchgeführt. Dem Versuchsvorhaben lag die Genehmigung der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales zugrunde.

3.1 Tiermodell

3.1.1 Wahl des Tiermodells und Herkunft der Tiere

Es wurde ein anerkanntes Tiermodell für Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms des Menschen verwendet. Als Versuchstiere dienten männliche WAG/RIJ-Ratten. Es handelt sich um einen speziellen Inzuchtstamm. Dieser Rattenstamm wurde 1924 von BACHARACH aus einem Wistar-Stamm in den Glaxo-Laboratorien in Großbritannien für Tierversuche entwickelt (CHARLES RIVER LABORATORIES, 1997). WAG steht für Wistar Albino Glaxo. RIJ kennzeichnet den Ort Rijswijk in den Niederlanden, in dessen Tierlaboratorien der Stamm weiterentwickelt wurde. Die Versuchstiere des Zuchtbetriebs CHARLES RIVER in Extertal wurden über die Zentralen Tierlaboratorien der Freien Universität Berlin bezogen. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere 2 - 3 Monate alt und hatten eine Masse von 200 - 300 g.

3.1.2 Haltung der Tiere

Die Versuchstiere wurden gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes gehalten. Dabei waren sie standardisierten Umweltbedingungen mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 06.00 - 18.00 Uhr bei einer Stalltemperatur von 18 ± 2 °C, einer relativen Luftfeuchte von 50 ± 5 % und einem Luftumsatz von 6mal/h mit gefilterter Frischluft ausgesetzt. Sie wurden in Standardlaborkäfigen auf entstaubter Holzgranulateinstreu gehalten und erhielten Standard-Diät für Ratten und Mäuse (Altromin GmbH und Co. KG, Lippe-Lage) und Wasser über eine Tränkflasche ad libitum.

3.2 CC-531-Tumormodell

3.2.1 Wahl und Charakterisierung des Modells

Der verwendete CC-531-Tumor ist ein anerkanntes Tumormodell für die Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms des Menschen (BUSCH et al., 1993; van HILLEGERSBERG et al., 1993; THOMAS et al., 1993). Es handelt sich um ein chemisch mit 1,2 Dimethylhydralazin erzeugtes, mäßig differenziertes, schwach immunogenes Adenokarzinom (THOMAS et al., 1993).

3.2.2 Herkunft und Haltung der Tumorzellen

Die verwendete Tumorzellsuspension wurde von der Arbeitsgruppe "Drug Targeting" des MAX DELBRÜCK Centrums für Molekulare Medizin in Berlin-Buch bedarfsgerecht einen Tag vor der Implantation bezogen. Die Zelllinie wurde in RPMI-1640-Medium ergänzt mit hitzeinaktiviertem 10 %igem fetalem Kälberserum, 2 mmol Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin, 50 U/ml Penicillin bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % gehalten.

3.2.3 Aufbereitung der Tumorsuspension

Um transportbedingte Vitalitätsschäden zu minimieren, wurden die Zellen 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Aufbereitung der Tumorsuspension erfolgte an einer Cleanbench GELAIRE® BSB4A (Flow Laboratories, USA). Zunächst wurde das Medium aus der Kulturflasche mittels einer PASTEUR-Pipette abgesaugt. Zum Abtrennen der abgestorbenen Zellen wurden dann 5 ml Trypsin-EDTA dazugegeben und nach vorsichtigem Schwenken abpipettiert, ohne den Zellrasen auf dem Boden der Kulturflaschen zu beschädigen. Nach Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA und vorsichtigem Schwenken wurden die verschlossenen Flaschen zum Trypsinieren 30 min im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen durch kräftiges Schlagen der Kulturflaschen gegen die Handfläche vollständig vom Boden gelöst, mit 10 ml RPMI-1640-Medium versetzt, in ein 50 ml FALCON-Röhrchen gegeben und durch vorsichtiges Schütteln klumpenfrei suspendiert.

Zur Prüfung der Vitalität wurden 50 µl der Suspension mit 50 µl Trypanblau (Biochrom GmbH, Berlin) in einer EPPENDORF-Pipette vermischt. Mit 50 µl dieser Mischung erfolgte die Vitalzählung in einer NEUGEBAUER-Zählkammer. Die Suspension wurde nun 10 min bei 2500 U/min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Nach Zugabe von 20 - 30 ml PBS wurde erneut zentrifugiert (10 min bei 2500 U/min) und der Überstand verworfen. Jetzt wurde die Tumorsuspension mit RPMI-1640-Medium auf eine Dichte von 750000 lebende Zellen auf 50 µl eingestellt. Durch regelmäßiges Schwenken wurde die Sedimentation der Zellen verhindert und so eine gleichmäßige Verteilung bis zur nachfolgenden Implantation garantiert.

3.2.4 Tumorimplantation

Die Implantation der Tumore erfolgte in Allgemeinnarkose, die mit 80 mg/kg Ketamin (Ketanest® 50 mg/ml Ketamin, Parke Davis GmbH, Freiburg) und 12 mg/kg Xylazin (Rompun 2 %, Bayer AG, Leverkusen) als intramuskuläre Bolusinjektion aus der Mischspritze eingeleitet wurde. Für die Erhaltung der Narkose wurde gegebenenfalls die Hälfte der Initialdosis nach ca. 45 min intramuskulär verabreicht. Nach Rasur des Abdomens und Hautdesinfektion mit PVP-Jod (Braunoderm®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) wurde durch eine 1,5 cm lange Inzision der Linea alba kaudal des Sternums die Bauchhöhle eröffnet.

Der durch seitlichen Druck auf die Bauchdecken aus der Wunde luxierte linke Leberlappen lag für die Dauer der Tumorzellinokulation auf einem sterilen Gazetupfer auf der Bauchwand. Mittels einer 1ml Einmalspritze und einer 24 G Punktionskanüle wurden durch subkapsuläre Punktion 5 - 8 x 10⁵ Tumorzellen injiziert. Beim Entfernen der Kanüle verhinderte ein sanfter Druck mit einem Wattetupfer das Entweichen von Zellen aus dem Stichkanal. Die Einstichstelle wurde mit einem Tropfen Enbucrilat (Histoacryl® Gewebekleber, B. Braun-Melsungen AG, Melsungen) verschlossen. Anschließend wurde der Leberlappen repunziert. Die Angehrate der Tumoren lag bei 98 %. Innerhalb von 12 bis 16 Tagen entwickelten sich solitäre Tumoren von ca. 1 cm Durchmesser, der definierten Ausgangsgröße für die Langzeittherapie.

3.3 SUV-PEG-Liposomen

3.3.1 Wahl des Liposomentyps

In Vorversuchen wurden drei verschiedene Liposomentypen (MLV, SUV und sterisch mit Polyethylenglykol stabilisierte SUV-PEG), die superparamagnetische Eisenoxide (SPIOs) enthielten, hinsichtlich ihres Anreicherungsverhaltens im Lebertumorgewebe mit Hilfe der MRT getestet. Die Dauer der Signalreduktion in der T2-gewichteten Untersuchung von Leber und Tumor wurde als Marker für das Anreicherungsverhalten der verschiedenen Liposomentypen im Gewebe bestimmt. Für die SUV-PEG wurde eine gleichbleibende, starke Signalreduktion, über 48 h beobachtet. Histologisch konnte lediglich in dieser Gruppe Eisen in vitalen Tumorzellen festgestellt werden. Bei den anderen Liposomen reicherte sich Eisen nur vereinzelt in einigen KUPFFER-Zellen, im nekrotischen Tumorgewebe und im Grenzbereich zwischen Tumor- und Lebergewebe an. Damit schienen die SUV-PEG geeignet, verkapselte Stoffe in die Tumorzellen zu transportieren und eine lange Verfügbarkeit des Therapeutikums zu gewährleisten, was in pharmakokinetischen Vorversuchen bestätigt werden konnte.

3.3.2 Herkunft und Herstellung der 5-FU-SUV-PEG-Liposomen

Die 5-FU-SUV-PEG-Liposomen (5-FU-SUV-PEG) wurden von der AG "Drug Targeting", des MAX DELBRÜCK Centrums für Molekulare Medizin in Berlin-Buch zur Verfügung gestellt. Bei der Herstellung wurden zuerst Hydriertes Ei-Phosphatidylcholin (HEPC, 50 mg/ml; Nattermann Phospholipid GmbH, Köln, Deutschland), Cholesterol (CH, 24,8 g/ml; Merck, Darmstadt, Deutschland) und Polyethylenglykol (MPEG-DSPE, 3000, 5,4 mg/ml; Sygena LTD, Liestal, Schweiz) im molaren Verhältnis 1:1:0,1 in Chloroform gelöst. Nach Entfernen der organischen Phase am Rotationsverdampfer wurde der entstandene, gut getrocknete Lipidfilm mit einer 5-FU-Lösung (Riboluor® 1000; 50 mg/ml Infusionslösung, Ribosepharm GmbH, München, Deutschland) resuspendiert. Anschließend wurde die gebildete Liposomendispersion 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die dabei entstandenen Multischichtvesikel (MLV-PEG) wurden durch eine Ultraschallbehandlung (Rüsselbeschaller,

6 x 4 min mit 50 % Intensität, Branson B225 sonifer; Branson, Carouge-Geheve, Schweiz) in Einschichtvesikel (SUV-PEG) umgewandelt und danach zur Entfernung des Titanabriebs von der Liposomendispersion 20 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Abschließend wurde die Vesikelgröße mit einem Photonenkorrelationspektrometer (Coulter Counter N4 MD Model and the AccuComp® System, Coulter Electronics Inc., Hialeah, USA) bestimmt. Die fertigen kleinen einschichtigen sterisch mit Polyethylenglykol stabilisierten Liposomen (5-FU-SUV-PEG) hatten eine Größe von 50 bis 150 nm. Die Verkapselungsrate des 5-FU betrug 10 %. Die Liposomen wurden bis zur Applikation bei -10 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.4 Therapiemonitoring im Langzeitversuch

In den Langzeitversuchen wurde die einmalige systemische Chemotherapie mit der einmaligen lokoregionären Applikation von 5-FU und liposomal verkapseltem 5-FU mit und ohne Embolisat verglichen. Als Responsekriterien wurden das Auftreten von Nekrosen, eine Tumorreduktion und vor allem eine Verlängerung der Überlebenszeit nach erfolgreicher Therapie definiert.

Bei Erreichen der Tumorausgangsgröße von etwa 1 cm Durchmesser wurden die Tiere den einzelnen Therapie- und Kontrollgruppen zugeordnet und einmalig behandelt. Zur Kontrolle des Behandlungserfolges wurde vor Beginn der Therapie und dann alle 7 Tage eine kontrastmittelgestützte dynamische MRT-Untersuchung der Leber zur Bestimmung der Veränderungen der Tumorgröße und der Nekroserate durchgeführt. Gleichzeitig wurden die Tiere gewogen und Blut zur Untersuchung abgenommen. Anhand der ermittelten Serumparameter der ersten Woche im Vergleich zum Ausgangswert wurde die therapiebedingte systemische Belastung der einzelnen Applikationsarten untereinander verglichen. Um den Tieren unnötige Qualen zu ersparen, wurden folgende Abbruchkriterien zur Ermittlung der Überlebenszeit festgelegt:

1. Störung des Allgemeinbefindens,
2. Gewichtsreduktion von mehr als 20 %,
3. Überschreiten des Tumorumfanges von 3500 µl bei einer Tumorausdehnung auf 9 Schichten bei der MRT-Untersuchung.

Bei Erreichen der Ausschlußkriterien wurden die Tiere in finaler Narkose euthanasiert und die tumortragende Leber wurde für die histologische Untersuchung entnommen.

3.4.1 Auswahl und Randomisierung der Versuchstiere

Da sich trotz standardisierter Implantationstechnik gewisse Tumorwachstumsschwankungen nicht vermeiden lassen, wurden die Tiere zufällig per Briefumschlagsystem den verschiedenen

Material und Methoden

Behandlungsgruppen zugeordnet. Es wurden immer nur so viele Briefumschläge vorbereitet, daß die Gruppenstärke um jeweils zwei in allen Gruppen anstieg. Dadurch wurden die Behandlungsgruppen gleichmäßig aufgefüllt und qualitative Unterschiede der Tumorsuspension auf alle Behandlungsgruppen gleich verteilt. Für die Versuche wurden nur Tiere verwendet, die folgende Voraussetzungen erfüllten:

1. Gut abgrenzbarer Tumor von ca 1 cm Durchmesser,
2. keine Tumordinfiltration extrahepatischer Strukturen,
3. frei durchgängige Arteria hepatica.

Wenn die Voraussetzungen nicht erfüllt waren, wurde der betreffende Umschlag wieder zurückgelegt und ein neues Tier ausgewählt.

3.4.2 Versuchsgruppen

Lokoregionäre Therapiegruppen

Gruppe 1 (5 Tiere)

Intraarterielle Gabe von 40 mg/kg 5-FU (Riboluo[®] 1000; 50 mg/ml Infusionslösung, Ribosepharm GmbH, München).

Gruppe 2 (5 Tiere)

Intraarterielle Chemoembolisation mit einem Gemisch aus 40 mg/kg 5-FU und 24 mg/kg Amilomer (Spherex[®], Amilomer 25 - 45, 60 mg/ml Injektionssuspension, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen).

Gruppe 3 (5 Tiere)

Es wurden 40 mg/kg 5-FU verkapselt in SUV-PEG-Liposomen (5-FU-SUV-PEG) intraarteriell injiziert.

Gruppe 4 (5 Tiere)

Für die Applikation wurden 40 mg/kg 5-FU-SUV-PEG-Liposomen mit 24 mg/kg Spherex[®] in einer 1 ml Insulinspritze gemischt und in 50 µl Schritten langsam über den Katheter appliziert.

Lokoregionäre Kontrollgruppen

Gruppe 5 (5 Tiere)

Zur Überprüfung möglicher Effekte des unbeladenen Systems wurde die den beladenen Liposomen entsprechende Menge (0,2 ml) SUV-PEG-Liposomen ohne Zytostatikum mit 24 mg/kg Spherex[®] vermischt und lokoregionär verabreicht.

Gruppe 6 (5 Tiere)

0,2 ml unbeladene SUV-PEG-Liposomen intraarteriell.

Gruppe 7 (5 Tiere)

Testung des reinen Embolisationseffektes mit 24 mg/kg Spherex[®] intraarteriell.

Intravenöse Therapiegruppen

Gruppe 8 (5 Tiere)

Den Tieren wurden 40 mg/kg 5-FU intravenös verabreicht.

Gruppe 9 (5 Tiere)

Es wurden 40 mg/kg 5-FU-SUV-PEG-Liposomen intravenös injiziert.

Spontanverlauf

Gruppe 10 (5 Tiere)

Unbehandelte Kontrollgruppe

3.4.3 Intraarterielle Applikation

Die intraarterielle Therapie erfolgte in Allgemeinnarkose. Zur Vorbereitung der regionalen Zytostatikaapplikation über die A. hepatica wurde ein Katheter in die A. gastroduodenalis implantiert. Dafür wurde ein Polyethylenschlauch mit einem Außendurchmesser von 0,8 mm und einem Innendurchmesser von 0,4 mm auf eine 26 G Kanüle geschoben, mit zwei Seidenligaturen (Perma-Hand®Seide, Stärke 5-0, Ethikon, Norderstedt) befestigt und die Katheterspitze schräg angeschnitten.

Nach Rasur und Hautdesinfektion wurde das Abdomen durch einen 2 - 3 cm breiten Oberbauchquerschnitt distal des Proc. xiphoideus eröffnet. Jetzt wurde die Leber kranial, das Darmkonvolut kaudal verlagert und mit sterilen Gazetupfern in der Bauchhöhle fixiert. Unter Sicht des Operationsmikroskops (OPMI-6S, Zeiss, Oberkochen) wurde bei 10 - 25facher Vergrößerung die A. hepatica communis im Bereich der Aufzweigung in die A. hepatica propria und die A. gastroduodenalis freipräpariert und mit Seidenfaden angezügelt, um einen retrograden Abfluß, insbesondere bei der Embolisation zu verhindern. Danach wurde die A. gastroduodenalis distal ligiert, proximal der Ligatur arteriotomiert und die Blutung durch Spannen der Zügel an der A. hepatica communis gestoppt. Jetzt wurde der Katheter in die A. gastroduodenalis eingeführt und so plaziert, daß seine Spitze nicht in das Lumen der A. hepatica communis hineinragte. Die korrekte Katheterposition wurde mit zwei Seidenligaturen gesichert und der Katheter mit physiologischer Kochsalzlösung über eine aufgesetzte 1 ml Insulinspritze gespült. Die Dichtheit des Kathetersystems und normale Perfusion der Leber wurde nun durch Öffnen der Zügelung an der A. hepatica communis geprüft. Die Injektion des Therapeutikums erfolgte angezügelt in 50 µl-Schritten. Um eine gleichmäßige Verteilung des Zytostatikums über den Blutstrom zu garantieren, wurde intermittierend der Zügel gelöst. Nach Verabreichung der Gesamtdosis und nachfolgender Spülung mit Kochsalzlösung wurde der Katheter entfernt, die Arteriotomiewunde ligiert und der Zügel sowie die Tupfer entfernt. Als Infektionsprophylaxe wurde den Tieren intraperitoneal 50 µl einer Antibiotikallösung (Mischung im Verhältnis 1:1 von: Benzylpenicillin, Penicillin 1 Mega, Grünenthal GmbH, Stollberg und Streptomycin, Heyl® Chemisch-pharmakologische Fabrik, Berlin) verabreicht. Der Wundverschluß erfolgte schichtweise (Peritoneum und Muskulatur: Vicryl®, Stärke 3-0, Ethikon, Norderstedt, Fortlaufende Naht; Haut: Sutaramid, Stärke 3-0, Ethikon, Norderstedt, Einzelhefte). Die Wunden heilten komplikationslos innerhalb weniger Tage.

3.4.4 Intravenöse Applikation, Gewinnung von Blut

Die intravenöse Applikation und Gewinnung von Blut erfolgte über eine in die Schwanzvene geschobene 22 G Venenverweilkanüle (Vasofix® Braunüle®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Das Plazieren der Kanüle in Vollnarkose erwies sich als ungeeignet, da der Blutdruck narkosebedingt erheblich gesenkt wird und somit die Gewinnung ausreichender

Mengen für die Blutuntersuchung unmöglich war. Daher wurden die Tiere unter leichter Etherbetäubung in ein Zwangsrohr verbracht und die Verweilkanüle wurde unter Anstauen der Schwanzvenen geschoben. Nach Spülung mit NaCl-Lösung zur Kontrolle der Position wurde die Kanüle mit Klebestreifen fixiert. Vom spontan austretenden Blut wurden 500 - 1000 µl in einem EPPENDORF-Röhrchen für die Untersuchung gesammelt. Anschließend wurde intravenös mit 50 - 100 µl einer Narkosemischung aus 20 µl Ketanest®, 10 µl Rompun 2 % und 70 µl NaCl-Lösung die Narkose eingeleitet und mit intramuskulärer Applikation fortgeführt. Therapeutikum oder Kontrastmittel für die dynamische MRT-Untersuchung wurden über die Kanüle appliziert.

3.4.5 Analyse der Blutproben

Da die Normserumwerte bei verschiedenen Rattenstämmen erhebliche Unterschiede aufweisen, wurden 10 gesunde Tiere als Nullwerte gemessen und die im Gerät angegebenen Toleranzbereiche für Wistarratten entsprechend korrigiert.

Das gewonnene Vollblut wurde bei 2000 U/min 10 min zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bis zur anschließenden Untersuchung gekühlt gelagert. Die Bestimmung der Serumparameter erfolgte mit dem Analysegerät Vetest 8008. Nach Eingabe der Tierart, Patientenkodierung und des Verdünnungsfaktors wurden die entsprechenden Untersuchungsplättchen in das Gerät eingeführt. Nach dem automatischen Ansaugen der entsprechenden Menge Serums wurden folgende Parameter bestimmt:

Alaninaminotransferase, Alkalische Phosphatase, Amylase,
Aspartataminotransferase, Creatinkinase,
Gammaglutaryltransferase, Lactatdehydrogenase, Lipase,
Albumin, Totalprotein
Harnsäure, Harnstoff, Kreatinin
Totalbilirubin
Cholesterin
Glucose

3.4.6 Magnetresonanztomographische Untersuchungen

Alle MRT-Untersuchungen dieser Studie wurden an dem Magnetresonanztomographen BRUKER Biospec BMT 24/40, Feldstärke 2.35 Tesla (BRUKER Medizintechnik GmbH, Ettlingen) der Radiologischen Klinik und Poliklinik, Abteilung Kernspintomographie des Universitätsklinikums "Benjamin Franklin" der Freien Universität Berlin durchgeführt.

3.4.6.1 Vorbereitung der Versuchstiere

Da bereits geringe Bewegungen zu erheblichen Bildqualitätsverlusten führen, wurden die Ratten zur MRT-Untersuchung, wie oben beschrieben, in Vollnarkose versetzt, um eine exakt definierte, stabile Position der Versuchstiere während der 30 Minuten dauernden Untersuchung zu garantieren. Um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten, muß sich die zu untersuchende Rattenleber im Zentrum der Meßspule befinden. Dazu wurde das Tier in Rückenlage auf eine speziell dafür angefertigte Kunststoffunterlage gelegt und so ausgerichtet, daß der Proc. xiphoideus des Brustbeins mit der Markierung auf der Unterlage übereinstimmte. Jetzt wurde das Tier mit Klebestreifen fixiert und die Unterlage anschließend bündig in die handabstimmbare Meßspule mit einem Innendurchmesser von 6,5 cm gefahren. Die so erreichte reproduzierbare Lagerung ermöglichte die Messung vergleichbarer Schichten alle 7 Tage.

3.4.6.2 Durchführung der MRT, Auswertung und Dokumentation der Befunde

Das Untersuchungsfeld (FOV) der Spule wurde auf eine Dimension von 80 x 80 mm gesetzt. Die Matrixdimension betrug 256 x 256 Pixel. Die MRT-Untersuchung wurde mit einer Standard-Turbospin-Echosequenz (RARE) durchgeführt. Nach der Aufnahme longitudinaler Übersichtsbilder zur Schichtpositionierung wurden 9 transversale Schichten mit einer Schichtdicke von 3 mm im Bereich des Tumors gemessen.

Die Auswertung der Bilder erfolgte an einem Macintosh G3 Power PC mit dem Programm NIH Image 1.62b7 vom National Institute of Health, USA.

Die Dokumentation der in dieser Studie ermittelten Befunde erfolgte als Printcopy mit einem Mitsubishi Video Copy Processor, Mitsubishi Electric Corporation, Tokyo, Japan; sowie auf jaz® 2GB, Iomega Corporation, Utah, USA.

3.4.6.3 Bestimmung der Tumorgröße

Für die Berechnung der Tumorgröße wurde eine protonengewichtete RARE-Sequenz mit einer Repetitionszeit (TR) von 1000 ms, einer Echozeit (TE) von 13,7 ms und einem Turbofaktor von 8 verwendet. Die Gesamtmeßzeit bei 4 Mittelungen betrug 6 min 37 sec.

Die Berechnung der Tumorgröße erfolgt durch Integration der Produkte der Querschnittsflächen des Tumors und der Schichtdicke (QUIN et al., 1990b). Damit der genaue Wert bestimmt werden kann, muß zuerst die Fläche, die ein Bildpunkt kodiert (Pixelgröße) berechnet werden. Aus der verwendeten Matrixdimension und dem Untersuchungsfeld ergibt sich eine Pixelgröße von $0,097 \text{ mm}^2$. Zur Bestimmung des Schichtvolumens wurde dann die jeweilige Tumorfläche einer Schicht auf dem Computer ausgemessen und mit der Pixelgröße

und der Schichtdicke multipliziert. Die Summation der einzelnen Schichtvolumina ergibt das Gesamttumolvolumen.

3.4.6.4 Dynamische MRT-Untersuchung

Nach den oben beschriebenen, protonengewichteten Aufnahmen zur Bestimmung der Tumorausdehnung wurden zur Bestimmung der relativen Signalintensität T₁-betonte Aufnahmen mit einer TR von 400 ms und einer TE von 15 ms angefertigt. Bei 4 Mittelungen und einem Turbofaktor von 1 betrug die Gesamtmeßzeit 6 min 57 sec. Nach einer Messung ohne Kontrastmittelgabe wurden 250 µmol/kg Gd-DTPA über die Verweilkanüle in die Schwanzvene injiziert. Dann wurden unmittelbar nach Kontrastmittelgabe und jeweils nach 7, 14 und 21 min Untersuchungen durchgeführt.

Am PC wurden die relativen Signalintensitäten (SI_{rel.}) der einzelnen Zeitpunkte mit folgender Formel berechnet und die Kontrastmittelkinetik wurde graphisch dargestellt:

$$SI_{rel.} = \frac{\frac{STu_{preKM}}{SRau_{preKM}}}{\frac{STu_{postKM}}{SRau_{postKM}}}$$

SI _{rel.}	=	relative Signalintensität
STu _{preKM}	=	Signalintensität des Tumors vor Kontrastmittelgabe
STu _{postKM}	=	Signalintensität des Tumors nach Kontrastmittelapplikation
SRau _{preKM}	=	Signal Rauschen vor Kontrastmittelgabe
SRau _{postKM}	=	Signal Rauschen nach Kontrastmittelgabe

3.4.7 Sektion und histologische Auswertung

Bei Überschreitung des Tumolvolumens von 3500 µl bei einer Tumorausdehnung auf neun Schichten im MR-Bild wurden die Tiere in tiefer Narkose durch eine Überdosis Narkotikum getötet. Anschließend wurde die tumortragende Leber entnommen, der Lebertumor wurde vorsichtig herauspräpariert und zur histologischen Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit dem Mikrotom wurden im Bereich des maximalen Tumorquerschnitts 12 µm dicke Gefrierschnitte in der dem MR-Bild entsprechenden Schnittebene angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (ROMEIS, 1989). Die HE-Färbung diente der Beurteilung des Anteiles an vitalem und nekrotischem Gewebe der Tumoren. Dabei wurden das Nekroseausmaß der einzelnen Therapiegruppen mit dem der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Es wurde untersucht, ob sich nach der Therapie Unterschiede im Vorhandensein und der Ausdehnung nekrotischer Areale als Reaktion auf die einmalige

Behandlung ergeben, und die Ergebnisse mit den dynamischen MRT-Untersuchungen korrelieren.

Das CC-531 ist in seinem Randbereich solide strukturiert. Kennzeichnend sind die typischen tubulären Strukturen und ein bindegewebiges Stroma. Im Zentrum treten gelegentlich spontane Kolliquationsnekrosen auf (THOMAS et al.,1993). Neben einer vollständigen Nekrosezone, in der sich fast ausschließlich kolliquiertes Nekrosematerial und Kerntrümmer befinden, läßt sich eine schmale Übergangszone mit Kernrückbildung und nur vereinzelt, lebensfähigen Tumorzellnestern abgrenzen, die funktionell der Nekrose zugerechnet werden kann. Bereiche in denen die vitalen Tumorzellen eindeutig überwogen und nur beginnende, geringe nekrotische Bereiche vorlagen wurden dem vitalen Tumoranteil zugerechnet.

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte semiquantitativ, wobei im Übersichtsbild bei 25facher Vergrößerung die Flächenanteile von vitalem Gewebe, der Übergangszone, der zentralen Nekrose sowie von tumorfremdem Restgewebe (Leber- oder Bindegewebe) bestimmt wurden.

Zur exakten Abgrenzung der einzelnen Zonen wurden die Präparate bei 100 und 300facher Vergrößerung durchmustert.