

3. Ergebnisse

3.1 Makroskopische Ergebnisse

3.1.1 Makroskopie der Referenztumoren

Unmittelbar nach der Entnahme der Leber zum Tötungszeitpunkt konnte der Referenztumor durch Palpation sicher intrahepatisch lokalisiert werden. Bei Untersuchung der Schnittfläche stellte sich der Tumor bei allen Gruppen und zu allen Zeiten ohne morphologische Veränderungen, als ellipsoides, weißes Gewebe dar, das sich deutlich sichtbar vom gesunden Lebergewebe abhob.

3.1.2 Makroskopische Vermessungen der Referenztumoren

Die gemessenen Daten der Länge, Breite sowie Höhe der Referenztumore und die daraus errechneten Volumina sind in der Abbildung 2 graphisch dargestellt.

3.1.2.1 Makroskopische Vermessungen der Referenztumoren nach 24 h

24 h postinterventionell betrug der Mittelwert für das Tumolvolumen \pm SEM (Standardfehler des Mittelwert) nach LITT $38,5\text{mm}^3 \pm 3,9$ nach Resektion $44,0\text{mm}^3 \pm 2,1$ und für die Kontrolle $41,8\text{mm}^3 \pm 2,2$. Die Unterschiede der Tumorumina in den 3 Gruppen LITT, Resektion und Kontrolle waren nach dem Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.1.2.2 Makroskopische Vermessungen der Referenztumoren nach 48 h

48 h postinterventionell betrug der Mittelwert für das Tumolvolumen \pm SEM (Standardfehler des Mittelwert) nach LITT $59,5\text{mm}^3 \pm 8,5$ nach Resektion $82,1\text{mm}^3 \pm 3,7$ und für die Kontrolle $82,0\text{mm}^3 \pm 12,3$. Die Unterschiede der Tumorumina in den 3 Gruppen LITT, Resektion und Kontrolle waren nach dem Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.1.2.3 Makroskopische Vermessungen der Referenztumoren nach 72 h

72 h postinterventionell betrug der Mittelwert für das Tumolvolumen \pm SEM (Standardfehler des Mittelwert) nach LITT $56,6\text{mm}^3 \pm 10,4$ nach Resektion $118,1\text{mm}^3 \pm 8,3$ und für die Kontrolle $76,7\text{mm}^3 \pm 9,8$. Die Unterschiede der Tumorumfänge in den 2 Gruppen LITT und Resektion waren nach dem Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p=0,009$).

3.1.2.4 Makroskopische Vermessungen der Referenztumoren nach 96 h

96 h postinterventionell betrug der Mittelwert für das Tumolvolumen \pm SEM (Standardfehler des Mittelwert) nach LITT $92,3\text{mm}^3 \pm 7,1$ nach Resektion $96,7\text{mm}^3 \pm 17,3$ und für die Kontrolle $103,3\text{mm}^3 \pm 31,9$. Die Unterschiede der Tumorumfänge in den 3 Gruppen LITT, Resektion und Kontrolle waren nach dem Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ($p>0,05$).

3.1.2.5 Makroskopische Vermessungen der Referenztumoren nach 14 Tagen

14 Tage postinterventionell betrug der Mittelwert für das Tumolvolumen \pm SEM (Standardfehler des Mittelwert) nach LITT auf $223,9\text{mm}^3 \pm 35,6$ nach Resektion $1233,3\text{mm}^3 \pm 181,5$ und für die Kontrolle $978,9\text{mm}^3 \pm 87,6$. Die Unterschiede der Tumorumfänge in den 2 Gruppen LITT und Resektion waren nach dem Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p=0,008$).

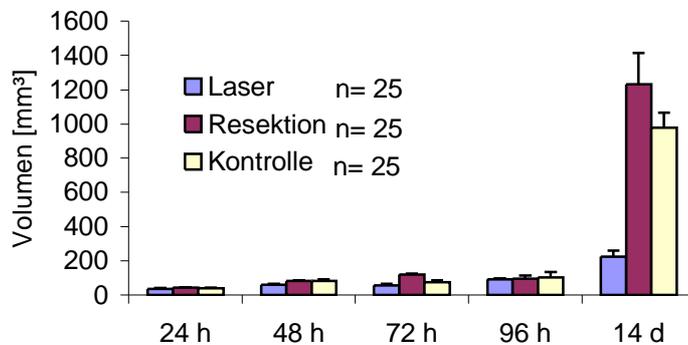


Abb. 2: Volumina der Referenztumore in $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$ 24, 48, 72, 96 h und 14 Tage postinterventionell in den 3 Gruppen Laser, Resektion und Kontrolle

3.1.3 Makroskopie der Behandlungstumore nach LITT

Unmittelbar nach der Entnahme der Leber zum Tötungszeitpunkt konnte die Koagulationsnekrose sicher intrahepatisch lokalisiert werden. Bei Untersuchung der Schnittfläche hob sich die Koagulationsnekrose zu allen Zeiten deutlich sichtbar durch eine hellere Farbe vom gesunden Lebergewebe ab.

3.1.4 Peritonealkarzinose

Eine Peritonealkarzinose wurde nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h in keiner Gruppe beobachtet. 14 Tage postinterventionell konnten Peritonealkarzinosen festgestellt werden.

3.1.4.1 Peritonealkarzinose in der Kontrollgruppe

Nach 14 Tagen wurde bei 3 von 5 Tieren eine Peritonealkarzinose festgestellt, dies entspricht einem prozentualen Anteil von 60%.

3.1.4.2 Peritonealkarzinose in der Lasergruppe

Nach 14 Tagen fand sich bei einem von 5 Tieren eine Peritonealkarzinose, dies entspricht einem prozentualen Anteil von 20%.

3.1.4.3 Peritonealkarzinose in der Resektionsgruppe

Nach 14 Tagen wurde bei 4 von 5 Tieren eine Peritonealkarzinose festgestellt, dies entspricht einem prozentualen Anteil von 80%.

3.1.5 Todesfälle vor Erreichen des Tötungszeitpunkts

Von n= 5 Tieren der Kontrollgruppe und der Resektionsgruppe starben je Gruppe n= 2 Tiere (40%) ein bis zwei Tage vor dem Erreichen des 14. postoperativen Tages. Die Autopsie ergab eine manifeste Ausbreitung der peritonealen Metastasenaussaat in die gesamte Bauchhöhle. Diese verendeten Tiere wurden nicht in die statistische Auswertung einbezogen, sondern durch neue Ratten in der Versuchsreihe ersetzt. Demgegenüber starb keines der Tiere der Lasergruppe vor dem Erreichen des 14. postoperativen Tages.

3.2 Histologische Ergebnisse

3.2.1 Auswertung der Schnittpräparate der Referenztumoren

3.2.1.1 Histologische Morphologie der vitalen Referenztumoren

Die histologische Morphologie der vitalen Referenztumoren wurde nach HE-Färbung von Paraffinschnitten beurteilt. Die Ergebnisse der Referenztumorpräparate sind im folgenden für die Kontroll-, Laser- und Resektionsgruppe zusammenfassend beschrieben, da die vitalen Tumoren keine morphologischen Unterschiede aufwiesen:

In den Referenztumorpräparaten zeigte sich ein unilokulär wachsendes, vollständig intrahepatisch gelegenes Adenokarzinom mit mittlerem Differenzierungsgrad.

Der Tumor zeigte überwiegend tubuläre Strukturen mit vakuolenartiger Lumenbildung und war von bindegewebigen Septen durchzogen. Im Bereich des Übergangs zum Lebergewebe wuchs der Tumor verdrängend mit breiter homogener Invasionsfront und partieller Infiltration der Hepatozyten oder hepatischen Sinus. Die Spontannekroserate betrug geschätzt 20 bis 40%. Die großen basophilen Tumorzellen besaßen eine deutliche Zell- und Kernpolymorphie mit Kern-Plasma-Verschiebung zu Gunsten des Zellkerns. Es ließen sich zahlreiche Mitosen nachweisen.

Im zeitlichen Verlauf änderte sich die Morphologie des Tumors nicht. Lediglich die Spontannekrosen nahmen im Zentrum mit dem Alter der Tumoren an Häufigkeit zu.

3.2.1.2 Histologische Morphologie der Behandlungstumoren nach LITT

3.2.1.2.1 Histologische Morphologie der Behandlungstumoren nach 24 h

Innerhalb der Applikationszone war keine Gewebecarbonisierung zu erkennen. Zentral, unmittelbar am Applikator anliegend, waren die Hepatozyten mechanisch komprimiert. In der Zentralzone unterschieden sich die hyperthermisch geschädigten Hepatozyten von den nicht geschädigten Hepatozyten durch eine beginnende Kernpyknose. In der Übergangszone ließen sich vereinzelt Granulozyteninfiltrationen nachweisen, wodurch die Abgrenzung der Zentralzone vom nicht hyperthermierten Lebergewebe der Referenzzone in der HE- Färbung ermöglicht wurde.

3.2.1.2.2 Histologische Morphologie der Behandlungstumoren nach 48 h

Innerhalb der Applikationszone war keine Gewebecarbonisierung zu erkennen. Zentral, unmittelbar am Applikator anliegend, waren die Hepatozyten mechanisch komprimiert. In der Zentralzone kam es zu einer Zunahme der Eosinophilie des Zytoplasmas der Hepatozyten. In der Übergangszone ließ sich ein durchgängiger, breiter Granulozytenwall nachweisen.

3.2.1.2.3 Histologische Morphologie der Behandlungstumoren nach 72 h

Innerhalb der Applikationszone war keine Gewebecarbonisierung zu erkennen. Zentral, unmittelbar am Applikator anliegend, waren die Hepatozyten mechanisch komprimiert. In der Zentralzone kam es durch den Verlust der Anfärbarkeit der Zellkerne zu einer weitgehenden Homogenisierung der geschädigten Hepatozyten. In der Übergangszone zeigte sich in den mit HE gefärbten Präparaten fokal Zeichen einer frühen Organisation durch frisches Granulationsgewebe.

3.2.1.2.4 Histologische Morphologie der Behandlungstumoren nach 96 h

Innerhalb der Applikationszone war keine Gewebecarbonisierung zu erkennen. Zentral, unmittelbar am Applikator anliegend, waren die Hepatozyten mechanisch komprimiert. In der Zentralzone kam es durch den Verlust der Anfärbarkeit der Zellkerne zu einer weitgehenden Homogenisierung der geschädigten Hepatozyten. In der Übergangszone zeigte sich ein breiter Granulozytensaum aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und Makrophagen.

3.2.1.2.5 Histologische Morphologie der Behandlungstumoren nach 14 Tagen

Innerhalb der Applikationszone war keine Gewebecarbonisierung zu erkennen. Zentral, unmittelbar am Applikator anliegend, waren die Hepatozyten mechanisch komprimiert. In der Zentralzone kam es durch den Verlust der Anfärbarkeit der Zellkerne zu einer weitgehenden Homogenisierung der geschädigten Hepatozyten. In der Übergangszone kam es zu einer kontinuierlichen Vergrößerung des Granulationsgewebesauemes.

3.2.2 Qualitative Auswertung der mRNA- Expression für HGF

Die HGF- Expression wurde nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 14 Tagen im Leberparenchym untersucht. Im Tumorgewebe war lediglich fokal eine HGF- Expression nachweisbar. Bei starker HGF- Expression wurde diese überwiegend in parenchymatischen Zellen dicht an dem Referenztumor nachgewiesen. Die intrahepatische HGF- Expression zeigte sich vorzugsweise im hepatozellulären Bereich der hepatischen Sinus und weniger in den Portalfeldern bzw. Zentralvenen.

3.3 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von HGF und CTGF bei den Referenztumoren

3.3.1 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von HGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle)

Der mRNA Nachweis von HGF gelang in allen Fällen.

3.3.1.1 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von HGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle) nach 24 h

24 h postinterventionell betrug die intrahepatische mRNA- Expression \pm SEM von HGF in der Gruppe I (LITT) $2,8 \pm 0,4z/mf$, in der Gruppe II (Resektion) $2,1 \pm 0,5z/mf$ und in der Gruppe III (Scheinoperation) $2,1 \pm 0,4z/mf$. Die Unterschiede der Expression in den 3 Gruppen LITT, Resektion und Kontrolle waren nach dem Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.3.1.2 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von HGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle) nach 48 h

48 h postinterventionell betrug die intrahepatische mRNA- Expression \pm SEM von HGF in der Gruppe I (LITT) $3,9 \pm 0,4z/mf$, in der Gruppe II (Resektion) $7,2 \pm 1,0z/mf$ und in der Gruppe III (Kontrolle) $5,2 \pm 0,5z/mf$. Die Unterschiede der Expression in den 2 Gruppen LITT und Resektion waren nach dem Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p=0.047$).

3.3.1.3 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von HGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle) nach 72 h

72 h postinterventionell betrug die intrahepatische mRNA- Expression \pm SEM von HGF in der Gruppe I (LITT) $3,5 \pm 0,5z/mf$, in der Gruppe II (Resektion) $5,1 \pm 0,3z/mf$, und in der Gruppe III (Kontrolle) $4,4 \pm 0,4z/mf$. Die Unterschiede der Expression in den 3 Gruppen LITT, Resektion und Kontrolle waren nach dem Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ($p>0.05$).

3.3.1.4 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von HGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle) nach 96 h

96h postinterventionell betrug die intrahepatische mRNA- Expression \pm SEM von HGF in der Gruppe I (LITT) $3,7 \pm 0,3z/mf$, in der Gruppe II (Resektion) $4,9 \pm 0,5z/mf$ und in der Gruppe III (Scheinoperation) $4,5 \pm 0,3z/mf$. Die Unterschiede der Expression in den 3 Gruppen LITT, Resektion und Kontrolle waren nach dem Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ($p>0.05$).

3.3.1.5 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von HGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle) nach 14 Tagen

14 Tage postinterventionell betrug die intrahepatische mRNA- Expression \pm SEM von HGF in der Gruppe I (LITT) $3,3 \pm 0,7z/mf$, in der Gruppe II (Resektion) $3,8 \pm 0,6z/mf$ und in der Gruppe III (Kontrolle) $4,4 \pm 0,4z/mf$. Die Unterschiede der Expression in den 3 Gruppen LITT, Resektion und Kontrolle waren nach dem Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

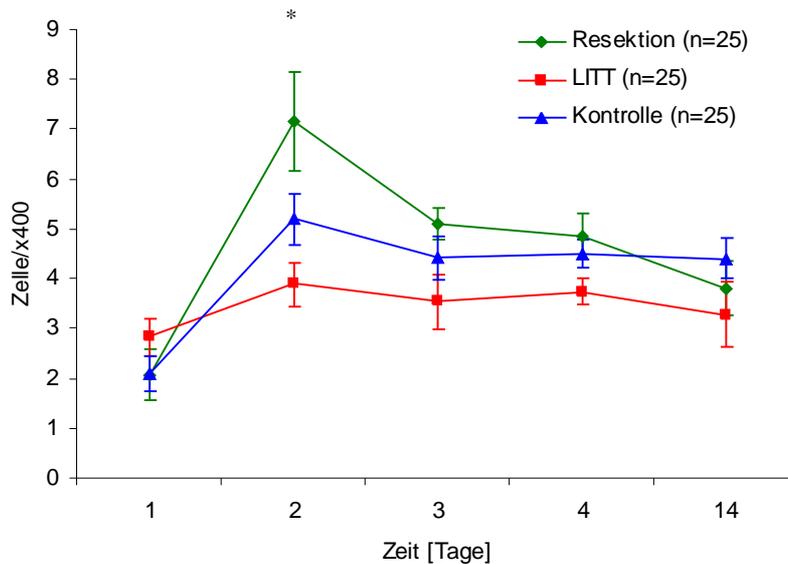


Abb. 3: mRNA- Expression von HGF im Lebergewebe 24, 48, 72, 96 h und 14 d post interventionell in den Gruppen I (LITT), II (Resektion) und III (Kontrolle)

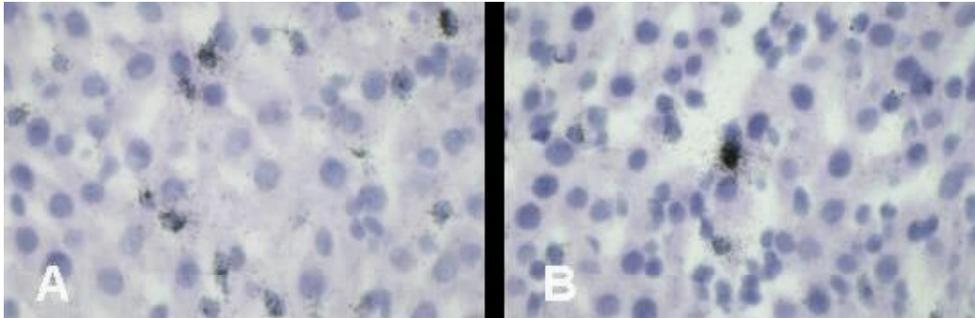


Abb. 4: Autoradiographie der mRNA- Expression (schwarze Körnchen) von HGF im Lebergewebe 48 h postinterventionell in den Gruppen I (LITT) [B] und II (Resektion) [A]; Vergrößerung: 400- fach

3.3.2 Qualitative Auswertung der mRNA- Expression für CTGF

CTGF wurde am 1., 2., 3., 4. und 14. Tag im Tumor exprimiert. Im Parenchym wurde keine CTGF- Expression nachgewiesen. Nach LITT wurde mit der zunehmenden Organisation einer fibrotischen Bindegewebeszone auch eine CTGF- Expression nachgewiesen.

3.3.3 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von CTGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle)

Der mRNA Nachweis von CTGF gelang in allen Fällen.

3.3.3.1 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von CTGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle) nach 24 h

24 h postinterventionell betrug die intratumoröse mRNA- Expression \pm SEM von CTGF in der Gruppe I (LITT) $2,2 \pm 0,6z/mf$, in der Gruppe II (Resektion) $2,5 \pm$

0,5z/mf und der Gruppe III (Scheinoperation) $2,3 \pm 0,4z/mf$. Die Unterschiede der Expression in den 3 Gruppen LITT, Resektion und Kontrolle waren nach dem Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.3.3.2 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von CTGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle) nach 48 h

48 h postinterventionell betrug die intratumoröse mRNA- Expression \pm SEM von CTGF in der Gruppe I (LITT) $4,1 \pm 0,4z/mf$, in der Gruppe II (Resektion) $3,3 \pm 0,3z/mf$ und der Gruppe III (Scheinoperation) $3,2 \pm 0,5z/mf$. Die Unterschiede der Expression in den 3 Gruppen LITT, Resektion und Kontrolle waren nach dem Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.3.3.3 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von CTGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle) nach 72 h

72 h postinterventionell betrug die intratumoröse mRNA- Expression \pm SEM von CTGF in der Gruppe I (LITT) $4,4 \pm 0,2z/mf$, in der Gruppe II (Resektion) $3,3 \pm 0,2z/mf$ und der Gruppe III (Scheinoperation) $4,5 \pm 0,4z/mf$. Die Unterschiede der Expression in den 2 Gruppen LITT und Resektion waren nach dem Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p = 0,028$).

3.3.3.4 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von CTGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle) nach 96 h

96 h postinterventionell betrug die intratumoröse mRNA- Expression \pm SEM von CTGF in der Gruppe I (LITT) $6,8 \pm 0,9z/mf$, in der Gruppe II (Resektion) $4,2 \pm 0,3z/mf$ und in der Gruppe III (Kontrolle) $5,3 \pm 0,6z/mf$. Die Unterschiede der

Expression in den 3 Gruppen LITT, Resektion und Kontrolle waren nach dem Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ($p > 0.05$).

3.3.3.5 Semiquantitativer Nachweis der mRNA- Expression von CTGF der Referenztumoren bei Laserung, Resektion und der Laparotomie (Kontrolle) nach 14 Tagen

14 Tage postinterventionell betrug die intratumoröse mRNA- Expression \pm SEM von CTGF in der Gruppe I (LITT) $13,9 \pm 0,8z/mf$, in der Gruppe II (Resektion) $8,1 \pm 0,8z/mf$ und der Gruppe III (Kontrolle) $8,6 \pm 0,9z/mf$. Die Unterschiede der Expression in den 2 Gruppen LITT und Resektion waren nach dem Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p=0.009$).

Die Ergebnisse sind graphisch in den folgenden Abbildungen 5 und 6 dargestellt.

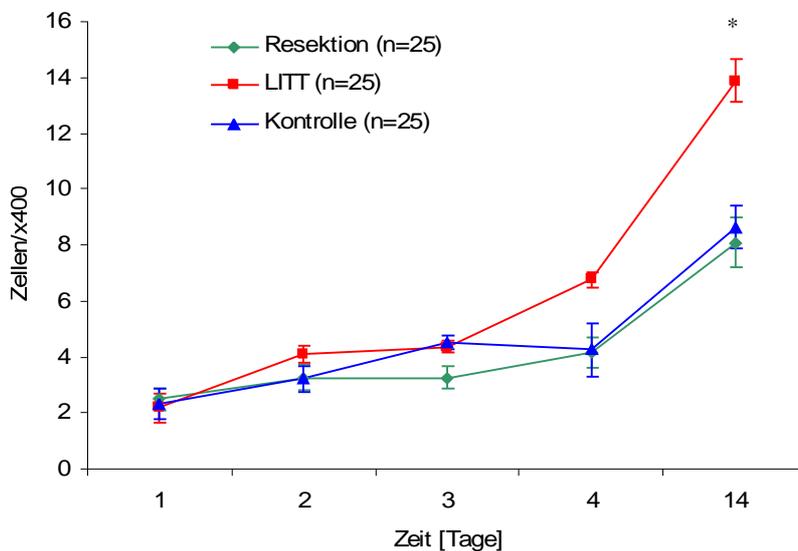


Abb. 5: mRNA- Expression von CTGF im Tumorgewebe 24, 48, 72, 96 h und 14 d post interventionell in den Gruppen I (LITT), II (Resektion) und III (Kontrolle).

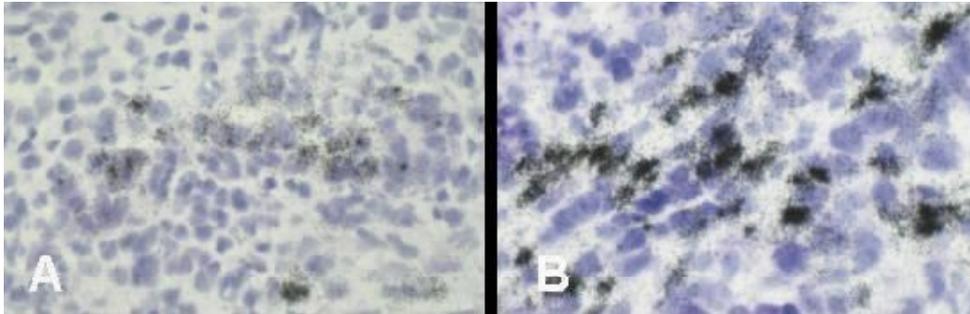


Abb. 6: Autoradiographie der mRNA- Expression (schwarze Körnchen) von CTGF im Tumorgewebe 14 d postinterventionell in den Gruppen I (LITT) [B] und II (Resektion) [A]; Vergrößerung: 400- fach

3.4 Temperaturentwicklung während der Laserapplikation

Die einzelnen Temperaturmesswerte am Behandlungs- und auch am Referenztumorrand, sind für die 25 Tiere der Gruppe der laserinduzierten Thermotheapie folgend beschrieben.

An den Rändern der Behandlungstumoren zeigten sich mit steigender Laserenergie kontinuierliche Temperatursteigerungen

An den Rändern der Referenztumoren zeigten sich während der gesamten Laserapplikation keine Abweichungen von der jeweiligen Ausgangstemperatur.