

Aus dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin,
Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. med. H. J. Buhr

**Die Laserinduzierte Thermotherapie (LITT) zur Behandlung von
Lebermetastasen – Kombinationstherapie mit Varianten der
selektiven/passageren Gefäßokklusion der Leber
- Eine experimentelle Studie –**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
am medizinischen Fachbereich
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörg Pelz
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. C.-T. Germer

Koreferent: Prof. Dr. ing. Prof. h.c. Dr. h.c. G. Müller

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches Humanmedizin der Freien
Universität Berlin

Promoviert am: 13.12.2002

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1.	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung	3
2.	Material und Methode	5
2.1	Materialien	5
2.1.1	Nd:YAG-Laser	5
2.1.2	Lichtübertragungssystem (Applikatorsystem)	5
2.1.2.1	Lichtwellenleiter	5
2.1.2.2	Einkopplung	6
2.1.2.3	Streukörper (Diffuser-Tip-Applikator)	6
2.1.3	Punktionsset	8
2.1.4	Applikatorhalterung	8
2.1.5	Leistungsmessgerät	8
2.1.6	Temperaturmesseinheit	8
2.1.7	Intraarterielle Katheter	8
2.1.8	PC-integrierter Laser-Doppler	9
2.1.9	Stärkemikrosphären (DSM)	9
2.1.10	Rotlichtlampe	11
2.1.11	Versuchstiere	11
2.1.11.1	Anatomie der Rattenleber	11
2.1.12	Tumorzellen	12
2.1.13	5-Brom-2-deoxy-uridin (BrdU)	12

	Seite
2.2 Methoden	13
2.2.1 Tumorzellsuspensionsherstellung	13
2.2.2 Operationsvorbereitung	14
2.2.2.1 Narkose	14
2.2.2.2 Rasur und Lagerung	14
2.2.3 Operative Eingriffe	14
2.2.3.1 Tumorimplantation und Randomisierung der Versuchstiere	14
2.2.3.1.1 Tumorzellimplantation	14
2.2.3.1.2 Auswahl der Tumore	15
2.2.3.2 I.a. Applikationen	15
2.2.3.2.1 Katheterimplantation	15
2.2.3.2.2 Beendigung der Katheterimplantation	16
2.2.3.2.3 Applikation der Substanzen	17
2.2.3.3 Flowmetrische Bestimmung der Leber- und Tumorperfusion	18
2.2.3.4 Pringle-Manöver	18
2.2.3.5 Ausklemmung der A.hepatica propria	18
2.2.3.6 Ausklemmung der Vena portae	19
2.2.3.7 Laserinduzierte Thermotheapie	19
2.2.3.7.1 Platzierung des Applikators und Laserung	19
2.2.3.7.2 Laserapplikation und Applikatorrest	19
2.2.3.8 „Scheinbehandlung“ der Kontrolltiere	20
2.2.3.9 Haltung der Tiere nach den operativen Eingriffen	20
2.2.3.10 Tötung der Tiere und Entnahme der Leber	20
2.2.4 Versuchstiergruppen	21
2.2.4.1 Versuchstiergruppen zur Evaluierung der suboptimalen Therapie der Behandlungstumore	21
2.2.4.2 Versuchstiergruppen zur Ermittlung der Perfusionsreduktion nach i.a. Applikation von Stärkemikrosphären	22
2.2.4.3 Versuchstiergruppen der Hauptversuche	22
2.2.5 Histologische Aufarbeitung	23
2.2.5.1 Verarbeitung der Formalinpräparate	23
2.2.5.1.1 Fixierung	23

	Seite	
2.2.5.1.2	Herstellung der Gewebeblöcke	23
2.2.5.1.3	Paraplastinenbettung	23
2.2.5.1.4	Herstellung der Schnittpräparate	24
2.2.5.1.5	Färbung der Schnittpräparate	24
2.2.5.1.5.1	Entparaffinierung, Hydrierung	24
2.2.5.1.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	24
2.2.5.1.5.3	Dehydrierung, Entalkoholisierung	24
2.2.5.1.5.4	Eindecken	25
2.2.5.2	Verarbeitung der Kryo-Präparate	25
2.2.5.2.1	Herstellung der Gefrierschnitte	25
2.2.5.2.2	Fixierung	25
2.2.5.2.3	5-Brom-2-deoxy-uridin-Färbung (BrdU-Färbung)	25
2.2.5.2.3.1	Durchführung der BrdU-Färbung	26
2.2.5.2.3.2	Eindecken	27
2.2.6	Auswertungskriterien	27
2.2.6.1	Beurteilung der intraoperativen Temperaturmessung	27
2.2.6.2	Beurteilung der makroskopischen Gewebeproben	27
2.2.6.3	Auswertung der histologischen Schnittpräparate	28
2.2.6.4	Definition der Tumor-/Läsionsvolumina	28
2.2.6.5	Beurteilung der Schnittpräparate nach BrdU-Reaktion	28
2.2.6.5	Histologische Beurteilung der Läsion nach der HE-Färbung und der BrdU-Reaktion	29
2.2.6.6	Statistische Analyse	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Ergebnisse der Vorversuche	30
3.1.1	Ermittlung der suboptimalen Therapie der Behandlungstumore	30
3.1.2	Perfusionsminderung nach i.a. Applikation von DSM	31
3.2	Ergebnisse der Hauptversuche	32

	Seite	
3.2.1	Temperaturentwicklung während der Laserapplikation	32
3.2.2	Makroskopie der induzierten Läsion	34
3.2.2.1	Makroskopie der Gruppe I	34
3.2.2.2	Makroskopie der Gruppe II	35
3.2.2.3	Makroskopie der Gruppe III	35
3.2.2.4	Makroskopie der Gruppe IV	35
3.2.2.5	Makroskopie der Gruppe V	36
3.2.2.6	Makroskopie der Gruppe VI	36
3.2.2.7	Makroskopie der Gruppe VII	36
3.2.3	Tumor-/Läsionsvolumina	37
3.2.3.1	Tumor-/Läsionsvolumina der Behandlungstumore im zeitlichen Verlauf	37
3.2.3.2	Größenvergleich der Tumor-/Läsionsvolumina der Gruppen I-VIII	38
3.2.4	Histologische Ergebnisse	42
3.2.4.1	Mikroskopie der Tumore der Gruppe I	42
3.2.4.2	Mikroskopie der Tumore der Gruppe II	43
3.2.4.3	Mikroskopie der Tumore der Gruppe III	44
3.2.4.4	Mikroskopie der Tumore der Gruppe IV	45
3.2.4.5	Mikroskopie der Tumore der Gruppe V	46
3.2.4.6	Mikroskopie der Tumore der Gruppe VI	47
3.2.4.7	Mikroskopie der Tumore der Gruppe VII	48
3.2.5	Residualer Tumor/Tumorrezidive und rezidivfreie Verläufe	49
4.	Diskussion	50
4.1	Zielsetzung der Arbeit	52
4.2	Die Temperaturentwicklung am Tumorrand	55
4.3	Das Tumor-/Läsionsvolumen	56
4.4	Histopathologische Merkmale	58
4.5	Tumorprogression und Regression	60
4.6	Schlussfolgerung	62

		Seite
5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis	67
7	Materialliste	79
8	Anhang	82
8.1	Temperaturen während der Laserapplikation	82
8.2	Paarweiser Gruppenvergleich der Temperaturmaxima	84
8.3	Präinterventionelle Läsionsvolumina	85
8.4	Postinterventionelle Tumor-/Läsionsvolumina	88
8.5	Paarweiser Gruppenvergleich der postoperativen Tumor-/ Läsionsvolumina	91
8.7	Makroskopie der Läsionen	93
8.8	Mikroskopie der Läsionen	95
9	Danksagung	97
10	Lebenslauf	99

Abstract

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurde an einem Lebermetastasenmodell der Ratte der Einfluß der Leberperfusion während der in-situ Ablation intrahepatischer Tumoren mittels laserinduzierter Thermotherapie (LITT) untersucht. Es sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Leberperfusion einen negativen Einfluß auf die Effizienz dieses Therapieverfahrens besitzt und ob durch die Reduktion der Leberperfusion bessere Therapieergebnisse zu erzielen sind.

Hierzu erfolgte bei 105 männlichen WAG-Ratten die subcapsuläre Induktion eines Tumors in den rechten Nach einer Latenzzeit von 10 Tagen wurden die Tiere in sieben Versuchstiergruppen randomisiert:

In der Gruppe I blieben die Tiere unbehandelt, in der Gruppe II erfolgte die alleinige i.a. hepatische Applikation von Stärkemikrosphären (DSM). In den Gruppen III-VII erfolgte die Lasertherapie mit 1200 J entweder als alleinige Therapie (Gruppe III), unmittelbar nach der Applikation von Stärkemikrosphären (Gruppe IV), während der Durchführung eines Pringle-Manövers (Gruppe V), oder während der selektiven Ausklemmung der A. hepatica (Gruppe VI) bzw. der V. portae (Gruppe VII).

Die Parameter der Lasertherapie wurde dabei so gewählt, dass mit einer alleinigen laserinduzierten Thermotherapie nur eine suboptimale Therapie erfolgen konnte.

In den Gruppen III-VII wurden während der Therapie die Temperaturverläufe am Tumor/Leber-Übergang dokumentiert. 24 Stunden, 7 und 21 Tage nach der Behandlung wurden jeweils 5 Tiere aus jeder Versuchstiergruppe relaparotomiert. Die Proben wurden sodann in Formalin und Kryo asserviert. Die angefertigten Paraffinschnitte wurden mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) gefärbt und hinsichtlich ihrer morphologischen Strukturen ausgewertet. Die Dedektion der BrdU-Inkorporation mittels BrdU-Antikörperreaktion sollte die Proliferationsrate der Tumore bestimmen. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden Varianzanalysen durchgeführt.

Obwohl in der Gruppe IV im Verlauf der LITT die geringsten Temperatursteigerungen bezüglich der LITT als Monotherapie gemessen wurden, konnte nur in dieser Gruppe bei allen 15 Präparaten eine vollständige Tumorregression histologisch festgestellt werden. Die Effizienzsteigerung der LITT durch die Manipulation der Leberperfusion kann somit nicht alleine auf die

Reduktion des sogenannten „cooling effects“ zurückgeführt werden. Inwieweit die Dauer der Ischämiephase einen Einfluss auf die Zellschädigung besitzt, ist derzeit noch spekulativ.

Die laserinduzierte Thermotherapie als Monotherapie führte, verglichen mit der Kontrollgruppe I, zu einer signifikanten Wachstumsverzögerung der Tumore.

Anhand der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit wurde die Effektivitätssteigerung der laserinduzierten (LITT) Thermotherapie durch verschiedene Methoden der Leberperfusionsmodulation verdeutlicht. Die Perfusionsminderung durch Stärkemikrosphären erwies sich dabei im Nutzen-Risiko Vergleich als die vorteilhafteste Methode. Die Studie stellt somit die Grundvoraussetzung dar, diese Möglichkeit der Effizienzsteigerung der laserinduzierten Thermotherapie maligner Lebertumoren klinisch zu evaluieren.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H.J. Buhr, Leiter der Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Chirurgische Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, danke ich für sein Einverständnis zur Durchführung und Einreichung der Dissertation in seiner Abteilung.

Herrn Prof. Dr. med. C.-T. Germer, Leitender Oberarzt der Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Chirurgische Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. ing. Prof. h.c. Dr. h.c. G. Müller, Direktor des Instituts für medizinische/technische Physik und Lasermedizin am Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin und Geschäftsführer der Laser- und Medizintechnologie gGmbH, Berlin, für die Überlassung der technischen Mittel zur Durchführung der experimentellen Untersuchungen. Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern Herrn Dipl. Phys. Dr. A. Roggan sowie Frau Dipl. Phys. V. Knappe, ohne deren persönliches Engagement die Durchführung der Versuche nicht möglich gewesen wäre.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. C. Isbert, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Chirurgische Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin für die hilfreiche Unterstützung und Korrektur meiner Arbeit. Insbesondere sein fundiertes Wissen über die Beurteilung der histologischen Gewebepräparate sowie die statistischen Analysen waren mir eine große Hilfe.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Albrecht, während meiner Arbeit wissenschaftlicher Mitarbeiter der Chirurgische Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, für seine Unterstützung und Betreuung der Arbeit bedanken. Seine engagierte Organisation waren mir eine große Hilfe.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. D. Schuppan, Leiter der gastroenterologischen Abteilung der Universität Erlangen-Nürnberg, der die Räumlichkeiten des gastroenterologischen Labors im Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin für die histologischen Untersuchungen zur Verfügung stellte.

Frau A. Schaubitzer-Meier, während meiner Arbeiten Medizinisch Technische Assistentin des chirurgischen Forschungslabors, gilt meinen Dank für die Einweisung und Hilfe bei der Anfertigung und Färbung der histologischen Gewebepräparate.

Bei Frau Dr. A. Boerner, zur gleichen Zeit Doktorandin an der chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, bedanke ich mich für die fruchtbaren Diskussionen und dem freundschaftlichen Umgang bei der Erstellung der Promotion.

Bei den Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors, insbesondere Frau A. Panhorst, und Frau B. Hotz, bedanke ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden bedanken, die mich mit Geduld, Nachsicht und Unterstützung während meiner Arbeit begleiteten.