

Aus Klinik für
Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. M.K. Schilling
Doktorvater: PD Dr. med. O. Kollmar

**Auswirkung lokal ablativer Verfahren
auf die Tumordestruktion und
auf die Disseminierung von Tumorzellen
im isolierten Leberperfusions-Modell der Ratte
(Kryo-RFA-LITT)**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2010***

vorgelegt von: Katharina Isabel Debnar-Daumler
geboren am 13.08.1982 in Rio de Janeiro

Dekan: Prof. Dr. med. M.D. Menger

Gutachter 1

2

3

Datum der Promotion:

meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.1	Zusammenfassung.....	1
1.2	Summary	2
2	Einleitung.....	3
2.1	Kolorektale Lebermetastasen.....	3
2.2	Chirurgische Therapie – Resektion.....	3
2.3	Alternative Therapieformen	5
2.4	Kryotherapie.....	6
2.5	Thermoablative Verfahren.....	8
2.5.1	Radiofrequenzablation.....	9
2.5.2	Laserinduzierte Thermotherapie	10
2.6	Fragestellung	10
3	Material und Methoden	12
3.1	Versuchstiere	12
3.2	Tumorzellen und GFP-Transfektion	12
3.3	Tumorzellaufbereitung und Implantation	13
3.4	Leberentnahme	15
3.5	Isolierte Leberperfusion.....	17
3.6	Versuchsprotokoll.....	19
3.7	Kryotherapie.....	20
3.8	Radiofrequenzablation	21
3.9	Laserinduzierte Thermotherapie	22
3.10	Aufbereitung Perfusat und DNA-Extraktion.....	23
3.11	Nachweis GFP-transfizierter Tumorzellen.....	24
3.12	Western Blot Technik	24
3.13	PCR Technik.....	26
3.14	Real Time PCR Technik.....	27
3.15	Histomorphologische Auswertung.....	28
3.16	Statistik.....	29
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Proliferationsrate der Tumorzellen	30
4.2	Versuchstiere und Perfusionssystem	31
4.3	Volumina der Tumoren und Läsionen	32
4.4	Perfusionsdruck während der isolierten Leberperfusion	33
4.5	Temperaturen während der isolierten Leberperfusion.....	34
4.6	Histomorphologische Auswertung.....	37
4.6.1	Tumoren	37
4.6.2	Azinusstruktur und intralobuläre Balkenstruktur in der peritumoralen Ablationszone ...	38
4.6.3	Intrasinusoidale zelluläre Fragmente	40
4.6.4	Intaktheit der Hepatozyten	42

4.6.5	Kondensation des Zellkerns der Hepatozyten	44
4.6.6	Intravaskuläre Fibrinthromben	46
4.6.7	Intravaskuläre Zellformationen.....	47
4.7	Nachweis der GFP-Transfektion in vivo und in vitro.....	48
4.8	Nachweis GFP-transfizierter Zellen im Perfusat.....	51
5	Diskussion	53
5.1	Modell der isolierten Rattenleberperfusion	53
5.2	GFP-Transfektion und Tumorzellimplantation in die Leber	57
5.3	Frühe Auswirkung thermoablativer Verfahren auf die isoliert perfundierte Leber im offenen System	60
5.4	Tumorzeldisseminierung durch thermoablativ Verfahren	61
5.5	Schlussfolgerung.....	65
6	Literaturverzeichnis.....	66
7	Danksagung.....	74
8	Lebenslauf	75

1.1 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung in Deutschland mit 70000 Neuerkrankungen pro Jahr. Bei 40-50% der Patienten treten im Verlauf Lebermetastasen auf. Während die Leberresektion der Goldstandard für die Therapie kolorektaler Lebermetastasen ist, konnten in den letzten Jahren lokal ablative Therapieverfahren, wie Kryotherapie (Kryo), Radiofrequenzablation (RFA) und Laserinduzierte Thermoablation (LITT), für nicht resektable Tumoren etabliert werden. Obwohl mit diesen alternativen Ablationsverfahren eine gute Tumorkontrolle erzielt werden kann, gehen diese mit einer hohen Rezidivrate einher. Aufgrund dessen werden in der vorliegenden Arbeit, unter Verwendung des etablierten Modells der isolierten Rattenleberperfusion im offenen System, die direkten Effekte ablativer Verfahren auf etablierte kolorektale Lebermetastasen untersucht. Hierbei werden die Kryo-, RFA- und LITT-Technik miteinander verglichen und Hauptaugenmerk auf die Disseminierung der GFP-transfizierten CC531-Tumorzellen und deren Nachweis gelegt. Nicht behandelte Tumore dienen der Kontrolle.

Im Western Blot zeigte sich, dass die GFP-Transfektion über Generationen stabil ist. Mittels Real Time PCR wurde eine Nachweisschwelle von 10^1 Tumorzellen auf 10^6 nicht GFP-haltigen kernhaltigen Zellen erzielt. Die verschiedenen ablativen Verfahren verursachten Volumina und Temperaturen, die eine adäquate Tumorerstörung verursachten. Allein in den Perfusaten der mittels Kryotherapie behandelten Tumoren konnte Tumorzell-DNA nachgewiesen werden. Die Arbeit konnte zeigen, dass eine Tumorzeldisseminierung im isolierten Leberperfuisionsmodell nur durch Kryotherapie verursacht wird.

1.2 Summary

The colorectal carcinoma is the second most common malignant tumor in Germany developing in 70000 patients per year. Liver metastases are found in 40-50% of all patients with colorectal cancer. While resection is the gold-standard therapy, Cryoablation (Cryo), Radiofrequency-ablation (RFA) and Laser-induced thermo-therapy (LITT) are to be named as well established procedures in the therapy even of unresectable tumors. Despite good local tumor control recurrences often occur. The aim of this study was to elucidate the effects of these local ablative procedures in a standardized model of isolated extracorporeal rat liver perfusion combined with established colorectal liver metastases, taking special note of the dissemination of malignant GFP-transfected cells and their detection. The control group were non-treated tumors.

Via Western Blot we verified that GFP-transfection is stable throughout many generations *in vivo*. Using Real Time PCR we detected 10^1 GFP-transfected tumor cells in 10^7 not GFP-bearing cells with nucleus. The different local ablative procedures caused lesions markedly larger than the tumor itself and temperatures adequate to destroy malignant tissue. Thus we succeeded to detect GFP-transfected cells only in the perfusate of cryoablated livers. The study showed that using the model of isolated extracorporeal rat liver perfusion tumorcell dissemination is caused exclusively by cryoablation.

2 Einleitung

2.1 Kolorektale Lebermetastasen

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist die zweithäufigste maligne Erkrankung mit über 70000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland an der 6% der Bevölkerung in Deutschland im Laufe ihres Lebens erkranken [1; 2]. Das CRC verursacht 15% aller Krebstodesfälle in Deutschland [2; 3]. Unter Nichtrauchern ist das CRC sogar die Hauptursache für den Tod an einem malignen Tumor in der westlichen Welt [3]. Die Inzidenz des CRC beträgt 30-35/100.000 Einwohner, wobei Männer mit einer Geschlechterverteilung von 60:40 (m:w) etwas häufiger betroffen sind als Frauen. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt je nach Krankheitsstadium und Therapie 40-60% [3; 4; 5; 6]. Die Leber ist nach den Lymphknoten als zweithäufigstes Organ überhaupt von Fernmetastasen betroffen. Die Metastasierung in die Leber erfolgt portal, arteriell, lymphogen oder per continuitatem. 40-50% aller Patienten mit CRC werden im Verlauf Lebermetastasen aufweisen [7; 8]. Unbehandelt liegt die mediane Überlebensrate von Patienten mit Metastasen des CRC bei 5-14 Monaten, die 5-Jahres-Überlebensrate bei 0% [9; 10]. Mit einem modernen, multimodalen Therapiekonzept liegen die 1-Jahres-, bzw. 5-Jahres-Überlebensraten von synchronen Metastasen bei 34,8%, bzw. 3,3%, respektive 37%, bzw. 6,1% bei metachronen Metastasen [3]. Die Therapiemöglichkeiten der CRLM sind vielfältig, wobei die chirurgische Resektion der Goldstandard ist. Je nach UICC-Stadium wird die chirurgische Therapie mit neoadjuvanter bzw. adjuvanter Chemotherapie erfolgreich kombiniert [2]. Bei nicht resektablen Lebermetastasen können neben einer palliativen Chemotherapie lokal ablativ Verfahren zur Anwendung kommen [2].

2.2 Chirurgische Therapie – Resektion

Die chirurgische Resektion ist der Goldstandard in der Therapie der malignen Veränderungen der Leber [11; 12; 13; 14]. Ungeachtet der Tatsache, dass bei Vorliegen von

Metastasen eine Generalisierung der Krankheit vorliegt, wird durch Resektion ein längeres Überleben erreicht [2; 15; 16]. Die Leber besitzt die Fähigkeit reseziertes Gewebe innerhalb einer Woche zu 30-50% zu regenerieren. Durch diese Regenerationsfähigkeit unterscheidet sich die chirurgische Resektion von Leberparenchym grundsätzlich von der aller anderen parenchymatösen Organe. Bei der chirurgischen Resektion von kolorektalen Lebermetastasen werden die anatomische und die atypische Resektion unterschieden. Die anatomische Resektion orientiert sich hierbei am segmentalen Aufbau der Leber, der einerseits über das arterioporale und biliäre System und andererseits über den venösen Abstrom zur V. cava inferior definiert ist. Bei der atypischen Leberresektion werden kleine, oberflächlich gelegene Metastasen ohne Berücksichtigung der Lebergefäßarchitektur mit einem entsprechenden Sicherheitsabstand entfernt. Die Wahl des Resektionsverfahrens richtet sich nach der Größe, der Lokalisation und der Anzahl der Metastasen. Der Vorteil der atypischen Leberresektion liegt im geringeren Verlust von funktionsfähigem Leberparenchym, insbesondere bei vorgeschädigter, z.B. zirrhotischer Leber. Nachteilig erweist sich jedoch, dass Gefäße und Gallenwege nachgeschalteter, funktionell abhängiger Parenchymbezirke verletzt werden können, mit konsekutiver Parenchymnekrosen, Biliomen und/oder Gallenfisteln. Vorteil der anatomischen Leberresektion ist, dass hiermit ein kompletter Parenchymbezirk entfernt wird und somit auch bereits embolisch gestreute Tumorzellen erfasst werden [17]. Das Ausmaß des Sicherheitsabstandes wird kontrovers diskutiert. Laut einiger Autoren hat dieser keinen Einfluss auf die Rezidivhäufigkeit, andere nennen einen Resektionsrand von min. 1 cm als am günstigsten. Unumstritten ist jedoch, dass alle Patienten von einer Resektion profitieren, auch bei einem Resektionsabstand kleiner als 1 cm [18; 19; 20]. Die Resektion ist jedoch aufgrund verschiedener Faktoren, wie z.B. Syntheseleistung der Leber bei Zirrhotikern, Allgemeinzustand des Patienten, Missverhältnis Tumorgröße zu Parenchym oder bilobärer Lage in nur bis zu 30% der Patienten möglich [2; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28]. Heutzutage werden daher multimodale Therapiekonzepte empfohlen, durch die ein Downstaging mit darauf folgender Resektion erreicht wird oder die Möglichkeit besteht, einen Teil der Tumormassen chirurgisch zu

entfernen und einen anderen Teil mit Hilfe alternativer Verfahren anzugehen [5; 29; 30]. Durch neo-adjuvante Chemotherapie ist es so z.B. möglich 10-15% der initial als inoperabel eingestuften CRLM zu resezieren [22]. Andere Strategien erhöhen die Resektabilitätsrate weiter auf über 20% [11; 22]. Auch wenn ein mehrzeitiges und multimodales Vorgehen erforderlich ist, ist die Resektion anzustreben, wenn Aussicht auf Heilung besteht [11; 31]. Im Allgemeinen kann nach Resektion von kolorektalen Lebermetastasen von 5-Jahres-Überlebensraten von über 40% und einer 10-Jahresüberlebensrate von 28% ausgegangen werden [2; 15; 16; 20; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38]. Die 5-Jahres-Überlebensraten nach Resektion von solitären kolorektalen Lebermetastasen übersteigen in einigen Studien 70% [6; 39].

2.3 Alternative Therapieformen

In den Fällen, in denen sich ein Tumor als irresektabel erweist, stehen verschiedene alternative Verfahren zur Verfügung. Zu nennen sind hier die systemische, palliative Chemotherapie sowie die arterielle Chemoembolisation und lokal nekroseinduzierende Verfahren wie Alkoholinjektion, Mikrowellenapplikation, Kryotherapie, Lasertherapie oder Radiofrequenzablation. Alle diese Verfahren wurden mehrfach in klinischen Studien untersucht, jedoch kann bis auf die systemische Chemotherapie keines von ihnen bisher als Standard angesehen werden [2]. Unter den Verfahren konnten sich die Kryotherapie, Radiofrequenzablation und Laserinduzierte Thermotherapie etablieren und sind deshalb Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Vorteil dieser Verfahren ist, dass Metastasen direkt therapiert werden, wobei das umgebende Leberparenchym geschont wird. In der Praxis können diese Verfahren allein oder zusätzlich zur chirurgischen Resektion verwendet werden. Zudem besteht mit den lokal ablativen Verfahren die Möglichkeit, die Sonden perkutan minimalinvasiv in den Tumor einzubringen und Patienten zu behandeln, die aufgrund ihres reduzierten Allgemeinzustandes für eine Laparatomie nicht in Frage kommen [11; 13; 40; 41].

2.4 Kryotherapie

Kryotherapie bedeutet Gewebe auf Temperaturen unter dem Nullpunkt herabzufrieren und dadurch eine Kolliquationsnekrose auszulösen. Die erstmalige Verwendung erfolgte im 19. Jahrhundert durch James Arnott in Brighton, England. Als Kältequelle nutzte er Salzlösungen die mit Eis versetzt wurden. Bis Mitte des 20. Jahrhunderts waren Kohlendioxid (Trockeneis) und flüssiger Sauerstoff die wichtigsten Kältequellen und die Kryotherapie etablierte sich im Bereich der externen Anwendung, insbesondere in der Dermatologie [42]. Mit der Verfügbarkeit flüssigen Stickstoffes, welcher heutzutage als Kältequelle der Wahl gilt, gelang eine reproduzierbare Frierkapazität mit der Möglichkeit die kryochirurgische Technik auch an inneren Organen anzuwenden, wie es Irving S. Cooper 1966 erstmals vorstellte [43]. Im Jahre 1988 etablierte Zhou das Verfahren für Lebertumore [44].

Heute wird die Kryochirurgie der Leber sowohl allein, als auch in Kombination mit der chirurgischen Resektion angewandt, z.B. wenn Herde chirurgisch nicht zugänglich sind oder wenn eine R0-Resektion nicht möglich ist (Resektionsrand-Kryo). Für gewöhnlich dienen Kryosonden mit Metallköpfen von 6 bis 12mm Durchmesser als Kälteapplikatoren. Diverse Protokolle zur genauen Durchführung des Frierens unterscheiden Einfach- versus Doppeltfrieren, sowie wahlweise in Kombination mit Unterbindung des Blutflusses [45; 46], wobei wiederholtes Frieren und insbesondere die Kombination mit der Unterbindung des Blutflusses mittels Pringle-Manöver die beste Zerstörung des Gewebes bewirkt [45]. Der ideale Temperaturbereich wird zwischen -20°C [47; 48] und -50°C [49] angegeben. Legt man eine Idealtemperatur von -40°C zur sicheren Zerstörung des gesamten Gewebes zugrunde, so ist festzustellen, dass die Vereisungszone nur einen Bereich von 2cm um die Sonde beträgt [50]. Hiermit erklärt sich die Notwendigkeit des gleichzeitigen Gebrauchs mehrerer Sonden. Dem entgegen stehen neuere experimentelle Untersuchungen an der Rattenleber die zeigen, dass eine Unterschreitung von 0°C ausreicht, um eine mikrovaskuläre Dysfunktion mit vollständiger Stase in den Sinusoiden und daraus folgender Gewebeschämie und Zelltod zu bewirken [51; 52; 53]. Das Herabfrieren bewirkt über

verschiedene Mechanismen die Nekrose des Gewebes. Zu nennen sind Dehydratation der Zellen und toxische Elektrolytverschiebung durch Wasserentzug, intrazelluläre Eiskristallbildung mit Berstung der Zellmembran, Denaturierung intrazellulärer Proteine und Zerstörung der Gefäßarchitektur [54; 55; 56]. Dabei ist zu beachten, dass der Effekt wesentlich ausgeprägter ist, wenn auf schnelles Frieren langsames Auftauen folgt [55]. Nach dem Auftauen konnte histologisch gezeigt werden, dass umgebende Sinusoide verstopft werden, was zur Ausdehnung der Läsion führt [53].

Die wichtigsten Nebenwirkungen der Kryotherapie sind ein Transaminasenanstieg, der sich meist am 5. postoperativen Tag normalisiert [45; 57], sowie eine Thrombozytopenie [58], die mit einem erhöhten postoperativen Blutungsrisiko einhergeht. Ursächlich ist das „Trapping“, die erhöhte Ansammlung von Plättchen in der Kryoläsion [59]. Gefürchtet sind besonders Nachblutungen nach dem sog. „cracking“ (Zerreißen) des Randes der Ablationszone [13]. Eine weitere gefährliche Nebenwirkung, gekennzeichnet durch Koagulopathie und Multiorganversagen, ist das seltene Kryoschockphänomen. Ursächlich ist eine massive Zytokinfreisetzung aus der Leber [24]. Besonders häufig ist diese Komplikation, wenn das kritische Vereisungsvolumen von 40-45% des Lebergesamtparenchyms überschritten wird [11; 60; 61; 62].

In Langzeitstudien wurde gezeigt, dass nach Kryotherapie ca. 40% der Patienten Rezidive erleiden [63; 64]. Das häufige Auftreten von Rezidiven am Ort der Ablation, welches zwischen 5 und 44% liegt wird mit unzureichender Zerstörung des malignen Gewebes begründet [1; 62; 63; 65; 66; 67; 68]. Auch außerhalb der primär behandelten Region werden häufig Rezidive beobachtet: intrahepatisch bei 32-80% drei Jahre posttherapeutisch [1; 63; 66; 68]. Die extrahepatische Rezidivhäufigkeit ist mit 10-90% stark abhängig von dem initialen Tumorstadium, der Anzahl abladiertes Lebermetastasen, sowie deren Größe [1; 63; 69].

Generell wird die Kryotherapie als palliative Methode angesehen, auch wenn Autoren ihr die gleichen Langzeitüberlebensraten zusprechen wie der chirurgischen Intervention [64]. Die 5-

Jahres-Überlebensrate liegt nach Kryotherapie bei bis 45%, sowohl bei alleiniger Behandlung als auch bei Resektionsrandtherapie nach R1- oder R2-Resektion [70; 71; 72].

2.5 Thermoablative Verfahren

Thermoablative Verfahren stellen eine effektive Methode zur Behandlung maligner Lebertumore dar und sind in den letzten Jahren zu den meist verwendeten lokal ablativen Verfahren avanciert [41; 73]. Aufgrund hoher Temperaturen entsteht eine Koagulationsnekrose [12], wobei der Wirkungsmechanismus in zwei Phasen eingeteilt werden kann. Erstere beruht auf der direkten sofortigen Hitzewirkung, wobei Tumorzellen deutlich empfindlicher auf Hitzeeinwirkung reagieren als gesundes Gewebe [41]. Nach Beendigung der direkten Hitzeeinwirkung kann im Rahmen der zweiten Phase eine progrediente Schädigung des Gewebes beobachtet werden, die auf mikrovaskuläre Schäden, Ischämie-Reperfusionsschäden und veränderte Immunantwort mit Aktivierung von Kupferzellen zurückgeführt wird [41]. Durch die Schrumpfung des Gewebes aufgrund der Verdunstung von Wasser verkleben zudem kleine Gefäße bis 1mm Durchmesser mit folgender Thrombosierung und Verstärkung des destruirenden Effektes durch Ischämie [74]. Wichtig ist auch hier, dass die Ablationszone mindestens 1 cm ins Gesunde reicht, um eine vollständige Zerstörung der Tumormassen, eine „R0-Ablation“, zu gewährleisten [13; 75]. Daher können nur Tumoren mit maximalem Durchmesser von ca. 4 cm in kurativer Absicht ablatiert werden [12; 41]. Subletale Schädigungen führen zu Reparaturvorgängen in der Zelle, welche zu einer akzelerierten Repopulation führen und zu den hohen Lokalrezidivraten [12; 13]. Außerdem führt die Hitzeeinwirkung zur Expression von Hitzeschockproteinen auf residualen Tumorzellen. Diese Antigene tragen wiederum zur Verstärkung der malignen Potenz der Zellen bei [12]. Gefordert werden Temperaturen von über 55°C, wobei es sinnvoll scheint die Temperatur auf 60°C zu steigern [75]. Hierdurch wird durch die wesentlich höhere Energieapplikation der Tumor sicher ablatiert, ohne dass das Koagulationsvolumen vergrößert wird [75]. Durch den Einsatz von wassergekühlten Sonden (Radiofrequenzablation) und den dadurch verringerten Temperaturgradienten zur

Peripherie hin und die Entwicklung von diffus abstrahlenden Applikatoren (Laserinduzierte Thermotherapie), wird Verkohlung gemindert und die Nekrosefläche vergrößert [41; 75; 76]. Zusätzlich kann durch Unterbindung des Blutflusses der thermoprotektive Effekt großer Gefäße auf das umliegende Gewebe gemindert werden (temporäre Okklusion des Lig. hepatoduodenale, Pringle-Manöver) [13; 75; 76]. Komplikationen der thermoablativen Verfahren sind insbesondere die Entstehung von reaktiven Pleuraergüssen, Gallefisteln, Hautverbrennungen, Hämoperitoneum, ventrikulären Fibrillationen, hepatischen Abszessen, subkapsulären Hämatomen. In bis zu einem Drittel der Patienten ist postinterventionelles Fieber zu beobachten [13; 14; 21; 77; 78; 79].

2.5.1 Radiofrequenzablation

Die Radiofrequenzablation (RFA) ist ein Verfahren bei dem Energie in Form von hochfrequentem Wechselstrom verwendet wird, um eine Koagulationsnekrose und die Denaturierung von Proteinen zu bewirken. Die Frequenz der erzeugten elektromagnetischen Wellen liegt unter 900kHz, normalerweise bei 375-500 kHz, d.h. im Mittelwellenbereich. Hiermit werden Temperaturen von ungefähr 90°C erreicht [41; 78]. Die RFA hat sich gegenüber der Kryotherapie und der Laserinduzierten Thermotherapie als eines der sichersten, billigsten und am leichtesten anzuwendenden ablativen Verfahren bewährt [78]. Die 1-, 3- und 5-Jahres Überlebensraten nach RFA bei CRLM liegen bei 90%, 45% und etwas über 30% [4, 39; 80; 81], das Gesamtüberleben bei 30 und mehr Monaten [30; 39]. Rezidivfreiheit kann für einen Zeitraum von im Mittel 13 Monaten erreicht werden [4]. Die Rezidivrate nach Ablation von CRLM liegt bei 66%; die lokale Rezidivrate hängt auch hier von der wirksamen Zerstörung aller Tumorzellen ab und liegt je nach Studie und deren Ein- und Ausschlusskriterien zwischen 1,8% und 39% [13; 81; 82; 83].

2.5.2 Laserinduzierte Thermotherapie

Laser wurde erstmalig 1960 verwendet und bereits 3 Jahre später von McGuff et al. in der Tumorthherapie eingesetzt [74]. Energiequelle ist hierbei Infrarotlicht mit Wellenlängen zwischen 800 und 1100 nm, wobei Temperaturen von 50 bis 100°C entstehen [41]. Im medizinischen Bereich hat sich der Nd:YAG Laser (Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat) mit einer Wellenlänge von 1064 nm aufgrund seiner hohen Reichweite im Gewebe bewährt [74]. Um eine komplette Tumordestruktion zu erreichen, werden bei Verwendung des Nd:YAG-Lasers Energien von 3 J/mm³ gefordert [75]. Nach Ablation von CRLM liegt trotz des häufigen Vorliegens allgemeiner prognostisch ungünstiger Faktoren die 5-Jahresüberlebensrate bei 30 bis 37% [14; 75; 84], die mittlere Überlebensrate bei 41,8 bis 54 Monaten [14; 21]. Die lokale Tumorkontrolle kann nach 6 Monaten bis 1 Jahr bei über 95% liegen [14; 21].

2.6 Fragestellung

Die beschriebenen Ablationsverfahren haben sich in der Behandlung von Lebermalignomen etabliert. Es stellt sich allerdings die Frage, warum es trotz Sanierung des Primärtumors zu hohen Prozentsätzen an neuen Metastasen außerhalb des Ablationsgebietes kommt. Weitz et al. [85] konnten belegen, dass aufgrund der Manipulation am Tumor während konventioneller Resektion, Tumorzellen in die Blutbahn ausgeschwemmt werden. Ist die Zelldisseminierung während Ablation analog als Ursache für die unzureichende lokale Tumorkontrolle anzusehen? Ziel dieser Arbeit war es daher folgende offene Fragen zu beantworten:

- Etablierung und Evaluation des Modells der isolierten Rattenleberperfusion im offenen System
- Etablierung und Evaluation dieses Modells in Verbindung mit der Implantation von GFP-transfizierten CC531-Zellen in die Rattenleber und deren Nachweis

- Welche morphologischen Veränderungen können an Leber und den lokalen Metastasen nach lokaler Ablation beobachtet werden?
- Werden im Rahmen der lokalen Ablation Tumorzellen aus dem Zellverband gelöst und in die Blutbahn disseminiert?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche Wistar-Albino-Glaxo(WAG)-Rij-Ratten mit einem Körpergewicht von 180-200g aus der Tierzucht des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (Leiter: Prof. Dr. M.D. Menger) verwendet. Alle Tierversuche sowie die Tierhaltung entsprachen den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden nach Genehmigung durch die zuständige Behörde (Landsratsamt des Saarpfalzkreises, Homburg/ Saar) durchgeführt. Die Tiere wurden bis zu Versuchsbeginn und in dem Zeitraum von 10 Tagen nach Tumorzellimplantation unter klimatisierten Bedingungen in Käfigen zu 2 bis maximal 8 Tieren in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie gehalten. Pelletierte Standardnahrung und Wasser standen ihnen jeweils bis 2 Stunden vor Versuchsbeginn zur Verfügung. In die Versuche wurden nur Tiere aufgenommen, die keine Anzeichen für Erkrankungen sowie ein normales Fress- und Putzverhalten zeigten. Es wurde mit CC531-Zellen ein etabliertes Lebermetastasenmodell in der syngenen WAG-Rij-Ratte verwendet [12; 51; 86].

3.2 Tumorzellen und GFP-Transfektion

Um Tumorzellen nachweisen zu können, mussten diese dauerhaft markiert werden. Dies wurde mittels Einbringung einer Gensequenz möglich, die ein grün fluoreszierendes Protein kodiert, welches im Zytoplasma der Zellen exprimiert wird. Die Gensequenz wurde mittels eines Vektors eingebracht.

CC531-Zellen wurden mit einer Fremd-DNA, die eine GFP kodierende Sequenz, sowie ein Sequenz für ein Resistenzgen für Kanmycin, enthielt, transfiziert. Zur Durchführung der GFP-Transfektion der CC531-Zellen des Kolonkarzinoms der Ratte wurden diese zunächst bis zu einer Konfluenz von 60-90% in der Petrischale bebrütet. Clonfectin[®] Stocksolution (10µg/µl) (Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) wurde mit auf 50°C

erwärmten HEPES-Buffer (Clontech) im Verhältnis 1:10 vorsichtig auf Eis vermischt. Dadurch erhielt man eine Cloninfectin Worksolution mit einer Konzentration von $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Zusätzlich wurde eine Lösung aus $8\mu\text{l}$ Plasmid (Clontech) und $400\mu\text{l}$ Serum-Antibiotika freiem Medium (RPMI 1640 with L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) mit 20% FCS (Foetal Bovine Serum Gold; PAA)) hergestellt, sowie eine zweite Lösung aus $8\mu\text{l}$ der Cloninfectin Worksolution und $100\mu\text{l}$ Serum-Antibiotika freiem Medium. Die Lösungen wurden miteinander vermischt, 30min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend $1,8\text{ml}$ Serum-Antibiotika freies Medium (RPMI (PAA Laboratories)) zugesetzt. Die Zellen wurden zweimal mit Serum-Antibiotika freiem Medium gespült und über 4 Stunden mit 2ml der Cloninfectin-Plasmid-Lösung bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen erneut zweimal mit Serum-Antibiotika freiem Medium gespült und nach 24-72 Stunden die Selektion durchgeführt. Den Zellen wurde hierzu $200\mu\text{l}$ G148 (Kanamycin) zugesetzt, wodurch nur transfizierte, folglich G418-resistente Zellen selektiert wurden. Das verwendete Kanamycin konnte bei unzureichendem Ergebnis schrittweise auf bis zu $800\mu\text{l}$ gesteigert werden. Nach 2 Wochen wurden gesunde Zellen selektiert, erneut inkubiert und die GFP-transfizierten selektioniert, so dass eine Population von CC531-GFP-Zellen mit einer Transfektionsrate von $>95\%$ erzielt werden konnte.

3.3 Tumorzellaufbereitung und Implantation

CC531-GFP-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 in RPMI-Medium (RPMI 1640 with L-Glutamin; PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 20% FCS (Foetal Bovine Serum Gold; PAA) und Pen/Strep (100U/ml Penicillin/ 0,1mg/ml Streptomycin; PAA) kultiviert. Da sie ein adhärentes Wachstum aufweisen, mussten sie zur Aufbereitung für die Implantation zunächst mit 0,5% Trypsin/ 0,02% EDTA (PAA) vom Boden der Kulturschale abgelöst werden. Die abgelösten Zellen wurden mit 10ml Medium in Zentrifugenröhrchen (50ml Centrifuge Tube; Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gegeben und mit $550\times g$ (550G) 3min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet aufgerüttelt und nochmals mit RPMI+ 20%FCS+ Pen/Strep zentrifugiert, um das Trypsin auszuwaschen. Das

Pellet wurde in Medium gelöst und die absolute Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese Zellen wurden wiederum in PBS (PAA Laboratories) gegeben und mit 550xg 3min lang zentrifugiert, um das Medium vollständig auszuwaschen. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet mit RPMI aufgefüllt, um eine Konzentration von 250.000Zellen/ μ l zu erhalten. Davon wurden 40 μ l in eine Einmal-Feindosierungsspritze (Omnican[®] F; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aufgezogen, die somit ca. 1×10^7 Zellen enthielt.

Die Anästhesie der Ratte wurde zunächst mit Äther eingeleitet und das Körpergewicht ermittelt. Anschließend erfolgte die intraperitoneale Gabe Ketamin 80 mg/kg KG (Ketavet[®]; Pharmacia, Erlangen, Deutschland) und Xylazin 4 mg/kg KG (Rompun[®] 2%; Bayer Vital GmbH, Leverkusen). Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Augen mit Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) bestrichen und das Abdomen rasiert. Nach medianer Oberbauchlaparatomie von Nabel bis Xyphoid wurde das Abdomen aufgespannt. Der linke Leberlappen wurde mit feuchten Tupfern mobilisiert und so gelagert, dass die einem zugewandte Fläche möglichst eben zu liegen kam. Mit der vorbereiteten Mikroliterspritze wurde an der Oberseite am Rand des Lappens eingestochen und die Kanüle vorsichtig und langsam direkt unterhalb der Leberkapsel vorgeschoben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kanülenöffnung immer gut sichtbar war. Langsame Injektion der 40 μ l über mindestens zwei Minuten, wobei zu jeder Zeit ein gelber, scharf begrenzter, ungefähr drei Millimeter durchmessender Fleck über der Kanülenöffnung zu sehen sein musste. Vorsichtiges Entfernen der Kanüle und sofortige leichte Kompression der Einstichstelle mit einem Tupfer. Um den Austritt von Tumorzellen über den Stichkanal in den Peritonealraum zu unterbinden, wurde ein kleiner Tropfen Gewebekleber Enbucrilat (Histoacryl[®], B. Braun) auf die trockene Einstichstelle aufgebracht. Zurücklagern des Leberlappens, so dass die Zirkulation der gesamten Leber wieder vollständig gewährleistet war. Die Leber wurde großzügig mit NaCl 0,9% (Ecotainer[®]; B. Braun) umspült, um starke Verwachsungen zu verhindern. Nach der Lagekontrolle von Intestinum wurde die Bauchwand mit einer fortlaufenden Naht (Prolene[®] 3/0 SH-Nadel;

Ethicon, Brüssel, Belgien) verschlossen. Vor dem endgültigen Verschluss erfolgte die Gabe von 10 ml NaCl 0,9% intraperitoneal.

3.4 Leberentnahme

Zehn Tage nach der Tumorimplantation erfolgte die Entnahme der Leber. Die Anästhesie der Ratte wurde zunächst mit Äther induziert und nach Ermittlung des Körpergewichts wurde Pentobarbital-Natrium, 53,3 mg/kg KG (Narkoren®; Merial, Hallbergmoos, Deutschland) intraperitoneal injiziert. Das Tier wurde auf dem Rücken fixiert und Hals sowie Abdomen rasiert. Zur Verkleinerung des Totraumes und Verbesserung der spontanen Atmung des Tieres wurde eine Tracheotomie durchgeführt. Nach medianem Schnitt am Hals, wurde die Trachea zunächst freipräpariert und unter Schonung der Gefäße längs der Trachea quer eingeschnitten. Daraufhin wurde ein Polyethylen Katheter ID 1,67mm (Portex®; Smiths Medical, Hythe, United Kingdom) eingeführt und mit einer zuvor kaudal gelegten Schlinge fixiert. Mediane Laparotomie und V-förmige Erweiterung von Symphyse bis zum Rippenbogen und Aufspannen des Abdomens nach kranial. Mobilisation der Leber unter Durchtrennung der ligamentären Strukturen mit einer Mikroschere, wobei die Leber nur mit angefeuchteten Tupfern berührt wurde. Zum Schutz vor Austrocknung wurde die Leber mit feuchten Kompressen bedeckt. Auslagern der Darmschlingen nach links, Einspannen des Jejunums mit einer Klemme unter leichtem Zug nach links, so dass die Vena portae und der Gallengang gut einsehbar waren. Anschlingen des Gallengangs und Ligatur soweit distal wie möglich. Ligaturen der V. gastrosplenica und der V. pancreaticoduodenalis superior. Dann Kanülieren des Gallengangs mit einem Polyethylen Katheter ID 0,58mm (Portex®). Anschlingen der V. portae mit zwei Fäden distal der ersten Aufzweigung. Anschlingen der infrahepatischen V. cava inferior mit zwei Fäden kranial der V. renalis dextra. Nun Gabe von 250 I.E. Heparin (Heparin-Natrium; B. Braun) in die V. femoralis sinistra und Kontrolle des Perfusionssystems.

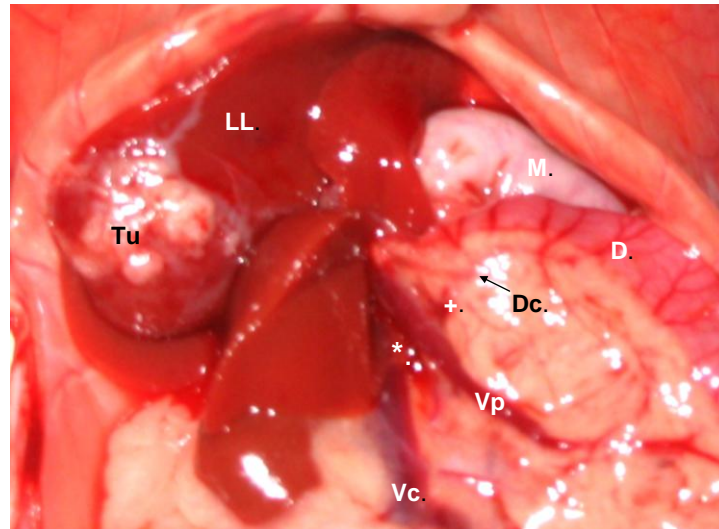


Abb. 1: Situs vor Explantation der Leber

Situs bei Explantation vor Legen der ersten Schlingen. Tu: Tumor, LL: Linker Leberlappen, M: Magen, D: Duodenum, Dc: Ductus choledochus, Vp: Vena portae, *: V. gastrosplenica, +: V. pancreaticoduodenale superior, Vc: Vena cava inferior

Verbinden einer Venenverweilkanüle (Venflon™ Pro; 20G; BD; Schweden) mit einem 3-Wege-Hahn (Discofix®, B. Braun) und entlüften mit NaCl 0,9%. Kanülierung der V. portae mit der Venenverweilkanüle und Befestigung mit Hilfe der vorgelegten Fäden. Die Kanülenspitze musste mindestens fünf Millimeter vor der ersten Aufzweigung der Vene liegen, da sonst die vollständige Perfusion der Leber nicht gewährleistet war. Flushen der Leber mit 100ml NaCl 0,9% über 10 Minuten mit einem Druck von ca. 100 cmH₂O, nachdem die infrahepatische V. cava inferior mit einer Venenverweilkanüle (Optiva™2; 14G; Ethicon, Brüssel, Belgien) kanüliert worden war. Die Leber wurde aufgedeckt. Falls notwendig wurde sie vorsichtig bewegt, um einen besseren Flush zu gewährleisten. Daraufhin Eröffnung des Thorax links des Sternums. Einschneiden des Zwerchfells entlang des Rippenbogens. Umstechung der suprahepatischen V. cava inferior unter Mitnahme des Zwerchfells, so dass die Aa. phrenicae in die Ligatur einbezogen waren (Vicryl 2-0 SH plus, Ethicon, Brüssel, Belgien). Nach Ende der Perfusion wurden die verbleibenden Strukturen durchtrennt und die Leber entnommen.

3.5 Isolierte Leberperfusion

Vor Beginn der Leberentnahme wurde Krebs-Henseleit-Puffer zur Leberperfusion wie folgt angesetzt: 6,90g Natriumchlorid, 0,36g Kaliumchlorid, 0,163g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,296 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 0,221g Calciumchlorid-Dihydrat und 2,1 g Natriumhydrogencarbonat wurden in 1l destilliertem Wasser unter Rühren und Erwärmen vollständig gelöst. (Sämtliche Salze von Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Anschluss der Leber an das Perfusionssystem und Inbetriebnahme der Pumpe (Beta[®] BT4a; ProMinent Dosiertechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit 144 Hüben/min und 50% Hubhöhe. Dadurch erhielt man 23ml Perfusat pro Minute. Oxygenierung des Puffers mit 4 l Carbogen/min (5% Kohlendioxid in Sauerstoff, Air Liquide GmbH, Berlin, Deutschland) und Erwärmen auf 37°C. Messen und Notieren der Zeit, die von der Ligatur der V. portae bis zur Inbetriebnahme der Pumpe verstrich.

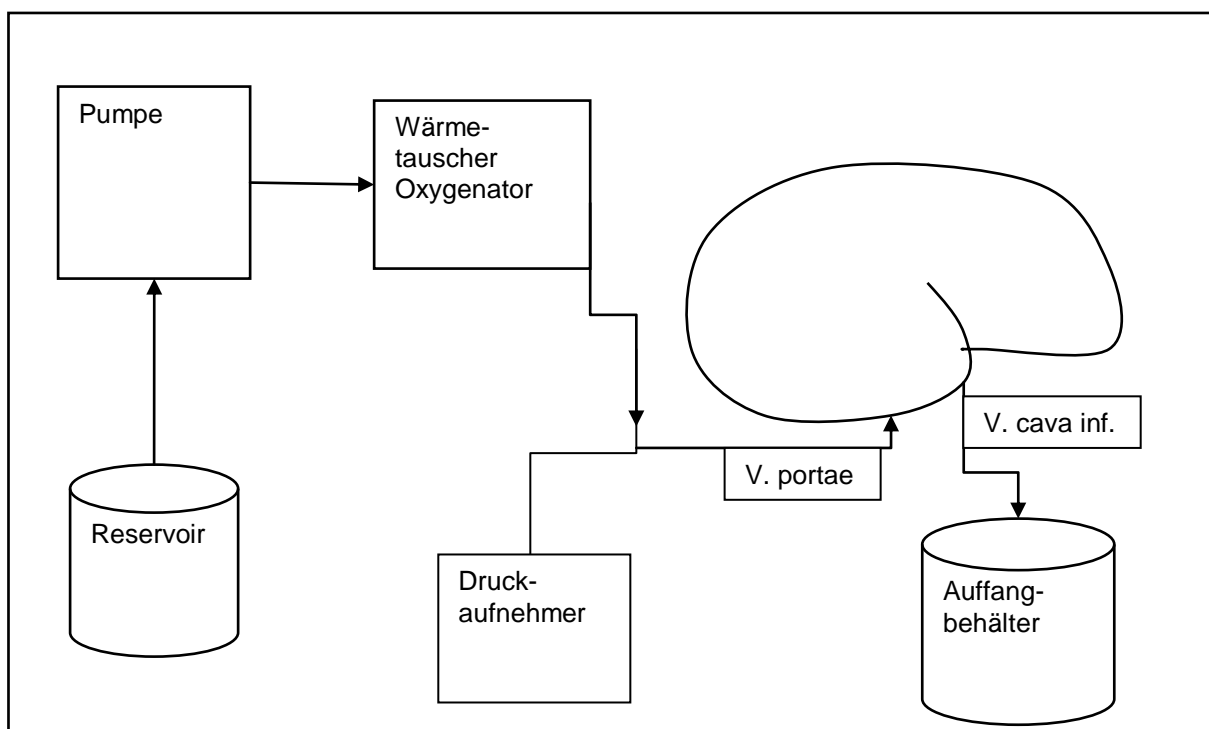
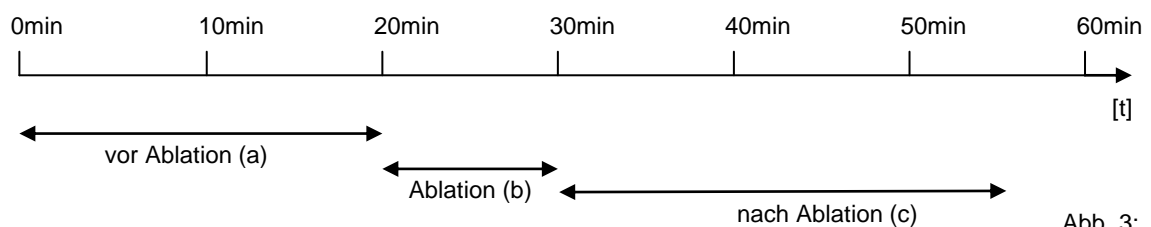


Abb. 2: Isolierte extrakorporale Rattenleberperfusion

Versuchsaufbau der isolierten extrakorporalen Rattenleberperfusion im offenen System mit pulsatilem Pumpe. Das Perfusat wird durch die Pumpe aus einem Reservoir mit 144 Hüben pro Minute, das entspricht 23ml pro Minute, gepumpt. In einem Wärmeaustauscher/ Oxygenator wird es auf 37°C erwärmt und mit Carbogen versetzt. Der Druck wird kontinuierlich gemessen. Nach Perfusion der Leber gelangt das Perfusat in den Auffangbehälter.

Das Perfusat aus der V. cava inferior wurde kontinuierlich aufgefangen und in Zentrifugenröhrchen (50ml Centrifuge Tube; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) aufbewahrt. Diese waren mit den Buchstaben „a“, „b“ oder „c“ markiert, um eine Zuordnung zum Abnahmezeitpunkt zu ermöglichen. Hierbei stand „a“ für Abnahme vor Ablation, „b“ für Abnahme während der Ablation und „c“ für Abnahme nach der Ablation (s. auch Abb. 3). Mit Hilfe eines Druckaufnehmers wurde der Perfusionsdruck [mmHg] kontinuierlich gemessen und im Abstand von 5 min dokumentiert. Die Therapie wurde nach einer Perfusion von 20 Minuten gestartet. Sechzig Minuten nach Beginn der Perfusion wurde diese beendet.



Zeiträume der Probenentnahmen

Abb. 3:

Vor Durchführung der Therapie wurde der Durchmesser (d) des Tumors an der Oberfläche ausgemessen. Nach Beendigung der Perfusion wurde die Tiefe des Tumors (h) ausgemessen. Da die Tumoren die Form der Hälfte eines Ellipsoids aufweisen, wurde das Tumolvolumen mit folgender Formel berechnet: $[4/3 \cdot \pi \cdot (d/2)^2 \cdot h/2]/2$. Nach Beendigung der Therapie wurde das Läsionsvolumen bestimmt. Hierzu wurden zwei zueinander rechtwinklig stehende Durchmesser (d_1 und d_2) der Läsion auf der Leberoberfläche ausgemessen, sowie die Tiefe der Läsion (d_3). Aufgrund der Tatsache, dass die Läsion ebenfalls die Form eines halbierten Ellipsoids aufweist, wurde das Läsionsvolumen mit folgender Formel berechnet: $[4/3 \cdot \pi \cdot (d_1/2 \cdot d_2/2 \cdot d_3/2)]/2$.

3.6 Versuchsprotokoll

Die Tiere wurden vor Beginn der Leberexplantation in 4 Gruppen randomisiert. Bei den der Kryogruppe zugehörigen Lebern wurde 20 min nach Beginn der Perfusion eine Kryotherapie durchgeführt. Analog erfolgte bei der RFA-Gruppe eine Radiofrequenzablation und bei der LITT-Gruppe eine Laserinduzierte Thermotherapie. In der Kontrollgruppe wurde keine Ablation durchgeführt, die Lebern wurden über 60 min kontinuierlich perfundiert. Allerdings wurden ebenso wie bei den drei Therapiegruppen Thermomesssonden in 5 und 10 mm Abstand zum Tumor eingebracht, um die Versuchsbedingungen in den Gruppen gleich zu halten.

Gruppenbezeichnung	Therapieart	Anzahl n
Kontrolle	keine Therapie	8
Kryo	lokale Kryotherapie	8
RFA	lokale Radiofrequenzablation	8
LITT	lokale Laserinduzierte Thermotherapie	8

Tab. 1: Anzahl der Tiere pro Gruppe und Gruppenbezeichnung

3.7 Kryotherapie

Vor Beginn der Therapie wurde die Sonde (Durchmesser 3,2 mm) des Ablationsgerätes CRYO6 (ERBE, Tübingen, Deutschland) mit leichtem Druck senkrecht auf das Zentrum des Tumors aufgesetzt und mit Hilfe eines Stativs fixiert. Im Abstand von 5 und 10 mm vom Sondenrand wurden die Thermomesssonden (Durchmesser 400µm) des Thermometers ERBE ET1 (ERBE) in das Gewebe eingebracht. 20 min nach Start der Perfusion wurde mit der Therapie begonnen und die Sondenspitze auf -168°C heruntergefroren und diese Temperatur für 30 Sekunden gehalten. Das passive Auftauen bis auf eine Temperatur von -30°C an der Sondenspitze wurde abgewartet, dann erneutes Frieren auf -168°C und Halten der Temperatur für weitere 30 Sekunden. Daraufhin wurde die Therapie mit erneutem passivem Auftauen beendet. Bei Erreichen definierter Temperaturen an der Spitze der Kryosonde (s. Abb. 3) wurden Zeit, Temperatur an den Temperatursonden und der Perfusionsdruck dokumentiert. Die Kryosonde wurde bis zum Ende der Perfusion auf der Tumoroberfläche belassen.

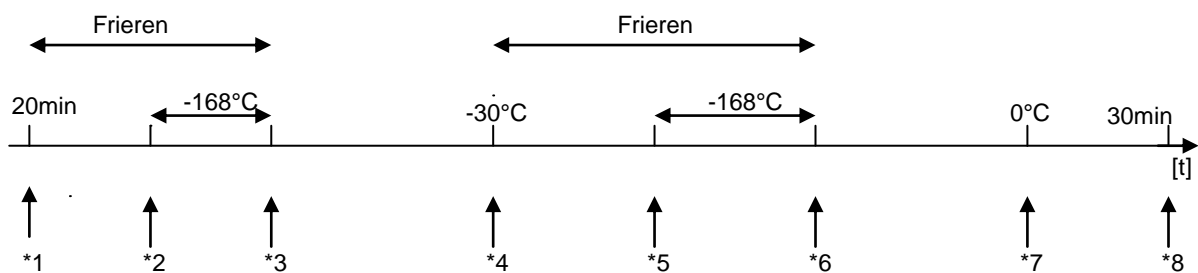


Abb. 4: Dokumentation Kryotherapie

*1-*8= Dokumentation von Zeit, Druck und Temperatur in 5 bzw. 10 mm Abstand zur Sonde

3.8 Radiofrequenzablation

Für die RFA wurde die Leber auf eine Einmal-Erdungselektrode (Radionics; EUROPE N.V.; Gent; Belgien) gelegt. Vor Beginn der Therapie wurde der Applikator (Radionics HF-Elektroden-Kit Cool-tip™) in das Zentrum des Tumors eingebracht, in einem Stativ fixiert und die Temperatursonden in 5 und 10 mm Abstand zum Applikator eingebracht. Zudem wurde die Pumpe in Betrieb genommen, die die Applikatorspitze mit NaCl 0,9% (Ecotainer®; B. Braun) während der Therapie kühlte. Ablation mit dem Radionic™ Cool-tip RF-System Tip (tyco healthcare, Boulder, CO, USA) über 3 min mit einer Leistung von 7 Watt. Zu den definierten Zeitpunkten (s Abb. 4) wurden der Perfusionsdruck, sowie die Temperaturen an der Applikatorspitze und an den Temperatursonden dokumentiert. Zudem wurden 1 min nach Beginn der RFA der Widerstand und die Stromstärke an der Applikatorspitze gemessen. Im Falle eines Leistungsabfalls, wurde dies durch Erhöhen des Outputs ausgeglichen. Die genannten Parameter wurden über 7 weitere Minuten erhoben. Der Applikator wurde bis zum Ende der Perfusion an der Leber belassen.

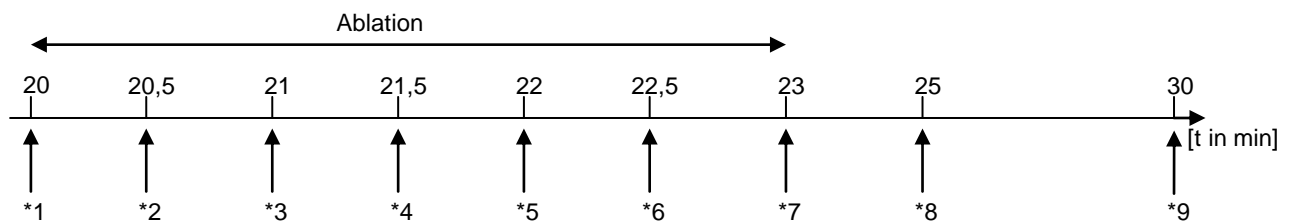


Abb. 5:

Dokumentation Radiofrequenzablation

*1-*9= Dokumentation; *3= Dokumentation von Widerstand [Ω] und Stromstärke [A]

3.9 Laserinduzierte Thermotherapie

Vor Beginn der Therapie wurde die genaue Leistung [W] des Lasers bestimmt und dokumentiert. Daraufhin wurde die Lasersonde in das Zentrum des Tumors und Temperatursonden im Abstand von 5 und 10 mm eingebracht und in einem Stativ fixiert. Laserablation über 8 min mit einer Leistung von 7 Watt in Dauerstrichbetrieb (continuous wave). Zu den definierten Zeitpunkten (s. Abb. 5) wurden der Perfusionsdruck, sowie die Temperaturen an der Applikatorspitze und an den Temperatursonden dokumentiert. Die genannten Parameter wurden über weitere 2 Minuten erhoben. Die Lasersonde wurde bis zum Ende der Perfusion im Tumor belassen.

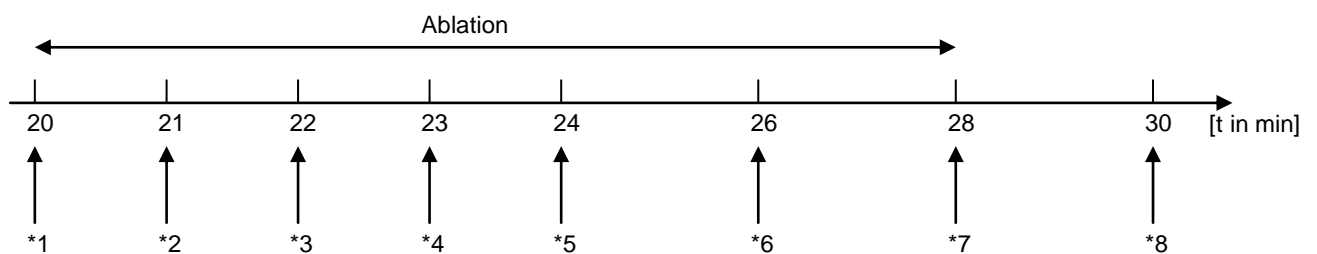


Abb. 6: Dokumentation Laserinduzierte Thermotherapie

*1-*8= Dokumentation von Druck [mmHg], Temperatur[°C] der Ablationssonde und Temperatur [°C] in 5 bzw. 10 mm Abstand zur Sonde

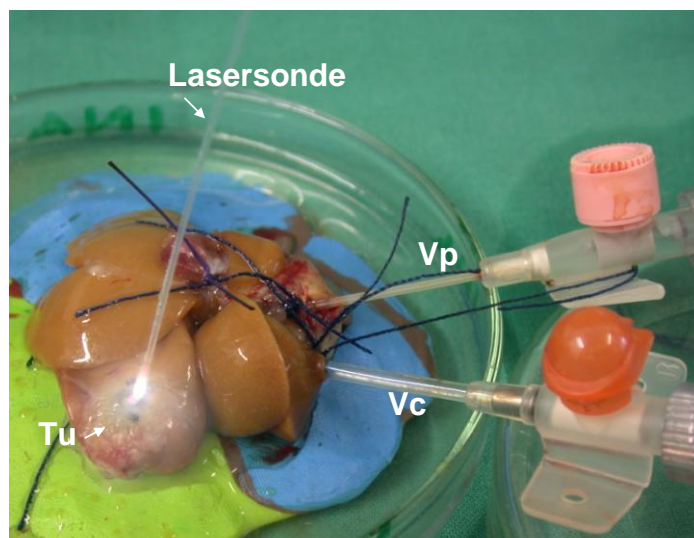


Abb. 7: Perfusion

Leber angeschlossen an das Perfusionssystem während der Therapie am Beispiel der LITT. Vp: Venenverweilkanüle in der Vena portae, Vc: Venenverweilkanüle in der Vena cava, Tu: Tumor

3.10 Aufbereitung Perfusat und DNA-Extraktion

Im Anschluss an die Perfusion wurde das Perfusat von a, b und c mit 550xg über 5min zentrifugiert (Zentrifuge CR 412, Jonan) und der Überstand abpipettiert. Jedes Pellet wurde dreimal gewaschen, indem es mit RPMI-Medium aufgemischt wurde (Vortex[®], Heidolph Reax Top, Fisher Scientific) und jeweils erneut bei 550xg über 5min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert wurde. Aus dem gewaschenem Pellet wurde die DNA mit Hilfe des QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) isoliert. Hierzu wurden zunächst 200µl PBS zu dem Pellet gegeben, um es aufzulösen. In einem Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde der entstandenen Lösung 20µl Protease (Proteinase K[®]) und 200µl Lysepuffer (Buffer AL[®]) zugefügt, gründlich gemischt (Vortex) und 10min bei 56°C im Wärmeblock (DRI-Block[®], Techne, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) inkubiert. Durch die Zugabe von 200µl Ethanol (96-100%) wurde die DNA ausgefällt. Eine QIAamp[®] Spinsäule wurde einem 2ml Sammelröhrchen aufgesetzt und die Lösung auf die Säule gegeben. Dies wurde 1min bei 550xg zentrifugiert, um die DNA in der Säule zu binden. Die Säule wurde in ein neues Sammelröhrchen gegeben. Die abzentrifugierte Flüssigkeit des Ansatzes wurde nun erneut auf die Säule gegeben und nochmals über 1min bei 550xg zentrifugiert, um die Menge an DNA zu maximieren. Auf ein frisches Sammelröhrchen gesetzt wurden 500µl Waschpuffer (AW1 Buffer[®]) auf die Säule gegeben und 1min bei 550xg zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dann mit 500µl AW2[®] Waschpuffer wiederholt und über 5min bei 550xg zentrifugiert. Die Spinsäule wurde nun auf ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) gesetzt und 50µl Elutionspuffer (AE Buffer[®]) zugegeben. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation über 1min bei 550xg zur Lösung der DNA aus der Säule, wurde die Probe auf drei Reaktionsgefäße verteilt und die Aliquots bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.11 Nachweis GFP-transfizierter Tumorzellen

Um eine quantitative Aussage über die Nachweisgrenze und den Gehalt an Zellen im Perfusat machen zu können, wurde zunächst eine Verdünnungsreihe erstellt. Hierzu wurde eine anteilig abnehmende Menge (10^1 - 10^6) von CC531- GFP-Zellen mit einer konstanten Menge von (1×10^6) nicht transfizierten CC531-Zellen vermischt und die GFP-Expression der Aliquots mit den unten beschriebenen Methoden (Western Blot, PCR und Real Time PCR) gemessen.

Zum GFP-Nachweis in den etablierten Tumoren wurden zusätzlichen Versuchstieren, wie in 2.3. beschrieben, Tumorzellen implantiert. Nach 10 Tagen wurden die Tiere wie in 2.4. beschrieben narkotisiert und der makroskopisch sichtbar Tumor aus der Leber exzidiert. Dieser Tumor wurde in Lysisbuffer (10mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan TRIS, pH 7,5; 10mM NaCl; 0,1mM EDTA; 0,5% Triton X100; 0,02% NaN_3 (Roth)) mit 3 μ l Proteinaseinhibitor-Cocktail ((1:75, Sigma, Taufkirchen, Deutschland), 100mM PMSF (1:75, Sigma) und 6 μ l 100mM PMSF (Roth) gelöst, 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation mit 16000xg bei 4°C wurde der Überstand abpipettiert und die erhaltenen Proteinextrakte mittels Western Blot untersucht. Für PCR bzw. Real Time PCR wurde aus den lysierten Zellen DNA isoliert und die DNA-Konzentration auf 1ng DNA/1 μ l respektive 1ng DNA/20 μ l HPLC-Aqua dest. eingestellt. Hierzu wurde zunächst die Ausgangskonzentration in der Probe photometrisch gemessen und das entsprechende Volumen HPLC-Aqua dest. hinzugegeben.

3.12 Western Blot Technik

Beim Western- bzw. Immunoblotting handelt es sich um eine quantitative Methode zur Ermittlung von Proteinkonzentrationen in verschiedenen Proben. Nach Extraktion der Proteine aus einer Zellsuspension, werden diese in einer Gelmatrix im elektrischen Feld aufgetrennt und die entstandenen Banden durch eine zweite Elektrophorese auf eine Membran transferiert. Die Targetproteine werden mit einem Enzym-konjugierten Antikörper

markiert und durch eine lichtemittierende Enzym-Substrat-Reaktion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Nach Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale mit 0,5%Trypsin/ 0,02%EDTA (PAA) und anschließendem zweimaligem Waschen mit 4°C-kaltem sterilem PBS Puffer, wurde das entstandene Pellet in 300µl Lysispuffer (10mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan TRIS, ph 7,5; 10mM NaCl; 0,1mM EDTA; 0,5% Trton X 100; 0,02% NaN₃ (Roth)), Proteinaseysecocktail (1:75, Sigma) und 6µl 100mM PMSF (1:75, Sigma) resuspendiert, auf Eis inkubiert, anschließend zentrifugiert und die Aliquots bei -20°C kryokonserviert oder direkt der weiteren Analyse zugeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels der colorimetrischen Methode nach Lowry. Die Proben wurden auf 30µg/20µl eingestellt. Die Gele wurden in einer vertikalen Flachgelapparatur nach Anleitung des Herstellers (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegossen und die Geltaschen mit 20µl Proteinsuspension beladen. Die Passage der Proteine durch das Trenngel wurde durch Anlegen einer Spannung von 140V über ca. 1 Stunde erreicht. Die nun auf dem Gel getrennten Proteinbanden wurden in einer Blotkammer unter Verwendung von Transferpuffer (25mM TRIS Base, 193mM Glycin in A.dest.) in einer zweiten Elektrophorese mit 50V über 2 Stunden auf eine mit Methanol equilibrierte PVDF-Membran (BioRad) transferiert. Nach Bindung des spezifischen unkonjugierten Primärantikörpers (Maus-Anti-GFP, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland) am Targetprotein auf der Membran und eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers (Schaf-Anti-Maus-IgG-POD, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) entstand unter dem Einsatz eines Chemilumiszenz-Substrats (ECL, Amersham), ein Licht emittierendes Produkt, welches dann auf einem Röntgenfilm die Position und Expressionsstärke des Targetproteins sichtbar machte. Die Ausprägung der an einer definierten Stelle vorhandenen Bande korreliert direkt mit der Expressionsstärke des Grün Fluoreszierenden Proteins.

3.13 PCR Technik

Bei der PCR handelt es sich um ein semiquantitatives Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins bestimmter Gene. Nach Extraktion der DNA aus kultivierten CC531-GFP-Zellen wurden nach photometrischer DNA-Konzentrationsbestimmung die Ansätze auf den gleichen DNA-Gehalt eingestellt (analog zu 2.9). Im Folgenden wurden die verschiedenen Proben der Polymerasekettenreaktion im ThermoCycler (MasterCycler personal, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zugeführt. Hierbei handelt es sich um eine *in vitro* Herstellung millionenfacher Kopien eines bestimmten DNA Fragmentes, in diesem Fall des GFP-Genes. Nach Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 94°C erfolgte bei 55°C die Hybridisierung eines komplementären Oligonukleotids. Ausgehend vom 3'-Ende dieses sog. Primers wurde ein neuer Doppelstrang durch spezielle thermostabile DNA-Polymerasen synthetisiert. Im Anschluss erfolgte die DNA-Gelelektrophorese bei 100V in 2% Agarosegel (1g Agarose + 50ml TBE-Puffer 1x, Roth) in einer horizontalen Gelkammer. Die Visualisierung der so entstandenen Banden erfolgte durch Anfärbung mit dem Nukleinsäure spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Roth), welcher bei Anregung durch UV-Licht rot-orange fluoresziert. Die Bandenstärke auf dem Agarosegel ist direkt proportional zum Anteil der entsprechenden DNA. Zur Kontrolle wurde in allen Ansätzen das ubiquitär vorhandene Haushaltsprotein β -Actin amplifiziert, welches in allen Ansätzen die gleiche Bandenstärke aufweisen musste.

	5'-3' Nukleotidsequenz
GFP-AS	CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG
GFP-S	CACGAACTCCAGCAGGACCATG
β -Actin-AS	TGCTTCTAGGCGGACTGTTACTGA
β -Actin-S	GACGCGACCATCCTCCTCTTAG

Tab. 2: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer

3.14 Real Time PCR Technik

Die Real Time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name „Real Time“). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufes (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente zur Quantifizierung, wie dies bei der herkömmlichen PCR nötig ist, erübrigt sich. Um den GFP Nachweis in den Proben mittels Real Time PCR zu erbringen, musste die DNA-Konzentration auf 1ng DNA/20µl HPLC-Aqua dest. eingestellt werden (analog zu 2.9). Sämtliche Real Time PCRs wurden mit Primern und Reaktionsmedien von Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die Analysen erfolgten nach Anleitung des Herstellers. Hierfür wurden pro Reaktion je 10µl 2xTaqMan PCR Universal Master Mix No AmpErase[®], 1µl gene assay (Applied Biosystems), 8µl RNase freies Wasser und 1µl isolierte genomische DNA (1ng/20µl) eingesetzt. Zur Signaldetektierung wurde der ABI Prism 7900 sequence detector auf einen Startzyklus von 10min bei 95°C programmiert, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus je 15s bei 95°C und 10min bei 60°C. Nach jedem Zyklus wurde eine Messung durchgeführt und anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale konnte der C_T-Wert erfasst werden.

3.15 Histomorphologische Auswertung

Um das Ausmaß der durch die Ablation entstandenen histomorphologischen Veränderungen zu bestimmen, wurde nach Beendigung der Perfusion bei jedem Tier eine Gewebeprobe entnommen. Diese enthielt makroskopisch Anteile des Tumors, der Läsion und normaler, nicht abladiertes Leber. Die Probe wurde sofort in einer Einbettkassette (VWR, Darmstadt, Deutschland) in 4%igem Formaldehyd (Roti®-Histofix, Carl Roth GmbH + Co. KG) fixiert, später in Paraffin eingebettet und 4µm feine Schnitte angefertigt. Diese wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die normale Leber, der abladierte Tumor sowie die peritumorale Ablationszone in 10 verschiedenen Feldern pro Tumor, bzw. Leber nach folgenden Kriterien semiquantitativ ausgewertet: Intaktheit der Azinusstruktur und der intralobulären Balkenstruktur in 10facher Vergrößerung. In 20facher Vergrößerung wurde nach intrasinusoidalen zellulären Fragmenten gesucht und der prozentuale Anteil auf der Gesamtfläche des Blickfeldes berechnet. Außerdem wurde der prozentuale Anteil der intakten Hepatozyten in 40facher Vergrößerung bestimmt. Die Zellkerne wurden auf normales oder pyknotisches Aussehen, mit Kondensation des Kernchromatins ebenfalls in 40facher Vergrößerung untersucht. In 10facher Vergrößerung wurde nach Vorhandensein von Gefäßen mit Fibrinthromben und Gefäßen mit Zellen im Lumen gesucht. Die jeweiligen Befunde wurden nach dem unten aufgeführten Punktesystem (Tab. 3) klassifiziert.

Parameter	Vergrößerung	Punktesystem
Azinusstruktur/ intralobuläre Balkenstruktur	A (10er)	0 = keine Struktur erhalten; 3 = unveränderte Struktur
Intrasinusoidale zelluläre Fragmente	B (20er)	0 = keine; 1 = <10%; 2 = <30%; 3 = ≥30%
Intaktheit Hepatozyten	C (40er)	0 = 100%; 1 = 70-99%; 2 = 50-69%; 3 = <50%
Chromatinkondensation	D (40er)	0 = 0%; 1 = 1-10%; 2 = 11-30%; 3 = >30%
Gefäße mit Fibrinthromben	E (10er)	0 = nein; 1 = ja
Gefäße mit Zellen im Lumen	F (10er)	0 = nein; 1 = ja

Tab. 3: Semiquantitative histomorphologische Auswertung
Beurteilte Kriterien in verschiedenen Vergrößerungen und Scores.

3.16 Statistik

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Prüfung auf Normalverteilung unter Verwendung des Computerprogramms Sigma Stat for Windows (Statistical Software, Jandel Scientific Software, Erkrath). Der Vergleich zwischen den Versuchsgruppen wurde nach einfaktorieller Varianzanalyse (one way ANOVA) mit dem post-hoc Student-Newman-Keuls Test vorgenommen. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Proliferationsrate der Tumorzellen

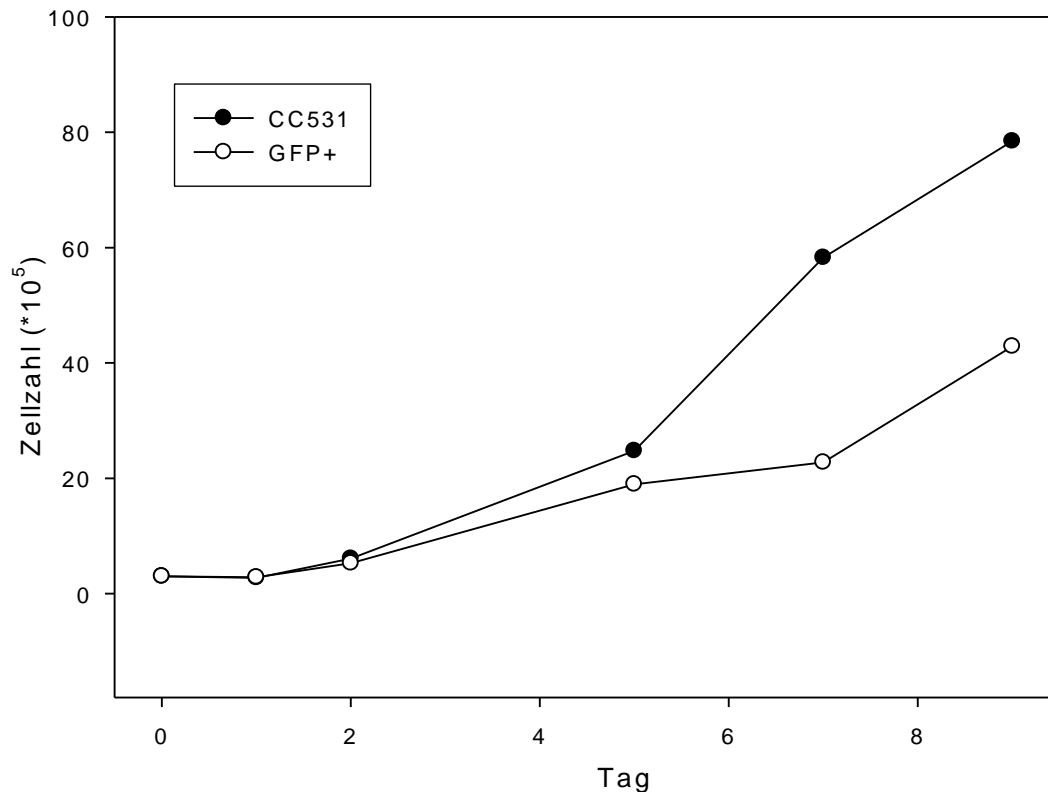


Abb. 8: Wachstumskurven

zeigt die Wachstumskurven der Zellen in Zellkultur. ● Wachstumskurve der nicht GFP-transfizierten CC531-Zellen, ○ Wachstumskurve der GFP-transfizierten CC531-Zellen. Verdopplungszeit der GFP+ Zellen liegt mit 26,84 Stunden deutlich über der der GFP- Zellen mit 20,81 Stunden. Die Verminderung der Teilungsrate beträgt 29%.

Die Proliferationsrate der GFP-transfizierten Zellen lag deutlich unter der der nicht transfizierten Zellen. Nach einem Zeitraum von 7 Tagen hatten sich die angesetzten 3×10^5 CC531-Zellen *in vitro* durch Teilung auf 58,25 Zellen vermehrt. Die GFP-transfizierten Zellen erreichten nach 7 Tagen Inkubation lediglich eine Zellzahl von 22,75. Das ergibt für die GFP-transfizierten CC531-Zellen im Median eine Verdopplungszeit von 26,84 Stunden während die normalen CC531-Zellen im Median 20,81 Stunden zur Teilung benötigten. Dies entspricht einer Verminderung der Teilungsrate um 29%.

4.2 Versuchstiere und Perfusionssystem

	Gewicht [g]	Narkose [ml]
Kontrolle	184,75 ±4,27	0,20 ±0,00
Kryo	187,50 ±7,19	0,20 ±0,01
RFA	187,44 ±4,85	0,19 ±0,01
LITT	184,78 ±6,33	0,19 ±0,01

Tab. 4: Gewicht und Narkosemenge bei Tumorzellimplantation, alle Werte sind MW ±SEM

	Gewicht [g]	Narkose [ml]
Kontrolle	182,50 ±6,70	0,19 ±0,00
Kryo	184,00 ±7,57	0,20 ±0,01
RFA	184,22 ±4,27	0,19 ±0,01
LITT	181,78 ±5,84	0,18 ±0,01

Tab. 5: Gewicht und Narkosemenge bei Leberentnahme, alle Werte sind MW ±SEM

In die Arbeit wurden ausschließlich Ratten mit einem Gewicht von 180-200g einbezogen, um ein vergleichbares Lebergewicht zu erhalten. Die Tiere hielten ihr Gewicht in den 10 Tagen bis zur Explantation der Leber ohne nennenswerten Gewichtsverlust stabil. Auch die benötigte Narkosemenge war in allen Gruppen gleich.

Nach Kanülierung der Vena portae wurde die Leber für einen kurzen Zeitraum nicht oxygeniert und Stoffwechselmetabolite konnten nicht abgepuffert werden. Nach Kanülierung der Vena cava wurde die Leber an das Perfusionssystem angeschlossen, mit oxygeniertem und mit Carbogen angereichertem Perfusat angeschlossen und angefallene saure Metabolite abgepuffert. Die Zeit, die bis zum Anschluss an das Perfusionssystem jeweils benötigt wurde, betrug in allen Gruppen durchgehend zwischen 14 und 15min (s. Tab. 6).

	Zeit [min]
Kontrolle	14,50 ±0,87
Kryo	14,38 ±0,80
RFA	15,11 ±0,45
LITT	14,56 ±0,93

Tab. 6: Zeit Kanülierung der V. portae bis Beginn der Perfusion, alle Werte sind MW ±SEM

4.3 Volumina der Tumoren und Läsionen

	Durchmesser d [mm]	Durchmesser h [mm]	Volumen [mm ³] [4/3*π*(d/2) ² *h/2]/2
Kontrolle	6,8 ±1,0	5,8 ±1,1	72,8 ±22,5
Kryo	5,0 ±0,5	5,3 ±0,6	40,6 ±10,8
RFA	5,4 ±0,5	5,9 ±0,5	52,2 ±15,2
LITT	4,7 ±1,0	5,3 ±1,1	74,1 ±56,9

Tab. 7: Tumorgröße, MW ±SEM

	Durchmesser d ₁ [mm]	Durchmesser d ₂ [mm]	Durchmesser d ₃ [mm]	Volumen [mm ³] [4/3*π*d ₁ /2*d ₂ /2*d ₃ /2]/2
Kryo	19,8 ±1,8	13,1 ±1,2	7,6 ±1,0	579,6 ±157,0
RFA	13,8 ±0,8	12,3 ±0,6	7,3 ±0,5	337,5 ±50,0
LITT	12,8 ±1,1	10,8 ±1,3	7,4 ±0,8	300,4 ±69,9

Tab. 8: Volumen der Ablationsläsion, MW ±SEM

Die Größe der Tumoren 10 Tage nach Tumorzellimplantation in die Leber, wurde unter Annahme der Form eines Ellipsoids berechnet. Die Halbachsen eines Ellipsoids sind jeweils die Tumordurchmesser geteilt durch zwei. Obwohl die Größe der Tumoren variierte, in der LITT-Gruppe fanden sich im Mittel die größten Tumoren, in der Kryogruppe die kleinsten, zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen allen vier Gruppen. Zur Berechnung des Volumens der erzeugten Ablationsläsion wurde ebenfalls die Form eines Ellipsoids angenommen. Das Volumen der Läsionen überschritt jeweils deutlich das Volumen der Tumoren. Die Kryotherapie erzeugte die größeren Läsionen, im Vergleich zu RFA und LITT, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war.

4.4 Perfusionsdruck während der isolierten Leberperfusion

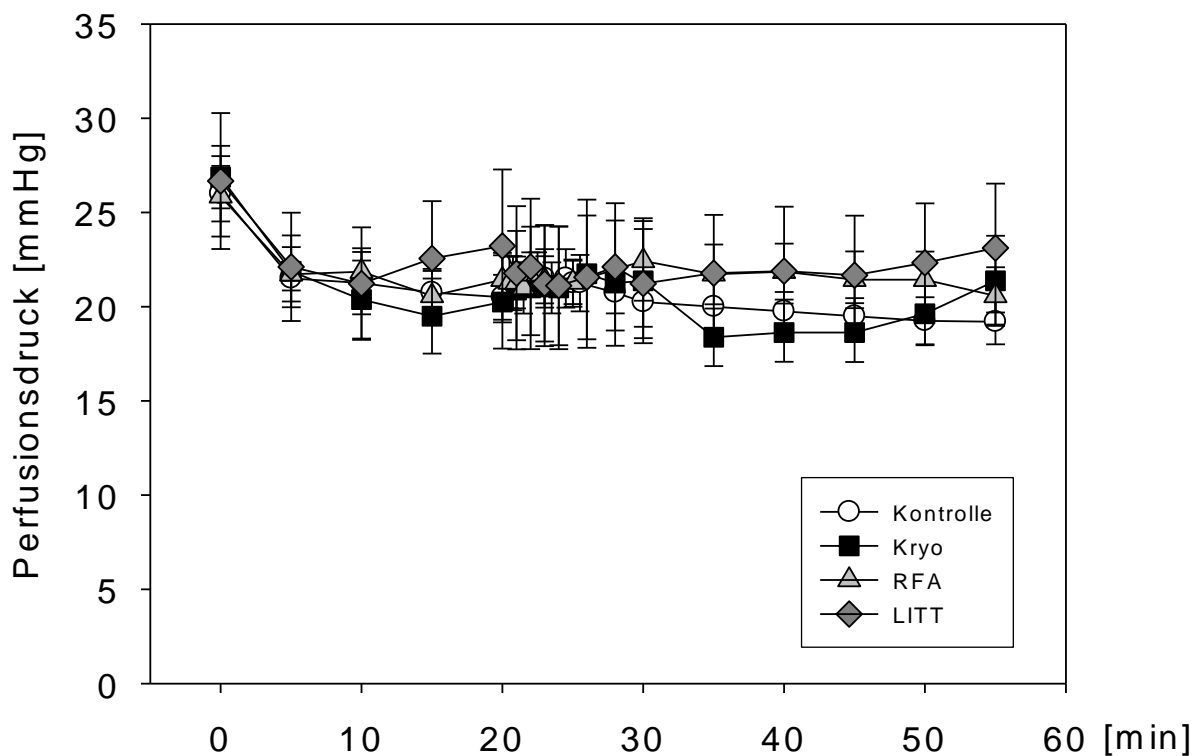


Abb. 9: Perfusionsdruck zeigt die Veränderungen des Druckes im Perfusionssystem der Kontrollgruppe und der Therapiegruppen während der Perfusion.

Die Leber wurde zunächst mit 100ml NaCl 0,9% mit 20cmH₂O (14,7mmHg) geflushed und nach Kanülierung der Vena cava an das Perfusionssystem angeschlossen. In allen Gruppen zeigte sich zwischen der ersten Messung nach Anschluss der Leber an das System und der zweiten Messung nach fünf Minuten ein Druckabfall von im Mittel 5mmHg. Der Perfusionsdruck blieb dann bis zu Beginn der Therapie in allen vier Gruppen konstant und blieb auch während und nach der Therapie in allen Gruppen im Mittel konstant. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden nicht.

4.5 Temperaturen während der isolierten Leberperfusion

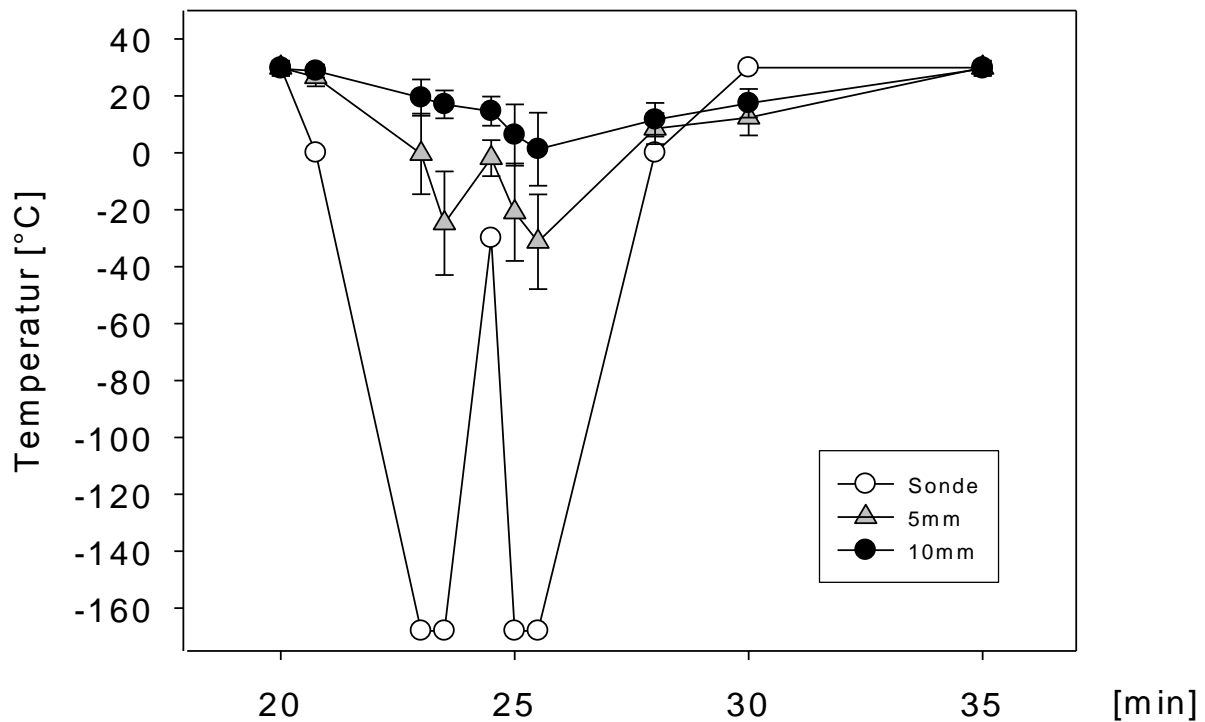


Abb. 10: Temperatur Kryotherapie zeigt die Änderung der Temperatur während der Kryotherapie an der Sonde, sowie im Abstand von fünf und zehn Millimeter zur Sonde.

Die geforderte Temperatur von kleiner -20°C wurde im Bereich der Kryosonde nach kurzer Zeit erreicht und über mehrere Minuten gehalten. Im Abstand von 5mm zur Kryosonde erfolgte der Temperaturabfall mit Verzögerung und blieb dann über den Therapiezeitraum unter 0°C . In 10mm Entfernung zur Kryosonde konnte lediglich ein diskreter Temperaturabfall beobachtet werden.

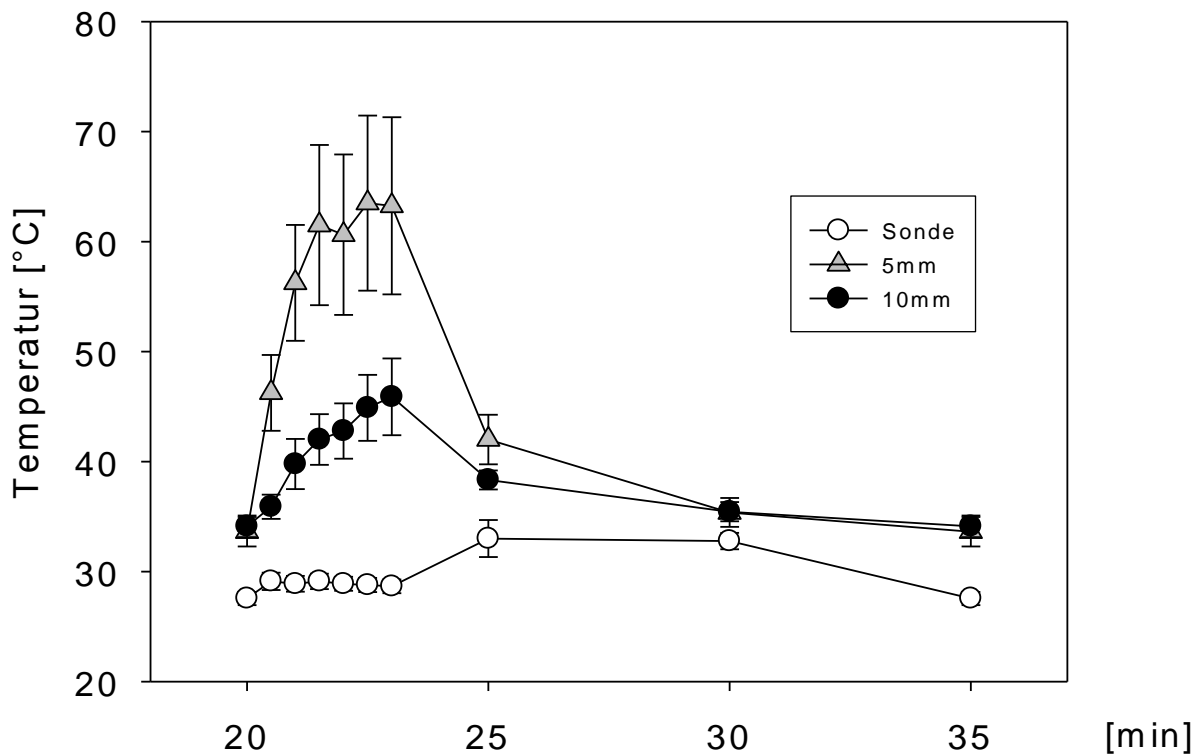


Abb. 11: Temperatur Radiofrequenzablation zeigt die Änderung der Temperatur während der RFA an der Ablationssonde sowie im Abstand von 5 und 10 mm zur Sonde.

Die Temperatur der Sondenspitze (RFA) blieb durch die kontinuierliche Kühlung während der Ablation konstant. Im ablatierten Bereich war die Veränderung in 5mm Abstand zur Sonde gekennzeichnet durch einen steilen Anstieg mit Beginn der Therapie und von einem raschen Abfall nach Beendigung. Der geforderte Temperaturanstieg auf 55-60°C wurde deutlich erreicht und über einen Zeitraum von mehreren Minuten gehalten. In 10mm Abstand zur Sonde war der Temperaturanstieg deutlich flacher. Hier wurde die Temperatur von mindestens 55°C nicht erreicht.

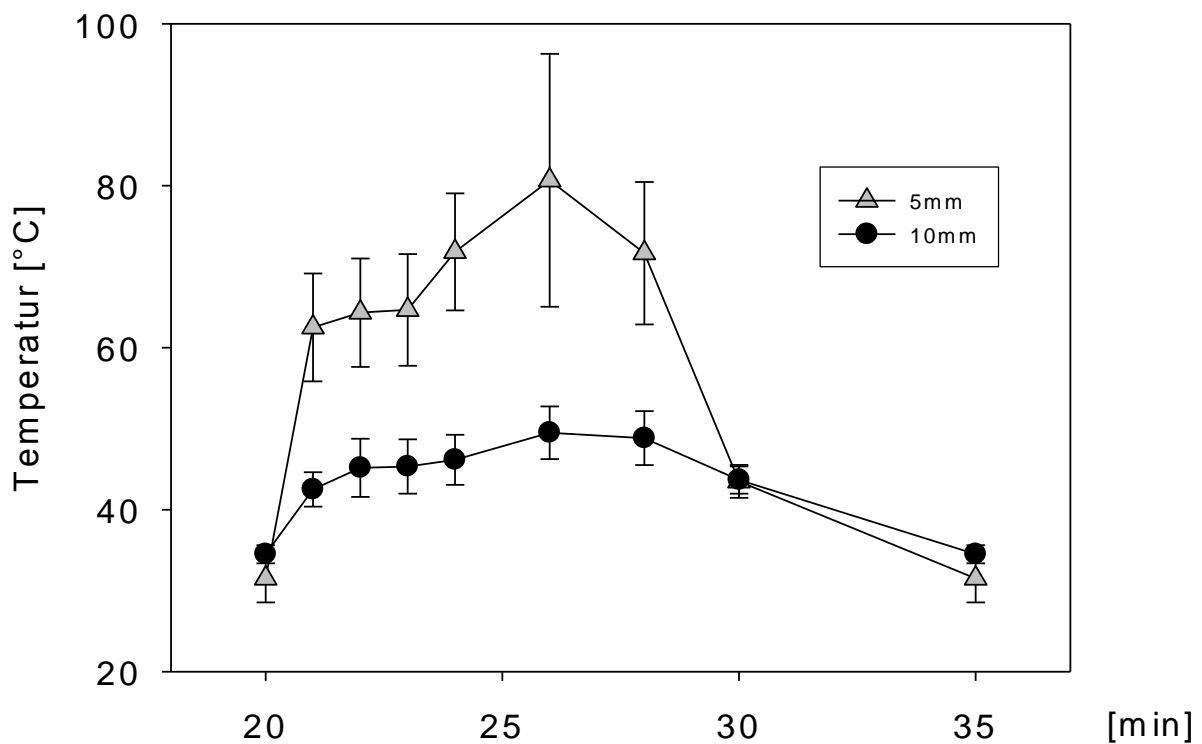


Abb. 12: Temperatur Laserinduzierte Thermotherapie zeigt die Änderung der Temperatur während der LITT im Abstand von 5 bzw. 10 mm von der Lasersonde.

Die geforderte Temperatur von über 55-60°C wurde im Umkreis von 5mm um die Sonde (LITT) rasch und über eine Zeitspanne von mehreren Minuten erreicht. 10mm von der Lasersonde entfernt war der Temperaturanstieg nur sehr flach und erreichte nie die Temperatur von 55-60°C.

4.6 Histomorphologische Auswertung

4.6.1 Tumoren

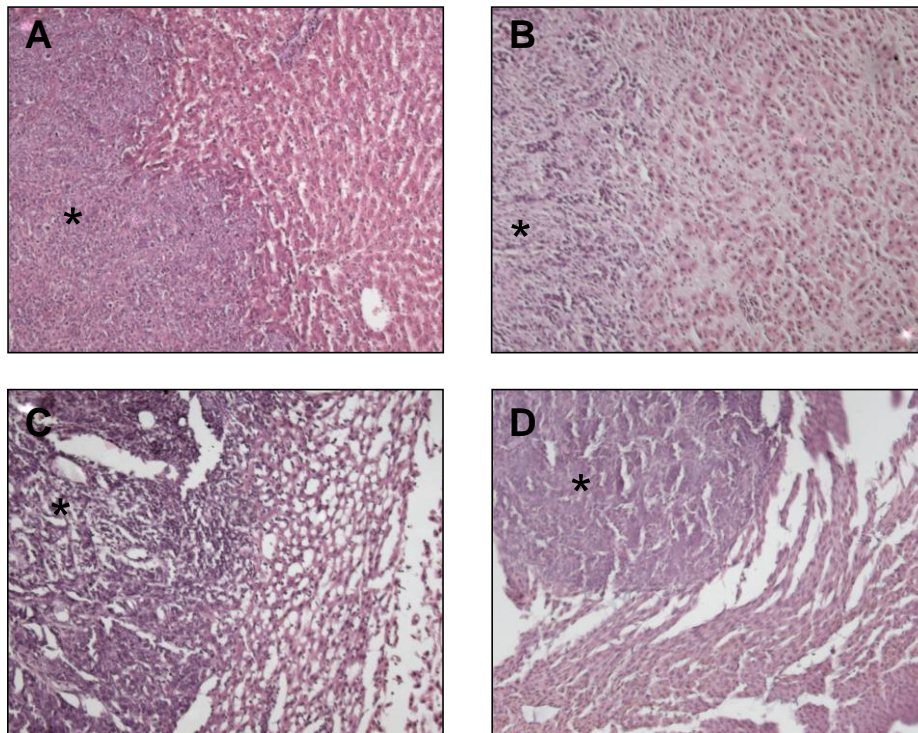


Abb. 13: Histologische Schnitte der Tumoren

HE-gefärbte histologische Schnitte zeigen exemplarisch die Auswirkungen der verschiedenen lokal ablativen Verfahren auf den Tumor und das umliegende Lebergewebe. **A**= Kontrolle, **B**= Kryo, **C**=RFA, **D**= LITT, * = Tumor. Vergrößerung **A-D** x44

Beispielhaft sind histologische Schnitte von ablatierten Tumoren und des peritumoralen Lebergewebes gezeigt. Bei einem Großteil der Lebern war allerdings eine solche Einstellung zur Bewertung der Veränderungen am Tumor durch die Ablation und eine Erhebung mehrerer Gesichtsfelder nicht möglich, da der Tumor vollständig ablatiert war. Somit erfolgte die histomorphologische Auswertung ausschließlich von peritumoralem Lebergewebe.

4.6.2 Azinusstruktur und intralobuläre Balkenstruktur in der peritumoralen Ablationszone

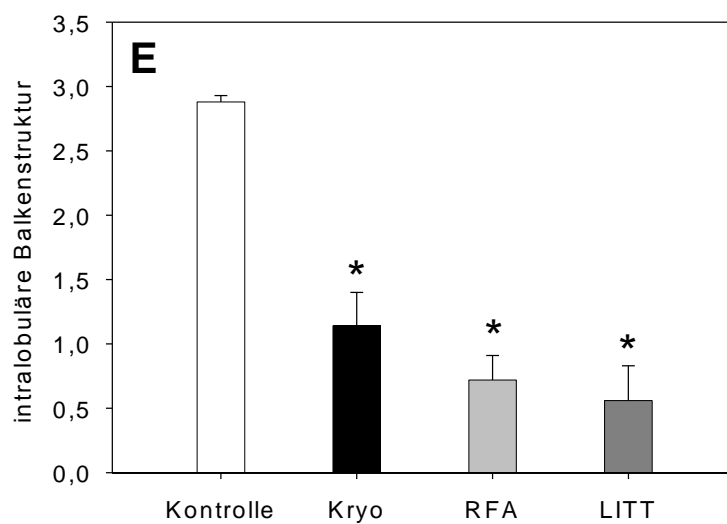
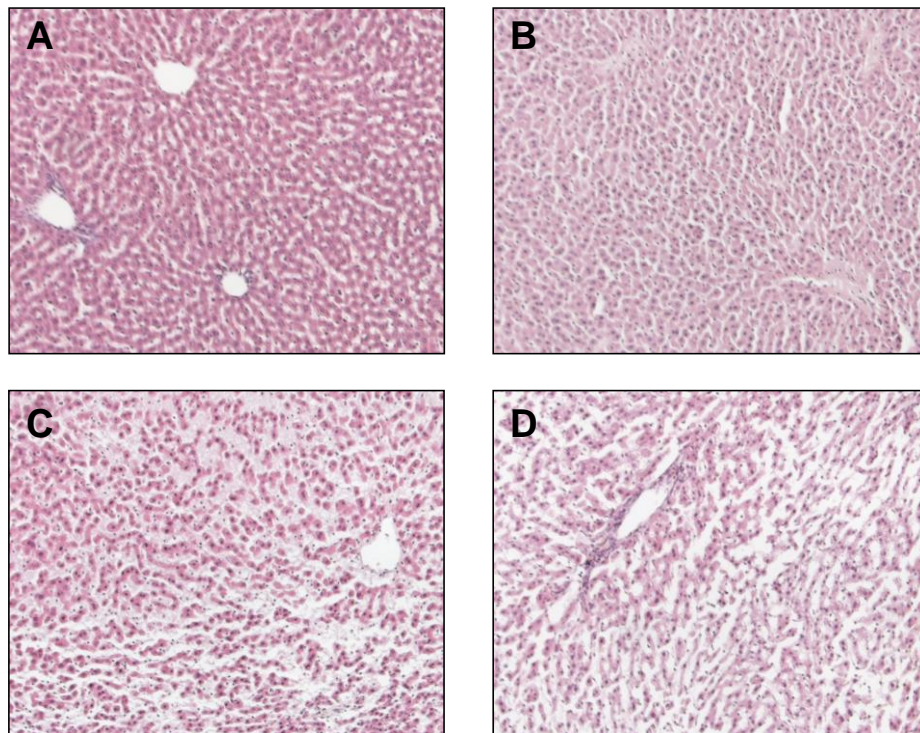


Abb. 14: Histomorphologische Auswertung: Azinusstruktur

A-D zeigen HE-gefärbte histologische Schnitte an denen exemplarisch die Veränderungen der intralobulären Balkenstruktur dargestellt sind. **A** entspricht hierbei einem Score von 3 Punkten, **D** entspricht 0 Punkten. **A** zeigt intakte Strukturen mit gut erkennbaren Sinusoiden und einem klar abzugrenzenden Portalfeld. In **B** sind bereits Veränderungen in der Balkenstruktur zu erkennen. **C** zeigt eine deutlichere Veränderung, die Hepatozyten liegen nicht mehr geordnet im Verband, die dargestellte Lebervene ist nicht klar begrenzt. In **D** ist eine völlige Zerstörung von Azinus- und intralobulärer Balkenstruktur zu erkennen. Vergrößerung **A-D** x44. Hierzu zeigt **E** die statistische Auswertung im Vergleich mit den verschiedenen Gruppen: MW ±SEM; * p<0,05 vs. Kontrolle

Die Intaktheit der intralobulären Balkenstruktur wurde in HE-Schnitten semiquantitativ bewertet. Ein Score von 3 Punkten entsprach einer erhaltenen Struktur mit klar abgrenzbaren Sinusoiden und deutlichen Portalfeldern. 2 Punkte wurden vergeben bei leichten Veränderungen dieser Strukturen. Einen Score von 1 Punkt erhielten deutliche Veränderungen in der Balkenstruktur, wobei hier die Portalfelder und Lebervene noch abzugrenzen waren, eine geordnete Balkenstruktur jedoch nicht mehr vorhanden war. 0 Punkte wurden vergeben bei völliger Zerstörung der genannten Merkmale. In der Kontrollgruppe zeigten sich keine Veränderungen in der intralobulären Balkenstruktur durch die einstündige extrakorporale Perfusion. In der peritumoralen Ablationszone war bei allen Therapiegruppen die Intaktheit der intralobulären Balkenstruktur im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert. Im Vergleich zu RFA und LITT war diese Zerstörung in der Kryogruppe weniger stark ausgeprägt. Hier war seltener eine komplette Zerstörung der Struktur zu erkennen.

4.6.3 Intrasinusoidale zelluläre Fragmente

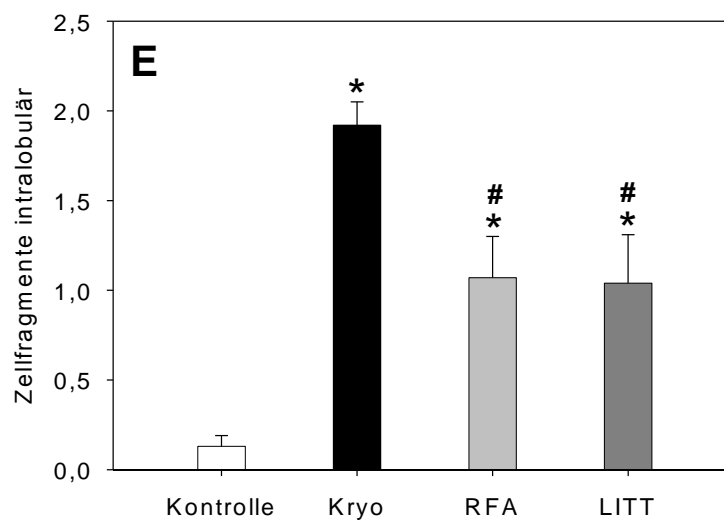
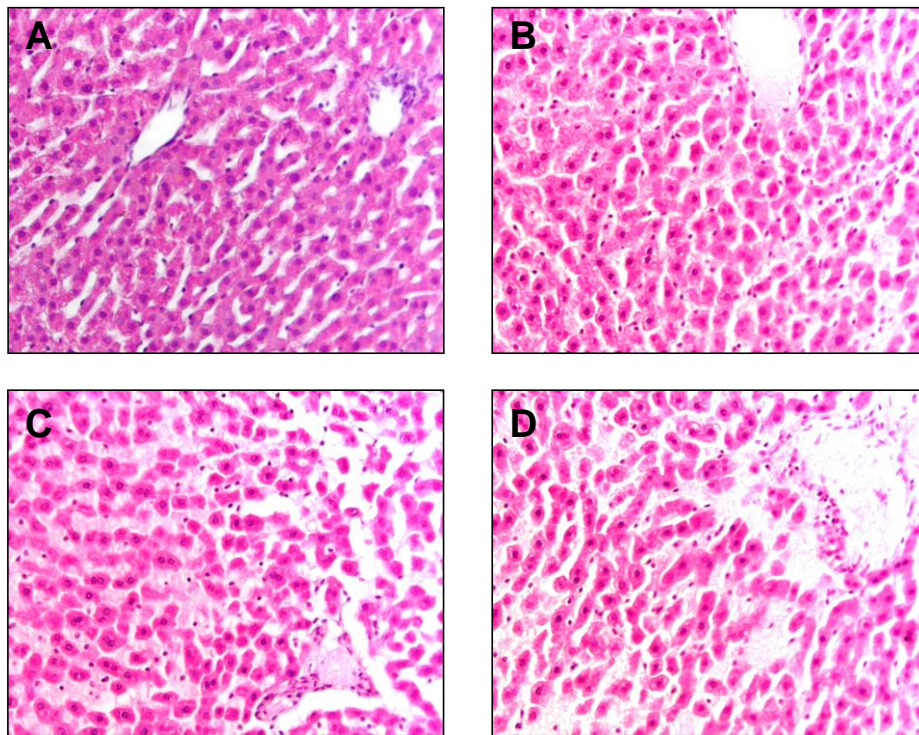


Abb. 15: Histomorphologische Auswertung: zelluläre Fragmente

A-D zeigen HE-gefärbte histologische Schnitte in denen die Merkmale zur Beurteilung der Häufigkeit von intrasinusoidalen zellulären Fragmenten erkennbar sind. **A** entspricht einem Score von 0, die Sinusoide sind frei von Fragmenten. **B** bis **D** zeigen jeweils immer deutlicher intrasinusoidal unscharf begrenzte, inhomogene Strukturen, wobei **D** einem Score von 3 entspricht. Vergrößerung **A-D** x88. **E** zeigt die statistische Auswertung, im Vergleich mit den verschiedenen Gruppen: MW ± SEM; * p<0,05 vs. Kontrolle; # p<0,05 vs. Kryo.

Die Häufigkeit von Zellfragmenten im intrasinusoidalen Raum wurde in HE-Schnitten semiquantitativ bewertet. Ein Score von 0 Punkten wurde für keine Fragmente im intrasinusoidalen Raum vergeben. 1 Punkt wurde vergeben, wenn 10% des intrasinusoidalen Raumes mit Zellfragmenten ausgefüllt waren. 2 Punkte wurden für 30% Fragmentanteil in den Sinusoiden vergeben. Einem Score von 3 Punkten entsprachen mehr als 30% bis zur nahezu völligen Ausfüllung des intrasinusoidalen Raumes mit unscharfen, inhomogenen Zellfragmenten. In der Kontrollgruppe zeigte sich kaum Zelldetritus im intrasinusoidalen Raum. Die einstündige Perfusion führte zu keiner ausgeprägten Veränderung in der Kontrollgruppe und erhielt die Leberzellarchitektur. In der RFA und der LITT-Gruppe zeigten sich Zellfragmente in ungefähr 10% der beurteilten Fläche, was signifikant mehr war als in der Kontrollgruppe. Interessanterweise fanden sich in der Kryogruppe intrasinusoidale Fragmente am häufigsten. Die Zerstörung und Auflockerung war signifikant größer im Vergleich zur RFA- und LITT-Gruppe.

4.6.4 Intaktheit der Hepatozyten

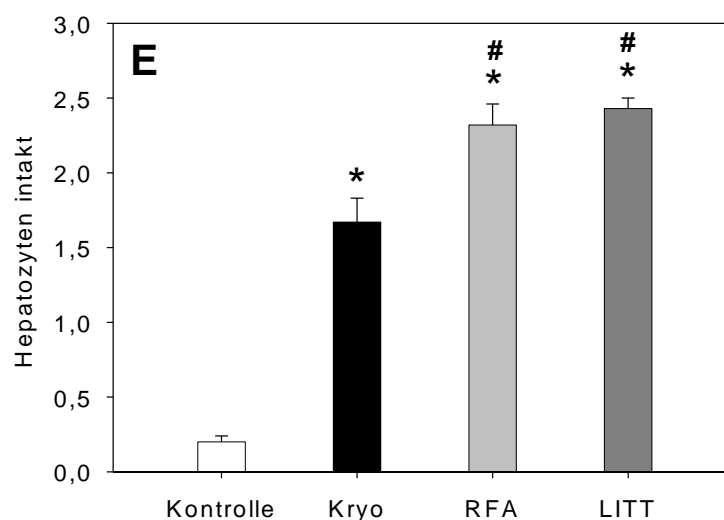
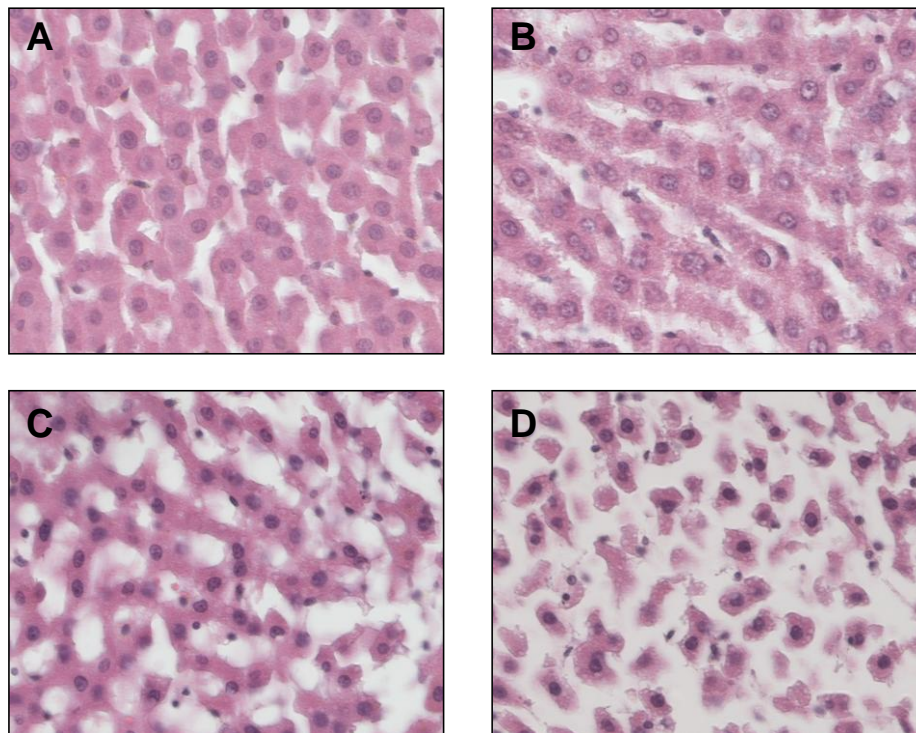


Abb. 16: Histomorphologische Auswertung: Intaktheit der Hepatozyten

A-D zeigen HE-gefärbte histologische Schnitte in denen die Intaktheit der Hepatozyten beurteilt wurde, wobei **A** einem Score von 0 und **D** von 3 Punkten entspricht. In **A** zeigen sich scharf abgrenzbare Hepatozyten. **B** zeigt bereits zum Teil veränderte Hepatozyten, die nicht mehr klar von einander abgrenzbar sind. In **C** sind teils geschrumpfte, teils geplatze, zerstörte Zellen zu erkennen. **D** zeigt vollkommen ungleichmäßige Zellen ohne Zellkontakte. Hier sind weniger als 50% der Hepatozyten intakt, was einem Score von 3 Punkten entspricht. Vergrößerung **A-D** x175. **E** zeigt die statistische Auswertung, im Vergleich mit den verschiedenen Gruppen: MW ± SEM; * p<0,05 vs. Kontrolle; # p<0,05 vs. Kryo.

Das Ausmaß der Intaktheit der Hepatozyten wurde in HE-Schnitten semiquantitativ bewertet. Ein Score von 0 Punkten wurde vergeben, wenn die Hepatozyten nicht verändert waren. Sie waren rund, glatt und klar voneinander abzugrenzen. 1 Punkt wurde vergeben wenn die Hepatozyten leichte Veränderungen zeigten. Die Abgrenzung der einzelnen Zellen voneinander war erschwert, die Zellen selbst erschienen unrund, das Gesamtbild des Zytoplasmas schollig. 2 Punkte wurden vergeben, wenn bereits ein Teil der Zellen geschrumpft oder sogar geplatzt war. Die Zellen waren voneinander nicht mehr abzugrenzen. Einem Score von 3 Punkten entsprach der Zerstörung der Hepatozyten >50%, es ist kein Zellverband mehr zu erkennen. Die Zellen sind größtenteils entrundet. In der Kontrollgruppe waren fast ausschließlich intakte Hepatozyten zu finden. Die einstündige Perfusion hat hier keine Veränderung verursacht. In den Therapiegruppen waren die Veränderungen der Hepatozyten signifikant stärker ausgeprägt im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei in der RFA und der LITT-Gruppe eine deutlichere Zerstörung der Hepatozyten durch die Ablation ausgelöst wurde, als dies in der Kryogruppe der Fall war.

4.6.5 Kondensation des Zellkerns der Hepatozyten

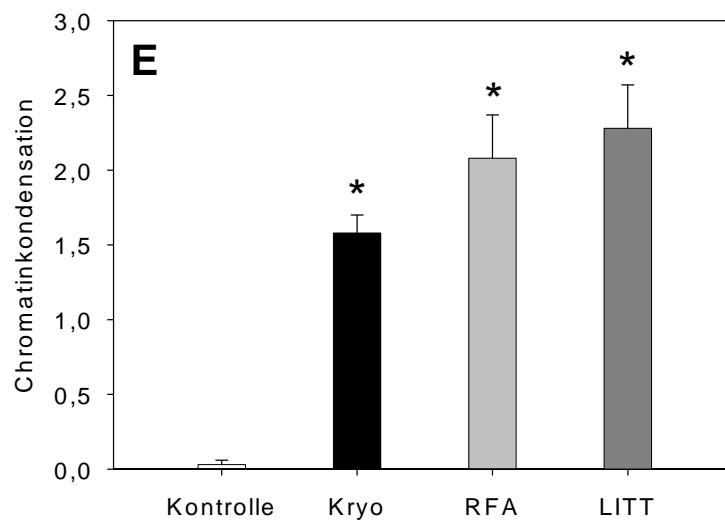
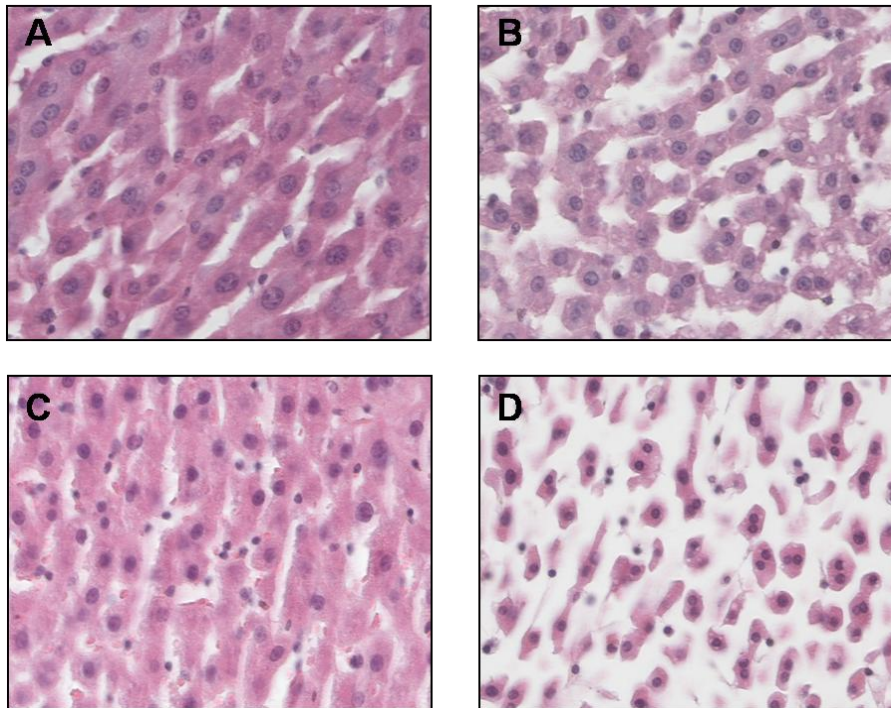


Abb. 17: Histomorphologische Auswertung: Kondensation des Zellkerns der Hepatozyten

A-D zeigen HE-gefärbte histologische Schnitte. **A** lässt intakte, runde große Kerne in den Hepatozyten erkennen, deren Chromatin deutlich abgrenzbar ist. Dies entspricht einem Score von 0 Punkten. In **B** und **C** sieht man eine zunehmende Verdichtung der Zellkerne, sie erscheinen dunkler und kleiner. In **D** sind so gut wie keine normalen Kerne in den Hepatozyten mehr zu erkennen, dies entspricht einem Score von 3 Punkten. Vergrößerung **A-D** x175. **E** zeigt die statistische Auswertung, im Vergleich mit den verschiedenen Gruppen: MW ± SEM; * p<0,05 vs. Kontrolle.

In HE-Schnitten wurden die Chromatinkondensation und die Schrumpfung der Zellkerne der Hepatozyten semiquantitativ untersucht. Die Morphologie der Zelle als Ganzes war hierfür nicht relevant. Ein Score von 0 Punkten entsprach unveränderten Zellkernen, sie zeigten sich hier rund und normal groß. Das Chromatin war deutlich abgrenzbar. 1 Punkt wurde vergeben wenn die Zellkerne leichte Veränderungen zeigten, indem sie insgesamt kleiner wirkten. 2 Punkte entsprachen einer deutlichen Zellkernschrumpfung. Ein Score von 3 Punkten wurde vergeben wenn fast ausschließlich kleine, geschrumpfte Kerne zu finden waren.

In der Kontrollgruppe fanden sich keine kondensierten Zellkerne. Die einstündige Perfusion führte zu keiner Beeinträchtigung der Hepatozyten und verursachte somit keine Nekrosen oder Apoptosen. In den Therapiegruppen war die Chromatinkondensation hochsignifikant stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe, wobei dies in der LITT-Gruppe am häufigsten zu finden war. Die Unterschiede zwischen den Therapiegruppen waren nicht signifikant.

4.6.6 Intravaskuläre Fibrinthromben

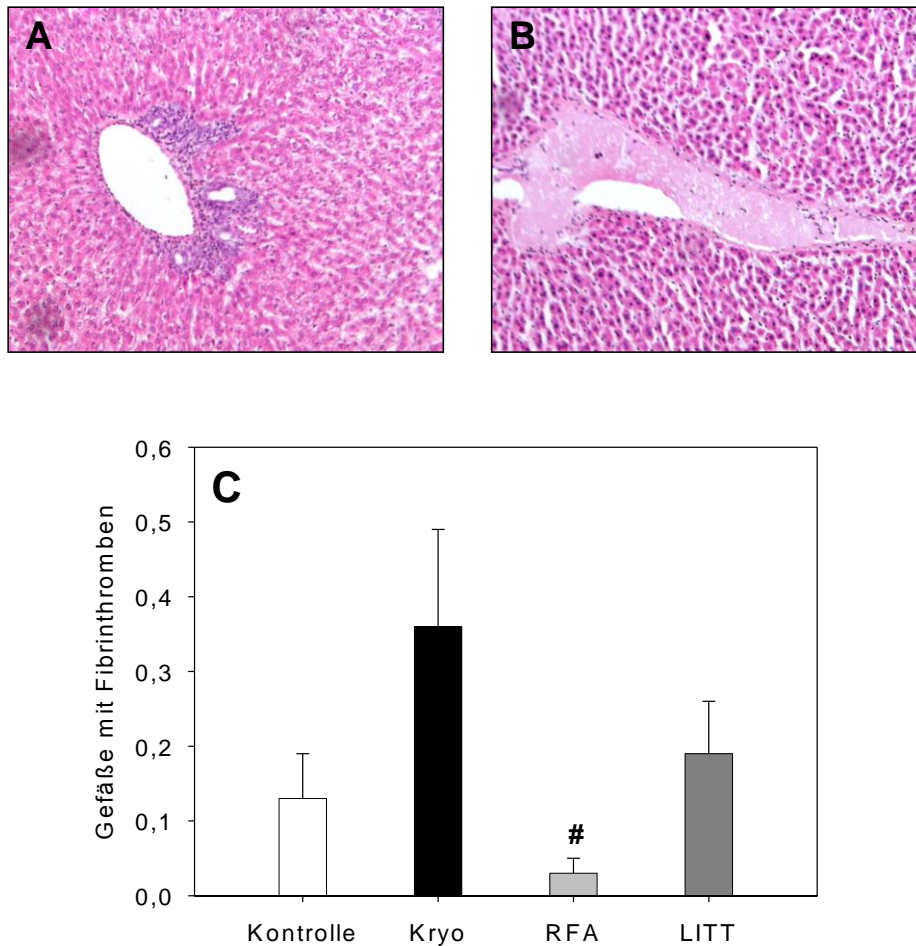


Abb. 18: Histomorphologische Auswertung: Gefäße mit Fibrinthromben in der normalen Leber

A und **B** zeigen HE-gefärbte histologische Schnitte an denen exemplarisch jeweils ein freies Gefäß (**A**, Score= 0 Punkte). -und ein Gefäß mit Fibrinthrombus (**B**, Score= 1 Punkt) zu erkennen sind. Vergrößerung **A** und **B** x44. **C** zeigt die statistische Auswertung, im Vergleich mit den verschiedenen Gruppen: MW ±SEM; # p<0,05 vs. Kryo.

Die Beurteilung der Häufigkeit von Gefäßen mit Fibrinthromben zeigte kein einheitliches Bild. Gesichtsfelder in denen keine Gefäße mit Fibrinthromben zu erkennen waren, entsprachen einem Score von 0 Punkten, solche mit Thrombus einem Score von 1 Punkt. Insgesamt waren Fibrinthromben selten zu finden. Diese Thromben zeigten sich besonders häufig bei Kryo-therapierten Lebern.

4.6.7 Intravaskuläre Zellformationen

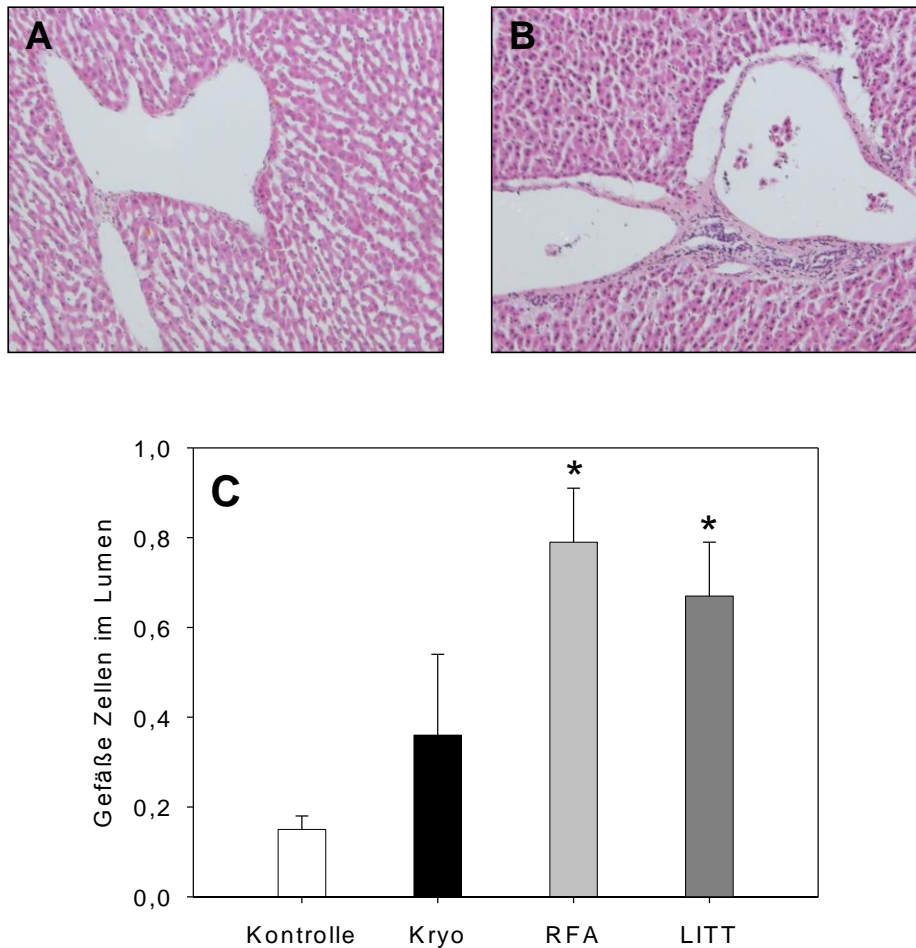


Abb. 19: Histomorphologische Auswertung: Gefäße mit Zellen im Lumen

A und **B** zeigen HE-gefärbte histologische Schnitte an denen exemplarisch jeweils ein freies Gefäß (**A**, Score= 0 Punkte). und ein Gefäß mit Zellen im Lumen (**B**, Score= 1 Punkt) zu erkennen sind. Vergrößerung **A** und **B** x44. **C** zeigt die statistische Auswertung, im Vergleich mit in den verschiedenen Gruppen: MW ±SEM; * p<0,05 vs. Kontrolle.

In der Kontrollgruppe zeigten sich nur selten Zellen in den großen Gefäßen im Bereich der normalen Leber. Interessanterweise fanden sich im Vergleich zur Kontrolle in der RFA und der LITT-Gruppe signifikant häufiger Zellen im Lumen der Gefäße. Diese Beobachtung konnte nach Kryotherapie nicht gemacht werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Kryogruppe und den beiden anderen Therapiegruppen bestand nicht.

4.7 Nachweis der GFP-Transfektion in vivo und in vitro

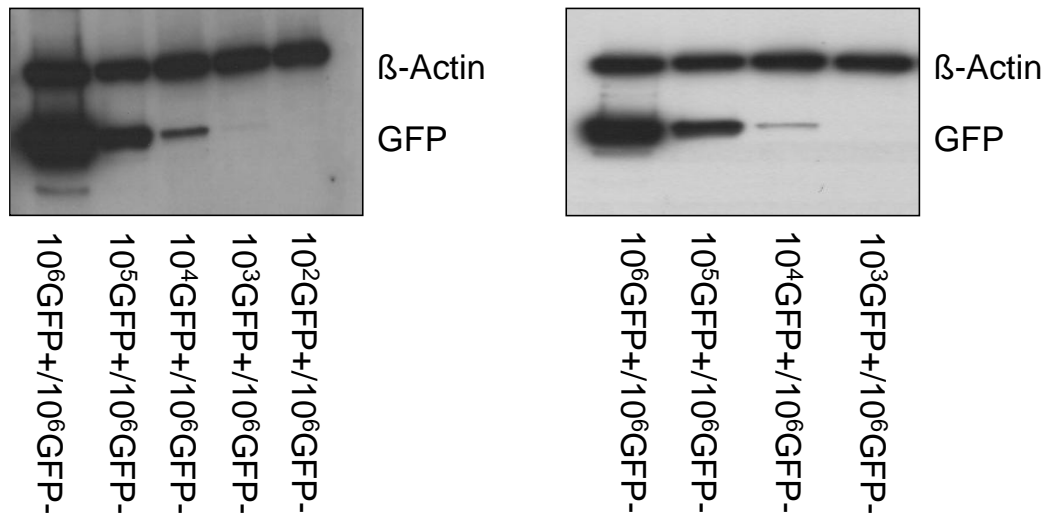


Abb. 20: Verdünnungsreihe Western Blot zeigt die Verdünnungsreihe von GFP-positiven mit GFP-negativen Zellen im Western Blot. Jeweils ganz links sind die Proteinextrakte von 10⁶ GFP-positiven gemeinsam mit 10⁶ GFP-negativen aufgetragen. Jeweils eine Spalte weiter nach rechts nimmt der Anteil an GFP-positiven Zellen je um eine 10er Potenz ab. Für die rechte Abbildung sind FITC-gelabelten Antikörper, für die linke TRITC-gelabelte Antikörper eingesetzt worden.

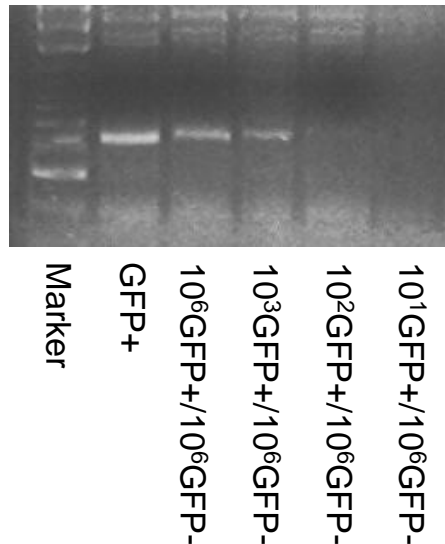


Abb. 21: Verdünnungsreihe PCR zeigt die Verdünnungsreihe von GFP-positiven mit GFP-negativen Zellen in der PCR. Jeweils ganz links ist der Marker aufgetragen. In der zweiten Spalte von links ist die DNA von 10⁶ GFP-positiven gemeinsam mit 10⁶ GFP-negativen, eingestellt auf 1ng DNA/1μl aufgetragen. Jeweils eine Spalte weiter nach rechts nimmt der Anteil an GFP-positiven Zellen je um eine 10er Potenz ab.

Die verschiedenen Verdünnungsreihen wurden sowohl mittels Western Blot als auch PCR auf ihre GFP-Expression untersucht. Es zeigt sich, dass im Western Blot bis zu einer Verdünnung von 10³ GFP-positiven auf 10⁶ GFP-negativen Zellen eine deutlich Bande zu

erkennen ist (s. Abb.20). In der PCR-Analyse lag die Nachweisschwelle für GFP positive Zellen ebenfalls bei 10^3 GFP positiven auf 10^6 GFP negativen Zellen. Durch lange Belichtungszeiten ließ sich mit beiden Methoden teilweise sogar ein Nachweis von bis zu 10^2 GFP positiven Zellen erzielen.

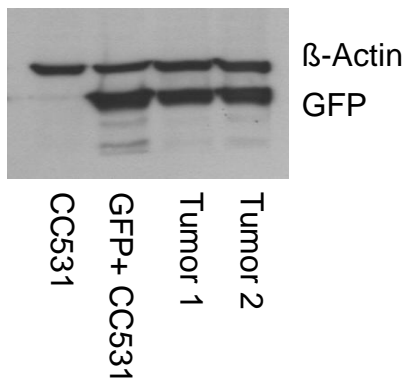


Abb. 22: Western Blot Tumor zeigt die Analyse von GFP-negativen CC531-Zellen aus der Kultur, GFP-positiven CC531-Zellen aus der Kultur und beispielhaft zwei verschiedenen Tumoren aus der Rattenleber im Western Blot.

Bei der Analyse von Zellen aus der Kultur und Tumoren aus der Rattenleber zeigte sich deutlich, dass sowohl die GFP-positiven Zellen aus der Kultur als auch jene die 10 Tage zuvor in die Rattenleber implantiert worden waren, das Grün-Fluoreszierende-Protein exprimierten. Die Bande der Tumoren erschien im Vergleich zu den GFP-positiven Zellen aus der Kultur etwas schwächer ausgeprägt.

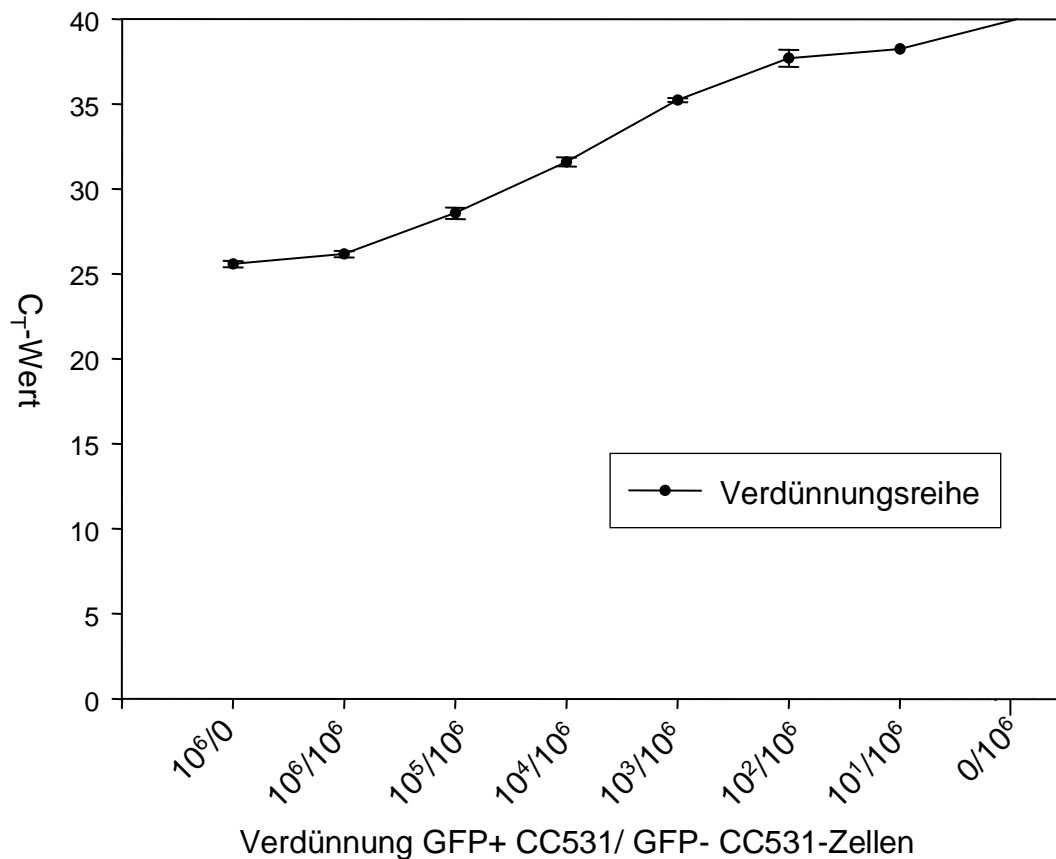


Abb. 23: Verdünnungsreihe TaqMan

zeigt die Verdünnungsreihe von GFP positiven mit GFP negativen Zellen, eingestellt auf 50 ng DNA/ μ l; es wurde 1 μ l, entsprechend 50ng eingesetzt. Abszisse: 10⁶/0 entspricht 10⁶ GFP-positiven Zellen, ohne GFP-negative Zellen; 10⁶/10⁶ entspricht GFP-positive und -negative Zellen zu gleichen Anteilen. Nach rechts nimmt der Anteil an GFP-positiven Zellen je um eine 10er Potenz ab. Ordinate: C_T-Wert, Anzahl der durchlaufenen Zyklen im TaqMan. Als negatives Ergebnis wurde ein C_T-Wert von 40 angenommen und nach 40 durchlaufenen Zyklen wurde der Versuch beendet.

Im TaqMan wurde 1 ng DNA eingesetzt, in der je nach Verdünnung die GFP codierende Sequenz enthalten war. Die Verdünnung 10⁶/0 bestand aus der isolierten DNA von 10⁶ ausschließlich GFP positiven Zellen, die Verdünnung 10⁶/10⁶ aus der DNA aus der gleichen Menge GFP positiven wie GFP negativen Zellen. 10⁵/10⁶ entsprach folglich 10⁵ GFP-positiven Zellen und 10⁶ GFP-negativen Zellen. Somit sank mit geringerer Verdünnung auch der Anteil von GFP tragenden Sequenzen. Abb.23 zeigt den Zusammenhang zwischen Verdünnung und Anzahl der im TaqMan benötigten Zyklen, um GFP tragende Sequenzen nachzuweisen. Als negatives Ergebnis wurde eine Zyklenzahl von 40 angenommen. Es zeigt sich, dass die DNA von GFP positiven Zellen bereits bei einem Anteil von 10 GFP positiven Zellen auf 10⁶ GFP negativen Zellen nachweisbar war. War keine GFP codierende Sequenz

in der Verdünnung vorhanden, war auch nach 40 Zyklen keine solche nachweisbar. Somit war die Real Time PCR im TaqMan die beste Methode für die Analyse des Perfusates.

4.8 Nachweis GFP-transfizierter Zellen im Perfusat

Aus den Proben welche vor der Ablation des Tumors aus den verschiedenen Gruppen gewonnen wurden, wurde die DNA isoliert. Diese isolierte DNA wurde auf das Vorhandensein von GFP-tragenden Sequenzen im TaqMan untersucht. In keiner der Proben die vor der Ablation gewonnen wurden, konnte GFP nachgewiesen werden.

Die Messung im TaqMan der isolierten DNA, die während der Ablation gewonnen wurde, erbrachte ebenfalls keinen Hinweis auf das Vorhandensein von GFP-tragenden Sequenzen. Während der Ablation wurden keine nachweisbaren Mengen GFP-haltiger Tumorzellen aus der Leber ausgeschwemmt.

Zeitpunkt	Kontrolle	Kryo	RFA	LITT
vor Ablation (a)	0 von 8	0 von 8	0 von 8	0 von 8
während Ablation (b)	0 von 8	0 von 8	0 von 8	0 von 8
nach Ablation (c)	0 von 8	<u>2 von 8</u>	0 von 8	0 von 8

Tab. 9: Ergebnisse TaqMan

zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der Proben aus Zeitpunkt (a), (b) und (c). Der Nachweis von GFP-kodierenden Sequenzen gelang bei zwei Tieren aus der Kryogruppe zum Zeitpunkt (c), nach der Ablation. $p=0,082$

Aus dem Perfusat, welches nach der Ablation über einen Zeitraum von 25 Minuten gesammelt wurde, wurde analog DNA isoliert und im TaqMan auf GFP-haltige Sequenzen überprüft.

In der Gruppe, welche mit RFA behandelt wurde, konnten keinen solchen Sequenzen nachgewiesen werden. In der mit LITT therapierten Gruppe konnte dieser Nachweis

ebenfalls nicht erbracht werden. Somit konnte kein Nachweis erbracht werden, dass während der beiden thermoablativen Verfahren Tumorzellen disseminiert werden.

In der Kontrollgruppe wurde Perfusat aus dem selben Zeitraum, beginnend bei 30 Minuten nach Perfusionsbeginn bis zum Ende der Perfusion nach insgesamt 55 Minuten, gesammelt. Ein Nachweis von GFP-haltiger DNA war auch hier nicht möglich.

In der Kryogruppe konnte in der aus dem Perfusat isolierten DNA bei 2 Tieren die GFP codierende DNA-Sequenz im TaqMan nachgewiesen werden. Im Einzelnen war der Nachweis nach 38,83 bzw. 39,73 Zyklen möglich. Die nachgewiesene Menge an DNA lag somit knapp oberhalb der Nachweisschwelle. Eine Signifikanz der Kryogruppe gegenüber den anderen Therapiegruppen und der Kontrollgruppen besteht nicht ($p > 0,05$).

5 Diskussion

5.1 Modell der isolierten Rattenleberperfusion

Das Modell der isolierten Rattenleberperfusion ist ein Modell zur Untersuchung von Physiologie und Pathophysiologie der Rattenleber. Claude Bernard verwendete es 1855 erstmals zur Untersuchung der Glykogenspeicherung in Hepatozyten [87]. Der Vorteil dieses Modells ist, dass es ermöglicht, die *in vivo* herrschenden Bedingungen bestmöglich zu simulieren und gleichzeitig eine maximale Standardisierung des Versuches zu erreichen. Der größte Kritikpunkt an dem Modell ist, dass verschiedene Faktoren nicht den *in vivo* herrschenden entsprechen. So herrscht zum Beispiel durch die Abwesenheit von Sauerstoff bindenden Molekülen ein deutlich niedrigerer Sauerstoffpartialdruck. Auch entspricht die Zusammensetzung des Perfusats bei weitem nicht der des Blutes, insbesondere das Fehlen der Interaktion mit Leukozyten, Zytokinen und anderen Bestandteilen nimmt dem Modell die Möglichkeit, dass zum Beispiel komplexe Regulationsmechanismen anlaufen können.

Durch Bessems wurde dieses Perfusionsmodell auf entstehenden Schaden hin evaluiert und Art des Perfusats, Perfusionsdruck und -fluss, Temperatur und Oxygenierungsmöglichkeiten verglichen [87]. Das am häufigsten verwendete Perfusat, wie auch in der hier vorliegenden Arbeit, ist der Krebs-Henseleit-Puffer. Dieser wird zumeist mit Glukose angereichert. Jedoch bevorzugen diverse Autoren auch die Perfusion der Leber mit Ringer-Lösung [87; 88; 89] oder auch mit modifizierter Kochsalzlösung [87; 90]. Bessems et al. kommen zu dem Schluss, das geeignetste Modell zur isolierten Rattenleberperfusion sei ein druckkontrolliertes, wobei bei einem konstanten Druck von 20cmH₂O (15mmHg) ein Perfusatsvolumen von 3ml /min /g Leber erzielt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde als konstanter Parameter das Perfusatsvolumen gewählt, da dies ein wesentlich praktikablerer Parameter ist und bei Schwankungen des Perfusionsdruckes durch die unterschiedlichen Behandlungen die gleiche Perfusatmenge verwendet wird. Eine Temperatur von 37°C ist vergleichbar mit der *in vivo* herrschenden Temperatur und wurde so auch in der

vorliegenden Arbeit verwendet. Die Oxygenierung erfolgte in dieser Arbeit mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂); das Kohlenstoffdioxid wird benötigt um die Pufferung von H⁺ Ionen zu ermöglichen, die aufgrund der mangelnden Oxygenierung anfallen [87; 88; 90].

Die Zeit in der warmen Ischämie zwischen in situ Perfusion und extrakorporaler Perfusion betrug in allen Gruppen zwischen 14 und 15 Minuten. Diese Ischämiezeit ist im Rahmen der Ischämietoleranz der Rattenleber, welche mit 30 Minuten deutlich länger ist. Hierzu haben Schleifer et al [91] gezeigt, dass Rattenlebern, die 15 Minuten bei vollständigem Kreislaufstillstand im warmen Tier belassen wurden, danach weiterhin eine ebenso gute Funktion zeigten wie Lebern ohne Kreislaufstillstand. Kupcsulik et al. zeigten, dass die Rattenleber ab einer warmen Ischämiezeit von 30 Minuten messbare Schäden aufweist. Gemessen wird die Funktion der Leber unter anderem an der Gallenproduktion. Richter et al. bestätigten diese Ergebnisse in der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie [92; 93; 94].

Wie bereits beschrieben, wird von Bessems et al. der ideale Druck zur isolierten Rattenleberperfusion mit 15 mmHg angegeben [87]. In den Untersuchungen lag der Ausgangsdruck nach Anschließen der Leber in allen Gruppen bei ungefähr 25 mmHg, welcher innerhalb der ersten 5 Minuten in allen Lebern um ungefähr 5mmHg abfiel. In der Kontrollgruppe wurden, ebenso wie in den Therapiegruppen, Temperatursonden in die Leber eingebracht. Auch wurde die Leber in den ersten 5 Minuten der Perfusion häufig noch gelagert, um eine optimale Perfusion aller Leberlappen zu ermöglichen. Die theoretisch bei Drücken über 15mmHg zu befürchtende hyperbare Schädigung der Leber konnte nicht beobachtet werden. Der venöse Abfluss war immer konstant. Bei keiner Perfusion kam es zu einer Schwellung der Leber. Während der Therapie blieb der Druck in allen Gruppen konstant. Der beobachtete Abfall des Druckes nach Therapie in der Kryogruppe ist am ehesten durch die entstandene Kolliquationsnekrose zu begründen. Nach dem Auftauen bot das durch die Therapie verflüssigte Gewebe einen geringeren Widerstand. In der klinischen Anwendung ist dieses Phänomen als Cracking bekannt und gilt als gefürchtete Komplikation, da es zu schwerwiegenden Blutungen führen kann. In dieser Gruppe konnte analog zum

leichten Druckverlust ein leichter Perfusatverlust über die Ablationsfläche nach dem Auftauen beobachtet werden. In der LITT und RFA-Gruppe blieb der Perfusionsdruck über den gesamten Zeitraum nach Therapie konstant. Bei diesen Therapien entsteht im Gegensatz zu der Kryotherapie eine Koagulationsnekrose. Dadurch wird die durch die Ablation entstandene Wundfläche durch geronnenes Eiweiß gewissermaßen versiegelt. Im Vergleich zur Kontrolle bei der der Druck bis zur Beendigung der Therapie konstant langsam abfiel, kann man bei den zwei thermoablativen Therapieverfahren sogar von einem relativen Druckanstieg sprechen, bedingt durch den durch die Koagulation entstandenen höheren Widerstand. Diese Beobachtungen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Entwicklung der Kryochirurgie hat diverse Protokolle hervorgebracht, die sich in Länge des Frierens, Einfach- oder Doppeltfrieren, sowie der zu erreichenden Temperatur unterscheiden. Als effektivste Methode hat sich die des Doppeltfrierens erwiesen. Hierbei vergrößert sich das Volumen der Kryonekrose im Vergleich zum Einfachfrieren, wodurch größere Volumina sicher abadiert werden können [46] und zudem eine effektivere Zerstörung der Architektur des abadierten Gewebes beobachtet werden kann [45]. Im Allgemeinen folgt auf eine schnelle Frierphase eine langsame passive Auftauphase. Gage et al. definierten schnelles Frieren als ein Abfallen der Temperatur um mindestens 30°C/min und langsames Auftauen als einen Anstieg um maximal 5°C/min [49]. Um die Auftauphase möglichst lang zu halten, wird empfohlen, die Kryosonde im Gewebe zu belassen. Diese Empfehlung zwischen den Frierphasen die Temperatur auf wenigstens 0°C steigen zu lassen erscheint jedoch in der klinischen Anwendung nicht als sinnvoll, da mit jedem Auftauen über den Gefrierpunkt das Risiko des Cracking, des Aufbrechens der Kryoläsion, steigt.

Die zu erzielende Temperatur, bei der eine sichere Zerstörung des Gewebes erreicht wird, wird weiterhin kontrovers diskutiert und ein Konsens konnte bisher nicht erzielt werden. Im Allgemeinen wird der ideale Temperaturbereich zwischen -20°C und -50°C angegeben [13; 48; 49]. Neuere Ergebnisse zeigen allerdings, dass bereits Temperaturen von 0°C

ausreichen, um einen Verschluss selbst großer Venolen zu verursachen und durch die folgende Ischämie die Gewebnekrose auszulösen [51; 52; 53].

Die genaue Länge der Frierzeit ist ebenfalls nicht exakt definiert, einige Autoren betrachten diese als unwichtig, lediglich das Erreichen einer definierten Temperatur sei relevant [95; 96]. Dies ist in der klinischen Anwendung auch sinnvoll, da der durch die Kälte ausgelöste Effekt abhängig ist von der Art des Gewebes und anderen Faktoren wie z.B. der Durchblutung. Aufgrund all dieser Daten entschied man sich in der vorliegenden Arbeit für einen Doppelfrierzyklus. In Vorversuchen am verwendeten Modell bewährte sich das zweimalige Frieren auf -168°C mit einer passiven Auftauphase auf -30°C gemäß dem klinisch angewandten Modell. So konnte in den Versuchen in einem Abstand von 5mm von der Kryosonde Temperaturen im Mittel bis zu -20°C erreicht werden. In 10mm Entfernung von der Sonde wurden die 0°C nicht immer sicher erreicht. Bei einem Tumordurchmesser von 5,3 bis 5,5mm kann aber somit von einer sicheren in toto Tumorzerstörung ausgegangen werden.

Das Vorgehen bei den thermoablativen Verfahren, Radiofrequenzablation und Laserinduzierte Thermotherapie, erscheint in der Literatur weniger kontrovers. Es ist bekannt, dass eine Temperatur von $+55^{\circ}\text{C}$ eine adäquate Gewebnekrose in Form einer Koagulationsnekrose bewirkt [11; 12; 75]. Maligne Zellen sind zudem deutlich empfindlicher gegenüber Hitze als normale Zellen. Es erscheint allerdings sinnvoll, die für die Ablation geforderte Temperatur auf $+60^{\circ}\text{C}$ zu steigern. Erstens wirkt so doppelt so viel Energie auf den Tumor, ohne dass sich das Koagulationsvolumen vergrößert [75], zweitens verursachen Temperaturen von mehr als $+60^{\circ}\text{C}$ eine irreversible Proteindenaturierung mit sofortigem Zelltod [41] und drittens verkürzt sich die benötigte Ablationszeit zum Erreichen der nötigen Temperatur exponentiell [41]. Höhere Temperaturen sind nicht anzustreben, da es bei 300°C bis 1000°C zur Karbonisation kommt. Hierdurch steigt zwar die Temperatur im abladierten Bereich stark an, aber die Verkohlung des Gewebes wirkt als Isolation und verhindert die Ausbreitung der Gewebsschädigung [41]. Außerdem steigt durch die Karbonisation der interstitielle Druck, was zur Dissemination von Tumorzellen tief ins Lebergewebe und in

Gefäße führen könnte [41]. Bei den thermoablativen Verfahren ist eine vollständige Zerstörung der malignen Zellen anzustreben, da bei subletaler Schädigung die Tumorzellen durch Reparationsvorgänge akzeleriert repopulieren und zu einer deutlichen Prognoseverschlechterung des Patienten führen [12].

Die Karbonisation wurde in den Versuchen durch die Verwendung einer Wasser gekühlten Cool Tip[®]-Sonde (RFA) bzw. eines diffus abstrahlenden Nd:YAG-Laser-Applikators (LITT) maximal gemindert [41; 75; 76; 97]. In der vorliegenden Arbeit wurden die erforderlichen Temperaturen bei den angewandten thermoablativen Verfahren in einem Abstand von 5mm von der Therapiesonde immer erreicht und über einige Minuten gehalten. In 10mm Entfernung wurde bei beiden Verfahren die 40°C-Marke überschritten, die erforderlichen mindestens 55°C jedoch nicht erreicht. Wie bei der Kryotherapie kann somit aber, sowohl bei der RFA, als auch bei der LITT von einer effektiven in toto Ablation mit Tumorzerstörung ausgegangen werden.

5.2 GFP-Transfektion und Tumorzellimplantation in die Leber

Die erste Verwendung eines grün fluoreszierenden Proteins zur Identifikation von Tumorzellen erfolgte 1997. Die Erbinformation stammt aus einer biolumineszenten Qualle und weist nach Transfektion in das Erbgut verschiedenster Zellen mittels eines Vektors in verschiedenen Arbeiten eine sehr gute Stabilität bei gleichzeitiger hoher Expressivität auch *in vivo* auf [98; 99; 100]. Der Vorteil der GFP-Fluoreszenz ist, dass sie keine Zugabe von exogenen Substanzen benötigt, keine Interferenz mit endogenem GFP vorhanden ist und dass das GFP-Gen durch seinen Einbau in das Genom der Zelle über Generationen weitergegeben wird und daher lange Zeit nachgewiesen werden kann [98]. Somit stellt es ein viel versprechendes Modell zur Untersuchung von Tumorzellen in Langzeitstudien dar, sowohl in Bezug auf die Wirksamkeit verschiedener Therapieoptionen als auch auf die Untersuchung von Mikrometastasen [101]. Jedoch zeigte sich auch, dass die Veränderungen des Erbgutes nicht ohne Einfluss auf die Eigenschaften eines Zellstammes sind. So wurde

mehrfach beschrieben, dass sich die Teilungsrate und die *in vivo* Angehrate der transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten deutlich verringert [88; 101]. Diese Ergebnisse konnten *in vitro* bestätigt werden. Die Teilungsrate der GFP-transfizierten Zellen war im Vergleich zu den nicht transfizierten CC531-Zellen um 29% verringert. Dies hatte zur Folge, dass das Protokoll zur Tumorzellimplantation angepasst werden musste. Die Zahl der implantierten Zellen musste verdoppelt und das Lösungsmedium verändert werden.

Die Expression von GFP ist laut Thews et al. *in vitro* über mehr als 40 Passagen stabil [101]. Um einen Verlust an GFP-Expression zu vermeiden, wurden ausschließlich Zellen bis zur 10. Passage verwendet. Hier wurde eine stabile Expression beobachtet.

Durch den Transfer von *in vitro* zu *in vivo* zeigte sich in verschiedenen Arbeiten ein Expressionsverlust um den Faktor 2 bis 4 [88; 101]. Die Lumineszenz der GFP positiven Zellen ist aber trotzdem um den Faktor 20 höher als die von GFP negativen Zellen [101]. Nach Implantation bleibt laut Thews et al. die GFP-Expression über mindestens 19 Passagen konstant [101]. Coralli et al. stellten hingegen fest, dass Hypoxie eine starke Abnahme der GFP-Expression verursacht, die erst nach 5-10 Stunden Reoxygenierung wieder erlangt wird, weshalb sie konstatierten, GFP eigne sich nicht zur Markierung von soliden Tumoren in denen Hypoxie ein häufiges Phänomen darstellt [102]. Um nachzuweisen, dass die in den Versuchen verwendeten Tumorzellen auch nach zehn Tagen *in vivo* in nahezu unverminderter Menge GFP exprimieren, wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Im Western Blot zeigte sich, dass GFP-transfizierte Zellen aus der Zellkultur eine deutliche Expression aufweisen. Tumoren aus Rattenlebern, induziert durch GFP-transfizierte Zellen, zeigten ebenfalls eine deutliche Bande. Diese zeigte sich ein wenig schwächer als jene der GFP-Zellen aus der Zellkultur. Aufgrund des bekannten Expressionsverlustes *in vivo* durch die oben genannten Faktoren, sowie der Tatsache, dass das Tumorgewebe nicht ausschließlich aus den implantierten CC531-Zellen besteht, sondern auch aus Fibroblasten, sowie anderen Stromazellen, kann von einer sehr guten Stabilität der GFP-Transfektion ausgegangen werden.

Mit der Verwendung von CC531 Tumorzellen und deren Implantation in den linken Leberlappen von WAG-Rij Ratten steht ein etabliertes Modell zur Verfügung, welches es ermöglicht, nach 7 bis 14 Tagen isolierte Tumoren zu erzeugen, die durch ihre Lage an der Oberfläche für verschiedenste Untersuchungen gut zugänglich sind. In der Regel werden 1×10^6 Zellen, gelöst in PBS, direkt unter die Leberkapsel injiziert. Bei der Verwendung von RPMI als Lösungsmittel für die Injektion wurde in einem Modell der Maus [103] ein überschießendes Tumorwachstum beobachtet. In dieser Arbeit wurde auch beschrieben, dass die Verwendung einer feinen Kanüle, z.B. 30 Gauge, von Bedeutung ist, um die Ausbreitung der Zellen in den Stichkanal und somit ein inhomogenes Tumorwachstum zu vermeiden. Zur Verhinderung der Ausbreitung von Tumorzellen über den Stichkanal in den extrahepatischen Raum und folglich Peritonealkarzinose erscheint der Verschluss der Injektionsstelle mit Acrylkleber als der effizienteste und praktikabelste [51; 86; 97; 103]. In dem vorliegenden Modell wurde dieses etablierte Modell mit der vorangehenden Transfektion der Tumorzellen mit GFP kombiniert. Aufgrund der bereits beschriebenen veränderten Wachstumsraten der transfizierten Zellen zeigte sich die Notwendigkeit die Zahl der zu implantierenden Zellen auf 10^7 zu steigern und diese zusätzlich in RPMI zu lösen, um eine adäquate Tumorgroße zu erreichen. Da die Suspension in $20 \mu\text{l}$ sehr dickflüssig war, um die feine Kanüle zu passieren, wurde das Protokoll modifiziert und die Zellen in einem Volumen von $40 \mu\text{l}$ gelöst. Entgegen der vorliegenden Daten war es aber trotzdem möglich ein isoliertes subkapsuläres Bläschen zu erzeugen und die Ruptur der Leberkapsel zu vermeiden. Die Injektion muss über mindestens 2 Minuten andauern und der Verschluss der Injektionsstelle sehr sorgfältig erfolgen. Mit diesem Vorgehen wurden in dieser Arbeit homogene, isolierte, GFP-positive Tumoren an der Oberfläche des linken Leberlappens nach einem Zeitraum von 10 Tagen erzeugt.

5.3 Frühe Auswirkung thermoablativer Verfahren auf die isoliert perfundierte Leber im offenen System

Verschiedene Autoren haben Klassifikationen für die Bewertung von Parenchymschäden, Integrität der Sinusoide, Vakuolenbildung, Nekrose und Apoptose in der Rattenleber entwickelt. Die von Tojimbara et al., Martin et al. und 't Hart et al. verwendeten Klassifikationen ähneln denen in der vorliegenden Arbeit. In HE-gefärbeten Schnitten wurden Veränderungen der Hepatozyten, der Kerne und der Sinusoide bewertet und daraus Rückschlüsse auf Leberparenchymschäden durch Hypoxie, Minderperfusion und hyperbare Perfusion gezogen. Die Beurteilung erfolgte in diesen Arbeiten nach semiquantitativen Scores. So wurden u.a. pyknotisch aussehende Kerne ebenso wie die Erweiterung der Sinusoide als Zeichen für eine ausgeprägte Leberzerstörung gesehen [87; 92; 104; 105]. Bei Betrachtung der Ergebnisse der histomorphologischen Veränderungen der Leber in der Kontrollgruppe kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die einstündige extrakorporale Perfusion keine zellulären Schäden verursachte. Die intralobuläre Balkenstruktur war durchgehend intakt, die Hepatozyten zeigten sich rund und regelmäßig, Anzeichen für Apoptose oder Pyknose waren nicht zu finden. Intrasinusoidale Zellfragmente oder Zellen im Lumen der Gefäße konnten nur vereinzelt gesehen werden. Die Häufigkeit von Fibrinthromben in den Gefäßen war sehr niedrig.

In der RFA- und LITT-Gruppe fanden sich sehr ähnliche histomorphologische Veränderungen. Das Volumen der Läsionen überschritt deutlich das Volumen der Tumoren, somit ist auch aufgrund der Histologie davon auszugehen, dass eine effektive Tumorzerstörung erreicht wurde. Die intralobuläre Balkenstruktur war stark zerstört. Analog konnte festgestellt werden, dass die Kondensation des Kernchromatins der Hepatozyten signifikant verstärkt beobachtet wurde als in der Kontrollgruppe. Es ist von einer Entkopplung von Translation und Transkription auszugehen. Dies ist Merkmal von Apoptose und nekrotischem Zelltod. Die Veränderungen der Hepatozyten waren signifikant stärker ausgeprägt waren als in der Kryogruppe. Signifikant gegenüber der Kontrollgruppe war auch

die Häufigkeit von Zellen im Lumen, als Zeichen für eine Instabilität des Zellverbandes. Auffällig waren die im Vergleich zur Kryogruppe sehr gering vorhandenen Fibrinthromben in der RFA-Gruppe. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die thermoablativen Verfahren eine ausgeprägte Schädigung des Leberparenchyms verursachten.

Die Beurteilung der histomorphologischen Veränderungen in der Kryogruppe ergab ein anderes Gesamtbild. Im Vergleich zu den thermoablativen Verfahren war die Intaktheit der Hepatozyten in der Kryogruppe signifikant besser. Auch die Zerstörung der intralobulären Balkenstruktur und Zellkernveränderungen waren in dieser Gruppe deutlich weniger ausgeprägt, allerdings nicht signifikant. Auffällig war das häufigere Auftreten von intrasinusoidalen Fragmenten und Gefäßthromben in der Kryogruppe. Diese Beobachtung korreliert mit den Beobachtungen von Schüder et al., die feststellten, dass sich während der Kryotherapie die Sinusoide erweitern und durch Zellschrott verstopft werden, was zur Ausdehnung der Läsion führt. Im Vergleich zu den thermoablativen Verfahren zeigten sich seltener Zellen im Lumen der Gefäße der normalen Leber. Allerdings wurden die histomorphologischen Schnitte in der aktuellen Arbeit erst 30 Minuten nach Beendigung der Ablation erstellt. Somit könnten Zellen, die aufgrund der Ablation ausgeschwemmt wurden, die Leber bereits verlassen haben.

5.4 Tumorzelldisseminierung durch thermoablativ Verfahren

Der Nachweis von GFP-transfizierten Zellen ist mit vielen Methoden möglich. Zur Suche von Mikrometastasen im Gewebe findet häufig die Färbung mit GFP-Antikörpern Anwendung. Diese Technik ist allerdings ungeeignet zur Quantifikation der Zellen und es müssen sehr viele Schnitte angefertigt und ausgewertet werden, um die gesuchten Zellen ausfindig zu machen [101]. Thews et al. haben gezeigt, dass die PCR für zirkulierende Zellen eine wesentlich sensitivere Technik bietet. Sie konnten sogar bis zu 10 Krebszellen (DS^{GFP} Sarkom der Ratte) in 100 ml Blut der Ratte nachweisen [101]. Das entspricht einer Nachweisgrenze von 10^1 Krebszellen auf 10^7 kernhaltigen Zellen. Um später bei Nachweis

der GFP-Zellen im Perfusat deren Quantifizierung vornehmen zu können, wurden Verdünnungsreihen erstellt. Im Western Blot zeigte sich eine Nachweisschwelle von 10^3 GFP-transfizierten Zellen auf 10^6 nicht transfizierten Zellen. Um die Nachweisschwelle weiter zu senken wurde dieselbe Reihe in der PCR untersucht. Hier zeigte sich dieselbe Sensitivität.

Da davon auszugehen war, dass die im Perfusat vermuteten Zellen in niedrigerer Konzentration vorhanden waren, wurde der Nachweis im TaqMan erprobt. Zen et al. hatten gezeigt, dass es mittels TaqMan sogar möglich ist 10 Krebszellen in 1 ml Blut zu identifizieren [106]. Dies entspricht bei menschlichem Blut mit durchschnittlich 6000 kernhaltigen Zellen pro μl , einer Schwelle von $10^1/6 \times 10^6$. In der erstellten Verdünnungsreihe zeigte sich analog zu diesen Ergebnissen, dass bis zu 10 GFP-transfizierte Zellen auf 10^6 nicht transfizierten Zellen nachweisbar waren, was annähernd den Ergebnissen von Zen et al. entspricht. Somit stellt die Real Time-PCR im TaqMan die geeignetste, sensitivste Methode zur Identifizierung von GFP-transfizierten Zellen.

Rezidive nach kurativer Resektion von kolorektalen Lebermetastasen sind ein häufig zu beobachtendes Phänomen. Weitz, Koch et al. stellten die Vermutung an, dass die hohe Rate extrahepatischer Rezidive an der Disseminierung von Tumorzellen während der Resektion liegt [85]. Mook et al. stellten fest, dass bei großen Eingriffen mit Ziel der Resektion von Metastasen in der Leber mit steigender Manipulation am Tumor ein höheres Risiko an Tumorzell-dissemination zu verzeichnen ist, was folglich höhere Rezidivraten mit sich ziehe [88]. In einer Folgestudie von Koch et al. hatten alle Patienten, bei denen in postoperativ abgenommenen Blutproben Tumorzellen nachweisbar waren, im Verlauf ein Rezidiv ihres Karzinoms und eine deutlich schlechtere Prognose als Patienten bei denen die Blutanalyse negativ war [107]. Folglich haben postoperativ nachweisbar peripher zirkulierende Tumorzellen eine prognostische Bedeutung für das ereignisfreie Überleben nach kurativer Resektion von Lebermetastasen [107].

In der vorliegenden Arbeit gelang in der Kryogruppe nach Ablation bei zwei von acht Tieren der Nachweis von GFP-kodierender DNA im TaqMan. In den beiden thermoablativen Gruppen, RFA und LITT, wurde dieser Nachweis nicht erbracht. Damit stellt sich die Frage, ob mit Anwendung der Kryotherapie das Risiko für Rezidive, intra- wie extrahepatisch, steigt. Yan et al. zeigten, dass nach Kryotherapie 43% der Patienten im Verlauf Lungenmetastasen aufwiesen und dass Patienten, deren Tumor reseziert und kryoabladiert oder ausschließlich kryotherapiert wurden, ein signifikant kürzeres Lungenmetastasen freies Überleben aufwiesen, als Patienten deren Tumor reseziert und nicht abladiert wurde [108]. Auch Onik et al. beobachteten nach Kryotherapie ein gehäuftes Auftreten von Rezidiven außerhalb des abladierten Gebietes [61]. Yan et al. vermuteten, die Ursache hierfür liege im Einbringen der Sonde oder dass Tumorzellen durch Blutung aus der Punktionsstelle ausgeschwemmt würden [108]. Dies ist keine Erklärung für die nachgewiesenen Tumorzellen im Perfusat. Perfusat, welches entsprechend einer Blutung aus der Punktionsstelle austrat, wurde nicht gesammelt. Während die Sonden bei RFA und LITT in den Tumor eingestochen wurden, kam es hier zu keiner nachweisbaren Tumorzell dissemination. Die Sonde der Kryotherapie hingegen wurde lediglich mit leichtem Druck auf den Tumor aufgebracht, der Tumor wurde hier nicht eingestochen, die Oberfläche wurde intakt gelassen. Trotzdem kam es in eben dieser Gruppe zu einer nachweisbaren Dissemination von Tumorzellen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Verfahren Kryotherapie an sich als Ursache für die im Vergleich zu anderen Therapieverfahren hohen intra- und extrahepatischen Rezidive zu sehen ist.

Zwei von acht positiv getesteten Tieren in der Kryogruppe gegenüber null von acht Tieren in den Vergleichsgruppen ist mit einem p-Wert von 0,082 knapp nicht signifikant. Die gemessene Zahl von GFP-positiven Zellen in den positiven Proben entspricht einer Konzentration von weniger als 10 Zellen in 10^6 Zellen. 0,0001% der im Perfusat vorhandenen kernhaltigen Zellen waren somit GFP-positiv. Aufgrund der angewandten Methodik war es notwendig, die im gesammelte Perfusat vorhandenen Zellen mehrfach zu waschen, um sie dem TaqMan zuführen zu können. Sehr wahrscheinlich ist trotz sorgfältigen

Vorgehens ein Teil der ausgeschwemmten Zellen verloren gegangen. Auch wenn es sich hier um eine sehr kleine Menge an nachgewiesenen Zellen handelt und keine Signifikanz besteht, ist die Tatsache, dass überhaupt ein Nachweis erbracht wurde, nicht von der Hand zu weisen. Ein Zusammenhang zwischen der nachgewiesenen Tumorzell dissemination und der hohen extra- und intrahepatischen Rezidivraten ist hochwahrscheinlich.

Es ist somit davon auszugehen, dass Tumorzellen im Rahmen der Kryotherapie kolorektaler Lebermetastasen disseminieren, was diese Therapie für die Behandlung von Lebermetastasen als untauglich erscheinen lässt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis von GFP-positiven Zellen über deren DNA erbracht. Der Nachweis von GFP-tragender DNA ist jedoch nicht zwangsläufig gleichbedeutend mit dem Nachweis lebender Tumorzellen. Fragmente einer bereits abgetöteten Zelle können ebenso DNA enthalten, da diese relativ stabil ist. Es wäre sinnvoll, wenn auch technisch deutlich aufwändiger, den Nachweis im Experiment mittels Reverser-Transkriptase-PCR (rt-PCR) zu erbringen, wie es z.B. Koch et al. [107] oder auch Zen et al. [106] gelungen ist. Im Gegensatz zu DNA ist der Nachweis von der in der rt-PCR verwendeten mRNA gleichbedeutend mit dem Nachweis lebender Zellen, da mRNA nach dem Tod der Zelle innerhalb kürzester Zeit von im Organismus zirkulierenden mRNAsen abgebaut wird [107]. Durch den Nachweis lebender disseminierter Zellen ließe sich feststellen, dass die Kryotherapie zur Behandlung CRLM obsolet ist.

5.5 Schlussfolgerung

Die Kombination des etablierten Modells der isolierten extrakorporalen Rattenleberperfusion mit der Verwendung von stabil GFP-transfizierten CC531-Zellen zur Erzeugung isolierter subkapsulärer Tumoren eignet sich gut zur Untersuchung von kolorektalen Lebermetastasen.

Trotz ausreichender lokaler Tumordestruktion werden immer wieder Lokalrezidive und Metastasen nach Tumorablation außerhalb des Ablationsgebietes intra- und extrahepatisch beobachtet. Nach Kryoblation von kolorektalen Lebermetastasen konnte in der Real Time PCR die DNA der Tumorzellen nachgewiesen werden. Nach Radiofrequenzablation oder Laserinduzierter Thermochemotherapie wurde dieser Nachweis nicht erbracht, weshalb von einer Dissemination von Tumorzellen im Rahmen der Kryotherapie auszugehen ist. Ein mRNA-Nachweis mittels rt-PCR könnte zeigen, dass es sich hierbei um lebende disseminierte Tumorzellen handelt.

6 Literaturverzeichnis

1. Seifert JK, Morris DL. (1999) Indicators of recurrence following cryotherapy for hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* 86:234-240.
2. Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Fleig W, Fölsch UR, Frühmorgen P, Graeven U, Hohenberger W, Holstege A, Junginger T, Kopp I, Kühnbacher T, Porschen R, Propping P, Riemann JF, Rödel C, Sauer R, Sauerbruch T, Schmitt W, Schmoll HJ, Zeitz M, Selbmann HK (2008) S3-Leitlinien "Kolorektales Karzinom" Ergebnisse evidenzbasierter Konsensuskonferenzen am 6./7. Februar 2004 und am 8./9. Juni 2007 (für die Themenkomplexe IV, VI, VII) *Z Gastroenterol* 46:1-43.
3. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM (2006) Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 244:254-259.
4. Machi J, Oishi AJ, Sumida K, Sakamoto K, Furumoto NL, Oishi RH, Kylstra JW. (2006) Long-term outcome of radiofrequency ablation for unresectable liver metastases from colorectal cancer: evaluation of prognostic factors and effectiveness in first- and second-line management. *Cancer J* 12:318-26.
5. Lise M, Pilati P, Da Pian P, Mocellin S, Nitti D, Corazzino S. (2003) Treatment options for liver metastases from colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 22:149-156.
6. Aloia TA, Vauthey JN, Loyer EM, Ribero D, Pawlik TM, Wei SH, Curley SA, Zorzi D, Abdalla EK. (2006) Solitary colorectal liver metastasis: resection determines outcome. *Arch Surg* 141:460-466.
7. Pantaleo MA, Nannini M, Maleddu A, Fanti S, Ambrosini V, Nanni C, Boschi S, Biasco G. (2008) Conventional and novel PET tracers for imaging in oncology in the era of molecular therapy. *Cancer Treat Rev* 34:103-121.
8. Ballantyne GH, Quin J. (1993) Surgical treatment of liver metastases in patients with colorectal cancer. *Cancer* 71:4252-4266.
9. Esposito A, Mancini R, Ettorre G, Garufi C, Saracca E, Arcieri S, Cosimelli M. (2003) A combined approach of neoadjuvant chemotherapy and surgery for colorectal liver metastases. *J Exp Clin Cancer Res* 22:197-202.
10. Cady B, Monson DO, Swinton NW. (1970) Survival of patients after colonic resection for carcinoma with simultaneous liver metastases. *Surg Gynecol Obstet* 131:697-700.
11. Martin RC. (2006) Hepatic tumor ablation: cryo versus radiofrequency, which is better? *Am Surg* 72:391-392.
12. Maataoui A, Qian J, Mack MG, Straub R, Oppermann E, Khan MF, Knappe V, Vogl TJ. (2005) Laser-induced interstitial thermotherapy (LITT) in hepatic metastases of various sizes in an animal model *Rofo* 177:405-410.

13. Wong SL, Edwards MJ, Chao C, Simpson D, McMasters KM. (2001) Radiofrequency ablation for unresectable hepatic tumors. *Am J Surg* 182:552-557.
14. Mack MG, Straub R, Eichler K, Engelmann K, Zangos S, Roggan A, Woitaschek D, Böttger M, Vogl TJ. (2001) Percutaneous MR imaging-guided laser-induced thermotherapy of hepatic metastases. *Abdom Imaging* 26:369-374.
15. Miller G, Biernacki P, Kemeny NE, Gonen M, Downey R, Jarnagin WR, D'Angelica M, Fong Y, Blumgart LH, DeMatteo RP. (2007) Outcomes after resection of synchronous or metachronous hepatic and pulmonary colorectal metastases. *J Am Coll Surg* 205:231-238.
16. Wei AC, Greig PD, Taylor B, Langer B, Gallinger S (2006) Survival after hepatic resection for colorectal metastases: a 10-year experience. *Ann Surg Oncol* 13:668-676.
17. Scheele J (2001) Anatomiegerechte und atypische Leberresektionen. *Chirurg* 72:113-124
18. Hamady ZZ, Cameron IC, Wyatt J, Prasad RK, Toogood GJ, Lodge JP. (2006) Resection margin in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastasis: a critical appraisal of the 1cm rule. *Eur J Surg Oncol* 32:557-563.
19. Tomlinson JS, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Fong Y, Kornprat P, Gonen M, Kemeny N, Brennan MF, Blumgart LH, D'Angelica M. (2007) Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *J Clin Oncol* 25:4575-4580.
20. Are C, Gonen M, Zazzali K, Dematteo RP, Jarnagin WR, Fong Y, Blumgart LH, D'Angelica M. (2007) The impact of margins on outcome after hepatic resection for colorectal metastasis. *Ann Surg* 246:295-300.
21. Puls R, Langner S, Rosenberg C, Hegenscheid K, Kuehn JP, Noeckler K, Hosten N (2009) Laser ablation of liver metastases from colorectal cancer with MR thermometry: 5-year survival. *J Vasc Interv Radiol* 20:225-234.
22. Fusai G, Davidson BR (2003) Strategies to increase the resectability of liver metastases from colorectal cancer. *Dig Surg* 20:481-496.
23. Onik GM, Atkinson D, Zemel R, Weaver ML. (1993) Cryosurgery of liver cancer. *Semin Surg Oncol* 9:309-317.
24. Seifert JK, Junginger T, Morris DL. (1998) A collective review of the world literature on hepatic cryotherapy. *J R Coll Surg Edinb* 43:141-154.
25. Ravikumar TS, Steele GD Jr. (1989) Hepatic cryosurgery. *Surg Clin North Am* 69:433-440.
26. Stangl R, Altendorf-Hofmann A, Charnley RM, Scheele J. (1994) Factors influencing the natural history of colorectal liver metastases. *Lancet* 4;343:1405-10.
27. Chiappa A, Zbar AP, Biella F, Staudacher C. (1999) Survival after repeat hepatic resection for recurrent colorectal metastases. *Hepatogastroenterology* 46:1065-1070.

28. Hughes KS, Simon R, Songhorabodi S, Adson MA, Ilstrup DM, Fortner JG, Maclean BJ, Foster JH, Daly JM, Fitzherbert D, et al. (1986) Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases: a multi-institutional study of patterns of recurrence. *Surgery* 100:278-284.
29. Lewis AM, Martin RC. (2006) The treatment of hepatic metastases in colorectal carcinoma. *Am Surg* 72:466-473.
30. Amersi FF, McElrath-Garza A, Ahmad A, Zogakis T, Allegra DP, Krasne R, Bilchik AJ. (2006) Long-term survival after radiofrequency ablation of complex unresectable liver tumors. *Arch Surg* 141:581-587.
31. Taschieri AM, Elli M, Vignati GA, Montecamozzo G, Danelli PG, Kurihara H, Poliziani D. (2003) Repeated liver resection for recurrent metastases from colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 50:472-474.
32. Kato T, Yasni K, Hirai T, Kanemitsu Y, Mori T, Sugihara K, Mochizuki H, Yamamoto J (2003) Therapeutic results for hepatic metastasis of colorectal cancer with special reference of effectiveness of hepatectomy; analysis of prognostic factors for 763 cases reported at 18 institutions. *Dis Colon Rectum* 46:22-31.
33. Ohlsson B, Stenram U, Tranberg KG. (1998) Resection of colorectal liver metastases: 25-year experience. *World J Surg* 22:268-276.
34. Van Ooijen B, Wiggers T, Meijer S, van der Heijde MN, Slooff MJ, van de Velde CJ, Obertop H, Gouma DJ, Bruggink ED, Lange JF, et al. (1992) Hepatic resections for colorectal metastases in The Netherlands. A multiinstitutional 10-year study. *Cancer* 70:28-34.
35. Rees M, Plant G, Bygrave S. (1997) Late results justify resection for multiple hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* 84:1136-1140.
36. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. (1999) Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 230:309-318.
37. Scheele J, Altendorf-Hofmann A, Grube T, Hohenberger W, Stangl R, Schmidt K. (2001) Resection of colorectal liver metastases. What prognostic factors determine patient selection? *Chirurg* 72:547-560.
38. Jaeck D, Bachellier P, Guiguet M, Boudjema K, Vaillant JC, Balladur P, Nordlinger B. (1997) Long-term survival following resection of colorectal hepatic metastases. Association Française de Chirurgie. *Br J Surg* 84:977-980.
39. Berber E, Tsinberg M, Tellioglu G, Simpfendorfer CH, Siperstein AE (2008) Resection versus laparoscopic radiofrequency thermal ablation of solitary colorectal liver metastasis. *J Gastrointest Surg* 12:1967-1972.

40. Mala T. (2006) Cryoablation of liver tumours - a review of mechanisms, techniques and clinical outcome. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 15:9-17.
41. Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. (2005) Mechanisms of focal heat destruction of liver tumors. *J Surg Res* 127:208-223.
42. Gage AA. (1998) History of cryosurgery. *Semin Surg Oncol* 14:99-109.
43. Cooper IS, Hirose T. (1966) Application of cryogenic surgery to resection of parenchymal organs. *N Engl J Med* 274:15-8.
44. Zhou XD, Tang ZY, Yu YQ, Ma ZC. (1988) Clinical evaluation of cryosurgery in the treatment of primary liver cancer. Report of 60 cases. *Cancer* 1;61:1889-1892.
45. Kollmar O, Richter S, Schilling MK, Menger MD, Pistorius GA (2004) Advanced hepatic tissue destruction in ablative cryosurgery: potentials of intermittent freezing and selective vascular inflow occlusion. *Cryobiology* 48:263-272.
46. Dilley AV, Dy DY, Wartlers A, Copeland S, Gillies AE, Morris RW, Gibb DB, Cook TA, Morris DL. (1993) Laboratory and animal model evaluation of the Cryotech LCS 2000 in hepatic cryotherapy. *Cryobiology* 30:74-85.
47. Healey WV, Priebe CJ Jr, Farrer SM, Phillips LL. (1971) Hepatic cryosurgery. Acute and long-term effects. *Arch Surg* 103:384-392.
48. Stucke K, Kahlert F. (1969) Morphological studies on cryogenic surgery of the liver. *Acta Hepatosplenol* 16:311-324.
49. Gage AA, Guest K, Montes M, Caruana JA, Whalen DA Jr. (1985) Effect of varying freezing and thawing rates in experimental cryosurgery. *Cryobiology* 22:175-182.
50. Berger WK, Schüder G, Feifel G. (1996) Temperature distribution pattern in liver tissue in freezing procedures with new cryoprobes. *Chirurg* 67:833-838.
51. Richter S, Pistorius G, Seidel R, Feifel G, Schilling MK, Vollmar B, Menger MD. (2005) Arteriovenular shunting critically determines shutdown of microcirculation upon cryotherapy in tumor-bearing rat liver. *Ann Surg Oncol* 12:303-312.
52. Schüder G, Pistorius G, Fehringer M, Feifel G, Menger MD, Vollmar B. (2000) Complete shutdown of microvascular perfusion upon hepatic cryothermia is critically dependent on local tissue temperature. *Br J Cancer* 82:794-799.
53. Schüder G, Vollmar B, Richter S, Pistorius G, Fehringer M, Feifel G, Menger MD. (1999) Epi-illumination fluorescent light microscopy for the in vivo study of rat hepatic microvascular response to cryothermia. *Hepatology* 29:801-808.
54. Charnley RM, Doran J, Morris DL. (1989) Cryotherapy for liver metastases: a new approach. *Br J Surg* 76:1040-1041.
55. Mazur P. (1977) The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14:251-272.
56. Mazur P. (1970) Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 168:939-949.

57. Stewart GJ, Preketes A, Horton M, Ross WB, Morris DL. (1995) Hepatic cryotherapy: double-freeze cycles achieve greater hepatocellular injury in man. *Cryobiology* 32:215-219.
58. Goodie DB, Horton MD, Morris RW, Nagy LS, Morris DL. (1992) Anaesthetic experience with cryotherapy for treatment of hepatic malignancy. *Anaesth Intensive Care* 20:491-496.
59. Pistorius GA, Alexander C, Krisch CM, Feifel G, Schilling MK, Menger MD. (2005) Local platelet trapping as the cause of thrombocytopenia after hepatic cryotherapy. *World J Surg* 29:657-660.
60. Stucke K, Hirte D. (1970) Cryosurgery of malignant liver tumors. *Acta Hepatosplenol* 17:416-422.
61. Onik G, Rubinsky B, Zemel R, Weaver L, Diamond D, Cobb C, Porterfield B. (1991) Ultrasound-guided hepatic cryosurgery in the treatment of metastatic colon carcinoma. Preliminary results. *Cancer* 15;67:901-907.
62. Jungraithmayr W, Burger D, Olschewski M, Eggstein S. (2005) Cryoablation of malignant liver tumors: results of a single center study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 4:554-60.
63. Junginger T, Seifert JK, Weigel TF, Heintz A, Kreitner KF, Gerharz CD. (1998) Cryotherapy of liver metastases. Initial results. *Med Klin (Munich)* 15;93:517-23.
64. Helling TS. (2000) Realistic expectations for cryoablation of liver tumors. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 7:510-5.
65. Mala T, Aurdal L, Frich L, Samset E, Hol PK, Edwin B, Søreide O, Gladhaug I. (2004) Liver tumor cryoablation: a commentary on the need of improved procedural monitoring. *Technol Cancer Res Treat* 3:85-91.
66. Adam R, Bismuth H, Castaing D, Waechter F, Navarro F, Abascal A, Majno P, Engerran L. (1997) Repeat hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 225:51-60.
67. Weaver ML, Atkinson D, Zemel R. (1995) Hepatic cryosurgery in treating colorectal metastases. *Cancer* 15;76:210-214.
68. Ravikumar TS, Kane R, Cady B, Jenkins R, Clouse M, Steele G Jr. (1991) A 5-year study of cryosurgery in the treatment of liver tumors. *Arch Surg* 126:1520-1523.
69. Stella M, De Cian F, Mariani F, Quaglia F, Baldo S, Mithieux F, Meeus P, Kaemmerlen P, Rivoire M. (2005) Cryosurgery with transpleurodiaphragmatic approach in the treatment of non-resectable and recurrent hepatic metastasis from the colorectum. *Suppl Tumori* 4:S44.
70. Al-Asfoor A, Fedorowicz Z, Lodge M (2008) Resection versus no intervention or other surgical interventions for colorectal liver metastases. *Cochrane Database Syst Rev* 16:CD006039

71. Yan DB, Clingan P, Morris DL. (2003) Hepatic cryotherapy and regional chemotherapy with or without resection for liver metastases from colorectal carcinoma: how many are too many? *Cancer* 98:320-330.
72. Dwerryhouse SJ, Seifert JK, McCall JL, Iqbal J, Ross WB, Morris DL. (1998) Hepatic resection with cryotherapy to involved or inadequate resection margin (edge freeze) for metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* 85:185-187.
73. Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. (2006) Altered growth patterns of colorectal liver metastases after thermal ablation. *Surgery* 139:73-81.
74. Bown SG. (1983) Phototherapy in tumors. *World J Surg* 7:700-709.
75. Germer CT, Buhr HJ, Isbert C. (2005) Nonoperative ablation for liver metastases. Possibilities and limitations as a curative treatment. *Chirurg* 76:552-554, 556-563.
76. Veenendaal LM, de Jager A, Stapper G, Borel Rinkes IH, van Hillegersberg R. (2006) Multiple fiber laser-induced thermotherapy for ablation of large intrahepatic tumors. *Photomed Laser Surg* 24:3-9.
77. Vogl TJ, Straub R, Eichler K, Woitascheck D, Mack MG (2002) Malignant liver tumors treated with MR imaging-guided laser-induced thermotherapy: experience with complications in 899 patients (2520 lesions). *Radiology* 225:367-377.
78. Chhabra DG, Shah RC, Parikh V, Jagannath P. (2006) Radiofrequency ablation of liver tumors: experience with open and percutaneous approach. *Indian J Gastroenterol* 25:66-70.
79. Vogl TJ, Mack MG, Müller PK, Straub R, Engelmann K, Eichler K. (1999) Interventional MR: interstitial therapy. *Eur Radiol* 9:1479-1487.
80. Gillams AR, Lees WR (2009) Five year survival in 309 patients with colorectal liver metastases treated with radiofrequency ablation. *Eur Radiol* 19:1206-1213.
81. Solbiati L, Livraghi T, Goldberg SN, Ierace T, Meloni F, Dellanoce M, Cova L, Halpern EF, Gazelle GS (2001) Percutaneous radio-frequency ablation of hepatic metastases from colorectal cancer: long term results in 117 patients. *Radiology* 22:159-166.
82. Bartlett DL. (2000) Treatment of patients with hepatic metastases. *Cancer J* 6:S169-176.
83. Chen MH, Yang W, Yan K, Gao W, Dai Y, Wang YB, Zhang XP, Yin SS. (2005) Treatment efficacy of radiofrequency ablation of 338 patients with hepatic malignant tumor and the relevant complications. *World J Gastroenterol* 28;11:6395-6401.
84. Vogl TJ, Straub R, Eichler K, Söllner O, Mack MG. (2004) Colorectal carcinoma metastases in liver: laser-induced interstitial thermotherapy--local tumor control rate and survival data. *Radiology* 230:450-458.
85. Weitz J, Koch M, Kienle P, Schrödel A, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M. (2000) Detection of hematogenic tumor cell dissemination in patients undergoing resection of liver metastases of colorectal cancer.

- Ann Surg 232:66-72.
86. Maataoui A, Qian J, Mack MG, Khan MF, Oppermann E, Roozru M, Schmidt S, Bechstein WO, Vogl TJ. (2005) Liver metastases in rats: chemoembolization combined with interstitial laser ablation for treatment. *Radiology* 237:479-484.
 87. Bessems M, 't Hart NA, Tolba R, Doorschodt BM, Leuvenink HG, Ploeg RJ, Minor T, van Gulik TM. (2006) The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim* 40:236-246.
 88. Mook OR, Van Marle J, Vreeling-Sindelárová H, Jonges R, Frederiks WM, Van Noorden CJ. (2003) Visualization of early events in tumor formation of eGFP-transfected rat colon cancer cells in liver. *Hepatology* 38:295-304.
 89. Cheung K, Hickman PE, Potter JM, Walker NI, Jericho M, Haslam R, Roberts MS. (1996) An optimized model for rat liver perfusion studies. *J Surg Res* 66:81-89.
 90. Ahmed I, Attia MS, Ahmad N, Lodge JP, Potts DJ. (2001) Use of isolated perfused rat liver model for testing liver preservation solutions. *Transplant Proc* 33:3709-3711.
 91. Schleifer D, Bikfalvi A, Sauer HJ (1970) Experimentelle Untersuchungen zur Ischämietoleranz der körperwarmen Leber. *Langenbeck's Archives of Surgery* 327:1052-1053.
 92. Tojimbara T, Wicomb WN, Garcia-Kennedy R, Burns W, Hayashi M, Collins G, Esquivel CO. (1997) Liver transplantation from non-heart beating donors in rats: influence of viscosity and temperature of initial flushing solutions on graft function. *Liver Transpl Surg* 3:39-45.
 93. Kucsulik P, Kokas P (1979) Ischemic damage of the liver. Part I: In vitro investigation of the prevention of the ischemic lesion of the liver. *Acta hepatogastroenterol* 26:279-283
 94. Richter S, Yamauchi J, Minor T, Vollmar B, Menger MD (2000) Effect of warm ischemia time and organ perfusion technique on liver microvascular preservation in a non-heart-beating rat model. *Transplantation* 69:20-24.
 95. Whittaker DK. (1978) Electron microscopy of the ice crystals formed during cryosurgery: relationship to duration of freeze. *Cryobiology* 15:603-607.
 96. Yamada S, Tsubouchi S. (1976) Rapid cell death and cell population recovery in mouse skin epidermis after freezing. *Cryobiology* 13:317-327.
 97. Germer CT, Isbert C, Albrecht D, Roggan A, Pelz J, Ritz JP, Müller G, Buhr HJ (1999) Laser-induced thermotherapy combined with hepatic arterial embolization in the treatment of liver tumors in a rat liver tumor model. *Ann Surg* 230:55-62.
 98. Chishima T, Miyagi Y, Wang X, Yamaoka H, Shimada H, Moossa AR, Hoffman RM. (1997) Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res* 57:2042-2047.
 99. Morin JG, Hastings JW. (1971) Energy transfer in a bioluminescent system.

- J Cell Physiol 77:313-318.
100. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 11;263:802-805.
101. Thews O, Lambert C, Kelleher DK, Biesalski HK, Vaupel P, Frank J. (2005) An in vivo tumor model expressing green fluorescent protein for the investigation of metastasis. *Int J Oncol* 27:705-712.
102. Coralli C, Cemazar M, Kanthou C, Tozer GM, Dachs GU. (2001) Limitations of the reporter green fluorescent protein under simulated tumor conditions. *Cancer Res* 15;61:4784-4790.
103. Kollmar O, Schilling MK, Menger MD. (2004) Experimental liver metastasis: standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin Exp Metastasis* 21:453-460.
104. 't Hart NA, van der Plaats A, Leuvenink HG, Wiersema-Buist J, Olinga P, van Luyn MJ, Verkerke GJ, Rakhorst G, Ploeg RJ. (2004) Initial blood washout during organ procurement determines liver injury and function after preservation and reperfusion. *Am J Transplant* 4:1836-1844.
105. Martin H, Bournique B, Sarsat JP, Albaladejo V, Lerche-Langrand C. (2000) Cryopreserved rat liver slices: a critical evaluation of cell viability, histological integrity, and drug-metabolizing enzymes. *Cryobiology* 41:135-144.
106. Zen H, Nakashiro K, Shintani S, Sumida T, Aramoto T, Hamakawa H. (2003) Detection of circulating cancer cells in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 23:605-610.
107. Koch M, Kienle P, Hinz U, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M, Weitz J. (2005) Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg* 241:199-205.
108. Yan TD, Chiang G, Zhao J, Chan D, Morris DL. (2006) Lung metastases after liver resection or cryotherapy for hepatic metastasis from colorectal cancer-there is a difference! *HPB (Oxford)* 8:124-131.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger, der es mir ermöglicht hat, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes arbeiten zu können.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Otto Kollmar für die Überlassung des Themas, die Einweisung in die experimentell-chirurgische Arbeit und das Ermöglichen selbstständigen Arbeitens. Hervorzuheben sind seine konstruktive Betreuung und die Unterstützung beim Lösen anfallender Probleme.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer, die mich mit ihrer persönlichen Anleitung in die wissenschaftliche Tätigkeit einführte und mich während der gesamten Zeit mit Rat und Tat unterstützte. Ihre fachliche Kompetenz und ihre guten Ideen waren für das Gelingen der experimentellen Arbeit unerlässlich.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, insbesondere bei Frau Elisabeth Gluding und Frau Janine Becker bedanken. Beide haben wesentlich zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Jörg Häufel, Patty Sehmer, Katharina Stegmayer und Matis Bürgler, die mich immer wieder motivierten und in allen Belangen unterstützten.

8 Lebenslauf

Katharina Isabel Debnar-Daumler

Geburtsdatum/-ort 13.08.1982, Rio de Janeiro, Brasilien
Staatsangehörigkeit deutsch und brasilianisch

Schulbesuch

1984-1987 Englischer Kindergarten von Medina Qaboos, Sultanat Oman
1987-1996 Grundschule und Gymnasium, Neufahrn b. Freising, Deutschland
1996-2001 Deutsche Schule Mailand, Italien
26.05.2001 deutsches und italienisches Abitur, Notendurchschnitt 1,5

Studium

09/2001-04/2008 Studium der Humanmedizin in Homburg, Universität des Saarlandes
09.09.2003 Ärztliche Vorprüfung, Gesamtnote: befriedigend
schriftlicher Teil: ausreichend
mündlicher Teil: sehr gut
09/2003-04/2004 Studium an der Universidad de Valencia, Spanien
02/2007-02/2008 Praktisches Jahr
02/2007-04/2007 Traumatologie und Allgemein Chirurgie, Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg
04/2007-06/2007 Herz-Thorax-Chirurgie, University of Toronto, Kanada
07/2007-11/2007 Innere Medizin, Spital Saanen, Schweiz
11/2007-02/2008 Allgemeine Pädiatrie und Kinderonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg
05.05.2009 Staatsexamen, Gesamtnote: gut
schriftlicher Teil: gut
mündlicher Teil: gut

Ärztliche Tätigkeit

seit 01.11.2008 Assistenzärztin, Allgemein- und Viszeralchirurgie, Chefarzt Prof. Dr. Jehle, OSK Kliniken, Krankenhaus St. Elisabeth, Ravensburg