

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral-,
Thorax- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

in Zusammenarbeit mit der

Chirurgischen Klinik im Presbyterian Medical Center
der Columbia Universität New York

DISSERTATION

Einfluß des operativen Traumas auf die Entwicklung pulmonaler Metastasen bei hämatogen zirkulierenden Tumorzellen

—

Prävention und Immuntherapie

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Peer Wildbrett

aus Riesa

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. PD Dr. med. Christoph Andreas Jacobi
2. Prof. Dr. Hans-Detlev Saeger
3. PD Dr. med. Matthias Pross

eingereicht: 11. April 2002

Datum der Promotion: 14. Juli 2003

Zusammenfassung

Hintergrund: In einer Vielzahl von Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass malignes Wachstum nach Laparotomie deutlich gesteigert sein kann. Die Mechanismen, welche dieser Beobachtung zugrunde liegen sind bisher nur ungenügend erforscht. Die Schwere des chirurgischen Traumas durch Verletzung der Bauchwand kann mit postoperativer pulmonarer Dysfunktion korrelieren und Änderungen im Hämostasesystem hervorrufen. Durch diese Beeinflussung von Organsystemen und funktionellen Systemen könnten intra- und/ oder postoperativ Bedingungen entstehen, welche das Wachstum pulmonaler, hämatogener Metastasen begünstigen. Die Hypothesen der vorliegenden Studie waren: (a) eine Reduktion des chirurgischen Traumas und (b) die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen die malignen Zellen führen zu einer signifikant geringeren pulmonalen Metastasierung. Beide Hypothesen wurden im Tiermodell getestet. Die Tumorzellen wurden intravenös verabreicht und bildeten pulmonale Metastasen. Methodik: In Studie 1 wurde die Inzidenz von Lungenmetastasen nach Laparotomie (OP) oder Anlage eines CO₂ Pneumoperitoneums bestimmt. Insgesamt 60 Tiere wurden in 3 Gruppen aufgeteilt (n=20/Gruppe): Kontroll-Gruppe, Laparoskopie-Gruppe und Laparotomie-Gruppe. 1×10^5 TA3Haushka Adenocarcinom-Zellen wurden direkt im Anschluss an den Eingriff intravenös verabreicht. In Studie 2 wurde die Wirkung einer perioperativen Immunstimulation auf die Entstehung pulmonaler Metastasen untersucht. Insgesamt 100 Tiere wurden in 5 Gruppen aufgeteilt (n=20/Gruppe): Kontroll-Gruppe, Laparotomie-Gruppe (OP), OP + Monophosphoryl Lipid A (MPLA), OP + lysierte Tumorzellen (LTC), OP + MPLA + LTC. Das Vakzine bestand aus 5×10^5 lysierten TA3Ha Tumorzellen (LTC) und wurde fünfmal präoperativ und einmal postoperativ verabreicht. Monophosphoryl Lipid A, ein nichttoxisches Lipopolysaccharid-Derivat wurde in der OP + MPLA Gruppe als Immunstimulans und in der OP + MPLA + LTC Gruppe als Adjuvans verwendet. Allen Versuchstieren wurden analog zu Studie 1 10^5 TA3Haushka Adenocarcinom-Zellen direkt im Anschluss an den Eingriff verabreicht. Am 14. postoperativen Tag wurden die Tiere getötet, die Lungen entnommen und die Anzahl der pulmonalen Metastasen bestimmt. Ergebnisse: Studie1: Verglichen mit der Kontroll- und Laparoskopie-Gruppe entwickelten die Tiere der Laparotomie-Gruppe signifikant mehr Lungenmetastasen. Zwischen Kontroll- und Laparoskopie-Gruppe bestand kein statistischer Unterschied. Studie 2: Die Tiere der OP + LTC Gruppe und OP + LTC + MPLA Gruppe zeigten signifikant weniger pulmonale Metastasen im Vergleich zur OP Gruppe allein. Nur 30% der Tiere der OP + LTC + MPLA Gruppe entwickelten Lungentumoren. Im Gegensatz dazu traten bei 100% der Tiere der OP Gruppe Lungenmetastasen auf. Zusammenfassung: Das operative Trauma einer Laparotomie war assoziiert mit einer deutlich gesteigerten Inzidenz pulmonaler Metastasen. Die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen die intravenös verabreichten Tumorzellen bewirkte eine deutlich geringere Anzahl pulmonaler Metastasen.

Schlagwörter:

Maligner Tumor

Metastasen

Laparoskopie

Immuntherapie

Vaccinierung

Abstract

Background: Subcutaneous tumor growth and establishment is increased after laparotomy; significantly smaller increases have been noted after CO₂pneumoperitoneum (CO₂ pneumo). Less is known about the impact of surgery on the fate of blood borne tumor cells. The extent of surgical abdominal wall trauma also correlates with the extent of early postoperative pulmonary dysfunction and changes of the haemostasis. These changes may favor lung metastases (mets) formation. This study's hypotheses were: (a) a reduction in surgical trauma or (b) a specific immune up-regulation would limit lung mets formation. An intravenous tumor cell injection lung met model was used to test these hypotheses. **Methods:** Study 1 determined the incidence of lung mets after sham laparotomy (OP) and CO₂ pneumo. Three groups were studied (n=25/group): Anesthesia control (AC), CO₂ pneumo, and OP. 1 x 10⁵ TA3Haushka adenocarcinoma cells were inoculated via tail vein injection into all mice immediately after surgery. Study 2 determined the impact of perioperative immunomodulation on lung mets formation. Five groups were studied (n=20/group) : AC, OP, OP + Monophosphoryl Lipid A (MPLA), OP + lysed tumor cells (LTC), or OP + MPLA + LTC. The vaccine consisted of 5 x 10⁵ lysed TA3Ha tumor cells (LTC) and was given 5 times preop and once postop to the vaccine groups. MPLA, the nontoxic moiety of lipopolysaccharide, was used both as a vaccine adjuvant in the OP + MPLA + LTC group and as a nonspecific perioperative immune up-regulator in the OP + MPLA group. Five periop injections of MPLA were given to the OP + MPLA group. All mice were given tail vein injections of tumor cells after surgery. Fourteen days after surgery all mice were sacrificed, the lungs transected en bloc, and India ink injected into the trachea. The lungs were placed in Fekete's solution to counterstain the tumor foci white. The number of surface lung metastases was determined by two blinded observers, separately. **Results:** In Study 1, there were significantly more lung tumors in the OP group than the AC group or the CO₂ Pneumo group. There were no significant differences in the number of metastases between the AC and the CO₂ Pneumo groups or in the incidence of animals in each group with 1 or more lung mets. In Study 2 significantly fewer metastases were noted for the Op + LTC group and the OP + LTC + MPLA group when compared to the OP group. Significantly fewer of the OP + LTC + MPLA group mice developed one or more lung tumors than in the OP, OP + MPLA, and the OP + LTC groups. **Conclusions:** Full sham laparotomy was associated with more postoperative lung metastases than CO₂ pneumo or anesthesia alone in this murine model. Up-regulation of the immune system in the perioperative period with lysed tumor cells, alone or in combination with MPLA, resulted in significantly fewer postoperative lung metastases.

Keywords:

Cancer

Metastases

Laparoscopy

Immunotherapy

Vaccine

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Allgemeine Einleitung	11
1.2	Pathophysiologische Folgen operativer Eingriffe	11
1.2.1	Neuroendokrine Reaktionen	11
1.2.2	Metabolische Veränderungen	12
1.3	Überblick über die Pathogenese hämatogener Metastasen	14
1.4	Regulation der Tumorangiogenese.....	16
1.5	Ausgesuchte Tierexperimente zur postoperativen Tumorentwicklung.....	17
1.5.1	Pulmonaler Arrest hämatogen zirkulierender maligner Zellen	17
1.5.2	Operatives Trauma und die Entwicklung von Fernmetastasen.....	18
1.5.3	Postoperatives Wachstum von Primärtumoren.....	19
1.6	Behandlung maligner Erkrankungen durch Immuntherapie.....	21
1.6.1	Unspezifische Immuntherapieansätze	21
1.6.2	Spezifische Immuntherapieansätze	21
1.6.3	Verstärkung der Immunreaktion durch das Adjuvans Monophosphoryl-Lipid-A	23
2	Herleitung der Aufgabenstellung.....	26
2.1	Entwicklung pulmonaler Metastasen nach operativem Trauma.....	26
2.2	Prävention pulmonaler Metastasen durch spezifische Immuntherapie	26
3	Methodik	28
3.1	Art der Versuchstiere	28
3.2	Haltung der Versuchstiere	28
3.3	Versuchsaufbau.....	28
3.3.1	Einfluß des operativen Traumas auf die Entstehung pulmonaler Metastasen.....	28
3.3.2	Perioperative Immuntherapie zur Prävention pulmonaler Metastasen.....	29
3.4	Operationsprotokoll: Laparotomie.....	29
3.5	Operationsprotokoll: Laparoskopie	30
3.6	Intravenöse Injektion der vitalen Tumorzellen.....	30
3.7	Vorbereitung von Monophosphoryl Lipid A (MPL-A).....	30
3.8	Anästhesie der Versuchstiere	30
3.9	Tötung der Versuchstiere.....	31
3.10	Zellkultur	31
3.10.1	Initiieren der Zellkultu.....	31
3.10.2	Mediumwechsel und Subkultivierung der Tumorzellen	31
3.10.3	Vorbereitung der Tumorzellen zur intravenösen Injektion.....	32
3.10.4	Kryokonservierung der Tumorzellen	33
3.10.5	Bestimmung der Zellzahl	33
3.10.6	Vitalitätstest der Tumorzellen.....	33
3.10.7	Herstellung des Tumorzelllysats	34
3.11	Identifikation der Metastasen	34

3.12	Quantitative Bestimmung der Lungenmetastasen	34
3.13	Paraffinschnitte und Hämatoxylin/ Eosin-Färbung	35
3.14	Statistische Analyse	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Histologie	36
4.2	Makroskopische Darstellung der Präparate	37
4.3	Einfluß des operativen Traumas auf die Entstehung pulmonaler Metastasen.....	38
4.3.1	Letalität	38
4.3.2	Inzidenz der pulmonalen Metastasen	38
4.3.3	Verteilung der Daten	39
4.3.4	Deskriptive Statistik.....	39
4.3.5	Mehrfachvergleich.....	40
4.3.6	Paarvergleiche	41
4.4	Perioperative Immuntherapie zur Prävention pulmonaler Metastasen	41
4.4.1	Letalität	41
4.4.2	Inzidenz der pulmonalen Metastasen	42
4.4.3	Verteilung der Daten	43
4.4.4	Deskriptive Statistik.....	44
4.4.5	Mehrfachvergleich.....	45
4.4.6	Paarvergleiche	46
5	Diskussion	48
5.1	Einfluß des operativen Traumas auf die Entstehung pulmonaler Metastasen.....	48
5.1.1	Einfluß der Lungenfunktion nach Laparotomie auf die pulmonale Absiedlung hämatogen, zirkulierender Tumorzellen	48
5.1.2	Einfluß des Hämostasesystems auf die pulmonale Absiedlung hämatogen zirkulierender maligner Zellen	52
5.1.3	Extravasation maligner Zellen – Rolle der Adhäsionsmoleküle.....	54
5.2	Perioperative Immuntherapie zur Prävention pulmonaler Metastasen.....	55
5.2.1	Stimulation des unspezifischen Immunsystems durch MPL-A.....	55
5.2.2	Stimulation des sypezifischen Immunsystems durch Tumorzellvakzine	56
5.2.3	Prinzip der Induktion einer spezifischen Immunreaktion – Die zelluläre Immunantwort.....	56
5.2.4	Die humorale Immunantwort.....	58
6	Zusammenfassung	61

Widmung

Für Fritz, Brigitte und Jan.

Vorwort

Die Methode der Nachprüfung der aufgestellten Hypothesen stammt von Karl Popper. Popper vertrat die Auffassung, daß Hypothesen nicht allein durch Experimente bestätigt oder widerlegt werden können. Der induktive Schluß von einer Stichprobe auf die Grundgesamtheit wurde von Popper abgelehnt. Ich selbst betrachte eine Schlußfolgerung, welche ausschließlich dem Ergebnis des Experiments zugrunde liegt, als ungenügend. Die Hypothese oder Theorie muß in erster Linie einer logischen Überprüfung standhalten. Dieser Test entscheidet außerdem, ob es sich um eine wissenschaftliche Theorie handelt oder die Aussage metaphysischen Charakter hat. Wie unterscheidet man wissenschaftliche von metaphysischen Aussagen?

Popper beschrieb in seinem Buch "Logik der Forschung", erschienen im Jahre 1934, eine Fehlbarkeitstheorie mit deren Hilfe das sogenannte Abgrenzungsproblem, d.h. Wissenschaft von anderen Gedanken abzugrenzen, gelöst werden konnte. Er forderte von jeder wissenschaftlichen Theorie, daß es möglich sein muß, diese logisch und empirisch zu widerlegen. Eine Theorie, welche nicht widerlegbar ist, ist somit unwissenschaftlich. Besteht die Hypothese die logische Überprüfung, folgt die praktische Anwendung im wissenschaftlichen Experiment. Ob ein Experiment erfolgreich verlaufen ist, d.h. die zu testende Annahme bestätigt wurde, entscheidet sich nach der statistischen Auswertung. Es ist notwendig, die Beschränkung dieser statistischen Aussage zu kennen, um den Wert des Ergebnisses beurteilen zu können.

Das spielt besonders dann eine Rolle, wenn der Stichprobenumfang klein ist, die Daten nicht normal verteilt sind und mehrere Gruppen in einem Experiment miteinander verglichen werden - eine typische Konstellation bei Tierexperimenten. Kann unter solchen Bedingungen das experimentelle Resultat darüber entscheiden, ob eine Hypothese abgelehnt oder verifiziert wird? Die Diskussion wird eine Lösung vorschlagen. Hat das System die Prüfung bestanden, gilt es als vorläufig bewährt. Je öfter sich eine Theorie bewährt, desto sicherer ist sie. Allerdings kann eine Theorie niemals als wahr angesehen werden, da niemand imstande ist, sie als solches zu überprüfen.

Berlin, im Sommer 2000

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Die Kenntnis der pathophysiologischen Veränderungen nach schwerem operativen Trauma beeinflusst die Wahl des Operationsverfahrens und ermöglicht eine problemorientierte prä- und postoperative Behandlung. Dies gilt insbesondere für die Resektion maligner Tumoren. Die posttraumatisch veränderte Stoffwechsellage und Funktionseinschränkungen des pulmonalen- und kardiovaskulären Systems können die hämatogene Absiedlung maligner Zellen begünstigen und so den postoperativen Krankheitsverlauf entscheidend beeinflussen. Die Wahl einer weniger traumatisierenden Operationstechnik und die damit verbundene geringere Beeinträchtigung von Organsystemen und funktionellen Systemen, wie dem Hämostasesystem, könnte mit einem geringeren Risiko der Entstehung maligner Metastasen verbunden sein. Zusätzlich könnte durch Stimulation des spezifischen Immunsystems die postoperative Entwicklung sekundärer Tumore gehemmt werden. Eine Möglichkeit der Induktion einer spezifischen Immunreaktion wäre die intraperitoneale Injektion autogener Tumorzellfragmente in Kombination mit einem potenten Adjuvans.

1.2 Pathophysiologische Folgen operativer Eingriffe

Charakteristisch für den Postaggressionsstoffwechsel ist der phasenhafte Verlauf. Die Akutphase dauert ca. 12 bis 36 Stunden und ist gekennzeichnet durch massiv erhöhte Plasmakonzentrationen von Katecholaminen, Glucagon, Cortisol und Wachstumshormon. Die Präsenz dieser katabolen Hormone führt zu einer ausgeprägten Suppression der Insulinsekretion, weshalb die Akutphase auch Phase des absoluten Insulinmangels genannt wird. In der sich anschließenden Übergangs- oder Postaggressionsphase wird Insulin wieder freigesetzt. Dies geschieht allerdings inadäquat, was einem relativen Insulinmangel gleichkommt. Zusätzlich besteht eine periphere Insulinresistenz mit gestörtem Glucosetransport in die Zelle. In der Reparationsphase normalisiert sich die Insulinsekretion, die antiinsulineren Hormone kehren in den Normalbereich zurück und anabole Stoffwechselreaktionen überwiegen [1, 2].

1.2.1 Neuroendokrine Reaktionen

Nach schwerem Trauma entwickelt sich eine Stoffwechsellage, die das Überleben des Organismus sichern soll. Die zentral vermittelte Steigerung der Sympathikusaktivität mit vermehrter Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin bewirkt eine kardiale Leistungssteigerung zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks und führt durch vermehrte Freisetzung von Glucagon und Cortisol zum Anstieg des Blutzuckers und damit zur schnellen Bereitstellung von Energie. Zusätzlich wird durch Aktivieren der Fettge-

webslipase die Abgabe freier Fettsäuren ins Blut gefördert und die Freisetzung glucoplastischer Aminosäuren aus Proteinen peripherer Gewebe verstärkt [3].

Das aktivierte Renin-Angiotensin-Aldosteron-System bewirkt eine vermehrte Sekretion von Angiotensin II und führt durch Vasokonstriktion zur Erhöhung des Blutdrucks. Die durch eine erhöhte Sekretion von Aldosteron- und Antidiuretischem Hormon bewirkte Flüssigkeitsretention trägt durch Aufrechterhaltung des Volumenstatus ebenfalls zur Stabilisierung des Blutdrucks bei. Allerdings kann es hierbei zu Hypernatriämie bzw. Hypokaliämie kommen, was lebensgefährliche Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen zur Folge haben kann [4].

Die Plasmakonzentration von Glucagon ist ca. 18 – 48 h postoperativ erhöht und verhält sich proportional zur Schwere des Traumas. Glucagon bewirkt neben Aktivierung der Lipolyse und Proteolyse eine Erhöhung des Blutzuckers durch Förderung der Gluconeogenese und Glycogenolyse in der Leber [4].

Das katabole Hormon Kortisol ist einer der charakteristischsten postoperativen Stoffwechselparameter. Es steigt durch vermehrte Freisetzung von ACTH innerhalb weniger Stunden rasch an. Bei schwer traumatisierten Patienten wurden Kortisolkonzentrationen von 300 mg im 24 h Sammelurin gemessen. Der Normwert beträgt 15-30 mg/ 24h. Kortisol führt über die Aktivierung der Gluconeogenese ebenfalls zur Erhöhung des Blutzuckers, hemmt die Insulinsekretion und setzt die Insulinempfindlichkeit peripherer Gewebe herab. Weiterhin stimuliert es die Glucagonsekretion, steigert die Proteolyse und mobilisiert Fettdepots. Die antiinflammatorische Wirkung, zum Beispiel die Hemmung der Leukozyteneinwanderung in Entzündungsgebiete, kann zur Verlangsamung zellulärer Abwehrmechanismen führen und wird als eine der Ursachen der postoperativ erhöhten Anfälligkeit für Infektionen diskutiert [4].

1.2.2 Metabolische Veränderungen

Die wichtigsten metabolischen Effekte nach schwerem operativen Trauma sind Hypermetabolismus mit erhöhter Wärmeproduktion, negative Stickstoffbilanz und ein erhöhter Glukosespiegel. Unmittelbar nach dem Trauma kommt es zur exzessiven Proteolyse im Muskel mit erhöhter Harnstoffsynthese und Ausscheidung von Stickstoff im Urin. Die gesteigerte Konzentration im Blut zirkulierender Aminosäuren dient unter anderem der Glukoneogenese und damit der Versorgung von glukoseabhängigem Visceral- und Nervengewebe sowie den immunkompetenten Zellen. Weiterhin werden die freien Aminosäuren zur Protein-Neusynthese, zum Beispiel zur Herstellung von Akute-Phase Proteinen, und zur Unterstützung der lokalen Reparaturvorgänge im Bereich der Operationswunde verwendet.

Das Hauptziel des Organismus in der postoperativen Phase ist die Bereitstellung von Glucose. In der Akutphase wird zur Versorgung der glucoseabhängigen Gewebe Glycogen aus Leber und Muskulatur mobilisiert. Nach wenigen Stunden sind die Reserven jedoch aufgebraucht und Glucose muß über den Weg der Gluconeogenese bereitgestellt werden. Dazu werden glucoplastische Aminosäuren aus der Muskulatur, lipolytisch freigesetztes Glycerin und Lactat aus dem anaeroben Stoffwechsel

verwendet. Die bereitgestellte Glucose kann in ausreichender Menge durch die glucoseabhängigen Gewebe nur durch die für den Postaggressionsstoffwechsel charakteristische Insulinresistenz genutzt werden. Das heißt, daß in den peripheren insulinabhängigen Geweben, wie Muskulatur, Fett- und Bindegewebe, die Glucoseaufnahme gedrosselt ist und dadurch vermehrt Glucose für die insulinunabhängigen Organe, wie ZNS, Erythrozyten und Lymphatisches Gewebe zur Verfügung steht [5].

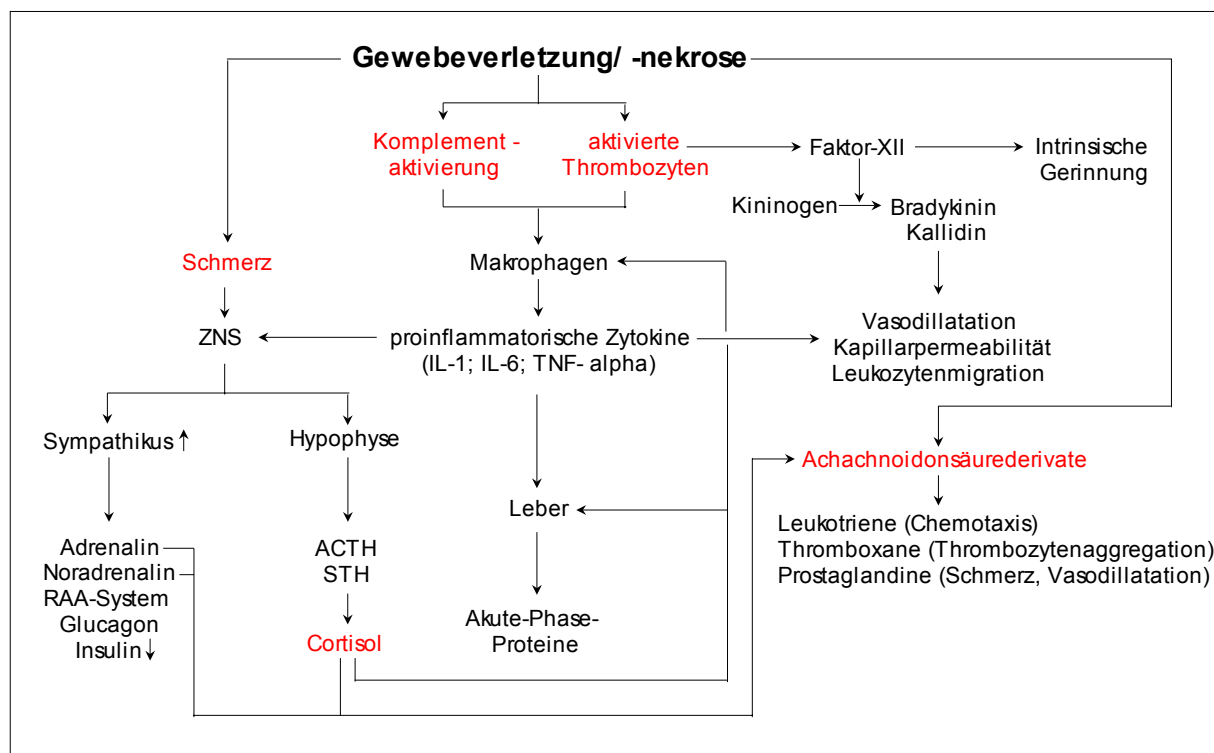


Abb. 1: Pathophysiologische Folgen schwerer operativer Eingriffe mit Auswirkungen auf ZNS, Endothel, Leber und Blutgerinnung. Wesentliche proinflammatorische Mediatoren sind IL-1, IL-6 und TNF- α . IL-1 und TNF- α bewirken unter anderem die Adhäsion neutrophiler Granulozyten am Endothel. IL-6 bewirkt die Synthese Akuter-Phase-Proteine in der Leber.

Die im Rahmen des Postaggressionssyndroms auftretenden Allgemeinveränderungen sind abhängig von der Schwere des operativen Traumas. Die unterschiedlich ausgeprägte Symptomatik beinhaltet unter anderem generalisierte periphere Durchblutungsstörungen, Funktionseinschränkung minderperfundierter Organe bis hin zum akuten Nierenversagen, Ketoazidose, Blutgerinnungsstörungen, respiratorische Insuffizienz und gastrointestinale Funktionsstörungen mit verminderter Darmperistaltik. Bisher existiert keine Möglichkeit das Postaggressionssyndrom kausal zu behandeln. Die Therapie beschränkt sich deshalb auf die Stabilisierung von Zirkulation und Respiration sowie eine adäquate Volumensubstitution. Präventiv ist eine so weit wie möglich atraumatische Operation von großer Bedeutung.

1.3 Überblick über die Pathogenese hämatogener Metastasen

Der Chirurg J.C.A. Récamier beschrieb 1829 als erster die Pathogenese maligner Metastasen. Er ging davon aus, daß Tumorzellen in Blutgefäße migrieren können und nach hämatogenem Transport an einer anderen Stelle des Körpers Metastasen bilden [6]. Der Internist Armand Trousseau beobachtete 1865 eine hohe Inzidenz von oberflächlichen Venenentzündungen bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren [7]. Im Jahr 1878 formulierte Theodor Billroth eine Theorie, nach welcher Tumorzellen in Gerinnungsthromben des Primärtumors überleben können und nach Abscheidung in den Blutkreislauf als Emboli im Lumen kleinerer Gefäße steckenbleiben. [8]. Diese Theorie erklärt das gehäufte Auftreten von Thrombophlebitiden bei Tumorpatienten und verdeutlicht, daß die Verteilung der Metastasen nicht zufällig geschieht, sondern davon abhängt, welches kapilläre Strombett den Tumorembolus zuerst abfängt. Diese Annahme wurde 1889 durch James Paget nach Autopsie von 735 Tumorpatienten erstmals bestätigt [9]. Nach Invasion der Tumorzellen in den Blutkreislauf, bilden diese mit Blutplättchen, Lymphozyten und anderen Blutkomponenten kleine Emboli. Werden diese Emboli durch das Herz transportiert, können sie im kapillaren Strombett der Lunge steckenbleiben. Nach Arrest der Emboli in den Lungenskapillaren kommt es zur Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel und/ oder die Basalmembran. Der Verschluss der Kapillaren durch die Emboli kann zur Verletzung der Endothelzellen führen, so daß ein direkter Kontakt zwischen Tumorzellen und extrazellulärer Matrix möglich wird. Nach der Adhäsion migrieren die malignen Zellen ins Lungenparenchym, wobei die extrazelluläre Matrixbarriere durch proteolytische Enzyme aufgespalten wird (Abb. 2). Die anschließende Entwicklung von Makrometastasen ist davon abhängig, ob der zur Ernährung der Zellen notwendige neoangiogenetische Prozeß aktiviert werden kann.

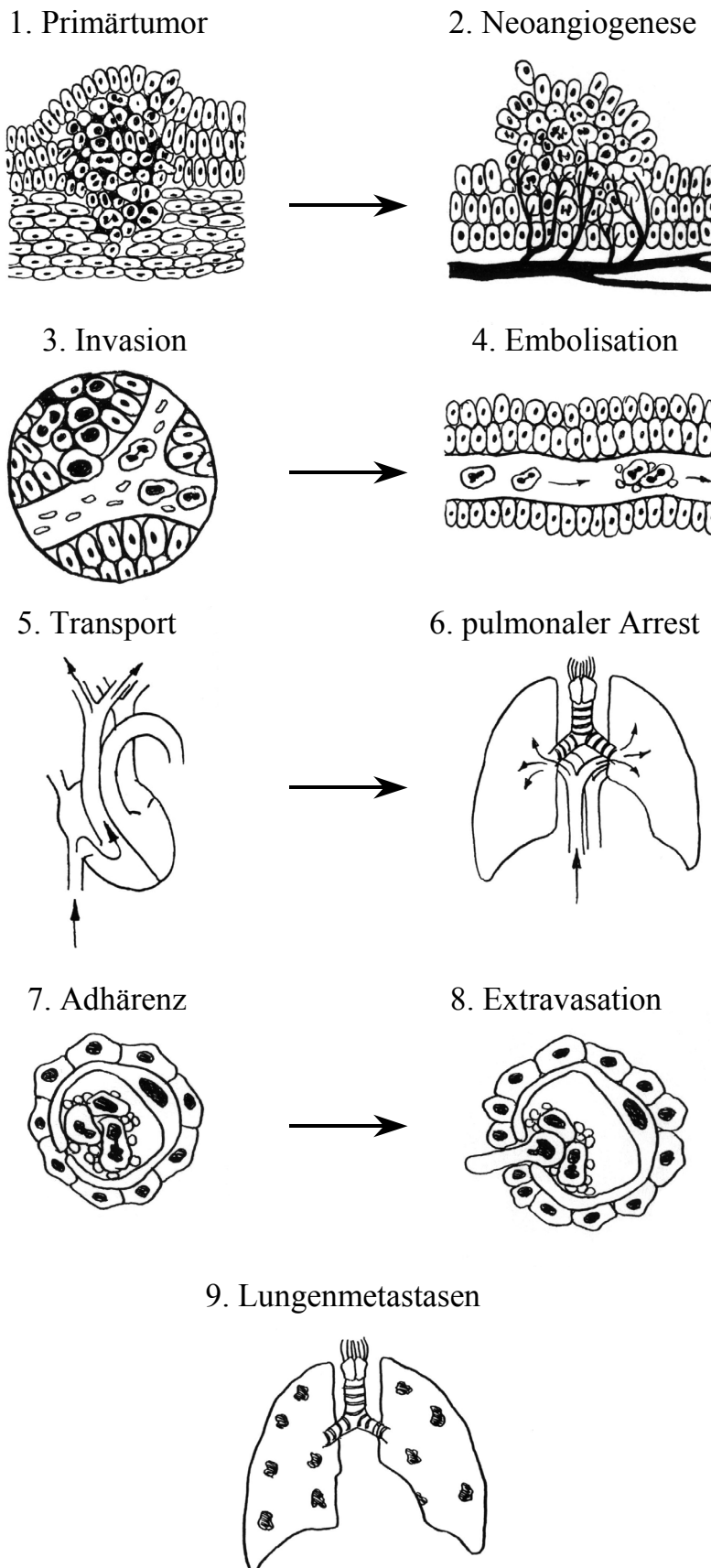


Abb. 2: Pathomechanismen der Entstehung pulmonaler maligner Metastasen

Das Einsprossen von Blutgefäßen in Tumorgewebe ist die Grundlage für das makroskopische Wachstum von Primärtumoren und Metastasen. Zusätzlich erlangt der Tumor durch die Vaskularisierung das Potential der hämatogenen Absiedlung maligner Zellen. Da die meisten invasiven Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnose bereits vaskularisiert sind, ist anzunehmen, daß bei einem großer Teil der Tumorpatienten bereits Fernmetastasen existieren [10, 11]. Diese sekundären Tumoren können als Mikrometastasen jahrelang symptomlos im Gewebe verweilen und sind deshalb nur schwer identifizierbar. Das Wachstum der Mikrometastasen wird unter anderem durch die Resektion des Primärtumors aktiviert.

1.4 Regulation der Tumorangiogenese

Die Untersuchung der pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen Resektion des Primärtumors und gesteigertem sekundären Tumorwachstum ist seit Jahrzehnten ein wesentlicher Bestandteil der onkologischen Forschung. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob die Resektion des Tumors und/ oder das mit der Operation assoziierte Trauma dieses gesteigerte sekundäre Tumorwachstum bedingen. Die Entdeckung, vom Primärtumor exprimierter, angiostatisch wirksamer Proteine (Angiostatin, Endostatin), die das Wachstum vorhandener Mikrometastasen hemmen, erklärt die Beobachtung des vermehrten Auftretens sekundärer Tumore nach Resektion des Primärtumors [12, 13]. Diese Theorie soll kurz dargestellt werden:

Eine Körperzelle, die aufgrund einer genetischen Veränderung maligne entartet, proliferiert ungehindert bis zur Größe von 1 bis 2 mm. Während dieser Zeit ernährten sich die Tumorzellen durch Diffusion. Ohne die anhaltende Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen kann der Mikrotumor nicht beliebig weiter wachsen. Es bedarf der Anbindung an das Blutgefäßsystem [14]. Der Prozeß der Tumor-Angiogenese wird einerseits durch Produktion angiogenetischer Proteine, wie *acidic fibroblast growth factor* und *vascular endothelial growth factor* angeregt, kann andererseits aber auch durch Abnahme der Konzentration angiostatisch wirksamer Proteine wie *Thrombospondin* aktiviert werden. Diese Hypothese wurde 1996 durch eine Entdeckung von O'Reilly et. al. wesentlich gefestigt [12]. Es wurde beobachtet, daß der Primärtumor die Angiogenese seiner Metastasen hemmen und dadurch ihr Wachstum wirkungsvoll inhibieren kann. Dieser Prozeß wird durch einen Angiogenese-Inhibitor vermittelt, welcher vom Primärtumor selbst produziert wird. O'Reilly nannte dieses Protein Angiostatin. Es handelt sich um ein 38 kD Protein, welches eine Homologie zu Plasminogen aufweist und ein spezifischer Inhibitor der Endothelzellproliferation ist. Im Jahr 1997 entdeckte dieselbe Arbeitsgruppe das zweite antiangiogenetisch wirksame Protein – Endostatin [13]. Auch diese Substanz wird vom Primärtumor selbst produziert und hemmt das Wachstum seiner Metastasen. Endostatin ist ein C-terminales Fragment von Kollagen XVIII und wirkt ebenfalls durch Inhibition der Proliferation von Endothelzellen [15].

Nach Resektion des Primärtumors kommt es zum Wegfall dieser Angiogenese-Inhibitoren. Die Folge ist ein gesteigertes Wachstum der vorhandenen Mikrometasta-

sen. Diese Interaktion zwischen Primär- und Sekundärtumor verdeutlicht, welcher komplexe Mechanismus der Beobachtung der vermehrten Entwicklung von Metastasen nach Tumorresektion zugrunde liegt.

1.5 Ausgesuchte Tierexperimente zur postoperativen Tumorentwicklung

Ein invasiver, gut vaskularisierter Tumor kann auf hämatogenem Weg täglich mehrere Millionen maligne Zellen freisetzen [16, 17]. Allerdings überleben nur ca. 0,01% dieser zirkulierenden Tumorzellen den Metastasierungsprozeß. Ein Grund dafür ist die hohe mechanische Belastung, welcher die Zellen im Blutkreislauf ausgesetzt sind [18]. Eine Verringerung dieser mechanischen Belastung durch Senkung des Blutdrucks und Verlangsamung der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes könnte den Prozeß der hämatogenen Absiedlung maligner Zellen begünstigen. Mosley et. al. untersuchten im Mausmodell die Wirkung der Amputation einer hinteren Extremität auf die Entwicklung pulmonaler Metastasen [19]. Alle Tiere trugen zum Zeitpunkt der Amputation ein bereits in der Flanke etabliertes, metastasierendes „Lewis lung“ Karzinom. Die schwer traumatisierten Tiere entwickelten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich höhere Anzahl pulmonaler Metastasen. Ursachen für das vermehrte Tumorstadium könnten die postoperative Einschränkung der Lungenfunktion und die traumabedingte Aktivierung des Hämostasesystems sein. Beides beeinflusst das pulmonale Mikromilieu und somit den dort stattfindenden Absiedlungsprozeß der malignen Zellen. Im Folgenden werden ausgewählte Aufsätze zu diesem Thema vorgestellt. Es sei im voraus vermerkt, daß es sich dabei ausschließlich um Tierexperimente handelt.

1.5.1 Pulmonaler Arrest hämatogen zirkulierender maligner Zellen

Bishop et. al. untersuchten die pulmonale Absiedlung im Blut zirkulierender Tumorzellen nach Laparotomie [20]. Es konnte gezeigt werden, daß die Anzahl in der Lunge arrestierender Tumorzellen bei den laparotomierten Tieren, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant gesteigert war. Dazu wurden 10^6 radioaktiv markierte Mastozytomzellen zwei Stunden nach durchgeführter Laparotomie intravenös injiziert und die pulmonale Radioaktivität bestimmt. Anschließend wurde der Versuch mit B16 Melanomzellen wiederholt. Auch in diesem Experiment war die Anzahl der pulmonal nachgewiesenen radioaktiv markierten B16 Melanomzellen nach Laparotomie deutlich erhöht. Trotz der ähnlichen Ergebnisse wurden nur nach Injektion der B16 Melanomzellen signifikant mehr pulmonale Metastasen nachgewiesen. Die intravenöse Applikation der Mastozytom Zellen hatte keinen Einfluß auf die Entwicklung von Makrometastasen. Bishops Beobachtungen machen deutlich, daß die einzelnen Schritte der Tumorphagenese, ausgehend vom Arrest der Zellen in den Lungenkapillaren über die Extravasation ins Parenchym bis hin zur Entwicklung der Makrometastasen, von der Aggressivität und Immunität der verwendeten Tumorzellen abhängig sind.

Die Anzahl makroskopischer Metastasen als einzige zu untersuchende Größe, könnte deshalb zu falschen Schlußfolgerungen führen.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um C.J. Bishop wurden mehrfach bestätigt. Skolnik et. al. zeigten, daß nach bilateraler Femurfraktur die Anzahl von i.v. injizierten, radioaktiv markierten malignen Zellen in der Lunge, im Vergleich zur Kontrollgruppe, verdoppelt war [21]. Ebenso beobachteten Page et. al. einen 2-fach gesteigerten pulmonalen Arrest intravenös applizierter Tumorzellen nach operativer Eröffnung der Bauchhöhle [22]. Durch perioperatives Verabreichen von Morphinium konnte die erhöhte Anzahl pulmonaler Tumorzellen bei laparotomierten Tieren auf das Niveau der Kontrollgruppe reduziert werden. Gleichzeitig wurde ein deutlicher Abfall der traumabedingten hohen Kortisol-Plasmakonzentration beobachtet. Ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen beiden Beobachtungen wurde von Fidler I. J. et. al. und Kodama M. et. al. untersucht [23, 24]. Beide Arbeitsgruppen beobachteten einen signifikant gesteigerten Arrest von radiomarkierten malignen Zellen in der Lunge nach Verabreichen von Triamcinolon und Hydrokortison. Kodama et. al. konnten zusätzlich eine deutlich verminderte Überlebenszeit der Versuchstiere und eine signifikant gesteigerte Anzahl von pulmonalen Metastasen nach Gabe von Hydrokortison nachweisen.

Van den Brenk et. al. zeigten, daß die Verabreichung von Katecholaminen eine ähnliche Wirkung auf die Entwicklung von Lungenmetastasen haben kann [25]. Die intraperitoneale Injektion von Adrenalin führte zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl pulmonaler Metastasen. Die erhöhten Konzentrationen von Glukokortikoiden und Katecholaminen nach schwerem operativen Trauma können allerdings nur zum Teil mit dem gesteigerten Tumorwachstum in Verbindung gebracht werden. Bishop et. al. zeigten, daß auch beidseitig adrenaletomierte Tiere, nach Laprotomie, eine deutlich gesteigerte Anzahl maligner Zellen im kapillaren Strombett der Lunge aufweisen [20]. Ursachen dieser Beobachtung könnten die, nach Laparotomie erheblich eingeschränkte Lungenfunktion und das aktivierte Blutgerinnungssystem sein. Beide Mechanismen werden später noch ausführlicher dargestellt.

1.5.2 Operatives Trauma und die Entwicklung von Fernmetastasen

Takekoshi et. al. beobachteten nach Resektion subkutaner, in der Flanke von Ratten etablierter Mammakarzinome mit anschließender Laparotomie eine wesentlich erhöhte Anzahl pulmonaler Metastasen als nach Tumorsektion allein [26]. Sellwood et. al. zeigten, daß laparotomierte „Wistar“ Ratten, welchen zuvor intravenös maligne Zellen injiziert wurden, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine deutlich gesteigerte Anzahl von Makrometastasen entwickelten [27]. In einem weiteren Experiment, welches sich durch Verwendung einer anderen Tierart („C-minus“ Mäuse) vom ersten Versuch unterscheidet, konnten Sellwood et. al. die Hypothese der traumabedingten gesteigerten pulmonalen Tumorabsiedlung nicht verifizieren [28]. Das gleiche Ergebnis beobachteten Schatten et. al. nach i.v. Injektion von S-91 Melanom-Zellen in DBA-strain Mäuse [29]. Eine Laparotomie führte bei diesem Tiermodell zu keiner ge-

steigerten pulmonalen Tumorabsiedlung. Hattori et. al. untersuchten den Einfluß von Thorakotomie, Thorakolaparotomie und Laparotomie auf die Entwicklung pulmonaler Metastasen [30]. Thorakotomie und Thorakolaparotomie bewirkten eine signifikant höher Anzahl von Lungenmetastasen und eine deutlich verringerte 50- Tage Überlebenszeit. Das chirurgische Trauma einer Laparotomie hatte im Gegensatz zur Thorakotomie keinen Einfluß auf Tumorwachstum und Überlebenszeit. Das Experiment von Hattori et. al. zeigt, daß die Schwere des operativen Traumas erheblichen Einfluß auf den postoperativen Krankheitsverlauf maligner Erkrankungen haben kann. Im Tierexperiment ist zusätzlich Art, Alter, Gewicht und Allgemeinzustand der Versuchstiere von entscheidender Bedeutung.

1.5.3 Postoperatives Wachstum von Primärtumoren

Buinauskas et. al. injizierten "Walker 256" Tumorzellen in das subkutane Fettgewebe von Holtzman Ratten und beobachteten den Einfluß einer Zöliotomie auf die Entwicklung solider, subkutaner Primärtumoren [31]. Die Laparotomie mit anschließender Resektion des Zäkums führte zu einer deutlich gesteigerten Größenzunahme der Tumoren mit signifikant reduzierter Überlebenszeit der Versuchstiere. Zöllner et. al. injizierten „Pankreas Adenokarzinomzellen“ in das Fersenpolster von BD X Ratten und untersuchten den Einfluß einer Laparotomie auf das Tumorwachstum [32]. Die laparotomierten Versuchstiere entwickelten signifikant größere Tumoren und wiesen eine deutlich vermehrte regionale Lymphknotenmetastasierung auf. Die Ergebnisse beider Experimente deuten auf einen engen Zusammenhang zwischen operativem Trauma und Tumorwachstum hin. Die Autoren machen die posttraumatisch eingeschränkte Funktion des Immunsystems für das gesteigerte Tumorwachstum verantwortlich. Es wird vermutet, daß die Immunabwehr der laparotomierten Versuchstiere auf die malignen Zellen nur noch bedingt reagieren kann, was eine vermehrte postoperative Tumorentwicklung zur Folge hat.

Die klinische Situation unterscheidet sich vom Experiment allerdings beträchtlich. Im Gegensatz zu den synergetischen Tumorzellen, welche den Versuchstieren verabreicht werden, handelt es sich beim Tumorpatienten um autogene Zellen, d.h. körpereigene Zellen gegen die der Organismus von vornherein keine wirkungsvolle Immunreaktion initiieren kann. Die posttraumatisch eingeschränkte Immunfunktion des Patienten hat demnach eine weitaus geringere Bedeutung für die Entstehung von Metastasen als bisher angenommen [33].

Tab. 1 Zusammenfassung der unter 1.5 beschriebenen Experimente

Einflußgröße	Zielgröße	Ergebnis	Tiermodell	Arbeitsgruppe
Amputation (hintere Extremität)	pulmonale Metastasen	↑	C57BL/10 Mäuse, Lewis-Lung- Carzinoma	Mosley et. al., 1978
Laparotomie	pulmonaler Arrest maligner Zellen	↑	P-815 Mastrozytom Zellen, DBA/2-Mäuse	Bishop et. al. 1982
Laparotomie	pulmonaler Arrest maligner Zellen, pulmonale Metastasen	↑ ↑	B16- Melanom- zellen, C57BL Mäuse	
bilaterale Femurfraktur	pulmonaler Arrest maligner Zellen	↑	Wistar-Ratten, Zellen induzierter Sarkome	Skolnik et. al. 1980
Laparotomie	pulmonaler Arrest maligner Zellen	↑	Fisher Ratten, MADB106 Zellen	Page et. al. 1998
Kortikosteroid (Triamcinolon)	pulmonaler Arrest maligner Zellen	↑	C57 Mäuse, B16 Melanomzelln	Fidler et. al. 1972
Kortikosteroide (Cortisol)	pulmonaler Arrest maligner Zellen, pulmonale Metastasen, Überlebenszeit	↑ ↑ ↓	Swiss/ICR Mäuse, Ehrlich-Aszitis- Tumorzellen	Kodama et. al. 1975
Katecholamine (Adrenalin)	pulmonale Metastasen	↑	SPF Caworth Ratten, W256-Tumor- zellen	van den Brenk et. al. 1976
Laparotomie + Resektion d. Primärtumors	pulmonale Metastasen	↑	SD Ratten, MRMT-1 Mamma- tumorzellen	Takekoshi et. al. 1984
Laparotomie	pulmonale Metastasen	↑	Wistar Ratten, Walker Tumor- zellen	Sellwood et. al. 1968
Laparotomie	pulmonale Metastasen	↔	C-minus Mäuse, Landschutz-Tumor- zellen	Sellwood et. al. 1968
Laparotomie	pulmonale Metastasen	↔	DBA Mäuse, S-91 Melanom- zellen	Schatten et. al. 1958
Thorakotomie Laparo- thorakotomie	pulmonale Metastasen	↑	Donryu Ratten, SCL-Tumorzellen	Hattori et. al. 1978
Laparotomie	pulmonale Metastasen	↔	Donryu Ratten, SCL-Tumorzellen	
Laparotomie + Zäkumresektion	Wachstum solider subcutaner Tumore	↑	Holtzman Ratten, Walker 256 Zellen	Buinauskas et. al. 1958
Laparotomie	Wachstum solider subcutaner Tumore	↑	BDX Ratten, BSp73AS-Pancreas Karzinomzellen	Zöller et. al. 1989

1.6 Behandlung maligner Erkrankungen durch Immuntherapie

1.6.1 Unspezifische Immuntherapieansätze

Zu Beginn des letzten Jahrhunderts beobachtete der New Yorker Chirurg William Coley, daß bakteriell infizierte Hauttumoren, im Vergleich zu nicht infizierten Malignomen, eine erhöhte Rückbildungstendenz aufweisen. Coley induzierte lokale, bakterielle Infektionen im Tumorbereich und erzielte einige eindrucksvolle Behandlungserfolge [34].

Die Hypothese, daß eine unspezifische Stimulation des Immunsystems malignes Wachstum inhibieren könnte, ist in des letzten Jahrzehnten intensiv untersucht worden. Die meiste Aufmerksamkeit wurde dabei dem Tuberkuloseimpfstoff BCG (Bacillus Calmette-Guerin) gewidmet. Von den verschiedenen Therapieansätzen mit BCG ist allerdings nur die lokale Instillation zur Prophylaxe des Blasenkarzinomrezidivs übriggeblieben. Als einen Wirkmechanismus vermutet man die Ansammlung antigenpräsentierender Zellen im Rahmen der durch BCG ausgelösten, lokalen Entzündung. Diese antigenpräsentierenden Zellen können wiederum T-Zellen aktivieren und so eine zelluläre Immunantwort gegen maligne Zellen auslösen [33].

Neben zahlreichen anderen Substanzen zur Immunstimulation findet vor allem das Antihelminthikum Levamisol Verwendung in der Tumorthherapie. Mehrere klinische Studien zeigten, daß die Rezidivrate bei Patienten mit radikal reseziertem Kolonkarzinom und anschließender adjuvanter Therapie bestehend aus 5-Fluorouracil (5-FU) und Levamisol, im Vergleich zur alleinigen Gabe von 5-FU, gesenkt werden kann [35]. Levamisol stimuliert die zelluläre Abwehr durch Potenzierung der T-Lymphozyten-Differenzierung bei Antigenstimulation. Außerdem kommt es zur Erhöhung der Aktivität der Effektor-Lymphozyten und der zytotoxischen T-Zellen. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer direkten antiproliferativen Wirkung von Levamisol auf die malignen Zellen, wie sie unter anderem der Tumorthherapie mit Interferon α zugeschrieben wird [33]. Neben Interferon wird Interleukin-2 (IL-2) zur unspezifischen Immuntherapie maligner Tumore eingesetzt. Die hochdosierte Applikation von IL-2 bei Patienten mit Nierenzellkarzinom bewirkte eine Verbesserung der CR-Rate (complete remission) [36]. IL-2 steuert Proliferation und Differenzierung naiver T-Zellen, beeinflußt aber auch das Wachstum von B-Lymphozyten und natürlicher Killerzellen [37].

1.6.2 Spezifische Immuntherapieansätze

Die Geschichte der Tumorkonvaleszenz beginnt 1777 mit einem Selbstversuch des englischen Arztes John M. Nouth, der sich mehrfach Tumorgewebe eines Patienten injizierte, um so das Auftreten eines eigenen malignen Tumors zu verhindern [38]. Wissenschaftlich fundiertere Experimente zu diesem Thema wurden erst in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts durchgeführt. Klein et. al. zeigten, daß die Vakzinierung von Versuchstieren mit Tumorzellen desselben Inzuchtstammes, das

Wachstum eines später transplantierten Tumors deutlich inhibiert [39]. Diese spezifische Immunreaktion war durch Lymphozyten auf andere Tiere übertragbar. Im Gegensatz zu synergetischen malignen Zellen sind autogene Tumorzellen meistens nicht immunogen genug, um eine wirkungsvolle Immunreaktion auslösen zu können [40]. Ihre Immunogenität kann durch gleichzeitiges Verabreichen adjuvanter Substanzen wesentlich gesteigert werden. Nach der erfolgreichen Anwendung in unterschiedlichen Tiermodellen wurden zahlreiche klinische Studien durchgeführt, welche in der Mehrzahl enttäuschend ausfielen [33]. Die beiden vielversprechendsten Entwicklungen der modernen Tumorzellvaksinierung sollen im Folgenden kurz dargestellt werden:

Tumorzellen exprimieren spezifische Antigene, welche durch MHC-Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Um eine naive CD-8 positive Zelle zu aktivieren, muß diese eine Bindung mit dem MHC-I Molekül und einem costimulierenden Rezeptor eingehen. Diese costimulierenden Moleküle (B7.1/B7.2 oder CD80/CD86) werden von der Tumorzelle nicht exprimiert, d.h. die immunkompetente Zelle kann nicht aktiviert werden. Transfiziert man die Tumorzelle mit dem Gen, welches für B7 kodiert, exprimiert diese den costimulierenden Rezeptor und die naiven CD-8 positiven T-Zellen werden aktiviert [41].

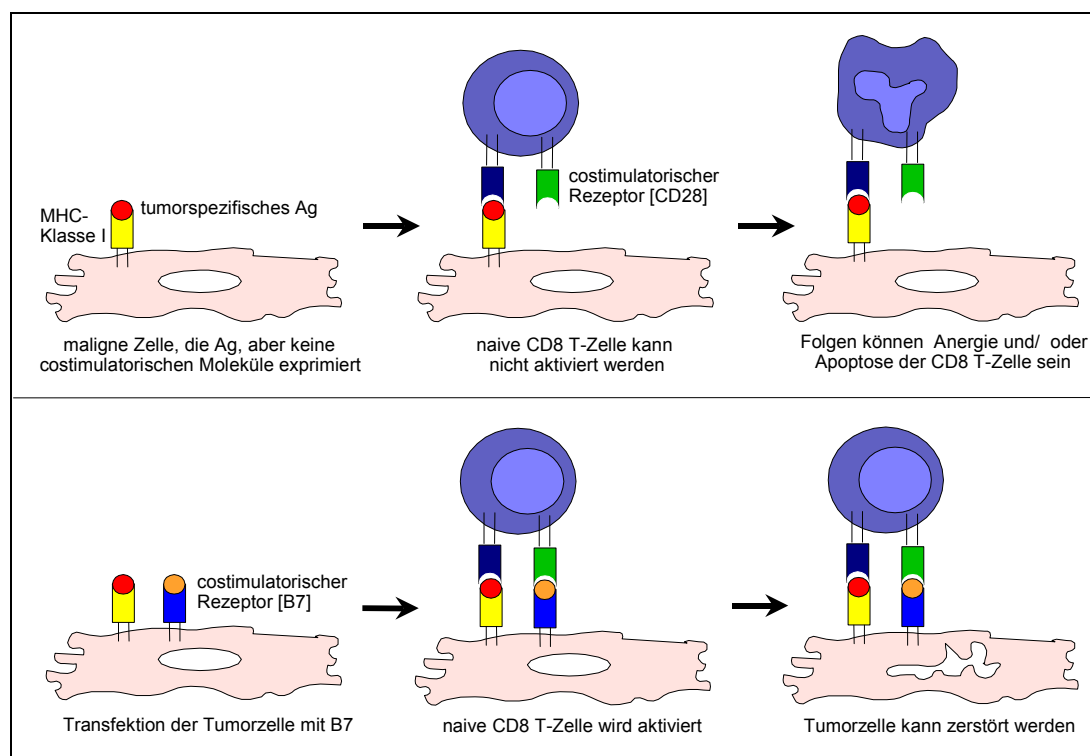


Abb. 3: Transfektion von Tumorzellen mit den Genen für den costimulierenden Rezeptor B7 erhöht ihre Immunogenität

Eine andere Möglichkeit der Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort ist die Gen-modifikation oder Antigenbeladung von antigenpräsentierenden, dendritischen Zellen. Entsprechend den Langerhanszellen der Epidermis können dendritische Zel-

len Antigene aufnehmen, in die regionalen Lymphknoten wandern und naive T-Zellen aktivieren. Dendritische Zellen exprimieren alle wichtigen costimulierenden Rezeptoren sowie MHC-Klasse I und MHC-Klasse II Moleküle. Diese Oberflächenrezeptoren ermöglichen es ihnen, nicht nur zytotoxische T-Zellen zu aktivieren, sondern auch eine dauerhafte, humorale Immunantwort mit Differenzierung von T-Gedächtniszellen zu initiieren [33].

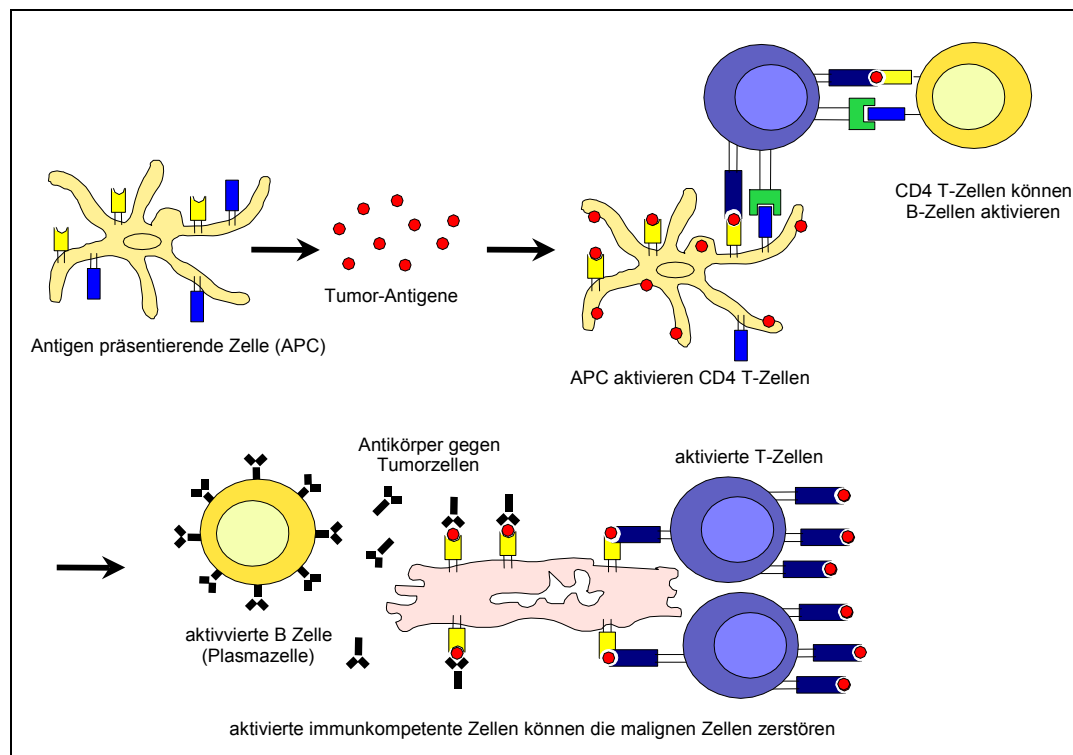


Abb. 4: APC können Tumorantigene in Kombination mit einem costimulatorischen Signal auf ihrer Oberfläche exprimieren und dadurch T- und B-Zellen aktivieren

1.6.3 Verstärkung der Immunreaktion durch das Adjuvans Monophosphoryl-Lipid-A

Monophosphoryl Lipid A (MPL-A) ist ein Derivat der Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien. Es entsteht durch Phenolextraktion der Bakterienzellwände mit anschließender Enttoxifizierung durch Versetzen mit Salzsäure. Der Toxizitätsverlust korreliert mit dem Wegfall der Phosphatgruppe in der Position 1 des reduzierten Zuckers. Das entstandene Monophosphoryl Lipid A ist 1000 mal weniger toxisch als das anfangs vorhandene Diphosphoryl-Glycolipid [42]. Lipopolysaccharide bestehen im wesentlichen aus zwei Anteilen, einem Polysaccharid, welches ein hochpotentes Antigen darstellt und dem adjuvanten Lipid A, welches die Reaktion des Immunsystems auf das Antigen massiv verstärkt [43]. Durch den Prozeß der Enttoxifizierung wird die Immugenität des Antigens fast vollständig aufgehoben, so daß es nach Verabreichen des entstandenen Monophosphoryl Lipid A zu keinerlei toxischen Nebenwirkungen kommt [44, 45].

MPL-A ist ein pleiotrop wirksames Glycolipid, dem in erster Linie adjuvante Eigenschaften zugesprochen werden, d. h. im Gemisch mit einem Antigen wird die Im-

munantwort gegen dieses Antigen verstärkt. Ein möglicher Mechanismus dieser resultierenden, erhöhten Immugenität des Antigens wird im Folgenden kurz dargestellt: Ein nichtbakterielles Proteinantigen, zum Beispiel ein spezifisches Tumorprotein, wird vom Makrophagen erkannt, aufgenommen und automatisch auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle exprimiert. Allerdings wird der Makrophage nicht aktiviert, d. h. er exprimiert nicht die notwendigen costimulierenden Zelloberflächenrezeptoren, welche den Kontakt mit der T-Zelle ermöglichen [46]. Moore et. al. beobachteten, daß die intraperitoneale Injektion von MPL-A, die Expression der costimulierenden Rezeptoren B7-1 auf Peritonealmakrophagen signifikant erhöht [47]. Durch diese Stimulation des Makrophagen mit Expression der costimulierenden Signale, sind T-Zellen jetzt in der Lage, das nicht-bakterielle Antigen zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen.

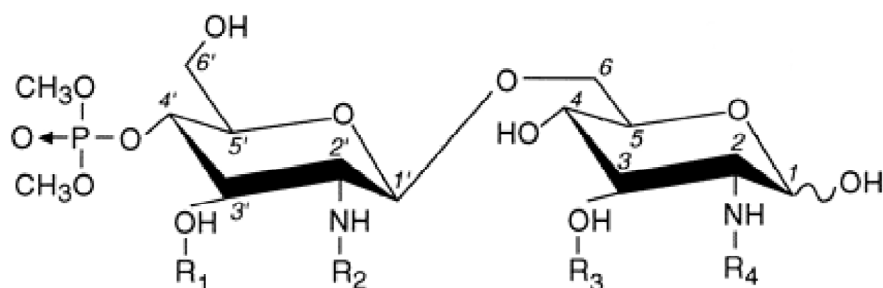


Abb. 5: Strukturformel Monophosphoryl Lipid-A [R₁: C₁₄-O-C₁₄ // R₂: C₁₄-OH // R₃: C₁₄-O-C₁₄ // R₄: C₁₄-OH]

Monophosphoryl Lipid A wurde in zahlreichen Studien als Adjuvans verwendet und führte bei jeder Anwendung zu einer erhöhten Immunantwort gegen das zusätzlich verabreichte Antigen [48, 49, 50, 51, 52, 53]. Neben der adjuvanten Wirkung konnten auch direkte Einflüsse auf immunkompetente Zellen nachgewiesen werden. Inkubation von Peritoneallymphozyten mit MPL-A bewirkte die Expression von Interferon- γ und Interleukin-2 [54, 55]. Beide Zytokine gehören zum charakteristischen Profil von TH-1 Helferzellen, einer funktionellen Klasse der CD-4 positiven Lymphozyten. TH-1 Helferzellen vermitteln zelluläre Immunreaktionen, aktivieren Makrophagen und regen B-Zellen an, opsonierende Antikörper zu bilden. Moore et. al. bestätigten, daß MPL-A die Differenzierung von CD-4 T-Lymphozyten in TH-1 Helferzellen induziert und dadurch antigenpräsentierende Zellen aktiviert werden [47].

Die zelluläre Immunantwort beginnt mit der Stimulation naiver, CD-8 positiver T-Zellen, welche sich in zytotoxische T-(Killer) Zellen (CTL) umwandeln und die antigenpositiven (Ag⁺) Zielzellen zerstören. Das Antigen muß in Verbindung mit einem MHC-I Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle exprimiert werden. Cho et. al. beobachteten, daß B16 Melanomzellen nur eine geringe Anzahl von MHC-I Rezeptoren exprimieren [56]. Nach Stimulation mit MPL-A war die MHC-I Expressionsdichte der

B16 Melanomzellen deutlich erhöht. Als eine der Ursachen wird die MPL-A vermittelte Interferon- γ Expression der TH1- Helferzellen diskutiert.

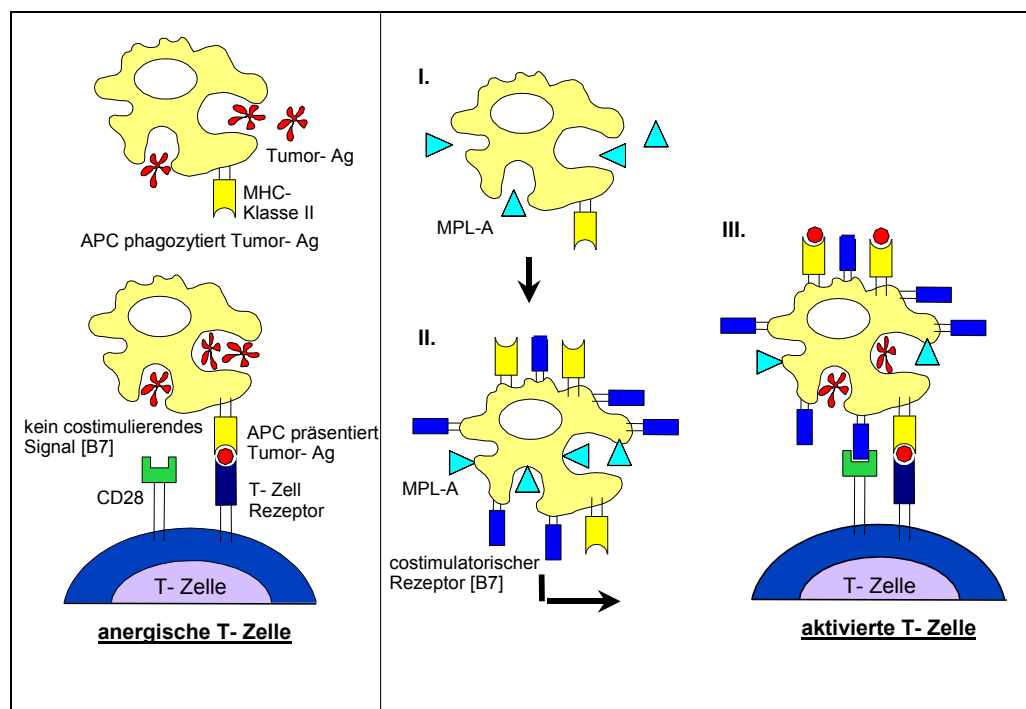


Abb. 6: MPL-A kann bei Antigen präsentierenden Zellen [APC] (Makrophagen, dendritische Zellen) ein costimulatorisches Signal auslösen

Ravindranath et. al. untersuchten, ob MPL-A die Induktion einer spezifischen Immunreaktion auf einen solidem, bei Mäusen etablierten Tumor verstärkt und dadurch zur Tumorregression beitragen kann [57]. Die Tiere wurden mit einer Kombination aus nicht-vitalen B16 Melanomzellen und MPL-A immunisiert und anschließend ein subcutaner B16 Melanomtumor induziert. Die vaccinierten Mäuse lebten, verglichen mit der Kontrollgruppe, signifikant länger und wiesen ein deutlich geringeres Volumen des Primärtumors auf.

2 Herleitung der Aufgabenstellung

2.1 Entwicklung pulmonaler Metastasen nach operativem Trauma

Bundesweit werden ca. 20% der abdominalchirurgischen Operationen laparoskopisch durchgeführt [58]. Obwohl die Invasion in den Körper, verglichen mit konventioneller Technik, die gleiche ist, wird durch Anwendung laparoskopischer Verfahren das operative Trauma deutlich reduziert. Sämtliche Vorteile der Minimal Invasiven Chirurgie gegenüber konventionellen Operationen ergeben sich aus dieser Verringerung des Traumas. Weniger Trauma bedeutet für den Patienten geringere postoperative Schmerzen, weniger Einschränkung der Lungenfunktion, weniger Beeinflussung der gastrointestinalen Motilität und weniger Immundepression. Daraus ergeben sich frühe Mobilisation, rasche Nahrungsaufnahme, rascher Beginn der Darmtätigkeit und Stuhlentleerung, frühe Entlassung aus der Klinik und frühere Rückkehr zu normaler Belastung. Denkbare Vorteile sind geringere Raten an Thrombosen und Pneumonien, bedingt durch die kurze Liegezeit. In den nächsten Jahren ist mit einer Zunahme laparoskopischer Operationen von ungefähr 10% zu rechnen [58]. Ein Teil dieser minimal invasiven Eingriffe wird auch die Tumorchirurgie betreffen. Es bleibt dabei abzuwarten, ob durch Reduktion des chirurgischen Traumas auch die onkologischen Langzeitergebnisse verbessert werden können.

Hypothese 1: Eine mediane Laparotomie vom Xiphoid bis zur Symphyse führt bei hämatogen zirkulierenden malignen Zellen zu einer deutlich gesteigerten pulmonalen Metastasierung. Im Vergleich dazu bewirkt der Aufbau eines Pneumoperitoneums keine gesteigerte Anzahl pulmonaler Metastasen.

2.2 Prävention pulmonaler Metastasen durch spezifische Immuntherapie

Berechtigte Hoffnung, daß in den nächsten Jahren eine wirkungsvolle Therapieform maligner Erkrankungen zur Verfügung steht, basiert auf der Identifizierung neuer Tumorantigene. Sollte es möglich sein, das spezifische Immunsystem gegen diese Antigene zu aktivieren, d. h. T-Lymphozyten zu stimulieren und eine zelluläre Immunreaktion auszulösen, könnten die nach Resektion des Primärtumors im Körper verbliebenen Tumorzellen effektiv bekämpft werden. Prinzipiell kann das Immunsystem minimale Veränderungen wie Punktmutationen erkennen, wenn das mutierte Peptid auf einem der HLA-Moleküle der Tumorzelle präsentiert wird [33]. Werden die Tumorzellen lysiert und intraperitoneal verabreicht, kommt es zur Phagozytose der Zelltrümmer durch Peritonealmakrophagen. Die Makrophagen präsentieren die Tumorantigene in Verbindung mit akzessorischen Molekülen auf ihrer Zelloberfläche und können somit eine antitumorale Immunantwort auslösen. Werden dem Patienten nach Resektion des Primärtumors autogene, lysierte, maligne Zellen verabreicht, könnten diese das Substrat für eine wirkungsvolle Therapie der sekundären Tumore sein.

Hypothese 2: Die Induktion einer spezifischen Immunreaktion gegen hämatogen zirkulierende Tumorzellen durch Verabreichen autogener Tumorzellfragmente in Kombination mit einem Adjuvans bewirkt eine signifikant geringere Anzahl pulmonaler Metastasen nach Laparotomie.

3 Methodik

3.1 Art der Versuchstiere

Die Experimente wurden weiblichen Mäusen der Spezies A/J durchgeführt (Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609 USA). Das Alter der Versuchstiere betrug 8 Wochen. Diese Mäuseart wurde 1921 durch Kreuzung von Cold Spring Harbor Mäusen und Bagg albino Mäusen entwickelt und seitdem weitestgehend in Krebs- und Immunologieforschung genutzt. Die Tiere wurden durch Inzucht vermehrt und haben ein albines Erscheinungsbild.

3.2 Haltung der Versuchstiere

Nach Lieferung der Tiere wurden diese in gesäuberten und desinfizierten Käfigen bei Standarddiät und Wasser ad libitum für eine Woche gehalten. In dieser Zeit konnten sie sich vom Transport erholen und an die neue Umgebung gewöhnen. Die Tiere wurden einem automatischen Tag/ Nacht Rhythmus ausgesetzt, die Käfige zweimal pro Woche gesäubert. Mit dem Beginn der Experimente wurden die Versuchstiere mehrmals täglich kontrolliert und Verhalten sowie Nahrungsaufnahme bewertet.

3.3 Versuchsaufbau

3.3.1 Einfluß des operativen Traumas auf die Entstehung pulmonaler Metastasen

60 Mäuse wurden in 3 Gruppen zu je 20 Tieren randomisiert. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden keinem Eingriff unterzogen. Bei den Tieren der Laparoskopie-Gruppe wurde ein CO₂ Pneumoperitoneum etabliert und dieses über einen Zeitraum von 15 min bei 2 mmHg aufrechterhalten. Danach wurde das Abdomen desuffliert und die Trokarinzision durch Klammernaht verschlossen. Bei den Tieren der Laparotomie-Gruppe wurde ein medianer Bauchschnitt von 3 cm Länge durchgeführt, die Bauchhöhle für 15 min geöffnet und danach durch Klammernaht verschlossen. Im direkten Anschluß an die Operationen wurde allen Tieren, einschließlich den Tieren der Kontroll-Gruppe, 10⁵ TA3 Hauschka Tumorzellen in die Schwanzvene injiziert. Zwei Wochen später wurden die Tiere getötet und die Anzahl der pulmonalen Metastasen bestimmt.

3.3.2 Perioperative Immuntherapie zur Prävention pulmonaler Metastasen

100 Versuchstiere wurden in 5 Gruppen zu je 20 Tieren randomisiert. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden keinem Eingriff unterzogen. Alle anderen Gruppen wurden laparotomiert.

Gruppe 1: [AC]	Kontrollgruppe
Gruppe 2: [OP]	Laparotomie
Gruppe 3: [MPL-A]	Laparotomie + Monophosphoryl Lipid A
Gruppe 4: [LTZ]	Laparotomie + lysierte Tumorzellen
Gruppe 5: [MPL-A + LTZ]	Laparotomie + Monophosphoryl Lipid A + lysierte Tumorzellen

Die Tiere der MPL-A Gruppe erhielten 6 intraperitoneale Injektionen, bestehend aus jeweils 16 µg Monophosphoryl Lipid A in 0,3 ml PBS. Das Adjuvans wurde einmal täglich, beginnend 3 Tage vor Operation bis einschließlich zweiter postoperativer Tag, verabreicht. Den Tieren der LTZ Gruppe wurden jeweils 5×10^5 lysierte Tumorzellen gelöst in 0,5 ml steriler Pufferlösung (PBS) an den präoperativen Tagen 15, 12, 9, 6 und 3, am Tag der Operation und am postoperativen Tag 3, intraperitoneal injiziert. Das gleiche Injektionsprotokoll wurde bei Gruppe 5 angewandt. Die Tiere der MPL-A + LTZ Gruppe erhielten 6 Injektionen, bestehend aus jeweils 16 µg Monophosphoryl Lipid A und 5×10^5 lysierten Tumorzellen. Im direkten Anschluß an die Operation wurden allen Tieren 1×10^5 TA3 Hauschka Tumorzellen in die Schwanzvene injiziert. Zwei Wochen später wurden die Tiere getötet und die Anzahl der pulmonalen Metastasen bestimmt.

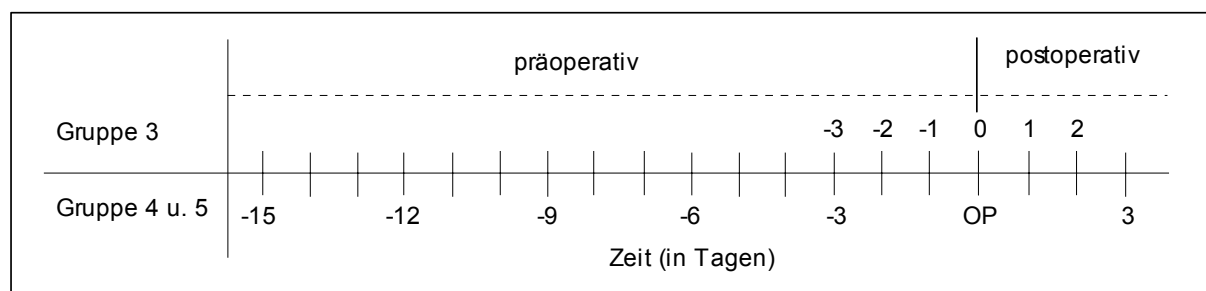


Abb. 7: Injektionsprotokoll

3.4 Operationsprotokoll: Laparotomie

Die Tiere wurden narkotisiert, die Bauchhaut rasiert und mit einer Mischung aus PVP-Jod und 70 %igem Alkohol desinfiziert. Danach wurden Haut und Muskeln entlang der Linea alba, ausgehend vom Xiphoid bis in den oberen Teil der Regio pubica,

separat durchtrennt. Die Bauchhöhle wurde geöffnet und die Inzision nach 15 min durch eine Klammernaht verschlossen.

3.5 Operationsprotokoll: Laparoskopie

Die Versuchstiere wurden anästhesiert, die Regio Umbilicalis des Bauches depiliert und desinfiziert. Die Haut über dem Abdomen wurde median mit einem 3 mm langen Schnitt durchtrennt, der Musculus rectus abdominis mit einer Pinzette angehoben und eine Flexüle durch den Muskel in die Bauchhöhle gelegt. Durch die Flexüle wurde Kohlendioxid in die Bauchhöhle insuffliert und ein Pneumoperitoneum mit einem Druck von 2 mmHg etabliert. Nach 15 min wurde das Abdomen desuffliert und der Hautschnitt durch eine Klammernaht verschlossen.

3.6 Intravenöse Injektion der vitalen Tumorzellen

Im Anschluß an die Operation wurden den Versuchstieren jeweils 1×10^5 vitale Tumorzellen in 0,1 ml PBS in eine der seitlichen Schwanzvenen injiziert. Der Schwanz wurde mit 70 %igem Alkohol desinfiziert und in der linken Hand zwischen Daumen und Zeigefinger festgehalten. Mit der rechten Hand wurde die Vene punktiert (Injektionskanüle 30 G, 1,5 cm lang) und die Tumorzellsuspension injiziert.

3.7 Vorbereitung von Monophosphoryl Lipid A (MPL-A)

Aus jeweils 2000 µg MPL-A (Monophosphoryl Lipid A (MPL®) Art: MPL® von S. minnesota R595, Produkt Nr.: R-373, RiBi ImmunoChem, Inc., 553 Old Corvallis Road, Hamilton, MT 59840, USA) wurde eine Stammlösung hergestellt. Dazu wurde der Wirkstoff in einem Gemisch aus 1998 µl sterilem Wasser und 2 µl Triethylamin gelöst und die Stammlösung für 30 Sekunden in 70 °C warmem Wasser inkubiert und anschließend weitere 30 Sekunden in einem Ultrakurzwellenbad suspendiert. Das Erwärmen und Suspendieren der Stammlösung wurde fünfmal wiederholt. 1 ml der Stammlösung wurde mit 17 ml PBS verdünnt, in 60 Portionen zu jeweils 0,3 ml aufgeteilt und bei 4 °C aufbewahrt.

3.8 Anästhesie der Versuchstiere

Die Narkose wurde unter Anwendung von Injektionsnarkotika durchgeführt. Aus Ketamin (Volumen: 1 ml; Konzentration: 100 mg/ml), Xylazine (Volumen: 0,1 ml; Konzentration: 100 mg/ml) und sterilem Wasser (10 ml) wurde eine Stammlösung hergestellt. Jedem Tier wurden 0,2 ml dieser Stammlösung intraperitoneal injiziert. Die Kurznarkose dauerte ca. 25 min.

3.9 Tötung der Versuchstiere

Zwei Wochen nach Injektion der vitalen Tumorzellen wurden alle Versuchstiere durch Gas getötet. In einem luftdichten Behälter wurden die Tiere 10 min lang einer Umgebung aus 99,9 % Kohlendioxid ausgesetzt. Die Tiere wurden nach ca. 30 Sekunden bewußtlos. Nach 10 min waren alle Versuchstiere verstorben und konnten für die Organentnahme vorbereitet werden.

3.10 Zellkultur

Die verwendeten TA3 Hauschka Tumorzellen (ECACC Nr.: 85061102, European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology & Research, Salisbury, Wiltshire SP4 0 JG, UK) wachsen gleichzeitig als adhärenente Einzelschicht (Monolayer) und in Suspension. Morphologisch handelt es sich um Epithelzellen, die ursprünglich von einem 1949 spontan aufgetretenen Maus Mammakarzinom einer A/HeHa Maus abstammen. Die Tumorzelllinie, benannt nach ihrem Entwickler T. S. Hauschka, wurde 1956 genetisch modifiziert, d.h. die Zellen erhielten ein zusätzliches Chromosom und wurden allotransplantabel für Mäuse anderer Spezies (Hauschka & Weiss, 1971).

3.10.1 Initiieren der Zellkultur

Die Tumorzellen wurden im gefrorenen Zustand geliefert und nach Erhalt in 36 °C warmem Medium (0,5l Eagle's minimum essential medium; 2 mM Glutamin; 1 % Nichtessentielle Aminosäuren; 10 % Fetales Rinderserum) aufgelöst. Innerhalb von ca. 1 Woche bildete sich ein dichter Zellrasen, so daß die Zellkultur subkultiviert werden konnte.

3.10.2 Mediumwechsel und Subkultivierung der Tumorzellen

Die Notwendigkeit das Kulturmedium zu wechseln, wird durch drei Faktoren angezeigt:

Der pH-Wert des Mediums sollte nicht kleiner als 7,0 sein. Ein Abfall des pH-Wertes ist am Übergang der Farbe des Mediums von rot über orange in gelb zu erkennen.

Die Zellkonzentration sollte nicht zu hoch sein. Bei großer Zelldichte, d.h. der Zellrasen erstreckt sich über den gesamten Boden der Kulturflasche, tritt Wachstumshemmung und Degeneration der Zellen auf.

Die Zellmorphologie sollte unauffällig sein. Auffällige Degenerationsmerkmale wie vakuolisiertes Zytoplasma kann Hinweis auf toxisches Serum, mikrobiologische Kontamination oder Altern der Zelllinie sein.

Die verwendete Tumorzellkultur wurde in wöchentlichem Abstand subkultiviert und jeweils am 4. Tag durch Zugabe von 10 ml frischem Medium ergänzt (Abb. 8). Bei der Zellpassagierung wurde das verbrauchte Medium mit den in Suspension befindlichen Zellen entfernt und in einem 50 ml Universalbehälter steril aufbewahrt. Die auf dem Kulturflaschenboden adhärenen Tumorzellen wurden für 1 min mit Trypsin (3 ml/ 25 cm²) inkubiert. Danach wurde die Kulturflasche geschüttelt bis alle Tumorzellen vom Boden abgelöst waren. Um die tryptische Aktivität zu stoppen wurde 5 ml frisches Medium zugesetzt, alle Flüssigkeit abpipetiert und zusammen mit dem zuvor gewonnenen Überstand bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der neue Überstand wurde verworfen und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Diesem Gemisch wurde 1 ml entnommen und einer vorbereiteten Kulturflasche mit 20 ml frischem Medium zugegeben.

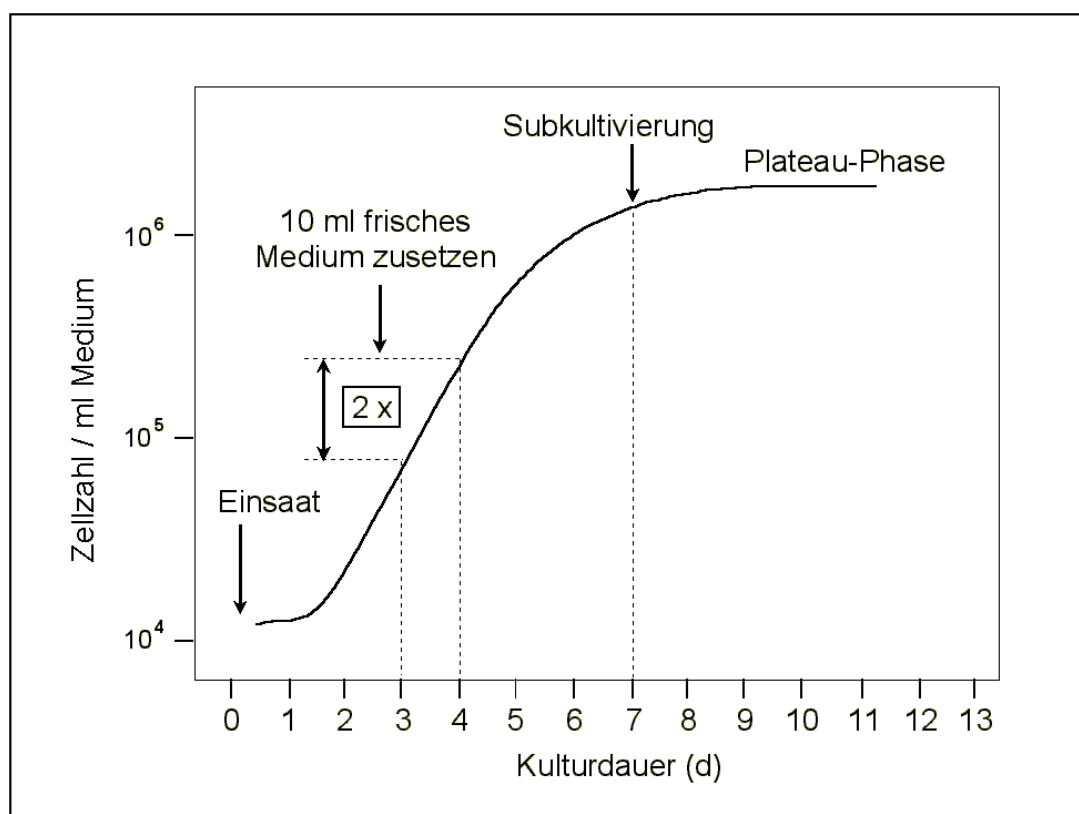


Abb. 8: Wachstumskurve der Zellkultur

3.10.3 Vorbereitung der Tumorzellen zur intravenösen Injektion

Nach einer Kulturdauer von 4 Tagen wurde das Medium entfernt, die Zellen durch Trypsinierung vom Boden der Kulturflasche gelöst, zentrifugiert und in steriler isotoner Salzlösung (PBS: phosphate buffered saline solution) vereinzelt. Nach 4 Tagen, vom Zeitpunkt der Subkultivierung ausgehend, sind ca. 80 % des verfügbaren Substrates besetzt, die Zellen erscheinen morphologisch einwandfrei, der Anteil abge-

storbener Zellen ist kleiner als 5 % der Zellgesamtzahl. Mit Hilfe des Neubauer Hämozytometers wurde die Konzentration auf 10^6 Zellen/ ml eingestellt und jeweils 0,3 ml der Suspension in sterile Eppendorfgefäße gegeben. Für die Injektion stand für jedes Tier ein Eppendorfgefäß mit steriler Tumorzellsuspension zur Verfügung.

3.10.4 Kryokonservierung der Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase (10^5 Zellen / cm^2) vermehrt. Das Medium mit den in Suspension befindlichen Zellen wurde entfernt und in einem sterilen 50 ml Universalbehälter aufbewahrt. Die in der Kulturflasche verbliebenen adhärennten Zellen wurden mit Trypsin (3 ml / 25 cm^2) von der Oberfläche gelöst. Um die zytotoxische Wirkung des Trypsins zu stoppen wurde der Suspension 5 ml frisches Kulturmedium zugefügt. Der gesamte Inhalt der Kulturflasche wurde zusammen mit dem anfänglich entfernten alten Medium bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen im vorbereiteten Gefriermedium resuspendiert und auf 5×10^6 Zellen / ml eingestellt. Das für die Kryokonservierung verwendete Kulturmedium (0,5l Eagle's minimum essential medium; 2 mM Glutamin; 1 % Nichtessentielle Aminosäuren; 10 % Fetales Rinderserum) enthielt das Gefrierschutzmittel DMSO in einer Endkonzentration von 10 %. Jeweils 1,5 ml der Zellsuspension wurden in Kryokontainer gefüllt und innerhalb von 2 Stunden kontinuierlich auf -90°C gefroren. Danach wurden die Kryokontainer in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.10.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe eines Hämozytometers nach Neubauer bestimmt. Aus der vorbereiteten Zellsuspension wurde mit einer Mikropipette $10 \mu\text{l}$ Flüssigkeit entnommen und am Rand der Zählkammer aufgetragen. Durch die Kapillarkraft saugt sich die Zellsuspension unter das Deckglas. Die Zellen wurden unter dem Mikroskops gezählt und ihre Konzentration in der Zellsuspension berechnet. Durch Verdünnung oder erneutes Zentrifugieren wurde die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

3.10.6 Vitalitätstest der Tumorzellen

Zur Überprüfung der Zellvitalität wurde der Trypanblau-Farbausschlußtest angewandt. Das Prinzip des Testes ist die Impermeabilität vitaler Zellen für den Farbstoff Trypanblau. Das Zytoplasma einer vitalen Zelle erscheint bei Anwendung dieses Testes hell und transparent. Ist die Zellmembran beschädigt, was bei einer abgestorbenen Zelle immer der Fall ist, färbt sich nach Inkubation mit dem Farbstoff das Zytoplasma blau. $20 \mu\text{l}$ frische Zellsuspension wurden 1:1 mit Trypanblau versetzt und 1 Minute inkubiert. Zur Auswertung wurden $10 \mu\text{l}$ des Gemisches auf ein Hämozytometer nach Neubauer aufgetragen und der Prozentsatz der ungefärbten Zellen be-

rechnet. Kriterium für die Verwendung der Tumorzellen war ein Anteil vitaler Zellen von mehr als 95 %.

3.10.7 Herstellung des Tumorzelllysats

Eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 10^6 Tumorzellen/ ml wurde hergestellt und in einem 50 ml Universalbehälter aufbewahrt. Als Medium für die Zellsuspension wurde eine sterile, isotone Pufferlösung (PBS) verwendet. Der Universalbehälter mit der Tumorzellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach 5 min in warmem Wasser aufgetaut. Diese Prozedur wurde sechsmal wiederholt. Durch die beim Einfrieren und Auftauen entstehenden Scherkräfte wurden die Zellmembranen zerstört. Die Lyse aller Zellen wurde mit Hilfe des Trypanblau-Farbausschlußtests bestätigt. Das Tumorzelllysate wurde portionsweise bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Eine Stunde vor Beginn der Injektionen wurde das gefrorene Tumorzelllysate aufgetaut, suspendiert und in Portionen zu 0,5 ml steril verwahrt.

3.11 Identifikation der Metastasen

Die toten Versuchstiere wurden in Rückenlage auf dem Untergrund befestigt. Eine Thorakolaparotomie wurde durchgeführt. Das Diaphragma wurde von medial nach lateral durchtrennt und die Lunge mobilisiert. Die Trachea wurde frei präpariert und durchtrennt. Es wurden 2 ml Kontrastmedium (85 ml destilliertes Wasser, 15 ml India ink) mit sanftem Druck in die Trachea injiziert. Die Alveolen füllten sich mit dem Farbstoff und die Lunge blähte sich auf. Alle Lungenlappen färbten sich tief schwarz. Lunge und Herz wurden en-bloc reseziert und für 5 min in Leitungswasser aufbewahrt. Überschüssiges Kontrastmedium konnte entweichen, die Lungenoberfläche wurde von Farbstoffpartikeln gereinigt. Danach wurde das Herz-Lungen Paket für 24 Stunden in Fekete's Lösung (100 ml Ethanol (70%), 10 ml Formaldehyd, 5 ml Essigsäure) aufbewahrt. Die Metastasen auf der Lungenoberfläche wurden durch das Gemisch weiß gebleicht. Anschließend wurden die Organe einzeln in 5 % Formalin-Lösung aufbewahrt [59].

3.12 Quantitative Bestimmung der Lungenmetastasen

Zunächst wurde das Herz von der Lunge abpräpariert. Danach wurden die 5 Lungenlappen freipräpariert und einzeln dargestellt. Die Lungenlappen wurden auf eine Glasplatte gebracht und durch eine zweite Glasplatte abgedeckt. Die beiden Glasplatten wurden durch Plastikspangen zusammengepreßt. Die Anzahl der Metastasen wurde auf beiden Seiten ausgezählt, wobei der Untersucher nicht über die Gruppenzugehörigkeit des Lungengewebes informiert war.

3.13 Paraffinschnitte und Hämatoxylin/ Eosin-Färbung

Zur Herstellung der 5 µm dicken Gewebsschnitte wurde das verwendete Lungengewebe in Paraffinblöcke eingebettet. Dazu wurde das, in Formalin fixierte Gewebe, mit PBS (Phosphat gepufferte NaCl-Lösung) gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe für jeweils 15 Minuten dehydriert. Anschließend wurde das Ethanol durch 30-minütige Inkubation mit dem Intermedium Xylol entfernt und dann das Xylol durch heißes Paraffinwachs ersetzt. Die von Paraffin durchtränkten Gewebestücke wurden in ein Gießschälchen gelegt, mit heißem Paraffin überschichtet und zu einem Paraffinblock verarbeitet. Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden bei 4°C mit dem Mikrotom geschnitten. Nach dem Schneiden der Präparate und Anheften der Gewebsschnitte an die Objektträger wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt. Die anschließende Hämatoxylin/ Eosin Färbung wurde nach dem Standardprotokoll von Bancroft und Stevens (1990) durchgeführt [60].

3.14 Statistische Analyse

Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe, bei denen pulmonale Metastasen festgestellt wurden, entspricht der Inzidenz. Ob sich die einzelnen Gruppen diesbezüglich signifikant unterscheiden wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests errechnet. Bei $p < 0,05$ wurden Paarvergleiche unter Verwendung des Exakten Tests nach Fisher durchgeführt.

Die Rohdaten wurden deskriptiv in Form von Boxplots dargestellt. Die Box stellt den Interquartilbereich mit 50% der Werte dar. Die von der Box ausgehenden Linien entsprechen den Perzentilen 10 und 90.

Zur Prüfung der Datenverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt. Die Datengruppen waren größtenteils nicht normal verteilt, weshalb für die weiteren Berechnungen nicht-parametrische Tests verwendet wurden. Die Mehrfachvergleiche wurden unter Verwendung des Kruskal-Wallis Tests durchgeführt. Bestand statistische Signifikanz ($p < 0,05$), wurden Paarvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau dieser Paarvergleiche wurde nach Bonferroni korrigiert und somit dem Mehrfachvergleich angepaßt. Dazu wurde das ursprüngliche Signifikanzniveau von $p = 0,05$ durch die Anzahl der durchgeführten Paarvergleiche dividiert.

4 Ergebnisse

4.1 Histologie

Die hämatogen zirkulierenden Karzinomzellen extravasiierten im kapillären Strombett der Lunge und bildeten multiple Metastasen. Dabei handelt es sich um undifferenzierte Adenokarzinome mit hoher Zell- und Zellkernpolymorphie sowie ausgeprägter mitotischer Aktivität. Die in Abbildung 10 deutlich erkennbaren Sekretionsphänomene in Form von intrazytoplasmatischen Vakuolen sind ein Hinweis auf die ursprüngliche adenoide Histogenese. Das Wachstumsmuster der Metastasen entspricht am ehesten einem soliden Adenokarzinom mit Schleimbildung. Die dunklen Rückstände im Lungenparenchym (Abb. 9) sind Reste des Kontrastmittels (India Ink) mit welchem das Organ zur besseren Abgrenzung der Metastasen gefüllt wurde.

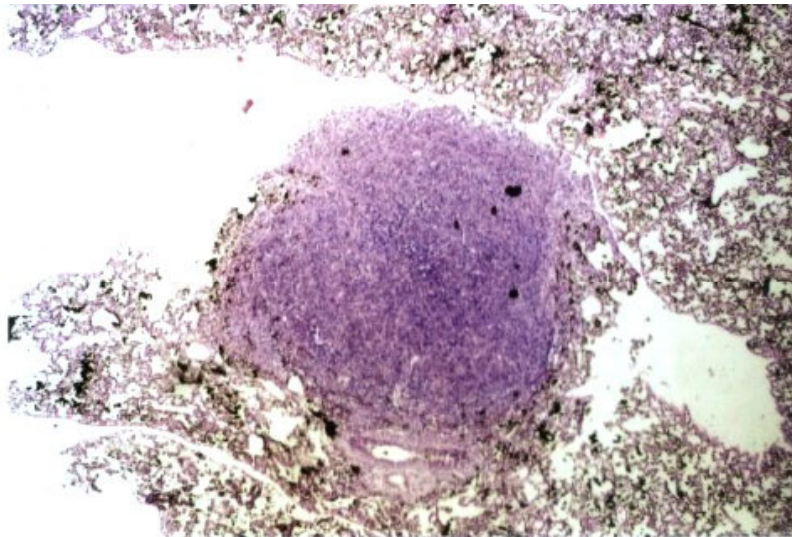


Abb. 9: pulmonale Metastase eines undifferenzierten Adenokarzinoms (HE, Vergr. 1:10)

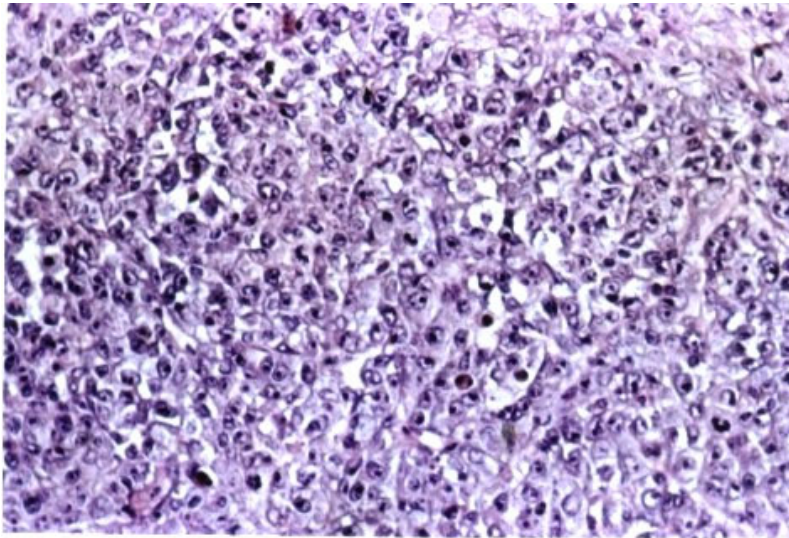


Abb. 10: Adenokarzinommetastase mit polymorphen Zellen, polymorphen Zellkernen, Mitosen und intrazytoplasmatischen Vakuolen (HE, Vergr. 1:100)

4.2 Makroskopische Darstellung der Präparate

Die Abbildungen 11a und 11b zeigen präparierte Herz-Lungen-Pakete mit gut abgrenzbaren Metastasen auf der Lungenoberfläche. Das Lungenparenchym ist schwarz gefärbt, die Metastasen sind weiß gebleicht und vom pulmonalen Gewebe gut abgrenzbar.

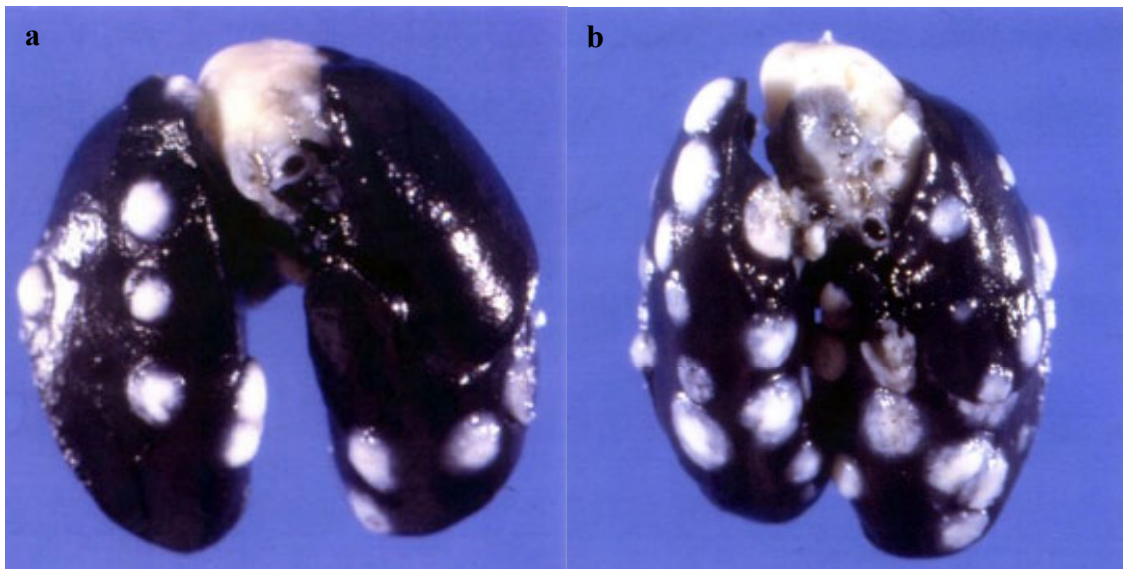


Abb. 11: pulmonale Metastasen hämatogen zirkulierender maligner Zellen

4.3 Einfluß des operativen Traumas auf die Entstehung pulmonaler Metastasen

4.3.1 Letalität

In der Kontrollgruppe starben 2 Tiere ca. 1 Stunde nach Injektion des Anästhetikums. Als Ursache kommt am ehesten eine durch Xylazine ausgelöste Atemdepression in Frage. Laparoskopie und Laparotomie hatten keinen Einfluß auf die Sterblichkeit. Die Gesamtletalität dieses Experimentes beträgt 3,3 %.

Tab. 2: Letalität

Gruppe	Kontrollgruppe	Laparoskopie	Laparotomie	Gesamt
Letalität	10%	0%	0%	3,33%

Die Tiere der Laparoskopie-Gruppe zeigten bereits 2 Stunden nach dem Eingriff bezüglich Nahrungsaufnahme, Spielen und Nestbau keine Besonderheiten. Das Verhalten der laparotomierten Tiere konnte erst 12 Stunden nach der Operation als unauffällig bewertet werden. Vorher verweigerten sie die Nahrungsaufnahme und lagen einzeln und bewegungslos in den Käfigen.

4.3.2 Inzidenz der pulmonalen Metastasen

Der Inzidenz der pulmonalen Metastasen unterscheidet sich in den einzelnen Gruppen nicht signifikant voneinander.

Tab. 3: Inzidenz, Chi-Quadrat nach Person: $p = 0,271$ (NS)

Gruppe	Tumor nicht vorhanden	Tumor vorhanden	Gesamt
Kontrollgruppe	4	14	18
Laparoskopie	4	16	20
Laparotomie	1	19	20
Gesamt	9	49	58

4.3.3 Verteilung der Daten

Der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest ergab, daß alle 3 Datengruppen nicht normal verteilt sind. Aus diesem Grund wurden für die weiteren statistischen Berechnungen nicht-parametrische Tests verwendet.

Tab. 4: Datenverteilung, Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

Gruppe	Signifikanz p	
Kontrollgruppe	0,071	NS
Laparoskopie	0,278	NS
Laparotomie	0,479	NS

4.3.4 Deskriptive Statistik

Die maximalen Werte der Laparotomie- und Laparoskopie-Gruppen werden als sogenannte Ausreißer in der Boxplotdarstellung nicht aufgeführt.

Tab. 5: Deskriptive Statistik

Gruppe	Anzahl (N)	Median	Perzentile 25	Perzentile 75	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	18	9	1,5	33,75	0	59
Laparoskopie	20	6,5	1	23	0	61
Laparotomie	20	31,5	6,25	68,5	0	200

Der Median der Laparotomie-Gruppe unterscheidet sich deutlich von den Medianen der Kontrollgruppe und Laparoskopie-Gruppe. Verglichen mit diesen beiden Gruppen beträgt er mehr als das Dreifache.

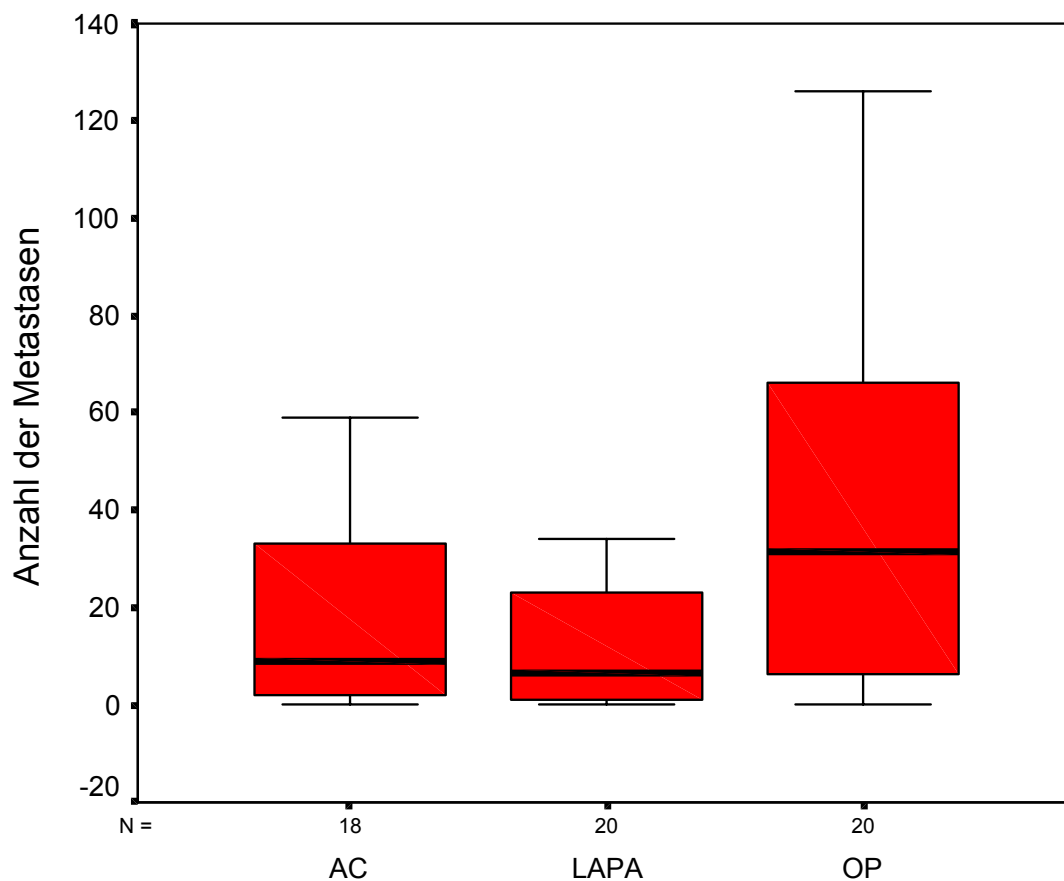


Abb. 12: Anzahl der Metastasen

4.3.5 Mehrfachvergleich

Der Kruskal-Wallis-Test ergibt einen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Die Lokalisation der Unterschiede wird durch Paarvergleiche unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

Tab. 6: Mehrfachvergleich

Gruppe	Mittlerer Rang
Kontrollgruppe	26,67
Laparoskopie	24,02
Laparotomie	37,53

Signifikanz p **0,028 (S)**

4.3.6 Paarvergleiche

Um das Signifikanzniveau der Paarvergleiche dem des Mehrfachvergleichs (Kruskal-Wallis-Test) anzupassen, wurde $p = 0,05$ durch die Anzahl der durchgeführten Paarvergleiche (Mann-Whitney-U-Tests) dividiert (Bonferroni Korrektur: $0,05 : 3 = 0,0167$). Somit gelten alle Werte kleiner $0,0167$ als statistisch signifikant.

Tab. 7: Paarvergleiche

Gruppe	Mittlerer Rang	Gruppe	Mittlerer Rang	Gruppe	Mittlerer Rang
Kontrollgruppe	20,42	Kontrollgruppe	15,75	Laparoskopie	15,85
Laparoskopie	18,67	Laparotomie	22,88	Laparotomie	25,15
Signifikanz p	0,633 (NS)	Signifikanz p	0,048 (NS)	Signifikanz p	0,011 (S)

Die Tiere der Laparoskopie-Gruppe entwickelten signifikant weniger Lungenmetastasen als die laparotomierten Tiere ($p = 0,011$). Zwischen Kontrollgruppe und Laparoskopie-Gruppe besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,633$). Der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Laparotomie-Gruppe ist nach Bonferroni ebenfalls nicht signifikant ($p > 0,0167$). Allerdings besteht ein deutlicher Trend ($p = 0,048$), der als Hinweis gewertet werden kann, daß sich bei einer höheren Fallzahl ein statistisch signifikanter Unterschied ergeben könnte.

4.4 Perioperative Immuntherapie zur Prävention pulmonaler Metastasen

4.4.1 Letalität

Von insgesamt 100 Versuchstieren starben 3 Tiere vor dem festgelegten Tötungszeitpunkt. Die Autopsie ergab jeweils blutige Pleuraergüsse und eine ausgeprägte Lungenmetastasierung. Die intraperitonealen Injektionen von Monophosphoryl Lipid A und dem Tumorzelllysate hatten keinen Einfluß auf die Letalität. Damit liegt die Gesamtletalität dieses Versuches bei 3%.

Tab. 8: Letalität

Gruppe	AC	OP	LTZ	MPL-A	MPL-A + LTZ	Gesamt
Letalität	0%	10%	5%	0%	0%	3%

4.4.2 Inzidenz der pulmonalen Metastasen

Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich bezüglich der Inzidenz der pulmonalen Metastasen signifikant voneinander [Chi-Quadrat nach Person: $p = 0,000$ (S)].

Tab. 9: Inzidenz der pulmonalen Metastasen

Gruppe	Tumor nicht vorhanden	Tumor vorhanden	Gesamt
AC	7	13	20
OP	0	18	18
LTZ	3	16	19
MPL-A	0	20	20
MPL-A + LTZ	14	6	20
Gesamt	24	73	97

Die Paarvergleiche wurden mit dem Exakten Test nach Fisher durchgeführt. Verglichen mit der OP-Gruppe, der LTZ-Gruppe und der MPL-A-Gruppe war die Inzidenz pulmonaler Metastasen in der MPL-A+LTZ-Gruppe signifikant niedriger. Nur bei 6 von 20 Tieren (30%) konnten Lungenmetastasen beobachtet werden. Die Inzidenz pulmonaler Metastasen in der OP-Gruppe betrug 100%.

Tab. 10: Exakter Test nach Fisher; a: Es wurde keine Statistik berechnet, da 100% der Tiere beider Gruppen Lungenmetastasen entwickelten.

Gruppe	AC	OP	LTZ	MPL-A
OP	p = 0,006			
LTZ	p = 0,157	p = 0,125		
MPL-A	p = 0,004	a	p = 0,106	
MPL-A + LTZ	p = 0,028	p = 0,000	p = 0,001	p = 0,000

4.4.3 Verteilung der Daten

Der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest ergab, daß die Daten von vier der fünf Gruppen nicht normal verteilt sind. Für die weitere Berechnung der Statistik wurden deshalb nicht-parametrische Tests verwendet.

Tab. 11: Datenverteilung

Gruppe	Signifikanz p	
AC	0,131	NS
OP	0,325	NS
LTZ	0,2	NS
MPL-A	0,086	NS
MPL-A + LTZ	0,001	S

4.4.4 Deskriptive Statistik

Tab. 12: Deskriptive Statistik

Gruppe	Anzahl (N)	Median	Perzentile		Minimum	Maximum
			25	75		
AC	20	6,5	0	27,25	0	91
OP	18	20	13,75	32,75	7	66
LTZ	19	3	1	6	0	19
MPL-A	20	4	2,25	24	1	76
MPL-A + LTZ	20	0	0	1	0	20

Der Median der Laparotomie-Gruppe ist verglichen mit den anderen Gruppen deutlich erhöht. Da 70% der Versuchstiere der MPL-A + LTZ Gruppe keine Lungenmetastasen entwickelten, wird der Median mit 0 angegeben.

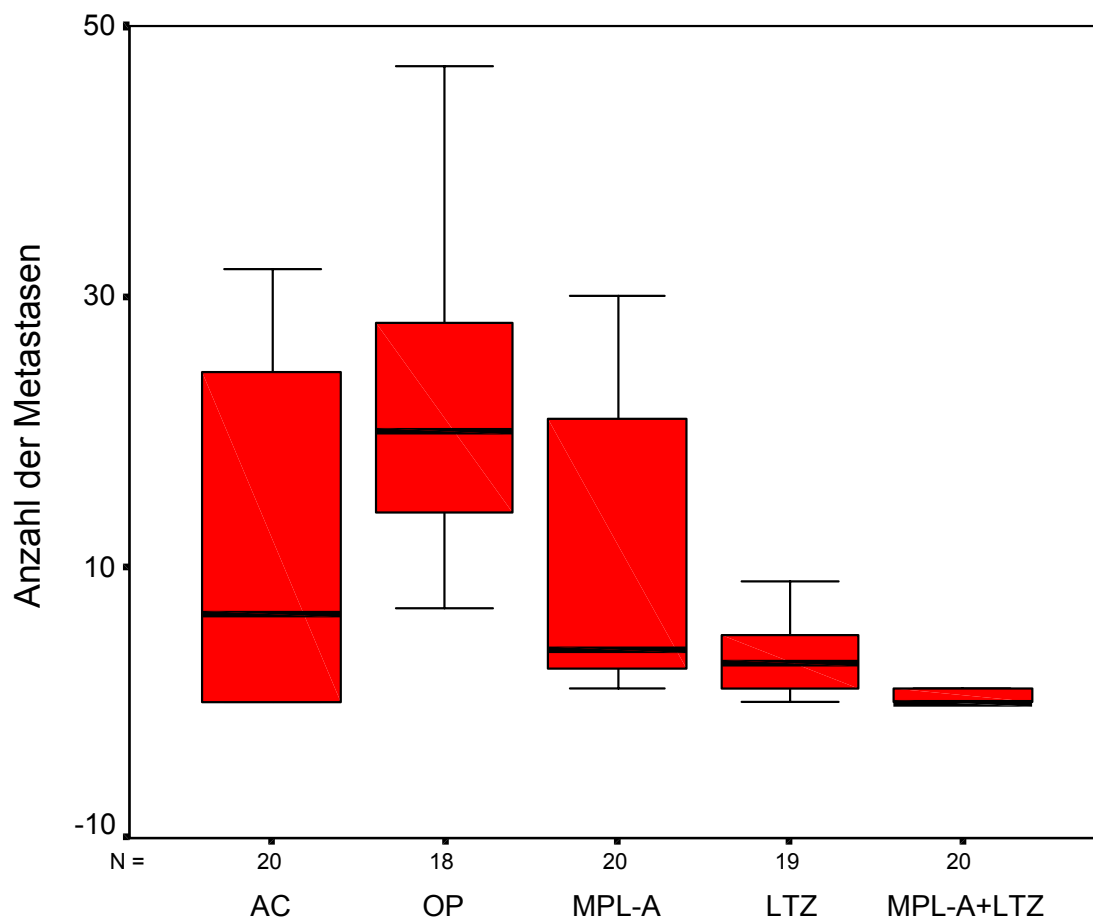


Abb. 13: Anzahl der Metastasen

4.4.5 Mehrfachvergleich

Der Kruskal-Wallis-Test ergibt einen signifikanten Unterschied (Signifikanz $p = 0,000$). Die Lokalisation der Unterschiede wird durch Paarvergleiche unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

Tab. 13: Mehrfachvergleich

Gruppe	AC	OP	LTZ	MPL-A	MPL-A + LTZ
Mittlerer Rang	51,22	75,72	40,34	56,6	23,35

4.4.6 Paarvergleiche

Die Kreuztabelle zeigt zehn mögliche Paarvergleiche (Mann-Whitney-U-Tests). Nach der Bonferroni Korrektur ergibt sich damit ein neues Signifikanzniveau von $p < 0,005$ ($0,05 : 10$).

Tab. 14: Paarvergleiche

Gruppe	AC	OP	LTZ	MPL-A
OP	1			
LTZ	2	5		
MPL-A	3	6	8	
MPL-A + LTZ	4	7	9	10

Die mit lysierten Tumorzellen immunisierten Tiere (LTZ-Gruppe) entwickelten signifikant weniger Lungenmetastasen als die unbehandelten Versuchstiere (OP-Gruppe). Die Anwendung von MPL-A in Kombination mit lysierten Tumorzellen (MPL-A + LTZ Gruppe) hatte den deutlichsten, inhibierenden Effekt auf das Tumorstadium. Die Tiere entwickelten signifikant weniger Tumore als die Versuchstiere der OP-Gruppe, der MPL-A-Gruppe und der LTZ-Gruppe.

Die perioperative Behandlung mit MPL-A ohne zusätzliche Verabreichung lysierter Tumorzellen, bewirkte, im Vergleich zur OP-Gruppe, eine geringere Anzahl pulmonaler Metastasen (Median = 4). Obwohl der Unterschied statistisch nicht signifikant ist ($p > 0,005$), zeigt sich ein deutlicher Trend ($p = 0,015$), der eine inhibierende Wirkung des MPL-A auf das Tumorstadium andeutet.

Die laparotomierten Tiere (OP-Gruppe, Median = 20) entwickelten, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median = 6,5), vermehrt Lungenmetastasen. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,03$; Signifikanzniveau 0,005). Trotzdem zeigt sich auch hier ein deutlicher Trend, welcher den Einfluß der Laparotomie auf die Entwicklung pulmonaler Metastasen verdeutlicht.

Gruppe	Mittlerer Rang	Gruppe	Mittlerer Rang	Gruppe	Mittlerer Rang	Gruppe	Mittlerer Rang
AC	15,8	AC	22	AC	19,83	AC	25,1
OP	23,61	LTZ	17,89	MPL-A	21,17	MPL-A + LTZ	15,9
Signifikanz	0,03	Signifikanz	0,27	Signifikanz	0,718	Signifikanz	0,012

Gruppe	Mittlerer Rang	Gruppe	Mittlerer Rang	Gruppe	Mittlerer Rang
OP	27,89	OP	24,11	OP	28,61
LTZ	10,58	MPL-A	15,35	MPL-A + LTZ	11,3
Signifikanz	0,000	Signifikanz	0,015	Signifikanz	0,000

Gruppe	Mittlerer Rang	Gruppe	Mittlerer Rang
LTZ	16,47	LTZ	25,39
MPL-A	23,35	MPL-A + LTZ	14,88
Signifikanz	0,061	Signifikanz	0,003

Gruppe	Mittlerer Rang
MPL-A	28,23
MPL-A + LTZ	12,77
Signifikanz	0,000

5 Diskussion

5.1 Einfluß des operativen Traumas auf die Entstehung pulmonaler Metastasen

Die Durchführung einer Laparotomie bewirkte eine signifikant gesteigerte Entwicklung pulmonaler Metastasen. Als mögliche Ursachen werden vor allem die eingeschränkte Lungenfunktion und das posttraumatisch veränderte Hämostasesystem diskutiert. Im Gegensatz dazu hatte der Aufbau eines Pneumoperitoneums keinen Einfluß auf die Entstehung sekundärer Tumore.

Obwohl der Unterschied zwischen Kontroll- und Laparotomiegruppe statistisch nicht signifikant ist, kann das Ergebnis von $p = 0,048$ (Signifikanzniveau = 0,0167) als deutlicher Trend gewertet werden, welcher die Hypothese des vermehrten Auftretens pulmonaler Metastasen nach schwerem operativen Trauma unterstreicht.

5.1.1 Einfluß der Lungenfunktion nach Laparotomie auf die pulmonale Absiedlung hämatogen, zirkulierender Tumorzellen

Gelangen Tumorzellen in den Blutkreislauf kommt es nach Kontakt mit Thrombozyten, Erythrozyten und anderem Blutbestandteilen zur Bildung von Mikroemboli. Diese können mit dem Blut in die Lunge transportiert werden und dort in den Kapillargefäßen steckenbleiben [61]. Die nach Laparotomie erheblich eingeschränkte Lungenfunktion kann diesen Tumorzellarrest begünstigen. Eine der Ursachen ist die von Euler und Liljestrand beobachtete Reflexerscheinung der Konstriktion von Arteriolen nach Abnahme des alveolären Sauerstoffpartialdrucks [5]. Die Funktionseinschränkung der Lunge bewirkt eine Hypoxie mit reflektorischer Gefäßverengung. Je kleiner der Gefäßdurchmesser, desto größer ist die Barriere für zirkulierende Tumoremboli. Die resultierende, größere Anzahl im Lungenstrombett verbleibender Tumorzellen, verbunden mit reduzierter mechanischer Belastung und längerer Verweildauer, könnte initiale Schritte der Extravasation erleichtern und damit die Entstehung pulmonaler Metastasen begünstigen.

Eine Hauptursache der eingeschränkten Lungenfunktion nach Laparotomie ist der ausgeprägte postoperative Wundschmerz. Der Patient ist aufgrund der Beschwerden nicht bereit, tief einzuatmen. Die verminderte Ventilation der Lunge beeinträchtigt den zillären Schleimabtransport. Das überschüssige Bronchialsekret wird aufgrund der postoperativen Schmerzen nicht abgehustet. Zusätzlich können durch das Trauma Bronchialspasmen verursacht werden. Es kommt zur Retention von Sputum und damit zur Verlegung feinsten Bronchien. Die Folge ist eine diffuse Entwicklung von Mikroatektasen [62].

Abraham Becker et al. beobachteten bei 50% der Patienten nach Oberbauchoperationen das Vorhandensein von Atektasen [63]. Diese waren im Röntgenbild sichtbar. Lindberg et al. konnten bei 85% der Patienten nach Unterbauchoperationen Atektasen im Lungengewebe mittels Computertomographie (CT) nachweisen [64].

Gleichzeitig wurden von allen Patienten Röntgenaufnahmen gemacht, auf denen keine der im CT beschriebenen Atelektasen sichtbar war. Dureul et. al. zeigten, daß operative Eingriffe am Oberbauch die Lungenfunktion und die Funktion des Zwerchfells deutlich stärker beeinträchtigen als Unterbauchoperationen [65]. Diese Ergebnisse lassen die allgemeine Schlußfolgerung zu, daß ein Großteil der Patienten nach ausgedehnten Bauchoperationen Mikroatektasen aufweisen.

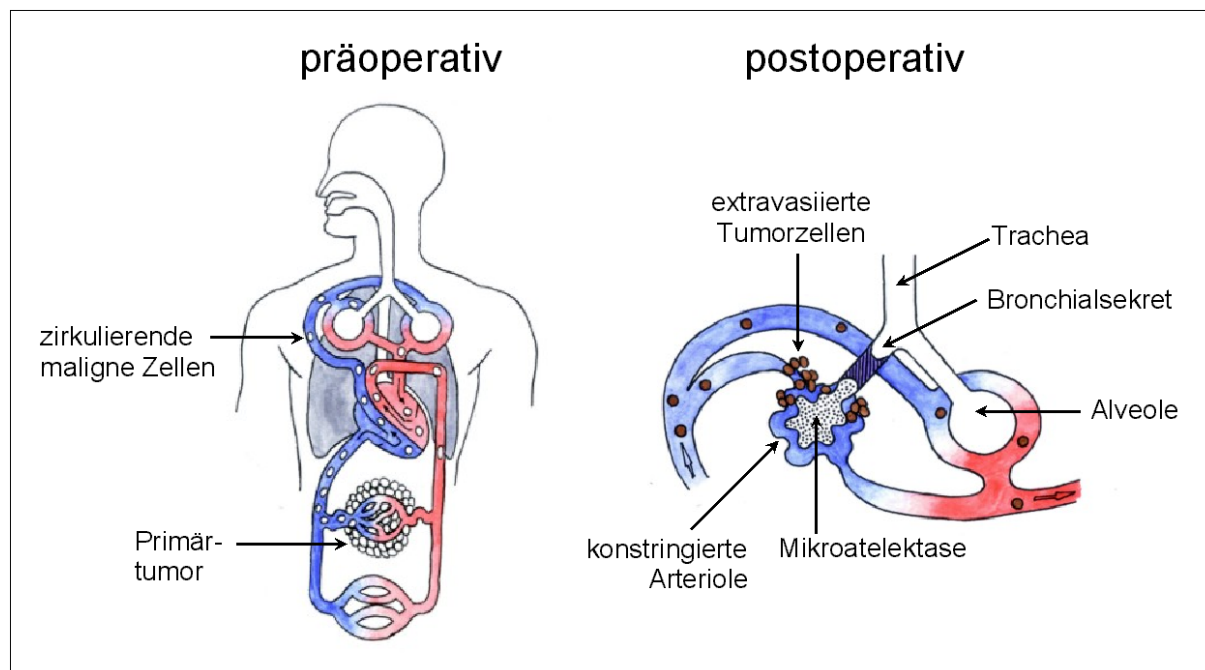


Abb. 14: Pathogenese pulmonaler Metastasen nach Laparotomie

Neben der Retention des Sputums können veränderte thorakale und abdominale Druckverhältnisse für die Entstehung von Atelektasen mitverantwortlich sein. So ist zum Beispiel der intestinale Luftgehalt, insbesondere im Ileum, nach Bauchoperationen oder anderen schmerzhaften Eingriffen deutlich erhöht, wodurch der abdominelle Druck ansteigt und basales Lungengewebe komprimiert werden kann [66].

Bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Druckverhältnisse in Brust- und Bauchraum spielt das Zwerchfell eine entscheidende Rolle. Die Bedeutung der Funktionseinschränkung des Zwerchfells für die eingeschränkte Lungenfunktion nach Laparotomie soll im Folgenden durch Arbeiten von G. T. Ford et. al. und G. Simonneau et. al. dargestellt werden [67, 68].

Um die Leistung des Zwerchfells einschätzen zu können, wurde die transdiaphragmatische Druckdifferenz (P_{di}) bestimmt. Dazu wurden mittels zweier Ballonkatheter die Drücke in Magen (P_{ab}) und Ösophagus (P_{es}) gemessen und ihre Differenz ($P_{ab} - P_{es} = P_{di}$) gebildet. Steigt durch die postoperative Dysfunktion des Zwerchfells der intrapleurale Druck an, wird gleichzeitig der Druck im Ösophagus erhöht. Das wiederum führt zum Absinken der transdiaphragmatischen Druckdifferenz und begünstigt den Kollaps kleiner Bronchien [69].

Beide Arbeitsgruppen beobachteten einen signifikanten Pdi-Abfall in der frühen postoperativen Phase. Die Dysfunktion des Zwerchfells und die Entwicklung von Atelektasen beeinträchtigen die gesamte Lungenfunktion. Die Vitalkapazität, die expiratorische Sekundenkapazität und das Atemzugvolumen waren nach konventioneller Cholezystektomie signifikant vermindert [67]. Beecher et. al. beobachteten bei Patienten nach Laparotomie eine erhöhte Atemfrequenz, signifikant kleinere expiratorische und inspiratorische Reservevolumina und eine deutlich reduzierte Totale Lungenkapazität [70, 71]. Die Arbeitsgruppen von M. L. Diamant, G. Hansen und A. K. Pierce zeigten einen signifikanten Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks am ersten postoperativen Tag nach Oberbauch-Laparotomie [72, 73, 74]. Ein erhöhter venös-arteriell pulmonaler Shunt, bedingt durch die diffuse Bildung von Mikroatelektasen, wurde als eine mögliche Ursache genannt.

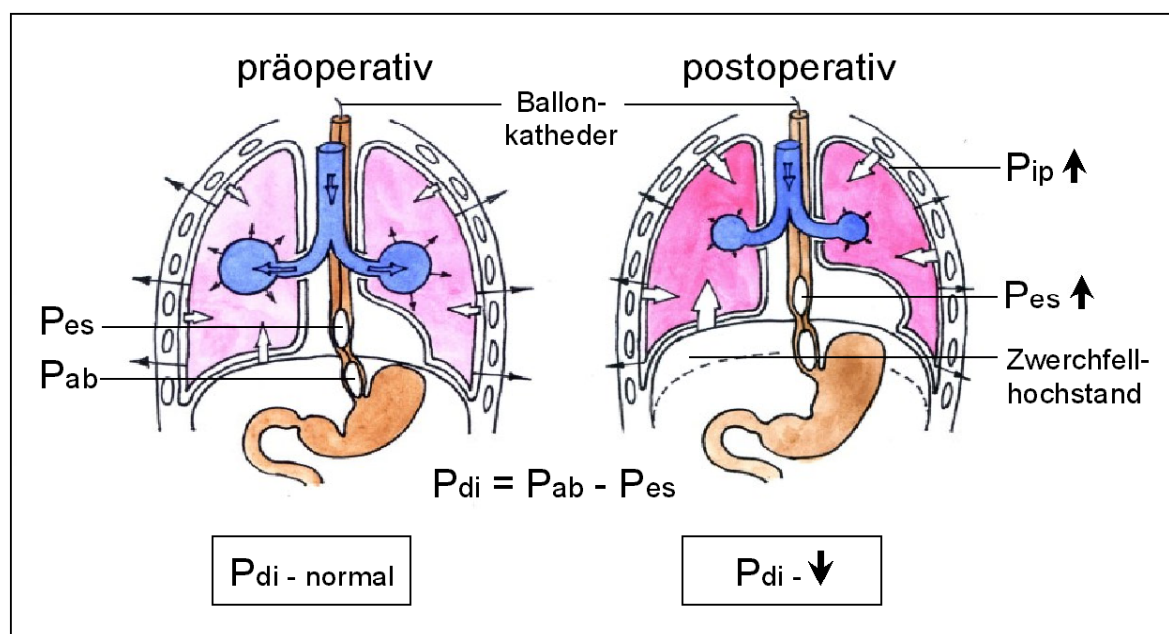


Abb. 15: Transdiaphragmatische Druckverhältnisse nach Laparotomie [Pdi - transdiaphragmatischer Druck; Pab - abdominaler Druck; Pes - ösophagealer Druck; Pip - intrapleuraler Druck]

An dieser Stelle soll nochmals auf den eingangs beschriebenen Pathomechanismus der gesteigerten pulmonalen Absiedlung von Tumorzellen bei reduzierter Lungenfunktion eingegangen werden. Im Mittelpunkt steht dabei die traumabedingte Entwicklung von Atelektasen. Da die kollabierten Bronchien nicht ventiliert werden können, ist das dazugehörige peribronchiale Gebiet der Lunge hypoxisch. Dieser Zustand bewirkt die Konstriktion der kleinen Lungengefäße, was zu einer gesteigerten pulmonalen Retention im Blut zirkulierender Tumorzellen führt.

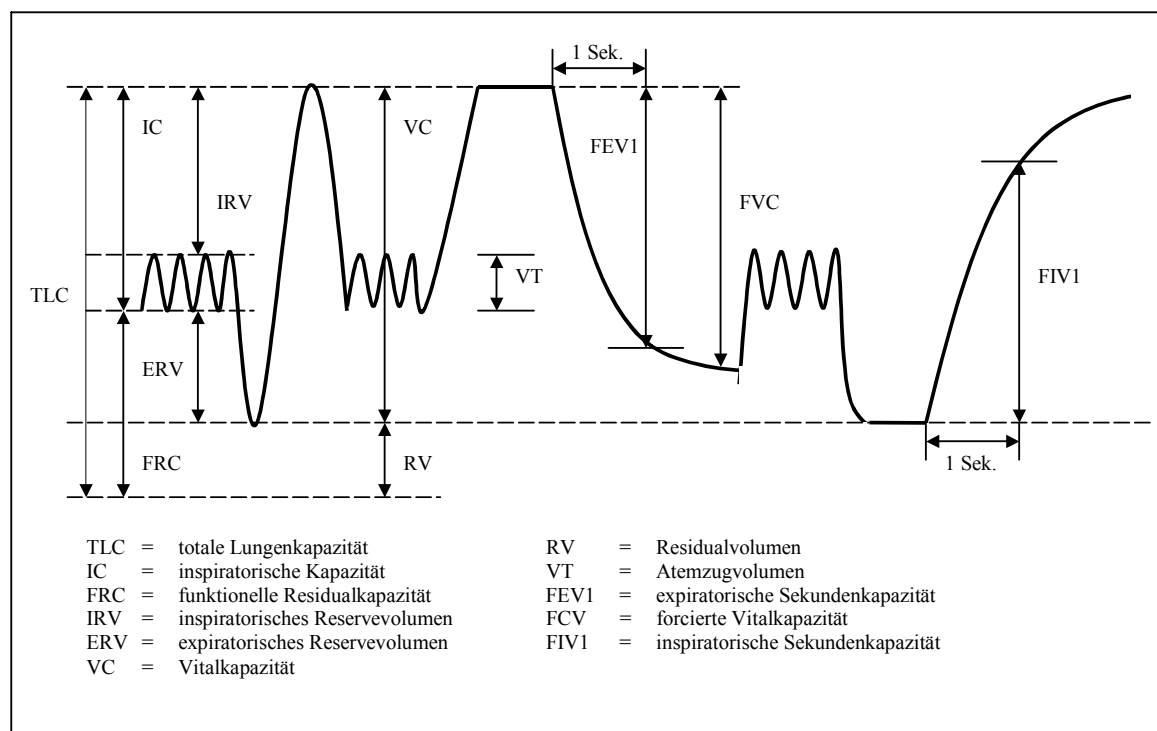


Abb. 16: Lungenfunktionsparameter

Die einfachste Lösung zur Verbesserung der postoperativen Lungenfunktion ist die Wahl eines weniger traumatisierenden Operationsverfahrens. Als solches kommt in erster Linie die Laparoskopie in Frage. Schauer et. al. und Rademaker et. al. untersuchten die postoperative Funktion der Lunge bei Patienten nach konventioneller und laparoskopischer Cholezystektomie [75, 76]. Verglichen mit den Patienten der Laparotomie-Gruppe, wurden nach Laparoskopie deutlich bessere Lungenfunktionsparameter gemessen. Die forcierte Vitalkapazität, expiratorische Sekundenkapazität, totale Lungenkapazität und Sauerstoffsättigung waren nach Laparoskopie, verglichen mit der Laparotomie-Gruppe, wesentlich weniger beeinträchtigt. 90% der laparotomierten Patienten entwickelten Atelektasen. Dabei handelte es sich hauptsächlich um fokale und segmentale Atelektasen. Nach Laparoskopie wurden bei 40% der Patienten weitgehend Mikroatelektasen nachgewiesen. Trotz dieser signifikanten Reduktion der Anzahl der Atelektasen wird deutlich, daß auch ein laparoskopischer Eingriff die Lungenfunktion beeinflussen kann. Wie bei den konventionellen Operationen ist auch hier die Schwere des Traumas von entscheidender Bedeutung. Erice et. al. zeigten, daß eine laparoskopische Cholezystektomie mit einer leichten Einschränkung der Lungenfunktion einher geht [77]. Im Vergleich dazu hatte eine laparoskopische Herniotomie keinen Einfluß auf die Funktion des Zwerchfells und der Lunge. Auch das Trauma einer Übersichtslaparoskopie scheint keine wesentliche Änderung der Lungenfunktion zu bewirken [78]. Vitalkapazität, Atemzugvolumen und transdiaphragmatischer Druck unterschieden sich nicht von den präoperativen Kontrollwerten.

Es gilt als sicher, daß laparoskopische Operationen, im Vergleich zur konventionellen Chirurgie eine deutlich bessere postoperative Lungenfunktion bedingen. Im durchgeführten Experiment korreliert diese Beobachtung mit einer signifikant geringeren Anzahl pulmonaler Metastasen.

5.1.2 Einfluß des Hämostasesystems auf die pulmonale Absiedlung hämatogen zirkulierender maligner Zellen

Zu den essentiellen Regelkreisläufen des Organismus, welche durch schweres operatives Trauma beeinflusst werden, zählt neben Hormon- und Immunsystem, Gastrointestinalem System und Kreislauf auch das Hämostasesystem. Die nach Laparotomie beobachtete Hyperkoagulabilität bewirkt eine verlangsamte Mikrozirkulation und verstärkte Bildung kleiner Thromben, was wiederum zur gesteigerten Retention maligner Zellen im kapillaren Strombett unterschiedlicher Organe führen kann [79]. Diese postoperative Entwicklung von Mikrothromben basiert auf der bekannten Virchow'schen Trias: Endothelalteration, Blutstromveränderung und Veränderung der Blutzusammensetzung.

Die postoperative Störungen der Lungenfunktion führt zur Bildung minderperfundierter hypoxischer Areale mit verringertem Stromzeitvolumen, d. h. die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes ist verlangsamt. Weiterhin kommt es zur Schädigung der Endothelzellen durch Tumoremboli, welche in den Lungenkapillaren fest klemmen. Das nach Verletzung des Endothels frei liegende Kollagen führt zur Thrombozytenaggregation [80]. Der dritte und entscheidende thrombogene Stimulus ist die postoperativ erhöhte Gerinnungsbereitschaft oder Koagulabilität des Blutes [81]. Diese kann entweder durch eine geringere Effektivität von gerinnungshemmenden bzw. fibrinolytischen Mechanismen und/ oder durch Expression von prokoagulatorischer Aktivität induziert werden. Beide Reaktionswege werden durch das Trauma indirekt beeinflusst. Eine Schlüsselrolle scheint dabei die nach Laparotomie auftretende Hypoxämie zu spielen. Die verminderte Sauerstoffkonzentration bewirkt eine signifikant erhöhte Konzentrationen von plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) im Blut [82]. Die Konzentration von Plasminogen, als fibrinolytisches Protein, ist nach größeren chirurgischen Eingriffen deutlich vermindert [83].

Neben der postoperativ verstärkten Hemmung der Fibrinolyse kommt es zu einer gesteigerten prokoagulatorischen Aktivierung. Wiederum ist die Hypoxämie von entscheidender Bedeutung. Bei kultivierten Endothelzellen, Monozyten und glatten Muskelzellen bewirkt der Sauerstoffabfall eine deutlich erhöhte Expression von Gewebsthromboplastin [81, 84]. Gewebsthromboplastin ist ein potenter Aktivator des Extrinsischen Blutgerinnungssystems. Außerdem steigert Hypoxie die Adhäsion von polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen, wobei die erhöhte Produktion von „Plättchenaktivierendem-Faktor (PF-3)“ durch das Endothel als Hauptmechanismus diskutiert wird. Die erhöhte PF-3 Konzentration führt zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und damit zur Aktivierung des Intrinsischen Blutgerinnungssystems. Dieser Vorgang wird durch die postoperativ gesteigerte

Thrombozytenzahl und erhöhte Adhäsionsbereitschaft der Thrombozyten erheblich erleichtert [85].

Innerhalb von 6 Stunden nach Einsetzen einer Hypoxämie, können elektronenmikroskopisch Fibrinbeläge in den Kapillargefäßen der Lunge nachgewiesen werden. Zusätzlich kommt es zur verkürzten Blutungszeit mit erhöhter Konzentration von Fibrinogen und Faktor VIII [84]. Dieses Mikromilieu bietet ausgezeichnete Voraussetzungen für die Entstehung kleiner Thromben, welche nach pulmonaler Mikroembolie den Arrest im Blut zirkulierender, maligner Zellen begünstigen können [86].

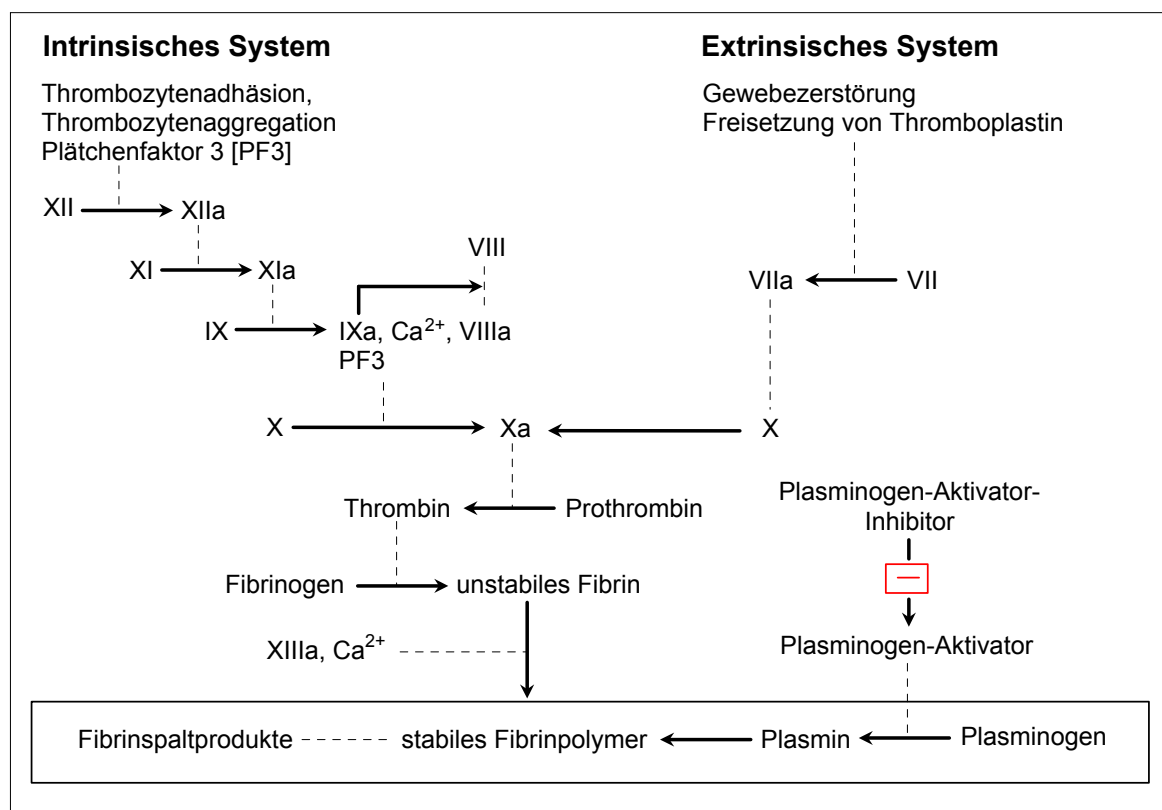


Abb. 17: Schema der Blutgerinnung

In einer umfangreichen Arbeit von Lars Iversson wurde gezeigt, daß eine künstlich induzierte Thrombozytopenie, die Anzahl pulmonaler Metastasen signifikant senken kann [87]. Weiterhin wurde beobachtet, daß die nach Laparotomie erhöhte Inzidenz von Lungenmetastasen bei deutlich reduzierter Thrombozytenzahl nicht auftrat. Auch die Hemmung der Blutgerinnung durch Heparin und Cumarinderivate bewirkte einen massiven Abfall experimenteller, durch intravenöse Injektion maligner Zellen induzierter Lungenmetastasen [88].

Neben der Applikation von antikoagulativen Medikamenten kann durch Reduktion des operativen Traumas die postoperativ erhöhte Gerinnungsbereitschaft des Blutes deutlich gesenkt werden. Es konnte gezeigt werden, daß die laparoskopische Entfernung der Gallenblase, im Vergleich zur konventionellen Cholezystektomie, eine wesentlich geringere prokoagulatorische Aktivität des Blutes zur Folge hat [89]. Als Nachweismethode diente die Thrombelastographie. Das Thrombelastogramm gibt

einen Überblick über Thrombozytenzahl und Thrombozytenfunktion sowie über den Ablauf des endogenen Gerinnungssystems und der Fibrinolyse. Nach konventioneller Cholezystektomie waren die Reaktionszeit, d.h. die Zeit bis zum Gerinnungseintritt, und die Thrombusbildungszeit, also die Geschwindigkeit der einsetzenden Gerinnung, im Vergleich zur Laparoskopie signifikant verkürzt.

Zusammenfassend können die Aktivierung des Hämostasesystems und die Einschränkung der Lungenfunktion als Hauptursachen der nach Laparotomie erhöhten pulmonalen Absiedlung maligner Zellen genannt werden. Neben dem gesteigerten Tumorzellarrest in den Kapillaren der Lunge könnte eine beschleunigte Extravasation der Tumorzellen ins Lungenparenchym die Entwicklung pulmonaler Metastasen zusätzlich begünstigen.

5.1.3 Extravasation maligner Zellen – Rolle der Adhäsionsmoleküle

Die Migration der Tumorzellen durch die Gefäßwand ist ein grundlegender Bestandteil der Pathogenese von Tumormetastasen. Dieser Mechanismus gleicht der Extravasation von neutrophilen Granulozyten [90]. Nach Aktivierung der Endothelzellen durch Entzündungsmediatoren (TNF- α ; IL-6; IL-1 β) werden innerhalb weniger Minuten auf der Oberfläche der Endothelzellen Selektine exprimiert. Diese Zelladhäsionsmoleküle interagieren mit Kohlenhydratepitopen bestimmter Glycoproteine der Leukozyten und führen zu einer reversiblen Anheftung der neutrophilen Zellen an die Gefäßwand. Dieser erste Adhäsionsschritt bewirkt eine zweite, stabilere Bindung zwischen sogenannten Integrinen, exprimiert auf der Granulozytenoberfläche, und den CAM- Rezeptoren (cell adhesion molecule) des Endothels. Die CAM Expression wird analog der Selektin-Hochregulation durch proinflammatorische Zytokine induziert. Mit der resultierenden festen Bindung der Zelle an die Gefäßwand beginnt die Diapedese. Die auf der migrierenden Zelle exprimierten Integrine bewirken zusätzlich eine feste Bindung zwischen Granulozyt und Basalmembran. Um die Basalmembran passieren zu können, zerstört der neutrophile Granulozyt die extrazelluläre Matrix mit Hilfe proteolytischer Enzyme und wandert unter dem chemotaktischen Einfluß von Interleukin 8 in das Parenchym [90].

Die Mechanismen der Adhäsion und Invasion maligner Zellen gleichen dem beschriebenen Verlauf der Extravasation neutrophiler Granulozyten. Auch hier kommt es unter Einfluß proinflammatorischer Zytokine zur Expression von Selektinen (E-Selektin und P-Selektin) auf den Endothelzellen. Diese binden sogenannte Sialyl-Lewis-Glycoproteine (sLe Epitope), die bereits auf Tumorzellen nachgewiesen wurden. Maehara et. al. beobachteten, daß Adenokarzinomzellen mit einer hohen sLe Rezeptordichte eine deutlich gesteigerte Bindung mit aktivierten Endothelzellen eingehen [91]. Monoklonale Antikörper gegen sLe Epitope bzw. das Blocken der Selektin-Expression inhibierten dagegen die Adhäsion zwischen Tumor- und Endothelzellen.

Die für die zweite festere Bindung zwischen Tumor- und Endothelzellen verantwortlichen Integrin-Rezeptoren der migrierenden Tumorzelle bestehen aus alpha- und be-

ta-Unter-einheiten. Beide Rezeptortypen werden von den, im Experiment verwendeten, intravenös injizierten, TA3-Hauschka Tumorzellen auf der Zelloberfläche exprimiert [92]. Beta(1)-Integrine können mit CAM-Rezeptoren der Endothelzellen adhäsive Bindungen eingehen. Alpha(5) und alpha(6)-Integrine sind bekannt für Bindungen mit Fibronectin- und Laminin Proteinen der Basalmembran. Die Up- und Down-Regulation der Adhäsionsrezeptorenfamilien erfolgt überwiegend im Zusammenspiel mit stimulierenden und supprimierenden Zytokinen. Die Endothelzellen können nach entsprechendem Stimulus innerhalb von Minuten die Dichte verschiedener Rezeptortypen deutlich erhöhen. Nach 2 - 6 Stunden erreicht die Rezeptordichte ein Maximum, um dann innerhalb von 24 Stunden wieder auf Normalwerte abzufallen. Ist die Funktion der Rezeptoren erfüllt, werden sie abgeworfen oder eingefahren [90].

Die postoperative Entzündungsreaktion mit erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine kann eine Hochregulation der beschriebenen Adhäsionsrezeptoren bewirken und damit zur verbesserten Adhäsion der malignen Zellen an das Endothel und Migration in das Parenchym beitragen.

5.2 Perioperative Immuntherapie zur Prävention pulmonaler Metastasen

5.2.1 Stimulation des unspezifischen Immunsystems durch MPL-A

Die Stimulation des unspezifischen Immunsystems durch separates Verabreichen von Monophosphoryl Lipid A bewirkte keine signifikante Einschränkung der Tumorentwicklung ($p = 0,015$; Signifikanzniveau 0,005). Allerdings zeigte sich ein deutlicher Trend, der eine inhibierende Wirkung des perioperativ verabreichten MPL-A auf die Entstehung pulmonaler Metastasen andeutet. Eine der Ursachen ist die hohe Immunität der intravenös injizierten, synergetischen Karzinomzellen. Die Versuchstiere waren in der Lage, eine spezifische Immunreaktion gegen die malignen Zellen zu initiieren, welche durch das Adjuvans MPL-A verstärkt wurde.

Die weit verbreitete Annahme, daß eine traumabedingte Immunsuppression der Grund für das vermehrte Auftreten maligner Metastasen nach schwerem, operativem Trauma ist und eine einfache Stärkung des Immunsystems dieses gesteigerte Tumorstadium inhibieren könnte, basiert auf der Theorie der immunologischen Überwachung [33]. Diese Theorie geht davon aus, daß die Erkennung und Elimination maligner Zellen eine primäre Funktion des Immunsystems ist. Das heißt, das Immunsystem besitzt die Fähigkeit, Tumorzellen von gesunden Körperzellen zu unterscheiden und sie, ähnlich wie fremde Zellen oder virusinfizierte Zellen, zu eliminieren. Die ungehinderte Entwicklung von Tumoren wäre demnach auf ein Versagen der Immunüberwachung zurückzuführen.

Das entscheidende Argument gegen die Theorie der immunologischen Überwachung basiert auf der Beobachtung, daß es bei fast vollständigem Versagen des Immunsystems, wie bei der HIV-Infektion, zu keinem vermehrten Tumorstadium kommt, welches nicht unmittelbar auf eine Infektion zurückzuführen ist. Die vermehrt auftreten-

den Lymphome oder Hauttumoren sind virusinduzierte Tumoren, deren Entstehung mit der verminderten Immunfunktion der Patienten einher geht.

Obwohl Tumorzellen spezifische Antigene exprimieren, die sie von anderen Zellen unterscheiden, ist das Immunsystem nicht in der Lage, wirkungsvoll auf diese Veränderungen zu reagieren. Einer der Gründe ist die geringe Immunität, d. h. das Fehlen und/ oder die ungenügende Expression von MHC-1 Rezeptoren und costimulierenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Weiterhin sind Tumorzellen befähigt, gegen sie gerichtete Antikörper durch Endozytose aufzunehmen und anschließend abzubauen. Eine dritte Möglichkeit der Immunreaktion zu entgehen, ist die Expression von immunsupprimierenden Zytokinen wie dem transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) [33].

Es steht außer Frage, daß schweres, chirurgisches Trauma eine deutliche Einschränkung der Immunfunktionen hervorruft. Das diese Immunsuppression für das vermehrte, postoperative Auftreten maligner Metastasen verantwortlich ist, konnte bisher allerdings nicht bestätigt werden.

5.2.2 Stimulation des spezialisierten Immunsystems durch Tumorzellvakzine

Verglichen mit den unbehandelten Versuchstieren (OP-Gruppe) bewirkte die Injektion lysierter Tumorzellen eine signifikant geringere Anzahl pulmonaler Metastasen. Die Kombination aus lysierten Tumorzellen und Monophosphoryl Lipid A hatte den deutlichsten Einfluß auf das Tumorstadium. Die Tiere der MPL-A + LTZ Gruppe entwickelten, im Vergleich zu allen anderen laparotomierten Versuchstieren (OP-Gruppe, LTZ- Gruppe, MPL-A-Gruppe) signifikant weniger Lungenmetastasen. 70% der Tiere dieser Gruppe zeigten keinerlei malignes Wachstum. Im Gegensatz dazu entwickelten 100% der unbehandelten, laparotomierten Versuchstiere (OP-Gruppe) pulmonale Metastasen. Die perioperativ induzierte, spezifische Immunantwort gegen hämatogen, zirkulierende, maligne Zellen basiert auf zellulären und humoralen Mechanismen.

5.2.3 Prinzip der Induktion einer spezifischen Immunreaktion – Die zelluläre Immunantwort

Immunreaktionen können durch die Art der verabreichten Antigene beeinflusst werden. Eine zelluläre Immunantwort kann nur durch Protein-Antigene induziert werden [46]. Die Induktion einer humoralen Immunreaktion ist durch Kontakt der B-Zellen mit Nukleinsäuren, Proteinen, Polysacchariden, Lipiden und anderen Substanzen möglich. Das Immunsystem ist dann voll aktiviert, wenn zelluläre und humorale Reaktionen ausgelöst werden. Um diese effizienteste Reaktion zu induzieren, wurden den Versuchstieren lysierte Tumorzellen, d.h. Protein-Antigene und Nicht-Protein-Antigene, verabreicht.

Im Folgenden werden die Standard-Immunreaktionen, welche durch die Tumorstimmung induziert werden, kurz erläutert [46]. Nach intraperitonealer Injektion der ly-

sierten Tumorzellen werden die Zelltrümmer durch Makrophagen phagozytiert. Peritoneale Makrophagen und dendritische Zellen gehören zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen, d. h. sie können körperfremde oder veränderte Proteine erkennen und in Kombination mit MHC-Molekülen und costimulierenden Faktoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Tumorspezifische Proteine, welche von Makrophagen auf MHC-I Molekülen exprimiert werden, aktivieren naive $CD-8^+$ T-Zellen, die sich anschließend in zytotoxische $CD-8^+$ Killerzellen umwandeln. Treffen diese zytotoxischen $CD-8^+$ T-Zellen auf vitale, maligne Zellen, lysieren sie diese durch Ausschütten von Zytotoxinen. Voraussetzung ist die Expression von MHC-I Oberflächenrezeptoren mit dem entsprechenden Antigen durch die Tumorzelle. Ohne dieses Signal kann die Killerzelle die maligne Zelle nicht identifizieren [46].

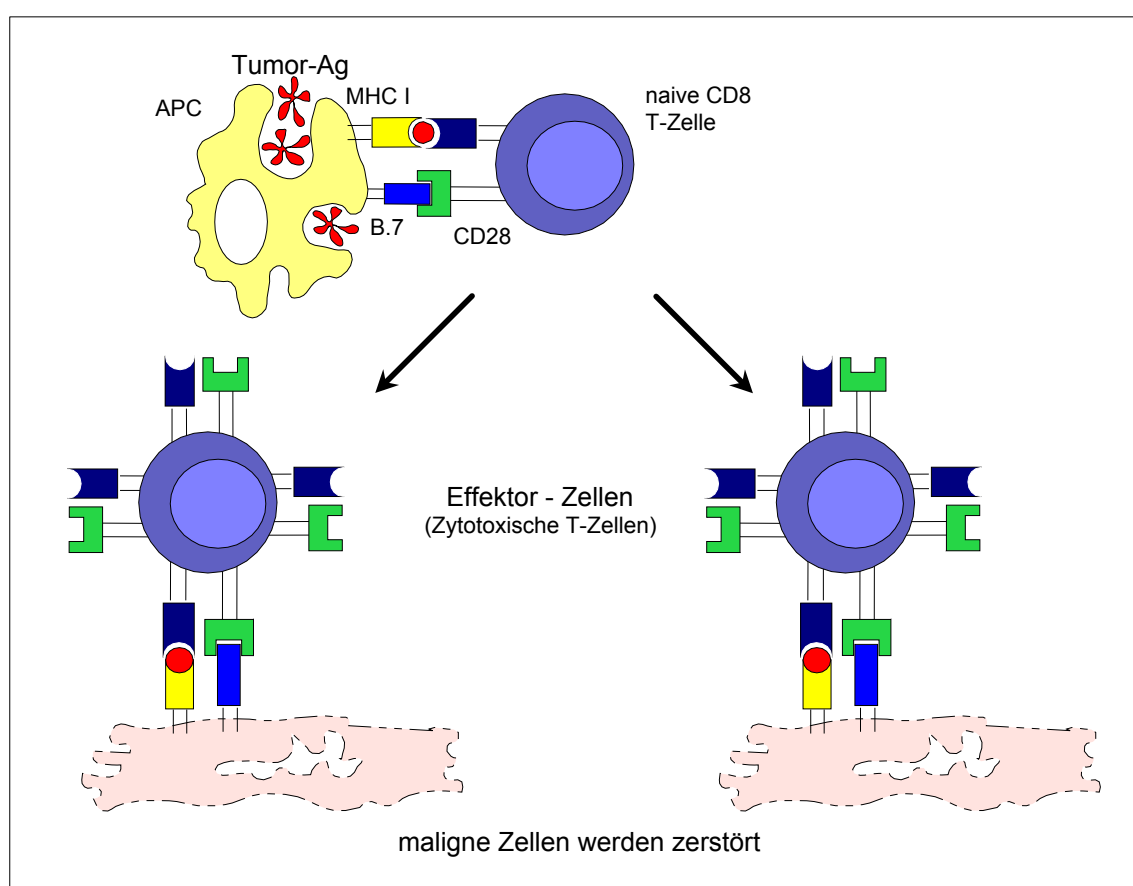


Abb. 18: Naive $CD8$ T-Zellen werden durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) aktiviert, differenzieren sich in zytotoxische T-Zellen und zerstören die malignen Zellen

Eine zweite Möglichkeit der Aktivierung zellulärer Immunreaktionen besteht in der $CD-4^+$ T-Zell vermittelten Stimulation naiver $CD-8^+$ T-Zellen. Hierbei müssen sowohl die $CD-4^+$ T-Zelle als auch die naive $CD-8^+$ T-Zelle Antigene auf der Oberfläche derselben antigenpräsentierenden Zelle erkennen. Die $CD-4^+$ T-Zelle kann die antigenpräsentierende Zelle dazu aktivieren, stärker costimulierende Aktivität zu entwickeln, wodurch die naive $CD-8^+$ T-Zelle leichter aktiviert wird. Weiterhin kann die $CD-4^+$ T-Zelle durch Sekretion von Interleukin-2 die naive $CD-8^+$ T-Zelle zur Proliferation und

Differenzierung anregen. $CD4^+$ T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der zellulären und der humoralen Immunität. Die Präsentation von Tumorantigenen in Kombination mit MHC-II Molekülen durch Makrophagen und dendritische Zellen führt nach Kontakt mit naiven $CD4^+$ T-Zellen zur Stimulation und Differenzierung in zwei funktionelle Klassen: T_H1 -Zellen oder T_H2 -Zellen (T-Helferzellen). Wie die Differenzierung der naiven $CD4^+$ T-Zellen gesteuert wird, ist weitestgehend unbekannt. Sie kann durch das Zytokin-Profil beeinflusst werden, daß während der ersten proliferativen Phase der T-Zell-Aktivierung zugegen ist. T_H1 -Zellen aktivieren unter anderem Makrophagen und naive $CD8^+$ T-Zellen, d.h. zelluläre Immunreaktionen werden initiiert. Dominiert die Klasse der T_H2 -Zellen oder T-Helferzellen, wird die Antikörperproduktion, also die humorale Immunantwort aktiviert [93].

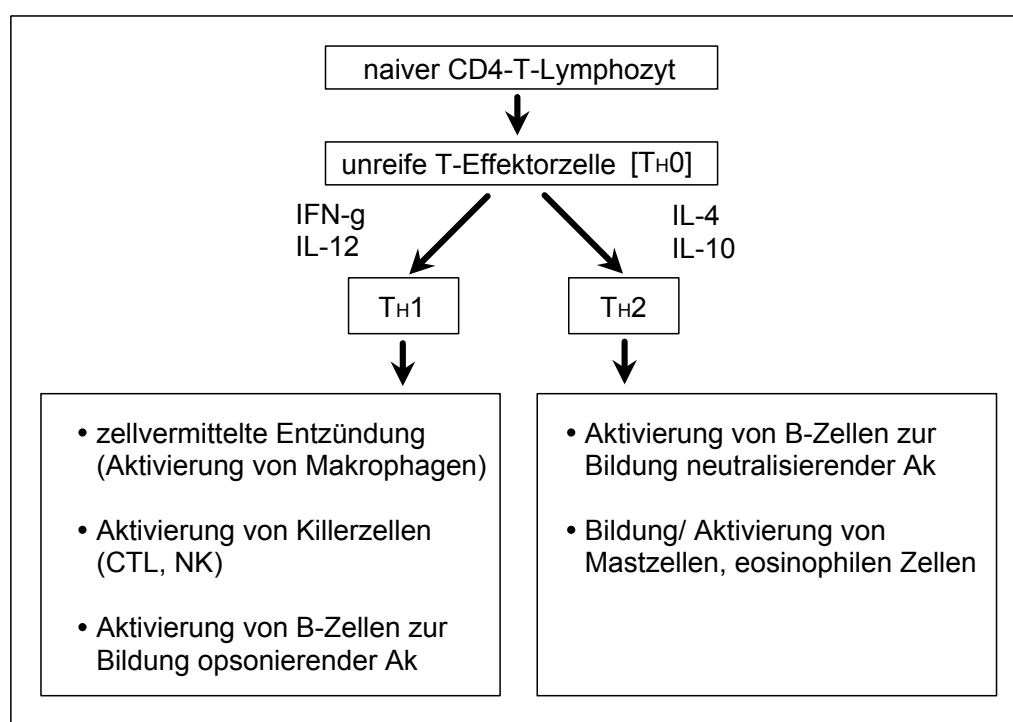


Abb. 19: Aktivierungsstadien der $CD4$ -T-Zellen

5.2.4 Die humorale Immunantwort

B- Lymphozyten phagozytieren Antigene und präsentieren diese in Kombination mit MHC-II Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. Diese MHC-Klasse-II-Komplexe werden von antigen-spezifischen, bewaffneten T- Helferzellen (T_H2 -Zellen) erkannt, worauf sich die B- Lymphozyten in antikörperproduzierende Plasmazellen und B-Gedächtniszellen umwandeln. B- Gedächtniszellen sind in der Lage, nach Zweitkontakt mit dem Antigen sofort spezifische Antikörper zu bilden. Für eine Langzeitaktivierung des Immunsystems ist deshalb die Aktivierung der humoralen Immunreaktion von außerordentlich großer Bedeutung. Die Hauptfunktionen der Antikörper sind Antigen-Neutralisierung, Opsonierung und Komplementaktivierung. Die Opsonierung der antigentragenden Zellen durch Antikörper bewirkt die Aktivierung von Makropha-

gen und führt somit zum verstärkten Abbau der Tumorzellen. Zusätzlich können antikörperbehaftete Tumorzellen von natürlichen Killerzellen erkannt werden, welche nach Kontakt die Zerstörung der malignen Zellen initiieren. Das stimulierte Komplementsystem führt ebenfalls zur Opsonierung der Tumorzellen und kann durch Generieren membranangreifender Komplexe die Lyse der malignen Zellen verursachen [94].

Bakterielle Polysaccharide, Proteine und Lipopolysaccharide können naive B-Lymphozyten auch ohne T-Zell-Hilfe stimulieren. Diese thymusunabhängigen Antigene (TI-Antigene) können B-Zellen durch verschiedene Mechanismen aktivieren und lassen sich so in zwei Klassen unterteilen. Die Antigene der ersten Klasse (TI-1-Antigene) besitzen die Eigenschaft, die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen direkt anzuregen. Diese polyklonale Aktivierung mit anschließender Antikörperproduktion beginnt im Gegensatz zur T-Zell-abhängigen Stimulation sehr früh. Allerdings können TI-1-Antigene weder einen Isotypenwechsel der Antikörper noch die Bildung von B-Gedächtniszellen effizient induzieren [94].

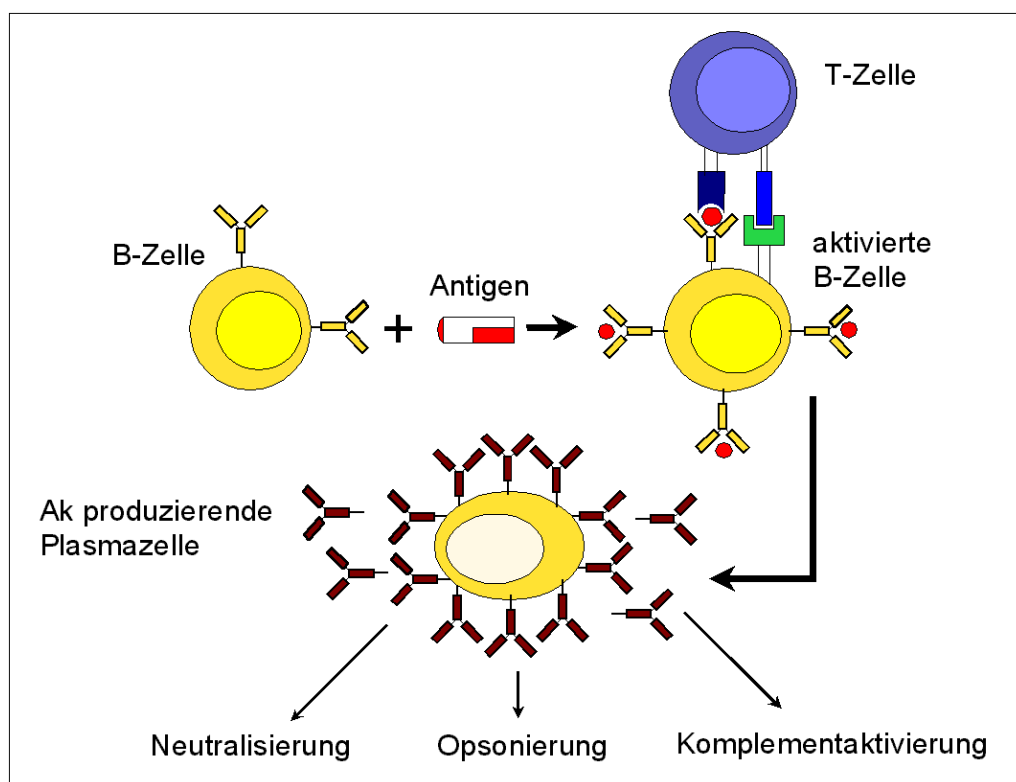


Abb. 20: Aktivierung der B-Zellen

Die zweite Gruppe von thymusunabhängigen Antigenen (TI-2-Antigene) besteht hauptsächlich aus Zellwandpolysacchariden gramnegativer Bakterien. An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, daß Monophosphoryl Lipid A ein Lipopolysaccharid-Derivat ist, d. h. der adjuvante Effekt von MPL-A könnte auch auf TI-2-Antigen ähnlichen Wirkmechanismen basieren. Die Vernetzung von Zelloberflächenimmunglobulinen der reifen B-Lymphozyten durch TI-2-Antigene bewirkt eine frühe und effektive Anti-

körperproduktion gegen Nichtproteinantigene. Das Sezernieren dieser Antikörper kann durch Kontakt mit T-Helferzellen gesteigert werden. Diese Interaktion kann zusätzlich einen Isotypwechsel der Antikörper hervorrufen mit der Folge einer spezifischeren Immunität [94].

Im Tiermodell kann die Aktivierung des Immunsystems nach intraperitonealer Injektion lysierter, allogener Tumorzellen, bei anschließender Applikation vitaler, maligner Zellen zu einem deutlich eingeschränkten Tumorwachstum führen. Dieses Phänomen ist seit vielen Jahrzehnten bekannt und leider nur von geringer klinischer Relevanz. Der Grund dafür ist die hohe Immugenität synergetischer Zelllinien, die sich im Gegensatz zu autogenen Tumorzellen genetisch vom Versuchstier unterscheiden. Trotzdem ist es außerordentlich beeindruckend, daß die Stimulation eines körpereigenen Systems die massive Vernichtung hochaggressiver Tumorzellen bewirken kann. Dies geschieht durch ein Zusammenspiel zellulärer und humoraler Immunreaktionen, wobei die Bedeutung der einzelnen Reaktionen am Gesamtprozeß nicht sicher angegeben werden kann. Sollte es gelingen, das Immunsystem gegen maligne Zellen wirkungsvoll zu aktivieren, stünde eine neue, äußerst aussichtsreiche Therapieform maligner Erkrankungen zur Verfügung.

6 Zusammenfassung

Die Beobachtung des vermehrten Auftretens maligner Metastasen nach Resektion des Primärtumors wurde durch zahlreiche tierexperimentelle Studien bestätigt [95]. Von den aufgestellten Hypothesen, welche den zugrundeliegenden Mechanismus erklären sollen, hat sich die Theorie Judah Folkmans' durchgesetzt. Diese beschreibt eine Hemmung der Neoangiogenese sekundärer Tumore durch anti-angiogenetische Proteine, welche vom Primärtumor systemisch freigesetzt werden. Nach Exzision des Primärtumors fällt dieser inhibierende Einfluß weg, die Metastasen werden an das Blutgefäßsystem angebunden und können ungehindert wachsen [96, 97]. Zusätzlich zu dieser stimulierenden Wirkung wird die Pathogenese sekundärer Tumore durch eine Vielzahl anderer Faktoren beeinflusst. Dabei ist umstritten, welches Maß jedem dieser Einflüsse zukommt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen unterschiedlicher chirurgischer Traumata auf die Entwicklung pulmonaler Metastasen untersucht. Das Etablieren eines Pneumoperitoneums stellte dabei das geringe chirurgische Trauma dar. Die Durchführung einer Laparotomie vom Xiphoid bis in die Regio pubica war stellvertretend für ein schweres chirurgisches Trauma. Den Versuchstieren wurden im direkten Anschluß an die chirurgischen Eingriffe Tumorzellen intravenös injiziert und die resultierende Entstehung pulmonaler Metastasen beurteilt. Mit dem verwendeten Tiermodell wurde bewußt auf einen Primärtumor und dessen wachstumsregulierenden Einfluß auf die Metastasen verzichtet, um die Wirkung des chirurgischen Traumas auf das Tumorwachstum besser beurteilen zu können. Es konnte gezeigt werden, daß eine Laparotomie die Entwicklung hämatogener, pulmonaler Metastasen deutlich verstärkt. Das Etablieren eines Pneumoperitoneums hatte keinen Einfluß auf das Tumorwachstum. Die anfangs aufgestellte Hypothese, daß schweres chirurgisches Trauma bei hämatogen zirkulierenden Tumorzellen die Entwicklung pulmonaler Metastasen begünstigt, gilt somit als vorerst bestätigt. Ob diese Ergebnisse klinisch verifiziert werden können, bleibt abzuwarten. Die diesbezüglich angelegten klinischen Studien werden erst in den kommenden Jahren sichere onkologische Langzeitergebnisse liefern.

Durch Induktion einer spezifischen Immunreaktion gegen die intravenös injizierten, vitalen Tumorzellen konnte die Entwicklung pulmonaler Metastasen deutlich eingeschränkt werden. Die perioperativ verabreichten, lysierten Tumorzellen bewirkten eine signifikant geringere Anzahl sekundärer Tumore. Durch Kombination der lysierten Tumorzellen mit dem Adjuvans Mono-phosphoryl Lipid A konnte das Wachstum der pulmonalen Metastasen weiter signifikant gesenkt werden. Nur 30% der Tiere, welche mit dieser Kombination behandelt wurden, entwickelten sekundäre Tumore. Im Gegensatz dazu wurden bei 100% der unbehandelten Versuchstiere Lungenmetastasen beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, daß verstreute, maligne Zellen durch das aktivierte, spezifische Immunsystem überaus wirkungsvoll bekämpft werden können. Damit gilt auch die zweite Hypothese für dieses Tiermodell als verifiziert.

Die Aktivierung des spezifischen Immunsystems erfolgte durch syngene Tumorantigene, d.h. die perioperativ verabreichten Tumorzellfragmente waren mit dem Versuchstier nicht 100% genetisch identisch. Unter solchen Bedingungen kann das Immunsystem leicht eine wirksame, spezifische Antwort generieren. Die malignen Zellen des Tumorpatienten sind autogene Zellen, die, obwohl sie vom Immunsystem erkannt werden, keine wirkungsvolle Immunreaktion auslösen [33]. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen ist die gentechnische Manipulation der malignen Zellen. So könnten die Tumorzellen zum Beispiel nach Transfektion mit Fremdgenen, welche für costimulierende Rezeptoren kodieren, entsprechende Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren und dadurch eine wirkungsvolle Aktivierung des Immunsystems auslösen. Diese neuen Behandlungsstrategien befinden sich noch weitestgehend im experimentellen Stadium. Neben den ungenügenden Kenntnissen im Bereich der Tumorummunologie gehört auch der enorme Kostenaufwand zu den Gründen, weshalb die Immuntherapie maligner Erkrankungen bisher keinen Durchbruch erzielte. Trotzdem besteht aufgrund der immer wieder gezeigten, überragenden Ergebnisse im Tierexperiment berechnigte Hoffnung, daß in den nächsten Jahrzehnten wirksame Tumorzellvakzine entwickelt und erfolgreich im Rahmen der multimodalen Therapie maligner Erkrankungen angewendet werden können.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Semsroth (1998): Postaggressionsstoffwechsel, Benzer, Buchardi, Intensivmedizin, 7. ed.
- [2] Puchstein (1994): Postaggressionssyndrom, Lawin, Praxis der Intensivbehandlung, 6. ed.
- [3] Hartl, W. H. and Jauch, K. W. (1994): [Post-aggression metabolism: attempt at a status determination], Infusionsther Transfusionsmed (vol. 21), No. 1, pp. 30-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8173310
- [4] Altemeyer, Schmitz, Seeling, Ahnefeld (1986): Der posttraumatische Stoffwechsel als Grundlage einer sinnvollen Ernährungstherapie, Eckart, Anästhesie, Intensivmedizin, Ernährung (vol. 57).
- [5] Schmidt, Thews (1990): Physiologie des Menschen, 24. ed., Springer Verlag.
- [6] Récamier (1829): Recherches sur le traitement du cancer par la compression méthodique simple ou combinée, et sur l'histoire générale de la même maladie, Gabon, Paris
- [7] Trousseau (1865): Phlegmasia alba dolens. Clinique medicale del l'Hotel-Dieu de Paris., London: The New Sydenham Society (vol. 3), pp. 654-656.
- [8] Billroth (1878): Lectures on surgical pathology and therapeutics: a handbook for students and practitioners., Translated from the 8th ed. London: The New Sydenham Society, p. 355.
- [9] Paget (1889): The distribution of secondary growth in cancer of the breast, Lancet (vol. 1), p. 571.
- [10] Schirmacher, V. (1985): Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies, Adv Cancer Res (vol. 43), pp. 1-73. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2581423
- [11] Sugarbaker (1981): Patterns of metastasis in human malignancies, Cancer Biol Rev (vol. 2), pp. 235-278. URL: C:\WINDOWS\Desktop\Library_Peer.enl
- [12] O'Reilly, M. S.; Holmgren, L.; Chen, C. and Folkman, J. (1996): Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice, Nat Med (vol. 2), No. 6, pp. 689-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8640562
- [13] O'Reilly, M. S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W. S.; Flynn, E.; Birkhead, J. R.; Olsen, B. R. and Folkman, J. (1997): Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, Cell (vol. 88), No. 2, pp. 277-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9008168
- [14] Folkman (1997): Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview, aus Regulation for Angiogenesis, Goldberg, Rosen, Birkhäuser Verlag, Basel/ Switzerland.
- [15] Bergers, G.; Javaherian, K.; Lo, K. M.; Folkman, J. and Hanahan, D. (1999): Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice, Science (vol. 284), No. 5415, pp. 808-12. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10221914
- [16] Fidler, I. J. Hart I.R. (1982): Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications.
- [17] Liotta, L. A.; Kleinerman, J. and Saidel, G. M. (1974): Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation, *Cancer Res* (vol. 34), No. 5, pp. 997-1004. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4841969
- [18] Weiss, L. (1987): The hemodynamic destruction of circulating cancer cells, *Bi-orheology* (vol. 24), No. 2, pp. 105-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3651584
- [19] Mosley, J. G.; Sadler, T. E. and Castro, J. E. (1978): Effects of amputation and *Corynebacterium parvum* on tumour metastases in mice, *Br J Cancer* (vol. 37), No. 4, pp. 571-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=646927
- [20] Bishop, C. J.; Sheridan, J. W.; Ablett, G. and Donald, K. J. (1982): The effect of dietary restriction, adrenaline, hydrocortisone and surgery on the rates of death of ¹²⁵IUdR-labelled, intravenously injected tumour cells in the lungs of mice, *Aust J Exp Biol Med Sci* (vol. 60), No. Pt 1, pp. 55-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6807273
- [21] Skolnik, G.; Alpsten, M. and Ivarsson, L. (1980): Studies on mechanisms involved in metastasis formation from circulating tumor cells. Factors influencing tumor cell lodgement during normal and post-traumatic conditions, *J Cancer Res Clin Oncol* (vol. 97), No. 3, pp. 249-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7440626
- [22] Page, G. G.; McDonald, J. S. and Ben-Eliyahu, S. (1998): Pre-operative versus postoperative administration of morphine: impact on the neuroendocrine, behavioural, and metastatic-enhancing effects of surgery, *Br J Anaesth* (vol. 81), No. 2, pp. 216-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9813526
- [23] Fidler, I. J. and Lieber, S. (1972): Quantitative analysis of the mechanism of glucocorticoid enhancement of experimental metastasis, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* (vol. 4), No. 3, pp. 607-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4638595
- [24] Kodama, M. and Kodama, T. (1975): Enhancing effect of hydrocortisone on hematogenous metastasis of Ehrlich ascites tumor in mice, *Cancer Res* (vol. 35), No. 4, pp. 1015-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1116140
- [25] Van Den Brenk, H. A.; Stone, M. G.; Kelly, H. and Sharpington, C. (1976): Lowering of innate resistance of the lungs to the growth of blood-borne cancer cells in states of topical and systemic stress, *Br J Cancer* (vol. 33), No. 1, pp. 60-78. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=175820
- [26] Takekoshi, T.; Sakata, K.; Kunieda, T.; Saji, S.; Tanemura, H. and Yamamoto, S. (1984): Facilitation of tumor metastasis by operative stress and participation of cell-mediated immunity. *Experimental study, Oncology* (vol. 41), No. 4, pp. 245-51. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6235469
- [27] Sellwood, R. A.; Burn, J. J. and Kuper, S. W. (1968): Effect of laparotomy on the fate of circulating Walker tumour cells in Wistar rats, *Br J Surg* (vol. 55), No. 6, pp. 462-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5651547
- [28] Sellwood, R. A.; Burn, J. I. and Kuper, S. W. (1968): Effect of laparotomy on the fate of circulating Landschutz tumour cells in C minus mice, *Br J Surg* (vol. 55), No. 6, pp. 464-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5651548
- [29] Schatten, Kramer (1958): An experimental study of postoperative tumor metastases., *Cancer Biol Rev* (vol. 11), pp. 460-462.
- [30] Hattori, T.; Hamai, Y.; Ikeda, H.; Harada, T. and Ikeda, T. (1978): Enhancing effect of thoracotomy on tumor growth in rats, *Gann* (vol. 69), No. 3, pp. 401-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=276503
- [31] Buinauskas, McDonald, Cole (1958): Resistance to inoculated cancer cells, *Annals of Surgery* (vol. 148), No. 4, pp. 642-648.
- [32] Zoller, M.; Heumann, U.; Betzler, M.; Stimmel, H. and Matzku, S. (1989): Depression of nonadaptive immunity after surgical stress: influence on metastatic spread, *Invasion Metastasis* (vol. 9), No. 1, pp. 46-68. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2703300
- [33] Pezzutto, A. (1998): [Immunotherapy: cytokines and tumor cell vaccines], *Internist (Berl)* (vol. 39), No. 11, pp. 1131-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9859047
- [34] Oettgen, Old (1991): The history of cancer immunotherapy, De Vita, Helman, Rosenberg, *Biologic Therapy of cancer, principles and practice* pp. 87-119, Lippincott, New York.
- [35] Moertel, C. G.; Fleming, T. R.; Macdonald, J. S.; Haller, D. G.; Laurie, J. A.; Goodman, P. J.; Ungerleider, J. S.; Emerson, W. A.; Tormey, D. C.; Glick, J. H. and et al. (1990): Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma, *N Engl J Med* (vol. 322), No. 6, pp. 352-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2300087
- [36] Motzer, R. J.; Bander, N. H. and Nanus, D. M. (1996): Renal-cell carcinoma, *N Engl J Med* (vol. 335), No. 12, pp. 865-75. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8778606
- [37] Janeway, Travers (1997): Die T-Zell-vermittelte Immunität, *Immunologie* (vol. 2) pp. 266-267, Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg/ Berlin/ Oxford.

- [38] Zuck, D. (1978): Dr Nooth and his apparatus. The role of carbon dioxide in medicine in the late eighteenth century, *Br J Anaesth* (vol. 50), No. 4, pp. 393-405. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=350247
- [39] Klein, Sjogren, Klein, Hellstrom (1960): Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host, *Cancer Res* (vol. 20), pp. 1561-1572.
- [40] Bodmer, W. F.; Browning, M. J.; Krausa, P.; Rowan, A.; Bicknell, D. C. and Bodmer, J. G. (1993): Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms, *Ann N Y Acad Sci* (vol. 690), pp. 42-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8368769
- [41] Janeway, Travers (1997): Gezielte Beeinflussung der Immunantwort, *Janeway, Travers, Immunologie* (vol. 2) pp. 521-523, Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg/ Berlin/ Oxford.
- [42] Johnson, A. G.; Tomai, M.; Solem, L.; Beck, L. and Ribj, E. (1987): Characterization of a nontoxic monophosphoryl lipid A, *Rev Infect Dis* (vol. 9 Suppl 5), pp. S512-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3317747
- [43] Alving, C. R. (1993): Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants, *Immunobiology* (vol. 187), No. 3-5, pp. 430-46. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8330907
- [44] Astiz, M. E.; Rackow, E. C.; Kim, Y. B. and Weil, M. H. (1989): Hemodynamic effects of monophosphoryl lipid A compared to endotoxin, *Circ Shock* (vol. 27), No. 3, pp. 193-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2706754
- [45] Astiz, M. E.; Rackow, E. C.; Kim, Y. B. and Weil, M. H. (1991): Monophosphoryl lipid A induces tolerance to the lethal hemodynamic effects of endotoxemia, *Circ Shock* (vol. 33), No. 2, pp. 92-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2049817
- [46] Janeway, Travers (1997): Die T-Zell-vermittelte Immunität, *Immunologie* (vol. 2) pp. 241-284, Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg/ Berlin/ Oxford.
- [47] Moore, A.; McCarthy, L. and Mills, K. H. (1999): The adjuvant combination monophosphoryl lipid A and QS21 switches T cell responses induced with a soluble recombinant HIV protein from Th2 to Th1, *Vaccine* (vol. 17), No. 20-21, pp. 2517-27. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10418898
- [48] Kotani, S.; Takada, H.; Takahashi, I.; Ogawa, T.; Tsujimoto, M.; Shimauchi, H.; Ikeda, T.; Okamura, H.; Tamura, T.; Harada, K. and et al. (1986): Immunobiological activities of synthetic lipid A analogs with low endotoxicity, *Infect Immun* (vol. 54), No. 3, pp. 673-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3781622

- [49] Ravindranath, M. H.; Brazeau, S. M. and Morton, D. L. (1994): Efficacy of tumor cell vaccine after incorporating monophosphoryl lipid A (MPL) in tumor cell membranes containing tumor-associated ganglioside, *Experientia* (vol. 50), No. 7, pp. 648-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8033972
- [50] Hraba, T.; Baker, P. J.; Taylor, C. E.; Fauntleroy, M. B. and Stashak, P. W. (1993): The influence of monophosphoryl lipid A (MPL) on erythrocyte autoantibody formation, *Immunobiology* (vol. 189), No. 5, pp. 448-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8125521
- [51] Friede, M.; Muller, S.; Briand, J. P.; Van Regenmortel, M. H. and Schuber, F. (1993): Induction of immune response against a short synthetic peptide antigen coupled to small neutral liposomes containing monophosphoryl lipid A, *Mol Immunol* (vol. 30), No. 6, pp. 539-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8487776
- [52] Baker, P. J.; Hiernaux, J. R.; Fauntleroy, M. B.; Stashak, P. W.; Prescott, B.; Cantrell, J. L. and Rudbach, J. A. (1988): Ability of monophosphoryl lipid A to augment the antibody response of young mice, *Infect Immun* (vol. 56), No. 12, pp. 3064-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2972626
- [53] Schneerson, R.; Fattom, A.; Szu, S. C.; Bryla, D.; Ulrich, J. T.; Rudbach, J. A.; Schiffman, G. and Robbins, J. B. (1991): Evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant. Enhancement of the serum antibody response in mice to polysaccharide-protein conjugates by concurrent injection with MPL, *J Immunol* (vol. 147), No. 7, pp. 2136-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1918948
- [54] Carozzi, S.; Nasini, M. G.; Schelotto, C.; Caviglia, P. M.; Santoni, O.; Barocci, S.; Cantarella, S.; Versace, F.; Salit, M.; Cantaluppi, A. and et al. (1989): Effect of monophosphoryl lipid A (MPLA) on peritoneal leukocyte function, *Adv Perit Dial* (vol. 5), pp. 143-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2577398
- [55] Baldridge, J. R.; Yorgensen, Y.; Ward, J. R. and Ulrich, J. T. (2000): Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration, *Vaccine* (vol. 18), No. 22, pp. 2416-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10738099
- [56] Cho, C. H.; Lee, B. K.; Kwak, S. M. and Kim, J. D. (1999): Monophosphoryl lipid A (MPL) upregulates major histocompatibility complex (MHC) class I expression by increasing interferon-gamma (IFN-gamma), *Yonsei Med J* (vol. 40), No. 1, pp. 20-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10198602
- [57] Ravindranath, M. H.; Morton, D. L. and Irie, R. F. (1994): Attachment of monophosphoryl lipid A (MPL) to cells and liposomes augments antibody response to membrane-bound gangliosides, *J Autoimmun* (vol. 7), No. 6, pp. 803-16.

URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7888037

- [58] Lange (1999): Minimal invasive Chirurgie, Skript zum Kurs Chirurgie der Humboldt Universität Berlin, Berlin
- [59] Wexler, H. (1966): Accurate identification of experimental pulmonary metastases, *J Natl Cancer Inst* (vol. 36), No. 4, pp. 641-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4160686
- [60] Bancroft, Stevens (1990): *Theory & Practice of Histopathological Technique*, 3. ed., Livingstone, NY.
- [61] Fine, G. (1972): Embolism: pulmonary and systemic, *Cardiovasc Clin* (vol. 4), No. 2, pp. 115-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4565910
- [62] Palmer, Sellick (1953): The prevention of postoperative pulmonary atelektasis, *The Lancet* (vol. Jan. 24), pp. 164-168.
- [63] Becker, Barak, Braun, Meyers (1960): The treatment of postoperative pulmonary atelektasis with intermittent positive pressure breathing, *Surg Gynecol. Obstet* (vol. 111), pp. 517-522.
- [64] Lindberg, P.; Gunnarsson, L.; Tokics, L.; Secher, E.; Lundquist, H.; Brismar, B. and Hedenstierna, G. (1992): Atelectasis and lung function in the postoperative period, *Acta Anaesthesiol Scand* (vol. 36), No. 6, pp. 546-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1514340
- [65] Dureuil, B.; Cantineau, J. P. and Desmonts, J. M. (1987): Effects of upper or lower abdominal surgery on diaphragmatic function, *Br J Anaesth* (vol. 59), No. 10, pp. 1230-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2960367
- [66] Squire, Noveline (1997): *Radiologie Grundlagen der klinischen Diagnostik für Studium und Praxis.*, Schattauer, Stuttgart; New York.
- [67] Ford, G. T.; Whitelaw, W. A.; Rosenal, T. W.; Cruse, P. J. and Guenter, C. A. (1983): Diaphragm function after upper abdominal surgery in humans, *Am Rev Respir Dis* (vol. 127), No. 4, pp. 431-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6838049
- [68] Simonneau, G.; Vivien, A.; Sartene, R.; Kunstlinger, F.; Samii, K.; Noviant, Y. and Duroux, P. (1983): Diaphragm dysfunction induced by upper abdominal surgery. Role of postoperative pain, *Am Rev Respir Dis* (vol. 128), No. 5, pp. 899-903. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6638679
- [69] Schwenk, W.; Bohm, B.; Witt, C.; Junghans, T.; Grundel, K. and Muller, J. M. (1999): Pulmonary function following laparoscopic or conventional colorectal resection: a randomized controlled evaluation, *Arch Surg* (vol. 134), No. 1, pp. 6-12; discussion 13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9927122
- [70] Beecher (1933): Effect of laparotomy on lung volume. Demonstration of a new type of pulmonary collapse., *J Clin Invest* (vol. 12), pp. 651-658.

- [71] Beecher (1933): The measured effect of laparotomy on the respiration, *J Clin Invest* (vol. 12), pp. 639-650.
- [72] Diament, M. L. and Palmer, K. N. (1967): Venous/arterial pulmonary shunting as the principal cause of postoperative hypoxaemia, *Lancet* (vol. 1), No. 7480, pp. 15-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4163736
- [73] Hansen, G.; Drablos, P. A. and Steinert, R. (1977): Pulmonary complications, ventilation and blood gases after upper abdominal surgery, *Acta Anaesthesiol Scand* (vol. 21), No. 3, pp. 211-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17990
- [74] Pierce, A. K. and Robertson, J. (1977): Pulmonary complications of general surgery, *Annu Rev Med* (vol. 28), pp. 211-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=324360
- [75] Schauer, P. R.; Luna, J.; Ghiatas, A. A.; Glen, M. E.; Warren, J. M. and Sirinek, K. R. (1993): Pulmonary function after laparoscopic cholecystectomy, *Surgery* (vol. 114), No. 2, pp. 389-97; discussion 397-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8342140
- [76] Rademaker, B. M.; Ringers, J.; Odoom, J. A.; de Wit, L. T.; Kalkman, C. J. and Oosting, J. (1992): Pulmonary function and stress response after laparoscopic cholecystectomy: comparison with subcostal incision and influence of thoracic epidural analgesia, *Anesth Analg* (vol. 75), No. 3, pp. 381-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1387297
- [77] Erice, F.; Fox, G. S.; Salib, Y. M.; Romano, E.; Meakins, J. L. and Magder, S. A. (1993): Diaphragmatic function before and after laparoscopic cholecystectomy, *Anesthesiology* (vol. 79), No. 5, pp. 966-75; discussion 27A-28A. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8239015
- [78] Benhamou, D.; Simonneau, G.; Poynard, T.; Goldman, M.; Chaput, J. C. and Duroux, P. (1993): Diaphragm function is not impaired by pneumoperitoneum after laparoscopy, *Arch Surg* (vol. 128), No. 4, pp. 430-2. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8457155
- [79] Weiss, L. (1990): Some effects of mechanical trauma on the development of primary cancers and their metastases, *J Forensic Sci* (vol. 35), No. 3, pp. 614-27. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2189944
- [80] Dvorak, H. F.; Senger, D. R. and Dvorak, A. M. (1983): Fibrin as a component of the tumor stroma: origins and biological significance, *Cancer Metastasis Rev* (vol. 2), No. 1, pp. 41-73. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6193869
- [81] Geiger, Binder (1999): Pathologie der Immobilisation, *WMW* (vol. 2), No. 3/4, pp. 33-34.
- [82] Williams, J. J.; Moalli, R.; Calista, C. and Herndon, J. H. (1990): Pulmonary endothelial injury and altered fibrinolysis after femur fracture in rabbits, *J Or-*

- thop Trauma (vol. 4), No. 3, pp. 303-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2172494
- [83] Ygge, J. (1970): Changes in blood coagulation and fibrinolysis during the postoperative period, *Am J Surg* (vol. 119), No. 3, pp. 225-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5443923
- [84] Yan, S. F.; Mackman, N.; Kiesel, W.; Stern, D. M. and Pinsky, D. J. (1999): Hypoxia/Hypoxemia-Induced activation of the procoagulant pathways and the pathogenesis of ischemia-associated thrombosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (vol. 19), No. 9, pp. 2029-35. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10479642
- [85] Keele, Neil (1961): *Samson Wright's Applied Physiology*, Oxford University Press, London.
- [86] Markus, G. (1984): The role of hemostasis and fibrinolysis in the metastatic spread of cancer, *Semin Thromb Hemost* (vol. 10), No. 1, pp. 61-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6538342
- [87] Ivarsson, L. (1976): Pulmonary metastasis formation after trauma, *Acta Chir Scand Suppl* (vol. 463), pp. 1-46. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1068612
- [88] Lione, A. and Bosmann, H. B. (1978): The inhibitory effect of heparin and warfarin treatments on the intravascular survival of B16 melanoma cells in syngeneic C57 mice, *Cell Biol Int Rep* (vol. 2), No. 1, pp. 81-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=630615
- [89] Nguyen, N. T.; Luketich, J. D.; Shurin, M. R.; Schatz, S.; Tran, Q.; Ravid, J. and Schauer, P. R. (1998): Coagulation modifications after laparoscopic and open cholecystectomy in a swine model, *Surg Endosc* (vol. 12), No. 7, pp. 973-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9632873
- [90] Ebnet, K.; Kaldjian, E. P.; Anderson, A. O. and Shaw, S. (1996): Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions, *Annu Rev Immunol* (vol. 14), pp. 155-77. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8717511
- [91] Maehara, M.; Yagita, M.; Isobe, Y.; Hoshino, T. and Nakagawara, G. (1993): Dimethyl sulfoxide (DMSO) increases expression of sialyl Lewis x antigen and enhances adhesion of human gastric carcinoma (NUGC4) cells to activated endothelial cells, *Int J Cancer* (vol. 54), No. 2, pp. 296-301. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7683631
- [92] Murthy, M. S.; Reid, S. E., Jr.; Yang, X. F. and Scanlon, E. P. (1996): The potential role of integrin receptor subunits in the formation of local recurrence and distant metastasis by mouse breast cancer cells, *J Surg Oncol* (vol. 63), No. 2, pp. 77-86. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8888798

- [93] Volk (1998): Vorlesungsskript Immunologie, Berlin, Medizinische Fakultät Charité
Institut für Medizinische Immunologie
Schumannstr. 20/21, 10117 Berlin.
- [94] Janeway, Travers (1997): Die humorale Immunantwort, Immunologie (vol. 2) pp. 285-337, Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg/ Berlin/ Oxford.
- [95] Sugarbaker, Weingrad, Roseman (1982): Observations on cancer metastasis in man, Liotta, Hart, Tumor invasion and metastasis pp. 425-465, Nijhoff, The Hague.
- [96] Folkman, J. (1992): The role of angiogenesis in tumor growth, Semin Cancer Biol (vol. 3), No. 2, pp. 65-71. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&doctype=Citation&list_uids=1378311
- [97] Gutman, M. and Fidler, I. J. (1995): Biology of human colon cancer metastasis, World J Surg (vol. 19), No. 2, pp. 226-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&doctype=Citation&list_uids=7754628

Anhang

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch Förderung und Zusammenarbeit mehrerer Institute und deren Mitarbeiter möglich. Ich danke Herrn Professor Richard L. Whelan und Herrn Professor David M. Stern von der Columbia Universität New York für ihr Vertrauen in meine Arbeit und den freundlichen Umgang. Ich danke Herrn Privatdozent Dr. Christoph Jacobi für die geduldige Unterstützung meiner Ideen und die Begeisterung für wissenschaftliche Arbeit. Ferner danke ich Herrn Baudisch, Frau Karsten, Herrn Lesener und Frau Siebert aus dem Rechenzentrum und der Abteilung für Medizinische Statistik der Humboldt-Universität zu Berlin für die ausführlichen Erklärungen statistischer Verfahrensweisen. Ich danke meinem Freund Horst Schuster für die Hilfe bei der Gestaltung der Grafiken.

Berlin, im Herbst 2001

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation zum Thema: "Einfluß des operativen Traumas auf die Entwicklung pulmonaler Metastasen bei hämatogen zirkulierenden Tumorzellen – Prävention und Immuntherapie" von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, im Winter 2002