

Aus der Klinik für Nuklearmedizin der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar

Bestimmung der Thrombozytenlebenszeit und des Thrombozytenabbauortes nach Kryotherapie der Leber

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

von

Jens Czyborra-Brinkmann

Geboren am 06.06.1971 in Kirchhellen

2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1. Lebertumore	3
1.2. Kryotherapie von Lebertumoren	3
1.3. Nebenwirkungen der Kryotherapie	4
1.4. Mögliche Ursachen einer Thrombozytopenie	4
1.5. Thrombozyten-Markierung	4
1.6. Selektive Vaskuläre Okklusion	5
1.7. Gabe von Aprotinin	5
1.8. Kryotherapie-Schema	6
1.9. Zielsetzung der Arbeit	6
2. Material und Methoden	7
2.1. Materialien	7
2.1.1. Geräte	7
2.1.2. Medikamente	8
2.1.3. Verbrauchsmaterialien	9
2.2. Methoden	10
2.2.1. Vorbemerkung	10
2.2.2. Versuchstiere	10
2.2.3. Anästhesie	10
2.2.4. Operation	11
2.2.5. Kryotherapie	12
2.2.6. Euthanasie	14
2.2.7. Versuchstiergruppen	14
2.2.8. Aprotinin	17
2.2.9. Selektive Einstrom-Okklusion (Pringle-Manöver)	17
2.2.10. Blutentnahme	17
2.2.11. Thrombozytenmarkierung	18
2.2.11.1. Vorbereitung	18
2.2.11.2. Radioaktive Markierung	18
2.2.11.3. Waschen der Thrombozyten	18
2.2.11.4. Resuspension	19
2.2.11.5. Markierungsausbeute	19
2.2.11.6. Applikation der markierten Thrombozyten	19
2.2.11.7. Radiopharmazeutikum ¹¹¹ Indium-Oxinat	20
2.2.12. Szintigraphie	20
2.2.12.1. Ganzkörper-Szintigraphie	20
2.2.12.2. Leber-Milz SPECT	20
2.2.13. Bildauswertung	21
2.2.14. Blutentnahmen	23
2.2.15. Auswertung der Blutentnahmen	23
2.2.16. Statistische Auswertung	23

3. Ergebnisse	24
3.1. Klinische Beobachtungen	24
3.2. Untersuchung der Thrombozytenlebenszeit	24
3.2.1. Normal-Kollektiv	24
3.2.2. Repetitive Freezing (RF)	25
3.2.3. Holding (HF)	25
3.2.4. Holding und Gabe von Aprotinin (AF)	25
3.2.5. Holding und Selektive Einstrom-Okklusion (PF)	26
3.3. Bildauswertung	26
3.3.1. Gruppe 1 Normalkollektiv	26
3.3.2. Gruppe 2 Repetitive Freezing (RF)	28
3.3.3. Gruppe 3 Holding Freezing (HF)	29
3.3.4. Gruppe 4 Holding Freezing + Aprotinin (AF)	29
3.3.5. Gruppe 5 Holding Freezing + Pringle (PF)	29
3.4. Statistische Daten	30
3.4.1. Statistisch signifikante Unterschiede	30
3.4.2. Statistisch nicht signifikante Unterschiede	31
3.4.3. Statistische Untersuchungen	31
4. Diskussion	35
4.1. Vorbemerkung	35
4.2. Thrombozytenlebenszeit	35
4.2.1. Normale Thrombozytenlebenszeit	35
4.2.2. Verkürzte Thrombozytenlebenszeit nach Kryotherapie	35
4.3. Organ-Aktivitäten	36
4.3.1. Aktivität in Leber und Milz	36
4.3.2. Aktivitäten in den Kryoläsionen	36
5. Zusammenfassung	38
6. Abkürzungsverzeichnis	40
7. Literaturverzeichnis	41
8. Lebenslauf	46
9. Danksagung	48

1. Einleitung

1.1. Lebertumore

Primäre und sekundäre Lebermalignome sind die häufigsten Tumoren in den westlichen Industrienationen. Lebermetastasen kommen etwa 30-mal häufiger vor als Hepatozelluläre Karzinome.

Die häufigste Tumorentität bei Nichtrauchern ist das kolorektale Karzinom. Dabei finden sich bei 80% der Patienten, die an dieser Krankheit versterben, Lebermetastasen. Zudem ist bei 20% dieser Patienten die Leber der einzige Ort einer Metastasierung [1,2].

Da eine Resektion der Metastasen mit einer deutlichen Verlängerung der Lebenserwartung einhergeht, ist die chirurgische Resektion der Gold-Standard zur Behandlung von Lebermetastasen [2, 15, 18, 67, 68, 72]. Sie führt zu einer 5-Jahres-Überlebensrate von 30% [26, 56]. Dieses Vorgehen ist jedoch nur in 20 bis 25% der Fälle möglich [26].

Gründe, die eine chirurgische Resektion verhindern, sind die Anzahl der Lebermetastasen (mehr als 5), die Größe der Läsionen (Durchmesser über 5 cm), Befall beider Leberlappen, Nähe zu großen Gefäßstrukturen, schlechter Allgemeinzustand des Patienten sowie nicht ausreichende funktionelle Leberreserven nach Resektion [2, 55, 63, 49].

Chemotherapie und Strahlentherapie sind zur Behandlung im Allgemeinen ineffektiv [70]. Der natürliche Verlauf der Erkrankung hat eine sehr schlechte Prognose mit Überlebenszeiten von im Mittel 13 Monaten (zwischen 3 und 57 Monaten) [6, 31].

Zur Behandlung nicht resezierbarer Lebertumore gibt es verschiedene Alternativen: Lebertransplantation (für kleine hepatozelluläre Karzinome und Zirrhose) [40], systemische und regionale Chemotherapie [10, 44], Chemo-Embolisation [75, 64], Immuntherapie [71, 33], Radiofrequenzablation [76, 23] und Kryotherapie [1, 52, 5].

1.2. Kryotherapie von Lebertumoren

Bei der Kryotherapie wird mit Hilfe von Kälte der Zelltod herbeigeführt. Drei Mechanismen führen dabei additiv zum Zelltod: 1. intrazelluläre Eiskristallbildung mit direkter Zellerstörung, 2. Koagulationsnekrose, die über Tage nach der Kryotherapie entsteht, und 3. Apoptose [70].

Zur Kryotherapie wird eine Sonde verwendet, welche von flüssigem Stickstoff mit einer Temperatur von minus 196° Celsius durchspült wird. Die Sonde wird chirurgisch in das zu therapierende Gewebe eingebracht und führt lokal zu einer Kryoläsion.

Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau eines Kryotherapie-Gerätes.

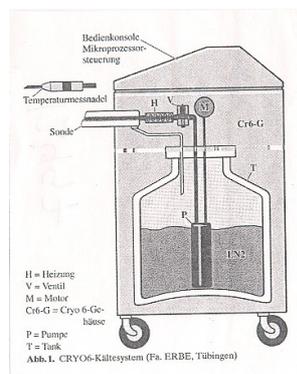


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Kryo-Gerätes

1963 wurde die Kryotherapie von Cooper als neuartige Methode zur Destruktion malignen und benignen Gewebes beschrieben [12]. Dabei wurden unter anderem M. Parkinson, Hypophysen-Tumoren, Mammakarzinome sowie Prostatakarzinome behandelt [16]. Die Möglichkeit des Intraoperativen Ultraschalls (IOUS) zur Überwachung des Frierprozesses wurde 1985 beschrieben [39] und führte zu einer weiteren Ausbreitung der Methode. 1991 veröffentlichten Onik et al. [37] und Ravikumar et al. [45] erste Studien über erfolgreiche interstitielle Kryotherapien bei unresektablen Lebertumoren.

Vorteile der Kryotherapie als lokal ablativer Methode sind Gewebeschonung, Möglichkeit der Behandlung mehrerer Läsionen, Therapie beider Leberlappen, Therapie in der Nähe großer Gefäße, erneute Therapie bei einem Rezidiv sowie die Therapie des Resektionsrandes [32, 17]. Zudem können kryotherapeutisch größere Areale als mit anderen lokal ablativen Verfahren behandelt werden.

Es ergeben sich Überlebensraten nach Kryotherapie der Leber von 81–85 % nach 1 Jahr, 62% nach 2 Jahren, 43–48% nach 3 Jahren und 19–28% nach 5 Jahren [26, 8]. Im Vergleich mit den anderen genannten Verfahren sind die Nebenwirkungsrate und die Komplikationsrate auf gleichem Niveau, gegenüber der Radiofrequenzablation ist die Mortalität jedoch größer [42, 36].

In den letzten Jahren haben klinische Studien die Sicherheit und Effizienz der Kryotherapie gezeigt [26, 53], heute wird sie in mehreren Zentren zur Therapie primärer und sekundärer Lebertumoren und beim Prostatakarzinom [59, 73, 9, 46, 38] eingesetzt. Leider sind Rezidive nach Kryotherapie der Leber häufig [1, 62] und bei Patienten mit Tumoren, die größer als 3 cm im Durchmesser sind, ist das rezidivfreie Intervall signifikant verkürzt [60].

Als Ursache häufiger Rezidive wird eine inadäquate, unvollständige Kryotherapie genannt [47], bei der gerade im Randbereich der Kryoläsion eine unzureichende Zelledestruktion erfolgt. Ein neuer Ansatz ist, die Kryotherapie nach erfolgter Operation ergänzend als Resektionsrand-Kryotherapie durchzuführen [17].

1.3. Nebenwirkungen der Kryotherapie

Die Kryotherapie der Leber wird normalerweise vom Patienten sehr gut vertragen. Da es sich um ein lokales Ablationsverfahren handelt, sind systemische Nebenwirkungen selten, teilweise können sie jedoch lebensbedrohlich sein. Die periinterventionelle Mortalität liegt bei 4,4 % bis 5,6 % [15, 55] und ist vergleichbar dem Risiko bei anderen lokal ablativen Verfahren.

Als Nebenwirkungen der hepatischen Kryotherapie zeigen sich Transaminasenanstieg, Hypothermie, Herzrhythmusstörungen, pleurale Effusion, hepatische Abszesse, Galle-Leckage, Thrombozytopenie sowie das Kryoschock-Phänomen (Multi Organversagen, Disseminierte Intravasale Coagulopathie ohne Zeichen einer Sepsis) [20, 51, 54, 22].

Eine systemische Thrombozytopenie nach Kryotherapie der Leber ist ein häufiges Phänomen. Eine behandlungsbedürftige Thrombozytopenie ist selten, eine ausgeprägte Koagulopathie jedoch gefürchtet. Im Blutbild wird oft ein Abfall der Thrombozytenzahl beobachtet [20, 22, 47]. Dabei wird der Thrombozyten-Nadir am postoperativen Tag 2 oder 3 erreicht [23, 20].

1.4. Mögliche Ursachen einer Thrombozytopenie

Als mögliche Ursache des Thrombozytenabfalls wird eine vermehrte Sequestration von Thrombozyten im Retikulo Endothelialen System (RES) genannt, zudem ist sie abhängig vom

Ausmaß des Leberzellschadens [13]. Außerdem werden bei der Bildung der intrazellulären Eiskristalle sowie beim folgenden Tauen Endothelien auch größerer Gefäße destruiert, so dass hier Thrombozyten aktiviert werden [22]. Zudem wird ein systemischer Effekt der Kryotherapie postuliert, welcher über immunologische Mechanismen und Zytokin-Ausschüttung zur Thrombozytopenie führt [22, 4, 61].

1.5. Thrombozyten-Markierung

In der Nuklearmedizin ist die Markierung von Blutbestandteilen seit langer Zeit bekannt. In der Routine-Diagnostik werden z.B. die Erythrozyten-Markierung zur Bestimmung einer Blutungsquelle oder zur Hirntod-Diagnostik, die Leukozyten-Markierung zur Entzündungsszintigraphie und die Thrombozyten-Markierung zur Bestimmung des Thrombozyten-Abbauortes durchgeführt.

Zur Thrombozyten-Markierung wird dem Patienten Blut entnommen, die Thrombozyten werden isoliert und mit ¹¹¹Indium-Oxinat radioaktiv markiert. Anschließend werden die radioaktiv markierten Thrombozyten dem Patienten re-injiziert. Szintigraphisch kann daraufhin der Abbauort der Thrombozyten mittels Ganzkörper-Szintigraphie bestimmt werden. Mittels Blutentnahmen wird die Thrombozytenlebenszeit bestimmt [65, 41, 50].

1.6. Selektive Vaskuläre Okklusion

Durch eine selektive vaskuläre Okklusion (Pringle-Manöver) mit intraoperativem, temporärem Verschluss der Vena portae sinistra und der Arteria hepatica sinistra kommt es durch den fehlenden Einstrom von Blut ins Leberparenchym zu einer größeren Nekrosezone [69]. Zudem wird eine Verminderung der Thrombozytopenie [51, 28, 47] beschrieben, da weniger Thrombozyten ins Leberparenchym einströmen [34, 43].

1.7. Gabe von Aprotinin

Aprotinin ist ein natürlicher Inhibitor verschiedener Proteasen, wie z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein. Die Inhibition erfolgt durch Bildung reversibler Enzym-Inhibitor-Komplexe [30].

Neben seiner antifibrinolytischen Wirkung vermag Aprotinin die Plättchen-Endothelzell-Interaktion zu vermindern. Dies geschieht durch Reduktion der P-selectin-Expression [24] und durch Verminderung aktivierter Glycoprotein IIb-IIIa-Komplexe [29].

Deshalb kann Aprotinin kryoläsionassoziierte Plättchen-Endothelzell-Interaktionen reduzieren und die lokale Fibrinolyse verhindern oder vermindern. Dies führt zu einer Verhinderung einer Gewebeheilung im Bereich der Kryoläsion durch Verhinderung eines intakten Blutflusses und damit zu einem verminderten Überleben von Tumorzellen sowie zu einer verminderten Aktivierung von Thrombozyten [27].

Von einigen Autoren wird eine Verminderung des Thrombozytenabfalls nach Gabe von Aprotinin beschrieben [27].

1.8. Kryotherapie-Schema

Die Durchführung der Kryotherapie erfolgt nach Durchsicht der Literatur nicht einheitlich. Manche Gruppen führen lediglich einen Frierprozess durch, andere Frieren repetitiv [28, 47, 56,34]. Die dabei erzielten Ergebnisse hinsichtlich einer Thrombozytopenie nach Kryotherapie der Leber werden unterschiedlich beurteilt.

Einige Autoren verweisen darauf, dass ein doppelter Frier-Tau-Prozess einen höheren Anteil an Zelledestruktion induziert als ein einzelner Frier-Tau-Prozess [14] und zu einem gleichmäßigeren Zelltod führt [34]. Zudem wird beschrieben, dass ein mehrfacher Frier-Tau-Prozess (repetitive freezing) zu einem größeren Volumen des Eisballs führt und damit zu einer Zunahme zerstörten Gewebes. Dadurch wird die Effektivität des Frierprozesses insgesamt erhöht [34, 35, 19]. Andere Autoren berichten, dass ein doppelter Frier-Tau-Prozess die Ergebnisse nach Kryotherapie nicht verbessert [25, 69].

1.9. Zielsetzung der Arbeit

1.) Thrombozyten-Abbauort

Durch Thrombozyten-Markierung vor Kryotherapie der Leber sollten an einem Schweine-Modell szintigraphisch die Thrombozytenverteilung sowie der Thrombozyten-Abbauort nach Kryotherapie der Leber bestimmt werden. Zudem wurde die normale Thrombozytenverteilung beim Schwein gezeigt.

2.) Thrombozytenlebenszeit

Die Thrombozytenlebenszeit (TLZ) wurde mittels Blutentnahmen bestimmt [65, 41, 50]. Dabei wurde zwischen verschiedenen Kryotherapie-Gruppen unterschieden. Da für Hausschweine kein Normalwert der Thrombozytenlebenszeit vorlag wurde ein Normalkollektiv untersucht und der Normalwert der Thrombozytenlebenszeit ermittelt.

3.) Bewertung potentieller Maßnahmen zur Verhinderung einer Thrombozytopenie

Der Einfluss einer periinterventionellen Gabe von Aprotinin wurde untersucht. Es wurde verabreicht um eine Thrombozytopenie zu verhindern oder zu vermindern sowie um die Zelledestruktion durch die Kryotherapie zu verstärken.

Um diese Effekte zu bewerten wurde untersucht, ob die Gabe von Aprotinin eine verminderte lokale Thrombozytenakkumulation in der Kryoläsion zur Folge hat.

Zudem wurde die Auswirkung einer selektiven vaskulären Okklusion auf die Thrombozytopenie und den Thrombozyten-Abbauort untersucht.

4.) Einfluss des Kryotherapie-Schemas auf die Thrombozytopenie

Mittels unterschiedlicher Kryotherapie-Schemata sollten Differenzen zwischen einem einfachen und einem doppelten Frier-Tau-Prozess hinsichtlich der Thrombozyten-Deposition und der Thrombozytenlebenszeit dargestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Für die Durchführung der Untersuchungen wurden folgende Geräte und Materialien eingesetzt:

2.1.1. Geräte

Brutschrank

WTB Binder, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Zentrifuge

SORVALL RC-3, General Purpose, Bad Homburg, Deutschland

Probenwechsler

Berthold LB951G, Berthold Technologies GmbH&CoKG, Bad Wildbad, Deutschland

Messplatz

PTW-Curiementor 2, Physikalisch Technische Werkstätten, Freiburg, Deutschland

Mischgerät

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwalbach, Deutschland

Temperatur-Sonden

ERBE Temperatursonden, 200 µm Durchmesser, ERBE, Elektromedizin, Tübingen, Germany

Kryotherapie-Gerät

ERBE Kryo 6, ERBE, Elektromedizin, Tübingen, Germany

Kryosonde

3.2 mm Durchmesser; ERBE Elektromedizin, Tübingen, Germany

Beatmungsgerät

Dräger AVL, Dräger Medical GmbH, Lübeck, Deutschland

Tier-Wärmematratze

Bair Hugger, Arizant Healthcare Inc., Illinois, USA

Infusionspumpe, elektrisch

Infusomat SL, Braun, Melsungen, Deutschland

Monitor

Siemens Sirecust SC7000

Gamma-Kamera

Siemens Multispect II, Siemens, Erlangen, Deutschland

Auswerterechner

Macintosh Power Mac 8100/100, Standard Akquisitions-Protokolle und Auswerte-Software

Drucker
Epson Stylus 850

2.1.2. Medikamente

Azaparon
Stresnil[®], Janssen, Neuss, Deutschland

Methomidate Hydrochlorid
Hypnodil[®], Janssen, Neuss, Deutschland

Etomidate
Hypnomidate[®], Janssen, Neuss, Deutschland

Thiopental Sodium
Trapanal[®], Byk Gulden, Konstanz, Deutschland

ACD-Lösung
Acidum Citricum Dextrose, Dextrose, anhydrous: 25g, trisodium citrate, 2H₂O:
22g, citric acid, H₂O: 8 g; distilled water to: 1 l

Aprotinin
Trasylo[®], Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

Physiologische Kochsalzlösung
NaCl 0,9%, Braun, Melsungen, Deutschland

1000 mg Ampicillin und 500 mg Sulbactam
Unacid[®], Pfizer, Karlsruhe, Deutschland

¹¹¹Indium-Oxinat
Tyco Healthcare GmbH
0,025 mg ¹¹¹Indium 8-hydroxychinolin,
37 MBq/ml, Inhalt 1 ml

Puffer
Tris(hydroxymethyl)aminomethan 24,2 mg in 1 ml Wasser
Mallinckrodt Medical B.V., Petten, Niederlande

Gesättigte Kaliumchlorid-Lösung

Tiernahrung
Standard-Diät, Raiffeisen, Köln, Deutschland

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Rundkopfröhrchen, steril, zur Thrombozytenmarkierung
Nalgene Centrifuge Ware, Rochester, New York, USA

Deckel für Rundkopfröhrchen
Centrifuge Tube Closure, PP; 30mm, Nalgene Centrifuge Ware, Rochester, New York, USA

Rundkopfröhrchen
13 ml, 100 x 16 mm, PS, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Pipetten-Spitzen
1000 µl und 500 µl, No 70.762, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Spritze 20 ml, 10ml, 5ml
Braun, B.Braun, Melsungen, Deutschland

Perfusorspritze
OPS, Original Perfusor Spritze, 50 ml, Braun, B.Braun, Melsungen, Deutschland

Nadel
BD Microlance 3, 22 G, 11/4, Becton, Dickinson S.A., Fraga, Spanien

Heidelberger Verlängerung
75 cm, Braun, B.Braun, Melsungen, Deutschland

Plexiglasständer
Eigenbau, zur Zentrifugation einer Perfusorspritze

Nahtmaterial
PDS 3-0 Faden, PDSTMII 3-0, Nadel SH, Ethicon, Johnson & Johnson Company,
Norderstedt, Deutschland

2. Material und Methoden

2.2. Methoden

2.2.1. Vorbemerkung

Die Tierversuche wurden in Zusammenarbeit mit zwei ärztlichen Kollegen, Dr. O. Kollmar und Dr. S. Richter aus der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes durchgeführt. Diese führten den gesamten operativen Eingriff durch und untersuchten andere Aspekte der Kryotherapie.

Der nuklearmedizinischen Teil der Studie wurde von mir durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse der Studie erfolgte ebenfalls unabhängig von den weiteren chirurgischen Fragestellungen.

Teilaspekte der Studie wurden bereits veröffentlicht [27, 28]. Zudem wurden die Ergebnisse dieser Studie auf dem Kongress 2003 der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin (DGN) und dem Kongress der Mittelrheinischen Gesellschaft für Nuklearmedizin (MRGN) im Rahmen von wissenschaftlichen Vorträgen vorgestellt.

Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und mit Zustimmung der Ethikkommission durchgeführt. Zudem wurde der Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [21] befolgt.

2.2.2. Versuchstiere

Für die gesamte Versuchsreihe wurden 30 Tiere verwendet. Dabei handelte es sich um Schweine beiderlei Geschlechts der Rasse Schwäbisch Hallesches Landschwein. 20 Tiere waren männlichen Geschlechts, 10 Tiere weiblichen Geschlechts. Das mittlere Körpergewicht betrug $24,5 \pm 2,9$ kg. Die Tiere waren gesund.

Die Tiere wurden mit freiem Zugang zu Wasser und einer Standard-Diät (Raiffeisen, Köln, Deutschland) in der Abteilung für Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gehalten. Sie entstammten einem Bio-Bauernhof im Saarland und wurden in große Einzelgehege bei Tageslicht gestellt.

Nach einer Adaptionszeit von 7 Tagen wurde den Tieren 24 Stunden vor den Experimenten das Futter entzogen. Freier Zugang zu Wasser blieb bestehen.

Post-interventionell wurden die Tiere in Einzelgehegen untergebracht und täglich der Allgemeinzustand der Tiere überprüft sowie die Blutentnahmen durchgeführt (siehe unten).

Für die szintigraphischen Untersuchungen wurden die Tiere in die Abteilung für Nuklearmedizin der Universität des Saarlandes transportiert. In der Abteilung für Experimentelle Chirurgie wurde nach Euthanasie der Tiere die Leber zur histologischen Aufarbeitung reseziert.

2.2.3. Anästhesie

Nach intramuskulärer Prämedikation mit 10 mg/kg Körpergewicht (KG) Azaperon (Stresnil[®], Janssen, Neuss, Deutschland) und 10 mg/kg KG Methomidate Hydrochlorid (Hypnodil[®], Janssen, Neuss, Deutschland) wurde eine Allgemeinanästhesie durch intravenöse Injektion von 1 mg/kg KG Etomidate (Hypnomidate[®], Janssen, Neuss, Deutschland) in eine Ohrvene eingeleitet. Die Tiere wurden anschließend intubiert (Beatmungsgerät Dräger AVL,

Lübeck, Deutschland) und mit einer Mischung aus Sauerstoff und Raumluft (FiO_2 von 0,30) mechanisch beatmet.

Eine ausreichende Narkosetiefe wurde während des Experimentes durch intravenöse Gabe von 2 bis 4 mg/kg/h Thiopental Natrium (Trapanal[®], Byk Gulden, Konstanz, Deutschland) über einen zentralen Venenkatheter (ZVK) gewährleistet. Der ZVK wurde in die Vena cava superior mittels perkutaner Punktion im mittleren Jugulum eingebracht.

Die Blutentnahme zur Thrombozytenmarkierung, die Gabe der markierten Thrombozyten sowie die Blutentnahmen zur Bestimmung der Thrombozytenlebenszeit erfolgten über diesen Katheter.

Während des Experiments wurden 10-20 mg/kg/h physiologische Kochsalzlösung infundiert. Der hämodynamische Status sowie Sauerstoff-Sättigung und Körpertemperatur wurden fortlaufend kontrolliert.

Eine prä-operative Einmal-Antibiose wurde mit 1000 mg Ampicillin und 500 mg Sulbactam (Unacid[®], Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt.

2.2.4. Operation

Die Versuchstiere wurden in Rückenlage auf den Operationstisch und eine Wärmevorrichtung (Bair-Hugger, Arizant, Illinois) gelegt, um eine Auskühlung der Tiere während der Operation zu vermeiden.

Die Laparotomie wurde durch eine Mittellinieninzision durchgeführt. Der linke mediale und linke laterale Leberlappen wurden mobilisiert und das Ligamentum hepatoduodenale disseziert. Nacheinander wurden zwei Kryoläsionen mittels Sonden (3.2 mm Durchmesser; ERBE Elektromedizin, Tübingen, Germany) im Parenchym des linken Leberlappens induziert. Die Temperatur wurde in 10 und 20 mm Abstand von der Kryosonde mittels Temperatursonden ((200 µm Durchmesser, ERBE) gemessen. Nach abgeschlossenem zweiten Tauen wurde die Kryosonde entfernt und die Leberkapsel mit PDS 3-0 (PDSTMII 3-0, Nadel SH, Ethicon, Johnson & Johnson Company, Norderstedt, Deutschland) genäht.

Nach Beendigung der Kryotherapie wurde das Abdomen verschlossen, der ZVK wurde subkutan getunnelt und auf den Nacken verlegt, damit die Versuchstiere ihn sich nicht selbst entfernen konnten.

Die Versuchstiere wurden postoperativ in Einzelgehegen mit Wärmelampe überwacht. Nach vollständigem Aufwachen wurden sie in Einzelgehege gebracht und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

Abbildung 2 zeigt das eröffnete Abdomen mit Darstellung des linken Leberlappens vor Kryotherapie.

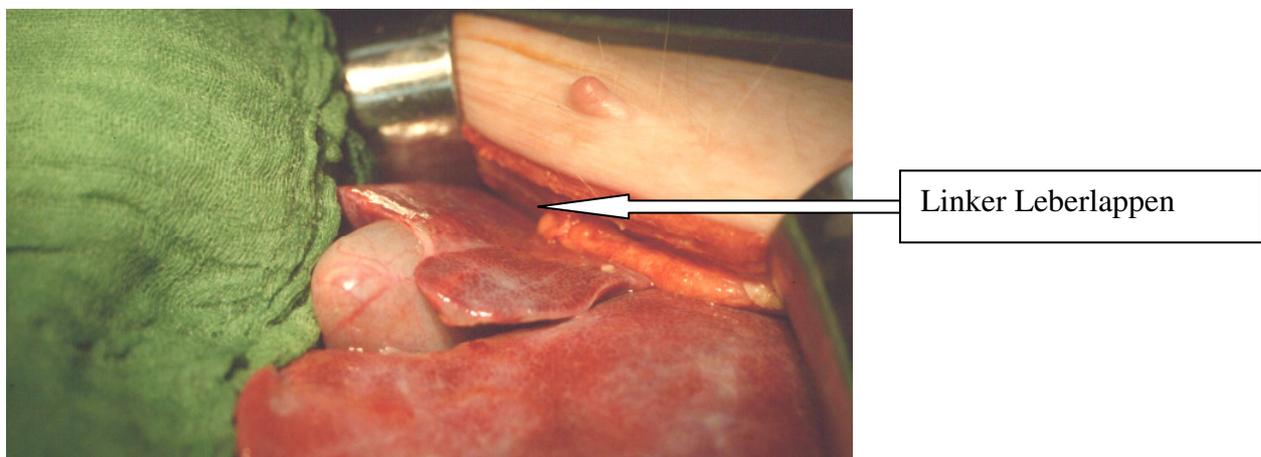
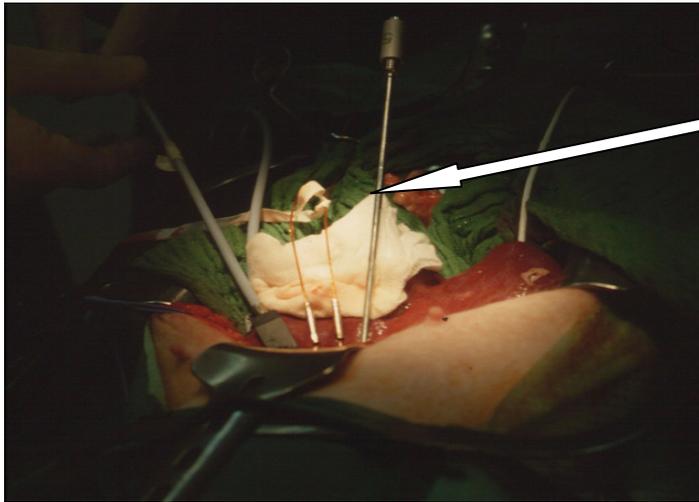


Abbildung 2: Operations-Situs nach Freipräparation der Leber



Kryo-Sonde

Abbildung 4: Operations-Situs mit liegender Kryo-sonde und Temperatursonden

Zur Temperaturkontrolle fand sich an der Spitze der Kryo-sonde eine Temperatursonde. Zwei weitere Temperatursonden (200 µm Durchmesser, ERBE) wurden in 10 und 20 mm Abstand von der Kryo-sonde ins Leberparenchym geschoben. Die Temperatur wurde alle 10 Sekunden gemessen und protokolliert.

Ziel der Kryotherapie war ein möglichst zügiges Erreichen einer Temperatur von -196 °C im Gewebe, um eine intrazelluläre Eiskristallbildung mit Destruktion der Zelle zu erzielen. Dazu konnte die Pumpleistung des Kryosystems in sechs Stufen variiert werden.

Nach Erreichen der Zieltemperatur von -196 °C, gemessen an der Spitze der Kryo-sonde, wurde die Pumpleistung der Maschine gerade soweit reduziert, dass die Zieltemperatur für den gewünschten Zeitraum gehalten werden konnte und das Gewebe sich nicht durch den Zustrom von warmem Blut erwärmte.

Je nach Versuchstiergruppe wurde die Kryotherapie unterschiedlich lange durchgeführt (siehe unten).

Nach Erreichen des gewünschten Zeitintervalls wurde das Kryosystem ausgeschaltet. Die Sonde wurde in der Läsion belassen und das Leberparenchym taute passiv durch den Einstrom von warmem Blut und durch die Umgebungstemperatur auf.

Je nach Therapie-Gruppe (siehe unten) erfolgte anschließend gegebenenfalls bei belassener Kryo-sonde eine erneute Kryotherapie derselben Läsion in gleicher Art. Nach erneutem passiven Tauen bis auf Zimmertemperatur wurde die Kryo-sonde entfernt, die Leberkapsel mit PDS 3-0 Faden (PDSTMII 3-0, Nadel SH, Ethicon, Johnson & Johnson Company, Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

Nach einer Erholungsphase von 15-60 Minuten und intravenöser Verabreichung der radioaktiv markierten Thrombozyten über den Zentralen Venenkatheter (ZVK) wurde die Kryo-sonde nach kleiner oberflächlicher Inzision lateral in den linken Leberlappen eingebracht und eine zweite Kryoläsion in genau gleicher Vorgehensweise wie bei der ersten Kryoläsion induziert.

Nach passivem Tauen bis auf Raumtemperatur wurde die Kryo-sonde entfernt, die Kapsel mit PDS 3-0 Faden genäht und das Abdomen nach Blutstillung verschlossen.

Die Kontrolle über einen erfolgreichen Frierprozess erfolgte bei den ersten vier Versuchstieren mittels intraoperativem Ultraschalls (Siemens, Erlangen, Deutschland). Die Ausbreitung des Eisballs konnte so genau verfolgt werden.

Da sich bei dem zarten Leberparenchym der Versuchstiere der Eisball bis zur Leberkapsel ausdehnte und von außen makroskopisch erkennbar das Leberparenchym gefror [Abb.5], wurde bei den folgenden Versuchstieren auf den intraoperativen Ultraschall verzichtet.

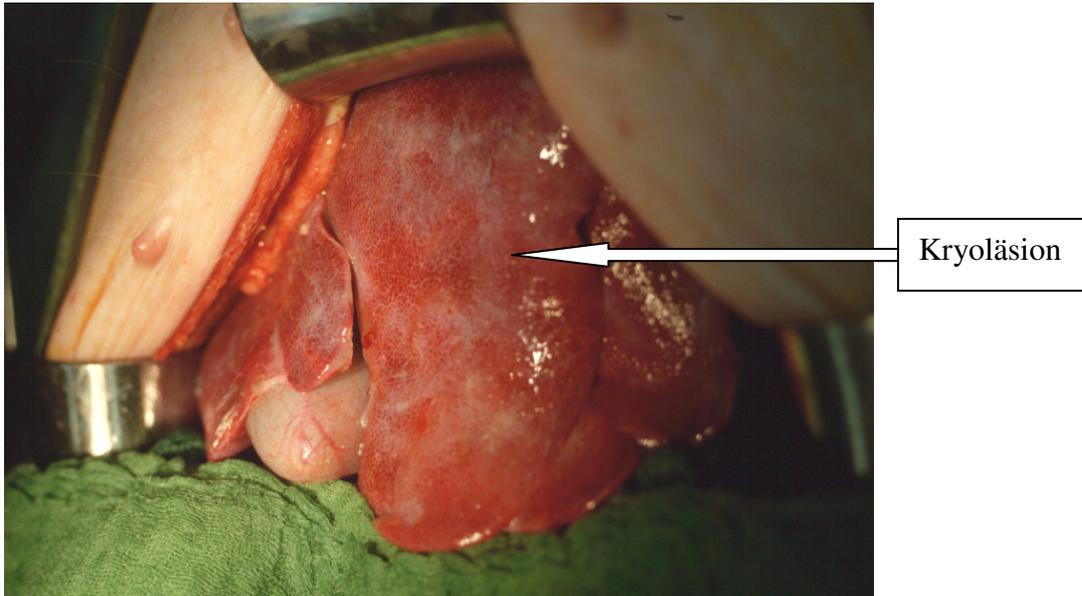


Abbildung 5: Darstellung der Kryoläsion nach passivem Tauen, Kryosonden und Temperatursonden sind entfernt

Zudem zeigten die Temperatur-Sonden in 10 und 20 mm Abstand von der Kryosonde durch einen Temperaturabfall ebenfalls die Ausbreitung des Eisballs an.

2.2.6. Euthanasie

Am siebten postoperativen Tag wurden die Tiere mit Thiopental Natrium (Trapanal[®], Byk Gulden, Konstanz, Deutschland) re-anästhesiert und mit gesättigter Kaliumchlorid Lösung euthanisiert. Dies geschah in der Abteilung für Experimentelle Chirurgie.

2.2.7. Versuchstiergruppen

In der Studie sollten unterschiedliche kryotherapeutische Maßnahmen gegenübergestellt sowie verschiedene Methoden verglichen werden, welche eine Thrombozytopenie verhindern könnten.

Die Auswirkungen auf die Thrombozytenlebenszeit und die Thrombozytenverteilung wurden untersucht.

Da es keine zuverlässigen Daten zur normalen Thrombozytenlebenszeit und Thrombozytenverteilung beim Schwein gab, wurde ein Normal-Kollektiv untersucht. Dazu wurden die Tiere zufällig in Gruppen aufgeteilt. Die Versuchstiere in den Gruppen unterschieden sich nicht in der Verteilung hinsichtlich Alter, Gewicht und Geschlechtsverteilung. Dagegen unterschieden sich die Gruppen hinsichtlich der Dauer der Kryotherapie sowie bezüglich der Gabe von Aprotinin oder dem Durchführen einer selektiven Vaskulären Okklusion (Pringle-Manöver).

Die Zuordnung der Tiere zu den Versuchsgruppen und damit der Modus der Therapie waren mir zum Untersuchungszeitpunkt nicht bekannt.

Tabelle 1 zeigt die Therapiegruppen.

	Kryotherapie	Maßnahmen
Gruppe 1 Normal-Kollektiv (NK)	Keine	
Gruppe 2 Repetitive Freezing (RF)	2 x je 7,5 Minuten Kryotherapie je Kryoläsion	
Gruppe 3 Holding Freezing (HF)	15 Minuten Kryotherapie je Kryoläsion	
Gruppe 4 Aprotinin Freezing (AF)	15 Minuten Kryotherapie je Kryoläsion	Intravenöse Gabe von Aprotinin
Gruppe 5 Pringle Freezing (PF)	15 Minuten Kryotherapie je Kryoläsion	Selektive Einstrom-Okklusion Pringle-Manöver

Tabelle 1: Therapiegruppen

1. Gruppe Normal-Kollektiv (NK)

In dieser Gruppe befanden sich sechs Tiere. Das mittlere Gewicht in dieser Gruppe betrug $26 \text{ kg} \pm 2,6 \text{ kg}$. Drei Tiere waren weiblich, drei männlich.

Sie erhielten eine mediane Laparatomie sowie einen Zentralen Venen Katheter (ZVK). Die Leber wurde nicht freipräpariert, es wurde keine Kryotherapie durchgeführt.

Die radioaktiv markierten Thrombozyten wurden nach der medianen Laparotomie über den ZVK appliziert.

Das sechste Versuchstier wurde am zweiten postoperativen Tag tot aufgefunden, die Todesursache blieb unklar. Aus der statistischen Auswertung wurde dieses Tier herausgenommen.

Die weiteren Versuchstiere überstanden die Therapie gut und wurden am siebten postoperativen Tag euthanisiert.

2. Gruppe Repetitive Freezing (RF)

In dieser Gruppe befanden sich sechs Tiere. Das mittlere Gewicht der Tiere dieser Gruppe betrug $25,8 \text{ kg} \pm 3,6 \text{ kg}$. Fünf Tiere waren männlich, eins war weiblich. Alle Tiere überstanden die Kryotherapie gut und wurden am siebten postoperativen Tag euthanisiert.

Nach medianer Laparatomie wurde je eine Kryoläsion im medialen und lateralen linken Leberlappen mittels Kryotherapie zu je zwei mal 7,5 Minuten gesetzt.

Dabei wurde die erste Kryoläsion vor Gabe der radioaktiv markierten Thrombozyten im medialen linken Leberlappen induziert.

Nach schnellem Frieren bis auf -196 °C für 7,5 Minuten wurde das Gewebe passiv bis auf Raumtemperatur tauen gelassen. Anschließend wurde die gleiche Kryoläsion bei belassener Kryosonde in gleicher Art noch einmal für 7,5 Minuten bis -196 °C gefroren.

Nach der Erholungsphase nach der Kryotherapie und passivem Tauen des Gewebes mit Erreichen der Raumtemperatur wurden die radioaktiv markierten Thrombozyten über den ZVK appliziert.

Anschließend erfolgte die Kryotherapie im lateralen linken Leberlappen in der gleichen Art wie bei der ersten Kryoläsion beschrieben.

3. Gruppe

Holding Freezing (HF)

In dieser Gruppe befanden sich sechs Tiere. Das mittlere Gewicht der Tiere dieser Gruppe betrug $24 \text{ kg} \pm 1,7 \text{ kg}$. Alle sechs Tiere waren männlich.

Nach medianer Laparatomie wurde je eine Kryoläsion im medialen und lateralen linken Leberlappen induziert. In dieser Gruppe wurde pro Kryoläsion 15 Minuten kontinuierlich gefroren. Dazu wurde nach schnellem Frieren bis auf -196 °C auf höchster Leistungsstufe des Kryo-Gerätes ERBE Kryo 6 die Temperatur durch weiteres Frieren auf höchster Leistungsstufe des Gerätes bei -196 °C gehalten.

Ziel sollte das Erreichen eines größeren Eisballs und damit eines größeren Parenchymschadens als in Gruppe 2 sein. Alle Tiere überstehen die Kryotherapie gut und werden am siebten postoperativen Tag euthanisiert. Die Gabe der radioaktiv markierten Thrombozyten erfolgte vor der zweiten Kryotherapie über den ZVK.

4. Gruppe

Holding Freezing + Aprotinin (AF)

In dieser Gruppe befanden sich sechs Tiere. Das mittlere Gewicht der Tiere dieser Gruppe betrug $24,7 \text{ kg} \pm 2,2 \text{ kg}$, drei Tiere sind weiblich, drei männlich.

Da es intraoperativ bei einem Versuchstier bei Fehllage des zentralen Venenkatheters unbemerkt zu einer Parainfusion des Aprotinins (Trasylo[®], Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) in den Thorax kam, wurde das entsprechende Versuchstier aus der Auswertung herausgenommen.

Nach Narkotisierung der Tiere und Intubation, und damit vor Beginn des operativen Eingriffs, wurden 70ml Aprotinin (entspricht 500.000 KIU, Kalicrein Inactivator Units, KIU = 277,8 European Pharmacopoeia Units, E.P. units) als intravenöser Bolus über eine Ohrvene verabreicht. Während der gesamten Operation wurden mittels eines Perfusors (Infusomat SL, Braun, Melsungen) weitere 500.000 KIU Aprotinin verabreicht.

Nach medianer Laparatomie wurde je eine Kryoläsion im medialen und lateralen linken Leberlappen induziert.

Die Gabe der radioaktiv markierten Thrombozyten erfolgte vor der zweiten Kryotherapie über den ZVK.

In dieser Gruppe wurde, wie in Gruppe 3 beschrieben, je Kryoläsion 15 Minuten gefroren. Dabei wurde die Temperatur für 15 Minuten auf höchster Leistungsstufe der Kryo ERBE 6 konstant bei -196 °C an der Spitze der Kryosonde gehalten. Anschließend taute das Gewebe passiv bis auf Raumtemperatur auf. Danach wurde die zweite Kryoläsion auf die gleiche Art induziert.

Alle Tiere überstanden die Kryotherapie gut und wurden am siebten postoperativen Tag euthanisiert.

5. Gruppe

Holding + Selektive Einstrom-Okklusion (PF)

In dieser Gruppe befanden sich sechs Tiere. Das mittlere Gewicht der Tiere dieser Gruppe betrug $24,1 \text{ kg} \pm 2,7 \text{ kg}$. Drei Tiere waren weiblich, drei männlich.

Nach medianer Laparatomie wurde die Leber freipräpariert, das Ligamentum hepato-duodenale wurde mit chirurgischen Klemmen unterbunden und anschließend je eine Kryoläsion im medialen und lateralen linken Leberlappen induziert.

Die Gabe der radioaktiv markierten Thrombozyten erfolgte vor der zweiten Kryotherapie über den ZVK.

In dieser Gruppe wurde wie in Gruppe 3 und 4 pro Kryoläsion 15 Minuten gefroren.

Nach schnellem Frieren bis auf -196 °C wurde die Temperatur des Leberparenchyms bei höchster Leistungsstufe der ERBE Kryo 6 konstant gehalten.

Anschließend taute das Gewebe passiv bis auf Raumtemperatur auf.

Ziel war das Erreichen eines möglichst großen Parenchymschadens durch das Entstehen eines größeren Eisballs als in Gruppe 2. Zudem sollte untersucht werden, ob durch den fehlenden Bluteinstrom in die Leber während der Kryotherapie eine Thrombozytenakkumulation in der Kryoläsion verhindert werden kann. Bei fehlendem Einstrom von warmem Blut dauerte die Erwärmung des Leberparenchyms wesentlich länger als in den anderen Gruppen, durchschnittlich 45-60 Minuten.

Alle Tiere überstanden die Kryotherapie gut und wurden am siebten postoperativen Tag euthanisiert.

2.2.8. Aprotinin

Aprotinin (Trasylol[®]) ist ein natürlicher Inhibitor verschiedener Proteasen, wie z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein. Die Inhibition erfolgt durch Bildung reversibler Enzym-Inhibitor-Komplexe.

Aprotinin wurde eingesetzt zur Verhinderung einer Gewebeheilung im Bereich der Kryoläsion durch Verhinderung eines intakten Blutflusses. Dies sollte zu einem verminderten Überleben von Tumorzellen im Eisball und zu einer besseren Wirksamkeit der Kryotherapie führen.

Die Studie untersuchte, ob die Gabe von Aprotinin eine verminderte lokale Plättchenakkumulation in der Kryoläsion zur Folge hat.

2.2.9. Selektive Einstrom-Okklusion (Pringle-Manöver)

Durch das selektive Unterbinden des Bluteinstroms in die Leber durch vorübergehendes Abklemmen der Vena portae sinistra und der Arteria hepatica sinistra wurde der Heat-Sink-Effekt vermindert. Darunter versteht man ein Erwärmen des Leberparenchyms im Bereich der Kryoläsion durch den Einstrom von warmem Blut.

Durch das Pringle-Manöver wurde dieser Effekt vermindert, die Schädigung des Leberparenchyms wurde größer. Es wurde untersucht, ob sich dadurch auch ein verminderter Thrombozytenabbau in der Leber erreichen lässt.

2.2.10. Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte über den in der Vena cava superior liegenden zentralen Venenkatheter mittels einer Perfusorspritze (50ml Volumen, B. Braun, Melsungen, Deutschland). In der Perfusorspritze befanden sich zur Antikoagulation 7ml ACD-Lösung (Krankenhaus-Apotheke, Universitätskliniken des Saarlandes). Durch vorsichtige und gleichmäßige Blutentnahme über den großlumigen Katheter wurde ein Entnahmeschaden der

Thrombozyten vermieden. Das entnommene Blut wurde vorsichtig in der Perfusorspritze geschwenkt um eine gute Durchmischung mit der ACD-Lösung zu erreichen. Die Thrombozytenmarkierung erfolgte nach wärmeisoliertem Transport in der Abteilung für Nuklearmedizin der Universitätskliniken des Saarlandes.

2.2.11. Thrombozytenmarkierung

2.2.11.1. Vorbereitung

In der Abteilung für Nuklearmedizin wurde zunächst die Perfusorspritze zur Zentrifugation vorbereitet. Der außen überstehende Kolben wurde abgeschnitten, die Perfusorspritze in einem zu diesem Zweck angefertigten Plexiglasständer in die Zentrifuge gestellt. Es erfolgte zunächst eine Zentrifugation mit 800 Umdrehungen pro Minute über 20 Minuten zur Plasmaseparation.

Nach Zentrifugation wurde das Plasma aus der Perfusorspritze über eine großlumige Heidelberger Verlängerung in ein steriles Rundkopfröhrchen gepresst.

Nach Verschluss des Rundkopfröhrchens mit dem passenden Deckel erfolgte eine Zentrifugation des plättchenreichen Plasmas (PRP, platelet rich plasma) mit 1200 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zur Separation der Thrombozyten.

Mit einer sterilen 20ml Spritze und einer großlumigen Nadel wurde anschließend der Überstand vorsichtig abgesaugt. Er entsprach dem plättchenarmen Plasma (PPP, platelet poor plasma). Es wurde zur späteren Verdünnung beiseite gelegt.

Die Plättchen fanden sich in Form eines Pellets am Boden des Rundkopfröhrchens. Durch Zugabe von 6 bis 8 Tropfen ACD-Lösung sowie der gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung (NaCl, 0,9% Lösung) wurde das Plättchen-Pellet durch vorsichtiges Schwenken re-suspendiert.

2.2.11.2 Radioaktive Markierung

Die radioaktive Markierung der Thrombozyten erfolgte durch Zugabe von im Mittel 27,01 MBq ¹¹¹Indium-Oxinat zu den re-suspendierten Thrombozyten. Durch Zugabe von 2ml Tris-Puffer wurde ein physiologischer pH-Wert erreicht.

In einem Wärmeschrank folgte bei 37°Celsius eine Inkubation von 30 Minuten.

2.2.11.3. Waschen der Thrombozyten

Nach Inkubation wurden die markierten Thrombozyten gewaschen und überschüssiges, nicht gebundenes ¹¹¹Indium-Oxinat wurde entfernt.

Dazu wurden 5 ml des plättchenarmen Plasmas (PPP) und 5 ml physiologische Kochsalzlösung zu den re-suspendierten und radioaktiv markierten Thrombozyten gegeben.

Diese Lösung wurde bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend befanden sich die Thrombozyten als Pellet am Boden des Rundkopfröhrchens. Der Überstand wurde mit einer sterilen Nadel und einer sterilen 20ml Spritze vorsichtig abgesaugt, beiseite gelegt und als Waschwasser 1 bezeichnet.

Anschließend wurde das Thrombozyten-Pellet erneut vorsichtig re-suspendiert. Dazu wurden wiederum 6-8 Tropfen ACD-Lösung und die gleiche Menge physiologische Kochsalz-Lösung zu dem Pellet gegeben und das Rundkopfröhrchen vorsichtig geschwenkt.

Anschließend wurden 5 ml des plättchenarmen Plasmas (PPP) und 5 ml physiologische Kochsalz-Lösung hinzugegeben und die Plättchen-Suspension bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert.

Nach Zentrifugation befanden sich die Thrombozyten erneut als Pellet am Boden des Rundkopfröhrchens. Der Überstand wurde wiederum mit einer sterilen Nadel und einer sterilen 20ml Spritze vorsichtig abgesaugt, beiseite gelegt und als Waschwasser 2 bezeichnet.

2.2.11.4. Resuspension

Die gewaschenen und mit ¹¹¹Indium-Oxinat markierten Thrombozyten wurden mit 6-8 Tropfen ACD-Lösung und der gleichen Menge physiologischer Kochsalz-Lösung durch vorsichtiges Schwenken re-suspendiert. Anschließend wurden 5-6 ml des plättchenarmen Plasmas (PPP) hinzugegeben und die Suspension in einer sterilen Spritze aufgezogen. Die Aktivität der Thrombozyten-Suspension sowie beider Waschwasser wurde mit Hilfe eines Aktivimeters (PTW Curiementor 2) gemessen.

Wärmeisoliert und in einem Radionuklid-Koffer erfolgte der Transport der markierten Thrombozyten in die Abteilung für Experimentelle Chirurgie.

2.2.11.5. Markierungsausbeute

Vor Applikation der radioaktiv markierten Thrombozyten wurden Aktivitäten von Waschwasser 1 und 2 sowie der Thrombozyten-Suspension mit Hilfe eines Aktivimeters bestimmt. Die Markierungsausbeute errechnete sich wie folgt:

$$\text{Markierungsausbeute} = \frac{A(\text{Thrombozyten})}{A(\text{Waschwasser 1}) + A(\text{Waschwasser 2}) + A(\text{Thrombozyten})}$$

A = Aktivität in MBq

Der Mittelwert der Markierungsausbeute betrug 68 % mit einer Standardabweichung von 0,15 %.

Der Mittelwert der applizierten Radioaktivität pro Versuchstier betrug 26,64 MBq mit einer Standardabweichung von 8,3 MBq.

Da ¹¹¹Indium nur einmal pro Woche angeliefert wurde und die Tierversuche mittwochs und donnerstags stattfanden, stand für die Versuchsgruppe am Donnerstag weniger Radioaktivität zur Verfügung als für die Versuchsgruppe am Mittwoch. Die Markierungsausbeute ist bei größerer Radioaktivitätsmenge besser. So erklärte sich die hohe Standardabweichung der Markierungsausbeute.

2.2.11.6. Applikation der markierten Thrombozyten

Über den zentralen Venenkatheter wurden die markierten Thrombozyten langsam injiziert. Der zentrale Venekatheter wurde anschließend mit physiologischer Kochsalz-Lösung gespült. Die Applikation der radioaktiv markierten Thrombozyten erfolgte stets nach Induktion der ersten Kryoläsion und mindestens 10 Minuten vor Induktion der zweiten Kryoläsion, um eine regelrechte Verteilung der Thrombozyten im Versuchstier zu erreichen.

2.2.11.7. Radiopharmazeutikum ¹¹¹Indium-Oxinat

Indium ist ein silbrigweißes, Metall der III. Hauptgruppe. Es wurde benannt nach der indigofarbenen Bande im Linienspektrum und wurde 1863 entdeckt.

Die Halbwertszeit von ¹¹¹Indium beträgt 2,8047 Tage, das Zerfallsprodukt ist ¹¹¹Cadmium. Das verwendete Produkt enthielt eine sterile, isotone wässrige Lösung von Indium-Oxin, bestehend aus 50 µg/ml Oxin, 100 µg/ml Polysorbit 80, 6 mg/ml HEPES Puffer und 7,5 mg/ml Natrium Chlorid.

Die Radioaktivitätskonzentration war 37 MBq/ml zum Referenzzeitpunkt. Die Lösung war Trägerfrei, der pH lag zwischen 6,5 und 7,5.

2.2.12. Szintigraphie

Nach Euthanasie der Versuchstiere am siebten postoperativen Tag erfolgte unmittelbar anschließend der Transport der Tiere in die Abteilung für Nuklearmedizin der Universitätskliniken des Saarlandes.

Die Tiere wurden in Rückenlage auf einer Siemens Multispect II Kamera (Siemens, Erlangen, Deutschland) positioniert. Dabei wurden die Vorderbeine nach vorne gestreckt, die Hinterbeine nach hinten, um einen geringeren Abstand der Kamera zum Tier zu erreichen.

2.2.12.1. Ganzkörper-Szintigraphie

Es erfolgte zunächst eine Ganzkörper-Akquisition von ventral und dorsal mit einer 1024x256 Matrix. Der Tisch-Vorschub betrug 5 cm/Minute. Es wurde ein Standard-Untersuchungsprotokoll (whole body acquisition, Siemens, Erlangen, Deutschland), welches für alle Versuchstiere identisch war, verwendet. Die Untersuchung dauerte je Versuchstier zwischen 20 und 30 Minuten, abhängig von der Körpergröße.

2.2.12.2. Leber-Milz SPECT

Anschließend erfolgte eine SPECT-Akquisition (Single Photonen Emission Computed Tomography) der Leber-Milz Region, ebenfalls auf der Siemens Multispect II Kamera. Hierfür wurde eine 64x64 Matrix verwendet, 30 Views, 360 Grad, 60 Sekunden/View, circular camera orbit, step and shoot mode.

Bei der SPECT-Akquisition rotierte die Gamma-Kamera um das Untersuchungsobjekt, um tomographische Schnittbilder der Untersuchungsregion zu erhalten.

Die Abbildung 6 zeigt ein Versuchstier in Rückenlage auf der Siemens Multispect II Gamma-Kamera.



Abbildung 6: Gamma-Kamera Siemens Multispect II, Versuchstier in Rückenlage

Nach erfolgter Ganzkörper-Szintigraphie und SPECT-Akquisition erfolgte der Transport der Tiere in die Abteilung für Experimentelle Chirurgie. Dort erfolgte durch die chirurgischen Kollegen die Entnahme der Leber mit histologischer Untersuchung.

2.2.13. Bildauswertung

Mit Hilfe der ROI-Technik (regions of interest) wurde am Auswerte-Computer (ICON System, Siemens) die Radioaktivitäts-Verteilung ermittelt. Anhand der Ganzkörper-Szintigramme wurde aus der ventralen und dorsalen Sicht durch Legen von ROIs um Leber, Milz, Ganzkörper und gegebenenfalls Kryoläsionen eine Organaktivität ermittelt und als Anteil an der Ganzkörperaktivität angegeben. Mittels Background-ROI wurde eine Hintergrund-Korrektur durchgeführt.

Abbildung 7 zeigt die computergestützte Auswertung des Ganzkörper-Szintigramms von ventral (linke Bildhälfte) und dorsal (rechte Bildhälfte). Die ROIs wurden im ventralen Szintigramm von Hand um Leber, Milz und gegebenenfalls die Kryoläsionen gelegt und anschließend auf die dorsale Ansicht gespiegelt. Zur genaueren Abgrenzung von Leber, Milz und Kryoläsion wurden die SPECT-Aufnahmen hinzugezogen. Der Computer ermittelte je ROI die maximale Aktivität, die Pixelanzahl und die mittlere Aktivität. Aus den Werten je ROI von ventralem und dorsalem Szintigramm wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und für die weiteren Berechnungen verwendet. Die Organaktivität wurde in Prozent der Ganzkörperaktivität angegeben.

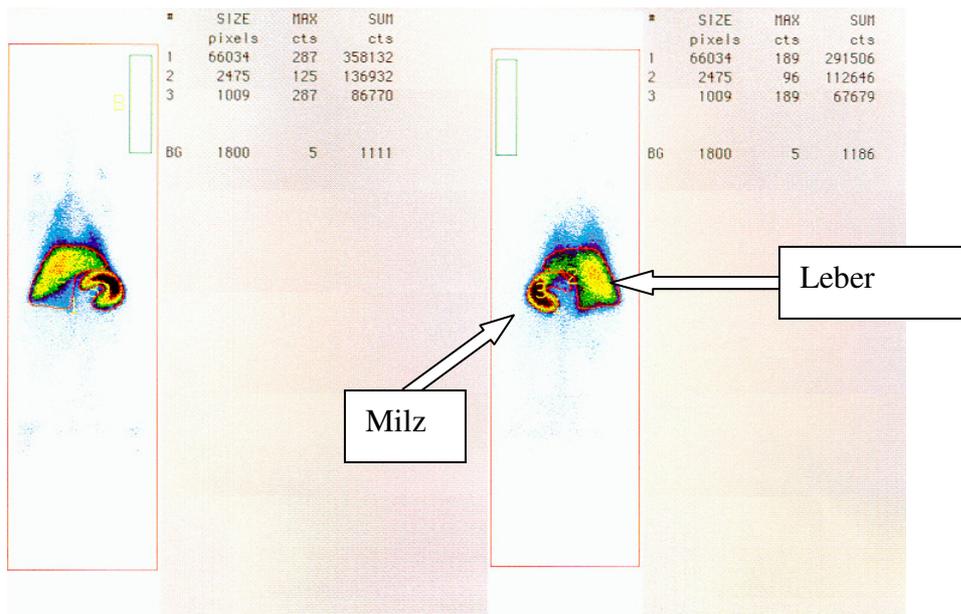


Abbildung 7: ROI-Auswertung anhand des Ganzkörper-Szintigrammes

Im dem Ganzkörper-Szintigramm sind die Umriss des Tieres nur schemenhaft erkennbar, die meiste Radioaktivität findet sich in Leber und Milz.

Zur genaueren Abgrenzbarkeit der Organgrenzen und gegebenenfalls der Kryoläsionen wurden die SPECT-Aufnahmen (Single Photonen Emission Computed Tomography) hinzugezogen. Sie gestatteten anhand der tomographischen Schnitte mit Darstellung transversaler, sagittaler und coronarer Schnittebenen eine genauere Zuordnung der ROIs zu Leber und Milz sowie den Kryoläsionen.

Abbildung 8 zeigt ein Leber-Milz-SPECT in koronarer Schnitfführung.

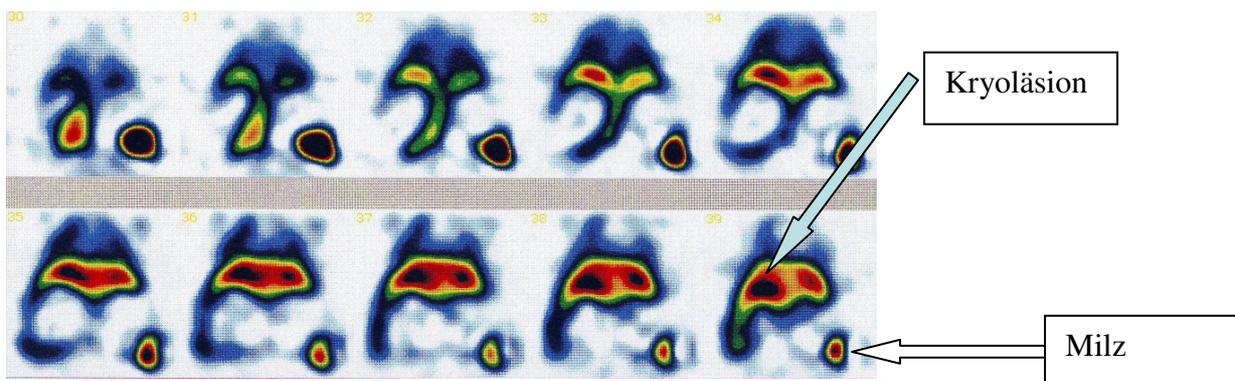


Abbildung 8: Leber-Milz-SPECT in koronarer Schnitfführung

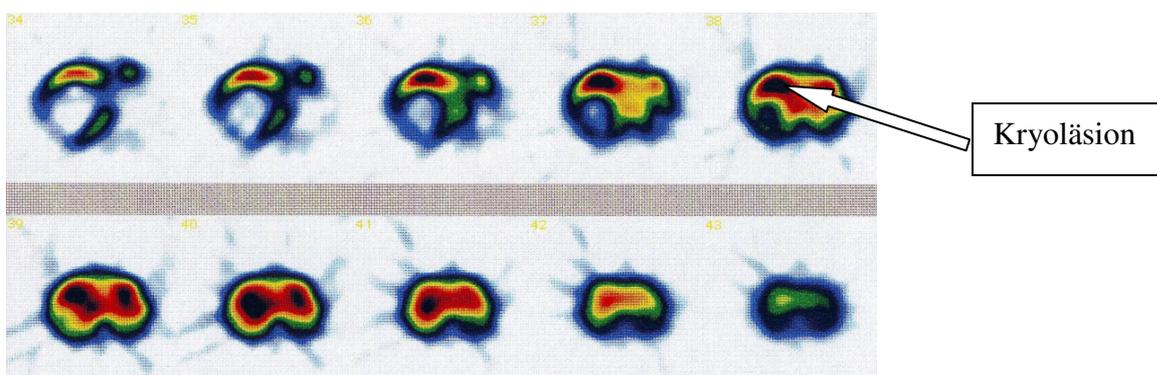


Abbildung 9: Leber-Milz-SPECT in transversaler Schnitfführung

2.2.14. Blutentnahmen

Zur Ermittlung der Thrombozytenlebenszeit wurden regelmäßige Blutentnahmen durchgeführt.

Blutentnahmen wurden immer über den Zentralen Venenkatheter entnommen. Blut wurde zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

0,5 h nach der 2. Kryotherapie

1,0 h nach der 2. Kryotherapie

3,0 h nach der 2. Kryotherapie

6,0 h nach der 2. Kryotherapie

24,0h nach der 2. Kryotherapie

Anschließend wurde täglich bis zum siebten postoperativen Tag eine Blutentnahme durchgeführt. Die letzte Blutentnahme erfolgte vor Euthanasie der Tiere.

Die ersten 2 bis 3 ml der Blutentnahme wurden verworfen, um eine Vermischung mit der im gespülten ZVK befindlichen Kochsalzlösung zu vermeiden. Die Blutentnahme erfolgte möglichst langsam und gleichmäßig, um einen Entnahmeschaden der Thrombozyten zu vermeiden und den Tieren nicht zuviel Schlagvolumen aus dem rechten Vorhof zu entziehen. Je Blutentnahme wurden zur Bestimmung der Thrombozytenlebenszeit (TLZ) 5ml Blut entnommen. Der ZVK wurde anschließend mit isotoner Kochsalzlösung gespült, damit darin verbliebenes Blut nicht anderenfalls den Katheter verstopfte und eine erneute Blutentnahme verhinderte.

2.2.15. Auswertung der Blutentnahmen

Je Blutentnahme wurde zu den oben genannten Zeitpunkten 5 ml Blut entnommen.

In der Abteilung für Nuklearmedizin wurden anschließend 2 ml Vollblut abpipetiert.

Die restlichen 3 ml wurden 15 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Anschließend wurden 1ml Serum und 0,5 ml Blutkuchen abpipetiert.

Am letzten Tag der Blutentnahme wurden nach Zentrifugation der letzten Blutentnahme und nach dem Pipetieren alle Blutproben eines Versuchstiers zusammen in einem Probenwechsler (Berthold LB951G) gemessen und die Zählrate/Minute gemessen. Die Bestimmung der Thrombozytenlebenszeit erfolgte nach einer in der Routine-Diagnostik üblichen Methode [7, 65, 41, 50].

Die Thrombozytenlebenszeit wurde in Tagen angegeben.

2.2.16. Statistische Auswertung

Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Sigma Stat Softwarepakets (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

Nach Beweis der Annahme der Normalität und Homogenität der Varianz zwischen den Versuchstier-Gruppen wurden Unterschiede zwischen den Gruppen mit Hilfe von ANOVA berechnet.

Statistische Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Beobachtungen

Alle Tiere, die ausgewertet wurden, hatten postinterventionell einen unauffälligen Heilungsverlauf. Ein Tier aus dem Normalkollektiv verstarb aus unklaren Gründen. Eine durchgeführte Obduktion erbrachte keinen wegweisenden Befund.

Ein weiteres Versuchstier wurde aus der Auswertung herausgenommen, da es peri-interventionell zu einer Para-Infusion des Aprotinin kam.

In keiner Versuchstiergruppe wurde nach Kryotherapie in der 7-tägigen Experimentphase eine Komplikation wie z.B. Leberversagen, Blutung, Wundheilungsstörung, Peritonitis oder Galle-Leckage beobachtet.

Die Induktion der Kryoläsion im Leberparenchym führte zu einer makroskopisch leicht erkennbaren, rosafarbenen hämorrhagischen Läsion, deren Ausbreitung intraoperativ gut beobachtet werden konnte.

Bei allen kryotherapierten Versuchstieren trat während der Kryotherapie ein Riss im Leberparenchym auf, der in einigen Fällen die Leberoberfläche erreichte. Wenn es dabei zu einer Blutung kam, konnte der Riss übernäht werden, zu größeren Blutverlusten kam es dabei nicht.

Die Operationszeit betrug durchschnittlich 211 ± 13 Minuten, das Markieren der Thrombozyten dauerte durchschnittlich 180 Minuten, einschließlich des Transports in die Abteilung für Experimentelle Chirurgie.

Bei den Tieren, die kryotherapiert wurden, zeigte sich in den Ganzkörper-Szintigrammen und den SPECT-Aufnahmen eine Anreicherung der radioaktiv markierten Thrombozyten in der zweiten Kryoläsion, welche nach Gabe der Thrombozyten induziert wurde. Die erste Kryoläsion ließ sich szintigraphisch nur bei 2 der untersuchten Tiere darstellen.

3.2. Untersuchung der Thrombozytenlebenszeit

3.2.1. Normal-Kollektiv

Gruppe 1: Normal-Kollektiv (NK)

In dieser Versuchstiergruppe verstarb ein Tier am zweiten postoperativen Tag. Die Ursache blieb unklar. Die übrigen Tiere zeigten einen unauffälligen postoperativen Verlauf.

Bei den verbliebenen Tieren der Beobachtungsgruppe ergab die Auswertung der Blutentnahmen einen Mittelwert der Thrombozytenlebenszeit von 6,4 Tagen mit einer Standardabweichung von 0,23 Tagen.

Tabelle 2 zeigt die Thrombozytenlebenszeit je Tier.

Tier	Thrombozytenlebenszeit in Tagen
1	6,8
2	6,4
3	6,2
4	6,4
5	6,3

Tabelle 2

3.2.2. Repetitive Freezing

Gruppe 2: Repetitive Freezing (RF)

In der Gruppe befanden sich sechs Tiere, die sich alle gut von dem operativen Eingriff erholten. Die Auswertung der Blutentnahmen ergab eine mittlere Thrombozytenlebenszeit von 2,4 Tagen mit einer Standardabweichung von 0,6 Tagen.

Tabelle 3 zeigt die Thrombozytenlebenszeit je Tier.

Tier	Thrombozyten- Lebenszeit in Tagen
1	2,6
2	1,8
3	2,6
4	3,3
5	1,8
6	2,4

Tabelle 3

3.2.3. Holding Freezing

Gruppe 3: Holding (HF)

In der Gruppe befanden sich sechs Tiere, die sich alle gut von dem operativen Eingriff erholten. In dieser Gruppe zeigte sich eine mittlere Thrombozytenlebenszeit von 2,3 Tagen mit einer Standardabweichung von 0,9 Tagen.

Tabelle 4 zeigt die Thrombozytenlebenszeit je Tier.

Tier	Thrombozyten- Lebenszeit in Tagen
1	3,9
2	1,6
3	2,0
4	2,2
5	2,7
6	1,6

Tabelle 4

3.2.4. Holding Freezing und Gabe von Aprotinin

Gruppe 4: Holding + Aprotinin (AF)

In dieser Gruppe befanden sich sechs Tiere, die sich alle gut von dem operativen Eingriff erholten. Da es bei einem Tier aufgrund einer Fehllage des ZVK zu einer Para-Infusion von Aprotinin kam wurde dieses Tier aus der Auswertung herausgenommen. In dieser Gruppe zeigt sich eine mittlere Thrombozytenlebenszeit von 3,3 Tagen mit einer Standardabweichung von 1,0 Tagen.

Tabelle 5 zeigt die Thrombozytenlebenszeit je Tier.

Tier	Thrombozyten- Lebenszeit in Tagen
1	2,9
2	2,3
3	4,3
4	2,6
5	4,4

Tabelle 5

3.2.5. Holding Freezing und Selektive Einstrom-Okklusion

Gruppe 5: Holding + Pringle (PF)

In dieser Gruppe befanden sich sechs Tiere, alle erholten sich gut von dem operativen Eingriff. Es zeigt sich eine mittlere Thrombozytenlebenszeit von 3,7 Tagen mit einer Standardabweichung von 1,9 Tagen.

Tabelle 6 zeigt die Thrombozytenlebenszeit je Tier.

Tier	Thrombozyten- Lebenszeit in Tagen
1	2,8
2	2,1
3	6,7
4	2,4
5	1,5
6	3,9

Tabelle 6

3.3. Bildauswertung

Darstellung der Organaktivitäten

3.3.1. Gruppe 1 Normalkollektiv

Die Abbildung 10 zeigt ein Ganzkörper-Szintigramm mit Ansicht von ventral in der linken Bildhälfte und von dorsal in der rechten Bildhälfte. Nahezu die gesamte Radioaktivität fand sich 7 Tage nach intravenöser Verabreichung der Thrombozyten in Leber und Milz. Die Organgrenzen ließen sich zur ROI-Auswertung anhand des SPECT gut nachvollziehen.

Abbildung 11 zeigt das dazugehörige SPECT in koronarer Schnittführung.

Abbildung 12 und 13 zeigen die ROI-Darstellung mit ROIs um Leber, Milz und Ganzkörper sowie das Hintergrund-ROI.

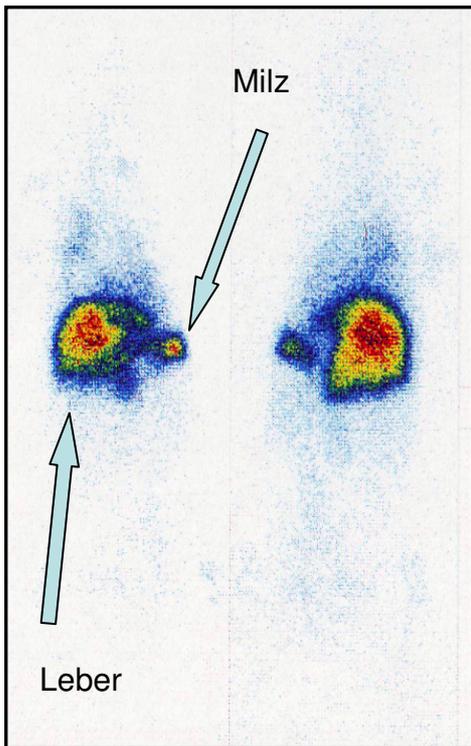


Abbildung 10: Ganzkörperaufnahme aus ventraler Ansicht (links) und dorsaler Ansicht (rechts)

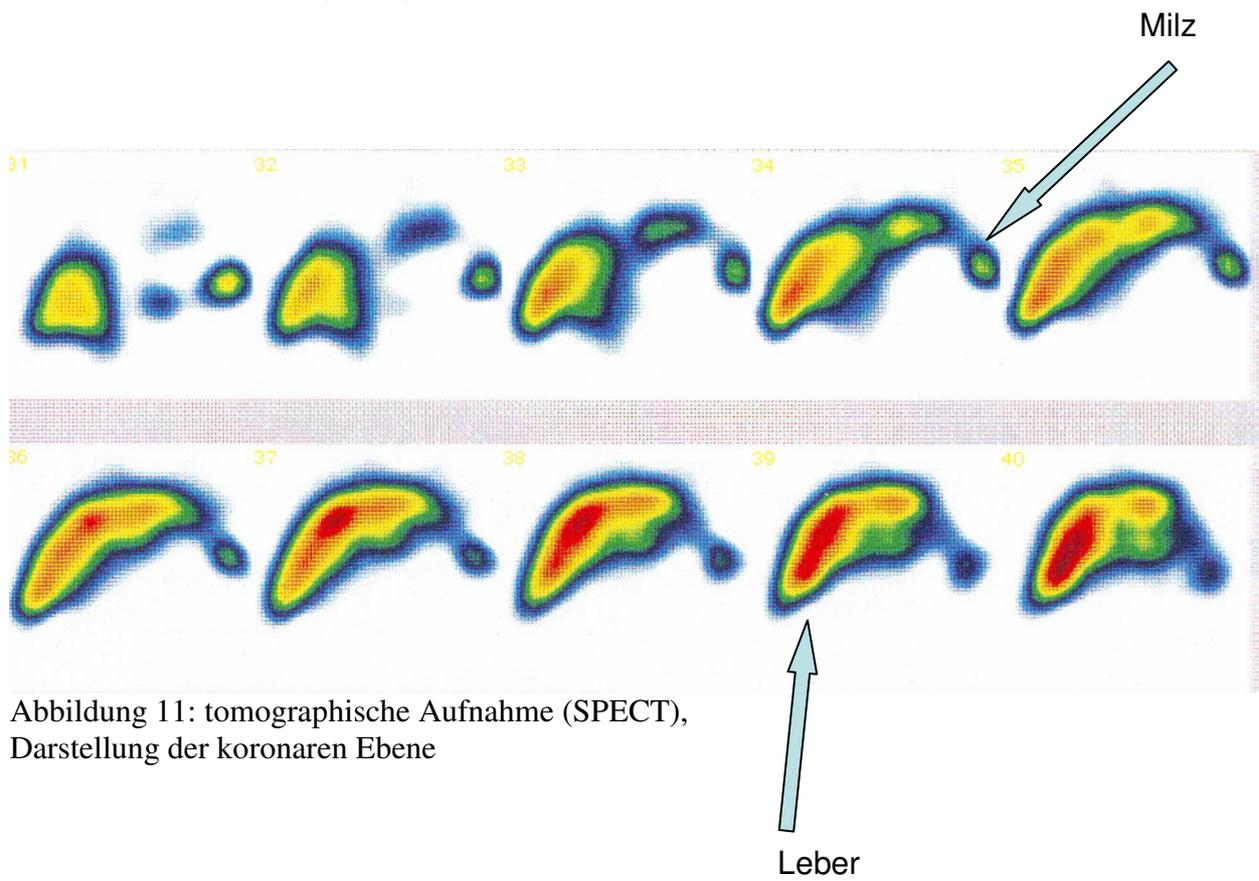


Abbildung 11: tomographische Aufnahme (SPECT), Darstellung der koronaren Ebene

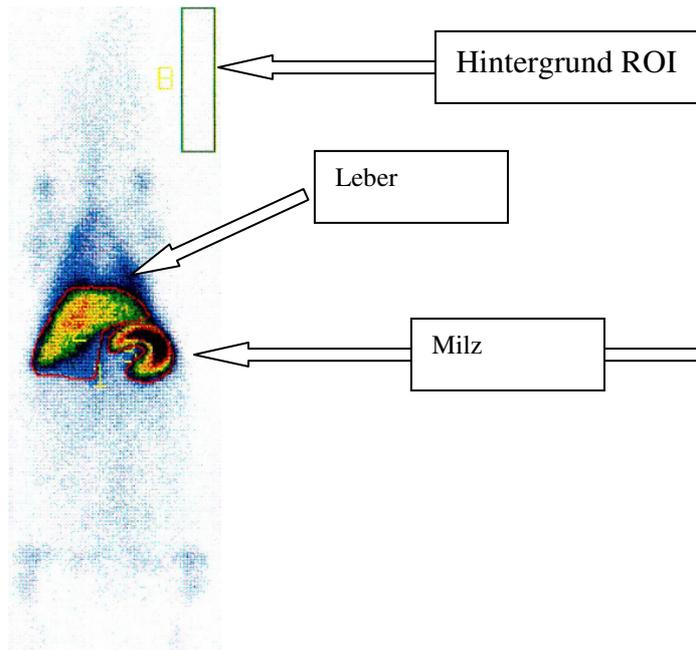


Abbildung 12: Ganzkörperaufnahme, ventrale Ansicht

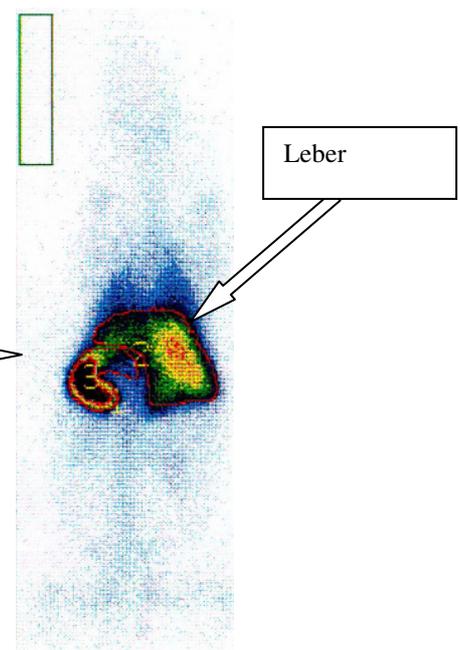


Abbildung 13: Ganzkörperaufnahme, dorsale Ansicht

Aus den Ganzkörper-szintigraphien wurden hintergrundkorrigierte Organaktivitäten von Leber, Milz und Ganzkörper von ventral und dorsal bestimmt. Dabei zeigte sich in der Leber eine Radioaktivität von 43,1 % der Ganzkörper-Aktivität (Standardabweichung 5,5 %) und in der Milz von 20% der Ganzkörper-Aktivität (Standardabweichung 5,2 %).

3.3.2. Gruppe 2 Repetitive Freezing (RF)

Nach Kryotherapie der Leber zeigte sich in den Ganzkörper-Szintigraphien die Kryoläsion als Ort einer Mehranreicherung der radioaktiv markierten Thrombozyten.

Die Bestimmung der hintergrundkorrigierten Organaktivitäten von Leber, Milz und Ganzkörper sowie der Kryoläsion zeigte in der Leber eine Radioaktivität von 40,4 % der Ganzkörper-Aktivität (Standardabweichung 5,2 %), in der Milz von 15,9% (Standardabweichung 6,7 %), und in der zweiten Kryoläsion von 14 % (Standardabweichung 4,2 %) der Ganzkörper-Aktivität. Die erste Kryoläsion, die vor Gabe der radioaktiven Thrombozyten induziert wurde, stellte sich nicht dar.

Abbildung 14 zeigt ein Ganzkörper-szintigramm mit Darstellung der zweiten Kryoläsion von ventral, Abbildung 15 von dorsal. Das SPECT wurde in allen Gruppen zur genaueren Organabgrenzung hinzugezogen.

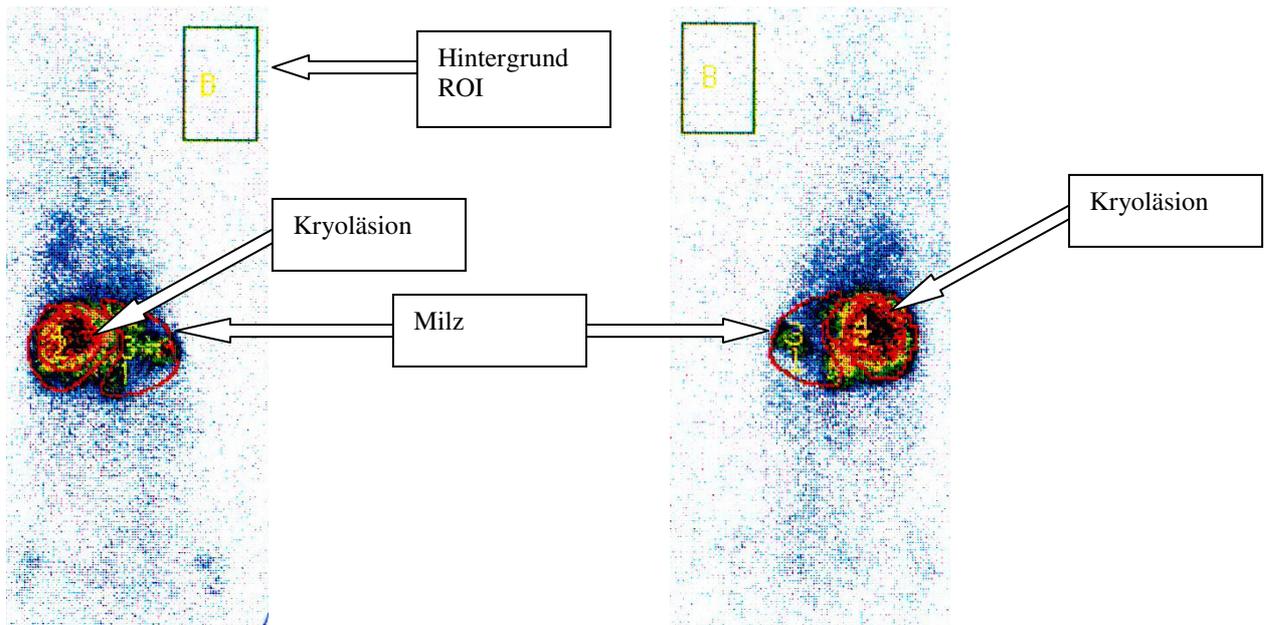


Abbildung 14: Ganzkörperaufnahme, ventrale Ansicht

Abbildung 15: Ganzkörperaufnahme, dorsale Ansicht

3.3.3. Gruppe 3 Holding Freezing (HF)

Die Bestimmung der hintergrundkorrigierten Organaktivitäten von Leber, Milz und Ganzkörper sowie der Kryoläsion zeigte in der Leber eine Radioaktivität von 43,2 % der Ganzkörper-Aktivität (Standardabweichung 5,2%), in der Milz von 16,8% (Standardabweichung 6,7%), und in der zweiten Kryoläsion von 5,3% (Standardabweichung 4,2%) der Ganzkörper-Aktivität. Die erste Kryoläsion, die vor Gabe der radioaktiven Thrombozyten induziert wurde, ließ sich bei einem Versuchstier abgrenzen. Es zeigte sich eine Radioaktivität von 8,7% der Ganzkörper-Aktivität.

3.3.4. Gruppe 4 Holding Freezing + Aprotinin (AF)

Die Bestimmung der hintergrundkorrigierten Organaktivitäten von Leber, Milz und Ganzkörper sowie der Kryoläsion zeigte in der Leber eine Radioaktivität von 42,9 % der Ganzkörper-Aktivität (Standardabweichung 4,7%) und in der Milz von 17,7% (Standardabweichung 4,4%). Die zweite Kryoläsion ließ sich auch unter zu Hilfenahme der SPECT nicht sicher abgrenzen. Ebenso ließ sich die erste Kryoläsion nicht abgrenzen.

3.3.5. Gruppe 5 Holding Freezing + Pringle (PF)

Die Bestimmung der hintergrundkorrigierten Organaktivitäten von Leber, Milz und Ganzkörper sowie der Kryoläsion zeigte in der Leber eine Radioaktivität von 42,6 % der Ganzkörper-Aktivität (Standardabweichung 8,8%), in der Milz von 16,0% (Standardabweichung 7,9%), und in der zweiten Kryoläsion von 10,7% (Standardabweichung 7,2%) der Ganzkörper-Aktivität. Die erste Kryoläsion, die vor Gabe der radioaktiven Thrombozyten induziert wurde, ließ sich bei einem Versuchstier abgrenzen. Es zeigte sich eine Radioaktivität von 6,7% der Ganzkörper-Aktivität.

Tabelle 7 fasst die oben beschriebenen Ergebnisse zusammen und nennt den Anteil der Aktivität in der Kryoläsion an der Ganzkörper- und der Leberaktivität:

Gruppe	1	2	3	4	5
Leber-Aktivität in %der Ganzkörper-Aktivität	43,06	40,4	43,2	42,9	42,1
Milz-Aktivität in % der Ganzkörper-Aktivität	19,96	15,9	16,8	17,7	15,3
Aktivität in Kryoläsion 1 in % der Ganzkörper-Aktivität		2,9	1,5	0	0
Aktivität in Kryoläsion 2 in % der Ganzkörper-Aktivität		14	5,3	0	11,1
Aktivität in Kryoläsion 1 in % der Leber-Aktivität		7,2	2,8	0	0
Aktivität in Kryoläsion 2 in % der Leber-Aktivität		34,7	11,9	0	35,9
Thrombozytenlebenszeit in Tagen	6,4	2,4	2,3	3,3	2,8

Tabelle 7

3.4. Statistische Auswertung

Ziel der Auswertung war statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen herauszufinden. Verglichen wurden die Thrombozytenlebenszeiten und die Organaktivitäten der einzelnen Versuchstiergruppen. Zunächst wurden die Versuchstiergruppen mit dem Normalkollektiv verglichen. Nachdem statistisch signifikante Unterschiede auffielen, wurden die Versuchstiergruppen untereinander verglichen. Tabelle 8 nennt die einzelnen Gruppen.

- Gruppe 1: Normal-Kollektiv
 - Gruppe 2: Repetitive Freezing
 - Gruppe 3: Holding
 - Gruppe 4: Holding + Aprotinin
 - Gruppe 5: Holding + Pringle-Manöver
- Tabelle 8

3.4.1. Statistisch signifikante Unterschiede

Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich für die folgenden untersuchten Gruppen:

Im Vergleich der Gruppen 2 (RF) und 3 (HF) für die Anreicherung der markierten Thrombozyten in der Kryoläsion 2 zeigte sich eine statistisch signifikante Mehranreicherung ($p < 0,005$) in Gruppe 2. Dies galt sowohl bezüglich der Ganzkörper-Aktivität, als auch bezogen auf die Anreicherung im Leberparenchym. Dabei zeigte sich in der Gruppe 2 (RF) eine mittlere Anreicherung in der Kryoläsion 2 von 14 % der Ganzkörper-Aktivität verglichen mit 5,3 % der Ganzkörper-Aktivität in der Holding-Gruppe (3).

Im Vergleich der Gruppen 2 (RF), 4 (AF) und 5 (PF) zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Anreicherung in der Kryoläsion 2 in Bezug auf die Ganzkörper-Aktivität und die Leber-Aktivität. Dabei war die Anreicherung der Thrombozyten in der Kryoläsion 2 geringer in der Gruppe, die perioperativ Aprotinin verabreicht bekommen hatte, verglichen mit der Therapie ohne Gabe von Aprotinin.

Zudem zeigte sich im Vergleich mit der nicht therapierten Kontrollgruppe (1) eine in allen Therapie-Gruppen statistisch signifikant verminderte Thrombozytenlebenszeit.

3.4.2. Statistisch nicht signifikante Unterschiede

Statistisch nicht signifikante Unterschiede ergaben sich für die folgenden Gegebenheiten:

Die Anreicherung markierter Thrombozyten in Leber und Milz war in allen Versuchstiergruppen vergleichbar. Sie betrug in der Leber im Mittel zwischen 43% und 46% der Ganzkörperaktivität und in der Milz im Mittel zwischen 15% und 20% der Ganzkörperaktivität. Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich nicht darstellen.

Die Anreicherung markierter Thrombozyten in der ersten Kryoläsion unterschied sich in allen Therapiegruppen nicht signifikant. Die erste Kryoläsion war lediglich bei zwei untersuchten Tieren mit Hilfe der SPECT abgrenzbar. Bei allen anderen untersuchten Tieren ließ sie sich nicht abgrenzen.

Auch der Vergleich der Anwendung des Pringle-Manövers (5) und der Gabe von Trasylol (4) mit der Holding-Gruppe (3) als Referenz ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Thrombozytenlebenszeit.

Der Vergleich der Pringle-Gruppe (5) mit der Repetitive Freezing-Gruppe (2) erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Anreicherung in der Kryoläsion 2.

3.4.3. Statistische Daten

3.4.3.1. Thrombozytenlebenszeit

ANOVA: Multiple Comparisons versus Kontroll-Gruppe 1 (NK) – post-hoc test: Dunnett's

Vergleich	Diff of Means	q`	P	P<0,050
1 (NK) vs. 3 (HF)	4,087	6,171	-	ja
1 (NK) vs. 2 (RF)	4,003	6,045	-	ja
1 (NK) vs. 4 (AF)	3,12	4,511	-	ja

Es bestehen statistisch signifikante Unterschiede.

3.4.3.2. Leberanreicherung in % der Ganzkörperanreicherung

ANOVA, Kontroll-Gruppe = 1 (NK)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	32,455	8,114	0,169	0,952
Residual	24	1155,333	48,139		
Total	28	1187,788			

Es besteht kein signifikanter Unterschied.

3.4.3.3. Milzanreicherung in % der GK-Anreicherung

ANOVA, Kontroll-Gruppe = 1 (NK)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	76,232	19,058	0,462	0,763
Residual	24	990,49	41,27		
Total	28	1066,722			

Es besteht kein signifikanter Unterschied.

3.4.3.4. Anreicherung in Kryoläsion 1 in % der GK-Anreicherung

Gruppe 3 (HF) gegen Gruppe 2 (RF): t-Test

Gruppe	N	Median	25%	75%
3 (HF)	6	0	0	0
2 (RF)	6	0	0	6,8

Es besteht kein signifikanter Unterschied: P=0,699

3.4.3.5. Anreicherung in Kryoläsion 2 in % der GK-Anreicherung

Gruppe 3 (HF) gegen Gruppe 2 (RF): t-Test

Gruppe	N	Mean	Std Dev	SEM
3 (HF)	6	5,25	2,979	1,216
2 (RF)	6	14,017	4,154	1,696

Es besteht ein signifikanter Unterschied: P=0,002

3.4.3.6. Anreicherung in Kryoläsion 1 in % der Leberanreicherung

Gruppe 3 (HF) gegen Gruppe 2 (RF): t-Test

Gruppe	N	Median	25%	75%
3 (HF)	6	0	0	0
2 (RF)	6	0	0	17,1

Es besteht kein signifikanter Unterschied: P=0,589

3.4.3.7. Anreicherung in Kryoläsion 2 in % der Leberanreicherung

Gruppe 3 (HF) gegen Gruppe 2 (RF): t-Test

Gruppe	N	Median	25%	75%
3 (HF)	6	13,4	11,5	14,4
2 (RF)	6	036,7	34,4	38,4

Es besteht ein signifikanter Unterschied: P=0,002

3.4.3.8. Anreicherung in Kryoläsion 1 in % der GK-Anreicherung

Gruppe 3 (HF) gegen Gruppe 5 (PF) gegen Gruppe 4 (AF) (Gruppe 3 ist Kontrollgruppe)

Gruppe	N	Median	25%	75%
3 (HF)	6	0	0	0
4 (AF)	5	0	0	0
5 (PF)	6	0	0	0

Es besteht kein signifikanter Unterschied: P=0,648

3.4.3.9. Anreicherung in Kryoläsion 2 in % der GK-Anreicherung

Gruppe 4 (AF) gegen Gruppe 3 (HF) und Gruppe 5 (PF) gegen Gruppe 3 (HF)

Vergleich	Diff of Ranks	Q	P<0,05
4 gegen 3	5,583	1,727	No
5 gegen 3	2,488	0,838	Do Not Test

Es besteht kein signifikanter Unterschied.

3.4.3.10. Anreicherung in Kryoläsion 1 in % der Leberanreicherung

Gruppe 3 (HF) gegen Gruppe 4 (AF) gegen Gruppe 5 (PF)

Gruppe	N	Median	25%	75%
3 (HF)	6	0	0	0
4 (AF)	5	0	0	0
5 (PF)	6	0	0	0

Es besteht kein signifikanter Unterschied: P=0,648

3.4.3.11. Anreicherung in Kryoläsion 2 in % der Leberanreicherung

Gruppe 3 (HF) gegen Gruppe 4 (AF) gegen Gruppe 5 (PF)

Vergleich	Diff of Ranks	Q	P<0,05
4 (AF) gegen 3 (HF)	5,417	1,676	No
5 (PF) gegen 3 (HF)	2,798	0,942	Do Not Test

Es besteht kein signifikanter Unterschied.

3.4.3.12. Anreicherung in Kryoläsion 1 in % der GK-Anreicherung

Gruppe 2 (RF) gegen Gruppe 5 (PF) gegen Gruppe 4 (AF): ANOVA, Gruppe 2 = Kontroll-Gruppe

Gruppe	n	Median	25%	75%
2 (RF)	6	0	0	6,8
5 (PF)	6	0	0	0
4 (AF)	5	0	0	0

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied: P=0,302

3.4.3.13. Anreicherung in Kryoläsion 2 in % der GK-Anreicherung

Gruppe 2 (RF) gegen Gruppe 5 (PF) gegen Gruppe 4 (AF)

Vergleich	Diff of Ranks	Q	P<0,05
4 (AF) gegen 2 (RF)	9,5	2,939	Ja
5 (PF) gegen 2 (RF)	3,5	1,178	nein

Statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 4 und 2.

3.4.3.14. Anreicherung in Kryoläsion 1 in % der Leberanreicherung

Gruppe 2 (RF) gegen Gruppe 5 (PF) gegen Gruppe 4 (AF)

Gruppe	n	Median	25%	75%
2 (RF)	6	0	0	17,1
5 (PF)	6	0	0	0
4 (AF)	5	0	0	0

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied: P=0,302

3.4.3.15. Anreicherung in Kryoläsion 2 in % der Leberaktivität

Gruppe 2 (RF) gegen Gruppe 4 (AF) und gegen Gruppe 5 (PF)

Vergleich	Diff of Ranks	Q	P<0,05
4 (AF) gegen 2 (RF)	10	3,093	Ja
5 (PF) gegen 2 (RF)	4,429	1,491	nein

Statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 4 und 2.

4. Diskussion

Eine behandlungsbedürftige Thrombozytopenie nach Kryotherapie der Leber ist eine seltene aber gefürchtete Nebenwirkung, welche lebensbedrohlich sein kann und die Notwendigkeit einer Thrombozytengabe bedingen kann. Die genaue Ursache ist nicht bekannt, es werden immunologische Mechanismen [13, 22, 4, 61] mit Akkumulation der Thrombozyten in der Milz, der Leber und dem retikuloendothelialen System vermutet sowie ein Thrombozytenabbau in der Leber benannt [3, 43, 48]. Im Folgenden soll auf einen Thrombozytenabbau in der Leber sowie eine verkürzte Thrombozytenlebenszeit eingegangen werden.

4.1. Vorbemerkung

Die Studie zeigte postoperativ eine gute Erholung der Versuchstiere nach der Kryotherapie. Blutungen, Leberversagen, Peritonitis oder Wundheilungsstörungen traten nicht auf. Diese Erfahrung deckt sich mit den Erfahrungen anderer Gruppen, bei denen die Kryotherapie ebenfalls gut überstanden wurde [13, 52, 68, 59, 20].

4. 2. Thrombozytenlebenszeit

4.2.1. Normale Thrombozytenlebenszeit

In der vorliegenden Arbeit konnte die normale Thrombozytenlebenszeit beim Hausschwein der Rasse Schwäbisch Hallesches Landschwein erstmals beschrieben werden. Bisher veröffentlichte Arbeiten zeigten lediglich, dass es möglich ist, porcine Thrombozyten mit einem am Menschen routinemäßig durchgeführten Verfahren [65, 41, 50] zu markieren, nannten jedoch keinen Normalwert für die Thrombozytenlebenszeit [14, 25, 69]. Bei den fünf untersuchten Tieren ergab sich ein Mittelwert der Thrombozytenlebenszeit von 6,4 Tagen mit einer Standardabweichung von 0,23 Tagen. Die geringe Standardabweichung lässt auf eine hohe Reproduzierbarkeit des Ergebnisses schließen.

Damit liegt die normale Thrombozytenlebenszeit beim Schwein unter dem für Menschen angenommenen Normalwert. Die mittlere Thrombozytenlebenszeit beim gesunden Menschen beträgt zwischen sieben und elf Tagen [3, 11, 66]. Conte et al. [11] nennen eine mittlere Thrombozytenlebenszeit von $7,9 \pm 1$ Tage als Normwert, ermittelt aus einem Kollektiv von 12 gesunden Probanden, Todorovic-Tirnanic et al. [66] nennen $8,9 \pm 0,6$ Tage als Normwert, ermittelt an einem Kollektiv von 22 gesunden Probanden. Alexander et al. [3] nennen 7 bis 11 Tage als Normwert.

Im Vergleich mit den nicht therapierten Versuchstieren zeigte sich nach Kryotherapie eine statistisch signifikant verminderte Thrombozytenlebenszeit ($p=0,002$) zwischen 2,3 Tagen in der Gruppe Holding Freezing (HF) und 3,7 Tagen in der Gruppe Pringle Freezing (PF). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Kryotherapie der Leber zu einer Verkürzung der Thrombozytenlebenszeit führt und dies sicherlich eine Ursache einer Thrombozytopenie nach Kryotherapie der Leber ist.

4.2.2. Verkürzte Thrombozytenlebenszeit nach Kryotherapie

Im Vergleich der Thrombozytenlebenszeiten der kryotherapierten Versuchstiere zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 2 (RF) und der Gruppe 3 (HF) ($p \leq 0,05$).

Die Gruppen 3 (HF), 4 (AF) und 5 (PF) zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Thrombozytenlebenszeit. Dies lässt darauf schließen, dass die Beeinträchtigung der Thrombozytenlebenszeit abhängig ist vom Modus des Frierens, ob repetitiv oder mit nur einem Frierzyklus gefroren wird. Dabei hat das repetitive Frieren eine größere Beeinträchtigung der Thrombozytenlebenszeit zur Folge. Maßnahmen wie die Gabe von Aprotinin oder eine selektive Venen-Okklusion können dagegen die Thrombozytenlebenszeit nicht statistisch signifikant beeinflussen. Andere Gruppen haben bisher die Auswirkungen einer Aprotinin-Gabe auf die Thrombozytenlebenszeit nicht untersucht. Auch bezüglich einer selektiven Venenokklusion gibt es keine weiteren Angaben zur möglichen Beeinträchtigung der Thrombozytenlebenszeit. Andere Gruppen [26, 68, 58, 59, 28, 47, 19] konnten zeigen, dass repetitives Frieren eine größere Zelledestruktion als ein einzelner Frierprozess zur Folge hat und die Vermutung liegt nahe, dass dies auch zu einer Differenz der Thrombozytenlebenszeiten führt.

4.3. Organ-Aktivitäten

4.3.1. Aktivität in Leber und Milz

Die statistische Auswertung der Ganzkörper-Szintigramme bezüglich einer Organanreicherung der markierten Thrombozyten in Leber und Milz ergibt zwischen allen untersuchten Gruppen, also auch dem Normalkollektiv, keine statistisch signifikanten Unterschiede. So finden sich in der Leber zwischen 40,4% und 43,1% der Ganzkörper-Aktivität und in der Milz zwischen 15,3% und 20% der Ganzkörper-Aktivität.

Einige Gruppen [13, 22, 4, 61] vermuten immunologische Gründe, die zur Ausbildung einer Thrombozytopenie führen. Cozzi et al [13] beschreiben in ihrer 1994 veröffentlichten Arbeit, dass splenektomierte Patienten nach einer Kryotherapie der Leber keine Thrombozytopenie erfahren und schlussfolgern, dass die Milz eine wesentliche Rolle bei der postoperativen Thrombozytopenie spiele.

Hamad et al [22] vermuten immunologische Ursachen als Auslöser einer Thrombozytopenie, welche zu einer verstärkten Sequestration von Thrombozyten im Retikulo Endothelialen System führe [20].

Die hier vorliegenden Ergebnisse widersprechen diesen Vermutungen. Bei einem vermehrten Pooling in Leber, Milz oder RES hätte man eine vermehrte Anreicherung der radioaktiv markierten Thrombozyten in Leber oder Milz erwartet und Unterschiede zwischen therapierten und nicht therapierten Tieren gesehen. Dies war jedoch in dieser Studie nicht zu beobachten.

Zu bemerken ist, dass es sich hier um eine Studie am Tiermodell handelt und die zitierten Arbeiten Datenauswertungen von Patienten entstammen. Ob die Erfahrungen am Tiermodell auf den Menschen übertragen werden können müssen ggf. weitere Studien zeigen.

4.3.2. Aktivitäten in den Kryoläsionen

Die radioaktiv markierten Thrombozyten reichert sich in der zweiten Kryoläsion an, d.h. sie wurden dort deponiert. Dem lag am ehesten eine Aktivierung der Thrombozyten durch Endothelschäden während der Kryotherapie zugrunde. Ein Vergleich mit anderen Arbeiten zu diesem Thema war nicht möglich, da bisher eine radioaktive Markierung von Thrombozyten vor Kryotherapie der Leber nicht durchgeführt wurde.

Das Ergebnis entspricht den Vermutungen vieler Autoren [64, 73, 9, 20, 54, 27, 28, 69], dass die Ursache einer Thrombozytopenie nach Kryotherapie der Leber am ehesten eine lokale Aktivierung und Verbrauch der Thrombozyten im Bereich der Kryoläsion ist.

Auch histologische Untersuchungen unterstützen diese These. So zeigten Richter et al. [47] und Kollmar et al. [27, 28] histologisch eine vermehrte Thrombozytenakkumulation in den Kryoläsionen nach Kryotherapie der Leber.

Die Anreicherung der markierten Thrombozyten in der zweiten Kryoläsion unterschied sich statistisch signifikant ($p=0,002$) nur zwischen den Gruppen 2 (RF) und 3 (HF), zwischen den anderen Gruppen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dies legt die Vermutung nahe, dass Unterschiede der Anreicherung in der zweiten Kryoläsion durch den Friermodus bedingt sind, also ob repetitiv oder nur einmalig gefroren wird. Das Durchführen einer selektiven Venen-Okklusion oder die Gabe von Aprotinin hatten keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Anreicherung der radioaktiv markierten Thrombozyten. Auch andere Gruppen kamen zu dem Ergebnis, dass weder die Gabe von Aprotinin noch die Durchführung einer selektiven Venenokklusion zu einer Verminderung des Risikos einer Thrombozytopenie führt.

Es fand sich in der Kryoläsion 1, welche vor Gabe der markierten Thrombozyten induziert wurde, nur bei zwei Tieren, je einem aus Gruppe 3 (HF) und 5 (PF), überhaupt eine Anreicherung der markierten Thrombozyten. Statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Thrombozyten-Akkumulation in Kryoläsion 1 zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ergeben sich nicht. In Kryoläsion 2, welche nach Gabe der radioaktiv markierten Thrombozyten induziert wurde, zeigte sich jedoch eine deutliche Aktivitätsanreicherung. Dies lässt darauf schließen, dass es sich um einen schnellen Prozess handelt, bei dem Thrombozyten während oder direkt nach Induktion der Kryoläsion in der Kryoläsion deponiert werden.

Vergleichbare Daten anderer Gruppen gibt es nicht. Histologisch betrachtet unterscheiden sich die beiden Kryoläsionen hinsichtlich der Anzahl dort gesehener Thrombozyten nicht voneinander [27, 28, 47, 43].

Berechtigung hat die Gabe von Aprotinin zur Verbesserung der Gewebedestruktion [27], ebenso führt die selektive Venenokklusion zu einer Vergrößerung der Nekrosezone [28, 47].

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse werden hoffentlich zum besseren Verständnis der Thrombozytopenie nach Kryotherapie der Leber beitragen. Weitere Untersuchungen zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen sollten angestrebt werden.

Zudem stammen die gewonnenen Ergebnisse aus einem Kollektiv von 6 Tieren je Gruppe.

Technische Verbesserungen der Gamma-Kameras durch Kombination mit einem Computertomographen (CT) und der Möglichkeit der Bildfusion verbessern die diagnostische Genauigkeit durch eine höhere Ortsauflösung. Somit wird die Abgrenzbarkeit der Kryoläsionen vom gesunden Leberparenchym verbessert.

5. Zusammenfassung

Primäre und sekundäre Lebermalignome sind die häufigsten Tumore des Menschen. Beim kolorektalen Karzinom ist die Leber der häufigste und oft auch der einzige Ort einer Metastasierung. Die chirurgische Resektion einer Lebermetastase ist der Goldstandard der Therapie und führt zu einer Verlängerung der Lebenserwartung und der Rezidivfreiheit. Bei vielen Patienten ist eine Metastasenresektion nicht möglich. Gründe dafür sind Größe und Anzahl der Metastasen, Befall beider Leberlappen, Nähe zu Gefäßstrukturen, nicht ausreichende funktionelle Reserven nach Resektion sowie ein schlechter Allgemeinzustand des Patienten.

Zur lokalen Therapie von Lebermetastasen sind verschiedene Verfahren bekannt, unter ihnen die systemische oder lokale Chemotherapie, die Chemo-Embolisation, Immuntherapie, Radiofrequenzablation und die Kryotherapie.

Die Ablation von Lebermetastasen durch Kälte ist ein langjährig bekanntes Verfahren. Nebenwirkungen der Kryotherapie sind Transaminasenanstieg, Hypothermie, hepatische Abszesse, Galle-Leckage und Thrombozytopenie.

Ziel dieser Studie war, mögliche Ursachen der Thrombozytopenie zu untersuchen und Möglichkeiten zur Verhinderung einer Thrombozytopenie zu prüfen.

Von mehreren Autoren wurde angenommen, dass ein lokaler Thrombozytenverbrauch in der Kryoläsion zur Thrombozytopenie führt. Durch radioaktive Markierung der Thrombozyten und Untersuchung der kryotherapierten Versuchstiere mit der Gamma-Kamera konnte szintigraphisch gezeigt werden, dass es nach Kryotherapie der Leber zu einer Thrombozyten-Akkumulation in den Kryoläsionen kommt. Bei einem großen Zellschaden kann also eine Thrombozytopenie resultieren.

Mittels Blutentnahmen konnte anhand eines Normal-Kollektivs die normale Thrombozytenlebenszeit beim Schwein bestimmt werden. Sie beträgt 6,4 Tage mit einer Standardabweichung von 0,23 Tagen.

Als weitere Ursache der posttherapeutischen Thrombozytopenie wurde eine verkürzte Thrombozytenlebenszeit vermutet. Die Bestimmung der Thrombozytenlebenszeit nach Kryotherapie der Leber zeigte eine deutliche Verkürzung der Thrombozytenlebenszeit im Vergleich mit dem nicht therapierten Normalkollektiv von 6,4 Tage auf durchschnittlich 2,8 Tage. Die Verkürzung der Thrombozytenlebenszeit nach Kryotherapie der Leber ist also eine weitere mögliche Ursache einer postinterventionellen Thrombozytopenie.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob der Modus der Kryotherapie die Thrombozytenlebenszeit beeinflusst. Ein Vergleich des repetitiven Frierens mit dem kontinuierlichen Frieren konnte zeigen, dass die Anreicherung der radioaktiven Thrombozyten in der Kryoläsion nach repetitivem Frieren signifikant höher als nach kontinuierlichem Frieren ist (34,7% zu 11,9 % der Leberaktivität), einem vermehrten Thrombozytenverbrauch entsprechend. Nach repetitivem Frieren ist das Risiko einer Thrombozytopenie also höher als nach kontinuierlichem Frieren.

Die Thrombozytenlebenszeit wird durch repetitives Frieren jedoch nicht statistisch signifikant stärker erniedrigt als durch kontinuierliches Frieren (2,3 Tage zu 2,4 Tage).

Aprotinin, ein natürlichen Inhibitor verschiedener Proteasen, wie z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein, sollte eingesetzt werden zur Verhinderung einer Gewebeheilung im Bereich der Kryoläsion durch Verhinderung eines intakten Blutflusses. Dies sollte zu einem verminderten Überleben von Tumorzellen im Eisball und zu einer besseren Wirksamkeit der Kryotherapie führen. Durch Verringerung der Thrombozyten-Aktivierung sollte eine

verminderte Anreicherung in den Kryoläsionen gezeigt werden. Im Vergleich mit den anderen Kryotherapie-Gruppen zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Thrombozytenlebenszeit. Szintigraphisch ließen sich die Kryoläsionen nach Aprotinin-Gabe jedoch nicht mehr darstellen. Diesbezüglich unterschied sich die Gruppe signifikant von den anderen Therapiegruppen.

Weiterhin wurde versucht mittels selektiver vaskulärer Okklusion (Pringle-Manöver), und damit vermindertem Bluteinstrom in die Leber, die Thrombozytenakkumulation in den Kryoläsionen und damit den Thrombozytenverbrauch zu verringern. Aber auch der Vergleich der Pringle-Gruppe mit den anderen Therapie-Gruppen zeigte bezüglich der Thrombozytenanreicherung und der Thrombozytenlebenszeit keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Ursache einer möglichen Thrombozytopenie nach Kryotherapie der Leber sowohl die Thrombozytenakkumulation in den Kryoläsionen ist, entsprechend einer Thrombozytenaktivierung, als auch die generell verkürzte Thrombozytenlebenszeit.

Der Modus der Kryotherapie beeinflusst lediglich den Thrombozytenverbrauch in den Kryoläsionen, nicht jedoch die Thrombozytenlebenszeit.

Die Durchführung des Pringle-Manövers beeinflusst die Thrombozytenlebenszeit nicht signifikant.

Die Gabe von Aprotinin vermindert szintigraphisch den Thrombozytenverbrauch in den Kryoläsionen, beeinflusst die Thrombozytenlebenszeit jedoch nicht.

6. Abkürzungsverzeichnis

ACD-Lösung	Acidum Citricum Dextrose
AF	Holding Freezing + Aprotinin
DGN	Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin
FiO ₂	Inspiratorischer Sauerstoff Partialdruck
HF	Holding Freezing
MRGN	Mittelrheinische Gesellschaft für Nuklearmedizin
M. Parkinson	Morbus Parkinson
PDS 3-0	Nahtmaterial
PF	Holding Freezing + Pringle
PPP	platelet poor plasma: plättchenarmen Plasmas
RES	Reticulo Endotheliales System
RF	Repetitive Freezing
ROI	Region of interest
SPECT	Single Photonen Emission Computed Tomography
TLZ	Thrombozytenlebenszeit
ZVK	zentraler Venenkatheter

7. Literaturverzeichnis

- 1 Adam R, Akpınar E, Johann M, Kunstlinger F, Majno P, Bismuth H: Place of cryosurgery in the treatment of malignant liver tumours. *Ann Surg* 1997; 225: 39-48
- 2 Adson MA: Resection of liver metastases- when is it worthwhile? *World J. Surg.* 11:511, 1987
- 3 Alexander C, Pistorius G, Feifel G, Kirsch CM: Lebenszeit und Abbauort von Thrombozyten nach Kryotherapie von Lebermetastasen. Eigene Daten; *Nuklearmedizin*, 1999
- 4 Allen PJ, D'Angelica M, Hodyl C, You Y-J, Fong Y: The effects of hepatic cryosurgery on tumor growth in the liver. *J Surg Res* 1998 Jul 1; 77(2): 132-136
- 5 Baust JG, Gage AA, Clarke D, Baust JM, Van Buskirk R: Cryosurgery- a putative approach to molecular-based optimization. *Cryobiology*. 2004 Apr;48 (2):190-204
- 6 Bengtsson G, Carlsson G, Hafstrom L, Jonsson PE: Natural history of patients with untreated liver metastases from colorectal cancer. *Am. J. Surg.* 141:586, 1981
- 7 Berberich R, Glöbel H: Markierung von Thrombozyten bei Verwendung kleiner Blutvolumina: *Nuklearmedizin, Ergebnisse in Technik, Klinik und Therapie*. Schattauer, 1974; 359-362
- 8 Brooks AJ, Wang F, Alfredson F, Yan TD, Morris DL: Synchronous liver resection and cryotherapy for colorectal metastases: survival analysis. *Surgeon* 2005 Aug; 3 (4): 265-8
- 9 Charnley RM, Doran J, Morris DL: Cryotherapy for liver metastases: a new approach. *Br J Surg* 1989; 76: 1040-1041
- 10 Chi-Leung L, Sheung-Tat F: Nonresectional therapies for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 1997, 173; 358-363
- 11 Conte G, Gonzalez P, Larrain C, Olea E, Parada X, Hurtado E, Cuneo M: Platelet labelling with In-111-oxine : platelet survival and the images. *Rev Med Chil.* 1990 Jan; 118 (1): 10-14
- 12 Cooper IS: Cryogenic Surgery-A New Method of Destruction or Extirpation of Benign or Malignant Tissues. *New England Journal of Medicine*, 1963, Vol 268, No 14: 743-9
- 13 Cozzi PJ, Stewart GJ, Morris DL: Thrombocytopenia After Hepatic Cryotherapy for Colorectal Metastases: Correlates with Hepatocellular Injury. *World J Surg.* 18, 774-777, 1994
- 14 Dilley AV, Dy DY, Warlters A, Copeland S, Gillies AE, Morris RW, Gibb DB, Cook TA, Morris DL: Laboratory and animal model evaluation of the Cryotech LCS 2000 in hepatic cryosurgery. *Cryobiology* 30 (1993), 74-85
- 15 Ekberg H, Tranberg KG, Andersson R, Lundstedt C, Hagerstrand I, Ranstam J, Bengmark S: Determinants of survival in liver resection for colorectal secondaries. *Br. J. Surg.* 73: 727, 1986

- 16 Gage AA: History of Cryosurgery, *Seminars in Surgical Oncology* 1998; 14:99-109
- 17 Gananadha S, Daniel S, Zhao J, Morris DL: An experimental evaluation of ablation devices for the local treatment of the liver resection edge. *Eur J Surg Oncol.* 2005 Jun;31 (5):528-32
- 18 Garcea G, Lloyd TD, Aylott C, Maddern G, Berry DP: The emergent role of focal liver ablation techniques in the treatment of primary and secondary liver tumours. *European Journal of cancer* 39 (2003) 2150-2164
- 19 Gill W, Fraser J, Carter DC: Repeated freeze-thaw cycles in cryosurgery. *Nature* 219 (1968), 410-413
- 20 Goodie DB, Horton MDA, Morris RW, Nagy IS, Morris DL: Anaesthetic experience with cryotherapy for treatment of hepatic malignancy. *Anaesth Intens Care* 1992; 20: 491-496
- 21 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council. NIH Guide, Vol 25, No. 28, 1996
- 22 Hamad G, Neifeld JP: Biochemical, Hematologic, and Immunologic Alterations Following Hepatic Cryotherapy. *Seminars in Surgical Oncology* 1998; 14:122-128
- 23 Helmberger T, Holzkecht N, Schöpf U, Kulinna C, Rau H, Stäbler A., Reiser M: Radiofrequenzablation von Lebermetastasen. *Radiologe* 2001, 41; 69-76
- 24 Inui K, Shimazaki Y, Watanabe T, Kuraoka S, Uesho K, Uchida T, Shiono S: Aprotinin reduces the expression of p-selectin on the surface of platelet and leucocyte-platelet conjugates. *Artif Organs* 1998; 22:1018-22
- 25 Kahlenberg MS, Volpe C, Klippenstein DL, Penetrante RB, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas MA: Clinicopathologic effects of cryotherapy on hepatic vessels and bile ducts in a porcine model. *Ann. Surg. Oncol.* 5 (1998) 713-718
- 26 Kerkar S, Carlin AM, Sohn RL, Steffes C, Tyburski J, Littrup P, Weaver D: Long-term follow up and prognostic factors for cryotherapy of malignant liver tumors. *Surgery, Volume* 136, October 2004, 770-779
- 27 Kollmar O, Richter S, Czyborra J, Menger MD, Kirsch CM, Pistorius GA: Aprotinin inhibits local platelet trapping and improves tissue destruction in hepatic cryosurgery. *Surgery* 2004; 136:624-632
- 28 Kollmar O, Richter S, Schilling MK, Menger MD, Pistorius GA: Advanced hepatic tissue destruction in ablative cryosurgery: potentials of intermittent freezing and selective vascular inflow occlusion. *Cryobiology* 2004; Vol 48, No 3, 263-272
- 29 Kozek-Langenecker SA, Mohammad SF, Masaki T, Green W, Kamerath C, Cheung AK: The effects of Aprotinin on platelets in vitro using whole blood flow cytometry. *Anesth Analg* 2000;90:12-6

- 30 Landis RC, Asimakopoulos G, Poullis M, Thompson R, Nourshsargh S, Haskard DO: Effect of Aprotinin (Trasylol®) on the inflammatory and thrombotic complications of conventional cardiopulmonary bypass surgery. *Heart Surg Forum* 2001, 4 Suppl 1:S35-9
- 31 Luna-Perez P, Rodriguez-Coria DF, Arroyo B, Gonzalez-Macouzet J: The natural history of liver metastases from colorectal cancer. *Arch Med Res.* 1998 Winter; 29(4): 319-24
- 32 Mascarenhas BA, Ravikumar TS: Experimental Basis for Hepatic Cryotherapy. *Seminars in Surgical Oncology* 1998; 14:110-115
- 33 Mayer-Kuckuck P, Banerjee D, Kemeny N, Fong Y, Bertino JR: Molecular Therapies for colorectal cancer metastatic to the liver. *Mol Ther* 2002, 5; 492-500
- 34 Neel HB, Ketcham AS, Hammond WG: Ischemia potentiating cryosurgery of primate liver. *Ann. Surg.* 174; 1971. 309-18
- 35 Neel HB, Ketcham AS, Hammond WG: Cryonecrosis of normal and tumor-bearing rat liver potentiated by inflow occlusion. *Cancer* 28; 1971, 1211-18
- 36 Ng KK, Lam CM, Poon RT, Shek TW, To JY, Wo YH, Ho DW, Fan ST: Comparison of systemic responses of radiofrequency ablation, cryotherapy, and surgical resection in a porcine liver model. *Ann Surg Oncol.* 2004 Jul; 11(7): 650-7
- 37 Onik G, Rubinsky B, Zemel R, Weaver L, Diamond D, Cobb C, Porterfield, B: Ultrasound-guided hepatic cryosurgery in the treatment of metastatic colon carcinoma. Preliminary results. *Cancer* 1991; 67: 901-907
- 38 Onik GM, Cohen JK, Reyes GD, Rubinsky B, Chang Z, Baust J: Transrectal ultrasound-guided percutaneous radical cryosurgical ablation of the prostate. *Cancer* 1993; 72:1291-1299
- 39 Onik GM, Gilbert J, Hoddick W, Filly R, Callen P, Rubinsky B, Farrel L: Sonographic monitoring of hepatic cryosurgery in an experimental animal model. *AJR Am J Roentgenol* 1985; 144:1043-1047
- 40 Pichlmayer R, Weimann A, Tusch G, Schlitt HJ: Indications and role of liver transplantations for malignant tumours. *Oncologist* 1997, 2; 164-170
- 41 Panel on Diagnostic Application of Radioisotopes in Hematology, International Committee for Standardization in Hematology: Recommended Methods for Radioisotope Platelet Survival Studies. *Blood*, Vol. 50, No 6, 1977
- 42 Pereira PL, Clasen S, Boss A, Schmidt D, Gouttefangeas C, Burkart C, Wiskirchen J, Tepe G, Claussen CD: Radiofrequency ablation of liver metastases. *Radiologe* 2004Apr;44(4):347-57
- 43 Pistorius GA, Alexander C, Kirsch CM, Feifel G, Schilling MK, Menger MD: Local Platelet Trapping as the Cause of Thrombocytopenia after Hepatic Cryotherapy. *World J Surg.* 2005 May; 29(5):657-60; discussion 661
- 44 Ramming KP, O'Toole K: The use of the implantable chemoinfusion pump in the treatment of hepatic metastases of colorectal cancer. *Arch. Surg.* 121: 1440, 1986

- 45 Ravikumar TS, Kane R, Cady B, Jenkins R, Clouse M, Steele G: A 5 year study of cryosurgery in the treatment of liver tumours. *Arch Surg* 1991; 126: 1520-1523
- 46 Ravikumar TS, Steele GD Jr: Hepatic cryosurgery. *Surg Clin North Am* 1989; 69: 433-439
- 47 Richter S, Kollmar O, Igna D, Menger MD, Schilling MK, Pistorius GA: Impact of Pringle's manoeuvre during cryosurgery of porcine liver: strategy for reduction of cryotherapy-associated thrombocytopenia? *Kongressband Chirurgisches Forum* 2003; 32:175-7
- 48 Richter S, Pistorius G, Seidel R, Feifel G, Schilling MK, Vollmar B, Menger MD: Arteriovenular Shunting Critically Determines Shutdown of Microcirculation Upon Cryotherapy in Tumor-Bearing Rat Liver. *Annals of Surgical Oncology*, 12 (4): 303-312, 2005
- 49 Rivoire M, Di Cian F, Meeus P, Gignoux B, Frering B, Kaemmerlen P: Cryosurgery as a means to improve surgical treatment of patients with multiple unresectable liver metastases. *Anticancer Res.* 2000;20:3785-3790
- 50 Rodrigues M, Sinzinger H, Thakur ML, Becker W, Dewanjee M, Ezekowitz M, Isaka Y, Martin-Comin J, Roca M, Stratton J: Labelling of platelets with indium-111-oxime: suggested methods. *International Society of Radiolabelled Blood Elements (ISORBE) Eur J Nucl Med* (1999) 26: 1614-1616
- 51 Ross WB, Morris DL, Morris R, Warlters A: Cardiac rhythm disturbances due to caval occlusion during hepatic cryosurgery. *Cryobiology* 1994; 31: 501-505
- 52 Ruers T, Bleichrodt RP: Treatment of liver metastases, an update on the possibilities and results. *Eur J Cancer* 2002 ; 38 : 1023-1033
- 53 Ruers TJ, Joosten J, Jager GJ, Wobbes T: Long-term results of treating colorectal metastases with cryosurgery. *Br J Surg* 2001; 88:844-9
- 54 Sarantou T, Bilchik A, Ramming KP: Complications of hepatic cryosurgery. *Sem Surg Oncol* 1998; 14: 156-162
- 55 Scheele J, Stang R, Altendorf-Hofmann A, Paul M: Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg* 1995, 19 , 59-71
- 56 Schlag PM, Benhidjeb T, Stroszczyński C: Resection and local therapy for liver metastases. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 16; 2002:299-317
- 57 Seifert JK, Springer A, Baier P, Junginger T: Liver resection or cryotherapy for colorectal liver metastases- A prospective case control study. *Int J Colorectal Dis.* 2005 Nov;20(6):507-20. Epub 2005 Jun 23.
- 58 Seifert JK, Morris DL: Prognostic factors after cryotherapy for hepatic metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 1998; 228: 201-208

- 59 Seifert JK, Junginger T, Morris DL: A collective review of the world literature on hepatic cryotherapy. *J.R. Coll. Surg. Edinb.*, 43; June 1998; 141-154
- 60 Seifert JK, Morris DL: Indicators of recurrence following cryotherapy for hepatic metastasis from colorectal cancer
- 61 Seifert JK, Becker J, Burg J, Dutkowski P, Junginger T: Vergleich der lokalen Effektivität und des Metastasierungsverhaltens nach Resektion, Kryotherapie und Lasertherapie an einem Tumormodell der Ratte. *Langenbecks Arch Chir Forumbd*
- 62 Smith JJ, Fraser J, MacIver AG: Ultrastructure after cryosurgery of the rat liver. *Cryobiology* 15; 1978, 426-32
- 63 Stone HH, Long WD, Smith RB 3rd, Haynes CD: Physiologic considerations in major hepatic resections. *Am J Surg* 1969, 117, 78-84
- 64 Taylor I: A critical review of the treatment of colorectal liver metastases. *Clin Oncol* 1982, 8; 149-158
- 65 Thakur ML, Welch MJ, Joist JH, Coleman RE: Indium-111 labeled platelets: Studies on preparation and evaluation of in vitro and in vivo functions. *Thrombosis research*, Vol. 9, pp. 345-357, 1976
- 66 Todorovic-Tirnanic M, Rolovic Z, Bosnjakovic V: Determining the lifespan of platelets labelled with 111-Indium oxinate-first results. *Med Pregl.* 1993;46 Suppl 1:97-9
- 67 Weaver ML, Atkinson D, Zemel R: Hepatic cryosurgery in treating colorectal metastases. *Cancer.* 1995;76: 210-214
- 68 Weaver ML, Atkinson D, Zemel R.: Hepatic cryosurgery in the treatment of unresectable metastases. *Surg. Oncol.* 1995; 4(5):231-6.
- 69 Weber SM, Lee FT, Chinn DO, Warner T, Chosy SG, Mahvi DM: Perivascular and intralesional tissue necrosis after hepatic cryoablation: results in a porcine model. *Surgery* 122 (1997) 742-47
- 70 Williams NN, Daly JM: Infusional versus systemic chemotherapy for liver metastases from colorectal cancer. *Surg. Clin. North Am.*69:401, 1989
- 71 Yoshida T, Okazaki N, Yoshino M, Okhura H, Shimada Y: Phase II trial of high dose recombinant gamma-interferon in advanced hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 1990, 26 ; 545-546
- 72 Zhou XD, Tang ZY, Yu YQ, Hou Z: Current management of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 1991;38:46-55
- 73 Zhou XD, Yu YQ, Tang ZY, Ma ZC: Clinical evaluation of cryosurgery in the treatment of primary liver cancer. Report of 60 cases. *Cancer* 1988; 61: 1889-1892

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jens Czyborra-Brinkmann
Adresse	Thomas-Mann-Strasse 14 66424 Homburg Deutschland
Geburtsdatum	06.06.1971
Geburtsort	Kirchhellen, Deutschland
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familie	Ehefrau: Regina Brinkmann, Assistenzärztin Abteilung für Radioonkologie, Universitätskliniken Homburg Tochter: Anna Thandi Sophie, geboren am 15.07.2006

Schulbildung

06.1977-07.1981	Matthias-Claudius-Grundschule, Kirchhellen
08.1981-06.1990	Heisenberg Gymnasium, Gladbeck

Zivildienst

08.1990-10.1992	Chirurgie, St. Barbara Hospital Gladbeck
-----------------	--

Hochschulbildung

11.1992-10.1998	Universität Lübeck: Studium der Humanmedizin
03.1995	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.1997	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12.1998	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktische Ausbildung

10.1997-02.1998	Chirurgie: Baragwanath Hospital, SOWETO, Südafrika
02.1998-05.1998	Innere Medizin: Universitätsklinik Lübeck, Onkologie
06.1998-09.1998	Radiodiagnostik: Kantonsspital Bruderholz, Basel, Schweiz

Berufliche Ausbildung

04.1999-10.2000	Arzt im Praktikum Innere Medizin, Prof. Dr. Fehm, Universität Lübeck
01.2001-11.2005	Assistenzarzt Nuklearmedizin, Prof. Dr. Dr. Kirsch, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg
seit 12.2005	Assistenzarzt Diagnostische Radiologie, Prof. Dr. Bücken, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg

Veröffentlichungen

Wissenschaftlicher Vortrag auf dem DGN-Kongress 2003: Czyborra J, Richter S, Kollmar O, Pistorius G, Alexander C, Kirsch C M : Thrombozytenüberlebenszeit und Abbauort nach Kryotherapie der Leber beim Schwein, Kongressband DGN 2003

Kollmar O, Richter S, Czyborra J, Menger MD, Kirsch CM, Pistorius GA: Aprotinin inhibits local platelet trapping and improves tissue destruction in hepatic cryosurgery. *Surgery* 2004; 136:624-632

Kollmar O, Richter S, Schilling MK, Menger MD, Pistorius GA: Advanced hepatic tissue destruction in ablative cryosurgery: potentials of intermittent freezing and selective vascular inflow occlusion. *Cryobiology* 2004; Vol 48, No 3, 263-272

Richter S, Kollmar O, Igna D, Menger MD, Schilling MK, Pistorius GA: Impact of Pringle's manoeuvre during cryosurgery of porcine liver: strategy for reduction of cryotherapy-associated thrombocytopenia? *Kongressband Chirurgisches Forum* 2003; 32:175-7

Danksagungen

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Kirsch für die Möglichkeit die vorliegende Doktorarbeit in der Klinik für Nuklearmedizin durchführen zu können.

Herrn PD Dr. Alexander danke ich für seine Hilfsbereitschaft und Kollegialität.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kollegen, Herrn Dr. Otto Kollmar und Herrn Dr. Sven Richter für die hervorragende Zusammenarbeit und wertvollen Ratschläge während der gemeinsamen Arbeit.

Herrn Professor Dr. Menger aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie danke ich für die Möglichkeit die Tierexperimente in seiner Abteilung durchführen zu können.

Herrn Professor Dr. Samnick danke ich für Mut und Zuspruch während der langen Nächte.

Meiner Frau Regina danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis während der Versuche und an den Wochenenden sowie für ihre Geduld und Weisheit.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Universität des Saarlandes zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Bestimmung der Thrombozytenlebenszeit und des Thrombozytenabbauortes nach Kryotherapie der Leber“ aus der Abteilung für Nuklearmedizin unter der Betreuung von Prof. Dr. Dr. C.M. Kirsch selbständig verfasst und ohne sonstige Hilfe durchgeführt habe. Weiterhin habe ich bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt.

Ich habe die Dissertation bisher an keiner in – oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht und versichere, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in dem Publikationsorgan Surgery and Cryobiology sowie dem Kongressband Chirurgisches Forum veröffentlicht. Ferner wurden die Ergebnisse als Vortrag auf dem DGN-Kongress vorgestellt.

Homburg, 05.09.2006