

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Tobias Keck

**„In-vivo Untersuchung der Wirkung der
Kaltplasmakoagulation auf Lunge und Dünndarm“**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von

Anita Ulrich

aus Crivitz

Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Hoffmann
2. Berichterstatter: Priv. -Doz. Dr. med. Hermann Heinze

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 29.06.2017

Promotionskommission der Sektion Medizin

Meine Dissertation widme ich meiner Mama, Angelika Ulrich:

Wir werden Dich liebe „Mammi“ nie vergessen, denn Alles Schöne haben wir durch Dich besessen!

Dein Dich ewig liebender „grüner Apfel mit einer roten Stelle“

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1 Das Pleuramesotheliom	1
1.1.1 Ätiologie.....	1
1.1.2 Asbestvorkommen und historische Daten	1
1.1.3 Statistische Daten	2
1.1.4 Mesotheliome - Die klinischen Herausforderungen	2
1.1.5 Therapieoptionen.....	5
1.2 Peritonealkarzinose und Primärtumore des Peritoneums	15
1.2.1. Statistische Daten.....	15
1.2.2 Diagnosestellung- Ein Wettlauf gegen die Zeit	17
1.2.3.Therapieoptionen.....	17
1.3 Fragestellung	23
2 Materialien und Methoden.....	24
2.1 Ethik und Tierschutzgesetz.....	24
2.2 Tiere.....	24
2.3 Zellen	25
2.4 Versuchsmodell.....	25
2.4.1 Thorakale Versuchsreihe	26
2.4.2 Abdominelle Versuchsreihe	28
2.5 Methoden	29
2.5.1 Anlegen einer Zellkultur in vitro	29
2.5.2 Ermittlung der Zellkonzentration mittels der Neubauer Zählkammer	29
2.5.3 Kaltplasmakoagulation	29
2.5.4 Prä- und intraoperative Vorbereitungen	33
2.5.5 Operationsverfahren	34
2.5.6 Postoperatives Management	37

2.5.7 Nachsorgeschema	37
2.5.8 Gewinnung der Proben und Herstellung von histologischen Präparaten	38
2.5.9 Auswertung der histologischen Präparate	40
2.5.10 Statistische Auswertung.....	40
3 Ergebnisse	41
3.1 Nachsorge.....	41
3.2 Makroskopische Untersuchungen (mit Videodokumentation)	43
3.2.1 Entstehung von Adhäsionen nach der Anwendung von Kaltplasma	44
3.2.2 Postoperative Rate an entzündlichen Infiltraten	45
3.2.3 Geringe Gefahr der Perforation und Fistelbildung nach Anwendung von Kaltplasma.....	46
3.2.4 Nebeneffekt der Serosa-Ablösung während der Applikationsphase der Kaltplasmakoagulation.....	48
3.2.5 Handhabung des Soering 1000 System.....	49
3.3 Histologische Untersuchungen	50
3.3.1 Abhängigkeit der Eindringtiefe des Kaltplasmas von dem applizierten Energilevel.....	50
3.3.2 Einfluss des Gasfluss auf die Eindringtiefe des Kaltplasmas.....	57
4 Diskussion	58
4.1 Kaltplasmakoagulation: Ergebnisse dieser Studie und Ausblicke	58
4.2 Kaltplasmakoagulation in der Therapie des Pleuramesotheliomes und der Peritonealkarzinose.....	60
4.3 Vergleich der Methode der Kaltplasmakoagulation mit anderen experimentellen therapeutischen Verfahren	62
4.3.1 Laser	62
4.3.2 Mono- und bipolare Koagulation	62
4.3.3 Argonplasmakoagulation	62
4.4 Kritische Wertung der Daten.....	63
5 Zusammenfassung	66
6 Literaturverzeichnis.....	67

7 Anhang	77
7.1 Grundlegende Daten zur Einteilung und zur Therapieoption des malignen Pleuramesotheliomes.....	77
7.2 Votum des Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume.....	79
7.3 Geräte	82
7.4 Reagenzien	83
8 Danksagungen	85

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Das Pleuramesotheliom

Das maligne Mesotheliom ist ein Tumor, der von den auskleidenden Häuten des gesamten Innenraumes des Thorax ausgeht. Dazu gehören die parietale und die viszerale Pleura. Hierbei sind die mesothelialen und submesothelialen Zellen die Ausgangszellen des malignen Tumors. Die Pleura stellt in über 80 Prozent den Ursprung der Mesotheliome dar [1]. Charakteristisch für diesen malignen Tumor ist das oberflächliche Wachstum. Diese Art von Tumoren stellt die Medizin nach wie vor vor große Herausforderungen [2].

1.1.1 Ätiologie

Die Asbestexposition ist klar assoziiert mit der Entstehung eines Mesotheliomes, dabei wurde nachgewiesen, dass der Stoff Krokodolith-Asbest eine wesentliche Rolle spielt [3]. In circa 90 Prozent ist Asbest die Ursache für die Entstehung eines Mesotheliomes. Die Latenzzeit von Exposition bis zur Tumorentstehung beträgt circa 20 bis 40 Jahre [4]. Die Inhalation der sogenannten „Asbestfasern“ ist dabei das gefährliche Agens und stellt ein hohes Risiko für die Entwicklung einer Asbestose und ein 100-fach höheres Risiko für die Entstehung eines Mesothelioms dar [5].

1.1.2 Asbestvorkommen und historische Daten

Der Einsatz von Asbest als Werkstoff war in unserer Gesellschaft weit verbreitet, da Asbest gegen Ende des 18. Jahrhundert und vor allem im 19. Jahrhundert in großem Stil in den verschiedensten industriellen Bereichen verarbeitet wurde. Für die Werkstoff-, Bau- und Textilindustrie spielte es eine wesentliche Rolle aufgrund seiner widerstandsfähigen Eigenschaften. Anwendungen fand es beispielsweise in Asbestzement, Fußbodenbelägen, verschiedensten Bauplatten und Rohrsystemen. Auch in der Automobilindustrie war Asbest weit verbreitet. Besonders in Brems- und Kupplungsbelägen wurde Asbest verarbeitet [5]. Seit 1936 sind die Asbestose und seit 1943 der asbestbedingte Lungenkrebs anerkannte Berufserkrankungen. Erst seit Mitte der sechziger Jahre wurden die ersten Menschen mit Asbestose oder asbestbedingtem Lungenkrebs von der Berufsgenossenschaft entschädigt. Trotzdem stieg der

Asbestverbrauch in der Bundesrepublik Deutschland von 1940 bis Mitte der Siebziger Jahre stetig an, „...mit einem Asbestverbrauch-Maximum von 180'000 Tonnen pro Jahr Mitte der Siebziger Jahre...“ [5]. Der Asbestverbrauch eines Landes korreliert mit der Häufigkeit der Mesotheliome [4].

1.1.3 Statistische Daten

Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass die Inzidenz der Mesotheliome weltweit ansteigt [6].

Die Inzidenz in Deutschland liegt im Mittel pro Jahr bei 20 je 1 Millionen Einwohner. Nach beruflicher Asbestexposition steigt das Erkrankungsrisiko ein Mesotheliom zu bekommen circa um den Faktor 40 im Vergleich zur Normalbevölkerung [2]. Die Inzidenzen steigen in Europa, Japan und Australien seit den letzten Jahren immer weiter an und der erwartete Häufigkeitspeak weltweit liegt im Zeitraum zwischen 2010-2040. In Deutschland wird dieser Peak für 2015-2020 erwartet [2].

Die

Tabelle 1 veranschaulicht diese Fakten noch einmal.

Land	Peak (Jahr/Zeitraum)	Inzidenz bei Peak (Erkrankungen pro 1 Million)
Australien	2010	40
Großbritannien	2016	38
Deutschland	2015-2020	20
Frankreich	2020-2040	20
USA	2010	15
Japan	2025-2033	15
Spanien	2016	11
Niederlande	2028	10

Tabelle 1: Inzidenzen und Häufigkeitsgipfel/Peak der Mesotheliomerkrankungen weltweit, modifiziert nach [2]

1.1.4 Mesotheliome - Die klinischen Herausforderungen

Aufgrund der langen Latenz, den unspezifischen und spät auftretenden Symptomen, stellt

die korrekte Diagnose eine besondere Herausforderung dar. In 90 Prozent der Fälle sind die Dyspnoe und der Thoraxschmerz die häufigsten Symptome [7, 8]. Der Thoraxschmerz kann darauf hinweisen, dass der Tumor schon die Brustwand infiltriert, denn dadurch kann es zu einer Reizung der Intercostalnerven kommen [2]. Andere aber seltener Symptome sind Müdigkeit (36%), Angst (29%), Husten (22%), Schwitzen (22%) und in 22% Verstopfung [7]. Reizhusten und ein Spontanpneumothorax kommen eher selten vor [2].

Meistens sind persistierende und/oder rezidivierende Pleuraergüsse die Initialbefunde [9, 10, 11]. Wenn ein Patient einen einseitigen Pleuraerguss hat und im Röntgen Thorax Pleuraverdickungen zu sehen sind, muss als Differentialdiagnose das Mesotheliom ausgeschlossen werden [11]. Die Berufsanamnese und die Frage nach einer Asbestexposition sollten unbedingt ein essentieller Bestandteil der Anamnese sein [10].

In der Regel wird als Basisdiagnostik die konventionelle Röntgendiagnostik mit Röntgen des Thorax in zwei Ebenen (p.a., seitlich), angewendet [9]. Sie reicht allerdings nicht als alleinige Diagnostik aus. Die Computertomographie des Thorax (CT/HRCT) ist nicht nur unverzichtbar sondern auch weiterhin Goldstandard um die Tumorausdehnung zu bewerten und vergrößerte Lymphknoten nachzuweisen [2]. Die Magnetresonanztomographie und die Positronen-Emission-Tomographie-CT haben ebenfalls durch die Beantwortung spezieller Fragestellungen, wie Invasion der Weichteilstrukturen des Thorax und dem Vorliegen intrathorakaler Lymphknotenmetastasen und Vorliegen von Fernmetastasen, einen Stellenwert in der bildgebenden Diagnostik [2, 8].

Unter den Methoden der invasiven Diagnostik empfehlen *die European Respiratory Society* und *die European Society of Thoracic Surgeons* in Ihrer gemeinsamen Richtlinie die Durchführung einer Thorakoskopie mit Probenentnahme zur Diagnosesicherung [10]. Die Thorakoskopie bietet zusätzlich den Vorteil, dass die Operabilität gut beurteilt werden kann [12].

Zur histologischen Diagnosesicherung ist es aufgrund der Heterogenität des Erscheinungsbildes der Mesotheliome empfohlen, dass ein speziell in Lungenkrankheiten ausgebildeter Histopathologe hinzugezogen wird. [10] Weitere immunhistochemische Untersuchungen können in enger interdisziplinärer Kooperation ebenfalls wegweisend sein [10].

Die bildgebende und die invasive Diagnostik sind die Grundbausteine für das korrekte Staging zur Einteilung der Mesotheliome entsprechend der *Tumor-Node-Metastasis-*

Klassifikation (TNM) der *Union internationale contre le cancer* (UICC) [8, 10, 13].

1.1.5 Therapieoptionen

Eine zügige Diagnose und eine individuell angepasste Therapie sind für die Patienten überlebensnotwendig, da die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung momentan bei circa 9-12 Monaten liegt [1]. Die Fünfjahresüberlebensrate des unbehandelten malignen Pleuramesotheliomes liegt bei unter 1 Prozent [13].

Es stellten sich in mehreren multizentrischen Studien positive und negative Prognosefaktoren heraus. Als Faktoren, die ein positives Outcome bedingen wurden Alter unter 75 Jahre, das weibliche Geschlecht, epitheloider Tumorsubtyp in der Histopathologie, niedriges Tumorstadium, Appetitlosigkeit, keine Schmerzen, guter Allgemeinzustand, niedriger Hämoglobingehalt, Laktatdehydrogenase von $<500 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$ und Leukozyten $<8,3 \cdot 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ nachgewiesen [10].

Aufgrund der erst spät auftretenden und unspezifischen Symptome werden die meisten Mesotheliome erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, so dass für die Mehrzahl der Patienten oft nur ein palliativer Therapieansatz in Frage kommt. Dies ist in den Tabellen 7.1.1 bis 7.1.3 im Anhang genauer dargestellt. Nur einer sorgfältig selektierten Patientengruppe stehen Therapieoptionen in der Vorstellung eines möglicherweise kurativen Ansatzes zur Verfügung. So steht die Palliation immer noch im Mittelpunkt der Therapie des malignen Pleuramesotheliomes [7]. Symptomkontrolle und Lebensqualität sind Schlüsselwörter, die für die Patienten und deren behandelnde Ärzte eine maßgebliche Rolle spielen [2, 7, 14, 15].

Chemotherapie

Die systemische Chemotherapie ist eine palliative Therapieoption für die meisten Patienten mit malignen Mesotheliomen. Die richtige Bewertung der vorhandenen Studien ist diffizil, da aufgrund der geringen Patientenzahlen evidenzbasierte Aussagen schwierig zu treffen sind. Die objektive Tumorreduktion kann bei weniger als 20 Prozent der Betroffenen, die eine Chemotherapie erhalten haben, verzeichnet werden, ohne dabei die Überlebenszeiten signifikant zu verlängern [10, 13].

Cisplatin wird häufig als Monosubstanz eingesetzt [13]. Es gibt Hinweise aus einer Phase III Studie mit 456 Patienten von Vogelzang, Rusthoven und Symanowski et al., dass eine Kombinationstherapie aus Pemetrexed und Cisplatin das mittlere Überleben von 9,3 Monaten (bei Cisplatin-Monotherapie) auf 12,1 Monate steigern kann [7]. Aus diesem

Grund hat sich diese Kombination als Standard first-line Chemotherapie beim malignen Pleuramesotheliom durchgesetzt [16]. Verschiedenste andere Wirkstoffkombinationen werden derzeit in klinischen Studien getestet.

Die Möglichkeit der Durchführung einer Chemotherapie ist verbunden mit einem relativ guten Allgemeinzustand der Patienten (Karnofsky-Index >60 Prozent oder ECOG-Status <3). In der Onkologie werden dazu sowohl eine sogenannte „Karnofsky performance status scale“ verwendet, als auch der Eastern Cooperative Oncology Group Index (ECOG), die die Fähigkeit zur Bewältigung der Aktivitäten des täglichen Lebens durch die Patienten bewerten [17, 18, 19].

In der first-line Therapie werden Kombinationen mit Platin, Pemetrexed und Raltitrexed eingesetzt. Beim Fortschreiten der Erkrankung sollte diese Therapie abgebrochen werden. Sind Patienten Responder der first-line Therapie und haben prolongierte Symptome sollte das gleiche Schema als second-line Chemotherapie wiederholt werden [7].

Die Chemotherapie ist oft ein Bestandteil des multimodalen Therapiekonzeptes und wird sowohl neoadjuvant als auch adjuvant eingesetzt. Es gibt keine Evidenz für die Verwendung dieser beiden Konzepte. Die aktuelle Studienlage zeigte, dass die Anwendung einer adjuvanten- oder neoadjuvanten Chemotherapie zu keinem Unterschied in den Überlebensraten führte. Der Vorteil der adjuvanten Chemotherapie ist, dass bereits das Tumorstadium bekannt ist. Andererseits sind Betroffene mit geplanter adjuvanter oder palliativer Therapie nach einer Operation oft noch sehr geschwächt, so dass die Durchführung aller Zyklen der Chemotherapie häufig nicht möglich ist [20].

Strahlentherapie

Auch diese therapeutische Option wird zu palliativen Zwecken angewendet. So dient die Strahlentherapie in erster Linie der Symptomkontrolle und der Schmerzlinderung. Die prophylaktische Applikation von Strahlen zur Lokalrezidivkontrolle nach chirurgischen Interventionen (Thorakoskopie) wird ebenfalls empfohlen, wobei die Wertigkeit dieses therapeutischen Ansatzes kontrovers diskutiert wird [2, 10]. In der europäischen Richtlinie zum Management des malignen Pleurmasotheliomes von 2010 wird dazu Stellung genommen und es werden weitere größere Studien empfohlen, um weitere Evidenz zu generieren [2, 21].

Die Strahlentherapie ist Baustein verschiedener multimodaler Therapiekonzepte. Verschiedene Autoren zeigten in ihren Arbeiten, dass eine Radiatio nach extrapleuraler Pleuropneumektomie (EPP) die Lokalrezidivrate statistisch signifikant reduzierte [10]. Die prophylaktische Bestrahlung des Hemithorax nach extrapleuraler Pneumektomie wurde in mehreren Studien angewandt [20, 22, 23].

Die potentiellen Komplikationen durch die Radio-Toxizität einer Bestrahlungstherapie werden weiterhin kontrovers diskutiert. Dies gilt insbesondere für Patienten ohne Pneumonektomie, da hier ein deutlich höheres Risiko einer Strahlenpneumonitis nach radikaler Strahlentherapie nachgewiesen wurde [20, 21].

Auf der 11. internationalen Konferenz der *International Mesothelioma Interest Group* (IMIG) in Boston 2012 wurde durch Marc de Perrot ein interessantes und vielversprechendes Konzept vorgestellt. Dieses beinhaltete die vorläufigen Ergebnisse einer Studie, bei der eine neoadjuvante modulierte hypofraktionierte Hemithorax-Radiatio und eine extrapleurale Pleuropneumektomie innerhalb von zwei Wochen durchgeführt wurden. In dieser Studie wurde bisher noch kein Toxizitätslevel 3 nach dem NCI Common Toxicity Index [24] beobachtet [20]. In wie fern dieser Ansatz Einfluss auf die Morbidität, die Letalität und die Überlebensrate hat, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Chirurgische Therapie

Bis dato gibt es keine genauen Aussagen über die Einzel-Effekte der chirurgischen Therapie, die man gut bewerten könnte, da die Selektion der Patienten in den Studien unterschiedlich vorgenommen wurde. Es besteht eine große Variationsbreite in der Auswahl der Ein- und Ausschlusskriterien. Erschwerend kam hinzu, dass die chirurgische Therapie immer nur ein Teil eines multimodalen Therapiekonzeptes war und so der Einfluss der chirurgischen Therapie nur sehr eingeschränkt quantifiziert werden konnte [13, 14, 22].

Insgesamt hat die Chirurgie einen zentralen Stellenwert in der Therapie des malignen Pleuramesothelioms. Sie ist in allen Phasen der Therapie (Diagnosestellung und Staging, kurativer Ansatz, Palliation) von großer Bedeutung. Die *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) veröffentlichte 2011 dazu, die in

Tabelle 2 dargestellten Zahlen [25].

Indikation zur Durchführung operativer Maßnahmen nach Ansicht der befragten Chirurgen	Anteil der angewendeten Maßnahme in Prozent
Diagnostik	98%
Staging	82%
Zytoreduktive Chirurgie (Therapie)	85%
Palliation (Therapie)	71%

Tabelle 2: Zentrale Rolle der Chirurgie in der Diagnostik und Therapie des malignen Pleuramesothelioms [16]

Eine Übersicht der Stellung der Chirurgie gaben Klikovits et al. 2013 [26]. Eine vereinfachte **Abbildung 1** ist unten dargestellt.

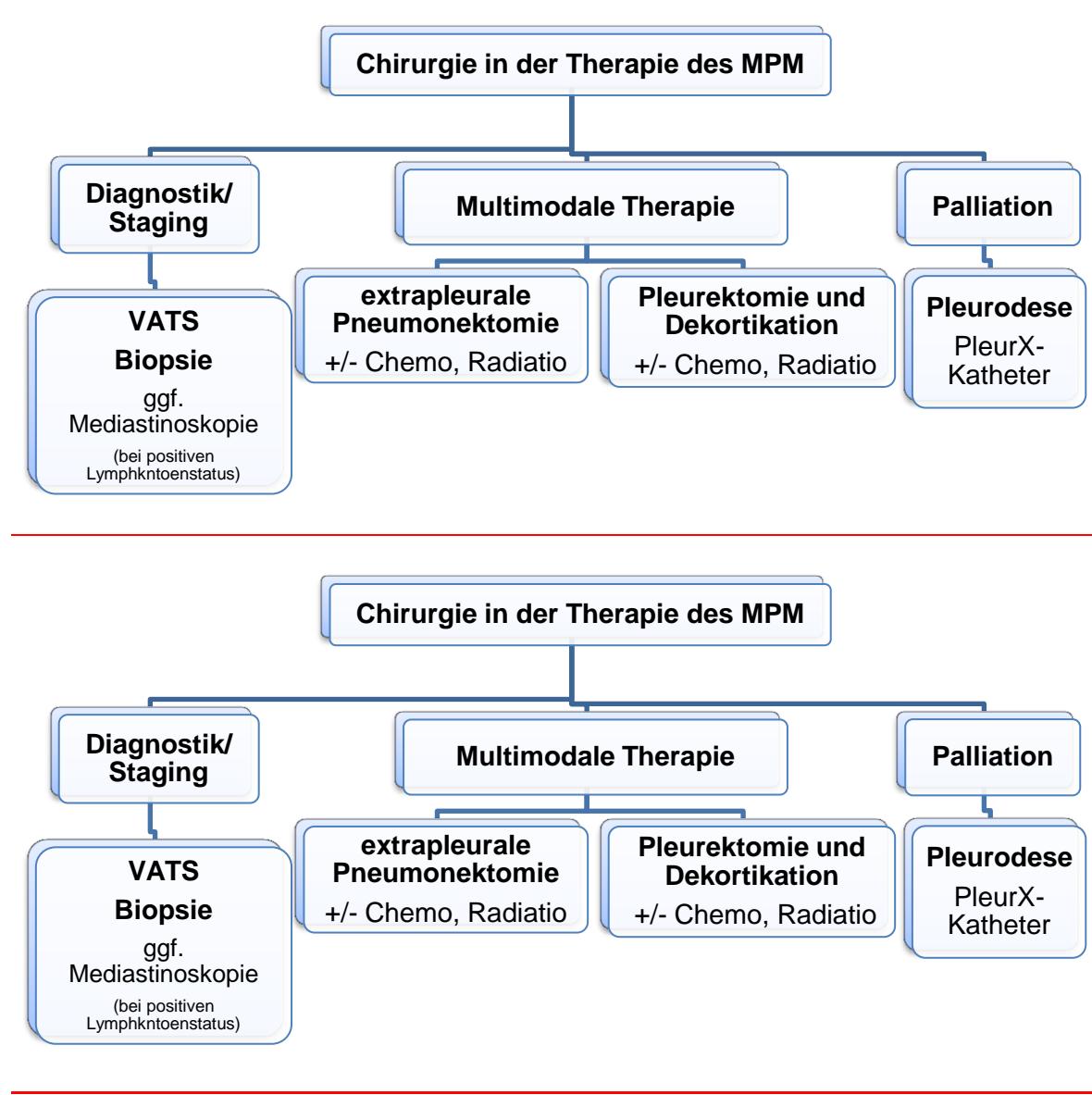


Abbildung 1: Zentrale Stellung der Chirurgie in der Therapie des Pleuramesothelioms, nach [26]

Trotz der vielen Varianten der chirurgischen Verfahren, die derzeit in den Studien untersucht werden, gibt es zwei Verfahren, die in einer Vielzahl von Zentren im Rahmen eines radikalen Therapieregimes durchgeführt wurden und werden. Dies sind die Pleurektomie und Dekortikation (P/D) und die extrapleurale Pleuropneumektomie (EPP) [20, 26].

Diese Verfahren können über eine Thorakotomie und über eine Video-assistierte-Thorakoskopie (VATS) realisiert werden. Wobei die VATS mit einer geringeren Morbidität einhergeht und deshalb wenn möglich bevorzugt wird [7].

Pleurektomie und Dekortikation (P/D)

Bei diesem Verfahren wird die parietale und viszerale Pleura reseziert ohne dabei das Perikard oder das Zwerchfell mit zu entfernen [2, 13, 26]. Das Perikard und das Zwerchfell werden bei der erweiterten Pleurektomie/Dekortikation zusätzlich mit entfernt, gemäß der Nomenklatur der *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) und der *International Mesothelioma Interest Group* (IMIG) von 2011. Diese Erweiterung kommt bei ausgedehnteren Befunden zum Einsatz [25, 26].

Die aktuelle Studienlage gibt keine klaren Empfehlungen in welchen Stadien die P/D angewendet werden soll, aber es gibt Konstellationen in der diese Therapieform angeraten wird. Dazu gehören Patienten mit deutlichen Herz- und Lungenfunktionsstörungen, sowie Betroffene, die eine radikalere extrapleurale Pleuropneumektomie aufgrund ihrer Co-Morbiditäten nicht zugänglich sind und Menschen, bei denen eine makroskopische Resektion des Tumors nicht erreicht werden kann [13, 20]. Die Pleurektomie und Dekortikation ist ein lungenerhaltendes Verfahren, mit dem trotzdem eine maximale Zytoreduktion erreicht kann [27].

Blutungen, Nachblutungen und die postinterventionelle prolongierte Lungenfistel („air leak“) gelten als bedeutende Komplikationen. Die perioperative Mortalität beträgt nach Sugarbaker und Wolf 1 bis 5 Prozent und mit einem sogenannten „prolongierten air leak“ in 4 bis 10 Prozent der Fälle [27].

Als videoassistierte thorakoskopische Pleurektomie und Dekortikation beträgt die mittlere Überlebensrate der Patienten 14-16 Monate. Die 3- und 5-Jahresüberlebensraten liegen zwischen 16 und 9 Prozent [26].

Extrapleurale Pneumonektomie (EPP)

Bei diesem chirurgischen zytoreduktiven Verfahren werden en-bloc die Lunge, die parietale und viszerale Pleura sowie das Perikard und das Zwerchfell reseziert. Dabei werden das Perikard und das Zwerchfell mit Netzen (Gore-Tex und Vicryl) rekonstruiert [26]. Die Morbidität und potentielle Mortalität dieses Verfahrens erfordert eine gewissenhafte Selektion der Patienten, die unter strengen Kriterien ausgesucht werden sollten [28, 29].

Es wird berichtet, dass mit dieser Technik mediane Überlebensraten von bis zu 20 bis 25 Monaten erreicht werden können [26, 27]. Flores et al. zeigten mit ihrer vergleichenden Studie, dass die Rezidivrate bei den Patienten nach extrapleuraler Pneumonektomie mit 33 Prozent deutlich geringer war, als bei denen, mit Pleurektomie und Dekortikation (65 Prozent) [26, 30]. Ein Grund hierfür könnte sein, dass man bei der extrapleuralen Pneumonektomie den Primärtumor und das gesamte umliegende Gewebe mit entfernt.

Bei der extrapleuralen Pneumonektomie ist eine adjuvante hochdosierte Strahlentherapie, aufgrund der Entfernung der betroffenen Lunge gut möglich. Nähere Erläuterungen hierzu wurden bereits im Abschnitt Strahlentherapie Seite 6 beschrieben. Jedoch wurde durch verschiedene Autoren nachgewiesen, dass dieses operative Verfahren mit mehr und deutlich schwereren postoperativen Komplikationen assoziiert war. Die Morbiditätsrate betrug zwischen 12 und 48 Prozent. Dieses Verfahren stellt mehr Anforderungen an die Patienten. Die perioperative Mortalität reicht von 1 bis 12 Prozent. Für diese Operation wird daher besonders empfohlen, es nur an in der Technik besonders erfahrenen Zentren durchzuführen, um die Mortalität und Morbidität bei entsprechender Expertise zu begrenzen [26, 29, 31].

Weiterhin steht die extrapleurale Pneumonektomie (EPP) immer wieder in der Kritik inwieweit Radikalität und Nutzen in einem angemessenen Verhältnis zueinander stehen. Die MARS-Studie, „clinical outcomes of the Mesothelioma and Radical Surgery“ [32], musste vorzeitig beendet werden, da die vorläufigen Ergebnisse vermuten lassen mussten, dass die Patienten, die im Rahmen dieser Studie einer extrapleuralen Pneumonektomie zugeführt worden sind, einen Überlebensnachteil im Vergleich zu der Gruppe ohne extrapleurale Pneumonektomie hatten [32]. Diese randomisierte Therapiestudie bestand aus zwei Patientengruppen. Die eine Gruppe erhielt zuerst Chemotherapie, dann wurde die extrapleurale Pneumonektomie durchgeführt und im Anschluss erfolgte eine Strahlentherapie. Bei der zweiten Patientengruppe wurde die extrapleurale Pneumonektomie ersetzt durch andere aggressive chirurgische Verfahren.

Die Ergebnisse wurden kritisch beleuchtet und verglichen mit ähnlichen Studien. In der MARS-Studie wurde ein medianes Überleben von 14,4 Monaten beobachtet. Nach der Analyse aller Ergebnisse der Studien wurde festgestellt, dass ein anderer Startzeitpunkt bei der Marsstudie verwendet wurde. Daher müssen 3,6 Monate zu diesem Ergebnis dazugerechnet werden, um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien anstreben zu können [20, 31, 32].

Multimodale Konzepte

Nach deutlich verbesserten Langzeitresultaten in vielen Studien, ist es üblich die einzelnen Therapieoptionen miteinander zu kombinieren, was zu multimodalen Konzepten führt. Die multimodale Therapie beinhaltet die chirurgische Therapie, z.B. die extrapleurale Pneumonektomie oder die Pleurektomie und Dekortikation, in Kombination mit neoadjuvanten oder adjuvanten Maßnahmen, wie der Radiatio, Chemotherapie und Immuntherapie [7, 10, 16, 20, 26].

Wenn durchführbar wurde die extrapleurale Pneumonektomie durch manche Autoren bevorzugt, da sie unter multimodalem Regime Überlebensraten von 10 bis 35 Monaten erreichen kann. Für die Pleurektomie und Dekortikation werden ähnliche Überlebensraten berichtet [23, 27]. Die medianen Überlebensraten könnten unter Anwendung der multimodalen Therapie gesteigert werden. Allerdings konnte die peri- und postoperative Morbidität im Rahmen eines solchen Modells nicht gesenkt werden [10]. In dem Review-Artikel von Weder et al. wird über ein medianes Überleben von bis zu 29 Monaten unter trimodaler Therapie berichtet [20]. Diese Trimodale Therapie umfasste eine Induktionschemotherapie, extrapleurale Pleuropneumektomie und eine adjuvante Hemithorax-Strahlentherapie [20, 33].

Der multimodale Therapieansatz ist aufwendig, erfordert ein hohes Maß an Compliance und hat trotz aller Bemühungen eine relevante Morbidität und Mortalität. Daher sollten die Patienten, die dieser Therapieoption zugeführt werden, sehr sorgfältig ausgewählt werden.

Die Morbidität und insbesondere die Mortalität der Pleurektomie und Dekortikation sind signifikant niedriger, so dass die meisten chirurgischen Zentren in den letzten zwei Dekaden einen Schwenk weg von der Pneumonektomie hin zu lungenparenchymsparenden Eingriffen mit Pleurektomie und Dekortikation vollzogen haben. Problematisch für eine definitive Festlegung ist die geringe Inzidenz des

Krankheitsbildes und die Durchführung der Therapie in spezialisierten Zentren, die im sehr heterogenen Patientengut sehr unterschiedliche Therapieansätze verfolgen. Eine Vergleichbarkeit liegt somit nicht oder nur in geringem Ausmaß vor.

Chirurgie: Intracavitäre/intraoperative Strategien

Intraoperative photodynamische Therapie

Bei dieser Methode wird intraoperativ eine fotosensible Substanz verabreicht. Nach erfolgter Operation (EPP oder P/D), wird Licht einer bestimmten Wellenlänge lokal appliziert. Dies führt zur Produktion von Sauerstoff, der mit Zellen Reaktionen ein geht. Nach einer Kaskade an Stoffwechselreaktionen kommt es zum Zelltod. [20] Man weiß, dass der direkte Zelltod, die verringerte Neovaskularisierung und die Einleitung einer Immunantwort gegen den Tumor, die wichtigsten Wirkmechanismen darstellen. [34] Es werden mediane Überlebensraten von bis zu 31 Monaten angegeben. [34, 35]

Auf der IMIG Konferenz 2012 berichteten Friedberg -et al. von Überlebensraten bis zu über 50 Monaten nach einer intraoperativen photodynamischen Therapie nach Pleurektomie und Dekortikation [34]. Es handele sich um Patienten einer bestimmten Gruppe, die ein N0-Stadium und einen epitheloiden Subtyp hatten [20]. Diese Pilotstudie wurde an 20 ausgewählten Patienten durchgeführt und die Ergebnisse müssen in größeren Studien noch weiter belegt werden [26, 35].

Hyperthermische thorakale Chemotherapie (HITOC)

Auch diese intraoperative Option wird derzeit in klinischen Studien erforscht. Das Prinzip dieser Therapie nach erfolgter EPP oder P/D, ist die intracavitäre Gabe von Chemotherapeutika (z.B. Cisplatin). Eine Übersicht gibt der Artikel von Hoffmann et al. 2010 [28].

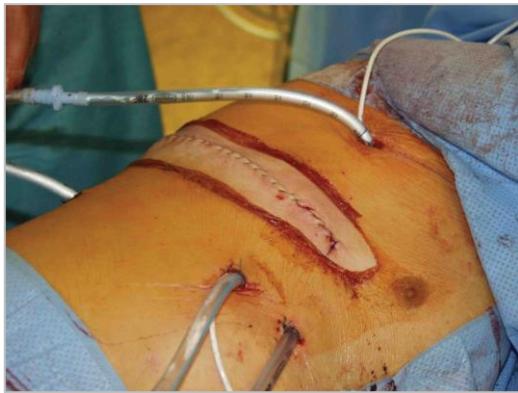


Abbildung 2: Klinisches Bild der hyperthermen Chemoperfusion [28]

Die Ratio für die Anwendung dieser Methode ist, dass hohe Konzentrationen eines Chemotherapeutikums an den gewünschten Ort appliziert werden kann, mit deutlich geringerer systemischer Verteilung der Substanz. Die Wirksamkeit ist dabei abhängig von der Penetration des Chemotherapeutikums [13]. Das Ziel dieser Therapie ist es, eine maximale auch mikroskopische Tumorzellreduktion und somit ein längeres Rezidiv freies Intervall zu erlangen [13, 20, 26].

Zellos et al. berichteten nach einer Phase I Studie mit HITOC (Cisplatin) nach extrapleuraler Pleuropneumektomie über mittlere Überlebensraten von 26 Monaten [36]. Tillemann et al. veröffentlichten im August 2009 Daten aus einer prospektiven Studie mit HITOC (Cisplatin) nach EPP. Die mittlere Überlebensrate betrug hier jedoch 12,8 Monate [37]. 2012 beschrieb Ried et al. eine mittlere Überlebensrate von 18 Monaten bei Patienten nach einer Therapie mit HITOC nach erweiterter Pleurektomie und Decortikation [38]. Nachteil dieser Methode ist, dass die Operationsdauer deutlich verlängert ist und dementsprechend die postoperativen Komplikationen zunehmen könnten. Des Weiteren muss ein längerer intensivstationärer Aufenthalt mit einberechnet werden [20, 26].

1.2 Peritonealkarzinose und Primärtumore des Peritoneums

Bei der Peritonealkarzinose handelt es sich in den meisten Fällen um die Infiltration von Malignomzellen in das Peritoneum. In der Regel ist die Peritonealkarzinose die Folge einer bestehenden bösartigen Tumorerkrankung, ausgehend von anderen Organsystemen [39]. Sehr häufig sind gastrointestinale und gynäkologische Tumoren der Ursprungsort. Dabei spielt das kolorektale Karzinom eine zentrale Rolle, da es die häufigste Tumorerkrankung des Gastrointestinaltraktes darstellt [40].

Weitere Primärtumoren, wie das Ovarialkarzinom, Appendixtumoren (zum Beispiel Pseudomyxoma peritonei), Magenkarzinom und primär auftretende Peritoneal-Karzinome, spielen ebenfalls eine Rolle [41, 42].

1.2.1. Statistische Daten

Zwanzig Prozent aller im *Eindhoven Cancer Registry* (ECR) registrierten kolorektalen Tumoren weisen eine Metastasierung auf. Die Peritonealkarzinose macht etwa 23 Prozent der Metastasierung aus [43]. In circa 4,7 Prozent aller Tumoren ist eine Peritonealkarzinose schon bei der Diagnosestellung vorhanden [43, 44]. In circa 56 Prozent haben die Erkrankten zusätzlich zur Peritonealkarzinose noch andere Metastasierungen. Diese Gruppe ist etwas jünger als die Betroffenen die nur eine Peritonealkarzinose aufwiesen [44, 45].

Bei den anderen Primärtumoren kann das Auftreten einer Peritonealkarzinose eine andere Gewichtung haben. So haben bei einem Ovarialkarzinom 60-80 Prozent der Betroffenen bei Erstdiagnose eine Peritonealkarzinose [46]. Weitere Zahlen sind aus der **Tabelle 3** Seite 16 ersichtlich.

Primarius	Auftreten der Peritonealkarzinose in Prozent
Kolorektales Karzinom	15-20 (isoliert) 20-30 (mit anderen Lokalisationen, z.B. Leber)
Magenkarzinom	10-20 (Erstdiagnose) 30-40 (T3N+-Status bei dem Primärtumor) 40-50 (Rezidiv)
Ovarialkarzinom	60-80 (Erstdiagnose), 55-75 (Rezidiv)
Pankreaskarzinom, Cholangiozelläres Karzinom	5-10
Cancer of unknown Primary (CUP), Mamma- und Nierenkarzinom, retroperitoneale Sarkome	< 5

Tabelle 3: Auftreten der Peritonealkarzinose bei verschiedenen Tumorentitäten [46]

Die Inzidenz der Erkrankung ist in dem Zeitraum von 1995 bis 2008 annähernd konstant geblieben mit 2-3/100 000 Erkrankten pro Jahr. Es wurde allerdings in dieser Zeit ein Anstieg der Inzidenz bei Frauen dokumentiert, von ca. 2,3 auf 2,9/100 000 Erkrankten pro Jahr. Seit Mitte 2006 sind die Inzidenzraten von Männern und Frauen in etwa gleich hoch (2,6-2,9/100 000 Erkrankten pro Jahr) [44, 45].

In verschiedenen Analysen zeigten sich bestimmte Faktoren, die ein höheres Risiko für eine Peritonealkarzinose beim kolorektalen Karzinom aufweisen. Dazu gehören „jüngere“ Erkrankte, weibliches Geschlecht, rechts betont befallenes Colon, steigender T- und N-Status, wenig bis undifferenzierte Tumoren und eine muzinöse/adenomatöse Histologie [35].

Die mittlere Überlebensrate für Erkrankte mit Peritonealkarzinose als einzige Absiedlung bei kolorektalen Karzinomen mit lediglich best supportive care beträgt circa 6 bis 11 Monate (2002-2008). Damit liegt dieser Wert unter den Patienten mit Lebermetastasen, bei denen eine mittlere Überlebensrate von 11 bis 14 Monaten (2002-2008) nachgewiesen wurde [35].

1.2.2 Diagnosestellung- Ein Wettlauf gegen die Zeit

Die Peritonealkarzinose stellt ebenfalls wie das Pleuramesotheliom eine Herausforderung in der Detektion dar.

Symptome – Erste Anzeichen bei der Peritonealkarzinose

Auch hier sind es nicht pathognomonische Anzeichen, die den behandelnden Ärzten gegenüberstehen, sondern erneut eine Reihe von unspezifischen Symptomen und Befindlichkeitsstörungen, die den Weg zur Diagnose erschweren. Dabei stellen die (Sub-) Ileus-Symptomatik bei zum Beispiel Darmstenosen (Bauchschmerzen, Obstipation, Übelkeit usw.) sowie das Auftreten von Aszites (Bauchumfangsvermehrung) einzelne Bausteine auf dem Weg zur Diagnose dar [46].

Die nicht invasiven diagnostischen Maßnahmen zum Staging, wie die Magnetresonanztomographie, die Computertomographie des Abdomen und die Positronen-Emission-Tomographie (PET-CT) spielen eine wichtige Rolle in der Diagnostik und beim Staging [41, 46]. Es besteht jedoch eine geringe Sensitivität beim Nachweis kleinerer Tumormassen im Bereich des Peritoneums und so ist es schwieriger diese bildmorphologisch sichtbar zu machen [42]. So sind invasive Verfahren, wie die diagnostische Laparoskopie und die Laparotomie, weiterhin unverzichtbare Mittel um ein objektives und umfassendes Bild der Erkrankung zu bekommen. Diese Verfahren stellen nach wie vor den Goldstandard in der Diagnosestellung und Feststellung des Ausdehnungsverhaltens einer Peritonealkarzinose dar [42, 45].

1.2.3.Therapieoptionen

Auch bei dieser malignen Erkrankung gab es in den letzten Jahren deutlich Entwicklungen bei der multimodalen Therapie. Bis dato war die Therapie von Patienten mit Peritonealkarzinose äußerst limitiert. Meist beschränkte sie sich auf palliative Maßnahmen, wie palliative Resektionen, Metastasen-Entferungen (selten) und palliative Radiochemotherapie [46, 47].

Palliative Therapie/ systemische Chemotherapie

In der **Tabelle 4** auf Seite 18 ist ersichtlich wie sich die prozentuale Verteilung der palliativen Maßnahmen beim kolorektalen Karzinom mit Peritonealkarzinose und Lebermetastasen in dem Zeitraum von 1995 bis 2010 verändert hat [43]. Dabei fällt auf, dass sich der Anteil der systemischen Chemotherapie in diesem Zeitrahmen mehr als verdoppelt hat [43]. Dieser Effekt liegt wahrscheinlich an einer grundlegenden Veränderung der verwendeten Chemotherapeutika. Der therapeutische Standard war immer weniger eine Monotherapie mit 5-Fluoruracil sondern Kombinationstherapien neuerer Chemotherapeutika (Oxaliplatin, Irinotecan) und Biologika/Biologicals (Bevacizumab, Cetuximab und Panitumumab) [41, 43, 48]. Die Überlebensraten konnten von circa 12 Monaten auf bis zu 22,4 Monate in Kombination mit Biologika gesteigert werden [49].

Palliative Therapieoptionen	1995-1999 N=105	2000-2004 N=134	2005-2010 N=201
Palliative Resektionen	60 %	54 %	41 %
Metastasektomie	1 %	3 %	2 %
Radiatio	5 %	6 %	4 %
Systemische Chemotherapie	22 %	37 %	49 %

Tabelle 4: Anteil der palliativen Therapieoptionen von Patienten mit Peritonealkarzinose und Lebermetastasen bei kolorektalem Karzinom in einem Zeitraum von 1995-2010 [43]

Insgesamt zeigte sich eine gebesserte Überlebensrate bei Patienten, die sich einer systemischen Chemotherapie unterzogen haben, im Vergleich zu denen, die keine Chemotherapie erhielten. Weiterhin nahm der Anteil an palliativen Resektionen ab. Ein Grund dafür könnte sein, dass sich die mittlere Überlebensrate der Patienten hierdurch nicht verbesserte [43].

Als therapeutische Option steht für den größten Anteil der Betroffenen mit Peritonealkarzinose nur eine Palliation zur Verfügung [46] und trotz aller Neuerungen bleibt die Prognose dieser Patienten weiterhin auf einem geringen Level [43].

Doch in den letzten Jahren zeigte sich, dass durchaus der kurative Gedanke in Form von

multimodalen Ansätzen angestrebt werden kann, wenn auch nur für ein selektiertes Patientenkollektiv [43, 44, 47]. Diese Gruppe umfasst circa ein Drittel der Patienten mit Peritonealkarzinose [43].

Multimodale Konzepte

Diese multimodalen Konzepte zielen darauf ab, den Tumor lokal zu kontrollieren und die Überlebensraten zu erhöhen. Dabei werden eine zytoreduktive Chirurgie (CRS), die hypertherme intraperitoneale Chemotherapie (HIPEC) und eine systemische Chemotherapie miteinander kombiniert [42, 50].

Dieser Ansatz gilt als chirurgisch aggressivere Variante, da nicht nur die größtmögliche Zytoreduktion, „...komplette makroskopische chirurgische Zytoreduktion...“ [46], sondern auch die größtmögliche lokale zytotoxische Wirksamkeit der Chemotherapeutika erreicht werden soll. Dies stellt nicht nur große Herausforderungen an die behandelnden Ärzte sondern vor allem an die Patienten. Daher ist es notwendig und sinnvoll eine sorgfältige Selektion der Patienten vor zu nehmen [41]. In genau ausgearbeiteten Protokollen hat die *Peritoneal Surface Malignancy Group International* (PSOGI) zu den Auswahlkriterien in Bezug auf das kolorektale Karzinom Stellung genommen [38, 42].

Folgende internationale Kriterien spielen eine wichtige Rolle in der Selektion:

Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status von ≤ 2 [19], begrenzte Peritonealkarzinomatose, bis zu drei resektable Lebermetastasen, keine extraabdominalen Metastasen, keine Gallenwegsobstruktion, keine Obstruktion der ableitenden Harnwege, maximal nur eine Stelle mit Darmwegobstruktion, kein ausgedehnter Dünndarmbefall, geringe Tumormasse im Bereich des Ligamentum hepatogastricum, *Peritoneal Cancer Index (PCI)* unter 20 für das kolorektale Karzinom, der PCI für Magenkarzinom sollte unter 10 sein, biologisches Alter und Komorbiditäten (Herz- und Lungenerkrankungen) [41, 46, 48, 51].

Zwei dieser Kriterien müssen näher erläutert werden. Zum einen der *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status* siehe auf Seite 6 und zum anderen der *Peritoneal Cancer Index (PCI)* als semi-quantitativer Score. Er dient der Selektion, indem eine Aussage darüber getroffen werden kann, wie ausgedehnt der Tumorbefall ist [52, 53]. Die Zytoreduktion spielt für das multimodale Therapiekonzept eine zentrale Rolle. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen PCI und Überlebensrate nach multimodaler Therapie nachgewiesen werden. Je niedriger der PCI, desto besser war das

Langzeitüberleben der Patienten mit Peritonealkarzinomatose bei kolorektalem Karzinom [52, 53]. Der PCI bezieht die Tumorlokalisierung und Tumorausdehnung bzw. das Infiltrationsausmaß mit in den Score ein. Dies ist in der **Abbildung 3** auf Seite 20 näher dargestellt. Je nach Lokalisation und Ausdehnung werden Punkte von 0 bis 39 vergeben.

Region	Ausdehnung	
0 zentral	-	
1 rechst oben	-	
2 epigastrisch	-	
3 links oben	-	
4 linke Flanke	-	
5 links unten	-	
6 Becken	-	
7 rechts unten	-	
8 rechte Flanke	-	
9 oberes Jejunum	-	Ausmaß der Infiltration
10 unteres Jejunum	-	LS 0 kein Tumor
11 oberes Ileum	-	LS 1 < 0,5 cm
12 unteres Ileum	-	LS 2 > 5,0 cm
		LS 3 > 5,0 cm oder konfluierend



Das Diagramm zeigt links einen schematischen menschlichen Körper mit einer 3x3-Gitterlinien-Klassifizierung der Bauchwand in 9 Regionen (1-9). Rechts ist eine anatomische Zeichnung des menschlichen Verdauungstrakts dargestellt, der aus Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Rectum besteht. Verschiedene Ziffern (1, 9, 19) markieren spezifische Lokalisationen innerhalb dieser Strukturen, die für die PCI-Klassifizierung relevant sind.

Abbildung 3: Peritonealkarzinose Index [52, 53]

Nach ausführlicher Selektion der Patienten wurden postoperative Morbiditätsraten zwischen 25 und 41 bis 50 Prozent, je nach Studie, veröffentlicht [46, 48]. Die Mortalität wird mit zwischen 1 und 6 bis 12 Prozent angegeben [46, 48, 51]. In Zentren, die viele Erfahrungen haben stellt sich die Datenlage deutlich besser dar. Es werden dann Letalitätsraten von maximal bis zu 3 Prozent angegeben [46].

Zytoreduktive Chirurgie (CRS)

Bei der zytoreduktiven Chirurgie steht die komplette makroskopische Entfernung des Tumorgewebes im Zentrum. Aufgrund der Heterogenität der verschiedenen Tumoren haben sich im Laufe der Zeit mehrere operative Verfahren entwickelt [46]. In verschiedensten Therapiestudien zeigte sich, dass es sehr wichtig ist den Primarius ausfindig zu machen. Die Peritonealkarzinose verhält sich in Ausbreitung und Prognose je nach Primarius unterschiedlich [35]. Die selektive parietale Peritonektomie (SPP) und komplett (inklusive viszeralen) Peritonektomie werden je nach Ausbreitungsmuster der Tumor-Aussaat

angewendet. Die selektive parietale Peritonektomie wird eher bei einer lokalen parietalen Ausbreitung angewendet. Dieses Verteilungsmuster findet man, z. B beim Magenkarzinom als Primarius. Die komplette Peritonektomie wird bei eher ausgedehnteren Verteilungsmustern, wie beim Pseudomyxoma peritonei, dem diffusen malignen Mesotheliom und dem muzinösen kolorektalen Karzinom bevorzugt [42]. Diese Operationsverfahren sind aufwendig und stellen hohe Anforderungen an die durchführenden Chirurgen. Protokolle und festgelegte Prinzipien im Vorgehen sollen die standardisierte Versorgung der Patienten und eine Vergleichbarkeit der Verfahren gewährleisten [54, 55, 56, 57]. Organ(teil)resektionen gehören oft in das operative Setting, so dass die Operation je nach Tumor unterschiedlichste Ausmaße annehmen kann. Damit verbunden steigen die Operationszeiten sowie intra- und postoperative Risiken je nach individueller Situation [46]. Während und nach dem operativen Verfahren wird das Ergebnis mit Hilfe eines Scores eingeteilt. Dieser *Completeness of Cytoreduction Score* (CCR) ist in **Tabelle 5** dargestellt [51]. Dieser Score ist für die Effektivität der zytoreduktiven Chirurgie von enormer Wichtigkeit. Es stellte sich heraus, dass CCR-0 und CCR-1 wichtige prognostische Faktoren sind, die direkt an das Überleben der Patienten gekoppelt sind [58].

Score-Nummer	Ausdehnung des Resttumorgewebes in mm
CCR-0	Kein sichtbarer Resttumor
CCR-1	$\leq 2,5$ mm
CCR-2	2,5 mm - 2,5 cm
CCR-3	$>2,5$ cm

Tabelle 5: Completeness of Cytoreduction Score (CCR-Score) [51]

Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie (HIPEC)

Die mikroskopische Zytoreduktion, in Form der hyperthermen-intraoperativen Chemotherapie, wird im Anschluss der Operation in derselben Sitzung durchgeführt. Dabei wird über Drainagen eine hohe Konzentration Zytostatika lokal appliziert. Die Chemotherapeutika perfundieren die oberen Zellschichten und sollen so die nicht

sichtbaren Tumorzellen zerstören [46, 50, 51, 59, 60]. Die Eindringtiefe beträgt circa 1 bis 2 mm [48]. Die Perfusionsdauer liegt je nach verwendetem Protokoll zwischen 30 bis 120 Minuten. Es konnte gezeigt werden, dass eine intraoperative Hyperthermie, Zielwert 41-43°C [46, 51], die Gewebepenetration der Chemotherapeutika erhöht und somit die Wirkung einiger dieser Substanzen verbessern kann [46, 60, 61, 62].

Im multimodalen Setting aller drei vorgestellten Anteile ist eine mittlere Überlebensrate von 62,7 Monate möglich, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 51 Prozent, wobei die Patientengruppen ohne multimodalen Therapieansatz 5-Jahres-Überlebensraten von circa 13 Prozent erreichten [60, 63].

1.3 Fragestellung

Die Nullhypothese war, dass die Applikation der Kaltplasmakoagulation auf den serösen Häuten der thorakalen und der abdominalen Organe nicht möglich sei und zum Beispiel nicht mit dem Auftreten enteraler oder pulmonaler Fisteln sowie Organnekrosen assoziiert war.

Weiterhin wurde postuliert, dass es keine lineare Abhängigkeit zwischen der Eindringtiefe der Kaltplasmakoagulation und der angelegten Generatorleistung bestand.

Zu diesen Fragestellungen lagen zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente keine *in vivo* Daten auf dem Darm und der Lunge vor, jedoch konnten wir wahrscheinliche Wirkungen der Technik aus den Daten für die Zulassung des Medizinproduktes und aus der klinischen Anwendung auf anderen Organen ableiten.

Vor Durchführung der Interventionen erfolgte eine Planung der statistischen Auswertung und eine entsprechende Beratung in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. hum. biol. Claudia Hemmelmann aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Ziegler).

2 Materialien und Methoden

2.1 Ethik und Tierschutzgesetz

Das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig - Holstein genehmigte am 19.01.2010 unter dem Zeichen V 312-72241.122-7 das Versuchsvorhaben „Untersuchung des Einsatzes der Kaltplasmakoagulation im Rahmen der Behandlung des Pleuramesothelioms und auf der Oberfläche des Darms“ von Schweinen nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG). Dies beinhaltete ebenfalls die Genehmigung der Tötung der Tiere zur Erhebung von Daten im Rahmen des Versuchsmodell gemäß des Tierschutzgesetzes. Nach Abschluss des Vorversuches, der an zwei Tieren durchgeführt wurde, und Darlegung der daraus folgenden Ergebnisse wurde die Verwendung weiterer Tiere am 01.07.2010 bewilligt.

2.2 Tiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um speziell gezüchtete, weibliche, erwachsene Minipigs von der Firma Ellergaard aus Dänemark. Das durchschnittliche Alter bei dem Erwerb der Tiere betrug 22-24 Monate, mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 33 bis 35 Kilogramm. Die Tierpfleger der Gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck sorgten für die artgerechte Haltung und Versorgung der Tiere. Die Minipigs wurden auf dem dafür vorgesehenen Außengelände der Gemeinsamen Tierhaltung im Freien, sowie in Gruppen- und Einzelboxen mit freiem Zugang zur Nahrung und Wasser gehalten. Vor dem ersten operativen Eingriff hatten die Minipigs eine Akklimatisierungsphase an ihre neue Umgebung, diese betrug jeweils etwa 14 Tage.

Der Aufbau des Thorax und des Abdomens sowie dessen Relation zum Körpergewicht von Menschen und Schweinen sind vergleichbar. Demzufolge ist der Einsatz von Schweinen zur Etablierung und Überprüfung von medizinischen Verfahren gebräuchlich. Die Anatomie von gewöhnlichen Hausschweinen und Minipigs ist nahezu identisch. Für diese Pilotstudie wurden Minipigs ausgewählt, da das Studiendesign einen relativ langen Überlebenszeitraum vorsah und so die Gewichtsentwicklung im Vergleich zu

herkömmlichen Hausschweinen besser zu kontrollieren war. Minipigs haben die Besonderheit aufgrund spezieller Züchtungsverfahren nur eine bestimmte Größe bzw. Gewicht erreichen zu können. Aus diesem Grund eignen sie sich speziell für wissenschaftliche Untersuchungen. Zum Zeitpunkt des Erwerbs der Tiere hatten diese ihr Endgewicht erreicht.

2.3 Zellen

Es wurde die humane Zelllinie MSTO-211H (ATCC-Nc.:CRL-2081) von ATCC (Manassas, VA, USA) verwendet. Diese wurden in Kooperation mit dem chirurgischen Forschungslabor der Universität zu Lübeck in einer Zellkultur angezüchtet und die Teilerpotenz festgestellt.

Die Verwendung einer humanen statt einer tierischen Zellreihe ist insofern zu erklären, als das es aktuell keine tierischen Zellreihen für das Pleuramesotheliom gibt. Schweine haben im Vergleich zum Menschen eine viel geringere Lebenserwartung, so dass die Entwicklung eines Pleuramesothelioms unwahrscheinlich ist.

2.4 Versuchsmodell

Die Versuchsreihe umfasste insgesamt 16 Minipigs und wurde in einen Vorversuch mit zwei - und die Hauptversuchsreihen mit 14 Minipigs aufgeteilt. Der Vorversuch diente der Überprüfung der Durchführbarkeit der Pilotstudie. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden dem Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein vorgelegt, welches daraufhin die Hauptversuchsreihe bewilligte. Das Design des Vorversuches war kongruent zu der Hauptversuchsreihe, welche im Folgenden beschrieben wird. Die operativen Interventionen fanden alle im Transfer-Operationssaal der Universität zu Lübeck statt.

Für die Durchführung der Operationen wurden die gleichen Operationsinstrumente benutzt, wie die täglich zum Einsatz kommenden Instrumente der Chirurgie und der Thoraxchirurgie.

Der Umfang der Pilotstudie umfasste verschiedene Lokalisationen und Organe und jeweils dazu mehrere operative Eingriffe, so dass die Tiere primär in zwei verschiedene

Gruppen eingeteilt wurden.

Dabei wurden bei der Thorax-Gruppe zusätzlich Proben des Zwerchfells, des Perikard und der Pleura parietalis entnommen. Bei der Abdomengruppe wurden dagegen Proben des Dünndarms, der Leber, der Milz und der Nieren entnommen.

2.4.1 Thorakale Versuchsreihe

Die Thoraxgruppe umfasste 8 Minipigs (T1 - T8). Bei diesen Tieren wurde ein Pleuramesotheliom induziert und die Behandlung mit Kaltplasma auf der Pleura viszeralis und parietalis im Rahmen der Therapie des Mesothelioms durchgeführt werden. Dazu wurde die Zellreihe MSTO-211H erworben und im chirurgischen Labor im UKSH-Campus Lübeck angezüchtet. Zehn Tage vor der ersten operativen Intervention wurde eine immunsuppressive Therapie, mit Hilfe von Prednisolon®, Sandimmun® und Myfortic in gewichtsadaptierter und für Schweine angepasster Dosis eingeleitet und im weiteren Verlauf fortgeführt.

Im ersten Eingriff wurde über einen minimal-invasiven thorakoskopischen Zugangsweg eine Suspension von $2 \cdot 10^8$ Mesotheliomzellen, mit maligner Potenz und anhaltender Wachstumstätigkeit, in die linke Thoraxhälfte eingebracht. Dieser Vorgang ist in der **Abbildung 4** dargestellt.



Abbildung 4: Instillation von Zellsuspension zwischen Pleura viszeralis und -parietalis während einer Thorakoskopie

Die Dauer dieses Eingriffes betrug, einschließlich Eröffnung und Verschluß des Thorax, im Durchschnitt 25-30 Minuten. Alle Eingriffe erfolgten unter endotrachealer Intubationsnarkose, begleitet von einer kontinuierlichen, intravenösen Anästhesie und Analgesie. Als Schmerzprophylaxe wurde eine postoperative Analgesie mittels Novalgin angewendet.

Im Intervall von mindestens 14 Tagen (im Mittel 14 bis 16 Tage) erfolgte eine diagnostische Thorakoskopie zur Feststellung eines induzierten Pleuramesothelioms. Dabei wurden die entsprechenden Proben entnommen, histologisch untersucht und ausgewertet. Es konnten bei zwei Tieren Inseln von Pleuramesotheliomzellen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf konnten keine großflächigen Pleuramesotheliome nachgewiesen werden. Daraus folgte die Schlussfolgerung, dass der Versuchsaufbau grundlegend überdacht werden musste, da eine konstante Induktion nicht gelungen war.

Der zugrunde liegende Gedanke der Übertragung von thermischer Energie auf eine Oberfläche, wie z.B. der Pleura, Dünndarm oder anderen Geweben, war davon unbeeinträchtigt weiterhin von Interesse, da die Kaltplasmakoagulation in diesem Rahmen noch nicht wissenschaftlich untersucht wurde. Es erfolgte somit analog des Studienprotokolls die direkte Anwendung von Kaltplasmakoagulation auf gesunder Pleura viszeralis.

Es erfolgte daher eine thorakoskopische Intervention, in der die kontaktlose Applikation der Energie (in nachstehend beschriebener Weise siehe 2.5.3 Kaltplasmakoagulation) im Bereich der gesunden Pleura viszeralis/parietalis vorgenommen wurde. Dabei wurde bei allen acht Versuchstieren nach 12-16 Tagen im Rahmen einer erneuten Thorakoskopie die rechte Lunge mit Kaltplasmakoagulation behandelt [64, 65].

Nach weiteren 16 Tagen wurden beide Lungen im Rahmen einer explorativen Thorakotomie auf Gewebeschäden (Fisteln, Entzündungsreaktion und Nekrosen) klinisch untersucht und Proben entnommen [64, 65].

Noch im perfundierten Zustand erfolgte eine erneute Applikation von Kaltplasmakoagulation auf noch unbehandelten Stellen der Pleura visceralis und des Zwerchfells [64]. Diese Anwendung sollte Aufschluss darüber geben, wie die initiale Eindringtiefe und der initiale Schaden durch Anwendung der Kaltplasmakoagulation war.

Im Laufe dieser Operation wurde, nachdem zuvor die Terminierung der tief narkotisierten und analgosedierten Schweine mit 10 ml T61® (MSD Animal Health, Unterschleissheim/Deutschland) stattfand, beide Lungen explantiert und die Proben der behandelten Organe entnommen [66].

Die Proben wurden histologisch aufgearbeitet und ausgewertet.

2.4.2 Abdominelle Versuchsreihe

Die Abdomengruppe umfasste ebenfalls 8 Minipigs (A1 - A8). Hierbei unterschied sich das Vorgehen insofern, als dass im ersten laparoskopischen minimal-invasiven Eingriff direkt die Kaltplasmakoagulation auf den Dünndarm appliziert wurde. Im Intervall von 12-16 Tagen erfolgte eine Laparotomie mit Detektion der betroffenen Dünndarmabschnitte und Inspektion entstandener intraabdomineller Operationsfolgen. Es wurden Proben entnommen. In gleicher Sitzung erfolgte ebenfalls eine erneute Applikation von Energie an der Leber und der Milz. Nach Terminierung der tief narkotisierten und analgosedierten Tiere mit 10 ml T61® wurde die Entnahme von allen vorher detektierten und im Verlauf markierten Gewebeproben zur histologischen Auswertung durchgeführt.

2.5 Methoden

2.5.1 Anlegen einer Zellkultur in vitro

Das Verfahren zum Anlegen einer Zellkultur in vitro wurde unter sterilen Bedingungen an einem sterilen Laborarbeitsplatz durchgeführt. Die humane Zelllinie MSTO-211H CRL-2081 wurden kryo-gefroren geliefert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit dem Medium RPMI 1640 zusammengeführt. Zusätzlich wurde 10 prozentiges FCS-Gold und eine 1 prozentige Penicillin/Streptomycin Mischung (100x) hinzugegeben. Diese Suspension wurde mit Hilfe von Zellkulturböden in Flaschen mit luftdurchlässigem Verschluss der Firma Sarsted kultiviert. Je nach Zellwachstum wurden 6-8 Flaschen mit Zellkulturböden verwendet. Nach ausreichendem Wachstum wurde die Zellsuspension mit dem Enzym, Trypsin-EDTA (1x) UV-irradiated, behandelt, um die Zellen vom Zellkulturboden abzulösen. Danach erfolgte eine Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung [67].

2.5.2 Ermittlung der Zellkonzentration mittels der Neubauer Zählkammer

Aus der nun etwa 20 ml umfassenden Suspension wurde eine kleine Menge (ca. 1-2 ml als Origonaltype) abpipettiert. Diese wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf den Faktor 1:10 verdünnt. Zur Bestimmung der Zellzahl verwendete man die Neubauerzählkammer [68, 69]. Es wurden 4 Großquadrate zum Auszählen ausgewählt und daraus der Mittelwert bestimmt. Dieser Wert wurde mit einem entsprechenden Faktor (Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Kammerhöhe) multipliziert, um die Zellzahl pro Volumeneinheit zu ermitteln. Des Weiteren multipliziert man diese Zellzahl pro Volumeneinheit mit dem Faktor 10, um die ursprüngliche Menge des Originaltypes zu erhalten. Dieser Wert entspricht der Zellzahl in 1 ml Lösung. Die ursprüngliche Lösung betrug 20 ml und so musste mit dem Faktor 20 multipliziert werden um die absolute Zellzahl zu erhalten. Grundsätzlich betrug die zu implantierende absolute Zellzahl 2×10^8 Zellen.

2.5.3 Kaltplasmakoagulation

Für diese Studie wurde das Gerät *Soering 1000 System* (Soering, Quickborn/Germany) der Firma Söring GmbH verwendet, siehe **Abbildung 5**. Die Kaltplasmakoagulation ist

nur ein Teil des Gerätes. Das Soering 1000 System wird in einigen medizinischen Bereichen eingesetzt: Allgemeinchirurgie, Neurochirurgie, Leberchirurgie, Schilddrüsenchirurgie, Thoraxchirurgie, Gynäkologie und Hals-Nasen-Ohrenheilkunde [70].



Abbildung 5: Soering 1000 System, a) (links) Steuereinheit, b) Applikator

Das Prinzip dieses geprüften und zertifizierten Medizinproduktes ist es, thermische Energie über einen Plasmastrahl auf eine Oberfläche zu übertragen und dabei einen thermischen Reiz zu setzen. Der Plasmastrahl besteht aus zwei Komponenten. Die erste Komponente ist eine Hochfrequenz-Spannung, die durch einen Hochfrequenzgenerator erzeugt wird. Das Trägermedium für diesen Hochfrequenzstrom ist Heliumgas und stellt die zweite Komponente dar. Dieser Plasmastrahl gelangt als Verschiebestrom von der Oberfläche zurück zum Generator. Eine kontaktlose Übertragung bzw. Koagulation ist durch den ionisierten, reinen Heliumstrahl möglich siehe **Abbildung 6** [70].



Abbildung 6: Kontaktlose Applikation der Kaltplasmakoagulation auf einer Dünndarmschlinge

Die Applikationsstellen der Organoberflächen wurden immer nach dem im Folgenden beschriebenen, standardisierten Schema aufgesucht und behandelt.

Bei der Pleura-Versuchsreihe wurden die 8 Zielstellen der Pleura viszeralis an Hand der natürlichen Grenzen der Lungenlappen ausgesucht. Dabei befanden sich jeweils 4 Applikationsstellen am Ober- und Unterlappen, die im Uhrzeigersinn angeordnet wurden.

In der Dünndarmgruppe wurde der Situs in vier Quadranten unterteilt. Es wurde immer oben rechts (vom Tier aus gesehen) begonnen und dann im Uhrzeigersinn die Kaltplasmakoagulation weitergeführt. Jeder Quadrant des Situs enthielt zwei Applikationsstellen, eine mediale und eine laterale Dünndarmstelle siehe **Abbildung 7** auf der Seite 31.

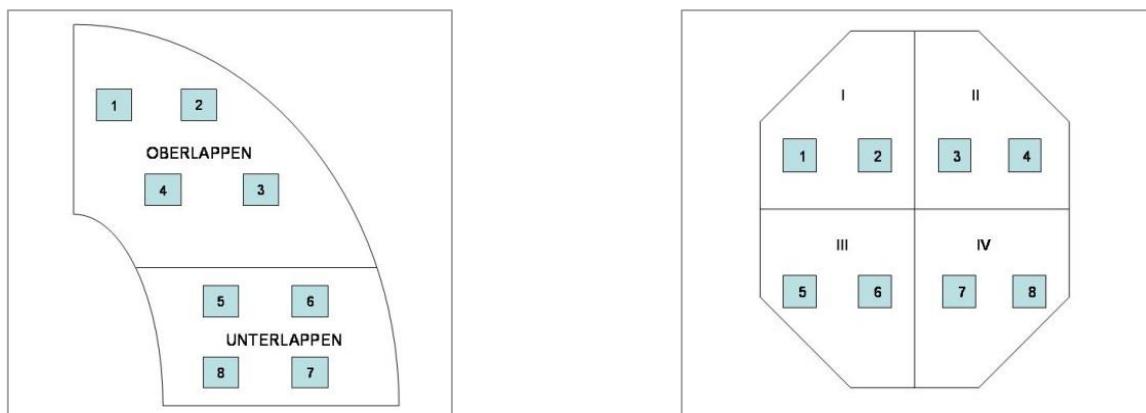


Abbildung 7: Einteilung der (7a) (links) Pleura viszeralis der rechten Lunge und (7b) der Dünndarmoberfläche im Abdomen der Tiere. Die Ziffern 1 bis 8 stellen die Applikationsstellen dar. Die Ziffern I bis IV stehen für die Quadranten des Abdomens in Abbildung 7b

Der Abstand zum Gewebe während der Applikation betrug 1-2 cm. Das behandelte Areal umfasste eine Fläche von bis zu 2 cm^2 und die Applikationsdauer des Plasmastrahls betrug bis zu 4 Sekunden, wobei der Plasmastrahl jeweils nur äußerst kurz an einer Stelle verweilte **Abbildung 8**.

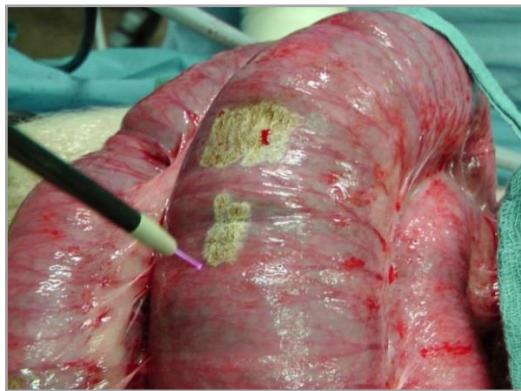


Abbildung 8: Darstellung der Fläche der behandelten Areale am Beispiel des Dünndarmes

Die Bewegung mit dem Applikator wurde mäanderförmig, wie in **Abbildung 9** dargestellt, durchgeführt, um eine gleichmäßige Eindringtiefe zu erreichen.

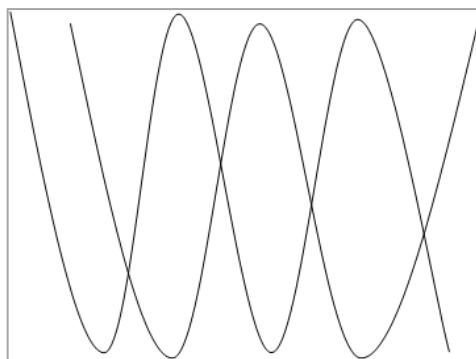


Abbildung 9: mäanderförmige Bewegung des Applikators während der Applikation des Kaltplasmastrahls

Das Soering 1000 System verfügt über mehrere vordefinierte Leistungsstufen. Es wurde jede voreingestellte Stufe (1-5) des Soering 1000 System und drei studienspezifische Energilevel (6, 7, 8) auf die oben beschriebene Weise standardmäßig bei jedem Tier appliziert (**Tabelle 6**).

CPC-Stufe	Energie in Watt	Gasfluss in Liter
1	10	1
2	20	1,5
3	50	2
4	75	2,5
5	100	3
6	50	3,5
7	75	3,5
8	100	3,5

Tabelle 6: Applizierte Kalplasmakoagulationsstufen mit definierter Gasfluss

Die Kaltplasmakoagulation kann potentiell je nach Einstellung ebenso für die intraoperative Blutstillung verwendet werden. Die Effektivität richtet sich dabei nach dem verwendeten Energilevel und der Einstellung des Gasflusses. Dabei bedarf es lediglich des Applikators und des Verbindungskabels zum Hauptgerät. Einer zusätzlichen Nullelektrode bedarf es nicht. Die übertragene Energie wird direkt über den Plasmastrahl kontaktlos appliziert. Somit ist theoretisch unter anderem eine kontrollierte Blutstillung ohne übermäßige Gewebeschäden möglich [70].

2.5.4 Prä- und intraoperative Vorbereitungen

Während der gesamten Versuchsreihe wurde die Entwicklung der Minipigs beider Gruppen mittels Gewichtskontrollen und Nahrungsaufnahmeverhalten in Kooperation mit den Mitarbeitern der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck streng beobachtet.

In der thorakalen Versuchsreihe wurden alle Minipigs 10 Tage vor dem ersten Eingriff mittels Sandimmun®, Prednisolon® und Myfortic, in für Schweine angepasster und gewichtsadaptierter Dosierung, entsprechend vorbehandelt. Die Immunsuppression erfolgte bis zur Evaluation der Diagnose: „Pleuramesotheliomzellen vorhanden“ oder „keine Pleuramesotheliomzellen vorhanden“. In Folge dessen wurde die weitere Immunsuppression angepasst.

Vor allen Eingriffen wurde eine gewichtsadaptierte Prämedikation den Tieren subcutan verabreicht. Diese umfasste Atropicum Sulfuricum 1,0 mg Eifelfango®, (Eifango, Bad Neuenahr- Ahrweiler/Deutschland), Ketanest® 25 mg/ml (Pfizer GmbH, Berlin/Deutschland), Midazolam-hameln 15 mg in 3ml (hameln pharma plus GmbH, Hameln/Deutschland) und Rompun® 2% (Bayer Vital GmbH, Leverkusen/Deutschland). Bei Rompun handelt es sich um ein bei Großtieren angewendetes Muskelrelaxans.

Daraufhin erfolgte die Anlage einer intravenösen Venenverweilkanüle über eine Ohrvene und die Verabreichung von 500ml Ringer-Infusionslösung. Die Tiere wurden auf dem Rücken gelagert und an allen vier Extremitäten fixiert. Im Rahmen des allgemeinen Monitoring, zur Überwachung der Vitalparameter, wurde die Ableitung eines Elektrokardiogramms, die Anlage eines Pulsoxymeters und die Anlage einer rektalen Temperatursonde vorgenommen. Bei jedem Eingriff wurde eine endotracheale Intubation und eine anschließende maschinelle Beatmung mit einem Fabius®-Tiro-Gerät der Firma Dräger (Dräger, Lübeck/Deutschland) durchgeführt. Begleitend dazu wurde eine

kontinuierliche, intraoperative und intravenöse Verabreichung von Propofol® -Lipuro 2% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen/Deutschland), Ketanest® 25 mg/ml, Midazolam-hameln 15 mg in 3ml und Rompun® 2% eingeleitet. Im Anschluss an die Gabe der perioperativen Antibiotikaprophylaxe mit 2g Cefotaxim (AstroPharma, Wien/Österreich) als Kurzinfusion erfolgten die dreimalige Desinfektion und das sterile Abdecken des Operationsgebietes [64]. Der Versuchsaufbau ist in Bezug auf diese Studie in **Abbildung 10** auf Seite 34 zu sehen.



Abbildung 10: Operation im Lübecker Transferoperationssaal, 10a) links, Vorbereitung einer Laparoskopie und 10b) rechts, Durchführung einer Thorakoskopie. [1] Anästhesiebereich mit Beatmungsgerät Fabius® Tiro, [2] Kaltplasmakoagulationssystem Soering 1000, [3] sterile Abdeckung des Operationsgebietes, [4] HDTV Storz- Endoskopierturm

2.5.5 Operationsverfahren

Im Rahmen dieser experimentellen Studie wurden minimalinvasive Verfahren, die Thorakoskopie in der thorakalen Versuchsreihe und die Laparoskopie in der abdominalen Versuchsreihe, durchgeführt.

Offene Operationsverfahren hätten größere Anforderungen an die Versuchstiere gestellt. Minimalinvasive Verfahren haben Vorteile, zum Beispiel geringerer Schmerzmittelbedarf, kürzere Operationszeiten, kleinere Zugänge, kürzere Erholungsintervalle usw., die für diese Überlebensstudie besser geeignet waren.

Die Interventionen wurden als Videodokumentationen festgehalten und ausgewertet. Vorbereitung, Ablauf und Instrumentarium entsprachen den standardmäßigen Richtlinien der Humanmedizin, um die Durchführbarkeit zu überprüfen und vergleichen zu können.

Minimalinvasive Verfahren

Der 10 mm Trokar wurde auf Höhe der 4. / 5. Rippe in der Medioclavicularlinie als Kamerazugang plaziert. Ein Arbeitszugang für den Applikator erfolgte über einen 5 mm Trokar und befand sich in der vorderen Axillarlinie (**Abbildung 11**).

Die Platzierung der Trokare bei den laparoskopischen Interventionen erfolgte etwa im Bereich der Medianlinie des Abdomens. Der 10 mm Trokar wurde im Oberbauch und der 5 mm Trokar im rechten Unterbauch eingebracht (**Abbildung 11**).



Abbildung 11: Versuchsaufbau: 11a) (links) für die Thorakoskopie und 10b) (rechts) für die Laparoskopie

Die Kaltplasma-Applikation erfolgte standardgemäß, wie oben im Abschnitt 2.5.3. beschrieben. In der folgenden **Abbildung 12** ist am Beispiel einer minimalinvasiven Thorakoskopie der Vorgang der Übertragung der thermischen Energie auf die Oberfläche der Lunge ersichtlich. Die Eingriffsdauer betrug im Mittel 45 Minuten.

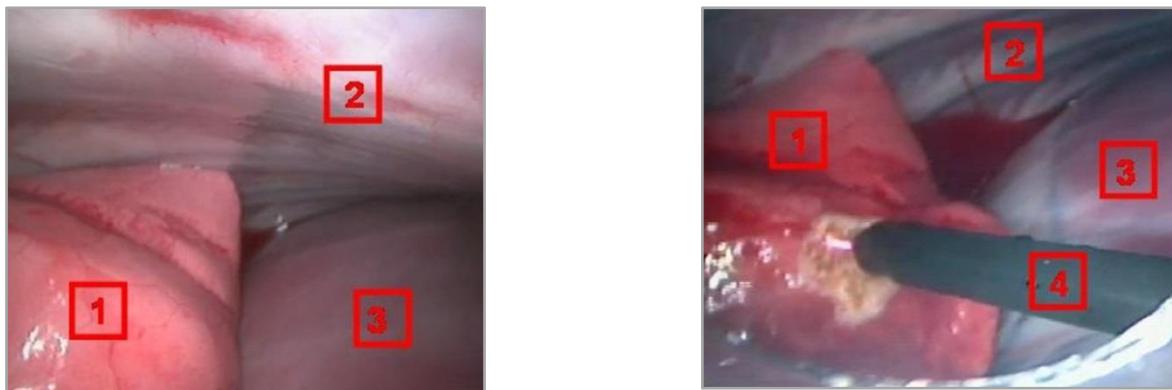


Abbildung 12: 12a) (links) Endoskopische Perspektive des Thorax eines Minipigs vor Kaltplasmaapplikation. 12b) (rechts) Kontaktlose Applikation des Plasmastrahles auf die Lungenoberfläche.

Ziffern: [1] Lungenoberfläche, [2] laterale Thoraxwand, [3] Zwerchfell, [4] Applikator

Offene Verfahren

Im weiteren Verlauf der Versuchsreihen erfolgten nach bestimmten Intervallen, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, explorative Thorakotomien und Laparotomien. Diese dienten der Erfassung und Dokumentation von entstandenen Veränderungen, wie zum Beispiel Verwachsungen und insbesondere Stenosen und Fisteln. Dabei wurde nach einem bestimmten Schema vorgegangen, wie in **Tabelle 7** dargestellt.

Parameter	Ergebnis
Abszess / Verhalt	ja nein
makroskopisch sichtbare Darm- / Lungenfisteln	ja nein
makroskopisch sichtbare Stenosen oder Kontinuitätsbehinderungen	ja nein
makroskopisch sichtbare peritoneale bzw. thorakale Adhäsionen	keine einzelne, wenige Verwachsungsstränge flächige Verwachsungen

Tabelle 7: Schema zur makroskopischen Beurteilung des Darms vor der Explantation

Die Gewinnung von Gewebeproben zur weiteren histologischen Aufbereitung und Auswertung stand ebenfalls im Mittelpunkt, wie in Abschnitt 2.5.8 beschrieben.

2.5.6 Postoperatives Management

Am Ende dieser chirurgischen Intervention wurde eine individuell an jedes Tier und Situation angepasste Narkoseausleitung vorgenommen. Dazu gehörte die Entwöhnung von der Narkose und die Extubation, nachdem eine spontane Atmung und adäquate Oxygenierung gewährleistet waren. Die postoperative Analgesie erfolgte über Verabreichung von Novalgin über die Nahrung. Die Minipigs wurden in spezielle Aufwachräume des Tierstalles transportiert. Nach etwa weiteren 6 Stunden und vollständig zurückgekehrter Aktivität kamen die Schweine wieder in ihre Gruppen zurück.

2.5.7 Nachsorgeschema

Nach den entsprechenden minimalinvasiven Verfahren wurden die Tiere täglich überwacht und begutachtet. Dabei wurden auf Anzeichen einer eventuell vorhandenen Peritonitis oder Mediastinitis durch entstandene Fisteln oder Perforationen geachtet. Weitere wichtige Parameter waren die Immobilisation und das Verhalten der Wasser- und Nahrungsaufnahme. Zweimal täglich erfolgte die Beobachtung und Dokumentation anhand eines standardisierten Protokolls, welches zur Erstellung eines Nachsorge-Scores verwendet wurde, siehe **Tabelle 8**. Ab einem Score > 2 und Score = 2 wurden die Tiere veterinärmedizinisch vorgestellt.

Parameter	Ergebnis/Punkte
Vigilanz	wach, kontaktfreudig = 0 wach = 1 somnolent = 2
selbstständige Nahrungsaufnahme	ja = 0 nein = 1
körperliche Aktivität	Auslauf, Spielverhalten = 0 kurze Wege, eher Liegen = 1 Liegen = 2
Auskultation der Lunge und des Abdomen	normale Darm/Atemgeräusche = 0 hochgestellte Darmgeräusche/pathologische Atemgeräusche= 1 keine Darmgeräusche = 1
Untersuchung des Abdomen	Bauch weich = 0 lokaler Druckschmerz = 1 generalisierte Abwehrspannung = 2
Komplikationen	oberer Atemwegsinfekt = 1 Abszess kutan = 1 Nahrungsverweigerung = 1 Diarrhoe = 1

Tabelle 8: Tägliches Nachsorgeschema nach Laparo- bzw. Thorakoskopie und Kaltplasmakoagulation der jeweiligen Organe. Die Zahlen entsprechen einem relativen Score, um das Auftreten potentieller Komplikationen entsprechen wichtigen zu können.

Für den Fall, dass Zeichen einer Peritonitis oder Pleuritis bestanden hätten, wäre unverzüglich eine Revisionsoperation eingeleitet worden.

Um die Entwicklung und den physischen Zustand der Minipigs beurteilen zu können, wurde die Gewichtsentwicklung genau dokumentiert. Dazu wurde vor und nach jeder chirurgischen Intervention das jeweilige Tier in prädefinierten Intervallen gewogen.

2.5.8 Gewinnung der Proben und Herstellung von histologischen Präparaten

Nach der Terminierung der Tiere mit T61® in tiefer Narkose und unter Analgesie wurden im Rahmen der jeweiligen Operationen die Präparation und Darstellung der behandelten Strukturen und Organe vorgenommen. Nach ausreichender Untersuchung des Sitzus wurden die für die Probenentnahme notwendigen Areale der Organe detektiert, fotodokumentiert und entnommen. In der Thoraxgruppe wurden beide Lungen reseziert, sowie die behandelten Stellen als Teilresektate des Zwerchfell, des Perikard und der Pleura entnommen. Teilresektate der entsprechend mit Kaltplasmakoagulation behandelten Organe (Dünndarm, Milz, Leber) wurden ebenfalls in der abdominellen

Versuchsreihe entnommen.

Fixierung und Paraffineinbettung

Hierbei handelte es sich, um seit langem etablierte Verfahren, die unter standardisierten Bedingungen durch entsprechende Ärzte des Institutes für Pathologie der Universität zu Lübeck durchgeführt wurden. Zur Asservierung der gewonnenen Materialien wurden diese zunächst in einer 4 prozentigen Formaldehydlösung mit einem pH-Wert von circa 7,5 fixiert. Je nach Beschaffenheit der einzelnen Gewebeteile wurde ein unterschiedliches Volumen der Formaldehydlösung hinzugegeben. Dabei wurde stets das Verhältnis 1 Anteil Gewebe zu 10 Anteilen Fixierungslösung eingehalten. Die Fixationsdauer richtete sich nach der Schichtdicke der Gewebeanteile. Dabei gilt die Regel, dass bei zunehmender Schichtdicke die Fixationsdauer proportional dazu ansteigt. Pro Stunde Einwirkzeit wird eine 1 mm Gewebeschicht adäquat von der Lösung durchdrungen. Nach entsprechender Fixierung wurde in aufsteigender Alkoholreihe das Material entwässert. Die Konzentration des Ethanols steigt bis zum absoluten Alkohol. Im weiteren Verlauf wurde Xylol zur Trennung des Materials vom Alkohol verwendet. Nach der Tränkung des Gewebes mit Paraffin und Gießung eines Paraffinblockes erfolgte die Aushärtung. Mit einem Mikrotom wurden 2-6 µm dicke Schnitte hergestellt und im warmen Wasserbad auf die Objektträger gezogen [71].

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Gewebeschnitte wurden zur Entparaffinierung in Xylol getränkt. Im nächsten Schritt erfolgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe. Dann erfolgte die Zugabe des Farbstoffes Hämatoxylin-Eosin [71].

Immunhistologie

Zum detektieren neoplastischer Mesothelproliferate aus dem Granulationsgewebe wurden die folgenden immunhistochemischen Marker verwendet: CD 68 / PGM1, Kalretinin und BER/EP4.

2.5.9 Auswertung der histologischen Präparate

Mit einem Standardmikroskop des Institutes für Pathologie der Universität zu Lübeck (Axioskop 108958 der Firma ZEISS, SIP 41794) und einem entsprechenden Messokular (Zeiss) wurden die Proben ausgewertet.

2.5.10 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Daten wurden der Mittelwert und als ein Bestandteil des Signifikanztestes der Median verwendet. Als Signifikanztest wurde der Wilkoxon-Test für Paardifferenzen angewendet. Dieser Test vergleicht abhängige bzw. paarige Werte miteinander. Es wurde das Programm SPSS Version 17.0 verwendet. Als Signifikanzniveau wurde ein $p \leq 0,05$ angenommen. Die Planung der statistischen Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. hum. biol. Claudia Hemmelmann aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck.

3 Ergebnisse

3.1 Nachsorge

Während dem gesamten Studienverlauf war keine peri- und postoperative Mortalität zu verzeichnen. Ein zusätzlicher Aspekt war die niedrige Morbidität über die Dauer der gesamten Studie.

Als peri- und postoperative Morbidität wurden Ereignisse erfasst, die den Gesundheitszustand der Versuchstiere beeinflusst haben. Im Nachsorgeschema des Material und Methodenabschnittes sind die Ereignisse in **Tabelle 8** dargestellt. Bei der postoperativen Vigilanz wurden in 50 durchgeführten Operationen fünf mal 1 Punkt (wach) vergeben und dreimal 2 Punkte (somnolent) vergeben.

Insgesamt drei Tiere in der ganzen Studie verweigerten am ersten postoperativen Tag die Nahrungsaufnahme. Diese Tiere fraßen ab dem zweiten postoperativen Tag ohne äußerliche Interventionen dann normal. In der Thoraxgruppe war bei einem Tier nach schwieriger Intubation am ersten Tag nach Intervention eine leichte Dyspnoe festzustellen. Die Dyspnoe war zu keinem Zeitpunkt für das Tier lebensbedrohlich und war ohne medizinische Intervention selbstlimitierend. In der laparoskopischen Gruppe wurde ein Minipig mit Diarrhoe am ersten postoperativen Tag beobachtet. Auch dieses Ereignis war am zweiten postoperativen Tag nicht mehr nachweisbar.

Während der weiteren Nachsorgephase fiel am zweiten postoperativen Tag ein weiteres Tier mit Husten unklarer Genese auf. Es wurde in diesem Fall als prophylaktische Maßnahme nach Hinzuziehung des verantwortlichen Tierarztes ein Depot-Penicillin intramuskulär verabreicht. Nach einem weiteren Tag war der Husten nicht mehr nachweisbar [64].

Insgesamt musste aufgrund der postoperativ aufgetretenen Komplikationen kein Revisionseingriff erfolgen.

Als ein sehr wichtiges Kriterium für die Entwicklung der Minipigs wurde die Gewichtsentwicklung während der Studie dokumentiert, überwacht und verfolgt. Der genaue Erfassungszeitraum erstreckte sich vom Eintreffen der Tiere im Tierstall bis zum Zeitpunkt der Probengewinnung. Eine genaue Auflistung der Daten ist in der **Tabelle 9** zu sehen.

Tiere	1.Intervention	2.Intervention	3.Intervention	4. Intervention
T1	40	39	40	42
T2	32	36	41	45
T3	38	38	41,5	50
T4	35	38	47	49,5
T5	41	47,5	54	53
T6	37,5	45	48	48
T7	38	38	45	46,5
T8	37	44,5	46,5	48

Thorakoskopische Gruppe

Tiere	1.Intervention	2.Intervention
A1	40	59
A2	39	59
A3	25	25
A4	25	28
A5	30	32
A6	28	27
A7	26	31
A8	34	31

Abdominelle Gruppe

Tabelle 9: Gewichtsentwicklung in Kilogramm der Minipigs während der Studie der Thoraxgruppe (oben) und der Abdomengruppe (unten)

1.Intervention: Gewicht vor Thorakoskopie / Laparoskopie

2.Intervention: Gewicht vor 2.Thorakoskopie / Laparotomie

3.Intervention: Gewicht vor 3.Thorakoskopie

4.Intervention: Gewicht vor der Thorakotomie

Es konnte eine stetige Gewichtszunahme der Minipigs verzeichnet werden. Dies gilt ebenfalls als ein guter Marker für den psychischen und physischen Zustand der Tiere während der gesamten Studie.

All dies sind wichtige Hinweise, dass die weitere Entwicklung der Tiere in nur geringem Maße durch die minimal-invasiven Interventionen beeinflusst wurde.

3.2 Makroskopische Untersuchungen (mit Videodokumentation)

Die makroskopischen Beobachtungen wurden im Rahmen der endoskopischen und explorativen offenen Verfahren vorgenommen und mit Hilfe von Videodokumentation und digitalen Bildern festgehalten.

In beiden Gruppen wurde bei der makroskopischen Begutachtung auf standardisierte Rahmenbedingungen und gleiche Untersuchungskriterien geachtet.

Bei den Tieren, die einem thorakalen Eingriff unterzogen wurden, wurde nach der ersten Thorakoskopie mittels erneuter Thorakoskopie Pleuramesotheliomplaques aufgesucht. Es konnten bei zwei Tieren Plaques im Sinne eines malignen Pleuramesothelioms nachgewiesen werden. Weitere therapeutische Anwendungen konnten aufgrund der nur geringen Anzahl der Zellen in diesem Studiendesign nicht durchgeführt werden, siehe Abschnitt 2.4.1.

Nach der zweiten Thorakoskopie und in der laparoskopischen Versuchsreihe nach den Laparoskopien erfolgten die explorativen Thorakotomien und Laparotomien, in denen zunächst die mit Kaltplasma behandelten Stellen der Organe, entsprechend der im Kapitel 2.5.8 beschriebenen Weise, aufgesucht und dargestellt werden mussten, wie auf den beiden folgenden Abbildungen (**Abbildung 13** und **Abbildung 14**) zu sehen.



Abbildung 13: Detektion der applizierten Stellen bzw. Flächen

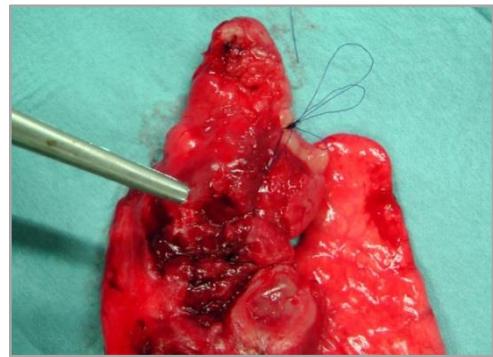
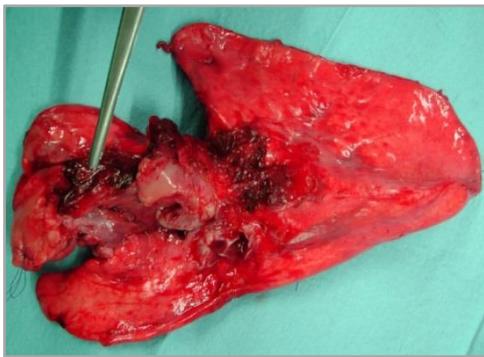


Abbildung 14: Explantierte Lunge nach Applikation von Kaltplasma. Die anatomische Pincette deutet auf einen mit Kaltplasma behandelten Bereich.

Für die Beurteilung möglicher Veränderungen auf der Oberfläche von Lunge und Dünndarm wurde jeweils ein standardisiertes Schema verwendet. Folgende Parameter wurden dokumentiert: Adhäsionen, Fisteln, Perforationen, Nekrosen, Empyeme und Einschnürungen durch Briden (**Tabelle 7**).

3.2.1 Entstehung von Adhäsionen nach der Anwendung von Kaltplasma

Die makroskopische Untersuchung zeigte eine deutlich Tendenz zur Entwicklung von Adhäsionen. In der Thoraxgruppe besonders zwischen Lunge und der Thoraxwand (**Abbildung 15**). In der Laparoskopiegruppe wurden sowohl die Entwicklung von interenterischen Adhäsionen (**Abbildung 16**) als auch die Entwicklung von Verwachsungen mit angrenzenden Organen, wie z.B. Peritoneum, Leber und Milz (**Abbildung 17**) beobachtet.

Die Verwachsungen bzw. Adhäsionen waren deutlich sichtbar und flächiger Natur.



Abbildung 15: Adhäsionen zwischen Lunge und Thoraxwand

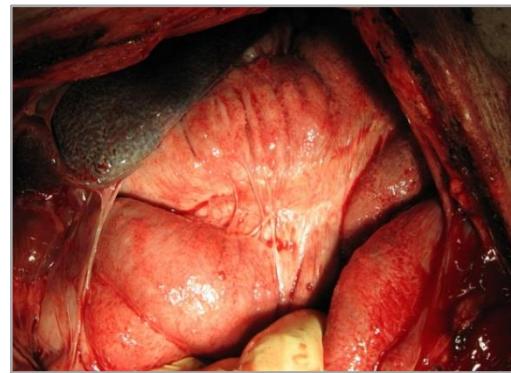
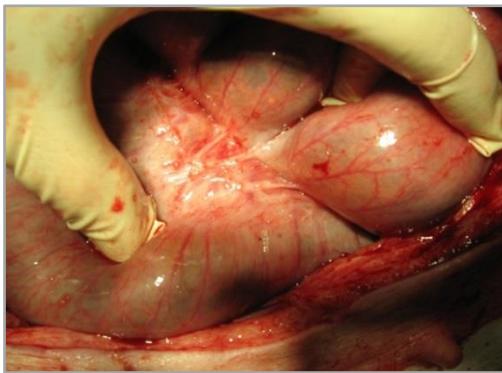


Abbildung 16: Interenterische Adhäsionen

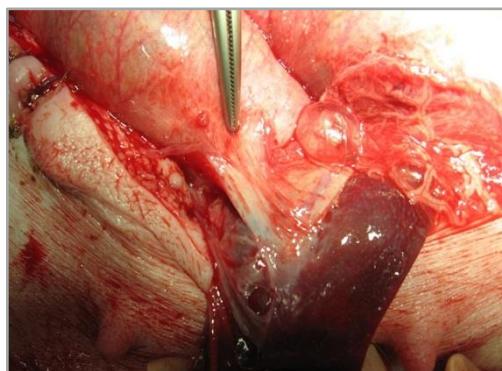


Abbildung 17: Adhäsionen zwischen Dünndarm und Milz

In Abhängigkeit von der Ausgangsleistung war das Vorhandensein und die Ausmaß der Verwachsungen unterschiedlich. Dabei zeigte sich, dass bei steigender Ausgangsleistung die Verwachsungen ausgeprägter waren und die Ausdehnung dieser Verwachsungen flächiger war. Währenddessen konnten keine Funktionseinschränkungen beim Gasaustausch der Lungen und keine Einengungen bzw. Stenosen in Form einer Reduktion des Durchmessers des Dünndarmes oder Dickdarmes nachgewiesen werden, so dass die enterale Passage wenig bis gar nicht beeinträchtigt war. Die postinterventionellen Reaktionen auf die Kaltplasmakoagulation waren in der thorakalen Versuchsreihe auf die Pleura und in der abdominalen Versuchsreihe überwiegend auf das Peritoneum und oberflächliche Muskelschichten des Darms begrenzt.

3.2.2 Postoperative Rate an entzündlichen Infiltraten

In der thorakalen Versuchsreihe wurde in keinem der Fälle ein klinisch apparenter Pneumothorax durch die Anwendung der Kaltplasmakoagulation induziert. Es wurden bei zwei Minipigs Pleuraergüsse während der Re-Thorakoskopie festgestellt, die aufgrund

des guten klinischen Zustandes der Tiere nicht drainiert werden mussten. Während der Thorakotomien wurden in beiden Fällen nicht nur die oben erwähnten pleuralen Adhäsionen beobachtet, sondern auch eine chronische Infiltration mit kleinen subpleuralen Abszessen festgestellt. Mikrobiologisch wurden keine Erreger in den Infiltrationen bzw. Abszessen nachgewiesen, so dass davon auszugehen ist, dass die Entstehung der chronischen Infiltrate durch das Unterlassen der Pleuradrainage begünstigt wurde.

3.2.3 Geringe Gefahr der Perforation und Fistelbildung nach Anwendung von Kaltplasma

Nach subtiler Dissektion der Adhäsionen wurden auf makroskopischer Ebene keine Perforationen der Organe und keine Nekrosen der Lunge und der Dünndarmwand festgestellt. Die Reaktionen der Gewebe auf die Kaltplasmakoagulation schienen sich bei den Tieren der Thoraxgruppe auf die Pleura und bei den laparoskopisch operierten Minipigs auf das Peritoneum und die äußeren Muskelschichten zu beschränken.

Die histopathologischen Untersuchungen der resezierten Organteile zeigten lediglich in einem Fall eine punktförmige Perforation des Dünndarmes in der laparoskopischen Versuchsreihe. Es handelte sich um eine kleine etwa 0,1 cm durchmessende Perforationsstelle. Diese kleine Fistel trat bei Applikation einer Leistung von 100 Watt mit einem voreingestellten Gasfluss von drei Litern auf. Die Perforationsstelle war durch eine benachbarte Darmschlinge und die Adhäsionen in diesem Bereich vollständig gedeckt. Der Lokalbefund und auch das histologische Ergebnis wiesen bei diesem Tier in dem Bereich ausgedehnte Adhäsionen zwischen den Dünndarmschlingen nach.

Die Auswertung der Videodokumentation zeigte in diesem Fall eine nicht protokollgerechte verlängerte Einwirkzeit des Plasmastrahles auf den Dünndarm. Die Anwendung sollte auf dieser Stelle maximal 1-2 Sekunden betragen hatte aber etwa 5 Sekunden in Anspruch genommen. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Studie am Beginn der experimentellen Phase. Vermutlich war daher aus akzidentellen Gründen die Anwendungsdauer des Plasmastrahles prolongiert. Trotz dessen bleibt der Zeitpunkt der Perforation bei dem klinisch völlig unauffälligen Tier letztlich ungeklärt. Viele Adhäsionen in einem bestimmten Bereich können bei Bewegungen Scherkräfte ausüben, so dass die Perforationsstelle nicht direkt nach Anwendung des Plasmastrahles entstanden sein muss. Postinterventionell zeigte das Minipig keine besonderen Auffälligkeiten während der engmaschigen Nachsorge. In der explorativen Laparotomie konnte eine Peritonitis

oder ein Abszess nicht nachgewiesen werden.

In der thorakalen Versuchsreihe konnten auch histologisch während der gesamten Dauer der Studie keine Perforationen oder Fisteln nachgewiesen werden. In den Präparaten zeigten sich überwiegend eine vollständige Ausheilung der betroffenen Gewebe sowie vereinzelte Vernarbungen in Form von Granulationsgewebe.

Tiere	Fisteln	Makroskopische Beobachtungen	Pathologie
T1	Nein	Kleines pleurales Empyem chronische Pneumonie pleurale Adhäsionen	Nekrose und heilendes Granulationsgewebe Alveolen sind nicht eröffnet
T2	Nein	Pleurale Adhäsionen	Nekrose und heilendes Granulationsgewebe Alveolen sind nicht eröffnet
T3	Nein	Pleurale Adhäsionen	Nekrose und heilendes Granulationsgewebe Alveolen sind nicht eröffnet
T4	Nein	Kleines pleurales Empyem chronische Pneumonie Pleurale Adhäsionen	Nekrose und heilendes Granulationsgewebe Alveolen sind nicht eröffnet
T5	Nein	Pleurale Adhäsionen	Nekrose und heilendes Granulationsgewebe Alveolen sind nicht eröffnet
T6	Nein	Pleurale Adhäsionen	Nekrose und heilendes Granulationsgewebe Alveolen sind nicht eröffnet
T7	Nein	Pleurale Adhäsionen	Nekrose und heilendes Granulationsgewebe Alveolen sind nicht eröffnet
T8	Nein	Pleurale Adhäsionen	Nekrose und heilendes Granulationsgewebe Alveolen sind nicht eröffnet

Tabelle 10: Makroskopische Beobachtungen invivo bzw. invitro und pathologische Ergebnisse der explantierten

Tiere	Fisteln	Makroskopische Beobachtungen	Pathologie
A1	Nein	Adhäsionen zwischen Dünndarm und Milz interenterische Adhäsionen	Nekrose und Granulationsgewebe (Vernarbung) Darmlumen nicht eröffnet
A2	Nein	interenterische Adhäsionen	Nekrose und Granulationsgewebe (Vernarbung) Darmlumen nicht eröffnet
A3	Nein	interenterische Adhäsionen	Nekrose und Granulationsgewebe (Vernarbung) Darmlumen nicht eröffnet
A4	Nein	Adhäsionen zwischen Dünndarm und Milz interenterische Adhäsionen	Nekrose und Granulationsgewebe (Vernarbung) Darmlumen nicht eröffnet
A5	Nein	interenterische Adhäsionen	Nekrose und Granulationsgewebe (Vernarbung) Darmlumen nicht eröffnet
A6	Nein	interenterische Adhäsionen	Nekrose und Granulationsgewebe (Vernarbung) Darmlumen nicht eröffnet
A7	Nein	interenterische Adhäsionen	Nekrose und Granulationsgewebe (Vernarbung) Darmlumen nicht eröffnet
A8	Nein	interenterische Adhäsionen	Nekrose und Granulationsgewebe (Vernarbung) Darmlumen nicht eröffnet

Tabelle 11: Makroskopische Beobachtungen in-vivo und in-vitro und pathologische Ergebnisse der explantierten Dünndarmanteile

3.2.4 Nebeneffekt der Serosa-Ablösung während der Applikationsphase der Kaltplasmakoagulation

Während der Applikationsphase wurde eine besondere Beobachtung in den beiden Gruppen festgehalten. Sowohl bei Anwendung des Kaltplasmas auf der parietalen Pleura als auch auf dem Dünndarm hob sich die Serosa (Pleura parietalis, äußeres bzw. innere Blatt des Peritoneums) ab. Dieser Nebeneffekt ist besonders gut in der Sequenzabfolge der **Abbildung 18** zu verfolgen.

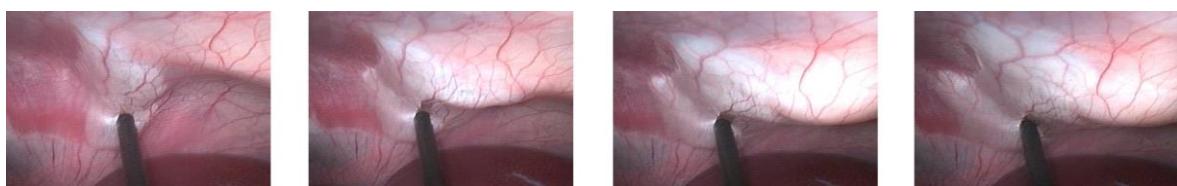


Abbildung 18: Prozess der Serosa-Abhebung des Peritoneums während der kontaktlosen Applikation von Kaltplasmakoagulation

Bei etwa 50% der Applikationen des Plasmastrahles konnte man diesen Effekt beobachten. Das Peritoneum wurde von den Muskelschichten leicht abgehoben nachdem der Plasmastrahl Kontakt mit der serösen Oberfläche der Organe, also Pleura parietalis

und Dünndarmoberfläche hatte. Makroskopisch ist am ehesten davon auszugehen, dass Gas über einen kleinen Defekt der Serosa in die subseröse Schicht eindringt und so das Peritoneum und die Pleura von ihrem jeweiligen Untergrund abhebt. Die Serosaabhebungen waren am Darm besonders häufig zu beobachten (**Abbildung 19**). Die Abhebungen waren schon nach kurzer Zeit der Anwendung mit Kaltplasma nicht mehr sichtbar.



Abbildung 19: Serosa-Abhebung am Dünndarm während der Applikation von Kaltplasma

Bei den Untersuchungen wurde dokumentiert, dass je weiter man mit dem Applikator von dem Gewebe entfernt war, die Intensität der Abhebung abnahm.

3.2.5 Handhabung des Soering 1000 System

Der Applikator ist für die Anwendung im minimalinvasiven operativen Bereich sehr gut geeignet. Jedoch ist die Steuerbarkeit des Applikator leicht eingeschränkt im Gegensatz zu den offenen Verfahren. Mit entsprechender praktischer Erfahrung ist dieser Effekt aber zu vernachlässigen.

Die Anwendungsdauer ist durch den Hersteller nicht vorgeschrieben und scheint abhängig von dem behandelten Gewebe. Am Beispiel in Kapitel 3.2.2 auf Seite 45 wird deutlich welche Bedeutung die vorher anhand bestimmter Kriterien, wie der Schichtdicken in einem Organ, festgelegte Anwendungsdauer des Plasmastrahles auf einen bestimmten Ort hat.

3.3 Histologische Untersuchungen

Nach der Gewinnung der Proben wurde eine histologische Auswertung in Kooperation mit dem pathologischen Institut der Universität zu Lübeck vorgenommen.

3.3.1 Abhängigkeit der Eindringtiefe des Kaltplasmas von dem applizierten Energilevel

Aufgrund der festgestellten Karyopyknose und Karyorhexis der mit Kaltoplasmakoagulation behandelten Präparate konnte von einem irreversiblen Schaden durch die übertragene Energie ausgegangen werden. Diese Nekrosezeichen zeigten sich je nach applizierter Energie bis zu einer bestimmten Tiefe. Es wurde dargestellt, dass eine Abhängigkeit der Nekrosetiefe zum eingesetzten Energilevel bestand. Mit steigender Generator-Energie nahm die Eindringtiefe des Plasmastrahls und somit die Nekrosetiefe zu [64].

Dieser Effekt ist ähnlich bei allen untersuchten Organen nachweisbar.

Lunge

10 Watt [cm]	Eindringtiefe	30 Watt [cm]	Eindringtiefe	50 Watt [cm]	Eindringtiefe	75 Watt [cm]	Eindringtiefe
0	Subserosa	0	Subserosa	0,01	Subserosa	0,01	Alveolarwand
0	Serosa	0,03	Alveolarwand	0,03	Alveolarwand	0,03	Alveolarwand
0,02	Parenchym	0,04	Alveolarwand	0,06	Alveolarwand	0,06	Alveolarwand
0	Serosa	0,01	Subseröses Bindegewebe	0,03	Alveolarwand	0,05	Parenchym
0	Serosa	0	Subserosa	0,03	Subserosa	0,05	Alveolarwand
0	Serosa	0,01	Serosa	0,01	Serosa	0,03	Alveolarwand
0	Subserosa	0	Subserosa	0,02	Alveolarwand	0,02	Alveolarwand
0	Serosa	0,01	Subserosa	0,03	Alveolarwand	0,03	Alveolarwand
100 Watt [cm]	Eindringtiefe	50 Watt /3,5I [cm]	Eindringtiefe	75 Watt/ 3,5I [cm]	Eindringtiefe	100Watt /3,5I [cm]	Eindringtiefe
0,05	Alveolarwand	0,01	Subserosa	0,01	Subserosa	0	Serosa
0,1	Alveolarwand	0,01	Serosa	0,01	Subserosa	0,01	Serosa
0,08	Alveolarwand	0,01	Subserosa	0,02	Subserosa	0,03	Alveolarwand
0,08	Alveolarwand	0,01	Subserosa	0,01	Subserosa	0,02	Subserosa
0,1	Alveolarwand	0,01	Subserosa	0,02	Subserosa	0,01	Subserosa
0,03	Alveolarwand	0,01	Subserosa	0,01	Subserosa	0,02	Alveolarwand
0,03	Alveolarwand	0,01	Subserosa	0,01	Subserosa	0,03	Alveolarwand
0,05	Alveolarwand	0,01	Subserosa	0,01	Subserosa	0,02	Alveolarwand

Tabelle 12: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Lungen nach Kaltoplasmakoagulation mit unterschiedlicher Ausgangsleistung

Aus der **Tabelle 12** ist ersichtlich, dass mit niedrigen Energieleveln (10 Watt und 20 Watt) die Nekrosetiefe auf die Pleura und die subpleurale Schicht limitiert ist. Wohingegen bei der Verwendung höherer Level auffällt, dass die Nekrose die Alveolarwände erreicht, aber nicht zerstört.

Dünndarm

10 Watt (cm)	Eindringtiefe	30 Watt (cm)	Eindringtiefe	50 Watt (cm)	Eindringtiefe	75 Watt (cm)	Eindring-tiefe
0	Serosa	0,01	Subserosa	0,01	Longitudinal-muskulatur	0,07	Zirkular-muskulatur
0,01	Longitudinal-muskulatur	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,03	Plexus myentericus
0,02	Longitudinal-muskulatur	0,04	Plexus myentericus	0,04	Zirkular-muskulatur	0,05	Zirkular-muskulatur
0	Serosa	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,04	Longitudinal-muskulatur
0	Serosa	0	Subserosa	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,03	Plexus myentericus
0	Subserosa	0,01	Longitudinal-muskulatur	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,05	Zirkular-muskulatur
0	Subserosa	0,01	Longitudinal-muskulatur	0,01	Longitudinal-muskulatur	0,03	Longitudinal-muskulatur
0,01	Subserosa	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,04	Longitudinal-muskulatur
100 Watt (cm)	Eindringtiefe	75 Watt/3,5l (cm)	Eindringtiefe	100 Watt/3,5l (cm)	Eindringtiefe		
0,07	Zirkular-muskulatur	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,02	Longitudinal-muskulatur		
0,03	Zirkular-muskulatur	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,03	Zirkular-muskulatur		
0,05	Zirkular-muskulatur	0,05	Zirkular-muskulatur	0,15	Zirkular-muskulatur		
0,05	Zirkular-muskulatur	0,03	Longitudinal-muskulatur	0,04	Zirkular-muskulatur		
0,1	Zirkular-muskulatur	0,03	Longitudinal-muskulatur	0,1	Zirkular-muskulatur		
0,04	Zirkular-muskulatur	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,03	Zirkular-muskulatur		
0,04	Zirkular-muskulatur	0,03	Longitudinal-muskulatur	0,04	Zirkular-muskulatur		
0,05	Zirkular-muskulatur	0,02	Longitudinal-muskulatur	0,03	Zirkular-muskulatur		

Tabelle 13: Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Dünndarmes nach Kaltplasmakoagulation mit unterschiedlicher Ausgangsleistung

Die Ergebnisse bei der Lunge lassen sich ebenfalls auf den Dünndarm übertragen (**Tabelle 13**). Bei einer Ausgangsleistung von 10 und 20 Watt reichte die Nekrosetiefe bis

zum Peritoneum viszerale und zur longitudinalen Muskelschicht. In höheren Energiestufen reichte die Nekrosetiefe bis zur zirkulären Muskelschicht und vereinzelt an den Plexus myentericus heran. In der **Abbildung 20** ist exemplarisch am Dünndarm die Veränderung nach Applikation verschiedener Leistungsstufen dargestellt.

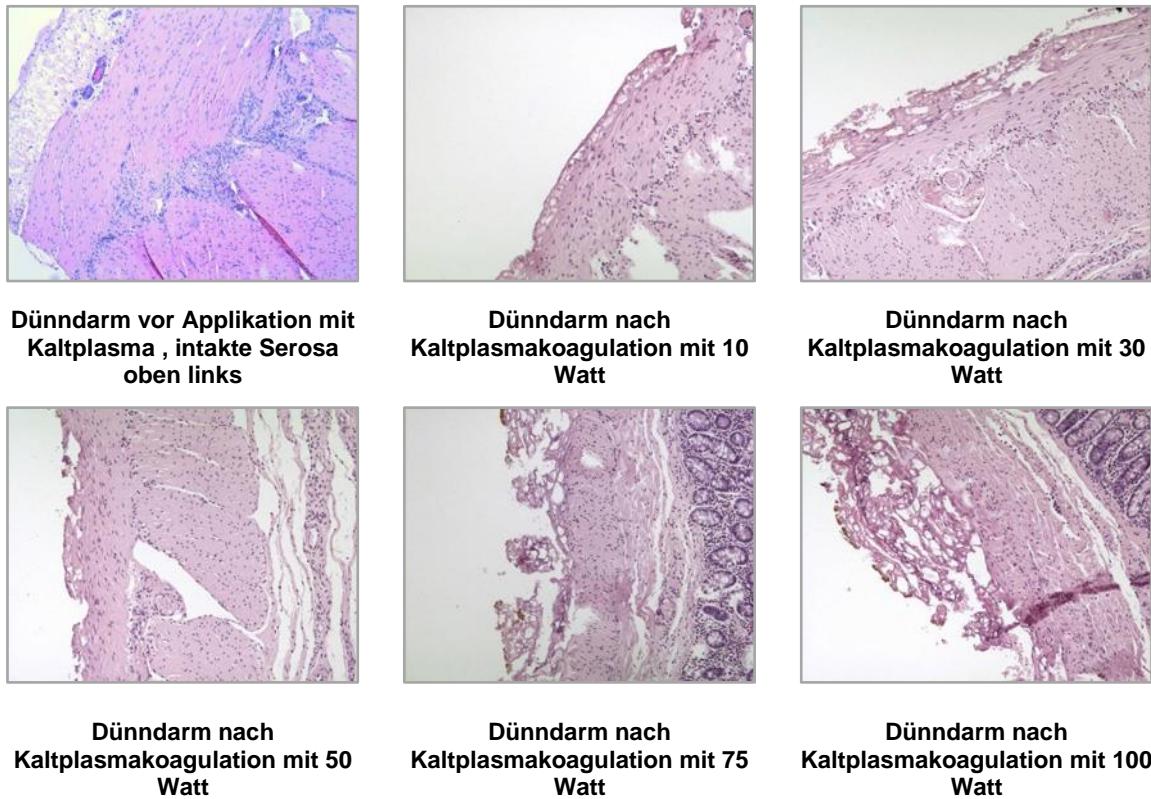


Abbildung 20: Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Dünndarmes nach Kaltplasmakoagulation mit unterschiedlicher Ausgangsleistung

Zwerchfell

10 Watt (cm)	30 Watt (cm)	50 Watt (cm)	75 Watt (cm)	100 Watt (cm)
0	0,01	0,02	0	0
0	0,01	0,01	0,01	0,05
0	0	0,02	0,08	0,04
0	0,01	0	0,03	0,2
0	0	0,01	0,01	0,01
0,01	0,01	0,02	0,05	0,05
0,01	0,02	0,02	0,02	0,05
0	0,01	0,02	0,04	0,05

Tabelle 14: Eindringtiefen in cm des Zwerchfelles nach Kaltplasmakoagulation mit unterschiedlicher Ausgangsleistung in Watt

Perikard

Das Perikard wurde insgesamt bei fünf Minipigs mit Kaltplasma behandelt. Die histologischen Untersuchungen ergaben bei allen Tieren Perforationen des Perikards ab dem Energilevel 2 (30 Watt, 3,5 Liter Gasfluß). Da eine Perforation des Perikards eine potentiell lebensbedrohliche Verletzung für jedes Lebewesen bedeutet, wurde die weitere Applikation zum Schutze der Minipigs eingestellt.

Leber

10 Watt (cm)	30 Watt (cm)	50 Watt (cm)	75 Watt (cm)	100 Watt (cm)
0	0	0,05	0,05	0,1
0	0,01	0,02	0,05	0,07
0,02	0,1	0,15	0,15	0,15
0,03	0,02	0,06	0,1	0,15
0	0	0,05	0,08	0,1
0	0,01	0,05	0,06	0,08
0	0,02	0,02	0,08	0,08
0	0,02	0,05	0,06	0,1

Tabelle 15: Eindringtiefen in cm der Leber nach Kaltplasmakoagulation mit unterschiedlicher Ausgangsleistung in Watt

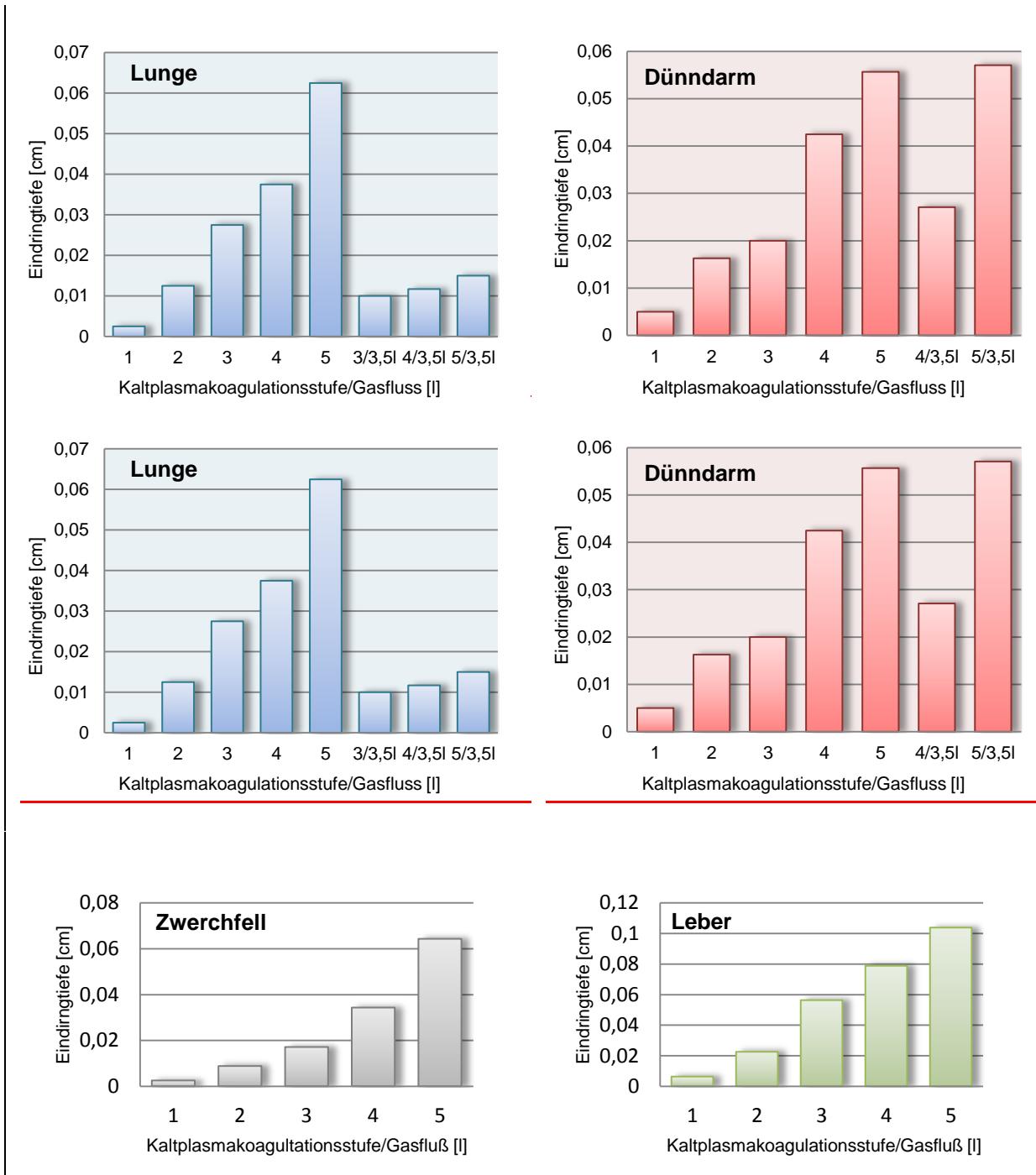
Milz

10 Watt (cm)	30 Watt (cm)	50 Watt (cm)	75 Watt (cm)	100 Watt (cm)
0	0	0,1	0,2	0,1
0	0,01	0,03	0,5	0,5
0	0,02	0,03	0,08	0,08
0	0,03	0,08	0,08	0,1
0	0,01	0,1	0,15	0,1
0	0,02	0,04	0,08	0,1
0	0,01	0,04	0,04	0,04
0	0,02	0,05	0,08	0,1

Tabelle 16: : Eindringtiefen in cm der Milz nach Kaltplasmakoagulation mit unterschiedlicher Ausgangsleistung in Watt

Linearität

Die oben gezeigten Daten belegten, dass eine annähernde lineare Korrelation zwischen Energilevel und mittlerer Tiefe der Nekrose besteht. Eine genauere Darstellung dieses Sachverhaltes wird in der **Abbildung 21** dargestellt.



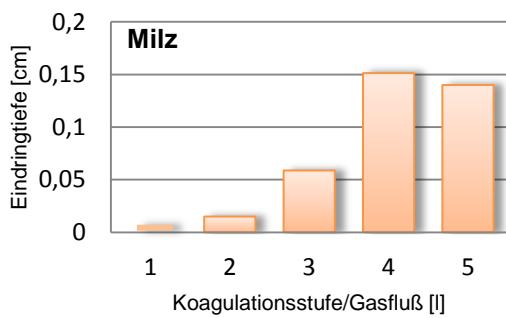
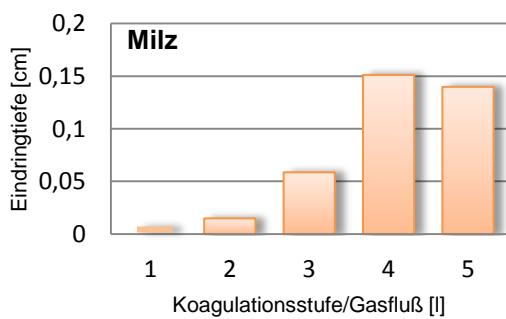
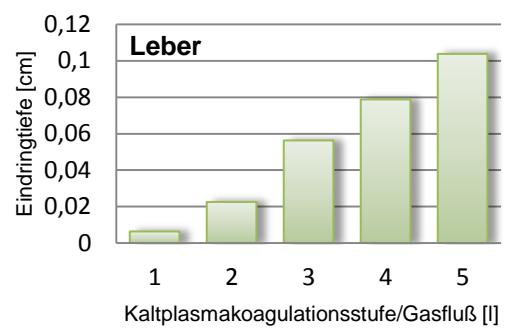
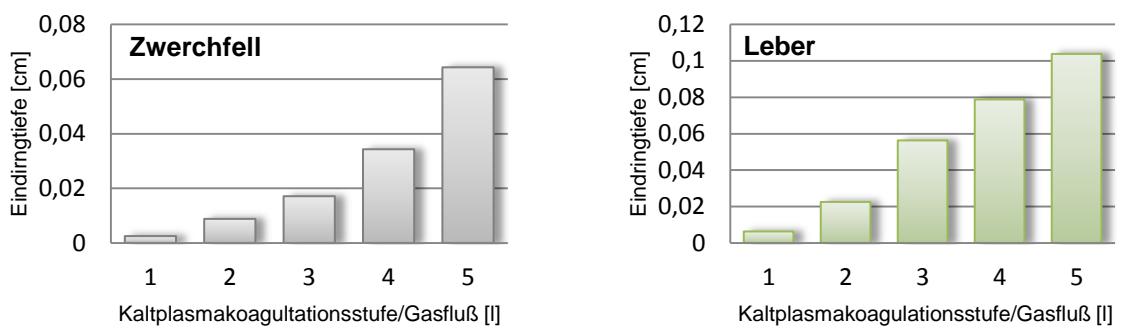


Abbildung 21: Graphische Darstellung über die lineare Abhängigkeit der Eindringtiefe abhängig von der Koagulationsstufe

Wilcoxon-Test

In der statistischen Auswertung wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests nachgewiesen, dass statistisch signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Leistungsstufen bestehen. Dabei wurden die aufeinander folgenden Leistungsstufen miteinander verglichen.

Der p-Wert < 0,05 zeigte die statistisch signifikante Differenz. Genauere Daten sind aus den folgenden Tabellen ersichtlich.

Lunge

Energielevel	Z, asymptotische Signifikanz
0 vs. 10W	(')-2.060, P=0.039
50 vs. 20 W	(')-2.264, P=0.024
75 vs. 50 W	(')-1.732,P=0.083
100 vs. 75 W	(')-2.2.01, P=0.028
75W/3,5l vs. 50W/3,5l	(')-1.000,P=0.317
100W/3,5l vs. 75W/3,5l	(')-0.707,P=0.480

Dünndarm

Energielevel	Z, asymptotische Signifikanz
20 vs. 10W	(')-2.460, P=0.014
50 vs. 20 W	(')-1.342,P=0.180
75 vs. 50 W	(')-2.546, P=0.011
100 vs. 75 W	(')-1.890,P=0.059
75W/3,5l vs. 50W/3,5l	(')-1.890,P=0.059
100W/3,5l vs. 75W/3,5l	(')-2.264, P=0.024

Zwerchfell

Energielevel	Z, asymptotische Signifikanz
20 vs. 10W	(')-2.236, P=0.034
50 vs. 20 W	(')-2.121, P=0.034
75 vs. 50 W	(')-1.604,P=0.109
100 vs. 75 W	(')-1.084,P=0.279
100W/3,5l vs. 75W	(')-1.342,P=0.180

Leber

Energielevel	Z, asymptotische Signifikanz
20 vs. 10W	(')-1.807,P=0.071
50 vs. 20 W	(')-2.388, P=0.017
75 vs. 50 W	(')-2.214, P=0.027
100 vs. 75 W	(')-2.232, P=0.026

Milz

Energielevel	Z, asymptotische Signifikanz
20 vs. 10W	(')-2.402, P=0.016
50 vs. 20 W	(')-2527, P=0.012

75 vs. 50 W	(')-2.207, P=0.027
100 vs. 75 W	(')-0.412, P=0.680

Tabelle 17: Tabellen über die statistische Auswertung der Ergebnisse

3.3.2 Einfluss des Gasfluss auf die Eindringtiefe des Kaltplasmas

Die studienspezifische Variation des Gasflusses zeigte einen zusätzlichen Aspekt der Steuerbarkeit der Kaltplasmakoagulation. Es konnte dargelegt werden, dass bei der Verwendung der gleichen Ausgangsleistung mit unterschiedlichem Gasfluss die Eindringtiefe des Plasmastrahls moduliert werden kann. Bei steigendem Gasfluss verringerte sich die Eindringtiefe. Damit stellte der Gasfluss ebenfalls eine wichtige Modulatorgröße bei diesem Medizinprodukt dar. Die Feineinstellung der Eindringtiefe kann somit ebenfalls gesteuert werden. Dieser Effekt wird in **Abbildung 21** dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Kaltplasmakoagulation: Ergebnisse dieser Studie und Ausblicke

Es wurde im Rahmen dieser Tierversuchsstudie erstmalig die sichere Übertragbarkeit von Hochfrequenzstrom auf die Oberfläche von verschiedenen Organen des Thorax und des Abdomens nachgewiesen [64].

Sichere Übertragbarkeit bedeutet in diesem Zusammenhang, dass transmurale Schäden der Hohlorgane und Schädigungen der parenchymatösen Organe vermieden wurden. Lediglich das Perikard ist bei einer Applikation von 30 Watt perforiert und war daher für diese Form der Energieübertragung ungeeignet.

Es konnte gezeigt werden, dass eine sichere Anwendung der Kaltplasmakoagulation nicht auf Lunge und Darm beschränkt ist, sondern auch auf Zwerchfell, Milz und Leber möglich ist.

Aufgrund der insgesamt nur geringen postoperativen Morbidität, die bei keinem Minipig zu bleibenden Beeinträchtigungen, noch zu Störungen der Entwicklung führten, ist die Kaltplasmakoagulation aus der Sicht der Untersucher ein sicheres Verfahren zur kontaktlosen Übertragung von Energie auf die Lunge, das Zwerchfell, den Dünndarm, die Leber und die Milz. Es wurde somit gezeigt, dass es möglich ist, die Oberfläche von Organen mit Kaltplasmakoagulation zu behandeln.

Die Letalität bei der Anwendung der Kaltplasmakoagulation lag insgesamt in dieser Studie bei null Prozent. Ebenfalls sehr gering war die peri- und postoperative Morbidität.

Die Entwicklung der Tiere schien im Allgemeinen äußerst wenig beeinträchtigt, insbesondere vor dem Hintergrund der Ergebnisse des Nachsorgescore und der positiven Gewichtsentwicklung, wie oben dargestellt. In beiden Studiengruppen nahmen die Minipigs kontinuierlich während der gesamten Studie zu, was einen wichtigen Indikator für die gute Verträglichkeit der Maßnahme darstellt.

Die wichtigsten Parameter für die Beurteilbarkeit der klinischen Sicherheit der Kaltplasmakoagulation, ist die Häufigkeit des Auftretens von Fisteln sowie weiteren postoperativen Komplikationen, wie entzündlichen Reaktionen und Abszessbildungen.

Bei der thorakalen Anwendung kam es in keinem Fall zu einer Fistelbildung [64]. „Die direkte Nekrosetiefe und der Kollateralschaden haben die Alveolen in allen Proben nicht zerstört...“ [64]. In dieser Gruppe wurden lediglich zwei Tiere mit Pleuraergüssen verzeichnet. Klinisch waren die Minipigs unauffällig, so dass von einer spezifischen Therapie abgesehen wurde. Erst die histopathologischen Ergebnisse zeigten in diesen beiden Fällen, chronische Infiltrate und pleurale Abszesse in den zuvor ergusshaltigen Bereichen zwischen Lunge und Thoraxwand.

Nach Kaltplasmakoagulation auf dem Dünndarm kam es in keinem Fall zur Entwicklung einer Peritonitis oder zur Entstehung eines intraabdominellen Abszesses. Nur in einem Fall kam es zu der Entstehung einer Dünndarmfistel. Es handelte sich um eine histopathologisch nachgewiesene, punktförmige Perforationsstelle, die jedoch vollständig mit Verwachsungen bedeckt war und zu keinen postoperativen Einschränkungen des Tieres führten. Über den Zeitpunkt der Entstehung kann nur spekuliert werden. Insgesamt wurden in keinem anderen untersuchten Dünndarmanteil von Tieren in dieser Studie, unabhängig von der angewandten Energiestufe, Perforationen oder Fisteln nachgewiesen.

Nicht nur die Möglichkeit der sicheren Anwendbarkeit der Kaltplasmakoagulation wurde durch die vorliegende Untersuchung nachgewiesen, sondern auch eine Vorhersage der Eindringtiefe scheint möglich. Je nach Ausgangsleistung konnte die Eindringtiefe variiert werden. Das bedeutet bei steigender Ausgangsleistung, konnte eine höhere Eindringtiefe erzielt werden. Hierbei bestand eine annähernd lineare Abhängigkeit. Eine Feinjustierung der Energieübertragung auf die den oben genannten Organen war möglich und gut durchführbar. Die Nullhypothese muss also verworfen werden: Generatorleistung und Eindringtiefe sind annähernd linear voneinander abhängig.

Diese nachgewiesenen Effekte lassen einige Schlussfolgerungen zu:

Durch die Karyopyknose und die Karyorhexis konnte ein irreversibler Schaden des Zellkerns nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass Tumorzellen ebenfalls zerstört werden könnten. Weitere Studien darüber müssen erfolgen.

Die kontrollierte Zerstörung von oberflächlichen Zellen und Zellschichten mit einer Vorhersehbarkeit des Schadens kann eine attraktive Ergänzung der therapeutischen Optionen in der chirurgischen Onkologie werden. Diese Form der Therapie kann besonders bei den Tumoren Anwendung finden, die nicht nur die Lebenserwartung stark begrenzen sondern ebenfalls nur mit sehr radikalen Eingriffen behandelt werden können.

Diese Eingriffe sind häufig in ihrer onkologischen Radikalität dadurch limitiert, dass durch einen Dünndarmbefall zwar eine technische Operabilität besteht, ein Eingriff sich aber durch den Dünndarmverlust verbietet.

Die Kaltplasmakoagulation könnte durch die oberflächliche Anwendbarkeit und gute Verträglichkeit die therapeutischen Möglichkeiten deutlich erweitern und deutlich mehr Patienten eine potentiell kurative Therapieoption ermöglichen [63].

4.2 Kaltplasmakoagulation in der Therapie des Pleuramesothelioms und der Peritonealkarzinose

Das Pleuramesotheliom und die Peritonealkarzinose sind Erkrankungen die sich initial auf der Oberfläche der betroffenen Organe abspielen. Die Karzinomherde sind daher direkt dem Kaltplasmastrahl ausgesetzt, so dass die oben beschriebene Karyopyknose und Karyorrhexis ebenfalls resultieren könnte. Kein weiteres bisher untersuchtes Verfahren würde eine solche direkte Anwendung auf der Oberfläche eines von serösen Häuten bedeckten Organs ermöglichen.

Die hyperthermische intrathorakale/intraabdominelle Chemotherapie könnte als ebenfalls direkt auf der Oberfläche einwirkendes Verfahren eine Ergänzung darstellen. Die hyperthermische intrathorakale/intraabdominelle Chemotherapie wird hierbei in Kombination mit einer maximalen makroskopischen Zytoreduktion durchgeführt. Aus der vorliegenden Studie geht nicht hervor, welche Wirkungen eine Kombination aus intracavitarer Chemotherapie und Kaltplasmakoagulation auf den Patienten hätte. Hierfür bedarf es weiterer Untersuchungen. Aufgrund der hohen Toxizität der eingesetzten Substanzen nicht nur gegenüber Tumorzellen, sondern auch gegenüber gesunden Zellen kann nicht ausgeschlossen werden, dass Heilungsvorgänge nach Kaltplasmakoagulation durch die angewandte Chemotherapie gestört werden. Potentielle lokale und systemische Komplikationen der hyperthermischen intrathorakalen/intraabdominellen Chemotherapie könnten daher deutlich schwerer sein, als bei Verzicht auf eine Kaltplasmakoagulation.

Die chirurgische Onkologie definiert Operationsabläufe und Anteile von Organen, die entfernt werden müssen, um eine ausreichende chirurgische Radikalität zu gewährleisten. So ist es möglich, dass große Teile der Lunge bei der extrapleuralen Pneumonektomie in

der Therapie des Pleuramesotheliomes oder zum Beispiel Dünndarm(teil)resektionen im Rahmen der zytoreduktiven Chirurgie bei der Peritonealkarzinose durchgeführt werden müssen, um eine maximale makroskopische Resektion der Tumoren zu erreichen. Verringerte Funktionsleistungen dieser Organe, einhergehend mit einer eingeschränkten Lebensqualität der Betroffenen sind das unerwünschte Resultat. Dies geht häufig mit einer deutlich eingeschränkten Lebensqualität einher.

Die Kaltplasmakoagulation stellt ein potentiell organerhaltendes Verfahren dar. Es konnte gezeigt werden, dass durch die geringe Morbidität und geringe Beeinträchtigung der Tiere bezogen auf Entwicklung und postoperatives Verhalten, die Lebensqualität der Tiere nicht wesentlich eingeschränkt wurde. Dies ist ein positiver Aspekt, der gegebenenfalls nach weiteren tierexperimentellen Studien einen Einsatz im Menschen rechtfertigt.

Aufgrund des potentiell möglichen minimal-invasiven Zuganges (Thorakoskopie, Laparoskopie) sind auch Eingriffe mit initial diagnostischem Ansatz und minimal-invasive Re-Eingriffe möglich.

Die Wirksamkeit der oben beschriebenen Therapieverfahren ist in vielen Studien und langjähriger Erfahrung erforscht und bewiesen worden. Die Kaltplasmakoagulation muss sich diesen Prüfungen noch unterziehen.

Dabei soll dieses vielversprechende Verfahren keineswegs die anderen Verfahren ersetzen. Sie könnte eine weitere Alternative oder eine zusätzliche Option in der Therapie des Pleuramesotheliomes und der Peritonealkarzinose darstellen.

In Zukunft könnte aufgrund der vielen oben genannten Vorteile, die Kaltplasmakoagulation in den palliativen- und auch in den multimodalen Therapieansatz beider Erkrankungen integriert werden. Hierfür sind weitere Studien erforderlich.

4.3 Vergleich der Methode der Kaltplasmakoagulation mit anderen experimentellen therapeutischen Verfahren

4.3.1 Laser

Die Lasertherapie wird in vielen Bereichen der Medizin therapeutisch angewendet. Laser sind sehr vielfältig und sind individuell einzustellen in Leistung und Ausrichtung, daher sind sie bei verschiedenen Erkrankungen als therapeutische Maßnahme etabliert.

Hauptindikationen bestehen bei Erkrankungsbildern, bei denen eine gleichzeitige Dissektion bei Thermokoagulation im Operationsgebiet notwendig ist. So ist der Laser ein etabliertes Therapieverfahren in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde bei der transorale Mikrochirurgie von Tumoren der Glottis und des Larynx und wird in verschiedenen Leitlinien empfohlen [72]. Für den Einsatz endorektal liegen ebenfalls eine Vielzahl von Beschreibungen vor, jedoch wird hier nicht auf eine Steuerbarkeit der Eindringtiefe sondern auf die Blutstillung fokussiert, so dass für den Laser keine Daten für die extraluminale Anwendung vorliegen [73, 74, 75].

4.3.2 Mono- und bipolare Koagulation

Weitere etablierte Optionen, thermische Energie auf eine Oberfläche zu übertragen, sind die mono- und bipolare Koagulation. Keine der beiden vorgenannten Techniken hat eine vorhersagbare Eindringtiefe. Insbesondere bei der monopolaren Koagulation kann es aufgrund des Stromflusses durch den Körper zu weiteren Schäden an anderen Orten als der eigentlichen Applikationsstelle kommen. Insbesondere von der gewünschten endoluminalen Anwendung als auch bei der ungewollten Anwendung auf der Serosa sind für mono- und bipolare Koagulation eine Vielzahl von Fallberichten publiziert worden [76, 77, 78].

4.3.3 Argonplasmakoagulation

Die Vorteile der in dieser Arbeit untersuchten Technik liegen in der kontaktlosen Übertragung der Energie mittels eines Edelgases als Trägermedium. Eine vergleichbare Technik ist die so genannte Argonplasmakoagulation, die bereits länger in der klinischen Routine etabliert ist [73, 79, 80, 81]. Die Hauptanwendung der Argonplasmakoagulation liegt in der endoluminalen Behandlung von Engstellen oder Blutungsquellen. Hierfür

liegen sehr gute klinische Daten vor. Ebenfalls ist eine Modulation des Gasflusses analog den oben beschriebenen technischen Optionen bei der Kaltplasmakoagulation möglich. Beispielhaft sei hier eine Arbeit von Panos und Koumi angeführt, die bei endoluminalen Behandlung von Teleangiektasien im rechten und linken Kolon keine erhöhte Perforationsrate bei Anwendung von 60 Watt Generatorleitung und einem Gasfluss von 1,2 l/min nachweisen konnten [82].

Alle vorbeschriebenen bestehenden Therapieoptionen haben gemein, dass für sie wie auch bis dato für die Kaltplasmakoagulation keine Daten für eine Anwendung auf der Oberfläche von Lunge und Dünndarm vorliegen. Alle publizierten Anwendungen sind Beschreibungen einer akzidentellen Anwendung mit zum Teil letalem Ausgang. Inwieweit eine Anwendung der Argonplasmakoagulation möglich wäre ist derzeit vollkommen unklar und kann aufgrund der fehlenden Zulassung nicht empfohlen werden.

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, dass die bestehenden technischen Möglichkeiten zur Energieübertragung auf eine Oberfläche für die Anwendung auf der Oberfläche der Lunge und des Darms nicht geeignet sind. Durch die Kaltplasmakoagulation könnten sich daher wie zuvor ausgeführt nach Durchführung weiterer Studien weitere Therapieoptionen ergeben.

4.4 Kritische Wertung der Daten

Zunächst ist festzustellen, dass diese Studie auf Daten basiert, die an Tieren und nicht am Menschen gewonnen wurden. Daher sind die oben genannten potentiellen Einsatzmöglichkeiten aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, nicht ohne weiteres in den Operationssaal für Eingriffe am Menschen zu übertragen. Die Wahrscheinlichkeit ist aber hoch, dass die Schlussfolgerungen zutreffen könnten, da Schweine dem Menschen im Aufbau und Funktion der Organe des Thorax und des Abdomen sehr ähnlich sind. Schweine stellen in der chirurgischen Forschung unter anderem aus den oben genannten Gründen, eine häufig verwendete Spezies bei der Untersuchung ähnlicher Fragestellungen dar.

Weiterhin war die Anzahl der Tiere für diese Studie relativ klein, begründet auf der Genehmigung einer begrenzten Anzahl gemäß dem Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig–Holstein. Es sollte lediglich zunächst die Möglichkeit der gefahrlosen Applikation von Kaltplasma auf der Oberfläche seröser

Häute bewiesen werden. So mussten die Interventionen auch gering gehalten werden, um die Tiere nicht unnötig zu belasten.

Die Kaltplasmakoagulation wurde in dieser Studie überwiegend an Nicht-Tumor-Zellen durchgeführt. Die sichere Induktion großflächiger Pleuramesotheliome war in der thorakalen Tiergruppe nicht zuverlässig reproduzierbar. Nur bei zwei Minipigs konnten histologisch Pleuramesotheliominseln nachgewiesen werden.

In der abdominellen Gruppe wurde von einer Induktion einer Peritonealkarzinose abgesehen, da dies nicht Bestandteil des Antrages war.

Zusätzlich zur Beantwortung der ursprünglichen Fragestellung der sicheren Übertragbarkeit thermischer Energie auf seröse Oberflächen wurde eindeutig nachgewiesen, dass auch eine Applikation in Randbereichen von Karzinoseherden nicht zu einer Darm-/ Lungenfistel geführt hätte. Dies ist insofern von hoher Bedeutung, da bei der Behandlung oberflächlicher Tumoren der Pleura und des Abdomens es auch immer zu einer thermischen Belastung der Randbereiche von Karzinoseherden kommen muss. Im Tiermodell hätte hieraus keine negative Konsequenz für den Patienten resultiert, da bei protokollgemäßiger Applikation in keinem Fall eine transmurale Schädigung von Lunge oder Darm auftrat. Die Kaltplasmakoagulation ist vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse daher als relativ sichere Option zur Übertragung thermischer Energie auf seröse Oberflächen zu werten.

Eine mögliche Limitierung der Kaltplasmakoagulation in der Behandlung der Peritoneal- und Pleurakarzinose könnten Tumoranteile sein, die zum Beispiel den Dünndarm ummauern. Auch dickere Tumorzellschichten, die transmural infiltrieren, stellen eine Begrenzung der Anwendbarkeit aufgrund der limitierten Eindringtiefe dar. Die Eindringtiefe richtet sich aber nicht nur nach den technischen Möglichkeiten, sondern auch nach organspezifischen maximalen Eindringtiefen.

Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren, welche nicht nur oberflächlich wachsen sondern große Teile der Organe infiltrieren, müssen weiterhin wenn möglich chirurgisch reseziert werden oder einer primär palliativen Therapie zugeführt werden.

Einen Vorteil könnte die Kaltplasmakoagulation daher eher bei oberflächlichen, wenig konfluierenden oder diffus wachsenden Tumorzellverbänden auf den Organen des Thorax und des Abdomens darstellen. Hier ist insbesondere der miliare Dünndarmbefall durch Karzinoseherde zu nennen, der bis dato vielfach eine Kontraindikation für ein weiteres operatives Verfahren darstellt.

Vor dem potentiellen Einsatz beim Menschen sollten weitere Erfahrungen und Daten zur Kaltplasmakoagulation insbesondere auf dem Dünndarm gewonnen werden. Das Vorliegen einer Dünndarmfistel in der abdominalen Tiergruppe vor diesem Hintergrund ist ein wichtiger Aspekt, der vor dem Einsatz dieser Methode beim Menschen zunächst weitere Untersuchungen nach sich ziehen muss. Einschränkend ist hierbei aber erneut anzumerken, dass es bei protokollgerechter Anwendung in keinem Fall zu einer transmuralen Schädigung kam.

5 Zusammenfassung

In dieser experimentellen Tierstudie wurde die Anwendung der Kaltplasmakoagulation auf der Oberfläche von thorakalen und abdominalen Organen erstmalig untersucht. Die Motivation zur Durchführung dieser Studie rührte daher, dass sowohl die Therapieoptionen des Pleuramesothelioms als auch der Peritonealkarzinose durch Tumorwachstum auf der viszeralen Oberfläche der Organe deutlich eingeschränkt sind. Die Kaltplasmakoagulation ist ein Verfahren bei der Hochfrequenzenergie über einen Heliumplasmastrahl auf eine Oberfläche übertragen wird und dabei thermische Energie auf die Oberfläche einwirkt.

Die Untersuchung war als Pilotstudie geplant und wurde nach vorheriger Genehmigung des Tierversuches durchgeführt. Die Minipigs wurden in zwei Gruppen (abdominal und thorakal), jeweils aus 8 Tieren bestehend, eingeteilt. Über einen minimal-invasiven Zugang (Thorakoskopie oder Laparoskopie) erfolgte die Kaltplasmakoagulation auf der Oberfläche von Lunge und Darm. Nach etwa 12 bis 16 Tagen erfolgte eine explorative Thorakotomie beziehungsweise Laparotomie. Operationsfolgen wurden standardisiert dokumentiert und nach der Terminierung der Tiere erfolgte die Entnahme multipler Gewebeproben zur pathologischen Untersuchung.

Während des gesamten Versuches wurden die Tiere täglich untersucht und nachbeobachtet. In beiden Studiengruppen nahmen die Minipigs kontinuierlich während der gesamten Studie zu, was einen wichtigen Indikator für die gute Verträglichkeit der Maßnahme darstellte. Die ebenfalls guten Ergebnisse im Nachsorgescore zeigten, dass die Entwicklung der Tiere postoperativ kaum beeinträchtigt wurde.

Die Letalität bei der Anwendung der Kaltplasmakoagulation lag insgesamt bei null Prozent. Ebenfalls sehr gering war die peri- und postoperative Morbidität.

Nach histologischer Auswertung der Proben konnte sowohl für den Darm als auch die Lunge gezeigt werden, dass eine annähernd lineare Abhängigkeit zwischen der Eindringtiefe der Kaltplasmakoagulation und der Ausgangsleistung des Generators sowie dem Gasfluss bestand.

Die Kaltplasmakoagulation stellt daher im Tiermodell ein sicheres und vorhersagbares Verfahren zur oberflächlichen Behandlung von Raumforderungen der Pleura und des Dünndarms dar.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Delgermaa V, Takahashi K, Park EK, Le GV, Haraa T, Sorahan T: Global mesothelioma deaths reported to the World Health. Research 89, 716-724, (2011)
- [2] Neumann V, Löseke S, Nowak D, Herth FJF, Tannapfel A: Malignant pleural mesothelioma: incidence, etiology, diagnosis, treatment and occupational health Dtsch Arztebl Int 110, 319–26 (2013)
- [3] Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P: Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the north western cape province. Brit. J. industr. Med. 17, 260-271 (1960)
- [4] Craighead JE: Epidemiology of mesothelioma and historical background. Recent Results Cancer Research 189, 13-25 (2011).
- [5] Daunderer M: Asbest, in Wirkungcharakter und Toxizität, Daunderer- Handbuch der Umweltgifte. Ausgabe 06/2006, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH, 20.10.2007
- [6] Belli C, Fennell D, Giovannini M, Gaudino G, Mutti L: Malignant pleural mesothelioma: current treatments and emerging drugs. Expert Opinion informa healthcare, 423-437 (2009)
- [7] Thiel E, Meerbeeck JP: European guidelines for the management of malignant pleural mesothelioma. POLSKIE ARCHIWUM MEDYCYNY WEWNĘTRZNEJ 12, 503-510 (2010)
- [8] Bibby A, Tsim S, Kanellakis N, Ball H, Talbot D, Blyth K, Maskell N, Psalidas I: Malignant pleural mesothelioma: an update on investigation, diagnosis and treatment. Eur Respir Rev 25, 472-486 (2016)
- [9] <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/002-038.html> (Tag des Zugriffs. 08.01.2016)

- [10] Scherpereel A, Astoul P, Baas P, Berghmans T, Clayson H, de Vuyst P, Dienemann H, Galateau-Salle F, Hennequin C, Hillerdal G, Pe'choux CL, Mutti L, Pairon JC, Stahel R, van Houtte P, van Meerbeeck J, Waller D, Weder W: Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. Eur Respir J 35, 479–495 (2010)
- [11] Gill RR: Imaging of mesothelioma. Recent Res Cancer Res 189, 27-55 (2011)
- [12] Hasegawa S, Kondo N, Matsumoto S, Takuwa T, Hashimoto M, Orui H, Fukuda S, Yoneda K, Okumura Y, Tsubota N, Fukuoka K, Torii I, Tsujimura T, Nakano T: Practical approaches to diagnose and Treatment to malignant pleural mesothelioma: a proposal for diagnostic total parietal pleurectomy. Int J Clin Oncol 17, 9-33 (2012)
- [13] Ceresoli GL, Cesare Gridelli AS: Multidisciplinary Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma. The Oncologist 12, 850-863 (2007)
- [14] Bayman N, Ardon D, Ashcroft L, Baldwin DR, Booton R, Darlison L, Edwards JG, Lang-Lazdunski L, Lester JF, Peake M, Rintoul RC, Snee M, Taylor P, Lunt C, Faivre-Finn C: Protocol for PIT: a phase III trial of prophylactic irradiation of tracts in patients with malignant pleural mesothelioma following invasive chest wall intervention. BMJ Open 6, e010589,1-8 (2016)
- [15] Hoda M, Klikovits T, Arns M, Dieckmann K, Zöchbauer-Müller S, GeltnerC, Baumgartner B, Errhalt P, Machan B, Pohl W, Hutter J, Eckmayr J, Studnicka M, Flicker M, Cerkl P, Klepetko W: Management of malignant pleural mesothelioma- part 2: therapeutic approaches: Consensus of the Austrian Mesothelioma Interest Group (AMIG). Wien Klin Wochenschr 128, 618-626 (2016)
- [16] Porpodis K, Zarogoulidis P, Boutsikou E, Papaioannou A, Machairiotis N, K. Tsakiridis K, Katsikogiannis N, Zaric B, Perin B, Huang H, Kougioumtzi I, Spyros D, Zarogoulidis K: Malignant pleural mesothelioma: current and future perspectives. Journal of Thoracic Disease 5, 397-406 (2013)
- [17] Karnofsky D, Burchenal JI: The Clinical Evaluation of Chemotherapeutic Agents in Cancer. In: MacLeod CM (Ed), Evaluation of Chemotherapeutic Agents. Columbia Univ Press, 196 (1949)

- [18] Verger E, Salamero M, Conill C: Can Karnofsky Performance Status be transformed to the Eastern Cooperative Oncology Group Scoring Scale and vice-versa. European Journal of Cancer 8-9, 1328-1330 (1992)
- [19] Oken M, Creech R, Tormey D, Horton J, Davis T, McFadden E, Carbone P: Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Onco 5, 649-655 (1982)
- [20] Weder W, Opitz I: Multimodality therapy for malignant pleural mesothelioma. Ann Cardiothorac Surg 1, 502-507 (2012)
- [21] Clive A, Wilson P, Taylor H, Morley A , de Winton E, Panakis N, Rahman N, Pepperell J, Howell T, Batchelor T, Jordan N, Lee Y, Dobson L, Maskell N: Protocol for the surgical and large bore procedures in malignant pleural mesothelioma and radiotherapy trial (SMART Trial): an RCT evaluating whether prophylactic radiotherapy reduces the incidence of procedure tract metastases. BMJ Open 5, e006673 (2015)
- [22] Papaspypros S, Papaspyros S: Surgical management of malignant pleural mesothelioma: impact of surgery on survival and quality of life-relation to chemotherapy, radiotherapy and alternative therapies. ISRN Surg Volume 2014, 817203, 1-13 (2014)
- [23] Stahel R, Riesterer O, Xyrafas A, Opitz I, Beyeler M, Ochsenbein A, Früh M, Cathomas R, Nackaerts K, Peters S, Mamot C, Zippelius A, Mordasini C, Caspar C, Eckhardt K, Schmid R, Aebersold D, Gautschi O, Nagel W, Töpfer M, Krayenbuehl J, Ribi K, Ciernik LF, Weder W: Neoadjuvant chemotherapy and extrapleural pneumonectomy of malignant pleural mesothelioma with or without hemithoracic radiotherapy (SAKK 17/04): a randomised, international, multicentre phase 2 trial. Lancet Oncol 16,1651-1658 (2015)
- [24] <http://www.eortc.be/services/doc/ctc/> ;
http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm.
(Tag des Zugriffs: 8.1.2016)
- [25] Rice D, Rusch V, Pass H, Asamura H, Nakano T, Edwards J, Giroux DJ, Hasegawa S, Kernstine KH, Waller D, Rami-Porta R: International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee and the

- International Mesothelioma Interest Group. Recommendations for uniform definitions of surgical techniques for malignant pleural mesothelioma: a consensus report of the international association for the study of lung cancer international staging committee and the international mesothelioma interest group. *Journal of Thoracic Oncology* 6, 1304-1312 (2011)
- [26] Klikovits T, Hoda M, Klepetko W: State of the Art: Chirurgische Therapieoptionen beim malignen Pleuramesotheliom. *Interdisziplinäre Onkologie* 5, 43-46 (2013)
- [27] Azzouqa AG, Stevenson JP: The evolution of the diminishing role of extrapleural pneumonectomy in the surgical management of malignant pleural mesothelioma. *Onco Targets Ther* 9, 7247-7252 (2016)
- [28] Hoffmann M, Bruch HP, Kujath P, Limmer S: Cold-plasma coagulation in the treatment of malignant pleuralmesothelioma: results of a combined approach. *Interactive Cardio-Vascular and Thoracic Surgery* 10, 502-505 (2010)
- [29] Caronia F, Fiorelli A, Santini M, Arrigo E: Extrapleural Pneumonectomy for Malignant Pleural Mesothelioma: A Novel Mini-Invasive Technique. *Innovations (Phila)* 11, 444-447 (2016)
- [30] Flores RM, Pass HI, Seshan VE, Dycoco J, Zakowski M, Carbone M, Bains MS, Rusch VW: Extrapleural pneumonectomy versus pleurectomy/decortication in the surgical management of malignant pleural mesothelioma: results in 663 patients. *Journal of Thorac Cardiovasc Surgery* 135, 620-626 (2008)
- [31] Cao C, Tian D, Manganas C, Matthews P, Yan T: Systematic review of trimodality therapy for patients with malignant pleural mesothelioma. *Ann Cardiothorac Surg* 4, 428-437 (2012)
- [32] Treasure T, Lang-Lazdunski L, Waller D, Bliss J, Tan C, Entwistle J, Snee M, O'Brien M, Thomas G, Senan S, O'Byrne K, Kilburn L, Spicer J, Landau D, Edwards J, Coombes G, Darlison L, Peto J: Extra-pleural pneumonectomy versus no extra-pleural pneumonectomy for patients with malignant pleuralmesothelioma: clinical outcomes of the Mesothelioma and Radical Surgery (MARS) randomised feasibility study. *The Lancet Oncology* 8, 763-772 (2011)

- [33] Krug LM, Pass HI, Rusch VW, Kindler HL, Sugarbaker DJ, Rosenzweig KE, Flores R, Friedberg JS, Pisters K, Monberg M, Obasaju CK, Vogelzang NJ: Multicenter Phase II Trial of Neoadjuvant Pemetrexed Plus Cisplatin Followed by Extrapleural Pneumonectomy and Radiation for Malignant Pleural Mesothelioma. *J Clin Oncol* 27, 3007-3017 (2009)
- [34] Friedberg J, Culligan M, Mick R, Stevenson JJ, Hahn S, Sterman D, Salman Punekar S, Glatstein E, Cengel K: Radical Pleurectomy and Intraoperative Photodynamic Therapy for Malignant Pleural Mesothelioma. *Ann Thorac Surg* 93, 1658-1667 (2012)
- [35] Friedberg JS: Radical pleurectomy and photodynamic therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Cardiothorac Surg* 4, 472-480 (2012)
- [36] Zellos L, Richards W, Capalbo L, Jaklitsch M, Chirieac L, Johnson B, Bueno R, Sugarbaker D: A phase I study of extrapleural pneumonectomy and intracavitary intraoperative hyperthermic cisplatin with amifostine cytoprotection for malignant pleural mesothelioma. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 137, 453-458 (2009)
- [37] Tilleman T, Richards W, Zellos L, Johnson B, Jaklitsch M, Mueller J, Yeap BY, Mujoomdar A, Ducko C, Bueno R, Sugarbaker D: Extrapleural pneumonectomy followed by intracavitary intraoperative hyperthermic cisplatin with pharmacologic cytoprotection for treatment of malignant pleural mesothelioma: A phase II prospective study. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 138, 405-411 (2009)
- [38] Ried M, Potzger T, Braune N, Neu R, Zausigb Y, Schalke B, Diez C, Hofmann HS: Cyoreductive surgery and hyperthermic intrathoracic chemotherapy perfusion for malignant pleural tumours: perioperative management and clinical experience. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 43, 801-807 (2012)
- [39] Spiliotis J, Halkia E, de Bree E: Treatment of peritoneal surface malignancies with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy-current perspectives. *Curr Oncol* 3, e266-275. doi: 10.3747/co.23.2831 (2016)
- [40] Glockzin G, Ghali N, Lang SA, Agha A, Schlitt HJ, Piso P: Peritoneal carcinomatosis. Surgical treatment, including hyperthermal intraperitoneal

chemotherapy. Chirurg 78, 1102-1106, 1108-1110 (2007)

- [41] Teo M: Peritoneal-based Malignancies and Their Treatment. Annals Academy of Medicine 39, 54-57 (2010)
- [42] Cocolini F, Gheza F, Lotti M, Virzì S, Lusco D, Ghermandi C, Melotti R, Baiocchi G, Giulini S, Ansaldi L, Catena F: Peritoneal carcinomatosis. World Journal of Gastroenterol 19, 6979-6994 (2013)
- [43] Thomassen I, van Gestel Y, Lemmens V, de Hingh IH: Incidence, Prognosis, and Treatment Options for Patients With Synchronous Peritoneal Carcinomatosis and Liver Metastases from Colorectal Origin. Diseases of the Colon & Rectum 56, 1373–1380 (2013)
- [44] Lemmens V, Klaver Y, Verwaal V, Rutten H, Coebergh J, de Hingh I: Predictors and survival of synchronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a population-based study. International Journal of Cancer 128, 2717–2725 (2011)
- [45] Quere P, Manfredi S, Facy O, Jooste V, Faivre J, Lepage C, Bouvier A: Epidemiology, Management and Survival of Peritoneal Carcinomatosis from Colorectal Cancer: A Population-Based Study. Dis Colon Rectum 58, 743-52 (2015)
- [46] Piso P, Arnold D: Multimodale Therapiekonzepte der Peritonealkarzinose bei kolorektalen Karzinomen. Deutsches Ärzteblatt 108, 802-808 (2011)
- [47] Glockzin G, Schlitt H, Piso P: Therapeutic options for peritoneal metastasis arising from colorectal cancer. World J Gastrointest Pharmacol Ther 7, 343-352 (2016)
- [48] Ihemelandu C, Shen P, Stewart J, Votanopoulos K, Levine E: Management of Peritoneal Carcinomatosis From Colorectal Cancer. Seminars in Oncology 38, 568-575 (2011)
- [49] Klaver Y, Leenders B, Creemers GJ, Rutten H, Verwaal V, Lemmens V, d. Hingh I: Addition of Biological Therapies to Palliative Chemotherapy Prolongs Survival in Patients With Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Origin. American Journal of Clinical Oncology 36, 157-161 (2013)

- [50] Klaver CE, Musters GD, Bemelman WA, Punt CJ, Verwaal VJ, Dijkgraaf MG, Aalbers AG⁷, van der Bilt JD⁸, Boerma D⁹, Bremers AJ¹⁰, Burger JW, Buskens CJ, Evers P, van Ginkel RJ, van Grevenstein WM, Hemmer PH, de Hingh IH, Lammers LA, van Leeuwen BL, Meijerink WJ, Nienhuijs SW, Pon J, Radema SA, van Ramshorst B, Snaebjornsson P, Tuynman JB' Te Velde EA, Wiezer MJ, de Wilt JH, Tanis PJ: Adjuvant hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in patients with colon cancer at high risk of peritoneal carcinomatosis; the COLOPEC randomized multicentre trial. BMC Cancer 15, 1-9 (2015)
- [51] Glockzin G, Schlitt H Piso P: Peritoneal carcinomatosis: patients selection, perioperative complications and quality of life related to cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. World Journal of Surgical Oncology 7, 1-8 (2009)
- [52] Esquivel J, Farinette A, Sugarbaker P: Elective surgery in recurrent colon cancer with peritoneal seeding: When to and when not to proceed. Cancer Therapeutics 1, 321-325 (1998)
- [53] Harmon R, Sugarbaker P: Prognostic indicators in peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer. International Seminars in Surgical Oncology 2, 1-10 (2005)
- [54] Sugarbaker P: Peritonectomy procedures. Ann Surg 221, 29-42 (1995)
- [55] Deutsche Gesellschaft für Viszeralchirurgie: Basisprotokoll für ein multimodales chirurgisches Therapiekonzept zur Behandlung von Patienten mit Peritonealcarcinose mittels Peritonektomie/Multiviszeralresektion und hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie.
- [56] Sugarbaker PH: Parietal Peritonectomy. Society of Surgical Oncology 19 (2012)
- [57] Sugarbaker P: Technical Handbook for the Integration of Cytoreductive Surgery and Perioperative Intraperitoneal Chemotherapy into the Surgical Management of Gastrointestinal and Gynecologic Malignancy, 4 th Edition, Michigan, USA: The Ludann Company Grand Rapids, 12-24, 2005.
- [58] Yan TD, Welch L, Black D, Sugarbaker PH: A systematic review on the efficacy of cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal

- chemotherapy for diffuse malignancy peritoneal mesothelioma. Annals of Oncology 18, 827–834 (2007)
- [59] Neuwirth M, Alexander H, Karakousis G: Then and now: cytoreductive surgery with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC), a historical perspective. J Gastrointest Oncol 7, 18-28 (2016)
- [60] Spiliotis J, Halkia E, de Bree E: Treatment of peritoneal surface malignancies with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy-current perspectives. Curr Oncol. 23, 266-277 (2016)
- [61] Lin E, Hsieh M, Chen C, Lu Y, Wu S: Outcomes of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for colorectal cancer with peritoneal metastasis. Medicine (Baltimore) 95, e5522 (2016)
- [62] Maciver A, Lee N , SkitzkiJ, Boland P, Francescutti V: Cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (CS/HIPEC) in colorectal cancer: Evidence-based review of patient selection and treatment algorithms. Eur J Surg Oncol 16, 30901-5 (2016)
- [63] Elias D, Levevre J, Cheavalier J, Brouquet A, Marchal F, Classe JM, Ferron G, Guilloit J, Meeus P, Goéré D, Bonastre J: Complete Cytoreductive Surgery Plus Intraperitoneal Chemohypothermia With Oxaliplatin for Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Origin. Journal of Clinical Oncology 27, 681-685 (2009)
- [64] Hoffmann M, Ulrich A, Schloericke E, Limmer S, Habermann JK, Wolken H, Bruch HP, Kujath P.: The application of Cold-Plasma Coagulation on the visceral pleura results in a predictable depth of necrosis without fistula generation. Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery 14, 239–243 (2012)
- [65] Hoffmann M, Ulrich A, Habermann J, Bouchard R, Laubert T, Bruch H, Keck T, Schloericke E: Cold-Plasma Coagulation on the Surface of the Small Bowel Is Safe in Pigs. Surg Innov 1, 7-13 (2016)
- [66] <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm051493.pdf> (Tag des Zugriffs. 03.05.2013)
- [67] Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA: Clonal origin and

- evolution of a transmissible cancer. Cell 126, 477-87 (2006)
- [68] http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_d.pdf (Tag des Zugriffs: 05.01.2016)
- [69] <http://www.lo-laboroptik.de/deutsch/info/info.html> (Tag des Zugriffs: 05.01.2016)
- [70] Firma Söring. Prospect . Innovative surgery, CPC-Kaltpasmakoagulation http://www.soering.com/products/high_frequency_surgery/generators_for_high_frequency_surgery/helium_plasma_coagulation/cpc_3000/hochfrequenzchirurgiegeräte, 03-3502/11-09/500.
- [71] Böcker W, Denk H, Heitz PU, Pathologie. In: Heitz PU, Komminoth P, Zimmermann D, Odermatt B, Probst-Hensch N, Bopp M: Aufgaben der Pathologie , 3. Auflage, 11-14, München, Deutschland: Elsevier GmbH, 2004
- [72] Jones TM, De M, Foran B, Harrington K, Mortimore S: Laryngael cancer: United kingdom National Multidisciplinary guidelines. J Laryngeal Otol 130, 75-82 (2016)
- [73] Bansal N, Soni A, Kaur P, Chauhan AK, Kaushal V: Exploring the Management of Radiation Proctitis in Current Clinical Practice. J Clin Diagn Res 10, XE01-XE06 (2016)
- [74] Tou S, Malik A, Wexner S, Nelson R: Energy source instruments for laparoscopic colectomy (Review).The Cochrane Library 5, 1-41 (2011)
- [75] Bolliger C, Sutedja T, Strausz J, Freitag L: Therapeutic bronchoscopy with immediate effect: laser, electrocautery, argon plasma coagulation and stents. European Respiratory Journal 27, 1258-1271 (2006)
- [76] Chertoff J, Khullar V, Burke L: Duodenal perforation following esophagogastroduodenoscopy (EGD) with cautery and epinephrine injection for peptic ulcer disease: An interesting case of nonoperative mangement in the medical intensive care unit (MICU). Int J Surg Case Rep 10, 121-5 (2015)
- [77] Lenz L, Tafarel J, Correia L, Bonilha D, Santos M, Rodrigues R, Gomes G, Andrade G, Martins F, Monaghan M, Nakao F, Libera E, Ferrari AP, Rohr R: Comparative study of bipolar electrocoagulation versus argon plasma coagulation for rectal bleeding due to chronic radiation coloproctopathy.

Endoscopy 43, 697-701 (2011)

- [78] Whitlow CB: Endoscopic treatment for lower gastrointestinal bleeding. Clin Colon Rectal Surg 23, 31-36 (2010)
- [79] Tsiamoulos Z, Bourikas L, Saunders B: Endoscopic mucosal ablation: a new argon plasma coagulation/injection technique to assist complete resection of recurrent, fibrotic colon polyps (with video). Gastrointestinal endoscopy 75, 400-404 (2012)
- [80] Rustagi T, Mashimo H: Endoscopic management of chronic radiation proctitis. World Journal of Gastroenterology 17, 4554-4562 (2011)
- [81] Reichle G, Freitag L, Kullmann HJ, Prenzel R, Macha HN, Farin G: Die Argon-Plasma-Koagulation in der Bronchologie: Eine neue Methode- alternativ oder komplementär. Pneumologie 54, 508-516 (2000)
- [82] Panos M, Koumi A: Argon plasma coagulation in the right and left colon: safety-risk profile of the 60W-1.2 i/min setting. Scand J Gastroenterol 49, 632-641 (2014)
- [83] Stahel RA, Weder W, Lievens Y, Felip E: ESMO Guidelines Working Group: Malignant pleural mesothelioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology 5, v126-v128 (2010)

7 Anhang

7.1 Grundlegende Daten zur Einteilung und zur Therapieoption des malignen Pleuramesotheliomes

7.1.1 IMIG Staging System [13]

Table 1. IMIG staging system

T, N, M	Region involved	Characteristics	
T1a	Limited to the ipsilateral parietal pleura, including the mediastinal and diaphragmatic pleurae.	No involvement of the visceral pleura.	
T1b	Ipsilateral parietal pleura, including the mediastinal and diaphragmatic pleurae.	Scattered tumor foci that also involve the visceral pleura.	
T2	Each ipsilateral pleural surface.	At least one of the following: (i) involvement of the diaphragmatic muscle, or (ii) a confluent visceral pleural tumor (including fissures) or tumor extension from the visceral pleura into the underlying pulmonary parenchyma	
T3	Locally advanced but potentially resectable tumor (each ipsilateral pleural surface)	At least one of the following: (i) involvement of the endothoracic fascia, (ii) extension into mediastinal fat, (iii) a solitary, completely resectable focus of tumor that extends into the soft tissues of the chest wall, or (iv) nontransmural involvement of the pericardium	
T4	Locally advanced, technically unresectable tumor (each ipsilateral pleural surface)	At least one of the following: (i) diffuse tumor extension or multiple tumor foci in the chest wall with or without associated rib destruction, (ii) direct transdiaphragmatic extension to the peritoneum, (iii) direct extension to the contralateral pleura, (iv) direct extension to the mediastinal organs, (v) direct extension to the spine, or (vi) extension to the internal surface of the pericardium with or without pericardial effusion or involvement of the myocardium	
NX		Presence of regional lymph nodes not assessable	
N0		No regional lymph node metastases	
N1		Metastases in ipsilateral bronchopulmonary or hilar lymph nodes	
N2		Metastases in subcarinal or ipsilateral mediastinal lymph nodes, including ipsilateral internal mammary lymph nodes	
N3		Metastases in contralateral mediastinal, contralateral internal mammary, and ipsilateral or contralateral supraclavicular lymph nodes	
MX		Presence of distant metastases not assessable	
M0		No distant metastases	
M1		Distant metastases present	
Stage	Tumor	Lymph nodes	Metastases
Ia	T1a	N0	M0
Ib	T1b	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	Any T3	Any N1 or N2	M0
IV	Any T4	Any N3	Any M1

Abbreviations: IMIG, International Mesothelioma Interest Group; M, metastases; N, lymph nodes; T, tumor.

7.1.2 TNM Staging System für das maligne Pleuramesotheliom [83]

Stage	TNM	Comments
Ia	T1a N0 M0	Primary tumor limited to ipsilateral parietal pleura
Ib	T1b N0 M0	As stage Ia plus focal involvement of visceral pleura
II	T2 N0 M0	As stage Ia or Ib plus confluent involvement of diaphragm or visceral pleura or involvement of the lung
III	Any T3 M0	Locally advanced tumour
	Any N1 M0	Ipsilateral, bronchopulmonary or hilar lymph node involvement
	Any N2 M0	Subcarinal or ipsilateral mediastinal lymph node involvement
IV	Any T4	Locally advanced technically unresectable tumour
	Any N3	Contralateral mediastinal, internal mammary, and ipsilateral or contralateral supraclavicular lymph node involvement
	Any M1	Distant metastases

7.1.3. Stadiengerechte Therapie für das maligne Pleuramesotheliom

Multimodale Therapie	Palliative Therapie
Stadium 1 und 2	Stadium 3 und 4
N0	N2
Keine cardialen/pulmonalen Erkrankungen	M1
	Reduzierter Allgemeinzustand

7.2 Votum des Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume

Zuordnung 27
Verw.-zweck 62
Krank-Art 77
Rechtsvorschr. 0
GVO/n

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 7151 | 24171 Kiel

Herrn
Dr. Martin Hoffmann
Klinik für Chirurgie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Ihr Antrag vom: 29.06.2009
mit Ergänzungen vom 01.10. und 29.12.2009

Mein Zeichen: V 312-72241.122-7 (86-6/09)

Herr Buttchereit
Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:
Herr Dr. R. Noël
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Von. Wm 17/3 m /10
2 Schw. / 31. 12. 11 2 6. Jan. 2010
+ 18 Schw. / 31. 12. 11

19. Januar 2010

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Dr. Hoffmann,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 15. Juli 2009 (BGBl. I S. 1950), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Untersuchung des Einsatzes der Kaltplasmakoagulation im Rahmen der Behandlung des malignen Pleuramesothelioms und auf der Oberfläche des Darms zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 2 Schweine verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Dezember 2011 befristet.
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.
3. Leiter des Versuchsvorhabens:
Herr Dr. Martin Hoffmann

Dienstgebäude: Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7238 | poststelle@mlr.landsh.de
www.landesregierung.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch signierte oder verschlossene Dokumente

4. Sein Stellvertreter:
Herr Prof. Dr. Peter Kujath
5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzugeben; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:
Herr Dr. R. Noël
7. Weitere Nebenbestimmungen:
Die Genehmigung beschränkt sich auf eine Machbarkeitsstudie mit zwei Tieren. Weitere Tiere können nicht in Aussicht gestellt werden. Anschließend ist ein Ergebnisbericht mit Versuchsprotokoll vorzulegen.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBL Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Irmer

Dr. Irmer

19/3m/10
Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein

12. Juli 2010

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 7151 | 24171 Kiel

Herrn
Dr. Martin Hoffmann
Klinik für Chirurgie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Ihr Antrag vom: 18.06.2010

Mein Zeichen: V 312-72241.122-7 (66-6/08)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herr Dr. R. Noël
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

1. Juli 2010

Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken

Sehr geehrter Herr Dr. Hoffmann,

aufgrund Ihres o. a. Antrages können im Rahmen meiner Genehmigung vom 19. Januar 2010 für das Versuchsvorhaben „Untersuchung des Einsatzes der Kaltplasmakoagulation im Rahmen der Behandlung des malignen Pleuramesothelioms und auf der Oberfläche des Darms“ weitere 18 Schweine verwendet werden.

Mit freundlichen Grüßen

Buttchereit

7.3 Geräte

- Kaltplasmakoagulation: Söring 1000 System (Söring, Quickborn/Deutschland)
- Kaltplasmaapplikator Söring CPC 54-111 (Söring, Quickborn,/Deutschland)
- Endoskopische Optik: 5mm Optik (Karl Storz GmbH, Tuttlingen/Deutschland)
- Endoskopieturm: HDTV Turm mit AIDA neo compact Thermoinsufflator (Karl Storz GmbH, Tuttlingen/Deutschland)
- Beatmungsgerät: Fabius® Tiro (Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck/Deutschland)
- Sauerstoffflasche 50l (Linde Gas Therapeutics GmbH, Unterschleissheim/Deutschland)
- Heliumgasflasche 10l (Linde Gas Therapeutics GmbH, Unterschleissheim/Deutschland)
- Trokare: 5/10 mm Endopath XCEL (Ethicon Endo Surgery, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt/Deutschland)
- OP-Tisch: Maquet Betastar (Maquet, Rastatt/Deutschland)
- Venenverweilkanüle: Vasofix Braunüle (B. Braun, Melsungen/Deutschland)
- Ringer-Infusionslösung: Jonosteril 500 ml (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg/Deutschland)
- Intubationshilfe: selbst entwickelter Intubationsspatel des Institutes für Biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck
- Fixationspflaster: Leukosilk 5,0m x 2,5cm (BSN medical GmbH, Hannover/Deutschland)
- Endoskopische Faßzange: CLICKLINE Außenschaft mit Arbeitseinsatz (Karl Storz GmbH, Tuttlingen/Deutschland)
- Schere: CLICKLINE Außenschaft mit Arbeitseinsatz (Karl Storz GmbH, Tuttlingen/Deutschland)
- Spülung: Einwegspülsystem Olympus (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg/Deutschland)
- Abdeckungen: Foliodrape Einmalabdeckung (Paul Hartmann AG, Heidenheim/Deutschland)
- Mikroskop: standardisiertes Mikroskop des Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck, Axioskop 108958 (Carl Zeiss Microscopy, Jena/Deutschland)

7.4 Reagenzien

- Zellkulturboden: Sarsted, Cat No: 83.1812.302 (Sarstedt GmbH, Nümbrecht/Deutschland)
- Humane Zelllinie: MSTO-211H, ATCC-Nc.:CRL-2081 (ATCC, Manassas, VA, USA)
- Zellkulturmedium: ATCC RPMI-1640 (ATCC, Manassas, VA, USA)
- Nährserum für Zellkultur: 10% FCS Gold (Fetal Bovine Serum-GOLD) PAA A15/151, CAT No: 30-2001, PAA Laboratories GmbH, Cölbe/Deutschland
- Antibiotikum für Zellkultur: 15 Penicillin/Streptomycin Mischung (100x), CAT No:P11-010, PAA Laboratories GmbH, Cölbe/Deutschland)
- Trypsin: Trypsin-EDTA (1x) UV-Irradiated CAT No: L11-660, PAA Laboratories GmbH, Cölbe/Deutschland)
- Prednisolon: Prednisolon 50 mg Tabletten (Ratiopharm GmbH, Ulm/Deutschland)
- Methylprednisolon: Urbason 250 mg (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt/Deutschland)
- Ciclosporin A: Sandimmun Optoralsaft 100 mg/ml (Novartis Pharma AG, Nürnberg/Deutschland)
- Mycophenolat: Myfortic 360 mg/Kapsel (Novartis Pharma AG, Nürnberg/Deutschland)
- Lidocainspray: Xylocain Pumpspray dental 50 ml (Astra Zeneca GmbH, Wedel/deutschland)
- Atropin: Atropicum Sulfuricum 1,0 mg Eifelfango® (Eifelfango, Bad Neuenahr Ahrweiler/Deutschland)
- S-Ketamin: Ketanest® 25 mg/ml (Pfizer Deutschland GmbH, Berlin/Deutschland)
- Midazolam: Midazolam-hameln 15 mg/3 ml (Hameln pharma plus GmbH, Hameln/Deutschland)
- Muskelrelaxans: Rompun® 2 % (Bayer Health Care, Leverkusen/Deutschland)
- Narkosemedikament: Propofol® -Lipuro 2% (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg/Deutschland)
- Analgetikum: Novalgin 500 mg Tabletten (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt/Deutschland)
- Narkotikum: T61® Intervet (Intervet Deutschland GmbH,

Unterschleißheim/Deutschland)

- Formaldehydlösung: Formaldehydlösung, 5%, pH-Wert 7,5 (Otto Fischar GmbH& Co. KG, Saarbrücken/Deutschland)

8 Danksagungen

Diese Arbeit wurde in der Klinik für Chirurgie der Universität zu Lübeck erstellt. Dem Direktor der Klinik **Herrn Prof. Dr. med. Tobias Keck**, möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Studie in seiner Klinik sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater, **Herrn PD Dr. med. Martin Hoffmann**, möchte ich zunächst für die Vergabe des Themas und die stetige sehr gute Unterstützung während jeder Phase des Projektes danken. Weiterhin danke ich ihm für seinen Ehrgeiz, seine anhaltende Ausdauer und sein angenehmes Wesen, mit dem er mir das wissenschaftliche Arbeiten nähergebracht hat.

Herrn Dr. rer. nat. Dirk Theisen-Kunde und **Herrn Veit Danicke**, wissenschaftliche technische Mitarbeiter des medizinischen Laserzentrum Lübeck GmbH, für die liebevolle Einarbeitung , Einweisung und Hilfestellung in jeder Situation bei der Arbeit im Transfer-OP.

Den **Tierpfleger/innen** der Gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck für die liebevolle Versorgung, Betreuung und Hilfestellung bei der Arbeit mit den Minipigs.

Prof. Dr. med. Sven Perner Institut der Pathologie , Direktor der Klinik für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck für die Anleitung und Zusammenarbeit bei der Begutachtung der histologischen Präparate.

Frau Dr. rer. hum. biol. Claudia Hemmelmann aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck für die Beratung und Zusammenarbeit bei der Auswertung der statistischen Daten.

Von ganzem Herzen Danke ich:

Herrn Dipl. Ing. Mario Plaul für den liebevollen und selbstlosen Rückhalt und das ständige Vertrauen in mich und mein Handeln, denn nur so entstand der nötige Raum, um eine solche Arbeit anfertigen zu können.

Meinem Vater, **Dipl. Ing. Hardy Andreas Ulrich**, für die Unterstützung in jedem Bereich meines Lebens. Insbesondere für die herausragende ständige Hilfestellung zu jeder Tages- und Nachtzeit während meiner kompletten schulischen und universitären Laufbahn bis einschließlich heute.