

2 Material und Methode

Die im Institut für Medizinische/Technische Physik und Lasermedizin des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin und in der Laser- und Medizin-Technologie gGmbH, Berlin (LMTB) entwickelte, neuartige koaxiale, bipolare Sonde zur Anwendung von hochfrequentem Strom zeigte einen nadelförmigen Aufbau [19, 20]. Aus diesem Grund wird im Folgenden neben dem Begriff HF-Applikator auch die Bezeichnung HF-Nadel verwendet.

2.1 Material

2.1.1 Hochfrequenzstrom-Applikatoren

Die bipolare HF-Nadel ist aus zwei Edelstahlelektroden aufgebaut, die koaxial hintereinander angeordnet sind. Dazwischen befindet sich ein Keramikisolator, wie in Abbildung 5 schematisch dargestellt ist. Diese koaxiale Anordnung ermöglicht einen Stromfluss beginnend zwischen den beiden isolatornahen Elektrodenenden mit einer symmetrischen Ausbreitung um die Nadel und bewirkt eine Erwärmung der unmittelbaren Umgebung.

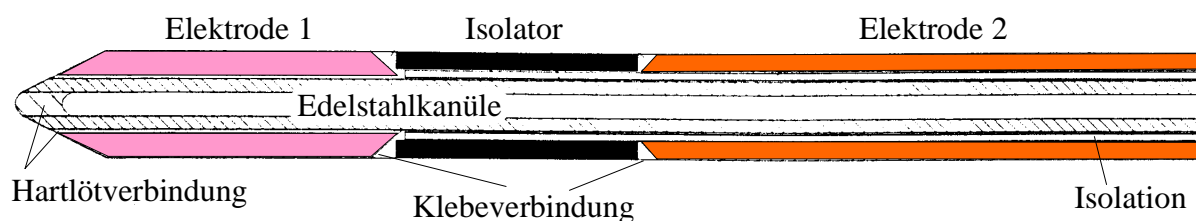


Abb. 5: Schematischer Aufbau eines HFITT-Applikators.

Der Durchmesser der Nadel und die Länge bzw. Form des Isolators bestimmen die räumliche Ausbreitung der Gewebeläsion in Größe und Form. Die in dieser Arbeit verwendeten Applikatoren wurden im Nadeldurchmesser variiert. Die Formen der erzeugten thermischen Läsionen sollten dabei sphärisch sein.

Abbildung 6 zeigt schematisch die Temperaturverteilung während der Applikation im Lebergewebe. Die höchsten Temperaturen werden analog zur Feldlinienverteilung zwischen beiden

Elektroden erzielt (Abbildung 7). Das gesamte Volumen der Läsion wird jedoch durch die Wärmeausdehnung ins umliegende Gewebe bestimmt.

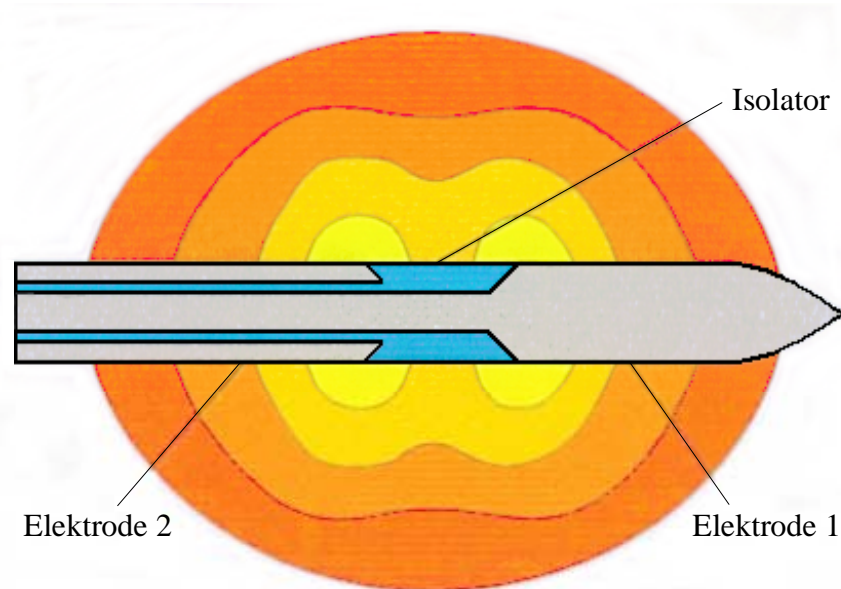


Abb. 6: Schematische Darstellung eines Hochfrequenzstrom-Applikators mit Temperaturverteilung im angrenzenden Gewebe. Die koaxial hintereinander angeordneten Elektroden sind durch einen Keramikisolator getrennt. Diese bipolare Anordnung ermöglicht, den Feldlinien entsprechend, eine annähernd sphärische Koagulation des Gewebes [22].

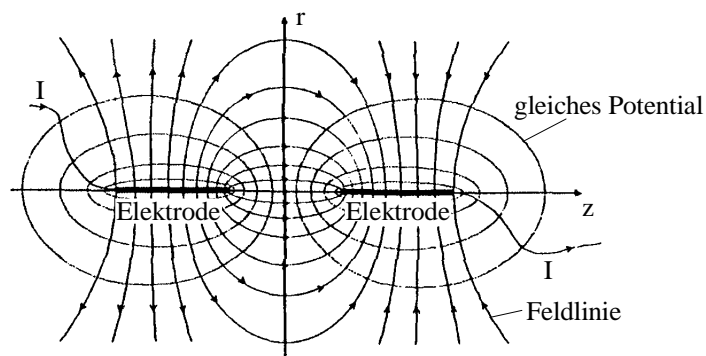


Abb. 7: Feldlinienverteilung einer koaxial angeordneten bipolaren Elektroden-Konfiguration [22] (I = Strom, r = Radius, z = Elektrodenachse).

Als Versuchsmuster wurden Nadeln mit Durchmessern von 1, 2 und 3 mm hergestellt (Abbildung 8). Vorversuche haben gezeigt, dass sich mit der HF-Nadel mit 1 mm Durchmesser für die Leberchirurgie nur unbefriedigend kleine Koagulationsvolumina erzielen lassen. Sie könnte daher im HNO-Bereich zum Einsatz kommen.

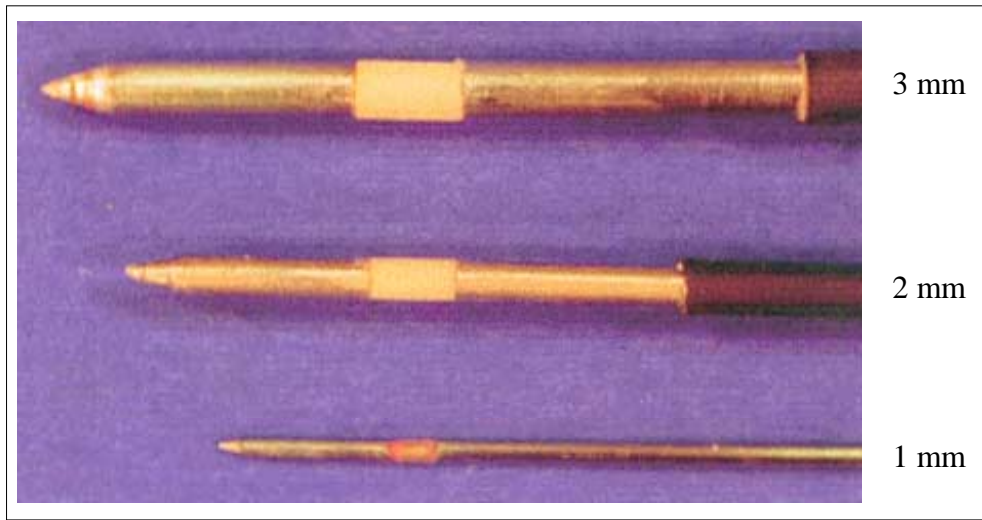


Abb. 8: Fotografie dreier bipolarer HFITT-Applikatoren mit unterschiedlichen Nadelstärken.

Da die Zielrichtung dieser Arbeit die Therapie von Lebermetastasen war, wurden die Experimente ausschließlich an Schweinelebergewebe durchgeführt und dabei Applikatoren verwendet, die größere Koagulationsvolumina erwarten ließen. In Tabelle 1 sind die geometrischen Daten der verwendeten HFITT-Nadeln aufgelistet.

Tabelle 1: Geometrische Abmessungen der verwendeten HFITT-Applikatoren.

Applikator	Durchmesser	Längen			Elektrodenoberfläche
		Elektrode 1	Isolator	Elektrode 2	
Nadel 1	2 mm	14 mm	4 mm	14 mm	88 mm ²
Nadel 2	3 mm	16 mm	6 mm	16 mm	151 mm ²

2.1.2 HFITT-Arbeitsplatz

Der Arbeitsplatz bestand aus einem HF-Generator mit einer daran angeschlossenen HF-Nadel. An diesem Generator wurde vor Messbeginn die gewünschte Leistung eingestellt. Die HF-Nadel war außerdem mit einem digitalen Oszilloskop verbunden, sodass die Leistung auch während der Applikation gemessen werden konnte. In Abbildung 9 ist der Arbeitsplatz schematisch wiedergegeben.

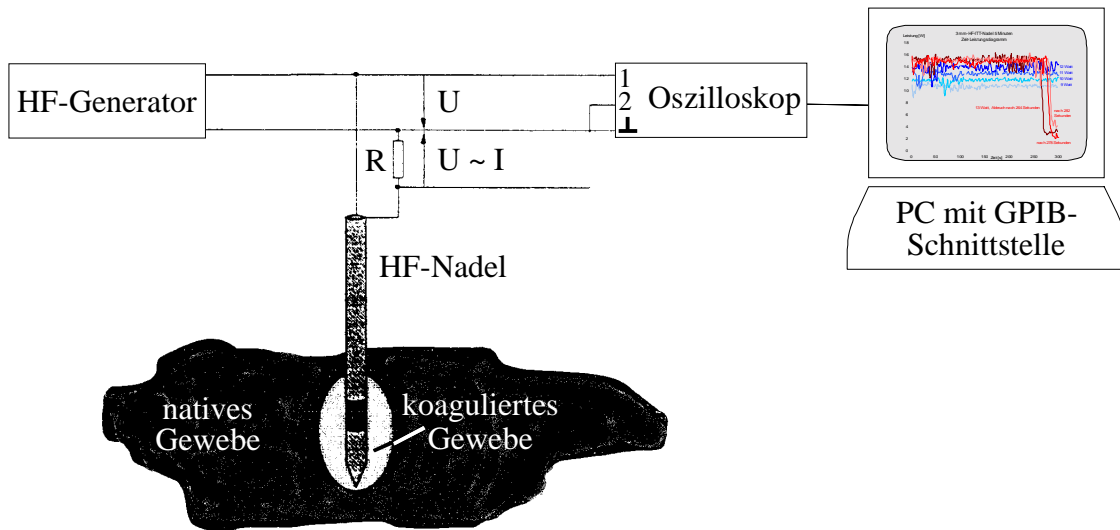


Abb. 9: Schematischer Aufbau eines HFITT-Arbeitsplatzes.

Die zeitliche Folge der Messwerte (Zeit, Spannung, Strom, Gewebeimpedanz, Leistung und zugeführte Energie) wurde in einem PC mit GPIB-Schnittstelle gespeichert und konnte während der Messung am Monitor aktualisiert und somit im Verlauf dargestellt werden.

Folgende Geräte wurden verwendet:

HF-Generator ME 401 der Firma Martin,

HF-Nadeln, Versuchsmuster hergestellt im Institut für Medizinische/Technische Physik und Lasermedizin des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der FU Berlin in Zusammenarbeit mit der LMTB (Laser- und Medizin-Technologie) gGmbH, Berlin,

Digitales Speicher-Oszilloskop Typ 9310A der Firma Le Croy,

Personal Computer mit GPIB-Schnittstelle.

Die Ausgangstemperatur des Gewebes in Nadelnähe wurde vor der HF-Applikation mit einem Thermoelement gemessen. Nach der Durchführung einer Hochfrequenzstromapplikation erfolgte die Präparation der Koagulationszone mittels Skalpell. Mit einer Schieblehre wurde die axiale und radiale Expansion ausgemessen. Die Abbildung 10 zeigt die benutzten Hilfsmittel.

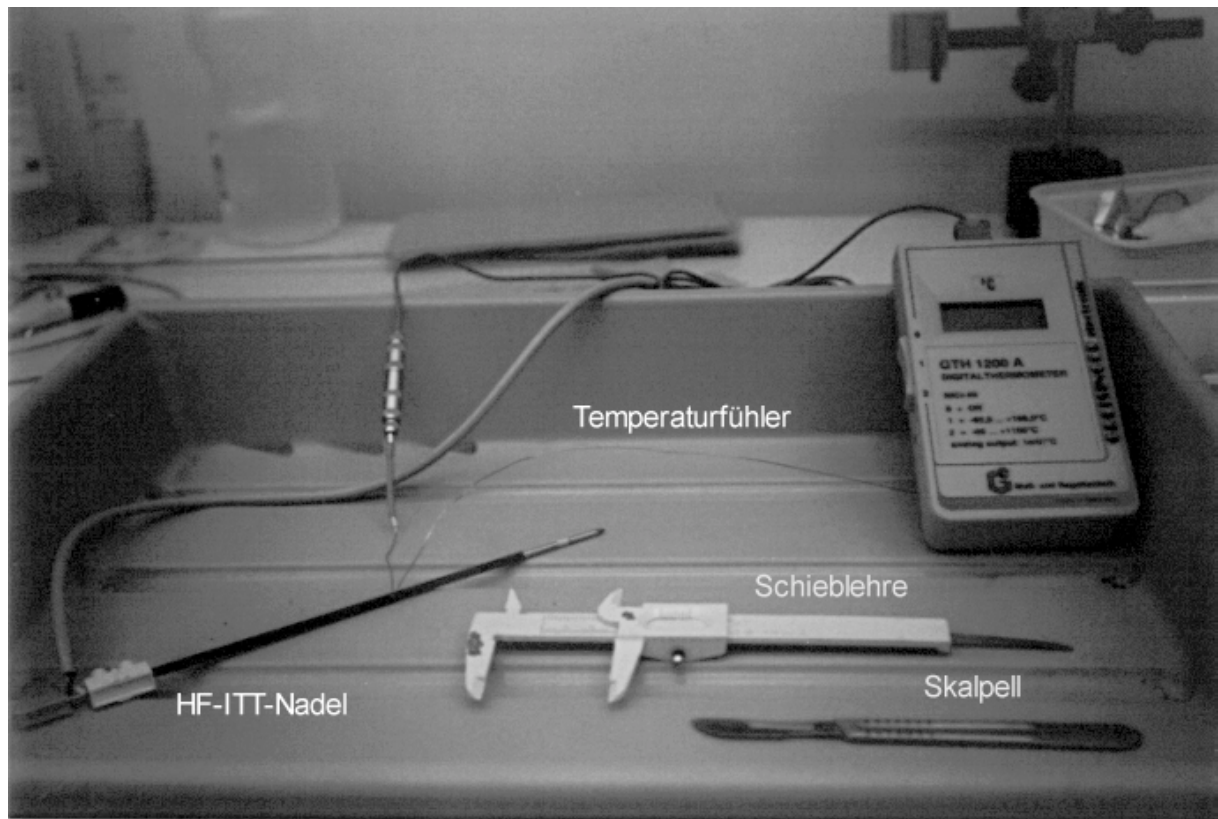


Abb. 10: *Ausrüstung des HFITT-Messplatzes.*

Verwendete Geräte:

*Minitaturthermoelemente, Typ LKI 05-50 der Firma Philips,
Skalpelle BB 84, Klagen-Typ 21 der Firma Aesculap,
Schieblehre.*

2.2 Methode

2.2.1 Versuchsdurchführung

Als Versuchsmedium wurden kältekonserverte Schweinelebern verwendet. Die Organe wurden vom Fleischgroßmarkt (Beusselstrasse, Berlin) bezogen. Der Transport erfolgte in geschlossenen Polyethylen-Beuteln der Firma Melitta, um das Gewebe vor Austrocknung zu schützen. Nach dem Transport wurden die Lebern sofort in den Gefrierschrank gegeben. Der Transport betrug ungefähr 30 Minuten.

Vor Versuchsbeginn wurden die eingefrorenen Schweinelebern, immer noch in Polyethylen-Beuteln verpackt, im 36°C warmen Wasserbad aufgetaut und danach etwa 30 Minuten liegen gelassen, um eine gleichmäßige Erwärmung auf Raumtemperatur zu erhalten.

Unmittelbar vor jeder Messung wurde die Leber dem Beutel entnommen und in einer Kunststoffwanne gelagert. Die anschließende Punktion der Leber durch die HF-Nadel erfolgte in einer Weise, die eine intrahepatische Lage des Applikators mit einer Eindringtiefe von 5 cm und 6 cm gewährleistete. Die zentrale Lage der Nadel diente der Ausschaltung von Randeffekten, denn bei kapselnaher Lage (Luft wirkt isolierend) des Applikators hätten zum Beispiel Deformationen des Koagulationsvolumens durch Wärmestaueffekte auftreten können.

Nach Positionierung der HF-Nadel wurde in Nadelnähe eine Temperatur von $21 \pm 1^\circ\text{C}$ gemessen. Das Thermolement wurde dann aber entfernt, da es zu Störungen der elektrischen Feldverteilung geführt hätte.

Anschließend wurde die Applikation des hochfrequenten Stroms vorgenommen.

Dabei wurde bei Anwendung der *2 mm-HF-Nadel* die eingestellte Generatorleistung von 4 Watt auf 9 Watt schrittweise um 1 Watt gesteigert. Die Applikationsdauer betrug jeweils 10 Minuten.

Die *3 mm-HF-Nadel* wurde bei Leistungen von 9 bis 13 Watt pro Messung 5 Minuten angewendet. Bei einer Applikationsdauer von 10 Minuten wurde diese Nadel mit Leistungen von 5 bis 10 Watt geprüft. Um den Einfluss der Applikationszeit zu ermitteln, wurde die Applikationsdauer bei 9 Watt und 10 Watt über einen Zeitraum von 5 bis 10 Minuten um jeweils eine Minute gesteigert.

Darüber hinaus wurden Vorversuche mit einem *modifizierten 3 mm-HFITT-Applikator* durchgeführt. Dessen veränderter Aufbau ermöglichte eine Kühlung der Elektroden. Sie wurden in einem geschlossenen System mit 23°C warmem Wasser gekühlt. Die Applikationsdauer betrug 10 Minuten, Leistung und Flussgeschwindigkeit der Kühlflüssigkeit wurden variiert.

Die Messungen der vom Generator abgegebenen Leistung erfolgt alle 2 Sekunden für die gesamte Dauer jeder einzelnen Applikation. Während der Versuchsdurchführung erfolgte die ständige Registrierung der zugeführten Energie und des Gewebewiderstandes, um den Feuchtigkeitsgehalt des Gewebes zu überprüfen. Die Einzelergebnisse jeder Messung wurden notiert und für die statistische Berechnung verwendet. Um die zu erwartende Gewebeveränderung sichtbar zu machen, musste nach jeder Applikation die HF-Nadel entfernt und das angrenzende Lebergewebe eingehend untersucht werden.

2.2.2 Beurteilung der Gewebeproben

Die makroskopische und histomorphologische Beurteilung der Gewebeeränderungen sowie die enzymhistochemische Untersuchung erfolgte mit folgenden Methoden:

1. Makroskopische Vermessung der entstandenen thermischen Gewebeläsionen.
2. Berechnung des Volumens der thermisch erzeugten Läsionen.
3. Lichtmikroskopie von Paraffinschnitten und Gefrierschnitten nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Präparate.
4. Lichtmikroskopie von Gefrierschnitten nach enzymhistochemischem Nachweis der NADH-Dehydrogenase.

Im Anschluss an jede Hochfrequenzstromapplikation erfolgte das sorgfältige Aufschneiden des Lebergewebes parallel zum Einstichkanal. Die makroskopisch sichtbare Gewebeeränderung wurde in axialer und radialer Achse zum Applikator mit einer Schieblehre vermessen.

2.2.2.1 Volumenbestimmung

Die Berechnung der thermisch erzeugten Läsionen erfolgte in Näherung mit Hilfe der Formel zur Bestimmung des Volumens für Rotationsellipsoide:

$$V = \frac{1}{6} \pi \cdot l \cdot D^2,$$

wobei l für den axialen und D für den radialen Durchmesser stehen.

2.2.2.2 Histologie

2.2.2.2.1 Schnittpräparation

Zur histologischen Aufarbeitung wurden ungefähr 1 x 1 cm große Gewebelöcke vom Grenz- bereich zwischen nativem Lebergewebe und der Läsion entnommen. Die Schnittführung erfolgte orientierend am Nadeleinstichkanal in axialer und radialer Achse (siehe Abbil- dung 14c), sodass in jedem Gewebelöcke der Grenz- bereich eine zentrale Lage einnahm. Die Hälfte der Gewebeproben wurden einer Paraffineinbettung zugeführt, von den übrigen Gewe- beproben wurden Gefrierschnitte angefertigt.

Bei der *Paraffineinbettung* wurden die Proben entlang der geplanten Schnittfläche mit einem Faden markiert, ohne die makroskopische Grenze zwischen hyperthermischer Läsion und nativem Gewebe zu verletzen. Danach wurden die Proben mindestens 3 Tage in 3,75 %iger Formalinlösung fixiert. Die Einbettung in Paraffin (Histosec der Firma Merck, Darmstadt) erfolgte in einer automatischen Einbettvorrichtung Modell Hypercenter 2 (Shandon, Frankfurt). Die in Tabelle 2 aufgeführten Medien wurden dabei durchlaufen und die angegebenen Spülzeiten eingehalten.

Tabelle 2: Inkubations- und Spülzeiten bei der Paraffineinbettung in einer automatischer Einbettvorrichtung

Medium	Inkubationszeit [min]	Spülzeiten	
		Xylol	Isopropanol
Formalin	150	60 min	60 min
Ethanol 70 %ig	45	15 min	15 min
Ethanol 80 %ig	60	15 min	15 min
Ethanol 96 %ig	45	15 min	15 min
Ethanol 96 %ig	40	15 min	15 min
Ethanol 100 %ig	50	15 min	15 min
Ethanol 100 %ig	60	15 min	15 min
Ethanol 100 %ig	60	15 min	15 min
Aceton	45	60 min	60 min
Aceton	60	60 min	60 min
Paraffin	90	60 min	60 min
Paraffin	120		

Die paraffinierten Gewebeproben wurden anschließend an einer Ausgussstation (der Firma Tissue Tek) in Würfel gegossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die markierte Seite mit der hyperthermisch induzierten Gewebeläsion parallel zur Würfelseite angeordnet war.

Nach Abkühlen der Paraffinwürfel wurden mit einem Schlittenmikrotom HM 400 (Microm, Laborgeräte GmbH, Walldorf) Schnitte von 8 µm Dicke hergestellt. Diese Schnitte wurden zum Strecken in ein 37°C warmes Wasserbad gebracht, anschließend mit einem Pinsel auf einen Objektträger aufgezogen und dann auf einem Wärmebänkchen getrocknet.

Zur Entparaffinierung der Präparate vor dem Anfärben der Schnitte wurden diese 10 Minuten in Xylol behandelt, ehe sie in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100 %ig, 2 x 96 %ig und 1 x 80 %ig) und destilliertem Wasser gewaschen wurden.

Zur Anfertigung der *Gefrierschnitte* wurden die gewonnenen Gewebeproben in Wägeschalen gebettet und bei -20°C tiefgefroren. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die makrosko-

pischen Grenzen zwischen hyperthermischer Läsion und intaktem Gewebe im Zentrum der Proben erfasst wurden. Die tiefgefrorenen Gewebeblöcke wurden auf Objektische von 30 mm Durchmesser übertragen. Auf den Objektisch wurde ein Gel, (Tissue Tec, Firma Sakura, Zoeterwoude) zur Fixierung des Gewebes aufgetragen. In einem Mikrotomkryostat Modell HM 500 OM (Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf) wurden bei -20°C Schnitte von 8 - 10 μm Dicke hergestellt. Jeder Schnitt wurde durch Andrücken eines zimmerwarmen Objektträgers vom Mikrotommesser gelöst.

Die Objektträger wurden zuvor 5 Minuten mit Aceton behandelt, mit 2 % APES (3-Aminopropyltriethoxysilan) in Aceton silanisiert, 2 Minuten mit destilliertem Wasser gespült und bei 37°C im Trockenschrank getrocknet.

2.2.2.2.2 Färbungen

Die Schnitte wurden zur Beurteilung mit zwei verschiedenen Färbemethoden behandelt: die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und die p-Nitrotetrazoliumblau-Färbung (NTB-Färbung).

Die Differenzierung verschiedener Gewebestrukturen erfolgte durch die *Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)*. Mit diesem Farbstoffgemisch lassen sich acidophile und basophile Strukturen in biologischen Geweben darstellen. Man kann also Kationen (zum Beispiel Proteine) und Anionen (zum Beispiel Nucleinsäuren) kenntlich machen. Dadurch können Gewebestrukturen differenziert werden. Nach der Durchführung von zwei Messungen wurden aus den Koagulationszonen axial zum Nadelverlauf je eine Gewebeprobe gewonnen. Die eine wurde herausgeschnitten und die andere gestanzt.

Für die Färbung mit *Hämatoxylin-Eosin* wurden sowohl Paraffinschnitte als auch Gefrierschnitte verwendet. Die Schnitte wurden nacheinander in folgende Lösungen eingebracht:

- Färben in Hämatoxylin nach Mayer (10 min)
- Spülen in destilliertem Wasser
- Bläuen in warmem Leitungswasser (10 min)
- Spülen in destilliertem Wasser
- Färben in 0,1 %igen wässrigem Eosin (45 s)
- Spülen in destilliertem Wasser

Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol entalkoholisiert (Gefrierschnitte: 1 x 80 %, 2 x 96 %, 2 x 100 % Ethanol, dann Xylol;

Paraffinschnitte: 1 x 70 %, 1 x 80 %, 2 x 96 %, 2 x 100 % Ethanol, dann Xylol). Die Schnitte wurden dann mit Entellan (Merck, Darmstadt) und Deckgläsern eingedeckt.

Um vitales von irreversibel geschädigtem Lebergewebe abzugrenzen, wurde der *enzymhistochemische Nachweis der NADH-Dehydrogenase mit dem Farbstoff p-Nitrotetrazoliumblau (NTB-Färbung)* herangezogen. Diese Färbung zeigt an, ob auch in scheinbar ungeschädigten Zellbereichen noch volle Vitalität vorhanden ist. Als lösliches farbloses Tetrazoliumsalz wird diese Verbindung durch das Enzym Diaphorase in unlösliches blaues Formazan überführt (Abbildung 11). Reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid NADH_2 wirkt als Coenzym und stellt in dieser histochemischen Reaktion Protonen und Elektronen zur Verfügung [93]. In thermisch belasteten Zellbereichen könnte dieses Tetrazolium-Reduktase-System gestört sein. Solche geschädigten Zellen verblieben dann ungefärbt.

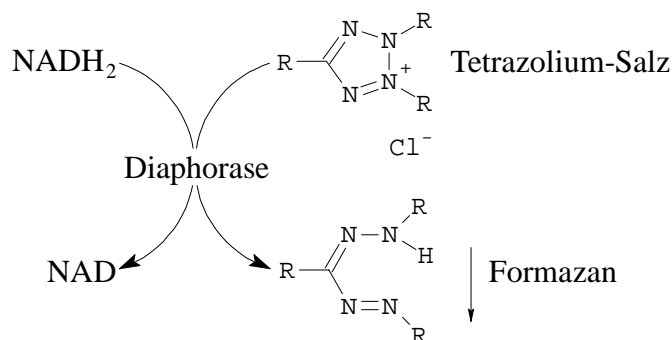


Abb. 11: Reaktionsschema der Bildung von blauem Formazan aus dem Tetrazoliumsalz *p*-Nitrotetrazoliumblau durch das Enzym Diaphorase. Im histochemischen Versuch wird damit vitales Gewebe angezeigt.

Für den enzymhistochemische Nachweis der NADH-Dehydrogenase mit *p*-Nitrotetrazoliumblau wurden Gefrierschnitte verwendet.

In eine mit destilliertem Wasser gefüllte Petrischale wurden auf die Oberseite eines Küvettendeckels drei gekühlte Schnitte platziert. Pro Schnitt wurden 50 μl des Inkubationsmediums aufpipettiert. Dann erfolgte die Inkubation für 15 Minuten in einem dunklen Raum (Tabelle 3 gibt die Zusammensetzung des Inkubationsmediums wieder). Anschließend wurden die Schnitte vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült. Die Objektträger mit den Schnitten wurden mit einem fusselfreien Papiertuch (Kimberly-Clark) abgetrocknet. Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit 37°C warmer Glyceringelatine, die mit einem Glasstab aufgetragen wurde, um die Bildung von Luftblasen zu verhindern.

Tabelle 3: Inkubationsmedium für 8 - 10 Schnitte zum enzymhistochemischen Nachweis der NADH-Dehydrogenase mit p-Nitrotetrazoliumblau.

Menge	Reagenzien
100 µl	Reduzierte α -NADH-Lösung (Sigma, Deisenhofen, 2,5 g/l in Wasser)
250 µl	p-Nitrotetrazoliumblau-Lösung (NTB, Sigma, Deisenhofen, 2 g/l in Wasser)
100 µl	PBS-Puffer (2 g/l, pH 7,4)
50 µl	Ringer-Lösung

2.2.2.3 Mikroskopie

Die mit Hämatoxylin-Eosin und p-Nitrotetrazoliumblau angefärbten Schnittpräparate wurden unter einem Lichtmikroskop Modell Axiophot der Firma Zeiss, Oberkochen betrachtet und fotografisch dokumentiert.

2.2.3 Statistische Analyse

Die Daten der in den ex-vivo-Versuchsreihen mit den unterschiedlichen Applikatoren induzierten Gewebeläsionsvolumina sind im tabellarischen Anhang für jeden einzelnen Versuch aufgeführt. Für die grafische Darstellung wurden Gruppenmittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte berechnet. Diese Werte lassen eine exploratorische Analyse zu [35]. Zur Beurteilung der Reliabilität wurde der F-Test als Dispersionstest herangezogen [73]. Als signifikant wurde der p-Wert kleiner 0,05 angegeben. Da es sich nur um eine eindimensionale statistische Methode handelt, soll durch die Berechnung des euklidischen Weges nach der Formel [55]

$$\frac{1}{n} \sum_p \sqrt{(x_p - \bar{x})^2 + (y_p - \bar{y})^2}$$

eine statistische Analyse der Messwerte vorgenommen werden, in der für x die Gesamtenergie und y das Volumen gleichzeitig eingehen. Damit wird die Clusterung einer jeden Energiestufe über die direkte Bestimmung des Abstandes der Einzelergebnisse vom Cluster beurteilt.