

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Ex-vivo-Versuchsreihe

#### Nd:YAG Laser

Verwendet wurde ein Nd:YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 1064 nm (Medilas fibertom 5100 mit Spülpumpe, Dornier, Germering, Deutschland) im kontinuierlich betriebenen Modus.

#### Lichtwellenleiter

Die Übertragung des Laserlichts erfolgte bei der Laserinduzierten Thermotherapie über einen flexiblen Lichtwellenleiter, welcher aus einem Kern (Core), Mantel (Cladding) und Hülle (Coating) aufgebaut war. Der Kern bestand aus Quarzglas (Durchmesser 400  $\mu\text{m}$ ), umschlossen von dem aus Kunststoff bestehenden Cladding (Tabelle 1). An der Grenzfläche zwischen Kern und Mantel wurde das Licht winkelabhängig totalreflektiert und somit nahezu verlustfrei im Kern fortgeleitet. Das Coating war eine äußere Kunststoffhülle, die eine vollständige Flexibilität der Quarzfaser ermöglichte.

Die Abstrahlcharakteristik am distalen Ende des Lichtwellenleiters bestimmte maßgeblich die Ausbreitung der Strahlung im Gewebe. Die Versuche wurden mit einem 'Diffusor-Tip-Applikator' durchgeführt. Das freipräparierte Ende des Faserkerns war durch Ätzung angeraut worden und mit einem schützenden Glasdom versehen. Durch die Anrauhung trat das Licht gleichmäßig diffus aus (aktive Länge 25 mm) (Mikrodom-Applikator, 25 mm, Trumpf Medizin Systeme, Umkirch, Deutschland).

**Tabelle 1:** Größenangaben des Diffusor-Tip-Applikators

aktive Länge	25 mm
Glasdomlänge	30 mm
Faserkerndurchmesser	400 $\mu\text{m}$
Glasdomaußendurchmesser	1,4 mm

#### Leistungsmessgerät

Vor jeder Laserapplikation wurde die Laserausgangsleistung direkt am Applikator gemessen, um faserbedingte Energieverluste berücksichtigen zu können. Dies erfolgte

mittels eines Leistungsmessgerätes, welches eine integrale Leistungsbestimmung über die gesamte Strahlenaustrittsfläche ermöglichte (MY-Test, Trumpf Medizin Systeme, Umkirch, Deutschland).

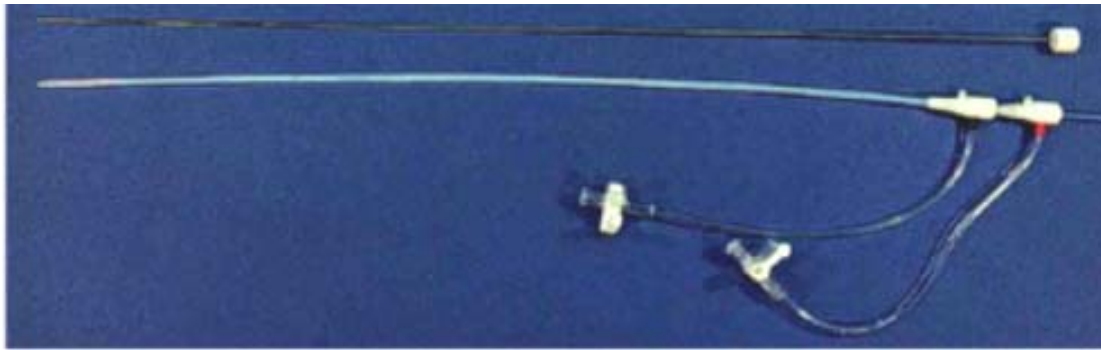
### **Punktionssysteme**

Zwei verschiedene Punktionssysteme, welche die Faser während der Applikation beherbergten, wurden getestet. Ihnen kam eine mechanische Schutzfunktion des Diffusor-Tip-Applikators zu. Eine aktive Kühlung der Applikatoroberfläche wurde durch eine geschlossene Spülung der Systeme mit Kühlflüssigkeit im Gegenstromverfahren ermöglicht. Die Kühlung schützte das applikatornahe Gewebe vor zu hohen Temperaturen. Sowohl die Kühlflüssigkeit, als auch die Materialien der Katheter zeigten eine fast ungehinderte Transmission für das Laserlicht. Als Kühlmedium wurde in den Versuchen 0,9%-Natriumchlorid-Lösung im Gegenstromverfahren um den Applikator geleitet (60ml/min).



**Abbildung 1:** intraoperatives Punktionssystem

Es kam zum einen ein chirurgisches, starres Punktionssystem zum Einsatz, das für den intraoperativen Einsatz konzipiert war (siehe Abbildung 1). Der distale Abschnitt bestand aus Quarz (C-LITT-Applikator, Trumpf Medizin Systeme, Umkirch, Deutschland). Der Außendurchmesser des intraoperativen Punktionssystems betrug 4 mm.



**Abbildung 2:** perkutanes Punktionssystem

Daneben wurde ein Punktionssystem der perkutanen Anwendung (‘gekühltes Power-Laser-Applikationsset’, Somatex Medizinische Instrumente, Teltow, Deutschland) (Abbildung 2) verwendet. Dieses war für den perkutan-interventionellen Einsatz in Seldinger-Punktionstechnik konzipiert. Der Außendurchmesser (3 mm) war kleiner, die Thermostabilität des Teflon-Katheters war gegenüber dem intraoperativen Punktionssystem geringer.

### **Organpräparate**

Die Ex-vivo-Messungen wurden an Schweinelungen vollzogen. Diese wurden vom Schlachthof frisch bezogen, gekühlt transportiert und sofort bei  $-60^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Die jeweils benötigten Lungen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Organe waren zum Zeitpunkt der Versuche nicht vollständig kollabiert, sondern zeigten einen residualen Luftgehalt, der auf ein Drittel des Ursprungsvolumens geschätzt wurde. Die Anordnung der Lungenlappen und der Verlauf der Lappenspalten ähneln grundsätzlich der humanen Lunge, allerdings sind die einzelnen Lappen flacher. So konnten pro Lappen höchstens zwei Messungen erfolgen, insgesamt wurden 90 Lungenlappen für die Versuche benötigt. Die Spezies Schwein wurde ausgewählt, da das Organ die erforderliche Größe aufweist und der feingewebliche Aufbau der Lunge der des Menschen ähnelt. Vor der Applikation erfolgte die Temperaturmessung an mehreren Stellen der Lunge. Benutzt wurde ein flexibles Nickel-Chrom-Nickel-Thermoelement der Firma Greisinger electronic (Greisinger electronic, Modell: GTH 1200 A, Regenstauf, Deutschland). Zur Vergleichbarkeit der Messungen wurde eine Gewebetemperatur zwischen  $17^{\circ}\text{C}$  und  $21^{\circ}\text{C}$  eingehalten.

### **Versuchsaufbau- und Durchführung**

Bei Verwendung des intraoperativen Punktionssystems konnten die Lungen direkt punktiert werden. Es wurde darauf geachtet, dass der Streukörper einen Mindestabstand von etwa 2 cm zur Pleura viszeralis sowie zu großen, palpablen Bronchien hatte. Zu oberflächennahe Punktionen wurden verworfen, da die so erzeugten, über die Organgrenzen hinausgehenden Läsionen nicht exakt zu vermessen waren. Danach erfolgte die Einführung der Faser in den Glasschaft des Punktionssinstrumentes, die 10 mm zurückgezogen wurde, bevor die Faser mittels einer Schraubvorrichtung fixiert wurde. Der Rückzug der Faser erfolgte, um eine unbehinderte Strömung der Kühlflüssigkeit zu gewährleisten. Anschließend wurde das Spülsystem mit einer Flussrate von 60 ml/min betrieben.

Die Punktion der perkutanen Sets erfolgte mittels eines stabilisierenden Mandrins. Nach dessen Entfernung wurde die Faser platziert und das Spülsystem angeschlossen.

Die Messungen erfolgten mit dem intraoperativen Punktionssystem bei Leistungen am distalen Faserende von 20, 22, 25, 28, 30 und 32 Watt und bei Expositionszeiten von jeweils 10, 15 und 20 Minuten. Jede Messung wurde 5x wiederholt.

Messungen bei niedrigerer Leistung und kürzerer Expositionszeit wurden wegen zu geringer Läsionsgrößen in Vortestungen nicht durchgeführt. Durch Leistungen über 32 Watt wurden in den Vortestungen ausgedehnte Karbonisationen erzeugt, dass hiervon abgesehen wurde. Expositionszeiten über eine Dauer von 20 Minuten hinaus wurden nicht durchgeführt, da dies unter dem Aspekt klinischer Durchführbarkeit nicht sinnvoll erschien.

Für das perkutane Punktionssystem war dasselbe Versuchsprotokoll vorgesehen. Bei einer Applikationsdauer von 10 Minuten und einer Leistung von 28 Watt wurde das System in zwei von drei Messungen allerdings aufgrund geringerer thermischer Belastbarkeit so gravierend geschädigt, dass auf eine Steigerung der Energie verzichtet wurde. Stattdessen wurden Messungen mit einer niedrigeren Leistung von 18 Watt durchgeführt. Das aus diesen Gründen differierende Vorgehen mit dem perkutanen System sah daher folgendermaßen aus:

Die Leistungsstufen betragen 18, 20, 22, 25 und 28 Watt. Bei einer konstanten Applikationsdauer von 10 Minuten wurden ebenfalls je 5 Messungen (respektive 3 Messungen bei 28 Watt/ 10 Minuten) durchgeführt.

### Leistungsdichten

Aus den genannten Außendurchmessern der beiden Punktionssysteme, der aktiven Länge des Applikators und den verwendeten Leistungsstufen ergaben sich folgende Leistungsdichten an der Oberfläche der Punktionssysteme:

#### Intraoperatives Punktionssystem:

20 Watt → 5,90 W/cm<sup>2</sup>

22 Watt → 6,49 W/cm<sup>2</sup>

25 Watt → 7,37 W/cm<sup>2</sup>

28 Watt → 8,26 W/cm<sup>2</sup>

30 Watt → 8,85 W/cm<sup>2</sup>

32 Watt → 9,44 W/cm<sup>2</sup>

#### Perkutanen Punktionssystem:

18 Watt → 7,47 W/cm<sup>2</sup>

20 Watt → 8,30 W/cm<sup>2</sup>

22 Watt → 9,13 W/cm<sup>2</sup>

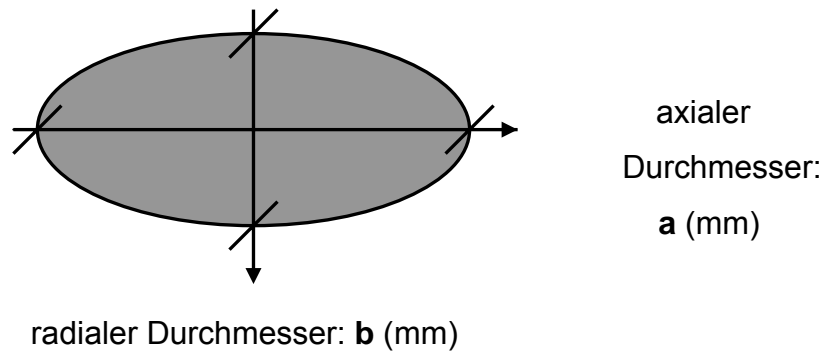
25 Watt → 10,37 W/cm<sup>2</sup>

28 Watt → 11,62 W/cm<sup>2</sup>

### Auswertung

Direkt im Anschluss an die Laserapplikationen wurden die Lungen entlang der Applikatorachse aufgeschnitten. Die Läsionen wurden inspiziert und Schwärzungen des Gewebes im Versuchsprotokoll festgehalten.

Der axiale Durchmesser a (mm) und der radiale Durchmesser b (mm) wurden vermessen (Abbildung 3). Entsprechend der Formel eines Rotationsellipsoiden ( $V = (\pi \cdot a \cdot b^2) / 6$ ) wurde das Läsionsvolumen errechnet, welches in cm<sup>3</sup> angegeben wird. Als Nekrose galten die deutlich demarkierten Anteile des sichtbar geschädigten Areal. Ein hämorrhagischer Übergangsbereich zu intaktem Gewebe wurde ausgeschlossen. Das arithmetische Mittel (x) und die Standardabweichung (s) der Volumina wurden aus den Einzelwerten bestimmt.



**Abbildung 3:** Vermessung der Läsion

### Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte für die Auswertung der Messungen durch den Student's t-Test. Mit dem t-Test konnte die Signifikanz beim Vergleich stetiger Zielgrößen geprüft werden, die normalverteilt waren und bei welchen eine Homogenität zwischen den Varianzen der Gruppen bestand. Unter diesen Voraussetzungen zeigt der t-Test eine große Trennschärfe, das heißt, eine hohe Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese abzulehnen, wenn sie tatsächlich falsch ist. Es wurde geprüft, ob ein signifikanter Unterschied in dem erzielten Läsionsvolumen bei aufeinanderfolgenden Leistungsstufen oder Applikationsdauern besteht. Bei dem Vergleich der beiden Punktionsysteme wurde aufgrund der Kleinheit der Gruppengröße bei 28 Watt ( $n=3$ ) der parameterfreie Mann-Whitney-Test verwendet. Die Nullhypothese lautete jeweils: 'Die Läsionsvolumina unterscheiden sich im Mittel nicht'. Als signifikant wurde jeweils eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angesehen. Die Läsionsvolumina wurden als Gruppenmittelwerte angegeben. Die Auswertung der erreichbaren Läsionsvolumina bezogen auf die applizierte Energie (Joule) erfolgte als Regressionsanalyse durch die Lowess Methode. Mit der Funktion Lowess (Lowess: **L**ocally **w**eighted **s**catterplot **s**moothing) wurde eine nonparametrisch geschätzte, glatte Regressionskurve mittels lokaler Wichtung berechnet.

### **3.2. Tierversuchsreihe**

#### **Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten 10 gesunde männliche WAG-Ratten aus der Zucht der Zentralen Tierlaboratorien der Freien Universität Berlin. Zum Zeitpunkt des Versuches betrug das Körpergewicht der Tiere zwischen 240 und 280 g, bei einem Lebensalter zwischen vier und sechs Monaten. Ihre Ernährung erfolgte bis dato mit einem Standard-Futter für Ratten und Wasser ad libitum aus der automatischen Tränkanlage. Die Tiere waren bei einer Raumtemperatur von 20°C ( $\pm$  2°C) und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten worden. Die Tierversuchsgenehmigungsnummer lautete: G0080/01.

#### **Laserinstrumentarium**

Analog zu der Ex-vivo-Versuchsreihe wurde ein Nd:YAG-Laser (1064 nm) im kontinuierlich betriebenen Modus eingesetzt (TL 80, Trumpf Medizin Systeme, Umkirch, Deutschland). Die Applikation der Laserenergie erfolgte in 6 Versuchen über eine frisch präparierte Bare-Fiber (400  $\mu$ m, Trumpf Medizin Systeme, Umkirch, Deutschland). In 4 Versuchen wurden Diffusor-Tip-Applikatoren einer aktiven Länge von 7 mm verwendet (Mikrodom, LMTB, Berlin, Deutschland). Unmittelbar vor den Versuchen wurde die Ausgangsleistung am Applikator bzw. am blanken Faserende gemessen (MY-Test, Trumpf Medizin Systeme, Umkirch, Deutschland).

#### **Intubationsnarkose**

Die Operation der Tiere erfolgte in Intubationsnarkose. Nach Sedierung der Tiere mit Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) wurde gewichtsadaptiert Ketanest® und Rompun® intramuskulär in die Oberschenkel appliziert (Rompun® 2%, 0,5 mg pro kg Körpergewicht, Bayer AG Leverkusen, Deutschland und Ketanest® in einer Dosierung von 1 mg pro kg Körpergewicht, Parke-Davis, Berlin, Deutschland). In Bauchlage des Tieres erfolgte die Intubation nach der von Weksler et. al. vorgeschlagenen Technik [43]. Mittels eines Otoskopes wurden bei zurückgehaltenem Kopf und unter Herausziehen der Zunge die Stimmbänder dargestellt. Ein weicher Führungsdraht wurde dann unter Sicht in die Trachea vorgeschoben, das Otoskop entfernt und über den Führungsdraht ein Venenverweilkatheter als Tubus

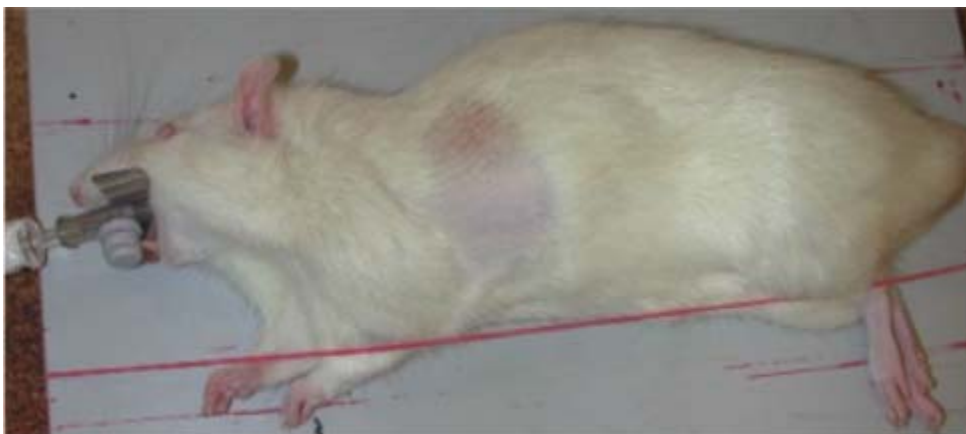
vorgeschoben. Die korrekte Lage desselben wurde durch die Beobachtung der Thoraxexkursionen nach Anschluss des Beatmungsgerätes überprüft (Small Animal Ventilator KTR-4, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland). Der endexpiratorische Druck betrug 10 – 12 cm Wassersäule, bei einer Beatmungsfrequenz von 70/ Minute. Beatmet wurde mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Druckluft, die zu gleichen Teilen in das Mischungsverhältnis eingingen ( je 2,5 NL/min.).

### **Thorakotomie**

Nach Rasur der seitlichen Brustwand, Lagerung und Fixierung in Seitenlage (Abbildung 4) sowie Desinfektion der Haut mit einer Jodlösung (B.Braun, Melsungen, Deutschland) wurde der Thorax lateral im 3. bis 4. Intercostalraum über einen 1,5 cm bis 2 cm langen Hautschnitt mit einem Skalpell eröffnet. Nach Durchtrennung der Muskelschichten, teilweise unter Ligatur größerer Venen, konnte die Pleura parietalis vorsichtig durchtrennt werden. Nach Einsetzen eines Rippenspreizers (Lidsperrer nach Sauer, Aeskulap, Tuttlingen, Deutschland) konnte der jeweilige Lungenlappen luxiert werden.

### **Punktion der Lunge**

In zwei von zehn Tieren wurde der rechte Mittellappen (ML) punktiert, bei 8 Tieren der linke Oberlappen (OL). Es wurde nach kaudal punktiert, meist in leicht dorsaler Richtung.



**Abbildung 4:** Lagerung des intubierten Tieres

Die Punktion der Lunge erfolgte bei den ersten drei Tieren mit Hilfe einer Verweilkanüle (Abbocath 16G, Abbott, Wiesbaden, Deutschland). Nach Rückzug des Mandrins wurde



die Faser in den Hüllkatheter vorgeschoben, bis sie bündig mit diesem abschloss. Zu diesem Zweck wurden vor Versuchsbeginn Markierungen an der Faser angebracht. Bei 7 Tieren wurde auf die Verweilkanüle verzichtet. Die Pleura viszeralis wurde lediglich anpunktiert, die eigentliche Punktion der Lunge wurde direkt mit der Faser vorgenommen, die dementsprechend ohne Hüllkatheter zu liegen kam.

Beide Punktionsmodi erfolgten nach großzügiger Luftinsufflation in Atemstillstand. Palpatorisch wurde überprüft, ob es nicht zu einer Durchstechung der Lunge gekommen war. Bei erneutem Anschluss des Beatmungsgerätes wurde beobachtet, ob die Atemexkursionen des Tieres nicht zu einer Dislokation der Faser führten.

### Laserinduzierte Thermotheapie

Die genaue Verteilung der aufgeführten Variablen sowie die jeweils applizierte Laserleistung (2 Watt oder 3 Watt), die Applikationsdauer (60 Sekunden bis 180 Sekunden), die applizierte Energie (120 Joule bis 540 Joule) sowie die resultierenden Leistungsdichten können der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 2) entnommen werden.

**Tabelle 2:** tabellarische Dokumentation der Behandlungsvariablen

Tier	Lokalisation	Applikator	Punktion	Leistung (W)	Zeit (s)	Energie (J)	Leistungsdichte (W/cm <sup>2</sup> )
1	li OL	bare-fiber	direkt	2	120	240	1600
2	re ML	bare-fiber	Abbocath	2	180	360	50
3	li OL	Mikrodom	Abbocath	2	90	180	3,45
4	re ML	Mikrodom	Abbocath	3	60	180	5,17
5	li OL	Mikrodom	Abbocath	2	120	240	3,45
6	li OL	bare-fiber	direkt	3	180	540	2400
7	li OL	bare-fiber	direkt	2	60	120	1600
8	li OL	Mikrodom	direkt	2	180	360	6,1
9	li OL	bare-fiber	direkt	2	60	120	1600
10	li OL	bare-fiber	direkt	2	120	240	1600

### **Beendigung der Operation und Tötung der Tiere**

Im Anschluss an die Laserapplikation wurde die Faser aus der Lunge gezogen, die Lunge reponiert und der Thorax zweischichtig fortlaufend verschlossen (Vicryl® 3/0, Ethicon, Norderstedt und Suturamid ® 3/0 Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Ein Tier musste noch intraoperativ aufgrund eines ausgedehnten Blutverlustes durch Überdosierung der Narkosemittel getötet werden. 9 Tiere wurden nach Verschluss des Thoraxschnittes und Überprüfung einer eigenständigen Atmung durch Überdosierung von Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) getötet.

### **Gewinnung der Präparate und makroskopische Beurteilung**

Nach der Tötung wurde der Thorax durch Inzision des Sternums weit eröffnet. Der gesamte Thoraxraum wurde inspiziert, Herz und Lungen entnommen. Der maximale Zeitabstand zwischen der Laserapplikation und der Entnahme der Lungen betrug 20 Minuten. Die Vermessung der Läsionen erfolgte an der Grenze zu normal imponierendem Gewebe in drei Achsen zu dem Stichkanal. Das Volumen wurde gemäß der Formel für Rotationsellipsoide errechnet. Die Lungen wurden anschließend für mindestens eine Woche in einer 10%igen Formalinlösung (August Hedinger GmbH & Co., Stuttgart; Deutschland) fixiert.

### **Erstellen der Schnittpräparate**

Die Paraffineinbettung der Lungen erfolgte in Plastikgittertäschchen (Tissue Tek®, Sakura, Zoeterwoude, Niederlande), hierbei war auf eine korrekte Lage der therapierten Lungenabschnitte zu achten. Die Entwässerung und Paraffineinbettung der Präparate erfolgte in einer automatischen Einbettvorrichtung (Hypercenter, Shandon, Frankfurt, Deutschland). Das entwässerte Gewebe wurde für 12 Stunden in flüssigem, 60°C warmen Paraffin gelagert, die Aushärtung des Paraffins erfolgte über mindestens 24 Stunden. Die Gewebelöcke konnten dann zur Herstellung histologischer Schnittpräparate in ein Mikrotom eingespannt werden (Hn 40, Leica, Nussloch, Deutschland). Schnittpräparate einer Dicke von 3µm wurden erstellt, mit einem Pinsel von dem Mikrotommesser abgenommen und in ein Wasserbad (40°C) zur Entfaltung der Schnitte gelegt. Die Schnitte konnten dann auf einen Objektträger aufgezogen werden und wurden zur Trocknung in einen 37°C-Wärmeschrank gelegt. Von jeder Gewebeprobe wurden Schnitte sowohl mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (HE-Färbung), als auch mit einer Trichrom-Färbung Elastika/van Gieson (EvG-Färbung).

**Beurteilung der Schnittpräparate**

Die Schnittpräparate wurden in Zusammenarbeit mit einem erfahrenen Pathologen beurteilt. Dieser war zu dem Untersuchungszeitpunkt über die makroskopische Beurteilung der Läsionen, nicht aber über deren Vermessung unterrichtet. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop (Olympus AX70, Hamburg, Deutschland) mit digitaler Messeinrichtung. Bei der Befundung war zu beurteilen, welche geweblichen Zonen sich histomorphologisch direkt nach LITT ausmachen ließen. Die Größe der Nekrose in Millimetern war zu bestimmen. Dabei sollten nur ganz eindeutig nekrotische Bereiche vermessen werden.