

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Histologische Auswertung der multipolaren Radiofrequenzablation
am Schweinemodell in vivo

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Christina Ann Neizert
aus Frankfurt am Main

Datum der Promotion: 18.12.2020

Für meinen Vater

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in geteilter Erstautorenschaft bei *Scientific Reports* veröffentlicht (siehe Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen):

Poch FGM*, **Neizert CA***, Geyer B, Gemeinhardt O, Bruder L, Niehues SM, Vahldiek JL, Bressem KK, Kreis ME, Lehmann KS

Influence of interapplicator distance on multibipolar radiofrequency ablation during physiological and interrupted liver perfusion in an in vivo porcine model

SciRep. 2020; 10(1): 16210, doi: 10.1038/s41598-020-71512-x.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Zusammenfassung	8
Abstract	10
1. Einleitung	11
1.1 Maligne Lebertumore	11
1.1.1 Primäre Lebertumore	11
1.1.2 Sekundäre Lebertumore	11
1.2 Klinik und Diagnostik maligner Lebertumore	12
1.3 Therapieverfahren maligner Lebertumore	13
1.3.1 Chirurgische Leberteileresektion	13
1.3.2 Minimalinvasive Thermoablationsverfahren	14
1.4 Radiofrequenzablation	14
1.4.1 Funktionsprinzip	14
1.4.2 Radiofrequenzablationssysteme	15
1.4.3 Die Radiofrequenzablation als Therapieverfahren	17
1.4.4 Der Tumordurchmesser als Risikofaktor	18
1.4.5 Kühleffekte	20
1.4.6 Pringle-Manöver	21
1.4.7 Vor- und Nachteile einer Radiofrequenzablation	22
1.4.8 Ex-vivo- und In-vivo-Studien der Radiofrequenzablation	23
1.5 Histologische Analyse	23
1.5.1 Mikroskopischer Aufbau der Leber	24
1.5.2 Zoneneinteilung einer Radiofrequenzablation	25
1.5.3 Histologische Färbemethoden	26
1.6 Fragestellung	27

2. Material und Methoden	29
2.1 Versuchsplan	29
2.2 Versuchstiere	29
2.3 Versuchsreihen	30
2.4 Ablationssystem	31
2.5 Versuchsdurchführung	32
2.5.1 Anästhesie	32
2.5.2 Laparotomie und Radiofrequenzablation	33
2.5.3 Leberentnahme und Probengewinnung	35
2.6 Histologische Aufarbeitung.....	36
2.6.1 Histologische Dünnschnittanfertigung	36
2.6.2 Histologische Färbung.....	37
2.7 Methodische Auswertung.....	38
2.7.1 Rekonstruktion der Ablationen	38
2.7.2 Qualitative Ablationsbeurteilung	39
2.7.3 Flächenauswertung	39
2.7.4 Erstellung einer Idealläsion	40
2.7.5 Methodische Einteilung der Gefäße	41
2.7.6 Methodische Auswertung innerhalb der Idealläsion	42
2.7.7 Statistische Auswertung	43
3. Ergebnisse	45
3.1 Versuchsübersicht	45
3.2 Makroskopie und Histologie im Vergleich	46
3.2.1 Ablationsform.....	46
3.2.2 Ablationszoneneinteilung	48
3.2.3 Flächenauswertung	52
3.2.4 Kühleffekte innerhalb der Idealläsion	55
3.3 Einfluss der Gefäße innerhalb der Idealläsion	57
3.3.1 Gesamtübersicht der Gefäßauswertung	57
3.3.2 Gefäßlokalisierung und Vitalfärbung	59

3.3.3	Distanz der Gefäße zum Ablationsmittelpunkt	64
3.3.4	Gefäßwandschädigung	68
4.	Diskussion	70
4.1	Radiofrequenzablation.....	70
4.2	Zielsetzung	71
4.3	Makroskopische Ablationsauswertung der multipolaren Radiofrequenzablation im Vergleich zur Histologie	71
4.3.1	Korrelation zwischen makroskopischen und histologischen Ablationszonen	72
4.3.2	Quantitative Gegenüberstellung histologischer Ablationsflächen	74
4.3.3	Qualitative Beurteilung der Ablationsform	76
4.4	Der Einfluss von Lebergefäßen auf die multipolare Radiofrequenzablation	78
4.4.1	Gefäßanalyse innerhalb der Idealläsion	78
4.4.2	Analyse des Ablationsradius	81
4.5	Limitationen der vorliegenden Arbeit	83
4.5.1	Segmentierung der Ablationen	83
4.5.2	Verwendung einer Idealläsion	83
4.5.3	Das Schwein als Tiermodell	83
4.6	Schlussfolgerung	84
5.	Literaturverzeichnis	86
	Eidesstattliche Versicherung	101
	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	102
	Lebenslauf	103
	Vollständige Publikationsliste	104
	Danksagung.....	105

Abkürzungsverzeichnis

A	Applikator
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CT	Computertomographie
EtOH	Ethanol
FLR	Future Liver Remnant
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.m.	Intramuskulös
i.v.	Intravenös
KRK	Kolorektales Karzinom
LITT	Laserinduzierte Thermotherapie
MRT	Magnetresonanztomographie
MWA	Mikrowellenablation
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NTB	Nitrotetrazoliumblau
RCAP	Resistance Controlled Automatic Power
RFA	Radiofrequenzablation/-en
RF-	Radiofrequenz-
RZ	Red Zone
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
WZ	White Zone

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Elektrodenkonfiguration bei mono- und bipolarer Radiofrequenzablation.	15
Abbildung 2 Mono-, bi- und multipolare Radiofrequenzablationssysteme.	16
Abbildung 3 Behandlungsalgorithmus des hepatozellulären Karzinoms.....	17
Abbildung 4 Applikatorformation um einen Tumor.	19
Abbildung 5 Exemplarische Darstellung des Gefäßkühleffektes.	20
Abbildung 6 Gliederung des Leberparenchyms.....	25
Abbildung 7 Differenzierung thermischer Ablationszonen.	26
Abbildung 8 Nicotinamidadeninukleotid-Reaktionsschema.....	27
Abbildung 9 Versuchsplan.	29
Abbildung 10 Übersicht der drei Versuchsreihen.	30
Abbildung 11 Das Generatorsystem.	31
Abbildung 12 Radiofrequenzapplikator.....	32
Abbildung 13 Positionierung der drei Applikatoren im Leberparenchym.....	34
Abbildung 14 Zeitlicher Ablauf des In-vivo-Großtierversuches.	35
Abbildung 15 Platzierung der Leber in einer speziell konstruierten Zielvorrichtung.....	35
Abbildung 16 Fotografische Ablationsdokumentation.	36
Abbildung 17 Fixierung eines tiefgefrorenen Ablationsblockes im Kryostat.....	37
Abbildung 18 Mögliche Ablationsformen der multipolaren Radiofrequenzablation.	39
Abbildung 19 Erstellung der Idealläsion.....	40
Abbildung 20 Methodische Auswertung innerhalb der Idealläsion.....	42
Abbildung 21 Exemplarische Gegenüberstellung aller drei Versuchsreihen.....	46
Abbildung 22 Einteilung der Radiofrequenzablationen nach Form.....	47
Abbildung 23 Makroskopischer Ablationszonenvergleich mit der Histologie.....	49
Abbildung 24 Zonengegenüberstellung bei Durchführung eines Pringle-Manövers.....	50
Abbildung 25 Makroskopische Darstellung der Ablationszonen.	51
Abbildung 26 Makroskopischer und histologischer Flächen- und Radiusvergleich.....	54
Abbildung 27 Exemplarische Darstellung der Kühlfläche.	55
Abbildung 28 Ablationsflächen- und Kühlflächenwerte innerhalb der Idealläsion.....	56
Abbildung 29 Exemplarische Darstellung einer Ablation der ersten Versuchsreihe.	61
Abbildung 30 Exemplarische Darstellung eines zonenüberschreitenden Gefäßes.	62
Abbildung 31 Exemplarische Darstellung einer Ablation der dritten Versuchsreihe.	63

Abbildung 32 Einfluss der Lebergefäße auf den Ablationsradius.	65
Abbildung 33 Distanzvermessung bei kontinuierlicher Blutperfusion.	66
Abbildung 34 Distanzvermessung bei Durchführung eines Pringle-Manövers.	67
Abbildung 35 Prozentuale Aufteilung der Gefäße innerhalb der Idealläsion.	68
Abbildung 36 Gefäßwanduntersuchung partiell vitaler Gefäße.	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.	38
Tabelle 2 Färbeprotokoll der Nicotinamidadenindinukleotid-Färbung.	38
Tabelle 3 Qualitative Beurteilung aller Gefäße innerhalb der Idealläsion.	41
Tabelle 4 Einteilung der Gefäßablation nach Färbungsgrad und Wandschädigung.....	43
Tabelle 5 Versuchsübersicht.....	45
Tabelle 6 Medianwerte der vermessenen Ablationsflächen.	53
Tabelle 7 Qualitative Einteilung der Gefäße.	58
Tabelle 8 Anzahl der Venen und Arterien innerhalb der Versuchsreihen.....	59
Tabelle 9 Kreuztabelle der drei Versuchsreihen.....	60

Zusammenfassung

Einleitung: Die Radiofrequenzablation (RFA) ist eine minimalinvasive In-situ-Ablationsmethode und wird als Alternative zur Leberteilresektion bei der Behandlung maligner Lebertumore angewandt. Essentiell für den Therapieerfolg ist die vollständige Ablation des Tumors. Problematisch ist hierbei, dass durch die natürliche Leberperfusion vaskuläre Kühleffekte entstehen, die eine unvollständige Tumordestruktion zur Folge haben können. Zudem basiert die Ablationsauswertung durch bildgebende Verfahren weitgehend auf makroskopischen Studien. Aussagen über die vollständige Tumorzellzerstörung sind daher nur indirekt möglich. Eine histologische Auswertung vaskulärer Kühleffekte und die Validierung einer makroskopischen Ablationsbeurteilung durch die Histologie sind deshalb erforderlich. In der vorliegenden Arbeit soll dabei der Einfluss einer temporären Unterbrechung der Leberperfusion (Pringle-Manöver) und der einer Abstandsverringerng zwischen den einzelnen Applikatoren bei der klinisch überwiegend im multipolaren Modus angewandten RFA makroskopisch und histologisch evaluiert werden.

Methoden: Drei intern gekühlte bipolare Applikatoren wurden mit einer Leistung von 90 W und einer Energiezufuhr von 50 kJ simultan verwendet, um eine multipolare RFA in Lebern von Hauschweinen in vivo durchzuführen. Der Applikatorabstand bei der Versuchsreihe mit Pringle-Manöver betrug 20 mm, bei kontinuierlicher Blutperfusion je 20 mm und 15 mm. Nach Leberentnahme wurden alle Ablationen auf Höhe des größten Querdurchmessers halbiert, fotografiert und histologisch gefärbt. Im Anschluss wurden die Ablationsformen und -flächen makroskopisch und histologisch miteinander verglichen. Zusätzlich erfolgte eine histologische Auswertung aller Gefäße mit einem Durchmesser $\geq 0,5$ mm innerhalb des Ablationsareals.

Ergebnisse: Es wurden 23 RFA in zwölf Schweinen durchgeführt. Bei den Versuchen mit kontinuierlicher Blutperfusion zeigte sich eine starke Korrelation zwischen der makroskopischen und histologischen Ablationsfläche ($p \leq 0,05$). Bei Durchführung eines Pringle-Manövers wurde histologisch eine 44 % größere Ablationsfläche im Vergleich zur Makroskopie beobachtet (1458 mm^2 versus 2095 mm^2 , $p \leq 0,05$). Homogene, konfluierende Ablationsgeometrien konnten durch ein Pringle-Manöver in 100 % der Ablationen und durch einen engen Applikatorabstand von 15 mm in 87,5 % der Ablationen induziert werden. Jedoch führte nur ein Pringle-Manöver zu einer vollständigen Avitalität aller Lebergefäße $\geq 0,5$ mm und zu einer zuverlässigen Zerstörung des perivaskulären Lebergewebes innerhalb des Ablationsareals.

Schlussfolgerung: Allein die Durchführung eines Pringle-Manövers führt zu homogenen, konfluierenden Ablationen, die sich für eine vollständige Destruktion des Lebergewebes einschließlich

der Gefäße eignen. Bei einem Pringle-Manöver wird die tatsächliche Ablationsgröße jedoch durch eine makroskopische Flächenauswertung unterschätzt, sodass insgesamt eine erhöhte therapeutische Sicherheit resultiert. Eine makroskopisch gestützte Flächenauswertung ist bei der multipolaren RFA mit kontinuierlichem Gefäßfluss valide.

Abstract

Introduction: Radiofrequency ablation (RFA) is a minimally invasive in situ procedure that can be utilized as an alternative treatment for liver malignancies. However, cooling effects originating from the natural liver perfusion can result in an incomplete tumor destruction. Additionally, the ablation evaluation through imaging modalities is primarily based on macroscopic studies. Therefore, statements about certain tumor cell death are only indirectly viable. Consequently, a validation of a macroscopic ablation evaluation through histology and a systematic histological assessment of vascular cooling effects are necessary. The aim of this study was to macro- and micromorphologically evaluate how a vascular occlusion of the liver (Pringle maneuver) and a distance reduction between the applicators affect multipolar RFA.

Methods: Three bipolar and internally cooled electrodes with a power of 90 W and an energy input of 50 kJ were simultaneously used to perform multipolar RFA in porcine livers in vivo. The applicator distance was set to 20 mm when a Pringle maneuver was performed. Test series with continuous vascular flow were planned with an applicator distance of both 20 mm and 15 mm. After liver explantation the ablations were photographed for a macroscopic evaluation and subsequently histologically stained. A macro- and micromorphological assessment of each ablation was conducted by comparing ablation forms and areas. All vessels ≥ 0.5 mm were histologically analyzed within each ablation area.

Results: 23 RFA were generated in twelve domestic pigs. Macromorphological and histological analysis showed a significant correlation regarding ablation area when there was continuous blood flow ($p \leq 0.05$). In comparison to the histological analysis, the size of the ablation area was macroscopically underestimated by 44 % (1458 mm² versus 2095 mm², $p \leq 0.05$) when a Pringle maneuver was performed. Homogenous and confluent ablation forms could be induced by a Pringle maneuver (100 % of the ablations) or by a distance reduction between the applicators to 15 mm (87,5 % of the ablations). However, only a Pringle maneuver led to complete ablation of all vessels ≥ 0.5 mm and perivascular liver tissue within the central ablation zone.

Conclusion: Only a Pringle maneuver leads to homogenous and confluent ablations which are adequate for a complete destruction of liver tissue and including vessels. When a pringle maneuver is performed the actual size of the ablation is underestimated through a macroscopic assessment. An evaluation of the ablation area based on macroscopic findings is valid if there is continuous blood flow.

1. Einleitung

1.1 Maligne Lebertumore

1.1.1 Primäre Lebertumore

Maligne Lebertumore zählen zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit (1-3). Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) macht ca. 90 % der primären Lebertumore aus und ist mit einer Inzidenz von mehr als 750.000 pro Jahr die weltweit fünfthäufigste Tumorentität (1, 3, 4). Zumeist ist das HCC mit einer Leberzirrhose assoziiert, welcher überwiegend eine chronisch virale Infektion mit den Hepatitisviren B oder C zugrunde liegt (3, 5-7). Geographische Unterschiede der Inzidenzraten des HCCs ergeben sich aus der in Asien und Afrika vorherrschenden Hepatitis-B-Infektion (1, 4). Mehr als 80 % der globalen HCC-Erkrankungsfälle sind in diesen Endemiegebieten zu verzeichnen (4). In den Industrieländern gehören die Hepatitis-C-Infektion sowie der steigende chronische Alkoholabusus und die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung zu den Hauptursachen des HCCs (4, 8). Ohne frühzeitige therapeutische Intervention ist die Prognose schlecht. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate unbehandelter HCC-Patienten bei unter 20 % (3).

Das wesentlich seltener auftretende intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom (CCC) macht bis zu 10 % der malignen primären Lebertumore aus und betrifft vorwiegend das männliche Geschlecht (2, 7, 9-11). Zu den Hauptrisikofaktoren zählen sowohl die primäre sklerosierende Cholangitis als auch parasitäre Erkrankungen und virale Hepatitisinfektionen (10). Das von den Gallengängen ausgehende infiltrative Wachstum resultiert in einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5 % (9).

1.1.2 Sekundäre Lebertumore

Sekundäre maligne Lebertumore haben ihren Ursprung zu 95 – 97 % extrahepatisch (6, 12). Dabei ist das kolorektale Karzinom (KRK) das Malignom mit dem größten Risiko einer hepatischen Filialisierung (13). Lebermetastasen können jedoch auch von anderen Tumoren des Gastrointestinaltraktes, des Bronchial- und neuroendokrinen Systems und der Mamma ausgehen (13, 14). Der Metastasierungsweg erfolgt meist hämatogen über die venöse Drainage des Pfortadersystems (13, 14). Es kommen aber auch eine lymphogene oder eine Metastasierung per continuitatem vor (12). An einem KRK erkranken in Deutschland jährlich etwa 64.000 Menschen, insgesamt werden pro Jahr ca. 26.000 Todesfälle dokumentiert (15). Mit 1,8 Millionen Neuerkrankungen weltweit ist das KRK bei Frauen die zweithäufigste und bei Männern die dritthäufigste Tumorentität (7). Bei Erstdiagnose lassen sich bereits bei 18 – 25 % der Patienten Lebermetastasen nachweisen (6, 15).

Letztendlich treten bei mehr als 50 % aller KRK-Patienten Lebermetastasen während des Krankheitsverlaufes auf (6, 16). Bei 30 % dieser Patienten stellt die Leber den einzigen Ort einer Fernfilialisierung dar (17). Unbehandelt führen diese Lebermalignome bei mehr als 70 % der Betroffenen innerhalb des ersten Jahres und bei mehr als 95 % innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung zum Tod (18, 19). Infolgedessen ist die hepatische Metastasierung ein wesentlicher Einflussfaktor für die Prognose erkrankter Patienten (12).

1.2 Klinik und Diagnostik maligner Lebertumore

Die Früherkennung maligner Lebertumore ist für den Krankheitsfortschritt und das therapeutische Vorgehen entscheidend. Laborchemisch lassen sich häufig keine Auffälligkeiten nachweisen. Tumormarker wie das Alpha-Fetoprotein können auch im Rahmen chronischer Lebererkrankungen eine Erhöhung aufzeigen und haben in der Tumordiagnostik eine Sensitivität von nur 55 % (4). Eine charakteristische klinische Symptomatik der Patienten ist oft nicht vorhanden. Das Auftreten von Symptomen impliziert meist ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium und geht mit niedrigen 5-Jahres-Überlebensraten einher (4, 20). Moderne bildgebende Verfahren haben daher in der Tumordiagnostik einen hohen Stellenwert (4, 15). Die Sonographie wird durch ihre hohe Verfügbarkeit und fehlende Strahlenbelastung primär zur Detektion und Verlaufskontrolle malignitätsverdächtiger Leberherde eingesetzt (15, 21). Die Magnetresonanztomographie (MRT) gehört unter Verwendung eines leberspezifischen Kontrastmittels zu den am häufigsten angewandten bildgebenden Verfahren (4, 15, 22). Auch die triphasische Computertomographie (CT) erlaubt eine Abgrenzung der Lebermalignome zu relevanten Differentialdiagnosen (22). Die Bildgebung dient der Klassifikation und Abschätzung des Krankheitsausmaßes im Rahmen eines Tumorstaging (15, 22). Die Größe und Anzahl der Tumore, ihre Lokalisation sowie eine mögliche Infiltration in angrenzende Gefäße und extrahepatisch liegende Strukturen können hierbei erfasst werden. Zusätzliche Befunde der Leberfunktion (beispielsweise mittels des Child-Pugh-Scores) und des Leistungszustandes der Patienten (beispielsweise durch den Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status) erlauben eine gezielte Risikostratifikation (8, 23, 24). International anerkannte Klassifikationen wie die der Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Group und die dort miteinbezogenen Mailand-Kriterien empfehlen in Abhängigkeit des Tumorstadiums einen therapeutischen Behandlungsalgorithmus (23). Interdisziplinäre Tumorkonferenzen sind jedoch für die Erstellung eines stadiengerechten individuellen Behandlungsplanes empfehlenswert.

1.3 Therapieverfahren maligner Lebertumore

1.3.1 Chirurgische Lebeteilresektion

Die chirurgische Lebeteilresektion ist gegenwärtig der therapeutische Goldstandard bei der Behandlung primärer und sekundärer maligner Lebertumore in kurativer Intention (16-18, 20). Nach erfolgreicher Resektion beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei KRK-Patienten 40 %, während bei einem HCC eine 5-Jahres-Überlebensrate von 50 – 70 % beschrieben wird (25, 26). Auch bei einem CCC erhöht sich die 5-Jahres-Überlebensrate nach einem chirurgischen Eingriff auf 40 % (27). Allerdings sind bei Erstdiagnose nur 5 – 15 % der Patienten für eine Operation geeignet (16, 17). Die Gründe für die Irresektabilität sind vielfältig. Eine eingeschränkte Leberfunktion (Child-Pugh B / C) und bereits bestehende Komorbiditäten des Patienten gehören zu den Hauptfaktoren. Eine enge anatomische Beziehung der Tumore zu großen Lebergefäßen sowie eine Lebergefäßinfiltration sind andere mögliche Gründe für eine Irresektabilität (16, 28-30). Auch ein extrahepatischer Krankheitsfortschritt gilt als relative Kontraindikation für einen operativen Eingriff an der Leber (28, 30).

Die Entfernung der kompletten Tumorlast ohne Residualränder im Rahmen einer R0-Resektion ist der prognostisch relevanteste Faktor für das Langzeitüberleben der betroffenen Patienten (31). Allerdings kann ein tumorfreier Resektionsrand nur in 73 – 77 % der Fälle erreicht werden (32, 33). Hinzu kommt der zum Teil verhältnismäßig hohe Verlust an gesundem Leberparenchym durch das operative Verfahren. Dabei steigt die Komplikationsrate proportional zum Anteil des entfernten Lebergewebes (34). Das Leberrestvolumen (future liver remnant, FLR) bei Patienten mit normaler Leberfunktion sollte mindestens 20 – 25 % betragen (35, 36). Bei Patienten mit vorbestehender Leberzirrhose wird ein FLR über 50 % empfohlen (35). Ziel ist es, dadurch postoperative Komplikationen wie eine Leberinsuffizienz und eine damit assoziierte erhöhte Mortalität zu vermeiden (34-37).

Nach Lebeteilresektion können bei bis zu 50 – 70 % der operierten Patienten Tumorrezidive auftreten (33, 38, 39). Eine erneute Resektion kann das Langzeitüberleben der Patienten sichern, ist jedoch nur bei wenigen Betroffenen aufgrund der Gefahr eines postoperativen Leberversagens sinnvoll (39, 40). Obwohl die Lebertransplantation einen weiteren kurativen Therapieansatz in der Behandlung von hepatischen Malignomen darstellt, kann sie aufgrund des Spenderorganmangels und der strengen Patientenselektion nur in ausgewählten Fällen erfolgen (24, 35, 38). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit für die Weiterentwicklung alternativer Therapieverfahren mit kurativer Intention.

1.3.2 Minimalinvasive Thermoablationsverfahren

Bei geeigneter Indikationsstellung stellen die minimalinvasiven In-situ-Thermoablationsverfahren eine wichtige Alternative zur Leberteilresektion dar, um hepatische Malignome mit kurativer Zielsetzung zu behandeln (4, 15, 41, 42). Sie werden zudem auch in palliativer Intention angewandt (4, 15, 20, 42, 43). Insbesondere bei inoperablen Lebermalignomen, fehlendem Ansprechen auf Chemotherapie und bestehenden Komorbiditäten nehmen sie einen hohen Stellenwert ein (29, 42, 43). Allen Thermoablationsverfahren liegt eine Tumordestruktion durch lokale thermische Nekrosen unter weitgehendem Erhalt des umgebenden gesunden Lebergewebes zugrunde (44). Zu den Vorteilen einer minimalinvasiven Anwendung gehören unter anderem eine komplikationsarme, parenchymsparende Vorgehensweise und die Option den Eingriff mehrfach zu wiederholen. Neben der Mikrowellenablation (MWA) und der laserinduzierten Thermoablation (LITT) ist vor allem die Radiofrequenzablation (RFA) das derzeit am besten untersuchte und am häufigsten eingesetzte Verfahren (41, 42, 44, 45).

1.4 Radiofrequenzablation

1.4.1 Funktionsprinzip

Die RFA wurde erstmalig im 19. Jahrhundert durch den französischen Arzt und Physiker Jacques-Arsène d'Arsonval beschrieben. In seinen Experimenten zur Elektrophysiologie und Diathermie führte die Applikation von Wechselstrom mit einer Frequenz von 10 kHz zu einem Wärmeanstieg in menschlichem Gewebe (46). Durch die stetige fächerübergreifende Weiterentwicklung kam die RFA erstmals in den 1990er Jahren erfolgreich bei Lebermalignomen zur Anwendung (46).

Die heutigen RFA-Systeme bestehen aus einem Generator, über welchen hochfrequenter Wechselstrom (300 – 500 kHz) durch RF-Elektroden unter bildgebender Kontrolle in den Tumor eingebracht werden kann (47-49). Der alternierende Strom resultiert in intrazellulären Ionenbewegungen, die wiederum zu einer Reibung führen. Durch diese Reibung kommt es zu einem Temperaturanstieg. Das Ziel der RFA ist ein lokalisierter Untergang des Gewebes durch Zellwandschädigung und Proteindenaturierung. Bereits Temperaturen ab 42 °C schädigen die dreidimensionale Struktur der Proteine und führen zu einem vollständigen Funktionsverlust. Ab 55 °C wird der Zelltod durch eine sofortige Gewebekoagulation und -nekrose induziert (44, 50). Ab 100 °C kommt es zu einer unmittelbaren Karbonisation und Vaporisation mit Gasbildung, welche sich negativ auf die Anwendung der RFA auswirken können (50, 51). Ein zu hoher Anstieg der Temperatur kann zu einer Dehydrierung des umliegenden Gewebes führen und folglich die elektrische Leitfähigkeit verringern (52). Das Risiko einer unvollständigen Ablation steigt. Bei der RFA werden

daher Temperaturen zwischen 55 – 100 °C angestrebt. Dadurch soll ein sicherer Zelluntergang erreicht werden, ohne dass es jedoch zu einer Karbonisation des umliegenden Gewebes kommt (42, 51, 53-55). Gegenwärtige RF-Applikatoren verfügen aus diesem Grund über interne Kühlungssysteme, die einen zu schnellen Temperaturanstieg und somit eine Austrocknung um die Applikatorspitze verhindern (47). Dadurch kann mehr Energie in das Gewebe eingebracht und demzufolge ein größeres Ablationsvolumen erreicht werden.

1.4.2 Radiofrequenzablationssysteme

Bei einer RFA wird zwischen monopolaren, bipolaren und multipolaren Systemen unterschieden (44). Bei der monopolaren Anwendung wird eine einzelne Elektrode in den Tumor eingeführt (Abbildung 1a).

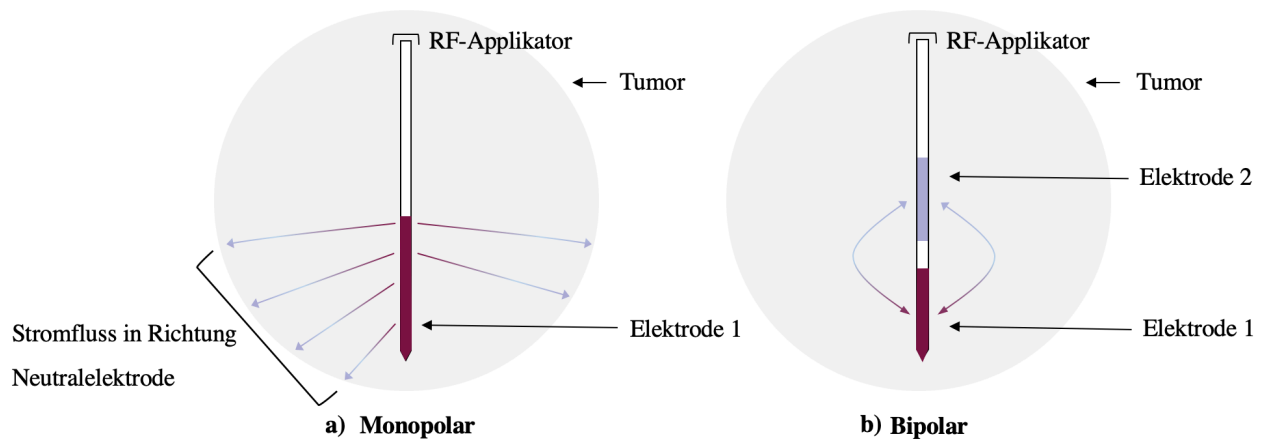


Abbildung 1 Elektrodenkonfiguration bei mono- und bipolarer RFA. **a)** Der RF-Applikator wird in den Tumor eingebracht und enthält nur eine Elektrode. Der Strom wird von einer extern auf der Haut des Patienten angebrachten Neutralelektrode abgeleitet. Dabei müssen größere Distanzen innerhalb des Körpers überwunden werden. **b)** Bei der bipolaren RFA werden zwei Elektroden in den Tumor eingeführt. Diese befinden sich meist innerhalb eines Applikators, sodass der Gebrauch einer Neutralelektrode entfällt. Der Stromfluss bleibt auf das Ablationsgebiet beschränkt.

Um den Stromkreis zu schließen, wird eine zweite Elektrode, eine sogenannte Neutralelektrode, extern auf der Haut des Patienten angebracht (55, 56). Dabei muss auf eine ausreichende Kontaktfläche zwischen der Elektrode und der Haut geachtet werden, um lokale Verbrennungen zu vermeiden (57, 58). Aufgrund der großen Distanz zwischen den beiden Elektroden kann es zu einer unkontrollierten Ausbreitung des Stroms und somit zu einer heterogenen Energiezufuhr in das Gewebe kommen (56). Vorausschätzungen des Ablationsareals werden dadurch erschwert und das

Risiko für Lokalrezidive steigt (48). Durch die inhomogene Energieverteilung können Verletzungen von benachbarten Strukturen und Organen entstehen (55-57). Daher ist die monopolare RFA in ihrer Anwendung limitiert (58).

Bei der bipolaren RFA wird ein Applikator mit zwei Elektroden in das Zielgewebe eingebracht (Abbildung 1b). Folglich kann auf eine Neutralelektrode verzichtet werden (59). Aufgrund der kurzen Distanz zwischen den Elektroden sind im Vergleich zur monopolaren RFA höhere lokale Energiedichten und infolgedessen größere Ablationsvolumina möglich (Abbildung 2b) (59, 60).

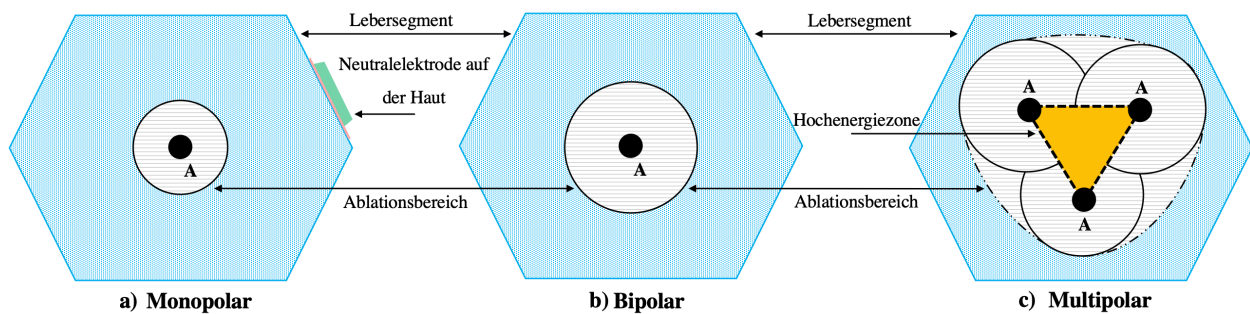


Abbildung 2 Mono-, bi- und multipolare RFA-Systeme im Vergleich. Im Gegensatz zu einer a) monopolaren RFA kann bei der b) bipolaren RFA auf den Gebrauch einer Neutralelektrode verzichtet werden. Hierbei befinden sich zwei Elektroden in einem Applikator (A, schwarzer Punkt). c) Bei der multipolaren RFA können mehrere bipolare Applikatoren verwendet werden. Dabei fusionieren die Ablationen um die einzelnen Applikatoren zu einer einzelnen annähernd sphärischen Ablation. In dem von den RF-Applikatoren eingeschlossenen Bereich bildet sich eine Hochenergiezone (gelb). Durch den Einsatz mehrerer Applikatoren kann bei der multipolaren RFA ein noch größeres Ablationsvolumen als bei der bipolaren RFA erzielt werden.

Die multipolare RFA stellt eine Weiterentwicklung der bipolaren RFA dar und erlaubt eine gezielte Platzierung multipler Elektroden um einen Tumor herum. Die Anzahl der Elektroden und der Abstand der Applikatoren zueinander kann dabei variieren (56). Bei drei Applikatoren mit jeweils zwei bipolaren Elektroden sind so beispielsweise insgesamt 15 Elektrodenpaarungen möglich. Jede Elektrodenpaarung wird der Reihe nach automatisch vom RFA-Generator aktiviert, bevor auf die nächste Elektrodenpaarung umgeschaltet wird. Das Ziel dieser getakteten Energieabgabe ist die Vermeidung einer vorzeitigen Gewebekarbonisation um die Applikatoren herum. Das Gewebe unmittelbar um die nicht aktiven Elektroden kann somit abkühlen. Extreme Temperaturspitzen werden vermieden. Durch die Generierung einer höheren lokalen Energiedichte können bei der multipolaren RFA dadurch wesentlich größere Koagulationsvolumina als bei der mono- oder bipolaren Anwendung erreicht werden (Abbildung 2c) (55, 56, 61, 62).

1.4.3 Die Radiofrequenzablation als Therapieverfahren

Obgleich die chirurgische Leberteilresektion bis vor Kurzem noch als einziges kuratives Therapieverfahren galt, kann die RFA bei einem ausgewählten Patientenkollektiv inzwischen vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich des Langzeitüberlebens aufweisen (63-68).

HCC: Laut Leitlinie sollte die RFA im HCC-Frühestadium (Child-Pugh-A / B) bei noch adäquater Leberfunktion und nur gering oder moderat ausgeprägter portaler Hypertension als kurativer Ansatz angeboten werden (4, 24). Um ein Rezidiv zu verhindern, wird ein maximaler Tumordurchmesser von kleiner als 3 cm unter Einhaltung eines ausreichenden Sicherheitsabstandes von 5 – 10 mm empfohlen (24, 69-72). Laut der BCLC-Klassifikation sollten pro Leberlappen nicht mehr als drei intrahepatische Läsionen vorhanden sein, wenn eine RFA in kurativer Intention geplant ist (Abbildung 3) (24).

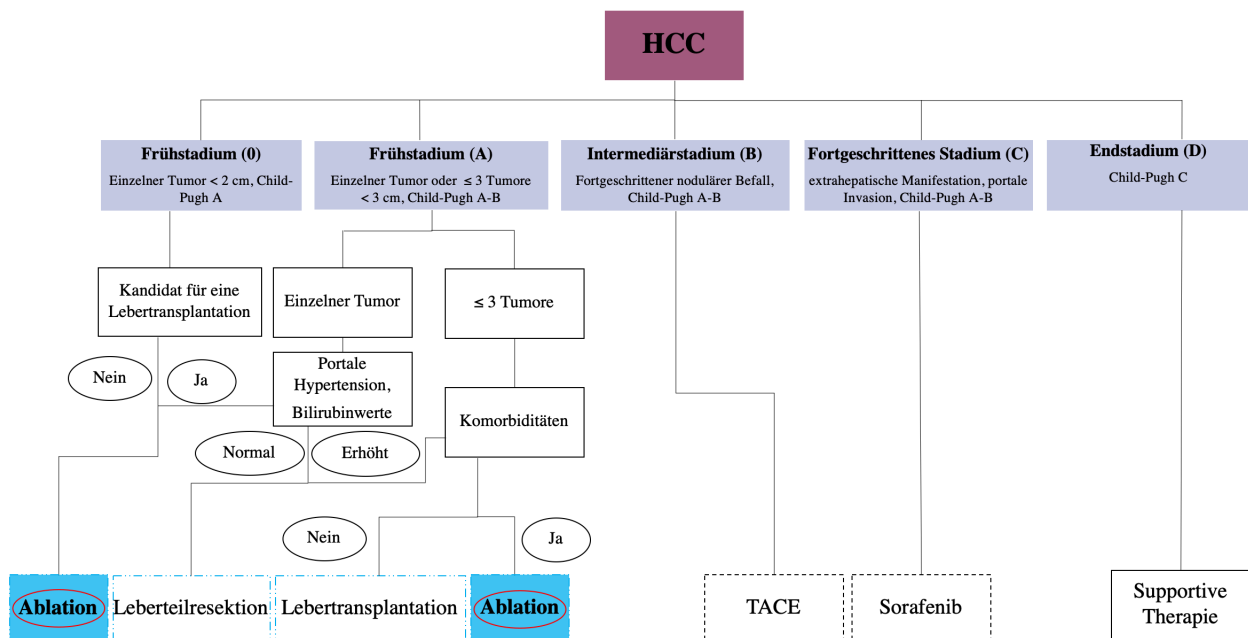


Abbildung 3 Behandlungsalgorithmus des HCCs (Abbildung modifiziert nach Forner et al. (24)). Ablation, Leberteilresektion und Lebertransplantation gelten als kurative (blau), die transarterielle Chemoembolisation (TACE) und das Chemotherapeutikum Sorafenib als palliative Therapieverfahren. Eine supportive Behandlung muss im Endstadium eines HCCs (Child-Pugh C) in Erwägung gezogen werden.

Bei HCC-Herden, die größer als 3 cm aber kleiner als 5 cm sind, sollte eine interdisziplinäre Abwägung zwischen RFA und chirurgischer Resektion erfolgen (4). Diese Empfehlung basiert auf aktuellen Untersuchungen, die keinen signifikanten Unterschied zwischen den 3-Jahres-Überlebensraten nach RFA (71,4 %) und nach Resektion (73,4 %) bei einem HCC unter 5 cm aufzeigten (66). In einigen Analysen ist die RFA bei geeigneter Indikationsstellung der Leberteilresektion

bereits überlegen (64, 73-75). Bei einem zentral gelegenen HCC kleiner als 2 cm betrug die 3-Jahres-Überlebensrate in einer Studie von Peng et al. 93,0 % nach RFA, jedoch nur 71,6 % nach Resektion (73). Prospektive randomisierte kontrollierte Studien sind nötig, um die Überlegenheit der RFA gegenüber einer chirurgischen Resektion bei kleinen HCC-Herden zu überprüfen (73).

KRK: Bei Patienten mit primär resektablen kolorektalen Lebermetastasen sollte die Indikation für ein lokalablatives Verfahren prinzipiell innerhalb multidisziplinärer Tumorkonferenzen gestellt werden (15). Analog zum HCC liegen klinische Studien vor, die keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Langzeitüberlebens bei kolorektalen Lebertumoren bis zu 3 cm zwischen RFA und Resektion belegen (15, 64, 73, 74, 76). Den Patienten sollte die RFA daher bei geeigneter Tumorgöße und -lokalisierung als minimalinvasives Verfahren alternativ zur chirurgischen Resektion angeboten werden (15).

Palliative Indikation: Die RFA kann weiterhin bei Patienten eingesetzt werden, bei denen beispielsweise aufgrund von Komorbiditäten oder vorausgegangener Leberteileresektion nur eine eingeschränkte oder nicht vorhandene Operationsfähigkeit besteht (15, 28, 65, 70, 74). Folgeuntersuchungen, welche die Möglichkeit einer sekundären Resektabilität oder erneuten RFA überprüfen, werden empfohlen (15). Insgesamt wird bei der Behandlung eines bereits fortgeschrittenen Krankheitsstadiums vor allem ein multimodales Therapiekonzept angestrebt (15). Dabei ist der Krankheitsprogress insbesondere von einer extrahepatischen Tumormanifestation sowie der Lokalisation, der Anzahl und dem Durchmesser der Lebertumore abhängig (15, 77-79).

1.4.4 Der Tumordurchmesser als Risikofaktor

Der Tumordurchmesser stellt einen entscheidenden Risikofaktor für die Rezidiventstehung und letztlich die Überlebensrate nach RFA dar (62, 69, 72, 78-81). Grundsätzlich sind Radiofrequenzablationen aufgrund physikalischer Gegebenheiten in ihrer Ausdehnung und Eindringtiefe in das Lebergewebe begrenzt (44, 81). Mit zunehmender Distanz vom RF-Applikator sinkt beispielsweise der Temperatureintrag in das Gewebe und somit auch der maximal mögliche Ablationsdurchmesser (47). Hinzu kommt, dass sich insbesondere die natürliche Leberperfusion negativ auf die Temperaturverteilung innerhalb des Leberparenchyms auswirken kann (siehe 1.4.5) (47, 82). In einer Analyse von Mulier et al. lag der durchschnittliche Ablationsdurchmesser von mono- und bipolaren Radiofrequenzablationen bei 20 – 40 mm (81). Habash et al. zeichneten Ablationsdurchmesser zwischen 30 – 60 mm auf (44). Unter zusätzlicher Beachtung eines Sicherheitsabstandes von 5 – 10 mm ist aufgrund dessen nur eine begrenzte Anzahl von Malignomen durch eine RFA sicher therapierbar (47, 69, 71, 81). Für die Durchführung einer multipolaren RFA mit kurativer

Zielsetzung sollte der Tumordurchmesser daher laut Leitlinien vorzugsweise kleiner als 3 cm sein (siehe 1.4.3) (4, 15). Dabei sollten sich das Ablations- und Tumorumfangen ausreichend überlappen, um eine lokale Tumorkontrolle zu gewährleisten. Studien zufolge wird eine erfolgreiche RFA zu 90 % bei einem Tumordurchmesser unter 2,5 cm erreicht (80). Bei Malignomen, die größer als 5 cm sind, sinkt der Ablationserfolg auf 50 % (62, 80). Eine ausreichende Zerstörung aller malignen Zellen wird bei Tumoren dieser Größe nicht mehr sichergestellt. Lokalrezidivraten von bis zu 58 % können auftreten (65, 69, 70, 83). Dabei nimmt die Überlebensrate mit steigendem Tumordurchmesser ab (79).

Bei einer RFA muss zusätzlich in Erwägung gezogen werden, dass der Tumordurchmesser in direktem Zusammenhang mit einer tumorösen Gefäßinvasion und der Präsenz von nodulären Mikrosatelliten steht (65, 81, 84). Diese Satellitenmetastasen sind regionäre Tumorabsiedlungen und kommen sowohl bei einem HCC als auch bei einer kolorektalen Lebermetastasierung vor (69, 85). Sie können bei bis zu 27 % der Tumore kleiner als 3 cm auftreten (85). Bei Tumoren größer als 6,5 cm kann in 55 % der Fälle eine vaskuläre Mikroinvasion beobachtet werden (Abbildung 4) (78, 86).

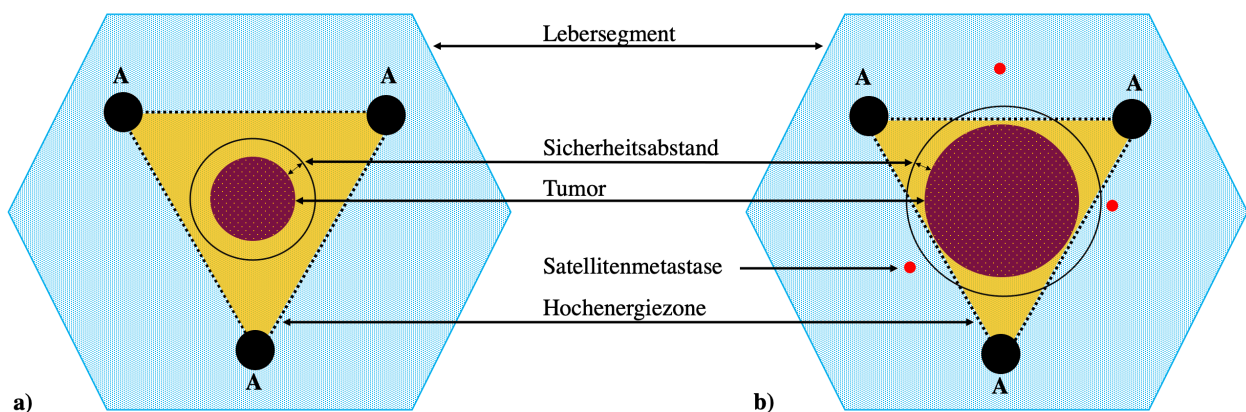


Abbildung 4 Multipolare RF-Applikatorformation um einen Tumor. **a)** Bei der multipolaren RFA werden die Applikatoren (A, schwarze Punkte) um den Tumor herum angeordnet. Ein Sicherheitsabstand von 5 – 10 mm sollte eingehalten werden, um eine vollständige Zerstörung aller malignen Zellen zu gewährleisten und mögliche Rezidive zu verhindern. **b)** Bei steigendem Tumordurchmesser besteht die Gefahr einer unvollständigen Tumordestruktion. Mögliche Satellitenmetastasen können nicht erfasst werden.

Satellitenmetastasen befinden sich meist in unmittelbarer Nähe des Primärtumors, können aber bei zunehmendem Tumordurchmesser auch bis zu 4 cm entfernt liegen (84, 86). Bildgebende Verfahren haben eine geringe Sensitivität gegenüber diesen Mikrosatelliten (84).

Durch die Anwendung eines multipolaren RFA-Systems ist in Zukunft allerdings auch eine sichere Ablation von Lebertumoren, die größer als 3 cm sind, vorstellbar (62, 87-89). Seror et al. zeigten, dass durch die Verwendung multipolarer RF-Applikatoren 81 % der HCCs, die ≥ 5 cm aber kleiner als 9 cm waren, komplett ablatiert werden können (88). Im Vergleich zu einer monopolaren RFA werden bei der multipolaren RFA durch das Erreichen wesentlich größerer Ablationsdiameter deutlich niedrigere Tumorrezidivraten beobachtet (62). Somit gilt neben dem Tumordurchmesser auch die Wahl des angewandten RFA-Systems als unabhängiger Prädiktor für das Ablationsergebnis einer RFA (62).

1.4.5 Kühleffekte

Der Erfolg einer RFA hängt maßgeblich von der Temperatur innerhalb der Ablation ab (47). Durch die natürliche Leberperfusion kann es während der RFA in Form eines Wärmeabtransportes durch den Blutfluss zu einer Temperaturabnahme innerhalb des Ablationsbereiches kommen (47, 90). Dies wird als vaskulärer Kühleffekt („heat sink effect“) bezeichnet (91, 92). Das Risiko residualer Tumorzellen ist daher im Wesentlichen von der Tumorlokalisation abhängig (Abbildung 5) (47).

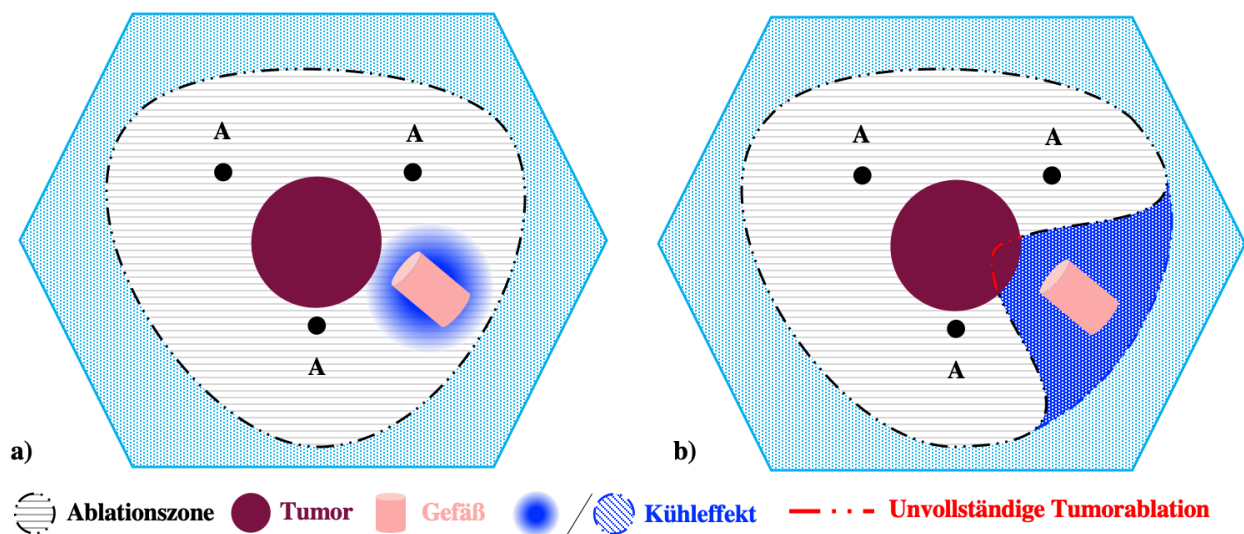


Abbildung 5 a) Lebergefäße in Ablationsnähe transportieren die zugeführte Energie in Form von Wärme ab. b) Sowohl das Volumen als auch die Form einer RFA können durch den Gefäßkühleffekt negativ beeinflusst werden. Hinzu kommt die Gefahr von residualen malignen Zellen, wenn der Tumor durch den Kühleffekt nicht vollständig von der Ablationszone erfasst wird.

Radiofrequenzablationen in Gefäßnähe sind mit Rezidivraten von bis zu 36,5 % assoziiert (43, 47, 69, 72, 93). Hinzu kommt, dass die Flussgeschwindigkeit, der Gefäßdurchmesser und die Gefäßart zusätzliche Auswirkungen auf den vaskulären Kühleffekt haben (82). Studien konnten zeigen, dass

bereits Flussraten ab 1 ml/min und ein Gefäßdurchmesser größer 3 mm zu signifikanten Kühleffekten führen (91, 93-95). Befinden sich Gefäße mit einem Durchmesser größer als 5 mm in Tumornähe, sinkt die Wahrscheinlichkeit einer sicheren und vollständigen Ablation erheblich (Abbildung 5b) (91, 95). Auch die Gefäßart muss in Hinblick auf den Kühleffekt berücksichtigt werden. Bei Ablationen in unmittelbarer Nähe zur Vena cava beträgt das Risiko eines Residualtumors 100 % (69). Bei RFA, die an die Portalvene oder an Lebervenen grenzen, können verbleibende vitale Tumorzellen in jeweils 57 % und 33 % der Fälle beobachtet werden (69). Portalfelder (bestehend aus Arteria interlobularis, Vena interlobularis, Ductus biliferi interlobularis und Lymphgefäßen, siehe 1.5.1) scheinen insgesamt einen ausgeprägteren Kühleffekt zu verursachen als vergleichbare Lebervenen (95, 96). Weiterhin induzieren maligne Tumoren häufig eine vermehrte Angiogenese (97). Mit zunehmendem Tumordurchmesser muss insofern durch eine stärkere Vaskularisation auch von einem wesentlichen Kühleffekt in Tumornähe ausgegangen werden. Die präinterventionelle Planung perivaskulärer Radiofrequenzablationen ist äußerst komplex und bleibt Gegenstand aktueller Forschung (47, 69). Eine vollständige Vermeidung der Gefäßkühleffekte durch die Leberperfusion kann derzeit nur durch eine Unterbrechung der Blutzufuhr, einem sogenannten Pringle-Manöver, sicher erreicht werden (90, 98-100).

1.4.6 Pringle-Manöver

Bei einem Pringle-Manöver wird das Ligamentum hepatoduodenale (bestehend aus Portalvene, Arteria hepatica propria und Ductus choledochus) temporär chirurgisch okkludiert, um die Blutzufuhr zur Leber zu unterbrechen (101). Die ursprüngliche Indikation zum Pringle-Manöver ist das Minimieren von großen intraoperativen Blutverlusten (101). Eine zeitweilige Minderperfusion führt dabei zu einer Verringerung der postoperativen Mortalität, Morbidität und Tumorrezidivrate (102). Durch die verminderte Leberperfusion werden jedoch auch vaskuläre Kühleffekte während einer RFA erheblich reduziert (69, 90). Folglich entstehen wesentlich größere und homogenere Ablationsvolumina (90, 98, 99, 103-105).

Die Anwendung eines Pringle-Manövers setzt allerdings mindestens eine minimalinvasive chirurgische Intervention voraus (47). Der Patient ist demnach den Risiken einer Operation ausgesetzt und die Vorteile einer rein perkutanen RFA gehen insbesondere für komorbide Patienten verloren (siehe 1.4.7). Das Pringle-Manöver kann zusätzlich Schädigungen des Leberparenchyms begünstigen (106-108). Der Grund hierfür ist die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (beispielsweise Interleukin-6 / Tumornekrosefaktor- α) und die mangelnde Sauerstoffzufuhr durch die Unterbrechung der Leberperfusion (109). Besonders bei Aufhebung des Pringle-Manövers kann die

Leber durch einen postischämischen Reperfusionsschaden längerfristig Funktionseinschränkungen davontragen (107). Ein Pringle-Manöver eignet also sich zur Reduktion von Kühleffekten. Dennoch muss vor einer geplanten RFA mit einem Pringle-Manöver eine sorgfältige Risiko-Nutzen-Abwägung erfolgen.

1.4.7 Vor- und Nachteile einer Radiofrequenzablation

Bei geeigneter Indikationsstellung gilt die RFA insgesamt als sicheres und komplikationsarmes Verfahren (4, 58, 110). Mit einer Gesamtmortalitätsrate von 0 – 2 % hat sie sich zu einer vielversprechenden Therapieoption von malignen Lebertumoren etabliert (58, 76, 110, 111). Großer Vorteil ist die Möglichkeit der wiederholten Intervention durch eine parenchymchonende Vorgehensweise bei Tumorrezidiven oder neu auftretenden Lebermalignomen (41, 44, 80). Die RFA wird im klinischen Alltag meist perkutan durchgeführt. Sie kann jedoch auch während einer chirurgischen Operation im Rahmen einer Laparoskopie oder Laparotomie erfolgen (55, 65, 69, 110, 112). Allen drei Zugangswegen ist eine präinterventionelle Planung mittels bildgebender Verfahren (Ultraschall, MRT, CT) gemeinsam (55, 110). Ziel ist unter anderem die Prävention punktionsassoziierter Komplikationen. Dazu zählen unter anderem intraabdominelle Blutungen (1,6 %), Gallengangsverletzungen (1,0 %), Pleuraergüsse (0,2 %) und Pneumothorax (0,3 %) (44, 55, 58, 64, 110). Schwerwiegendere Komplikationen wie intrahepatische Abszesse mit septischer Streuung (1,1 %), Leberversagen (0,8 %), thermische Schäden des Darms (0,5 %) und Leberinfarkte (0,04 %) wurden ebenfalls im Rahmen einer RFA dokumentiert (17, 44, 58, 110). Je nach Zugangsweg steigt die Komplikationsrate der RFA mit der Invasivität des Eingriffs (perkutan 7,2 %, Laparoskopie 9,5 %, Laparotomie 9,9 %) (58). Im Vergleich zu einer viszeralchirurgischen Maßnahme in Vollnarkose können die Patienten durch die schnelle und minimalinvasive Behandlung das Krankenhaus in der Regel nach 24 Stunden wieder verlassen (80). Wird eine RFA mit einer Leberteileresektion kombiniert, steigt der Krankenhausaufenthalt auf durchschnittlich sieben Tage (28, 113). Bei einer offenchirurgischen RFA müssen zusätzlich die Risiken jeder Laparoskopie und Laparotomie beachtet werden (58). Jedoch kann während einer chirurgisch durchgeführten RFA beispielsweise der Einsatz eines intraoperativen Ultraschalls erfolgen (28, 47, 58). Durch die verbesserte Einsicht in den Bauchraum können dadurch mögliche Satellitenmetastasen (siehe 1.4.4) schneller und präziser detektiert werden. Weiterer Vorteil ist die parallele Anwendung eines Pringle-Manövers zur Erzielung größerer Ablationsvolumina (siehe 1.4.6) (47, 69, 99). Eine sorgfältige präinterventionelle Planung bleibt allerdings notwendig, um einen sicheren Einsatz der RFA zu gewährleisten.

1.4.8 Ex-vivo- und In-vivo-Studien der Radiofrequenzablation

Um die prätherapeutische Planung zu optimieren und letztlich den Erfolg einer RFA zu sichern, werden tierexperimentelle Studien durchgeführt (47, 92, 114-116). Mulier et al. empfehlen Ex-vivo-Versuche vor allem als Grundlage, um die RF-Technologie unter Laborbedingungen weiterzuentwickeln (92). Durch die Absenz der natürlichen Leberperfusion im Ex-vivo-Modell sind Aussagen über den Einfluss der Gefäße auf eine RFA jedoch nur begrenzt möglich (99). Durch den fehlenden Kühleffekt besteht unter Ex-vivo-Bedingungen zudem die Gefahr von Überschätzungen der Ablationsgröße und -geometrie (92, 117, 118). Denys et al. führten Untersuchungen mit RFA-Generatorsystemen vier verschiedener Hersteller am Schweinemodell durch (117). Ex vivo beobachtete die Arbeitsgruppe Ablationsvolumina zwischen 55 – 68 cm³, während in vivo bei gleichbleibenden Versuchsparametern allerdings nur Ablationsgrößen zwischen 29 – 42 cm³ erzeugt wurden (117). Auch Kim et al. zeigten in Schweinelebern signifikant kleinere Ablationsflächen in vivo im Vergleich zu den Ablationsflächen ex vivo auf (118). Die Ergebnisse von Ex-vivo-Experimenten sollten daher durch In-vivo-Analysen validiert werden.

Studien unter In-vivo-Voraussetzungen sind vor allem notwendig, um ein besseres Verständnis physiologischer Abläufe während einer RFA zu erhalten (99). Insbesondere die natürliche Leberperfusion und die damit einhergehenden Gefäßkühleffekte müssen aufgrund der beschriebenen Tumorrezidive nach einer RFA weitergehend in vivo untersucht werden. Aufgrund des minimalinvasiven Eingriffes einer RFA in der klinischen Situation, sollten In-vivo-Versuche zusätzlich dazu eingesetzt werden, um Ablationen makroskopisch und histologisch zu beurteilen. Ziel sollte letztlich eine präzisere Vorhersagbarkeit der resultierenden Ablationsvolumina sein, um zukünftig eine optimalere RFA am Patienten durchzuführen zu können (92, 99).

1.5 Histologische Analyse

Während bei chirurgischen Therapiemaßnahmen ein histologisch gesicherter tumorfreier Resektionsrand (R0) als Erfolgskriterium gilt, kann bei einer minimalinvasiven RFA keine histologische Aufarbeitung des Gewebes erfolgen (119). Im klinischen Alltag wird daher mehrheitlich auf Modalitäten wie die Sonographie, MRT oder CT zurückgegriffen, um das Leberparenchym prä- und postinterventionell zu beurteilen (17, 41, 44, 53, 80, 81, 119-121). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass bildgebende Verfahren die tatsächliche Größe einer Ablation durch die fehlende direkte visuelle Kontrolle unter- oder überschätzen können (49, 81, 119, 122). Um die Auswertung durch die Bildgebung zu validieren und zu optimieren, werden Ex-vivo- und In-vivo-Studien durchgeführt (siehe 1.4.8) (81, 92, 119). Großer Vorteil ist die Möglichkeit einer makroskopischen

und histologischen Bestimmung der Ablationsgröße durch Ex-vivo- und In-vivo-Analysen (114). Allerdings werden in den meisten Studien überwiegend makroskopische Ablationsflächenberechnungen und -formbeschreibungen durchgeführt (119, 123). Folglich basiert die Validierung einer RFA-Auswertung durch bildgebende Verfahren hauptsächlich auf makroskopischen Daten (103, 119). Aussagen über den Ablationserfolg und mögliche Tumorresiduen durch die Makroskopie oder die Bildgebung sind jedoch nur bis zu einem gewissen Grad annehmbar (69). Letztlich ist der Nachweis einer vollständigen Tumorablation allein durch histologische Untersuchungen zulässig (124). Infolgedessen ist eine Verifizierung einer makroskopischen Ablationsflächenauswertung durch die Histologie erforderlich. Bisher führten ausschließlich Gemeinhardt et al. einen Vergleich zwischen makroskopischen und histologischen Ergebnissen anhand von In-vivo-Versuchen der bipolaren RFA am Schweinmodell durch (114). Die Arbeitsgruppe zeigte, dass eine starke Korrelation zwischen der makroskopischen und mikroskopischen Ablationsfläche und -morphologie existiert (114). Die makroskopische Ablationsauswertung kann bei der bipolaren RFA daher als valide angesehen werden. Für die multipolare RFA mit deutlich höherem Energieeintrag liegen makroskopische und histologische Analysen dieser Art noch nicht vor.

Aufgrund von Tumorrezidiven nach einer RFA besteht des Weiteren Grund zur Annahme, dass Lebergefäße sowie perivaskuläres Lebergewebe innerhalb der Ablationen erhalten bleiben (47, 69, 72, 91). Genaue Kenntnisse über die individuelle Gefäßanatomie und deren Einfluss auf den Ablationsradius und die Ablationsform sind für die Durchführung einer erfolgreichen RFA essenziell (125). In-vivo-Versuche einer multipolaren RFA sind demnach notwendig, um eine histologische Analyse von einzelnen Gefäßen innerhalb des Ablationsareals zu ermöglichen. Dafür muss ein grundlegendes Verständnis des anatomischen Leberaufbaus vorhanden sein. Da Radiofrequenzablationen zusätzlich hinsichtlich ihres Erscheinungsbildes in Zonen eingeteilt werden können (siehe 1.5.2), ist die Identifikation histologischer Ablationsmerkmale innerhalb des Leberparenchyms von Relevanz.

1.5.1 Mikroskopischer Aufbau der Leber

Das Leberparenchym besteht vorwiegend aus Leberepithelzellen (Hepatozyten). In radiärer Anordnung bilden die Hepatozyten ca. 1,0 – 1,5 Millionen, 1 – 2 mm große, polyedrisch geformte Zentralvenenläppchen (126). Drei aneinandergrenzende Zentralvenenläppchen umschließen ein Periportalfeld. In diesem finden sich Anschnitte von Lymphgefäßen und der sogenannten Glisson-Trias (Arteria interlobularis, Vena interlobularis und Ductus biliferi interlobularis) (Abbildung 6).

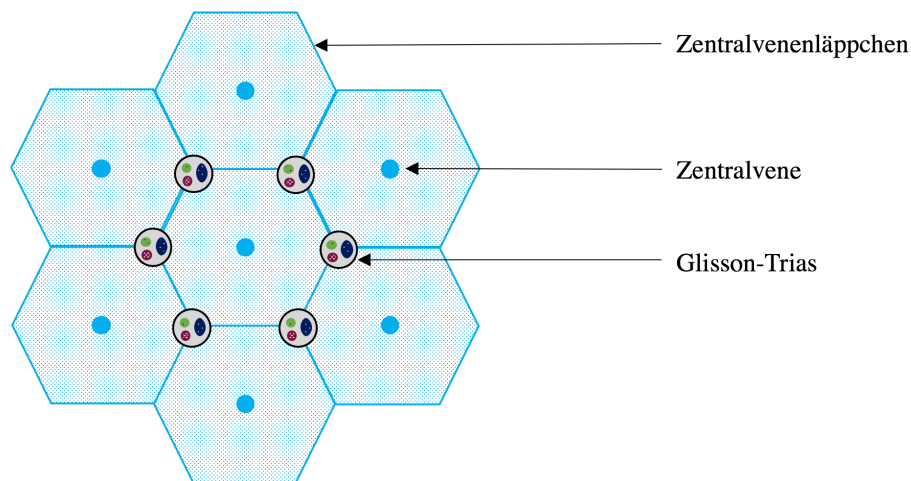


Abbildung 6 Gliederung des Leberparenchyms. Baueinheit ist das Zentralvenenläppchen, in dessen Mitte sich die Zentralvene (hellblau) befindet. Drei aneinandergrenzende Zentralvenenläppchen umschließen ein Periportalfeld, welches aus der Glisson-Trias (Arteria interlobularis (lila), Vena interlobularis (dunkelblau) und Ductus biferi interlobularis (grün)) und Anschnitten von Lymphgefäßen besteht.

Weitlumige Kapillaren (Sinusoide) grenzen beidseits an je einen Hepatozyten (126). Dazwischen ist der Disse-Raum gelegen, welcher sich besonders durch die Vitamin-A-haltigen Ito-Zellen auszeichnet. Ito-Zellen sind im Rahmen von Fibrose- und Zirrhoseprozessen für die vermehrte Ausbildung von Proteoglykanen und Kollagenfibrillen verantwortlich (126).

1.5.2 Zoneneinteilung einer Radiofrequenzablation

Goldberg et al. empfehlen eine allgemeingültige Einteilung der Radiofrequenzablationen in Zonen, um einen akkuraten Ergebnisvergleich verschiedener Forschergruppen sicher zu stellen (122). Terminologisch wird dabei das zentrale Ablationsareal als „White Zone“ (WZ) bezeichnet (49, 114, 122). In dieser Zone wird eine vollständige Zerstörung der malignen Zellen angenommen. Der sich ringförmig daran anschließende Bereich wird „Red Zone“ (RZ) genannt (81, 114, 122). Die RZ enthält sowohl avitale als auch vitale Zellanteile und kann somit im klinischen Alltag den Erfolg einer vollständigen Ablation durch mögliche Tumorresiduen gefährden (49, 114). Makroskopisch erfolgt die zonale Einteilung anhand der Farbe des Leberparenchyms. Das Areal in unmittelbarer Nähe um die RF-Applikatoren herum ist in der Regel fahlgrau bis hellbraun (WZ). Die an die WZ angrenzende RZ zeichnet sich durch ihre hellrote Farbe aus und geht diffus in dunkelrotes natives Leberparenchym über (49). Histologisch ergibt sich die zonale Differenzierung der Ablation in WZ und RZ durch den Auflösungsgrad der Gewebearchitektur und den Grad der Farbtintensität je nach angewandter Färbemethode (Abbildung 7).

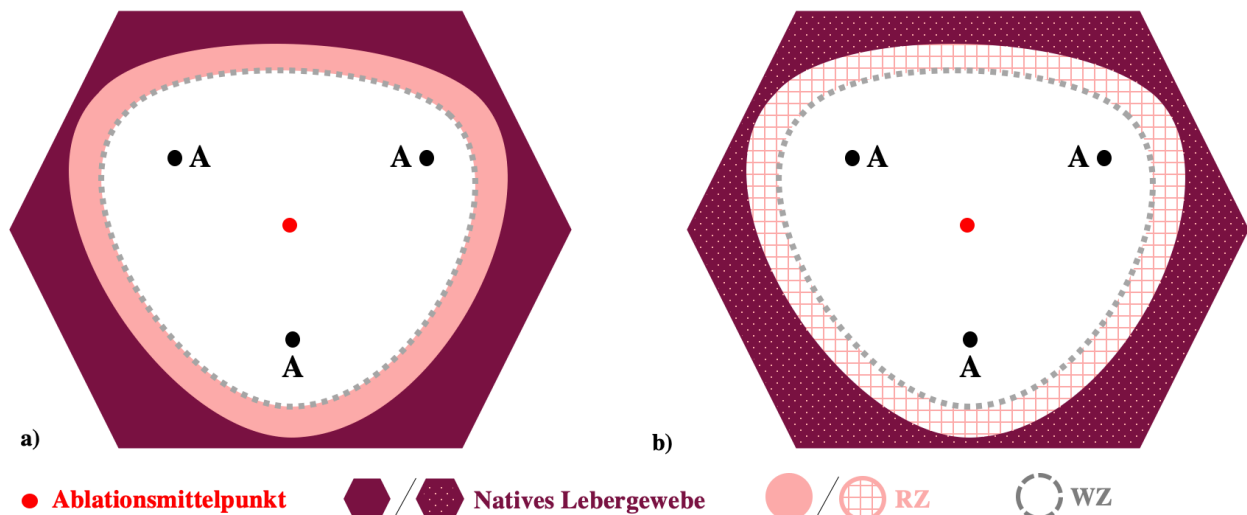


Abbildung 7 Differenzierung thermischer Ablationszonen. A = Applikator. **a)** Makroskopische Einteilung der Ablationszonen je nach Farbabstufung des Leberparenchyms. Die zentrale WZ ist dabei typischerweise fahlgrau bis hellbraun, während sich die daran anschließende RZ hellrot darstellt. Natives Lebergewebe ist dunkelrot. **b)** Die histologische Einteilung der Ablationszonen kann einerseits wie in der Makroskopie nach dem Färbungsgrad und andererseits nach der Gewebekonstitution des Leberparenchyms erfolgen.

1.5.3 Histologische Färbemethoden

Die Standardfärbung bei histologischen Analyseprozessen ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) (126). Anhand dieser Färbung werden der mikroskopisch-anatomische Aufbau der Leber sowie die Gefäßarchitektur beurteilt. Aufgrund ihrer negativen elektrischen Ladungen nehmen einzelne Gewebekomponenten, wie zum Beispiel Zellkerne und Ribosomen, den basischen Farbstoff Hämatoxylin auf und erscheinen blauviolett. Anteile des Zytoplasmas und Kollagen nehmen durch ihre positive elektrischer Ladung den azidophilen Farbstoff Eosin auf und werden rot gefärbt (126). Thermische Einwirkungen auf das Leberparenchym wie bei einer RFA können histologisch durch den Untergang der Glisson-Trias mit Auflösung der Gefäßwand, insgesamt durch den Strukturverlust des Zentralvenenläppchens (siehe 1.5.1), identifiziert werden. In der WZ kommt es zu einem vollständigen Verlust der Gewebearchitektur (49). Die RZ zeichnet sich durch das Vorhandensein beschädigter als auch intakter Zellbestandteile aus (Abbildung 7) (114).

Zunehmend gewinnt jedoch die Vitalfärbung mit Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) an Bedeutung (114, 127). NADH ist ein Ko-Enzym der Mitochondrien und an wichtigen Stoffwechsellaskaden der Energiebereitstellung beteiligt (127, 128). Bei hohen Temperaturen wird die Proteinstruktur der NADH-Diaphorase zerstört. Die damit eingehende Hemmung der Enzymaktivität der NADH-Diaphorase führt zu einer verminderten farbstoffbildenden Reduktions-Oxidations-Reaktion mit dem Farbstoff Nitrotetrazoliumblau (NTB) zu Formazan (Abbildung 8).

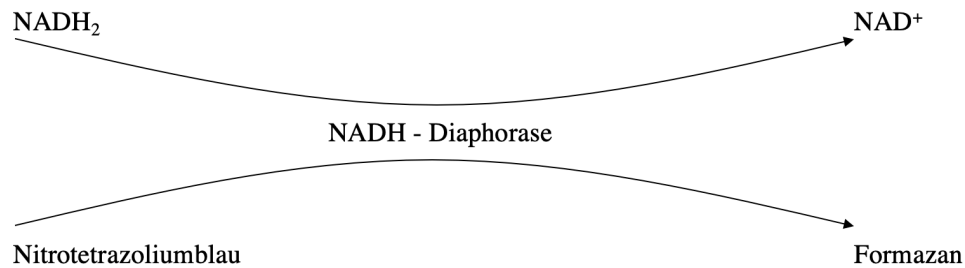


Abbildung 8 Nicotinamidadeninucleotid-Reaktionsschema. Katalysiert durch die NADH-Diaphorase entsteht unter Abspaltung von NAD⁺ das dunkelblaue Reaktionsprodukt Formazan.

Die Farbintensität der einzelnen Zellbestandteile ist dabei Indikator für den Grad der Zellschädigung (127-129). Die Farbe dunkelblau markiert intaktes natives Gewebe. Histologisches Korrelat für eine Apoptose ist die fehlende Verstoffwechslung von NTB zu dunkelblauem Formazan. Abladierte Zellelemente erscheinen folglich farblos / braun und werden der WZ zugeteilt. Die RZ enthält sowohl dunkelblaue (vitale) als auch farblose (avitale) Zellbestandteile.

1.6 Fragestellung

Durch den minimalinvasiven Eingriff können Radiofrequenzablationen im Gegensatz zur chirurgischen Leberteilresektion histologisch nicht auf eine komplette Tumordestruktion hin beurteilt werden. Die Kontrolle des Therapieerfolges erfolgt ausschließlich indirekt über bildgebende Verfahren. Die Ablationsauswertung durch diese Verfahren beruht jedoch weitgehend auf makroskopischen Studien. Daher erscheint zunächst die Validierung einer makroskopischen Ablationsanalyse durch eine histologische Untersuchung notwendig. Dafür sollen makroskopische und histologische Ablationszonen und -flächen miteinander korreliert werden.

Kühleffekte von Lebergefäßen können den Ablationserfolg und somit das Tumorrezidivrisiko nach einer RFA maßgeblich beeinflussen. Histologische Untersuchungen des Gefäßkühleffektes bei der multipolaren RFA existieren derzeit noch nicht. Dabei sind genaue Kenntnisse über die Auswirkungen von einzelnen Lebergefäßen auf die Ablationsform und den Ablationsradius elementar für eine präzise präinterventionelle Therapieplanung. Es ist unklar, ob Lebergefäße innerhalb des Ablationsareals vollständig abladiert werden. Experimentelle Studien mit einer histologischen Aufarbeitung einzelner Gefäße innerhalb einer Ablation sind notwendig. Einflussnehmende Faktoren wie die Gefäßart und der Gefäßdurchmesser sollten dabei berücksichtigt werden. Maßnahmen wie ein Pringle-Manöver oder eine Distanzreduktion zwischen den Applikatoren können so vorausgeplant werden, um eine vollständige Tumordestruktion zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit sollen Ablationen nach multipolarer RFA in Schweinelebern in vivo makroskopisch und mikroskopisch evaluiert werden. Ziel ist dabei die Bearbeitung folgender Fragestellungen:

1. Ist eine makroskopische Auswertung von Leberablationen nach In-vivo-Versuchen mit der multipolaren RFA valide?

- a. Kann sowohl makroskopisch als auch histologisch eine Einteilung in die für die RFA typischen Ablationszonen (WZ / RZ) erfolgen?
- b. Stimmen makroskopisch erkennbare Ablationsflächen qualitativ und quantitativ mit den histologisch erkennbaren Ablationsflächen überein?

2. Inwieweit beeinflussen die Gefäße innerhalb einer Ablation den Erfolg einer multipolaren RFA?

- a. Werden Lebergefäße innerhalb des Ablationsareals vollständig ablatiert?
- b. Nehmen Lebergefäße Einfluss auf den Ablationsradius?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsplan

Das Versuchsvorhaben gliederte sich in drei Schritte. Im Rahmen von In-vivo-Großtierversuchen wurden unter computertomographisch-gesteuerter Kontrolle Radiofrequenzablationen in Lebern von Hausschweinen durchgeführt. Anschließend erfolgte die komplette Leberentnahme und Segmentierung der einzelnen Ablationsläsionen auf Höhe des größten Querdurchmessers. Die Anfertigung von Dünnschnittpräparaten dieser Ablationen mit Hilfe eines Kryostats sowie die darauffolgende histologische Färbung mit Hämatoxylin-Eosin und Nicotinamidadenindinukleotid waren für eine mikroskopische Analyse und statistische Bearbeitung notwendig (Abbildung 9).

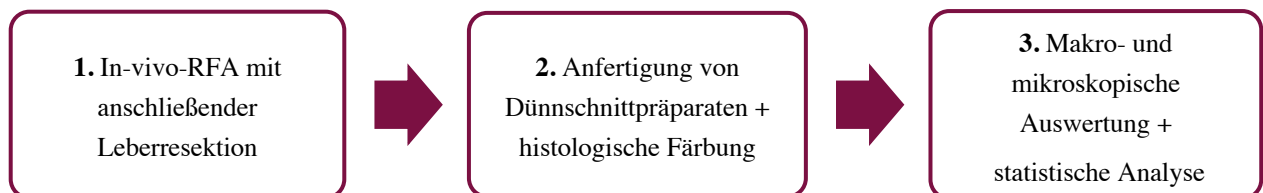


Abbildung 9 Versuchsplan. Die Versuchsdurchführung wurde in drei Abschnitte eingeteilt. Auf die RFA in Schweinelebern folgte die histologische Aufarbeitung der Ablationen. An die makro- und mikroskopische Beurteilung schloss sich die statistische Analyse an.

2.2 Versuchstiere

Für das Versuchsvorhaben wurden ausschließlich weibliche Hausschweine (Kreuzung der Rassen Pietrain und Topigs) von einem Zuchtbetrieb bezogen. Die Tiere befanden sich vor Versuchsstart zur Akklimation mindestens zehn Tage in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin, Campus Virchow-Klinikum, Charité Universitätsklinikum Berlin (Zertifizierungsnummer ISO 9001:2015). Die Tiere wurden in einem Stall isoliert und standen unter kontinuierlicher tierärztlicher und pflegerischer Beobachtung. Ein Tag-Nacht-Rhythmus von zwölf Stunden, eine Raumtemperatur von 15 – 24 °C und eine gleichbleibende Ernährung wurden eingehalten. Die Tiere waren vor Narkosebeginn nüchtern. Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Tierversuchsantragsnummer G0281/12) und in einem Tieroperationssaal der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt. Die gesetzlichen Richtlinien für Tierversuche (Deutsches Tierschutzgesetz, EU Richtlinien 2010/63/EU, FELASA) wurden eingehalten.

2.3 Versuchsreihen

Insgesamt wurden drei Versuchsreihen geplant. Auf Basis von vorausgegangenen RFA-Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit einem Applikatorabstand von 20 mm wurde für alle Versuchsreihen eine Leistung von 90 W und eine Energiezufuhr von 50 kJ festgelegt (115, 130, 131). Ziel sollten homogene Ablationen sein (103, 130).

Da die Ablationsform und -größe einerseits durch eine Gefäßokklusion (Pringle-Manöver), andererseits durch den Effekt einer Abstandsveränderung zwischen den Applikatoren beeinflusst werden können, wurden drei Versuchsreihen geplant (Abbildung 10) (90, 98):

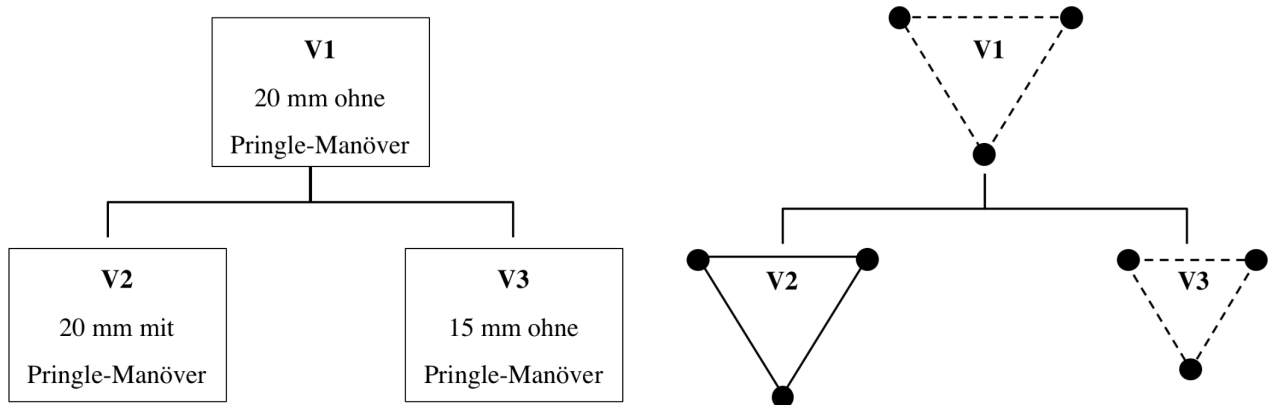


Abbildung 10 Übersicht der drei Versuchsreihen. V = Versuchsreihe, -- = kontinuierlicher Gefäßfluss, - = Pringle-Manöver / kein kontinuierlicher Gefäßfluss. Die Millimeterangaben beziehen sich hierbei auf den Abstand zwischen den einzelnen RF-Applikatoren.

- V1:** Applikatorabstand von 20 mm, kein Pringle-Manöver / kontinuierlicher Gefäßfluss
- V2:** Applikatorabstand von 20 mm, vollständige Okklusion des Gefäßflusses durch ein Pringle-Manöver mit dem Ziel jegliche Kühleffekte zu unterbinden und die Ablationsfläche zu vergrößern
- V3:** Applikatorabstand von 15 mm, kein Pringle-Manöver / kontinuierlicher Gefäßfluss mit dem Ziel durch den reduzierten Applikatorabstand eine höhere Energiedichte innerhalb des Ablationsareals zu erreichen und dadurch Kühleffekte zu verringern

Für alle Versuchsreihen wurden acht Ablationen ($n = 8$) geplant. Es wurden möglichst viele Ablationen pro Versuchstier durchgeführt.

2.4 Ablationssystem

Für die Versuche wurde das RF-Therapiesystem CelonSurgical (Olympus Surgical Technologies Europe, Hamburg, Deutschland) verwendet, welches sich aus dem Steuergerät CelonLabPOWER, der Peristaltikpumpe CelonAquaflow III und den RF-Applikatoren CelonProSurge zusammensetzt (Abbildung 11) (61).

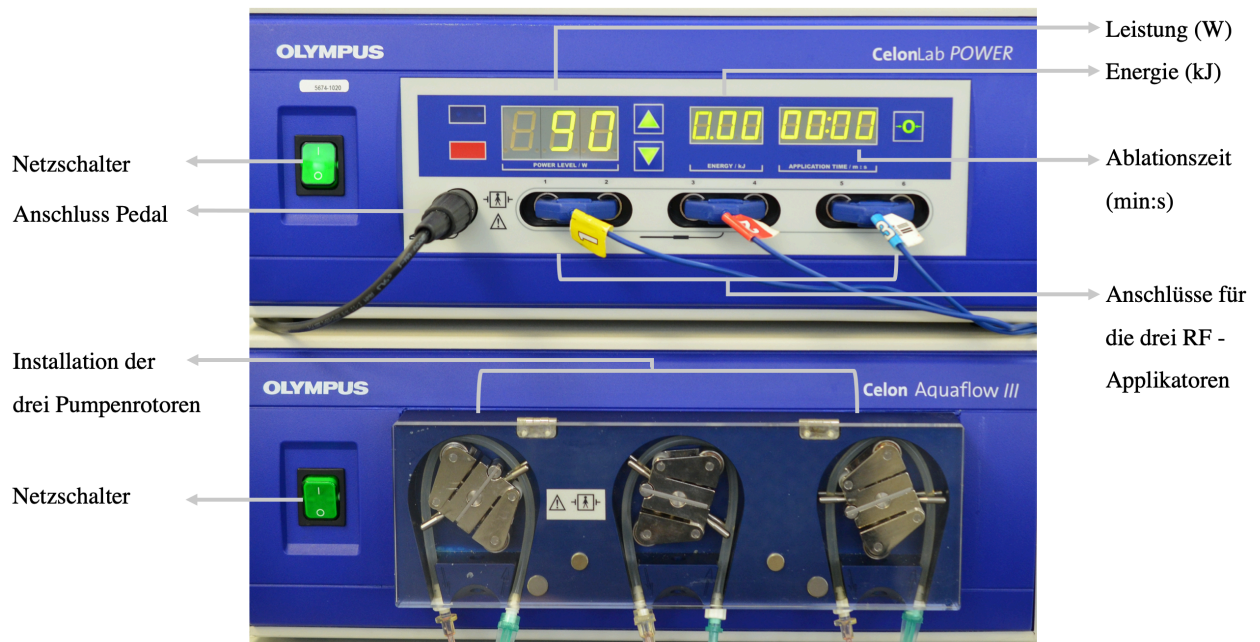


Abbildung 11 Das multipolare RFA-Generatorsystem CelonLab POWER. Insgesamt können drei multipolare RF-Applikatoren an die drei dazugehörigen Pumpenrotoren der Peristaltikpumpe CelonAquaflow III angeschlossen werden. Leistung (W), Energie (kJ) und Ablationszeit (min:s) werden vom RFA-Generatorsystem angezeigt.

Das Leistungssteuerungsgerät kann eine maximale Leistung von 250 W und Wechselstrom bis zu einer Frequenz von 470 kHz abgeben. Es ist manuell durch zwei Netzschalter bedienbar. Zudem können Ablationen mit einem Pedal begonnen und beendet werden. Je nach Anwendung werden zwischen ein bis drei Applikatoren eingesetzt. Radiofrequenzablationen können somit entweder im bipolaren oder multipolaren Modus durchgeführt werden. Da der Strom ausschließlich zwischen den im Gewebe eingebrachten Applikatoren fließt, kann bei allen Applikationsmodi auf eine Neutralelektrode verzichtet werden (siehe 1.4.2). Für die vorliegenden Versuche wurden drei CelonProSurge RF-Applikatoren (Typ 150 – T30 = Schaftlänge 150 mm, Elektrodenlänge 30 mm) mit einem Durchmesser von 1,8 mm verwendet. Jeder dieser Applikatoren verfügt über zwei Elektroden, die über einen Isolator voneinander getrennt sind (Abbildung 12).

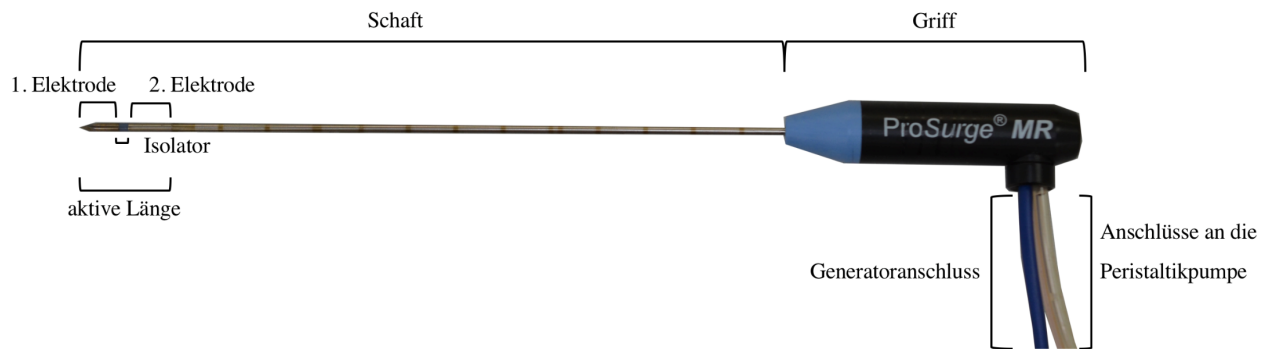


Abbildung 12 Einer von drei simultan verwendeten RF-Applikatoren. Der blaue Schlauch dient dem Anschluss an den RFA-Generator, die zwei durchsichtigen Schläuche dem Anschluss an die Peristaltikpumpe CelonAquaflow III. An der Schaftspitze sind zwei Elektroden angebracht, welche durch einen Isolator voneinander getrennt sind (vergleiche Abbildung 1b). Die zwei Elektroden bilden zusammen mit dem Isolator die aktive Länge des RF-Applikators.

Bei drei Applikatoren, die jeweils zwei Elektroden enthalten, sind 15 verschiedene Elektrodenpaarungen möglich (siehe 1.4.2). Der Generator passt die Energieabgabe je nach Gewebeimpedanz zwischen den Elektroden an und kann hierdurch die Leistungsabgabe optimieren und die Behandlungsdauer minimieren (auch „resistance controlled automatic power“ (RCAP) genannt) (61). Die Ablation wird automatisch beendet sobald die maximale Impedanz von über 500 Ω aller Elektrodenkombinationen bei dem jeweiligen Aktivieren dreimal überschritten wurde. Die Ablationsdauer und die eingebrachte Energie sind während der RFA am Generator ablesbar (Abbildung 11). Zusätzlich können Parameter wie die Impedanz (Ω) und die Temperatur ($^{\circ}\text{C}$) mit Hilfe einer speziellen Software (MultiMES 3.1, MultiMES®, Greding, Deutschland) aufgezeichnet werden. Die Peristaltikpumpe CelonAquaflow III enthält drei Pumpenrotoren, in die je ein Kühlschlauch eingebracht werden kann (Abbildung 11). Ein im Schaft der Applikatoren enthaltenes Kühlrohr ermöglicht einen in sich geschlossenen Kühlkreislauf bis hin zur Applikatortspitze und von dort zurück zum proximalen Ende des Applikatorschaftes. Durch die interne Kühlung mit isotoner Kochsalzlösung kann eine zu starke Erhitzung um die Applikatortspitze herum verhindert werden. Die interne Flussgeschwindigkeit der Kühlflüssigkeit beträgt konstant 30 ml/min (61).

2.5 Versuchsdurchführung

2.5.1 Anästhesie

Die Prämedikation erfolgte durch die intramuskuläre (i.m.) Injektion von Ketamin (24 mg/kg, Ursotamin®, 100 mg/ml, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und Azaperon (180 mg/Tier, Stresnil®, 40 mg/ml, Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) sowie

einer separaten i.m.-Gabe von Atropin (0,01 mg/kg, Atropinsulfat, 0,5 mg/ml, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Xylazin (2,7 mg/kg, Xylavet, 20 mg/ml, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland) in die Nackenmuskulatur um die Sedierung einzuleiten. Die Dosierung erfolgte in Abhängigkeit vom Körpergewicht der Versuchstiere. Die Gabe von Azaperon wurde alle vier Stunden wiederholt. Für die Anlage zweier peripherer Venenkatheter wurden die Venen am Ohr der Tiere punktiert. Hierüber konnte die Dauernarkose intravenös (i.v.) mit Ketamin (2 ml i.v./20 min, Ursotamin®, 100 mg/ml, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und Xylazin (0,7 ml i.v./20 min, Xylavet 20 mg/ml, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland) über einen Perfusor verabreicht werden. Über den zweiten Zugang erhielten die Tiere zur Kreislaufstabilisation im Wechsel je einen Liter Sterofundin (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Ringer-Infusionslösung (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Die Anlage eines Blasenkateters ermöglichte eine kontinuierliche Flüssigkeitsbilanzierung. Zur Analgesierung und weiteren Sedierung wurde Fentanyl (1 – 3 µg/kg i.v. und i.m. parallel, Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland) und gegebenenfalls additiv Propofol (2 – 4 ml als Bolusinjektion, 1 %, 10 mg/1 ml, MCT Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) verabreicht. Die Kontrolle der Vitalparameter erfolgte über die Dauer des gesamten Versuches durch ein Pulsoxymeter.

2.5.2 Laparotomie und Radiofrequenzablation

Die Versuchstiere wurden mit Hilfe eines Laryngoskopes und Endotrachealtubus im Tieroperatonsaal intubiert. Eine kontrollierte Atmung wurde mit einem Beatmungsgerät (Dräger Servo Ventilator, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) sichergestellt. Die Öffnung der Bauchdecke erfolgte durch eine Oberbauch-Medianlaparotomie mittels Elektrokauterisation. Zwei ca. 10 cm lange beidseitige Rippenbogenrandschnitte vom Xiphoid bis zur vorderen Axillarlinie waren für eine vollständige Darstellung der Leber erforderlich. Das Ligamentum hepatoduodenale wurde bei Durchführung eines Pringle-Manövers nur für das Ablationsintervall abgeklemmt und anschließend wieder freigegeben.

Die RFA-Versuche wurden offen chirurgisch durchgeführt, um einerseits eine optimale Applikatorpositionierung in der Leber unter visueller Kontrolle sicherzustellen und um andererseits das Zentrum des jeweiligen Ablationsareals um einen RF-Applikator herum zu markieren. Für Letzteres wurden die Applikatorschäfte mit Hülsen überzogen, die nach einer RFA auf die Höhe des Isolators vorgeschoben wurden. Durch eine Positionierungsschablone mit Punktionskanälen im

Abstand von 15 mm, 20 mm und 30 mm wurde ein standardisierter Applikatorabstand zwischen den RF-Applikatoren eingehalten (Abbildung 13).

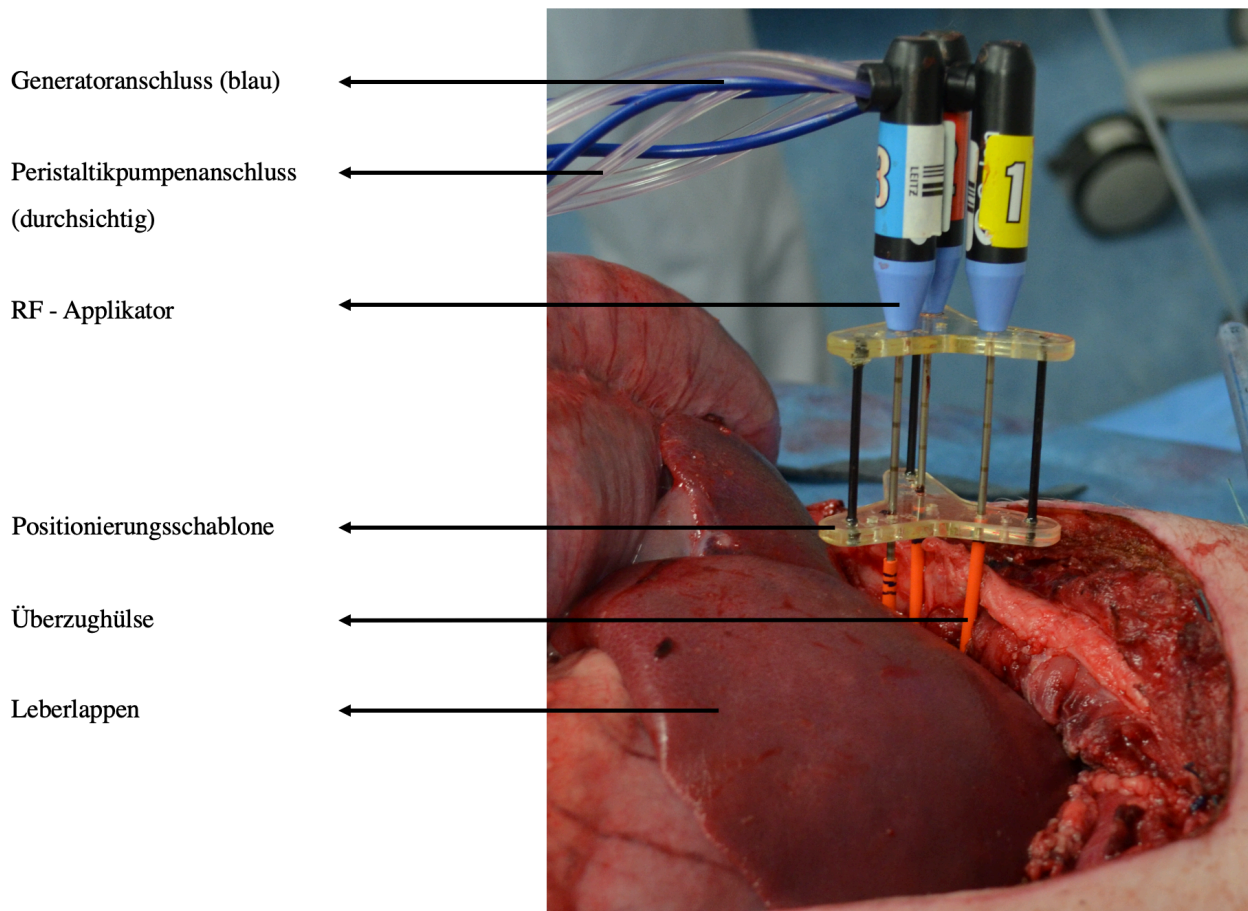


Abbildung 13 Positionierung der drei RF-Applikatoren mit Hilfe der Schablone in der Schweineleber unter CT-gestützter Kontrolle. Der Applikatorabstand konnte je nach Wahl des Punktionskanals zwischen 15 mm, 20 mm und 30 mm variieren. Überzughülsen (orange) markierten die Einstichstellen der RF-Applikatoren.

Vor den jeweiligen Ablationen erfolgte die Lagekontrolle der RF-Applikatoren durch eine Multi-detektor-CT (Aquilion PRIME, Toshiba Medical Systems Corporation, Ōtawara, Japan). Alle Tiere erhielten zusätzlich Pancuronium (0,11 – 0,12 mg/kg alle 45 min, 4 mg/2 ml, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) um einen kurzzeitigen Atemstillstand zu erzielen. Mögliche Bewegungsartefakte in der Bildgebung konnten hiermit unterdrückt werden. Die Kontrastmittelgabe (Imeron Bracco Imaging GmbH, Konstanz, Deutschland) erfolgte i.v. über einen dritten peripheren Venenkatheter. Abschließend wurde nach jeder Ablation erneut eine kontrastmittelverstärkte CT-Darstellung der Leber durchgeführt, um die Ablationsausdehnung zu erfassen (Abbildung 14). Dadurch konnte zusätzlich einer Überlappung der darauffolgenden Ablationen in benachbarten Lebersegmenten vorgebeugt werden.

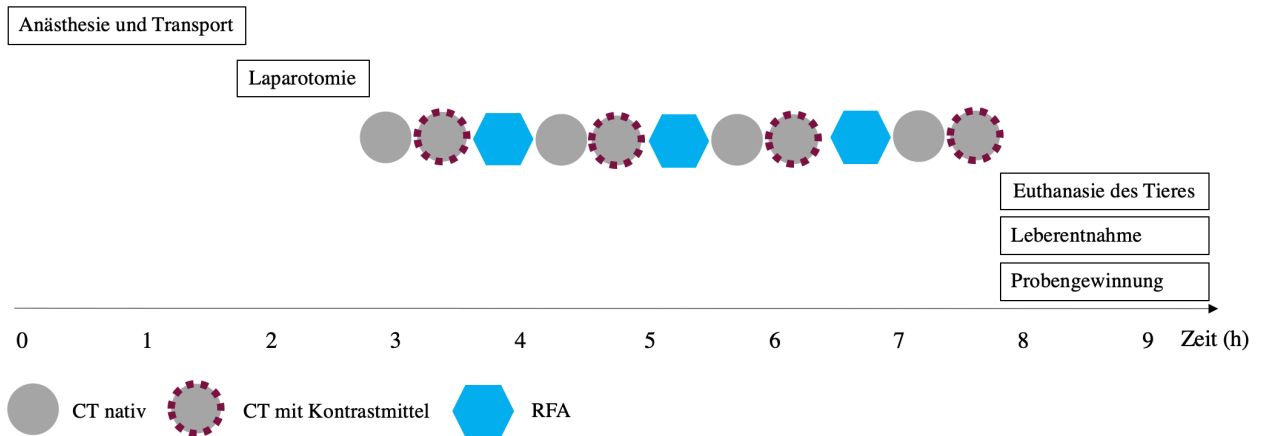


Abbildung 14 Zeitlicher Ablauf des In-vivo-Großtierversuches. Anästhesie, Transport und die Medianlaparotomie nahmen die ersten drei Stunden der Versuchsdurchführung ein. Zur Planung der Ablationen erfolgten CT-Aufnahmen mit und ohne Kontrastmittel jeweils vor und nach der Durchführung einer multipolaren RFA. Im Anschluss wurde die Leber nach Euthanasie des Tieres zur weiteren makroskopischen und histologischen Beurteilung der Ablationen reseziert. Insgesamt musste mit einem zeitlichen Aufwand von ca. neun Stunden gerechnet werden.

2.5.3 Leberentnahme und Probengewinnung

Vor der Leberentnahme wurden die narkotisierten Tiere mit einer i.v. Injektion mit T61 (4 – 6 mg pro 50 kg, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) euthanasiert. Unmittelbar nach Feststellung des Kreislaufstillstandes wurde die gesamte Leber entnommen. Nach Identifizierung der einzelnen Ablationen wurden diese großflächig reseziert. Anschließend folgte die Halbierung der Ablationen in einer speziell entwickelten Zielvorrichtung auf Höhe der Applikatorisolatoren. Ziel war es, den größten Querdurchmesser der Ablation zu ermitteln (Abbildung 15).

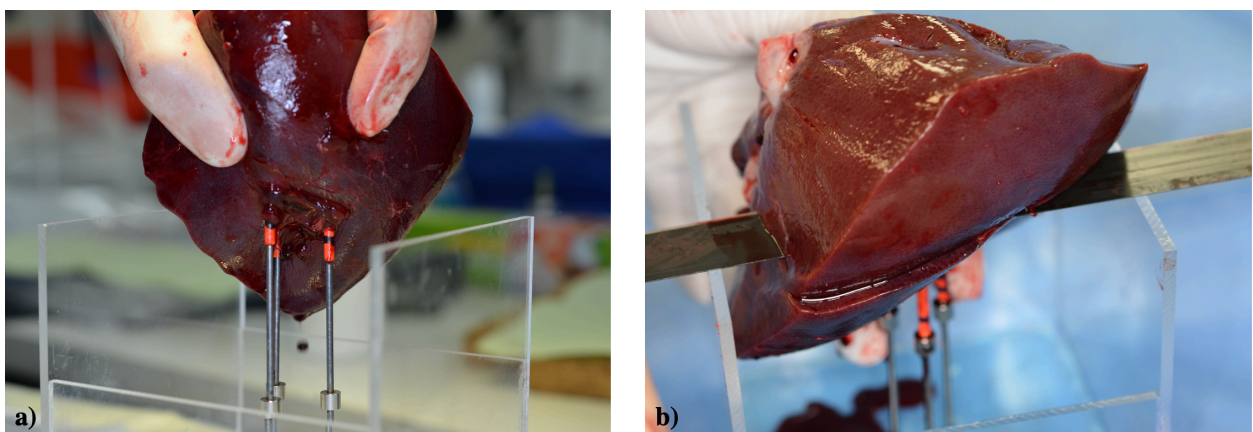


Abbildung 15 a) Platzierung des ablatierten Lebersegments in einer speziell konstruierten Zielvorrichtung. Die Spitzen der Überzughülsen (orange) markierten das Zentrum der Ablation. **b)** Halbierung der Ablation in orthogonaler Schnittführung. Auf Höhe der Applikatorisolatoren wurde der größtmögliche Querdurchmesser erwartet.

Um vitales Lebergewebe deutlicher von avitalem Lebergewebe unterscheiden zu können, wurden die Ablationshälften anschließend mit 2, 3, 5- Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, 2,0 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Hierfür wurden 6 g TTC in 300 ml Phosphatpuffer aufgelöst. In dieser Lösung wurden die Ablationshälften für 15 Minuten bei 37 °C licht- und luftdicht in einem Brutschrank inkubiert (132). In mitotisch aktivem Gewebe wird das farblose TTC zum roten 1, 3, 5- Triphenylformazan reduziert. Apoptotisches Gewebe bleibt folglich farblos. Jede Ablation wurde anschließend neben Millimeterpapier mit einer Spiegelreflexkamera (Modell D5100, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) fotografiert (Abbildung 16).

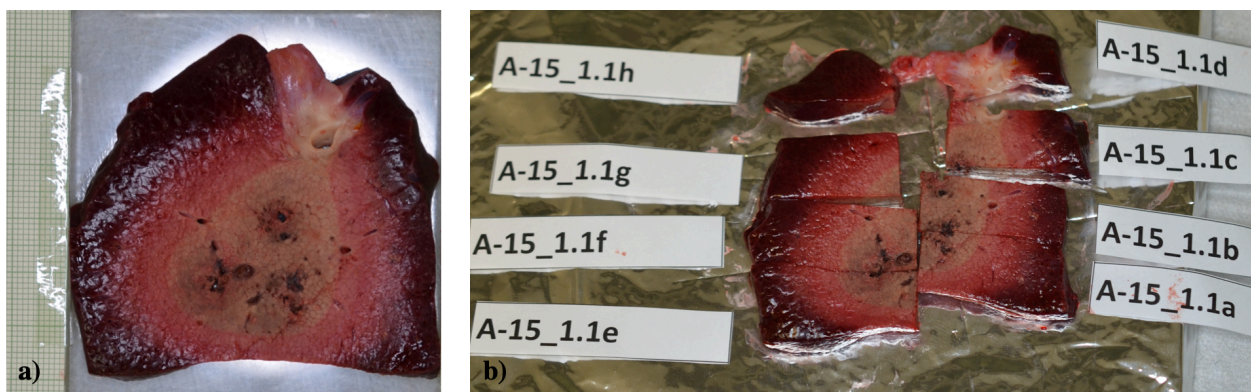


Abbildung 16 Exemplarische fotografische Dokumentation einer Ablation (Applikatorabstand von 20 mm mit Pringle-Manöver, V2). **a)** Mit Hilfe des Millimeterpapiers konnte später eine präzise Bildkalibrierung für die quantitative Flächenauswertung erfolgen. **b)** Die Ablation wurde in mehrere kleine Blöcke segmentiert, um im späteren Verlauf eine histologische Aufarbeitung der gesamten Ablation zu ermöglichen.

Die Größe eines Standardobjektträgers beträgt 25,0 x 75,0 x 1,0 mm. Die Ablationen wurden daher in mehrere kleine, passende Blöcke zerteilt, um eine histologische Auswertung zu gewährleisten (Abbildung 16b). Anschließend wurden die einzelnen Blöcke in flüssigem Stickstoff eingebettet und zusätzlich mit TissueTek® (Sakura Color Products Corporation, Osaka, Japan) fixiert. Zur Erhaltung des Gewebes blieben alle Blöcke bis zur weiteren histologischen Aufarbeitung bei -80 °C tiefgefroren.

2.6 Histologische Aufarbeitung

2.6.1 Histologische Dünnschnittanfertigung

Für die mikroskopische Beurteilung der Radiofrequenzablationen wurden Dünnschnittpräparate der tiefgefrorenen Ablationsblöcke angefertigt. Hierfür wurde ein Kryostat (CryoStar™ NX70,

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) verwendet. Das in der Kühlkammer des Kryostatgehäuses integrierte Mikrotom stellte die Anfertigung gleichmäßig großer Schnitte sicher. Die initial -80 °C kalten Blöcke wurden zur Akklimatisation bei -20 °C für 30 Minuten im Kryostat platziert. Anschließend folgte die Entfernung der Proben aus den Einbettformen und deren Befestigung am Probenhalter durch Tissue-Tek® (Abbildung 17).

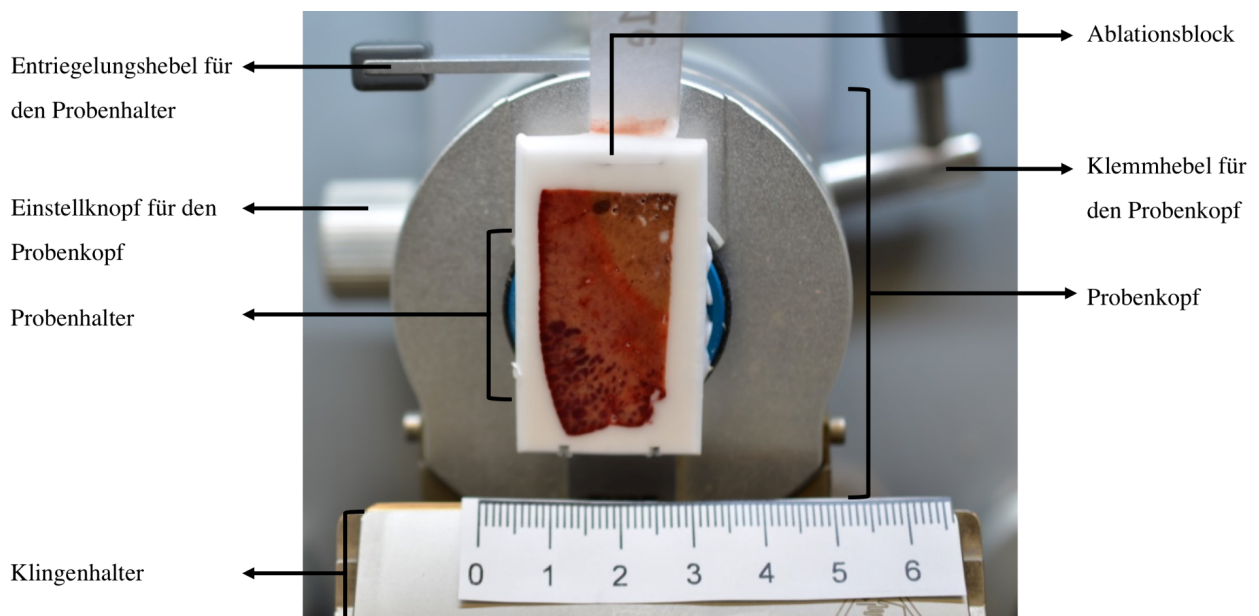


Abbildung 17 Fixierung eines tiefgefrorenen Ablationsblockes am Probenhalter (hellblau) mit Tissue-Tek®. Um eine gerade Schnittführung des Ablationsblockes zu gewährleisten, konnte der Probenkopf in der X- und Y-Achse mit Hilfe eines Einstellknopfes adjustiert werden.

Bei -12 °C wurden die einzelnen Ablationsblöcke zwischen 6 und 8 μm dünn geschnitten und auf 25,0 x 75,0 x 1,0 mm große Standardobjektträger (Thermo Scientific Menzel Gläser Superfrost Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte für 24 Stunden bei Raumtemperatur unter einem Abzug getrocknet. Die Präparate wurden im Folgenden zur histologischen Evaluation eingefärbt.

2.6.2 Histologische Färbung

Zur Beurteilung der Zellarchitektur wurde die histologische Standardfärbung mit HE verwendet (siehe 1.5.3). Dafür wurde folgendes Protokoll eingesetzt (Tabelle 1):

Tabelle 1 Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Insgesamt gliederte sich der Färbeprozess in sieben Schritte.

Teilschritt	Zeit (s)
1. Platzierung der Objektträger in Hämalaun	90
2. Abspülen unter fließendem Leitungswasser	90
3. Gegenfärbung mit Eosin	60
4. Abspülen mit destilliertem Wasser	1 – 2
5. Anschließend kurzes Abspülen in 70%igem Ethanol (EtOH) und 96%igem EtOH	1 – 2
6. Erneute Platzierung der Objektträger in 70%igem EtOH	45
7. Fixierung der Objektträger mittels Roti (Xylolersatz)	75

Die gefärbten Objektträger wurden zum Trocknen für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur unter einen Abzug gestellt und abschließend mit Deckgläsern (24 x 50 mm, Dicke: 0,13 – 0,16 mm, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) und Roti®-Histokitt II (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Um Aussagen über die Vitalität des zuvor abladierten Leberareals machen zu können, wurde die NADH-Vitalfärbung verwendet (siehe 1.5.3). Die Färbung erfolgte in einer Feuchtkammer nach folgendem Färbeschema (Tabelle 2):

Tabelle 2 Färbeprotokoll der Nicotinamidadenindinukleotid-Färbung. Insgesamt gliederte sich der Färbeprozess in acht Schritte.

Teilschritt	Zeit (min)
1. Vermengung von 333,3 μ l NADH mit 333,3 μ l phosphatgepufferter Salzlösung	
2. Vermengung von 833,3 μ l NTB mit 166,6 μ l Ringerlösung	
3. Zusammenführen beider Ansätze in einem 5 ml Eppendorfgefäß	
4. Pipettieren von 100 μ l des Gemisches aus Schritt drei auf den jeweiligen Objektträger	
5. Inkubation des Objektträgers in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur	15
6. Abspülen des Objektträgers mit destilliertem Wasser	1
7. Trocknen bei Raumtemperatur	1440
8. Fixieren mit Deckgläsern (24 x 50 mm, Dicke: 0,13 – 0,16 mm, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) und Aquatex (Merck KG, Darmstadt, Deutschland)	

2.7 Methodische Auswertung

2.7.1 Rekonstruktion der Ablationen

Alle Objektträger wurden für eine digitale Auswertung mit einem speziellen Hochauflösungsscanner (Nikon SupercoolScan 5000 ED, Nikon Corporation, Tokyo, Japan; optische Auflösung:

4000 dpi, Farbtiefe: 16 bit, Scandauer 38 s) eingescannt. Anschließend erfolgte die Ablationsrekonstruktion orientierend am Ablationsrand mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Photoshop, Version 19.0, Adobe Systems Incorporated, San José, USA). Ein direkter qualitativer und quantitativer Vergleich zwischen den makroskopischen und histologischen Ablationen konnte so durchgeführt werden.

2.7.2 Qualitative Ablationsbeurteilung

Der Fokus der qualitativen Beurteilung der Ablationen richtete sich auf die Ablationsform. Durch die Anwendung einer multipolaren RFA mit drei Applikatoren können drei Geometrien entstehen. Jede makroskopische und histologische Ablationsform wurde qualitativ beurteilt und einer dieser drei Gruppen zugeordnet (Abbildung 18):

- **I** = eine einzelne, runde, homogene, konfluierende Ablation
- **II** = zwei einzelne, partiell konfluierende, inhomogene Ablationen
- **III** = drei einzelne, nicht-konfluierende, inhomogene Ablationen

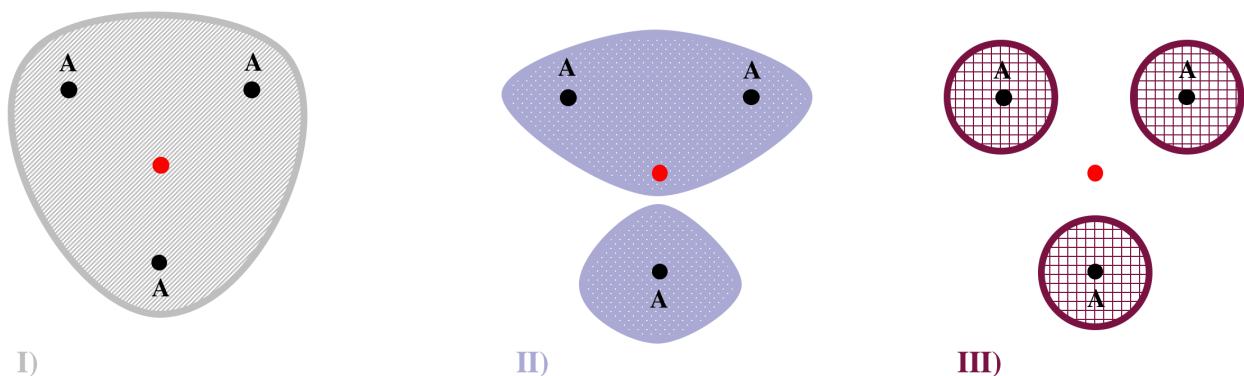


Abbildung 18 Mögliche Ablationsformen der multipolaren RFA. Ablationsmittelpunkt (rot). A = Applikator. **I**) Homogene, vollständig konfluierende Ablation. **II**) Nur zum Teil konfluierende Ablation. **III**) Drei einzelne, nicht-konfluierende Ablation.

2.7.3 Flächenauswertung

Die quantitative Analyse aller Ablationen wurde mit dem oben genannten Bildbearbeitungsprogramm durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die makroskopischen Bilder anhand des mitfotografierten Millimeterpapiers kalibriert. Für die histologischen Schnitte wurden die Kalibrierungsangaben des Hochauflösungsscanners herangezogen (1 mm = 157 px). Anschließend erfolgte die separate Flächenvermessung der Ablationszonen. Dafür wurde orientierend an der Farbabstufung

des Leberparenchyms (Makroskopie) / dem NADH-Färbungsgrad (Histologie) (siehe 1.5.2, 1.5.3) die jeweilige Ablationszone (WZ / RZ) manuell umfahren. Die vom Bildbearbeitungsprogramm errechneten Flächenwerte wurden in einer Tabelle dokumentiert. Abschließend erfolgte die Berechnung der Gesamtfläche (WZ + RZ) für jede makroskopische und histologische Ablation.

2.7.4 Erstellung einer Idealläsion

Um mögliche aufgetretene Kühleffekte numerisch erfassen zu können, war die Erstellung einer sogenannten Idealläsion notwendig. Hierbei handelt es sich um eine hypothetisch perfekte Ablation, in welcher das Lebergewebe vollständig destruiert ist und kein Kühleffekt auftritt. Ein solcher Bereich innerhalb einer Ablation wird ausschließlich in der WZ erwartet. Pro Versuchsreihe wurde eine Idealläsion berechnet. Hierfür erfolgte zuerst die Bestimmung der Applikatoreinstichstellen und des geometrischen Mittelpunktes aller makroskopischen Ablationen. Anschließend wurde mit Hilfe eines Gradkreises ausgehend vom Mittelpunkt alle 20° der Radius der WZ gemessen, um die größtmögliche Ausdehnung der Ablation (R_{\max}) zu bestimmen (Abbildung 19a).

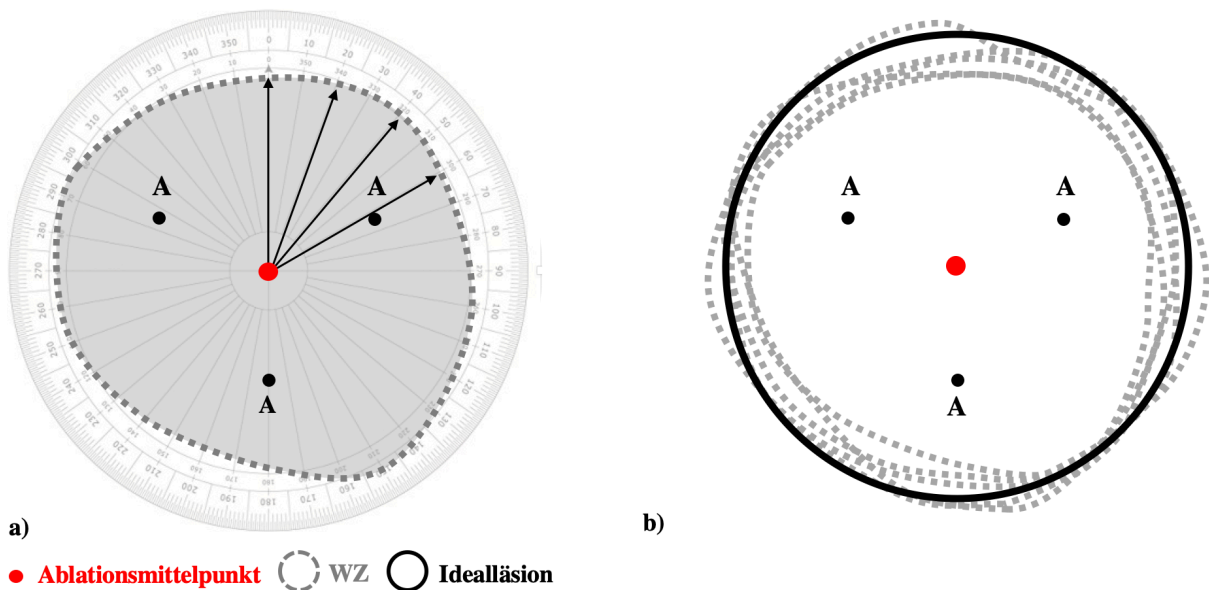


Abbildung 19 Erstellung der Idealläsion am Beispiel der Versuchsreihe 2 (Applikatorabstand von 20 mm mit Pringle-Manöver). A = Applikator. **a)** Mittels eines Gradkreises wurde ausgehend vom Ablationsmittelpunkt alle 20° der Radius der WZ bestimmt (Pfeile). **b)** Anschließend erfolgte die Erstellung einer Idealläsion (schwarz) anhand des Medianwertes aller einzeln vermessenen maximalen Radien innerhalb einer Versuchsreihe.

Der Radius einer Idealläsion ergab sich aus dem Medianwert der maximalen Radien aller Ablationen innerhalb einer Versuchsreihe. Somit konnte die Idealläsion insgesamt größer als das eigentliche Ablationsareal einer RFA sein. Rechnerisch waren vaskuläre Kühleffekte aufgrund dessen

und infolge der nicht vollständig runden Ablationsgeometrie bei der multipolaren RFA (Abbildung 2, Abbildung 18) auch innerhalb der Idealläsion zu erwarten. Die Idealläsion wurde anschließend als Maske über die makroskopischen und histologischen Ablationen gelegt, um Kühleffekte darstellen zu können. Die Kühlfläche ergab sich aus der Differenz zwischen Idealläsion und Ablationsfläche.

2.7.5 Methodische Einteilung der Gefäße

Methoden einer histologischen Kühleffektauswertung bei der multipolaren RFA wurden in der Literatur bisher nur unzureichend beschrieben. Aus diesem Grund wurde ein eigenes System konzipiert, um alle Lebergefäße innerhalb der Idealläsion nach ihrer Art, ihrer Lokalisation und ihrem NADH-Färbungsgrad zu klassifizieren. Ziel war es, zu evaluieren, ob sowohl die Gefäßart als auch die Gefäßlokalisierung mit dem Grad der NADH-Färbung zusammenhängen. Die Bezeichnungen I, II, III dienten lediglich einer systematischen Einteilung und sollten keine Wertung darstellen (Tabelle 3).

Tabelle 3 Qualitative Beurteilung aller Gefäße innerhalb der Idealläsion nach ihrer Art (Lebervene, Portalvene und Portalarterie), Lokalisation (innerhalb der Ablationszone oder außerhalb) und dem NADH-Färbungsgrad (vital = dunkelblau, avital = farblos / braun).

Parameter	Beschriftung	Definition
Gefäßart	I	Lebervene
	II	Portalvene
	III	Portalarterie
Gefäßlokalisierung	I	WZ
	II	RZ
	III	Außerhalb der Ablationsfläche, natives Lebergewebe
NADH-Färbungsgrad	I	Es befindet sich kein vitales Gewebe um das Gefäß herum Färbungsgrad: farblos / braun
	II	Vitales als auch avitales Gewebe ist um das Gefäß herum sichtbar Färbungsgrad: sowohl farblos / braun als auch dunkelblau
	III	Das Gewebe um das Gefäß herum ist vollständig vital Färbungsgrad: dunkelblau

Um zusätzlich Aussagen über den Einfluss der Gefäße auf ihren NADH-Färbungsgrad treffen zu können, wurde der Gefäßdurchmesser jedes einzelnen Gefäßes bestimmt. Da die Auflösung der

CT meist nur eine Identifizierung von Gefäßen mit einem Gefäßdurchmesser $\geq 0,5$ mm erlaubt, wurden ausschließlich Gefäße $\geq 0,5$ mm histomorphologisch beurteilt. Damit sollte ein praxisrelevanter Bezug gewährleistet werden. Durch die willkürliche Positionierung der Applikatoren im Leberparenchym konnte zudem der Einfluss größerer und kleinerer Gefäße auf eine Ablation beurteilt werden. Die klinische Situation, bei der die Tumorlokalisation eine erhebliche Heterogenität aufweist, wurde somit imitiert.

2.7.6 Methodische Auswertung innerhalb der Idealläsion

Zur Beurteilung des Einflusses einzelner Gefäße auf den Ablationsradius wurde der Abstand jedes Gefäßes zum Ablationsmittelpunkt vermessen. Ziel war die Bestimmung des Ablationsradius, innerhalb dem es zu einem vollständigen Untergang der Gefäße und des perivaskulären Lebergewebes kam (Abbildung 20).

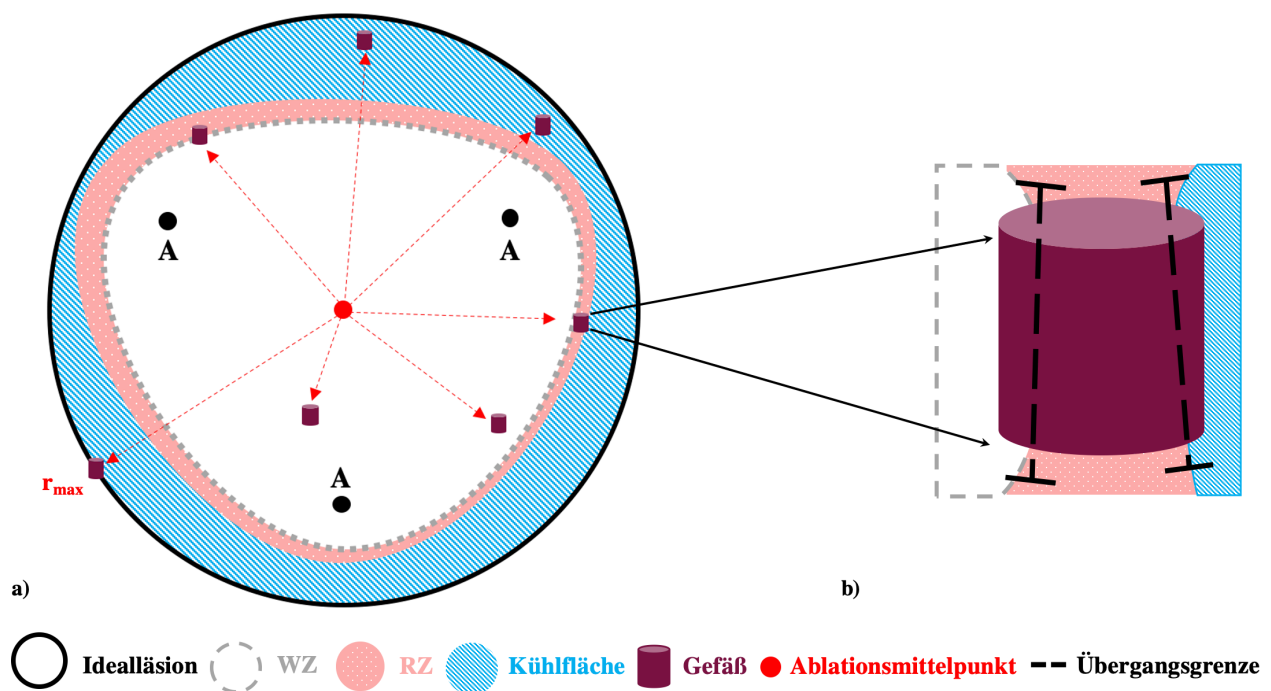


Abbildung 20 Methodische Auswertung innerhalb der Idealläsion. A = Applikator. **a)** Nach Identifizierung der Gefäße wurde deren Durchmesser bestimmt (siehe 2.7.5). Anschließend erfolgte die Vermessung des Abstandes aller Gefäße zum geometrischen Mittelpunkt (rote Pfeile). **b)** Um zonenüberschreitenden Gefäßen eine Lokalisation (WZ, RZ, außerhalb der Ablationsfläche; Tabelle 3) zuzuordnen, wurden zunächst die Übergangsgrenzen zu den jeweiligen Zonen markiert (gestrichelt schwarz). Das Gefäß wurde der Zone mit seinem prozentual größten Flächenanteil zugeordnet (in diesem Beispiel folglich also zur RZ).

Mit Hilfe des NADH-Färbungsgrades und einer zusätzlichen Untersuchung der Gefäßwand konnte eine Beurteilung aller Gefäße innerhalb der Idealläsion erfolgen (Tabelle 4):

Tabelle 4 Kriterien einer vollständigen / unvollständigen Ablation eines Gefäßes. Hierfür erfolgte die Beurteilung des NADH-Färbungsgrades des Gefäßes und des perivaskulären Leberparenchyms sowie eine zusätzliche Untersuchung der Gefäßwand.

	NADH-Färbungsgrad des Gefäßes / des perivaskulären Leberparenchyms	Gefäßwand / Endothelzellschicht
Vollständige Ablation	Fehlende Farbaufnahme <u>Färbungsgrad:</u> farblos / braun	<u>Schädigung des Schichtaufbaus:</u> Kontinuitätsunterbrechung / Auflösung / Absenz
Unvollständige Ablation	1. Partielle Farbaufnahme <u>Färbungsgrad:</u> farblos / braun + dunkelblau 2. Vollständige Farbaufnahme <u>Färbungsgrad:</u> dunkelblau	intakt

Die maximale Distanz eines Gefäßes zum Ablationsmittelpunkt war der Rand der Idealläsion (R_{max}). Befand sich ein Gefäß innerhalb des Ablationsmittelpunktes betrug die Distanz 0 mm. Somit konnte ermittelt werden, bis zu welchem Abstand vom Ablationsmittelpunkt die Gefäße kein vitales Gewebe / eine Gefäßwandschädigung aufzeigten und ab welchem Abstand folglich von einer vollständigen Ablation ausgegangen werden konnte. Die Bestimmung des individuellen Einflusses von einzelnen Portalvenen und Portalarterien auf den Kühleffekt ist aufgrund der engen anatomischen Verhältnisse nicht möglich. Daher erfolgte die Auswertung dieser beiden Gefäßtypen innerhalb der Idealläsion zusammenfassend als „Portalfeld“. Für zonenüberschreitende Gefäße, die sowohl partiell gefärbte als auch farblose Anteile enthielten, galt ein differenziertes Einteilungssystem (Abbildung 20b). Die Zonenübergänge fungierten hierbei als Grenzscheiden. Das Gefäß wurde der Lokalisation zugeteilt, in welchem sich sein prozentualer Hauptflächenanteil befand.

2.7.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse und graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mittels Excel (Version 16.11 für Mac OS, Microsoft Corporation, Redmond, USA) und IBM SPSS Statistics (Version 25.0 für Mac OS, International Business Machines Corporation, Armonk, USA). Der Median (Minimum – Maximum) diente als Zentralwertdarstellung der einzelnen Parameter. Die Durchführung

des Shapiro-Wilk-Tests zeigte keine Normalverteilung der Daten, sodass für die weitere statistische Bearbeitung nichtparametrische Tests angewandt wurden. Für mehrere unverbundene Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test und für zwei unverbundene Stichproben der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für die Gegenüberstellung makroskopischer und histologischer Ablationen wurde der Spearmans-Rangkorrelationskoeffizient (Spearmans Rho) für nicht normalverteilte Variablen herangezogen. Die Testdurchführung erfolgte zweiseitig. Das Signifikanzniveau wurde für alle Testungen auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Versuchsübersicht

Insgesamt wurden 23 In-vivo-Radiofrequenzablationen mit einer Leistung von 90 W und einer Energiezufuhr von 50 kJ an zwölf weiblichen Hausschweinen durchgeführt. Eine Gesamtübersicht der Versuche ist Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5 Versuchsübersicht. Median (Minimum – Maximum) für Gewicht (kg) und Alter (d) der Versuchstiere, sowie Ablationszeit (min:s) pro Versuchsreihe. Die Millimeterangaben (20 mm, 15 mm) beziehen sich hierbei auf den Abstand zwischen den drei RF-Applikatoren.

	V1 (20 mm ohne Pringle-Manöver)	V2 (20 mm mit Pringle-Manöver)	V3 (15 mm ohne Pringle-Manöver)	Gesamt
Versuchszahl (n)	8	7	8	23
Gewicht der Versuchstiere (kg)	69 (62 – 71)	68 (62 – 80)	74 (68 – 80)	69 (62 – 80)
Alter der Versuchstiere (d)	154 (114 – 165)	165 (141 – 180)	163 (150 – 180)	161 (114 – 180)
Ablationszeit (min:s)	16:07 (15:08 – 22:57)	20:38 (20:02 – 21:14)	17:29 (15:46 – 21:49)	17:34 (15:08 – 22:57)

Die Tiere hatten ein medianes Gewicht von 69 kg und Alter von 161 Tagen. Die Ablationszeit der Versuchsreihe mit Pringle-Manöver (V2 / Applikatorabstand von 20 mm) war mit 20 Minuten und 38 Sekunden im Vergleich zu der Versuchsreihe ohne Pringle-Manöver (V1 / Applikatorabstand von 20 mm) um 27 % länger.

Eine kardiopulmonale Reaktion in Form einer Tachykardie konnte bei allen Versuchstieren bei Durchführung eines Pringle-Manövers beobachtet werden. Eines der zwölf Versuchstiere verstarb kurz nach Abschluss einer Lebergefäßokklusion (daher n = 7 anstatt der geplanten n = 8 bei V2, siehe 2.3) (Tabelle 5). Leichte, hämodynamisch nicht relevante Blutungen durch die Leberpunktion der RF-Applikatoren traten bei allen Versuchsreihen auf.

3.2 Makroskopie und Histologie im Vergleich

3.2.1 Ablationsform

Um die histologischen Ablationen mit der Makroskopie vergleichen zu können, erfolgte die Rekonstruktion der histologischen Schnitte zu einer vollständigen Radiofrequenzablation orientierend am Ablationsrand (siehe 2.7.1, Abbildung 16b). In der Histologie stellten sich die Ablationsformen erwartungsgemäß entsprechend ihrem makroskopischen Abbild dar (Abbildung 21).

V1 (20 mm ohne Pringle-Manöver)

V2 (20 mm mit Pringle-Manöver)

V3 (15 mm ohne Pringle-Manöver)

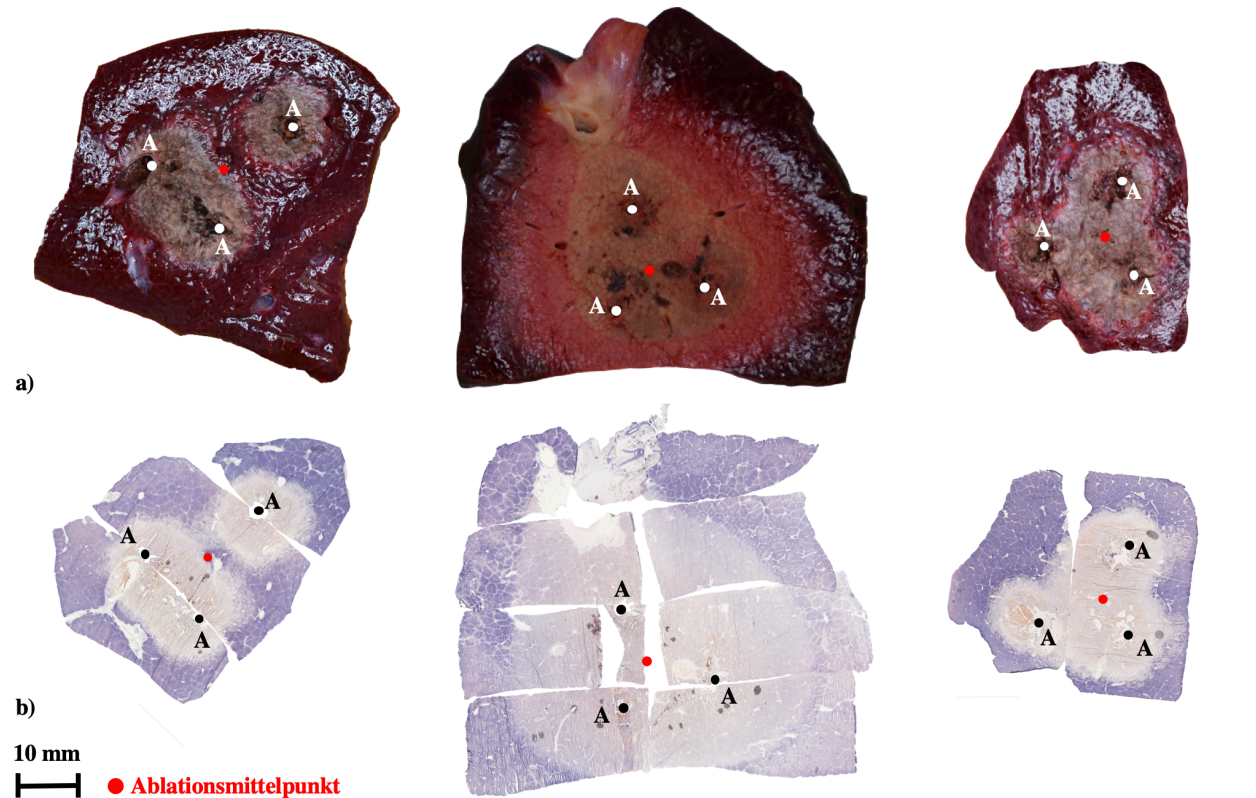
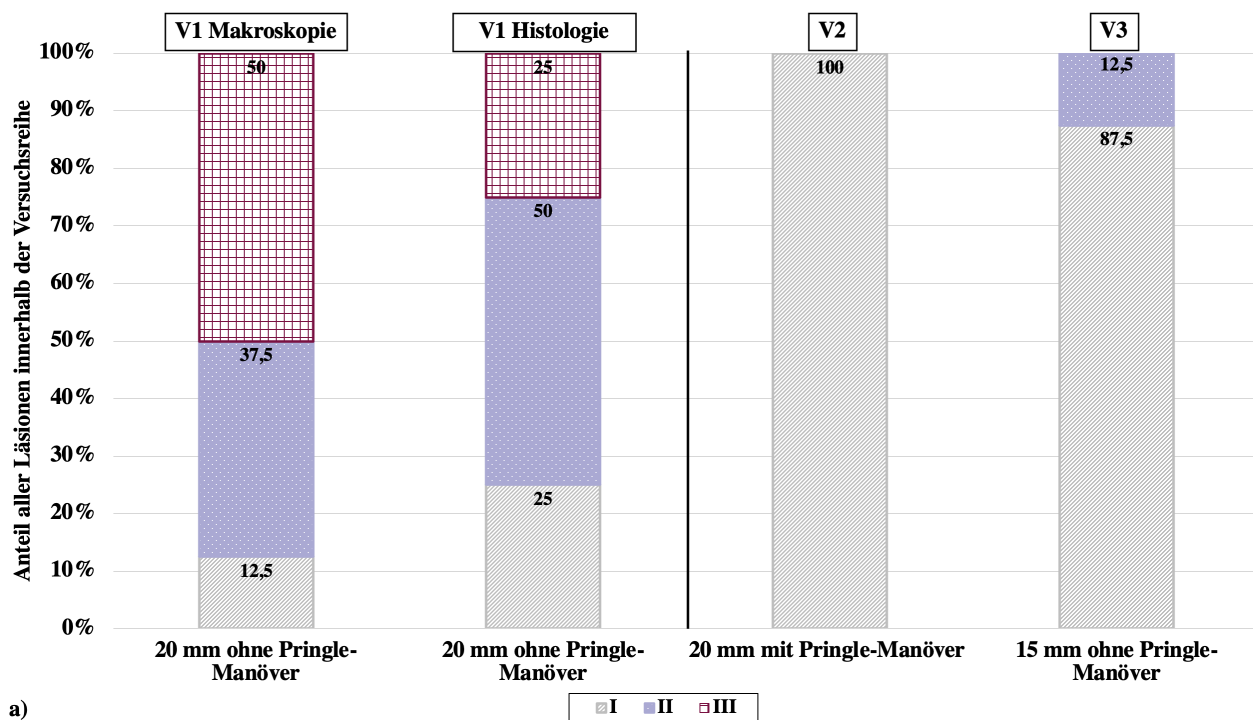
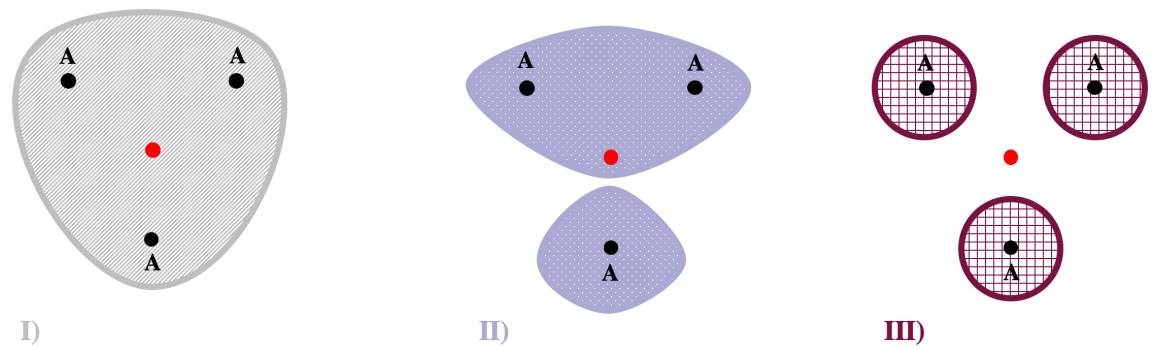


Abbildung 21 Exemplarische Gegenüberstellung aller drei Versuchsreihen in der **a)** Makroskopie und **b)** Histologie. Markiert wurden des Weiteren die Applikatoreinstichstellen (A) sowie der geometrische Ablationsmittelpunkt. Die histologischen Ablationsformen waren mit den makroskopischen Ablationsformen vergleichbar.

V1: Bei einem Applikatorabstand von 20 mm und kontinuierlicher Blutperfusion wurde eine ausgeprägte Variabilität der Geometrie beobachtet. Die unterschiedlichen Ablationsformen konnten sowohl in der Makroskopie als auch in der Histologie identifiziert werden. Makroskopisch wiesen 87,5 % der Ablationen und histologisch 75 % der Ablationen eine inhomogene Geometrie auf. Davon konfluieren 50 % in der Makroskopie und 25 % in der Histologie nicht miteinander, sodass um jeden Applikator eine einzelne Ablation entstand (Abbildung 22).



a)



b)

Abbildung 22 Einteilung der Radiofrequenzablationen nach Form. **a)** Graphische Darstellung der makroskopischen Ablationsformen nach Versuchsreihe. **b)** Ablationsformen: I = runde, homogene, konfluierende Ablation; II = inhomogene, nur zum Teil konfluierende Ablation; III = inhomogene, nicht-konfluierende, einzelne Ablationen.

Ablationsformen von V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) waren mehrheitlich inhomogen und nicht-konfluierend (II, III). Makroskopisch und histologisch waren 100 % der Ablationen mit Pringle-Manöver (V2 / Applikatorabstand von 20 mm) und 87,5 % der Ablationen von V3 (Applikatorabstand von 15 mm, Gefäßfluss) konfluierend und homogen (I).

V2: Die Ablationsformen bei einem Pringle-Manöver und einem eingehaltenen Applikatorabstand von 20 mm waren makroskopisch und histologisch alle (100 %) homogen, konfluierend und fast kreisförmig. Es traten keine Einziehungen auf.

V3: Auch bei einem Applikatorabstand von 15 mm und kontinuierlichem Gefäßfluss war der Großteil der Ablationen (87,5 %) makroskopisch und histologisch homogen und konfluierend. Nur eine Ablation (12,5 %) zeigte eine inhomogene, nicht-konfluierende Geometrie auf.

Schlussfolgerung (3.2.1)

- Makroskopische und histologische Ablationsformen stimmten innerhalb der Versuchsreihen weitgehend miteinander überein.
- Versuche mit einem Applikatorabstand von 20 mm und kontinuierlichem Gefäßfluss (V1) führten zu inhomogenen Ablationen. Die makroskopische Ablationsform war nicht immer mit der histologischen Ablationsgeometrie identisch.
- RFA unter Durchführung eines Pringle-Manövers (V2) führten immer zu konfluierenden, homogenen Ablationen.
- Durch eine Abstandsreduktion zwischen Applikatoren von 20 mm auf 15 mm (V3) konnten vermehrt konfluierende und homogene Ablationen erreicht werden.

3.2.2 Ablationszoneneinteilung

Im makroskopischen und histologischen Vergleich konnte nur in den Versuchsreihen mit Gefäßfluss (V1 / Applikatorabstand von 20 mm; V3 / Applikatorabstand von 15 mm) eine klare Einteilung in die für die RFA typischen Ablationszonen erfolgen (siehe 1.5.2). In der Makroskopie differenzierten sich die Zonen durch die unterschiedliche Farbabstufung des Lebergewebes von dunkelrot (nativ) zu hellrot (RZ) bis hin zu hellbraun (WZ). Histologisch zeigte sich ausgehend vom nativen Leberparenchym eine zur WZ zunehmende zentripetale Auflösung der Gewebearchitektur.

Natives Lebergewebe: Makroskopisch konnte natives Lebergewebe durch seine dunkelrote Farbe bestimmt werden. In nativem Leberparenchym diente in allen Versuchsreihen das Zentralvenenläppchen als histologisches Identifikationsmerkmal. Die Zentralvene und die einzelnen Bestandteile der Periportalfelder konnten identifiziert werden (siehe 1.5.1). Die Zellkerne der Hepatozyten (blau in HE, weiß in NADH) und die daran angrenzenden Sinusoide waren voneinander abgrenzbar. Ergänzend wurde enzymatisch aktives und somit intaktes Gewebe in der NADH-Färbung durch eine blaue Farbaufnahme markiert (Abbildung 23a).

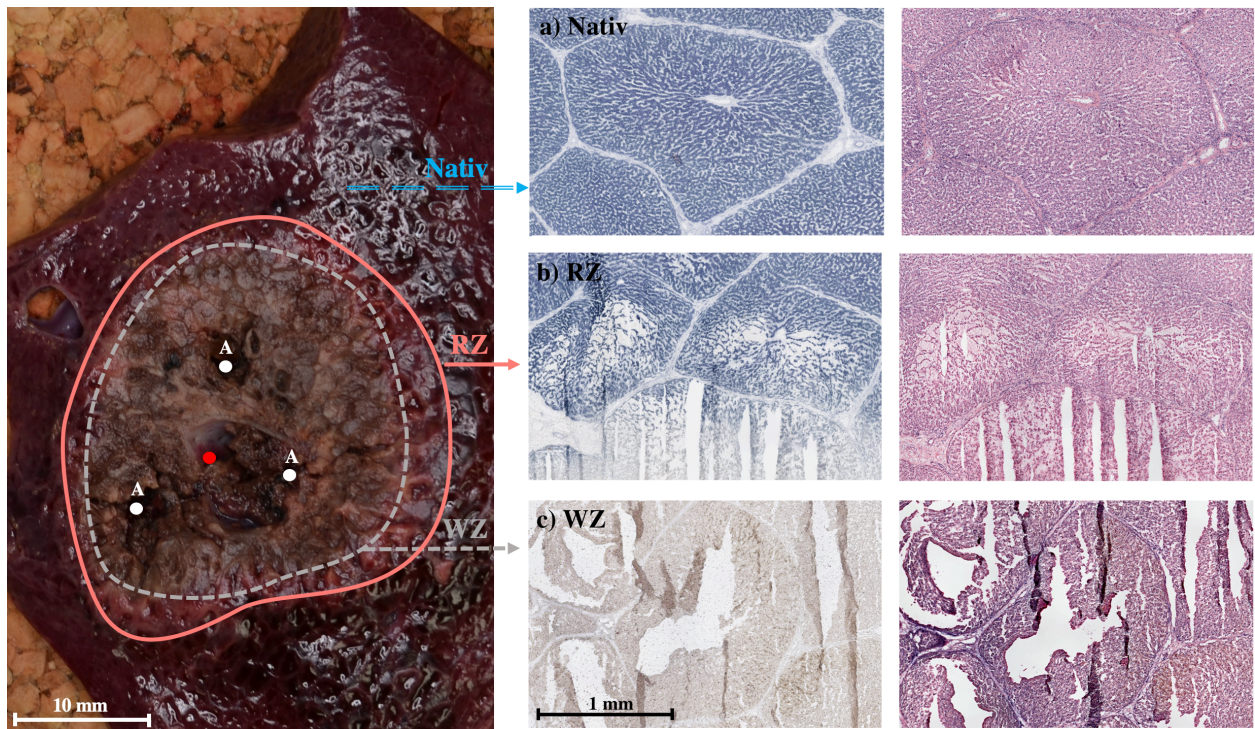


Abbildung 23 Makroskopischer (TTC-Färbung) Ablationszonenvergleich mit der Histologie (NADH und HE) einer exemplarischen V3-Ablation (Applikatorabstand von 15 mm, Gefäßfluss). A = Applikatoren. **a)** Makroskopisch stellte sich natives Lebergewebe dunkelrot dar. Histologisch konnten im nativen Lebergewebe die einzelnen Zentralvenenläppchen eindeutig identifiziert werden. **b)** In der RZ kam es histologisch zu einem verstärkten Verlust der Gewearchitektur. Sowohl in der NADH-Färbung als auch in der Makroskopie konnte in der RZ eine zunehmende Farbabstufung beobachtet werden. **c)** Makroskopisch stellte sich die WZ hellbraun dar. Die WZ war in der HE-Färbung vor allem durch den Untergang der zellulären Strukturen gekennzeichnet, in der NADH-Färbung zusätzlich durch einen vollständigen Farbverlust.

„Red Zone“ (RZ): In allen Versuchsreihen erfolgte die makroskopische Differenzierung der RZ durch die hellrote Farbe des Lebergewebes. Die Merkmale einer RZ wurden histologisch nur in den Versuchsreihen mit Gefäßfluss (V1 / Applikatorabstand von 20 mm; V3 / Applikatorabstand von 15 mm) beobachtet. Hier kam es durch die thermische Einwirkung zu einer partiellen Auflösung der zellulären Strukturen. Eine ödematöse Ausdehnung der Hepatozyten und Sinusoide war typisch. Das histologische Korrelat für den partiell eingetretenen Zelluntergang in der RZ bei der Vitalfärbung war eine unvollständige Farbaufnahme (Abbildung 23b). Bei der HE-Färbung wiesen vor allem beginnende strukturelle Deformationen der Zellbestandteile auf einen apoptotischen Effekt (siehe 1.5.3). Teilweise erhaltene Hepatozyten und bedingt intaktes Bindegewebe indizierten das Vorhandensein von vitalen Zellen in dieser Zone.

Bei Durchführung eines Pringle-Manövers (V2 / Applikatorabstand von 20 mm) wurden jedoch Abweichungen zwischen der makroskopischen und histologischen Zoneneinteilung beobachtet.

Makroskopisch konnte eindeutig eine hellrote RZ identifiziert werden. Diese grenzte sich deutlich von nativem dunkelrotem Lebergewebe und der hellbraunem / hellrosa WZ ab (Abbildung 24a).

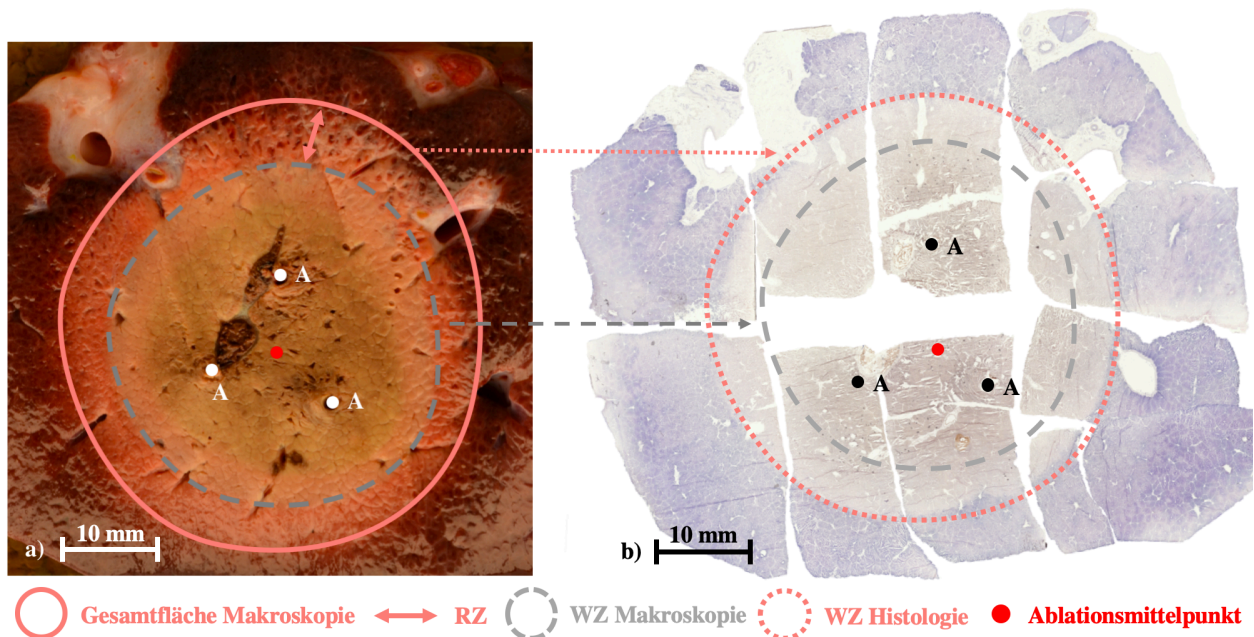


Abbildung 24 Makroskopische und histologische Gegenüberstellung einer Ablation bei Durchführung eines Pringle-Manövers (V2 / Applikatorabstand von 20 mm). A = Applikator. **a)** Makroskopisch war die Einteilung der Ablation in eine scheinbare WZ und RZ möglich. **b)** Platzierte man die makroskopisch umfahrene WZ auf den histologischen Schnitt, wurde eine klare Diskrepanz evident. Histologisch wurde anstelle der Merkmale einer RZ ein vollständiger Strukturverlust und eine fehlende NADH-Färbung nachgewiesen (WZ).

Die für die RZ beschriebenen typischen zellulären Veränderungen konnten histologisch bei V2 (Applikatorabstand von 20 mm, Pringle-Manöver) im Gegensatz zu den Versuchsreihen mit Gefäßfluss (V1 / Applikatorabstand von 20 mm; V3 / Applikatorabstand von 15 mm) nicht beobachtet werden. Anstelle einer RZ kam es in V2 histologisch zu einem vollständigen Untergang der zellulären Strukturen und einer fehlenden NADH-Farbaufnahme innerhalb des Ablationsareals. Histologisch konnte die Ablation folglich nur in eine WZ und somit in keine zusätzliche RZ eingeteilt werden (Abbildung 24b). Platzierte man die Zonenumrandung der makroskopisch umfahrenden WZ auf den histologischen Schnitt, wurde das histologisch identifizierte Ablationsareal nur unzureichend eingeschlossen. Wurde jedoch die gesamte Umrandung der makroskopisch identifizierten Ablation (WZ + RZ) auf die histologische Ablation projiziert, kam es zu einer vollständigen Überlappung (Abbildung 24b).

„White Zone“ (WZ): Durch das Erreichen von Temperaturen über 55 °C karbonisierte das Lebergewebe um die Applikatoren herum. In dieser sogenannten Karbonisationszone war von einer

vollständigen Zellzerstörung durch Nekrose auszugehen. Die Karbonisationszone nahm den zentralen Teil der WZ ein und war durch die hell- bis dunkelbraune Verfärbung des Lebergewebes vor allem in der Versuchsreihe mit Pringle-Manöver (V2 / Applikatorabstand von 20 mm) zu erkennen (Abbildung 25).

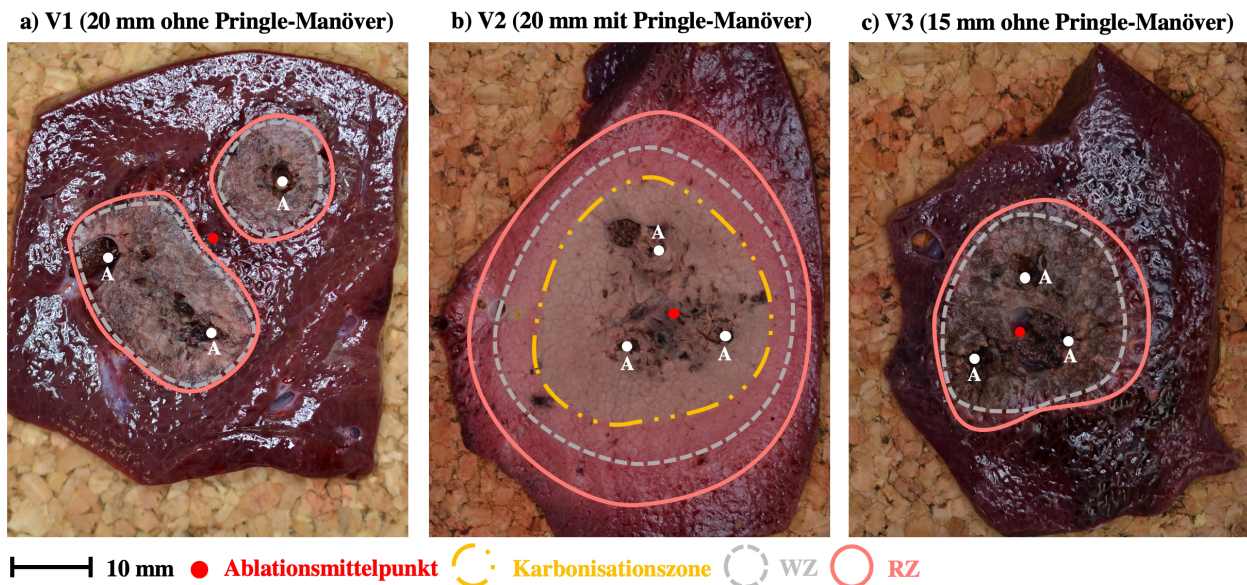


Abbildung 25 Exemplarische makroskopische Darstellung der Ablationszonen (Karbonisationszone, WZ, RZ) in allen drei Versuchsreihen. In allen Versuchsreihen konnten makroskopisch sowohl eine WZ und als auch eine RZ klar identifiziert werden. Bei der Versuchsreihe mit Pringle-Manöver markierte die Karbonisationszone den Bereich unmittelbar um die Applikatoren (A) herum. Die Karbonisationszone gehörte zum zentralen Teil der WZ.

Ein sich an die Karbonisationszone anschließender Restbestandteil der WZ konnte nur bei V2 (Applikatorabstand von 20 mm, Pringle-Manöver) durch seine hellrosa Gewebeerfärbung identifiziert werden (Abbildung 25b). Bei den Versuchsreihen mit Gefäßfluss (V1 / Applikatorabstand von 20 mm; V3 / Applikatorabstand von 15 mm) konnte dieser periphere hellrosa Saum trotz TTC-Färbung nicht abgegrenzt werden. Überdies zeigte die WZ bei Letzteren eine weitaus dunklere Veränderung des Leberparenchyms auf als bei der Versuchsreihe mit Pringle-Manöver. Bei den Ablationen mit kontinuierlicher Blutperfusion war die WZ nicht deutlich von der Karbonisationszone zu unterscheiden (Abbildung 25a/c). Die makroskopische RZ der beiden Versuchsreihen mit Gefäßfluss (V1 / Applikatorabstand von 20 mm; V3 / Applikatorabstand von 15 mm) war im Vergleich zu der RZ der Ablationen mit Pringle-Manöver (V2 / Applikatorabstand von 20 mm) deutlich schmaler und farblich schwerer von nativem Lebergewebe abzugrenzen.

Die histologische WZ war in allen Versuchsreihen durch die vollständige Absenz der Zellintegrität und die Auflösung des Bindegewebes um die Zentralvenenläppchen gekennzeichnet (Abbildung

23c). Das Herauslösen einzelner Parenchymareale aus ihrem zellulären Verband sprach für eine Kondensation der Gewebeflüssigkeit aufgrund der thermischen Einwirkung. Zellkerne waren vereinzelt zu erkennen, jedoch nur noch diffus im Gewebe verteilt.

Schlussfolgerung (3.2.2)

- In den Versuchsreihen mit Gefäßfluss (V1, V3) konnten sowohl histologisch als auch makroskopisch die für eine RFA typischen Ablationszonen (WZ, RZ) identifiziert und voneinander abgegrenzt werden.
- Bei Durchführung eines Pringle-Manövers (V2) konnte nur makroskopisch eine RZ von nativem Lebergewebe und der WZ unterschieden werden. Histologisch zeigte sich keine RZ, sondern nur eine WZ. Die Makroskopie unterschätzt somit im Fall eines Pringle-Manövers die WZ.

3.2.3 Flächenauswertung

Für eine quantitative Auswertung der makroskopischen und histologischen Ablationen wurden die Gesamtfläche (WZ + RZ), die Flächen der RZ und WZ, sowie der maximale Radius der WZ vermessen. Die kleinste Gesamtfläche konnte makroskopisch und histologisch bei V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) beobachtet werden. Die größte Gesamtfläche fand sich bei der Versuchsreihe mit Pringle-Manöver (V2 / Applikatorabstand von 20 mm). Auch die WZ und der Radius der WZ waren bei V2 am größten (Tabelle 6).

Die statistische Korrelation zwischen der Mikroskopie und Histologie innerhalb aller Versuchsreihen ergab eine signifikante Übereinstimmung der Gesamtfläche ($p \leq 0,05$). Bei den Versuchsreihen mit Gefäßfluss (V1 / Applikatorabstand von 20 mm; V3 / Applikatorabstand von 15 mm) korrelierten ergänzend die Flächen der RZ und WZ sowie der maximale Radius der WZ makroskopisch und histologisch miteinander. Eine deutliche Diskrepanz zwischen der makroskopischen und histologischen RZ-Vermessung wurde bei V2 (Applikatorabstand von 20 mm, Pringle-Manöver) beobachtet. Da bei V2 in der Histologie nur eine WZ und keine zusätzliche RZ identifiziert werden konnte, betrug die mediane Gesamtfläche der RZ histologisch 0 mm² (Tabelle 6).

Tabelle 6 Median (Minimum – Maximum) der makroskopischen und histologischen Gesamtablationsfläche (WZ + RZ), der Fläche der RZ und der WZ sowie des maximalen Radius der WZ. In V2 (Applikatorabstand von 20 mm, Pringle-Manöver) betrug die RZ 0 mm², da im Gegensatz zur Makroskopie in der Histologie keine RZ identifiziert werden konnte (siehe 3.2.2).

	V1 (20 mm ohne Pringle-Manöver)		V2 (20 mm mit Pringle-Manöver)		V3 (15 mm ohne Pringle-Manöver)	
	Makroskopie	Histologie	Makroskopie	Histologie	Makroskopie	Histologie
Gesamtfläche (mm²)	494 (234 – 638)	500 (153 – 630)	2040 (1998 – 3034)	2095 (2009 – 3317)	554 (413 – 627)	540 (394 – 603)
Korrelation	0,91		0,86		0,83	
p-Wert	0,002		0,014		0,010	
Fläche RZ (mm²)	160 (41 – 317)	122 (26 – 307)	717 (515 – 1345)	0 (0 – 913)	140 (110 – 202)	132 (97 – 201)
Korrelation	0,86		0,61		0,76	
p-Wert	0,007		0,144		0,028	
Fläche WZ (mm²)	321 (194 – 462)	324 (126 – 457)	1458 (1299 – 1689)	2095 (2009 – 2403)	400 (303 – 497)	403 (293 – 454)
Korrelation	0,98		0,11		0,88	
p-Wert	< 0,010		0,819		0,004	
R_{max} WZ (mm)	18 (11 – 25)	19 (12 – 25)	26 (23 – 31)	29 (27 – 38)	15 (14 – 19)	15 (12 – 19)
Korrelation	0,74		0,04		0,95	
p-Wert	0,037		0,939		< 0,010	

Histologisch war die WZ der Ablationen mit Pringle-Manöver folglich um etwa 44 % größer als die in der Makroskopie vermessene WZ (Makroskopie: 1458 mm² versus Histologie: 2095 mm²). Die histologische WZ entsprach damit in etwa der Fläche der makroskopischen Gesamtablation (Makroskopie: 2040 mm²). Aufgrund dieser Flächenabweichungen konnte in V2 (Applikatorabstand von 20 mm, Pringle-Manöver) keine Korrelation zwischen der makroskopischen und histologischen Fläche der RZ, WZ und des Radius der WZ nachgewiesen werden.

Der makroskopische Flächenvergleich der Versuchsreihen untereinander zeigte zwischen V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) und V3 (Applikatorabstand von 15 mm, Gefäßfluss) keinen Unterschied bezüglich der Gesamtfläche, der RZ und des maximalen Radius (Abbildung 26b).

Ablationsflächen und Radien in Relation zu V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) (%)

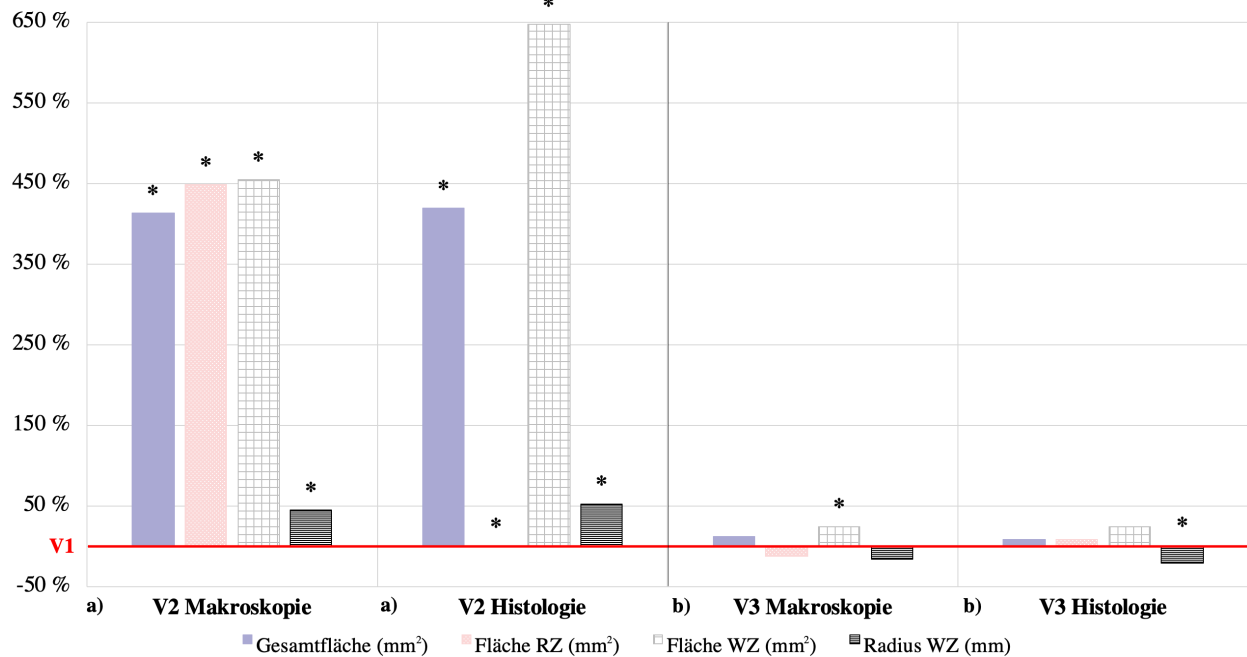


Abbildung 26 Makroskopischer und histologischer Flächen- und Radiusvergleich von V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) (eingezeichnet als Baseline / 0 %) mit **a)** V2 (Applikatorabstand von 20 mm, Pringle-Manöver) und **b)** V3 (Applikatorabstand von 15 mm, Gefäßfluss).

Durch eine Reduktion des Applikatorabstandes von 20 mm auf 15 mm wurde makroskopisch eine 25 % größere WZ erzielt ($p \leq 0,05$). Im histologischen Flächenvergleich konnte in V3 (Applikatorabstand von 15 mm, Gefäßfluss) jedoch keine signifikant größere WZ im Vergleich zu V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) aufgezeigt werden. Histologisch war der maximale Radius der WZ in V1 um 27 % größer als in V3.

Die Gesamtfläche und die WZ waren bei der Versuchsreihe mit Pringle-Manöver (V2 / Applikatorabstand von 20 mm) makroskopisch und histologisch um mehr als das Vierfache, der Radius der WZ um mehr als 40 % größer als bei V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) (Tabelle 6, Abbildung 26a). Die histologische WZ war in V2 (Applikatorabstand von 20 mm, Pringle-Manöver) zudem sechsfach so groß wie die histologische WZ in V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss). Histologisch konnten die typischen zellulären Veränderungen einer RZ bei V2 nicht beobachtet werden (siehe 3.2.2). Folglich betrug der Medianwert der RZ in V2 0 mm², wodurch die Versuchsreihe mit einem Applikatorabstand von 20 mm und kontinuierlichem Gefäßfluss (V1) eine signifikant größere RZ aufwies (Abbildung 26a).

Schlussfolgerung (3.2.3)

- Makroskopische und histologische Ablationsflächen (Gesamtfläche, RZ, WZ, Radius WZ) korrelierten bei den Versuchen mit kontinuierlichem Gefäßfluss (V1, V3) miteinander.
- Bei der Versuchsreihe ohne Gefäßfluss (V2 / Pringle-Manöver) korrelierte die histologische Fläche der WZ mit der makroskopischen Gesamtablationsfläche. Eine RZ konnte histologisch nicht identifiziert werden. Die Fläche der WZ wurde dadurch makroskopisch deutlich unterschätzt.
- Durch ein Pringle-Manöver konnte bei gleichbleibendem Applikatorabstand (20 mm) eine signifikant größere Gesamtablationsfläche erreicht werden als mit Gefäßfluss.
- Eine Distanzreduktion von 20 mm auf 15 mm zwischen den Applikatoren hatte histologisch keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtablationsfläche, die Fläche der WZ und die Fläche der RZ.

3.2.4 Kühleffekte innerhalb der Idealläsion

Um Kühleffekte zu quantifizieren, wurde für jede Versuchsreihe eine Idealläsion erstellt (siehe 2.7.4). Diese Idealläsion wurde anschließend als Maske über alle makroskopischen und histologischen Ablationen gelegt (Abbildung 27).

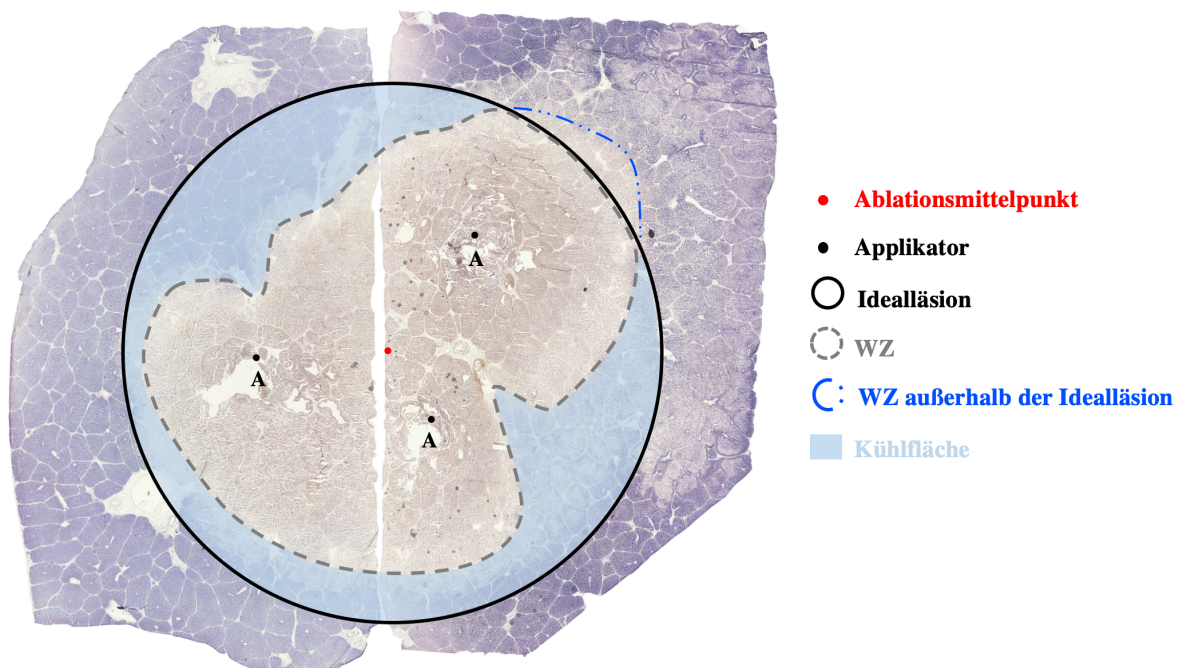


Abbildung 27 Exemplarische Darstellung der Kühlfläche innerhalb der Idealläsion einer histologischen V3-Ablation (15 mm Abstand, Gefäßfluss). Die Kühlfläche ergab sich aus der Differenz zwischen Idealläsion und WZ.

Aufgrund der nicht vollständig runden Ablationsgeometrie der multipolaren RFA (Abbildung 2, Abbildung 21) konnten sich Anteile der WZ außerhalb der Idealläsion befinden. Kühleffekte wurden daher methodisch bedingt innerhalb jeder Idealläsion erwartet.

Die größte Kühlfläche fand sich makroskopisch bei V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) mit 750 mm² (673 mm² – 847 mm²) (72 % der Idealläsion). Bei V3 (Applikatorabstand von 15 mm, Gefäßfluss) waren innerhalb der Idealläsion makroskopisch 51 % des Lebergewebes abladiert und folglich 49 % noch vital. Im Vergleich zu V1 war die Kühlfläche innerhalb der Idealläsion bei V3 makroskopisch um 23 % kleiner (Abbildung 28).

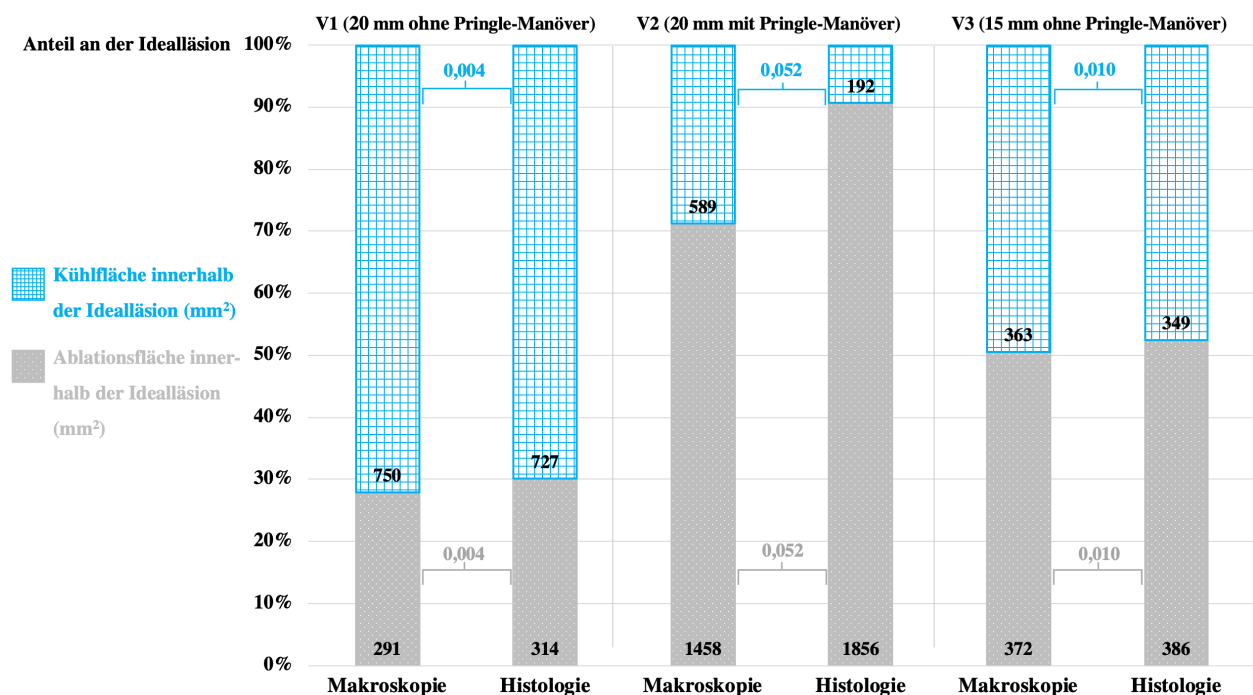


Abbildung 28 Ablationsflächen- und Kühlflächenwerte (Zahlen in den Balken: Fläche in mm²; Zahlen zwischen den Balken: p-Werte der Korrelation zwischen makroskopischen und histologischen Flächen) innerhalb der Idealläsion pro Versuchsreihe im makroskopischen und histologischen Vergleich. Die größten Kühlflächen fanden sich bei den Versuchsreihen mit Gefäßfluss (V1 / Applikatorabstand von 20 mm; V3 / Applikatorabstand von 15 mm). Die größte Ablationsfläche und demnach auch die kleinste Kühlfläche trat bei den RFA bei Durchführung eines Pringle-Manövers (V2 / Applikatorabstand von 20 mm) auf.

Die größte Ablationsfläche mit 1458 mm² (1299 mm² – 1624 mm²) (71 % der Idealläsion) und demzufolge auch die kleinste Kühlfläche konnte makroskopisch bei der Versuchsreihe mit Pringle-Manöver (V2 / Applikatorabstand von 20 mm) gemessen werden. Die Ablationsfläche innerhalb der Idealläsion war im Vergleich zu V1 (Applikatorabstand von 20 mm, kontinuierliche Blutperfusion) um 43 % größer. Histologisch fand sich in V2 eine Ablationsfläche von 1856 mm²

(1730 mm² – 2003 mm²) (knapp 91 % der Idealläsion). Dies ergab eine gemessene Differenz von 20 % zwischen der Makroskopie und Histologie (Abbildung 28).

Bei den Versuchsreihen mit Gefäßfluss (V1 / Applikatorabstand von 20 mm; V3 / Applikatorabstand von 15 mm) zeigte sich innerhalb der Versuchsreihen eine signifikante Korrelation zwischen den makroskopischen und histologischen Flächenwerten (Abbildung 28; Zahlen zwischen den Balken). Wie bereits in 3.2.3 beschrieben, wurde bei den Pringle-Ablationen (V2 / Applikatorabstand von 20 mm) histologisch eine wesentlich größere Ablationsfläche im Vergleich zur Makroskopie festgestellt. Folglich korrelierten die Ablationsfläche und die Kühlfläche bei Durchführung eines Pringle-Manövers innerhalb der Idealläsion makroskopisch und histologisch nicht miteinander (Abbildung 28).

Schlussfolgerung (3.2.4)

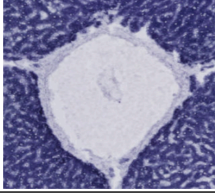
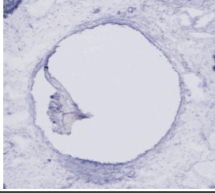
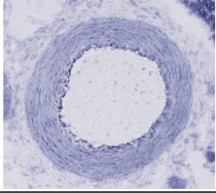
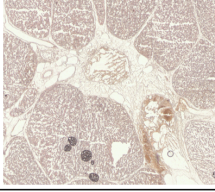
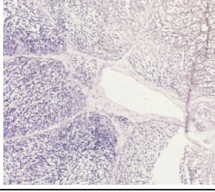
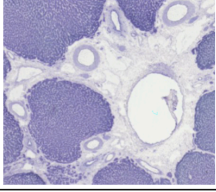
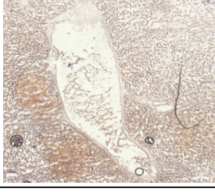
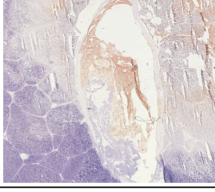
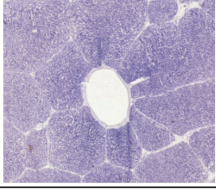
- Kühleffekte waren in jeder Versuchsreihe zu beobachten.
- Histologisch war die Ablationsfläche bei der Versuchsreihe mit Pringle-Manöver (V2) größer als die makroskopische Ablationsfläche. Im Vergleich zu den Ablationen mit Gefäßfluss (V1, V3) können folglich durch ein Pringle-Manöver unbewusst größere Ablationsflächen erzielt werden.

3.3 Einfluss der Gefäße innerhalb der Idealläsion

3.3.1 Gesamtübersicht der Gefäßauswertung

Um den Einfluss von einzelnen Lebergefäßen auf eine RFA ermitteln zu können, erfolgte eine differenzierte Analyse der Gefäße. Innerhalb der Idealläsion wurden alle Gefäße $\geq 0,5$ mm anhand eines selbstkonzipierten Einteilungssystems nach Gefäßart, Lokalisation und NADH-Färbungsgrad histologisch klassifiziert (Tabelle 3, Tabelle 7).

Tabelle 7 Qualitative Einteilung der Gefäße nach Gefäßart, Lokalisation und NADH-Färbungsgrad mit dazugehörigem histologischem Abbild (vergleiche Tabelle 3). Die Beschriftungen I, II und III dienen allein der systematischen Einteilung. Die Tabelle zeigt exemplarische Querschnitte.

	I	II	III
Gefäßart			
	Lebervene	Portalvene	Portalarterie
Gefäßlokalisierung			
	WZ	RZ	Außerhalb der Ablationsfläche
NADH-Färbungsgrad			
	Avital	Teilweise vital	Vital

Die Unterscheidung von Portalvenen und Lebervenen erfolgte anhand ungleicher Anteile an begrenzendem Bindegewebe. Portalvenen waren stets im Verbund mit weiteren Gefäßen anzutreffen. Portalarterien zeichneten sich durch die starke Ausprägung ihrer dreischichtigen muskulären Gefäßwand aus. Durch die Hitzeinwirkung resultierende Stase des Blutflusses konnte innerhalb einiger Gefäße in der WZ mehrfach koaguliertes Serum beobachtet werden (Tabelle 7).

Insgesamt wurden 771 Gefäße identifiziert. Davon waren 344 Lebervenen, 379 Portalvenen und 48 Portalarterien. Bei Durchführung eines Pringle-Manövers (V2 / Applikatorabstand von 20 mm) wurden im Vergleich zu den Versuchsreihen ohne Pringle-Manöver (V1 / Applikatorabstand von 20 mm; V3 / Applikatorabstand von 15 mm) eine größere Anzahl von Gefäßen gefunden (376 Gefäße), was auf die Größe der Idealläsion zurückzuführen ist (Tabelle 8).

Tabelle 8 Anzahl der Lebervenen, Portalvenen und Portalarterien innerhalb der Versuchsreihen sortiert nach Lokalisation. V1 = Applikatorabstand von 20 mm ohne Pringle-Manöver, V2 = Applikatorabstand von 20 mm mit Pringle-Manöver, V3 = Applikatorabstand von 15 mm ohne Pringle-Manöver.

Versuchsreihe	Gefäßart			
	Lebervene	Portalvene	Portalarterie	Gesamt
V1	93	112	26	231
V2	167	189	20	376
V3	84	78	2	164
Gesamt	344	379	48	771
Gefäßlokalisierung	Gefäßart			
	Lebervene	Portalvene	Portalarterie	Gesamt
WZ	172	239	19	430
RZ	75	47	2	124
Außerhalb der Ablation	97	93	27	217
Gesamt	344	379	48	771

3.3.2 Gefäßlokalisierung und Vitalfärbung

Eine Zusammenfassung der Gefäßauswertung für jede Versuchsreihe wurde mit Hilfe einer Kreuztabelle realisiert. Dabei wurden die Gefäße nach Gefäßlokalisierung und NADH-Färbungsgrad sortiert. Zusätzlich wurde der Gefäßdurchmesser jedes einzelnen Gefäßes $\geq 0,5$ mm innerhalb der Idealläsion vermessen.

Bei allen Versuchsreihen konnte nachgewiesen werden, dass über 90 % der in der WZ befindlichen Gefäße kein vitales Gewebe mehr aufzeigten und somit vollständig abladiert waren. Auffallend war, dass insgesamt elf Gefäße in der WZ eine partielle Farbaufnahme aufwiesen. Der Durchmesser dieser partiell vitalen Gefäße war im Vergleich zum Durchmesser der komplett avitalen Gefäße deutlich größer (Tabelle 9).

Tabelle 9 Kreuztabelle der drei Versuchsreihen. Auswertung von 771 Gefäßen je nach Lokalisation und NADH-Färbungsgrad. In hellblau ist jeweils die Anzahl der Gefäße markiert, die trotz Lokalisation in der WZ eine partielle Vitalfärbung aufzeigten. In hellrot ist der Prozentsatz der Gefäße dargestellt, die in der WZ Avitalität aufwiesen (V1 = 92,3 %, V2 = 99,7 %, V3 = 91,6 %). \varnothing = medianer Gefäßdurchmesser (Minimum – Maximum) (mm).

		V1 20 mm Abstand ohne Pringle-Manöver				V2 20 mm Abstand mit Pringle-Manöver				V3 15 mm Abstand ohne Pringle-Manöver			
		Gesamt	Avital	Teilweise vital	Vital	Gesamt	Avital	Teilweise vital	Vital	Gesamt	Avital	Teilweise vital	Vital
WZ	Anzahl	52	48	4	0	306	305	1	0	72	66	6	0
	%	100	92,3	7,7	0	100	99,7	0,3	0	100	91,7	8,3	0
	\varnothing (mm)	0,7 (0,5 – 8,8)	0,7 (0,5 – 4,7)	1,9 (0,8 – 8,8)	–	0,9 (0,5 – 8,6)	0,9 (0,5 – 8,6)	3,7	–	0,8 (0,5 – 10,3)	0,7 (0,5 – 3,8)	5,1 (3,2 – 10,3)	–
RZ	Anzahl	37	0	36	1	51	0	50	1	36	0	36	0
	%	100	0	97,3	2,7	100	0	98,0	2,0	100	0	100	0
	\varnothing (mm)	0,9 (0,5 – 4,1)				0,8 (0,5 – 8,5)				1,0 (0,5 – 9,7)			
Nativ	Anzahl	142	0	24	118	19	0	12	7	56	0	25	31
	%	100	0	16,9	83,1	100	0	63,2	36,8	100	0	44,6	55,4
	\varnothing (mm)	0,8 (0,5 – 8,9)				0,9 (0,5 – 7,4)				0,8 (0,5 – 5,4)			
Gesamt	Anzahl	231	48	64	119	376	305	63	8	164	66	67	31
	%	100	20,8	27,7	51,5	100	81,1	16,8	2,1	100	40,2	40,9	18,9
	\varnothing (mm)	0,8 (0,5 – 8,9)				0,9 (0,5 – 8,6)				0,8 (0,5 – 10,3)			

VI: In V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) wiesen insgesamt vier Gefäße (eine Lebervene, drei Portalvenen) trotz Lokalisation in der WZ eine partielle NADH-Farbaufnahme auf (Tabelle 9, Abbildung 29).

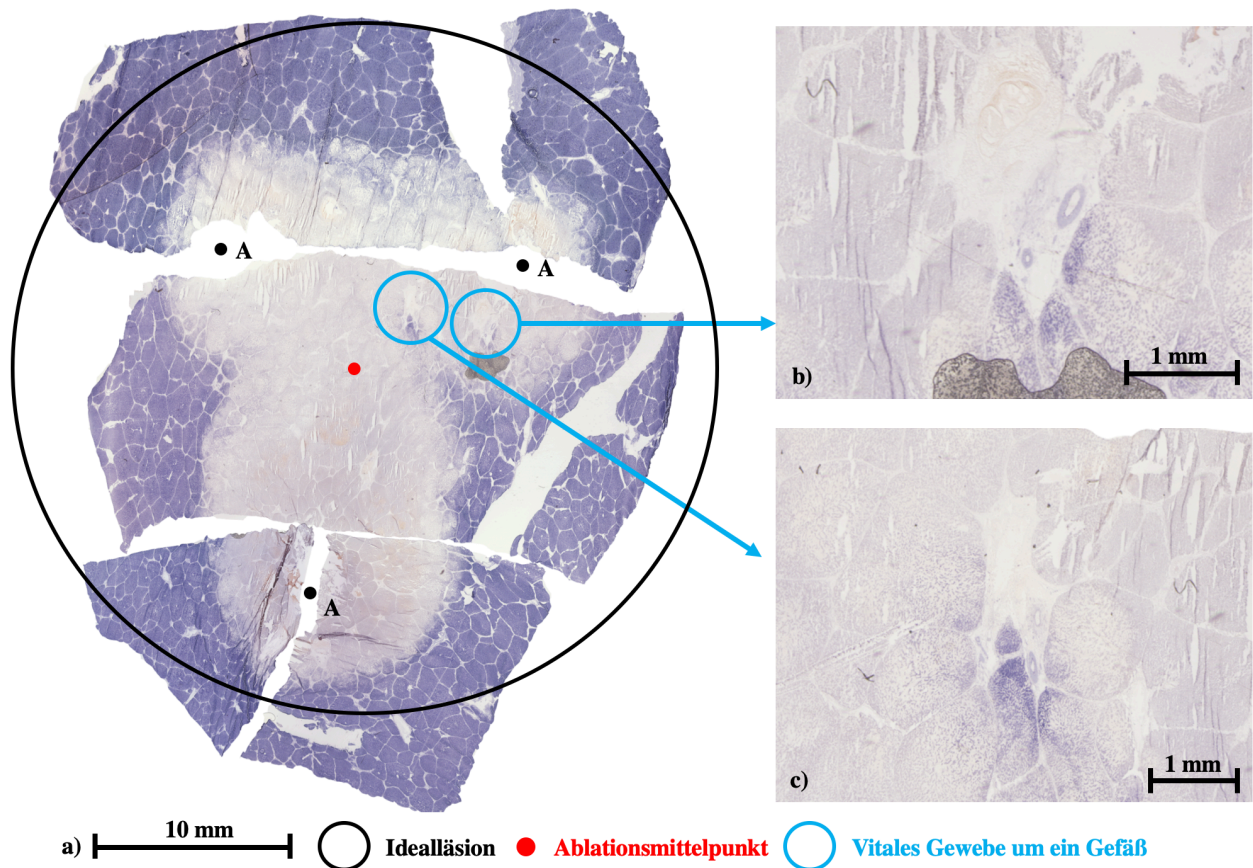


Abbildung 29 a) Exemplarische Darstellung einer V1-Ablation (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss). Innerhalb der WZ befanden sich zwei Portalfelder (b, c), die eine partielle Farbaufnahme aufzeigten. Mit einem Gefäßdurchmesser von b) 1,2 mm und c) 0,8 mm waren diese Gefäße größer als die restlichen Gefäße in der WZ in V1 (0,7 mm).

In V1 lag der Gefäßdurchmesser der avitalen Gefäße in der WZ mit 0,7 mm deutlich unter dem Durchmesser der Gefäße, die vitale Zellresiduen aufwiesen (1,9 mm) (Tabelle 9). Zwei Gefäße, die in der WZ eine NADH-Farbaufnahme aufzeigten, lagen zonenüberschreitend (Abbildung 30).

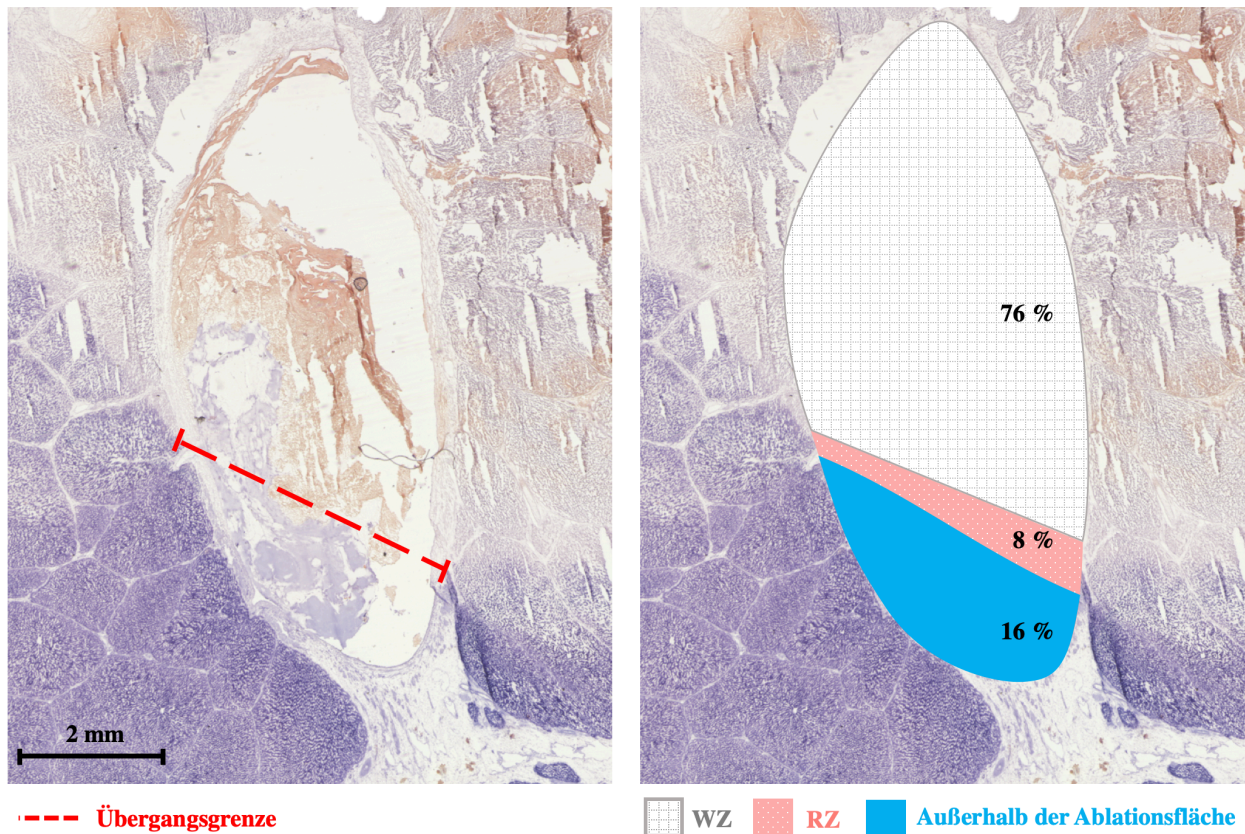


Abbildung 30 Exemplarische Darstellung eines zonenüberschreitenden Gefäßes mit einem Durchmesser von 8,8 mm in V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) (vergleiche Abbildung 20b). Der Großteil des Gefäßes (76 %) befand sich in der WZ, während sich 8 % in der RZ beziehungsweise 16 % außerhalb der Ablation befanden. Dieses Gefäß wurde trotz partieller NADH-Färbung der WZ zugeteilt.

In der RZ waren 36 der Lebergefäße (97,3 %) in V1 teilweise von vitalem Gewebe umgeben (Tabelle 9). Insgesamt befanden sich 142 der 231 (61 %) der Gefäße in V1 außerhalb der Ablationszone, wovon wiederum 118 (83,1 %) vollständige Vitalität aufwiesen. Mögliche Erklärungen für die große Anzahl vitaler Gefäße innerhalb der Idealläsion bei V1 sind einerseits die große Kühlfläche (Abbildung 28) und andererseits die inhomogenen, nicht-konfluierenden Ablationsformen (Abbildung 21, Abbildung 22). Das größte Gefäß mit einem Durchmesser von 8,9 mm befand sich außerhalb der Ablation (natives Lebergewebe) und war vollständig vital.

V2: Bei den Versuchen mit Pringle-Manöver (Applikatorabstand von 20 mm, V2) war das größte Gefäß mit einem Durchmesser von 8,6 mm in der WZ lokalisiert und vollständig von avitalem Lebergewebe umgeben. Eine Portalvene mit einem Durchmesser von 3,7 mm zeigte trotz Lokalisation in der WZ eine Farbaufnahme auf und überschritt damit deutlich den Gefäßdurchmesser der komplett avitalen Gefäße in der WZ (0,9 mm) (Tabelle 9). Dieses Gefäß lag zonenüberschreitend. Bei den Pringle-Manöver-Versuchen wurden 376 Gefäße analysiert, von denen sich 81 % (306

Gefäße) in der WZ befanden. Die mittels der makroskopischen Radien erzeugte Idealläsion umschloss histologisch fast nur zugrunde gegangenes Leberparenchym. Im Vergleich zu V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss), wo sich 61 % der Gefäße außerhalb des Ablationsareals befanden, wurden in V2 nur 19 Gefäße von 376 (5 %) in nativem Lebergewebe identifiziert.

V3: In V3 (Applikatorabstand von 15 mm, Gefäßfluss) konnte bei sechs Gefäßen (vier Lebervenen, zwei Portalvenen) in der WZ (8,3 %) eine partielle Farbaufnahme nachgewiesen werden. Der Gefäßdurchmesser dieser sechs Gefäße war mit 5,1 mm um 4,4 mm größer als der Durchmesser der avitalen Gefäße in der WZ (0,7 mm) (Tabelle 9). Drei dieser partiell vitalen Gefäße lagen zonenüberschreitend, während die restlichen drei Gefäße zentral von der WZ eingeschlossen waren. Auffallend war, dass sich zwei partiell vitale Gefäße in der zentralen WZ in der einzigen Ablation von V3 befanden, die keine homogene, konfluierende Ablationsform aufzeigte (Abbildung 31).

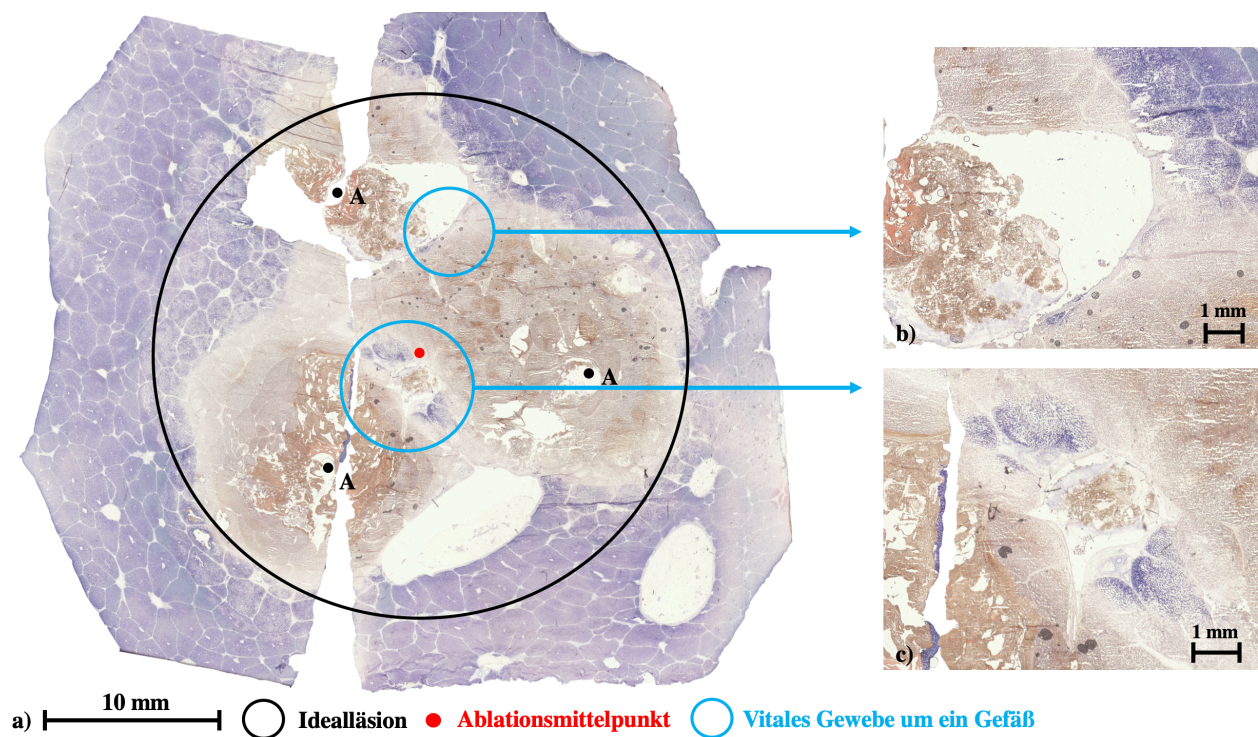


Abbildung 31 a) Darstellung der einzigen V3-Ablation (Applikatorabstand von 15 mm, Gefäßfluss), bei der es nicht zu einer homogenen, konfluierenden Ablation kam. A = Applikator b) Eine Lebervene (Durchmesser von 6,0 mm) war trotz Lokalisation in der WZ von vitalem Leberparenchym umgeben. c) Im Ablationsmittelpunkt befand sich zudem ein Portalfeld, welches vitale Zellresiduen aufwies. Das größte Gefäß des Portalfeldes war eine Portalvene mit einem Gefäßdurchmesser von 3,2 mm.

In der RZ waren 100 % der Gefäße in V3 teilweise von vitalem Leberparenchym umgeben und somit nur unvollständig abladiert (Tabelle 9).

Schlussfolgerung (3.3.2)

- Es bestand ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation und dem Grad der NADH-Färbung der Gefäße. Mehr als 90 % der Gefäße (einschließlich des perivaskulären Gewebes) in der WZ waren avital und somit vollständig abladiert. Mehr als 97 % der Gefäße in der RZ waren zum Teil vital und somit erwartungsgemäß nicht vollständig abladiert.
- Gefäße, die innerhalb der WZ Vitalität aufzeigten, hatten einen größeren Gefäßdurchmesser als die avitalen Gefäße in dieser Zone.

3.3.3 Distanz der Gefäße zum Ablationsmittelpunkt

In der bisherigen makroskopischen und histologischen Radiusvermessung der WZ wurde der Einfluss der Gefäße auf den Ablationsradius noch nicht in Betracht gezogen. Um die Auswirkung der Gefäße auf die Größe einer Ablation zu bestimmen, wurde deshalb der Kühleffekt in Abhängigkeit des Gefäßabstandes zum Ablationsmittelpunkt evaluiert (Abbildung 32).

a) Lebervenen

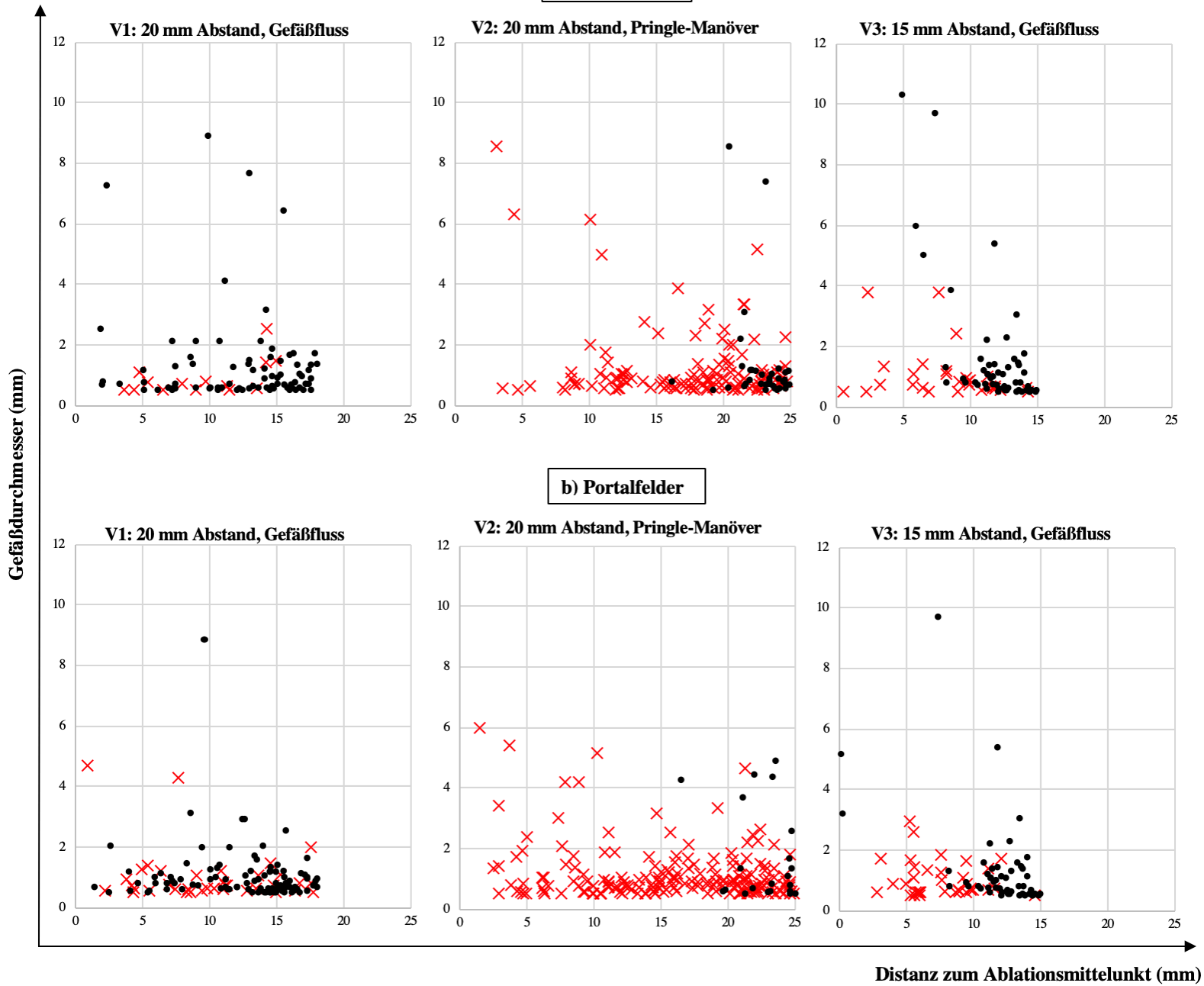


Abbildung 32 Einfluss der Lebergefäße auf den Ablationsradius. a) Lebervenen und b) Portalfelder in Abhängigkeit ihres Durchmessers zu ihrem Abstand vom Ablationsmittelpunkt sortiert nach Versuchsreihe.

× = Gefäß mit Gefäßwandschädigung / von avitalem Gewebe umgeben

● = Gefäß mit vollständig intakter Gefäßwand / von vitalem Gewebe umgeben

V1: Bei V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) wurde bei einem Großteil der Lebervenen und Portalfelder, die in unmittelbarer Nähe um den Ablationsmittelpunkt herum lokalisiert waren, Vitalität festgestellt. Dabei konnte neben einer intakten Gefäßwand auch vitales Lebergewebe um einen Großteil der Gefäße beobachtet werden (Abbildung 32, Abbildung 33).

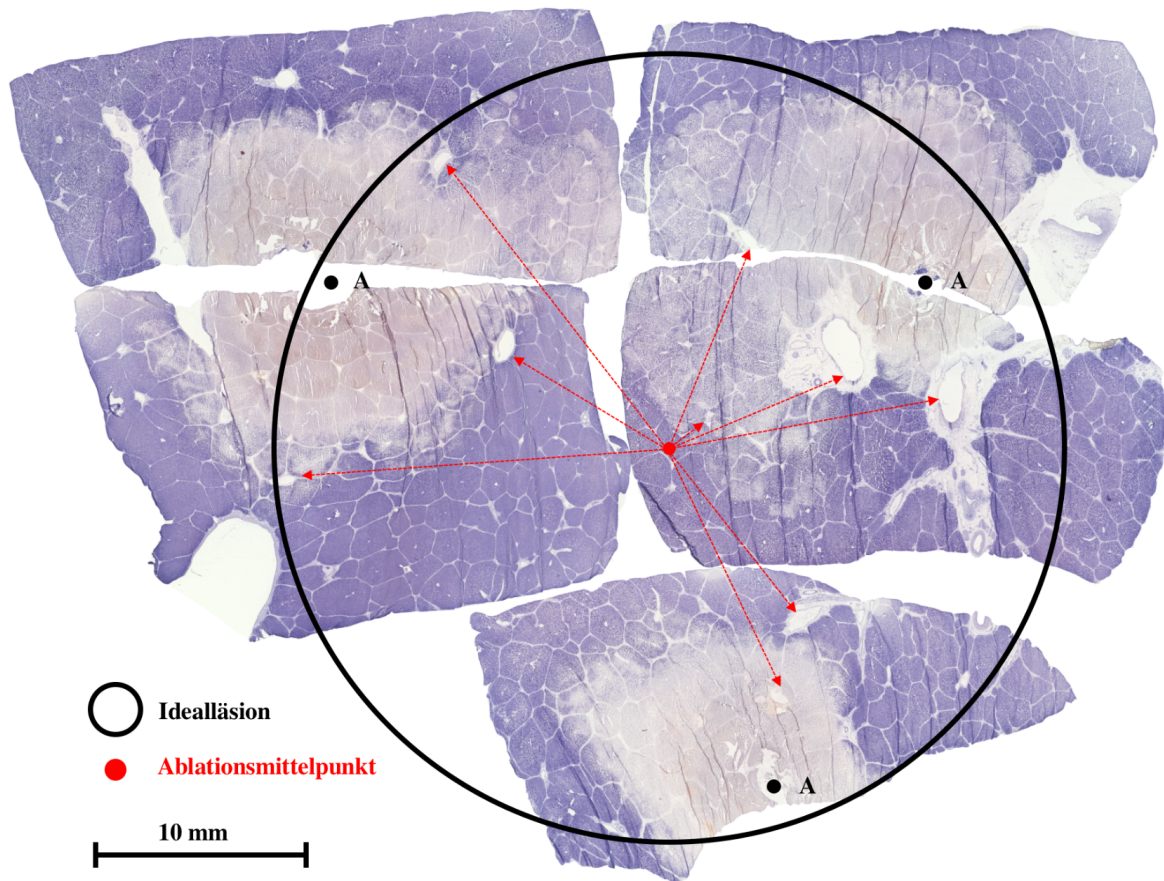


Abbildung 33 Exemplarische Darstellung der Distanzvermessung bei einer V1-Ablation (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) (vergleiche Abbildung 20). Die Idealläsion stellt dabei eine hypothetisch perfekte Ablation ohne Gefäßkühleffekte dar. Demnach sollte sich innerhalb der Idealläsion kein vitales Gewebe mehr befinden. Eine Fusion der einzelnen Ablationen um die Applikatoren zu einer einzelnen, homogenen Ablation konnte in der vorliegenden Darstellung nicht beobachtet werden. Es zeigte sich vitales Gewebe um Gefäße, die in unmittelbarem Abstand um den Ablationsmittelpunkt gelegen waren.

Unabhängig von der Distanz zum Ablationsmittelpunkt waren alle Lebervenen mit einem Gefäßdurchmesser größer als 3 mm vital (Abbildung 32).

V2: Bei Durchführung eines Pringle-Manövers (V2 / Applikatorabstand von 20 mm) konnte bis zu einem Ablationsradius von 16 mm weder eine intakte Gefäßwand noch vitales Lebergewebe um die Gefäße festgestellt werden (Abbildung 32). Gefäße waren unabhängig ihres Durchmessers und ihrer Art vollständig bis zu dieser Distanz zerstört. Der sichere Ablationsdurchmesser betrug

demnach 32 mm. Lebervenen und Portalfelder in der Ablationsperipherie (mehr als 16 mm vom Ablationsmittelpunkt entfernt) waren teilweise unvollständig abladiert und zeigten vitales Lebergewebe in ihrer Umgebung auf. Im Vergleich zu den Versuchsreihen mit Gefäßfluss (V1 / Applikatorabstand von 20 mm; V3 / Applikatorabstand von 15 mm) war in V2 der Großteil aller Gefäße abladiert (Abbildung 34).

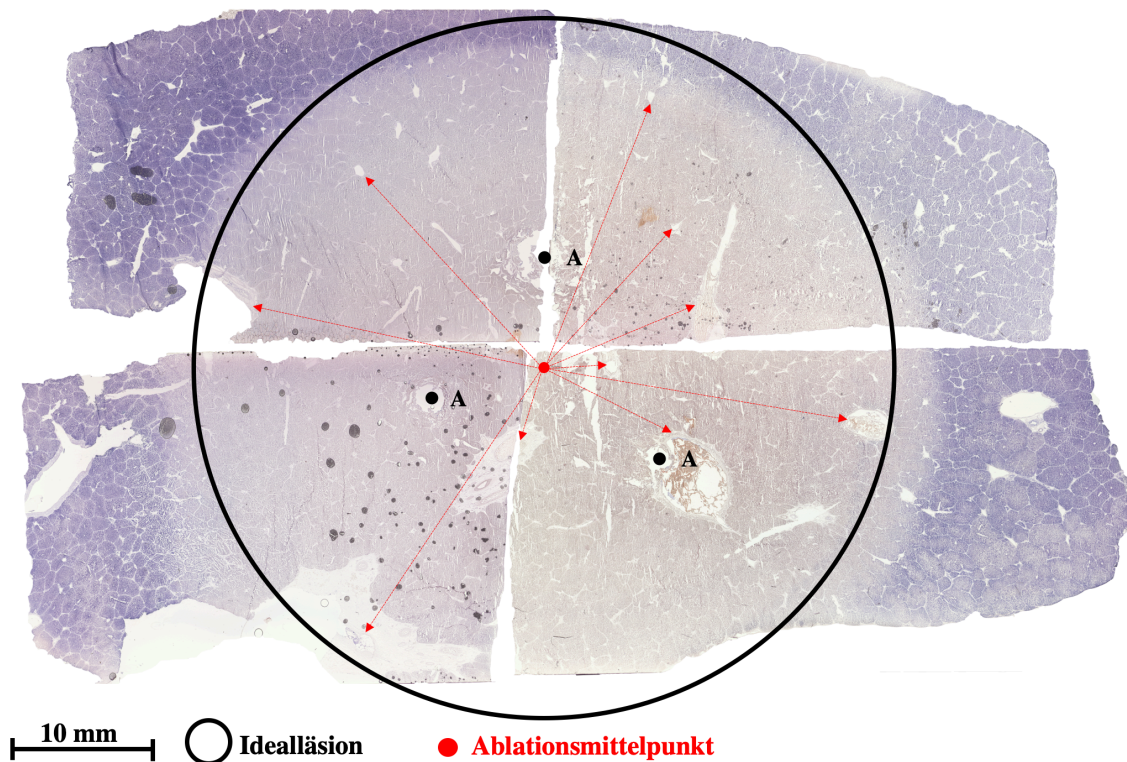


Abbildung 34 Exemplarische Darstellung der Distanzvermessung bei einer V2-Ablation (Applikatorabstand von 20 mm, Pringle-Manöver) (vergleiche Abbildung 33). Die Idealläsion umfasste dabei nahezu das komplette Ablationsareal. Im Gegensatz zu V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) zeigte sich kein vitales Gewebe um Gefäße, die in unmittelbarem Abstand um den Ablationsmittelpunkt gelegen waren.

V3: Bei V3 (Applikatorabstand von 15 mm, Gefäßfluss) war vitales Gewebe um zwei Portalfelder zu beobachten, die sich jeweils im Ablationsmittelpunkt befanden (Distanz zum Mittelpunkt: 0 mm) (Abbildung 32). Lebervenen waren bis zu einem Abstand von 4,8 mm vom Ablationsmittelpunkt von avitalem Lebergewebe umgeben. Im Vergleich zu V1 (Applikatorabstand von 20 mm, Gefäßfluss) waren insgesamt mehr Lebervenen und Portalfelder unmittelbar um den Ablationsmittelpunkt abladiert. Ab einem Gefäßdurchmesser von 4 mm waren alle Lebervenen von vitalem Lebergewebe umgeben und wiesen eine intakte Gefäßwand / vitales perivaskuläres Gewebe auf. Lebervenen und Portalfelder waren ab 10 mm zum Ablationsmittelpunkt fast alle vital.

Schlussfolgerung (3.3.3)

- **V1:** Da vitale Gefäße unmittelbar um den Ablationsmittelpunkt beobachtet wurden, eignet sich ein Applikatorabstand von 20 mm mit Gefäßfluss nicht, um Gewebe innerhalb des von den Applikatoren eingeschlossenen Bereiches vollständig zu abladiere.
- **V2:** Die Anwendung eines Pringle-Manövers resultierte in einer vollständigen Ablation aller Gefäße / des perivaskulären Gewebes bis zu einem Radius von 16 mm.
- **V3:** Eine Abstandsreduktion zwischen den Applikatoren von 20 mm auf 15 mm zeigte eine höhere Anzahl abladiertes Gefäße im Ablationsareal auf. Dennoch können Gefäße in unmittelbarer Nähe zum Ablationsmittelpunkt auch bei einem Applikatorabstand von 15 mm vitale Anteile aufzeigen und somit den Ablationserfolg gefährden.

3.3.4 Gefäßwandschädigung

Insgesamt wurden 771 Gefäße untersucht, von denen 217 außerhalb der Ablationsfläche (28 %), 124 in der RZ (16 %) und 430 in der WZ (56 %) lokalisiert waren (Tabelle 8). Dabei konnte bei 419 Gefäßen (97 %, Gesamtdurchmesser 0,8 mm) in der WZ keine Farbaufnahme beobachtet werden, während die restlichen 11 Gefäße (3 %) teilweise vitales Gewebe aufzeigten (Abbildung 35).

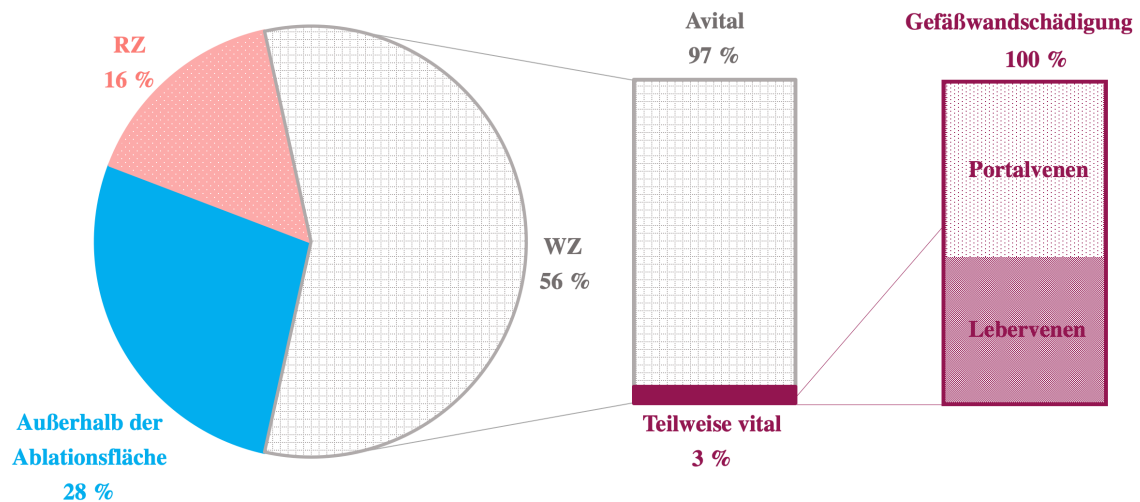


Abbildung 35 Prozentuale Aufteilung der Gefäße innerhalb der Idealläsion (Tabelle 8). 56 % der Gefäße befanden sich in der WZ, davon waren wiederum 97 % avital und 3 % teilweise vital. Bei 100 % dieser partiell vitalen Gefäße in der WZ (fünf Lebervenen, sechs Portalvenen) konnte eine Gefäßwandschädigung festgestellt werden.

Bei diesen elf partiell vitalen Gefäßen handelte es sich um fünf Lebervenen und sechs Portalvenen mit einem Gesamtgefäßdurchmesser von 3,9 mm (0,8 mm – 10,3 mm). Sechs der elf Gefäße befanden sich am Übergang der WZ in die RZ / natives Lebergewebe und hatten einen Durchmesser

von 4,5 mm (2,6 mm – 8,8 mm). Aufgrund ihres prozentual größeren Flächenanteils in der WZ wurden diese Gefäße auch der WZ zugeteilt (siehe 2.7.6). Fünf Gefäße (vier Portalvenen, eine Lebervene) zeigten partielle Vitalität in der zentralen WZ auf. Der Durchmesser dieser Gefäße betrug 3,2 mm (0,8 mm – 10,3 mm). Im nächsten Schritt wurden alle elf partiell vitalen Gefäße in der WZ auf mögliche Gefäßwandschädigungen untersucht. Dabei wurde insbesondere auf Kontinuitätsunterbrechungen, eine Absenz oder auf eine Auflösung des Schichtaufbaus der Gefäßwand geachtet (Tabelle 4). Es konnte gezeigt werden, dass bei allen Gefäßen (100 %) trotz partieller Farbaufnahme in der WZ eine Schädigung der Gefäßwand vorlag (Abbildung 36).

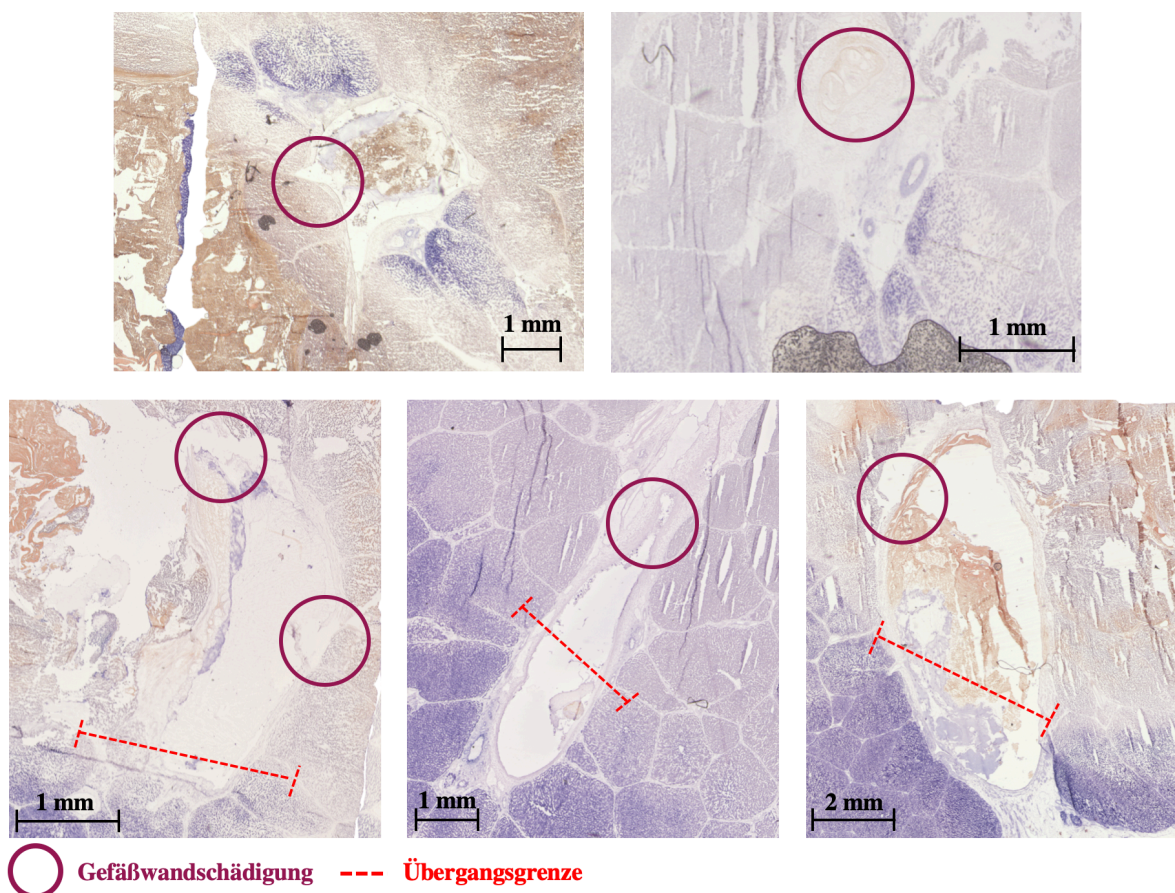


Abbildung 36 Exemplanische Gefäßwanduntersuchung von Gefäßen, die der WZ zugeteilt wurden, aber dennoch eine partielle Farbaufnahme aufzeigten. Bei allen Gefäßen war eine klare Gefäßwandschädigung in Form einer Kontinuitätsunterbrechung, Auflösung oder Absenz der Gefäßwandschichtung ersichtlich.

Schlussfolgerung (3.3.4)

- Bei Gefäßen, die trotz ihrer Lokalisation in der WZ eine partielle Farbaufnahme aufzeigten, wurde bei 100 % eine Gefäßwandschädigung festgestellt.

4. Diskussion

4.1 Radiofrequenzablation

Primäre und sekundäre Lebermalignome gehören zu den häufigsten Tumorerkrankungen weltweit (1, 2, 4, 7, 8). Neben der chirurgischen Leberteilektomie können bei geeigneter Tumorgröße und -lokalisation mittlerweile auch minimalinvasive In-situ-Thermoablationsverfahren angewandt werden, um Lebertumore mit kurativem Ansatz zu behandeln (4, 15, 16, 18, 20, 24, 41, 55). Dabei hat sich vornehmlich die RFA gegenüber anderen thermischen minimalinvasiven Verfahren durchgesetzt (41, 44). Durch die Generierung von hochfrequentem Wechselstrom werden bei der RFA Thermonekrosen im Tumorgewebe induziert (44, 53). Um eine vollständige Destruktion aller malignen Zellen zu gewährleisten, ist die Anwendung jedoch bisher auf eine Tumorgröße von 3 cm limitiert (4, 24, 69). Durch die Ausweitung monopolarer RFA-Systeme zur multipolaren RFA (simultane Verwendung von mehr als zwei Elektroden; siehe 1.4.2) können inzwischen größere Ablationsvolumina erzielt werden (55, 56, 62). Zukünftig ist infolgedessen potenziell auch eine Ablation größerer Lebermalignome möglich (62, 88, 89). Die Anwendung der multipolaren RFA ist in der klinischen Praxis jedoch noch nicht abschließend untersucht.

Vaskuläre Kühleffekte („heat sink effect“), die durch die natürliche Leberperfusion entstehen, stellen einen entscheidenden Risikofaktor für die Rezidivrate nach RFA dar (43, 47, 69, 90, 91, 93, 133). Lebergefäße können zu einem Wärmeabtransport und somit zu einem Verlust der zugeführten Energie führen (47). Dadurch wird die Effektivität des RFA-Eingriffes eingeschränkt und die Gefahr von Tumorresiduen steigt (43, 47, 69, 72). Derzeit können vaskuläre Kühleffekte allein durch eine Okklusion des Ligamentum hepatoduodenale (ein sogenanntes Pringle-Manöver, siehe 1.4.6) erheblich reduziert werden (90, 98, 99, 101). Da die Durchführung eines Pringle-Manövers jedoch mindestens eine chirurgische Intervention voraussetzt, sollte der Nutzen stets den potenziellen Risiken gegenüber gestellt werden (47). Untersuchungen eines Pringle-Manövers und des vaskulären Kühleffektes existieren vor allem für die RFA im mono- oder bipolaren Modus (91, 94, 109, 134-136). Systematische Studien des Kühleffektes bei der multipolaren RFA wurden zuvor ausschließlich am Ex-vivo-Modell durchgeführt (130). Eine Übertragung von Ex-vivo-Untersuchungen auf die klinische Situation kann jedoch nicht ohne Weiteres erfolgen. Zuvor sind In-vivo-Analysen der multipolaren RFA notwendig (99).

Das behandelte Lebergewebe einer In-situ-Ablation kann im Gegensatz zur chirurgischen Resektion nicht histologisch untersucht werden. Somit ist ein direkter Nachweis der vollständigen Tumordestruktion nicht möglich. Deshalb werden bildgebende Verfahren post ablationem für die

Beurteilung des Ablationserfolges eingesetzt (119). Beschreibungen der Ablationsform und Berechnungen der Ablationsvolumina durch die Bildgebung basieren vor allem auf makroskopischen Analysen (81, 103, 119, 123). Eine Validierung der makroskopischen Ergebnisse durch histologische Untersuchungen liegt bei der multipolaren RFA zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vor.

4.2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung einer temporären Unterbrechung der Leberperfusion (Pringle-Manöver) und der Effekt einer Abstandsverringering zwischen den einzelnen Applikatoren auf die multipolaren RFA anhand von In-vivo-Versuchen am Schweinmodell makroskopisch und histologisch evaluiert werden:

1. Ziel war die Validierung einer makroskopischen Ablationsflächenauswertung der multipolaren RFA anhand von histologischen Schnitten. Dafür wurde ein Vergleich der Ablationsgeometrien sowie der charakteristischen Ablationszonen der RFA („White Zone“ und „Red Zone“; siehe 1.5.2) qualitativ und quantitativ in der Makroskopie und Histologie durchgeführt. Mit diesen Ergebnissen soll zukünftig eine präzisere Beurteilung des Ablationserfolges in experimentellen Studien ermöglicht werden.

2. Zusätzlich hatte die vorliegende Analyse die Untersuchung des klinisch relevanten Kühleffektes zum Ziel, um das Risiko für Tumorrezidive nach einer multipolaren RFA einschätzen zu können. Hierfür wurden Lebergefäße sowohl innerhalb des Ablationszentrums als auch in der Ablationsperipherie ausgewertet. Zudem wurde dabei der Einfluss der Gefäßart und der des Gefäßdurchmessers auf den Ablationserfolg einer multipolaren RFA beurteilt.

Die multipolare RFA soll mit Hilfe der vorliegenden Arbeit reproduzierbarer und besser planbar werden, um betroffenen Patienten einen optimalen Therapieerfolg zukommen zu lassen.

4.3 Makroskopische Ablationsauswertung der multipolaren Radiofrequenzablation im Vergleich zur Histologie

Die Bewertung des Therapieerfolges einer RFA kann nur indirekt über bildgebende Verfahren erfolgen. Prä- und postinterventionelle mathematische Berechnungen der Ablationsflächen und Beschreibungen der Ablationsformen basieren überwiegend auf den Ergebnissen makroskopischer Auswertungen experimenteller Ex-vivo- oder In-vivo-Versuche (81, 92, 99, 119, 123). Folglich wird die Makroskopie in allen experimentellen Studien dazu verwendet, um den Ablationserfolg zu beurteilen. Bisher ist jedoch noch nicht nachgewiesen, ob die Makroskopie das vollständige Ausmaß einer multipolaren RFA exakt wiedergibt. Endgültige Aussagen über mögliche residuale

Tumorzellen sind letztlich allein durch eine histologische Untersuchung der Ablationen möglich (114, 124). Eine Validierung einer makroskopischen Ablationsauswertung durch die Histologie liegt nur für die bipolare, aber nicht für die multipolare RFA vor (114). Der Vergleich einer makroskopischen Analyse mit histologischen Schnitten ist deshalb für eine Beurteilung der multipolaren RFA erforderlich. Mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit kann die Ablationsauswertung zukünftiger experimenteller Studien präzisiert werden.

4.3.1 Korrelation zwischen makroskopischen und histologischen Ablationszonen

In der makroskopischen und histologischen Auswertung werden thermische Ablationszonen mit Hilfe einer standardisierten Terminologie eingeteilt (siehe 1.5.2) (49, 92). Von Bedeutung ist dabei die WZ, die den Tumor im klinischen Alltag zirkumferent umschließen sollte. In dieser Zone sollte es erwartungsgemäß zu einem vollständigen Strukturverlust und zur Destruktion aller malignen Zellen kommen (49, 122). Die sich der WZ anschließende RZ geht diffus in das native Lebergewebe über. Die RZ enthält sowohl vitale als auch avitale Zellanteile (49, 114). Mögliche Tumorresiduen sowie regionäre Tumorabsiedlungen in dieser Zone gefährden den Erfolg einer vollständigen RFA (86).

In allen Versuchsreihen konnte sowohl makroskopisch als auch histologisch eine WZ identifiziert werden. Zusätzlich zur WZ konnte nur bei den Versuchsreihen mit erhaltener Leberperfusion (Applikatorabstand von 15 mm und 20 mm) eine RZ unterschieden werden. Ferner korrelierten in diesen beiden Versuchsreihen die Werte für die Gesamtfläche (WZ + RZ), die Fläche der RZ und der WZ sowie für den maximalen Radius der WZ in der Makroskopie und Histologie miteinander (Korrelationskoeffizienten: 0,74 – 0,95; Tabelle 6). In Übereinstimmung mit einer In-vivo-Studie der bipolaren RFA von Gemeinhardt et al. wird somit auch in der vorliegenden Arbeit eine hohe Korrelation histologischer und makroskopischer Ablationszonen aufgezeigt (114). Eine makroskopisch gestützte zonale Gliederung und Flächenauswertung ist demnach bei der multipolaren RFA mit kontinuierlichem Gefäßfluss zulässig.

Die Bedeutung einer histologischen Analyse zeigt sich bei Durchführung eines Pringle-Manövers mit einem Applikatorabstand von 20 mm. Makroskopisch konnte analog zu den Versuchsreihen mit Gefäßfluss sowohl eine RZ als auch eine WZ identifiziert werden. Histologisch war jedoch lediglich eine WZ, aber keine RZ sichtbar. Die Fläche der histologischen WZ war um 44 % größer als makroskopisch angenommen (Tabelle 6). Makroskopische und histologische Daten korrelierten daher auch nicht miteinander. In einer Analyse der multipolaren RFA am Ex-vivo-Modell von Poch et al. findet sich möglicherweise eine Erklärung für das alleinige Bestehen einer WZ: Hier

konnte gezeigt werden, dass Ablationen bei fehlender Leberperfusion selbst bei einem maximalen Energieeintrag von 150 kJ nach zwei Stunden noch größer werden (115). Radiofrequenzablationen sind laut Literatur jedoch in ihrer Ausdehnung eingeschränkt (82, 90). So wird zu Beginn einer RFA nach einer starken Zunahme des Ablationsvolumens ein Gleichgewichtszustand („steady state“) erreicht. Dabei steigt die Temperatur im Gewebe so lange an, bis der Energieabtransport durch die Lebergefäße („heat sink effect“) dem Energieeintrag entspricht (82, 115). Mit Eintritt dieses Gleichgewichtszustandes ist das maximal mögliche Volumen einer Ablation erreicht. Im Vergleich zu ex vivo, trifft der Gleichgewichtszustand in vivo aufgrund des Energieverlustes durch die Körperoberfläche und die natürliche Leberperfusion voraussichtlich früher ein (115). Aufgrund des reduzierten Gefäßkühleffektes bei Durchführung eines Pringle-Manövers kommt dem Energieverlust durch die Körperoberfläche in vivo möglicherweise eine größere Bedeutung zu. So führt letzterer eventuell zu einem ausgeprägten Temperaturabfall, sodass die WZ fast übergangslos in das native Lebergewebe übergeht. Eine Übergangszone (RZ), bei der die Temperatur einer sicheren Zellzerstörung womöglich nur kurz erreicht wird, entsteht somit nicht. Weitere histologische In-vivo-Studien sind nötig, um die aufgezeigten Diskrepanzen zwischen der makroskopischen und histologischen Zoneneinteilung bei einem Pringle-Manöver zu untersuchen. Bis dahin sollte eine auf der Makroskopie basierende Kalkulation der Ablationsfläche mit dem Wissen erfolgen, dass die klinisch relevante WZ deutlich unterschätzt wird. Im klinischen Alltag würden Tumore bei Durchführung eines Pringle-Manövers unbewusst mit einem größeren Sicherheitsabstand ablatiert werden. Eine höhere therapeutische Sicherheit und eine damit einhergehende verbesserte Langzeitüberlebensrate können resultieren (71).

Eine zonale Einteilung der Radiofrequenzablationen wird lediglich in der Makroskopie und Histologie verwendet (49, 122). In der klinischen Situation spielt diese Gliederung eine untergeordnete Rolle, da zur Evaluation einer RF-Therapie in der Regel bildgebende Verfahren eingesetzt werden (44, 80, 81, 119, 137, 138). Bei Letzteren können Ablationen weder farblich noch strukturell in die typischen Ablationszonen (WZ, RZ) eingeteilt werden. In der CT hebt sich das Ablationsareal hypodens vom umliegenden Lebergewebe ab (137-139). Vereinzelt sind jedoch auch Hyperdensitäten aufgrund der bei einer RFA auftretenden Gewebenekrose und Hämorrhagie zu eruieren (137, 138). Nicht erfasstes Tumorgewebe kann gelegentlich in der Ablationsperipherie als hyperdenses Areal identifiziert werden (137). Die Ablationsfläche ist daher nicht immer eindeutig von benachbartem Leberparenchym und von etwaigen Tumorresiduen abgrenzbar (137, 140). In der klinischen Situation sind also Kalkulationsfehler der Ablationsfläche möglich, die infolgedessen mit einer Tumorpersistenz einhergehen können (121). Um die Ablationsbeurteilung

durch bildgebende Verfahren sicherer zu machen, vergleichen einige Studien daher die Ergebnisse einer makroskopischen Ablationsflächenberechnung mit den Resultaten einer Flächenbestimmung durch die CT oder MRT (81, 119). Laut aktueller Literatur kommt es dabei weitgehend zu einer zuverlässigen Übereinstimmung (49, 120, 122). Weitere experimentelle Untersuchungen sind erforderlich, um die gegenwärtigen Ergebnisse den vorhandenen CT-Aufnahmen gegenüberzustellen (siehe 2.5.2). Die genaue Kenntnis der Ablationsausdehnung durch histologische Analysen kann zukünftig im klinischen Alltag helfen, etwaige Fehlberechnungen des Ablationsvolumens durch bildgebende Verfahren zu reduzieren.

4.3.2 Quantitative Gegenüberstellung histologischer Ablationsflächen

Um Tumorgewebe vollständig zu abladieren, muss ein großes Ablationsvolumen mit ausreichendem Sicherheitsabstand erzeugt werden (24, 69, 78). Bestehen post ablationem vitale Tumorresiduen, ist die onkologische Sicherheit der RFA nicht mehr gewährleistet (81).

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals makroskopische und histologische Flächenberechnungen bei der multipolaren RFA miteinander verglichen. Im Vergleich eines engeren Applikatorabstandes von 15 mm mit einem Applikatorabstand von 20 mm zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Gesamtfläche (WZ + RZ) sowie der Fläche der RZ und WZ. Abweichungen des Applikatorabstandes scheinen also die Ablationsform (siehe 3.2.1, 4.3.3), jedoch nicht die Größe des Ablationsareals zu beeinflussen.

Untersuchungen der multipolaren RFA am Ex-vivo-Schweinemodell von Poch et al. ergaben, dass geringe Veränderungen des Applikatorabstandes (Applikatorabstand von 15 mm vs. 20 mm vs. 25 mm) bei Energieeinträgen zwischen 37,5 – 75,0 kJ weder eine Auswirkung auf die Ablationsgröße, noch auf den minimalen Ablationsradius haben (115). Es existiert folglich ein optimaler Energiebetrag, bei dem auch geringe Deviationen des Applikatorabstandes (± 5 mm) die Ablationsfläche einer multipolaren RFA nicht mehr signifikant beeinflussen (115). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Energiemenge von 50 kJ (siehe 2.3) erscheint angemessen, um bei Applikatorabständen von 15 mm und 20 mm ähnlich große Ablationsflächen zu erzielen. Es muss jedoch beachtet werden, dass trotz ähnlicher Ablationsfläche erhebliche Differenzen der Ablationsform zwischen einem Applikatorabstand von 15 mm und 20 mm auftreten können. So reicht der Energieeintrag in das Lebergewebe nur bei einem Applikatorabstand von 15 mm aus, um homogene und konfluierende Ablationen zu induzieren (siehe 4.3.3). In der klinischen Situation sollte daher auf eine exakte Applikatorpositionierung geachtet werden, um den therapeutischen Erfolg der multipolaren RFA zu sichern.

Neben einer quantitativen Flächenberechnung ist zudem eine qualitative Beurteilung der Ablationsgeometrie empfehlenswert, um die Radiofrequenzablationen auf Konfluenz und Homogenität zu untersuchen (81, 92). Dies ist klinisch besonders relevant, da nicht-konfluierende Ablationen - trotz eines als ausreichend befundenen Ablationsvolumens - aufgrund möglicher vitaler Zellen im Ablationszentrum ein Risiko für Tumorrezidive darstellen (69).

Die Analyse der vorliegenden Daten zeigt signifikante Unterschiede der Ablationsfläche bei der Anwendung eines Pringle-Manövers im Vergleich zu kontinuierlichem Gefäßfluss bei einem gleichbleibenden Applikatorabstand von 20 mm auf: So kann mit Hilfe eines Pringle-Manövers eine mehr als vierfache Steigerung der Gesamtfläche erzielt werden (Tabelle 6). Klinisch ist dadurch eine Ablation von Tumoren mit einem größeren Sicherheitsabstand beziehungsweise eine Ablation größerer Tumore mit einem weiterhin ausreichenden Sicherheitsabstand möglich.

Die Vergrößerung des Ablationsareals durch eine Gefäßokklusion wurde bereits in einer Vielzahl von makroskopischen RFA-Studien mit Pringle-Manöver beschrieben (47, 90, 98, 99, 104, 123). So demonstrierten Chang et al. in einer In-vivo-Untersuchung der monopolen RFA an Hauschweinen einen fast sechsfachen Anstieg des Ablationsvolumens von 4,9 cm³ auf 28,6 cm³ (104). Auch Chinn et al. und Frich et al. erreichten durch die Anwendung eines Pringle-Manövers eine annähernd dreifache Zunahme des Ablationsvolumens (90, 98). Grund dieser Effektivitätssteigerung ist der erheblich reduzierte Kühleffekt („heat sink effect“) intrahepatischer Blutgefäße und der daraus resultierende rapide Temperaturanstieg im Leberparenchym (123). Durch eine wesentlich höhere und gleichmäßigere Verteilung des Energieeintrages zwischen den Applikatoren wird die Größe und Form einer RFA positiv beeinflusst (100, 123, 141). Es muss jedoch beachtet werden, dass Temperaturen ab 100 °C eine Desikkation und Karbonisation des Lebergewebes begünstigen (50, 51). Die darauffolgende Abnahme der Gewebeleitfähigkeit kann die weitere Energieabgabe in das Leberparenchym durch den Anstieg des Gewebewiderstandes und der Gewebeimpedanz erschweren (50). Mittels des Gebrauches intern gekühlter Applikatoren und des im Generator installierten RCAP-Systems wurde diesem Effekt in der vorliegenden Arbeit entgegengesteuert (siehe 2.4) (61, 142). Große Ablationsvolumina gehen dennoch mit einer potenziellen Verletzung benachbarter Strukturen einher (44, 58, 98, 110). Hinzu kommt, dass ein Pringle-Manöver eine laparoskopische oder offenchirurgische Anwendung der RFA voraussetzt (43, 47, 123). Mit erhöhter Invasivität steigt entsprechend auch das Komplikationsrisiko des Eingriffes (58, 106, 107). Durch die Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr kann es zudem zu Schädigungen des Leberparenchyms kommen (108). In einigen Studien wird demzufolge ein intermittierendes Pringle-Manöver dem kontinuierlichen Pringle-Manöver vorgezogen (143). Durch kurze alternierende Phasen

eines Perfusionsstops und einer Reperfusion kann das Lebergewebe im Gegensatz zum kontinuierlichen Pringle-Manöver besser auf hypoxische Schäden reagieren (144). Dieses Verfahren der ischämischen Präkonditionierung stellt eine schonendere Alternative zum Pringle-Manöver dar (145, 146). Um dies zu bestätigen, sind weitere In-vivo-Versuche notwendig. Bis dahin sollte vor Durchführung eines Pringle-Manövers stets eine Risiko-Nutzen-Abwägung erfolgen.

Zusammenfassend kann die klinische Anwendung eines Pringle-Manövers aufgrund der Steigerung des Ablationsvolumens und der vermehrt homogenen Ablationen im Vergleich zu einer multipolaren RFA mit kontinuierlichem Gefäßfluss in einem höheren Therapieerfolg resultieren (90, 104, 105). Eine verbesserte lokale Tumorkontrolle sowie niedrigere Lokalrezidivraten sind demzufolge durch eine Unterbrechung der Blutzufuhr zu erwarten (90).

4.3.3 Qualitative Beurteilung der Ablationsform

Große, homogene und konfluierende Ablationsformen haben einen positiven prädiktiven Wert in Bezug auf das Langzeitergebnis einer RFA (81, 98). Ziel ist die Induktion annähernd sphärischer und reproduzierbarer Radiofrequenzablationen, um einer insuffizienten Überlappung von Ablations- und Tumolvolumen vorzubeugen.

Bei einem weiten Applikatorabstand von 20 mm mit Gefäßfluss sind sowohl makroskopisch als auch histologisch inhomogene Ablationsformen zu erwarten (Abbildung 22). In der vorliegenden Arbeit zeigten Ablationen bei diesem Applikatorabstand zum Teil jeweils drei einzelne, nicht-konfluierende Ablationsgeometrien auf, sodass innerhalb des zentral von den Applikatoren eingeschlossenen Bereiches erhebliche Kühleffekte zu erkennen waren (Abbildung 33). Die Distanz zwischen den Applikatoren (20 mm) ist demnach zu groß, um mögliche Kühleffekte im Ablationszentrum zu überwinden. Überdies führt ein zu weiter Applikatorabstand zu einer erheblichen Variabilität der Ablationsform. Die Reproduzierbarkeit der Ablationen bei einem Applikatorabstand von 20 mm und kontinuierlicher Leberperfusion muss trotz gleicher Leistungshöhe und Energiezufuhr (90 W, 50 kJ) in Frage gestellt werden. Im klinischen Alltag eignet sich ein Applikatorabstand von 20 mm folglich nicht, um Tumore mit kurativer Zielsetzung zu behandeln.

Eine Abstandsreduktion zwischen den Applikatoren von 20 mm auf 15 mm resultierte in 87,5 % in homogenen und konfluierenden Ablationen (Abbildung 22). Grund sind höhere Energiedichten infolge der verringerten Distanz zwischen den RF-Applikatoren (115). Die zugeführte Energie breitet sich gleichmäßiger im Lebergewebe aus und kann - im Gegensatz zu einem Applikatorabstand von 20 mm - auftretende Kühleffekte in der Ablationsmitte überwinden (115). Dies bedeutet, dass während einer multipolaren RFA mit kontinuierlichem Gefäßfluss auf eine exakte Platzierung

der Applikatoren geachtet werden muss. Dabei ist der Gebrauch einer Positionierungsschablone empfehlenswert (Abbildung 13), da sich bereits Abweichungen der Applikatorspitzen im Millimeterbereich (± 5 mm) wie in der hier beschriebenen Analyse negativ auf die Ablationskonfiguration auswirken können. Eine präzise Applikatorpositionierung ist klinisch also von sehr hoher Bedeutung.

Unter hepatischer Gefäßokklusion (Applikatorabstand von 20 mm, Pringle-Manöver) wurden sowohl in der Makroskopie als auch der Histologie in allen Fällen große, homogene Ablationen mit hoher Reproduzierbarkeit erzielt. Neben einer Reduktion des Applikatorabstandes eignet sich somit auch die Unterbrechung der hepatischen Blutperfusion dazu, konfluierende und runde Ablationen zu erreichen.

In der Literatur werden Änderungen der Ablationsform meist auf größere Lebergefäße in unmittelbarer Nähe zur Ablation zurückgeführt (Abbildung 5) (54, 91, 93, 116). Eine inhomogene, exzentrisch geformte Ablation durch fokale Einkerbung entsteht aufgrund einer höheren Wärmekapazität großer Gefäße und birgt die Gefahr einer unvollständigen Tumorkoagulation (91, 134). Diese lokalen Kühleffekte werden von diffusen Kühleffekten differenziert (134). Diffuse Kühleffekte sind durch die kapilläre Perfusion der Leber bedingt und wirken sich negativ auf die Ablationsgröße aus (47, 81, 95). Der lokale Kühleffekt ist besonders von individuellen Unterschieden der Gefäßanatomie abhängig. Bei einem Applikatorabstand von 20 mm und Gefäßfluss konnten im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsreihen (V2 / Applikatorabstand von 20 mm und Pringle-Manöver; V3 / Applikatorabstand von 15 mm mit kontinuierlichem Gefäßfluss) nicht vermehrt große Lebergefäße identifiziert werden, die für die beschriebenen Formabweichungen verantwortlich gemacht werden können. Daher muss vermutet werden, dass sich der Kühleffekt einzelner kapillärer Lebergefäße in unmittelbarer Nähe zum Applikator aufsummiert. Eine Fusion der einzelnen Ablationen zu einer konfluierenden Ablation (Abbildung 2c) wird folglich durch den diffusen Kühleffekt bei einem Applikatorabstand von 20 mm und kontinuierlicher Blutperfusion verhindert.

Zusammenfassend erscheint eine qualitative Beschreibung der Ablationsform (homogen, konfluierend / inhomogen, nicht-konfluierend) sinnvoll, um etwaige Irregularitäten offenzulegen, die mit einer alleinigen quantitativen Flächenvermessung nicht dargestellt werden können: Obwohl sich die Ablationsflächen bei einem Applikatorabstand von 20 mm und 15 mm nicht signifikant unterscheiden (siehe 4.3.2, Abbildung 26), kann eine multipolare RFA mit einem Applikatorabstand von 20 mm aufgrund der inhomogenen Ablationsgeometrie die vollständige Destruktion eines Malignoms in der klinischen Situation nicht sicherstellen. Folglich kann geschlussfolgert werden,

dass das Risiko einer Tumorpersistenz mit zunehmender Distanz zwischen den RF-Applikatoren steigt.

4.4 Der Einfluss von Lebergefäßen auf die multipolare Radiofrequenzablation

Große Lebergefäße in Applikatornähe stellen einen entscheidenden Risikofaktor für den Ablationserfolg nach einer RFA dar (47, 69, 91, 92, 94, 95, 133). Der vorhandene Gefäßfluss transportiert die induzierte Energie der RF-Applikatoren in Form von Wärme ab („heat sink effect“), so dass die Gefahr einer inkompletten Tumordestruktion besteht (43, 72, 93). Rezidivraten von bis zu 36,5 % können auftreten (47, 69). Um eine optimale Planung der multipolaren RFA sicherzustellen, muss der Gefäßkühleffekt unmittelbar um die Gefäße bekannt sein. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von Lebergefäßen auf multipolare RF-Ablationen detailliert untersucht.

4.4.1 Gefäßanalyse innerhalb der Idealläsion

Für eine onkologisch sichere Anwendung muss malignes Gewebe innerhalb des Ablationsareals vollständig zerstört werden (71, 81, 147). In der vorliegenden Arbeit befand sich jedoch vitales Leberparenchym um elf Gefäße, die sich in der klinisch relevanten WZ befanden (Tabelle 9). Die Mehrheit dieser Gefäße wurde am Zonenübergang der WZ in die RZ / natives Lebergewebe identifiziert, sodass hier ohnehin von einer partiellen Vitalfärbung auszugehen war. Der Durchmesser dieser zonenübergreifenden Gefäße war mehr als fünffach so groß wie der Durchmesser aller avitalen Gefäße in der WZ. Große Gefäße mit einem minimalen Gefäßdurchmesser von 2,6 mm (siehe 3.3.4) am Ablationsrand können folglich unabhängig des Applikatorabstandes oder der Durchführung eines Pringle-Manövers den Therapieerfolg einer multipolaren RFA gefährden. Um dies zu vermeiden, sollte im klinischen Alltag auf eine korrekte Platzierung der RF-Applikatoren um den Tumor herum geachtet werden (71, 115, 130). Wird das Maligom nicht zentral zwischen den Applikatoren eingeschlossen, kann Tumorgewebe aufgrund des Kühleffektes dieser peripher gelegenen Gefäße möglicherweise bestehen bleiben.

Eine zusätzliche Untersuchung der Gefäßwand zeigte bei allen elf partiell vitalen Lebergefäßen - unabhängig des Gefäßdurchmessers - eine Kontinuitätsunterbrechung des dreischichtigen Wandaufbaus oder eine Absenz der Zellintegrität (Abbildung 36). Im Gegensatz dazu konnte eine In-vivo-Analyse der monopolaren RFA von Lu et al. eine vollständige Endothelschädigung nur bei Lebergefäßen mit einem Durchmesser kleiner als 3 mm innerhalb des Ablationsareals nachweisen (91). Dennoch muss beachtet werden, dass eine Verletzung der Gefäßwand synchron mit vitalem

perivaskulären Gewebe vorkommen kann. In der klinischen Situation besteht daher trotz nachgewiesener Endothelschädigung dieser Gefäße die Gefahr der Tumorpersistenz. Laut Literatur kann bei 48 % aller perivaskulär gelegenen Malignome infolge einer unvollständigen Ablation innerhalb eines Jahres mit einem Lokalrezidiv gerechnet werden (93).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit legen zusätzlich nahe, dass während einer multipolaren RFA mit kontinuierlichem Gefäßfluss vitale Zellen im Ablationszentrum auftreten können. Bei einem Applikatorabstand von 20 mm zeigte bereits ein Gefäß mit einem Durchmesser von 0,8 mm partiell vitale Anteile auf (Abbildung 29). Eine erfolgreiche klinische Durchführung der multipolaren RFA mit einem Applikatorabstand von 20 mm und Gefäßfluss muss daher infrage gestellt werden. Bei einem engeren Applikatorabstand von 15 mm besteht die Gefahr perivaskulärer vitaler Zellen erst ab einem Gefäßdurchmesser $\geq 3,2$ mm (Abbildung 31). Befinden sich Gefäße mit diesem Durchmesser im Ablationszentrum, kann die optimale Durchführung einer multipolaren RFA in der klinischen Situation aufgrund des Risikos eines Tumorverbleibs nicht mehr sichergestellt werden. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch weder ein Tumormodell verwendet wurde noch eine Langzeitbeobachtung möglich war, müssen die genannten Schlussfolgerungen in weiteren Studien überprüft werden.

Um die Destruktion perivaskulärer Tumorzellen zu gewährleisten, empfehlen Lu et al. die vollständige Okklusion der Leberperfusion (91, 93). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass sich ein Pringle-Manöver eignet, um alle Gefäße (unabhängig ihres Durchmessers und des Gefäßtyps) sowie das perivaskuläre Lebergewebe in der zentralen WZ vollständig zu abladieren. Es kann daher angenommen werden, dass eine effektive und vollständige Tumorerstörung nur mittels eines Pringle-Manövers bei Durchführung einer multipolaren RFA im klinischen Alltag garantiert wird.

Alternativ wäre auch die Anwendung einer MWA denkbar, um die Destruktion von perivaskulärem Gewebe in der Ablationsmitte zu gewährleisten. Mikrowellen mit einer Frequenz von 900 – 2450 MHz werden über eine Antenne in den Tumor eingeführt (44, 148-150). Polare Moleküle werden durch das entstandene elektrische Feld zur Oszillation angeregt, was zu Reibung und schließlich zur Wärmeentstehung führt (43, 148). Aufgrund des schnelleren Temperaturanstieges im Leberparenchym wird in einigen Studien eine geringere Anfälligkeit der MWA gegenüber des vaskulären Kühleffektes im Vergleich zur RFA beschrieben (149-151). So kann laut Simon et al. und Carrafiello et al. trotz perivaskulärer Lokalisation und Lebergefäßdurchmessern über 3 mm eine vollständige Ablation sichergestellt werden (148, 152). Der Einfluss des vaskulären Kühleffektes auf die MWA ist jedoch nicht abschließend untersucht.

Neben dem Gefäßdurchmesser hat auch der Typ der Lebergefäße einen Einfluss auf die Entstehung von vaskulären Kühleffekten (69, 90, 95, 96, 153). Eine eindeutige Differenzierung von Lebervenen, Portalvenen und Portalarterien ist für die multipolare RFA in der vorliegenden Arbeit erstmals durchgeführt worden (Tabelle 8). Nichtsdestotrotz konnte der Einfluss eines einzelnen Gefäßes in Bezug auf die Ablationsgeometrie und -fläche aufgrund der engen anatomischen Verhältnisse nicht vollständig untersucht werden. Daher erfolgte die Auswertung der Portalvenen und Portalarterien zusammenfassend als Portalfeld (Abbildung 32). Bei einem Applikatorabstand von 20 mm und erhaltener Blutperfusion war die Gesamtanzahl und der Durchmesser der Lebervenen und Portalfelder innerhalb der Idealläsion vergleichbar. Es kann also nicht sicher geschlossen werden, ob Lebervenen oder Portalfelder zu gleichen Teilen für die Formaberrationen sowie die reduzierte Ablationsfläche verantwortlich gemacht werden können (Abbildung 32, Abbildung 33). Weitere In-vivo-Studien sind nötig, um den Einfluss von verschiedenen Lebergefäßen auf die multipolare RFA zu untersuchen.

Dementsprechende Analysen existieren bereits für die mono- und bipolare RFA (47, 90, 153). Durch eine alleinige Okklusion der Portalvene konnten Aschoff et al. an Hasenlebern eine 69%ige Vergrößerung des Ablationsdurchmessers im Vergleich zu den RFA mit kontinuierlicher Blutperfusion feststellen (13 mm vs. 22 mm) (153). Studien an der Schweineleber wiesen einen vergleichbaren Effekt einer Ligatur der Portalvene nach (90). Zudem beobachteten Bangard et al. im In-vivo-Schweinmodell, dass Ablationsvolumina bei kontinuierlichem Blutfluss in Lebervennähe um mehr als 60 % größer werden als in Portalvenennähe (96). Die Gefahr von möglichen Tumorresiduen stieg sowohl bei Aschoff et al. als auch bei Bangard et al. mit zunehmender Nähe zur Portalvene (69, 96, 153). In der vorliegenden Arbeit wurde bei den Versuchsreihen mit kontinuierlichem Gefäßfluss (Applikatorabstand von 15 mm und 20 mm) vitales Gewebe um insgesamt vier Portalfelder (80 % der vitalen Gefäße in der zentralen WZ, siehe 3.3.4) in unmittelbarer Nähe zum Ablationsmittelpunkt beobachtet. Möglicherweise stellen Portalfelder im Ablationszentrum also einen höheren Risikofaktor für den Erfolg einer multipolaren RFA mit kontinuierlichem Gefäßfluss dar als Lebervenen.

Aufgrund der geringen Anzahl partiell vitaler Portalfelder in der Ablationsmitte ist eine abschließende Aussage bezüglich des Kühleffektes dieser Gefäße durch die vorliegende Arbeit nicht sicher möglich (Abbildung 35). Da aber im Vergleich zu Lebervenen dennoch eine höhere Gefahr von vitalen Tumorresiduen besteht, sollten in der klinischen Praxis alle Portalfelder präinterventionell identifiziert werden (95). Mögliche Maßnahmen einer Effektivitätssteigerung (beispielsweise in Form eines Pringle-Manövers / längerer Elektroden / eines höheren Energieeintrages; siehe 4.4.2)

sollten evaluiert werden, um das Risiko vitaler Lebergefäße im Ablationszentrum bei einer multipolaren RFA mit kontinuierlicher Blutperfusion zu reduzieren (96).

Weiterführende Untersuchungen erscheinen zusätzlich aufgrund bestehender Unterschiede der Flusseigenschaften verschiedener Gefäßarten von Bedeutung. Die Blutperfusion der menschlichen Leber beträgt 1450 ml/min (154, 155). Davon fließen 1150 ml/min durch die Portalvene und 300 ml/min durch die Leberarterie. Eine Ex-vivo-Analyse der bipolaren RFA von Lehmann et al. an der Schweineleber belegte, dass bereits Gefäßflussraten ab 1 ml/min signifikante vaskuläre Kühleffekte mit sich bringen (94). Lehmann et al. stellten zudem fest, dass der maximale Kühleffekt bei 10 ml/min erreicht war und sich bis zu einer Flussrate von 1500 ml/min nicht mehr signifikant veränderte (94). Neben dem Gefäßdurchmesser und der Gefäßart kann also auch die Flussgeschwindigkeit Einfluss auf eine RFA nehmen (94, 134). Im klinischen Alltag ist prätherapeutisch daher die Kenntnis der intrahepatischen Gefäßanatomie und deren Einfluss auf den RFA-Ablauf entscheidend. Experimentelle Studien, welche die präzise Kalkulation auftretender Gefäßkühleffekte ermöglichen sind notwendig, um eine effiziente Durchführung des Therapievorhabens zu gewährleisten (125).

4.4.2 Analyse des Ablationsradius

Der prognostisch relevanteste Faktor für das Langzeitüberleben bei Tumorpatienten ist die vollständige Destruktion des malignen Gewebes (71, 72, 133). Da bei einer RFA im Vergleich zur Leberteilresektion keine histologische Schnellschnittuntersuchung erfolgen kann, muss die Induktion einer Koagulationsnekrose mit angemessenen Sicherheitssaum (5 – 10 mm) sichergestellt werden (31, 69, 71, 81). Dabei ist prätherapeutisch besonders die Kenntnis über die maximal mögliche Ausdehnung einer Ablation relevant, um einen Tumor in der klinischen Situation vollständig zu abladieren. Zusätzlich kann somit auch das Risiko einer Verletzung von nahegelegenen Strukturen eingeschätzt werden (92).

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit einem Applikatorabstand von 20 mm und kontinuierlichem Gefäßfluss keine Ablationen erreicht werden, die sich für eine vollständige Tumordestruktion eignen (siehe 3.2.1, 3.3.3). Der von den Applikatoren eingeschlossene Bereich geht bei einem Großteil der Ablationen mit einem beträchtlichen Kühleffekt einher, sodass bei klinischer Anwendung in diesem Areal ein Tumorrezidiv wahrscheinlich ist.

Bei Durchführung eines Pringle-Manövers waren histologisch alle Lebergefäße unabhängig ihres Durchmessers und Gefäßtyps (Lebervene, Portalfeld) bis zu einer Distanz von 16 mm vom Ablationsmittelpunkt vollständig avital (Abbildung 32). Mit einem Gesamtdurchmesser von 32 mm

könnten in der klinischen Situation somit Lebertumore kleiner als 2 cm mit einem Sicherheitsabstand von 0,5 cm sicher abladiert werden.

Analog zu den Ablationen eines Applikatorabstandes von 20 mm mit kontinuierlicher Leberperfusion wurden auch bei einem engeren Applikatorabstand von 15 mm vitale Gefäße im Ablationszentrum beobachtet. Im klinischen Alltag bestünde infolgedessen auch hier eine erhebliche Gefahr der Tumorpersistenz.

Um zukünftig alle Gefäße im Ablationszentrum bei kontinuierlicher Leberperfusion zu abladieren, sollte eine Alternation der Applikationsparameter evaluiert werden. So könnte beispielsweise die Verwendung von bipolaren RF-Applikatoren mit einer aktiven Elektrodenlänge von 40 mm statt 30 mm in Erwägung gezogen werden. Einen Vergleich zwischen verschiedenen Elektrodenlängen führten Zurbuchen et al. bei der bipolaren RFA am Ex-vivo-Modell an Rinderlebern durch (156). Dabei wurden die größten Ablationsvolumina bei 40 mm langen Elektroden beobachtet (20562 mm^3) (156). Im Vergleich dazu resultierten Elektrodenlängen von 20 mm und 30 mm bei gleicher Ausgangsleistung (20 W) in signifikant kleineren Ablationsvolumina (4008 mm^3 beziehungsweise 14538 mm^3) (156). Zurbuchen et al. fanden zusätzlich heraus, dass sich eine zu hohe Ausgangsleistung unabhängig der Elektrodenlänge negativ auf das Ablationsvolumen auswirkt. Ähnliche Ergebnisse konnten auch von Clasen et al. anhand von Ex-vivo-Untersuchungen der multipolaren RFA an Schweinelebern nachgewiesen werden (87, 157). In seiner Analyse war eine Steigerung des Leistungseintrages $\geq 125 \text{ W}$ mit einer zu hohen Wärmedeposition in das Lebergewebe assoziiert (157). Die daraus folgende Dehydration führte laut der Studie zu einer Reduktion der Gewebeleitfähigkeit und schlussendlich zu kleineren und teilweise nicht-konfluierende Ablationen (87, 157).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Startleistung von 90 W gewählt. Eine Erhöhung der Startleistung (bis auf $< 125 \text{ W}$) sollte in zukünftigen Analysen evaluiert werden, um möglicherweise einen höheren Ablationserfolg der multipolaren RFA mit kontinuierlichem Gefäßfluss zu erzielen (157). Die Ergebnisse des Ex-vivo-Modells von Clasen et al. sind letztendlich nur eingeschränkt auf In-vivo-Untersuchungen übertragbar (87, 157). Weitere In-vivo-Studien sind erforderlich, um eine Alternation der Applikationsparameter zu untersuchen. Dabei sollte einerseits der Gebrauch längerer Elektroden und andererseits eine Steigerung der Ausgangsleistung evaluiert werden, um zukünftig eine vollständige Zerstörung aller vitalen Zellen in der Ablationsmitte bei kontinuierlichem Gefäßfluss zu erreichen.

4.5 Limitationen der vorliegenden Arbeit

4.5.1 Segmentierung der Ablationen

Der Flächenvergleich der Makroskopie mit der Histologie zeigte eine Variabilität zwischen den Korrelationskoeffizienten auf (0,74 – 0,95, Tabelle 6). Aufgrund der Größe der Ablationen musste eine Segmentierung in mehrere kleine Ablationsblöcke erfolgen, um eine histologische Auswertung zu ermöglichen (siehe 2.5.3). Die Rekonstruktion der zerteilten Ablationsblöcke zu einer vollständigen Ablation erfolgte orientierend am Ablationsrand. Eine mögliche Abnahme der Präzision während der histologischen Ablationsflächenvermessung muss somit in Betracht gezogen werden. Da die Ablationen jedoch für die Anfertigung histologischer Dünnschnittpräparate der Größe eines Standardobjektträgers entsprechen mussten, wurde mit der vorliegenden Ablationssegmentierung die bestmögliche Methode ausgewählt.

4.5.2 Verwendung einer Idealläsion

Um mögliche Kühleffekte quantitativ zu erfassen, wurde in der vorliegenden Arbeit für jede der drei Versuchsreihen eine eigene sphärische Idealläsion anhand der makroskopischen Ablationen konstruiert (siehe 2.7.4). Damit wurde ein standardisiertes Auswertungsverfahren gewährleistet. Die Möglichkeit eines statistischen Vergleiches zwischen den Versuchsreihen fiel durch die Verwendung drei verschiedener Idealläsionen jedoch weg.

Es muss zusätzlich beachtet werden, dass Kühleffekte methodisch bedingt in jeder Idealläsion zu erwarten waren. Aufgrund der nicht vollständig runden Ablationsgeometrie bei der multipolaren RFA (Abbildung 2, Abbildung 21) konnte sich natives Lebergewebe innerhalb der Idealläsion befinden und so zu einer vermeintlichen Kühlfläche führen (Abbildung 27). Die Erstellung von drei einzelnen runden Idealläsionen erschien aufgrund der Variabilität der Ablationsformen zwischen den drei Versuchsreihen dennoch sinnvoll. Da Malignome in der klinischen Praxis meist rund / oval sind, ist daher auch die Verwendung einer sphärischen Idealläsion vertretbar.

4.5.3 Das Schwein als Tiermodell

Die RFA wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits umfänglich an Ex-vivo-Schweinelebern untersucht (94, 114, 130, 134). Hausschweine haben sich aufgrund ihrer zum Menschen ähnlichen anatomischen, genetischen und physiologischen Eigenschaften als Tierversuchsmodelle bewährt (158, 159). Zahlreiche Studien verwenden Schweine, um die Ätiologie und Pathogenese humaner Erkrankungen zu erforschen (158, 160, 161). Nach derzeitigem Erkenntnisstand existieren bisher

keine Tumormodelle für das Hausschwein. In der vorliegenden Arbeit wurde daher gesunde Schweineleber verwendet.

Im Rahmen tumoröser Prozesse unterliegt die humane Leber allerdings fibrotischen oder zirrhotischen Veränderungen (4). Zurbuchen et al. untersuchten die elektrischen und thermischen Eigenschaften von nativem Lebergewebe im Vergleich zu humanen Lebermetastasen (162). Es konnte nachgewiesen werden, dass hepatische Tumorzellen unabhängig der eingesetzten Frequenz eine höhere elektrische Leitfähigkeit aufzeigen als gesunde Zellen (162, 163). Grund dafür ist, dass nekrotisches Gewebe im Gegensatz zu gesunden Leberzellmembranen die Fähigkeit zur elektrischen Isolation verliert (163). Zusätzlich führt eine erhöhte Mikroperfusion des neoplastischen Gewebes sowie dessen Sensibilität gegenüber Temperaturveränderungen zu einer Beeinflussung des elektrischen Widerstandes (92). Unvorhersehbare Ablationsflächenveränderungen können resultieren (42, 98, 162). Mit einem gesunden Schweinmodell wurden infolgedessen heterogene Tumorgewebeeigenschaften vermieden. Dennoch können durch die Kenntnis der elektrischen und thermischen Eigenschaften von nativem und malignem Lebergewebe möglicherweise mathematische Umrechnungen erfolgen, um die vorliegenden Daten auf ein Tumormodell zu übertragen (162).

4.6 Schlussfolgerung

Mit dieser experimentellen Arbeit wurde erstmalig eine vollständige qualitative und quantitative Analyse multipolarer Radiofrequenzablationen anhand von In-vivo-Versuchen am Schweinmodell durchgeführt. Ziel war es, eine makroskopische Ablationsauswertung anhand der Histologie zu validieren (**1.**) und mit einer zusätzlichen Auswertung dieser histologischen Schnitte, den Einfluss der Lebergefäße auf den Ablationserfolg der multipolaren RFA zu evaluieren (**2.**).

1. Die vorliegende Studie legt nahe, dass eine makroskopische Flächenvermessung bei Radiofrequenzablationen mit kontinuierlicher Blutperfusion als vollständig valide angesehen werden kann. Bei Durchführung eines Pringle-Manövers ist zu beachten, dass eine makroskopische Auswertung die Ablationsfläche deutlich unterschätzt. Im klinischen Alltag ist daher ein größeres Ablationsareal zu erwarten. Tumore werden infolgedessen mit einem größeren Sicherheitsabstand ablatiert, sodass insgesamt eine höhere therapeutische Sicherheit resultiert.

In weiteren experimentellen Analysen sollte der Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit den Daten einer Flächenberechnung durch bildgebende Verfahren erfolgen.

2. Zusätzlich kann geschlossen werden, dass Gefäße im Ablationszentrum bei Durchführung einer multipolaren RFA mit kontinuierlicher Leberperfusion bereits ab einem Durchmesser von

0,8 mm eine partielle Vitalität aufzeigen können. In der klinischen Praxis geht vitales perivaskuläres Gewebe im Ablationszentrum mit einem erheblichen Tumorrezidivrisiko einher. Obwohl eine Reduktion des Applikatorabstandes zu vermehrt homogenen, konfluierenden Ablationen führt, sollte eine Alternation der Methodik in zukünftigen In-vivo-Studien der multipolaren RFA untersucht werden: Möglicherweise eignen sich eine Steigerung der Ausgangsleistung oder der Elektrodenlänge, um vitale Zellen in der Ablationsmitte bei engerem Applikatorabstand erfolgreich zu abladieren. Bis dahin wird die Anwendung eines Pringle-Manövers empfohlen, da ausschließlich reproduzierbare und konfluierende Ablationen resultieren, die zudem zu einer vollständigen Destruktion des Lebergewebes einschließlich der Gefäße führen. Im klinischen Kontext können dementsprechend bei Durchführung eines Pringle-Manövers mit einem Applikatorabstand von 20 mm und einem Energieeintrag von 50 kJ Tumore kleiner als 2 cm mit einem Sicherheitsabstand von 0,5 cm effektiv abladiert werden. Aufgrund der erhöhten Invasivität sollte die Entscheidung zu einer Gefäßokklusion jedoch stets im multidisziplinären Konsens getroffen werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):359-86.
3. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2003;362(9399):1907-17.
4. Leitlinienprogramm Onkologie (AMWF DKeV, Deutsche Krebsgesellschaft e.V.). Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Langversion 1.0 Berlin 2013 (Accessed January 3, 2020 at: https://www.dgvs.de/wp-content/uploads/2016/11/S3-HCC-OL-Langversion_V1.0.pdf).
5. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol.* 2006;45(4):529-38.
6. Herold G. Tumoren der Leber. In: Herold G, editor. *Innere Medizin.* Köln: Gerd Herold Verlag; 2016. p. 566-7.
7. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
8. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2012;379(9822):1245-55.
9. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet.* 2005;366(9493):1303-14.
10. Tyson GL, El-Serag HB. Risk Factors of Cholangiocarcinoma. *J Hepatol.* 2011;54(1):173-84.
11. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019;144(8):1941-53.
12. Zangos S, Mack MG, Straub R, Eichler K, Engelmann K, Woitaschek D, Balzer JO, Vogl TJ. Transarterielle Chemoembolisation (TACE) bei sekundären Lebertumoren. In: Vogl TJ, Mack

MG, Balzer JO, editors. *LeberMetastasen: Diagnose - Intervention - Therapie*. Heidelberg: Springer-Verlag 2002. p. 290.

13. Engels K, Kriener S, Hansmann ML. Epidemiologie und Pathologie von Lebermetastasen. In: Vogl TJ, Mack MG, Balzer JO, editors. *LeberMetastasen: Diagnose - Intervention - Therapie*. Heidelberg: Springer-Verlag; 2002. p. 1-2.

14. Ananthakrishnan A, Gogineni V, Saeian K. Epidemiology of Primary and Secondary Liver Cancers. *Semin Intervent Radiol*. 2006;23(1):47-63.

15. Leitlinienprogramm Onkologie der Wissenschaftlichen und Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF), Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Krebshilfe D. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, Januar 2019 Berlin 2019 (Accessed December 29, 2019 at: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OL1_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf).

16. Adam R, Vinet E. Regional treatment of metastasis: surgery of colorectal liver metastases. *Ann Oncol*. 2004;15(4):103-6.

17. Schlag PM, Benhidjeb T, Stroszczyński C. Resection and local therapy for liver metastases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002;16(2):299-317.

18. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg*. 2006;244(2):254-9.

19. Stangl R, Altendorf-Hofmann A, Charnley RM, Scheele J. Factors influencing the natural history of colorectal liver metastases. *Lancet*. 1994;343(8910):1405-10.

20. Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2016;150(4):835-53.

21. Reiser M, Kuhn FP, Debus J. Leber, biliäres System, Pankreas, Milz. In: Reiser M, Kuhn FP, Debus J, editors. *Duale Reihe Radiologie* 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2004. p. 474-5.

22. Schulz A, Viktil E, Godt JC, Johansen CK, B. DJ, Holtedahl JE, Labori KJ, Bach-Gansmo T, Klow NE. Diagnostic performance of CT, MRI and PET/CT in patients with suspected colorectal liver metastases: the superiority of MRI. *Acta Radiol*. 2015;57(9):1040-8.

23. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. The Barcelona Approach: Diagnosis, Staging, and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Liver Transpl*. 2004;10(2):115-20.

24. Forner A, Gilibert M, Bruix J, Raoul J-L. Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(9):525-35.

25. Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2005;25(2):181-200.
26. Hackl C, Gerken M, Loss M, Klinkhammer-Schalke M, Piso P, Schlitt HJ. A population-based analysis on the rate and surgical management of colorectal liver metastases in Southern Germany. *Int J Colorectal Dis.* 2011;26(11):1475-81.
27. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park J-W, Patel T, Pawlik TM, Gores GJ. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol.* 2014;60(6):1268-89.
28. van Amerongen MJ, van der Stok EP, Futterer JJ, Jenniskens SF, Moelker A, Grunhagen DJ, Verhoef C, de Wilt JH. Short term and long term results of patients with colorectal liver metastases undergoing surgery with or without radiofrequency ablation. *Eur J Surg Oncol.* 2016;42(4):523-30.
29. Nielsen K, Scheffer HJ, Volders JH, van der Vorst MJ, van Tilborg AA, Comans EF, de Lange-de Klerk ES, Sietses C, Meijer S, Meijerink MR, van den Tol MP. Radiofrequency Ablation to Improve Survival After Conversion Chemotherapy for Colorectal Liver Metastases. *World J Surg.* 2016;40(8):1951-8.
30. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. Analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg.* 1999;230(3):309-18.
31. Chen HW, Liao S, Lau WY, Wang FJ, Deng FW, Lai EC, Zhen ZJ. Prognostic impact of hepatic resection for hepatocellular carcinoma: the role of the surgeon in achieving R0 resection--a retrospective cohort study. *Int J Surg.* 2015;13:297-301.
32. Mayo SC, Pulitano C, Marques H, Lamelas J, Wolfgang CL, de Saussure W, Choti MA, Gindrat I, Aldrighetti L, Barrosso E, Mentha G, Pawlik TM. Surgical management of patients with synchronous colorectal liver metastasis: a multicenter international analysis. *J Am Coll Surg.* 2013;216(4):707-16; discussion 16-8.
33. Tranchart H, Chirica M, Faron M, Ballardur P, Lefevre LB, Svrcek M, de Gramont A, Tiret E, Paye F. Prognostic impact of positive surgical margins after resection of colorectal cancer liver metastases: reappraisal in the era of modern chemotherapy. *World J Surg.* 2013;37(11):2647-54.
34. Mullin EJ, Metcalfe MS, Maddern GJ. How much liver resection is too much? *Am J Surg.* 2005;190(1):87-97.
35. Dimitroulis D, Damaskos C, Valsami S, Davakis S, Garmpis N, Spartalis E, Athanasiou A, Moris D, Sakellariou S, Kykalos S, Tsourouflis G, Garmpi A, Delladetsima I, Kontzoglou K,

Kouraklis G. From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world. *World J Gastroenterol.* 2017;23(29):5282-94.

36. Grundmann RT, Hermanek P, Merkel S. Diagnostik und Therapie von Lebermetastasen kolorektaler Karzinome - Workflow. *Zentralbl Chir.* 2008;133(3):267-84.

37. Mullen JT, Ribero D, Reddy SK, Donadon M, Zorzi D, Gautam S, Abdalla EK, Curley SA, Capussotti L, Clary BM, Vauthey JN. Hepatic insufficiency and mortality in 1,059 noncirrhotic patients undergoing major hepatectomy. *J Am Coll Surg.* 2007;204(5):854-62; discussion 62-4.

38. Schoenberg MB, Bucher JN, Vater A, Bazhin AV, Hao J, Guba MO, Angele MK, Werner J, Rentsch M. Resection or Transplant in Early Hepatocellular Carcinoma. *Dtsch Arztebl Int.* 2017;114(31-32):519-26.

39. Wicherts DA, de Haas RJ, Salloum C, Andreani P, Pascal G, Sotirov D, Adam R, Castaing D, Azoulay D. Repeat hepatectomy for recurrent colorectal metastases. *Br J Surg.* 2013;100(6):808-18.

40. Thelen A, Jonas S, Benckert C, Schumacher G, Lopez-Hänninen E, Rudolph B, U. N, Neuhaus P. Repeat liver resection for recurrent liver metastases from colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33(3):324-8.

41. Dodd GD, 3rd, Soulen MC, Kane RA, Livraghi T, Lees WR, Yamashita Y, Gillams AR, Karahan OI, Rhim H. Minimally invasive treatment of malignant hepatic tumors: at the threshold of a major breakthrough. *Radiographics.* 2000;20(1):9-27.

42. Gruber-Rouh T, Marko C, Thalhammer A, Nour-Eldin NE, Langenbach M, Beeres M, Naguib NN, Zangos S, Vogl TJ. Current strategies in interventional oncology of colorectal liver metastases. *Br J Radiol.* 2016;89(1064).

43. Pathak S, Jones R, Tang JM, Parmar C, Fenwick S, Malik H, Poston G. Ablative therapies for colorectal liver metastases: a systematic review. *Colorectal Dis.* 2011;13(9):252-65.

44. Habash WY, Bansal R, Krewski D, Alhafid HT. Thermal Therapy, Part III: Ablation Techniques. *Crit Rev Biomed Eng.* 2007;35(1-2):37-121.

45. Veltri A, Sacchetto P, Tosetti I, Pagano E, Fava C, Gandini G. Radiofrequency Ablation of Colorectal Liver Metastases: Small Size Favorably Predicts Technique Effectiveness and Survival. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2008;31(5):948-56.

46. Nguyen KT, Geller DA. RFA Historical Background In: Carr BI, editor. *Hepatoceccular Carcinoma: Diagnosis and Treatment.* 2nd ed. New York Humana Press 2010. p. 423-4.

47. Goldberg SN, Hahn PF, Tanabe KK, Mueller PR, Schima W, Athanasoulis CA, Compton CC, Solbiati L, Gazelle GS. Percutaneous radiofrequency tissue ablation: does perfusion-mediated tissue cooling limit coagulation necrosis? *J Vasc Interv Radiol*. 1998;9(1):101-11.
48. Vogl TJ, Mack M, Eichler K. Interventionelle Thermoablation von malignen Lebertumoren und Lebermetastasen: Vergleich von Radiofrequenzablation (RFA), laserinduzierter Thermotherapie (LITT) und Mikrowellenablation (MWA). *Hessisches Ärzteblatt*. 2011;10:606-16.
49. Ahmed M, Solbiati L, Brace CL, Breen DJ, Callstrom MR, Charboneau JW, Chen MH, Choi BI, de Baère T, Dodd GD, Dupuy DE, Gervais DA, Gianfelice D, Gillams AR, Lee FT, Leen E, Lencioni R, Littrup PJ, Livraghi T, Lu DS, McGahan JP, Meloni MF, Nikolic B, Pereira PL, Liang P, Rhim H, Rose SC, Salem R, Sofocleous CT, Solomon SB, Soulen MC, Tanaka M, Vogl TJ, Wood BJ, Goldberg SN, Ablation IWGoI-gT, Panel IOSFE, Radiology TACotSoI, Europe SoPCotCaIRSo. Image-guided Tumor Ablation: Standardization of Terminology and Reporting Criteria—A 10-Year Update. *Radiology*. 2014;273(1):241-60.
50. Goldberg SN. Radiofrequency tumor ablation: principles and techniques. *Eur J Ultrasound*. 2001;13(2):129-47.
51. Lencioni R, Crocetti L, Pina MC, Cioni D. Percutaneous image-guided radiofrequency ablation of liver tumors. *Abdom Imaging*. 2009;34(5):547-56.
52. Nguyen KT, Geller DA. Mechanism of Ablation. In: Carr BI, editor. *Hepatoceccular Carcinoma: Diagnosis and Treatment*. 2nd ed. New York: Humana Press; 2010. p. 424-6.
53. Feliberti EC, Wagman LD. Radiofrequency Ablation of Liver Metastases From Colorectal Carcinoma. *Cancer Control*. 2006;13(1):48-51.
54. Hansen PD, Rogers S, Corless CL, Swanstrom LL, Siperstein AE. Radiofrequency Ablation Lesions in a Pig Liver Model. *J Surg Res*. 1999;87(1):114-21.
55. Buscarini E, Savoia A, Brambilla G, Menozzi F, Reduzzi L, Strobel D, Hansler J, Buscarini L, Gaiti L, Zambelli A. Radiofrequency thermal ablation of liver tumors. *Eur Radiol*. 2005;15(5):884-94.
56. Frericks BB, Ritz JP, Roggan A, Wolf KJ, Albrecht T. Multipolar Radiofrequency Ablation of Hepatic Tumors: Initial Experience. *Radiology*. 2005;237(3):1056-62.
57. Goette A, Reek S, Klein HU, Geller JC. Case report: severe skin burn at the site of the indifferent electrode after radiofrequency catheter ablation of typical atrial flutter. *J Interv Card Electrophysiol*. 2001;5(3):337-40.

58. Mulier S, Mulier P, Ni Y, Miao B, Marchal G, De Wever I, Michel L. Complications of radiofrequency coagulation of liver tumours. *Br J Surg*. 2002;89(10):1206-22.
59. Osaki Y, Ikeda K, Izumi N, Yamashita S, Kumada H, Hatta S, Okita K. Clinical effectiveness of bipolar radiofrequency ablation for small liver cancers. *J Gastroenterol*. 2013;48(7):874-83.
60. Clasen S, Schmidt D, Dietz K, Boss A, Krober SM, Schraml C, Fritz J, Claussen CD, Pereira PL. Bipolar radiofrequency ablation using internally cooled electrodes in ex vivo bovine liver: prediction of coagulation volume from applied energy. *Invest Radiol*. 2007;42(1):29-36.
61. Celon AG Medical Instruments. Bipolar and Multipolar RFITT Ablation System. Teltow, Germany: Olympus Medical Systems Group; 2016.
62. Cartier V, Boursier J, Lebigot J, Oberti F, Fouchard-Hubert I, Aube C. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: Mono or multipolar? *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(3):654-60.
63. Peng ZW, Zhang YJ, Chen MS, Lin XJ, Liang HH, Shi M. Radiofrequency ablation as first-line treatment for small solitary hepatocellular carcinoma: Long-term results. *Eur J Surg Oncol*. 2010;36(11):1054-60.
64. Lencioni R, Cioni D, Crocetti L, Franchini C, Pina CD, Bartolozzi C. Early-Stage Hepatocellular Carcinoma in Patients with Cirrhosis: Long-term Results of Percutaneous Image-guided Radiofrequency Ablation. *Radiology*. 2005;234(3):961-70.
65. Sucandy I, Cheek S, Golas BJ, Tsung A, Geller DA, Marsh JW. Longterm survival outcomes of patients undergoing treatment with radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma and metastatic colorectal cancer liver tumors. *HPB* 2016;18(9):756-63.
66. Chen MS, Li JQ, Zheng Y, Gu RP, Liang HH, Zhang YQ, Lin XJ, Lau WY. A prospective randomized trial comparing percutaneous local ablative therapy and partial hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*. 2006;243(3):321-8.
67. Hocquelet A, Balageas P, Laurent C, Blanc JF, Frulio N, Salut C, Cassinotto C, Saric J, Possenti L, Bernard PH, Montaudon M, Trillaud H. Radiofrequency ablation versus surgical resection for hepatocellular carcinoma within the Milan criteria: A study of 281 Western patients. *Int J Hyperthermia*. 2015;31(7):749-57.
68. Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Izumi N, Ichida T, Kudo M, Ku Y, Sakamoto M, Nakashima O, Matsui O, Matsuyama Y. Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: a cohort study based on a Japanese nationwide survey. *J Hepatol*. 2013;58(4):724-9.

69. Mulier S, Ni Y, Jamart J, Ruers T, Marchal G, Michel L. Local Recurrence After Hepatic Radiofrequency Coagulation: Multivariate Meta-Analysis and Review of Contributing Factors. *Ann Surg.* 2005;242(2):158-71.
70. Hof J, Wertenbroek MW, Peeters PM, Widder J, Sieders E, de Jong KP. Outcomes after resection and/or radiofrequency ablation for recurrence after treatment of colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 2016;103(8):1055-62.
71. Wang X, Sofocleous CT, Erinjeri JP, Petre EN, Gonen M, Do KG, Brown KT, Covey AM, Brody LA, Alago W, Thornton RH, Kemeny NE, Solomon SB. Margin size is an independent predictor of local tumor progression after ablation of colon cancer liver metastases. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2013;36(1):166-75.
72. Liu CH, Yu CY, Chang WC, Dai MS, Hsiao CW, Chou YC. Radiofrequency ablation of hepatic metastases: factors influencing local tumor progression. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(9):3090-5.
73. Peng ZW, Lin XJ, Zhang YJ, Liang HH, Guo RP, Shi M, Chen MS. Radiofrequency ablation versus hepatic resection for the treatment of hepatocellular carcinomas 2 cm or smaller: a retrospective comparative study. *Radiology.* 2012;263(3):1022-33.
74. Siperstein AE, Berber E, Ballem N, Parikh RT. Survival After Radiofrequency Ablation of Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg.* 2007;246(4):216-24.
75. Mohkam K, Dumont PN, Manichon AF, Jouvret JC, Boussel L, Merle P, Ducerf C, Lesurtel M, Rode A, Mabrut JY. No-touch multibipolar radiofrequency ablation vs. surgical resection for solitary hepatocellular carcinoma ranging from 2 to 5cm. *J Hepatol.* 2018;68(6):1172-80.
76. Gillams A, Goldberg N, Ahmed M, Bale R, Breen D, Callstrom M, Chen MH, Choi BI, de Baere T, Dupuy D, Gangi A, Gervais D, Helmberger T, Jung EM, Lee F, Lencioni R, Liang P, Livraghi T, Lu D, Meloni F, Pereira P, Piscaglia F, Rhim H, Salem R, Sofocleous C, Solomon SB, Soulen M, Tanaka M, Vogl T, Wood B, Solbiati L. Thermal ablation of colorectal liver metastases: a position paper by an international panel of ablation experts, The Interventional Oncology Sans Frontieres meeting 2013. *Eur Radiol.* 2015;25(12):3438-54.
77. Gillams AR, Lees WR. Five-year survival in 309 patients with colorectal liver metastases treated with radiofrequency ablation. *Eur Radiol.* 2009;19(5):1206-13.
78. Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, Nagorney DM, Ng IO, Ikai I, Yamaoka Y, Belghiti J, Lauwers GY, Poon RT, Abdalla EK. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2005;11(9):1086-92.

79. Ko S, Jo H, Yun S, Park E, Kim S, Seo HI. Comparative analysis of radiofrequency ablation and resection for resectable colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol.* 2014;20(2):525-31.
80. Pereira PL. Actual role of radiofrequency ablation of liver metastases. *Eur Radiol.* 2007;17(8):2062-70.
81. Mulier S, Ni Y, Miao Y, Rosiere A, Khoury A, Marchal G, Michel L. Size and geometry of hepatic radiofrequency lesions. *Eur J Surg Oncol.* 2003;29(10):867-78.
82. Crezee J, Lagendijk JJ. Temperature uniformity during hyperthermia: the impact of large vessels. *Phys Med Biol.* 1992;37(6):1321-37.
83. Kim JH, Won HJ, Shin YM, Kim KA, Kim PN. Radiofrequency Ablation for the Treatment of Primary Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *AJR Am J Roentgenol.* 2011;196(2).
84. Chevallier P, Baudin G, Anty R, Guibal A, Chassang M, Avril L, Tran A. Treatment of hepatocellular carcinomas by thermal ablation and hepatic transarterial chemoembolization. *Diagn Interv Imaging.* 2015;96(6):637-46.
85. Ikeda K, Seki T, Umehara H, Inokuchi R, Tamai T, Sakaida N, Uemura Y, Kamiyama Y, Okazaki K. Clinicopathologic study of small hepatocellular carcinoma with microscopic satellite nodules to determine the extent of tumor ablation by local therapy. *Int J Oncol.* 2007;31(3):485-91.
86. Sasaki A, Kai S, Iwashita Y, Hirano S, Ohta M, Kitano S. Microsatellite distribution and indication for locoregional therapy in small hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2005;103(2):299-306.
87. Clasen S, Schmidt D, Boss A, Dietz K, Krober SM, Claussen CD, Pereira PL. Multipolar radiofrequency ablation with internally cooled electrodes: experimental study in ex vivo bovine liver with mathematic modeling. *Radiology.* 2006;238(3):881-90.
88. Seror O, N'Kontchou G, Ibraheem M, Ajavon Y, Barrucand C, Ganne N, Coderc E, Trinchet JC, Beaugrand M, Sellier N. Large (≥ 5.0 -cm) HCCs: multipolar RF ablation with three internally cooled bipolar electrodes--initial experience in 26 patients. *Radiology.* 2008;248(1):288-96.
89. N'Kontchou G, Nault JC, Sutter O, Bourcier V, Coderc E, Grando V, Nahon P, Ganne-Carrie N, Diallo A, Sellier N, Seror O. Multibipolar Radiofrequency Ablation for the Treatment of Mass-Forming and Infiltrative Hepatocellular Carcinomas > 5 cm: Long-Term Results. *Liver Cancer.* 2019;8(3):172-85.

90. Chinn SB, Lee FT, Jr., Kennedy GD, Chinn C, Johnson CD, Winter TC, 3rd, Warner TF, Mahvi DM. Effect of vascular occlusion on radiofrequency ablation of the liver: results in a porcine model. *AJR Am J Roentgenol*. 2001;176(3):789-95.
91. Lu DS, Raman SS, Vodopich DJ, Wang M, Sayre J, Lassman C. Effect of vessel size on creation of hepatic radiofrequency lesions in pigs: assessment of the "heat sink" effect. *AJR Am J Roentgenol*. 2002;178(1):47-51.
92. Mulier S, Ni Y, Frich L, Burdio F, Denys AL, De Wispelaere JF, Dupas B, Habib N, Hoey M, Jansen MC, Lacrosse M, Leveillee R, Miao Y, Mulier P, Mutter D, Ng KK, Santambrogio R, Stippel D, Tamaki K, van Gulik TM, Marchal G, Michel L. Experimental and Clinical Radiofrequency Ablation: Proposal for Standardized Description of Coagulation Size and Geometry. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(4):1381-96.
93. Lu DS, Raman SS, Limanond P, Aziz D, Economou J, Busuttil R, Sayre J. Influence of Large Peritumoral Vessels on Outcome of Radiofrequency Ablation of Liver Tumors. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2003;14(10):1267-74.
94. Lehmann KS, Poch FG, Rieder C, Schenk A, Stroux A, Frericks BB, Gemeinhardt O, Holmer C, Kreis ME, Ritz JP, Zurbuchen U. Minimal vascular flows cause strong heat sink effects in hepatic radiofrequency ablation ex vivo. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2016;23(8):508-16.
95. Frericks BB, Ritz JP, Albrecht T, Valdeig S, Schenk A, Wolf KJ, Lehmann K. Influence of intrahepatic vessels on volume and shape of percutaneous thermal ablation zones: in vivo evaluation in a porcine model. *Invest Radiol*. 2008;43(4):211-8.
96. Bangard C, Gossmann A, Kasper HU, Hellmich M, Fischer JH, Hölscher A, Lackner K, Stippel DL. Experimental radiofrequency ablation near the portal and the hepatic veins in pigs: differences in efficacy of a monopolar ablation system. *J Surg Res*. 2006;135(1):113-9.
97. Kietzmann T. Tumorwachstum, Tumorangiogenese und Metastasierung In: Püschel G, Kühn H, Kietzmann T, Höhne W, Christ B, Doenecke D, et al., editors. *Taschenlehrbuch Biochemie 1*. Stuttgart Georg Thieme Verlag KG; 2011. p. 490-1.
98. Frich L, Mala T, Gladhaug IP. Hepatic radiofrequency ablation using perfusion electrodes in a pig model: effect of the Pringle manoeuvre. *Eur J Surg Oncol*. 2006;32(5):527-32.
99. Patterson EJ, Scudamore CH, Owen DA, Nagy AG, Buczkowski AK. Radiofrequency ablation of porcine liver in vivo: effects of blood flow and treatment time on lesion size. *Ann Surg*. 1998;227(4):559-65.

100. Shen P, Fleming S, Westcott C, Challa V. Laparoscopic radiofrequency ablation of the liver in proximity to major vasculature: effect of the Pringle maneuver. *J Surg Oncol.* 2003;83(1):36-41.
101. Pringle JH. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg.* 1908;48(4):541-9.
102. Man K, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Wong J. Tolerance of the Liver to Intermittent Pringle Maneuver in Hepatectomy for Liver Tumors *Arch Surg.* 1999;134(5):533-40.
103. Vahldiek JL, Lehmann KS, Poch F, Zurbuchen U, Kreis ME, Gemeinhardt O, Hamm B, Niehues SM. Measuring and optimizing results in multipolar RFA: Techniques and early findings in an experimental setting. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;58(1):77-87.
104. Chang CK, Hendy MP, Smith JM, Recht MH, Welling RE. Radiofrequency ablation of the porcine liver with complete hepatic vascular occlusion. *Ann Surg Oncol.* 2002;9(6):594-8.
105. Denys AL, De Baere T, Mahe C, Sabourin JC, Sa Cunha A, Germain S, Roche A. Radiofrequency tissue ablation of the liver: effects of vascular occlusion on lesion diameter and biliary and portal damages in a pig model. *Eur Radiol.* 2001;11(10):2102-8.
106. van Gulik TM, de Graaf W, Dinant S, Busch OR, Gouma DJ. Vascular occlusion techniques during liver resection. *Dig Surg.* 2007;24(4):274-81.
107. van Riel WG, van Golen RF, Reiniers MJ, Heger M, van Gulik TM. How much ischemia can the liver tolerate during resection? *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2016;5(1):58-71.
108. Dello SA, Reisinger KW, van Dam RM, Bemelmans MH, van Kuppevelt TH, van den Broek MA, Olde Damink SW, Poeze M, Buurman WA, Dejong CH. Total intermittent Pringle maneuver during liver resection can induce intestinal epithelial cell damage and endotoxemia. *PLoS One.* 2012;7(1).
109. Ypsilantis P, Lambropoulou M, Anagnostopoulos C, Tsigalou C, Vasiliadis C, Kortsaris A, Papadopoulos N, Simopoulos C. Pringle maneuver exacerbates systemic inflammatory response and multiple-organ injury induced by extended liver radiofrequency ablation. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30(11):1855-64.
110. Rhim H, Lim HK, Kim YS, Choi D, Lee WJ. Radiofrequency ablation of hepatic tumors: lessons learned from 3000 procedures. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(10):1492-500.
111. Wong SL, Mangu PB, Choti MA, Crocenzi TS, Dodd GD, Dorfman GS, Eng C, Fong Y, Giusti AF, Lu D, Marsland TA, Michelson R, Poston GJ, Schrag D, Seidenfeld J, Benson AB. American Society of Clinical Oncology 2009 clinical evidence review on radiofrequency ablation of hepatic metastases from colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(3):493-508.

112. Curley SA, Davidson BS, Fleming RY, Izzo F, Stephens LC, Tinkey P, Cromeens D. Laparoscopically guided bipolar radiofrequency ablation of areas of porcine liver. *Surg Endosc.* 1997;11(7):729-33.
113. Cheung TT, Ng KK, Chok KS, Chan SC, Poon RT, Lo CM, Fan ST. Combined resection and radiofrequency ablation for multifocal hepatocellular carcinoma: prognosis and outcomes. *World J Gastroenterol.* 2010;16(24):3056-62.
114. Gemeinhardt O, Poch FG, Hiebl B, Kunz-Zurbuchen U, Corte GM, Thieme SF, Vahldiek JL, Niehues SM, Kreis ME, Klopffleisch R, Lehmann KS. Comparison of bipolar radiofrequency ablation zones in an in vivo porcine model: Correlation of histology and gross pathological findings. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2016;64(3):491-9.
115. Poch FGM, Rieder C, Ballhausen H, Knappe V, Ritz JP, Gemeinhardt O, Kreis ME, Lehmann KS. Finding Optimal Ablation Parameters for Multipolar Radiofrequency Ablation. *Surg Innov.* 2017;24(3):205-13.
116. Bitsch RG, Dux M, Helmberger T, Lubienski A. Effects of vascular perfusion on coagulation size in radiofrequency ablation of ex vivo perfused bovine livers. *Invest Radiol.* 2006;41(4):422-7.
117. Denys AL, De Baere T, Kuoch V, Dupas B, Chevallier P, Madoff DC, Schnyder P, Doenz F. Radio-frequency tissue ablation of the liver: in vivo and ex vivo experiments with four different systems. *Eur Radiol.* 2003;13(10):2346-52.
118. Kim YN, Rhim H, Choi D, Kim YS, Lee MW, Chang I, Lee WJ, Lim HK. The effect of radiofrequency ablation on different organs: ex vivo and in vivo comparative studies. *Eur J Radiol.* 2011;80(2):526-32.
119. Rathke H, Hamm B, Guettler F, Lohneis P, Stroux A, Suttmeier B, Jonczyk M, Teichgraber U, de Bucourt M. Volume comparison of radiofrequency ablation at 3- and 5-cm target volumes for four different radiofrequency generators: MR volumetry in an open 1-T MRI system versus macroscopic measurement. *Biomed Tech (Berl).* 2015;60(6):521-31.
120. Goldberg SN, Gazelle GS, Compton CC, Mueller PR, Tanabe KK. Treatment of intrahepatic malignancy with radiofrequency ablation: radiologic-pathologic correlation. *Cancer.* 2000;88(11):2452-63.
121. Schraml C, Clasen S, Schwenzler NF, Koenigsrainer I, Herberts T, Claussen CD, Pereira PL. Diagnostic performance of contrast-enhanced computed tomography in the immediate assessment of radiofrequency ablation success in colorectal liver metastases. *Abdom Imaging.* 2008;33(6):643-51.

122. Goldberg SN, Grassi CJ, Cardella JF, Charboneau JW, Dodd GD, 3rd, Dupuy DE, Gervais DA, Gillams AR, Kane RA, Lee FT, Jr., Livraghi T, McGahan J, Phillips DA, Rhim H, Silverman SG, Solbiati L, Vogl TJ, Wood BJ, Vedantham S, Sacks D, Society of Interventional Radiology Technology Assessment C, the International Working Group on Image-guided Tumor A. Image-guided tumor ablation: standardization of terminology and reporting criteria. *J Vasc Interv Radiol*. 2009;20(7 Suppl):S377-90.
123. Ritz JP, Lehmann KS, Isbert C, Reissfelder C, Albrecht T, Stein T, Buhr HJ. In-vivo evaluation of a novel bipolar radiofrequency device for interstitial thermotherapy of liver tumors during normal and interrupted hepatic perfusion. *J Surg Res*. 2006;133(2):176-84.
124. Lu DS, Yu NC, Raman SS, Limanond P, Lassman C, Murray K, Tong MJ, Amado RG, Busuttill RW. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: treatment success as defined by histologic examination of the explanted liver. *Radiology*. 2005;234(3):954-60.
125. Lehmann KS, Ritz JP, Valdeig S, Schenk A, Holmer C, Peitgen HO, Buhr HJ, Frericks BB. Portal vein segmentation of a 3D-planning system for liver surgery - in vivo evaluation in a porcine model. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(7):1899-907.
126. Welsch U, Deller T. Leber und Gallenwege In: Welsch U, editor. *Lehrbuch Histologie 3*. München Urban & Fischer 2010 p. 334.
127. Anderson JK, Baker M, Jaffers O, Pearle MS, Lindberg GL, Cadeddu JA. Time course of nicotinamide adenine dinucleotide diaphorase staining after renal radiofrequency ablation influences viability assessment. *J Endourol*. 2007;21(2):223-7.
128. Song KD, Lee MW, Rhim H, Kang TW, Cha DI, Yang J. Chronological changes of radiofrequency ablation zone in rabbit liver: an in vivo correlation between gross pathology and histopathology. *Br J Radiol*. 2017;90(1071).
129. Neumann RA, Knobler RM, Pieczkowski F, Gebhart W. Enzyme histochemical analysis of cell viability after argon laser-induced coagulation necrosis of the skin. *J Am Acad Dermatol*. 1991;25(6 Pt 1):991-8.
130. Poch FG, Rieder C, Ballhausen H, Knappe V, Ritz JP, Gemeinhardt O, Kreis ME, Lehmann KS. The vascular cooling effect in hepatic multipolar radiofrequency ablation leads to incomplete ablation ex vivo. *Int J Hyperthermia*. 2016;32(7):749-56.
131. Poch FGM, Neizert CA, Gemeinhardt O, Geyer B, Eminger K, Rieder C, Niehues SM, Vahldiek J, Thieme SF, Lehmann KS. Intermittent Pringle maneuver may be beneficial for radiofrequency ablations in situations with tumor-vessel proximity. *Innov Surg Sci*. 2018;3(4):245-51.

132. Wilkins LR, Wu H, Haaga JR, Exner A. Radiofrequency ablation: effect of tumor- and organ-specific pharmacologic modulation of arterial and portal venous blood flow on coagulation diameter in an N1-S1 tumor model. *J Vasc Interv Radiol*. 2012;23(6):826-32.
133. Napoleone M, Kielar AZ, Hibbert R, Saif S, Kwan BY. Local tumor progression patterns after radiofrequency ablation of colorectal cancer liver metastases. *Diagn Interv Radiol*. 2016;22(6):548-54.
134. Lehmann KS, Ritz JP, Valdeig S, Knappe V, Schenk A, Weihusen A, Rieder C, Holmer C, Zurbuchen U, Hoffmann P, Peitgen HO, Buhr HJ, Frericks BB. Ex situ quantification of the cooling effect of liver vessels on radiofrequency ablation. *Langenbecks Arch Surg*. 2009;394(3):475-81.
135. Welp C, Siebers S, Ermert H, Werner J. Investigation of the influence of blood flow rate on large vessel cooling in hepatic radiofrequency ablation. *Biomed Tech (Berl)*. 2006;51(5-6):337-46.
136. Huang HW. Influence of blood vessel on the thermal lesion formation during radiofrequency ablation for liver tumors. *Med Phys*. 2013;40(7):073303.
137. Park MH, Rhim H, Kim YS, Choi D, Lim HK, Lee WJ. Spectrum of CT findings after radiofrequency ablation of hepatic tumors. *Radiographics*. 2008;28(2):379-90; discussion 90-2.
138. Sainani NI, Gervais DA, Mueller PR, Arellano RS. Imaging after percutaneous radiofrequency ablation of hepatic tumors: Part 1, Normal findings. *AJR Am J Roentgenol*. 2013;200(1):184-93.
139. Ippolito D, Fior D, Bonaffini PA, Capraro C, Leni D, Corso R, Sironi S. Quantitative evaluation of CT-perfusion map as indicator of tumor response to transarterial chemoembolization and radiofrequency ablation in HCC patients. *Eur J Radiol*. 2014;83(9):1665-71.
140. Ippolito D, Bonaffini PA, Capraro C, Leni D, Corso R, Sironi S. Viable residual tumor tissue after radiofrequency ablation treatment in hepatocellular carcinoma: evaluation with CT perfusion. *Abdom Imaging*. 2013;38(3):502-10.
141. Burdio F, Guemes A, Burdio JM, Navarro A, Sousa R, Castiella T, Cruz I, Burzaco O, Guirao X, Lozano R. Large hepatic ablation with bipolar saline-enhanced radiofrequency: an experimental study in in vivo porcine liver with a novel approach. *J Surg Res*. 2003;110(1):193-201.
142. Ni Y, Miao Y, Mulier S, Yu J, Baert AL, Marchal G. A novel "cooled-wet" electrode for radiofrequency ablation. *Eur Radiol*. 2000;10(5):852-4.

143. Boyko VV, Pisetska ME, Tyshchenko OM, Skoryi DI, Kozlova TV, Gorgol NI, Volchenko IV. Role of ischemic preconditioning in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014;3(4):179-84.
144. Belghiti J, Noun R, R M, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous Versus Intermittent Portal Triad Clamping for Liver Resection. *Ann Surg.* 1999;229(3):369-75.
145. Cheng XD, Jiang XC, Liu YB, Peng CH, Xu B, Peng SY. Effect of ischemic preconditioning on P-selectin expression in hepatocytes of rats with cirrhotic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2003;9(10):2289-92.
146. Chiappa A, Makuuchi M, Zbar AP, Biella F, Vezzoni A, Pozzi S, Andreoni B. Comparison of continuous versus intermittent hepatic pedicle clamping in an experimental model. *Hepato-gastroenterology.* 2001;48(41):1416-20.
147. Lemke J, Cammerer G, Ganser J, Scheele J, Xu P, Sander S, Henne-Bruns D, Kornmann M. Survival and Prognostic Factors of Colorectal Liver Metastases After Surgical and Nonsurgical Treatment. *Clin Colorectal Cancer.* 2016;15(4):e183-e92.
148. Simon CJ, Dupuy DE, Mayo-Smith WW. Microwave ablation: principles and applications. *Radiographics.* 2005;25 Suppl 1:S69-83.
149. Brace CL. Microwave ablation technology: what every user should know. *Curr Probl Diagn Radiol.* 2009;38(2):61-7.
150. Poulou LS, Botsa E, Thanou I, Ziakas PD, Thanos L. Percutaneous microwave ablation vs radiofrequency ablation in the treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015;7(8):1054-63.
151. Wright AS, Sampson LA, Warner TF, Mahvi DM, Lee FT, Jr. Radiofrequency versus microwave ablation in a hepatic porcine model. *Radiology.* 2005;236(1):132-9.
152. Carrafiello G, Lagana D, Mangini M, Fontana F, Dionigi G, Boni L, Rovera F, Cuffari S, Fugazzola C. Microwave tumors ablation: principles, clinical applications and review of preliminary experiences. *Int J Surg.* 2008;6 Suppl 1:S65-9.
153. Aschoff AJ, Merkle EM, Wong V, Zhang Q, Medenz MM, Duerk JL, Lewin JS. How does alteration of hepatic blood flow affect liver perfusion and radiofrequency-induced thermal lesion size in rabbit liver? *J Magn Reson Imaging.* 2011;12(1):57-63.
154. Davies B, Morris T. Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans. *Pharma Res.* 1993;10(7):1093-5.
155. Lundgren O, Jodal M. Regional blood flow. *Annu Rev Physiol.* 1975;37:395-414.

156. Zurbuchen U, Frericks B, Roggan A, Lehmann K, Bossenroth D, Buhr HJ, Ritz JP. Ex vivo evaluation of a bipolar application concept for radiofrequency ablation. *Anticancer Res.* 2009;29(4):1309-14.
157. Clasen S, Rempp H, Schmidt D, Schraml C, Hoffmann R, Claussen CD, Pereira PL. Multipolar radiofrequency ablation using internally cooled electrodes in ex vivo bovine liver: correlation between volume of coagulation and amount of applied energy. *Eur J Radiol.* 2012;81(1):111-3.
158. Swindle MM, Smith AC. Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scand J Lab Anim Sci.* 1998;25(1):11-21.
159. Martins AC, Machado MA, Ferraz AA. Porcine liver: experimental model for the intra-hepatic glissonian approach. *Acta Cir Bras.* 2008;23(2):204-7.
160. Douglas WR. Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, *sus scrofa*, in human medical research. *Space Life Sci.* 1972;3(3):226-34.
161. Vodicka P, Smetana K, Jr., Dvorankova B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, Ourednik V, Motlik J. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1049:161-71.
162. Zurbuchen U, Poch FG, Gemeinhardt O, Kreis ME, Niehues SM, Vahldieck JL, Lehmann KS. Determination of the electrical conductivity of human liver metastases: impact on therapy planning in the radiofrequency ablation of liver tumors. *Acta Radiol.* 2016;58(2):164-9.
163. Haemmerich D, Schutt DJ, Wright AW, Webster JG, Mahvi DM. Electrical conductivity measurement of excised human metastatic liver tumours before and after thermal ablation. *Physiol Meas.* 2009;30(4):459-66.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christina Ann Neizert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Histologische Auswertung der multipolaren Radiofrequenzablation am Schweinmodell in vivo“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Ort, Datum

Christina Ann Neizert

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Ich, Christina Ann Neizert, hatte folgenden Anteil an den nachfolgenden Publikationen:

Publikation 1

Poch FGM*, **Neizert CA***, Geyer B, Gemeinhardt O, Bruder L, Niehues SM, Vahldiek JL, Bresssem KK, Kreis ME, Lehmann KS

Influence of interapplicator distance on multibipolar radiofrequency ablation during physiological and interrupted liver perfusion in an in vivo porcine model

Sci Rep. 2020; 10(1): 16210, doi: 10.1038/s41598-020-71512-x.

Beitrag im Einzelnen:

Planung: Formulierung der wissenschaftlichen Fragestellung, Literaturrecherche

Methodische Durchführung: Histologische Dünnschnittanfertigung, histologische Färbung (Nicotinamidadenindinukleotid und Hämatoxylin-Eosin), Ablationsrekonstruktion mittels Bildbearbeitungsprogrammen

Datenerhebung: Konzepterstellung der Datenakquirierung, qualitative Bewertung der Ablationsgeometrie, quantitative Auswertung der Ablationsfläche

Datenauswertung: Durchführung der statistischen Auswertung mit anschließender Interpretation

Publikation: Geteilte Erstautorenschaft (*) mit gleichwertiger Beteiligung am Schreibprozess. Die Abbildungen 2 und 3 der Publikation basieren auf Abbildung 22 der vorliegenden Dissertation. Tabelle 1 der Publikation enthält die Daten der Tabelle 6.

Ort, Datum, Stempel

PD. Dr. med. Kai Lehmann

Ort, Datum

Christina Ann Neizert

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Vollständige Publikationsliste

Publikation 1

Poch FGM*, **Neizert CA***, Geyer B, Gemeinhardt O, Bruder L, Niehues SM, Vahldiek JL, Bresssem KK, Kreis ME, Lehmann KS

Influence of interapplicator distance on multibipolar radiofrequency ablation during physiological and interrupted liver perfusion in an in vivo porcine model

Sci Rep. 2020; 10(1): 16210, doi: 10.1038/s41598-020-71512-x.

Publikation 2

Poch FGM, Geyer B, **Neizert CA**, Gemeinhardt O, Niehues SM, Vahldiek JL, Frericks B, Kreis ME, Lehmann KS:

Periportal fields cause stronger cooling effects than veins in hepatic microwave ablation – an in vivo porcine study

Acta Radiol. 2020; Epub ahead of print, doi: 10.1177/0284185120928929.

Publikation 3

Geyer B, Poch FGM, Gemeinhardt O, **Neizert CA**, Niehues SM, Vahldiek JL, Klopffleisch R, Lehmann KS:

Microwave ablation zones are larger than they macroscopically appear - Reevaluation based on NADH vitality staining ex vivo

Clin Hemorheol Microcirc. 2019; 73(2): 371-378, doi: 10.3233/CH-190583.

Publikation 4

Poch FGM, **Neizert CA**, Gemeinhardt O, Geyer B, Eminger K, Rieder C, Niehues SM, Vahldiek JL, Thieme SF, Lehmann KS:

Intermittent Pringle maneuver may be beneficial for radiofrequency ablations in situations with tumor-vessel proximity

Innov Surg Sci. 2018; 3(4): 245-251, doi: 10.1515/iss-2018-0008.

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater PD Dr. med. Kai Lehmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit unter seiner Anleitung an einem relevanten experimentellen Forschungsprojekt beteiligt zu sein. Durch seine intensive Betreuung ist die erfolgreiche Fertigstellung der vorliegenden Arbeit erst möglich gewesen.

Ebenfalls außerordentlichen Dank möchte ich meinem Betreuer Dr. med. Franz Poch aussprechen, der mich während aller Phasen meiner Promotionszeit tatkräftig unterstützte und gewissenhaft beriet. Seinem großen Engagement, stetigen konstruktiven Feedback und motivierenden Zuspruch ist das Gelingen dieser Doktorarbeit geschuldet.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter des chirurgischen Forschungslabors für die freundliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere zu erwähnen ist Dr. med. vet. Beatrice Geyer, die mir oft während der praktischen Umsetzung dieses Forschungsprojektes unter die Arme griff.

Großen Dank auch an Dr. med. vet. Ole Gemeinhardt für seine Hilfsbereitschaft bei der histologischen Analyse. Frau Dipl.-Math. Andrea Stroux danke ich für die statistische Beratung.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Geschwistern Ashley und Nicholas Neizert für den kontinuierlichen Beistand und die vielen Korrekturvorschläge bedanken. Meinem Vater Christoph Neizert möchte ich diese Arbeit widmen. Ohne seine Unterstützung im Rahmen meiner Ausbildung und seinen Glauben an mich wäre die Erstellung dieser Promotion nicht möglich gewesen.