

2. Materialien und Methode

2.1 Evaluation eines intern gekühlten bipolaren Applikationssystems zur Radiofrequenztherapie von Lebertumoren an der gesunden Rinderleber ex-vivo

2.1.1 Zielsetzung der Versuchsreihe

Im Rahmen von Vorversuchen zu diesem Projekt wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische/Technische Physik und Lasermedizin des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin der Prototyp eines neuen Applikators zur bipolaren Radiofrequenztherapie in biologischem Gewebe entwickelt, der anschließend durch eine Firmenneugründung (Celon-AG, Teltow-Berlin) für den kommerziellen Markt weiterentwickelt wurde.

Ziel der im folgenden dargestellten Versuchsreihe war es, dieses Applikationssystem im Hinblick auf dessen Eignung zur Behandlung von Lebertumoren zu erproben. Dabei sollte insbesondere der Fragestellung nachgegangen werden, ob die bipolare Konfiguration des Applikationssystems es ermöglicht, ausreichend hohe Energiemengen interstitiell zu applizieren, um entsprechend große Schädigungsvolumina im Zielgewebe induzieren zu können. Diese Versuchsreihe erfolgte ex-vivo an gesunder Rinderleber, welche die Induktion ausreichend großer Läsionsvolumina zulässt.

2.1.2 Materialien

2.1.2.1 Hochfrequenzstrom - Generator

Der verwendete Hochfrequenzstrom-Generator war ein Leistungssteuergerät mit einer maximalen Ausgangsleistung von 250 W und einer Ausgangsfrequenz von 470 kHz. Es konnten 1-3 bipolare Applikatoren simultan an den Generator angeschlossen werden. Bei Anschluss von zwei Elektroden (entsprechend einem bipolaren Applikator) befand sich das Gerät im bipolaren Betriebszustand. Dem bipolaren Modus lag ein Regelalgorithmus zugrunde, welcher bei einsetzender Gewebedehydrierung und Anstieg der Gewebeimpedanz die Leistungsabgabe für 4 Sekunden unterbrach (resistance control automatic power „RCAP-Modus“) und anschließend die Leistungsabgabe wieder aktivierte. Die Endabschaltung erfolgte bei Überschreiten eines Widerstandsgrenzwertes von 500 Ω .

2.1.2.2 Arbeitsplatz

Der Hochfrequenzstrom floss im bipolaren Modus ausschließlich zwischen den im zu behandelnden Gewebe platzierten Elektroden. Eine Neutralelektrode war nicht notwendig. Das Leistungssteuergerät wertete zur Steuerung der Leistungsabgabe den Gewebewirkwiderstand und nicht die Gewebeimpedanz aus. Die Leistungssteuerung war somit unabhängig von den verwendeten Applikatoren und erfolgte stets reproduzierbar. Es wurde bei Leistungsabgabe die tatsächlich in das Gewebe eingebrachte Wirkleistung angezeigt, welche den therapeutischen Effekt bewirkte. Am Gerät selbst war nur die Leistungsstufe zu wählen und die Leistungsabgabe mit dem Fußschalter zu aktivieren. Die abgegebene Energiemenge sowie die Applikationsdauer wurden bei Aktivierung des Generators automatisch gemessen und am Gerät angezeigt (s. Abb. 1).



Abb. 1: Arbeitsplatz mit Laptop, Leistungssteuerungsgerät, Peristaltikpumpe und drei im Gewebe positionierten bipolaren Radiofrequenzapplikatoren

2.1.2.3 Bipolare Hochfrequenzstromelektrode

Es wurde eine bipolare, intern gekühlte, starre Koagulationselektrode verwendet (s. Abb. 2). Über die Zu- und Ablauföffnung der Elektrode konnte die interne Kühlung des gesamten Schaftes mit Kochsalzlösung erfolgen, wodurch eine zu rasche Erhitzung und Austrocknung des applikatornahen Gewebes verhindert werden sollte. Der Durchmesser der verwendeten Elektroden betrug 1,8 mm und die Schaftlänge 150 mm. Die aktive Länge einer Elektrode wurde von der Applikatorspitze bis zum Ende der zweiten Elektrode und dem Beginn des Isolators bemessen. Es kamen aktive Längen von 20 mm, 30 mm sowie 40 mm zum Einsatz.

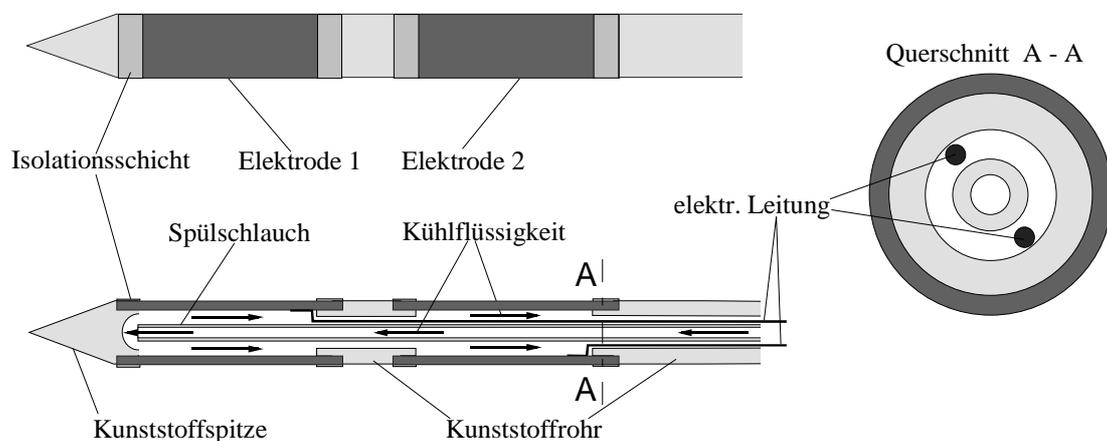


Abb. 2: Schematisch Darstellung des intern gekühlten bipolaren Applikators (oben: Außenansicht, unten: Längsschnitt, rechts: Querschnitt)

Den schematischen Aufbau einer bipolaren gekühlten starren Koagulationselektrode zeigt Abbildung 2. Die bipolare Konfiguration bestand aus zwei Edelstahlelektroden, die koaxial hintereinander angeordnet waren. Dazwischen befand sich ein Kunststoffisolator. Die Länge des Isolators betrug 10 % der aktiven Länge. Die Kühlflüssigkeit wurde durch ein zentrales Rohr bis an die Spitze des Applikators gepumpt und strömte an den Elektroden entlang wieder zurück zum proximalen Ende des Applikators. Die koaxiale Anordnung der Elektroden ermöglichte einen Hochfrequenzstromfluss, der zwischen den beiden isolatornahen Elektrodenenden begann und sich dann symmetrisch um die Elektroden herum ausbreitete.

2.1.2.4 Peristaltikpumpe

Für die kontinuierliche Aufrechterhaltung der internen Kühlung während der bipolaren Applikation wurde in allen Versuchen eine Peristaltikpumpe eingesetzt, die automatisch mit dem Ingangsetzen des Stromflusses im Applikator startete. Die Peristaltikpumpe bestand aus einer Rollenpumpe mit drei Pumpenrotoren (s. Abb. 3). Durch die Rollen der Pumpenrotoren wurden die eingelegten Schläuche so okkludiert, dass die darin vorhandene Flüssigkeit transportiert wurde. Die Schlauchpumpe ermöglichte den Transport flüssiger Medien ohne in Kontakt mit der Pumpe zu kommen. Die Flüssigkeitsfördermenge betrug 30 ml/min pro Rotor. Es wurde Kochsalzlösung für die Kühlung verwendet, welche sich in einem Kreislauf mit einem Behälter als Zwischenspeicher befand. Die Temperatur der Kühllösung betrug 20°C.

2.1.2.5 Gewebeproben (Rinderleber)

Als Versuchsmedium für die bipolaren Versuchsreihen wurde Rinderleber verwendet. Die Lebern waren post-mortem ca. 28h alt. Das Gewicht der Rinderlebern betrug im Durchschnitt 9 Kg. Die Organe wurden vom Fleischgroßmarkt (Beusselstrasse, Berlin) bezogen. Die Transportzeit vom Großmarkt bis zum Laborarbeitsplatz betrug 40 min und erfolgte in Polyethylenbeuteln, um das Gewebe vor Austrocknung zu schützen.

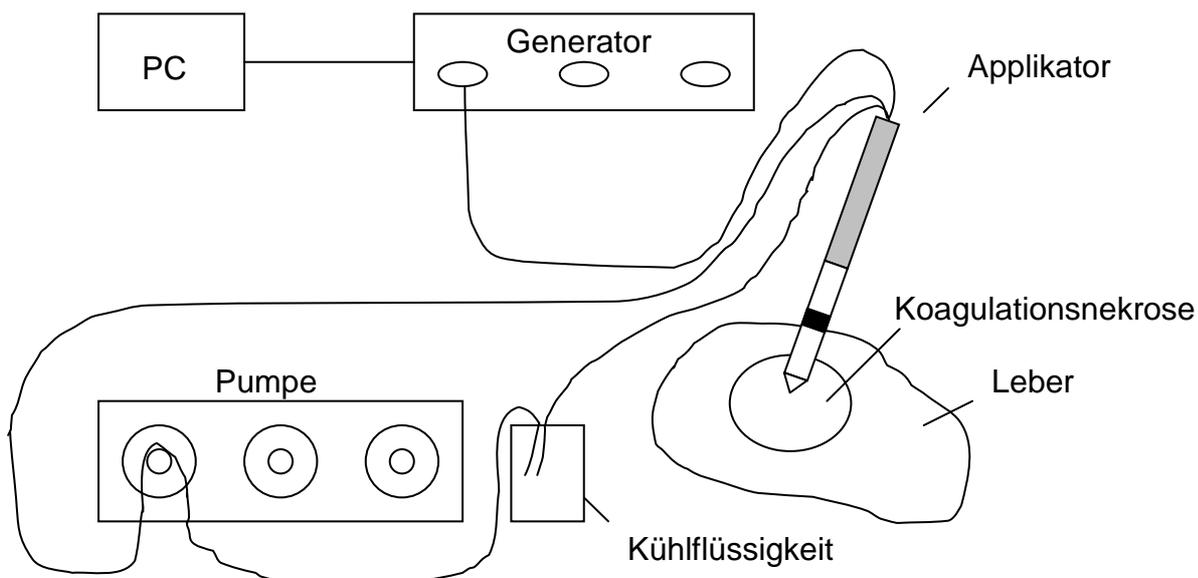


Abb. 3: Schematische Darstellung des Arbeitsplatzaufbaus während der bipolaren Radiofrequenztherapie

2.1.3 Methoden

2.1.3.1 Gewebevorbereitung und Präparation

Im direkten Anschluss an den Transport wurden die Lebern im geschlossenen Polyethylenbeutel im Wasserbad auf eine konstante Ausgangstemperatur von ca. 20°C temperiert. Die Positionierung der Koagulationselektroden wurde so ausgewählt, dass um die Elektroden an der breitesten Stelle des Lappens platziert wurden, um eine vollständige Koagulation über die gesamte Lappenbreite zu verhindern. Zusätzlich wurde darauf geachtet, die Applikation nicht hilusnah durchzuführen, um so wenig Gefäße wie möglich im Koagulationsgebiet zu haben.

2.1.3.2 Versuchsdurchführung

Für den bipolaren Versuchsaufbau wurde ein an das Leistungssteuergerät eine bipolare Koagulationselektrode (2.1.2.3 und Abb. 3) angeschlossen. Nach der vollständigen Installation aller beteiligten Geräte erfolgte die Positionierung der bipolaren Koagulationselektrode mit einer aktiven Länge von 20, 30 oder 40 mm im gleichmäßig temperierten Gewebe. Die Punktion der Leber wurde so durchgeführt, dass eine zentrale intrahepatische Lage der Elektrode plus mindestens 2 cm Eindringtiefe gewährleistet war. Danach erfolgte die Applikation des Hochfrequenzstromes. Die Applikation wurde automatisch vom Gerät beendet, sobald ein Überschreiten des Widerstandsgrenzwertes von 500 Ω auftrat (s. 2.1.2.1; S. 26), was durch einen Signalton akustisch angezeigt wurde. Nach dem Ausschalten des Generators und der Pumpe wurde die Koagulationselektrode weitere 60 Sekunden zur Abkühlung im Gewebe belassen.

Die Messungen der vom Generator abgegebenen Leistung erfolgte jede Sekunde für die gesamte Dauer jeder einzelnen Applikation. Während der Versuchsdurchführung erfolgte die ständige Registrierung der zugeführten Energie und des Gewebewiderstandes, um die relative Austrocknung des Gewebes zu überprüfen. Die Einzelergebnisse jeder Messung wurden notiert und für die statistische Berechnung verwendet. Für die Versuche wurden Elektroden mit 20, 30 und 40 mm aktiver Länge eingesetzt. Es wurden jeweils 5 Messungen bei 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 und 50 W durchgeführt, wobei die Abschaltung durch das Leistungssteuergerät vorgegeben wurde (s. 2.1.2.1; S. 26). Bei einer Elektrodenlänge von 30

und 40 mm ergab sich bei einer Ausgangsleistung von 10 W keine komplette Koagulation, woraufhin diese Einstellung verworfen wurde (s. Tab. 1).

Applikator	Aktive Elektrodenlänge	Leistungseinstellungen (W)	n
Bipolar	20	10/ 15/ 20/ 25/ 30/ 35/ 40/ 45/ 50	45
Bipolar	30	15/ 20/ 25/ 30/ 35/ 40/ 45/ 50	40
Bipolar	40	15/ 20/ 25/ 30/ 35/ 40/ 45/ 50	40

Tab. 1 : Darstellung der bipolaren Versuchsreihen unter Berücksichtigung der verschiedenen Elektrodenlängen und Leistungseinstellungen

2.1.3.3 Präparation und Beurteilung der Gewebeproben

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

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

2.1.3.3.1 Makroskopische Beurteilung der Läsionen

Im Anschluss an jede bipolare Hochfrequenzstromapplikation erfolgte das Aufschneiden des Lebergewebes längs zur Applikatorachse, um das Ausmaß der Thermoläsion makroskopisch zu bestimmen. Die makroskopisch sichtbaren Gewebeeränderungen wurden in axialer und radialer Richtung zum Applikator mit einer Schieblehre vermessen. Aus diesen Daten wurden die Volumina der thermisch erzeugten Läsionen berechnet. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Formel zur Bestimmung des Volumens für Rotationsellipsoide ($V = 1/6 \pi \cdot Da \cdot Dr^2$).

2.1.3.3.2 Mikroskopische Beurteilung der Läsionen

Zur histologischen Aufarbeitung wurden 1 x 1 cm große Gewebelöcke vom Grenzbereich zwischen nativem Lebergewebe und der Läsion entnommen. Die Hälfte der Gewebeproben wurden einer Paraffineinbettung zugeführt, von den übrigen Gewebeproben wurden Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden zur Beurteilung mit zwei verschiedenen Färbemethoden behandelt: die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und die p-Nitrotetrazoliumblau-Färbung (NTB-Färbung). Für die Herstellung der *H&E-Präparate* wurde jeweils die Hälfte des die Läsion beinhaltenden Leberlappens in einer 10-%igen Formalinlösung für mindestens 1 Woche fixiert. Nach Paraffineinbettung wurden die Präparate mit einem Verschiebeschlitten-Mikrotom geschnitten und nach Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe alle histologischen Schnittpräparate eines Gewebelockes gefärbt.

Um vitales von irreversibel geschädigtem Lebergewebe abzugrenzen, wurde der enzymhistochemische Nachweis der NADH-Dehydrogenase mit dem Farbstoff p-Nitrotetrazoliumblau (NTB-Färbung) herangezogen. Diese Färbung zeigte an, ob auch in scheinbar ungeschädigten Zellbereichen noch volle Vitalität vorhanden war. Dazu wurde die Läsion auf Korkplättchen aufgebracht. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff (-176° C) tiefgefroren und bei -80° C gelagert. Von den Gewebelöcken wurden in einem Kryostatraum (2800 Frigocut N, Reichert - Jung) Schnitte von 10µm hergestellt. Nach Fixierung und Trocknung wurden die Schnitte in einen Inkubationskasten bei 37° C gebracht. Dann erfolgte das gleichmäßige Aufbringen des Inkuabationsmediums [NADPH 0,5 mg/ml, Phosphatpuffer 0,1 M (pH 7,4), Tetranitrotetrazoliumblau (TNBT) 1 mg/µl in organischem Lösungsmittel] und die Inkubation für 45 Minuten. Nach der Inkubation wurde das Medium abgossen, die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült und dann für 10 sec. in Aqua destillata bewegt. Zum Nachgasen wurden die Schnitte für 24 Stunden im Brutschrank (V 30, Memmert) belassen. Abschließend erfolgte das Eindecken der Schnitte mit Glyceringelatine. Die histologischen Schnittpräparate wurden von zwei unabhängigen Untersuchern lichtmikroskopisch beurteilt und photographisch dokumentiert.

2.1.3.4 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte PC-gestützt mit dem Statistikprogramm SPSS 11.5 für Windows 2000. Für die graphischen Darstellungen wurden Gruppenmittelwerte und

Standardabweichungen der Mittelwerte berechnet. Die statistische Analyse der Messergebnisse von den erzeugten Läsionsvolumina und den eingebrachten Energiemengen erfolgte mit Hilfe nichtparametrischer Tests und Regressionsanalysen.

Beim Vergleich der bipolaren Daten von Koagulationsvolumina und Energiemengen für die verschiedenen Elektrodenlängen 20, 30 und 40 mm wurde der Mann – Whitney – Test verwendet. Die Einzelauswertung der erzeugten Läsionsvolumina und eingebrachten Energien in den verschiedenen Versuchsreihen mit den unterschiedlichen Elektrodenlängen wurde mit Hilfe von Regressionsanalysen durchgeführt. Als signifikant wurde bei allen Ergebnissen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen [204].

2.2 Untersuchungen zur Effektivitätssteigerung bei der bipolaren Radiofrequenztherapie und laserinduzierten Thermotherapie von Lebermetastasen durch Unterbrechung der hepatischen Perfusion

2.2.1 Einfluss der kompletten und selektiven hepatischen Perfusionsunterbrechung auf das induzierbare Läsionsvolumen bei der bipolaren Radiofrequenztherapie und laserinduzierten Thermotherapie an der Schweineleber in-vivo

2.2.1.1 Zielsetzung der Versuchsreihe

Nachdem mit dem neuentwickelten Applikator für die bipolare Radiofrequenztherapie und dem bereits in früheren Studien entwickelten Applikator für die laserinduzierte Thermotherapie [9] zwei Systeme vorlagen, mit denen reproduzierbare Thermoläsionen im Lebergewebe ex-vivo induziert werden konnten, wurden die folgenden In-vivo Versuchsreihen durchgeführt. Hintergrund dieser Versuchsreihe war die Problematik, dass die mit einer Einzelapplikation induzierten Thermoläsionen unter klinischen Aspekten nur die Behandlung einer begrenzten Anzahl von Metastasen zulassen würden. Frühere Studien konnten weiterhin zeigen, dass der Kühleffekt der hepatischen Perfusion einen wesentlichen Einfluss auf die Größe der Thermoläsion hat und durch eine komplette Blutflussunterbrechung eine signifikante Vergrößerung der Thermoläsionen zu erzielen ist.

Ziel dieser Studie war es, den Effekt der bipolaren Radiofrequenztherapie und der laserinduzierten Thermotherapie in Kombination mit einer kompletten (Pringle-Manöver) oder selektiven (intraarterielle Applikation von Stärkemikrosphären) hepatischen Blutflussunterbrechung am Schweinelebermodell auf die induzierbare Läsionsgröße zu bestimmen sowie den Temperaturverlauf um den Applikator als Maß für die Effektivität der Wärmeausbreitung zu ermitteln. Hierbei sollte besonders der Fragestellung nachgegangen werden, welchen Effekt eine selektive arterielle Mikroembolisation der Leberperfusion auf die entstehenden Thermoläsionen hat. Diese Versuchsreihe erfolgte in-vivo am Schweinemodell unter Einsatz der bipolaren Radiofrequenztherapie (s. 2.2.1.2; S. 35) und der laserinduzierten Thermotherapie (s. 2.2.1.3; S. 39).

2.2.1.2 Einfluss der kompletten und selektiven hepatischen Perfusionsunterbrechung bei bipolarer Radiofrequenztherapie

2.2.1.2.1 Materialien

2.2.1.2.1.1 Radiofrequenz-Equipment

Zur Induktion der Thermoläsionen wurde ein intern gekühltes bipolares Radiofrequenzsystem verwendet, welches bereits in den Vorversuchen eingesetzt und dort ausführlich beschrieben wurde (s. 2.1.2.1 – 2.1.2.4; S. 26 ff.). Zum Einsatz in diesem Versuchsaufbau kamen bipolare Radiofrequenzstromelektroden mit einem Durchmesser von 3,0 mm, einer Gesamtlänge von 15 cm und einer aktiven Länge von 40 mm. Die Leistungsabgabe entsprach dem in den Vorversuchen beschriebenen Modus mit impedanzkontrollierter Leistungsabgabe (s. 2.1.2.1; S. 26). Zur Temperaturmessung während der RF-Applikation im Gewebe wurden flexible Nickel-Chrom-Nickel-Thermoelemente (Standard Integrated Thermocouple Thermocoax, Philips, 500 µm) verwendet. Die Temperaturentwicklung wurde automatisch jede Sekunde dokumentiert, beginnend 5 Minuten vor der Radiofrequenzablation. Der Abstand des Applikators vom Thermoelement betrug 10 mm. Um diesen Abstand sicher reproduzieren zu können, wurde eine spezielle Halte- und Einführungsschablone verwendet.

2.2.1.2.1.2 Intraoperativer Ultraschall

Die exakte intrahepatische Platzierung der Applikatoren und des Thermoelementes wurde mittels eines intraoperativen Ultraschalls überprüft und kontrolliert. Die sonographischen Untersuchungen wurden mit einem hochauflösenden Ultraschallgerät (Echocamera SSD-620, Aloka) und einem 7,5 MHz Linear-Scanner durchgeführt. Während der Applikation erfolgte über die gesamte Zeit die sonographische Darstellung der Applikatoren..

2.2.1.2.1.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere dieser Versuchsreihe dienten 12 deutsche männliche Hausschweine (Gewicht 30-40 kg, Alter 10-12 Wochen, Genehmigungsnummer LaGetSi Berlin: G 0015-02). Die Tiere erhielten eine Standarddiät und wurden zum Tag des Experiments nüchtern gelassen. Die Auswahl der Versuchstierspezies Schwein erfolgte aufgrund der Ähnlichkeiten

der Leber des Schweines zur menschlichen Leber im histomorphologischen Aufbau und in den optischen Gewebeparameter [271]. Darüber hinaus wurde aufgrund der zu erwartenden Dimensionen der maximal induzierbaren Läsionsvolumina ein Versuchstier benötigt, dessen Lebervolumen dem des Menschen annähernd ähnelt.

2.2.1.2.1.4 Stärkemikrosphären (DSM)

Zur Unterbrechung des arteriellen Blutflusses erfolgte die Verwendung von Stärkemikrosphären (Spherex®, Pharmacia; Uppsala, Schweden). Hierbei handelte es sich um aus Stärke synthetisiertes, nicht immunogen wirksames Material (DSM = degradable starch microspheres). Durch Aufquellen in wässriger Phase erhielten die Mikrosphären geleeartige Eigenschaften, waren nicht völlig starr, sondern etwas deformierbar und konnten sich somit der Form der vaskulären Umgebung anpassen. Sowohl durch den Grad der Quervernetzung als auch durch die Teilchengröße lässt sich die Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaus durch die körpereigene α -Amylase steuern. Die in diesem Versuchsteil verwendete Mikrosphären wiesen einen mittleren Teilchendurchmesser von $45 \pm 7 \mu\text{m}$ auf. Unter physiologischen Bedingungen zeigten die Mikrosphären in-vitro eine Halbwertszeit von 20 bis 30 Minuten bei 37°C und pH 7.0. Nach etwa einer Stunde waren die Partikel vollständig abgebaut. Die Dauer der Okklusion ist linear von der Dosis abhängig. Aufgrund der Größe der Mikrosphären erfolgt die Okklusion in den Arteriolen nahe am kapillären Bett.

2.2.1.2.2 Methoden

2.2.1.2.2.1 Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden in einem voll ausgestatteten Tier-OP unter Verwendung standardmäßiger steriler chirurgischer Technik und Instrumente durchgeführt. Alle Experimente begannen nachdem die Tiere mit Ketamin (10 mg/kg i.m.) und Thiopental (10 mg/kg i.v.) narkotisiert wurden. Die Tiere wurden intubiert und beatmet. Die Beatmung erfolgte über einen Respirator (Sulla 808 V-D, Dräger) mit O_2 , N_2O , Halothan (1/2/0,8Vol.%). Die Tiere wurden in Rückenlage gelagert und fixiert und der Bauchraum zur optimalen Exposition der Leber durch eine Oberbauchquerlaparotomie eröffnet. Nach Lebermobilisierung wurden die Strukturen des hepatoduodenalen Bandes sowie die Arteria gastroduodenalis freipräpariert. Über eine Arteriotomie der Art. gastroduodenalis konnte ein

Silikonkatheter (Durchmesser 1.2 mm) bis zur Einmündung in die Arteria hepatica communis vorgeschoben und mit einer Ligatur (5-0 Vicryl) fixiert werden. Zur Überprüfung der korrekten Katheterlage und zum Ausschluss aberrierender Gefäße zum Magen erfolgte die Injektion von Blaulösung (10 ml Methylenblau, Verdünnung 1:1 mit NaCl-Lösung). Bei Anfärbung von aberrierenden Gefäßen zum Magen wurde diese selektiv ligiert. In der Pringle-Gruppe wurde das hepatoduodenale Ligament angeschlungen und unmittelbar vor Beginn der Applikation durch Setzen einer Klemme okkludiert. Der hepatische Blutfluss konnte unmittelbar nach Beendigung der Applikation freigegeben werden. Die mittlere Dauer des Pringle-Manövers betrug in dieser Versuchsreihe 800 ± 30 Sekunden. Pro Leber wurden drei RF-Applikationen im Abstand von mindestens 5 cm platziert, um eine Überschneidung der Läsionen zu verhindern. Nach jeder Applikation wurde 20 Minuten gewartet, bevor eine erneute Ablation begonnen wurde. Die RF-Applikation wurde mit einer Energie von 60 Watt begonnen, die Applikationsdauer wurde auf 720 Sekunden limitiert. Die eingebrachte Energiemenge und die Länge der Applikation wurde automatisch erfasst und angezeigt.

Nach Beendigung des Experimentes erhielten die Tiere eine letale intravenöse Bolusinjektion von Pentobarbital, ohne aus der Narkose zu erwachen. Die Leber wurde entfernt und längs zur Applikatorachse aufgeschnitten, um das Ausmaß der Thermoläsion makroskopisch zu bestimmen (s. 2.1.3.3.1; S. 31). Die Läsionen wurden longitudinal und transversal zur Applikatorachse vermessen und das Volumen der Läsion berechnet. Ein Effektivitätsindex wurde für jede Versuchsgruppe berechnet, um die Menge an Gewebe zu ermitteln (in ccm), welche durch Applikation einer definierten Menge von Energie (10 kJ) thermisch zerstört werden konnte.

2.2.1.2.2.2 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in eine Kontrollgruppe und zwei Versuchsgruppen von je 4 Tieren aufgeteilt.

In *Gruppe RF-I* (Kontrollgruppe, n = 4 Tiere) erfolgte keine Unterbrechung der hepatischen Perfusion. Nach Platzierung der RF-Applikatoren wurden die Thermoläsionen wie oben beschrieben induziert.

In *Gruppe RF-II* (Embolisation durch DSM, n = 4 Tiere) wurde die hepatische Perfusion durch intraarterielle Embolisation von abbaubaren Stärkemikrosphären unterbrochen. Der RF-Applikator und der arterielle Katheter wurden wie oben beschrieben eingebracht. Unmittelbar

vor dem Beginn der RF-Applikation wurden 450 mg DSM (7.5 ml Spherex®, Pharmacia&Upjohn, Erlangen, Germany) über den liegenden Katheter appliziert.

In *Gruppe RF-III* (Pringle-Manöver, n = 4 Tiere) wurde die hepatische Perfusion durch Anlegen des Pringle-Manövers für die Dauer der RF-Applikation wie beschrieben komplett unterbrochen.

2.2.1.2.2.3 Statistische Analyse

Die Mittelwerte und die Standardabweichung vom Mittelwert wurde aus der Gesamtzahl der induzierten Läsionen berechnet. Der Student-T-Test wurde angewendet, um die Unterschiede zwischen individuellen Effekten in der Gesamtgruppe oder in Subgruppen nachzuweisen. Eine Varianzanalyse erlaubte die simultane Untersuchung von beiden Effekten. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt [204].

2.2.1.3 Einfluss der kompletten und selektiven hepatischen Perfusionsunterbrechung bei laserinduzierter Thermotherapie

2.2.1.3.1 Materialien

2.2.1.3.1.1 Laser-Equipment

Analog zur bipolaren Radiofrequenztherapie wurde in diesem Versuchsteil ebenfalls ein intern gekühltes Applikationssystem verwendet (Somatex Power Laser, 9 French; s. Abb. 4). Das Laserlicht wurde durch ein flexibles 400- μ m Glasfaserkabel (Lichtwellenleiter) geleitet, welches an seinem distalen Ende mit einer diffus abstrahlenden Applikatorspitze als Streukörper versehen war (Diffuser-Tip-Applikator, Außendurchmesser 1,0 mm, aktive Länge 20 mm, Hüttinger Medizintechnik, Umkirch; s. Abb. 5 und 6). Für die Induktion der laserinduzierten Thermotherapie wurde ein Nd:YAG Laser (Wellenlänge 1064 nm, 5100 Fibertome; Dornier-Medizintechnik, München) in kontinuierlicher Abstrahlungscharakteristik verwendet (s. Abb. 7). Um den Energieverlust so gering wie möglich zu halten, wurde eine genaue Fokussierung des Laserstrahls auf das Zentrum der Faser (Quarkern) eingerichtet. Dies geschah durch eine Einkopplung, welche auf das proximale Ende des Lichtleiters aufgeklebt wurde. Sie ermöglichte die genaue Fixierung des Lichtwellenleiters im optischen Strahlengang und stellte die Verbindung zwischen Laser und Lichtleiter her. In den durchgeführten Versuchen kam ein axiales Einkopplungssystem zur Anwendung, welches den vom Laser emittierten Lichtstrahl in axialer Richtung auf die Eingangsfläche des Lichtwellenleiters lenkt. Das Applikatorsystem wurde intern gekühlt. Zur Kühlung wurde Kochsalzlösung (60ml/min) bei Raumtemperatur verwendet. Da die Laserausgangsleistung am Applikationssystem von entscheidender Bedeutung für den erzielbaren Therapieeffekt war, erfolgte vor jeder Applikation eine Leistungsmessung direkt am Applikationssystem. Zur Quantifizierung der faserbedingten Energieverluste bei der Applikation wurde daher ein Leistungsmessgerät, das nach dem Prinzip der Ulbricht-Kugel funktioniert, verwendet (My-Test, Hüttinger Medizintechnik, München). Dabei wurde durch Einbringen der Laserfaser in die Kugel und Applikation von Laserlicht ein leistungsabhängiges Strahlungsfeld, welches sich durch vielfache Reflexion an der hochreflektierenden Innenwand (15-schichtigen Barium-Sulfat Coating) aufbaut, mittels Photodiode gemessen. Die Temperaturmessung während der Ablation erfolgte wie unter 2.2.1.2.1.1 (S. 35) beschrieben mit Hilfe eines

flexiblen Thermoelements. Die Temperaturmessungen erfolgten im Abstand von 10 Sekunden und wurden manuell dokumentiert. Die Lage des Thermoelements und der Applikatoren wurde mit Hilfe eines intraoperativen Ultraschall überprüft und kontrolliert (s. 2.2.1.2.1.2; S. 35).

2.2.1.3.1.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dieser Versuchsreihe dienten 12 deutsche männliche Hausschweine (Gewicht 30-40 kg, Alter 10-12 Wochen, Genehmigungsnummer LaGetSi Berlin: 0015-02). Die Tiere erhielten eine Standarddiät und wurden am Tag des Experiments nüchtern gelassen.

2.2.1.3.2 Methoden

2.2.1.3.2.1 Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung entsprach der Vorgehensweise und Technik die für die In-vivo Versuche zur bipolaren Radiofrequenztherapie eingesetzt wurde (s. 2.2.1.2.2.1; S. 36). Pro Leber wurden drei Laserapplikationen im Abstand von mindestens 5 cm platziert, um eine Überschneidung der Läsionen zu verhindern. Die mittlere Dauer des Pringle Manövers betrug 900 ± 30 Sekunden. Nach jeder Applikation wurde 10 Minuten gewartet, bevor eine erneute Lasertherapie begonnen wurde. Die Eindringtiefe der Applikatoren im Lebergewebe betrug 50 ± 5 mm. Die Laserapplikation erfolgte bei 30 W für 900 Sekunden, entsprechend einer eingebrachten Energie von 27000 Joule. Nach Beendigung der Ablation wurde die Leber entnommen und die Thermoläsionen wie unter 2.1.3.3.1 (S. 31) beschrieben vermessen.

2.2.1.3.2.2 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in eine Kontrollgruppe und zwei Versuchsgruppen von je 4 Tieren aufgeteilt.

In *Gruppe LITT-I* (Kontrollgruppe, n = 4 Tiere) erfolgte keine Unterbrechung der hepatischen Perfusion. Nach Platzierung der Applikatoren wurden die Thermoläsionen wie oben beschrieben induziert.

In *Gruppe LITT-II* (Embolisation durch DSM, n = 4 Tiere) wurde die hepatische Perfusion durch intraarterielle Embolisation von abbaubaren Stärkemikrosphären unterbrochen. Der

Laserapplikator und der arterielle Katheter wurden wie oben beschrieben eingebracht. Unmittelbar vor dem Beginn der Laserapplikation wurden 450 mg DSM (7.5 ml Spherex®, Pharmacia&Upjohn, Erlangen, Germany) über den liegenden Katheter appliziert.

In *Gruppe LITT-III* (Pringle-Manöver, n = 4 Tiere) wurde die hepatische Perfusion durch Anlegen des Pringle-Manövers für die Dauer der Laserapplikation wie beschrieben komplett unterbrochen.

2.2.1.3.2.3 Statistische Analyse

Die Mittelwerte und die Standardabweichung vom Mittelwert wurde aus der Gesamtzahl der induzierten Läsionen berechnet. Der Student-T-Test wurde angewendet, um die Unterschiede zwischen individuellen Effekten in der Gesamtgruppe oder in Subgruppen nachzuweisen. Eine Varianzanalyse erlaubte die simultane Untersuchung von beiden Effekten. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt [204].

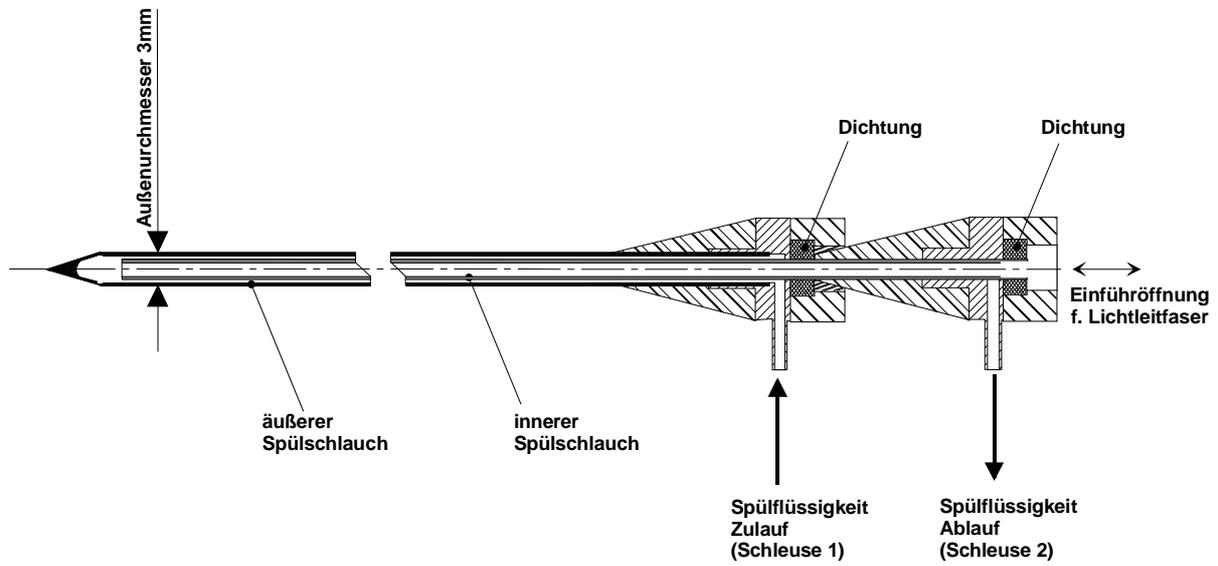


Abb. 4 : Schemazeichnung des intern gekühlten Applikatorhüllsystems für die laserinduzierte Thermotherapie

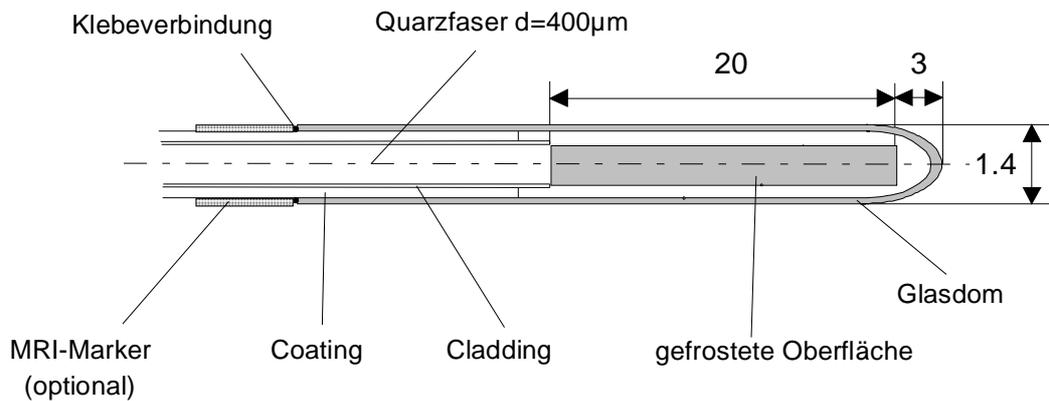


Abb. 5: Schema des Diffuser-Tip-Applikators für die laserinduzierte Thermotherapie mit Angabe der Außenmaße in mm

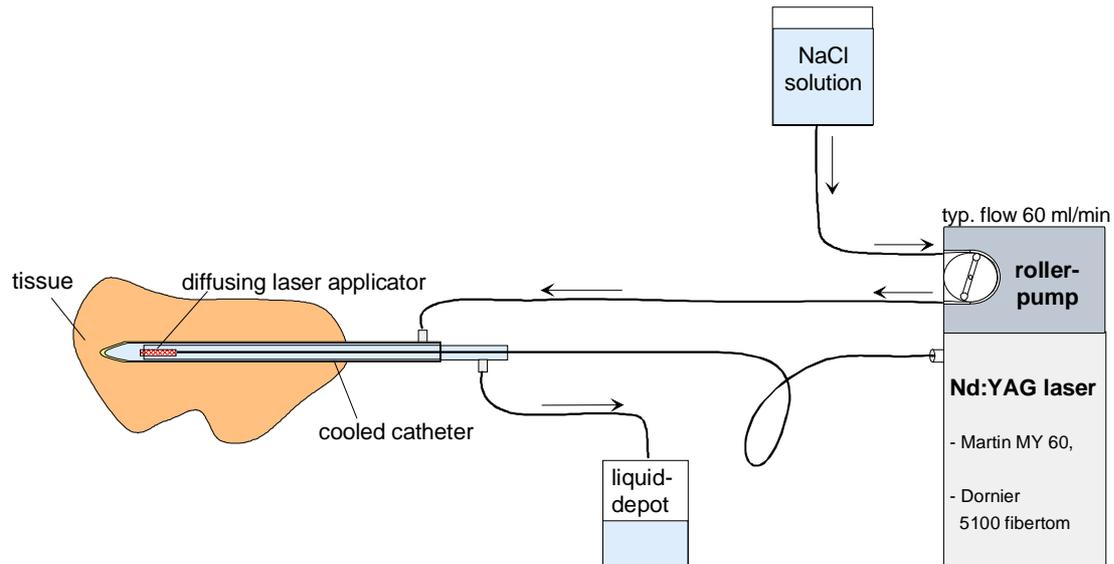


Abb. 6: Schematisch dargestellter Arbeitskreislauf zur Anwendung der laserinduzierten Thermotherapie



Abb. 7: Nd:YAG-Lasersystem mit integrierter Spülpumpe für die laserinduzierte Thermotherapie

2.2.2 Einfluss der kompletten und selektiven Unterbrechung der hepatischen Perfusion auf die lokale Tumorkontrolle bei laserinduzierter Thermotherapie an einem Tumormodell der Ratte

2.2.2.1 Zielsetzung der Versuchsreihe

Die vorherigen Versuchsreihen konnten zeigen, dass durch den Einsatz der bipolaren Radiofrequenztherapie und laserinduzierten Thermotherapie an der gesunden Schweineleber in-vivo Thermoläsionen induziert werden können, die für eine klinische Anwendung relevant sind. Gleichzeitig bestätigten diese Versuche, dass eine Kombination von In-Situ Ablation und kompletter sowie selektiver Unterbrechung der Leberperfusion eine signifikante Steigerung des induzierbaren Läsionsvolumens bewirkt. Neben diesem rein quantitativen Effekt ist es jedoch vor allem im Hinblick auf einen späteren klinischen Einsatz von großer Bedeutung zu überprüfen, welchen Einfluss eine Unterbrechung der Leberdurchblutung auf die Vollständigkeit der intraläsionären Tumorerstörung, der lokalen Tumorkontrolle und damit auf die Entstehung eines Lokalrezidivs hat. Diese Fragestellung sollte mit Hilfe der folgenden Versuchsreihe untersucht werden.

Ziel war es dabei, die Effekte von unterschiedlichen Modulationen der Leberperfusion auf die In-Situ-Ablation an einem Tumormodell zu untersuchen. Insbesondere sollte dabei auf die Frage eingegangen werden, wie die lokale Tumorkontrolle beeinflusst wird. Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchsreihen wurde hier nicht die maximal induzierbare Läsionsgröße als Zielparameter gewählt, sondern der potentielle Effekt einer Kombinationstherapie auf den behandelten Tumor und die hiermit verbundenen mikroskopischen Veränderungen. Um die potentielle Erhöhung eines Effekts der Ablation zu untersuchen, mussten hierbei Versuchsbedingungen gewählt werden, welche bei der Monotherapie einen vitalen Resttumor zurückließen. Nur so konnte eine mögliche Effizienzsteigerung der Therapie unter den vorgegebenen Bedingungen objektiv beurteilt werden. Da zu erwarten war, dass die auftretenden Effekte nicht von der Art der thermischen Energiequelle abhängen, wurden diese Versuche mittels der laserinduzierten Thermotherapie als alleiniges In-Situ-Ablationsverfahren durchgeführt. Als geeignetes Modell wurde für diesen Versuchsteil ein orthotopes Tumormodell an der Rattenleber gewählt.

2.2.2.2 Materialien

2.2.2.2.1 Laserequipment

Die Durchführung der Versuchsreihe erfolgte unter Verwendung des in den vorausgegangenen Versuchsreihen ausführlich dargestellten Laserequipments (s. 2.2.1.3.1.1; S. 39). Die Wiedergabe erfolgt an dieser Stelle daher in tabellarischer Form (Tab. 2).

<i>Equipment</i>	
Lasers	Nd:YAG-Laser
Lichtwellenleiter	400 µm Quarzfaser
Einkopplung	Axiale Einkopplung
Streukörper	Diffuser-Tip-Applikator
Applikatorhalterung	Laserfaser und Temperatursonde
Leistungsmessgerät	My-Test
Temperaturmessung	Nickel-Thermoelement

Tab. 2: Laserequipment der Versuchsreihe

2.2.2.2.2 Arterielle Mikroembolisation

Zur arteriellen Mikroembolisation wurden abbaubare Stärkemikrosphären (Spherex®, Pharmacia; Uppsala, Schweden) mit einem mittleren Teilchendurchmesser von $45 \pm 7 \mu\text{m}$ eingesetzt (s. 2.2.1.2.1.4; S. 36). Für die Applikation der Stärkemikrosphären in die A. hepatica der Ratte wurde eigens ein Katheter aus Polyethylen hergestellt. Dabei wurde ein im Außendurchmesser 2,5 mm messender Polyethylenschlauch über einer Flamme soweit ausgezogen, dass der Durchmesser des distalen Endes problemlos in die A. hepatica des Tieres eingeführt werden konnte. Die technischen Daten des Katheters sind in der Tabelle 3 wiedergegeben:

Außendurchmesser des distalen Endes	0,8 mm
Innendurchmesser des distalen Endes	0,5 mm
Außendurchmesser des proximalen Endes	2,5 mm
Innendurchmesser des proximalen Endes	2 mm

Tab. 3: Maße des Katheters zur i.a. Applikation

2.2.2.2.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche WAG-Ratten aus der Zucht der Zentralen Tierlaboratorien (ZTL; Tierversuchsgenehmigungsnummer LaGetSi Berlin: G 0099/98) der Freien Universität Berlin mit einem initialen Körpergewicht von 200-280 g (entsprechend ihrem Lebensalter von 4-6 Monaten). Ihre Ernährung erfolgte mit Altromin® Standard-Diät-Haltung für Ratten und uneingeschränktem Wasserangebot aus der automatischen Tränkanlage. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 18°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% ($\pm 5\%$) und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

2.2.2.2.4 Tumorzellen

Bei den verwendeten Tumorzellen handelte es sich um ein chemisch induziertes Adenokarzinom des Sigma, der Reihe CC 531 aus der Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg. Der Tumor besaß eine Proliferationsrate von 40 – 60 %, entsprechend der Proliferationsrate bei humanen kolorektalen Karzinomen. Der Tumor wurde durch ein Tumorzellsuspensionsverfahren implantiert. Die Angehrate des Tumors lag bei dem Tumorzellsuspensionsverfahren bei 88 %, ohne die Ausbildung weiterer extrahepatischer Tumore.

2.2.2.2.5 Brom-2-Deoxy-Uridin-Färbung

Mit Hilfe der Färbung durch 5-Brom-2-deoxy-uridin (LaRoche, Mannheim) konnte die Proliferationsrate des Gewebes bestimmt werden. Es handelte sich bei 5-Brom-2-deoxy-uridin um ein Nukleosidanalogs, welches von den Replikationsenzymen als Nukleosid erkannt und in die Ribonukleinsäure eingebaut wurde. Je höher die Proliferationsrate des Tumors war, und

um so mehr messenger-RNA synthetisiert wurde, desto mehr 5-Brom-2-deoxy-uridin wurde in den Zellkern aufgenommen und in die RNA eingebaut.

Mit Hilfe der Antikörper-Antigen-Reaktion konnte die Menge des inkorporierten Broms immunhistochemisch bestimmt werden. In Abhängigkeit der Menge des aufgenommenen 5-Brom-2-deoxy-uridin wurden die Signale der Färbung als negativ (-), wenig (+), mäßig (++) oder hoch (+++) eingestuft. Die Substanz wurde 6 Stunden vor der Tötung der Tiere in einer Konzentration von 200 mg/kg Körpergewicht intravenös injiziert.

2.2.2.3 Methoden

2.2.2.3.1 Tumorsuspensionsherstellung

Die CC531-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Gibco, Eggenstein), welches mit 10% fötalem Kälberserum (Seromed, Berlin) und 1% Penicillin/Streptomycin (Seromed, Berlin) komplettiert wurde, kultiviert. Es erfolgte die Versetzung von 2×10^6 Zellen/ml mit 20 ml Komplettmedium und anschließende Bebrütung in einer liegenden 80 cm^3 - Kulturflasche für 3-4 Tage bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 . Für die Zellernte musste das Medium aus den Kulturflaschen abgegossen und die Zellen zweimal mit Phosphatpuffer (PBS, Seromed, Berlin) gewaschen werden. Nach der Zugabe von 3 ml Trypsin (Seromed, Berlin; proteinspaltendes Enzym) wurde die Kulturflasche für 2-5 Minuten im Brutschrank belassen. Nach dem „Abschwämmen“ der Zellen erfolgte die Zugabe von 6 ml des Komplettmediums in die Kulturflasche. Danach wurde die Zellsuspension mit einer 10 ml Pipette 10x resuspendiert. Die Suspension wurde in eine 50 ml Falcontube umgefüllt, mit PBS (Seromed, Berlin) auf 50 ml aufgefüllt und bei 800 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde abgegossen, die Zellen abermals mit PBS (Seromed, Berlin) aufgefüllt, resuspendiert und die Zellzählung durchgeführt. Für die Zellzählung wurden 100 μl Zellsuspension mit 100 μl Trypanblau (Merck, Darmstadt) versetzt, zentrifugiert und in eine Neubauerkammer pipettiert. Es wurden dann alle Zellen in den vier Feldern der Kammer ausgezählt. Nachdem man die Zellzahl/ml errechnet hatte, wurde soviel PBS (Seromed, Berlin) aufgefüllt, dass sich ein Verhältnis von 1×10^6 Zellen in 0,1 ml Flüssigkeit ergab.

2.2.2.3.2 Operation

2.2.2.3.2.1 Tumorimplantation

Die Implantation des Tumors, die Laserbehandlung, sowie die Tötung der Tiere erfolgten in Allgemeinnarkose. Hierfür wurde Xylazin (Rompun 2 %, Bayer AG, Leverkusen) in einer Dosierung von 0,5 mg/kg i.p. und Ketamin (Ketanest® 50, Parke-Davis, Berlin) in einer Dosierung von 1 mg/ kg i.m. injiziert. Die Tiere wurden in Rückenlage gelagert. Der Zugang erfolgte über eine obere Medianlaparotomie. Nach Eröffnung des Peritoneums wurde der linke Leberlappen mobilisiert und auf eine sterile Gazekompressen vor die Bauchdecke verlagert. Die Implantation des Tumors erfolgte durch subkapsuläre Injektion von 0,1 ml

(1×10^6 Zellen) der Tumorzellsuspension. Die Einstichstelle der Leberkapsel wurde mit Acrylkleber (B.Braun, Melsungen) verschlossen. Nach 10 Tagen wurden die Versuchstiere relaparotomiert und der Tumor vermessen und dokumentiert. Behandelt wurden nur Tumore mit einem Durchmesser von mindestens 10 ± 2 mm. Nicht behandelt wurden Tiere, bei denen extrahepatische Metastasen nachweisbar waren.

2.2.2.3.2.2 Versuchsgruppen

Nach der Tumorimplantation wurden die Tiere in zwei Kontrollgruppen (I und II) sowie fünf Versuchsgruppen (III-VII) mit je 3 Untergruppen (A-C) á 5 Tiere behandelt. Die Tiere wurden im Zufallsprinzip den Therapiegruppen und den Tötungszeitpunkten zugeordnet. Das Behandlungsschema der jeweiligen Versuchsgruppen ist in Tabelle 4 aufgeführt.

	Versuchstiergruppe	Index	N	Histologie
Kontroll-Gruppe	Schein-OP (Gruppe I)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
	DSM-Mono (Gruppe II)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
Versuchs-Gruppe	LITT-Mono (Gruppe III)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
	LITT-DSM (Gruppe IV)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
	LITT-Pringle (Gruppe V)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
	LITT-Arterie (Gruppe VI)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d
	LITT-Vene (Gruppe VII)	A	5	24 h
		B	5	7 d
		C	5	21 d

Tab. 4: Aufteilung der Tiere in die Versuchsgruppen (n=105). Aufgeführt sind die beiden Kontrollgruppen, sowie die Durchführung der laserinduzierten Thermotherapie (LITT) als Monotherapie oder Kombinationstherapie mit Blutflussunterbrechung

2.2.2.3.2.3 Versuchsdurchführung

In *Gruppe I* (Schein-OP) erfolgte lediglich eine Scheinbehandlung der Tiere. Hierzu wurde eine Medianlaparotomie durchgeführt, welche nach 15 Minuten ohne therapeutische Maßnahme wieder verschlossen wurde.

In *Gruppe II* (DSM-Mono) und *Gruppe IV* (LITT-DSM) erfolgte die i.a. Applikation von DSM und NaCl in die A. hepatica ohne (*Gruppe II*) und mit (*Gruppe IV*) anschließender LITT. Hierzu wurde unter dem Operationsmikroskop (ZEISS OPMI S-6, 25-fache Vergrößerung) die A. hepatica communis mit dem Abgang der A. gastroduodenalis präpariert. Nach Anschlingung der A. hepatica communis und Ligatur der Aa. gastroduodenales dexter et sinister erfolgte die Implantation und Fixation des Katheters (s. Abb. 8). Über diesen Katheter konnten die Stärkemikrosphären (50 mg/kg, 0,4 ml) injiziert werden.

In *Gruppe III* (LITT-Mono) erfolgte nach Medianlaparotomie eine alleinige Lasertherapie (s. 2.2.2.3.2.4; S. 50) des Tumors ohne Blutflussunterbrechung.

In *Gruppe V* (LITT-Pringle) wurde das Lig. hepatoduodenale freipräpariert und angezügelt. Nach Darstellung von A. hepatica und Vena portae wurden beide Gefäße mit einer weichen Gefäßklemme unter Schonung des Ductus choledochus ausgeklemmt. Nach einer Latenzzeit von 5 Minuten erfolgte die Lasertherapie. Nach Beendigung der Laserung wurden nach einer weiteren Latenzzeit von 5 Minuten die Klemmen entfernt, so dass wieder ein freier Blutfluss in die Leber gewährleistet war.

In *Gruppe VI* (LITT-Arterie) und *Gruppe VII* (LITT-Vene) wurden in gleicher Weise das hepatoduodenale Band freipräpariert und angeschlungen. Nach selektiver Freipräparation von A. hepatica propria (*Gruppe VI*) und Vena portae (*Gruppe VII*) wurden diese Gefäße selektiv mit einer weichen Gefäßklemme abgeklemmt und die Lasertherapie nach einer Latenzzeit von 5 Minuten begonnen. Nach der Lasertherapie wurde nach weiteren 5 Minuten die Klemme entfernt, so dass der Blutfluss wiederhergestellt war.

2.2.2.3.2.4 Laserinduzierte Thermotherapie

Zunächst erfolgte die Punktion des Tumors in seinem Zentrum mit einer Punktionsnadel (4 Fr/Ch). Über diesen Punktionskanal wurde der Laserapplikator eingebracht. Mit Hilfe des Laserpilotstrahles konnte gewährleistet werden, dass das Photonenfeld im Zentrum des Tumors lag, und diente während der gesamten Laserung als Lagekontrolle. Die

Laserapplikation erfolgte mit 2 Watt für 600 Sekunden, entsprechend einer Energieleistung von 1200 Joule. Um eine mögliche Veränderung des „Heat-sink-Effects“ in Form von Veränderungen der Temperaturverläufe und -maxima in den einzelnen Therapiegruppen beurteilen zu können, wurde während jeder Laserung von Beginn der Applikation bis zu ihrem Ende in 10-sekündigen Abständen die Temperatur gemessen. Das Thermoelement parallel zum Applikatorsystem am makroskopisch erkennbaren Tumorrand eingebracht. Vor jeder Laserapplikation wurde die distale Applikatorleistung ermittelt (s. 2.2.1.3.1.1; S. 39).

2.2.2.3.2.5 Präparation und Beurteilung der Gewebeproben

Die Tiere wurden zur Entnahme der Gewebeproben narkotisiert und mittels einer intravenösen Injektion mit Embutramid (T 61®, Hoechst, Unterschleißheim, 0,3 ml/kg) getötet. Die Leber wurde entnommen und entlang des Stichkanals des Applikators in radialer und axialer Achse aufgeschnitten. Die Messung der makroskopisch sichtbaren Läsion erfolgte mit einem Mikrometer. Die Thermoläsionen wurde in Formalinlösung beziehungsweise in Phosphatpuffer-Lösung fixiert. Die histologischen Schnittpräparate wurden von zwei unterschiedlichen Untersuchern beurteilt. Als vollständige Tumorablation wurde dabei gewertet, wenn in den HE-Präparaten keine vitalen Tumorzellen nachweisbar waren und gleichzeitig die BrdU-Reaktion negativ (-) war.

Da die physiologische Nekrose der Tumore teilweise schwer von der induzierten Koagulationsnekrose zu unterscheiden war, musste eine Definition der Tumor-/Läsionsvolumina geschaffen werden, die eine Beurteilung über die Effizienz der verschiedenen Therapien erlaubt. Des weiteren bestand das Problem, dass in den Gruppen I (Schein-OP) und II (DSM-Mono) keine auswertbaren Koagulationsnekrosen zu erzielen waren, da hier keine LITT zur Anwendung kam. Aus diesem Grund wurde als Tumor-/Läsionsvolumen das Gewebe zusammengefasst, welches nicht dem gesunden Lebergewebe entsprach, unabhängig davon, ob die posttherapeutische Läsion kleiner, gleich groß oder größer als der zu behandelnde Tumor war.

2.2.2.3.2.6 Statistische Analyse

Aus den jeweils 5 Tieren der 15 Untergruppen wurde das arithmetische Mittel (\bar{x}), der Median (m), die Standardabweichung (s) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der errechneten prä- und postinterventionellen Tumor-/Läsionsvolumina berechnet. Das Ergebnis

der Randomisierung der Tiere vor der Behandlung sowie Unterschiede in der Berechnung der Tumor-/Läsionsvolumina zwischen den verschiedenen Therapiegruppen wurden mittels Vergleich mehrerer unabhängiger nicht normal verteilten Stichproben durch den Kruskal-Wallis-Test verglichen. Die Ergebnisse der durchschnittlichen Temperaturmaxima wurden ebenfalls durch diesen Test auf ihre Signifikanz überprüft. Als signifikant wurde dabei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen [204].

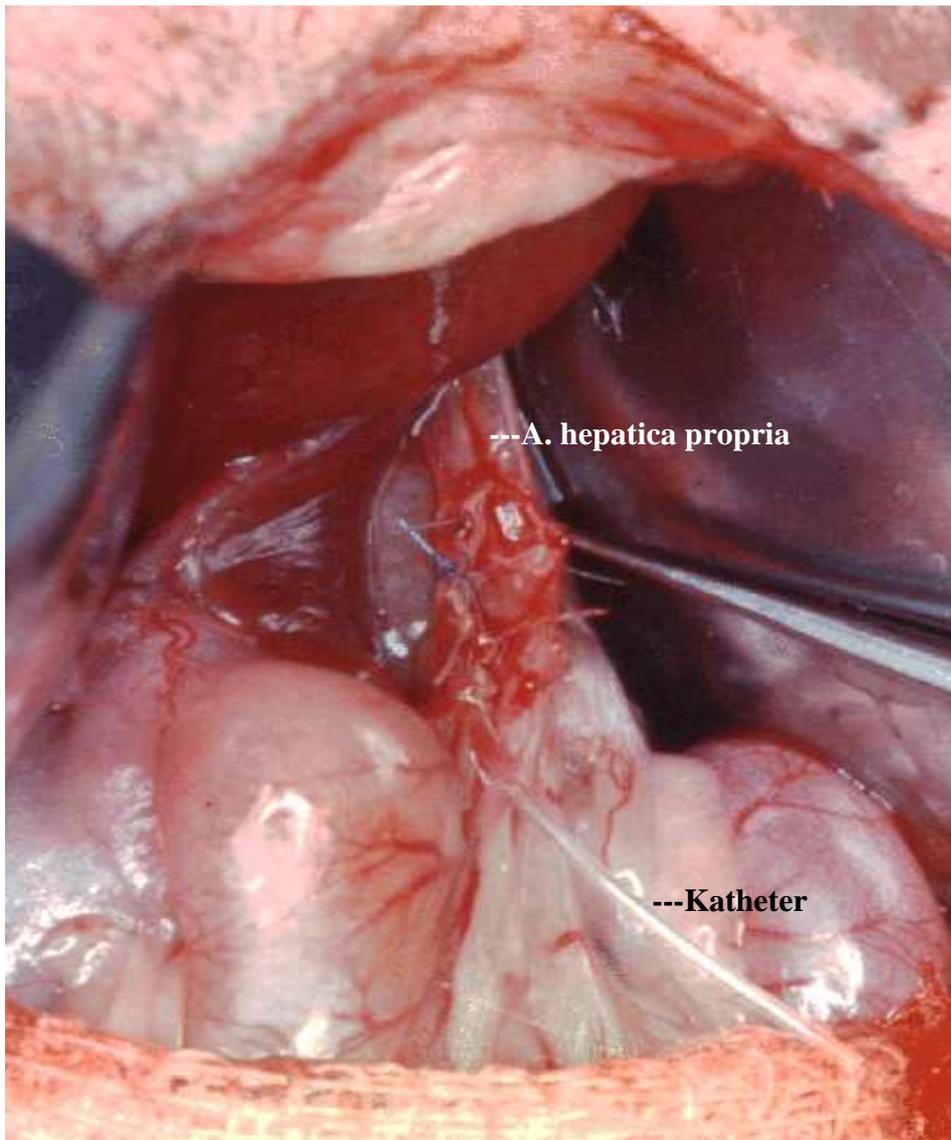


Abb. 8: Darstellung der Katheterimplantation in die Arteria hepatica der Ratte. Erkennbar ist die A. hepatica communis mit ihren beiden Abgängen der A. hepatica propria und der A. gastroduodenalis. Der Katheter ist implantiert und fixiert.

2.2.3 Effektivität und Durchführbarkeit der laserinduzierten Thermotherapie in Kombination mit der kompletten und selektiven hepatischen Blutflussunterbrechung bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen

2.2.3.1 Zielsetzung der Versuchsreihe

Die vorausgegangenen tierexperimentellen Versuchsreihen dienten zur Überprüfung des Effektes der hepatischen Blutflussunterbrechung bei der In-Situ-Ablation auf das induzierbare Läsionsvolumen und die lokale Tumorkontrolle. Diese Versuchsreihen hatten gezeigt, dass sowohl durch eine komplette Perfusionsunterbrechung als auch durch eine selektive arterielle Mikroembolisation eine signifikante Effektivitätssteigerung bei der In-Situ-Ablation zu erzielen ist. Diesen Ergebnissen lieferten die Grundlage dafür, diese Kombinationstherapie unter klinischen Aspekten zu evaluieren.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die laserinduzierte Thermotherapie in Kombination mit einer kompletten oder selektiven Blutflussunterbrechung hinsichtlich ihrer Effektivität, Komplikationsrate, Durchführbarkeit und prognostischer Relevanz bei Patienten mit irresektablen hepatischen Metastasen zu überprüfen. Insbesondere sollte dabei der Frage nachgegangen werden, ob die experimentell beobachteten positiven Effekte auch unter klinischen Aspekten nachvollziehbar sind, in welcher Größenordnung sich die mit Hilfe der Laserbehandlung erzielten Läsionsvolumina bewegen, welche Komplikationen auftreten und welchen Verlauf das Tumorleiden der Patienten nach der Therapie einnimmt. Als therapeutisches Verfahren für diese Studie wurde die laserinduzierte Thermotherapie gewählt, da mit diesem Verfahren langjährige experimentelle Erfahrungen vorlagen und die Grundlagen für eine klinische Anwendung der bipolaren Radiofrequenztherapie zum Zeitpunkt des Beginns der klinischen Studie noch nicht gegeben waren.

2.2.3.2 Patienten und Einschlusskriterien

In die vorliegende Studie wurden alle Patienten einbezogen, die seit dem 1.1.1999 bis zum 30.03.02 im Universitätsklinikum Benjamin Franklin im Rahmen einer hepatischen Metastasierung einer laserinduzierten Thermotherapie (LITT) unterzogen wurden. Folgende Einschlusskriterien wurden dabei berücksichtigt:

- Es durften maximal 5 hepatische Metastasen nachweisbar sein
- Der maximale Durchmesser der größten Metastase durfte 5 cm betragen
- Bei dem Patienten musste der zugrundeliegende Primärtumor (Status R0) vollständig reseziert worden sein
- Jeder der LITT zugeführte Patient musste vor der Laserbehandlung einem onkologischen Konsil unterzogen worden sein
- Zum Zeitpunkt der Laserbehandlung durfte bei dem Patienten keine extrahepatische Metastasierung oder ein Lokalrezidiv des Primärtumors vorliegen
- Eine kurative Therapie des Krankheitsbildes (Resektion, Chemotherapie, Radiatio) durfte nicht möglich sein
- Der Patient musste einen Karnofsky-Index von $> 70\%$ aufweisen und über eine ausreichende Knochenmarksfunktion (Leukozyten $> 3.000/\mu\text{l}$, Thrombozyten $> 100.000/\mu\text{l}$) und Leberfunktion (Quick $> 50\%$, Bilirubin $< 50 \mu\text{mol/l}$) verfügen
- Jeder Patient musste über mögliche Risiken und Alternativen aufgeklärt werden und sein schriftliches Einverständnis gegeben haben.

2.2.3.3 Datenerhebung

Mit Hilfe eines *Erfassungsbogens* (s. tab. Anhang) wurden alle relevanten Daten des Patienten erhoben, die den allgemeinen Gesundheitszustand sowie das aktuelle Beschwerdebild unmittelbar vor der ersten Laserbehandlung dokumentierten (z.B. Primärtumor, TNM, Histologie, Lokalisation, Differenzierungsgrad, Größe, Alter, Gewicht, Lokalisation, Größe, Anzahl). Diese Informationen wurden mit Hilfe von Krankenakten, Operationsprotokollen, Labor- und radiologischen Befunden gewonnen. Ein *Therapiebogen* (s. tab. Anhang) diente zur Dokumentation der LITT (Energie, Therapiedauer, Applikatoren, Art des Monitorings, Gefäßunterbrechung, Komplikationen). Zur postinterventionellen Verlaufskontrolle der Patienten wurde der aktuelle Gesundheitszustand der Patienten zum Studienende im März 2002 in einem *Verlaufsbogen* dokumentiert (Allg. Angaben, Todestag, Todesursache, Primärtumorstatus, Lokalrezidiv, Art der Therapie, Metastasenstatus, Tumorrezidiv intrahepatisch). Um einen Überblick über den Krankheitsverlauf zu gewinnen, wurden die Patienten und Hausärzte angeschrieben, bzw. im Rahmen der Tumornachsorgesprechstunde befragt. Eine Anfrage an das Landeseinwohnermeldeamt diente zur Ermittlung des Todesdatums bereits verstorbener Patienten.

2.2.3.4 Statistische Analyse

Zur Anwendung kam das Programm SPSS 9.0 für Windows. Die Fragebögen wurden mit Identifikationsnummern versehen und die enthaltenen Informationen mit numerischen Variablen codiert. Die Grundgesamtheit, die hinter „(n=)“ angegeben ist, bezieht sich auf die absolut zu erhebenden Daten. Fehlende Werte wurden in die Analyse nicht mit einbezogen. Die statistische Signifikanz der Untersuchungen wurde anhand von zweidimensionalen Kreuztabellen überprüft (Chi-Quadrat-Test, Student-t-Test und Mann-Whitney-U-Test). Als statistisch signifikant wurden Aussagen bewertet, deren Signifikanzniveau $p < 0,05$ war. Die Überlebenszeiten wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebenskurven ermittelt [204].

2.2.3.5 Laserequipment

Die Durchführung der Versuchsreihe erfolgte unter Verwendung eines Nd:YAG-Lasers (1064 nm) mit einem intern gekühlten Diffuser-Tip-Applikator, wie es bereits des in den vorausgegangenen Versuchsreihen ausführlich dargestellt wurde (s. 2.2.1.3.1.1; S. 39, Tab.5). Die Platzierung des Applikators erfolgte percutan in Lokalanästhesie oder offen im Rahmen einer Laparotomie (s. 2.2.3.6; 2.2.3.7; S. 56 ff.).

Beschreibung	
Lasertyp	Nd:YAG-Laser (Dornier: Martin MY 60)
Fasergesamtlänge	12 m
Außendurchmesser	2,1 mm
Aktive Länge	25 mm
Faserkerndurchmesser	400 µm
Faserkernmaterial	Quarz
Laserschluss	SMA 905
Hüllkatheter	Intern gekühltes Set (Somatex power)

Tabelle 5: Technische Daten des klinisch verwendeten Lasersystems

2.2.3.6 Applikationstechniken

Für die Therapie wurden je nach Lokalisation, Größe und Anzahl der hepatischen Läsionen verschiedene Applikationstechniken eingesetzt. Bei einem Metastasendurchmesser von bis zu

3 cm erfolgte eine Monoapplikation durch Platzierung eines Applikators in der Mitte des zu therapierenden Tumors. Zur Therapie größerer Metastasen wurde eine Multiapplikation mit unifokalem oder multifokalem Zugang angewendet. Beim unifokalen Zugang wurde der Applikator in der Metastase platziert und nach Beendigung der ersten Applikation vom selben Zugang aus zurückgezogen, neu platziert und eine weitere Ablation direkt angeschlossen (sog. Rückzugstechnik, s. Abb. 9a). Beim multifokalem Zugang wurden über mehrere Zugänge bis zu 4 Applikatoren in den Tumor platziert und simultan betrieben (sogenannte Multiapplikatorstechnik; s. Abb. 9 b).

2.2.3.7 Zugangswege und Perfusionsunterbrechung

Die laserinduzierte Thermotherapie wurde in der vorliegenden Studie über zwei verschiedene Zugangswege durchgeführt. In Abhängigkeit von Indikationsstellung, Metastasengröße und Metastasenlokalisation wurde die Therapie über einen percutanen oder offenen Zugang durchgeführt. Beim percutanen Zugang erfolgte die LITT bei dem in Rückenlage gelagerten Patienten unter Analgosedierung (30mg Pentazocin i.v., Fortral®; Sanofi-Synthelabo; 2-5mg Midazolam i.v., Dormicum®, Hoffmann-la Roche, Grenzach, Germany) in einem offenen MRT als Monitoringverfahren. Dabei wurde unter permanenter MRT-Kontrolle der Laserapplikator in Seldinger-Technik über eine Stichinzision an der rechts lateralen Bauchwand bis zu der zu therapierenden Läsion vorgeschoben (s. Abb. 10 a und b).

Bei Verdacht auf zusätzliche extrahepatische Metastasierung, fraglicher Resektabilität oder unmittelbarer Nachbarschaft zu thermisch sensiblen Strukturen wurde ein offener Zugang über eine Oberbauchquerlaparotomie in Intubationsnarkose gewählt. Hierbei wurde nach kompletter Freilegung der Leber durch Palpation und intraoperative Sonographie eine Überprüfung des Metastasenstatus, der Resektabilität und des Vorhandenseins extrahepatischer Tumoren vorgenommen. Nach Anschlingung des hepatoduodenalen Bandes erfolgte die Positionierung des Applikators unter sonographischer Führung bis ins Zentrum der Metastase (s. Abb. 11).

Zur Wirkungsverstärkung der LITT wurden zwei Verfahren zur Perfusionsunterbrechung eingesetzt.

1. : Die temporäre arterielle Gefäßembolisation mit Mikrosphären (DSM)

Hierzu erfolgte zunächst unter angiographischer Kontrolle die Implantation eines MRT-

kompatiblen Katheter über eine Punktion der Arteria Femoralis. Dieser Katheter wurde in DSA-Technik in die Arteria hepatica propria vorgeschoben und so fixiert, dass der Patient in das offene MRT transportiert werden konnte. Unmittelbar vor der LITT wurden dann über diesen Katheter Stärkemikrosphären (Spherex®, Menge:7,5ml, entsprechend 450 mg DSM) intraarteriell injiziert.

2. Die komplette Perfusionsunterbrechung durch Pringle-Manöver

Dieses Verfahren kam bei der offenen LITT zur Anwendung. Unmittelbar vor der Energiezufuhr wurde die Perfusion durch Okklusion des hepatoduodenalen Bandes unterbrochen und die LITT durchgeführt.

2.2.3.8 Therapiemonitoring

Das Monitoring für die percutane LITT erfolgte über ein offenes MRT-System (0,2 T, Magnetom OPEN, Siemens, Erlangen, Germany) unter Einsatz thermosensitiver Sequenzen alle 120 Sekunden (T1-gewichtet, FLASH 2D; TR 110ms; TE 9ms; FA 80°; SL 8mm). Die Ablation wurde beendet sobald die Thermoläsion die Größe der Metastase erreichte. Bei der offenen LITT erfolgte das Monitoring mit Hilfe des intraoperativen Ultraschalls (Siemens Ultrasound, Mountainview, CA, 3,5 Mhz). Nach 24-48 h und postinterventionell nach 3 und 6 Monaten erfolgte für die Patienten eine Follow-up mittels kontrastgestützter MRT-Untersuchung (0.1 mmol/kg Gd-DTPA, Magnevist®, T1-Sequenzen, FLASH 2D; TR 238 ms; TE 5 ms; FA 90°; SL 9 mm, 1.5T Magnetom VISION, Siemens, Erlangen, Germany). Die Läsionen wurden anhand der prä- und postinterventionellen Bildgebung in ihrem maximalen Durchmesser ausgemessen und das Volumen berechnet.

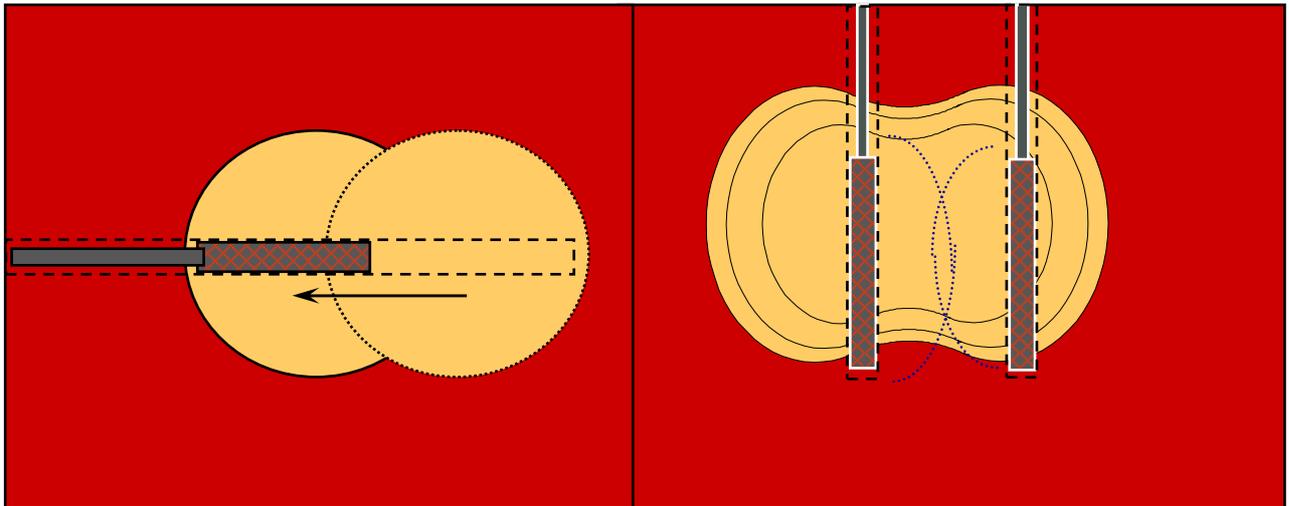


Abb. 9 a und b: Schematische Darstellung der Punktionstechnik durch Multiapplikation über unifokalem Zugang (sogenannte Rückzugstechnik; links) oder Multiapplikation über multifokalem Zugang (sogenannte Multiapplikatortechnik; rechts)

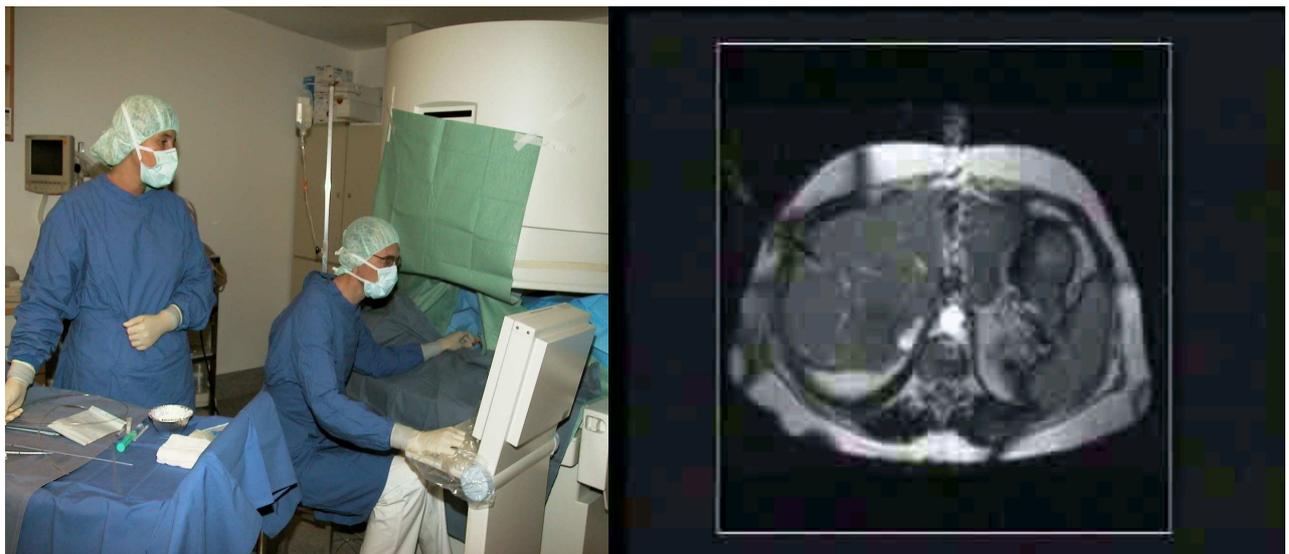


Abb. 10 a und b: Arbeitsplatz der percutanen LITT im offenen MRT (links) mit MRT-gesteuerter Kontrolle des Punktionsweges (rechts)

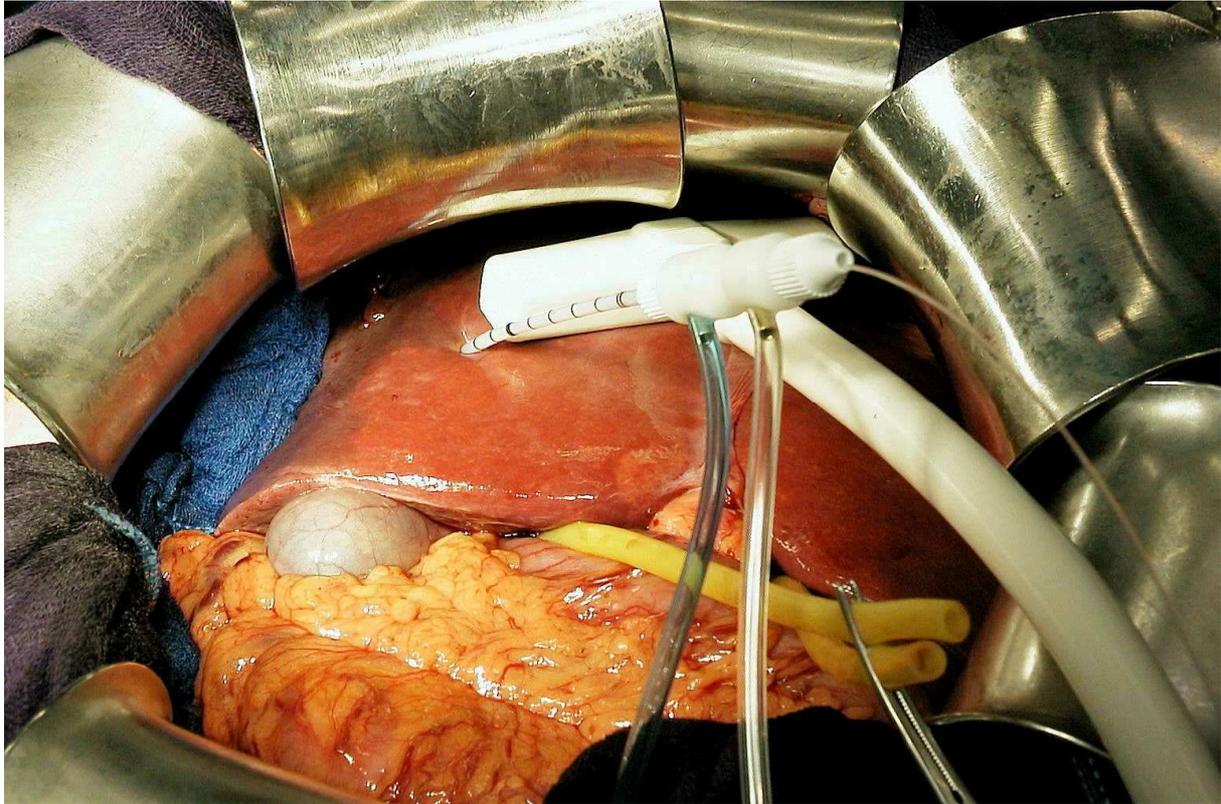


Abb. 11: Abbildung einer intraoperativen LITT mit Darstellung des Applikators, des Ultraschallkopfes und des zum Pringle-Manöver angelegten Silikonschlauches

2.3 Untersuchungen zur Dosimetrie und Therapieplanung bei der laserinduzierten Thermotherapie von Lebermetastasen

2.3.1 Bestimmung der optischen Parameter von kolorektalen Lebermetastasen und deren Primärtumoren für die Entwicklung einer Dosimetrie thermischer Laseranwendungen

2.3.1.1 Zielsetzung der Versuchsreihe

In den vorherigen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass der Einsatz der In-Situ Ablation in Kombination mit einer Blutflussunterbrechung zu einer Effektivitätssteigerung führt, die im klinischen Einsatz für eine komplikationsarme und effektive Therapie von Lebermetastasen verwendet werden kann. Ein wesentliches Problem aller Ablationsverfahren liegt jedoch darin, dass eine exakte Vorhersage oder Beurteilung von Ausmaß und Konfiguration der entstehenden thermischen Läsionen derzeit nicht möglich ist und die histologische Bestätigung einer „R-0-Ablation“ gleichzeitig entfällt. Dies steigert selbst bei großen Thermoläsionen das Risiko lokaler Rezidive aufgrund unzureichender Überlappung von Destruktionsvolumen und Tumolvolumen. Zur onkologisch sicheren Anwendung der In-situ-Ablationsverfahren ist daher eine präzise Bestimmung der Ausbreitung und Wirkung der Temperaturentwicklung im Vorfeld der Therapie wünschenswert. Voraussetzung für die Entwicklung einer solchen Dosimetrie sind Kenntnisse über das optische Verhalten des Zielgewebes und dessen Dynamik während der Thermokoagulation. Die bislang vorliegenden Daten zu den optischen Parametern weisen erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies und Gewebetypen auf und erlauben es somit nicht, eine verlässliche individuelle Bestrahlungsplanung für die laserinduzierte Thermotherapie von Lebermetastasen durchzuführen.

Ziel der folgenden Versuchsreihen war es daher, die optischen Parameter von Lebermetastasen kolorektaler Karzinome experimentell zu bestimmen. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob sich die optischen Parameter von kolorektalem Primärtumor und Lebermetastase so gleichen, dass eine Untersuchung des optischen Verhaltens des Primärtumors ausreichen würde, um die Parameter für eine Dosimetrie der Lebermetastase zu ermitteln, ohne diese gesondert zu erheben. Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden,

welche Wellenlänge für die Lasertherapie von Lebermetastasen geeignet ist und welchen Einfluss die Thermokoagulation auf die optischen Parameter hat.

2.3.1.2 Materialien

2.3.1.2.1 Versuchsaufbau

Für die Experimente kam die Single-Ulbrichtkugel-Technik zur Verwendung (s. Abb. 12). Im Unterschied zum Doppel-Ulbrichtkugel-System bei welchem zwei räumlich getrennte mit Bariumsulfat (BaSO_4)beschichtete Kugeln die diffuse Remission R_d und die totale Transmission T_t messen, misst die drehbar gelagerte Einzelkugel aus Spectralon (Labsphere IS-060) beide Parameter, je nachdem, ob sich die Probe zur Messung der diffusen Remission *hinter* oder zur Messung der totalen Transmission *vor* der Kugel befindet. Die Hohlkugel (Innendurchmesser 152 mm) war durch eine hohe Reflexion des auftreffenden Lichtes charakterisiert ($0,95 < R < 0,99$). Die Kugel besaß vier in der Mittelebene angeordnete, um 90° versetzte kreisförmige Öffnungen (Durchmesser 38 mm). Der Lichtstrahl konnte in jeder Drehposition zwei einander gegenüberliegende Öffnungen zentral passieren. Die Detektoren waren in einem 90° Winkel zur Probe angeordnet. Zwei weitere Ulbricht-Kugeln mit einem Durchmesser von 100 mm detektierten die Referenzintensität I_0 des eingehenden Lichtstrahls und die kollimierte, ungestreute Transmission T_c ohne Umbau des Messplatzes. Im Wellenlängenbereich von 300 bis 1140 nm kamen zur Photodetektion Siliziumdetektoren (Si, 09-SiU04-C, AMKO) mit Quarzfenstern zum Einsatz. Als Lichtquelle wurde eine Quecksilber-Kurzbogenlampe (100 W, 0,3 mm Bogenlänge, 220000 cd/cm^2 ; Osram) ausgewählt. In Kombination mit einem fokussierenden Parabolspiegel ($f/4.5$, AMKO) wurde die Lichtleistung in den nachgeschalteten Monochromator eingekoppelt. Die Lichtquelle wurde über einen Tubus mit dem Gittermonochromator (200 mm Fokusslänge, AMKO 01-002SF) verbunden, der die spektrale Zerlegung des Lichtes realisierte, in dem aus dem "Wellenlängengemisch" eine monochromatische Strahlung herausgefiltert wurde. Das mögliche Spektrum des monochromatischen Lichtstrahls umfasste den Wellenlängenbereich zwischen 300 nm und 2500 nm. Mit einem sphärischen Spiegel (\varnothing 100 mm, $f=250$ mm) wurde der aus dem Monochromator austretende divergente Lichtstrahl auf die Gewebeprobe fokussiert. Das realisierte Abbildungsverhältnis betrug 1:3 (Abstand Austrittsspalt - sphärischer Spiegel: 330 mm, sphärischer Spiegel - Probe: 990 mm), so dass sich auf der Gewebeprobe ein Leuchtfleck mit einem Durchmesser von 3 mm bei einer Strahlendivergenz

von 4.7° ergab. Für die Messungen der Gewebeprouben wurden zylindrische Quarzküvetten für spektroskopische Untersuchungen (Hellma) verwendet. Die Küvetten hatten kalibrierte Schichtdicken, so dass Messfehler bei geeigneter Präparation auf ein Minimum reduziert werden konnten (s. Tab. 6). Für die Durchführung der automatischen Arbeitsabläufe wurde ein Computerprogramm verwendet (LMTB gGmbH), welches den Monochromator (Schrittmotor) einschließlich Wellenlängenkalibrierung, sowie die Lock- in- Verstärker (Synchronisation, Offsetabgleich, Messwertaufnahme) steuerte. Lediglich das Wechseln der Probe und des Standards erfolgte manuell. Die Messergebnisse wurden in einer Datei gespeichert und konnten direkt der anschließenden Monte-Carlo-Simulation als Basiswerte zugeführt werden. Für die Auswertung der durchgeführten Messungen wurde eine inverse Monte-Carlo-Simulation verwendet.

2.3.1.2.2 Inverse Monte-Carlo-Simulation

Für die Auswertung der durchgeführten Messungen wurde die inverse Monte-Carlo-Simulation verwendet. Dieses Auswerteverfahren berücksichtigt die geometrischen und optischen Verhältnisse des Versuchsaufbaus (Blendendurchmesser, Strahldivergenz, Brechungsindexsprünge) sowie die Probengeometrie und die Kugelparameter. Die unbekanntenen "mikroskopischen" Parameter (die optischen Parameter μ_a , μ_s , g) wurden anhand der gemessenen "makroskopischen" Werte (diffuse Remission, totale Transmission, kollimierte Transmission) bestimmt. Dazu wurde ein Startparametersatz von μ_a , μ_s , und g geschätzt. Hierbei fand die Kubelka- Munk- Theorie Anwendung (Kubelka 1931). Mit den geschätzten Startparametern wurde eine Monte-Carlo-Simulation durchgeführt. Diese berechnete die makroskopischen Parameter bei kollimierter Beleuchtung (R_{cd} , T_{ct} , T_c), wie sie in einem wechselwirkungsfreien System gemessen werden könnten. Hierbei wurden die geometrischen Verhältnisse des Aufbaus berücksichtigt. Schließlich lag ein simulierter Satz von Messdaten vor (simulierte diffuse Remission R_{cd}^s , simulierte totale Transmission T_{ct}^s , simulierte kollimierte Transmission T_c^s). Dieser simulierte Datensatz wurde anschließend mit den gemessenen Werten verglichen. Stimmt die gemessenen und berechneten Werte innerhalb bestimmter Fehlergrenzen (0,5%) überein, konnte der verwendete Satz optischer Parameter für die gemessene Probe übernommen werden. Kam es zu Abweichungen, wurden die Startparameter geringfügig verändert und weitere Simulationen durchgeführt (s. Abb. 13).

2.3.1.2.3 Gewebeauswahl und -gewinnung

Die Versuche wurden mit humanen Gewebeproben von Kolonkarzinomgewebe und Lebermetastasengewebe durchgeführt. Die Gewebeproben entstammten Operationspräparaten von Patienten, die bei Vorliegen eines hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinoms einer chirurgischen Kolon- mit synchroner oder metachroner Leberresektion unterzogen wurden. Im Operationssaal wurden mit einem Skalpell aus den resezierten Leber- und Kolongewebetumoren ca. 1x1 cm große Proben ausgeschnitten. Der Transport erfolgte in einem mit Flüssigstickstoff gekühlten Behälter (Devar-Gefäß). Die durchschnittliche Transportzeit von der Entnahme der Proben bis zur Präparation betrug 60 Minuten. Es wurde perioperativ von 10 Patienten Probenmaterial entnommen. Von den verschiedenen Gewebearten (gesundes Kolongewebe, Kolonkarzinomgewebe, Lebermetastasengewebe) wurden jeweils drei verschiedene Quarzküvetten mit Probenmaterial gefüllt und anschließend vermessen. Somit wurden die Versuche mit 30 Proben gesunden Kolongewebes, 30 Proben Kolonkarzinomgewebes und 30 Proben Lebermetastasengewebes durchgeführt.

2.3.1.3 Methoden

2.3.1.3.1 Gewebepräparation

Die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Gewebeproben wurden in einem ebenfalls mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser homogenisiert. Die Größe der dabei erzeugten Gewebecluster betrug zwischen 50 und 500 μm . So wurde gesichert, dass die Zellen intakt blieben, da die Leberzellgröße bei 8 μm liegt [153]. Das Homogenisat wurde mit einem gekühlten Spatel in den Innenraum der Quarzküvette präpariert. Die Küvette wurde mit dem dazugehörigen Deckglas verschlossen, ohne Gewebslücken oder Luftblasen auszubilden. Das Austrocknen der Gewebeproben wurde durch Abdichtung der Küvetten mit einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung verhindert. Danach konnten die Küvetten in einer Manschette fest eingespannt werden, um Messfehler durch Lageveränderungen zu verhindern. Die Schichtdicke wurde so gewählt, dass die kollimierte Transmission gerade noch über 0,1% lag und gleichzeitig eine maximale Stärke der Probe erreicht wurde. Für gesundes Gewebe (Kolon) wurde eine Stärke von 200 μm verwendet, für das tumorös veränderte Kolon- und Lebergewebe betrug die Stärke 500 μm .

2.3.1.3.2 Versuchsdurchführung

Die Messung der optischen Gewebeparameter erfolgte im Wellenlängenbereich von 800-1100 nm in Schritten von 10 nm und verlief in mehreren Schritten (s. Abb. 14):

1) *Messung der diffusen Remission (Rückstrahlung des Gewebes) R_d* : Zunächst wurde das Meßsystem ohne Probe kalibriert. Dazu wurde die Kugel so gedreht, dass sich die Probe nicht im Strahlengang befand. Die zwei der Probenöffnung und Einstrahlöffnung gegenüberliegenden Kugelöffnungen waren mit einem Reflexionsstandard verschlossen. Zur Messung der Probe wurde die Kugel um 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht, so dass sich die Probe *hinter* der Kugel befand. Dazu musste ein Standard umgesetzt werden.

2) *Messung der totalen Transmission (gestreute und ungestreute Durchstrahlung des Gewebes) $T_t = T_d + T_c$* : Analog zur R_d -Kalibrierung erfolgte die Kalibrierung des T_t -Systems. Zur Messung wurde die Kugel im Uhrzeigersinn um 90° gedreht, so dass sich die Probe *vor* der Kugel befand.

3) *Messung der kollimierten Transmission (ungestreute Durchstrahlung des Gewebes) T_c* : Die Kalibrierung des T_c -Systems erfolgte durch direkte Beleuchtung der T_c -Kugel durch die R_d/T_d -Kugel hindurch. Für die Messung wurde die Probe vor die Kugel positioniert und die anderen Öffnungen freigehalten. Zur Messung der optischen Parameter im koagulierten Zustand wurde die Küvette mit der umschließenden Manschette erhitzt. Dazu wurde physiologische Kochsalzlösung in einem Messbehälter aus Glas auf 80°C erwärmt. Die Küvette wurde in die Lösung vollständig eingetaucht und für 600 Sekunden koaguliert. Danach wurden die koagulierten Proben erneut vermessen. Der Messablauf erfolgte analog zur Messung der nativen Gewebeproben.

2.3.1.3.3 Statistische Analyse

Für den Vergleich der optischen Parameter einer Gewebeart bei Licht verschiedener Wellenlänge wurde der Friedman-Test für den Vergleich von mehr als zwei verbundenen Stichproben verwendet. Der Vergleich von nativen und koagulierten Gewebeproben, sowie der Vergleich von Proben verschiedenen Gewebetyps (gesundes Gewebe/tumoröses Gewebe; Primärtumor/Metastasen) wurde mit dem Test nach Wilcoxon für zwei verbundene Stichproben durchgeführt. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen. Die interindividuellen Schwankungen der optischen Eigenschaften wurden (wie oben angegeben) durch die Standardabweichungen bestimmt [204].

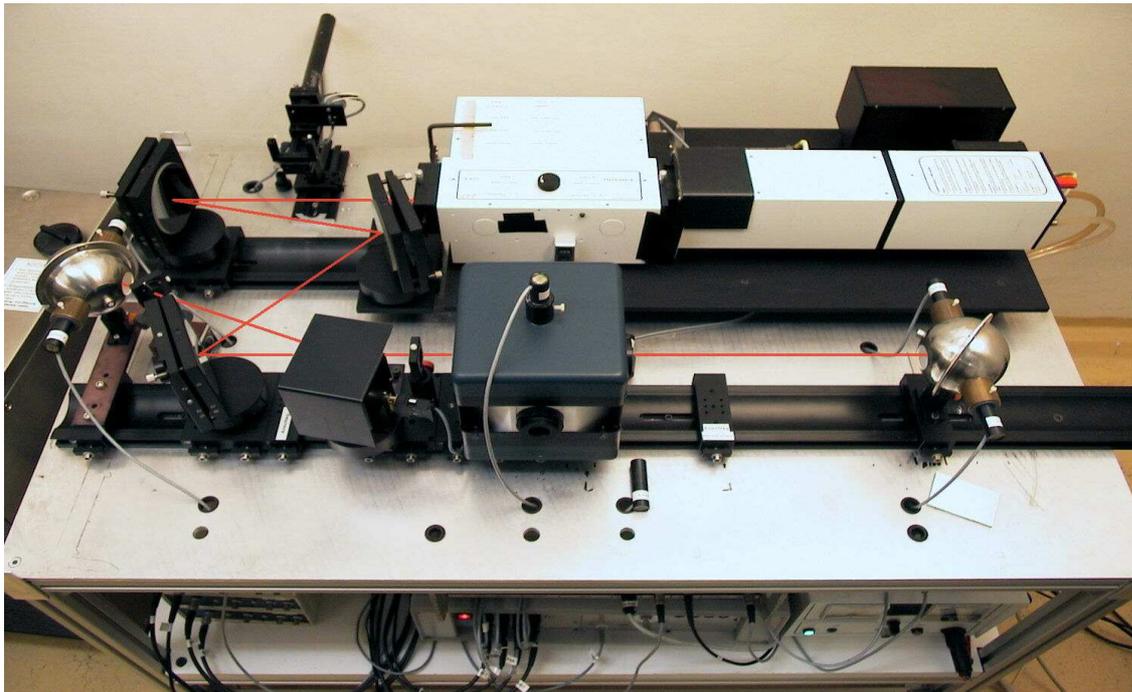


Abb. 12: Fotografie des Single-Kugel-Messplatzes

Stärke der Küvettengläser	mm	1.25
Außendurchmesser der Küvette	mm	22
Innendurchmesser der Küvette	mm	15
Schichtdicke (d)	µm	200 (gesundes Gewebe) 500 (tumoröses Gewebe)

Tabelle 6: Daten der verwendeten Quarzküvetten

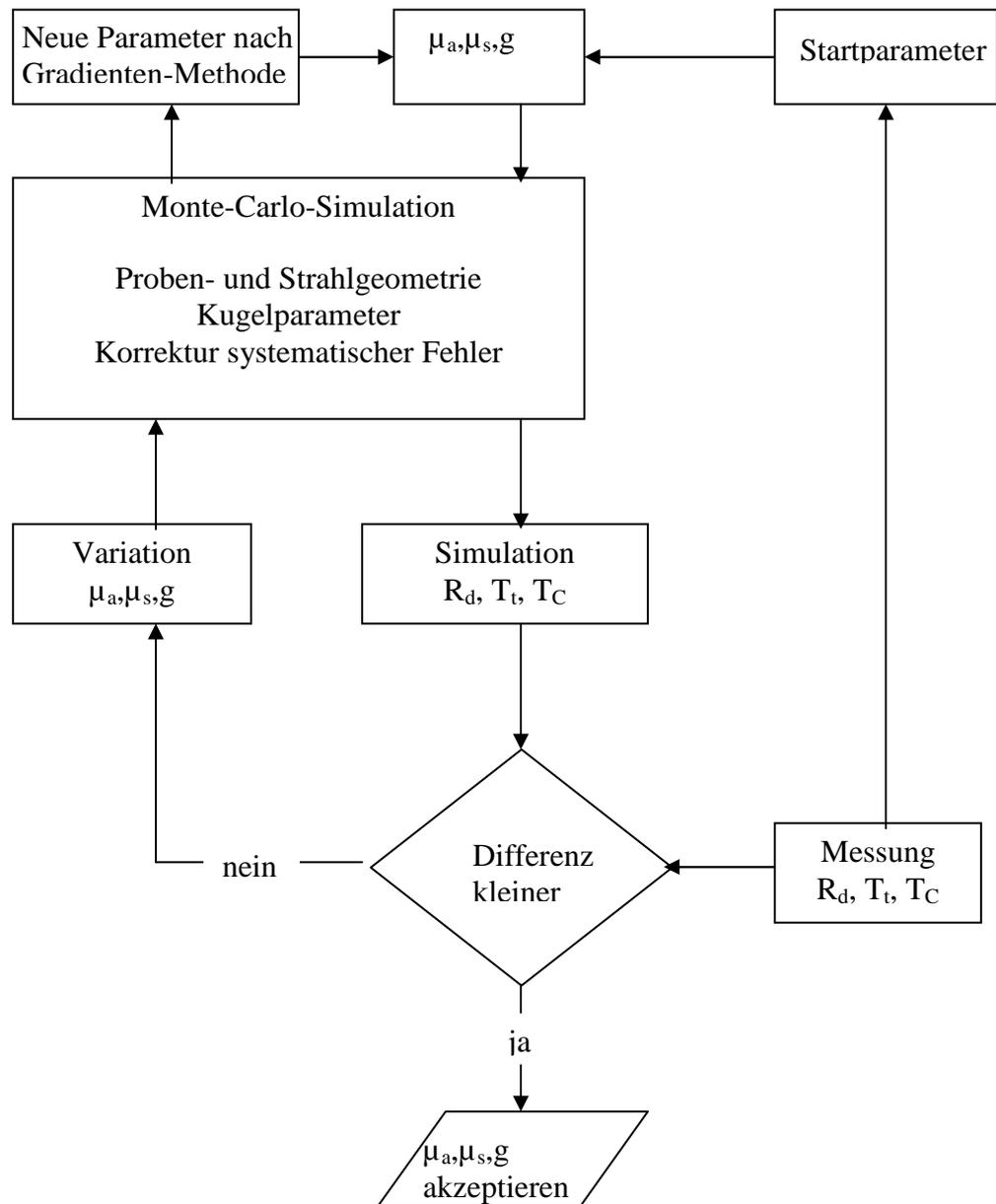


Abb. 13: Flussdiagramm der inversen Monte-Carlo-Simulation zur Berechnung von Photonverteilungen in streuenden und absorbierenden Medien.

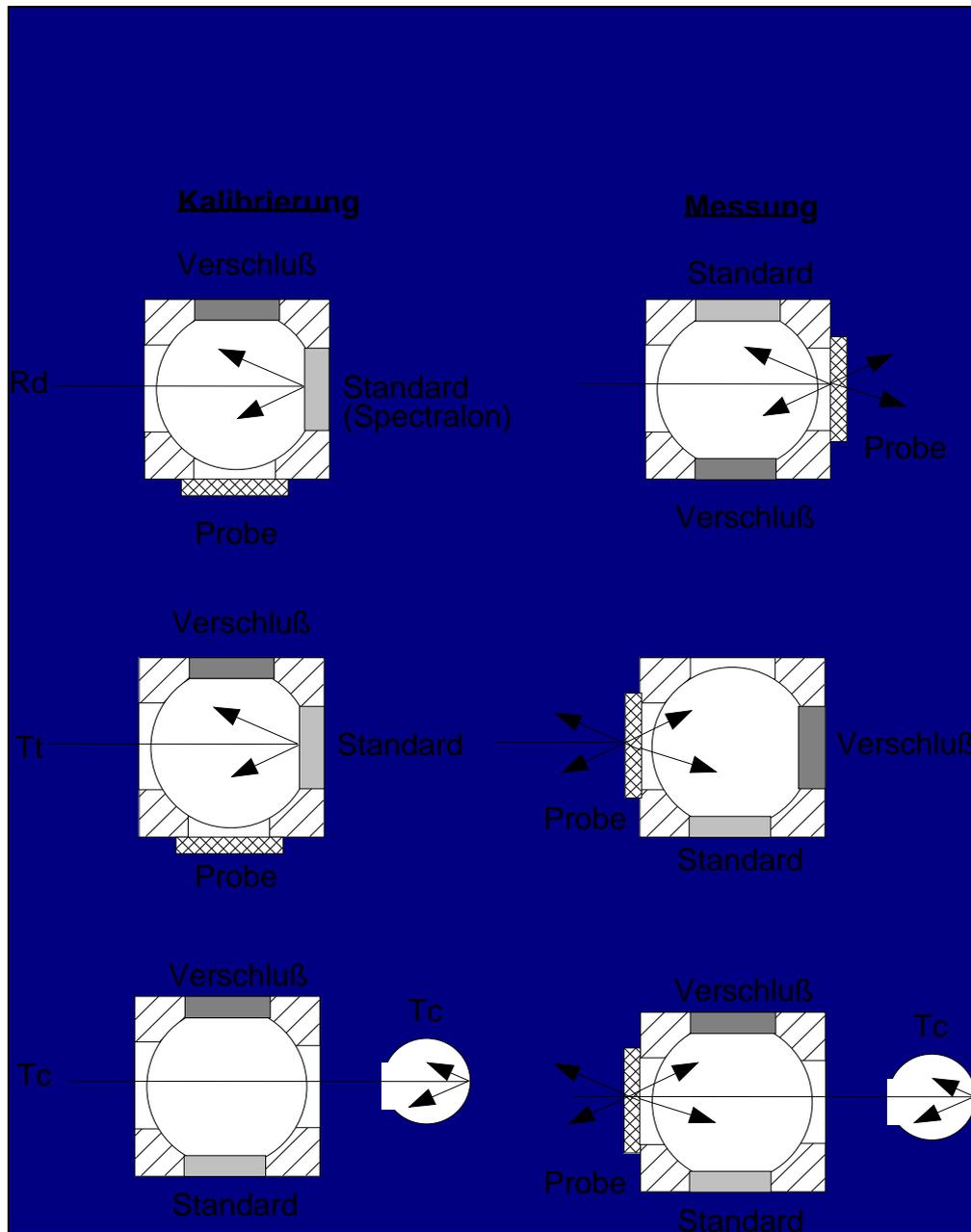


Abb. 14: Schematische Darstellung des Messablaufs mit drehbarer Single-Ulbrichtkugel

2.3.2 Entwicklung und Evaluation eines dreidimensionalen Bestrahlungsmodells für die laserinduzierte Thermotherapie von Lebermetastasen

2.3.2.1 Zielsetzung der Versuchsreihe

Die in der vorherigen Versuchsreihe ermittelten optischen Parameter von Lebermetastasengewebe und die Bestimmung deren Veränderung durch die thermische Koagulation bildeten die wesentlichen Grundlagen für die Entwicklung eines Dosimetriemodell für die laserinduzierte Thermotherapie mit dem es ermöglicht werden soll, bereits im Vorfeld einer In-Situ Ablation die geeigneten Behandlungsparameter zu bestimmen, die erforderlich sind, um eine Metastase vollständig thermisch zu zerstören.

Ziel der folgenden Versuchsreihe war es, die im Vorversuch gewonnenen Daten zu nutzen, um in Kooperation mit dem Institut für medizinisch-technisch Physik und Lasermedizin der FU-Berlin ein dreidimensionales Bestrahlungsmodell für die laserinduzierte Thermotherapie von Lebermetastasen zu entwickeln und zu evaluieren. Insbesondere sollte dabei untersucht werden, ob die durch dieses Modell berechneten und simulierten Thermoläsionen mit den tatsächlich bei einer laserinduzierten Thermotherapie erhobenen Daten ex-vivo und in-vivo übereinstimmen.

2.3.2.2 Materialien

2.3.2.2.1 Berechnung des Strahlungstransports

Da für biologisches Gewebe einfache Berechnungsmethoden des Strahlungstransportes auf Grundlage des Lambert-Beer-Gesetzes nicht geeignet waren, wurde die Anwendung eines mathematischen Näherungsverfahrens erforderlich, wie sie die Monte-Carlo-Simulation bietet. Die Implementierung der Monte-Carlo-Methode zur Berechnung der Strahlungsverteilung erfolgte nach dem sogenannten 'Fixed Stepsize' Verfahren [270]. Hierbei wurde jedes virtuelle Photon ausgehend von seiner initialen Position und Richtung eine sehr kleinen Distanz bewegt. Initiale Position und Richtung wurden direkt aus Applikatorposition, Applikatorgeometrie und Applikatorcharakteristik abgeleitet. Anschließend wurde die Wahrscheinlichkeit für ein Absorptionsereignis bzw. Streuereignis mit einer Zufallszahl

verglichen. Im Fall einer Absorption wurde die Energie des Photons im aktuellen Volumenelement akkumuliert und ein neues Photon an der Quellposition initiiert. Im Fall eines Streueignisses wurde die neue Richtung gemäß der Henyey-Greenstein-Funktion bestimmt. Anschließend wurde das Photon, weiterbewegt und der Vorgang wiederholt, bis schließlich Absorption eintrat oder das Rechenvolumen verlassen wurde. Typischerweise wurden pro Applikator über die gesamte Expositionszeit 10^6 Photonen verfolgt.

2.3.2.2.2 Berechnung der Wärmeleitung im Gewebe

Unter Berücksichtigung aller wesentlichen Einflussfaktoren konnte die zeitabhängige (nicht-stationäre) Temperaturverteilung durch die sogenannte 'Bioheat'-Transportgleichung beschrieben werden, die eine räumliche Verteilung der thermischen Gewebeparameter zulässt. Als Methode der Wahl für die Lösung der zeitabhängigen 'Bioheat'-Transfergleichung wurde die Methode der Finiten Differenzen (FDM) gewählt. Letztere konnte an die geometrischen Veränderungen angepasst werden und erlaubte die Berücksichtigung dynamischer Parameter. Die Implementierung der FDM zur Berechnung von Temperatenausgleichsvorgängen erforderte die Formulierung in Differenzenquotienten. Nach Umformung resultierte die Temperaturdarstellung jeden Voxels in Abhängigkeit von deren Wert zu jedem Zeitpunkt.

2.3.2.2.3 Berechnung der thermischen Gewebeschädigung

Da es sich bei der Proteindenaturierung um eine irreversible chemische Reaktion handelt, wurde die Beschreibung der Gewebekoagulation durch eine Ratengleichung auf der Theorie von Arrhenius entwickelt. Die Anwendung dieses Modells lieferte den Parameter Ω als Schädigungsintegral. Ein Wert $\Omega=0$ beschrieb eine native Proteinzusammensetzung, wohingegen für $\Omega \rightarrow \infty$ die vollständige Koagulation erreicht wurde. Zur Korrelation des Schädigungsintegrals mit der letalen Temperaturdosis wurde $\Omega > 1$ als Maß für eine irreversible Schädigung festgelegt. Die Ratenparameter ergaben sich zu $A=9,4 \cdot 10^{104} \text{ s}^{-1}$ und $E=670 \text{ kJmol}^{-1}$. Der Einfluss des Koagulationsgeschehens auf die Blutperfusion wurde derart berücksichtigt, dass eine vollständige Unterbrechung der Perfusion in den Volumenelementen erfolgte, die ein Schädigungsintegral von $\Omega > 1$ aufwiesen (s. Abb. 15).

2.3.2.2.4 Programmimplementierung

Voraussetzung für den Einsatz der oben beschriebenen Methoden in einem Dosimetriemodell war die Diskretisierung einer Region of Interest (ROI) in kubische Volumenelemente. Unter klinischen Gesichtspunkten wurde dabei eine Ortsauflösung von 1 mm und eine Zeitauflösung von 1 Sekunde gewählt. Für die Therapie von großen Tumoren in Multiapplikatortechnik wurde die Kantenlänge der ROI mit 100 mm veranschlagt, so dass eine Gesamtzahl von 10^6 Voxeln resultierte. Die Implementierung der oben dargestellten Algorithmen erfolgte auf einer WindowsTM-Plattform. Der Speicherbedarf für ein Voxel betrug 88 Byte, so dass eine Region of interest (ROI) mit 10 cm Kantenlänge einen Arbeitsspeicher von unter 90 Megabyte erforderten. Für jede Grenzfläche der ROI ließen sich unterschiedliche thermische Randbedingungen definieren (isoliert, offen, feste Temperatur), die Applikatoren selbst konnten optional auf eine fixierte Temperatur gesetzt werden (z.B. Kühlung). Die Darstellung der Simulationsergebnisse erfolgte in transversalen oder sagittalen Schichten der ROI, wobei Intensität, Temperatur und Schädigung angezeigt wurden (Abb. 16). Um die klinische Situation zu repräsentieren, konnten sphärische oder zylindrische Strukturen mit individuellen physikalischen Parametern innerhalb der ROI definiert werden.

2.3.2.3 Methoden

2.3.2.3.1 Laserequipment

Die Durchführung der Evaluation des oben dargestellten Systems erfolgte unter Verwendung des mehrfach vorbeschriebenen Nd:YAG-Laser-Systems mit einem Diffuser-Tip-Applikator (s. 2.2.1.3.1.1; S. 39).

2.3.2.3.2 Ex-vivo Evaluation

Zur Ex-vivo Evaluation wurden Ergebnisse der Induktion von LITT-Thermoläsionen an Schweinelebern (frische Schlachthofpräparate; s: 2.1.3.1; S. 32) den Simulationsergebnissen des Dosimetrieprogramms gegenübergestellt. Es erfolgte hierzu eine synchrone 3-fach-Applikation der Schweineleber mit einem Applikatorabstand von 12 mm. Die aktive Länge der LITT-Applikatoren betrug 5 mm. Die Ausgangsleistung betrug 3 x 2,5 Watt bei einer

Expositionszeit von 10 Minuten und einer Gewebeausgangstemperatur von 21°C. Unmittelbar nach der Exposition wurden die läsionstragenden Leberlappen orthogonal zu den Applikatorachsen in Schichten von 3 mm segmentiert. Die Bewertung der thermischen Destruktion (Flächenbestimmung) erfolgte am Videomikroskop für jede einzelne Schicht anhand der Gewebefarbe (Ausbleichungseffekt bei Koagulation). Unter Berücksichtigung der Schichtdicke und des Schnittverlustes konnte so das gesamte Volumen der Schädigungszone rekonstruiert und mit dem Simulationsergebnis verglichen werden.

2.3.2.3.3 In-vivo Evaluation

Für die In-vivo Evaluation des Dosimetriemodells erfolgte die Induktion einer thermischen Läsion durch eine laserinduzierten Thermotherapie an der gesunden Schweineleber in-vivo. Als Versuchstiere dieser Versuchsreihe dienten deutsche männliche Hausschweine (Gewicht 30-40 kg, Alter 10-12 Wochen, Genehmigungsnummer LaGetSi Berlin: 0015-02). Die Tiere erhielten eine Standarddiät und wurden am Tag des Experiments nüchtern gelassen. Die Vorbereitung und Durchführung der Versuche entsprach vollständig der Vorgehensweise der unter 2.2.1.3 (s. S. 39 ff.) beschriebenen Versuchsreihe. An insgesamt 5 Schweinen erfolgte eine laserinduzierte Thermotherapie mit 30 Watt über 15 Minuten (Nd:YAG-Laser, 1064 nm; gekühlter Diffuser-Tip Applikator). Pro Tier wurden 2 aufeinanderfolgende Thermoläsionen in einem Abstand vom mindestens 10 cm durchgeführt. Jeweils eine Läsion wurde dabei während normaler hepatischer Perfusion und während kompletter Blutflussunterbrechung durch ein Pringle-Manöver induziert. Zwischen den Applikationen wurde eine Latenzzeit von mindestens 5 Minuten eingehalten. Dem rechnergestützten Bestrahlungsmodell wurden die Parameter der geplanten LITT (30 Watt, 15 Minuten, Nd:YAG-Laser) vorgegeben und ein dreidimensionales Bild des Koagulationsausmaßes erstellt. Die gewählte Gewebeausgangstemperatur wurde hierin auf 36°C festgelegt und die ROI mit einer Kantenlänge von 10 cm bei allseits offenen thermischen Rändern berechnet. Als Gewebepfusion wurde für die normal perfundierte Leber ein Wert von $0,5 \text{ cm}^3\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ angesetzt. Bei den Versuchen unter Pringle-Manöver wurde die Leberperfusion mit $0 \text{ cm}^3\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ angesetzt. Postinterventionell wurde die Tiere getötet ohne aus der Narkose zu erwachen. Die Leber wurde entnommen und die Thermoläsionen longitudinal und transversal vermessen und die Volumina berechnet.

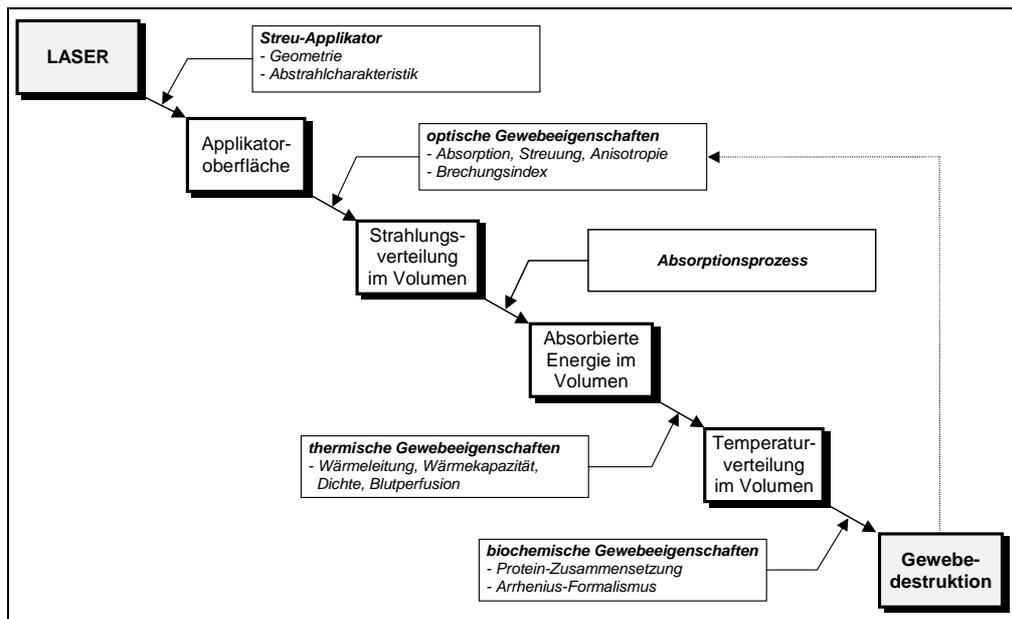


Abb. 15: Schematischer Ablauf der Dosimetrie einer LITT von Lebermetastasen

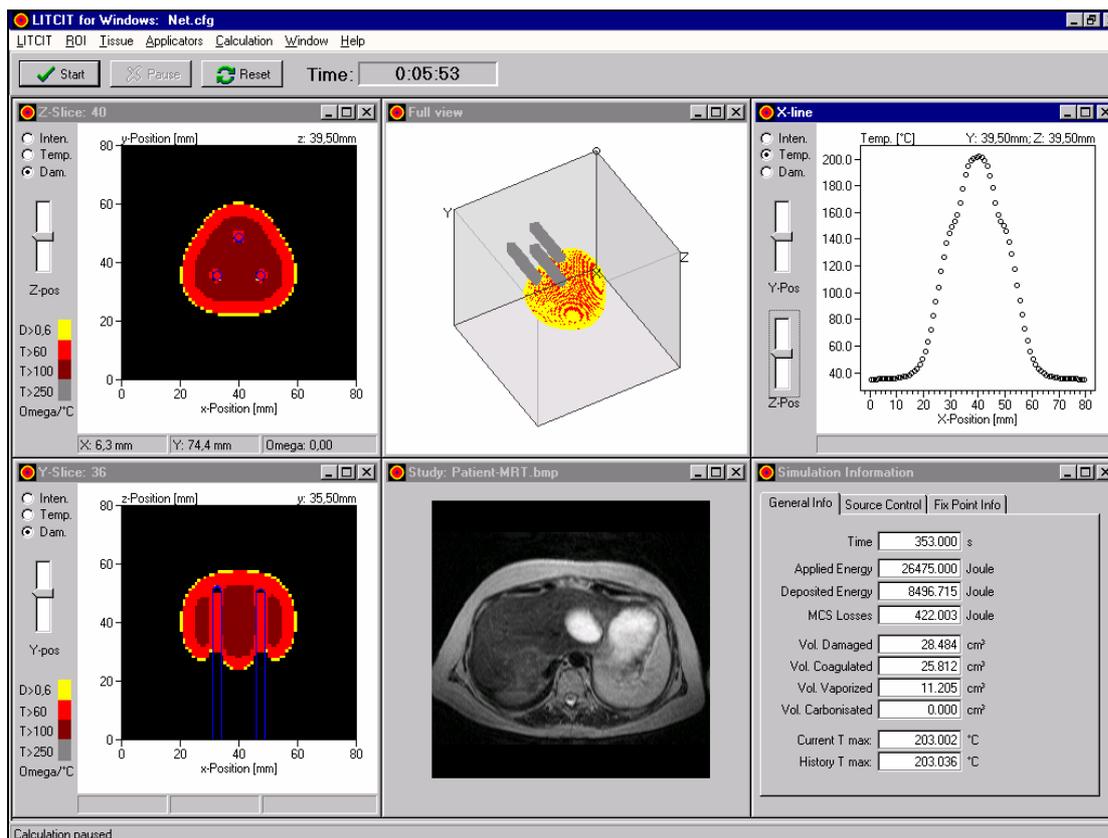


Abb. 16: Abbildung der PC-gestützten Benutzeroberfläche des Dosimetriemodells. Beispiel einer 3-fach-Applikation. Links oben u. unten: Darstellung der Schädigung transversal und sagittal; Mitte oben: 3D-Visualisierung des Schädigungsvolumens, Mitte unten: Integration von MRT- oder CT-Datensätzen. Rechts oben: Line-Scan der Temperatur; Rechts unten: statistische Daten und Applikatorsteuerung