

Aus der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ablation von Lebergewebe mittels IRE – Charakterisierung der Gewebeveränderung
in der Akutphase im Großtiermodell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Lind, Marie-Christine
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 25. April 2025

Widmung

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
1. Einleitung	12
2. Literaturdiskussion	14
2.1 Besonderheiten von Anatomie und Funktion der Leber	14
2.2 Tumoren der Leber	14
2.2.1 Metastasen	15
2.2.2 Primäre Malignome	15
2.2.2.1 Hepatozelluläres Karzinom	15
2.2.2.2 Cholangiozelluläres Karzinom	17
2.2.3 Benigne Lebertumoren	18
2.3 Therapiemöglichkeiten	19
2.3.1 Benigne Tumoren	19
2.3.2 Maligne Tumoren	19
2.3.2.1 Chirurgische Therapie	20
2.3.2.2 Systemische Therapie	22
2.4 Ablative Verfahren	22
2.4.1 Thermische Ablationsverfahren	23
2.4.1.1 Radiofrequenzablation	23
2.4.1.2 Mikrowellenablation	24
2.4.1.3 Sonstige Verfahren	25
2.4.2 Chemische Verfahren	26
2.4.3 Strahlentherapie	26
2.5 Irreversible Elektroporation	27
2.5.1 Allgemeines	27
2.5.2 Biologische Grundlagen	27
2.5.3 Reversible Elektroporation	28
2.5.4 Technisches Verfahren	28
2.5.5 Bildgebung	29
2.5.6 Vorteile	30
2.5.7 Nachteile	31
2.5.8 Komplikationen	32
2.5.9 Prozess der Gewebeerstörung	32
3. Material und Methoden	36
3.1 Studiendesign	36
3.2 Versuchsaufbau	36
3.3 Geräte und Materialien	37
3.3.1 Irreversible Elektroporation	37
3.3.2 Bildgebung	38
3.4 Tiermodell	38
3.5 Versuchsablauf	39
3.5.1 Anästhesie	39
3.5.2 IRE	40
3.5.3 MRT	41
3.5.4 Tötung und Gewebegewinnung	42
3.6. Auswertung	44
3.6.1 Histopathologische Auswertung	44
3.6.2 MRT	47
3.7 Datenerhebung und -auswertung	47
4. Ergebnisse	49
4.1 Histopathologische Ergebnisse	50
Chronologische Aufführung der Ablationszeitpunkte	52

4.2 Ergebnisse MRT	64
4.3 Korrelation Pathologie und MRT	75
4.3.1 Korrelation Ausmaß der Zellzerstörung	75
4.3.2 Korrelation Ablationszonen	77
4.3.3 Korrelation Übergangszone	81
4.3.4 Zusammenfassung	82
5. Diskussion	84
5.1 Beurteilung im wissenschaftlichen Kontext	84
5.1.1 Histopathologische Ergebnisse (Unterüberschriften nicht als Überschrift)	84
Erfolg der Ablationen	84
Zonenaufbau der Ablationsflächen	85
Thermoablative Nekrose	85
Dynamik der histopathologische Veränderungen im zeitlichen Verlauf	86
Art der Gewebezzerstörung	87
Ablationsflächen-Größe + Übergangszone	88
5.1.2 MRT-Ergebnisse (Unterüberschriften nicht als Überschrift)	90
MRT: Signalintensität	90
MRT: Ablationszone	92
5.1.3 Korrelation MRT- und histopathologische Ergebnisse (Unterüberschriften nicht als Überschrift)	94
Korrelation: Nekroseggrad + Signalintensität	94
Korrelation Fläche	96
5.2 Methodenkritik	97
5.2.1 Tiermodell	97
5.2.2 Versuchsdurchführung	98
5.2.3 Auswertung	99
5.3 Ausblick	101
5.4 Konklusion	102
6. Zusammenfassung	105
7. Literaturverzeichnis	107
8. Anhang	117
Histologische Arbeitsmethoden	117
Formalin Fixierung	117

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
A	Ampere
A.	Arterie
ADC	apparent diffusion coefficient
AFP	Alpha Fetoprotein
AP	Alkalische Phosphatase
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BGA	Blutgasanalyse
Bzw.	Beziehungsweise
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CT	Computertomographie
DWI	diffusion weighted imaging
EKG	Elektrokardiogramm
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
g	Gramm
ggfs.	gegebenenfalls
Gy	Gray
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDR	High Dose Rate
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFU	Hochfokussierter Ultraschall
ID	Identifikationsnummer
IRE	Irreversible Elektroporation
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
LITT	Laserinduzierte Thermotherapie
mg	Milligramm
MHz	Megahertz

ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
µs	Mikrosekunde
mV	Millivolt
MWA	Mikrowellenablation
Mm	Millimeter
nm	Nanometer
PEI	Perkutane Ethanol-Injektion
pH	potentia Hydrogenii
RE	Reversible Elektroporation
RFA	Radiofrequenzablation
RKI	Robert Koch Institut
ROI	Region of interest
SIRT	Selektive interne Strahlentherapie
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TierSchVersV	Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren
u.a.	unter anderem
UICC	Union for International Cancer Control
V	Volt
V.	Vene
z.B.	Zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anteil von Tumorentitäten an Lebermalignomen, modifiziert nach (11).....	15
Abbildung 2: Barcelona Clinic Liver Cancer, modifiziert nach (17) BSC: Best Supportive Care, OP: Operation, TX: Transplantation	20
Abbildung 3: Versuchsaufbau: zeitlicher Verlauf Ablauf der Interventionen	37
Abbildung 4: schematische Darstellung der histologischen Präparate	44
Abbildung 5: Messung der Ablationsfläche, schematische Darstellung am Frischpräparat	46
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Messung der Ablationsflächen am histologischen Präparat.....	46
Abbildung 7: Anzahl an durchgeführten Ablationen pro Zeitpunkt	49
Abbildung 8: Links: Frischpräparat: Bereich der IRE Schädigung dunkelrot. Bereich der thermischen Schädigung unmittelbar angrenzend an die Sonden weißlich, rechts: Fixiertes Präparat (18h): IRE Schädigung dunkel, thermische Schädigung um die Sonden hellgrau.....	50
Abbildung 9: links: Schema der Ablationszonen, 1: vitales Lebergewebe, 2: thermoablative Zone, 3: Bereich der IRE-Schädigung; rechts: mikroskopischer Überblick entsprechend des Schemas.....	50
Abbildung 10: Verschiedene Gewebeabschnitte, 4x Vergrößerung Auf dem Bild sind beispielhaft sowohl ein Bereich der thermischen Gewebeschädigung (unten links), als auch der Schädigung durch IRE zu sehen. Zum Vergleich oben im Bild vitales Lebergewebe.	51
Abbildung 11: Thermische Gewebeschäden, 10-40x Vergrößerung Auf dem linken Bild sieht man im oberen Abschnitt einen Bereich der thermischen Ablationszone, unten im Bild den Übergang zur Gewebeschädigung durch IRE. Das rechte Bild zeigt in stärkerer Vergrößerung die Effekte der thermischen Ablation: Aufgehobene Zellgrenzen, zerstörte Zellkerne, gestörte Läppchenstruktur.....	51
Abbildung 12: Ablationszone zum Zeitpunkt $t=1$, 4x Vergrößerung Die Läppchenstruktur ist erhalten, erste Zellveränderungen sind sichtbar	52
Abbildung 13: IRE-Ablationszone, 4x Vergrößerung Ca. 80% zerstörte Zellen , die Bindegewebssepten sind intakt	55
Abbildung 14: IRE-Schädigung nach 18 Stunden, 4x Vergrößerung Fast 100% der Zellen sind zerstört, die Bindegewebssepten verlieren ihre Struktur. Im unteren rechten Quadranten sieht man einen Teil der thermoablativen Zone.....	56
Abbildung 15: IRE-Zone zum Zeitpunkt $t=24$, 4x Vergrößerung Die Zellen sind zu 100% zerstört, auch die Bindegewebssepten sind nekrotisch, die Läppchenstruktur ist weitestgehend aufgehoben.	57
Abbildung 16: 1h nach IRE, HE, 15x Vergrößerung	59
Abbildung 17: 6h nach IRE, HE, 15x Vergrößerung	59
Abbildung 18: 18h nach IRE, HE, 20x Vergrößerung	60
Abbildung 19: 24h nach IRE, HE, 15x Vergrößerung	60
Abbildung 20: Entwicklung des prozentualen Anteils an zerstörten Zellen in Stunden nach erfolgter Ablation(Mediane, sowie Range). Für die Zeitpunkte $t=1$ und $t=3$ sind keine Mediane bestimmbar	61
Abbildung 21: Mediane und Range der Ausmaße der Läsionen im Frischpräparat in Stunden nach erfolgter Ablation.....	62
Abbildung 22: Maße der Läsionen der fixierten Präparate über die Zeit.....	62
Abbildung 23: Mittelwerte der Größendifferenz der Läsionen im Frischpräparat und im fixiertem Präparat nach Zeitpunkt.....	63
Abbildung 24: Vergleich Übergangszone von Frisch- und fixiertem Präparat.....	63
Abbildung 25 Typische IRE 3-Schichtung in der T2 Wichtung	66
Abbildung 26 T1 Nativbild, 18h nach IRE	69
Abbildung 27 T1 Frühvenöse Phase, 18h nach IRE	70

hat formatiert: Schriftart: (Standard) Times New Roman, 12 Pt.

Abbildung 28 T1 Spätvenöse Phase, 18h nach IRE	70
Abbildung 29: Vergleich T1- und T2 Wichtung 24 nach IRE	71
Abbildung 30: Zeitliche Entwicklung der Signalintensität in den verschiedenen MRT-Sequenzen.....	72
Abbildung 31: Zeitliche Entwicklung der Signalintensität in den verschiedenen MRT-Sequenzen.....	73
Abbildung 32: Zeitliche Entwicklung der Mediane der Ablationszone und der Ablationszone plus Übergangszone in der T2-Wichtung.....	73
Abbildung 33: Entwicklung der Ablationsflächen über die Zeit in den T1-Wichtungen T1 portal entspricht der portalvenösen KM Phase, T1 spät der spätvenösen KM Phase	74
Abbildung 34: Vergleich der Mediane der Nekrosgade der histopathologischen Auswertung in % und der Veränderungen der Signalintensität der MRT-Bilder in Absolutwerten über die Zeit	76
Abbildung 35: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=1 frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase	77
Abbildung 36: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=3 frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase	78
Abbildung 37: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=6 frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase	79
Abbildung 38: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=12 frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase	79
Abbildung 39: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=18 frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase	80
Abbildung 40: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=24 frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase	81
Abbildung 41: Läsion 24h nach IRE, T2-Wichtung	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Parameter der MRT-Sequenzen	42
Tabelle 2: Semiquantitative Einteilung der histologischen Veränderungen, angelehnt an (123-126).....	45
Tabelle 3: Maße der Ablationszonen in mm, Mittelwert der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %	53
Tabelle 4: Maße der Ablationszonen in mm, Mittelwert der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %.....	53
Tabelle 5: Maße der Ablationszonen in mm, Mittelwert der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %.....	54
Tabelle 6: Maße der Ablationszonen in mm, Mittelwert der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %.....	56
Tabelle 7: Maße der Ablationszonen in mm, Mittelwert der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %.....	57
Tabelle 8: Maße der Ablationszonen in mm, Mittelwert der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %.....	58
Tabelle 9: Signalintensität zum Zeitpunkt t=1 in verschiedenen Sequenzen Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung.....	64
Tabelle 10: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt t=1 in mm. Zudem Maße der in der t-2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet)	65
Tabelle 11: Signalintensität zum Zeitpunkt t=3 in verschiedenen Sequenzen Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung.....	65
Tabelle 12: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt t=3 in mm. Zudem Maße der in der t-2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet)	66
Tabelle 13: Signalintensität zum Zeitpunkt t=6 in verschiedenen Sequenzen Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung.....	66
Tabelle 14: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt t=6 in mm. Zudem Maße der in der t-2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet)	67
Tabelle 15: Signalintensität zum Zeitpunkt t=12 in verschiedenen Sequenzen Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung.....	67
Tabelle 16: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt t=12 in mm. Zudem Maße der in der t-2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet)	68
Tabelle 17: Signalintensität zum Zeitpunkt t=18 in verschiedenen Sequenzen Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung.....	68

Tabelle 18: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt t=18 in mm. Zudem Maße der in der t-2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet).....	69
Tabelle 19: Signalintensität zum Zeitpunkt t=24 in verschiedenen Sequenzen Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung.....	70
Tabelle 20: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt t=24 in mm. Zudem Maße der in der t-2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet).....	71
Tabelle 21: Vergleich des Zelluntergangs in den histopathologischen Schnitten in Prozent mit der Signalintensität (über ROI gemessen) der MRT-Sequenzen sowie prozentuale Angabe der Veränderung von t=24 zu t=1.....	75
Tabelle 22: Mediane der Ausmaße der Übergangszonen , aufgeteilt nach Ablationszeitpunkt	82

1. Einleitung

Nach aktuellen Zahlen des Robert-Koch-Institutes (aus dem Jahr 2019) treten pro Jahr in Deutschland fast eine halbe Million Neuerkrankungen an Krebs auf (1) . Davon entfallen weniger als 10.000 Neuerkrankungen auf das Hepatozelluläre (HCC) und Cholangiozelluläre Karzinom. Damit tritt Leberkrebs zwar nicht besonders häufig auf, zählt jedoch mit knapp 8.000 Todesfällen im gleichen Jahr zu den häufigsten Krebstodesursachen und hat somit eine schlechte Prognose (2).

Neben der Behandlung von primären malignen Lebertumoren kommt auch der Therapie von Lebermetastasen eine große Bedeutung zu, da sie bei einer Vielzahl von Malignomen das häufigste Metastasierungsmuster darstellen. Daneben gibt es verschiedene benigne Lebertumoren, die häufig als Zufallsbefund diagnostiziert werden (3).

Es gibt heutzutage verschiedene Therapiemöglichkeiten für die Behandlung primärer und sekundärer Lebertumore. Als kurative Optionen sind die chirurgische Resektion, die Lebertransplantation und einige ablativ Verfahren zu nennen. Palliativ steht insbesondere für das HCC die transarterielle Chemoembolisation (TACE) und die systemische Therapie mit den Medikamenten Atezolizumab und Bevacizumab im Mittelpunkt der Therapiestrategie, bei Metastasen sind es die Chemo- und die Immuntherapie (3)(4)(5).

Als weitere Therapiemöglichkeit wurde in den letzten Jahrzehnten eine Reihe an minimal-invasiven Verfahren entwickelt. Basis dieser Verfahren ist die lokale Zerstörung des veränderten Gewebes inklusive eines Sicherheitsraums unter gleichzeitig größtmöglicher Schonung des gesunden Gewebes. Zu den heute bereits bekannten und angewandten Methoden bei Lebertumoren zählen unter anderem die Radiofrequenzablation und die Mikrowellenablation, die auf einer thermischen Gewebedestruktion basieren. Dadurch treten allerdings Limitationen auf, unter anderem die Lage von Tumoren in der Nähe von kritischen Strukturen, wie zum Beispiel Blutgefäße oder Gallenwege, die auch durch die thermische Schädigung zerstört werden können (3)(6).

Ein relativ neuartiges lokalablativ Verfahren ist die irreversible Elektroporation (IRE), die nach bisherigem Kenntnisstand überwiegend auf nicht thermischen Effekten beruht. Davon verspricht man sich, auch Tumore in der Nähe kritischer Strukturen behandeln zu können (7)(8). Da das Verfahren verhältnismäßig neu ist, ist die Datenlage hier noch relativ spärlich, insbesondere bezüglich des genauen zeitlichen Ablaufs der Gewebeschädigung. In meiner Dissertation befasste ich mich mit der Frage, wie in einem Großtiermodell die Gewebeveränderungen in der Akutphase anhand histopathologischer Schnitte und MRT-

Aufnahmen charakterisiert werden können. Ein besonderes Augenmerk gilt der Frage, ab welchem Zeitpunkt nach der Ablation eine definitive Schädigung des Gewebes sichtbar ist und inwieweit dies mit Veränderungen in bildgebenden Verfahren korreliert.

2. Literaturdiskussion

2.1 Besonderheiten von Anatomie und Funktion der Leber

Die Leber liegt unterhalb des Zwerchfells im rechten Oberbauch, misst etwa 20 x 15 x 10 cm und ist circa 1500 Gramm schwer. Sie ist das zentrale Stoffwechselorgan und erhält über die Pfortader das Blut aller Verdauungsorgane (außer des unteren Rektums). Sie selbst wird zusätzlich durch die A. hepatica propria versorgt und drainiert über die Lebervenen in die V. cava inferior. Nach Couinaud wird die Leber in acht funktionelle Segmente unterteilt, die anhand der Pfortaderäste vorgenommen wird. Jedes Segment wird von einer eigenen Trias aus Leberarterie, Gallengang und Pfortaderast versorgt. An den Grenzen der Segmente verlaufen die drainierenden Lebervenen. Histologisch betrachtet setzt sich die Leber aus den Leberläppchen zusammen, die aus Hepatozyten und Sinusoiden bestehen, welche radiär um die sogenannte Zentralvene angeordnet sind. Zwischen diesen beiden Strukturen befindet sich ein schmaler Spalt, der mit Blutplasma und spezialisierten Zellen gefüllt ist, der Disse-Raum. Die Sinusoide sind erweiterte Kapillaren und besitzen ein diskontinuierliches Endothel, durch das auf einer Länge von etwa 0,5 mm der gesamte Stoffaustausch mit den Hepatozyten stattfindet. Zwischen zwei Reihen der Leberzellen befinden sich die Canaliculi biliferi, die den Ursprung der intrahepatischen Gallenwege bilden und entgegengesetzt des Blutes aus Richtung der Zentralvene zu den periportal Feldern ziehen. Die periportal Felder stellen eine bindegewebige Struktur an den Kontaktpunkten verschiedener Leberläppchen dar und beinhalten die Glisson-Trias. Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal ist die ausgesprochen gute Regenerationsfähigkeit der Leber. Selbst nach einer Reduktion der Lebermasse um 40-70% ist das Organ in der Lage sich innerhalb weniger Wochen vollständig zu regenerieren. Dabei wächst die Leber allerdings nicht in ihre ursprüngliche Form nach, sondern die verbleibenden Segmente vergrößern sich. Dies ist einerseits eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg von chirurgischen Therapien und ermöglicht andererseits die Lebendspende einer Leber (3) (9)(10).

2.2 Tumoren der Leber

In der Leber lassen sich verschiedene benigne und maligne Tumoren finden, die primären und sekundären Ursprungs sein können. Bei den Malignomen überwiegen Tumore sekundären Ursprungs, die Metastasen (11).

2.2.1 Metastasen

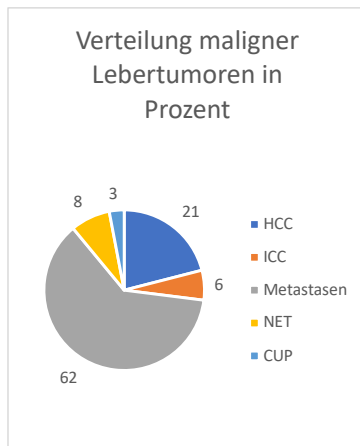


Abbildung 1: Anteil von Tumorentitäten an Lebermalignomen, modifiziert nach (11)

Metastasen stellen die häufigste Form maligner Tumore in der Leber dar. Bei 25-50% aller Malignome entwickeln sich im Laufe der Erkrankung Lebermetastasen. Die Leber ist das häufigste Organ einer hämatogenen Metastasierung. Der häufigste Ursprung von Lebermetastasen ist das kolorektale Karzinom, bedingt durch seinen portal-venösen Abfluss (12)(13). Weitere Ursprungsorte liegen im Gastrointestinaltrakt, in der Mamma, in der Lunge oder im Urogenitaltrakt. Lebermetastasen können singulär auftreten, jedoch sind bei Diagnosestellung multiple Läsionen häufiger zu finden. Sie sind selten in einer zirrhotischen

Leber zu finden (14). Da die Sonographie die am häufigsten eingesetzte bildgebende Methode darstellt, werden die meisten Metastasen sonographisch nachgewiesen. Allerdings kann sich eine Metastase in der Bildgebung sehr unterschiedlich darstellen und eine Vielzahl an morphologischen Aspekten und Vaskularisierungsmustern annehmen. Erschwerend für die Diagnostik ist die Tatsache, dass eine klinische Symptomatik erst spät einsetzt und auch dann oft sehr unspezifisch ist, wie zum Beispiel diffuser Oberbauchschmerz (3)(12)(14). Zum späteren Staging wird dann ein Kontrastmittel-CT oder MRT durchgeführt (13). Prognostisch relevant sind unter anderem Lage, Anzahl und Größe der Metastasen, sowie Anteil an gesunder Restleber und Entität des Primärtumors (6)(15).

2.2.2 Primäre Malignome

2.2.2.1 Hepatozelluläres Karzinom

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) wird auch als primäres Leberzellkarzinom bezeichnet. Es gehört weltweit zu den acht-häufigsten Tumorentitäten, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (Verhältnis 3:1). Die Inzidenz in Deutschland beträgt jährlich etwa 4 pro 100.000 Einwohner, ist allerdings gerade in den Industrieländern steigend. Besonders hoch ist sie im südostasiatischen Raum, aufgrund der hohen Rate an chronischen HBV-Infektionen. Ein Häufigkeitsgipfel liegt im 5. – 6. Lebensjahrzehnt, wobei die asiatischen Patient:innen häufig jünger sind. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Anzahl der Todesfälle fast

genauso hoch ist wie die Inzidenz des HCC, was die ungünstige Prognose dieses Tumors deutlich macht (2)(3)(16)(17).

Einem Großteil der HCC geht eine chronische Lebererkrankung voraus. In über 90% der Fälle liegt eine Leberzirrhose unterschiedlicher Genese vor. Die häufigsten Gründe für eine Zirrhose sind in Europa und Nordamerika das Vorliegen einer chronischen Hepatitis-C-Infektion und hoher Alkoholkonsum. Auch eine Hämochromatose, eine HBV-Infektion oder in selteneren Fällen das Aflatoxin B1 können ursächlich sein. In Asien und Afrika hingegen liegt bei bis zu 2/3 der Patient:innen eine HBV-Infektion zu Grunde, gefolgt von einer HCV-Infektion. Eine Zirrhose aufgrund hohen Alkoholkonsums spielt nur eine untergeordnete Rolle. Weitere assoziierte Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC sind männliches Geschlecht, Alter über 50 Jahre, Nikotinabusus, Adipositas und Diabetes mellitus (3)(15)(18).

Pathologisch betrachtet findet man beim HCC drei verschiedene Wachstumsmuster: solitär, multizentrisch oder diffus infiltrierend. Häufig bildet der Tumor eine Pseudokapsel. Als deskriptive Klassifikation werden für das HCC die TNM-Klassifikation und die UICC-Stadieneinteilung angewandt, im klinischen Kontext hat sich für die Stadieneinteilung und Therapiestratifikation die „Barcelona Clinic Liver Cancer“-Klassifikation durchgesetzt, auf die im späteren Verlauf der vorliegenden Arbeit noch genauer eingegangen wird (3)(4)(15).

Das HCC wird fast ausschließlich (90-95%) über die Leberarterie versorgt und unterscheidet sich hiermit vom gesunden Lebergewebe. Typisch für das HCC in der kontrastmittelverstärkten Bildgebung ist eine kräftige früharterielle Anreicherung und Auswaschen des Kontrastmittels in der portalvenösen und spätvenösen Phase. Der wichtigste Tumormarker ist das Alpha-Fetoprotein. Dieser Tumormarker kann sowohl zur Prognoseeinschätzung, zur Verlaufskontrolle als auch zur Früherkennung eingesetzt werden, jedoch gibt es auch Tumore die kaum AFP sezernieren. Des Weiteren werden die üblichen Leberfunktionsparameter bestimmt. Das HCC ist einer der wenigen Tumore, die ein solch spezifisches bildgebendes Verhalten zeigen, dass dieser bei nachgewiesener Zirrhose bereits anhand der typischen bildgebenden Eigenschaften diagnostiziert werden kann. In Einzelfällen kann eine Biopsie jedoch sinnvoll, beziehungsweise sogar notwendig sein (15)(17)(19). Das HCC breitet sich vor allem intrahepatisch aus und metastasiert nur spät lymphogen. Eine hämatogene Streuung wird ebenfalls selten beobachtet und kommt meist erst bei fortgeschrittenen Tumorstadien vor. Typisch für das HCC ist eine Gefäßinvasion in Pfortader oder Lebervene, welche die Prognose deutlich verschlechtern (20).

Klinisch bleiben maligne Lebertumoren lange Zeit unauffällig und werden häufig als Zufallsbefund entdeckt. Es kann im späten Verlauf zu Schmerzen im rechten Oberbauch

(Kapseldehnungsschmerz), zu Gewichtsverlust, Inappetenz und bei einer Beteiligung der Gallenwege zu einem Ikterus kommen. Eine bestehende Leberzirrhose kann unter dem Tumorwachstum dekomensieren und es kann zu der Entstehung von Aszites kommen (3)(4). Die Prognose des HCCs ist sehr variabel und hängt vor allem von dem BCLC Stadium bei Diagnosestellung ab. Während das mediane Überleben in den frühen Stadien über fünf Jahre beträgt, ist die Überlebensdauer in fortgeschrittenen Stadien sehr kurz (4)(17). Zur Prävention sollten Neugeborene und Risikogruppen gegen Hepatitis-B geimpft werden, da eine Impfung das Risiko eines HCC reduziert (17).

2.2.2.2 Cholangiozelluläres Karzinom

Das Gallengangskarzinom (CCC) macht circa ein Prozent aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland aus (1). Die Inzidenz liegt bei circa 3 pro 100.000 pro Jahr (3) und ist zunehmend. Insgesamt gehört das Malignom damit aber zu den seltenen Tumoren. Je nach Lage des CCC teilt man es in intrahepatisch oder extrahepatisch (entspricht duktal) ein. Die duktaalen Tumoren werden je nach Lage noch weiter unterteilt. Die intrahepatischen CCC werden als primärer Lebertumor gewertet, machen aber nur etwa 10-20% aller primären Lebertumoren aus. Von allen CCC entsprechen sie einem Anteil von etwa 10%. Deutlich häufiger sind mit etwa 70% aller CCC die perihilär gelegenen Tumoren, die im Bereich der Hepatikusgabel entstehen und auch als Klatskin-Tumoren bezeichnet werden. In Deutschland sind mehr Männer als Frauen betroffen und es gibt einen Häufigkeitsgipfel zwischen 60-70 Jahren (3)(4)(15).

Die meisten CCC treten sporadisch ohne genau detektierbare Ursachen auf. Es gibt jedoch einige Risikoerkrankungen, die mit dem CCC assoziiert werden. Dazu gehören vor allem chronische entzündliche Prozesse. Assoziierte Risikoerkrankungen sind die primär sklerosierende Cholangitis, fibropolyzystische Lebererkrankungen, Colitis ulcerosa und parasitäre Erkrankungen der Gallenwege. Auffallend ist, dass Gallensteine im Gegensatz zum Gallenblasenkarzinom beim CCC nicht vermehrt auftreten (3)(15).

Histopathologisch betrachtet handelt es sich zumeist um Adenokarzinome. Bei Kindern können auch embryonale Rhabdomyosarkome auftreten. Die Struktur ist in 95% der Fälle tubulopapillär. Sie können im gesamten Gallenwegssystem auftreten. Für die Diagnostik des CCC ist eine Bildgebung ausschlaggebend. Neben (Endo-) Sonographie, CT und MRT wird häufig eine MRCP durchgeführt. Die MRCP ersetzt aufgrund der geringeren Invasivität zunehmend die ERCP. Im Labor ist neben den üblichen Cholestaseparametern der Tumormarker CA 19-9 für die Verlaufskontrolle relevant (3)(21). Aufgrund der Lokalisation metastasieren CCC frühzeitig in die Leber. Ansonsten streuen sie vor allem in benachbarte Lymphknoten und in die Lunge

(15). CCC-Patient:innen zeigen klinisch keine Frühzeichen. Im Verlauf kann es, vor allem bei den dukталen Tumoren, zu einem positiven Courvoisier-Zeichen kommen (schmerzloser Ikterus und tastbar vergrößerte Gallenblase). Weitere Symptome sind allgemeine Cholestasezeichen wie Ikterus, eine Stuhlfärbung, dunkler Urin, Juckreiz oder auch epigastrische Schmerzen und Gewichtsverlust (15)(22). Die Prognose ist ohne R0-Resektion schlecht. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt insgesamt für das CCC bei 15-25% und für intrahepatische CCC sogar unter 5%. In den letzten Jahren gab es kaum positive Veränderungen (4)(9).

2.2.3 Benigne Lebertumoren

Primäre benigne Lebertumoren stellen eine sehr heterogene Gruppe dar und sind häufig Zufallsbefunde. Die häufigsten sind dabei Adenome, gefolgt von fokalen nodulären Hyperplasien und Hämangiomen. Initial verursachen sie zumeist keine Symptome. Bei einer Größenprogredienz kann es durch die raumfordernde Wirkung unter anderem zu Oberbauchschmerzen kommen. In seltenen Fällen können Adenome rupturieren und bluten. Benigne Lebertumore sind wichtige Differentialdiagnosen der Lebermalignome. Eine gute Diagnostik ist daher unabdingbar (3).

Leberzelladenome kommen meist solitär vor und treten häufiger bei der Einnahme hormoneller Kontrazeptiva auf. Es wird vermutet, dass Östrogen und Gestagen wachstumsfördernde Effekte haben. Anabolen Steroiden spricht man die gleiche Eigenschaft zu. Obwohl es bei Lebertumoren keine generelle Adenom-Karzinom-Sequenz gibt, wird in bis zu 10% aller Adenome eine maligne Entartung beschrieben (23).

Bei der fokalen nodulären Hyperplasie (FNH) handelt es sich nicht wirklich um eine Neoplasie, sondern um eine unspezifische Hyperplasie der Hepatozyten. Die arterielle Perfusion ist jedoch pathologisch gesteigert. Das Auftreten ist zumeist solitär. Genau wie bei den Adenomen ist ein vermehrtes Vorkommen bei Frauen im gebärfähigen Alter zu beobachten. FNH entarten nicht. Bei Hämangiomen handelt es sich um Tumore mesenchymalen Ursprungs. Sie machen selten Symptome. Sehr selten kann es, wenn sie oberflächlich gelegen sind, zu einer Spontanruptur und Blutung in die Bauchhöhle kommen (23)(24).

2.3 Therapiemöglichkeiten

Für die unterschiedlichen Tumoren der Leber existieren in den verschiedenen Stadien eine Vielzahl an potenziell kurativen und palliativen Therapiemöglichkeiten. Grundsätzlich bedürfen alle Patient:innen einer interdisziplinären Zusammenarbeit von Chirurgen, Onkologen, Pathologen, Strahlentherapeuten und interventionellen Radiologen und jeder Fall sollte in einer Tumorkonferenz vorgestellt werden (5)(25). Als potentiell kurative Optionen gelten die chirurgische Therapie, die Lebertransplantation und einige ablativ Verfahren. Die Systemtherapie hat ihren festen Stellenwert in der palliativen Situation. Die Strahlentherapie kann dabei eine unterstützende Rolle spielen (3)(5)(15).

2.3.1 Benigne Tumoren

Benigne Tumoren werden meist als Zufallsbefund diagnostiziert und bedürfen oftmals keiner Therapie. Eine chirurgische Intervention ist bei primär benignen Tumoren prinzipiell nur notwendig, wenn es Zweifel an der Dignität gibt, Symptome oder Komplikationen auftreten. Aufgrund des Entartungspotenzials von Adenomen wird von einigen Autoren eine Resektion empfohlen, wenn diese symptomatisch oder größer als fünf Zentimeter werden (23). Bei Adenomen sollten hormonelle Kontrazeptiva abgesetzt und eine Schwangerschaft vermieden werden, da diese das Tumorstadium fördern können (26). In sehr seltenen Fällen kommt auch bei benignen Lebertumoren eine Lebertransplantation in Betracht, wenn diese symptomatisch sind und aufgrund der Lage eine Resektion nicht möglich ist. (15)(24).

2.3.2 Maligne Tumoren

Die Entscheidungsgrundlagen für die verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten bei Lebermalignomen sind vielfältig. Bei Lebermetastasen ist die Wahl des Therapieverfahrens insbesondere vom Primärtumor und Tumorstadium abhängig (27)(28)(29). Die Therapie des HCC wird im Wesentlichen vom Allgemeinzustand der Patient:innen, der Leberfunktion und dem Tumorstadium bestimmt. Entscheidet für die Therapiewahl ist, ob bei den Patient:innen eine Leberzirrhose vorliegt. Für die Therapie des HCC auf dem Boden einer Zirrhose hat sich die BCLC Klassifikation etabliert. Sie teilt das HCC in fünf klinische Stadien ein. Während in den frühen Stadien eine kurative Therapie angestrebt wird, kommen im intermediären Stadium und fortgeschrittenen Stadium palliative Konzepte zum Tragen. Im Terminalstadium steht eine rein symptomatische Behandlung im Sinne einer *Best Supportive Care* im Vordergrund (15)(17)(30).

Für die Beurteilung der Leberfunktion hat sich die Child-Pugh Klassifikation etabliert. Diese wurde entwickelt, um eine Leberzirrhose einzuteilen und die Prognose besser abschätzen zu können. Dabei werden für fünf Aspekte (Albumin, Bilirubin, Quick, Grad der Enzephalopathie und das Vorhandensein von Aszites) insgesamt zwischen 5-15 Punkte verteilt. Je mehr Punkte die Patient:innen erhalten desto geringer die 1-Jahr-Überlebensrate (3)(30).

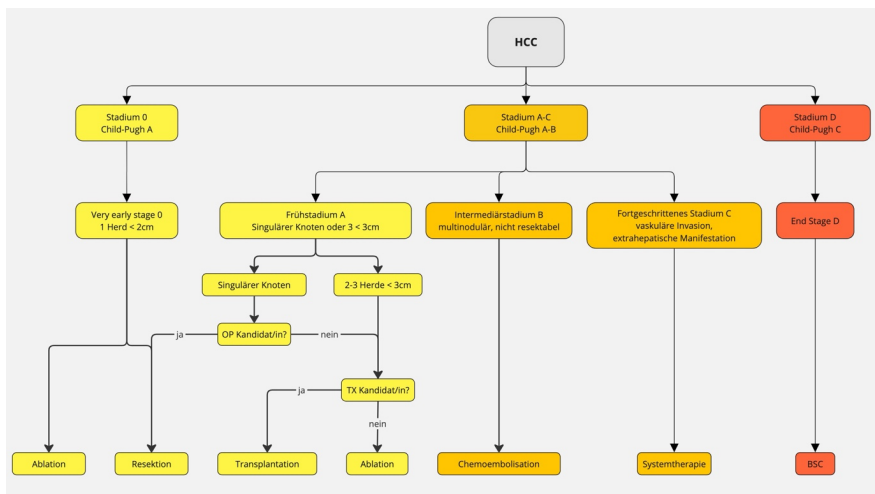


Abbildung 2: Barcelona Clinic Liver Cancer, modifiziert nach (17)
BSC: Best Supportive Care, OP: Operation, TX: Transplantation

2.3.2.1 Chirurgische Therapie

Zu den chirurgischen Therapiemöglichkeiten zählen die Transplantation und die Leberteilresektion (9).

Mittel der Wahl bei nicht-zirrhatischen HCC-Patient:innen ist laut deutscher S3-Leitlinie die Resektion, soweit dieses anatomisch möglich ist. In den letzten Jahren gab es erhebliche Fortschritte in der Leberchirurgie, sodass heutzutage Resektionen von bis zu 80% des Lebertumors durchgeführt werden können. Kriterien, die gegen eine Resektion sprechen, sind extrahepatische Tumormanifestationen oder nicht-resezierbare Tumore, allgemeine Operations-Unfähigkeit der Patient:innen oder eine zu geringe funktionale Leberreserve. Prognostisch relevanter als die Größe des Tumors ist dessen Lagebeziehung zu den Gefäßen und Gallengangsstrukturen. Ebenfalls sollte der Tumor nur reseziert werden, wenn eine R0-Resektion zu erwarten ist. Begleiterkrankungen können die Prognose der Patient:innen auch bei erfolgreicher Resektion deutlich verschlechtern (5)(17)(31).

Für HCC-Patient:innen mit Leberzirrhose wird die chirurgische Resektion als kuratives Verfahren nur in einem frühen Tumorstadium empfohlen (BCLC 0 und A) (15)(17). Zudem sollten sich die Patient:innen in einem guten Allgemeinzustand befinden, wobei die Lebenserwartung relevanter ist als das Alter der Patient:innen, und die Zirrhose sollte sich als CHILD-A-Stadium einstufen lassen. Diese sehr vorsichtige Empfehlung wird aktuell diskutiert, da sich in den letzten Jahren sowohl die Operationsmöglichkeiten an sich, als auch die perioperative Betreuung verbessert haben.

Therapie der Wahl des nicht fernmetastasierten intrahepatischen Cholangiokarzinoms ist die Resektion, sofern sich eine R0 Situation erzielen lässt. Die wichtigsten Prognosefaktoren sind hierbei eine Gefäßinvasion, ein Lymphknotenbefall und die Multifokalität. Eine Lebertransplantation sollte außerhalb von Studien nicht erfolgen (5)(32).

Beim HCC stellt die Lebertransplantation das Verfahren mit den besten Langzeitergebnissen dar und ist fester Bestandteil des Therapiekonzepts. Allerdings wird eine Transplantation nur empfohlen, wenn die sogenannten Mailand-Kriterien erfüllt sind: das bedeutet entweder ein Knoten < 5 cm oder bis zu drei Knoten < 3 cm, keine makrovaskuläre Infiltration und keine extrahepatische Tumormanifestation (5)(31). Bei einer auf die Leber beschränkten Tumorerkrankung sieht die deutsche S3 Leitlinie mittlerweile auch die Möglichkeit eines Downstagings vor, wenn die Patienten initial die Mailand-Kriterien nicht erfüllen. Sofern durch eine geeignete Vorbehandlung eine Situation innerhalb der Mailand-Kriterien erzielt werden kann, kann eine Lebertransplantation erwogen werden.

Die meiste Erfahrung bei der Therapie von Lebermetastasen besteht beim kolorektalen Karzinom. Generell besteht bei hepatischen Metastasen durch eine R0-Resektion die höchste Chance auf Heilung. Selbst multiple Metastasen können prinzipiell mit kurativer Absicht reseziert werden, ausschlaggebend ist die technische und funktionelle Möglichkeit, die unter anderem von der Lage der Metastasen, der Größe und Funktion der verbleibenden Restleber abhängt. Eine Resektion sollte allerdings nur angestrebt werden, wenn eine vollständige Entfernung sämtlicher Metastasen möglich scheint (13)(28)(33). Daten zeigen, dass eine unvollständige Entfernung der Metastasen zu keiner verlängerten Überlebensdauer führt und auch sonst keine klinischen Vorteile für die Patient:innen ergibt (34). Insgesamt sollte eine mögliche Resektion individuell unter interdisziplinärer Abstimmung und Einbeziehung der Patient:innen diskutiert werden (15) (35). Die Transplantation spielt in der Therapie von Lebermetastasen nur eine untergeordnete Rolle. Dies liegt zum einen an den hohen

Rezidivraten in Verbindung mit einem schlechten Langzeitüberleben und zum andere an der ausgeprägten Organknappheit (15)(35).

2.3.2.2 Systemische Therapie

Die Systemtherapie des HCC ist gemäß der deutschen S3 Leitlinie bei Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium (Fernmetastasen, Pfortaderverschluss) mit erhaltener Leberfunktion indiziert, oder bei Patienten im intermediären Tumorstadium, bei denen durch die lokalen Therapieverfahren keine Tumorkontrolle erreicht werden kann. Als Erstlinientherapie kommt dabei unter anderem die Kombination aus Atezolizumab und Bevacizumab in Frage (5). Für das CCC ist eine Systemtherapie indiziert, wenn Fernmetastasen vorliegen oder ein lokal fortgeschrittener Tumorbefall nicht resektabel ist. Des Weiteren kann eine Systemtherapie in neoadjuvanter oder adjuvanter Intention durchgeführt werden (5).

Die Therapie von Lebermetastasen richtet sich in erster Linie nach der Entität des Primärtumors (27). Die neoadjuvante Chemotherapie bei primär nicht-resektablen Lebermetastasen ist eine valide Therapieoption. Bei bis zu 15-50% aller Patient:innen kann durch eine neoadjuvante Therapie eine resektable Situation erzielt werden (33)(36)(37). Ein Problem der Chemotherapie ist allerdings der verlängerte Zeitraum bis zur Operation. Unter Umständen kann es zu einem Tumorprogress unter der Therapie kommen, zudem ist mitunter das postoperative perioperative Komplikationsrisiko erhöht.

2.4 Ablative Verfahren

In den letzten zwei Jahrzehnten haben sich minimal-invasive Verfahren der Tumorablation zu einer effektiven Therapieoption bei primären und sekundären Lebermalignomen entwickelt. Ein potenzieller Vorteil gegenüber der Resektion ist die deutlich geringere Invasivität und die Möglichkeit Tumore zu behandeln, die aufgrund ihrer Lage für eine Resektion nicht in Frage kommen. Somit können potenziell mehr Patienten einer kurativen Therapie zugeführt werden. Ziel der Verfahren ist dabei eine vollständige Zerstörung des Tumors einschließlich eines ausreichenden Sicherheitsabstands, analog zur Resektion (6)(38). Für die Behandlung des HCCs und iCCAs, sowie von kolorektalen Lebermetastasen hat die Tumorablation Einzug in die Leitlinien gefunden (5)(39). Man kann die interventionellen Verfahren je nach Wirkprinzip in verschiedene Gruppen einteilen. Die Wirkung kann chemisch, thermisch, durch Strahlung oder potenziell nicht-thermisch durch Stromimpulse bedingt sein. (13). Hierzu zählen die

perkutane Ethanolinjektion (PEI), die interne Strahlentherapie und thermische Verfahren. Beispiele für die letzteren sind die Radiofrequenzablation (RFA), die laserinduzierte Thermotherapie (LITT), die Mikrowellenablation (MWA), der fokussierte Ultraschall und die Kryotherapie (15)(38).

2.4.1 Thermische Ablationsverfahren

2.4.1.1 Radiofrequenzablation

Die Radiofrequenzablation ist aktuell die am weitesten verbreitete und am intensivsten erforschte Methode (40). Sie gehört zu den thermischen Ablationsverfahren und hat einen festen Stellenwert in der leitliniengerechten Therapie des HCC und des kolorektalen Karzinoms (5)(39). Für das HCC wird sie zur Behandlung in kurativer Absicht bei Patient:innen im CHILD-A/B Stadium mit Tumoren kleiner fünf Zentimeter aufgeführt, bei Tumoren kleiner als drei Zentimeter wird sie als gleichwertige Alternative zur Resektion gesehen. Zudem wird sie in der Leitlinie als Option zum Bridging und Downstaging genannt vor Lebertransplantation genannt. Die Mikrowellenablation wird als gleichwertig zur Radiofrequenzablation angesehen. Die Leitlinie des CRC sieht die Radiofrequenzablation als indiziert, wenn Metastasen technisch nicht respektabel sind, oder der Allgemeinzustand der Patienten eine Resektion nicht zulässt. Die Leitlinie des CRC führt die RFA als alleiniges ablatives Therapieverfahren an.

Bei der RFA wird ein hochfrequenter (350-480 kHz) Wechselstrom erzeugt. Dieser wird durch die perkutan, oder intraoperativ eingebrachten Sonden direkt in das Tumorgewebe appliziert. Über eine am Patienten angebrachte Neutralelektrode wird der Stromkreis geschlossen. Über eine Schwingung der Ionen kommt es zu einer Wärmebildung im Tumorgewebe und konsekutiv zu einer Nekrose. Die Zellen werden somit direkt geschädigt. Des Weiteren kommt es vor allem in den Randzonen zu einer ischämischen Zerstörung der Zellen, die durch eine Thrombosierung kleiner Gefäße hervorgerufen wird (15). In Studien hat sich eine Temperatur von 50-100°C als optimal herausgestellt, da in diesem Bereich die Proteine sicher irreversibel denaturieren und es dadurch zu einer Koagulationsnekrose kommt. Dieser Temperaturbereich ist jedoch nicht so hoch, dass man eine Vaporisation oder Karbonisation des Gewebes befürchten muss (41). Durch diesen Effekt würde sich der Widerstand im Gewebe erhöhen und somit die Ausbreitung der Temperatur vermindern (42). Die Impedanzsteigerung ist ein wesentlicher Nachteil dieser Methode. Diese erhöht sich ebenso mit der zunehmenden Nekrose und einem zu schnellen Temperaturanstieg (42). Ein weiterer Nachteil ist der sogenannte „Heat-Sink-Effekt“ (41). Durch die ausgedehnte Vaskularisation der Leber wird durch Konvektion die thermische Energie im Zielgebiet abgeschwächt, wodurch Tumorzellen der thermischen

Zerstörung entgehen können (43). Ferner verhindern Verkalkungen und lokale Fibrosen eine symmetrische, ungestörte Ausbreitung der Ablationszone (44). Durch diese technischen Limitationen ist die maximal behandelbare Tumorgöße mit einer Sonde auf 5 cm begrenzt, um einen ausreichenden Sicherheitsabstand zu erzielen ist eine Tumorgöße unter 3 cm ideal (38). Es gibt verschiedene Strategien, um die genannten Nachteile auszugleichen. Dazu gehört die Kühlung der Elektrode, das Einsetzen eines Multiapplikatorsystems, Okklusion der Gefäße vor der RFA (beispielsweise durch Ballonokklusion), oder die Injektion von Kochsalzlösung, um dadurch die elektrische Leitfähigkeit zu erhöhen (15)(42). Wie alle thermischen Ablationsverfahren birgt auch die RFA das Risiko der Schädigung sensibler Strukturen wie Gallengänge oder Blutgefäße (15).

2.4.1.2 Mikrowellenablation

Die Mikrowellenablation (MWA) ist ein weiteres thermisches Verfahren. Elektromagnetische Wellen versetzen Wassermoleküle in Schwingungen, wodurch eine lokale Reibungswärme entsteht und konsekutiv das Gewebe durch eine Koagulationsnekrose zerstört wird (6). Somit bieten sich besonders Gewebe mit einem hohen Wasseranteil für dieses Verfahren an (45). Die Frequenzen, die dabei eingesetzt werden, liegen zwischen 900 und 2450 Megahertz (MHz) (46). Somit liegen sie mit ihrer Wellenlänge zwischen infrarotem Licht und Radiowellen (15). Aufgrund technischer Limitationen stand dieses Ablationsverfahren lange Zeit im Hintergrund in der klinischen Anwendung. Zu den Problemen zählten unter anderem der hohe Energieverlust vom Generator bis zur Antenne und die Erwärmung der Antennenspitze (47). Mittlerweile konnten dafür Lösungen entwickelt werden, sodass die MWA eine vielversprechende Alternative darstellt. Insbesondere im Vergleich mit der RFA ergeben sich einige positive Aspekte (48). Da das Verfahren nicht auf einem Stromfluss basiert, ergeben sich keine Schwierigkeiten durch Verkohlungen oder Verdampfung des Gewebes. Somit spielt auch eine Erhöhung des elektrischen Widerstandes keine Rolle und es ist möglich, Ablationen in Geweben mit hoher Impedanz, wie zum Beispiel der Lunge, durchzuführen (45)(49). Dadurch können bei der MWA auch höhere Temperaturen als mit der RFA erreicht werden und somit sowohl eine größere Ablationszone als auch eine verkürzte Ablationsdauer. Gerade für die stark vaskularisierte Leber ist es von hoher Relevanz, dass der Heat-Sink-Effekt bei der MWA geringer als bei der RFA ist (49)(50). Dies ist jedoch zugleich auch ein potenzieller Nachteil zur RFA, da das Risiko für eine thermische Schädigung sensibler Strukturen höher ist.

2.4.1.3 Sonstige Verfahren

Laserinduzierte Thermotherapie

Ein drittes hyperthermes Verfahren ist die laserinduzierte Thermotherapie (LITT). Dieses Verfahren zeichnet sich durch einen hohen Grad an Kontrolle während der Ablation aus, wodurch es gleichzeitig aber auch das aufwendigste der thermoablativen Verfahren ist (6). Die Energie wird in Form von Laserlicht in das Gewebe appliziert. Durch eine Absorption der Photonen kommt es zu einer Wärmebildung und schlussendlich zu einer Koagulationsnekrose (38). Eine wesentliche Limitation der LITT erklärt sich durch das Verfahren selbst: die Patient:innen müssen MR-fähig sein. (51). Trotz der vielversprechenden Eigenschaften dieser Ablationsmethode wird sie nur von wenigen Zentren angeboten, was vor allem an dem hohen Aufwand und den damit verbundenen hohen Kosten liegt (38).

Fokussierter Ultraschall

Bei dem fokussierten Ultraschall wird eine Erhitzung des Gewebes durch mechanische Wellenenergie übertragen (15)(52). Der große Vorteil dieses Verfahrens ist, dass keine Sonden eingebracht werden müssen, somit kein Risiko für eine punktionsbedingte Komplikation besteht (53)(54). Des Weiteren kann das Ausmaß der Ablation direkt festgestellt werden, indem man das nicht mehr perfundierte Gewebe misst (55)(54).

Einschränkungen bei dieser Methode ergeben sich durch Faktoren, die zu einer Streuung oder Reflexion der Ultraschallwellen führen (55). Auch stellt es ein Problem dar, dass Organe wie die Leber oder die Lunge atemverschieblich sind. Das erschwert die exakte Fokussierung auf die Ablationszone (54)(56). Es gibt zwar bereits einige vielversprechende Studien für Lebertumoren beziehungsweise -metastasen, im klinischen Alltag ist diese Ablationsmethode allerdings noch nicht etabliert (41)(55)(56)(57).

Kryotherapie

Die Kryotherapie zählt zu den ältesten lokalen Ablationsverfahren und ihre Anfänge reichen bis ins 19. Jahrhundert zurück (58). Es werden Sonden in das Tumorgewebe eingebracht, die auf -30°C bis -180°C gekühlt werden (52).

Da für dieses Verfahren kein elektrischer Fluss benötigt wird, liegt ein Vorteil darin, dass es auch nicht zu Interaktionen in der Bildgebung kommt. Des Weiteren ist anzuführen, dass die Kälte selbst einen analgetischen Effekt besitzt (58). Ein klarer Nachteil sind die hohen Kosten des Verfahrens, die sich nicht nur auf die Sonden, sondern auch auf das verwendete Gas belaufen (58). Ebenfalls muss bedacht werden, dass auch größere, zentral gelegene Gallengänge zerstört werden können durch die Kryotherapie. In der Auftauphase besteht eine

erhöhte Blutungsgefahr, da temporär durch den Eisball verschlossene, aber beschädigte Blutgefäße nach der Wiedererwärmung erneut durchblutet werden (52). Zudem wird eine Entzündungsreaktion hervorgerufen und durch das sogenannte Kälteschocksyndrom kann es bis zu einem systemischen Schock kommen (41)(58).

Zusammenfassend ist die Kryoablation bei der Behandlung von Lebertumoren den anderen Ablationsverfahren unterlegen, vor allem in Bezug auf die Komplikationsrate (58)(59).

2.4.2 Chemische Verfahren

Bei der perkutanen Ethanol-Injektion (PEI) handelt es sich um das älteste perkutane Ablationsverfahren, das auch heute noch zur Tumordestruktion eingesetzt wird (38). Bei diesem Verfahren wird eine Ethanollösung per Sonde direkt in den Tumor appliziert (15)(38). Durch die Bildgebung ist es möglich, die Verteilung des Ethanols in Echtzeit zu verfolgen (60)(61). Das Einbringen des Alkohols führt zu einer Dehydrierung in der Zelle, der schließlich eine Nekrose folgt. Zusätzliche Effekte, die auftreten, sind die Proteindenaturierung und die Thrombose, die auch durch den zytotoxischen Effekt des Alkohols bedingt sind (15)(60)(62). Eine große Einschränkung des Verfahrens liegt in der Tatsache begründet, dass sich Flüssigkeiten im Lebergewebe unkontrolliert verteilen (38). Daher kann man dieses Verfahren nur bei Tumoren einsetzen, die von einer (Pseudo-) Kapsel umgeben sind, wodurch die PEI zum Beispiel zur Behandlung von Metastasen nicht geeignet ist (63).

Die PEI galt lange Zeit als Standard in der loko-regionären Therapie des HCC (64). Laut aktueller Leitlinie sollte sie jedoch nicht mehr durchgeführt werden, sofern eine RFA oder Resektion möglich ist (5). Insgesamt ist die PEI durch die modernen Ablationsverfahren weitgehend ersetzt worden.

2.4.3 Strahlentherapie

Brachytherapie

Bei dieser Radiotherapie wird ein Katheter zur Behandlung direkt in das Tumorgewebe positioniert und hierüber eine Strahlenquelle eingebracht so dass das Tumorgewebe aus sehr kurzer Entfernung bestrahlt werden kann (15). Durch die genaue Dosimetrie, die CT-gestützt erfolgt, kann die Bestrahlung präzise erfolgen und damit das umliegende Gewebe und sensible Strukturen, wie zum Beispiel zentrale Gallenwege, besonders gut geschützt werden (52)(65)(66). Insgesamt scheint die Brachytherapie ein relativ sicheres und effektives Verfahren zu sein (67). Eine Kontraindikation dieses Verfahrens ist ein zu hohes Risiko durch schwierige anatomische Verhältnisse beim Einführen des Katheters (68) oder eine zu geringe

Restfunktion der Leber der Patienten (68). Schwerwiegende Komplikationen wie zum Beispiel eine postinterventionelle Blutung treten selten auf (67)(69).

Stereotaktische Bestrahlung

Die stereotaktische Bestrahlung ist ein weiteres Verfahren, durch das die Bestrahlung von Tumoren mit einer sehr hohen Präzision möglich ist. Die Einzeldosen sind dabei deutlich höher als bei herkömmlichen Bestrahlungen (70)(71). Dieses Verfahren wird bereits in der Leitlinie genannt, aktuell allerdings nur, falls es keine weiteren Therapieoptionen gibt (5).

2.5 Irreversible Elektroporation

2.5.1 Allgemeines

Die irreversible Elektroporation (IRE) ist ein vergleichsweise neues Ablationsverfahren. Grundlage ist eine überwiegend nicht-thermische Destruktion von Gewebe durch starke elektrische Felder. Durch die starken Stromfelder bilden sich Nanoporen in der Zellmembran und die Homöostase der Zelle wird aus dem Gleichgewicht gebracht (72). Im Gegensatz zur reversiblen Elektroporation ist das Ziel bei der IRE die dauerhafte Schädigung der Zellmembran, die schlussendlich zum Zelltod führt. Ob die Elektroporation und die damit einhergehende Schädigung der Zelle von Dauer oder temporär ist, hängt vor allem von der Art des behandelten Gewebes, der Stärke des elektrischen Feldes sowie Anzahl und Dauer der einzelnen Impulse ab (73).

2.5.2 Biologische Grundlagen

Um das Wirkprinzip der irreversiblen Elektroporation zu verstehen, muss man sich zunächst mit den biologischen Grundlagen der Zelle auseinandersetzen. Die Zelle - auch als Grundeinheit des Lebens bezeichnet - besteht aus Cytoplasma, in dem sich die Zellorganellen befinden, und dem Karyoplasma. Umgeben ist sie von einer Zellmembran, die eine zentrale Rolle spielt: sie dient der Abgrenzung und dem Zusammenhalt des Zellinhalts. Darüber hinaus ist sie entscheidend für den Austausch von Substanzen zwischen der Zelle und ihrer Umgebung. Durch selektive Permeabilität der Membran ist es möglich, dass zwischen dem Zellinneren und dem Extrazellulärraum unterschiedliche Milieus entstehen. Elementarer Bestandteil der Zellmembran ist die Lipiddoppelschicht. Ihr Aufbau und ihre Integrität sind essentiell für die Homöostase jeder Zelle. Sie besteht aus amphiphilen Lipiden (unter anderem Phospholipiden,

Cholesterol, Glykolipiden) und Proteinen, die asymmetrisch verteilt sind in der Membran. Die Phospholipide legen sich spontan so aneinander, dass die polaren Köpfe jeweils zur wässrigen Phase gerichtet sind. So entsteht eine Einheitsmembran in Form eines Bilayers. Die enthaltenen Proteine spielen eine wichtige Rolle als Transportenzyme, da die Zellmembran für die meisten Ionen und Biomoleküle undurchlässig ist. Allerdings darf sie nicht für alle Stoffe unpassierbar sein, da die Zelle ansonsten nicht in der Lage wäre, physiologische Bedingungen aufrechtzuerhalten. So können zum Beispiel Wasser und kleinste polare Moleküle die Membran passieren. Dadurch baut sich ein Membranpotential auf, welches zwischen den Zellen und ihrer Umgebung variiert. Man erhält einen elektrischen Gradienten, die entscheidenden Ionen hierfür sind Calcium, Kalium, Natrium und Chlorid. Dieser Gradient wird als elektrisches Ruhepotential bezeichnet und beträgt je nach Art der Zelle zwischen -100 mV und -50 mV. Diesen elektrischen Gradienten kann man beeinflussen, indem man ein elektrisches Feld anlegt, durch das die Homöostase zerstört wird. In Simulationen auf Molekularebene beobachtet man zunächst eine Aneinanderreihung der Wassermoleküle. Diese dringen in den hydrophoben Anteil der Zellmembran ein und bilden eine Art Kanal. Der Durchmesser und die Länge der aus Wassermolekülen bestehenden Kanäle nimmt zu und bildet schließlich Nanoporen in der Zellmembran. Die Lipid-Köpfe tragen zur Stabilisierung dieser Poren bei, somit steigt die Permeabilität der Membran. Dieser Effekt ist das grundlegende Wirkprinzip der Elektroporation (7)(74)(75)(76)(77).

2.5.3 Reversible Elektroporation

Die reversible Elektroporation (RE) ist schon länger bekannt in der klinischen Anwendung. Hierbei wird nur für wenige Mikrosekunden ein hoher elektrischer Impuls angelegt. Dadurch wird die Permeabilität der Membran temporär erhöht. Durch die entstandenen Nanoporen können nun größere Stoffe die Zellmembran passieren. Dieser Effekt ist jedoch reversibel, die Zellen sind in der Lage, die entstandenen Poren wieder abzubauen. Die Nanoporen werden therapeutisch genutzt, indem man zum Beispiel Zytostatika in die Zelle einschleust und somit eine deutlich höhere Konzentration intrazellulär erreichen kann, als bei einer systemischen Gabe des Medikaments (7)(76).

2.5.4 Technisches Verfahren

Bei der klinischen Anwendung der irreversiblen Elektroporation werden entweder offen chirurgisch, laparoskopisch oder perkutan mehrere Sonden mit einem Durchmesser von 1mm, (entspricht 18 Gauge), in das Gewebe eingebracht. Aktuell werden nur noch monopolare

Sonden verwendet, so dass mindestens zwei Sonden eingesetzt werden müssen. Je nach Tumorgröße und -form wird eine bestimmte Anzahl an Sonden um das Zielgewebe herum positioniert, die Einbringung erfolgt in der Regel bildgesteuert. Nach Einbringung der Sonden werden diese mit dem IRE-Generator verbunden. Dieser erzeugt nun sequentiell hochenergetische Starkstromimpulse, wodurch zwischen den Sonden ein elektrisches Feld aufgebaut wird (41). Typischerweise werden Stromimpulse mit einer Länge von 70-100 μ s, Spannungen zwischen 2000 und 3000 V und Stromstärken bis zu 50 A generiert (7). Dabei werden etwa 80-100 Impulse für eine vollständige Ablation benötigt (7). Zwischen den einzelnen Impulsen pausiert das Gerät für 100 bis 1000 ms, die Impulse werden meist in mehreren Zyklen mit jeweils zehn Impulsen abgegeben. Insgesamt beträgt die Ablationszeit dabei zwischen einer und zehn Minuten.

Die gesamte Intensität der Ablation hängt von verschiedenen Parametern ab. Ziel ist, die Intensität so zu wählen, dass sie hoch genug ist, um das Gewebe sicher zu zerstören, aber nicht zu hoch, um mögliche thermische Effekte zu minimieren. Studien beschreiben, dass die Leitfähigkeit des Gewebes mit jedem Impulszyklus zunimmt. Das bedeutet gleichzeitig eine Abnahme des elektrischen Widerstands. Dies kann einerseits durch die erhöhte Membranpermeabilität, andererseits aber auch durch eine steigende Gewebetemperatur bedingt sein (78)(79). Diese Korrelation und konsekutiv steigende Gesamt-Energiemenge (in Joule) bei jedem Zyklus muss bei der Planung und Durchführung bedacht werden (78).

Bei der Verwendung monopolarer Sonden können bis zu sechs mit einem Abstand von 1,5 – 3,0cm gleichzeitig platziert werden, (7). Um möglichst homogene Ablationszonen zu erzielen, müssen diese dabei annähernd parallel eingebracht werden. Das maximale Ablationsvolumen bei Verwendung von zwei Sonden beträgt etwa 24cm³ (79)(80). Eine Rhythmus-Synchronisation per EKG ist wichtig, damit keine ungewollte Defibrillation ausgelöst wird. Dafür werden die Impulse in der refraktären Phase des Myokards durchgeführt (7). Aktuell wird an einer *High-Frequency* Irreversiblen Elektroporation geforscht. Durch den Einsatz höherer Energie soll die Ablation verkürzt und somit die Nebenwirkungen, vor allem die starken Muskelkontraktionen, verringert werden (81).

2.5.5 Bildgebung

Für die Bildgebung im Rahmen der IRE sind verschiedene Methoden möglich, vor allem werden dazu die Sonographie, die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie genutzt. Prinzipiell sind dabei die diagnostische, die periinterventionelle und die postablative, Bildgebung zu unterscheiden (41)(79).

Die günstigste und am häufigsten verfügbare Methode ist die Sonographie. Sie wird häufig als erste orientierende Diagnostik angewandt. Ebenfalls kann sie während der Ablation eingesetzt werden, um die Platzierung der Sonden in Echtzeit steuern und überprüfen zu können. Ein großer Vorteil ist die nicht vorhandene Strahlenbelastung. Nachteile ergeben sich durch das hohe Maß an Abhängigkeit von der Expertise des Untersuchers und eine Einschränkung der Bildqualität durch Überlagerung von zum Beispiel Rippen, Luft oder Adipositas (8)(73)(80). Die Computertomographie gilt derzeit als Standard in der Bildgebung bei lokal-ablativen Leberinterventionen. Sie ist wesentlich unabhängiger vom Anwender und erlaubt eine bessere anatomische Orientierung. Eine Platzierung der Sonden in Echtzeitkontrolle ist ebenfalls möglich. Ein weiterer großer Vorteil ist die Möglichkeit der multiplanaren Rekonstruktion der Bilder nach der Intervention, so lassen sich die Ausmaße der Ablationszone besser bestimmen. Der größte Nachteil ist die Strahlenbelastung, der die Patient:innen und das Personal ausgesetzt sind. Zudem ist es mitunter schwierig kleinere Läsionen gegenüber dem Leberparenchym sicher abzugrenzen. (8)(41)(82).

Eine weitere Möglichkeit der Bildgebung stellt die Magnetresonanztomographie (MRT) dar. Für die Diagnostik von Lebertumoren hat sie sich als Goldstandard entwickelt, da sie die höchste Sensitivität für die Detektion von primären und sekundären Lebertumoren aufweist. Der häufig hohe Kontrast zwischen Lebertumoren und gesundem Lebergewebe macht die MRT auch für die Eingriffssteuerung interessant. Darüber hinaus erlaubt die Magnetresonanzt-Thermometrie eine Echtzeitabschätzung der Gewebetemperatur, was insbesondere bei Ablation in der Nähe kritischer Strukturen hilfreich sein kann.

Ein Nachteil der MRT für die periinterventionelle Anwendung ist der bauartbedingt schwierige Zugang zum Patienten und die Interaktion zwischen dem starken Magnetfeld und den Ablationsgeräten, so dass eine aufwendige Abschirmung der Ablationstechnik notwendig wird (73)(80)(82)(83).

2.5.6 Vorteile

Die Effektivität der IRE wurde schon in diversen Studien belegt (84). Dabei wurde in ersten klinischen Studien bereits die Behandlung von Hepatozellulären Karzinomen primär erfolgreich durchgeführt (85)(86). Gefäße im Gewebe scheinen die Ausbreitung der Ablationszone nicht maßgeblich zu beeinflussen (87). Der bei den thermischen Ablationsverfahren limitierende *Heat-Sink-Effekt* spielt bei der IRE keine Rolle. Somit kann auch Gewebe unmittelbar bis an die Gefäßwand abladiert werden (88). Lediglich in Einzelfällen wird über eine inhomogene Ausbreitung in Bereichen großer Gefäße berichtet (89). Somit kann

das Verfahren auch in der Nähe von Gefäßen durchgeführt werden. Ein weiterer großer Vorteil liegt in dem Prinzip des Verfahrens, das seine Wirkung an der Zellmembran entfaltet. Damit wird extrazelluläres Gewebe, wie zum Beispiel Bindegewebe mit vielen kollagenen und elastischen Fasern, oder auch Proteine, nicht zerstört (7)(90)(91). Somit bleiben sensible Strukturen wie Blutgefäße und Gallengänge mit einer höheren Wahrscheinlichkeit intakt (92)(93). Zwar wird in manchen Studien von einer akut auftretenden milden Entzündungsreaktion und vorübergehenden Verengungen in Gefäßen berichtet, in späteren Kontrolluntersuchungen zeigten sich jedoch keine Langzeitfolgen (88). Somit wäre auch die Behandlung zentraler Lebertumore möglich (41). Eine intakte Blutversorgung bedeutet gleichzeitig eine schnellere Regeneration des Gewebes (90). Ein weiterer potenzieller Vorteil gegenüber den thermoablativen Verfahren besteht darin, dass es eine relativ scharfe Grenze zwischen ablatiertem Areal und gesundem Gewebe gibt. Bei den thermischen Verfahren gibt es eine breite Zone, in der stufenweise der Grad der Schädigung abnimmt (94). Ein weiterer positiver Aspekt dieses Verfahrens ist die kurze Dauer der Ablation. Die einzelnen Impulse liegen bei unter einer Sekunde und ein gesamter Ablationszyklus dauert nur wenige Minuten, während bei den thermoablativen Verfahren pro Sitzung eine Zeitspanne bis zu einer halben Stunde eingeplant werden muss (85)(80)(87). Postinterventionelle Vorteile liegen in der kurzen stationären Aufenthaltsdauer sowie in dem geringen Ausmaß an Schmerzen. Allerdings ist dies ähnlich zu den anderen lokalen Ablationsverfahren (79)(95).

2.5.7 Nachteile

Ein großer Nachteil der IRE ist, dass eine Allgemeinanästhesie mit vollständiger neuromuskulärer Blockade durchgeführt werden muss (17). Ohne diese kann es zu starken Kontraktionen der Skelettmuskulatur kommen, da die motorische Endplatte direkt stimuliert wird. Dadurch entfällt ein großer Vorteil der meisten anderen ablativen Verfahren, da alle Patient:innen ausgeschlossen werden, die nicht narkosetolerant sind. Des Weiteren gibt es bedingt durch die starken Stromfelder einige absolute Kontraindikationen. Dazu gehören elektronische oder metallhaltige Implantate in der Nähe des Ablationsareales, Epilepsie, kürzlich stattgehabte Myokardinfarkte und die Therapie im Bereich der Augen (96). Die IRE muss unter strenger Rhythmus-Synchronisation stattfinden, da es sonst zu lebensbedrohlichen Arrhythmien kommen kann (41). Somit stellen Patient:innen mit Herzschrittmachern ebenfalls eine relative Kontraindikation dar (97). Eine weitere Herausforderung ist die exakte Planung und Durchführen der Ablation. Im Gegensatz zu den meisten thermischen Ablationsverfahren sind bei der IRE mindestens zwei Sonden notwendig, in der Praxis jedoch häufig mindestens vier

Sonden, um ein ausreichend großes Ablationsareal zu erzielen. Die verschiedenen Sonden müssen zudem möglichst parallel in einem begrenzten Abstand voneinander angeordnet werden. Je nach Lage des Tumors und Beschaffenheit des Zugangswegs ist die Platzierung mitunter sehr anspruchsvoll und zeitintensiv (7)(87). Die Heterogenität des Tumors ist ebenfalls problematisch, da der Widerstand des Gewebes innerhalb des Tumors variiert, was bei der Planung der Energiemenge bedacht werden muss (79). Auch die Tumorgöße ist ein limitierender Faktor. Zur Zeit wird nur eine Behandlung von Tumoren bis zu einem maximalen Durchmesser von 3-4 cm empfohlen (86)(97). Bislang ist die Studienlage hinsichtlich der onkologischen Effektivität noch relativ eingeschränkt, sodass die IRE in der Regel nur dann zur Anwendung kommen sollte, wenn die etablierten Ablationsverfahren nicht anwendbar sind (98).

2.5.8 Komplikationen

In bis zu 7% der Fälle kommt es zu schwerwiegenden Komplikationen nach der Ablation mittels IRE (98)(99). Dazu zählen Leberversagen, intrahepatische Abszesse und schwere Blutungen (100)(97). Über IRE-bedingte Todesfälle wird dabei nicht berichtet (98), es wurde ein erhöhtes Risiko für Patient:innen mit vorbestehender biliodigestiver Anastomose erkannt (98). Leichte Komplikationen treten in 16-34% der Behandlungen auf (97)(99). Es wurden leichte Blutungen (auch durch die Platzierung der Therapiesonden bedingt), Thrombosen der Pfortaderäste, Pneumothoraces, intrahepatische arteriovenöse Shunts und Nervenschäden (auch durch die Sonden verursacht) beobachtet (98)(101)(102). Des Weiteren wurden weitere entzündliche Reaktionen, wie zum Hepatitiden oder Pankreatitiden in der Umgebung des Ablationsareals beschrieben (102). Als weitere Komplikationen werden periinterventionelle EKG-Veränderungen und schwankende Blutdruckwerte genannt (102)(103). Im Vergleich zu den thermoablativen Methoden RFA und MWA scheinen die Komplikationsraten vergleichbar zu sein (99).

2.5.9 Prozess der Gewebeerstörung

Es gibt bereits einige Studien, die sich mit den histopathologischen Effekten der irreversiblen Elektroporation beschäftigt haben (104)(105), allerdings nur wenige, die sich mit dem zeitlichen Verlauf der Gewebeschädigung in der Akutphase nach IRE auseinandersetzen (89). Gesichert ist, dass dynamische Prozesse nach der Ablation stattfinden (80)(89)(106)(107).

In ersten Längsschnittstudien wurden die dynamischen Prozesse nach der Ablation mittels IRE untersucht. Zeitnah nach der Ablation sind erste unspezifische Zellveränderungen zu beobachten (108). Dazu gehören Einblutungen und geschwollene Sinusoide (89). Nach einigen Stunden folgt dann die Immunantwort im Rahmen einer Entzündungsreaktion, dies ist vor allem an den einwandernden neutrophilen Granulozyten zu erkennen (89). In einigen Studien wird ein Ende in der Veränderung der Ablationszone nach etwa 4-6 Stunden festgestellt (89). Nach 24 Stunden beobachtet man einen vollständigen Zelluntergang (80), anschließend beginnt langsam die Fibrosierung des zerstörten Gewebes (108). In anderen Studien wird jedoch beschrieben, dass auch nach über 24 Stunden Veränderungen der Größe der Ablationszone stattfinden. Eine Annahme ist, dass es sich dabei um eine Art Transitionszone handelt, die die eigentliche Ablationszone umgibt, für eine effektive Zerstörung des Tumorgewebes allerdings nicht ausreichend ist (89). Eine andere Hypothese ist, dass es sich um Gewebe handelt, dass sekundär durch Ischämie und konsekutive Hypoxie zerstört wird, da es sich in Bereichen befindet, die durch die primären Effekte der IRE von zerstörtem Gewebe umgeben sind (85) (109).

Eine Studie von Padia et. al (110) hat die Veränderung der Bildgebung über mehrere Monate nach der Intervention untersucht. Sie kommt zu dem Ergebnis, dass die periphere Zone der Ablation mit der Zeit abnimmt. Die Forscher vermuten, dass dies der Transitionszone entspricht und die Verringerung durch eine Erholung des stark geschädigten, aber nicht irreversibel zerstörten Gewebes entspricht.

Art der Gewebeerstörung

Ein viel diskutierter Vorteil der irreversiblen Elektroporation ist die Art des Zelluntergangs. Es wurde lange vermutet, dass nach erfolgter Ablation alle Zellen per Apoptose zugrunde gehen (80). Die Apoptose wird als der programmierte Zelltod bezeichnet. Sie findet permanent im Organismus statt und ist für die Regulation und Aufrechterhaltung der physiologischen Prozesse existenziell. Die Apoptose kann intrinsisch oder extrinsisch aktiviert werden. Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Kaskade spielt die *Caspase*, die man immunhistologisch auch als Nachweis der Apoptose nutzen kann. Histologisch beobachtet man bei der Apoptose ein Schrumpfen der Zelle, eine Fragmentierung zunächst des Zellkerns und schließlich der gesamten Zelle in kleine Partikel, die letztendlich phagozytiert werden. Es findet keine Entzündungsreaktion statt. Eine einzelne Zelle kann somit abgebaut werden, ohne die Integrität des gesamten Gewebes zu zerstören (74)(111).

Die andere „klassische“ Art des Zelluntergangs ist die Nekrose. Sie stellt den Gegenspieler zur Apoptose dar. Bei der Nekrose beobachtet man auf histologischer Ebene eine Schrumpfung der Zellkerne und eine Zerstörung der Zellorganellen. Dadurch schwillt die Zelle an und kann platzen, was dann eine Entzündungsreaktion hervorruft (74).

In IRE Studien wurden bislang widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf den Zelluntergang gefunden. So haben zum Beispiel Guo et al. (112) in ihrer IRE Studie an Hepatozellulären Karzinomen in Ratten eine hohe Caspase-3 Aktivität 24 Stunden nach Ablation festgestellt. Caspase 3 ist ein aktivierender Stimulus der extrinsischen Apoptose und lässt somit als Art des Zelltodes die Apoptose vermuten. Jose et al. (113) haben hingegen in ihrer Studie zur IRE am Pankreaskarzinom keine Caspase nachweisen können, was auf eine Nekrose schließen lässt. Es wird diskutiert, ob die Art des Zelltodes vom jeweiligen Gewebetypen abhängt. Es sind jedoch histopathologisch in einer Gewebeart beide Formen des Zelluntergangs nachweisbar (109).

Mehrere Studien zeigen, dass es auch bei Verwendung der empfohlenen Ablationsparameter zu signifikanten Temperaturerhöhung im Bereich um die Sonden kommt (106)(108)(114). Daher wird für die Ablation ein Sicherheitsabstand von 5 mm von den Elektroden zu sensiblen Strukturen wie den Gallenwegen empfohlen (78). Eine Studie aus dem Jahr 2012 kommt zu dem Schluss, dass die Intensität der IRE und damit auch die Temperaturerhöhung im Gewebe entscheidend ist für die Art des Zelluntergangs (106). Ablationen, die mit mindestens 90 Impulsen bei einer Spannung von über 2500 V durchgeführt wurden, erzeugten Temperaturen von über 50 °C und somit eine Koagulationsnekrose (106). Bei einer geringeren Intensität wurden hingegen keine Nekrosezeichen gefunden, sondern IRE-spezifische Veränderungen wie geschwollene Sinusoide, Einblutungen und dehydrierte Zellen (106).

Um möglichst eine rein nicht-thermische Zellschädigung hervorzurufen, wurde untersucht, wie der thermische Effekt reduziert werden kann. Eine mögliche Herangehensweise ist die Auswahl des Abstandes zwischen monopolaren Sonden. Dieser sollte nicht zu groß ausfallen (10-15 mm) (78). Die Anordnung der Elektroden ist auch entscheidend, da unregelmäßige Abstände zwischen ihnen ein unregelmäßiges elektrisches Feld erzeugen können und somit einen unterschiedlich starken thermischen Effekt an den einzelnen Sonden hervorrufen (78). Indem man mittels IRE-Generator die Impulse sequentiell abgibt (in Gruppen von 20-30 Impulsen), kann der Anstieg der Temperatur ebenfalls reduziert werden (78). Insgesamt bleibt der genaue Mechanismus des Zelluntergangs bei der IRE unklar. Aktuell werden die bekannten Arten des Zelltodes in der Forschung diskutiert und mögliche weitere Prozesse untersucht (111). Ein Ansatz ist dabei die sogenannten *Nekroptose*, die als ein Hybrid der beiden bekannten Formen Nekrose und Apoptose gilt (111). Diese könnte auch bei der irreversiblen Elektroporation

relevant sein. Die Nekroptose ist ein programmierter Zelltod, der sich morphologisch jedoch ähnlich einer klassischen Nekrose darstellt (111). So werden dabei zum Beispiel auch Entzündungszeichen beobachtet (111).

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive experimentelle Arbeit. Sie ist im Bereich der Grundlagenforschung angesiedelt und wurde an Versuchstieren durchgeführt. Sie stellt einen Grundbaustein zur Validierung einer neuartigen Therapie im klinischen Kontext dar, die aufgrund der bislang vorliegenden Daten noch nicht ausreichend erforscht wurde.

3.2 Versuchsaufbau

Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung der Gewebeveränderung in der Akutphase nach durchgeführter IRE. Als Akutphase wurde für diese Versuchsreihe eine Zeitspanne von 24 Stunden festgelegt, da laut vorhandener Literatur die meisten Veränderungen innerhalb dieser Zeit stattfinden (80)(108). Für eine möglichst menschenähnliche Anatomie erfolgte der Versuch an einem Großtiermodell. Um das Leid der Tiere möglichst gering zu halten, erfolgte die Ankunft der Tiere erst unmittelbar vor Versuchsbeginn und die Eingriffe und Bildgebung wurden unter dauerhafter Narkose durchgeführt.

Für eine präzise Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Gewebeveränderung wurden pro Versuch sechs Ablationen durchgeführt. Parallel fanden in dem Versuch auch Interventionen an der Niere statt. Diese sind jedoch kein Bestandteil dieser Arbeit. Etwa eine Stunde nach Ende der letzten Ablation wurde die Bildgebung durchgeführt und anschließend die Tiere euthanasiert. Die grobe Organpräparation wurde im Interventionsraum durch das Team durchgeführt, die anschließende feingewebliche Aufbereitung fand durch das Institut für Pathologie der Uniklinik Mainz statt. Durch den Versuchsaufbau wurden Präparate von sechs unterschiedlichen Zeitpunkten in jedem Tier erzeugt, die entsprechend auf den MRT Bildern zu sehen sind. Die erste durchgeführte Ablation fand 24 Stunden vor der Bildgebung, und somit dem Versuchsende, statt und wurde als $t=24$ definiert. Die weiteren Interventionen wurden ebenfalls mit Blick auf die verbleibende Versuchszeit betitelt. $t=1$ stellt die letzte durchgeführte Ablation, eine Stunde vor Bildgebung, dar. In der anschließenden Auswertung wurden mithilfe dieses Ablationsareales die Gewebeveränderungen eine Stunde nach Intervention beschrieben.



Abbildung 3: Versuchsaufbau: zeitlicher Verlauf Ablauf der Interventionen

3.3 Geräte und Materialien

Vor dem Einsatz der Geräte wurden diese auf ihre Funktion geprüft. Das Versuchspersonal war mit dem Umgang der Geräte vertraut.

3.3.1 Irreversible Elektroporation

Für die Ablationen wurde das Gerät *NanoKnife*® der Firma *AngioDynamics* (USA) verwendet. Dies war zum Zeitpunkt der Experimente das einzige System, das für die klinische Anwendung zugelassen war. Der Generator ist als Rollwagen aufgebaut und besteht aus dem Impulsgenerator, einem EKG-Monitor zur Synchronisation und einem 15“-LCD-Bildschirm. Bei Bedarf kann ein Fußschalter angeschlossen werden. Für die Ablation wurden spezielle monopolare Sonden (ebenfalls der Firma *AngioDynamics*) genutzt, deren Maße 150mm x

1,67mm betragen. Die Länge der aktiven Spitze am Sondenschaft kann manuell angepasst werden, an den Generator können bis zu sechs Sonden angeschlossen werden. Für die Ablationen können verschiedene Parameter durch den Anwender eingestellt werden: Dazu gehören die Stromstärke (in Ampere), die Feldstärke als Spannung pro Zentimeter (Volt/ cm), die Pulslänge (in μ s) und die Anzahl der Impulse.

3.3.2 Bildgebung

Die Platzierung der Sonden wurde unter sonographischer Kontrolle mit Hilfe des Ultraschallgeräts Logiq 7 der Firma GE durchgeführt. Vorteil des Ultraschalls ist die Möglichkeit der Platzierung der Sonden unter Echtzeitkontrolle. Die Bildgebung nach Ablation erfolgte mittels Magnetresonanztomographie. Es wurde dabei das Gerät Prisma der Firma Siemens verwendet. Es handelt sich hierbei um ein dediziertes Experimentalgerät mit einer Feldstärke von 3 Tesla. In der MRT können die Schnittbilder in mehreren Sequenzen erzeugt werden, wodurch die verschiedenen Gewebearten eine unterschiedlich starke Signalintensität annehmen, das heißt unterschiedlich hell dargestellt werden. Grundlage hierfür ist der Eigendrehimpuls der Wasserstoffprotonen, die Ausrichtung der Protonen in einem Magnetfeld und deren Relaxation nach einem Hochfrequenzimpuls. Protonen haben einen Eigendrehimpuls, sie drehen sich ungeordnet um sich selbst in einer bestimmten Frequenz und erzeugen ein magnetisches Feld. Gelangen die Protonen nun in ein äußeres Magnetfeld, wie in einem MRT, werden die Protonen entlang des Magnetfeldes ausgerichtet.

3.4 Tiermodell

Als Tiermodell wurde das Schwein ausgewählt, da die Anatomie und Physiologie, insbesondere der Leber, der des Menschen ähnelt. Größe und Lage der Leber entsprechen in etwa der des Menschen. Im speziellen wurden männliche Landrasseschweine von einem Bauern aus der Region bezogen, die ursprünglich zur Mast gezüchtet wurden und nicht speziell für Tierversuche. In der Studie wurden die Versuche an insgesamt sieben Versuchstieren durchgeführt. Die Schweine hatten im Schnitt ein Gewicht von etwa 30 kg und wurden von dem Züchter Bernd Eisenmenger (Lindenhof 10, 55270 Bubenheim) erworben.

Zur Durchführung des Tierversuchsvorhabens wurde der Antrag gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes vom 25.05.1998 durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz begutachtet und genehmigt.

3.5 Versuchsablauf

3.5.1 Anästhesie

Die Versuchstiere wurden an dem Morgen eines jeden Versuches von dem Züchter in die Uniklinik transportiert. Um die Belastung für die Tiere möglichst gering zu halten, wurden sie noch vor dem Transport mit einem Mischpräparat sediert, das intramuskulär injiziert wurde (Azaperon 8mg/kgKG, Ketanest 4mg/kgKG, Atropin 0,5 mg). Nach Ankunft in der Uniklinik wurde den Tieren ein peripherer intravenöser Zugang im Bereich einer Ohrvene gelegt, um eine Allgemeinanästhesie durchführen zu können. Für die Überwachung der Vitalparameter (Blutdruck, Puls, Sauerstoffsättigung) fand während des gesamten Versuches ein Monitoring statt, den Tieren wurde ein EKG angelegt. Dies ist wichtig, um die Herztätigkeit während des Versuches zu überwachen, da die Ablationen mittels IRE kardiale Arrhythmien hervorrufen können. Zudem kann eine unregelmäßige und schnelle Herzfrequenz sowie ein erhöhter Blutdruck Ausdruck einer Stressreaktion im Körper sein, die durch eine Adrenalin-Ausschüttung verursacht wird. Dies kann als Hinweis auf Schmerzen und damit eine unzureichend tiefe Narkose gedeutet werden.

Die Narkoseeinleitung wurde mit Fentanyl (4 µg/kgKG i.v.) und Propofol (3-4 mg/kgKG i.v.) durchgeführt, als Muskelrelaxans wurde Atracurium (0,5 mg/kgKG i.v.) benutzt. Die Tiere wurden endotracheal intubiert und während des gesamten Versuches volumenkontrolliert beatmet. Die Einstellung der Beatmungsparameter wurde dabei bei jedem Tier individuell angepasst und durch die Messung der Sauerstoffsättigung (mittels Pulsoxymetrie) und des Kohlenstoffdioxids in der Ausatemluft (Kapnometrie) kontrolliert und adaptiert. Das Kohlenstoffdioxid wurde endtidal direkt am Beatmungsgerät und zusätzlich per Blutgasanalyse gemessen. Für die Aufrechterhaltung der Narkose wurden Perfusoren eingesetzt, dabei wurde Propofol (8-12 mg/kgKG/h) und Fentanyl (8 µg/kgKG/h) verwendet. Sobald die Tiere in Narkose waren, wurden sie in einer Vakuummatratze auf dem Rücken gelagert, sodass die Leber gut zugänglich war. Um eine sichere Applikation der Medikamente über die gesamte Versuchsdauer zu gewährleisten, wurde den Tieren nach Hautdesinfektion unter sterilen Bedingungen ultraschallgesteuert ein zentraler Venenzugang in die V. femoralis und zusätzlich ein arterieller Zugang in die A. femoralis gelegt, um den arteriellen Blutdruck kontinuierlich überwachen zu können. Während des gesamten Versuches wurde die Qualität der Narkose mittels Monitoring und intermittierenden Blutgasanalysen überwacht und gegebenenfalls adaptiert. Um möglichen Druckstellen vorzubeugen und die Oxygenierung der verschiedenen Lungenareale zu verbessern, wurden die Tiere in regelmäßigen Zeitabständen neu gelagert. Die Augen wurden mit einer Dexpanthenol-Creme benetzt und abgeklebt, um ein Austrocknen zu

verhindern. Um einer Dehydrierung vorzubeugen, erhielten die Tiere kristalloide Infusionslösungen (4 ml/kgKG/h) während der gesamten Versuchsdauer. Mittels Sonographie wurde der Füllungszustand der Blase kontrolliert und bei Bedarf ein suprapubischer Blasenkatheter unter sterilen Bedingungen gelegt. Der Blutzuckerspiegel wurde mit 5%-Glucoselösungen aufrechterhalten, die Temperatur wurde mittels einer rektal eingebrachten Sonde überwacht. Mit einer Wärmedecke konnte die Körpertemperatur der Tiere konstant bei circa 37°C gehalten werden.

3.5.2 IRE

Vor der Ablation wurde der Interventionsbereich an den Tieren, welche sich bereits in Narkose und auf dem Rücken liegend befanden, vorbereitet. Dazu zählten eine Enthaarung, eine Hautdesinfektion und das sterile Abdecken. Danach wurde der Ablationsort in der Leber sonographisch festgelegt, wobei vor allem die anatomischen Gegebenheiten (wie zum Beispiel die Rippen) relevant für die Platzierung der Sonden waren. Der Abstand zwischen den Sonden betrug 1,5 cm, die Länge der aktiven Spitze 2 cm (115)(116). Um eine homogene Feldverteilung zu erzielen, mussten die Sonden möglichst parallel zueinander eingebracht werden (96). Dies geschah ultraschallgesteuert perkutan. Die Läsionen wurden auf die verschiedenen Lebersegmente verteilt und es wurde darauf geachtet, dass ein ausreichend großer Abstand (mindestens zwei Zentimeter) zwischen den Läsionen eingehalten wurde. Die Lage der einzelnen Ablationsbereiche wurde auf Skizzen festgehalten, um diese später für die histopathologische Untersuchung richtig zuordnen zu können. Die Sonden wurden an den IRE-Generator angeschlossen.

Vor den Ablationen wurden den Tieren erneut Muskelrelaxantien injiziert, um unerwünschte Muskelkontraktionen durch die Spannungsimpulse weitgehend zu unterdrücken. Dazu wurde erneut Atracurium in einer Dosierung von 0,5 mg/kgKG i.v verwendet und die Anschlagszeit (1-3 Minuten) abgewartet.

In der Zwischenzeit wurde der Generator vorbereitet. Zunächst konnten patientenspezifische Informationen eingegeben werden, jedem Tier wurde eine ID entsprechend der Versuchsnummer zugeordnet. Als nächstes wurde die Anzahl der Elektroden festgelegt, in diesem Versuchsaufbau wurden zwei verwendet. Durch den Generator wurde die Verbindung bestätigt und die zu erwartende Ablationsfläche angezeigt, in unserem Fall zwei in der Mitte verschmelzende Ovoide, die im Querschnitt einer ovalen Fläche entsprachen. Die Geometrie der Ablationszone kann durch Einstellung verschiedenen Parameter beeinflusst werden.

Parameter

- Stromstärke	30 A
- Feldstärke	1500 V/cm
- Pulslänge	100 µs
- Anzahl der Impulse	90
- Sondenabstand	1,5 cm
- Länge der aktiven Spitze	2,0 cm

Nachdem alle Parameter eingestellt und der Generator bereit war wurde zunächst ein Testimpuls mit geringer Spannung abgegeben, um einen erfolgreichen Stromfluss zwischen den Sonden zu bestätigen. Nachdem am IRE-Gerät die Testung als erfolgreich bestätigt wurde konnte die eigentliche Ablation durchgeführt werden, die aus 90 Impulsen bestand, die direkt hintereinander abgegeben wurden. Um Herzrhythmusstörungen zu vermeiden, wurden die Spannungsimpulse durch eine EKG-Triggerung gesteuert, wodurch die Impulse in die nicht-vulnerable Phase des Herzzyklus fielen. Nach erfolgter Ablation wurden die Therapiesonden entfernt (96).

3.5.3 MRT

Nach Abschluss aller Ablationen wurden die Tiere in den Magnetresonanztomographen gebracht, der sich direkt im Nebenraum befand. Die kontrollierte Beatmung war währenddessen weiter sichergestellt. Das Tier befand sich auf einer Vakuummatratze, in der eine gleichbleibende Position des Schweines während der Untersuchung gewährleistet war. Durch Apnoephasen konnten mögliche Artefakte reduziert werden. Es wurden verschiedene T1- und T2-gewichtete Sequenzen akquiriert, sowie kontrastverstärkte dynamische T1-gewichtete Serien und diffusionsgewichtete Sequenzen. Als Kontrastmittel (KM) wurde Dotarem 0,2 ml/kgKG genutzt.

<u>Sequenzen</u>	Echozeit TE	Repetitionszeit TR	Schichtdicke in mm
Nicht kontrastverstärkt, T2-Wichtung (T2 HASTE)	98-101	1400- 2180	3,0 - 4,0
Nicht kontrastverstärkt, T1-Wichtung mit Fettsuppression (T1 VIBE FS)	1,15 – 1,2	3,76 – 4,14	0,9 - 1,1

Kontrastverstärkte dynamische Serien in T1-Wichtung mit Fettsuppression (arteriell, portalvenös, venös) (T1 VIBE FS)	1,15	3,76	1,1
Kontrastverstärkte, T1-gewichtete Sequenz mit Fettsuppression (spät) (T1 VIBE FS)	1,19 – 1,2	4,14	0,9
Diffusionsgewichtete Aufnahme (DWI)	54-61	1900-8700	5,0

Tabelle 1: Parameter der MRT-Sequenzen

Während in der T1-Wichtung Fett hell dargestellt wird ist hingegen Wasser dunkel. In der T2-Wichtung hingegen erscheinen Flüssigkeiten und Fettgewebe hyperintens. Mit Hilfe eines Kontrastmittels lässt sich der Kontrast zwischen verschiedenen Geweben erhöhen, was eine präzisere Differenzierung ermöglicht. Die Unterdrückung des Fettsignals in den KM-verstärkten Sequenzen erhöht den KM-spezifischen Gewebekontrast. In den verschiedenen Phasen nach der Kontrastmittelgabe (arteriell, portalvenös, spätvenös) werden unterschiedliche Strukturen stärker kontrastiert. Eine weitere MRT-Sequenz ist die sogenannten Diffusionsgewichtete Aufnahme (DWI), dabei wird der Grad der Diffusion von Wasserstoffmolekülen gemessen. In geschädigten Arealen ist die Diffusion vermindert, die Moleküle können sich nicht mehr frei bewegen. Areale mit eingeschränkter Diffusion werden in den erzeugten Bildern hyperintens dargestellt. Da die DWI-Sequenz aus technischer Sicht der T2-Wichtung relativ ähnlich ist, können auch T2-Effekte die Darstellung beeinflussen. Um sicher differenzieren zu können, ob es sich bei einem Areal mit hoher Signalintensität um einen diffusionsgestörten Bereich oder um Wasser handelt, wird eine sogenannte ADC (Apparent Diffusion Coefficient) -Karte angefertigt, eine Art Negativbild, bei der die T2-Effekte eliminiert werden. Bei einer realen Diffusionseinschränkung wird dies in der ADC Karte hypointens dargestellt.

3.5.4 Tötung und Gewebegewinnung

Nach abgeschlossener Bildgebung erfolgte die Tötung der Tiere, dazu wurde eine Kaliumchlorid-Lösung (2 mval / kg KG) verwendet, die einen Herzstillstand herbeiführte. Um sicherzustellen, dass die Tiere dabei keine Schmerzen empfanden, wurden vorher Boli von Fentanyl (5 µg/kg KG) und Propofol (3 mg/kg KG) injiziert (117). Anschließend ließ man die Tiere zum größten Teil ausbluten, was vor allem über den Zugang in der V. femoralis erreicht

wurde. Zur Organentnahme erfolgte eine mediane Laparotomie und eine longitudinale Teil-Sternotomie. Die Leber wurde freipräpariert, die großen Gefäße wurden bei Bedarf abgebunden und die Leber wurde als Ganzes entnommen. Anschließend wurden die einzelnen Läsionen vorsichtig unter Zuhilfenahme der Sonographie herauspräpariert und gemäß Protokoll den verschiedenen Ablationszeitpunkten zugeordnet. Bei dem weiteren Zuschnitt wurde darauf geachtet, dass dieser senkrecht zur Längsachse der Läsionen erfolgt. Um die achsengerechte Präparation der Läsionen zu erzielen, wurden diese mittels Sonographie der entnommenen Leber lokalisiert. Die Präparate wurden für über 24 Stunden in Phosphat-gepuffertem 4%igen Standard-Formalin-Fixans fixiert (s.a. Anhang).

Der Zuschnitt der mikroskopischen Präparate, die Einbettung und Einfärbung fand durch das Institut für Allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz statt.

Bevor die Präparate zugeschnitten werden konnten, mussten sie entwässert werden, was zu einer Aushärtung führte. Zunächst wurde das Fixierungsmittel mit Hilfe von Wasser ausgewaschen, anschließend erfolgte der Wasserentzug durch eine in der Konzentration steigende Alkoholreihe, mit Iosopropanol (20-100%) (118)(119)(120). Anschließend erfolgte die Vermischung mit Xylol, welches als Intermediärmedium fungierte. Bei Temperaturen zwischen 50-70° C wurden die Präparate in geschmolzenes Paraffin eingebettet. Das Xylol verdampfte dabei und wurde durch das Paraffin ersetzt. Dieses wurde nun in Blöcke gegossen (118)(119)(120).

Der nächste Schritt in der Präparatezubereitung ist das Schneiden in dünne Scheiben. Vor dem Schneiden wurden die Paraffinblöcke für mindestens zwei Stunden bei -20°C gekühlt. Anschließend wurden die Blöcke in dem Mikrotom eingespannt und in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Es wurden für jeden Ablationszeitpunkt zwei Schnitte angefertigt. In einem ist die gesamte Läsion eingebettet, in dem anderen ist nur eine Hälfte der Läsion, dafür aber mehr vitales Lebergewebe erfasst. Mit Hilfe eines Wasserbades wurden die Schnitte geglättet und auf einen Objektträger gezogen und getrocknet. Um die verschiedenen Gewebekomponenten besser beurteilen zu können ist es möglich die Schnitte anzufärben. Zuvor wurde das noch enthaltene Paraffin mittel Xylol entfernt und die Präparate über eine nun absteigende Alkoholreihe rehydriert. Es wurde eine Routine-Färbung, die Hämatoxylin-Eosin-Färbung benutzt (121)(122). Durch diese werden die stellen sich basophile Anteile, wie zum Beispiel der Zellkern mit seinen negativ geladenen Säuren blau-violett dar, das Zytoplasma hingegen rötlich. Als letzter Schritt wurden die Präparate nach der Anfärbung wieder mit einer steigenden Alkoholreihe entwässert und mit einem dünnen Deckgläschen durch den Einsatz eines Harzes fixiert (118)(119)(120)(123).

3.6. Auswertung

3.6.1 Histopathologische Auswertung

Die Auswertung der histopathologischen Schnitte erfolgte analog an einem Lichtmikroskop (BX51 der Firma Olympus, Japan). Die Objektträger wurden in der Reihenfolge der durchgeführten Versuche analysiert. Dabei wurden alle Schnitte eines Versuches komplett untersucht, bevor zum nächsten Versuch übergegangen wurde. Innerhalb der Versuche fand eine fortwährende Sichtung der Objektträger statt, es wurde mit der letzten Ablation (eine Stunde vor Tötung des Tieres) angefangen und dann stufenweise die Schnitte der anderen Ablationszeitpunkte untersucht. Durch diese Methode erhielt man bei der Auswertung direkt eine chronologische Entwicklung der Ablationen.

Bereits veröffentlichte Studien legen nahe, dass nach der IRE nicht ein homogener Ablationsbereich entsteht, sondern unterschiedliche Zonen voneinander abgrenzbar sind (89)(115). Diese unterschiedlichen Bereiche konnten auch bei unseren Präparaten bereits makroskopisch voneinander differenziert werden. Für die Ablationen gab es zwei Schnitte pro Zeitpunkt, von denen einer den gesamten Ablationsbereich abbildete, der andere nur die Hälfte, um größere Anteile des umgebenden Lebergewebes zu erfassen.

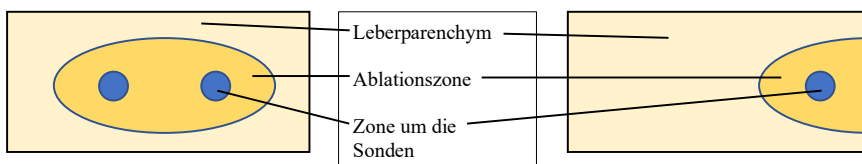


Abbildung 4: schematische Darstellung der histologischen Präparate

Um für die Auswertung ein Areal auszuwählen, das sicher innerhalb der Ablationszone liegt, wurde der Bereich zwischen den Einstichstellen der Sonden ausgewählt. Aus dem repräsentativen Ausschnitt wurden fünf (wenn die halbe Ablationszone dargestellt war), bzw. zehn Leberläppchen zufällig ausgewählt und analysiert (124)(125)(126). Dabei wurde darauf geachtet, dass das Areal direkt um die Einstichlöcher der Sonden nicht einbezogen wurde. Neben einer qualitativen Beschreibung der histopathologischen Veränderungen wurde ebenfalls eine (semi-) quantitative Analyse durchgeführt. Für diese wurde ein eigener Score entwickelt, der sich an den Arbeiten von Kubiak, Pietsch, von Eckardstein und Zodrow orientiert (124)(125)(126)(127). Dort wurde das Ausmaß der Schädigung semiquantitativ eingeteilt.

<u>Stadium</u>	0	I	II	III	IV
Histologische Auffälligkeiten					
Sinusoidale Kongestion	/	X	X	X	X
Kondensation der Zellkerne	/	X	X	X	X
Zunehmende Eosinophilie in den Zellen	/	/	X	X	X
Aufhebung der Zellgrenzen	/	/	/	X	X
Eosinophilie in den Bindegewebssepten	/	/	/	X	(X)
Aufgehobene Läppchenstruktur	/	/	/	/	X

Tabelle 2: Semiquantitative Einteilung der histologischen Veränderungen, angelehnt an (123- 126)

Des Weiteren wurde die Menge an Zellen, die als sicher avital identifiziert werden konnte (Pyknose und/ oder Karyorrhexis (120)(128)) durch manuelles Zählen in den fünf, bzw. zehn Leberläppchen bestimmt. Diese wurden dann in Verhältnis mit den vitalen Hepatozyten gesetzt und daraus ein Quotient ausgerechnet, der zur übersichtlicheren Darstellung in Prozent angegeben wurde.

Begonnen wurde die Auswertung mit einer makroskopischen Sichtung der Präparate. Dort konnten bereits verschiedenen Zonen voneinander differenziert werden. Anschließend wurden die Objekte unter das Mikroskop gelegt und bei 4-facher Vergrößerung erfolgte eine erste Orientierung. Es wurden, sofern auf den Schnitten vorhanden, die beiden Einstichstellen der Therapieelektroden identifiziert und die verschiedenen Zonen der Ablation (die bereits makroskopisch identifiziert wurden) differenziert. Als Gegenkontrolle wurde auf jedem Objektträger ein Bereich mit vitalem Lebergewebe identifiziert, um sicherzustellen, dass sich vor der Ablation gesundes Leberparenchym in dem Bereich der Läsionen befand, und um die Unterschiede zwischen dem abladierten Gewebe und normalem Leberparenchym exakter charakterisieren zu können. Nach der Identifizierung der verschiedenen Bereiche in jedem Schnitt wurden die Leberläppchen, die sich mittig zwischen den beiden Sonden befinden,

genauer untersucht. Die Struktur der Läppchen wurde überprüft und die einzelnen Zellen wurden genau betrachtet, dies fand in einer 40-fachen Vergrößerung statt. Hauptmerkmale waren die aus dem in Tabelle 2 dargestellten Score. Dazu gehörten die Darstellung der Sinusoide, die Beschaffenheit des Zellkerns und des Zytoplasmas, sowie die Integrität der Zellgrenzen und der gesamten Leberläppchen. Die gesamte Beurteilung wurde durch einen erfahrenen Facharzt für Pathologie (Dr. med. R. Kromminga, Berlin) sowie die Doktorandin durchgeführt. Um die Validität der Ergebnisse zu erhöhen, wurde die gesamte Evaluation zwei Mal durchgeführt. Falls dabei große Diskrepanzen zu den Ergebnissen der ersten Analyse auftraten, wurde die Quantifizierung ein weiteres Mal überprüft. Die Ergebnisse wurden in einer Excel-Tabelle festgehalten, parallel die histopathologischen Veränderungen und Entwicklungen stichpunktartig für jedes Versuchstier notiert. Zudem wurden Ausschnitte der Objektträger mit besonders interessanten und repräsentativen Ergebnissen ausgewählt, um Beispielbilder in der Arbeit aufzeigen zu können.

Die Quantifizierung der Ablationsfläche wurde mithilfe von makroskopischen Bildern der Läsionen durchgeführt, welche zum Teil von den Frischpräparaten und zum anderen Teil von

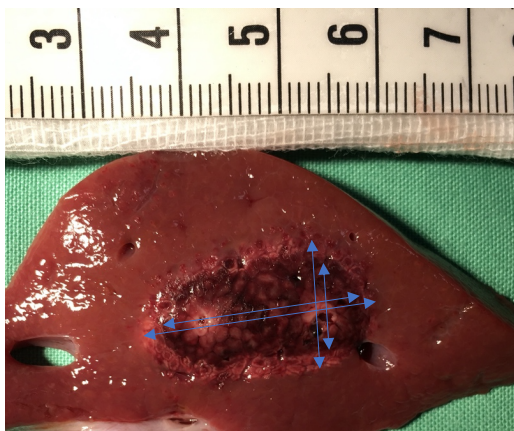


Abbildung 5: Messung der Ablationsfläche, schematische Darstellung am Frischpräparat

den fixierten Läsionen vor dem Zuschnitt angefertigt wurden. Bei einigen Läsionen wurden beide Varianten fotografiert. Auf den Bildern befindet sich ein Zentimetermaß, welches als Maßstab genutzt wurde, mithilfe der Software *Image J*, (Wayne Rasband (129)) wurden die Flächen digital ausgemessen. Dabei wurde zum einen die definitive IRE-Zone und zum anderen die gesamte Ablationsfläche gemessen. Aus der Differenz und

Division der Messungen wurde das Ausmaß des Übergangsbereiches bestimmt.

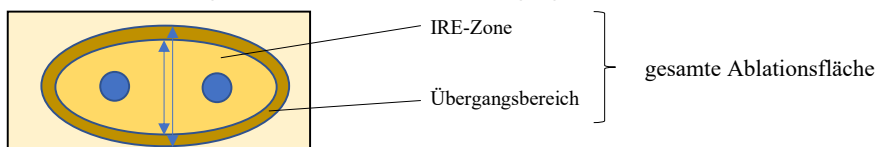


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Messung der Ablationsflächen am histologischen Präparat

3.6.2 MRT

Die Auswertung der MRT-Bilder erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätsmedizin Mainz, die Auswertung fand mithilfe des Programmes *Sectra* statt. Es wurden jeweils alle Bilder eines Versuchstieres ausgewertet, bevor zu dem nächsten Versuchstier übergegangen wurde. Die einzelnen Ablationen wurden in den verschiedenen Sequenzen dargestellt und die Läsionen wurden anhand von Versuchsprotokollen den verschiedenen Ablationszeitpunkten zugeordnet.

Zunächst wurde die Signalintensität ausgewertet, dies fand über die Messung der *Region of Interest (ROI)* statt. Dazu wurden die Umrisse der Ablationszonen in repräsentativen Schichten markiert und über das Programm *Sectra* wurde sowohl ein Mittelwert der Intensität als auch die mittlere Abweichung innerhalb der markierten Flächen ermittelt. Neben der Entwicklung der absoluten Signalintensität ließen sich somit auch die zeitlichen Veränderungen der Homogenität innerhalb der Läsionen auswerten. Da die absolute Signalintensität auf den MRT-Bildern innerhalb der Leber und zwischen den verschiedenen Versuchstieren nicht immer identisch war, wurden zusätzlich in den T2-Sequenzen in vier repräsentativen Bereichen um die Läsionen herum die Signalintensitäten gemessen. Mit dem Mittelwert dieser Messungen und der Signalintensität der Läsionen wurde ein Quotient gebildet, wodurch die Ergebnisse und deren Entwicklung zwischen den Versuchstieren besser vergleichbar waren. Die Idee dieser Auswertung war herauszufinden, ob über die Messung der Signalintensität ein indirekter Rückschluss auf das Ausmaß der Zellzerstörung möglich ist.

Anschließend wurden die Ablationsflächen gemessen, dazu wurde zunächst mithilfe des Programmes *Sectra* in den T1-gewichteten Volumendatensätzen mittels multiplanarer Rekonstruktion (MPR) alle drei Raumebenen so eingestellt, dass diese denen der Läsion entsprachen. Für die Messung wurde dabei die Rekonstruktion senkrecht zur Längsachse der Läsionen verwendet, da diese der Schnitttrichtung der histopathologischen Schnitte entsprach. Es wurde in allen Sequenzen das Ausmaß der IRE-Ablationszone gemessen. Da es sich bei den T2-gewichteten Sequenzen nicht um Volumendatensätze handelt, wurden diese bereits bei der MRT Untersuchung in der entsprechenden Ebene erzeugt. Bei den T2-gewichteten Bilddaten zeigt sich eine signalintensere äußere Zone und eine weniger intense innere Zone, die, analog zu den Makropräparaten, jeweils separat vermessen wurden.

3.7 Datenerhebung und -auswertung

Da es sich um eine experimentelle Studie an Tiermodellen handelte, gab es keine patientenbezogenen Daten. Des Weiteren lagen vor den Versuchen keine Informationen zu den

einzelnen Tieren vor, die in die erhobenen Ergebnisse und Daten eingeflossen sind. Aufgrund der relativ geringen Anzahl an Versuchstieren gab es keine statistisch signifikanten quantitativen Auswertungen. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm MS Excel Microsoft® Excel® Version 2010) ausgewertet und graphisch aufbereitet, anschließend qualitativ beschrieben. Bei einem Versuchstier (Nummer 6) musste der Versuch aufgrund von Komplikationen vorzeitig abgebrochen werden. Die bis dahin gewonnenen Ergebnisse wurden aufgrund des deskriptiven Charakters der Auswertung jedoch nicht ausgeschlossen.

4. Ergebnisse

Durchgeführte Ablationen

Es wurden insgesamt 41 Ablationen an sieben Versuchstieren durchgeführt, welche alle erfolgreich verliefen. Nach dem ersten Versuch wurde das Protokoll von sieben auf sechs Ablationen pro Tier geändert, da sich herausstellte, dass von besagtem Zeitpunkt ($t=9$) keine relevanten Erkenntnisse zu erwarten waren. An zwei Tieren wurde von dem Versuchsprotokoll abgewichen. Bei Tier Nummer 5 wurden zwei Ablationen zum Zeitpunkt $t=3$ durchgeführt, da die beiden Elektroden bei der ersten Ablation in verschiedene Leberlappen platziert wurden,

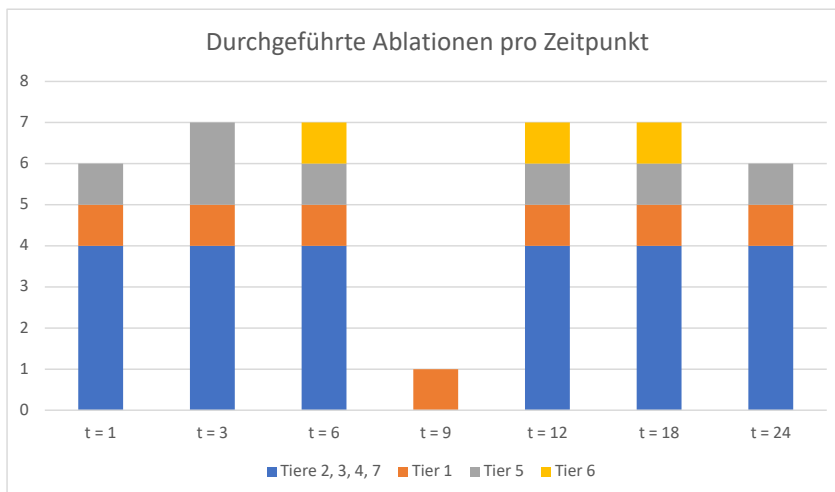


Abbildung 7: Anzahl an durchgeführten Ablationen pro Zeitpunkt

was sich für die Auswertung als nachteilhaft erwies. Für die histopathologische Auswertung fehlt bei Tier 4 die Läsion zum Zeitpunkt $t=6$, da es nicht möglich war, diese aus dem Organ zu präparieren. Bei einem weiteren Tier (Nummer 6) musste der Versuch vorzeitig beendet werden, da es zu einer nicht beherrschbaren Oxygenierungsstörung kam, deren Ursache letztlich nicht eruiert werden konnte. Die MRT Untersuchung wurde dahingehend vorgezogen und das Tier sechs Stunden vor dem eigentlichen Ende des Versuches getötet. Die Ergebnisse aus diesem Fall sind nicht in die endgültigen Auswertungen eingeflossen.

4.1 Histopathologische Ergebnisse

Erfolg der Ablationen

Alle durchgeführten Ablationen haben sichtbare Veränderungen im Lebergewebe hervorgerufen, damit können sie primär als erfolgreich durchgeführt betrachtet werden. Bereits makroskopisch waren die Ablationszonen an den Präparaten zu erkennen. An den Frischpräparaten waren angrenzend an die Einstichstellen der Sonden helle weißlich bis graue

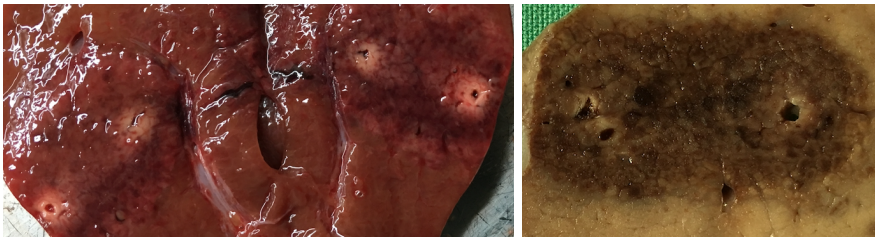


Abbildung 8: links: Frischpräparat: Bereich der IRE Schädigung dunkelrot. Bereich der thermischen Schädigung unmittelbar angrenzend an die Sonden weißlich, rechts: Fixiertes Präparat (18h): IRE Schädigung dunkel, thermische Schädigung um die Sonden hellgrau

Bereiche erkennbar, daran angrenzend ein Areal, welches sich dunkelrot bis braun darstellte. In der mikroskopischen Betrachtung spiegelten sich diese verschiedenen Zonen der Ablation wider. Auch dort waren drei verschiedene Zonen klar zu erkennen, die sich jeweils mit einer

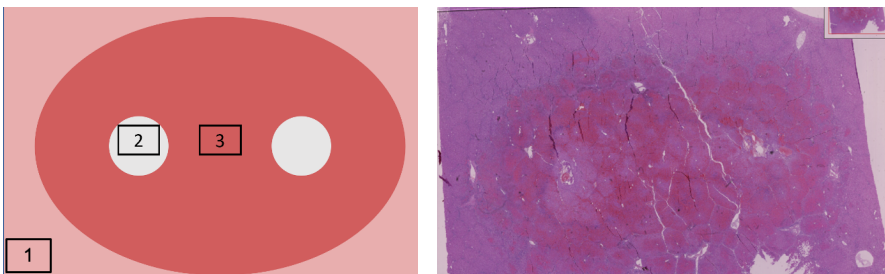


Abbildung 9: links: Schema der Ablationszonen, 1: vitales Lebergewebe, 2: thermoablative Zone, 3: Bereich der IRE-Schädigung; rechts: mikroskopischer Überblick entsprechend des Schemas

relativ scharfen Trennstärke voneinander abgrenzten (Abbildung 8). Insgesamt stellte sich die Ablationszone oval bis elliptisch dar.

Am Rand der IRE-Zone lässt sich in einigen Schnitten ein weiterer abgrenzbarer Bereich finden, eine Art Übergangszone. In diesem Bereich erfasst die Schädigung nicht mehr das gesamte Leberläppchen, sondern nur die zentralen Anteile.

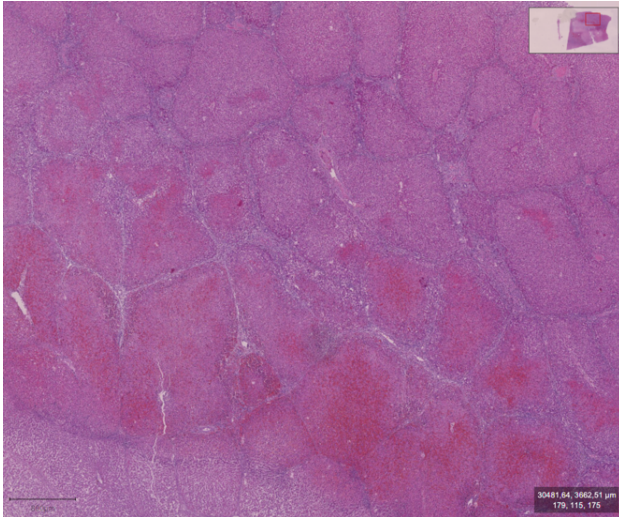


Abbildung 8: Verschiedene Gewebeabschnitte, 4x Vergrößerung
Auf dem Bild sind beispielhaft sowohl ein Bereich der thermischen Gewebeschädigung (unten links), als auch der Schädigung durch IRE zu sehen. Zum Vergleich oben im Bild vitales Lebergewebe.

Thermoablative Nekrose

Bereits in vorherigen Studien wurde beschrieben, dass sich im Bereich um die Einstichstellen der Therapieelektroden eine Zone befindet, die aufgrund ihres morphologischen Erscheinungsbildes eine thermische Zerstörung des Gewebes vermuten lässt. Es wurde angenommen, dass die Sonden durch das Abgeben der Stromimpulse selbst erhitzt wurden und diese Wärme an die Umgebung abgegeben haben (106). Bei allen Läsionen dieser

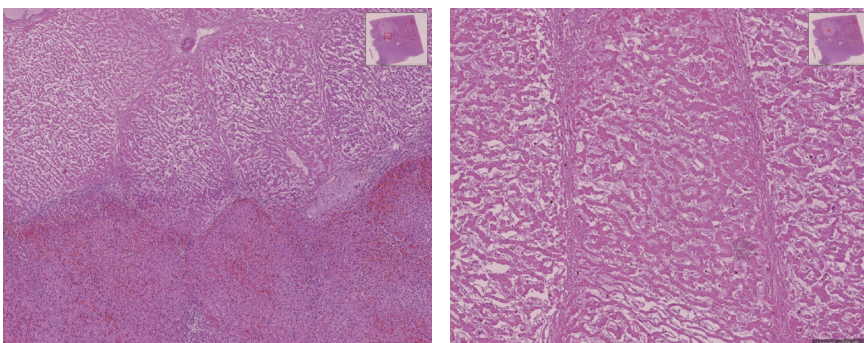


Abbildung 9: Thermische Gewebeschäden, 10-40x Vergrößerung
Auf dem linken Bild sieht man im oberen Abschnitt einen Bereich der thermischen Ablationszone, unten im Bild den Übergang zur Gewebeschädigung durch IRE. Das rechte Bild zeigt in stärkerer Vergrößerung die Effekte der thermischen Ablation: Aufgehobene Zellgrenzen, zerstörte Zellkerne, gestörte Läppchenstruktur.

Versuchsreihe wurde eine solche möglicherweise thermoablative Zone angrenzend an die Einstichstelle der Sonden gefunden. Ihre makroskopische und mikroskopische Erscheinung unterschied sich grundlegend von dem Bereich der IRE-Schädigung, es ließen sich typische Anzeichen einer Koagulationsnekrose finden. In der HE-Färbung war eine verstärkte Eosinophilie zu beobachten, was auf eine Eosinbindung an die intrazellulären denaturierten Proteine zurückgeführt werden kann. Die Umrisse der einzelnen Leberläppchen konnten zwar noch erahnt werden, eine klare Abgrenzung durch die Bindegewebssepten, die ebenfalls nekrotisch waren, war jedoch nicht mehr vorhanden. Die Zellgrenzen der einzelnen Hepatozyten waren verschwommen, es ließen sich keine einzelnen Zellkerne mehr finden. Die Periportalfelder waren ebenfalls zerstört, man sah keine intakten Blutgefäße. Umrandet war die thermoablative Nekrosezone von einem Leukozytenwall. Die Abgrenzung zum benachbarten Bereich der IRE-Schädigung war relativ trennscharf.

Chronologische Aufführung der Ablationszeitpunkte

Ablation 6, $t=1$

Die Schnitte des Zeitpunktes $t=1$ zeigten die Ablationen, die eine Stunde vor Versuchsende durchgeführt wurden. Hier waren die Läsionen am frischesten und stellten somit den Beginn der Entwicklung der Ablationszone nach IRE dar. Bei allen vorliegenden Schnitten zeigten sich bereits eine Stunde nach der Ablation Veränderungen des Gewebes. Makroskopisch waren zu diesem Zeitpunkt die verschiedenen Zonen noch nicht eindeutig voneinander zu unterscheiden.

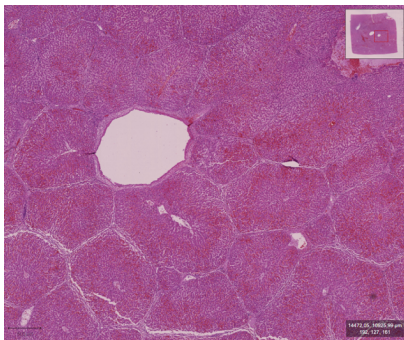


Abbildung 10: Ablationszone zum Zeitpunkt $t=1$, 4x Vergrößerung
Die Läppchenstruktur ist erhalten, erste Zellveränderungen sind sichtbar

Mikroskopisch ließen sich bereits Schäden, jedoch keine Anzeichen für einen definitiven Zelluntergang finden. Die Degeneration des Gewebes äußerte sich in einer hochgradigen sinusoidalen Kongestion mit konsekutiver Schwellung dieser Strukturen. Zu diesem frühen Zeitpunkt war es noch nicht möglich einzelne Zellen als sicher vollständig zerstört zu identifizieren, auch wenn einige Anzeichen, wie eine leichte Schrumpfung des Zellkerns, darauf hindeuten. Zum Zeitpunkt $t=1$ betrugen die Maße der definitiven IRE-Ablationszone in den frischen

Läsionen im Mittel $10,3 \times 28,03$ mm, die Übergangszone hatte im Mittel eine vertikale Ausdehnung von 2,24 mm und horizontal 3,81 mm.

Höhe von 4,47 mm und eine Breite von 7,62 mm. Gerade zu diesem frühen Zeitpunkt nach der IRE gab es große Unterschiede an den Ausmaßen der Läsionen zwischen den verschiedenen Versuchstieren. Aufgrund der zu geringen Datenmenge wurden für diesen Zeitpunkt keine Quartile berechnet. In der thermoablativen Zone war zu diesem frühen Zeitpunkt (t=1) bereits eine vollständige Nekrose aller Zellen zu finden.

Zeitpunkt t=1	Frische Präparate		Fixierte Präparate	
	Höhe	Breite	Höhe	Breite
Median [mm]	10,3	28,03	8,09	22,55
Q1 [mm]	/	/	7,25	20,79
Q3 [mm]	/	/	8,51	28,03
Range [mm]	9,36 – 15,96	27,38 – 30,91	5,91 – 15,72	20,39 – 30,67
Median des Übergangsbereiches [mm]	2,24 vertikal	3,81 horizontal	3,11 vertikal	0,24 horizontal
Grad der histologischen Veränderung			I	
Anzahl zerstörter Zellen [in %]			0	

Tabelle 3: Maße der Ablationszonen in mm, Median der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %

Ablation 5, t=3

Die Präparate des vorletzten Versuchszeitpunkts stammten aus dem Bereich der Ablationen, die drei Stunden vor Versuchsende durchgeführt wurden. Die Prozesse waren weiter vorangeschritten, weiterhin war eine massive sinusoidale Kongestion sichtbar, die Zellgrenzen verschwommen weiter und es ließ sich eine zunehmende Eosinophilie beobachten. Die Struktur des Gewebes war noch intakt, sowohl die bindegewebigen Septen als auch die Periportalfelder erschienen unversehrt. In den Schnitten einiger Versuchstiere war eine deutliche Schrumpfung des Zellkerns bei einem Teil der Zellen zu beobachten, sodass hier von einem definitiven Zelltod ausgegangen werden konnte. Das Ausmaß der Zellzerstörung lag zwischen 0 % - 77,5 %, was eine große Diskrepanz zwischen den Ablationen der verschiedenen Versuchstiere aufzeigte. Auf eine statistische Auswertung der einzelnen der Werte wurde daher zu diesem Zeitpunkt verzichtet. Die Übergangszone hatte im Mittel in den fixierten Präparaten eine Ausdehnung von vertikal 2,69 mm und horizontal 2,95 mm.

Zeitpunkt t=3	Frische Präparate		Fixierte Präparate	
	Höhe	Breite	Höhe	Breite
Median [mm]	13,85	26,74	10,85	24,42
Q1 [mm]	10,74	25,89	8,54	23,96
Q3 [mm]	16,95	27,59	11,22	25,98
Range [mm]	10,18 - 17,76	24,87 - 30,48	6,33 - 15,93	22,77 - 26,54
Median des Übergangsbereiches [mm]	0,72 vertikal	1,43 horizontal	2,69 vertikal	2,95 horizontal
Grad der histologischen Veränderung			II	
Anzahl zerstörter Zellen [in %]			0 – 77,5	

Tabelle 4: Maße der Ablationszonen in mm, Median der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %

Ablation 4, t=6

Die nächsten Ablationen wurden sechs Stunde vor Versuchsende durchgeführt. Ein Teil der Zellen und der Zellkerne war zu diesem Zeitpunkt deutlich geschrumpft und kondensiert. Die Eosinophilie war stark ausgeprägt, die Zellgrenzen verschwommen immer mehr, waren jedoch noch nicht vollständig aufgehoben. Die Gewebestruktur mit den Septen zwischen den Leberläppchen und den Periportalfeldern war nach wie vor intakt. Der Median des Anteils zerstörter Zellen betrug 53,75% (Range: 42,50 – 95,00 %).

Die Größe der Ablationszone betrug im Mittel in den frischen Präparaten 15,31 x 27,46 mm, beziehungsweise mit dem Übergangsbereich 16,4 x 29,79 mm. In den fixierten Präparaten beliefen sich die Maße auf 10,59 x 24,70 mm, beziehungsweise 14,35 x 29,34 mm mit Übergangsbereich. Es ist auffallend, dass der Übergangsbereich im fixierten Präparat größere Ausmaße hatte als im Frischpräparat.

Zeitpunkt t= 6	Frische Präparate		Fixierte Präparate	
	Höhe	Breite	Höhe	Breite
Median [mm]	15,09	24,55	9,34	22,92
Q1 [mm]	12,51	24,49	8,98	22,57

Q3 [mm]	17,67	24,61	9,78	23,26
Range [mm]	9,11 - 21,96	23,6 - 37,15	8,46 - 15,23	22,35 - 30,63
Median des Übergangsbereiches [mm]	0,55 vertikal	1,17 horizontal	1,88 vertikal	2,32 horizontal
Grad der histologischen Veränderung			II	
Anzahl zerstörter Zellen (Median und Range) [in %]			53,75 (42,5 – 95)	
Anzahl zerstörter Zellen (Q1 und Q3) [in %]			50; 87,5	

Tabelle 5: Maße der Ablationszonen in mm, Median der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %

Ablation 3, t=12

Zwölf Stunden vor Versuchsende wurde die nächste Ablation durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt haben schon viele Veränderungen stattgefunden, ein Großteil der Zellen ist definitiv zerstört. Auffällig war, dass die Struktur der Leberläppchen mit den Periportalfeldern und die Bindegewebssepten nach wie vor erhalten waren, die Zellgrenzen innerhalb der Läppchen jedoch sehr stark verschwommen waren. Die Zellkerne waren zu diesem Zeitpunkt ebenfalls stark geschrumpft und kondensiert. Der Grad an den untergegangenen Zellen liegt im Median bei 93,0%, die Grenzen liegen zwischen 75%- 100%.

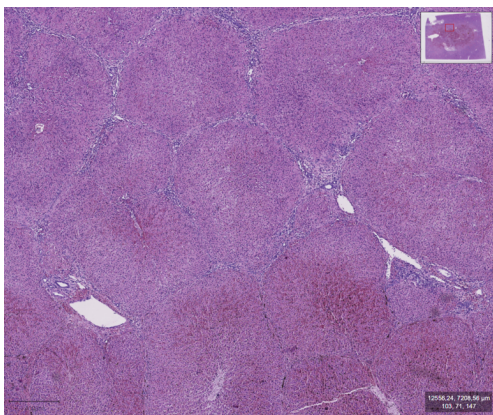


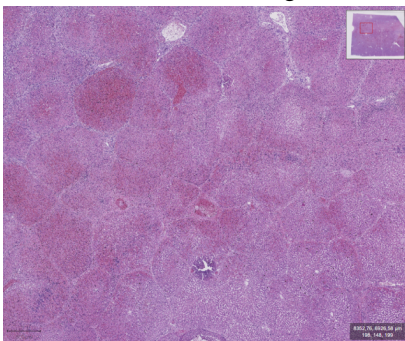
Abbildung 11: IRE-Ablationszone, 4x Vergrößerung
Ca. 80% zerstörte Zellen, die Bindegewebssepten sind intakt

Zeitpunkt t= 12	Frische Präparate		Fixierte Präparate	
	Höhe	Breite	Höhe	Breite
Median [mm]	9,37	22,27	9,58	20,6
Q1 [mm]	9,02	22,10	9,07	20,02
Q3 [mm]	9,71	22,43	9,79	20,99
Range [mm]	8,38 - 16,48	21,7 - 28,46	7,19 - 14,42	19,08 - 26,35
Median des Übergangsbereiches [mm]	1,17 vertikal	1,87 horizontal	2,69 vertikal	2,45 horizontal
Grad der histologischen Veränderung			II	
Anzahl zerstörter Zellen (Median und Range) [in %]			95 (75 – 100)	
Anzahl zerstörter Zellen (Q1 und Q3) [in %]			92,5; 97,5	

Tabelle 6: Maße der Ablationszonen in mm, Median der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %

Ablation 2, t=18

Die zweitältesten Läsionen wurden 18 Stunden vor Versuchsende durchgeführt, Die einzelnen Zellen ließen sich nicht mehr klar voneinander abgrenzen, die Zellkerne waren nach wie vor sichtbar, jedoch waren sie maximal geschrumpft und kondensiert. Die Leberläppchen ließen sich noch klar voneinander abgrenzen, allerdings ließen sich zu diesem Zeitpunkt auch in einem



Teil der Septen Veränderungen beobachten. Dazu zählten vor allem eine steigende Eosinophilie des Bindegewebes. Zudem verschwommen die Grenzen einiger Septen, die ursprüngliche Struktur löste sich langsam auf. Im Mittel liegt der Anteil der untergegangenen Zellen bei 98,75%, die Grenzen in den verschiedenen Schnitten belaufen sich auf 97,5% - 100%.

Abbildung 12: IRE-Schädigung nach 18 Stunden, 4x Vergrößerung
Fast 100% der Zellen sind zerstört, die Bindegewebssepten verlieren ihre Struktur.
Im unteren rechten Quadranten sieht man einen Teil der thermoablativen Zone.

Zeitpunkt t= 18	FrISChe Präparate		Fixierte Präparate	
	Höhe	Breite	Höhe	Breite
Median [mm]	12,42	26,51	8,13	20,77
Q1 [mm]	11,51	25,13	6,84	20,69
Q3 [mm]	13,33	27,88	8,63	23,87
Range [mm]	8,67 - 19,35	20,33 - 30,97	6,8 - 12,4	19,01 - 25,76
Median des Übergangsbereiches [mm]	1,44 vertikal	1,55 horizontal	2,97 vertikal	2,84 horizontal
Grad der histologischen Veränderung			III	
Anzahl zerstörter Zellen (Median und Range) [in %]			98,75 (97,5 - 100)	

Tabelle 7: Maße der Ablationszonen in mm, Median der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %

Ablation 1, t=24

Direkt zu Beginn des Versuches, 24 Stunden vor Versuchsende, wurde die erste Ablation durchgeführt, die in der histopathologischen Auswertung somit chronologisch betrachtet die

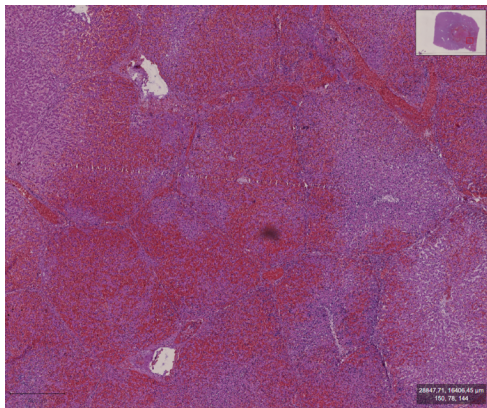


Abbildung 13: IRE-Zone zum Zeitpunkt t=24, 4x Vergrößerung
Die Zellen sind zu 100% zerstört, auch die Bindegewebssepten sind nekrotisch, die Läppchenstruktur ist weitestgehend aufgehoben.

ältesten Läsion des Versuchs darstellt. Die Veränderungen waren zu diesem Zeitpunkt maximal ausgeprägt. Die einzelnen Zellgrenzen waren nicht mehr differenzierbar, die Zellkerne zeichneten sich zwar noch ab, sie waren jedoch extrem geschrumpft und kondensiert. Die Eosinophilie war ebenfalls maximal ausgeprägt. Auffällig war, dass sich zu diesem Zeitpunkt auch die verschiedenen

Leberläppchen nicht mehr eindeutig voneinander abgrenzen ließen. Die Umrisse der Läppchen ließen sich zwar noch errahnen, aber die bindegewebigen Septen präsentierten sich ebenfalls als

stark geschädigt. In allen Präparaten betrug der Anteil der zerstörten Zellen 100%, im Bereich der Ablationszone ließ sich kein vitales Gewebe mehr erkennen.

Zeitpunkt t= 24	Frische Präparate		Fixierte Präparate	
	Höhe	Breite	Höhe	Breite
Median [mm]	11,22	26,64	8,60	21,13
Q1 [mm]	8,83	23,5	8,39	19,86
Q3 [mm]	13,6	29,77	9,01	22,39
Range [mm]	8,56 - 18,21	20,01 - 30,21	7,31 - 11,67	19,03 - 25,77
Median des Übergangsbereiches [mm]	0,81 vertikal	0,6 horizontal	2,44 vertikal	2,24 horizontal
Grad der histologischen Veränderung			IV	
Anzahl zerstörter Zellen (Median und Range) [in %]			100 (alle 100 %)	

Tabelle 8: Maße der Ablationszonen in mm, Median der Übergangszone in mm, Grad der histologischen Veränderung nach Tabelle 2, Anzahl der zerstörten Zellen in %

Zusammenfassung

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Gewebeerstörung durch eine Ablation per irreversibler Elektroporation einen dynamischen Prozess verkörpert. Bei der makroskopischen Auswertung der Bilder fiel auf, dass die verschiedenen Schichten der Ablationszone, inklusive der Übergangszone, bei den älteren Läsionen besser voneinander abgrenzbar waren. Des Weiteren waren die Maße der Übergangszone zu dem Zeitpunkt t=1 explizit in den Frischpräparaten verhältnismäßig groß.

Auf den folgenden Seiten vergrößerte Bildbeispiele, um die histologischen Veränderungen zu veranschaulichen.

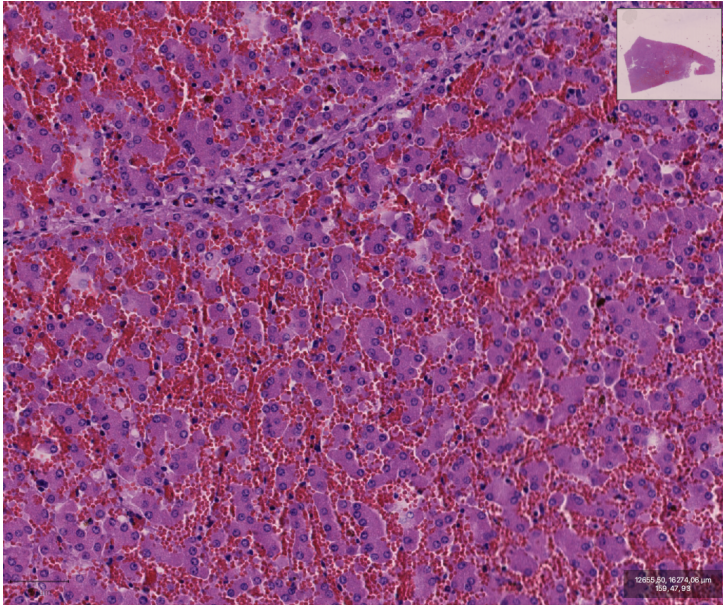


Abbildung 14: 1h nach IRE, HE, 15x Vergrößerung

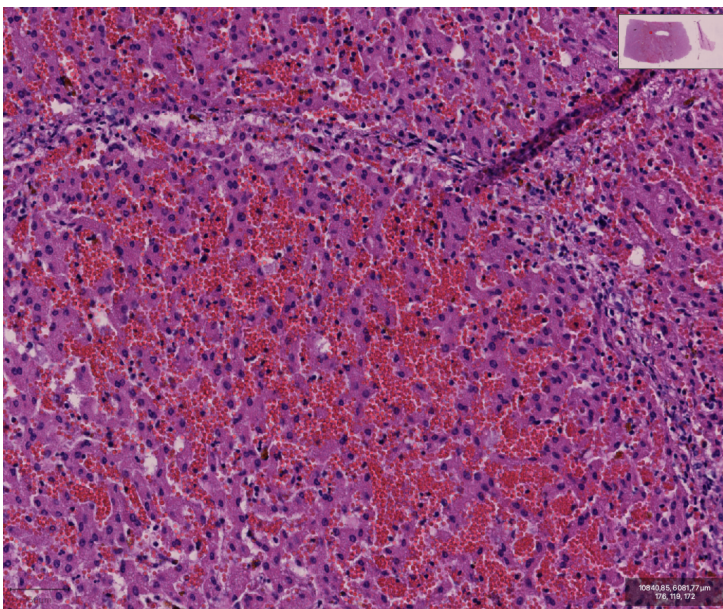


Abbildung 15: 6h nach IRE, HE, 15x Vergrößerung

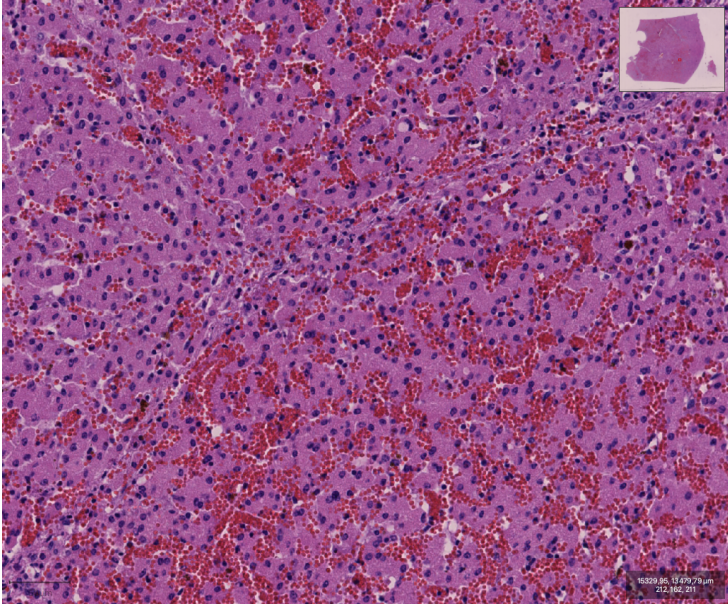


Abbildung 16: 18h nach IRE, HE, 15x Vergrößerung

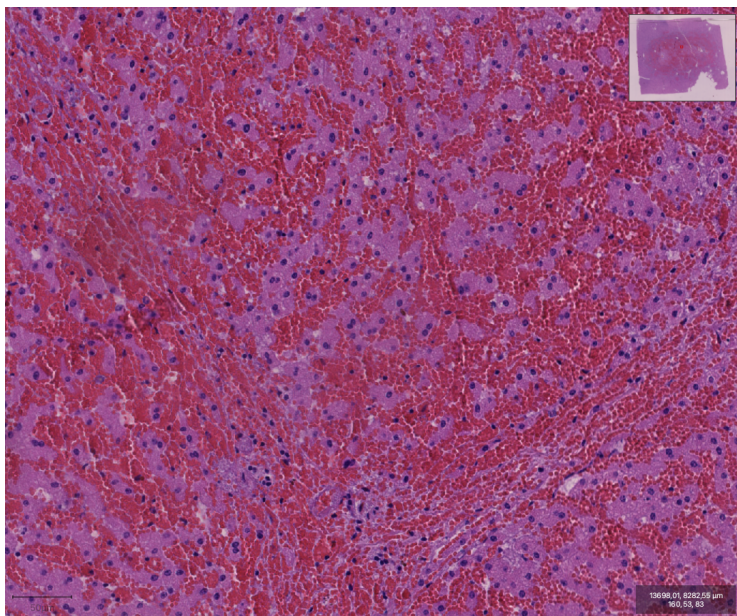


Abbildung 17: 24h nach IRE, HE, 15x Vergrößerung

Veränderung der zerstörten Zellen

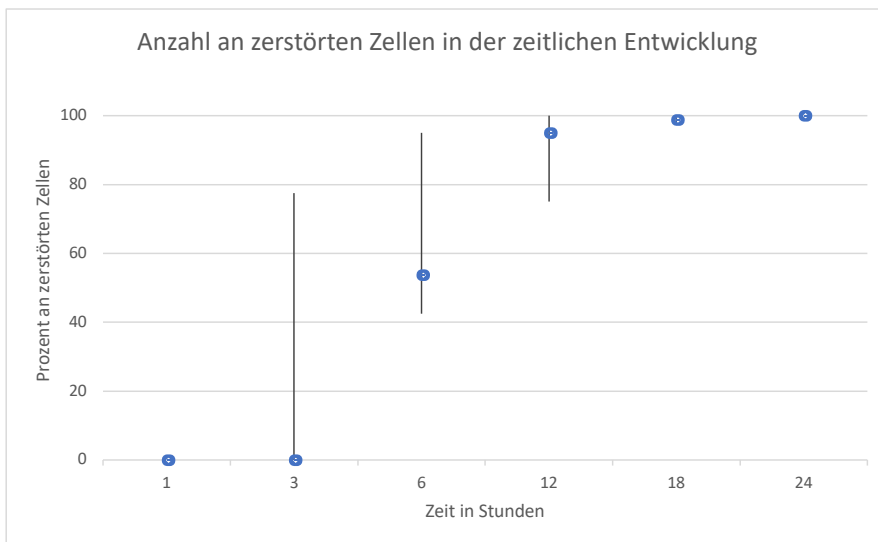


Abbildung 18: Entwicklung des prozentualen Anteils an zerstörten Zellen in Stunden nach erfolgter Ablation (Mediane, sowie Range). Für die Zeitpunkte $t=1$ und $t=3$ sind keine Mediane bestimmbar.

In der Auswertung der mikroskopischen Bilder war es für den ersten Zeitpunkt, eine Stunde nach erfolgter Ablation, nicht möglich, einen definitiven Prozentsatz an untergegangenen Zellen zu definieren. Es ließen sich zwar schon starke Veränderungen des Gewebes feststellen und einige Zellen waren bereits stark geschädigt, jedoch waren die Veränderungen noch nicht so weit vorangeschritten, dass sich zerstörte Zellen sicher identifizieren lassen. Drei Stunden nach der Ablation ist der interindividuelle Unterschied im Grad der Zellschädigung zwischen den Versuchstieren am stärksten ausgeprägt. Zu den nachfolgenden Ablationszeitpunkten, die chronologisch betrachtet ältere Läsionen darstellten, glichen sich die prozentualen Werte der untergegangenen Zellen der verschiedenen Versuchstiere immer weiter an. Bei der Betrachtung der Mediane ließ nach initial steilem Anstieg der Kurve eine deutliche Abflachung der Kurve mit schlussendlichem Erreichen der 100 %- Marke beobachten. Während in der thermoablativen Zone das gesamte Gewebe, inklusive der Gefäße, direkt zerstört wurde, blieben in der IRE-Zone die Septen und Portalfelder lange erhalten. Ab 18 Stunden nach erfolgter Ablation waren jedoch auch in diesem Bereich Schädigungen zu beobachten.

Veränderung der Ablationsflächen

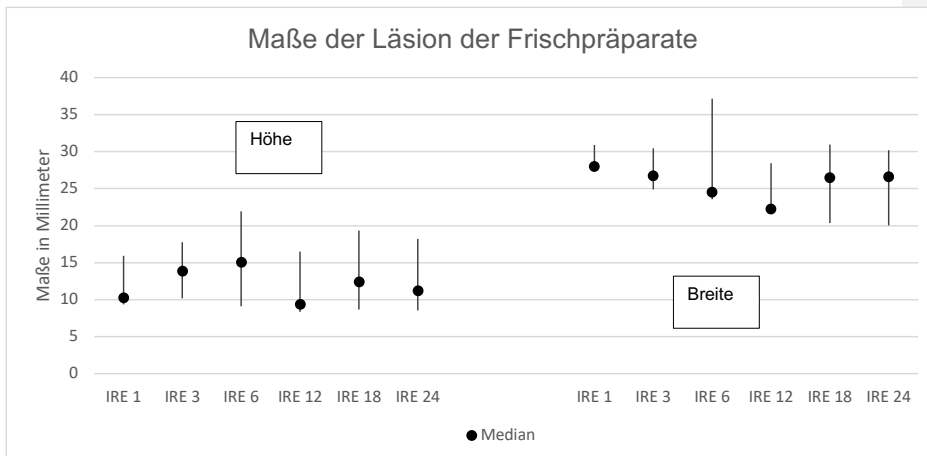


Abbildung 19: Mediane und Range der Ausmaße der Läsionen im Frischpräparat in Stunden nach erfolgter Ablation

Bei der Entwicklung der Ablationsfläche an den Frischpräparaten fällt auf, dass die Ausmaße der Läsionen über die Zeit relativ konstant blieben. Es konnte keine eindeutige Entwicklung der Ablationsfläche festgestellt werden, sie wurden weder kontinuierlich größer noch kleiner. Im Gegensatz zum Prozess des Zelluntergangs während des gesamten Versuchszeitraum zeigte sich bei der Größe der Läsion kein anhaltender dynamischen Prozess.

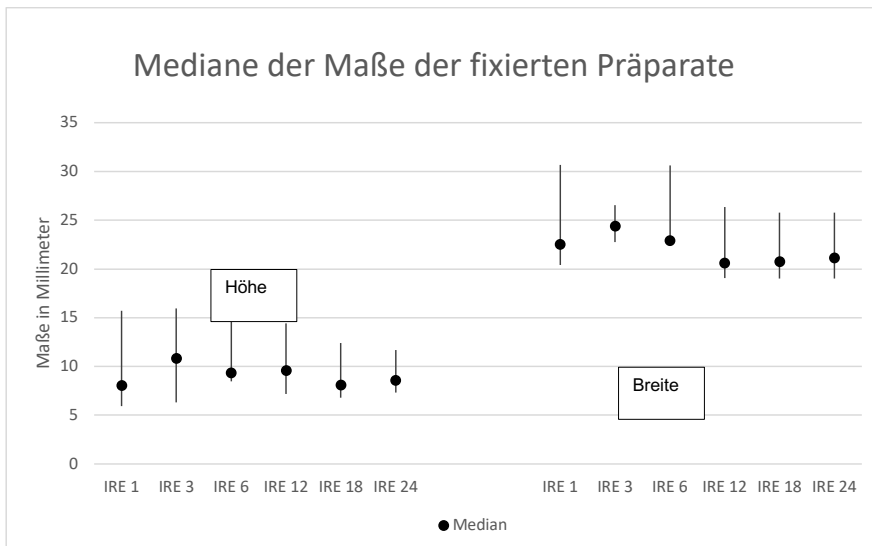


Abbildung 20: Maße der Läsionen der fixierten Präparate über die Zeit

Die Betrachtung der fixierten Läsionen fiel ähnlich aus. Auch hier zeigten sich leichte Schwankungen zwischen den verschiedenen Ablationszeitpunkten, aber eine eindeutige Größenentwicklung war nicht zu verzeichnen.

Beim Vergleich der Maße von Frisch- und fixiertem Präparat war auffällig, dass die Ausmaße der Ablationsflächen in den Frischpräparaten bis auf eine Ausnahme immer höher waren als bei den fixierten Läsionen.

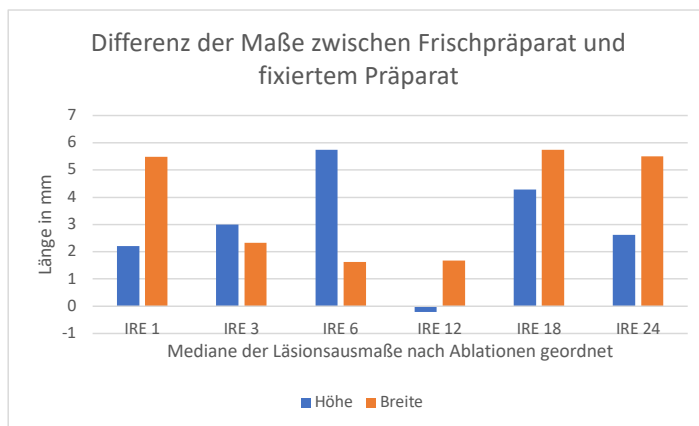


Abbildung 21: Mittelwerte der Größendifferenz der Läsionen im Frischpräparat und im fixiertem Präparat nach Zeitpunkt

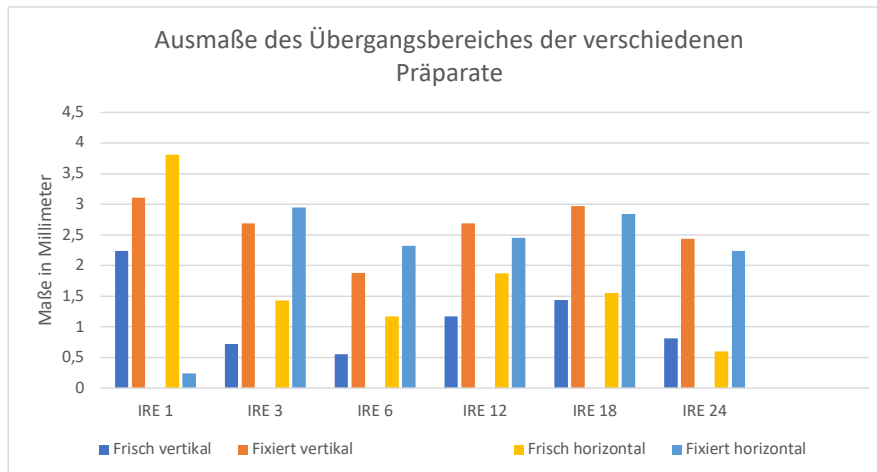


Abbildung 22: Vergleich Übergangszone von Frisch- und fixiertem Präparat

Die Ausmaße der Übergangszone wurden aus der Differenz der Messungen der Läsionen zwischen äußerer und innerer Abgrenzung der IRE-Läsion zum vitalen Lebergewebe (s.a. Punkt 3.5.1 *Histopathologische Auswertung*) berechnet. Bei der Betrachtung der verschiedenen Ablationszeitpunkte fiel auf, dass sich die Werte deutlich unterscheiden. Eine klare Tendenz der Entwicklung war dabei nicht zu erkennen. Es war jedoch auffällig, dass die Ausmaße der Übergangszone in den fixierten Läsionen zu jedem Zeitpunkt, außer t=1, größer waren als die in den Frischpräparaten.

4.2 Ergebnisse MRT

Chronologische Aufführung der Ablationszeitpunkte

Im Folgenden wurden die Ergebnisse der Auswertung der MRT-Bilder entsprechend der histopathologischen Schnitte in chronologischer Reihenfolge dargestellt.

t=1

<u>Sequenzen</u>	<u>ROI Quotient</u>	<u>ROI Median</u>	<u>ROI Q1</u>	<u>ROI Q3</u>	<u>ROI Range</u>
T2	1,34	162,50	152,00	186,00	149,00 – 302,00
DWI	/	41,01	24,16	66,05	14,08 - 68,95
ADC	/	854,50	654,00	999,00	508,00 – 1057,00

Tabelle 9: Signalintensität zum Zeitpunkt t=1 in verschiedenen Sequenzen
Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe. Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung

<u>Sequenzen</u>	<u>T2</u>	<u>T2 inkl. Übergangszone</u>	<u>T1 nativ</u>	<u>T1 KM portalvenös</u>	<u>T1 KM spätvenös</u>
Höhe					
Median	10,55	17,20	9,90	14,60	13,70
Q1	10,50	15,80	9,70	12,60	10,70
Q3	10,60	18,60	10,40	17,50	16,00
Range	9,50 – 13,10	14,20 – 22,40	9,10 – 16,60	9,70 – 18,80	8,40 – 16,20
Breite					
Median	26,45	34,20	23,10	29,55	27,80
Q1	25,80	34,00	21,80	29,10	26,00

Q3	27,10	34,40	25,70	31,00	29,70
Range	24,20 – 28,20	30,30 – 35,80	20,40 – 33,80	21,20 – 32,40	23,30 – 30,80
Mediane des Übergangsbereichs in der T2-Wichtung in mm			vertikal: 3,33	horizontal: 3,88	

Tabelle 10: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt t=1 in mm. Zudem Maße der in der T2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet)

Der Zeitpunkt t=1 stellte in der Chronologie wiederum die frischesten Läsionen dar, stammte also von den Ablationen, die eine Stunde vor Versuchsende durchgeführt wurden. Bei der Auswertung war auffallend, dass die Läsionen vor allem in den T1-Wichtungen sehr schlecht vom umgebenden Lebergewebe abgrenzbar waren. Insgesamt ließen sich in allen Sequenzen der MRT-Bilder ähnliche Ausmaße der Läsionen feststellen. Der in der T2-Wichtung gemessene Übergangsbereich hatte ein vertikales Ausmaß von 3,33mm und horizontal 3,88mm.

t=3

Sequenzen	ROI Quotient	ROI Median	ROI Q1	ROI Q3	ROI Range
T2	1,39	213,50	188,00	251,00	166,00 – 270,00
DWI	/	48,42	22,39	55,06	17,30 - 62,10
ADC	/	696,50	654,00	826,00	568,00 – 1108,00

Tabelle 11: Signalintensität zum Zeitpunkt t=3 in verschiedenen Sequenzen
Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe. Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung

Sequenzen	T2	T2 inkl. Übergangszone	T1 nativ	T1 KM portalvenös	T1 KM spätvenös
Höhe					
Median	10,00	13,15	10,25	11,55	9,05
Q1	9,90	10,70	8,90	9,40	8,20
Q3	10,10	15,60	13,30	13,90	10,60
Range	7,60 – 11,30	10,00 – 15,70	8,30 – 18,40	9,00 – 19,10	7,80 – 12,30
Breite					
Median	22,30	25,50	22,40	27,75	23,10
Q1	21,40	23,50	21,10	21,40	21,60
Q3	23,20	27,50	26,40	31,30	29,40
Range	19,40 – 24,70	21,20 – 30,50	17,80 – 36,20	17,70 – 34,40	19,40 – 30,80

Mediane des Übergangsbereichs in der T2-Wichtung in mm	vertikal: 1,58	horizontal: 1,60
--	----------------	---------------------

Tabelle 12: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt $t=3$ in mm. Zudem Maße der in der T2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet)

Zum Zeitpunkt $t=3$ fiel auf, dass die Ablationsfläche in der T2-Wichtung vor allem in der Breite kleiner war als zum vorherigen Zeitpunkt. In den T1-Wichtungen fand sich kein eindeutiger Unterschied. Die typische 3-Schichtung nach IRE ließ sich gut in der T2-Wichtung beobachten. Die Übergangszone stellte sich auffallend kleiner dar. Die Signalintensität zeigte zu diesem Zeitpunkt noch keine eindeutige Entwicklung, sie ist in den Absolutwerten der T2-Wichtung und der DWI-Aufnahme leicht gestiegen, in der ADC-Aufnahme gesunken.

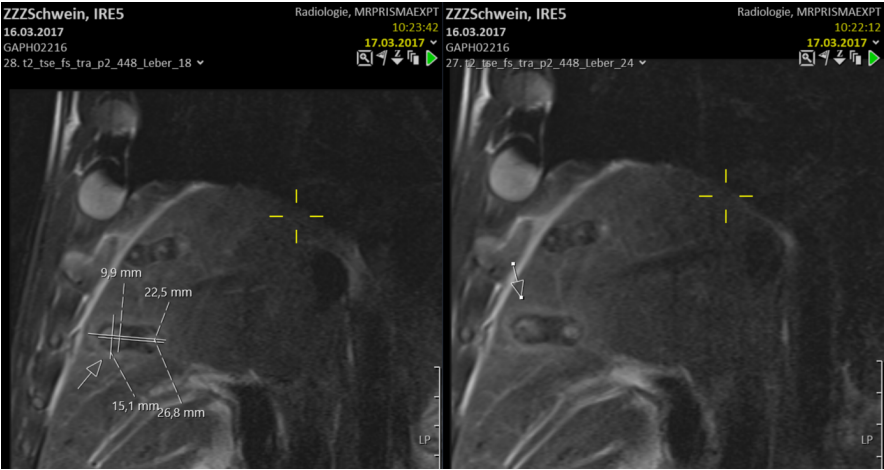


Abbildung 23 Typische IRE 3-Schichtung in der T2 Wichtung

$t=6$

Sequenzen	ROI Quotient	ROI Median	ROI Q1	ROI Q3	ROI Range
T2	1,43	200,00	192,00	204,00	178,00 – 220,00
DWI	/	26,72	22,20	34,58	20,61 - 70,74
ADC	/	740,00	666,00	880,00	146,00 – 980,00

Tabelle 13: Signalintensität zum Zeitpunkt $t=6$ in verschiedenen Sequenzen
Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung

<u>Sequenzen</u>	<u>T2</u>	<u>T2 inkl. Übergangszone</u>	<u>T1 nativ</u>	<u>T1 KM portalvenös</u>	<u>T1 KM spätvenös</u>
Höhe					
Median	8,80	12,85	9,60	10,60	8,80
Q1	8,70	12,70	9,50	10,20	8,30
Q3	8,90	13,00	12,80	11,60	8,90
Range	8,50 – 9,00	10,40 – 13,70	8,80 – 16,50	9,50 – 17,50	7,50 – 11,60
Breite					
Median	21,55	24,95	23,90	23,00	23,30
Q1	21,10	24,40	21,60	22,60	21,80
Q3	22,00	25,50	29,40	32,80	23,40
Range	19,80 – 24,40	23,80 – 29,10	21,50 – 34,60	20,70 – 33,70	19,20 – 24,50
Mediane des Übergangsbereichs in der T2-Wichtung in mm				vertikal: 2,03	horizontal: 1,70

Tabelle 14: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt t=6 in mm. Zudem Maße der in der T2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet)

Die sechs Stunden alten Läsionen waren in Bezug auf die Ablationsflächen weitgehend konstant zum vorherigen Zeitpunkt, jedoch hatte sich innerhalb der T1-Wichtungen das Verhältnis verschoben. Während zum ersten Zeitpunkt die Läsionen in der spätvenösen Phase größer erschienen als in der nativen Phase, war es nun umgekehrt. Mit einer Höhe von 8,80 mm und einer Breite von 23,30 mm in der spätvenösen KM-Phase stellte sich die Ablationsfläche dort etwas kleiner dar als in den anderen T1-Sequenzen. Die Übergangszone stellte sich zu diesem Zeitpunkt leicht größer dar. Die Signalintensität zeigte einen schwankenden Verlauf. Während sie in der T2-Wichtung und in der DWI abfiel, stieg sie in der ADC und im Quotienten leicht an.

t=12

<u>Sequenzen</u>	<u>ROI Quotient</u>	<u>ROI Median</u>	<u>ROI Q1</u>	<u>ROI Q3</u>	<u>ROI Range</u>
T2	1,28	217,00	160,00	231,00	112 - 299
DWI	/	28,16	21,09	65,15	12,66 - 80,61
ADC	/	728,50	402	961	336 - 1355

Tabelle 15: Signalintensität zum Zeitpunkt t=12 in verschiedenen Sequenzen
Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung

<u>Sequenzen</u>	<u>T2</u>	<u>T2 inkl. Übergangszone</u>	<u>T1 nativ</u>	<u>T1 KM portalvenös</u>	<u>T1 KM spätvenös</u>
Höhe					
Median	7,85	10,45	11,70	11,60	9,00
Q1	7,80	10,00	11,20	10,30	8,10
Q3	7,90	10,90	12,20	14,60	11,20
Range	6,60 – 8,00	9,90 – 12,10	8,40 – 14,20	8,80 – 14,80	7,10 – 11,60
Breite					
Median	22,90	26,30	28,40	25,25	22,60
Q1	21,90	25,30	21,30	24,20	20,30
Q3	23,90	27,30	30,40	26,40	23,90
Range	21,80 – 25,00	25,00 – 29,20	20,50 – 33,90	24,00 – 26,60	18,30 – 25,60
Mediane des Übergangsbereichs in der T2-Wichtung in mm				vertikal: 1,30	horizontal: 1,70

Tabelle 16: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt t=12 in mm. Zudem Maße der in der T2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet)

Die Ablationsflächen veränderten sich wie bereits zuvor nur geringfügig im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt. Gerade in den T1-gewichteten Aufnahmen waren diese relativ konstant im zeitlichen Verlauf. Die Signalintensität zeigte einen ähnlichen Verlauf wie zuvor mit einem Abfall im ROI-Quotienten sowie im ADC und einen Anstieg in der T2- und DWI Wichtung. Die Ausmaße der Übergangszone waren etwas niedriger als zuvor.

t=18

<u>Sequenzen</u>	<u>ROI Quotient</u>	<u>ROI Median</u>	<u>ROI Q1</u>	<u>ROI Q3</u>	<u>ROI Range</u>
T2	1,22	148,00	119,00	196,00	114,00 – 310,00
DWI	/	22,96	21,46	45,28	21,09 - 74,43
ADC	/	777,00	520,00	937,00	463,00 – 1168,00

Tabelle 17: Signalintensität zum Zeitpunkt t=18 in verschiedenen Sequenzen
Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung

<u>Sequenzen</u>	<u>T2</u>	<u>T2 inkl. Übergangszone</u>	<u>T1 nativ</u>	<u>T1 KM portalvenös</u>	<u>T1 KM spätvenös</u>
Höhe					
Median	9,45	12,95	9,15	11,70	8,60
Q1	9,20	11,60	9,10	9,20	8,40
Q3	9,70	14,30	9,60	12,80	9,20
Range	9,00 – 9,90	10,40 – 15,10	8,70 – 12,50	8,50 – 16,00	6,70 – 13,20
Breite					
Median	22,00	24,70	23,15	24,85	20,45
Q1	21,80	24,10	20,70	20,80	18,20
Q3	22,20	25,30	23,80	27,70	21,90
Range	18,70 – 22,50	23,00 – 26,80	20,30 – 30,40	20,20 – 29,10	16,30 – 25,50
Mediane des Übergangsbereichs in der T2-Wichtung in mm				vertikal: 1,75	horizontal: 1,35

Tabelle 18: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt t=18 in mm. Zudem Maße der in der T2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet)

Die Ablationsfläche nahmen in allen Sequenzen leicht ab mit Ausnahme der Höhe der Läsionen in der T2-Wichtung und der KM-verstärkten T1-Wichtung in der portalvenösen Phase. In den verschiedenen T1-Wichtungen ließen sich die Läsionen gut vom umgebenden Gewebe abgrenzen.

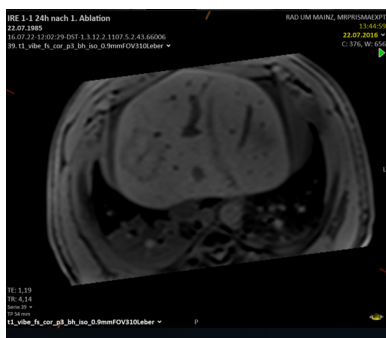


Abbildung 24 T1 Nativbild, 18h nach IRE



Abbildung 25 T1 Frühvenöse Phase, 18h nach IRE

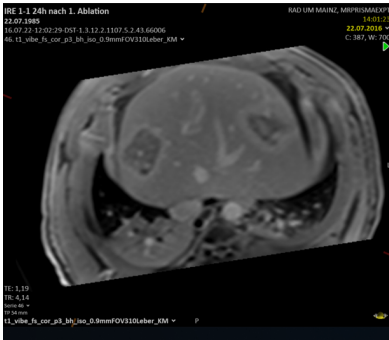


Abbildung 26 T1 Spätvenöse Phase, 18h nach IRE

t=24

Sequenzen	ROI Quotient	ROI Median	ROI Q1	ROI Q3	ROI Range
T2	1,31	151,00	146,00	164,00	115,00 – 169,00
DWI	/	22,20	13,56	27,38	12,93 - 33,36
ADC	/	1013,00	779,00	1107,00	342,00 – 1247,00

Tabelle 19: Signalintensität zum Zeitpunkt t=24 in verschiedenen Sequenzen
Signalintensität über ROI gemessen, Angabe als Median, Q1, Q3 und Range. Zudem ROI Quotient, Verhältnis aus ROI im Bereich der Läsion zu gesundem Gewebe Zudem Grenzen der Messwerte und mittlere Abweichung

Sequenzen	T2	T2 inkl. Übergangszone	T1 nativ	T1 KM portalvenös	T1 KM spätvenös
Höhe					
Median	7,60	10,35	9,95	9,75	7,90
Q1	7,50	10,1	8,30	7,70	7,20

Q3	7,70	10,6	12,10	11,40	9,50
Range	7,40 – 8,00	8,30 – 12,30	7,70 – 16,40	7,30 – 11,80	6,30 – 10,20
Breite					
Median	20,50	22,65	22,35	23,15	20,85
Q1	20,40	22,20	21,30	21,40	17,60
Q3	20,60	23,10	25,60	24,40	22,20
Range	20,30 – 20,90	20,90 – 24,20	17,10 – 34,40	21,30 – 27,00	14,50 – 24,10
Mediane des Übergangsbereichs in der T2-Wichtung in mm				vertikal: 1,38	horizontal: 1,08

Tabelle 20: Maße der Ablationsflächen zum Zeitpunkt t=24 in mm. Zudem Maße der in der T2 Wichtung gemessenen Übergangszone (als Differenz berechnet)

Die 24 Stunden Läsionen ließen sich in den T2-Wichtungen nur sehr schlecht vom umgebenden vitalen Lebergewebe abgrenzen. Die Ablationsflächen waren im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt in der T2-Wichtung kleiner geworden und in den T1-Wichtungen relativ konstant geblieben. Auffällig war, dass die Übergangszone zu diesem Zeitpunkt die geringsten Ausmaße aufweist, allerdings bei ebenso verringerter Ablationsfläche. Bei der Entwicklung der Signalintensität zeigte sich ein deutlicher Anstieg in der ADC-Sequenz sowie ein leicht gestiegener ROI-Quotient, die anderen Werte zeigten sich nahezu konstant.

Zusammenfassung

Allgemein ließ sich bei der Auswertung der MRT-Bilder feststellen, dass die Läsionen in den verschiedenen Sequenzen zu den verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich gut zu identifizieren waren. Während in den T1-Wichtungen die 1h-Läsionen am schlechtesten zu differenzieren waren, verhielt es sich in den T2-Wichtungen genau umgekehrt, dort waren die 24h-Läsionen nur schwer abzugrenzen. Des Weiteren war die in der histopathologischen Auswertung deutlich erkennbare 3-Schichtung der Läsionen in den MRT-Bildern nicht in allen Sequenzen zu erkennen, diese waren am ehesten in den T2-Wichtungen abzugrenzen, in den T1-Wichtungen war eine klare Differenzierung nicht möglich.

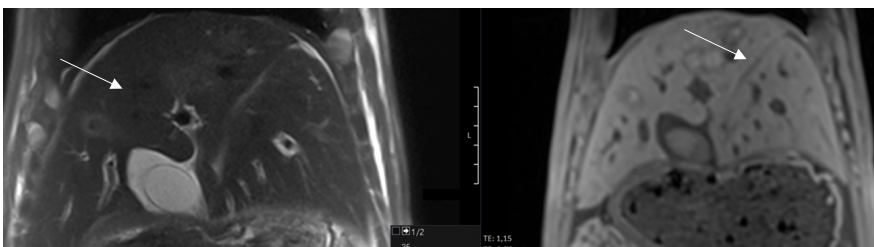


Abbildung 27: Vergleich T2- und T1 Wichtung 24 nach IRE

Veränderung der Signalintensität

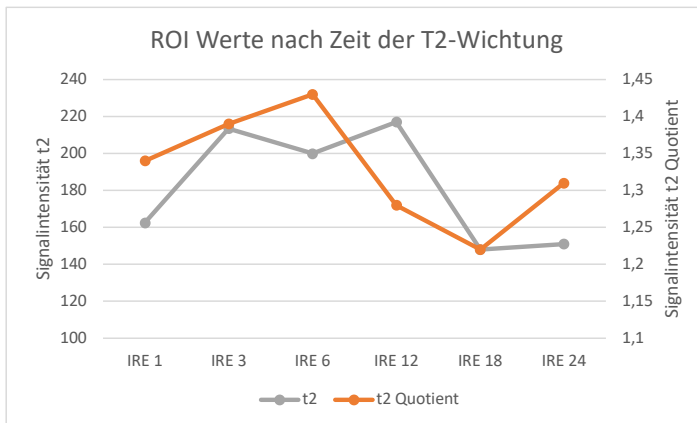


Abbildung 28: Zeitliche Entwicklung der Signalintensität in den verschiedenen MRT-Sequenzen

Die zeitliche Entwicklung der Signalintensität der Läsionen zeigte in den verschiedenen Wichtungen unterschiedliche Verläufe. In den T2-Wichtungen wurden sowohl die Quotienten als auch die absoluten Werte dargestellt, die Quotienten bildeten die Beziehung der absoluten Werte der Signalintensität zu dem die Läsionen umgebenden vitalen Lebergewebe ab. Bei beiden Messungen in den T2-Wichtungen war keine eindeutige Entwicklung der im zeitlichen Verlauf zu erkennen. Der 24h-Wert war bei beiden Kurven geringfügig niedriger als der 1h-Wert, in den dazwischenliegenden Zeitpunkten fluktuieren die Messungen mit einer relativ geringen Schwankungsbreite, sodass hier keine eindeutige Tendenz festzustellen war. Auffällig war jedoch, dass beide Kurven einen ähnlichen Verlauf zeigten.

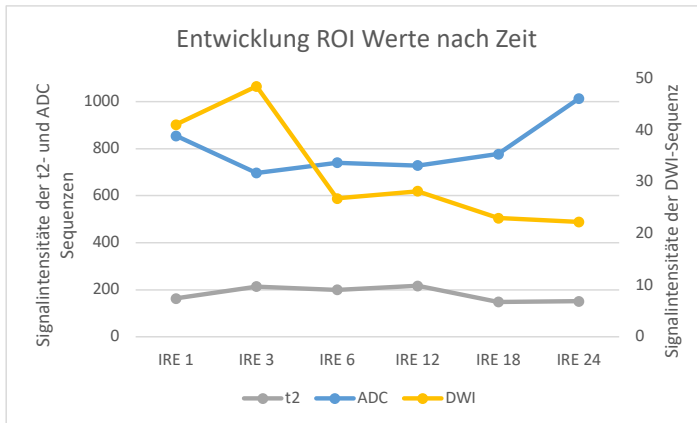


Abbildung 29: Zeitliche Entwicklung der Signalintensität in den verschiedenen MRT-Sequenzen

Die beiden Kurven der diffusionsgewichteten Aufnahmen zeigten in Bezug auf die Signalintensität einen gegensätzlichen Verlauf. Während die Werte der DWI-Aufnahmen nach einem primären Anstieg im zeitlichen Verlauf deutlich abfielen, zeigte sich in den ADC-Sequenzen ein initialer Abfall gefolgt von einem Anstieg der Signalintensität über die Zeit. Allerdings stellten diese Veränderungen keinen linearen Verlauf dar. In Abgrenzung zu den Werten der T2-Wichtung war jedoch eine klare Tendenz in der Entwicklung der Signalintensität zu erkennen.

Veränderung der Ablationsflächen

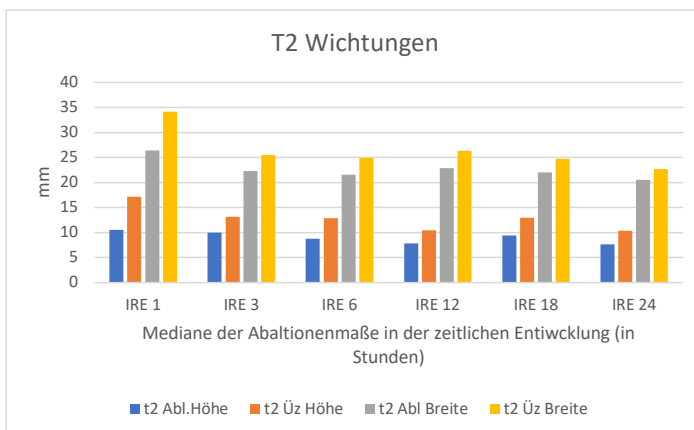


Abbildung 30: Zeitliche Entwicklung der Mediane der Ablationszone und der Ablationszone plus Übergangszone in der T2-Wichtung

Bei der Entwicklung der Flächen der Ablationszonen in den T2-Wichtungen ließen sich einige Tendenzen erkennen. So nahm sowohl die Höhe als auch die Breite der Ablationszone über die Zeit leicht ab. Die größte Differenz war dabei vom ersten Zeitpunkt $t=1$ zum zweiten Zeitpunkt $t=3$ festzustellen. Danach ließ sich ein schwankender Verlauf beobachten, der sich jedoch insgesamt als fallend beschreiben lassen konnte. Zudem nähern sich die Werte der Ablationszone und der Fläche von Ablationszone plus Übergangszone im zeitlichen Verlauf immer weiter an. Dies spiegelt sich in den Maßen der Übergangszone wider, die zum Zeitpunkt $t=24$ deutlich kleiner war als zu Beginn.

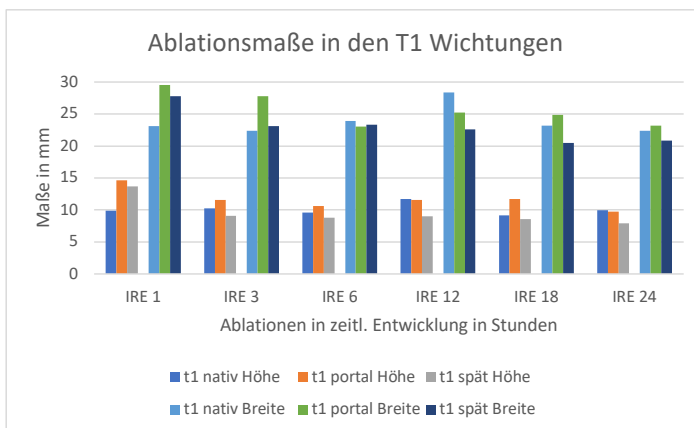


Abbildung 31: Entwicklung der Ablationsflächen über die Zeit in den T1-Wichtungen
T1 portal entspricht der portalvenösen KM Phase, T1 spät der spätvenösen KM Phase

In der chronologischen Entwicklung der Läsionsgrößen in den T1-Wichtungen ließ sich ein ähnlicher Verlauf wie in den T2-Wichtungen erkennen. Die Höhe und die Breite der Ablationsflächen nahmen in der zeitlichen Entwicklung leicht ab, dies zeigte sich abermals in keinem steten, sondern in einem uneinheitlichen Rückgang. Die Abnahme der Größe der Ablationsfläche ließ sich vor allem in den kontrastmittelverstärkten Sequenzen feststellen. In den nativen T1-Wichtungen zeigten die Werte zwar einen schwankenden zeitlichen Verlauf, insgesamt sind sie aber eher konstant. Im Vergleich der Ablationsflächen innerhalb der verschiedenen T1-Sequenzen ließ sich beobachten, dass die Ausmaße der Läsionen in den portalvenösen KM-Phasen im Durchschnitt leicht größer waren als in den anderen beiden Phasen. Des Weiteren änderte sich das Verhältnis von der nativen zur spätvenösen T1-Wichtung. Während zu Beginn die Ablationsflächen in der spätvenösen KM-Phase größer als

in der nativen Phase erschienen, kehrte sich das Verhältnis im zeitlichen Verlauf um, und die Größe der Läsionen stellte sich in der nativen Phase größer dar als in der spätvenösen KM-Phase.

4.3 Korrelation Pathologie und MRT

4.3.1 Korrelation Ausmaß der Zellzerstörung

Ein relevantes Forschungsziel dieser Studie war die Beantwortung der Frage, ob das Ausmaß der Zell- bzw. Gewebeschädigung innerhalb der Ablationszone mit einer entsprechenden Änderung in der MR-Bildgebung einhergeht, und somit die zeitliche Entwicklung der Schädigung potenziell durch die MR-Bildgebung abgeleitet werden kann. Zur Beantwortung dieser Frage wurde durch die Auswertung der histopathologischen Schnitte der prozentuale Anteil an zerstörten Zellen durch die irreversible Elektroporation zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Diese ließen sich nun mit den verschiedenen MRT-Sequenzen vergleichen.

	t=1	t=3	t=6	t=12	t=18	t=24	Differenz von t=24 zu t=1 in %
<u>Histopathologische Schnitte</u>							
Zerstörte Zellen [%]	0	0	53,75	95,00	98,75	100	100
<u>ROI Werte der MRT-Sequenzen</u>							
T2	162,50	213,50	200,00	217,00	148,00	151,00	7,01
T2 Quotient	1,34	1,39	1,43	1,28	1,22	1,31	2,24
DWI	41,01	48,42	26,72	28,16	22,96	22,20	45,89
ADC	854,50	696,50	740,00	728,50	777,00	1013,00	18,55

Tabelle 21: Vergleich des Zelluntergangs in den histopathologischen Schnitten in Prozent mit der Signalintensität (über ROI gemessen) der MRT-Sequenzen (jeweils als Median) sowie prozentuale Angabe der Veränderung von t=24 zu t=1

Anhand der Daten der histopathologischen Auswertung wurde festgestellt, dass es nach der Ablation von Lebergewebe mittels IRE zu einer fortschreitenden Zellschädigung innerhalb der Ablationszone kommt, die nach 24 Stunden zu einem nahezu vollständigen Zelluntergang führt. Während in den Präparaten eine Stunde nach Ablation die histologischen Marker der Zellschädigung noch relativ gering sind, sind diese nach 24 Stunden maximal ausgeprägt. Idealerweise würde sich in der Bildgebung eine gleichsinnig ausgeprägte Dynamik zeigen. Die

Auswertung der MRT-Bildgebung ergab jedoch, dass die Veränderungen der Signalintensität im Bereich der Ablationszone über die Zeit nicht so ausgeprägt ist. Neben dem berechneten Quotienten aus Signalintensität der Läsionen und des gesunden umgebenden Lebergewebes zeigten die Absolutwerte in den T2-Wichtungen die geringsten Veränderungen, so wich der 24-Stunden-Wert nur um 7,01 % vom Ausgangswert ab. Die größte Differenz ließ sich in den DWI-Aufnahmen finden, dort betrug die Abweichung vom ersten zum letzten gemessenen Wert 45,89 %. Ferner ließ sich feststellen, dass in der DWI-Sequenz die eindeutig höchste Diskrepanz der Signalintensitäten zwischen t=1 und t=24 vorlag, in den anderen Aufnahmen war das Delta zu t=1 bereits zu früheren Zeitpunkten gleich, bzw. höher als zu t=24.

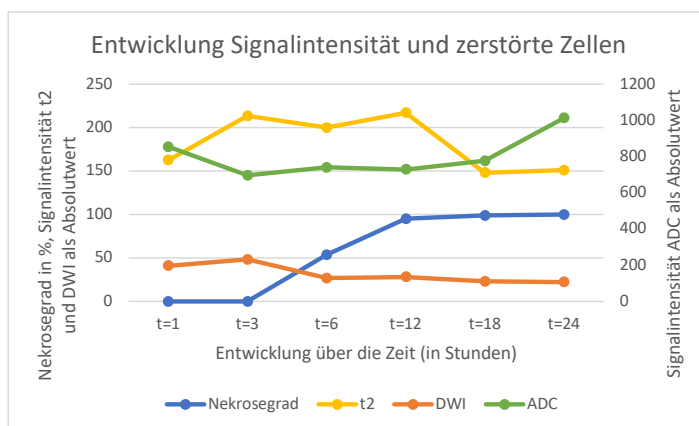


Abbildung 32: Vergleich der Mediane der Nekrosethese der histopathologischen Auswertung in % und der Veränderungen der Signalintensität der MRT-Bilder in Absolutwerten über die Zeit

Bei der Analyse der zeitlichen Entwicklung der zerstörten Zellen fiel auf, dass sich die Werte der histopathologischen Schnitte im gesamten Ablauf in die gleiche Richtung bewegten, mit zunächst stärkerer und dann immer weiter abnehmender Dynamik. Im Vergleich wurde bei der Analyse der MRT-Bildgebung kein hierzu entsprechender Verlauf in der Signalintensität der Läsionen festgestellt. Hier zeigte sich schwankende Messergebnisse, ohne klaren Trend. Zudem zeigte keine der Kurven eine starke initiale Dynamik zwischen t=3 und t=12 gefolgt von einem Abflachen der Kurve, entsprechend der Werte der histopathologischen Schnitte. Des Weiteren verlief keine der Kurven kontinuierlich in dieselbe Richtung, sie stiegen und fielen im zeitlichen Verlauf, was ebenso wenig in einer Übereinstimmung zu den Daten der histopathologischen Auswertung stand.

Insgesamt ließ sich folglich feststellen, dass keine der untersuchten MRT-Sequenzen eine den histologischen Veränderungen entsprechende Dynamik aufweist.

4.3.2 Korrelation Ablationszonen

Für die Korrelation der Ablationsflächen wurden die Ergebnisse der verschiedenen Messungen der histopathologischen Schnitte und der MRT-Sequenzen in chronologischer Reihenfolge für jeden Zeitpunkt verglichen.

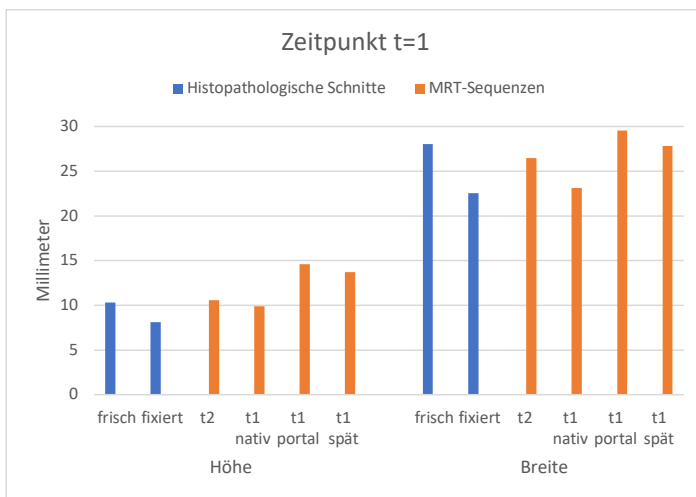


Abbildung 33: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=1
frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase

Zum Zeitpunkt t=1, entsprechend eine Stunde nach erfolgter Ablation, war die makroskopisch gemessene Ausdehnung der Ablationszone im Median in den Frischpräparaten (10,30 x 28,03 mm) am größten, in der MRT-Bildgebung kam die gemessene Ausdehnung in der T2-Wichtung (10,55 x 26,45 mm) diesen am nächsten. Die größte Ausdehnung der Läsion in der Bildgebung ergab sich in der KM-verstärkten T1-Wichtung während der portalvenösen Phase, diese lagen hier mit (14,60 x 29,55 mm) über den makroskopisch bestimmten Werten.

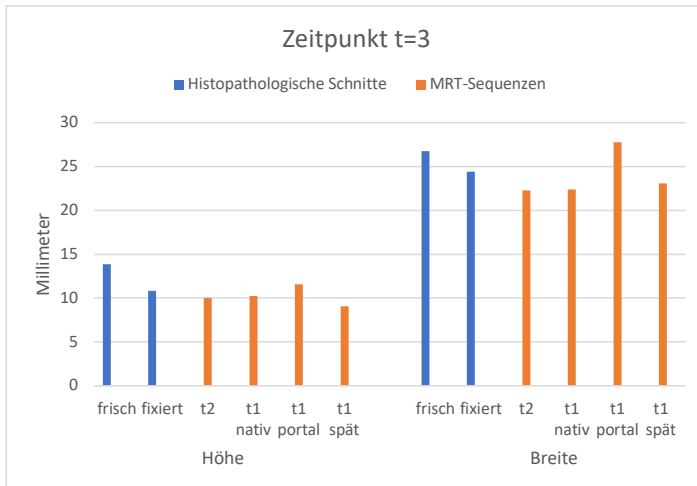


Abbildung 34: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=3
frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase

Zum Zeitpunkt t=3 waren die Maße der Ablationsflächen insgesamt homogener. Die Werte der Messung der histologischen Präparate waren im Median abermals beim Frischpräparat höher (im Schnitt 3,00 mm in der Höhe und 2,32 mm in der Breite). Die größten Übereinstimmungen waren zu dem Zeitpunkt zwischen dem fixierten Präparat (10,85 x 24,42 mm) und der nativen T1-Wichtung (10,25 x 22,40 mm) sowie der spätvenösen KM-Phase in der T1-Wichtung (9,05 x 23,10 mm) zu finden. Wiederum wurde in der Bildgebung die größte Läsionsausdehnung in der portalvenösen KM-Phase bestimmt.

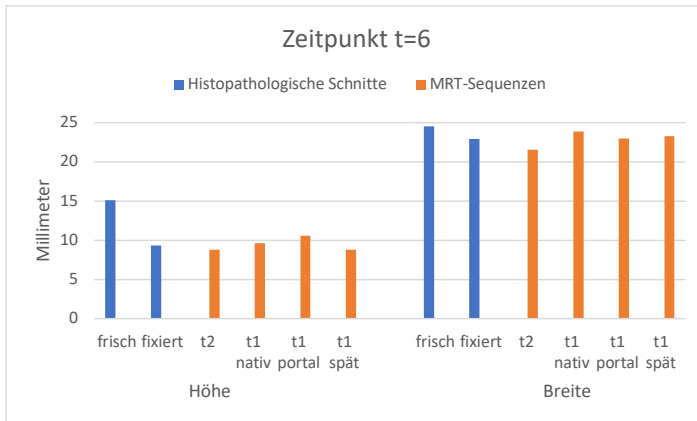


Abbildung 35: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=6
frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase

Zum Zeitpunkt t=6 glichen sich die Maße der Läsionen weiter an. Es war auffällig, dass die Läsionsgröße im Durchschnitt etwas niedriger war, als zu den vorherigen Zeitpunkten. Unverändert waren die Läsionen in den Frischpräparaten größer als in den fixierten Präparaten. In der Bildgebung ergaben sich nur geringe Abweichungen zwischen den verschiedenen Sequenzen bzw. KM-Phasen. Auffällig ist, dass die gemessene Läsionsgröße eher den fixierten Präparaten entspricht.

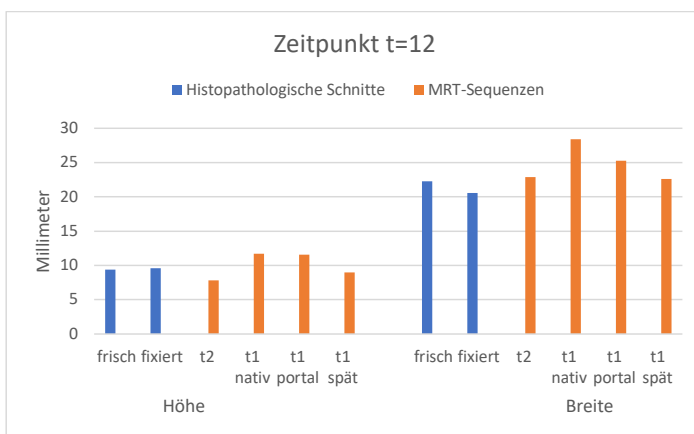


Abbildung 36: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=12
frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase

Zum Zeitpunkt t=12 war auffällig, dass sich die mediane Werte der Ablationsflächen in den histologischen Präparaten stark annäherten. Die höchste Übereinstimmung in den Ausmaßen der Zonen ließ sich zwischen dem Frischpräparat (9,37 x 22,27 mm) und der spätvenösen KM-Phase (9,00 x 22,60 mm) finden (jeweils Mediane).

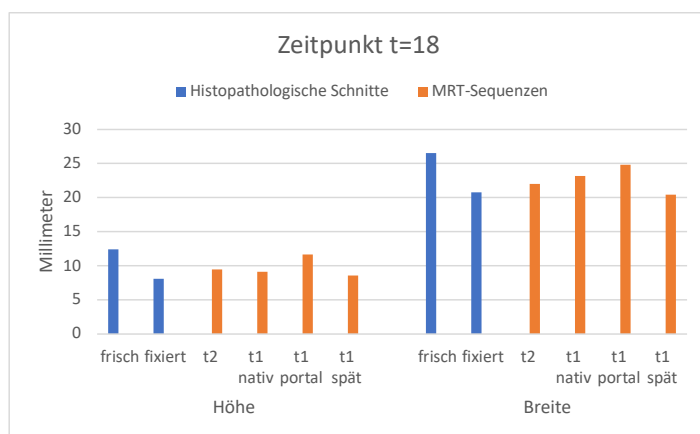


Abbildung 37: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=18
frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase

Zum Zeitpunkt t=18 waren die Ergebnisse zwischen den fixierten und Frischpräparaten in der histologischen Auswertung wieder etwas größer. Innerhalb der verschiedenen MRT-Sequenzen zeigte sich keine klare Tendenz. Die größte Übereinstimmung der Mediane in den Ausmaßen der Ablationsflächen fand sich zwischen den fixierten Präparaten (8,13 x 20,77 mm) und der spätvenösen KM-Phase (8,60 x 20,45 mm).

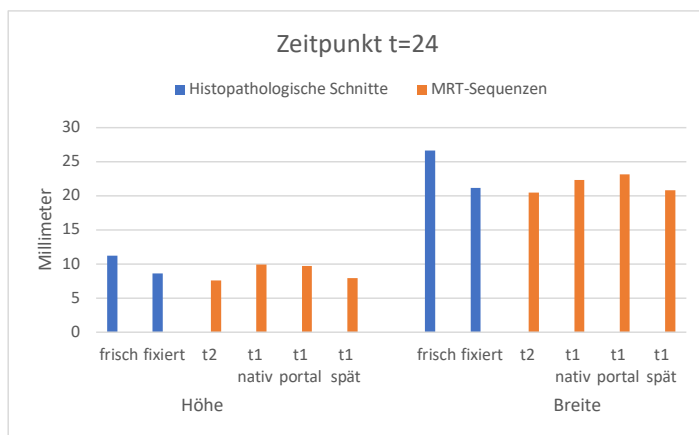


Abbildung 38: Vergleich der Maße (Mediane) der Ablationsflächen der histologischen Auswertung und der verschiedenen MRT Sequenzen zum Zeitpunkt t=24
frisch= Frischpräparat Histologie, fixiert= fixiertes Präparat Histologie, nativ = native T1-Wichtung MRT, portal entspricht portalvenöser Kontrastmittelfase in T1-Wichtung, spät entsprechend spätvenöser KM-Phase

Zum letzten Zeitpunkt in der chronologischen Entwicklung der Ablationszonen, entsprechend 24 Stunden nach erfolgter Ablation, waren die Läsionsgrößen zum überwiegenden Anteil geringer als zum Zeitpunkt t=1. Eine Ausnahme hiervon stellte die Höhe der Ablationsfläche in den histologischen Präparaten dar. Genau wie zu dem vorherigen Zeitpunkt, war die höchste Übereinstimmung zwischen der medianen Werte der fixierten Präparate (8,60 x 21,13 mm) und der Werten aus den Messungen der spätvenösen KM-Phase (7,90 x 20,85 mm) zu finden.

4.3.3 Korrelation Übergangszone

Für den Vergleich der Übergangszonen standen die Daten aus den T2-Wichtungen und aus den Messungen sowohl der frischen als auch der fixierten Läsionen zur Verfügung.

<u>Zeitpunkt der Ablation</u>	<u>Frischpräparat</u> (vertikal und horizontal in mm)	<u>fixiertes Präparat</u> (vertikal und horizontal in mm)	<u>T2-Wichtung</u> (vertikal und horizontal in mm)
t=1	2,24 x 3,81	3,11 x 0,24	3,33 x 3,88
t=3	0,72 x 1,43	2,69 x 2,95	1,58 x 1,60
t=6	0,55 x 1,17	1,88 x 2,32	2,03 x 1,70
t=12	1,17 x 1,87	2,69 x 2,45	1,30 x 1,70
t=18	1,44 x 1,55	2,97 x 2,84	1,75 x 1,35

t=24	0,81 x 0,6	2,44 x 2,24	1,38 x 1,08
------	------------	-------------	-------------

Tabelle 22: Mediane der Ausmaße der Übergangszonen , aufgeteilt nach Ablationszeitpunkt

Bei der Analyse der Zonen fiel auf, es durchweg keine klare Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Maßen gab. Die Werte aus den Messungen der fixierten Läsionen waren zu den meisten Zeitpunkten höher als die der Frischpräparate. Eine Gemeinsamkeit aller drei Messungen war, dass die Zonen insgesamt im zeitlichen Verlauf kleiner werden.

4.3.4 Zusammenfassung

Bei der Auswertung der Ergebnisse fiel auf, dass in den histopathologischen Schnitten die Grenzen zwischen den verschiedenen Ablationszonen schärfer dargestellt waren als in den MRT-Bildern. In einigen Sequenzen, zum Beispiel zu dem Zeitpunkt t=24 in der T2-Wichtung,



Abbildung 39: Läsion 24h nach IRE, T2-Wichtung

ließen sich die Läsionen nur noch sehr bedingt von dem umgebenden vitalen Lebergewebe abgrenzen. Des Weiteren war zu beobachten, dass die für die IRE-Ablationszone typische 3-Schichtung, die sich in den histopathologischen Schnitten wiederfinden ließ, jedoch nur in wenigen MRT-Sequenzen klar dargestellt wurde, vor allem in der T2-Wichtung. Bei dem Vergleich des Anteils an zerstörten Zellen in der mikroskopischen Auswertung mit der Signalintensität der MRT-Bilder ließ sich keine klare Übereinstimmung finden. Keine der Kurven, die die Entwicklung der

Signalintensität der verschiedenen Sequenzen abbildet, glich im zeitlichen Ablauf oder in der Veränderungsdynamik den Daten aus der histopathologischen Auswertung.

Bei der Auswertung der Ablationsflächen in Hinblick auf eine mögliche Korrelation wurden die Maße der reinen IRE-Flächen - ohne Übergangszone - herangezogen, da dies der Bereich ist, in dem eine definitive Gewebedestruktion stattfindet, die per definitionem das Ziel der Ablation ist. Zudem wurden die Daten der MRT-Bilder einmal mit den histopathologischen Ergebnissen der Frischpräparate und einmal mit den fixierten Läsionen verglichen.

Hierbei zeigte sich, dass sowohl die nativen T2-gewichteten Aufnahmen, als auch die nativen T1-gewichteten Aufnahmen, ebenso wie die KM-verstärkten T1-gewichteten Aufnahmen eine vergleichsweise gute Übereinstimmung mit den makroskopischen Präparaten aufwiesen. Keine der Wichtungen bzw. KM-Phasen zeigte hierbei hinsichtlich aller Zeitpunkte eine eindeutige Überlegenheit.

Die Analyse der Übergangszonen ergab keine klare Übereinstimmung zwischen den histopathologischen Schnitten und den unterschiedlichen MRT-Sequenzen. Es ließ sich zwar feststellen, die Daten der T2-Wichtungen zwischen denen der Frisch- und fixierten Präparate lag, jedoch gab es keine klare Tendenz zu einer der Datenreihen.

Zusammenfassend war zu konstatieren, dass die Läsionsgröße in der MRT-Bildgebung in allen untersuchten Wichtungen bzw. KM-Phasen eine vergleichsweise gute Übereinstimmung mit den makroskopischen bzw. histologischen Ergebnissen aufweist und daher eine Abschätzung der Läsionsgröße in der MRT-Bildgebung möglich ist. Da der Gewebekontrast zwischen vitalem und abladiertem Lebergewebe in den KM-verstärkten Aufnahmen zu allen Zeitpunkten am besten ist, sind diese am verlässlichsten. Bei dem Vergleich der Signalintensität in den MRT-Sequenzen und dem Anteil der zerstörten Zellen in den histopathologischen Schnitten ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine gleichsinnige Entwicklung.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen Betrag zu der Therapieoption von Tumoren mittels irreversibler Elektroporation zu leisten. Dabei stand die Charakterisierung des zeitlichen Ablaufs der Gewebeveränderung in der Akutphase nach irreversibler Elektroporation am Großtiermodell im Fokus. Durchgeführt wurden die Interventionen an der Leber von Schweinen. Ein Augenmerk lag auf der Frage, ob es einen Zeitpunkt gibt, ab dem das abladierte Gewebe als sicher zerstört definiert werden kann. Ein weiterer Fokus lag auf dem Vergleich von MRT-Bildgebung und histopathologischen Präparaten. Hierbei sollte untersucht werden, inwieweit die Größe des makroskopisch bzw. histologisch bestimmten Ablationsareals mit der in der MRT-Bildgebung gemessenen Größe übereinstimmt, und welche Wichtung bzw. KM-Phase an den ehesten Rückschlüssen auf die definitive Läsionsgröße erlaubt. Zudem wurde untersucht, ob sich die Dynamik der histologisch nachzuweisenden Zellschädigung ein entsprechendes Korrelat in der MRT-Bildgebung findet.

5.1 Beurteilung im wissenschaftlichen Kontext

Im Vergleich zu den bereits länger etablierten thermischen Ablationsverfahren, wie der Radiofrequenzablation, der Mikrowellenablation, oder der Kryoablation, ist die irreversible Elektroporation eine relativ neue Methode, der zudem einen grundsätzlich unterschiedlicher Wirkmechanismus zu Grunde liegt. Die Datenlage hierzu ist noch deutlich weniger umfangreich, als bei den thermoablativen Verfahren.

5.1.1 Histopathologische Ergebnisse

Erfolg der Ablationen

Die Ergebnisse der Versuche zeigen eine Wirksamkeit der irreversiblen Elektroporation an gesundem Lebergewebe. So haben alle 41 durchgeführten Ablationen sichtbare Veränderungen am Lebergewebe hervorgerufen und in der später durchgeführten histopathologischen Auswertung wurde bei allen 24 Stunden alten Läsionen der Anteil der untergegangenen Zellen mit 100 % bewertet. Dabei zeigte sich, dass innerhalb der ovalären Läsionen die Zellzerstörung homogen war, es also nicht zu residuellen vitalen Anteilen innerhalb der Ablationszone kam (130). Andere durchgeführte Studien (unter anderem von Pompili et al. (92) oder Lee et al. (84)) beschreiben ebenfalls eine hohe Effektivität der IRE, die zwischen 67 % – 100 % liegt (102). Die Prozentzahl an zerstörten Zellen liegt in dieser Arbeit geringfügig höher als in anderen Studien, jedoch gilt zu beachten, dass, ebenso wie bei Lee et al., die Ablationen an gesundem Lebergewebe an Schweinen durchgeführt wurden, während die Studien von Pompili

et al. und Scheffer et al. bereits die Wirksamkeit an hepatischen Tumoren an Menschen untersucht haben. Scheffer et al. haben in ihrer Arbeit bislang veröffentlichte Studien ausgewertet und differenzieren bei der Erfolgsquote nach Tumorgöße. Solange die Tumore kleiner als drei Zentimeter sind, wird bei 93% – 100 % eine vollständige histologische Zerstörung erreicht, sind sie größer, liegt der Erfolg nur bei circa 63 %. Somit stimmen die in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Effektivität der IRE an gesundem Lebergewebe an Schweinen mit den bereits publizierten Arbeiten überein

Zonaufbau der Ablationsflächen

In der vorliegenden Arbeit zeigten die Ablationsflächen verschiedene Zonen, die sowohl makroskopisch als mikroskopisch an den histopathologischen Präparaten differenzierbar waren. Dazu zählen eine schmale Zone direkt um die Einstichstellen der Sonden herum, eine weitere ovalförmige Zone, die die erste Zone einschließt und letztendlich angrenzend das vitale Lebergewebe. Des Weiteren ist zwischen der ovalförmigen Zone und den vitalen Zellen oftmals eine schmale Übergangs- oder Transitionszone zu beobachten. Ein ähnlicher Aufbau der Ablationszonen wurde bereits unter anderem von Vogel et al. (89) beschrieben, die in ihrer Studie ebenfalls Ablationen an nicht tumorösen Lebergewebe durchgeführt haben.

Da die Ergebnisse dieser Arbeit denen vorheriger Studien entsprechen, untermauern diese den prinzipiellen Aufbau der Ablationsflächen, der nach einer Intervention mittels IRE auftritt. Die Kenntnis dieser Reliabilität ist eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz im klinischen Alltag, da eine möglichst exakte Planung vor der Ablation von hoher Bedeutung ist.

Thermoablative Nekrose

Direkt um die Einstichstellen der Sonden herum ließ sich eine Nekrosezone nachweisen, die vermutlich durch die Erhitzung der Sonden bei der Abgabe der Stromimpulse entstanden ist und deren makroskopische und mikroskopische Eigenschaften denen der thermoablativen Verfahren ähneln.

Diese Ergebnisse deckten sich mit vorherigen Arbeiten (89)(116), in denen ebenfalls ein Bereich der Koagulationsnekrose beschrieben wurde.

Die Erkenntnis, dass es bei der IRE eine thermische Nekrosezone gibt, widerlegt die ursprüngliche Annahme, dass bei der IRE eine komplett nicht-thermische Zellschädigung stattfindet. Zumindest in dem unmittelbar der Sonde angrenzenden Gewebe werden mit den üblichen Ablationsparametern mutmaßlich Temperaturen erzielt, die zu einer thermischen

Gewebeschädigung führen. Dies ist für die Eingriffsplanung relevant, da eine unmittelbare Nähe der Sonden zu sensiblen Strukturen vermieden werden sollte.

Dynamik der histopathologische Veränderungen im zeitlichen Verlauf

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass in Folge der irreversiblen Elektroporation dynamische Prozesse im Gewebe ablaufen. Die Ablationen fanden zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten statt, sodass die histologischen Veränderungen innerhalb der ersten 24 Stunden präzise beschrieben werden können. Die vorliegende Studie zeigt damit auch quantitativ die Dynamik der IRE auf.

Zwar ist zu einem frühen Zeitpunkt (eine Stunde nach erfolgter Ablation) die Beurteilung der einzelnen Zellen aufgrund einer starken sinusoidalen Kongestion sehr erschwert, dennoch lassen sich bereits erste Veränderungen feststellen, wobei eine definitive Zerstörung der Zellen zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht nachzuweisen ist.

Die meisten publizierten Studien konzentrieren sich auf die Entwicklung der Ablationsfläche, jedoch nicht auf den Grad der Zellschädigung. Lediglich Long et al. (131) geben in ihrer Studie, die ebenfalls in vivo an Schweineleber durchgeführt wurde, den Anteil an untergegangenen Gewebe nach sechs Stunden mit 85 % -90 % und nach 24 Stunden mit 93 % - 98 % an. Bei Betrachtung des Anteils der zerstörten Zellen unserer Studie im zeitlichen Verlauf fällt auf, dass die höchste Diskrepanz zwischen den einzelnen Versuchstieren drei Stunden nach der Ablation auftritt. Während in einigen Präparaten noch keine Zelle als sicher avital charakterisiert werden konnte, waren es bei anderen Tieren bereits bis zu $\frac{3}{4}$ der Zellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Veränderungen zu diesem Zeitpunkt sehr variabel sind. Während bei manchen Präparaten bereits ein Großteil des Gewebes zerstört ist, zeigen andere Schnitte lediglich eine starke Degeneration der Zellen. Diese Erkenntnis ist sehr relevant, da ein endgültiger Vergleich des Ablationserfolges in Studien oder eine abschließende Bewertung des Erfolgs der Ablation nach drei Stunden noch nicht sinnvoll erscheint. Aus welchem Grund der Verlauf so variabel ist, obwohl die Parameter des IRE-Generators und der Abstand der Elektroden identisch waren, bleibt unklar. Eine Möglichkeit ist die vorliegende Gewebestruktur, die je nach Versuchstier und Positionierung innerhalb der Leber unterschiedlich sein kann. Eine weitere mögliche Erklärung ist die Zeit, die benötigt wurde, um nach der Tötung der Tiere die Ablationszonen aus der Leber zu präparieren und zu fixieren. Diese Zeiten wurden nicht dokumentiert, es ist aber davon auszugehen, dass diese nicht bei jedem Tier exakt gleich waren. Da das Fortschreiten der Veränderungen auf Zellebene erst mit

der Fixierung der Präparate zum Stillstand kommen, wären abweichende Zeiten bis zur Fixierung eine gute Erklärung für die diskrepanten Befunde zu diesem Zeitpunkt.

Nach sechs Stunden betrug der Median an zerstörten Zellen 53,75 % (Range 42,50 – 95 %), nach zwölf Stunden 95% (Range 75-100%) und nach 24 Stunden 100%.

Anhand der Daten lässt sich feststellen, dass die interindividuelle Bandbreite im Ausmaß der Zellzerstörung im zeitlichen Verlauf abnimmt, bis nach 24 Stunden in allen Präparaten ein vollständiger Zelluntergang stattgefunden hat.

Long et al. gaben in ihrer Studie den Anteil an untergegangenen Gewebe nach sechs Stunden mit 85 % -90 % und nach 24 Stunden mit 93 % - 98 % an. Damit zeigen die Autoren ebenfalls eine Dynamik des Zelluntergangs nach IRE auf, wobei bei ihnen die Range deutlich geringer ist als in der vorliegenden Studie. Dazu muss man anmerken, dass Long et al. die Ablationen lediglich an einem Schwein durchgeführt haben. Daher ist eine Hypothese, dass der unterschiedliche Anteil an zerstörten Zellen von der Beschaffenheit des Leberparenchyms der verschiedenen Versuchstiere abhängig ist.

Art der Gewebeerstörung

Zusätzlich zur quantitativen Entwicklung der Zellzerstörung wurde in der vorliegenden Studie der qualitative Prozess des Gewebeuntergangs analysiert.

Bereits eine Stunde nach erfolgter Ablation lassen sich mikroskopische Veränderungen feststellen. Die Zellkerne beginnen bereits zu kondensieren, was auf einen bevorstehenden Zelluntergang hindeuten könnte. Damit unterscheidet sich die Gewebeerstörung eindeutig von der thermischen Ablationszone, in der die Nekrose bereits direkt nach der Intervention zu detektieren ist. Im zeitlichen Verlauf lässt sich eine steigende sinusoidale Kongestion beobachten, die Eosinophilie nimmt zu und die Zellgrenzen verschwimmen immer stärker. Die Struktur der Leberläppchen mit den bindegewebigen Septen und den Periportalfeldern bleibt dabei lange erhalten. 18 Stunden nach erfolgter Ablation lassen sich jedoch auch in diesem Bereich Veränderungen feststellen. Die Eosinophilie in den Bindegewebssepten nimmt zu und nach 24 Stunden ist die Läppchenstruktur aufgehoben.

Der genaue Mechanismus der Gewebeerstörung nach Ablation mittels IRE wird kontrovers diskutiert. Konsens herrscht in der Forschung bei der Annahme, dass die eigentliche IRE-Ablationszone gesondert von der Nekrosezone direkt um die Einstichstellen der Sonden herum betrachtet werden muss (107)(116).

Vogel et al. (89), die ebenfalls die histologischen Veränderungen an einer Schweineleber untersucht haben, beschreiben in ihrer Studie ebenfalls erste unspezifische Veränderungen kurz nach erfolgter Intervention. Dabei werden in der histopathologischen Auswertung Einblutungen und geschwollene Sinusoide beschrieben sowie eine Kondensation des Zellkerns und eine allgemeine Entzündungsreaktion genannt (108).

Die Auswertung der Präparate der vorliegenden Studie deckt sich größtenteils mit den Ergebnissen der vorherigen Studien. Auffällig in der Analyse ist jedoch die Tatsache, dass ab circa 18 Stunden nach der Ablation auch die bindegewebigen Septen degenerative Veränderungen aufzeigten. In vorherigen Studien, wie die von Kosiek et al. (7) oder Lee et al. (84), wurde hingegen beobachtet, dass es einen kompletten Zelluntergang gibt, ohne, dass die Struktur innerhalb der Leber zerstört wird. Dies führt zu der Frage, wie die Gewebedestruktion generell stattfindet. Lange Zeit wurde propagiert, dass der Zelluntergang durch Apoptose der entscheidende Vorteil der irreversiblen Elektroporation sei. Studien aus den letzten Jahren bringen diese Hypothese ins Wanken. So gab es Versuche, zum Beispiel von Jose et al. (113), bei denen keine typischen Apoptose-Marker in der Immunhistologie nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren beschreiben Vogel et al. in ihrem Paper aus dem Jahr 2019, dass histopathologisch sowohl Zeichen der Apoptose als auch der Nekrose beobachtet werden können. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie untermauern die Beobachtungen von Vogel et al. Eine relativ neue interessante Hypothese stellt Hanson (111) in einem Paper aus dem Jahr 2016 vor. Sie bezeichnet die Nekroptose als eine Art Hybrid der Nekrose und Apoptose, die zwar programmiert abläuft, allerdings Zeichen der Nekrose aufweist, wie zum Beispiel Entzündungszeichen. Die bei der Analyse festgestellte Dynamik der Gewebeerstörung und die für lange Zeit erhaltene Struktur der Leberläppchen deuten auf eine programmierte Zeldestruktion hin, allerdings sprechen die letztendlichen degenerativen Veränderungen der bindegewebigen Septen und die Entzündungszeichen dagegen. In ihrer Gesamtheit sprechen die gewonnenen Ergebnisse aus unserer Studie gegen die Theorie der Destruktion alleinig durch Apoptose.

Ablationsflächen-Größe + Übergangszone

Bei der Analyse der Entwicklung der Ablationsflächen lässt sich feststellen, dass keine wesentliche Größenveränderung im zeitlichen Verlauf stattfindet. Auffällig ist jedoch, dass die Ablationsflächen der fixierten Läsionen im Vergleich zu den Frischpräparaten im Schnitt um etwa zwei Millimeter kleiner waren.

In einem systematischen Review von Vogel et al. (108) wurde ebenfalls die Beobachtung gemacht, dass es keine wesentlichen Veränderungen in der Größe der Ablationsfläche gibt. Eine spätere Studie von Vogel et al. (89) hingegen kommt zu dem Ergebnis, dass sich die Fläche über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden vergrößert. Allerdings stellen die Autoren die Vermutung auf, dass es sich dabei lediglich um eine Übergangszone handelt und nicht um die eigentliche homogene IRE-Ablationszone, die aber notwendig ist, um das Gewebe sicher vollständig zu zerstören. Eine mögliche Erklärung für die Vergrößerung liefern Scheffer et al. (109), die vermuten, dass es in diesem Bereich sekundär zu einem Zelluntergang kommt durch die Hypoxie und konsekutiver Ischämie des umgebenden zerstörten Gewebes.

Die Feststellung, dass die Ausmaße in den fixierten Läsionen kleiner sind, lässt sich durch den Wasserentzug des Präparates im Rahmen der Fixierung erklären. Die Auswertung der vorliegenden Studie deckt sich mit den Ergebnissen der meisten anderen Studien, da es keinen wesentlichen Progress in der Größe der Ablationszone gibt. Daraus kann man schließen, dass die Veränderungen an den Zellen vermutlich direkt durch die Intervention verursacht werden. Bei der Auswertung der Ablationsflächen lässt sich zudem beobachten, dass die Trennschärfe zwischen den einzelnen Ablationszonen im zeitlichen Verlauf immer stärker wird und sich die einzelnen Bereiche somit besser voneinander abgrenzen und messen lassen. Dies ist vermutlich auf den zunehmenden Zelluntergang zurückzuführen.

Eine weitere interessante Erkenntnis ist das Vorliegen einer sogenannten Übergangs- oder Transitionszone. Außen um die eigentliche Ablationsfläche herum befindet sich ein weiterer Saum, der sowohl makroskopisch, als auch mikroskopisch abgegrenzt werden kann (89) (109)(110). In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls in den meisten Präparaten eine Übergangszone abgegrenzt werden. Wir haben die Größe der Übergangszone sowohl an den Frischpräparaten als auch an den fixierten Läsionen ausgemessen. Bei der Analyse ließ sich keine klare Dynamik feststellen. Bei den frischen Läsionen ist der Übergangsbereich eine Stunde nach Ablation deutlich größer, verändert sich danach allerdings nur unwesentlich. Die Breite der Transitionszone der fixierten Läsionen schwankt ebenfalls geringfügig, ohne allerdings eine klare Tendenz zu zeigen.

Aus der Tatsache, dass die Transitionszone vom ersten zum zweiten Zeitpunkt kleiner wird, die gesamte Ablationszone jedoch relativ unverändert in ihrem Ausmaß bleibt, scheint es eher unwahrscheinlich, dass dieser Gewebeanteil komplett in die reguläre IRE-Ablationszone übergegangen ist. Es bleibt unklar, ob sich die dort primär auffälligen Zellen im zeitlichen Verlauf regenerieren oder sekundär geschädigt werden, wie zum Beispiel von Scheffer et al.

vermutet. Ein Erklärungsansatz dafür, dass die Transitionsflächen in den fixierten Läsionen relativ betrachtet größer sind als in den Frischpräparaten, ergibt sich aus dem Fakt, dass der Bereich der IRE-Schädigung in den Frischpräparaten stärker ödematös verändert ist und somit größer erscheint.

5.1.2 MRT-Ergebnisse

MRT: Signalintensität

Es wurde die zeitliche Entwicklung der Signalintensität der Läsionen in verschiedenen Sequenzen analysiert und festgestellt, dass diese ebenfalls einer Dynamik unterliegt und sich in den verschiedenen Sequenzen unterschiedlich darstellt. Allgemein lässt sich beobachten, dass sich die Läsionen in den T2-Wichtungen eher hyperintens und in T1-Wichtung hypointens zum nicht abladierten Leberparenchym präsentieren.

Diese Erkenntnis deckt sich mit den Resultaten anderer Studien, unter anderen von Zhang et al. (132)(133) und Srimathveeravalli et. al (134). Bei der Auswertung der Ergebnisse ist aufgefallen, dass die Läsionen in der T1-Wichtung im zeitlichen Verlauf geringfügig an Signalintensität zunehmen. In den T2-gewichteten Aufnahmen ergibt sich ein konträres Bild. Dort ist es bei den Läsionen, die 24 Stunden alt sind, kaum noch möglich, diese vom umgebenden vitalen Lebergewebe sicher abzugrenzen. Diese Beobachtung machten auch Barabasch et al. (135) in ihrer Studie an menschlichen Lebermetastasen bei MRT-Bildern, die einen Tag nach erfolgter Intervention angefertigt wurden. Bei dem Vergleich der nativen T1-Bilder mit den kontrastmittelverstärkten Aufnahmen fällt in der Auswertung auf, dass die Signalintensität vom nativen Bild zur portalvenösen Phase zunimmt und dann in der spätvenösen Phase wieder abfällt.

Es wurde für jede Ablation die Signalintensität in den DWI-Aufnahmen (diffusion weighted imaging), den resultierenden ADC-Karten (apparent diffusion coefficient) und den T2-Wichtungen gemessen, bei Letzteren sowohl als Absolutwert als auch im Verhältnis zum vitalen, die Läsion umgebenden Lebergewebe. Zunächst muss angemerkt werden, dass sich der visuelle Eindruck, der sich bei der Analyse zeigte, nicht exakt mit den gemessenen Werten deckt. Die Veränderung der Signalintensität imponierte visuell stärker als die tatsächlichen Ergebnisse der durchgeführten Messungen. Die Umrandungen der einzelnen Läsionen wurden markiert und die Signalintensität wurde über die ROI (*Region of interest*) gemessen. Diese Werte sind allerdings Absolutwerte. Da die Signalintensität in verschiedenen MRT-Aufnahmen variieren kann, sind die Werte nur bedingt vergleichbar. Um die Entwicklung im zeitlichen Verlauf zu charakterisieren, können diese Ergebnisse dennoch herangezogen werden. Um eine gute Vergleichbarkeit der Absolutwerte zwischen den Versuchstieren zu erzielen, wurde für die

T2-Wichtung neben jeder Läsion in vier repräsentativen Abschnitten ebenfalls die Signalintensität des vitalen Lebergewebes gemessen und ein Quotient aus den Werten und der Intensität der Läsionen gebildet.

Die gemessenen Werte in den T2-Wichtungen zeigen nur eine geringe Dynamik im zeitlichen Verlauf. Zwar ist der 24-Stunden Wert mit 151 niedriger als der Wert nach einer Stunde (162,50), allerdings schwanken die Werte in der Zwischenzeit in beide Richtungen. Die Messung des Quotienten ergibt eine noch geringere Variabilität und zeigt keine klare Tendenz. Warum die Werte sich nicht mit dem visuellen Bild decken, kann nicht abschließend beantwortet werden. Eine mögliche Erklärung liegt in dem Versuchsdesign begründet. Die Läsionen befinden sich an unterschiedlichen Stellen in der Leber, daher kann das Lebergewebe selbst an einigen Stellen signalstärker erscheinen. Bei den mit dem vitalen Lebergewebe ins Verhältnis gesetzten Messungen dürfte dieser Effekt jedoch nicht so ausgeprägt sein. Bei den diffusionsgewichteten Aufnahmen zeigt sich eine stärkere Dynamik. Während die Werte der DWI-Bilder nach initial vorübergehendem Anstieg abfallen, verhält es sich bei den ADC-Aufnahmen umgekehrt. Durch diese divergente Entwicklung können T2-Durchscheineffekte ausgeschlossen und eine wahre Diffusionsrestriktion angenommen werden. Die Entwicklung der ADC Werte könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass das interstitielle Volumen zu Beginn durch eine Zellschwellung kleiner wird und dann im Verlauf ansteigt aufgrund des Zellzerfalls (136).

Bei der Analyse der Ergebnisse kommt die Frage auf, ob eine steigende Destruktion des Gewebes generell mit - je nach Sequenz - steigenden beziehungsweise fallenden Signalintensitäten korreliert. Zhang et al. (132) haben in ihrer Studie die Bildgebung nach IRE von normalem Gewebe mit Tumorgewebe an Ratten verglichen. Sie stellen die These auf, dass die akute Signalanhebung im normalen Gewebe in den MRT-Aufnahmen auf eine Flüssigkeitsansammlung aufgrund der Intervention zurückzuführen ist. Lee et al. (137) haben in ihrer Studie das Kontrastmittelverhalten nach der IRE im Lebergewebe von Schweinen untersucht. Zwar haben die Autoren als Bildgebung die Computertomographie genutzt und somit sind die Ergebnisse nicht uneingeschränkt mit den Erkenntnissen der vorliegenden Studie zu vergleichen, einige theoretische Überlegungen jedoch könnten auch für die Analyse der hier vorliegenden Daten interessant sein. So stellen Lee et al. fest, dass die Gefäßstruktur im Ablationsbereich erhalten bleibt. Das könne – so die Autoren - durch den erhaltenen Blut-, und damit auch Kontrastmittelfluss, einerseits zu einer erhöhten KM-Anreicherung innerhalb der Läsionen durch den Gefäßaustritt von KM durch Mikroläsionen führen. Andererseits könne die KM-Zufuhr durch Ödeme und Stauungen im Ablationsbereich die KM-Zufuhr deutlich

verlangsamt werden. Des Weiteren stellen Lee et al. die Vermutung auf, dass das Kontrastmittel - wenn es einmal in den Bereich der IRE-Schädigung gelangt ist - dort länger verbleibt als im vitalen Lebergewebe, da es dort schneller wieder entfernt werden kann. Lee et al. zeigen somit verschiedene Thesen auf, wodurch die Signalanreicherung nach der IRE beeinflusst werden kann.

Die Ergebnisse der beiden oben genannten Studien untermauern die These der vorliegenden Forschungsarbeit, dass die Veränderung der Signalintensität nach der IRE von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird und mutmaßlich kein Ausdruck des Grads der Zellzerstörung darstellt.

MRT: Ablationszone

Bei der Auswertung der Ablationsflächengröße in den T2-Wichtungen fällt auf, dass diese im zeitlichen Verlauf geringfügig kleiner werden. Das betrifft sowohl den inneren, eigentlichen IRE-Ablationsbereich, als auch die Fläche inklusive der Transitionszone.

Weitere Studien, die detailliert den zeitlichen Ablauf der akuten Veränderungen in den Fokus nehmen, standen bislang noch aus. Barabasch et al. (135) untersuchen die MRT-Bilder in den ersten Wochen nach der Intervention. Für die ersten 24 Stunden nach Ablation beschreiben sie eine leichte Größenzunahme und erst dann eine Verringerung der Fläche. Allerdings untersuchen Barabasch et al. in ihrer Studie das Volumen der Läsionen an Lebermetastasen von Menschen, während in der vorliegenden Studie die Läsionsgröße an gesundem Lebergewebe von Schweinen ausgemessen wurde.

Bei den Ergebnissen dieser Arbeit handelt es sich um Differenzen im Millimeterbereich. Auffällig ist bei der Auswertung der Daten, dass sowohl die eigentliche Ablations-, als auch die Transitionszone kleiner werden. Ein möglicher Erklärungsansatz für die Abnahme der Werte ist die Tatsache, dass die Läsionen in den T2-Wichtungen immer hypointenser geworden sind und zum Schluss nur schwer vom umgebenden Gewebe abzugrenzen waren. Es könnte also sein, dass sich ein Teil der eigentlichen Ablationsfläche als vitale Zellen präsentiert hat. In der Studie von Barabasch et al. wurde die Ablation der IRE an Lebermetastasen von Patient:innen untersucht. Hierin könnte ebenfalls ein Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse liegen. Es wäre denkbar, dass die Größe der Ablationszone im Tumorgewebe anfangs geringfügig steigt und dann erst abfällt, während im vitalen Lebergewebe von Schweinen direkt eine Verringerung der Fläche stattfindet. Die Transitionszone nimmt im zeitlichen Verlauf ebenfalls an Größe ab, wobei vom Zeitpunkt $t=1$ zu $t=3$ der größte Sprung stattfindet, danach sind die Veränderungen geringer. In diesem Zeitraum nimmt ebenfalls die Größe der gesamten

Ablationsfläche ab. Ein Erklärungsansatz ist, dass kurz nach der Ablation ein Ödem im Bereich der Ablationszone entsteht, welches im weiteren Verlauf wieder abnimmt.

In einem Teil der T2-gewichteten MRT-Bilder ist ähnlich zu den histologischen Präparaten eine 3-Schichtung der Ablationszone zu erkennen. In den anderen MRT-Sequenzen ist dies deutlich schwieriger. Dieser Aufbau wurde ebenfalls in der Studie von Felker et al. (73) beschrieben, die ebenfalls gesundes Lebergewebe von Schweinen untersuchten. Damit bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie die prinzipielle Struktur der Ablationsfläche durch die irreversible Elektroporation auf MRT-Bildern, allerdings unterscheidet sich die Auswertung in Bezug auf die Signalintensität. Felker et al. beschreiben in der T2-Wichtung eine hyperintense Nekrosezone, umgeben von einem ebenfalls hyperintensiven IRE-Bereich, der wiederum außen in einen isointensen Inflammationsbereich übergeht. In den vorliegenden Bildern stellt sich der Nekrosebereich ebenfalls hyperintens dar, ist allerdings von einer hypointensen IRE-Zone umgeben und schließt außen mit einer wiederum hyperintensiven Umrandung, einer Art Halo, ab. Während die MRT-Sequenzen der vorliegenden Arbeit 1-24 Stunden nach erfolgter Intervention durchgeführt wurden, sind in der Studie von Felker et al. alle Aufnahmen 50 Stunden nach der Ablation angefertigt worden. Dies ist eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse, da die Veränderungen erwiesenermaßen einer Dynamik unterliegen und der Zeitpunkt der MRT-Aufnahmen somit eine relevante Rolle spielt.

Bei der Analyse der Größe der Ablationsfläche im zeitlichen Verlauf in den T1-gewichteten Sequenzen lässt sich ebenfalls eine Abnahme erkennen, auch wenn die Dynamik nicht ganz so ausgeprägt ist wie in den T2-Wichtungen. Am geringsten sind die Veränderungen in den nativen T1-gewichteten Aufnahmen. Bei dem Vergleich der verschiedenen T1-gewichteten Sequenzen fällt auf, dass die Ablationszonen in der portalvenösen KM-Phase leicht größer sind als in den anderen beiden Phasen. Während zu Beginn die Werte der spätvenösen KM-Phase höher sind als die der nativen Aufnahmen, kehrt sich das Verhältnis im zeitlichen Verlauf um. Felker et al. haben in ihrer Studie zwar nicht die zeitliche Entwicklung der Ablationszone charakterisiert, aber sie haben die Flächen in verschiedenen Sequenzen gemessen und verglichen. Bei ihnen sind die Maße in der nativen Phase am größten, gefolgt von der portalvenösen KM-Phase und am geringsten sind die Werte in der spätvenösen Phase. Damit decken sich die Ergebnisse nur teilweise. Da die Läsionen zum Zeitpunkt der Untersuchung bei Felker et al. 50 Stunden alt sind, ist ein Vergleich am ehesten für den Zeitpunkt $t=24$ in unserer Studie durchzuführen. Die Flächen in den spätvenösen KM-Phasen sind zum spätesten gemessenen Zeitpunkt nach Ablation in beiden Studien am kleinsten. Allerdings sind in der Auswertung vorliegenden Studie die Zahlen der portalvenösen Phase höher als die der nativen

Phase, bei Felker et al. ist diese Relation umgekehrt. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Differenz ist wiederum in der Dynamik der Gewebedestruktion zu verorten. Da in unserer Studie die Maße der nativen Sequenzen im zeitlichen Verlauf relativ konstant bleiben, die der portalvenösen Phase jedoch geringer werden, könnte es sein, dass 50 Stunden nach der Intervention auch bei unserer Auswertung ein umgekehrtes Verhältnis zu erkennen wäre. Die Tatsache, dass die KM-Phasen eine stärkere Dynamik in der Ablationsflächengröße präsentieren, erscheint kongruent, da sich eine starke Veränderung der Durchblutung nach der Ablation erwarten lässt.

Bei dem Vergleich der Ablationsflächen zwischen der T1- und der T2-Wichtung lässt sich feststellen, dass bis auf wenige Ausnahmen die Maße der Ablationszonen in den T1-Sequenzen minimal größer sind als in den T2-Wichtungen. Zhang et al. (133) haben in ihrer Studie an gesundem Lebergewebe von Ratten die Beobachtung gemacht, dass bei einer Spannung von 1500 V die Fläche in den T1-Aufnahmen größer ist als in den T2-Sequenzen. Somit zeigen sich in beiden Studien (wir haben ebenfalls 1500 V/cm verwendet) ähnliche Ergebnisse. Als möglichen Erklärungsansatz diskutieren Zhang et al., dass entweder Messfehler, oder eine zufällige Veränderung der Signalintensität in allen Bereichen der Ablationsfläche als Ursachen in Betracht kommen. Eine endgültige Erklärung bleibt somit ausstehend.

5.1.3 Korrelation MRT- und histopathologische Ergebnisse

Korrelation: Nekrosegrad + Signalintensität

Eine relevante Forschungsfrage der vorliegenden Arbeit ist, ob man durch die Auswertung der Signalintensität der MRT-Bilder indirekt auf das Ausmaß der Zellzerstörung in den Läsionen schließen kann. Dazu wurden die Ergebnisse der histopathologischen Auswertung mit den MRT-Aufnahmen verglichen. In der mikroskopischen Analyse der Präparate fällt im zeitlichen Verlauf eine stetige Zunahme an zerstörten Zellen auf, zu Beginn mit höherer Dynamik, nach zwölf Stunden flacht die Kurve immer weiter ab. Bei der Auswertung wurde die Entwicklung der Signalintensität in drei unterschiedlichen Sequenzen (T2, DWI, ADC) untersucht und zusätzlich für die T2-Wichtung die Signalintensität der Läsionen in Verhältnis zum umgebenden vitalen Lebergewebe gesetzt. Für keine der MRT-Sequenzen lassen sich Hinweise auf eine Korrelation zu den histopathologischen Ergebnissen finden. In den Messungen aller MRT-Aufnahmen gibt es Schwankungen der Signalintensitäten im Verlauf. Da aus der mikroskopischen Analyse jedoch hervorgeht, dass zu Beginn 0 % der Zellen zerstört sind und zum Ende 100 %, sollte für eine gute Übereinstimmung mit der Signalintensität der MRT-Sequenzen ebenfalls die höchste Differenz zwischen den Zeitpunkten $t=1$ und $t=24$ liegen. Dies

trifft trotz sichtbarer Tendenz der Daten in den diffusionsgewichteten Aufnahmen (DWI) auf keiner der MRT Sequenzen zu.

Es gibt bis dato keine vergleichbare Studie, die sich detailliert mit dem Vergleich von zerstörtem Gewebe und Signalintensität im zeitlichen Verlauf in der Akutphase beschäftigt hat. In der Diskussion der MRT-Ergebnisse wurde bereits die Entwicklung der Signalintensität aufgegriffen. Zhang et al. (132) beschreiben in ihrer Studie an Lebertumoren von Ratten, dass die Signalanreicherung im normalen Gewebe nach der irreversiblen Elektroporation vermutlich stark mit einer Flüssigkeitsansammlung durch eine vorübergehend gesteigerte Permeabilität der Blutgefäße zusammenhängt. Laut Zhang et al. würde diese Theorie auch die Erkenntnis ihrer Studie untermauern, dass die Signalanreicherung in normalem Gewebe deutlich höher ist als in Tumorgewebe, da dieses gerade in der Leber stark vaskularisiert ist. Die Ergebnisse von Zhang et al. decken sich auch mit der Beobachtung der vorliegenden Studie, dass die Signalintensität in der T2-Wichtung, in der unter anderem Wasser hyperintens dargestellt wird, im zeitlichen Verlauf tendenziell abnimmt. Denkbar wäre also, dass die Veränderungen der Intensität in den verschiedenen Sequenzen vor allem auf eine Flüssigkeitsanreicherung bzw. Ödem in der Ablationszone zurückzuführen sind. Die umgekehrte Entwicklung in der T1-Wichtung spricht ebenfalls für diese Hypothese. Für die diffusionsgewichteten Aufnahmen muss man diese Annahme differenzierter betrachten. Zwar sind die Werte der DWI-Sequenz anfangs sehr hoch, was sowohl durch eine eingeschränkte Diffusion, als auch auf einen erhöhten Flüssigkeitsgehalt im Gewebe begründet sein kann. Die sich tendenziell gegensätzlich entwickelnden gemessenen ROI Werte der ADC Aufnahmen untermauern diese These jedoch nicht.

Wie bereits zuvor betont, handelt es sich bei den Gewebeveränderungen nach der IRE um einen äußerst dynamischen Prozess. In der histopathologischen Auswertung ist drei Stunden nach Versuchsbeginn die Spannweite der Ergebnisse am größten und nimmt dann im zeitlichen Verlauf ab. Diese Werte könnten mit der Dynamik der Zellzerstörung korrelieren.

Zusammenfassend lässt sich aus dem Versuch die wichtige Erkenntnis ableiten, dass es zumindest innerhalb der ersten 24 Stunden nach erfolgter Ablation nicht möglich ist, durch eine Signaländerung in den von uns verwendeten MRT-Sequenzen indirekt auf das Ausmaß an zerstörten Zellen zu schließen. Dies bedeutet nicht, dass dies mit dem MRT grundsätzlich nicht möglich sein könnte, da wir uns auf Standardsequenzen beschränkt haben und somit nur für diese eine Aussage treffen können. Komplexere MRT-Sequenzen, wie die Elastographie oder Mappingverfahren, wären möglicherweise besser geeignet, den Grad der Gebeschädigung bildgebend zu bestimmen und sollten bzgl. dieser Fragestellung in weiteren Studien untersucht werden.

Korrelation Fläche

Bei dem Vergleich der Ablationsflächen zwischen den histopathologischen Präparaten und den verschiedenen MRT-Sequenzen lässt sich beobachten, dass die prinzipielle Struktur der Zonen identisch ist. Diese Übereinstimmung finden auch unter anderem Felker et al. (73) und Zhang et al. (133) in ihren Studien. Zhang et al. beschreiben, dass sich die verschiedenen Ablationszonen gut voneinander abgrenzen lassen. Die Auswertung in der vorliegenden Studie bestätigt diese Aussage, wobei die typische 3-Schichtung bei uns vor allem in den T2-gewichteten Aufnahmen sichtbar war. In den T1-Sequenzen ließ sich die Transitionszone nicht immer klar abgrenzen.

In den vorliegenden Daten lässt sich keine MRT Sequenz bestimmen, in der durchweg die höchste Übereinstimmung zwischen den Maßen der Ablationsflächen der histologischen Präparate und der MRT Bilder zu finden ist. Es gibt eine Tendenz, dass insgesamt die Daten der kontrastmittelverstärkten Phasen besser übereinstimmen als die T2- oder nativen T1-Sequenzen. Zu den letzten untersuchten Zeitpunkten gibt es dabei die höchste Übereinstimmung zu der spätvenösen KM-Phase.

Zhang et al. fanden in ihrer Studie an Lebergewebe von Ratten eine gut erkennbare Korrelation sowohl in T1- als auch in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen, wobei die T2-Sequenzen minimal besser korrelierten. In der Studie von Felker et al. an Schweinelebern wurde die signifikanteste Korrelation zwischen den histologischen Präparaten und der hepatobiliären KM-Phase gefunden, gefolgt von der portalvenösen KM-Phase.

In den beiden oben genannten Studien zeigen sich durchaus einige Differenzen in den Erkenntnissen, allerdings sind die Ziele der Experimente und Versuchsdurchführungen ebenfalls unterschiedlich. So wollten Zhang et al. der Hypothese nachgehen, ob man die Auswirkung nach einer IRE direkt auf MRT-Bildern detektieren kann, zudem wurden keine kontrastmittelgestützten Sequenzen untersucht. In der Studie von Felker et al. wurden die Daten für die hepatobiliäre KM-Phase 20 Minuten nach der Kontrastmittelgabe erhoben. Die Autoren haben sich hierfür entschieden, weil Ringe et al. (138) in ihrer Studie herausgefunden haben, dass zu diesem Zeitpunkt die Kontrastmittelaufnahme der Hepatozyten am höchsten ist. Das Ergebnis für diesen Zeitpunkt zeigt nun in der Studie von Felker et al. die höchste Korrelation zu den Maßen der mikroskopischen Analyse, gefolgt von der portalvenösen KM-Phase, jedoch ohne, dass zwischen den beiden Sequenzen ein statistisch signifikanter Unterschied vorhanden ist. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Ergebnisse stark vom Versuchsaufbau und der Durchführung abhängig sind. Es scheint, dass, wenn

kontrastmittelverstärkte Phasen durchgeführt werden, diese eine höhere Übereinstimmung aufzeigen.

Bei dem Vergleich der Transitionszonen werden in der vorliegenden Studie die Maße aus der T2-Wichtung mit den Daten der Frischpräparate und der fixierten Läsionen herangezogen. Dabei ließ sich keine signifikante Korrelation feststellen. Für die Vorhersage des Ablationserfolges scheint vor allem die eigentliche IRE-Ablationszone relevant zu sein, die Transitionszone spielt dabei eher eine untergeordnete Rolle. Guo et al. (139) haben in ihrer Studie MRT-Aufnahmen mit und ohne Verwendung von Kontrastmittel untersucht. Sie kamen dabei zu dem Ergebnis, dass die unterschiedlichen Ablationszonen, vor allem die umgebende Transitionszone, bei KM-gestützten Sequenzen besser abzugrenzen ist und sich der reine IRE-Bereich somit besser messen lässt. Guo et al. geben weiter an, dass die Maße der Fläche ohne die umgebende Penumbra genauere Ergebnisse zeigen im Vergleich zu den histopathologischen Daten. Somit ist laut Guo et al. für die Analyse vor allem die IRE-Ablationszone ohne den umgebenden Bereich bedeutsam. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der vorliegenden Studie zwar keine hohe Korrelation für die Transitionszone zwischen den Präparaten und den MRT-Bildern gefunden wurde, dies aber für die Beurteilung des Ablationserfolges auch nicht sonderlich relevant zu sein scheint.

5.2 Methodenkritik

5.2.1 Tiermodell

Die IRE stellt ein relativ neuartiges Verfahren dar, zu dem die aus der Forschung vorliegenden Daten noch spärlich sind. Bevor sich diese Methode im klinischen Alltag etablieren lässt, ist es enorm wichtig, den genauen pathophysiologischen Ablauf nach der Ablation und mögliche Korrelationen in einer Bildgebung zu kennen. Für die vorliegende Studie wurde ein Tiermodell, genauer das Schwein, ausgewählt. In Bezug auf Lage und Größe der Leber kommt es dem menschlichen Organismus relativ nahe. In diesem Forschungskontext ist es auch eindeutig den Nagetieren überlegen, da speziell bei der irreversiblen Elektroporation die Platzierung der Elektroden eine Herausforderung darstellen kann und die Anwendung an Schweinen besser mit dem menschlichen Körper verglichen werden kann. Zudem sind die Ausbreitung und die Entwicklung der Ablationszonen allein aufgrund der Größe des Organs bei Schweinen besser, um eine präzise Vorhersage für den Menschen treffen zu können. Ein großer Nachteil ist grundsätzlich das Tiermodell per se, da die Übertragbarkeit trotz großer Ähnlichkeit auf den Menschen nur eingeschränkt möglich ist. Gerade bei der IRE sind biomolekulare Abläufe von

großer Bedeutung im Rahmen der Gewebedestruktion. Kee et al. (76) haben über die Relevanz von Kalzium bei der Zellhomöostase berichtet. Da die Ionenkonzentration bei Schweinen nicht exakt mit der bei Menschen übereinstimmt, mindert das Tiermodell ebenfalls die prognostische Validität. Des Weiteren wurden in der vorliegenden Studie die Ablationen an gesundem Gewebe durchgeführt und nicht an Tumorzellen. Speziell bei der irreversiblen Elektroporation ist jedoch der Aufbau der Zellen und der Zellmembran äußerst relevant, da die IRE dort ihre Wirkung zeigt. Für diese Grundlagenforschung ist ein Tiermodell notwendig und insgesamt ist das Schwein, in Abgrenzung zu Nagetieren, gut geeignet.

5.2.2 Versuchsdurchführung

Die Anzahl an Versuchstieren ist mit sieben Schweinen relativ niedrig, eine höhere Zahl würde die Reliabilität der Ergebnisse verbessern. Während der Experimente befanden sich die Tiere über 24 Stunden in Narkose. Diese lange Zeitspanne könnte Einfluss auf die Durchblutung und auf physiologische Parameter genommen haben, die eventuell den Ablauf der Gewebedestruktion beeinflusst haben könnten. Ein weiterer Aspekt ist die mehrfache Durchführung von Ablationen pro Tier. Vogel et al. (89) stellen in der Bewertung ihrer Studie (ebenfalls an Schweinelebern) die These auf, dass durch die mehrfache Durchführung eine systemische Reaktion ausgelöst werden könnte, was wiederum die Ergebnisse beeinflussen könnte. Da es Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Akutphase nach der Intervention zu charakterisieren, haben wir uns entschieden, die Versuchsdauer auf 24 Stunden festzulegen. Da sich in den Ergebnissen zu dem Zeitpunkt eine vollständige Zerstörung des Gewebes beobachtet lässt, erwies sich diese Zeitspanne für unsere Forschungsfrage als adäquat. Trotzdem wäre es möglicherweise aufschlussreich gewesen, einen längeren Nachbeobachtungszeitraum zur Verfügung zu haben. Dadurch hätte man den weiteren Ablauf, zum Beispiel eine mögliche Regeneration, untersuchen können. Bei der MRT Untersuchung hätte man statt einem rein extrazellulären Kontrastmittel auch ein leberspezifisches Kontrastmittel (z.B. Gadoxetsäure / Primovist®) verwenden können, da dies möglicherweise noch eine bessere Übereinstimmung mit dem tatsächlich zerstörten Lebergewebe erlaubt hätte. Dies legen zumindest die Ergebnisse von Felker et al. (73) nahe, die in ihrer Studie Gadoxetsäure als Kontrastmittel verwendet haben und sich hier die höchste Übereinstimmung zwischen MRT und Histopathologie in der für dieses Kontrastmittel spezifischen hepatobiliären Phase zeigte. Zhang et al. (132) haben in ihrer Studie an Ratten ermittelt, dass durch die IRE in normalem Lebergewebe die Signalanreicherung stärker gesteigert wird als in Tumorgewebe. Wenn diese Erkenntnis auf das Schwein übertragen werden kann, entspricht die Entwicklung

der Signalintensität nicht vollständig derjenigen, die man nach einer Tumorbehandlung im menschlichen Organismus erwarten würde. Ein weiterer zu diskutierender Aspekt ist der Mechanismus des Zuschnittes der Läsionen. Nach der Präparation der Leber aus dem Torso wurden die einzelnen Läsionen vorsichtig herauspräpariert und für den weiteren Zuschnitt wurde versucht, senkrecht zur Längsachse der Läsionen zu schneiden. Dies war jedoch nicht immer exakt durchführbar, sodass möglicherweise in einzelnen Schnitten die Läsionen leicht verkippt und somit nicht in kompletter Größe abgebildet sind. Dies würde wiederum die Messung der Ablationsflächen beeinflussen.

5.2.3 Auswertung

Die vorliegende Arbeit weist ebenfalls einige Limitationen auf. Das Hauptziel dieser Arbeit ist die deskriptive Charakterisierung der Gewebedestruktion in der Akutphase anhand histopathologischer Auswertungen und MRT-Bilder. Ein weiterer Aspekt ist die Analyse einer möglichen Korrelation zwischen der Histologie und den verschiedenen MRT-Sequenzen. Auf Grund der sehr aufwendigen Versuche war es nur möglich, eine begrenzte Anzahl an Versuchstiere zu verwenden. Die Zahl der zur Auswertung verfügbaren Ablationszonen war dahingehend ebenfalls limitiert, was eine valide statistische Auswertung der Ergebnisse schwierig macht. Es wurde daher bereits bei der Planung der Studie entschieden, dass diese als Pilotstudie für weitere Untersuchungen dienen sollte, und daher zunächst einen deskriptiven Charakter haben sollte.

Für die histopathologische Auswertung wurde ein Lichtmikroskop verwendet. Unter Anleitung eines erfahrenen Pathologen wurden die Analysen der Präparate durchgeführt. Die Auswertung fand lediglich durch zwei Personen statt. Um die Validität der Ergebnisse zu erhöhen, wurden sämtliche Schnitte mehrfach begutachtet, jedoch wäre die Gültigkeit der Ergebnisse durch eine Analyse durch zusätzliche Personen gestärkt worden. Des Weiteren wurden auf den Präparaten jeweils einige zentral, zwischen den beiden Elektrodeneinstichen, liegende Leberläppchen untersucht, da dort die maximale Auswirkung der Gewebedestruktion zu erwarten war. Es wäre des Weiteren interessant gewesen, die periphere Ablationszone genauer zu untersuchen. So bleibt unklar, ob die Zellzerstörung in diesen Bereichen in der gleichen Zeitspanne und Intensität abläuft wie in der zentralen Zone.

Die Messung der Ablationsflächen der histopathologischen Präparate fand mithilfe von Fotos statt, die zuvor angefertigt wurden. Es gab einige Bilder, auf denen sich die verschiedenen Ablationszonen nur schwer voneinander abgrenzen ließen. Möglicherweise wäre es in diesen Fällen besser gewesen, die Messung direkt am Präparat vorzunehmen.

Für die Analyse der MRT-Bilder wurde das Computerprogramm *Sectra* genutzt. Die Erhebung der Signalintensität wurde über die Messung der *Region of interest (ROI)* durchgeführt, dazu wurden die Umrandungen der Läsionen markiert. Einige der Läsionen waren jedoch nur sehr schwer von dem umgebenden vitalen Lebergewebe abzugrenzen, sodass sich die Markierung teilweise sehr anspruchsvoll gestaltete. Dabei kann es zu geringfügigen Messungenauigkeiten gekommen sein. Um die Signalanreicherung der Läsionen in der T2-Wichtung mit der Intensität des vitalen Lebergewebes in Relation setzen zu können, wurde in vier, jeweils die Läsion umgebenden, Bereichen ebenfalls die *ROI* gemessen. Obwohl akribisch darauf geachtet wurde, diese Areale möglichst repräsentativ zu wählen, war es aufgrund der Position der Läsionen nicht immer möglich, vier verschiedene Bereiche zu markieren.

Bei der Auswertung der Größe der Ablationszonen ist ebenfalls negativ zu werten, dass in der vorliegenden Studie Flächen und nicht Volumina gemessen wurden. Für einen Vergleich der histopathologischen Auswertung und den MRT-Bildern war dieses Vorgehen jedoch zielführend, allerdings spiegelt es nicht die reelle Entwicklung der Ablationszone wider. Tumore präsentieren sich in vielen verschiedenen morphologischen Varianten und sind nur selten kugelförmig, so wie sie in vielen Darstellungen vereinfacht abgebildet werden. Aufgrund dieser Tatsache ist es von hoher Relevanz, die Ablationszone in allen drei Ebenen zu analysieren, um eine hohe prognostische Validität für die Behandlung von Tumoren erzielen zu können.

Während der Intervention war es erwartungsgemäß nicht immer möglich, die Elektroden so zu positionieren, dass sich die Läsionen mit ihrer Längsachse genau in den drei Hauptebenen befinden. Mit dem Programm *Sectra* ist es möglich, die verschiedenen MRT-Sequenzen in allen drei Ebenen darzustellen und die Winkel jeweils so einzustellen, dass die Läsionen mit ihrer Längsachse möglichst genau in den Ebenen liegen. Das ist relevant, um exakte Werte der Flächen messen zu können und diese darauffolgend mit den anderen Läsionen vergleichen zu können. Bei diesen Einstellungen kann es zu geringfügigen Messungenauigkeiten gekommen sein. Die Messung der Flächen selbst gestaltete sich ebenfalls in einigen Sequenzen als schwierig, es erwies sich teilweise als sehr anspruchsvoll, die einzelnen Ablationszonen exakt voneinander abzugrenzen. In einigen wenigen Fällen war es sogar herausfordernd, die Läsion überhaupt von dem umgebenden vitalen Lebergewebe abzugrenzen.

Insgesamt sind bei der MRT-Auswertung einige Schritte durchgeführt worden, die auf der Analyse einer Person beruhen. Für eine höhere Validität und Reliabilität wäre es hilfreich gewesen, die Auswertung der Bilder von mehreren Experten durchführen zu lassen.

5.3 Ausblick

Mit der vorliegenden Studie werden einige wichtige Aspekte der Grundlagenforschung beantwortet. Dennoch sind im Verlauf dieser Studie weitere Fragen aufgekommen, die das Versuchsdesign nicht beantworten kann, zum Beispiel ob es eine mögliche Regeneration des Gewebes gibt. Das liegt unter anderem an der Dauer des Versuches, da die vorliegende Studie den Fokus auf die Akutphase legt. Zwar hat nach 24 Stunden, also zum Versuchsende, eine komplette Zellzerstörung stattgefunden, was für die Beantwortung unserer Frage zielführend war. Jedoch wäre es auch interessant, eine mögliche Regeneration des Gewebes in den Randbereichen zu untersuchen. Durch das Versuchsdesign bleibt somit zum Beispiel offen, ob die Schädigung der Septen zwischen den Leberläppchen und der Periportalfelder dauerhaft ist oder ob sich diese Strukturen erholen. Somit könnte es von Interesse sein, den weiteren Ablauf der Gewebeveränderungen im zeitlichen Verlauf zu analysieren.

In dem vorliegenden Experiment war der Abstand der Therapieelektroden zueinander immer identisch. In weiteren Studien wäre es interessant, die Abstände zu variieren und zu untersuchen, welche Auswirkung die Anordnung auf den Ablauf der Gewebedestruktion hat. Es wäre des Weiteren interessant zu untersuchen, wie man die Elektroden bei Läsionen platzieren kann, die nicht kugelförmig sind, sondern eine unregelmäßige Form haben mit zum Beispiel Ausziehungen. Ein Vorteil der IRE ist, dass sich viele verschiedenen Parameter individuell einstellen und anpassen lassen. Das bedeutet allerdings gleichzeitig, wie bereits Ben-David et al. (87) in ihrer Studie aufführen, dass alle unterschiedlichen Einstellungen in Experimenten gut analysiert werden müssen. In der vorliegenden Studie wurden kontinuierlich dieselben Parameter genutzt, daher bleiben weitere experimentelle Untersuchungen offen, die sich ausschließlich auf die Auswirkungen unterschiedlicher Parameter konzentrieren.

Ein weiterer zu erforschender Aspekt ist die Anwendung und der Vergleich der irreversiblen Elektroporation an verschiedenen Geweben. Da der Aufbau des Gewebes bei der IRE eine relevante Rolle spielt, wäre es sehr interessant, unterschiedliche Organe, zum Beispiel Lunge, Niere und Leber, zu untersuchen und zu vergleichen. Daneben ist auch die Entwicklung der Gewebedestruktion in zumeist heterogenem Tumorgewebe relevant. Eine weiterführende Forschungsfrage hier lautet zum Beispiel: Wie genau verläuft die Ausbreitung der Ablationszonen bei unregelmäßig wachsenden Tumoren, die vitales Lebergewebe, Gefäße oder Gallenwege umschließen? Dabei sollte auch die Bildgebung an Tumoren weiter untersucht werden, da die Signalanreicherung dort geringer ist als an normalem Lebergewebe (132). Zur Prädiktion der IRE-Zone wäre es interessant, in einer Studie die Volumina der Ablationsflächen zu untersuchen und somit die Ausbreitung in allen drei Ebenen zu analysieren. Ein zusätzlicher

Forschungsaspekt ist die Entwicklung des elektrischen Feldes in heterogenen Geweben. Wie Qin et al. (140) in ihrer Studie beschreiben, verändert sich nach der IRE das elektrische Feld in dem abladierten Gewebe. Dies könnte dazu führen, dass für einen Teil der Zellen die elektrische Energie nicht ausreichend hoch ist, um die Zellen sicher zu zerstören. Dieser mögliche Effekt sollte in weiteren Studien detaillierter an Tumorgewebe untersucht werden. Ein weiterer Punkt, der genauer erforscht werden sollte, sind die möglichen systemischen Effekte durch die Intervention.

Die genaue Art des Zelluntergangs ist bislang nicht abschließend geklärt. Es ist gesichert, dass es sich bei der Gewebedestruktion nicht um reine Apoptose handelt. Aber ob der Zelluntergang per Nekrose und Apoptose erfolgt oder ein Hybridverfahren wie die *Nekroptose* abläuft, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Nicht zuletzt ist natürlich die Anwendung und Analyse der IRE an Menschen wichtig. In klinischen Längsstudien ist vor allem der Aspekt interessant, ob und wenn ja, wie lange ein Ablationserfolg bestehen bleibt. Des Weiteren ist der Punkt relevant, wie sich die Funktion des Organs im zeitlichen Verlauf nach einer Intervention darstellt.

Durch eine Durchführung mit vielen Probanden beziehungsweise Versuchstieren könnten Erkenntnisse statistisch signifikant untermauert werden. Insgesamt bleiben einige Fragen offen, die nur durch Grundlagenforschung beantwortet werden können, was vor einer sicheren klinischen Etablierung höchste Relevanz besitzt.

5.4 Konklusion

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Studie einige Thesen anderer Autoren, wie zum Beispiel die Effektivität an normalem Lebergewebe (84), den grundlegenden Aufbau der Ablationszone (84) und die thermoablative Nekrose (89) um den Bereich der Einstichstellen der Sonden bestätigt. Des Weiteren wurden in dieser Studie die Mechanismen der Gewebeveränderung in den ersten 24 Stunden deskriptiv und der Zelluntergang auch quantitativ charakterisiert, was in dieser Form bislang noch nicht untersucht wurde. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse decken sich mit neueren Ansichten, dass die Gewebedestruktion kein reine apoptotischer Vorgang ist (89), sondern womöglich ein Hybrid aus Nekrose und Apoptose (111). Diese These widerspricht ursprünglichen Annahmen, wonach die IRE auf rein apoptotischen Veränderungen beruhen soll. Somit bestärkt diese Studie die neueren Ergebnisse und bringt einen wichtigen Punkt in die Diskussion um die Art der Gewebedestruktion mit ein. Die Feststellung, dass histopathologisch frühestens nach ca. 12 Stunden das definitive Ausmaß

der Zellschädigung weitgehend erreicht ist, hat bedeutsame Implikationen für Akutversuche am Großtiermodell, bei denen z.B. unterschiedliche Einflussfaktoren auf das Ablationsergebnis untersucht werden. In der Vergangenheit wurde bei einigen solcher Arbeiten das Ausmaß der Ablation bereits nach einem sehr kurzen Intervall bestimmt (3-6 Stunden), bei dem aber gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit der Prozess des Zelluntergangs noch nicht ausreichend fortgeschritten ist, was wiederum die Validität der Experimente bedeutsam beeinflussen kann. Für das Design von IRE Studien am Großtiermodell sollte damit zukünftig berücksichtigt werden, ein ausreichend langes Intervall (mindestens 12 Stunden), zwischen Ablation und Tötung der Versuchstiere einzuplanen. Dies unterscheidet sich stark von den Prozessen nach thermischer Ablation, bei denen die definitive Gewebeschädigung bereits kurz nach der Ablation zu beobachten ist.

Die Analyse der Größe der Ablationsfläche deckt sich mit Ergebnissen eines Reviews von Vogel et al. (108) aus dem Jahr 2016. Andere Studien, auch eine spätere von Vogel et. al (89), stellen eine Vergrößerung der Fläche fest, wobei sich die Beobachtung vor allem auf die Transitionszone bezieht. Bei der Frage der für den Ablationserfolg deutlich relevanteren IRE-Zone stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Studie folglich mit der Mehrheit der Publikationen überein.

In der zeitlichen Entwicklung der Signalgebung der Läsionen in verschiedenen MRT-Sequenzen wurde in dieser Studie kein stringenter Verlauf gefunden. Es scheint abschließend so, dass die Änderung der Intensität multifaktoriell bedingt ist und nicht ausschließlich auf dem Anteil an vitalen beziehungsweise zerstörten Zellen beruht. Damit liefert die vorliegende Studie eine wichtige Erkenntnis für die Bildgebung nach irreversibler Elektroporation. Die Fläche der Ablationszone wird auf den MRT-Bildern im zeitlichen Verlauf geringfügig kleiner. Damit decken sich die Ergebnisse bedingt mit einer Studie von Barabasch (135) et al., die ebenfalls nach einem anfänglichen Anstieg eine Reduktion der Fläche beobachten. Die Unterschiede könnten auf das unterschiedliche Versuchsdesign zurückzuführen sein (Humanstudie mit Ablation von Lebertumoren versus Tierversuch mit Ablation von gesundem Lebergewebe).

Der Versuch, eine Korrelation zwischen dem Grad der Zellschädigung in den mikroskopischen Präparaten und der Signalintensität der MRT-Sequenzen zu finden, war nicht erfolgreich. Es gab bislang keine Studie, die in der Akutphase nach der Intervention einen solchen Vergleich angestellt hat. Grund für die fehlende Korrelation sind vermutlich die multifaktoriellen Ursachen einer Signaländerung des abladierten Gewebes, wie die Entstehung eines Ödems, eine verminderte Parenchymperfusion und eine Kongestion, die wahrscheinlich einen größeren

Einfluss auf das Signalverhalten haben, aber nicht zwingend gleichsinnig mit dem Fortschreiten der Zellschädigung verlaufen. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für die klinische Anwendung, da es somit nicht möglich scheint, bildgebend auf den Grad der Gewebeschädigung schließen zu können. Als letzter Punkt wurde in dieser Studie das Ausmaß der Ablationszone in der histopathologischen Analyse und den MRT-Sequenzen verglichen. Dabei ließ sich zu keiner spezifischen Sequenz eine eindeutig höchste Übereinstimmung finden. Während Zhang et al. (133) untersucht haben, ob es überhaupt eine Korrelation gibt, haben Felker et al. (73) in ihrer Studie untersucht, zu welcher MRT-Sequenz die beste Korrelation besteht, sie haben die hepatobiliäre und portalvenöse KM-Phase detektiert. In der vorliegenden Studie sind die Daten der kontrastmittelverstärkten Phasen die, die den Maßen der histologischen Präparate am nächsten kommen. Während sich die Analyse von Felker et al. jedoch nur auf einen Zeitpunkt (50 Stunden nach erfolgter Intervention) bezogen hat, haben wir den dynamischen Verlauf über 24 Stunden untersucht. Mit fortschreitendem Zeitabstand zur Ablation decken sich die Ergebnisse am ehesten mit der spätvenösen Kontrastmittelfase.

6. Zusammenfassung

Pro Jahr erkranken circa 9.000 Menschen in Deutschland an Leberkrebs (2). Noch häufiger als primäre Malignome lassen sich in der Leber Metastasen finden. Trotz aller Fortschritte in der Chirurgie in den letzten Jahren sind nach wie vor nur etwa 20 % - 25 % aller Patient:innen chirurgisch resektabel (33). Daher bedarf es dringend alternativer Therapieoptionen.

Ein relativ neuartiges Verfahren, für das die Datenlage noch verhältnismäßig spärlich ist, ist die irreversible Elektroporation. Bei der IRE wird durch wiederholte starke Stromimpulse die Zellmembran zerstört, was wieder die Zellhomöostase beeinträchtigt. Wenn dabei eine kritische Grenze überschritten wird, kommt es zu einem Zelluntergang. Folglich handelt es sich dabei um ein primär nicht-thermisches Ablationsverfahren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zeitlichen Veränderungen der Gewebeschädigung in der Akutphase deskriptiv anhand histopathologischer Schnitte und verschiedener MRT-Sequenzen charakterisiert. Ein wichtiger Aspekt der Arbeit war die Analyse des Zeitpunkts nach der Ablation, an dem histologisch eine irreversible Zellschädigung nachzuweisen ist. Des Weiteren steht die Frage nach einer möglichen Korrelation zwischen mikroskopischen Präparaten und MRT-Bildern im Mittelpunkt, dabei wird der Fokus sowohl auf den Grad der Zellzerstörung als auch auf das Ausmaß der Ablationsfläche gelegt.

Eine wichtige Erkenntnis aus der Deskription der Gewebeschädigung ist der Befund, dass sich um die Einstichstellen der Elektroden eine thermoablative Nekrose finden lässt. Auch in der IRE-Zone läuft der Zelluntergang nicht rein apoptotisch ab, es zeigen sich ebenso Merkmale der Nekrose. Bei der Gewebedestruktion handelt es sich um einen dynamischen Prozess. Kurz nach der Ablation sind erste Zellschädigungen sichtbar, die Zellen sind jedoch noch nicht als irreversibel geschädigt zu charakterisieren. Während der ersten Stunden ist die Dynamik am stärksten ausgeprägt, nach sechs Stunden sind bereits 53,75 % der Zellen untergegangen. Zwölf Stunden nach erfolgter Intervention sind 95,00 % des Gewebes zerstört und nach 24 Stunden 100%.

Bei der Auswertung der Ablationsfläche in den mikroskopischen Präparaten ist vornehmlich aufgefallen, dass die Ausmaße im zeitlichen Verlauf relativ konstant geblieben sind. Bei der Analyse der Signalanreicherung in verschiedenen MRT-Sequenzen zeigt diese Studie, dass es keine eindeutige Entwicklung im zeitlichen Verlauf gibt. Die Intensität scheint multifaktoriell bedingt zu sein und kein valider Indikator für das Maß an zerstörten beziehungsweise vitalen Zellen. Die Maße der Ablationsflächen auf den MRT-Bildern werden im zeitlichen Verlauf

geringfügig niedriger, zeigen aber ebenso wenig eine ausgeprägte Dynamik. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen keine klare Übereinstimmung zu einer spezifischen Sequenz in Bezug auf die Ablationsfläche zwischen MRT-Bildern und den histopathologischen Präparaten, jedoch gibt es eine Tendenz zu den kontrastmittelverstärkten Phasen. Zwischen dem Anteil an zerstörten Zellen aus der mikroskopischen Auswertung und der Signalanreicherung der Läsionen in den MRT-Bildern konnte keine Korrelation gefunden werden.

Die vorliegende Studie fördert damit wichtige Überlegungen auf dem Weg zur klinischen Etablierung der irreversiblen Elektroporation. Einige bereits bestehende Annahmen, zum Beispiel zum Aufbau der Ablationszone, konnten untermauert werden. Des Weiteren wurde präzise der Ablauf der Gewebeveränderungen auf mikroskopischer Ebene im zeitlichen Verlauf der Akutphase charakterisiert. Die Diskussion über den genauen Mechanismus der Gewebedestruktion wurde durch die Ergebnisse dieser Studie ebenfalls weiter angestoßen. Darüber hinaus wurden relevante Erkenntnisse im Kontext der Bildgebung gewonnen. Dazu gehört der empirische Befund, dass eine Vorhersage des Anteils an zerstörten Zellen durch die Signalanreicherung nicht möglich ist.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die irreversible Elektroporation eine relativ neue und hochinteressante Ablationsmethode ist. Sie birgt zwar einige prinzipielle Nachteile, wie zum Beispiel die Tatsache, dass für die Intervention, im Gegensatz zu den meisten anderen ablativen Verfahren, eine Allgemeinanästhesie benötigt wird und die Patient:innen MRT-tauglich sein sollten. Dennoch stellt die IRE aufgrund ihrer Wirkungsweise und den damit verbundenen Vorteilen, wie zum Beispiel die Durchführbarkeit in der Nähe von sensiblen Strukturen, eine vielversprechende Alternative dar. Mithilfe der vorliegenden Studie konnte die Grundlagenforschung vorangetrieben und einige wichtige Erkenntnisse im Rahmen der Bildgebung für die klinische Etablierung gewonnen werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Krebsinformationsdienst des Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland - 2015/2016 I Krebs gesamt. 2019. p. 16–23.
2. Krebsinformationsdienst des Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland | 2015/2016 | Leber C22. 2019;44–7.
3. Herold G. HEROLD Innere Medizin 2018. In: Innere Medizin. Köln: Dr. Gerd Herold; 2018.
4. Müller M. Chirurgie für Studium und Praxis. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste; 2016.
5. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie: Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome [Internet]. Z Gastroenterol. 2023 [cited 2024 Jul 23]. Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaere-karzinome/>
6. Vogl TJ, Eichler K, Zangos S. Regionale Therapieverfahren bei Lebermetastasen unterschiedlicher Primärtumoren: Lokale Chemotherapie und Thermoablation. In: Regionale Therapie maligner Tumoren [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013 [cited 2019 Jul 10]. p. 237–48. Available from: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-642-35014-6_19.pdf
7. Kosiek O, Strach K, Ricke J, Pech M. Irreversible elektroporation - “A new kid on the block?” Radiologe. 2012;52(1):38–43.
8. Golberg A, Yarmush ML. Nonthermal Irreversible Electroporation: Fundamentals, Applications, and Challenges. IEEE Trans Biomed Eng [Internet]. 2013 Mar;60(3):707–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23314769>
9. Schumpelick V, Bleese N, Mommsen U, editors. Kurzlehrbuch Chirurgie [Internet]. Kurzlehrbuch Chirurgie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014 [cited 2019 Oct 16]. Available from: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-002-33687>
10. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, et al. Duale Reihe Anatomie. Duale Reihe Anatomie. Stuttgart: Thieme; 2017.
11. Tannapfel A, Dienes H-P, Lohse AW. The Indications for Liver Biopsy. Dtsch Aertzblatt Online [Internet]. 2012 Jul 9 [cited 2019 Jul 10]; Available from: <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2012.0477>
12. Bundesausschuss G. Protonentherapie bei Lebermetastasen Abschlussbericht Beratungsverfahren nach § 137c SGB V (Krankenhausbehandlung) [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 1]. Available from: https://www.g-ba.de/downloads/40-268-1606/2011-01-20_KHMe-RL-Prot-Lebermetastasen_ZD.pdf
13. Akgül Ö, Çetinkaya E, Ersöz Ş, Tez M. Role of surgery in colorectal cancer liver metastases. World J Gastroenterol [Internet]. 2014 May 28 [cited 2019 Oct 23];20(20):6113–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876733>
14. Kasper HU, Drebber U, Dries V, Dienes HP. Lebermetastasen: Inzidenz und histogenetische einordnung. Z Gastroenterol [Internet]. 2005 Oct 12 [cited 2019 Jul 10];43(10):1149–57. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2005-858576>
15. Birth M, Ittel TH, Pereira PL. Hepatobiliäre und Pankreastumoren [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [cited 2019 Aug 12]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-04935-4>
16. Maxwell Parkin D, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer. 2001;

17. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul J-L, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2019 Oct 16];69(1):182–236. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827818302150?via%3Dihub>
18. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors. In: *Gastroenterology*. 2004.
19. Cottone M, Turri M, Caltagirone M, Maringhini A, Sciarrino E, Virdone R, et al. Early detection of hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis by ultrasound and alfafetoprotein: a prospective study. *Hepatogastroenterology* [Internet]. 1988 Jun [cited 2019 Oct 21];35(3):101–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2456973>
20. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: The BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* [Internet]. 1999 [cited 2019 Oct 16];19(3):329–37. Available from: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-2007-1007122.pdf>
21. Siqueira E, Schoen RE, Silverman W, Martini J, Rabinovitz M, Weissfeld JL, et al. Detecting cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastrointest Endosc* [Internet]. 2002 Jul 1 [cited 2019 Oct 21];56(1):40–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016510702000056?via%3Dihub>
22. Manns MP, Schneidewind S, editors. *Praxis der Hepatologie* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016 [cited 2019 Oct 16]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-41620-0>
23. Wirth T, Vogel A. Benigne Tumoren der Leber. In: *Praxis der Hepatologie* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016 [cited 2019 Oct 21]. Available from: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-642-41620-0_29.pdf
24. Shaked O, Siegelman ES, Olthoff K, Reddy KR. Biologic and Clinical Features of Benign Solid and Cystic Lesions of the Liver [Internet]. Vol. 9, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. W.B. Saunders; 2011 [cited 2019 Oct 21]. p. 547–562.e4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1542356511002382?via%3Dihub>
25. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma [Internet]. Vol. 42, *Hepatology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2005 [cited 2019 May 27]. p. 1208–36. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20933>
26. Cobey FC, Salem RR. A review of liver masses in pregnancy and a proposed algorithm for their diagnosis and management. *Am J Surg* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2019 Oct 22];187(2):181–91. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002961003005099?via%3Dihub>
27. Deutsche Krebsgesellschaft e.V., editor. *Gastrointestinale Tumoren*. München: Elsevier; 2018.
28. Scheele J, Altendorf-Hofmann A. Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg*. 1999;19(4):59–71.
29. Umgelter A, Prinz C. Leber. In Heidelberg: Springer; 2012 [cited 2019 Oct 23]. p. 191–222. Available from: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-642-12377-1_10.pdf
30. Sauerbruch T. *Therapie-Handbuch - Gastroenterologie und Hepatologie*. 1. Auflage. Therapie-Handbuch - Gastroenterologie und Hepatologie. München: Elsevier; 2021.
31. Farkas SA, Schlitt HJ. Operative therapy of hepatocellular carcinoma [Internet]. Vol. 54, *Radiologe*. Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cited 2019 Oct 22]. p. 673–8.

- Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00117-014-2653-3>
32. Schneider A, Vogel A, Lankisch T. Gallengangskarzinom und Klatskintumor. In: Praxis der Hepatologie [Internet]. 2016 [cited 2019 Oct 22]. p. 227–33. Available from: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-642-41620-0_158.pdf
 33. Geoghegan JG, Scheele J. Multi-modality treatment of colorectal liver metastases. Br J Surg [Internet]. 1999 [cited 2019 Jul 30];86:158–69. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2168.1999.01013.x>
 34. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A, Gall FP. Indicators of prognosis after hepatic resection for colorectal secondaries. Surgery [Internet]. 1991 Jul [cited 2019 Oct 23];110(1):13–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1866690>
 35. Vogl TJ, Mack MG, Balzer JO, editors. LeberMetastasen Diagnose — Intervention — Therapie [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2002 [cited 2021 Feb 4]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-59385-7>
 36. Malafose R, Penna C, Cunha AS, Nordlinger B. Surgical management of hepatic metastases from colorectal malignancies. Ann Oncol [Internet]. 2001 Jul 1 [cited 2019 Oct 21];12(7):887–94. Available from: <http://academic.oup.com/annonc/article/12/7/887/150608/Surgical-management-of-hepatic-metastases-from>
 37. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. Lancet [Internet]. 2000 Mar 25 [cited 2019 Oct 23];355(9209):1041–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673600020341?via%3Dihub>
 38. Mahnken AH, Bruners P, Günther RW. Techniken der interventionellen Tumorthherapie. Dtsch Arztebl. 2008;105(38):646–53.
 39. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1 [Internet]. 2019 [cited 2024 Jul 23]. Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [
 40. McGahan JP, Brock JM, Tesluk H, Gu WZ, Schneider P, Browning PD. Hepatic Ablation with Use of Radio-Frequency Electrocautery in the Animal Model. J Vasc Interv Radiol. 1992;3(2):291–7.
 41. Fischbach F, Ricke J, Fischbach K. Lokal ablative Therapie bei Lebertumoren. Radiol up2date [Internet]. 2017 [cited 2021 Feb 9];17(02):139–56. Available from: www.thieme.de/eref-registrierung
 42. Pereira PL, Trübenbach J, Schmidt D. Radiofrequenzablation: Grundlagen, Techniken und Herausforderungen. J Mater Process Technol [Internet]. 2018 [cited 2021 Feb 12];(1):1–8. Available from: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-2003-36612.pdf>
 43. HELPING THE HEPATIC SURGEON Essential Techniques for Successful Radio-frequency Thermal Ablation of Malignant Hepatic Tumors 1.
 44. Rhim H, Goldberg SN, Dodd GD, Solbiati L, Lim HK, Tonolini M, et al. Essential techniques for successful radio-frequency thermal ablation of malignant hepatic tumors. Radiographics. 2001;21(SPEC.ISS.):17–39.
 45. Lubner MG, Brace CL, Hinshaw JL, Lee FT. Microwave tumor ablation: Mechanism of action, clinical results, and devices. J Vasc Interv Radiol. 2010;21(8):192–203.
 46. Simon CJ, Dupuy DE, Mayo-Smith WW. Microwave ablation: Principles and applications. Radiographics. 2005;25(SPEC. ISS.):69–83.
 47. Hoffmann R, Rempp H, Clasen S. Mikrowellenablation: Neue systeme, neue

- einsatzgebiete? Radiologe. 2012;52(1):22–8.
48. Wright AS, Sampson LA, Warner TF, Mahvi DM, Lee FT. Radiofrequency versus microwave ablation in a hepatic porcine model. Radiology [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2023 May 1];236(1):132–9. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2361031249>
 49. Vogl TJ, Nour-Eldin NE, Hammerstingl RM, Panahi B, Naguib NNN. Microwave Ablation (MWA): Basics, Technique and Results in Primary and Metastatic Liver Neoplasms - Review Article [Internet]. Vol. 189, RoFo Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren. 2017 [cited 2021 Feb 15]. p. 1055–66. Available from: <https://doi.org/10.1055/s-0043-117410>
 50. Vogl TJ, Lee C, Nour-Eldin NE, Farshid P, Mack MG, Balzer J. Interventionelle tumordestruktion durch thermische verfahren. Onkologie. 2010;16(11):1086–94.
 51. Kahl-Scholz M, Vockelmann C. Basiswissen Radiologie Nuklearmedizin und Strahlentherapie - Grundlagen. Basiswissen Radiologie Nuklearmedizin und Strahlentherapie. Berlin: Springer; 2017. 1–126 p.
 52. Helmberger T. Interventionelle Verfahren bei Lebermetastasen. Chirurg. 2010;81(6):542–50.
 53. ter Haar G. HIFU tissue ablation: Concept and devices. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing Switzerland; 2016. p. 3–20.
 54. Wijlemans JW, Bartels LW, Deckers R, Ries M, Mali WPTM, Moonen CTW, et al. Magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound (MR-HIFU) ablation of liver tumours. In: Cancer Imaging. 2012. p. 387–94.
 55. Siedek F, Yeo SY, Heijman E, Grinstein O, Bratke G, Heneweer C, et al. Magnetic Resonance-Guided High-Intensity Focused Ultrasound (MR-HIFU): Technical Background and Overview of Current Clinical Applications (Part 1) [Internet]. Vol. 191, RoFo Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren. 2019. p. 522–30. Available from: <https://doi.org/10.1055/a-0817-5645>
 56. Denis de Senneville B, Moonen C, Ries M. MRI-guided HIFU methods for the ablation of liver and renal cancers. Adv Exp Med Biol. 2016;880:43–63.
 57. Yang T, Ng DM, Du N, He N, Dai X, Chen P, et al. HIFU for the treatment of difficult colorectal liver metastases with unsuitable indications for resection and radiofrequency ablation: a phase I clinical trial. Surg Endosc [Internet]. 2020;1:3. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00464-020-07644-y>
 58. Mahnken AH, König AM, Figiel JH. Current Technique and Application of Percutaneous Cryotherapy. RoFo Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der Bildgeb Verfahren [Internet]. 2018;190:836–46. Available from: <https://doi.org/10.1055/a-0598-5134>
 59. Baust JG, Gage AA, Bjerklund Johansen TE, Baust JM. Mechanisms of cryoablation: Clinical consequences on malignant tumors [Internet]. Vol. 68, Cryobiology. 2014 [cited 2021 Feb 25]. p. 1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.11.001>
 60. Swierz MJ, Storman D, Riemsma RP, Wolff R, Mitus JW, Pedziwiatr M, et al. Percutaneous ethanol injection for liver metastases. Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2020. p. 1–35.
 61. Holtkamp W. Perkutane minimalinvasive entfernung von lebertumoren. Onkologie [Internet]. 2001;24(1):59–64. Available from: www.karger.com/journals/onk
 62. Ansari D, Andersson R. Radiofrequency ablation or percutaneous ethanol injection for the treatment of liver tumors [Internet]. Vol. 18, World Journal of Gastroenterology.

- Baishideng Publishing Group Inc; 2012 [cited 2021 Feb 26]. p. 1003–8. Available from: [/pmc/articles/PMC3296972/](https://pmc/articles/PMC3296972/)
63. Brunken C, Steiner P, Rogiers X. Perkutane Ethanolinjektion (PEI) und Kryotherapie. *Internist*. 2000;41(2):205–7.
 64. Shiina S, Sato K, Tateishi R, Shimizu M, Ohama H, Hatanaka T, et al. Percutaneous Ablation for Hepatocellular Carcinoma: Comparison of Various Ablation Techniques and Surgery. *Can J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018;1–8. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/4756147>
 65. Ricke J, Wust P, Stohlmann A, Beck A, Cho CH, Pech M, et al. CT-gesteuerte brachytherapie. Eine neue perkutane technik zur interstitiellen ablation von lebermetastasen. *Strahlentherapie und Onkol*. 2004;180(5):274–80.
 66. Schleicher UM, Staatz G, Alzen G, Andreopoulos D. Combined external beam and intraluminal radiotherapy for irresectable Klatskin tumors. *Strahlentherapie und Onkol*. 2002;178(12):682–7.
 67. Böning G, Büttner L, Jonczyk M, Lüdemann WM, Denecke T, Schnapauff D, et al. Complications of Computed Tomography-Guided High-Dose-Rate Brachytherapy (CT-HDRBT) and Risk Factors: Results from More than 10 Years of Experience. *Cardiovasc Intervent Radiol* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Mar 2];43(2):284–94. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00270-019-02386-4>
 68. Denecke T, Lopez Hänninen E. Brachytherapy of liver metastases. *Recent results cancer Res*. 2008;177:95–104.
 69. Ricke J, Wust P. Computed Tomography-Guided Brachytherapy for Liver Cancer. Vol. 21, *Radiation Oncology*. W.B. Saunders; 2011. p. 287–93.
 70. Mangoni M, Borghesi S, Aristei C, Becherini C. Radiobiology of stereotactic radiotherapy. *Reports Pract Oncol Radiother*. 2022;27(1):57–62.
 71. Zhuang H, Zhuang H, Lang N, Liu J. Precision Stereotactic Radiotherapy for Spinal Tumors: Mechanism, Efficacy, and Issues. *Front Oncol*. 2020;10(May).
 72. Wendler JJ, Ganzer R, Hadaschik B, Blana A, Henkel T, Köhrmann KU, et al. Irreversible Elektroporation: Aktueller Stellenwert in der fokalen Therapie des Prostatakarzinoms. *Urologe* [Internet]. 2015;54(6):854–62. Available from: <https://www.dimdi.de/dynamic/de>
 73. Felker ER, Dregely I, Chung DJ, Sung K, Osuagwu FC, Lassman C, et al. Irreversible electroporation: Defining the MRI appearance of the ablation zone with histopathologic correlation in a porcine liver model. *Am J Roentgenol* [Internet]. 2017;208(5):1141–6. Available from: www.ajronline.org
 74. Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M, Schweiger M-R. *Biologie und molekulare Medizin* [Internet]. Biologie und molekulare Medizin. Stuttgart: Thieme; 2016 [cited 2021 Mar 4]. Available from: <https://shop.thieme.de/Biologie-und-molekulare-Medizin/9783132034372>
 75. Poeggel G. *Kurzlehrbuch Biologie* [Internet]. Stuttgart: Thieme; 2013 [cited 2021 Mar 4]. Available from: <https://www.lehmanns.de/shop/medizin-pharmazie/28214669-9783131765031-kurzlehrbuch-biologie>
 76. Kee ST, Gehl J, Lee EW. *Clinical Aspects of Electroporation* [Internet]. Kee ST, Gehl J, Lee EW, editors. Clinical Aspects of Electroporation. New York, NY: Springer New York; 2011 [cited 2021 Mar 4]. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-8363-3>
 77. Tarek M. Membrane electroporation: A molecular dynamics simulation. *Biophys J* [Internet]. 2005;88(6):4045–53. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.050617>
78. van den Bos W, Scheffer HJ, Vogel JA, Wagstaff PGK, de Bruin DM, de Jong MC, et al. Thermal Energy during Irreversible Electroporation and the Influence of Different Ablation Parameters. *J Vasc Interv Radiol* [Internet]. 2016 Mar;27(3):433–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvir.2015.10.020>
 79. Rubinsky B. Irreversible Electroporation [Internet]. Rubinsky B, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. (Series in Biomedical Engineering). Available from: <http://www.ifmbe.org>
 80. Lee EW, Chen C, Prieto VE, Dry SM, Loh CT, Kee ST. Advanced hepatic ablation technique for creating complete cell death: Irreversible electroporation. *Radiology*. 2010;255(2):426–33.
 81. Siddiqui IA, Kirks RC, Latouche EL, DeWitt MR, Swet JH, Baker EH, et al. High-Frequency Irreversible Electroporation: Safety and Efficacy of Next-Generation Irreversible Electroporation Adjacent to Critical Hepatic Structures. *Surg Innov* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2018 Apr 18];24(3):276–83. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1553350617692202>
 82. Granata V, de Lutio di Castelguidone E, Fusco R, Catalano O, Piccirillo M, Palaia R, et al. Irreversible electroporation of hepatocellular carcinoma: preliminary report on the diagnostic accuracy of magnetic resonance, computer tomography, and contrast-enhanced ultrasound in evaluation of the ablated area. *Radiol Medica*. 2016;121(2):122–31.
 83. Fischbach F, Bunke J, Thormann M, Gaffke G, Jungnickel K, Smink J, et al. MR-guided freehand biopsy of liver lesions with fast continuous imaging using a 1.0-T open MRI scanner: Experience in 50 patients. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2011;34(1):188–92.
 84. Lee EW, Loh CT, Kee ST. Imaging guided percutaneous irreversible electroporation: Ultrasound and immunohistological correlation. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2007;6(4):287–93. Available from: www.tcr.org
 85. Guo Y, Zhang Y, Klein R, Nijm GM, Sahakian A V., Omary RA, et al. Irreversible Electroporation Therapy in the Liver: Longitudinal Efficacy Studies in a Rat Model of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Feb 15;70(4):1555–63. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-09-3067>
 86. Cannon R, Ellis S, Hayes D, Narayanan G, Martin RCG. Safety and early efficacy of irreversible electroporation for hepatic tumors in proximity to vital structures. *J Surg Oncol*. 2013;107(5).
 87. Ben-David E, Appelbaum L, Sosna J, Nissenbaum I, Goldberg SN. Characterization of Irreversible Electroporation Ablation in In Vivo Porcine Liver. *Am J Roentgenol* [Internet]. 2012 Jan;198(1):W62–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194517>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194517>
literatuur alles/Ben-David et al. - 2012 - Characterization of irreversible electroporation ablation in in vivo porcine liver.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194517
 88. Lee YJ, Lu DSK, Osuagwu F, Lassman C. Irreversible Electroporation in Porcine Liver. *Invest Radiol* [Internet]. 2012 Nov;47(11):671–5. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00004424-201211000-00008>
 89. Vogel JA, van Veldhuisen E, Alles LK, Busch OR, Dijk F, van Gulik TM, et al. Time-Dependent Impact of Irreversible Electroporation on Pathology and Ablation Size in

- the Porcine Liver: A 24-Hour Experimental Study. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2019;18. Available from: <https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>
90. Rubinsky B, Onik G, Mikus P. Irreversible electroporation: A new ablation modality - Clinical implications. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2007;6(1):37–48. Available from: www.tcrt.org
 91. Sugimoto K, Moriyasu F, Kobayashi Y, Kasuya K, Nagakawa Y, Tsuchida A, et al. Assessment of Various Types of US Findings after Irreversible Electroporation in Porcine Liver: Comparison with Radiofrequency Ablation. *J Vasc Interv Radiol* [Internet]. 2015 Feb;26(2):279-287.e3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1051044314010677>
 92. Pompili M, Francica G. Irreversible electroporation for hepatic tumors. *J Ultrasound* [Internet]. 2019;22(1):1–3. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40477-019-00367-4>
 93. Dollinger M, Zeman F, Niessen C, Lang SA, Beyer LP, Müller M, et al. Bile Duct Injury after Irreversible Electroporation of Hepatic Malignancies: Evaluation of MR Imaging Findings and Laboratory Values. *J Vasc Interv Radiol* [Internet]. 2016 Jan 1;27(1):96–103. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1051044315009665>
 94. Edd JF, Horowitz L, Davalos R V., Mir LM, Rubinsky B. In vivo results of a new focal tissue ablation technique: Irreversible electroporation. *IEEE Trans Biomed Eng* [Internet]. 2006 Jul [cited 2018 Apr 10];53(5):1409–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16830945>
 95. Narayanan G, Froud T, Lo K, Barbary KJ, Perez-Rojas E, Yrizarry J. Pain analysis in patients with hepatocellular carcinoma: Irreversible electroporation versus radiofrequency ablation - Initial observations. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2013;36(1):176–82.
 96. AngioDynamics. NanoKnife® User Manual United States Edition. NanoKnife® User Manual United States Edition. AngioDynamics; 2009.
 97. Niessen C, Beyer LP, Pregler B, Dollinger M, Trabold B, Schlitt HJ, et al. Percutaneous ablation of hepatic tumors using irreversible electroporation: A prospective safety and midterm efficacy study in 34 patients. *J Vasc Interv Radiol* [Internet]. 2016;27(4):480–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvir.2015.12.025>
 98. Dollinger M, Beyer LP, Haimerl M, Niessen C, Jung EM, Zeman F, et al. Adverse effects of irreversible electroporation of malignant liver tumors under CT fluoroscopic guidance: A single-center experience. *Diagnostic Interv Radiol*. 2015;21(6):471–5.
 99. Verloh N, Jensch I, Lürken L, Haimerl M, Dollinger M, Renner P, et al. Similar complication rates for irreversible electroporation and thermal ablation in patients with hepatocellular tumors. *Radiol Oncol*. 2019;53(1):116–22.
 100. Sutter O, Calvo J, N’Kontchou G, Nault J-C, Ourabia R, Nahon P, et al. Safety and Efficacy of Irreversible Electroporation for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma Not Amenable to Thermal Ablation Techniques: A Retrospective Single-Center Case Series. *Radiology* [Internet]. 2017 Sep 28 [cited 2018 Mar 7];284(3):877–86. Available from: <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2017161413>
 101. Thomson KR, Cheung W, Ellis SJ, Federman D, Kavnoudias H, Loader-Oliver D, et al. Investigation of the safety of irreversible electroporation in humans. *J Vasc Interv Radiol* [Internet]. 2011;22(5):611–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvir.2010.12.014>
 102. Scheffer HJ, Nielsen K, De Jong MC, Van Tilborg AAJM, Vieveen JM, Bouwman A, et al. Irreversible electroporation for nonthermal tumor ablation in the clinical setting: A

- systematic review of safety and efficacy. *J Vasc Interv Radiol* [Internet]. 2014;25(7):997–1011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvir.2014.01.028>
103. Frühling P, Nilsson A, Duraj F, Haglund U, Norén A. Single-center nonrandomized clinical trial to assess the safety and efficacy of irreversible electroporation (IRE) ablation of liver tumors in humans: Short to mid-term results. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2017 Apr 11 [cited 2018 Mar 18];43(4):751–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28109674>
 104. Wagstaff PGK, Buijs M, van den Bos W, de Bruin DM, Zondervan PJ, de la Rosette JJMCH, et al. Irreversible electroporation: State of the art. *Onco Targets Ther*. 2016;9:2437–46.
 105. Chen Y, Moser MAJ, Luo Y, Zhang W, Zhang B. Chemical Enhancement of Irreversible Electroporation: A Review and Future Suggestions. *Technol Cancer Res Treat*. 2019;18:1–13.
 106. Faroja M, Ahmed M, Appelbaum L, Ben-David E, Moussa M, Sosna J, et al. Irreversible electroporation ablation: Is all the damage nonthermal? *Radiology* [Internet]. 2013;266(2):462–70. Available from: <http://radiology.rsna.org/lookup/suppl/doi:10.1148/radiol.12120609/-/DC1>
 107. Deodhar A, Monette S, Single GW, Hamilton WC, Thornton R, Maybody M, et al. Renal tissue ablation with irreversible electroporation: Preliminary results in a porcine model. *Urology* [Internet]. 2011;77(3):754–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2010.08.036>
 108. Vogel JA, Van Veldhuisen E, Agnass P, Crezee J, Dijk F, Verheij J, et al. Time-Dependent Impact of Irreversible Electroporation on Pancreas, Liver, Blood Vessels and Nerves: A Systematic Review of Experimental Studies. *PLoS One*. 2016;11:1–18.
 109. Scheffer HJ, Nielsen K, van Tilborg AAJM, Vieveen JM, Bouwman RA, Kazemier G, et al. Ablation of colorectal liver metastases by irreversible electroporation: results of the COLDFIRE-I ablate-and-resect study. *Eur Radiol*. 2014;24(10):2467–75.
 110. Padia SA, Johnson GE, Yeung RS, Park JO, Hippe DS, Kogut MJ. Irreversible electroporation in patients with hepatocellular carcinoma: Immediate versus delayed findings at mr imaging. *Radiology*. 2016;278(1):285–94.
 111. Hanson B. Necroptosis: A new way of dying? [Internet]. Vol. 17, *Cancer Biology and Therapy*. 2016 [cited 2018 Apr 25]. p. 899–910. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27434654>
 112. Guo Y, Zhang Y, Klein R, Nijm GM, Sahakian A V., Omary RA, et al. Irreversible electroporation therapy in the liver: Longitudinal efficacy studies in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 2010;70(4):1555–63. Available from: www.aacrjournals.org
 113. José A, Sobrevalls L, Ivorra A, Fillat C. Irreversible electroporation shows efficacy against pancreatic carcinoma without systemic toxicity in mouse models. *Cancer Lett* [Internet]. 2012 [cited 2021 Mar 10];317(1):16–23. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0304383511006690?token=E3E07668D43BED9251BB0EE31C6BC264020F7DC3034E312E1B76BD37B82236430E22E8BBD19AF657C27F52F29B7227FA>
 114. Van Den Bos W, Scheffer HJ, Vogel JA, Wagstaff PGK, De Bruin DM, De Jong MC, et al. Thermal Energy during Irreversible Electroporation and the Influence of Different Ablation Parameters. *J Vasc Interv Radiol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Mar 15];27(3):433–43. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1051044315010635?token=469F458D8CC>

BFCFCF7C17B021BE9785A5EDFA232D11CB2CC32D599CD8F03DB3548BEBAF173A5AF
8419068BE912220294

115. Ben-David E, Ahmed M, Faroja M, Moussa M, Wandel A, Sosna J, et al. Irreversible Electroporation : Treatment Effect Is Susceptible. *Radiology*. 2013;269(3):738–47.
116. Dunki-Jacobs EM, Philips P, Martin RCG. Evaluation of thermal injury to liver, pancreas and kidney during irreversible electroporation in an in vivo experimental model. *Br J Surg*. 2014;101(9):1113–21.
117. Kretz F-J, Schäffer J, Terboven T. *Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie*. Vol. 6. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. 128 p.
118. *Methoden Histologie Uni Mainz*. Methoden Histologie Uni Mainz [Internet]. Vol. 6. 2016. Available from: <https://www.unimedizin-mainz.de/fileadmin/kliniken/virologie/Dokumente/methoden>
119. Junqueira C. *Histologie*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1996.
120. Welsch PD med. D rer. nat. U. *Lehrbuch Histologie*. 2nd ed. München: Elsevier; 2006.
121. Avwioro G. Histochemical uses of Haematoxylin - A review. *Jpcs* [Internet]. 2011;1(April-June):24–34. Available from: http://www.arpapress.com/Volumes/JPCS/Vol1/JPCS_1_05.pdf
122. Ramulu S, Kale AD, Hallikerimath S, Kotrashetti V. Comparing modified papanicolaou stain with ayoub-shklar and haematoxylin-eosin stain for demonstration of keratin in paraffin embedded tissue sections. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2013;17(1):23–30.
123. Rolls G. 101 Steps to better histology. Melb Leica Microsystems [Internet]. 2008;132. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Steps+to+better+histology#0>
124. Brunt EM. Liver biopsy interpretation for the gastroenterologist. *Curr Gastroenterol Rep*. 2000;2(1):27–32.
125. Pietsch C, Schulz C, Rovira P, Kloas W, Burkhardt-Holm P. Organ damage and hepatic lipid accumulation in carp (*Cyprinus carpio* L.) after feed-borne exposure to the Mycotoxin, Deoxynivalenol (DON). *Toxins (Basel)*. 2014;6(2):756–78.
126. Zodrow JM, Stegeman JJ, Tanguay RL. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquat Toxicol*. 2004;66(1):25–38.
127. Von Eckardstein A. Labordiagnostik der Leberfibrose und der nichtalkoholischen Fettleber-Krankheit. *LaboratoriumsMedizin*. 2014;38(2):75–85.
128. Kubiak BD, Albert SP, Gatto LA, Snyder KP, Maier KG, Vieau CJ, et al. Peritoneal negative pressure therapy prevents multiple organ injury in a chronic porcine sepsis and ischemia/reperfusion model. *Shock*. 2010;34(5):525–34.
129. Papadopoulos F, Spinelli M, Valente S, Foroni L, Orrico C, Alviano F, et al. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. *Ultrastruct Pathol*. 2007;31(6):401–7.
130. Zimmerman A, Grand D, Charpentier K. Irreversible electroporation of hepatocellular carcinoma: patient selection and perspectives. *J Hepatocell Carcinoma*. 2017;Volume 4:49–58.
131. Long G, Bakos G, Shires PK, Gritter L, Crissman JW, Harris JL, et al. Histological and finite element analysis of cell death due to irreversible electroporation. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jun 10];13(6):561–9. Available from: www.tcr.org
132. Zhang Y, White SB, Nicolai JR, Zhang Z, West DL, Kim DH, et al. Multimodality imaging to assess immediate response to irreversible electroporation in a rat liver tumor

- model. *Radiology*. 2014;271(3):721–9.
133. Zhang Y, Guo Y, Ragin AB, Lewandowski RJ, Yang G-Y, Nijm GM, et al. MR Imaging to Assess Immediate Response to Irreversible Electroporation for Targeted Ablation of Liver Tissues: Preclinical Feasibility Studies in a Rodent Model. *Radiology* [Internet]. 2010 Aug;256(2):424–32. Available from: <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.10091955>
 134. Srimathveeravalli G, Cornelis F, Mashni J, Takaki H, Durack JC, Solomon SB, et al. Comparison of ablation defect on MR imaging with computer simulation estimated treatment zone following irreversible electroporation of patient prostate. *Springerplus*. 2016;5(1):1–9.
 135. Barabasch A, Distelmaier M, Heil P, Krämer NA, Kuhl CK, Bruners P. Magnetic Resonance Imaging Findings after Percutaneous Irreversible Electroporation of Liver Metastases: A Systematic Longitudinal Study. *Invest Radiol*. 2017;52(1):23–9.
 136. Fischbach F, Fischbach K. MRT der Leber Diagnostik, Differenzialdiagnostik, Therapieansätze [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2017 [cited 2024 Jul 23]. Available from: <https://shop.thieme.de/MRT-der-Leber/9783131994516>
 137. Lee YJ, Lu DSK, Osuagwu F, Lassman C. Irreversible electroporation in porcine liver: Acute computed tomography appearance of ablation zone with histopathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr*. 2013;37(2):154–8.
 138. Ringe KI, Husarik DB, Sirlin CB, Merkle EM. Gadoxetate disodium - enhanced MRI of the liver: Part 1, protocol optimization and lesion appearance in the noncirrhotic liver. *Am J Roentgenol*. 2010;195(1):13–28.
 139. Guo Y, Zhang Y, Nijm GM, Sahakian A V., Yang GY, Omary RA, et al. Irreversible electroporation in the liver: Contrast-enhanced inversion-recovery MR imaging approaches to differentiate reversibly electroporated penumbra from irreversibly electroporated ablation zones. *Radiology*. 2011;258(2):461–8.
 140. Qin Z, Jiang J, Long G, Lindgren B, Bischof JC. Irreversible electroporation: An in vivo study with dorsal skin fold chamber. *Ann Biomed Eng*. 2013;41(3):619–29.

8. Anhang

Histologische Arbeitsmethoden

Formalin Fixierung

gepuffertes Formalin:

9,07 g	KH ₂ PO ₄
11,86 g	Na ₂ HPO ₄
in 860 ml	aqua dest. lösen, und
140 ml	Formalin (37% Stammlösung) hinzugeben und gut mischen den pH bei 7,4 einstellen

Protokoll: Formalin-Fixierung

8-18 h	Gewebe in der fertig angesetzten Formalinlösung bei RT fixieren (Dauer je nach Größe des Gewebes)
2-6 h	Spülen der Gewebe in Leitungswasser, danach aufsteigende Alkoholreihe:
45-60 min	Isopropanol, 20%, in aqua dest.
45-60 min	Isopropanol, 40%, in aqua dest.
45-60 min	Isopropanol, 60%, in aqua dest.
45-60 min	Isopropanol, 80%, in aqua dest.
45-60 min	Isopropanol, 90%, in aqua dest.
45-60 min	Isopropanol, 100%, Nr. 1
45-60 min	Isopropanol, 100%, Nr. 2
8 bis 16h	Isopropanol, 100%, Nr. 3
1 Stunde	Xylol, Nr. 1
1 Stunde	Xylol, Nr. 2
1 Stunde	Xylol, Nr. 3
4 h	Paraffin, 55°-65°C, Nr. 1
8-16 h	Paraffin, 55°-65°C, Nr. 2
4 h	Paraffin, 55°-65°C, Nr. 3
	danach in heißem Paraffin einblocken

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen großen Dank an alle Personen aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

10. Tabellarischer Lebenslauf