

Martin Mory
Dr. med.

Hochenergetischer fokussierter Ultraschall zur lokalen Tumorthherapie: Untersuchungen am Beispiel des Dunning-Prostata-Karzinoms der Ratte

Geboren am 30.06.1969 in Davos/Schweiz
Reifeprüfung am 26.04.1989 in Schwäbisch Hall
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1989/90 bis WS 1996/97
Physikum am 17.09.1991 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 08.11.1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Debus

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war es, die Möglichkeit der nichtinvasiven perkutanen Ablation von solidem malignem Tumorgewebe mit Hilfe des hochenergetischen fokussierten Ultraschalls (HIFU) zu untersuchen. Gleichzeitig sollte mittels Kernspintomographie ein nicht-invasives Verfahren zur *on line* Therapie- und Temperaturüberwachung evaluiert werden.

Als Schallquelle wurden planare Hochleistungs-Ultraschallwandler mit einem nachgeschaltetem variabel fokussierenden Linsensystem verwendet. Die Piezokeramiken wurden bei Frequenzen von 448 kHz und 1,184 MHz angesteuert. Druck- und Temperaturmessung in den Ultraschallfeldern, sowie der indirekte Nachweis von Kavitation mit Hilfe des Terephthalsäure-Dosimeters erfolgten in den Ultraschallfeldern. Die MR-Thermometrie erfolgte *on line* und nichtinvasiv unter Einsatz eines Magnetresonanztomographen (1,5 Tesla SIEMENS Magnetom[®] SP 63/84) mit Hilfe einer T1-gewichteten Saturation-Recovery TurboFlash-Sequenz. Als Tumormodell verwendeten wir das subkutan am Hinterlauf transplantierte anaplastische syngene Dunning-Prostata-Karzinom der Copenhagen-Ratte. Der mittlere Tumordurchmesser zum Zeitpunkt der Beschallung betrug 10 mm \pm 2 mm. Zielgröße des makroskopischen Wachstums war die Zeit bis zum Erreichen des fünffachen Tumorausgangsvolumens. Als Kontrollgruppe dienten scheinbeschallte tumortragende Tiere. In den Untersuchungen zum Tumorwachstum nach Ultraschallapplikation wurden 50 anästhesierte Tiere in fünf Versuchsgruppen beschallt. Bei 448 kHz wurde mit insgesamt neun Schallpositionen das gesamte Tumolvolumen bei maximaler Intensität (1250 W/cm²) mit einer Beschallungszeit von 15, bzw. 30 Sekunden abgetastet. Bei 1,184 MHz wurde einmalig das Tumorzentrum mit maximaler Intensität (3500 W/cm²) über 7, bzw. 30 Sekunden, sowie bei halbmaximaler Intensität (1750 W/cm²) über 60 Sekunden beschallt. Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurden bei 40 Tieren Tumore 24, bzw. 72 Stunden nach Beschallung zur Aufarbeitung entnommen. Die immunhistochemische Bestimmung des Proliferationsindices erfolgte 72 Stunden nach Beschallung mit Hilfe des Nachweises von zuvor appliziertem Bromdesoxyuridin (BrdU). Die Quantifizierung wurde computergestützt mit Hilfe des LEICA Quantimet 600 vorgenommen. Darüber hinaus wurde der Nachweis von Hitze-Schock-Proteins HSP 72 auf Tumorgewebeschnitten nach Ultraschallapplikation durchgeführt.

Die Druckverteilung zeigte nach Linsenfokussierung einen Maximalwert von 6,75 MPa (448 kHz), bzw. 10,20 MPa (1,184 MHz) im Abstand f von der Linse. Im biologischen Gewebe *ex vivo* kam es zu einer Temperaturerhöhung von 30-40°K im Fokusbereich bei maximaler Schallintensität von 3500 W/cm² über 30 Sekunden, bereits im Abstand von 10 mm zum Fokus konnte keine biologisch relevante Temperaturerhöhung gemessen werden. Bei 448 kHz konnte indirekt mit Hilfe des Terephthalsäure-Dosimeters eine intensitäts- und zeitabhängige Zunahme der Kavitationsereignisse

nachgewiesen werden, bei den unbeschallten, sowie bei den mit 1,184 MHz beschallten Proben konnte keine Kavitation detektiert werden. Die zur MR-Thermometrie verwendete T1-gewichtete TurboFlash Sequenz führte nach Beschallung zu einer Hypointensität. Aus der linearen T1-Temperatur-Relation konnte über die Differenz der Signalintensität die aktuelle Gewebetemperatur mit einer Genauigkeit von 2-3°C innerhalb von ca. 4 Sekunden bestimmt werden. Die Bildakquisition dauerte bei einer Schichtdicke von 6 mm und einem räumlichen Auflösungsvermögen von 1,2 mm insgesamt 1,2 Sekunden. Die so errechnete Maximaltemperatur im subkutan transplantierten Dunning-Karzinom in vivo nach perkutaner Beschallung über 50 Sekunden mit 3500 W/cm² betrug maximal 72°C. Auf stark T2-gewichteten SpinEcho Aufnahmen konnten die Gewebeveränderungen nach Ultraschallapplikation dargestellt werden.

Die makroskopische Ausdehnung der thermischen Koagulationsnekrose entsprechenden längsovalen hellen Läsionen korrelierte ex vivo bei 1,184 MHz eng mit der Dauer der Beschallung und der Höhe der eingestrahlten Intensität, nicht dagegen bei 448 kHz. Bei einer 30 Sekunden dauernden Beschallung mit maximaler Fokusintensität von 3500 W/cm² betrug die Ausdehnung 5 mm radial und 15 mm axial. Das makroskopische Wachstum im Tumormodell zeigte nach Beschallung des gesamten Tumolvolumens mit 9×1500 W/cm² (448 kHz) bei 15 und bei 30 Sekunden jeweils eine Verzögerung von 4,9 Tagen gegenüber der Kontrollgruppe (p < 0,01; Wilcoxon). Die einmalige Beschallung des Tumorzentrums bei maximaler Intensität von 3500 W/cm² (1,184 MHz) über 7 Sekunden führte zu einer Verzögerung von 3,8 Tagen, über 30 Sekunden zu 5,3 Tagen (p < 0,01; Wilcoxon) und bei halbmaximaler Intensität über 60 Sekunden zu einer Verzögerung von 5,5 Tagen (p < 0,01; Wilcoxon). In der histologischen Auswertung zeigten sich nach Ultraschallapplikation scharf demarkierte Nekrosen innerhalb des Fokusareals bei intakt erscheinender Umgebung. Die Ausdehnung der Läsionen korrelierte eng mit der Dauer der Beschallung und der Höhe der eingestrahlten Energie. Die Tumore in der Kontrollgruppe wiesen über den Beobachtungszeitraum kaum spontane Nekrosen auf. Für den Proliferationsindex 48 Stunden nach Ultraschallapplikation ergab sich nach einmaliger Beschallung eine Reduzierung der Bromdesoxyuridin-markierten Tumorzellen um den Faktor 5 bis 50 in Abhängigkeit von der Höhe der eingestrahlten Energie und der Dauer der Applikation. In den beschallten Tumoren konnte keine Exprimierung von HSP 72 nachgewiesen werden.

In den Ultraschallfeldern konnte mit Hilfe der Fokussierung die Intensität in biologischem Gewebe um den Faktor 15 gegenüber dem unfokussierten Schallfeld gesteigert werden. Die perkutane Beschallung führte so zu einer für die Therapie maligner Tumore ausreichenden Temperaturerhöhung von bis zu 72°C im biologischen Gewebe. Bei 448 kHz konnten die stark schwankenden Ergebnisse für Druck und Temperatur durch die Entstehung von Kavitation erklärt werden, welche möglicherweise zur Behinderung der Schallausbreitung führen. Die Beobachtung der Läsionsgröße und des makroskopischen Wachstums nach Beschallung des gesamten Tumorgewebes bei 448 kHz lieferte stark schwankende Ergebnisse. Dies ist durch die subkutane Lage des Tumors mit der direkt anliegenden Grenzschicht Wasser-Haut zu erklären, welche die Entstehung von Kavitation begünstigt. Bei 1,184 MHz konnten keine Kavitationsereignisse nachgewiesen werden, es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen Läsionsgröße und eingestrahlter Intensität, sowie Dauer der Beschallung. Die makroskopischen Tumorstadiumsverzögerung nach Beschallung konnte gut reproduziert werden. Bei 1,184 MHz zeigte sich eine bis zu 50fache Erniedrigung des Proliferationsindex 72 Stunden nach einmaliger Beschallung. Der fehlende Nachweis von HSP 72 auf Gewebeschnitten beschallter Tumore weist auf einen sofortigen irreversiblen Zelltod durch die Erwärmung hin. Die kernspintomographische Kontrolle erlaubte eine Überwachung der Ultraschallapplikation bei guter räumlicher und zeitlicher Temperaturauflösung.

Zur lokoregionären Tumorthherapie werden Ultraschall-, Laser- und Kryochirurgie eingesetzt. Vorteil des fokussierten Ultraschalls stellt die fehlende Invasivität, die Ablation solider Tumore unter Schonung der Umgebung und die hohe Flexibilität in der Anwendung dar. Möglicherweise ist dieses lokal ablativ Verfahren in der Lage, bei Vorliegen von Kontraindikationen zur

chirurgischen Tumorresektion neben der systemischen, bzw. regionalen Chemotherapie die Tumorkontrollrate und somit das Überleben positiv zu beeinflussen. Die Effektivität einer Wiederholung der Ultraschalltherapie muß in weiterführenden Studien untersucht werden. Erschwerend wirkt sich für das Verfahren die Anforderung an eine ungehinderte Schallausbreitung im Gewebe aus. Insbesondere die anatomische Beziehung der Leber zum Rippenbogen und der Lunge, sowie die Atemverschieblichkeit des Organs erschweren den Zugang.

Die vorliegenden vielversprechenden Ergebnisse lassen eine zukünftige Anwendung von hochenergetischem fokussiertem Ultraschall in der Therapie solider Tumore erwarten. Technische Entwicklungen fokussieren auf die Entwicklung von perkutan, als auch laparoskopisch oder intraoperativ anwendbarer Ultraschallapplikatoren unter kernspintomographischer Temperaturüberwachung.