

# **HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG ZUR BI- UND MULTIPOLAREN RADIOFREQUENZABLATION DER NIERE**

Kumulative Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinæ  
(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

Eingereicht von:  
Lisa Blachut, geb. 21.07.1984 in Leipzig

Angefertigt an der Universität Leipzig,  
Klinik für Urologie

Betreut von:  
Prof. Dr. med. Jens-Uwe Stolzenburg und PD Dr. rer. nat. habil. Jochen Neuhaus

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 23.06.2015

# Bibliographische Beschreibung

Blachut, Lisa

## Titel der Arbeit

Histologische Untersuchung zur bi- und multipolaren Radiofrequenzablation der Niere

Universität Leipzig, Dissertation

Textteil: 33 S., 6 Abb., 1 Tab., 107 Lit.

## Referat

Das Nierenzellkarzinom ist in Europa die 10. häufigste Tumorerkrankung [1]. Da das Prädiagnosealter bei 62 Jahren liegt [2] und die Inzidenz mit steigendem Alter zunimmt, geht die Erkrankung häufig mit einer Vielzahl an Komorbiditäten einher. Dies fordert eine Auseinandersetzung mit der Anwendung minimal invasiver Methoden, die das operative Risiko minimieren. Immer noch wird die Therapie durch radikale Nephrektomie favorisiert. Ziel der Studie war es deshalb Entscheidungshilfen für die Anwendung der Radiofrequenzablation (RFA) zu liefern. Daher untersuchten wir an Hausschweinen technische Einflussgrößen auf Behandlungszeit, Ablationsvolumen und Läsionsform bei bipolarer und multipolarer RFA im Vergleich. Dabei ergaben sich nach 3-D-Rekonstruktion größere Ablationsvolumina im multipolaren Modus, wobei sich signifikante Formunterschiede in beiden Anwendungen herauskristallisierten. Bei multipolarer RFA ergaben sich größere Inhomogenitäten. Die Ablation kleinerer Tumorgößen unter 2 cm erscheint mit bipolarer RFA sicher. Patienten mit Tumoren bis zu 3 cm profitieren von multipolarer Radiofrequenzablation. Die Anwendung multipolarer RFA bei Tumoren größer 3 cm gestaltet sich durch die inhomogene Ablation schwierig und bietet ein schwer kalkulierbares Risiko für die Patienten. Es konnte kein Vorteil durch Steigerung des Energietransfers innerhalb eines Modus nachgewiesen werden, da dies mit einer längeren Behandlungszeit einherging, jedoch nicht mit einer Zunahme der Läsionsgröße korrelierte. Bei Patienten mit Niereninsuffizienz, Einzelnieren oder bilateralen Tumoren liegt ein Hauptaugenmerk der Therapie auf dem Erhalt der Nierenfunktion. Um eine mögliche Schädigung von gesundem Nierengewebe durch die RFA zu detektieren, färbten wir die Markerproteine aktivierte Caspase3 und HSP70 immunohistochemisch an. Bei Ablation nahe des Nierenbeckenkelchsystems konnten beide Proteine sowohl im System des distalen Sammelrohrs, als auch im Nierenmark gefunden werden. Hauptsächlich war das Auftreten jedoch auf die Randgebiete der zentralen Koagulationszone begrenzt. Die Radiofrequenzablation scheint daher ein sicheres Verfahren für die Therapie von Tumoren  $\leq 3$  cm zu sein.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einführung und Fragestellungen</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Einführung</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Das Nierenzellkarzinom</b>	<b>2</b>
1.2.1 Epidemiologie	2
1.2.2 Risikofaktoren	3
1.2.3 Klinik des Nierenzellkarzinoms	4
1.2.4 Diagnostik und Therapieverfahren bei Nierenzellkarzinomen	4
<b>1.3 Radiofrequenzablation</b>	<b>7</b>
1.3.1 Pathophysiologie und Technische Details der Radiofrequenzablation	7
1.3.2 Monopolare, bipolare und multipolare Radiofrequenzablation	8
1.3.3 Histologische Betrachtungen der Radiofrequenzablation	9
<b>1.4 Theoretische Einführung in die Untersuchungsparameter</b>	<b>10</b>
1.4.1 Apoptose und Enzyme der Apoptosekaskade	10
1.4.2 Heat Shock Proteine	12
<b>1.5 Fragestellungen und Ziele der Studie</b>	<b>13</b>
<b>2 Publikationsmanuskript</b>	<b>14</b>
<b>3 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen</b>	<b>23</b>
<b>4 Literaturverzeichnis</b>	<b>28</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AIF</b>	Apoptosis Inducing Factor
<b>Apaf-1</b>	Apoptotic Protease Activating Factor-1
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BAG-1</b>	Bcl-2 associated athanogene-1
<b>BAG-3</b>	Bcl-2 associated athanogene-3
<b>Bcl-2</b>	B-Cell Leukemia-2
<b>BID</b>	BH3-interacting Domain death agonist
<b>BMI</b>	Body mass index
<b>Caspase</b>	Cysteiny-l-aspartate-specific-proteases
<b>dATP</b>	desoxadenosintriphosphat
<b>DISC</b>	Death Inducing Signaling Complex
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EAU</b>	European Association of Urology
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>FADD</b>	Fas-Associated protein with Death Domain
<b>FasI</b>	Fas Ligand
<b>GEKID</b>	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
<b>HIFU</b>	High intensive focused Ultrasound
<b>HSP</b>	Hitzeschockproteine
<b>KJ</b>	KiloJoule
<b>MMP</b>	Mitochondriale Membranpermeabilisation
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomografie
<b>PN</b>	Partielle Nephrektomie
<b>RFA</b>	Radiofrequenzablation
<b>RN</b>	Radikale Nephrektomie
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>TRAIL</b>	Tumor Nekrose Faktor - related apoptosis induced Ligand

# 1 EINFÜHRUNG UND FRAGESTELLUNGEN

## 1.1 EINFÜHRUNG

Die Inzidenz des Nierenzellkarzinoms steigt mit zunehmendem Alter und erreicht ein Plateau um die 70-75 Jahre [3].

Die Mehrzahl der Patienten in diesem Alter haben Nebenerkrankungen. Auch die Nierenfunktion nimmt mit steigendem Alter ab. Diese Patienten haben ein erhöhtes perioperatives Risiko. Trotzdem ist die radikale Nephrektomie (RN) weiterhin der Goldstandard [4], obwohl sie das Risiko erhöht, ein Stadium IV der chronischen Niereninsuffizienz zu entwickeln [5–7]. Das wiederum hat Auswirkungen auf die Morbidität in Hinblick auf kardiologischen Folgeschäden, welche massiv zunehmen [8]. Diese Patienten könnten von der Anwendung der Radiofrequenzablation (RFA) profitieren. Zudem werden zunehmend Nierentumore im Frühstadium entdeckt, bedingt durch die Fortschritte in der bildgebenden Diagnostik. Diese kleinen, peripher liegenden und lokal begrenzten Tumore machen 60-70% aller entdeckten Neubildungen der Niere aus [9]. Es stellt sich die Frage, warum die RFA bei Patienten mit Niereninsuffizienz, Einzelnieren oder hohem Operationsrisiko im Vergleich zur RN so wenig zum Einsatz kommt, wo sie doch ein vergleichbares onkologisches Outcome bei kleinen Tumoren verspricht [6].

Es liegen bisher nur wenige Untersuchungen zur Sicherheit und Technik der bi- und multipolaren RFA vor, die insgesamt größere Ablationsvolumina versprechen [10,11]. Wir untersuchten daher technische Einflussgrößen auf die Ablationsvolumina, sowie auf die Form und Homogenität der ablatierten Areale und visualisierten dies mit Hilfe einer 3D-Rekonstruktion von Serienschnitten.

Da man weiß, dass prolongierte Hyperthermie über 40°C zu Apoptose führen kann [12] und Apoptose nach RFA im Lebergewebe nachgewiesen werden konnte [13–15], untersuchten wir mithilfe des Apoptosemarkers Caspase3 die Effekte der Wärmestreuung im Nierengewebe. Dies ist vor allem klinisch bedeutsam, betrachtet man die Anwendung der RFA bei Niereninsuffizienz, Einzelnieren oder bilateralen Tumoren der Niere, wo die Funktion des Restgewebes erhalten bleiben muss.

Um weitere Streuung der Hitze, welche nicht zum Tode führt, nachzuweisen, detektierten wir das Hitzeschockprotein HSP70, welches Zellen bei Stress vor Apoptose schützt.

## 1.2 DAS NIERENZELLKARZINOM

### 1.2.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom ist mit 90% der am häufigsten in der Niere vorkommende maligne Tumor, sodass im Folgenden vornehmlich auf diesen Tumor eingegangen wird.

Andere Tumoren sind z.B. Sarkome, Nephroblastome, Transitionalzellkarzinome, Embryonalkarzinome, Neuroblastome und Metastasen [16].

Das Nierenzellkarzinom, welches histologisch als Adenokarzinom imponiert, ist für 3% aller Tumorerkrankungen bei Frauen und für 5% der Tumorerkrankungen bei Männern verantwortlich [17]. Global erkrankten 2008 rund 271.000 Menschen an Nierenzellkarzinomen [18]. Die Inzidenz ist je nach geografischer Lage unterschiedlich. Die höchsten Raten sind in Europa, Nordamerika und Australien zu verzeichnen, während in Indien, Japan, Afrika und China Nierenzellkarzinome seltener auftreten [19]. Auch innerhalb Deutschlands fällt auf, dass die Erkrankungs- und Sterberaten in den neuen Bundesländern im Vergleich mit den alten Bundesländern höher ausfallen [20]. Die Häufigkeit des Nierenzellkarzinoms nahm in den letzten Dekaden stetig zu [17,21,22] und stabilisiert sich nun europaweit [19].

In den 70er Jahren betrug die Anzahl der Neuerkrankungen in den Industriestaaten noch 6-7 pro 100.000 Einwohner [23]. Derzeit liegt die Anzahl der Neuerkrankungen für Deutschland bei 22,3 bzw. 13,4/100.000 für Männer bzw. Frauen. Laut der GEKID wird für 2014 eine Inzidenz von 23,9 bzw. 14,5/100.000 für Männer bzw. Frauen erwartet. Männer sind zweimal häufiger betroffen als Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der 6. Lebensdekade [2], wobei jedoch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens mit dem Alter steigt [19]. Die relative Überlebensrate des Nierenzellkarzinoms erscheint mit 75% bei Männern und 77% bei Frauen prognostisch günstig [20]. Der ausschlaggebende Anteil für die Prognose ist jedoch die Metastasierung. Die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt nach Diagnose einer Metastasierung nur noch ca. 50% [2,20]. Insgesamt ist die Mortalitätsrate für Nierentumoren in Europa zwischen den achtziger und neunziger Jahren angestiegen, während sich die Sterberate nun stabilisiert oder teilweise sinkt [19]. In Deutschland ist die Mortalität auf derzeit 7,7/100.000 für Männer und 5,2/100.000 für Frauen gesunken [19], was unter anderem an der frühen Diagnosestellung mittels Sonografie und anderer bildgebender Verfahren liegen könnte.

### 1.2.2 Risikofaktoren

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Nierentumoren spielen Risikofaktoren.

Man kann diese für das Nierenzellkarzinom in 3 Kategorien unterteilen.

#### 1. Karzinogene Substanzen:

Sie spielen vor allem als berufsbedingte Expositionen eine Rolle. Das sind zum Beispiel Halogenkohlenwasserstoffe, Cadmium, Blei, petrochemische Substanzen, Thorotrast, Teer und Holzschutzmittel. Auch Genussmittel wie Kautabak und Nikotin [24] erhöhen die Gefahr an einem Nierentumor zu erkranken.

#### 2. Epidemiologische Risikofaktoren:

Sie erfahren einen zunehmenden Stellenwert in unserer Gesellschaft und werden als wichtige Ansatzpunkte für die Prävention diskutiert. Solche epidemiologischen Risikofaktoren sind der arterielle Hypertonus [25], ein niedriger sozialer Status, und die urbane Herkunft [3]. Sport hingegen scheint protektiv zu sein. Ein großer Zusammenhang besteht auch zwischen Adipositas und Nierenkrebs [26]. Bei Frauen erhöht sich das Risiko für Nierenkrebs um 34%, bei Männern um 24% mit jeder Erhöhung des body mass index (BMI) um 5kg/m<sup>2</sup> [26]. Die Niereninsuffizienz [27,28] ist ein wesentlicher Risikofaktor der für eine minimal invasive Behandlungsmethode spricht. Der Erhalt der Nierenfunktion ist dabei entscheidend. Gerade für diese Patienten erscheint die in unserer Studie untersuchte Sicherheit der Radiofrequenzablation in Hinblick auf Zelltod in der Koagulationszone und Zellschädigungen außerhalb der Koagulationszone wichtig.

Bezüglich weiterer Risikofaktoren wie z .B. erhöhter Konsum von Fetten und Proteinen mit der Nahrung, sowie Alkoholkonsum oder vorangegangene Infektionen des Urogenitalsystems zeigen die Studien uneinheitliche Ergebnisse, sodass hier weiterhin ein hoher Forschungsbedarf besteht.

#### 3. Familiäre Disposition:

Mit 3% aller Nierenzellkarzinome macht sie nur einen geringen Teil der Nierenzellkarzinome aus. Jedoch verdoppelt sich das Risiko für erstgradige Verwandte von betroffenen Patienten [29]. Auch seltene genetisch bedingte Syndrome wie z.B. das von Hippel-Lindau-Syndrom oder die Tuberöse Sklerose gehen vermehrt mit Nierenzellkarzinomen einher. Diese sind oft multifokal und treten häufiger schon in einem jüngeren Lebensalter auf [20].

### 1.2.3 Klinik Des Nierenzellkarzinoms

Da ca. 40% aller Nierentumoren inzidentell aufgefunden werden sind ausgeprägte klinische Symptome selten [2]. Diese sind vor allem Hämaturie, Flankenschmerzen, welche durch Nekrosen, Infiltrationen oder Einblutungen entstehen, und ein tastbarer Tumor oder eine neu aufgetretene Varikozele. Insbesondere die Hämaturie ist ein Spätsymptom, weil diese erst durch Einbruch des Tumors in das Nierenbeckenkelchsystem entsteht. Allgemeine Symptome wie Leistungsabfall, Gewichtsverlust, subfebrile Temperaturen, Anämie und Nachtschweiß sprechen eher für ein fortgeschrittenes Stadium [2]. Metastasen-bedingte Symptome können Hyperkalziämie und Knochenschmerzen bei Skelettbefall, Husten und Dyspnoe bei pulmonaler Beteiligung oder neurologische Ausfälle bei zerebraler Manifestation sein [30].

---

### 1.2.4 Diagnostik Und Therapieverfahren Bei Nierenzellkarzinomen

Neben der ausführlichen Anamnese und einer kompletten körperlichen Untersuchung spielt vor allem die Abdomensonografie eine wichtige Rolle. Ein Großteil der Nierenzellkarzinome wird heutzutage mittels Abdomensonografie entdeckt. Zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose erfolgen weitere Untersuchungen mittels Kontrastmittel-Computertomografie (CT), im Falle einer Allergie auf Kontrastmittel oder bei Niereninsuffizienz wird stattdessen ein MRT durchgeführt. Im Labor werden Parameter wie Urinstatus, Blutbild, Elektrolyte (Na, K, Ca), LDH, Nierenfunktionsparameter, Leberwerte und die Gerinnung untersucht. Da es für das Nierenzellkarzinom derzeit noch keine etablierten Tumormarker gibt, sind Laborparameter eher unspezifisch [2]. Bevor man eine Einteilung in die Tumorstadien nach der TNM-Klassifikation treffen kann, sollte nach Bestätigung der Verdachtsdiagnose die Ausbreitungsdiagnostik zur Suche nach Fernmetastasen erfolgen. Die TNM-Klassifikation definiert die anatomische Ausdehnung der Erkrankung [31], wobei T für Tumor, N für Nodes (Lymphknotenbefall) und M für Metastasen steht (Tabelle 1). Nach der TNM-Klassifikation richtet sich der Algorithmus der Primärtherapie. Eine Biopsie ist derzeit einzig bei Anwendung von ablativen oder systemischen Therapien ohne vorherige Histologie und bei abwartender Beobachtung indiziert [32,33]. Der einzige kurative Behandlungsansatz für das Nierenzellkarzinom ist die operative Therapie. Chemotherapie, Hormontherapie, Immuntherapie und Strahlentherapie sind nur wenig wirksam und werden eher zur Palliation angewendet [2]. Die Targeted-Therapie, bei der Substanzen Wachstumssignale modifizieren, gewinnt v. a. in der Second-Line-Therapie zunehmend an Bedeutung [2]. Bei der operativen Versorgung ist noch immer die radikale Nephrektomie (RN) die am häufigsten angewendete Therapie [34].

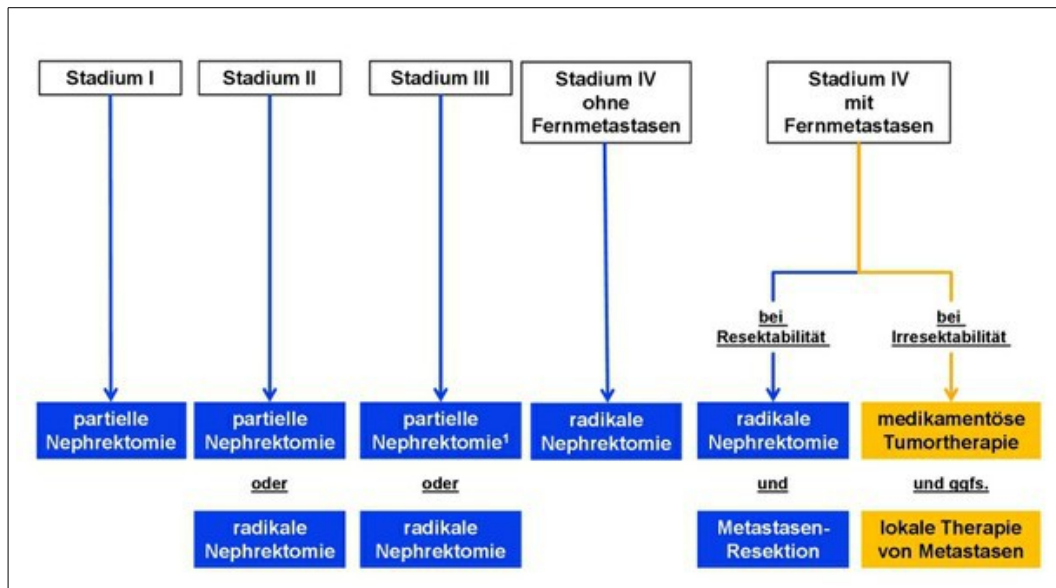


**Tabelle 1:** Klassifikation der Tumorstadien ( modifiziert nach F3 Leitlinie der DGU [2])

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fernmetastasen
I	T1a < 4cm	N0	M0
	T1b > 4cm < 7cm		
II	T2 > 7cm, auf die Niere begrenzt	N0	M0
III	T3 a	N0	M0
	T3 b-c	N1	
IV	T4	N0, N1	M0
	Alle T	Alle N	M1
T1 Tumor ≤ 7 cm, auf die Niere begrenzt		N0 keine Metastasen	
T1a Tumor ≤ 4 cm		N1 Metastase in einem solitären regionären Lymphknoten	
T1b Tumor > 4 cm, aber nicht > 7 cm		N2 Metastasen in mehr als einem Lymphknoten	
T2 Tumor > 7 cm, auf die Niere begrenzt		M1 Fernmetastasen	
T3 Invasion in Nebenniere, perirenales Fettgewebe (T3a) oder größere Venen (T3b, T3c) ohne Überschreitung der Fascia gerota			
T4 Durchbruch der Fascia gerota			

Sie geht mit einem erhöhten Risiko für chronische Niereninsuffizienz Stadium IV einher [5]. Das wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit kardiologische Folgeschäden zu entwickeln [5,8]. Einen wichtigen Stellenwert wird die RN weiterhin bei großen Tumoren einnehmen mit der Möglichkeit großzügig Tumorgewebe und Lymphknoten entfernen zu können. Eine Alternative stellen organerhaltende Verfahren wie die partielle Nephrektomie (PN), die Kryotherapie, die Behandlung mit hochintensivem fokussierten Ultraschall (HIFU), Mikrowellenablation, die irreversible Elektroporation und die Radiofrequenzablation dar. Diese Verfahren können aufgrund des Organerhalts vor allem bei Patienten mit Einzelniere, chronischer Niereninsuffizienz, bilateralen Tumoren und bei erhöhtem operativen Risiko sinnvoll angewendet werden [2] und zeigen zudem vergleichbare onkologische Ergebnisse mit der RN [6]. Obgleich laut der deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) organerhaltende Verfahren immer häufiger bevorzugt werden [35], haben diese außer der partiellen Nephrektomie in den Algorithmen für die Primärtherapie des Nierenzellkarzinoms der DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie) derzeit jedoch nur einen geringen Stellenwert (Abb. 1).

Abbildung 1: Algorithmus für die Primärtherapie nach DGHO [30]



Die erste Anwendung der RFA für ein einzelnes Organ (Leber) geht auf das Jahr 1990 zurück [36]. Erst 1997 wurde erstmals von der Ablation eines Nierentumors berichtet [37]. Anwendung findet die RFA unter anderem bei der Behandlung von Metastasen, vor allem Metastasen der Leber, zur Eradikation von Schleimhautdysplasien bei Barrett-Ösophagus [38], zur Therapie von Herzrhythmusstörungen [39] und bei der Behandlung von Primärtumoren der Niere. Sie wird perkutan mittels Sonografie oder CT- gestützt angewendet oder kann laparoskopisch erfolgen. Die Komplikationsrate ist mit 8-13% sehr niedrig [40,41]. Zumal die Komplikationen meist leicht zu behandeln sind und eine geringe Morbidität aufweisen. Zu den schwerwiegenden Komplikationen zählen Verletzungen des Darms und des Ureters, massive Blutungen, Residuen und Rezidivtumoren. Kleinere Komplikationen schließen Hämatome, Schmerzen, Hämaturie, Infarzierungen, Pneumothoraces, entzündliche Läsionen und neuromuskuläre Verletzungen ein. Diese bedürfen häufig keiner Intervention, lediglich der Observation. Betrachtet man, dass bei PN eine Komplikationsrate von 20% vorliegt, kann man sagen, dass RFA eine relativ risikoarme Methode darstellt [42], die bei T1-klassifizierten Tumoren zunehmend angewendet werden sollte. Die PN birgt nach der Metaanalyse von Campbell et al. sogar das höchste Risiko für urologische Komplikationen, wie z .B. Leckagen oder postoperativen Hämorrhagien [43]. Die Kryoablation von Zonen größer 3 cm erhöht die Inzidenz von Blutungen und ist mit einem signifikanten Anstieg an Morbidität assoziiert [44]. Auch die Mikrowellenablation, sowie die HIFU sind Verfahren, die technisch noch viele Limitationen aufweisen und weiterer Evaluation bedürfen [45,46].

### 1.3 RADIOFREQUENZABLATION

#### 1.3.1 Pathophysiologie Und Technische Details Der Radiofrequenzablation

Bei der Radiofrequenzablation wird in einem Generator hochfrequenter Wechselstrom erzeugt. Dieser Hochfrequenzstrom wird dem Zielgewebe über einen Applikator (Elektroden) zugeführt. Der schnelle Richtungswechsel des Stromes bringt die Ionen im Gewebe zum Schwingen und erzeugt somit Wärme, die fortgeleitet wird [47]. Die Ablationszonen entstehen, indem die Wärme kleine Gefäße thrombost und Gewebe nekrotisiert [48]. Die Kontrolle der Gewebeerstörung erfolgt durch die Messung des elektrischen Widerstandes (Resistance). Gemessen werden zudem der Energietransfer und die effektive Leistung (Power). Um Tumorzellverschleppung und Blutungen zu vermeiden, wird der Einführungskanal beim Retrahieren des Applikators durch hohen Stromfluss koaguliert.

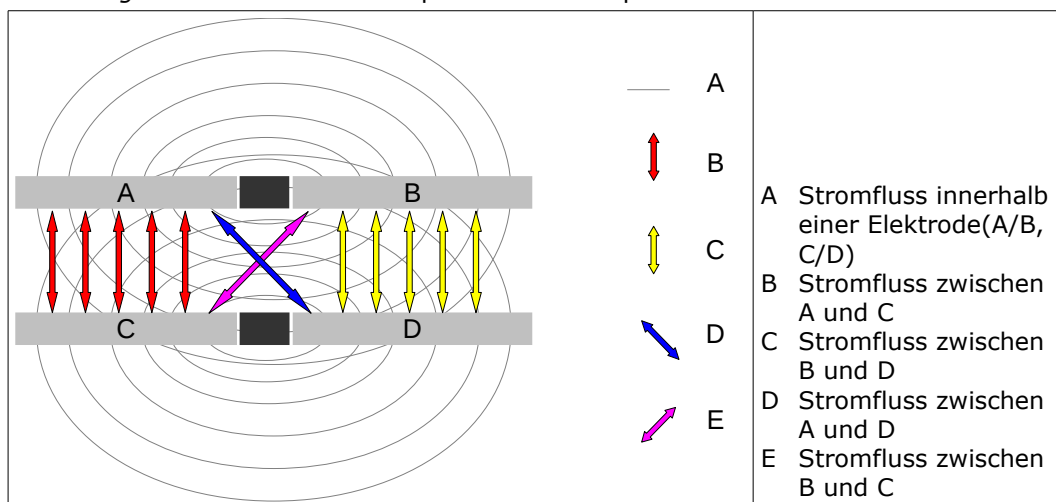
Zwei Faktoren scheinen den Erfolg der RFA zu bestimmen. Zum einen ist die TumorgroÙe entscheidend und zum anderen die Tumorlokalisation [49]. Mit wachsender Entfernung von der Elektrode nimmt die Wärme exponentiell ab [50]. Das erklärt zum Teil, warum eine sichere Ablation bisher nur für kleine Nierentumoren (<4cm) gelingt [40]. Befindet sich die Ablationszone in der Nähe von größeren GefäÙen oder dem Nierenbeckenkelchsystem, so wirken diese als Schutzschilder für dahinterliegendes Gewebe und verhindern die Weiterübertragung der Hitze [48]. Dieser sogenannte „Heat-sink“ Effekt tritt vor allem bei zentral gelegen Tumoren mit Nähe zu großen GefäÙen und dem Sammelrohrsystem auf. Kortikomedulläre Tumoren können daher nicht sicher ablatiert werden [51]. Des Weiteren führt ein zunehmendes Austrocknen, v.a im Gewebe um die Elektrode, zu einer Erhöhung des Widerstandes und damit zu reduziertem Stromfluss [52]. Das limitiert die Wärmeausbreitung und somit die Wirksamkeit der Ablation [52]. Verschiedene Firmen haben daher Elektroden entwickelt, die mit einer Kochsalzlösung intern gekühlt werden, so dass maximale Temperaturen von 25°C um die Elektroden erreicht werden. Steigt trotzdem der Widerstand, so setzt der Impedanz-Kontroll-Mode den Strom für 15 Sekunden aus. Damit wird ein weiterer Temperaturanstieg um die Elektrode verhindert [53].

### 1.3.2 Monopolare, Bipolare Und Multipolare Radiofrequenzablation

Bisher werden hauptsächlich monopolare Elektroden zur Radiofrequenzablation verwendet. Dabei fließt der Strom zwischen der aktiven Elektrode und einer Neutralelektrode auf der Haut des Patienten. Es kann zu Verbrennungen an der Neutralelektrode kommen [54] oder metallische Materialien, welche sich innerhalb des Stromkreises befinden (Schrittmacher, Clips) können sich erhitzen. Eine weitere Grenze stellt die Größe der Ablationszone bei monopolarer RFA dar. Diese ist aufgrund der Abnahme der Stromstärke mit Distanz zur Elektrode stark limitiert [50].

Um mit einer RFA-Sitzung größere Ablationszonen zu erreichen und die Nachteile der monopolaren RFA zu umgehen, wurden bipolare Elektroden entwickelt. Der bipolare Applikator trägt 2 Elektroden, welche durch einen Isolierkörper voneinander getrennt sind. Der Strom fließt zwischen diesen beiden Elektroden. Werden nun 2 bipolare Elektroden verwendet, dann spricht man von multipolarer RFA, denn es gibt 4 Elektroden mit 6 möglichen Paarkombinationen ( Abb.2). Die abgegebene Energie wird zwischen diesen aufgeteilt, je nach aktuell gemessenem Widerstand. Die Paare werden automatisch nacheinander aktiviert.

Abbildung 2: Stromfluss bei multipolarer Radiofrequenzablation



Lee et al. (2007) [11] vergleicht monopolare RFA mit multipolarer RFA mit 2 Applikatoren. Dabei ergaben sich größere Koagulationsvolumina im multipolaren Modus. Das deckt sich mit Ergebnissen der Studie von Nakada et al. [55] bei dem monopolare und bipolare RFA verglichen werden.

Im bi- und multipolaren Modus wird vermutlich eine höhere Stromdichte erzeugt [56]. Die Hitze strahlt nicht wie bei der monopolaren RFA in alle Richtungen ab.

Mit der multipolaren Methode kreuzt der Strom den Tumor auf unterschiedlichen Bahnen (Abb. 2). Sogenannte Skip-Läsionen mit überlebenden Tumorzellen können eher vermieden werden. Zudem wird ein kontinuierlicher Stromfluss durch die Abstimmung der Energieverteilung je nach Widerstand der einzelnen Elektrodenpaare gewährleistet [57].

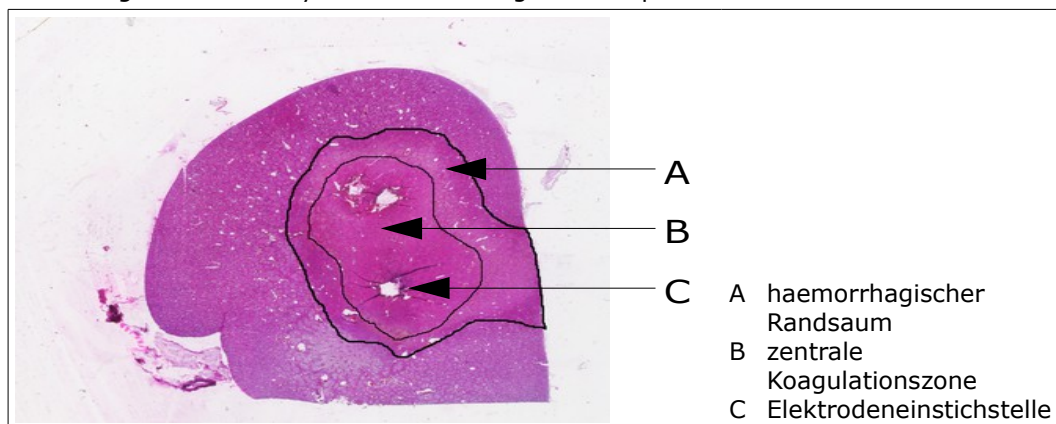
Weitere Charakterisierungen für bi- und multipolare RFA zu finden, war Gegenstand dieser Promotionsarbeit.

### 1.3.3 Histologische Betrachtungen Der Radiofrequenzablation

Histologisch können 3 Zonen unterschieden werden.

Die Koagulationsnekrosezone, welche die Elektrode zirkulär umgibt, ist gekennzeichnet durch Denaturierung der Zellproteine, die Auflösung der Zellwand und den Verlust von extra- und intrazellulärem Wasser [58]. Diese erste Zone wird umgeben von einem haemorrhagischen Randsaum. In dieser Zone führen Spasmen der Microgefäße und Thrombosen zu Ischämie und später zu Reperfusionsschäden [58,59]. Die 3. Zone ist die des normalen Parenchyms, welche physiologische Zellverhältnisse aufweist. (Abb. 3)

*Abbildung 3:* Haematoxylin-Eosin-Färbung bei multipolarer RFA



## 1.4 THEORETISCHE EINFÜHRUNG IN DIE UNTERSUCHUNGSPARAMETER

### 1.4.1 Apoptose Und Enzyme Der Apoptosekaskade

Betrachtet man den Zelltod spielen die 2 Formen Nekrose und Apoptose eine entscheidende Rolle. Die Nekrose stellt einen ungeordneten Zelltod dar, der aufgrund einer irreversiblen Schädigung von Außen auftritt und bei der es zu Zellschwellung und Schädigung der Zellstrukturen kommt. Die Zellmembran löst sich auf. Die Folge ist eine Inflammation, die auf die Umgebung übergreift [60]. Diese Form tritt meist bei Ischämie auf und ist somit hauptsächlich bei der RFA zu finden [59]. Im Gegensatz dazu steht die Apoptose, der programmierte, organisierte Zelltod. Dies ist ein aktiver Prozess mit typischen morphologischen Veränderungen [61]. Der Vorgang der Apoptose kann durch einen extrinsischen oder intrinsischen Pfad induziert werden, die beide in eine gemeinsame Endstrecke münden (Abb. 4). Auf dem extrinsischen Weg werden durch extrazellulären Stress angeregt, spezifische Liganden (fas ligand (FasL), Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF-L), TNF-related apoptosis induced ligand (TRAIL) und CD95-Ligand) an sogenannte Todesrezeptoren (death receptors, DR) [62], wie z. B. fas, CD95, apo-2, apo-3 und TNFR-1 [63]. Diese aktivieren intrazellulär über verschiedene Adaptermoleküle (auch DISC (Death Inducing Signaling Complex)) die Initiatorcaspase 8 (-10) [64,65]. Caspasen -Cysteinyl Aspartate Specific Proteases - sind eine Familie von Proteasen mit einem Cysteinrest im aktiven Zentrum, die Proteine spezifisch hinter Aspartatresten schneiden [66]. Sie liegen in inaktiver Form als Procaspasen im Zytoplasma vor und werden durch Proteolyse aktiviert [67]. Man unterscheidet dabei Initiatorcaspasen (Caspasen 2, 8, 9, 10), welche die proapoptotischen Signale vermitteln, von Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6, 7). Im Rahmen des extrinsischen Weges kann die Initiatorcaspase 8 nun direkt die Caspasekaskade aktivieren oder über Spaltung des BH3-interacting Domain death agonist (BID) die Mitochondriale Membranpermeabilisation (MMP) anregen [68,69]. Eine weitere Möglichkeit die extrinsische Apoptose anzustoßen stellen abhängige Rezeptoren dar, die letale Signale bei Abstinenz ihrer Liganden über Transduktoren aussenden und entweder die MMP [70] stimulieren oder direkt die Effektorcaspasen aktivieren [71].

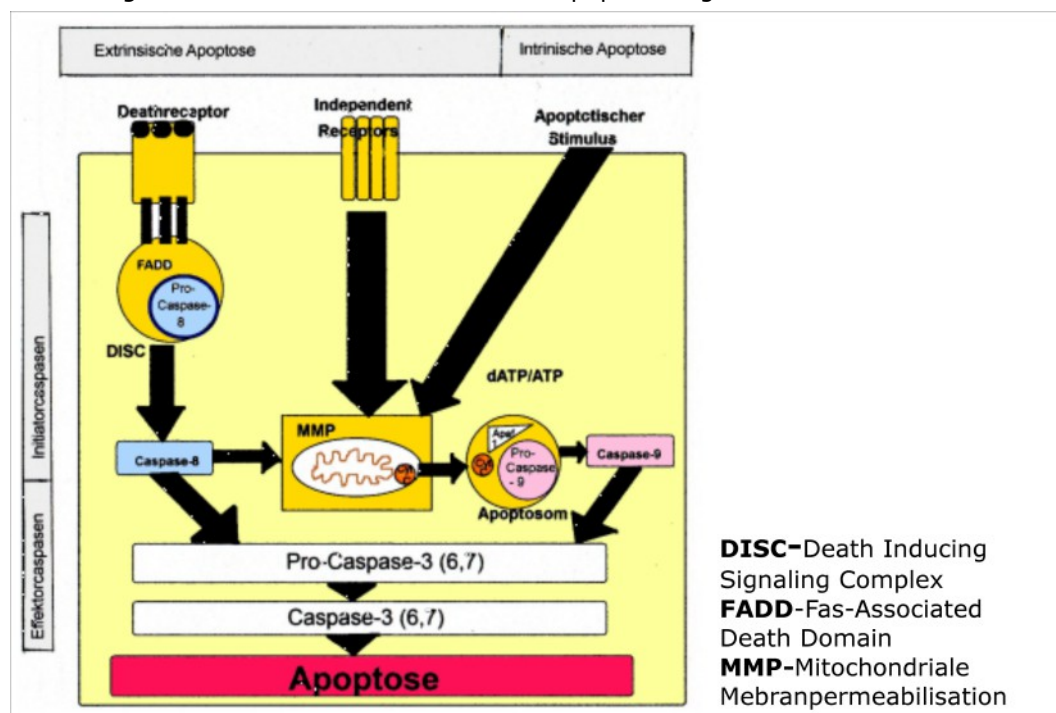
Es gibt eine Vielzahl an Stimuli, die zu intrazellulärem Stress führen und den intrinsischen Apoptoseweg einleiten. Zum Beispiel können Hypoxie, Strahlung oder Toxine zu DNA Schäden, oxidativem Stress oder über die Veränderung der Calciumhomöostase zur Akkumulation fehlerhafter Proteine im Endoplasmatischem Retikulum (ER) führen [72]. Die Mitochondrien stellen die zentrale Schaltstelle für den Stress dar und die mitochondriale Membranintegrität wird von pro- und antiapoptotischen Proteinen beeinflusst [73]. Überwiegen die proapoptotischen Signale der Bcl-2 Familie (B-Cell Leukaemia-2) kommt es zur Zerstörung der mitochondrialen Membran und z.B. der Freisetzung von Cytochrom C, was zu einer Aktivierung des intrinsischen Apoptose Signalweges führt [73].

Aus den Mitochondrien freigesetztes Cytochrom C bildet zusammen mit Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), ATP (Adenosintriphosphat) und Procaspase-9 den Apoptosomenkomplex, welcher die Initiatorcaspase 9 aktiviert [74].

Sowohl Caspase 8, als auch Caspase 9 der beiden Apoptosepfade führen schließlich zur Aktivierung der Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7), welche den point-of-no-return einleiten und die zellulären Proteine zerstören.

Dabei bleibt die Zellintegrität erhalten. Die Zelle schrumpft, stülpt sich aus, die DNA kondensiert und wird fragmentiert [61]. Die entstehenden Apoptosekörperchen werden im Anschluss phagozytiert, sodass im Gegensatz zur Nekrose keine Entzündungsreaktion entsteht [67]. Um Schädigungen der Zellen durch Radiofrequenzablation außerhalb der Nekroseareale zu erkennen, wurde in unserer Studie aktivierte Caspase 3, als gemeinsame Endstrecke des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges, immunhistochemisch detektiert.

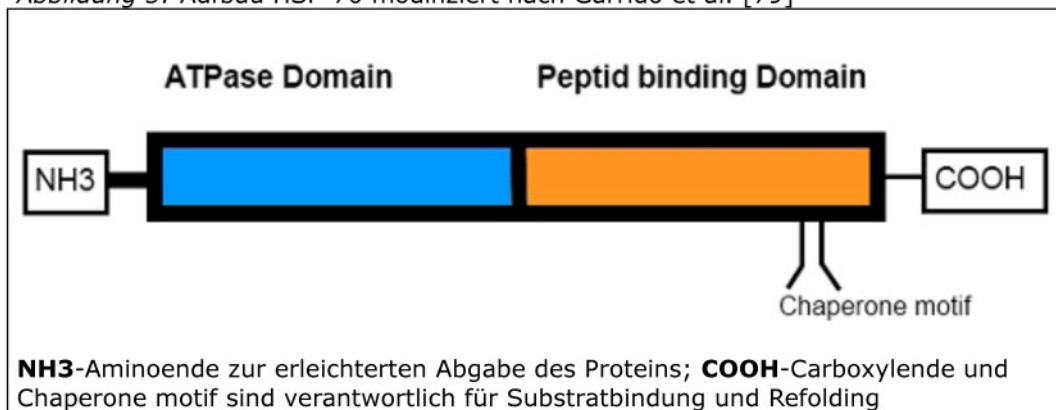
Abbildung 4: Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg



### 1.4.2 Heat Shock Proteine

Hitzeschockproteine (HSP) sind eine Familie von Proteinen, die nach Ihrem spezifischen Molekulargewicht klassifiziert werden [75]. Sie sind in eine Vielzahl von Interaktionen mit Proteinen der Apoptose involviert, haben zytoprotektive Eigenschaften und dienen als molekulare Chaperone für andere zelluläre Proteine. Ihre Induktion erfolgt durch unterschiedlichen Stress auf die Zelle [76]. Bei Hitze, oxidativem Stress oder durch Chemotherapeutika werden vor allem die Proteine HSP27 und HSP70 ausgeschüttet [77]. Sie verhelfen der Zelle mit denaturierten oder ungefalteten Proteinen umzugehen [78]. HSP70 besitzt ein hohes Molekulargewicht und ist ein ATP-abhängiges Chaperon, welches Co-Chaperone, wie HSP40, BAG-1 oder z.B. BAG-3, zur Modulation benötigt [75]. Man unterscheidet beim HSP70 2 funktionelle Domänen, eine ATP-Bindungsregion mit einem Aminoende (NH<sub>2</sub>) und eine Peptidbindungsdomäne mit Carboxylgruppe (COOH) (siehe Abb. 5) [79]. Da es nahezu alle Wege des Zelltodes durch Störung der Caspaseaktivierung blockieren kann, ist HSP70 eines der stärksten antiapoptotischen Proteine [75]. Der intrinsische Apoptosepfad wird auf dem, dem Mitochondrium vorgeschalteten Level, durch Modulation der Aktivierung von stressinduzierten Kinasen gehemmt [75]. Mitochondrial kontrolliert HSP-70 die Ausschüttung von Cytochrom-C und anderer proapoptotischer Signale [80] und postmitochondrial interagiert es mit Apaf-1 [81]. Auf dem extrinsischen Weg kann HSP70 die Aktivierung der Caspase-8 blockieren, BID spalten und auf dem Caspaseunabhängigen Apoptoseweg AIF hemmen. Wir verwendeten einen polyklonalen Anti-HSP-70-Antikörper um HSP-70 Induktion und somit Hitzestress außerhalb der Ablationszone in der Niere feststellen zu können.

Abbildung 5: Aufbau HSP-70 modifiziert nach Garrido et al. [79]





### 1.5 FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER STUDIE

Die Prävalenz der Radiofrequenzablation hat in den letzten Jahren zugenommen [34]. Die Mehrheit der Nierenzellkarzinome wird immer noch mit radikaler Nephrektomie behandelt [4]. Obwohl Komorbiditäten bei einem Großteil der Patienten ein perioperatives Risiko darstellen und die RFA gerade bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine gute Alternative zur Erhaltung der Nierenfunktion ist [82], scheint die Unsicherheit in Hinblick auf die Anwendung der RFA noch groß zu sein. Es ist bedenklich, dass gerade Patienten, die von einer organerhaltenden Therapie profitieren würden, selten RFA-Verfahren erhalten. Weitreichende Studien zur Sicherheit der RFA und der Vergleich der einzelnen RFA-Methoden miteinander sind daher unumgänglich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb:

1. der Vergleich bipolarer und multipolarer Radiofrequenzablation in Hinblick auf die Ablationsvolumina, sowie die jeweiligen Minimal - und Maximaldurchmesser der Läsion
2. die Untersuchung des Einflusses der zugeführten Energie auf die Größe der Ablationszone und die Behandlungszeit.

Damit sollen verschiedenen Tumorgrößen die passenderen Ablationsverfahren zugeordnet werden können und Re-Eingriffe bei unvollständig abladierten Tumoren verhindert werden.

Des Weiteren erfolgte:

3. die Analyse der 2- dimensional Form der Ablationszone und die Erstellung einer 3D-Rekonstruktion der Läsion zur Detektion eventueller Inhomogenitäten, die sichere Tumoreradikationen verhindern.
4. mit Hilfe von aktivierter Caspase3, einem Apoptosemarker, die Suche nach möglichen Zellschäden außerhalb der Koagulationszone.
5. durch Visualisierung von HSP-70 die Untersuchung auf Wärmestreuung innerhalb der Niere, um damit verbundenen Zellstress zu erkennen.

JOURNAL OF ENDOUROLOGY  
 Volume 25, Number 5, May 2011  
 © Mary Ann Liebert, Inc.  
 Pp. 859–867  
 DOI: 10.1089/end.2010.0578

## Efficiency Analysis of Bipolar and Multipolar Radiofrequency Ablation in an *In Vivo* Porcine Kidney Model Using Three-Dimensional Reconstruction of Histologic Section Series

Jochen Neuhaus, Ph.D.,<sup>1</sup> Lisa Blachut,<sup>1</sup> Robert Rabenalt, M.D.,<sup>2</sup> Thomas Stein, Ph.D.,<sup>3</sup> Fritjoff König, M.D.,<sup>4</sup> Markus Wehner, M.D.,<sup>4</sup> Evangelos Liatsikos, M.D., Ph.D.,<sup>1,5</sup> and Jens-Uwe Stolzenburg, M.D.<sup>1</sup>

### Abstract

**Background and Purpose:** Radiofrequency ablation (RFA) was established for minimally invasive treatment of small kidney tumors in multimorbid patients. Bipolar and multipolar RFA may allow the treatment of larger tumors. Safe tumor coagulation depends on total energy supplied and proper electrode placing. To investigate the influence of energy on ablation size and shape in intact kidneys, we used cooled bipolar and multipolar RFA in an *in vivo* pig model.

**Materials and Methods:** Twenty-five male pigs were treated with percutaneous bipolar (one electrode) or multipolar (two electrodes) RFA with various energy transfer under laparoscopic visual control. The animals were sacrificed 4 to 5 hours after RFA. Volume and shape of the coagulation zone was analyzed by three-dimensional reconstruction of hematoxylin and eosin and diaminobenzidine stained paraffin serial sections. Heat-induced cellular activation was addressed by immunohistologic detection of apoptosis marker proteins heat shock protein 70 (Hsp70) and caspase-3 (Casp3).

**Results:** Multipolar RFA led to significant larger tissue ablation than bipolar RFA. Increasing energy, however, did not result in significant enlargement of the coagulation volume. Shape control was better in bipolar RFA. Hsp70 and activated Casp3 immunoreactivity were increased close to the central coagulation zone and occasionally in the caliceal system.

**Conclusions:** RFA causes minimal tissue damage beyond the primary coagulation zone, indicating that RFA is a safe, minimally invasive method for treatment of renal tumors. The ablation of larger volumes necessitates further improvement of multipolar RFA. These findings may be of general interest, because treatment failure correlates with mass size in monopolar RFA and cryoablative techniques as well.

### Introduction

ALMOST 4% OF ALL malignant tumors worldwide are renal-cell cancers (RCC),<sup>1</sup> and the incidence for RCC has continuously risen over the past 20 years, especially in North America and northern Europe.<sup>2</sup> Despite increased detection and treatment of small-sized renal tumors ( $\leq 4$  cm), however, the mortality is not reduced in patients with masses of 2 to 4 cm.<sup>3</sup> One reason may be the increase in comorbidities, leading to higher overall mortality, whereas kidney cancer-specific mortality did not rise.<sup>3</sup>

Surgical intervention with either partial or radical nephrectomy is still the gold standard of RCC treatment.<sup>4</sup> Because the maximum incidence for RCC is between ages 50 and 70 years, however, comorbidities are common in those patients, posing a risk for open surgical treatment. For those patients, radiofrequency ablation (RFA) can provide an alternative with minimal impact on renal function,<sup>5</sup> quicker recovery, and lower morbidity.<sup>6</sup> Moreover, RCC is prone to occur bilaterally, so that RFA is a good choice for patients with a single kidney.

Recently Tracy and associates<sup>7</sup> reported 93% recurrence-free survival after RFA of 243 patients with renal masses

<sup>1</sup>Department of Urology, University of Leipzig, Leipzig, Germany.

<sup>2</sup>Department of Urology, University of Duesseldorf, Duesseldorf, Germany.

<sup>3</sup>Celon AG Medical Instruments, Teltow, Germany.

<sup>4</sup>Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany.

<sup>5</sup>Department of Urology, University of Patras, Patras, Greece.

<4 cm (mean 2.4 cm). Vital tumor cells, however, have been detected in 35% of the patients 6 months after percutaneous RFA in another study.<sup>8</sup> Thus, local tumor control may be suboptimal when compared with surgical excision<sup>9</sup> or laparoscopic cryoablation.<sup>8</sup> Rendon and colleagues<sup>10</sup> monitored lesion growth intraoperatively by power Doppler ultrasonography and reported that lesion size and the time needed to create lesions were not reproducible. The use of internally cooled bipolar electrodes greatly improved homogeneity and size control of the RFA-induced tissue ablation.<sup>11</sup> "Skipping" of tissue areas and thus leaving viable cells, however, is still a problem of RFA.<sup>12,13</sup>

Data reported so far are based on the use of monopolar RFA. Only a few experimental studies compared the properties of monopolar and bipolar RFA. As demonstrated in an *in vivo* comparative study in pigs, multipolar RFA can produce larger ablation volumes compared with monopolar single or cluster electrodes, but treatment time was more than twice that needed in monopolar settings.<sup>14</sup>

Our study was conducted to address some fundamental open questions concerning the use of bipolar and multipolar RFA: The correlation between energy delivery, treatment time, and lesion size; the geometry of the coagulation volume; and possible cell damage by heat dissemination distant from the central coagulation zone.

We used three-dimensional reconstruction of serial histologic sections for exact description of the coagulation volume, because even small skip areas might result in prognostically relevant tumor-cell survival in case of RFA application in renal tumors. Heat-induced cellular activation was addressed by immunohistochemical detection of activated caspase-3 (Casp3) and heat shock protein 70 (Hsp70).

#### Materials and Methods

##### Animal care

Twenty-five male domestic pigs (30-35 kg) provided from the MEZ (Medical Experimental Centre) Leipzig, University

of Leipzig, were anesthetized according to the German animal protection guidelines and Good Clinical Practice guidelines by human medical anesthetists with special experience in animal anesthesia. The anesthesia was introduced by an intramuscular injection of azaperone (Stresnil,® Janssen-Cilag, Neuss, Germany) and ketamine (Ketamine-Ratiopharm,® Ratiopharm, Ulm, Germany). Venous access was obtained via the ear vein by an in-dwelling catheter. Thiopental (Trapanal,® Altana Pharma, Konstanz, Germany) in a dose of 2 mg/kg body weight was injected to facilitate the intubation of the trachea.

The cardiovascular function and the oxygenation were monitored by electrocardiography, pulsoxymetry, and arterial blood pressure, measured in a carotid artery. The anesthesia was maintained with fentanyl (Fentanyl,® Janssen-Cilag) and isoflurane (Isofluran Baxter,® Germany). The ventilation (breathing volume of 6 to 8 mL/kg body weight; frequency of 15 to 25 per minute) was adjusted by kapnography and arterial blood gas analyses.

##### Experimental procedure

We used a laparoscopic approach for visual control by placing a 12-mm trocar (Olympus, Hamburg, Germany) approximately 20 mm cranially of the umbilicus. High-flow carbon dioxide insufflation (12 mm Hg) ensured optimal development of the operating field. After positioning the laparoscopic instruments, the pigs were moved into a modified flank position. Electrodes were placed percutaneously under visual control into the lower pole of the kidney perpendicular to the kidney surface (Fig. 1).

RFA was performed either in bipolar mode (7 kJ (n=3) or 10 kJ (n=6) or multipolar mode (15 kJ (n=7), 20 kJ (n=3), or 25 kJ (n=3) using internally cooled CelonProSurge® applicators (Celon AG medical instruments, Teltow, Germany; Fig. 2). To account for the dimensions of the pig kidney, an active conductor of 20 mm (T20) was selected with a shaft length of 150 mm. Power was set to 20 W in bipolar and 40 W in mul-

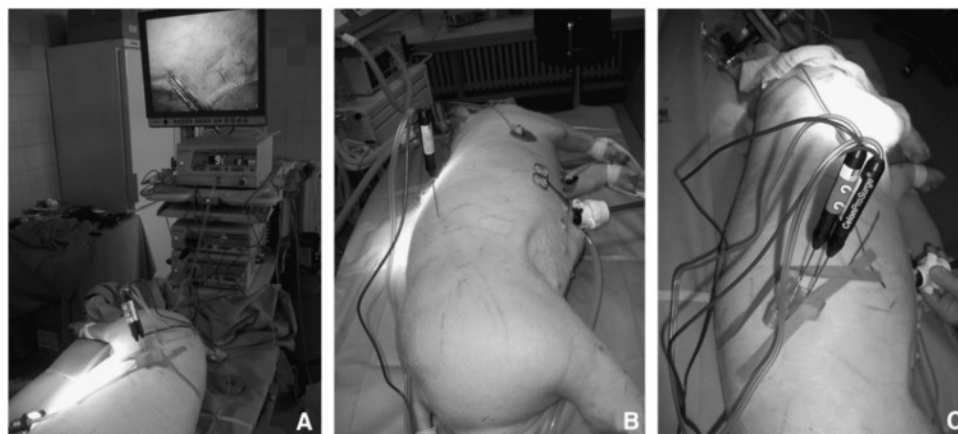
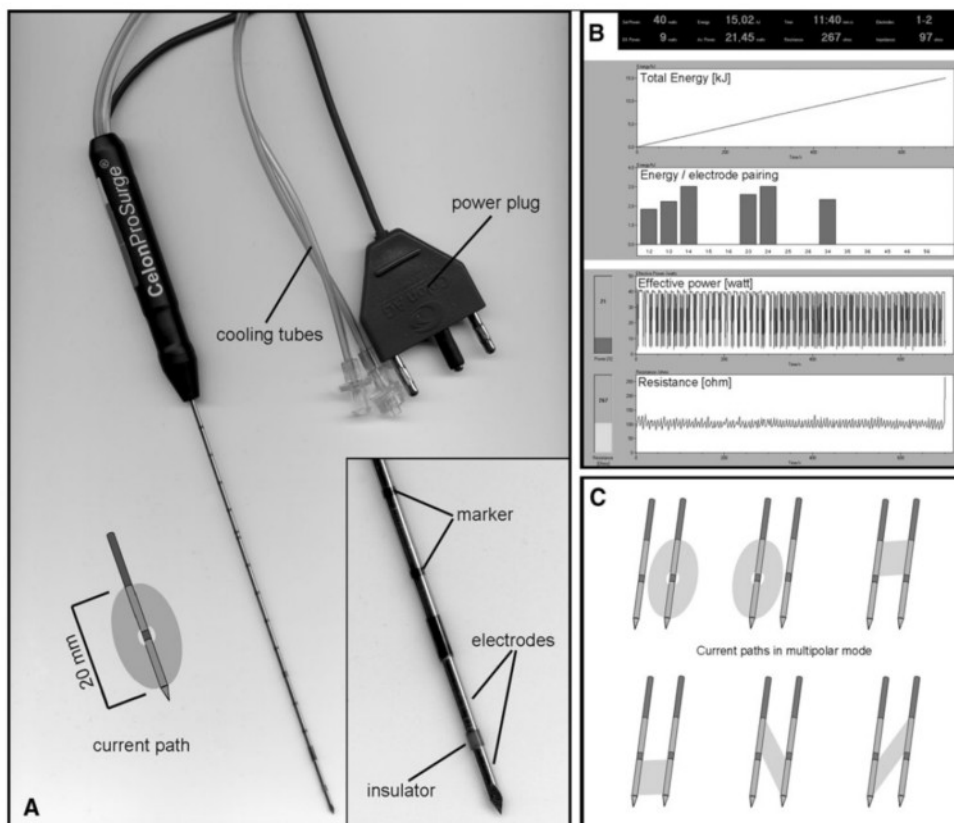


FIG. 1. Experimental setup and placing of the T20 needle electrodes. (A) Laparoscopic visual control was achieved by introducing a camera through a 12-mm trocar placed 2 cm cranially of the umbilicus; (B) bipolar setup (1T20); (C) multipolar setup with two T20 electrodes (2T20).



**FIG. 2.** Radiofrequency ablation (RFA) application system and controls. **(A)** The CelonProSurge<sup>®</sup> 150-T20 applicator has an internally cooled shaft of 1.8 mm (15 gauge) diameter. The total active conductor length of this type of applicator is 20 mm (T20), and shaft length is 150 mm. **(B)** Representative original recording of a multipolar RFA using two bipolar applicators (→ 4 electrodes); parameter setup is indicated in the upper black bar; note the linear energy supply over the whole application time; bars in the lower graph indicate the energy flow of specified electrode configurations; current was alternated between the distinct electrodes every 2 seconds; power and impedance curves demonstrate feedback control by tissue resistance; **(C)** current paths between the four electrodes in multipolar mode.

tipolar RFA. Impedance, power supply, and energy transfer was monitored and controlled by the RFA system (Fig. 2B).

For multipolar RFA, two electrodes were placed in parallel at a distance of 12 mm using a modified CelonPuncture-Guide<sup>®</sup> and six different electrode combinations were alternately activated for 2 seconds each (Fig. 2C). Track ablation by high current flow was performed routinely during withdrawal of the electrode, to mimic real surgical procedure. Pigs were monitored for 4 to 5 hours after RFA and then sacrificed with intravenous injection of T61<sup>®</sup> (Intervet, Germany). The kidneys were carefully removed and immediately fixed by immersion in 4% buffered formalin.

**Histology**

Paraffin serial sections (10 μm) transverse to the needle track were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or with

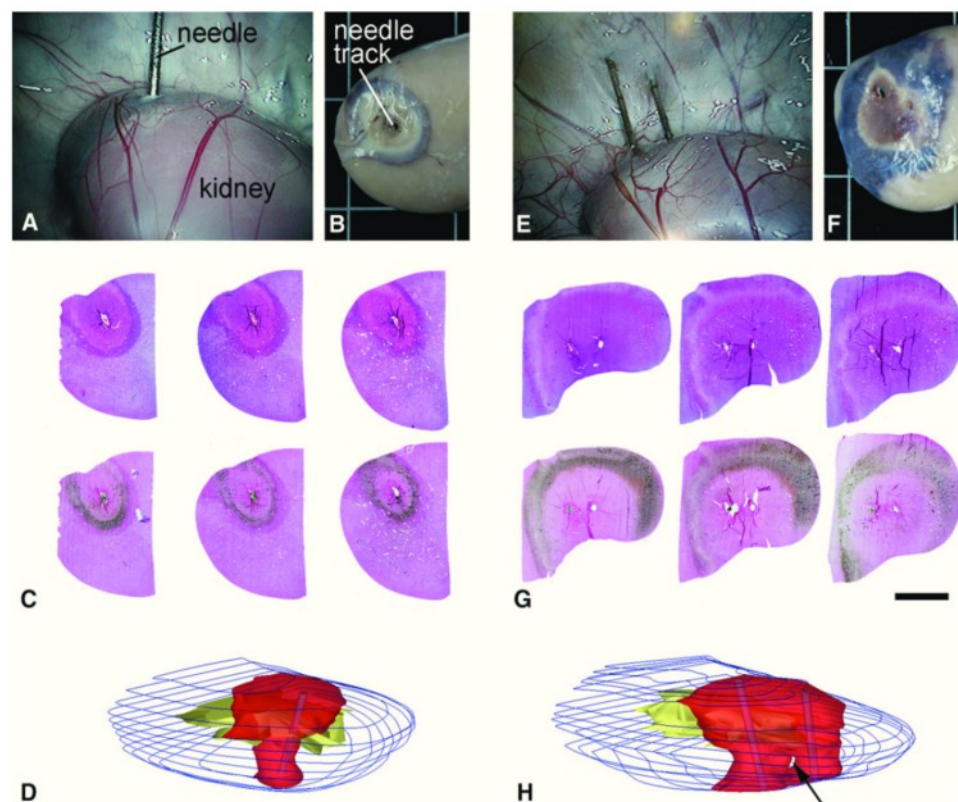
diaminobenzidine (DAB)/nuclear fast red. DAB is processed by endogenous peroxidase giving a brown deposit.

**Morphometry and three-dimensional reconstruction**

Sections were scanned at 1200 dpi resolution (Epson Perfection 4490 Photo); morphometric analysis and three-dimensional reconstruction of the coagulation zone were done using Cell<sup>2D</sup> (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) and ImageJ (Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Md).

**Evaluation of central and distal cell damage**

Three kidneys were sectioned at 5-mm intervals directly after nephrectomy and incubated for 40 minutes in 2% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC, Sigma) at room



**FIG. 3.** Representative bipolar (A-D) and multipolar (E-H) radiofrequency ablation. (A, E) Laparoscopic intraoperative view of needle placement; (B, F) aspect of lesion after removal of the electrodes; (C, G) 10  $\mu\text{m}$  thick serial sections separated by 100  $\mu\text{m}$  stained with hematoxylin and eosin (upper row) and diaminobenzidine (lower row); (D, H) three-dimensional reconstruction of the ablation zone (red), the renal caliceal system (yellow), the contour of the kidney (blue lines), and the needle tracks (grey); note the distally narrowing shape of the ablation in bipolar (D) and multipolar (H) mode, causing nonoverlapping lesion zones at the distal end when using two needles (H, arrow); bar (G) indicates 20 mm.

temperature to identify live cells by reduction of the colorless TTC to red formazan by mitochondrial enzymes.<sup>14</sup> Hsp70 is upregulated in response to hyperthermia (>43°C) and has cytoprotective effects by ensuring proper folding of proteins.<sup>15</sup> Casp3, the central enzyme in the apoptosis pathway, is activated by phosphorylation and was detected by a specific polyclonal antibody. Those antigens were selected to detect early cellular responses of viable cells affected by hyperthermia for estimation of heat dissemination in the perfused kidney.

Selected sections were deparaffinized, rehydrated, pretreated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 70% methanol, blocked with 3% skimmed milk, and incubated overnight at 4°C with polyclonal rabbit anti-Hsp70 antibody (abcam, Cambridge, MA; 1:200) or polyclonal rabbit anticaspase-3 antibody (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany; 1:200). Biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody, and streptavidin-horseradish peroxidase complex (Vector, Burlingame, CA) with DAB re-

action enhancement by glucose oxidase-DAB-nickel method<sup>16</sup> were used for visualization.

#### Statistical analysis

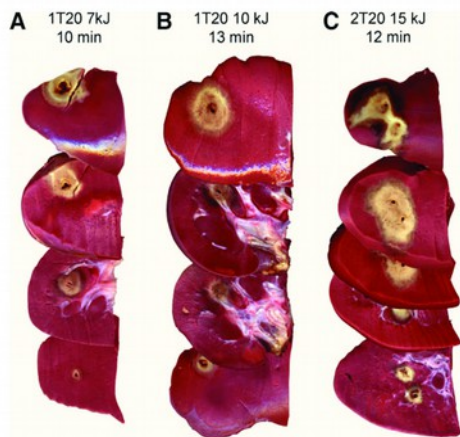
Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 for Mac OS X. Differences were considered significant at a value of  $P < 0.05$ .

#### Results

Laparoscopic visual control allowed reproducible percutaneous needle placement into the lower pole of the kidney in 23 of 25 experiments (Fig. 3A, E). Two cases with renal pelvis penetration were excluded from analysis. The lesion zone was prominent after removal of the kidneys (Fig. 3B, F). Complete tissue damage could be addressed by H&E histologic staining (Fig. 3C, G, upper row) or DAB reaction depicting the hemorrhagic rim around the central coagulation zone (Fig. 3C, G, lower row).

**BIPOLAR AND MULTIPOLAR RFA IN PERFUSED PIG KIDNEY**

863



**FIG. 4.** Tissue damage revealed by 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride live/dead staining. (A) 1T20, 7 kJ; (B) 1T20, 10 kJ; (C) 2T20, 15 kJ. Note the butterfly-like central coagulation in multipolar radiofrequency ablation using two electrodes (C).

Three-dimensional reconstruction revealed significant shape differences between RFA treatment using one needle for bipolar (Fig. 3D) or two needles for multipolar RFA (Fig. 3H). Essentially, RFA did not result in the theoretically predicted ellipsoid or spherical ideal ablation volume, neither in bipolar nor in multipolar mode. In both cases, the coagulation zone narrowed distally, so as to result in an inverted conical

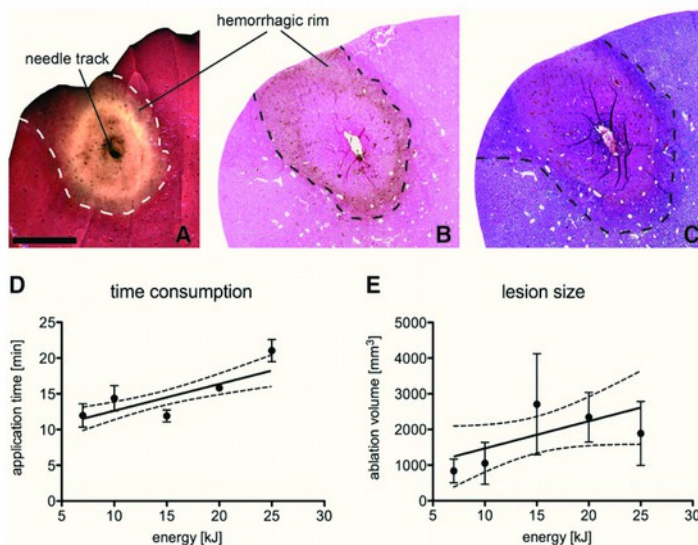
ablation (Fig. 3D) and even leaving a distal gap between the two needles in the multipolar mode (Fig. 3H, arrow).

Inhomogeneous ablation could also be demonstrated in representative TTC-stained kidneys (Fig. 4). In TTC staining alive cells were stained red, while dead cells remained colorless, leaving the central coagulation zone unstained, surrounded by a dark gray margin (Fig. 5A). DAB reaction of paraffin slices clearly identified the dark gray area as hemorrhagic rim (Fig. 5B). In H&E stained sections, this central coagulated tissue was surrounded by a darker region, indicating further cellular damage (Fig. 5C). All treated kidneys showed the same histologic alterations.

To answer the question as to whether more energy transfer evokes larger ablation, we analyzed treatment time and lesion size. While treatment time positively correlated with the amount of energy applied with a minimum of 10.32 minutes (one needle at 7 kJ) and 22.73 minutes (two needles at 25 kJ; Fig. 5D), lesion size did not correlate with energy transfer in the observed energy interval (Fig. 5E).

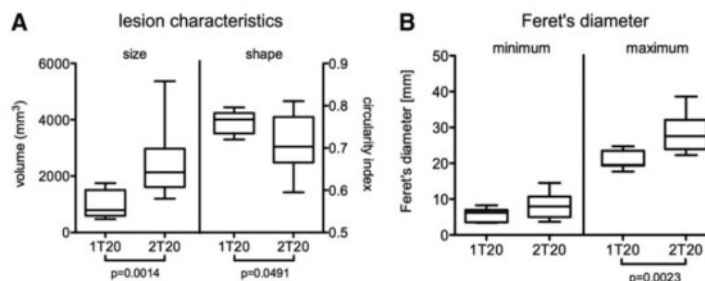
Ablation volume, measured in three-dimensional reconstructions (Fig. 3D, H) of H&E stained serial sections, revealed higher ablation volumes in multipolar mode (Fig. 6A). There was no difference between three-dimensional reconstructions of H&E and DAB stained sections (data not shown).

We used circularity ( $\text{circularity} = 4\pi \cdot \text{area} / \text{perimeter}^2$ ) as a shape descriptor for the two-dimensional lesion shape in serial sections. A value of 1.0 indicates a perfect circle, while values approaching 0.0 indicate an increasingly elongated shape. Circularity was lower in multipolar mode, indicating inhomogeneous ablation (Fig. 6A). Because maximum and minimum diameter of the lesion is crucial for the safety of tumor ablation, we measured maximum and minimum Feret diameter, which are defined as the longest and shortest distance in between the lesion boundary, respectively. Maximum



**FIG. 5.** Depiction and analysis of radiofrequency ablation (RFA)-induced lesions. (A) 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride live cell staining of an unfixed kidney treated with bipolar RFA at 10 kJ; red colored cells; (B) diaminobenzidine reaction depicting the hemorrhagic rim; (C) hematoxylin and eosin staining indicating damage of cells adjacent to the central coagulation zone (dark pink color); lesion zone is demarked in C-E; scale bar = 5 mm (C) applies to C-E; (D) application time positively correlated with target energy ( $R^2=0.44$ ;  $P=0.0003$ ), while lesion size was not correlated (E); data in A and B given as mean  $\pm$  standard error; regression  $\pm$  95% confidence interval.

**FIG. 6.** Volume and shape of lesions. (A) Volume of the lesion measured in hematoxylin and eosin stained serial sections; (B) minimum and maximum Feret diameters.



Feret diameter was significantly higher in multipolar RFA, while minimum Feret diameter was unchanged (Fig. 6B).

To detect possible early distant cell damage, we used immunohistochemical staining of two marker proteins that are altered within several hours after cell insult. We found immunoreactivity to Hsp70 and activated Casp3 to be restricted mainly close to the central coagulation zone (Fig. 7B, C). When ablation was close to or affecting the renal caliceal system, however, Hsp70 and activated Casp3 immunoreactivity were also found in distal collecting duct cells of the renal medulla (Fig. 7D, E), indicating cellular response to heat stress.

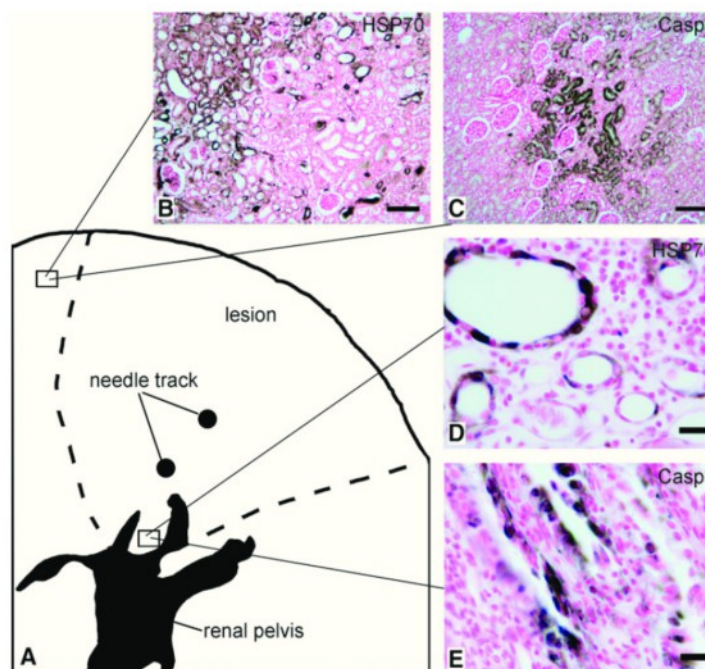
**Discussion**

RFA of small kidney tumors ( $\leq 3$  cm) has been reported to be an alternative for multimorbid, aged, or single kidney

patients.<sup>5,17</sup> Despite promising initial results, the reintervention rate is about 14% in RFA.<sup>4,18</sup> Usually, more than one application is necessary to achieve complete tumor ablation.<sup>4</sup> Oncologic long-term follow-up is still not available, and local control seems to be suboptimal when compared with surgical excision.<sup>18</sup>

The physical principle of RFA is local heat production by molecular friction induced by high-frequency alternating current (470 kHz). Success of RFA depends greatly on optimal electrode placing, configuration, and tissue properties. Comparable demands have to be met by cryoablative techniques. Incomplete ablation, as defined by radiologic methods, was found in 14.0% and 4.8% of RFA and cryoablation, respectively.<sup>4</sup> Probe placing and parameter settings are essential for size control of the ablation using either method.<sup>12</sup>

**FIG. 7.** Immunohistochemical detection of heat shock protein (Hsp70) and caspase-3 (Casp3). (A) Sketch of lesioned pig kidney, dotted line outlines the lesion; Hsp70 and Casp3 immunoreactive cells were found in the renal cortex (B) and occasionally in distal collecting duct cells in the medulla (D, E); bars = 100  $\mu$ m (B, C); bars = 20  $\mu$ m (D, E).



Tissue desiccation and carbonization of the electrodes are common problems, restricting lesion size. The introduction of wet RFA using electrolyte infusion into the kidney has been used to maintain tissue impedance low over a longer period, thus enabling increased lesion size as did the use of multitined umbrella electrodes. Size and parameter control, however, were still not reproducible as reported by Rendon and coworkers.<sup>10</sup>

Bipolar RFA using internally cooled applicators has improved local parameter control compared with the monopolar approach.<sup>19</sup> Multipolar RFA is an extension of the bipolar mode, using two or more needle applicators, and allows larger ablation volumes.<sup>14,19</sup> Internal cooling of the needles and feedback controlled current flow via tissue resistance measurement help to avoid electrode charring and tissue desiccation, thus improving heat distribution.<sup>20</sup>

Power setting (20, 30, 60 W) did not alter lesion size at identical application times. Therefore, larger ablation volumes are likely to be effectively achieved only by the use of additional needle electrodes.<sup>20</sup>

Our study confirmed this notion, demonstrating significant larger ablation volumes even with lowest used energy transfer (15 kJ) in multipolar ( $2708 \pm 1416 \text{ mm}^3$ ; 95% confidence interval [CI]:  $1221\text{--}4194 \text{ mm}^3$ ) compared with 7 kJ in bipolar mode ( $838 \pm 331 \text{ mm}^3$ ; 95% CI:  $167\text{--}1659 \text{ mm}^3$ ), while there was no significant difference in lesion size with increasing energy transfer within one mode (mean  $\pm$  standard deviation; Fig. 5E, Fig. 6A). The achieved ablation volumes were comparable to the data reported by others.<sup>21</sup>

We found a linear correlation between time consumption and energy transfer, but lesion size did not correlate with energy transfer in the observed energy interval (Fig. 5D, E). Despite the fact that there is no difference in time consumption between bipolar RFA with 7 kJ and multipolar RFA with 15 kJ applied energy, the lesion size is significantly higher in multipolar RFA (Fig. 5E, Fig. 6A). Because of the relative high standard error at 15 kJ, however, the optimal setting might be 20 kJ using two needle electrodes at the costs of additional 4 minutes of treatment time.

Maximum lesion diameter was  $20.65 \pm 2.58 \text{ mm}$  (95% CI:  $18.49\text{--}22.80 \text{ mm}$ ) in bipolar and  $28.60 \pm 5.01 \text{ mm}$  (95% CI:  $35.41\text{--}31.78 \text{ mm}$ ) in multipolar RFA, which is comparable to the ablation size achieved by monopolar RFA using a 2 cm array diameter needle probe (RadioTherapeutics, Mountainview, CA) and slightly larger than the lesion produced by the RITA® needle array.<sup>22</sup> Because of the smaller interprobe spacing (12 mm) in two electrode multipolar RFA, the ablation diameters and volumes in our study were less than reported by Lee and colleagues,<sup>14</sup> who used a spacing of 20 mm.

In general, it is difficult even to compare studies using bipolar and multipolar RFA, because length of active conductor and probe spacing as well as applied energy are critical parameters defining ablation volume and geometry. Bearing this in mind, our results correspond well to the results of Hacker and colleagues, who investigated bipolar and multipolar RFA using the same system in a perfused *ex vivo* pig kidney experimental setup.<sup>20</sup> One fundamental difference to our study is the energy range they used for coagulation (1.24–8.41 kJ, 20-mm probe). We used 7 kJ and 10 kJ in bipolar mode, leading to comparable lesion volumes. Hacker and associates<sup>23</sup> observed a positive correlation between lesion volume and energy transfer. In our experiments, applying more energy did not lead to larger lesion volume, which indicated that we reached

a physical barrier restricting achievable lesion size with the specific electrode setup.

The significance of electrode spacing has also been demonstrated in an *in vivo* study comparing conventional cluster electrodes to multiple electrodes (Valleylab Cool-tip™ monopolar system) at various spacing. Three electrodes were used in either configuration at identical ablation parameters (12 min, impedance control loop). Spacing multiple electrodes at 1.5 cm led to significant larger coagulation volume than the control cluster electrode. Interestingly, 2.0-cm spacing produced reduced volumes and less compact lesion shape.<sup>24</sup>

To the best of the authors' knowledge, ablation shape has not been analyzed microscopically in other studies. We found significant differences in the shape of the lesions by three-dimensional visualization, represented by circularity index and Feret diameters. While lesion size was higher in multipolar RFA, circularity index of the lesion was significantly lower—ie, homogeneous coagulation of a spherical or ellipsoid volume was less well achieved using two electrodes (Fig. 3, 4, 6A). Comparable results have been reported for *ex vivo* RFA of liver tissue, proposing a standardized nomenclature for macroscopic evaluation of the lesion shape.<sup>25</sup>

The measurement of ablation volume from three-dimensional serial sections reconstruction proved that the assumption of an elliptical lesion is not suitable for the estimation of the ablation volume. Aberration from theoretical ellipsoid lesion may be because of inhomogeneous structure of the kidney itself; heat dissemination by blood and urine flow; electrode placement within the renal pelvis; improper electrode spacing.<sup>14</sup> In our study, three-dimensional reconstruction revealed inhomogeneous ablation in between the two ablation probes after multipolar RFA, while we did not see skip areas in bipolar RFA. Therefore, electrode spacing or geometry has to be improved in multipolar RFA to allow the firm ablation of larger tissue masses.

Only occasionally, cells distant from the central lesion site showed Hsp70 and Casp3 immunoreactivity, indicating activation of protective and apoptotic pathways in response to cellular stress. We conclude that RFA is safe if care is taken to spare the renal pelvis. In two cases, we experienced renal occlusion during RFA, resulting in hydronephrosis.

There are some limitations to our study. First, all ablations were performed in healthy kidneys and not in renal-cell tumor tissue. There is some evidence from liver RFA that ablation size and shape is improved in neoplastic tissue.<sup>26</sup> Because renal tumors are usually more compact than normal parenchyma, this might also be the case in the kidney.

Second, survival time of the pigs was limited to 4 to 5 hours. Therefore, lesion size might be underestimated compared with other studies, where ablation was evaluated several days after RFA treatment.<sup>14,27,28</sup> As shown by Hsu and coworkers,<sup>28</sup> however, at light and electron microscopic level, progressive irreversible cell death and necrosis occurs within the central lesion site after monopolar RFA, accompanied by local inflammation reaction at the edge of the lesion, followed by near total resorption of the necrotic tissue within 90 days. No tissue damage was evident in the parenchyma as close as 1 cm away from the central lesion.<sup>28</sup>

This is in good agreement with the low expression of activated caspase-3 and Hsp70, proteins that are usually activated or upregulated within a few hours after cell insult. Acute tissue damage by RFA was restricted to a central coagulation zone.



Third, the use of electrodes with a short active length of 20 mm (T20) was necessary because of anatomic reasons in the healthy pig kidney. The increase of the electrode length from 20 to 30 mm or modification of the needle distance could prevent noncoagulated tissue in between the two needles.<sup>23</sup>

Safe and effective management of renal tumors >2 cm is a problem concerning RFA as well as cryoablative techniques.<sup>12</sup> The feasibility of exact radiologic monitoring (MRI, CT) is still an advantage of cryoablation and multitined needle RFA; however, MRI compatible internally cooled bipolar probes are also available and could further improve bipolar RFA.

Serial histologic evaluation of the lesions is not available in the literature to date. Therefore, the problem of remaining viable cells within the ablation volume cannot be addressed in most of the RFA systems and setups reported.

There is a considerable variation in the design of RFA systems, including monopolar or bipolar, cooled or uncooled single probe and multiprobe arrays, and multitined probes. Energy delivery may be controlled either temperature- or impedance-based. Despite those differences, all the systems face the common problem of electrode charring and tissue drying, causing exponential rise of time-consumption/kJ energy delivery. Therefore, our finding of an upper limit to lesion size increase may well apply to all RFA systems. In addition, there is some evidence that our finding of inhomogeneous ablation is also a common problem in other RFA setups, a phenomenon necessitating further investigations and optimization of probe geometry before using RFA for tumor masses >2 to 3 cm.

#### Conclusions

Percutaneous bipolar and multipolar RFA with cooled needle electrodes led to reproducible tissue lesions in perfused pig kidneys. The ideal ellipsoid lesion can hardly be achieved neither by bipolar nor by multipolar RFA using two needles. In multipolar RFA with two 20 mm electrodes at a spacing of 12 mm, the lesions are inhomogeneous, often leaving distal noncoagulated zone in between the two needles, while in bipolar RFA the lesion is best described as inverted conical.<sup>25</sup> We found 7 kJ and 20 kJ to be the upper limits of supplied energy in bipolar and multipolar mode, respectively, because the ablation volumes did not further increase with the use of more energy.

Adjacent and distal kidney tissue were hardly affected, indicating that RFA is a safe procedure. Taking into account the nonellipsoid lesion shape, bipolar RFA seems suitable for renal tumors ≤2 cm and multipolar RFA using two needle electrodes for tumor masses of 2 to 3 cm. Further investigations are necessary to define optimum electrode spacing to ensure homogeneous ablation of larger tissue masses.

#### Acknowledgments

The authors gratefully appreciate the excellent technical support by Mrs. A. Weimann, and want to thank Dr. P. Madaj-Sterba and the staff of the Medical Experimental Centre Leipzig for taking care of the animals.

#### Disclosure Statement

This study was financially supported by Olympus Winter and Ibe GmbH, Hamburg, Germany, and Celon AG Medical

Instruments, Teltow, Germany (JN). TS is an employee of Celon AG Medical Instruments. No competing financial interests exist for LB, RB, FK, MW, EL, and JUS.

#### References

- Chen DY, Uzzo RG. Optimal management of localized renal cell carcinoma: Surgery, ablation, or active surveillance. *J Natl Compr Canc Netw* 2009;7:635–643.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225–249.
- Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Rising incidence of small renal masses: A need to reassess treatment effect. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1331–1334.
- Remzi M, Javadli E, Ozsoy M. Management of small renal masses: A review. *World J Urol* 2010;28:275–281.
- Jacobsohn KM, Ahrar K, Wood CG, Matin SF. Is radiofrequency ablation safe for solitary kidneys? *Urology* 2007;69:819–823.
- Matsumoto ED, Johnson DB, Ogan K, et al. Short-term efficacy of temperature-based radiofrequency ablation of small renal tumors. *Urology* 2005;65:877–881.
- Tracy CR, Raman JD, Donnally C, et al. Durable oncologic outcomes after radiofrequency ablation: Experience from treating 243 small renal masses over 7.5 years. *Cancer* 2010;116:3135–3142.
- Weight CJ, Kaouk JH, Hegarty NJ, et al. Correlation of radiographic imaging and histopathology following cryoablation and radio frequency ablation for renal tumors. *J Urol* 2008;179:1277–1283.
- Campbell SC, Novick AC, Belldgrun A, et al. Guideline for management of the clinical T1 renal mass. *J Urol* 2009;182:1271–1279.
- Rendon RA, Gertner MR, Sherar MD, et al. Development of a radiofrequency based thermal therapy technique in an in vivo porcine model for the treatment of small renal masses. *J Urol* 2001;166:292–298.
- Nakada SY, Jerde TJ, Warner TF, et al. Bipolar radiofrequency ablation of the kidney: Comparison with monopolar radiofrequency ablation. *J Endourol* 2003;17:927–933.
- Rehman J, Landman J, Lee D, et al. Needle-based ablation of renal parenchyma using microwave, cryoablation, impedance- and temperature-based monopolar and bipolar radiofrequency, and liquid and gel chemoablation: Laboratory studies and review of the literature. *J Endourol* 2004;18:83–104.
- Klingler HC, Marberger M, Mauermann J, et al. 'Skipping' is still a problem with radiofrequency ablation of small renal tumours. *BJU Int* 2007;99:998–1001.
- Lee JM, Han JK, Kim SH, et al. In vivo efficiency of multipolar radiofrequency ablation with two bipolar electrodes: A comparative experimental study in pig kidney. *J Vasc Interv Radiol* 2007;18:1553–1560.
- Morimoto RI. Cells in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993;259:1409–1410.
- Shu SY, Ju G, Fan LZ. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 1988;85:169–171.
- del Cura JL, Zabala R, Iriarte JJ, Unda M. Treatment of renal tumors by percutaneous ultrasound-guided radiofrequency ablation using a multitined electrode: Effectiveness and complications. *Eur Urol* 2010;57:459–465.
- Novick AC, Campbell SC, Belldgrun A, et al. Guideline for management of the clinical stage 1 renal mass. American Urological Association. Available at: <http://www.auanet.org/content/media/renalmass09.pdf>. Accessed: February 2, 2011.

## BIPOLAR AND MULTIPOLAR RFA IN PERFUSED PIG KIDNEY

867

19. Lee JM, Han JK, Kim SH, et al. A comparative experimental study of the in-vitro efficiency of hypertonic saline-enhanced hepatic bipolar and monopolar radiofrequency ablation. *Korean J Radiol* 2003;4:163–169.
20. Häcker A, Vallo S, Weiss C, et al. Technical characterization of a new bipolar and multipolar radiofrequency device for minimally invasive treatment of renal tumours. *BJU Int* 2006;97:822–828.
21. Pereira PL, Trübenbach J, Schenk M, et al. Radiofrequency ablation: In vivo comparison of four commercially available devices in pig livers. *Radiology* 2004 232:482–490.
22. Gettman MT, Lotan Y, Corwin TS, et al. Radiofrequency coagulation of renal parenchyma: Comparison of effects of energy generators on treatment efficacy. *J Endourol* 2002;16:83–88.
23. Häcker A, Vallo S, Weiss C, et al. Bipolar and multipolar radio frequency ablation with resistance controlled power output: Standardized ex vivo kidney tissue evaluation. *J Urol* 2006;175:1122–1126.
24. Laeseke PF, Sampson LA, Frey TM, et al. Multiple-electrode radiofrequency ablation: Comparison with a conventional cluster electrode in an in vivo porcine kidney model. *J Vasc Interv Radiol* 2007;18:1005–1010.
25. Mulier S, Ni Y, Frich L, et al. Experimental and clinical radiofrequency ablation: Proposal for standardized description of coagulation size and geometry. *Ann Surg Oncol* 2007;14:1381–1396.
26. Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, et al. Small hepatocellular carcinoma: Treatment with radio-frequency ablation versus ethanol injection. *Radiology* 1999;210:655–661.
27. Pareek G, Wilkinson ER, Bharat S, et al. Elastographic measurements of in-vivo radiofrequency ablation lesions of the kidney. *J Endourol* 2006;20:959–964.
28. Hsu TH, Fidler ME, Gill IS. Radiofrequency ablation of the kidney: Acute and chronic histology in porcine model. *Urology* 2000;56:872–875.

Address correspondence to:  
*Jochen Neuhaus, Ph.D.*  
*Department of Urology*  
*University of Leipzig*  
*Liebigstr. 20*  
*04103 Leipzig*  
*Germany*

*E-mail: jochen.neuhaus@medizin.uni-leipzig.de*

**Abbreviations Used**

Casp3 = caspase-3  
 CI = confidence interval  
 CT = computed tomography  
 DAB = diaminobenzidine  
 H&E = hematoxylin and eosin  
 Hsp70 = heat shock protein 70  
 MRI = magnetic resonance imaging  
 RCC = renal-cell cancer  
 RFA = radiofrequency ablation  
 TTC = 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride

### 3 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Durch die Entwicklung bildgebender Verfahren werden zunehmend kleinere Nierentumore entdeckt [83]. Dies führte zur Weiterentwicklung minimal-invasiver Verfahren als Behandlungsalternative zu radikalen Operationen. Das spiegelt sich auch in den internationalen Leitlinien wider. Obwohl der Goldstandard für die Behandlung lokaler Nierentumore die chirurgische Exzision bleibt, herrscht ein internationaler Konsens bei Nierentumoren kleiner 4 cm, wann immer möglich, minimal-invasive Methoden anzuwenden [31,33]. Dabei steht die PN im Vordergrund. Eine ausdrückliche Empfehlung für die Anwendung der RFA durch die EAU (European Association of Urology) liegt vor bei Patienten mit kleinen Tumoren und/oder mit signifikanter Komorbidität, welche nicht für eine Operation oder Allgemeinanästhesie in Frage kommen [33]. Zudem stellen anatomische oder funktionelle Einzelnieren absolute Indikationen dar. Relativ Indikationen sind Konditionen, die die Nierenfunktion der kontralateralen Niere zukünftig beeinträchtigen könnten [33], da die RFA im Vergleich zur RN signifikant zum Erhalt der Nierenfunktion beiträgt [84]. Trotz der vielversprechenden Vorteile der RFA, bleibt die Anwendung in der Praxis gering.

Eine Metaanalyse von Thorstenson et al. zeigt, dass 82 % der behandelten Nierenzellkarzinome in Schweden zwischen 2005 und 2010 weiterhin mit einer RN und nur 4% mit Kryotherapie oder Radiofrequenzablation behandelt wurden, obwohl die Tumorgößen insgesamt abgenommen haben [85].

Der Grund für die marginale Stellung der RFA sind zum einen die differierenden Studienergebnisse in Hinblick auf Sicherheit und Rezidivrate. In dem Review von Campbell et al. 2009 [43] zeigen die Studien in der Kurzzeitanalyse eine geringere Tumorkontrolle mit einer geringeren rezidivfreien Überlebensrate. Bei Krokidis et al. 2013 [86] jedoch ergeben sich für die RFA vielversprechende Langzeitergebnisse in Hinblick auf Gesamtüberleben, Erhaltung der Nierenfunktion und lokale Tumorkontrolle. Dies erklärt sich vielleicht durch die rasante Weiterentwicklung auf dem Gebiet der RFA in den letzten Jahren. Es wurden verschiedene Elektroden entwickelt (internally cooled, wet electrodes, expandable electrodes und bi- und multipolare Elektrode), die den Stromfluss kontrollieren und verbessern [52]. Es besteht daher ein hoher Bedarf an Studien, die die Technik charakterisieren und Bezug auf die Sicherheit der Methode nehmen.

Wir führten dazu die RFA am narkotisierten Hausschwein in laparoskopischer Technik durch und platzierten die Elektroden unter Kamerakontrolle in den unteren Pol der Niere. Die Platzierung unter visueller Kontrolle war gut reproduzierbar und ist für die Anwendung zu empfehlen, da das Risiko für Verletzungen anderer Organe reduziert werden kann. Um genügend Kohlenstoffdioxid insufflieren zu können, sollte jedoch eine ausreichende Lungenfunktion seitens des Patienten vorhanden sein.

## Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Ein wichtiges Kriterium bei der Behandlung lokaler Tumoren ist die Tumorkontrolle, das heißt die sichere Eradikation des Tumors. Dabei spielt das Ablationsvolumen die entscheidende Rolle. Bisher stellen monopolare Sonden die Standardtechnik bei RFA dar [87].

Bipolare Radiofrequenzablation mit intern gekühlten Applikatoren weisen jedoch eine bessere lokale Parameterkontrolle auf als monopolare Verfahren [88] und erreichen so größere Ablationsvolumina [11,55]. Wir verwendeten daher ausschließlich intern gekühlte bipolare Elektroden und verglichen erstmals technische Parameter der bipolaren und multipolaren RFA an in vivo Schweinenieren. Wir konnten für die multipolare RFA im Vergleich zur bipolaren Ablation sogar mit der niedrigsten Energie von 15kJ größere Ablationsvolumina bei gleichem Zeitverbrauch nachweisen. Dies deckt sich mit den ex vivo Ergebnissen von Häcker et al. [10]. Auch die Untersuchung des maximalen Feretdurchmessers, welcher definiert ist, als der längste Abstand entlang der Läsionsgrenze, zeigte signifikant höhere Werte ( $p=0,0023$ ) für die multipolare RFA. Der minimale Feretdurchmesser war für beide Ablationsformen gleich. Bezüglich der kleinsten Ausdehnung der Ablationszone besteht somit Sicherheit in beiden Applikationsformen.

Das könnte sich dadurch erklären, dass bei der Verwendung von 2 Applikatoren im multipolaren Modus 6 unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten an Elektroden bestehen, zwischen denen sich der Strom aufteilt, bzw. zwischen denen der Strom das dazwischen liegende Gewebe kreuzt. Auf der Fläche fließt der Strom somit mit höherer Dichte [11]. Zudem wird eine Elektrode von der gegenüber liegenden Elektrode vor äußerem Wärmeabtransport geschützt. Die Wärme wird zwischen den beiden Elektroden gefangen gehalten und höhere Temperaturen werden erreicht [11]. Es wird auf einem bestimmten Stromlevel also mehr Hitze produziert [88,89] als bei monopolarer oder bipolarer RFA, so dass größere Volumina erklärbar scheinen.

Wird der elektrische Widerstand durch die Dehydrierung des Gewebes zu groß, reduziert die Kontrolleinheit automatisch die Stromstärke, sodass die Wärmebelastung sinkt und somit Flüssigkeit wieder in dehydrierte Gebiete diffundiert, bis der Widerstand des Gewebes sinkt und Strom bei der gewünschten Stromstärke wieder fließen kann [10]. Dieses Verfahren stellt ein Maximum an Energieeintrag sicher [10]. Bei multipolarer RFA kann bei Zunahme des elektrischen Widerstandes Strom auf andere Elektroden verteilt werden, sodass sich ein konstanterer Energiefluss als bei anderen Modi ergibt [57].

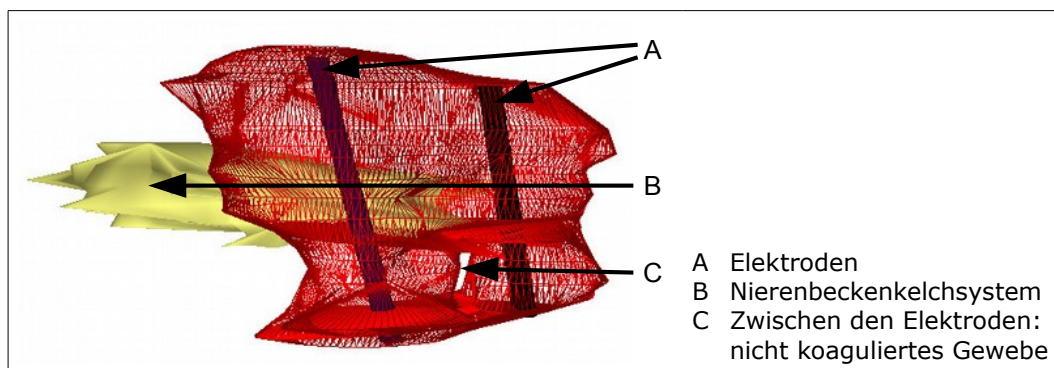
Es zeigte sich, dass sich durch die Steigerung der zugeführten Gesamtenergie (7kJ, 10kJ, 15kJ bipolare RFA und 15kJ, 20kJ, 25kJ multipolare RFA) innerhalb eines Modus, keine Zunahme des Ablationsvolumens erreicht werden kann. Eine positive Korrelation bestand jedoch zwischen der applizierten Energiemenge und der Behandlungszeit. Für Anwender ist es demnach nicht zu empfehlen die Energie zu hoch zu wählen, da dies nur die Applikationsdauer verlängert, jedoch nicht zur Zunahme der Koagulationsgröße führt. Da die Varianz der Ergebnisse bei 15kJ im multipolaren Modus jedoch relativ hoch war, sollte bei Anwendung von 2 Applikatoren 20 kJ Zielenergie mit zusätzlich 4 Minuten Behandlungszeit verwendet

werden. Die erreichten Ablationsvolumina stimmten mit den Daten anderer Autoren überein [52], obgleich man beachten sollte, dass für unsere Untersuchungen gesunde Schweine verwendet wurden und sich Ablation in Nierenzelltumorgewebe anders verhalten könnten. Es gibt Anhalt dafür, dass bei RFA in der Leber Ablationsgröße und Läsionsform in Tumorgewebe verbessert sind [90]. Des Weiteren verwendeten wir Elektroden mit 150 mm Länge und einem 20mm langen aktiven Konduktor um der Größe der Schweine Rechnung zu tragen. So dass man größere Ablationszonen bei Verwendung größerer Elektroden erwarten würde.

Einen wichtigen Unterschied zwischen den beiden Formen der RFA konnten wir bei der Berechnung der Circularity ( $\text{Circularity} = 4 \cdot \pi \cdot (\text{Fläche} / \text{Umfang}^2)$ ), als Formbeschreiber für die 2-dimensionale Läsionsform, ermitteln. Bei der multipolaren Applikation ergaben sich niedrigere Werte für die Circularity, was eine starke Abweichung von der Kreisform bedeutet. Inhomogenitäten zeigten sich schließlich auch bei der 3D-Rekonstruktion der Ablationszonen.

Bei beiden Methoden zeigten, dass sich die Koagulationszonen distal der Punktionsstelle verjüngten, sodass sich eine invertierte konische Form für die Ablationszonen ergab. Wir ermittelten außerdem bei der Verwendung von 2 Elektroden am distalen Ende der Nadeln 2 separate Läsionszonen, die von vitalem Gewebe getrennt sind (Abb. 6). Das widerlegt die Daten von Häcker et al.[10] bei denen sowohl im bipolaren als auch im multipolaren Modus elliptische Formen zu verzeichnen waren. Die Untersuchungen bei Häcker et al. fanden jedoch an ex vivo Nieren statt, was auf eine Veränderte Dynamik in der Wärmeableitung zurückzuführen sein könnte.

**Abbildung 6:** separate Läsionszonen bei multipolarer RFA unter Verwendung von 2 Elektroden



Diese Abweichungen von einer elliptischen Form könnten durch die inhomogene Struktur der Niere an sich entstehen. Die Architektur der Niere ist gekennzeichnet aus einer Vielzahl kleiner Gefäße, Tubuli und Sammelrohre unterschiedlichen Kalibers. Wärme kann so durch den Blutfluss über Blutgefäße und über Sammelrohre mit dem Urin in die Peripherie abtransportiert werden. Es resultieren Gewebeanteile, die nicht sicher koaguliert werden können. Ähnlich verhält es sich bei der Anwendung der RFA in Lebergewebe. In der Leber ist

## Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

die Anwesenheit von Blutgefäßen und der Blutfluss ein Prädiktor für inkomplette Tumordestruktion [91,92], weshalb die RFA-Anwendung in der Leber auch auf kleine Tumoren bis 4cm Durchmesser beschränkt ist [52,93]. Allerdings ist die überwiegende Zahl der hepatischen Ablationszonen konzentrisch, das heißt mit geringer Abweichung von der Kreisform [94], was auf eine stärkere Wärmedissipation in der Niere durch die Mehrzahl der Tubuli und Gefäße schließen lässt.

Ziel der RFA ist es durch die produzierte Wärme eine Nekrose zu induzieren [95]. Das heißt es kommt zur irreversiblen Schädigung der Zellen durch Zellschwellung mit Auflösung der Zellwand, Denaturierung und dem Verlust von intra- und extrazellulärem Wasser. Eindrücklich stellt sich die Nekrose in der Färbung mit 2% 2,3,5 Triphenyl Tetrazolium Chlorid (TTC) dar. Um herauszufinden, ob auch die zweite Form des Zelltodes, die Apoptose, durch RFA induziert wird, färbten wir immunhistochemisch aktivierte Caspase-3 an. Die Expression von Caspase-3 zeigt an, dass in der betreffenden Zelle Apoptose induziert wird (Abb. 4). Caspase-3 konnte nahe der zentralen Koagulationszone im renalen Cortex nachgewiesen werden. Ähnlich verhielt es sich mit der immunhistochemischen Anfärbung von HSP-70. Dieses Protein könnte man als Gegenspieler der Caspase-3 bezeichnen, da es die Zellen vor Hitzeschäden schützt. HSP-70 wird bei Hyperthermie hochreguliert [96]. Wir fanden es hochreguliert im Bereich der Nierenrinde am Rande der Koagulationszone, in ähnlicher Verteilung wie Caspase-3. Dies spricht dafür, dass die Zellen in dieser Zone zwar von der Wärmestreuung betroffen sind, es aber nicht unbedingt zum Zelltod kommt.

Zudem indiziert das geringe Auftreten der Markerproteine eine enge Begrenzung der Zellschäden. Wir konnten so immunhistochemisch Ergebnisse anderer Studien reproduzieren, die RFA als sicherere Methode in Hinblick auf Erhalt der Nierenfunktion deklarieren [82,86]. Ma et al. zeigte in seiner Langzeitstudie über RFA behandelte T1a Tumoren der Niere keinen signifikanten Unterschied der Glomerulären Filtrationsrate vor und nach der Behandlung [97]. Die RFA stellt somit eine sichere Alternative zur radikalen Nephrektomie bei Patienten mit Einzelniere, chronischer Niereninsuffizienz oder bilateralen Tumoren dar, bei der ein hohes Risiko für eine Verschlechterung der Nierenfunktion besteht [5,6,84].

Da das Überleben unserer Testschweine auf 5 bis 6 Stunden begrenzt war, könnte man sonst davon ausgehen, dass die Läsionszonen von uns unterschätzt wurden, da in anderen Studien die Nieren erst Tage später entfernt wurden [11,98]. Die Markerproteine werden jedoch schon nach wenigen Stunden hochreguliert, sodass wir von einer realistischen Darstellung der Ablationsgrößen ausgehen können [14,99].

Fand die Ablation nahe des Nierenbeckenkelchsystems statt, konnten wir die Markerproteine HSP70 und aktivierte Caspase-3 auch im distalen Tubulussystem des Nierenmarks nachweisen. Dieser Befund legt nahe, dass die Wärme über das Nierenbecken diffus weitergeleitet werden kann und das zu nicht kontrollierten Zellschäden in Läsions-fernen Bereichen führt. In 2 Fällen kam es bei Ablation im Bereich des Nierenbeckens sogar zur Okklusion und schließlich zur Hydronephrosis. Dies bestätigt die wichtige Rolle der Elektrodenplatzierung

für eine sichere Ablation. Der Abstand der beiden Elektroden sollte nicht zu weit voneinander entfernt sein, da die Stromdichte sonst stark verringert wird. Das Nierenbecken sollte ausgespart werden, da sonst keine sichere Ablation gewährleistet werden kann.

Wir sind mit unserer Studie auf die zahlreichen Forderungen von Lee et al. [11] oder Häcker et al. [10] nach Untersuchungen zu technischen Parametereinstellungen der RFA in vivo und experimentellen Ermittlungen zur Sicherheit der Methode eingegangen. Wir konnten zeigen, dass eine Steigerung des Energietransfers über 7kJ bei bipolarer RFA und 20 kJ bei multipolarer RFA für den Anwender keinen Benefit bringt. Bipolare RFA scheint eine sichere Alternative für Tumoren kleiner 2 cm, während die multipolare RFA bei Tumorgrößen von 2-3 cm Durchmesser indiziert ist.

Wir konnten somit die Ergebnisse der retrospektiven Analyse von del Cura et al. [51] bestätigen, die besagen, dass Tumoren größer 3 cm Durchmesser eine größere Chance für inkomplette Ablation haben. Aufgrund der starken Inhomogenitäten bei der multipolaren RFA stellen Tumoren größer 3 cm ein zu hohes Risiko für Rezidive mit dieser Methode dar. Mehrfachablationen sind zwar möglich, gestalten sich in der Praxis jedoch schwierig.

Für Tumoren kleiner 3 cm zeigt eine Datenanalyse von Best et al. [100] eine 3 Jahres-Tumorfreie-Überlebensrate von 96%. Ähnliche Ergebnisse mit einer sicheren Ablation von Tumoren kleiner 3 cm berichten aktuell Wah et al. [101] und Zagoria et al. [40]. Yuksel et al. weist eine Erfolgsrate von 91,7% auf und befindet RFA eine sichere, wenig invasive und effektive Methode für kleine Tumoren und Patienten mit hohem anästhesiologischem und operativen Risiko [102]. Die RFA zeigt damit durchaus vergleichbare Ergebnisse zu denen der partiellen Nephrektomie [97]. Olweny et al. bestätigt ein vergleichbares 5-Jahres-Rekurrenz-freies Überleben für beide Methoden, obwohl es sich nur um eine kleine Patientenzahl mit kurzem Follow-up von 30 Monaten handelt [103]. Die Studien stellen damit die derzeitige Stellung der RFA am Rande der Therapieleiter in Frage. Die bisherige Empfehlung der RFA nur für eine ausgewähltes Patientenkontinental ist zu überdenken. Da die RFA eine sicherere Methode für kleine Tumoren darstellt und die PN das Risiko für erhöhte Morbidität und eine chronische Niereninsuffizienz im Vergleich zur RFA signifikant erhöht [104,105], sollte man in Hinblick auf das Langzeitüberleben über eine gleichwertige Empfehlungsstellung der RFA in den Leitlinien nachdenken.

Die Entwicklung nanotechnisierter Substanzen zur präziseren Ablation [106] und das Kombinieren mit zytoreduktiven Substanzen [107] wird die Rolle der RFA in Zukunft neu definieren. Da die Expertise des Anwenders für das Outcome der RFA- Anwendung eine große Rolle spielt, sind weitere Untersuchungen ähnlich unserer Studie zu Anwendungsdetails unerlässlich.

## 4 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2010;46:765–81.
- [2] Fischer C, Oberneder R. F3 Richtlinien der Deutschen Krebsgesellschaft n.d.
- [3] Chow W-H, Devesa SS. Contemporary epidemiology of renal cell cancer. *Cancer J Sudbury Mass* 2008;14:288–301.
- [4] Remzi M, Javadli E, Özsoy M. Management of small renal masses: a review. *World J Urol* 2010;28:275–81.
- [5] Huang WC, Levey AS, Serio AM, Snyder M, Vickers AJ, Raj GV, et al. Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumours: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2006;7:735–40.
- [6] Lau WK, Blute ML, Weaver AL, Torres VE, Zincke H. Matched comparison of radical nephrectomy vs nephron-sparing surgery in patients with unilateral renal cell carcinoma and a normal contralateral kidney. *Mayo Clin Proc* 2000;75:1236–42.
- [7] Malcolm JB, Bagrodia A, Derweesh IH, Mehrazin R, Diblasio CJ, Wake RW, et al. Comparison of rates and risk factors for developing chronic renal insufficiency, proteinuria and metabolic acidosis after radical or partial nephrectomy. *BJU Int* 2009;104:476–81.
- [8] Weight C, Larson B, Fergany A. Re: nephrectomy induced chronic renal insufficiency is associated with increased risk of cardiovascular death and death from any cause in patients with localized cT1b renal masses: C. J. Weight, B. T. Larson, A. F. Fergany, T. Gao, B. R. Lane, S. C. Campbell, J. H. Kaouk, E. A. Klein and A. C. Novick *J Urol* 2010; 183: 1317-1323. *J Urol* 2010;184:2213–2214; author reply 2214.
- [9] Russo P. Renal cell carcinoma: presentation, staging, and surgical treatment. *Semin Oncol* 2000;27:160–76.
- [10] Häcker A, Vallo S, Weiss C, Stein T, Alken P, Knoll T, et al. Technical characterization of a new bipolar and multipolar radiofrequency device for minimally invasive treatment of renal tumours. *BJU Int* 2006;97:822–8.
- [11] Lee JM, Han JK, Kim SH, Son KR, Kim HC, Kim SJ, et al. In vivo efficiency of multipolar radiofrequency ablation with two bipolar electrodes: a comparative experimental study in pig kidney. *J Vasc Interv Radiol JVIR* 2007;18:1553–60.
- [12] Benndorf R, Bielka H. Cellular stress response: stress proteins--physiology and implications for cancer. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Prog Dans Rech Sur Cancer* 1997;143:129–44.
- [13] Hoffman AL, Wu SS, Obaid AK, French SW, Lois J, McMonigle M, et al. Histologic evaluation and treatment outcome after sequential radiofrequency ablation and hepatic resection for primary and metastatic tumors. *Am Surg* 2002;68:1038–43.
- [14] Rai R, Richardson C, Flecknell P, Robertson H, Burt A, Manas DM. Study of apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in hepatocytes following radiofrequency ablation (RFA). *J Surg Res* 2005;129:147–51.
- [15] Vanagas T, Gulbinas A, Sadauskiene I, Dambrauskas Z, Pundzius J, Barauskas G. Apoptosis is activated in an early period after radiofrequency ablation of liver tissue. *Hepatogastroenterology* 2009;56:1095–9.
- [16] Boeckmann W, Jakse G. Nierenzellkarzinome. In: Rübgen PD med H, editor. *Uroonkologie*, Springer Berlin Heidelberg; 1994, p. 21–50.
- [17] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225–49.
- [18] Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of



- worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–917.
- [19] Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Cho HY, Jacqmin D, Lee JE, et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2011;60:615–21.
- [20] Kaatsch P, Spix, Claudia, Hentschel, Stefan, Katalinic, Alexander, Luttmann, Sabine, Stegmaier, Christa, Caspritz, Sandra, Cernaj, Josef, Ernst, Anke, Folkerts, Juliane, Hansmann, Jutta, Kranzhöfer, Kristine, Krieghoff-Henning, Eva, Kunz, Beatrice, Penzkofer, Andrea, Tremml, Kornelia, Wittenberg, Kerstin, Baras, Nadia, Barnes, Benjamin, Bertz, Joachim, Buttman-Schweiger, Nina, Dahm, Stefan, Franke, Manuela, Haberland, Jörg, Kraywinkel, Klaus, Wienecke, Antje, Wolf, Ute, Stang, Andreas. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010. Berlin: Robert Koch-Institut; 2013.
- [21] King SC, Pollack L, Li J, King JB, Master VA. Continued Rise in Incidence of Renal Cell Carcinoma, Especially in Young and High-Grade Disease—US 2001–2010. *J Urol* n.d.
- [22] Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Rising Incidence of Small Renal Masses: A Need to Reassess Treatment Effect. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1331–4.
- [23] Jensen OM, Estève J, Møller H, Renard H. Cancer in the European Community and its member states. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 1990;26:1167–256.
- [24] Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer J Int Cancer* 2005;114:101–8.
- [25] Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjønneland A, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol* 2008;167:438–46.
- [26] Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The Lancet* 2008;371:569–78.
- [27] Russo P. End Stage and Chronic Kidney Disease: Associations with Renal Cancer. *Front Oncol* 2012;2.
- [28] Denton MD, Magee CC, Ovuworie C, Mauiyyedi S, Pascual M, Colvin RB, et al. Prevalence of renal cell carcinoma in patients with ESRD pre-transplantation: a pathologic analysis. *Kidney Int* 2002;61:2201–9.
- [29] Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carcinoma. *J Urol* 2006;176:2353–8.
- [30] Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen (DGHO). Leitlinie Nierenzellkarzinom (Hypernephrom) Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen (DGHO) 2014.
- [31] Novick AC, Campbell SC. Guideline for Management of the Clinical Stage 1 Renal Mass. American Urological Association Education and Research, Inc.; 2009.
- [32] Shannon BA, Cohen RJ, de Bruto H, Davies RJ. The value of preoperative needle core biopsy for diagnosing benign lesions among small, incidentally detected renal masses. *J Urol* 2008;180:1257–1261; discussion 1261.
- [33] Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol* 2010;58:398–406.
- [34] Woldrich JM, Palazzi K, Stroup SP, Sur RL, Parsons JK, Chang D, et al. Trends in the surgical management of localized renal masses: thermal ablation, partial and radical nephrectomy in the USA, 1998–2008. *BJU Int* 2013;111:1261–8.
- [35] Deutsche Gesellschaft für Urologie. Urologen appellieren auf 65. DGU-

- Kongress: Nierenfunktion entscheidend für Lebensqualität und Lebenserwartung 2013.
- [36] McGahan JP, Browning PD, Brock JM, Tesluk H. Hepatic ablation using radiofrequency electrocautery. *Invest Radiol* 1990;25:267-70.
- [37] Zlotta AR, Wildschutz T, Raviv G, Peny MO, van Gansbeke D, Noel JC, et al. Radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) is a possible new modality for treatment of renal cancer: ex vivo and in vivo experience. *J Endourol Endourol Soc* 1997;11:251-8.
- [38] Bhat S, Coleman HG, Yousef F, Johnston BT, McManus DT, Gavin AT, et al. Risk of Malignant Progression in Barrett's Esophagus Patients: Results from a Large Population-Based Study. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2011;103:1049-57.
- [39] Yadla M, Parvathina S, Chennu K, Durgaprasad R, Vanaja V, Vishnubotla S. Successful management of recurrent atrio-ventricular nodal re-entrant tachycardia with radiofrequency ablation in a patient on maintenance hemodialysis. *Saudi J Kidney Dis Transplant Off Publ Saudi Cent Organ Transplant Saudi Arab* 2014;25:415-8.
- [40] Zagoria RJ, Pettus JA, Rogers M, Werle DM, Childs D, Leyendecker JR. Long-term outcomes after percutaneous radiofrequency ablation for renal cell carcinoma. *Urology* 2011;77:1393-7.
- [41] Gervais DA, McGovern FJ, Arellano RS, McDougal WS, Mueller PR. Radiofrequency ablation of renal cell carcinoma: part 1, Indications, results, and role in patient management over a 6-year period and ablation of 100 tumors. *AJR Am J Roentgenol* 2005;185:64-71.
- [42] Lowrance WT, Yee DS, Savage C, Cronin AM, O'Brien MF, Donat SM, et al. Complications after radical and partial nephrectomy as a function of age. *J Urol* 2010;183:1725-30.
- [43] Campbell SC, Novick AC, Belldegrun A, Blute ML, Chow GK, Derweesh IH, et al. Guideline for management of the clinical T1 renal mass. *J Urol* 2009;182:1271-9.
- [44] Lehman DS, Hruby GW, Phillips CK, McKiernan JM, Benson MC, Landman J. First Prize (tie): Laparoscopic renal cryoablation: efficacy and complications for larger renal masses. *J Endourol Endourol Soc* 2008;22:1123-7.
- [45] Nabi G, Goodman C, Melzer A. High intensity focused ultrasound treatment of small renal masses: Clinical effectiveness and technological advances. *Indian J Urol IJU J Urol Soc India* 2010;26:331-7.
- [46] Olweny EO, Cadeddu JA. Novel methods for renal tissue ablation. *Curr Opin Urol* 2012;22:379-84.
- [47] Cosman ER, Nashold BS, Ovelman-Levitt J. Theoretical aspects of radiofrequency lesions in the dorsal root entry zone. *Neurosurgery* 1984;15:945-50.
- [48] Hansen PD, Rogers S, Corless CL, Swanstrom LL, Siperstien AE. Radiofrequency ablation lesions in a pig liver model. *J Surg Res* 1999;87:114-21.
- [49] Balageas P, Cornelis F, Le Bras Y, Hubrecht R, Bernhard JC, Ferrière JM, et al. Ten-year experience of percutaneous image-guided radiofrequency ablation of malignant renal tumours in high-risk patients. *Eur Radiol* 2013;23:1925-32.
- [50] Goldberg SN. Radiofrequency tumor ablation: principles and techniques. *Eur J Ultrasound Off J Eur Fed Soc Ultrasound Med Biol* 2001;13:129-47.
- [51] Del Cura JL, Zabala R, Iriarte JI, Unda M. Treatment of renal tumors by percutaneous ultrasound-guided radiofrequency ablation using a multitined electrode: effectiveness and complications. *Eur Urol* 2010;57:459-65.
- [52] Pereira PL, Trübenbach J, Schenk M, Subke J, Kroeber S, Schaefer I, et al. Radiofrequency Ablation: In Vivo Comparison of Four Commercially Available Devices in Pig Livers. *Radiology* 2004;232:482-90.
- [53] Goldberg SN, Stein MC, Gazelle GS, Sheiman RG, Kruskal JB, Clouse ME.

- Percutaneous radiofrequency tissue ablation: optimization of pulsed-radiofrequency technique to increase coagulation necrosis. *J Vasc Interv Radiol JVIR* 1999;10:907–16.
- [54] Mulier S, Mulier P, Ni Y, Miao Y, Dupas B, Marchal G, et al. Complications of radiofrequency coagulation of liver tumours. *Br J Surg* 2002;89:1206–22.
- [55] Nakada SY, Jerde TJ, Warner TF, Wright AS, Haemmerich D, Mahvi DM, et al. Bipolar radiofrequency ablation of the kidney: comparison with monopolar radiofrequency ablation. *J Endourol Endourol Soc* 2003;17:927–33.
- [56] Haemmerich D, Wright AW, Mahvi DM, Lee FT Jr, Webster JG. Hepatic bipolar radiofrequency ablation creates coagulation zones close to blood vessels: a finite element study. *Med Biol Eng Comput* 2003;41:317–23.
- [57] Ritz J-P, Lehmann KS, Reissfelder C, Albrecht T, Frericks B, Zurbuchen U, et al. Bipolar radiofrequency ablation of liver metastases during laparotomy. First clinical experiences with a new multipolar ablation concept. *Int J Colorectal Dis* 2006;21:25–32.
- [58] Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Mechanisms of Focal Heat Destruction of Liver Tumors. *J Surg Res* 2005;127:208–23.
- [59] Gravante G, Ong SL, Metcalfe MS, Bhardwaj N, Lloyd DM, Dennison AR. The effects of radiofrequency ablation on the hepatic parenchyma: histological bases for tumor recurrences. *Surg Oncol* 2011;20:237–45.
- [60] Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3–15.
- [61] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239–57.
- [62] Dietmar P. Berger, Rupert Engelhardt, Roland Mertelsmann, Hüthig Jehle Rehm. *Das Rote Buch*. 11.12.2013; n.d.
- [63] Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002;296:1635–6.
- [64] Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995;14:5579–88.
- [65] Dickens LS, Powley IR, Hughes MA, MacFarlane M. The “complexities” of life and death: death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res* 2012;318:1269–77.
- [66] Kühl M, Linnemann M. *Biochemie für Mediziner*. 7. Auflage. n.d.
- [67] von Joachim Rassow, Karin Hauser, Rainer Deutzmann, Roland Netzker. *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag KG; 2012.
- [68] Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491–501.
- [69] Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94:481–90.
- [70] Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu Rev Biochem* 2006;75:189–210.
- [71] Mille F, Thibert C, Fombonne J, Rama N, Guix C, Hayashi H, et al. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nat Cell Biol* 2009;11:739–46.
- [72] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012;19:107–20.
- [73] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007;87:99–163.

- [74] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479–89.
- [75] Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 2008;12:743–61.
- [76] Ritossa F. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Exp* 1962 18571-3 n.d.
- [77] Didelot C, Schmitt E, Brunet M, Maingret L, Parcellier A, Garrido C. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol* 2006:171–98.
- [78] Nollen EA, Brunsting JF, Roelofsen H, Weber LA, Kampinga HH. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol* 1999;19:2069–79.
- [79] Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle Georget Tex* 2006;5:2592–601.
- [80] Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CPZ, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 2005;280:38729–39.
- [81] Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000;2:476–83.
- [82] Jacobsohn KM, Ahrar K, Wood CG, Matin SF. Is Radiofrequency Ablation Safe for Solitary Kidneys? *Urology* 2007;69:819–23.
- [83] Patard J-J. Incidental renal tumours. *Curr Opin Urol* 2009;19:454–8.
- [84] Takaki H, Soga N, Kanda H, Nakatsuka A, Uraki J, Fujimori M, et al. Radiofrequency Ablation versus Radical Nephrectomy: Clinical Outcomes for Stage T1b Renal Cell Carcinoma. *Radiology* 2014;270:292–9.
- [85] Thorstenson A, Bergman M, Scherman-Plogell A-H, Hosseinnia S, Ljungberg B, Adolfsson J, et al. Tumour characteristics and surgical treatment of renal cell carcinoma in Sweden 2005-2010: a population-based study from the National Swedish Kidney Cancer Register. *Scand J Urol* 2014.
- [86] Krokidis K, Spiliopoulos S, Jarzabek M, Fotiadis N, Sabharwal T, O'Brien T, et al. Percutaneous radiofrequency ablation of small renal tumours in patients with a single functioning kidney: long-term results. *Eur Radiol* 2013;23:1933–9.
- [87] Ito N, Pfeffer J, Isfort P, Penzkofer T, Kuhl CK, Mahnken AH, et al. Bipolar Radiofrequency Ablation: Development of a New Expandable Device. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2013.
- [88] Lee JM, Han JK, Kim SH, Sohn KL, Lee KH, Ah SK, et al. A Comparative Experimental Study of the In-vitro Efficiency of Hypertonic Saline-Enhanced Hepatic Bipolar and Monopolar Radiofrequency Ablation. *Korean J Radiol* 2003;4:163–9.
- [89] McGahan JP, Gu WZ, Brock JM, Tesluk H, Jones CD. Hepatic ablation using bipolar radiofrequency electrocautery. *Acad Radiol* 1996;3:418–22.
- [90] Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, Meloni F, Solbiati L, Gazelle GS. Small Hepatocellular Carcinoma: Treatment with Radio-frequency Ablation versus Ethanol Injection. *Radiology* 1999;210:655–61.
- [91] Lu DSK, Raman SS, Limanond P, Aziz D, Economou J, Busuttil R, et al. Influence of large peritumoral vessels on outcome of radiofrequency ablation of liver tumors. *J Vasc Interv Radiol JVIR* 2003;14:1267–74.
- [92] Patterson EJ, Scudamore CH, Owen DA, Nagy AG, Buczkowski AK. Radiofrequency ablation of porcine liver in vivo: effects of blood flow and treatment time on lesion size. *Ann Surg* 1998;227:559–65.
- [93] Kunzli BM, Abitabile P, Maurer CA. Radiofrequency ablation of liver tumors:

- Actual limitations and potential solutions in the future. *World J Hepatol* 2011;3:8–14.
- [94] Frericks BB, Ritz JP, Roggan A, Wolf K-J, Albrecht T. Multipolar radiofrequency ablation of hepatic tumors: initial experience. *Radiology* 2005;237:1056–62.
- [95] Goldberg SN, Gazelle GS. Radiofrequency tissue ablation: physical principles and techniques for increasing coagulation necrosis. *Hepatogastroenterology* 2001;48:359–67.
- [96] Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993;259:1409–10.
- [97] Ma Y, Bedir S, Cadeddu JA, Gahan JC. Long-term outcomes in healthy adults after radiofrequency ablation of T1a renal tumours: RFA outcomes in healthy patients. *BJU Int* 2014;113:51–5.
- [98] Pareek G, Wilkinson ER, Bharat S, Varghese T, Laeseke PF, Lee FT Jr, et al. Elastographic measurements of in-vivo radiofrequency ablation lesions of the kidney. *J Endourol Endourol Soc* 2006;20:959–64.
- [99] Ohno T, Kawano K, Sasaki A, Aramaki M, Yoshida T, Kitano S. Expansion of an ablated site and induction of apoptosis after microwave coagulation therapy in rat liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:360–6.
- [100] Best SL, Park SK, Youssef RF, Yaacoub RF, Olweny EO, Tan YK, et al. Long-term outcomes of renal tumor radio frequency ablation stratified by tumor diameter: size matters. *J Urol* 2012;187:1183–9.
- [101] Wah TM, Irving HC, Gregory W, Cartledge J, Joyce AD, Selby PJ. Radiofrequency ablation (RFA) of renal cell carcinoma (RCC): experience in 200 tumours: RFA for RCC. *BJU Int* 2014;113:416–28.
- [102] Yuksel MB, Karakose A, Gumus B, Tarhan S, Atesci YZ, Akan Z. Analysis of radiofrequency ablation of small renal tumors in patients at high anesthetic and surgical risk: urologist experience with follow-up results in the initial six months. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2013;14:6637–41.
- [103] Olweny EO, Park SK, Tan YK, Best SL, Trimmer C, Cadeddu JA. Radiofrequency Ablation Versus Partial Nephrectomy in Patients with Solitary Clinical T1a Renal Cell Carcinoma: Comparable Oncologic Outcomes at a Minimum of 5 Years of Follow-Up. *Eur Urol* 2012;61:1156–61.
- [104] Lucas SM, Stern JM, Adibi M, Zeltser IS, Cadeddu JA, Raj GV. Renal function outcomes in patients treated for renal masses smaller than 4 cm by ablative and extirpative techniques. *J Urol* 2008;179:75–79; discussion 79–80.
- [105] Miller DC, Schonlau M, Litwin MS, Lai J, Saigal CS, Urologic Diseases in America Project. Renal and cardiovascular morbidity after partial or radical nephrectomy. *Cancer* 2008;112:511–20.
- [106] Rolland PH, Berry JL, Louis G, Velly L, Vidal V, Brige P, et al. A Nanoengineered Embolic Agent for Precise Radiofrequency Ablation. *Ann Biomed Eng* 2014;42:940–9.
- [107] Boorjian S. Commentary on “Cytoreductive radiofrequency ablation in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC) with small primary tumours treated with sunitinib or interferon- $\alpha$ .” Tsimafeyeu I, Zart JS, Chung B, Kidney Cancer Research Bureau, Moscow, Russian Federation. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 2014;32:514–5.