

3. Eigene Untersuchungen

Die Versuche wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigten Versuchsvorhabens (Genehmigungs-Nr. 0282/94) durchgeführt.

Die Untersuchungen lassen sich in Vor- (3.1) und Hauptuntersuchungen (3.2) gliedern. Jeweils werden Material & Methoden und Ergebnisse & Diskussion unterschieden.

3.1 Vorversuche zum Thrombenmodell

3.1.1 Material und Methoden

Zur kernspintomographischen Untersuchung von venösen Thromben unter Zuhilfenahme von SPIO lagen zu Beginn der Studie noch keine Erfahrungen vor.

Aus der Vielzahl der in anderen Zusammenhängen etablierten Modelle der Thrombusinduktion (s. Breddin, Gross, Rotter [**Breddin, 1981**]) wurden folgende vier auf ihre Standardisierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Praktikabilität hin untersucht:

- I. Gleichstrom-Thrombusinduktion in der Vena iliaca
- II. Thrombin-Gabe in der Vena iliaca
- III. Laserthermische Koagulation in der Vena iliaca
- IV. Thrombin-Gabe in der Vena jugularis

ad I.)

Bei der Gleichstrommethode wird durch eine Vena sectio in der rechten Leiste eine Mikroelektrode (Herzdraht KSS, Firma Ethicon, 2 metric, 3-0, HD 23 SS), angeschlossen an der Anode der Konstantstromquelle (Elabor Typ 2 GA 3682-1H (45-26), in die rechte Vena femoralis eingeführt und ihrem Verlauf folgend über die V. iliaca communis dexter bis zur Einmündung der V. iliaca communis in die V. cava inferior vorgeschoben. Diese Position ist in zirka 1,5 - 2 cm Tiefe erreicht. Eine einfache Umschlingung sichert dann den Draht im Gefäß und die Hautwunde wird mit feuchten sterilen Tupfern bedeckt. In der vorderen rechten Axillarlinie in Höhe der unteren Thoraxapertur wird eine 23 G Kanüle in das subkutane Fettgewebe gestochen, welche an die Kathode der Stromquelle angeschlossen ist. Der Gleichstrom wird über eine halbe Stunde appliziert, in der ersten Minute mit einer konstanten Stromstärke von 2,5 Milliampere, in den anschließenden Minuten mit konstant 0,5.mA. Bei drei Tieren wurde dieses Verfahren erprobt.

ad II.)

Bei der Thrombin-Methode wird die Vena iliaca freipräpariert, ein künstlicher Blutstillstand durch Kompression erreicht und 1000 IE Thrombin injiziert. Nach der Bildung des Thrombus wird der Zugang chirurgisch verschlossen. Drei Tieren wurde so ein Thrombus induziert.

ad III.)

Bei der Laser-Methode wird ein 2 mm dicke "Hot-Tip"-Faser (Trimeddyne Inc, Santa Ana Ca) verwendet, bei der eine Silikatfaser in einen runden Metallknopf von 2 mm Durchmesser mündet. Durch Aktivierung des Lasers wird dieser in kürzester Zeit auf 500° bis 700°C erhitzt. Dies geschieht mehrmals in Form von Pulsen, nachdem die "Hot-Tip"-Faser über eine Vena sectio in die rechte V. fem. eingeführt und über die V. iliaca com. bis zur Einmündung in die V. cava inf. vorgeschoben wurde. Dabei werden Laserstöße von 4-7 Watt appliziert. Die Untersuchungsgruppe umfaßte drei Ratten.

ad IV.)

Die Thrombin-Methode in der Vena jugularis externa entspricht der zweiten Methode mit dem Unterschied der Lokalisation des operativen Vorgehens, der Schaffung des Blutstillstandes über passageres Anschlaufen der freipräparierten V. jugularis externa statt manueller Kompression und mit zusätzlicher Embolieprophylaxe mittels subtotaler Stenose. Dieses Modell ist den drei anderen überlegen und wird in Material und Methoden des Hauptversuches (siehe 3.2.1) detailliert beschrieben.

3.1.2 Ergebnisse und Diskussion

ad I.)

Dieses Verfahren bietet einige Vorteile: Über dem Thrombus befindet sich keine Operationswunde, die das Meßgebiet stören könnte. Die Induktion ist exakt reproduzierbar, weil sich Elektrizität genauestens dosieren läßt.

Dieses Modell wird im Klinikum Benjamin Franklin bevorzugt.

Es hat allerdings gewichtige Nachteile: Die kernspintomographische Darstellung der Beckenregion ist schwierig, da die Automotilität des Darmes die Messungen stören kann.

Arterien und Venen liegen in unmittelbarer Nachbarschaft und können sich überlagern. Der Thrombus, der durch Gleichstrom induziert wurde, ist der Embolisierungsgefahr ausgesetzt, da keine kleine Ligatur zur Fixierung des Thrombus vorgenommen werden kann.

Auch aus tierschützerischer Perspektive ist diese Methode grenzwertig. Die V. iliaca verfügt über kein ausgeprägtes System an Kollateralen und ihre Thrombosierung führt zu venösen

Stauungen mit Beeinträchtigung (Zyanose bis Nekrose) der Gliedmaße und damit des Allgemeinbefindens.

Die histologischen Eisenfärbungen zeigen beim elektrischen Modell unabhängig davon, ob ein eisenhaltiges KM eingesetzt wurde, einen erhöhten Eisengehalt im Thrombus. Dieser ist so stark, daß nur ehemaliges Häm-Eisen dafür nicht allein verantwortlich sein kann.

Weidenbach und Sedlarik [Weidenbach, 1978] beschrieben 1978 bei Versuchen an Zwergschweinen, daß es zu einer Eisenablagerung in der Gefäßwand von der Stahldrahtelektrode durch Gleichstromwirkung kommt. Da es im MR-Bild durch solche Ablagerungen zu einer Signalstörung kommt, untersuchten wir daraufhin eine Palladium-Elektrode auf ihre eisenfreie thrombogene Wirksamkeit. Auch auf diese Weise kommt es nach Gleichstromapplikation zu Eisenablagerungen, unabhängig vom KM-Einsatz. Es ist also wahrscheinlich, daß auch zusätzlich körpereigene Ionen durch die angelegte Spannung mobilisiert werden.

Daraufhin wurde die Suche nach einer Nichteisen-Elektrode (Platindraht) abgebrochen und diese Methode verlassen, da der Kontrastmittelursprung, der mittels histologischen Färbungen nachgewiesenen Eisenspuren, nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte (siehe Abb. 1). Eine radioaktive oder fluoreszierende Markierung des KM-Eisens kam nicht in Betracht.

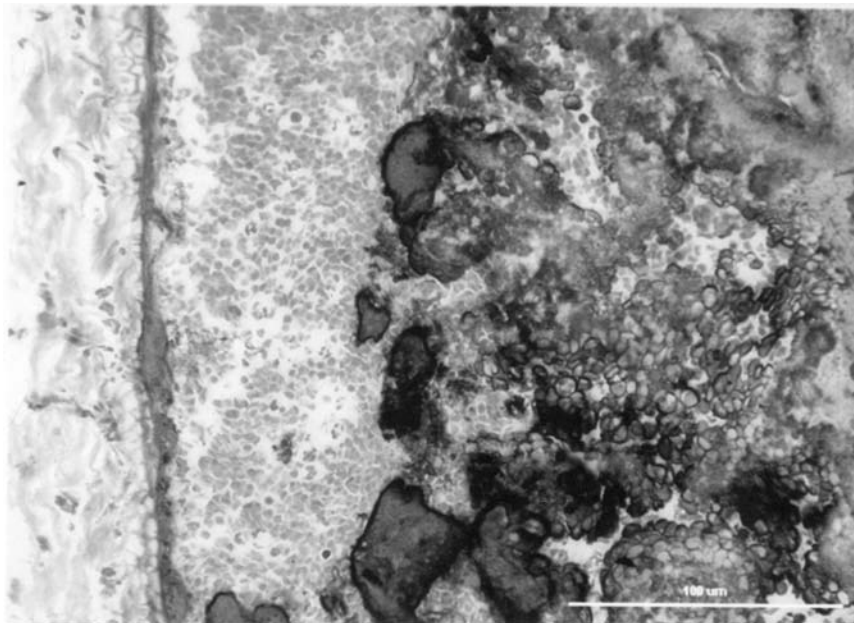


Abb.1: Berliner-Blau-Färbung eines durch Gleichstrom induzierten 24 h- alten Thrombus. Massive Eiseneinlagerungen sind blau angefärbt.
Links die Gefäßwand, rechts das Zentrum des Thrombus

ad II)

Die Induktion eines Thrombus in der Vena iliaca mit Hilfe von Thrombin ist in den Händen eines versierten Tierexperimentators im mikrochirurgischen Labor möglich. Der **Vorteil** liegt im Verzicht auf elektrischen Strom mit der Verhinderung von Ionen (Eisen) - Anreicherungen aus dem Körperbestand.

Diese bleiben so auf das magnetresonanztomographische Bild ohne Auswirkung. Die **Gefahr** eines Infarktes ist aber weiterhin gegeben, da keine Embolieprophylaxe realisierbar ist, d.h., daß dem Ablösen und Abschwimmen des Thrombus nicht vorgebeugt werden kann. Auf die Möglichkeit einer Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Versuchstiere, wurde unter I) hingewiesen.

ad III.)

Als Alternative wurde das laserthermische Induktionsmodell erprobt.

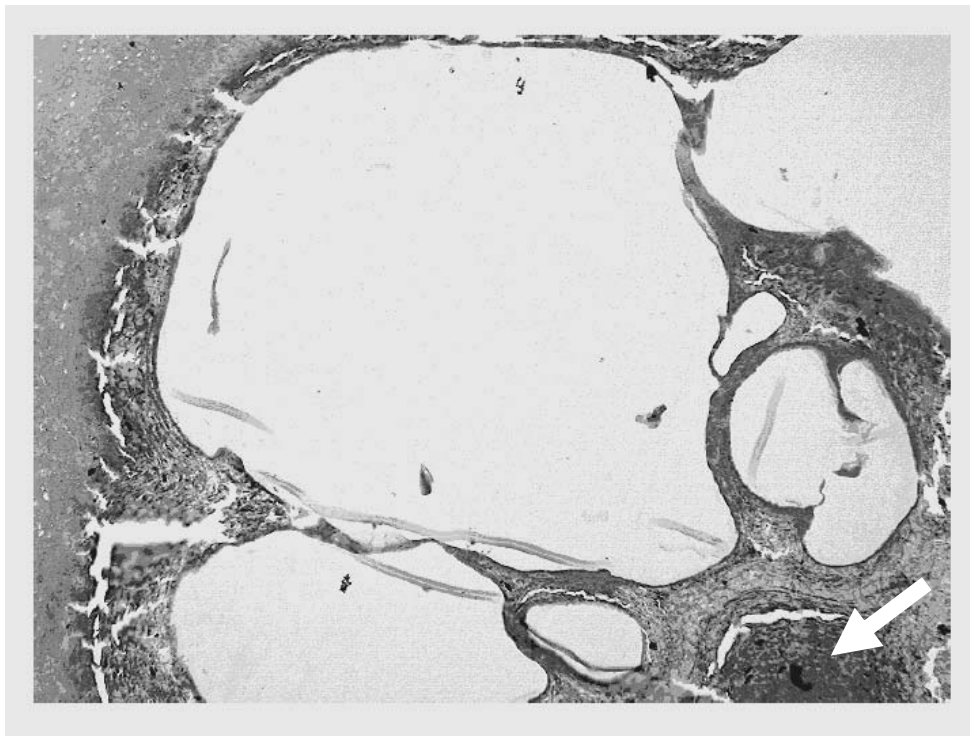


Abb.2: HE-Färbung einer laserthermischen Venenobliteration.
Die Hitzeblasen gruppieren sich traubenförmig um die „Hot-Tip“-Faser
(mit einem Pfeil ist deren ehemalige Lage markiert)

Die auf diese Weise erzeugten Gefäßverschlüsse hatten pathohistologisch mit einem intra vitam entstandenen Thrombus nichts gemein. Zentral befand sich eine traubenförmige Ansammlung von kleinen Blasen (siehe Abb. 2). Diese Venenobliteration nach Vorwerk et al. [Vorwerk, 1994] wurde verlassen.

ad IV.)

Die Thrombin-Induktionsmethode in der Vena jugularis wurde aufgrund folgender Vorzüge gewählt:

- Die Tiere waren in ihrem Allgemeinbefinden ungestört.
- Das Setzen des Thrombus bedarf keines mikrochirurgischen Labors.
- Die Thrombusbildung erfolgt unter Sichtkontrolle.
- Eine Embolisierung kann wirksam durch eine subtotale Stenose verhindert werden.
- Die Thrombusbildung erfolgt ohne künstliche Hilfsmittel (Elektrizität, Laserstrahlen) als Imitation der Pathogenese eines Thrombus, der durch Stase und Hyperkoagulabilität in der Humanmedizin entsteht.
- Es gibt bei diesem Vorgehen keine galvanische Abscheidung von Eisen der Anode. Dadurch wird es möglich, gefundenes Eisen zweifelsfrei als aus den untergegangenen Erythrozyten oder dem Kontrastmittel stammend zu identifizieren. Darüber hinaus ist das histologische Bild nicht durch methodische Artefakte in Mitleidenschaft gezogen.
- Die Vena jugularis wird von keinem pulsierenden Blutgefäß begleitet. Arterien könnten die Bildgebung in der Vene beeinträchtigen
- Die Vena jugularis ist eines der größten Gefäße im Rattenkörper.
- Die MR-tomographische Darstellung ist im Halsbereich besonders günstig, da wenig Bewegungsartefakte dort auftreten.

3.2 Hauptstudie

3.2.1 Material und Methoden

Tiere, Narkose, Operationstechnik

Für die Versuche wurden 42 männliche Wistar-Ratten vom Albinostamm (Han:WIST) mit einem Gewicht zwischen 300 und 500 g verwendet, welche vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin geliefert wurden.

Unterschiede in Körpergewicht resp. Alter ließen sich nicht vermeiden, da die Bestellung und Vorbehandlung der Tiere nach den zur Verfügung stehenden MR-tomographischen Untersuchungsterminen vorgenommen wurden. Die Unterbringung erfolgte zu 2 - 3 Tieren in Makrolonkäfigen Typ IV. Als Einstreu diente entstaubtes Holzgranulat der Firma Altromin (Lage, Lippe). Die Raumtemperatur wurde zwischen 20° und 22° C gehalten, die Luftfeuchte betrug 50 - 55 % und ein zwölfstündiger Hell-Dunkel-Wechsel war vorgegeben. Somit wurden die Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde befolgt.

Die Ernährung wurde durch pelletiertes Standard-Rattenfutter (Altromin, Lage,Lippe) und Leitungswasser, beides ad libitum, sichergestellt.

Es wurden 6 Gruppen (1d, 3d, 5d, 7d, 9d und 11d) gebildet, mit jeweils 7 Tieren.

Narkose

Damit die Tiere leichter handhabbar waren, wurden sie vorher kurz, d.h. bis zum Wirkungseintritt, in einen Äther-Topf verbracht.

Das für die Katzen-Praxis entwickelte TILEST 500 (Firma Parke-Davis) mit seiner Kombination von Tiletamin und Zolazepam kam anfänglich zu Einsatz. Dosierte wurde es mit 15 mg/kg s.c. Nach Eintritt des Toleranzstadiums wurde Rompun zusätzlich i.m. injiziert. Eine Nachdosierung war nicht nötig.

TILEST : 15mg/kg s. c. + ROMPUN : 5mg/kg i. m

Während des experimentellen Teils, wurde die Herstellung von Tilest eingestellt, so daß die gängige tiermedizinische Vorgehensweisen, die Injektion von Ketamin (KETANEST 50) zur Schmerzausschaltung (80 mg/kg i.m.) und Rompun (12 mg/kg i.m.) zur Muskelrelaxation, mit kürzerer Wirkungsdauer Verwendung fanden. Bei einer Gesamtuntersuchungszeit von ca. 120 Minuten musste das wiederholt werden.

Thrombin- Konfektionierung und -Dosierung

Die Ausgangssubstanz wird von SIGMA[®]-Aldrich Chemie GmbH Steinheim bezogen. Es handelt sich dabei um 1.000 Einheiten aus bovinem Plasma gewonnenen Thrombin.

Das lyophilisierte Pulver enthält ungefähr 50% Protein, welches zusätzlich NaCl enthält und mit Tris HCl auf pH 7,0 bilanziert (21 mg gelöst, 48 Einheiten / gelöstem mg, 98 Einheiten / mg Protein) wird. Es ist aktiviert mit bovinem Gehirn-Thromboplastin und getrocknet.

Gelagert werden muß es bei weniger als 0° C, also im Tiefkühlschrank.

Das exakte Dosieren ist bei der benötigten winzigen Enzymmenge nur mit der Satorius-Analysenwaage möglich.

Bei einem Bedarf von ca. 100 Einheiten Thrombin pro Tier, wird für zwei Tiere 4 mg Ausgangssubstanz abgewogen und in 0,4 ml isotoner Kochsalzlösung gelöst, die sich in einem 1,5 ml fassenden Reaktionsgefäß (PLASTIBRAND) der Firma Brand - Wertheim befindet.

Operationstechnik

Das vollständig (Äther, Tilest, Rompun) betäubte Tier wird im linken Trigonum omoclaviolare (Fossa supraclavicularis major) elektrisch geschoren und in Rückenlage mit Klebestreifen auf dem OP-Tisch fixiert. Weiter kranial in der Regio colli lateralis stören subfasziale Lymphknoten den operativen Zugang zur Vena jugularis externa. Zuerst wird die Oberhaut mit einem Einmalskalpell Marke FEATHER FIG 20 vorsichtig auf einer Länge von ungefähr 10 mm parallel zur Medianen perforiert. Anschließend benutzt man nur noch ein spitzes Skalpell FIG 11 und feine spitze Pinzetten, um mehr oder weniger stumpf zur Vene vorzudringen und diese zu läsen. Sobald das gelungen ist, schlaucht man sie mit einem CAT-GUT-Faden (Firma ETHICON 3-0) an und zieht sie leicht kaudal, um sie mittels einer kleinen Klemme in der Regio epigastrica zu fixieren. Durch diesen „Zügel“ wird eine vollständige Hämostase erzielt. Das Wundgebiet wird regelmäßig mit sterilen Kompressen (Gazin) vom Blut befreit und mit istoton. NaCl-Lösung 0,9% (BRAUN-Melungen) vor dem Austrocknen bewahrt. Nun kann man mit einer feinen Venenverweilkanüle der schwedischen Firma Ohmeda (Neoflon 0,6/19mm) die Venenwand kanülieren und das Aliquot Thrombin langsam injizieren. Dabei führt man die Kanüle reibend 20mm vor und zurück und streicht zusätzliches Blut von kranial in den sich bildenden Blutpfropf. Dadurch erhofft man, infolge der leichten mechanischen Alteration der Gefäßwand, ein besseres Haften des Thrombus zu erreichen. Zur Prävention einer Lungenembolie setzt man anschließend eine partielle Ligatur, indem man distal des „Zügels“, die Vene und die Plastikspitze einer Venenverweilkanüle mit sehr dünner Seide (Virgin Silk 8/0 ETHICON) umschlingt und verknotet. Der „Platzhalter“, i.e. die Plastikspitze, wird anschließend vorsichtig herausgezogen. Darauf gibt man noch eine 1:1 Mischung von

Streptomycin-Heyl und Penicillin "Grünenthal" in Tropfenform in das Wundgebiet. Die Wunde wird in zwei Schichten verschlossen. Die Unterhaut mit Vicryl 3-0 USP / 2 metric, die Oberhaut mit Prolene 3/0 (2metric). Anschließend wird das Tier mit Papier bedeckt und in seinen Käfig gelegt, der je nach Umgebungstemperatur auch neben der Heizung positioniert werden kann.

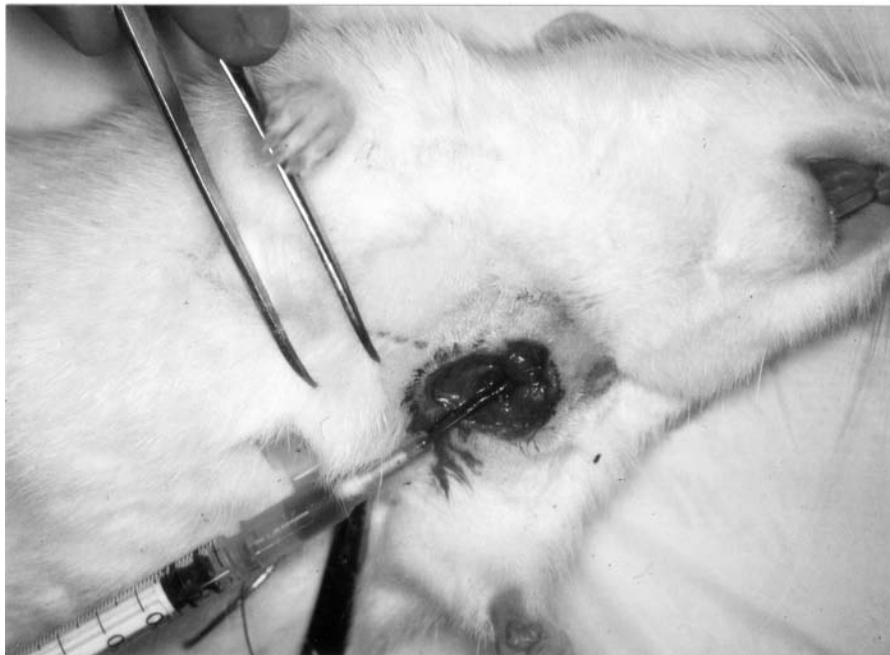


Abb.3 : Operationssitus
Thrombeninduktion mittels Thrombininjektion
In die V. jugularis

3.2.1.1 Kernspintomographische Untersuchung

Das klinische Standardgerät mit 1,5 Tesla Magnetfeldstärke (Vision; Siemens, Erlangen, Deutschland) wurde verwandt. In der dazugehörigen Kniespule mit einem lichten Durchmesser von 20 cm (Siemens Magnetom CP Extremity Coil), wurden die Ratten auf dem Rücken auf einer angefertigten Lagerungsplatte (s. u.) untersucht. Die Untersuchung erfolgte 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 Tage nach Thrombusinduktion und dann unmittelbar vor (prae bzw. nativ), und in 10', 30' und 90 minütigem Abstand nach KM-Gabe. Die Tiere wurden dann wie bei der OP betäubt.

Ein Zugang zur Vena caudalis wurde gelegt, indem nachdem der Schwanz heiß gesäubert wurde eine Vasofix Braunüle 22 G1'' (0,9 x 25 mm) von der Firma Braun-Melsungen gelegt wurde. Dadurch konnte später der durch Polyurie häufig eintretenden Exsikkose mittels Infusionen entgegen gewirkt werden und das Kontrastmittel injiziert werden. Um die zwei gleichzeitig auszuwertenden Tiere in dieser Röhre waagrecht nebeneinander zentral positionieren zu können, fertigte man eine spezielle Lagerungsplatte an:

Diese ist 18 x 28 cm groß und 7 mm dick. Zur Verlängerung der Haltbarkeit ist sie mit einer Plastikfolie überzogen. Damit sich die Halsgefäße gestreckt in einer Ebene darstellen lassen, sind an einer Schmalseite zwei "Kopfstützen" befestigt. Sie sind 40 x 26 x 7 mm groß

und dienen der gleichzeitigen Darstellung aller interessierenden Gefäßabschnitte in einer Schicht. Bei ihnen handelt es sich um geschlossene *Tissue-Tek III* – Plastikkassetten, die über BAYER DIAGNOSTICS U.K. LTD - Evans House Houndsmill, Basingtoke Hampshire, RG21 2YE bezogen werden. Auf der Pappe sind sie 3 cm von der Schmalseite, je 4 cm von den beiden seitlichen Breitseiten und 6cm voneinander entfernt aufgeklebt.

Auf diese Platte werden nun die zwei Ratten gelegt, links und rechts mit gerolltem Papier stabilisiert und am Kinn mit Klebestreifen auf der Unterlage fixiert.

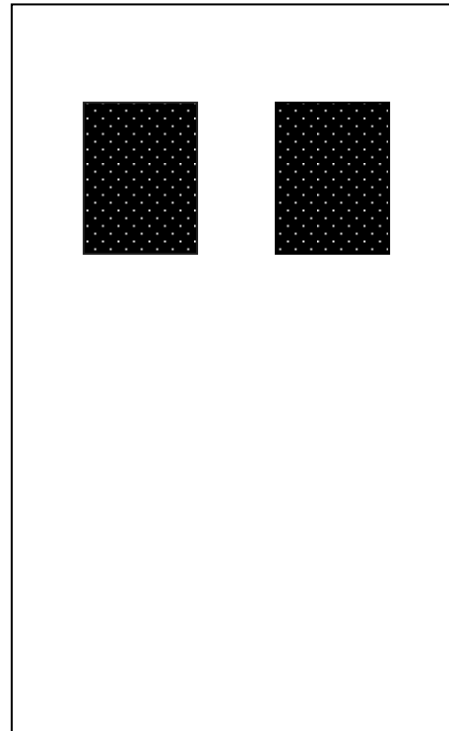


Abb.4: Lagerungsplatte mit zwei Kunststoffboxen für die Lagerung der Köpfe

Aufnahmesequenzen

Technik	TR [ms]	TE [ms]	FA [Grad]	FoV [mm]	Matrix Pixel	Pixel- größe [mm]	Schic- ht- dicke [mm]	Schicht- zahl	Akquisi- tionen	Orien- tierung	Gesamt- meßzeit [min]
SE T1	500	15	90	75 x 150	128 x 2560	0,59x0,59x2	2	17	4	transversal	04:19
SE T2	2100	70	90	75 x 150	128 x 2560	0,59x0,59x2	2	17	2	transversal	09:01
f12d	300	10	60	75 x 150	128 x 2560	0,59x0,59x2	2	13	12	transversal	07:43
fisp 3d	50	6	40	165 x 220	162 x 5120	1,02 x 0,04 x 0,7	0,7	20	1	koronal	05:28

Tabelle 2

3.2.1.2 Kontrastmittel

DDM 43/34, die verwendete Substanz, ist eine kolloidale Lösung von sphärischen superparamagnetischen $\text{Fe}^{++}/\text{Fe}^{+++}$ Oxidkristallen (kontrastbeeinflussende Komponente), die zur galenischen Stabilisierung mit Carboxydextran beschichtet sind. Der mittlere Außendurchmesser beträgt 34 nm. Es wird als undurchsichtige, schwarze, kolloidale Lösung ausgeliefert.

Deklariert ist die Zusammensetzung der Lösung mit einer Konzentration von 55-57 mg Fe/ml und 60-65 mg Carboxydextran (Cdx) / ml. Die Partikel besitzen eine schwache negative Oberflächenladung, die wahrscheinlich auf die Carboxylgruppen der Dextrane zurückzuführen ist (Polyanion).

Eine genaue Zuordnung der Identität des Eisenoxides ist nicht möglich, da bei Partikeln dieser Größenordnung weder die kristallographischen (Röntgendiffraktion) noch die mößbauer-spektroskopischen Messungen eine Differenzierung von Magnetit (Fe_3O_4) und Magnetit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) erlauben. Über die Bestimmung des Fe^{++} -Anteils, war es anderen möglich festzustellen, daß statt dem zu erwartenden Anteil von 33% nur ca. 20% des Eisens in divalenter Form vorlagen.

Gelagert wurde DDM 43/34 bei 6° C in einer dunklen Flasche, da es sich gezeigt hat, daß unter dem Einfluß von höheren Temperaturen und durch Beleuchtung die Substanz aufkonzentriert und oxidiert (Abnahme des prozentualen Fe^{++} -Anteils). Auch verliert der Stoff mit wiederholter Substanzentnahme aus einem Vial die biologische Wirksamkeit. Dies wird auf eine sukzessive Oxidation des Eisenoxidkerns zurückgeführt, da sich bei jeder Entnahme das Luftvolumen im Vial erhöht und eine Oxidation bewirkt.

Relaxivitäten, LD 50 vo Eisen, Halbwertszeit und verwendete Dosis von DDM 43/34

Als Maß des Einflusses von magnetischen Substanzen auf das Relaxationsverhalten von Protonen ist die Relaxivität definiert. Die R1- und R2-Relaxivitäten bei 0,47 Tesla in Aqua bidest. Sind bei 37° Celsius 31 und 57 L/(mmols * s). Bei der Ratte beträgt die LD 50 35 mmol (10^3) Fe/kg Körpergewicht und die Halbwertszeit 56 +/- 17 Minuten.

Für alle Untersuchungen wurde eine Dosis von 30 Mikromol (10^{-9}) Eisen pro Kilogramm Körpergewicht den Ratten appliziert.

3.2.2 Untersuchungsgang

3.2.2.1 Sektion und Histologie

Im Anschluß an die NMR-Untersuchung wird dem noch betäubten Tier der Thrombus entnommen. In Abhängigkeit vom Alter des Thrombus variiert seine Konsistenz und seine Haftung an der Venenwand. Es besteht die Gefahr, daß er sich ablöst und abschwimmt. Zur Prophylaxe setzt man proximal und distal eine Ligatur mit Vicryl (Firma ETHICON 3-0 USP, 2 metric). Im Anschluß an die Entnahme des Thrombus werden die Tiere in tiefer Narkose durch Blutentzug euthanasiert.

Da es sich um ein MPS-spezifisches KM handelt, entnimmt man dazugehörige Lymphknoten (Nodi lymphatici cervicales superficiales), ein Stück Leber und Milz und zusätzlich die kontralaterale Vene. Gesammelt werden diese Proben in einem kleinen Plastikgefäß (Superpolyethylen VialTM der Firma Packard[®], in Standardgröße zu 20 ml), welches mit Formalin nach Lilly gefüllt ist und bis zur histologischen Einbettung im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt wird.

Histologische Aufbereitung

Die gewonnenen Proben werden in (neutral-) gepuffertem Formalin nach Lilly aufbewahrt, da sich Eisenionen in sauren Fixiermedien aus dem Hämosiderin unter zurücklassen von Aposiderin lösen. Dazu gießt man 100 ml Formol (handelsübliches, etwa 35 %iges Formaldehyd) zu 900 ml aqua dest., in dem zuvor 4g Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) und 6,5g Dinatriumhydrogenphosphat wasserfrei (NaH_2PO_4) gelöst wurden. Das stabilisierte Formalin bewahrt man lichtgeschützt auf. Fixiert wird bei 4° C über Nacht im Kühlschrank.

Anschließend werden die Thromben in *Tissue-Tek[®] III* - Plastikkassetten gelegt, die über BAYER DIAGNOSTICS U.K. LTD. Evans House Houndsmill, Basingtoke Hampshire, RG21 2YE bezogen wurden. Diese verschlossenen Gitterkörbchen haben folgende Abmessungen: 26 x 40 x 7 mm.

Auf diesen Kästchen können die Gewebe eindeutig gekennzeichnet werden und so vergrößert, daß sie gewässert und während der folgenden Entwässerungsreihe leichter und geschützter von einem Alkohol in den nächst höherprozentigen gebracht werden können.

Das entsprechende Schema sieht folgendermaßen aus:

Entwässerungsreihe	Temperatur	Einwirkungsdauer
Aqua purificata	Zimmertemperatur	2 Stunden
Ethanol 70%	Zimmertemperatur	2 Stunden
Ethanol 96%	Zimmertemperatur	2 Stunden
Ethanol 100%	Zimmertemperatur	1 Stunde

Anschließend folgt die Präinfiltration in einem Gemisch unseres Infiltrationsmediums mit 100%igem Ethanol (zu gleichen Teilen) über 2 Stunden bei Zimmertemperatur. Danach kann die Probe einen Tag lang in dem unverdünnten Infiltrationsmedium TECHNOVIT 7100 (Firma Heraeus Kulzer) gehärtet werden. Nach Beendigung der Infiltration legt man die Gewebeteilchen in eine Einbettform (Histoform S), in die vorher mit einer Einwegpipette etwa 1ml Einbettflüssigkeit pro Einbettmulde gegeben wurde.

Die Polymerisation erfolgt innerhalb einer Stunde bei Zimmertemperatur (23°C) und anschließend noch einer weiteren bei 37°C im Wärmeschrank. Nach Ablauf der Polymerisation wird der Trägerteil Histobloc in die Aussparungen der Einbettungsform gelegt, und man bereitet TECHNOVIT 3040 (2-3 Teile Pulver : 1 Teil Flüssigkeit) zu. Das TECHNOVIT 3040 wird in den Histobloc gegeben. Durch Kopolymerisation verbindet sich dann der Histobloc innerhalb von 3-5 Minuten fest mit der Einbettung, d. h. er wird "aufgeblockt". Nun kann die Einbettung aus der Form gelöst werden und steht zum Schneiden in einem JUNG-Mikrotom K, für Hartschnitt-Technik, zur Verfügung.

Die Schnitte werden in aqua dest. gestreckt und auf einer Heizplatte bei 60 °C getrocknet. Darauf sind die Objektträger bereit zur Färbung, da die Kunststoffmatrix nicht entfernt zu werden braucht. Dieses Polymerisationssystem zum Einbetten von Gewebe in 2-Hydroxyethyl-Methacrylat (GMA) bietet entscheidende Vorteile:

- Man erhält ein Kunststoffblöckchen von uniformer Härte, das transparent bleibt und sich nicht verfärbt. Das Polymerisationssystem ist für Inhibition durch Luft-Sauerstoff weniger empfindlich als das GMA-Benzoylperoxid / aromatische Aminensystem.
- Luftdichtes Abschließen mit Paraffin ist nicht erforderlich.
- Die enthaltenen Komponenten sind bedeutend weniger toxisch.
- Während der Polymerisation steigt die Temperatur nicht über 40°C.
- Kürzere Färbezeiten.
- Es besteht die Möglichkeit, Serienschnitte anzufertigen.

Damit kann man 1-2 µm dünne Schnitte anfertigen, was bei der Größe der Halsgefäße einer Ratte erst das Gewinnen einer Anzahl von histologischen Schnitten ermöglicht.

Histologische Färbungen

Mit Hilfe der histologischen Untersuchungen sollen folgende Fragen geklärt werden :

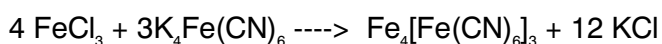
- Ist überhaupt noch ein Thrombus vorhanden?
- Wie sieht dieser zu einem definierten Zeitpunkt mikroskopisch aus?
- Welche Zellen lassen sich finden?
- Ist es zu einer nachweisbaren Eiseneinlagerung gekommen?
- Ist dieses Eisen endogenen oder exogenen Ursprungs?

Als Standard - Färbung wählen wir HÄMATOXYLIN-EOSIN.

Der Kunststoff braucht Hämatoxylin nach Gill:

Hämatoxylin nach Gill		Alkoholisches Eosin	
Hämatoxylin (C.I. 75290)	6 g	Eosin Y- (C.I. 45380)	0,5 g
Natriumjodat	0,6 g	Ethanol 96%	100 ml
Aluminiumsulfat	52,8 g	Eisessig	2 Tropfen
Aqua dest.	690 ml		
Ethylenglykol	250 ml		
Eisessig	60 ml		
Verfahren:		Ergebnis: (Färbung in HE nach Gill)	
Farbstofflösungen filtrieren		Zellkerne:	blau
Schnitte färben in Hämatoxylin nach Gill (15 min)		basophiles Cytoplasma:	blau
Bläuen in Leitungswasser (10 Minuten)		azidophiles Cytoplasma:	rosa
Spülen in aqua dest.		Muskelgewebe:	rosa
Schnitte gegenfärben mit Eosin (2-5 min)		Bindegewebe:	rosa
Entwässern über Ethanol 96% und 100%			
Klären mit Xylen und eindecken mit Eukitt			

Um die Frage nach der vermuteten Eisenanreicherung im Mononukleären Phagozyten System beantworten zu können (Frage 4), wählt man die BERLINERBLAU REAKTION NACH PERLS.



Die dazu nötige Lösungen werden wie folgt angesetzt:

Histologische Auswertung

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch nach verschiedenen Kriterien klassifiziert:

Die HE-Färbungen nach folgender **SCALA (Score)**:

Histologische Füllungs-Länge der Vena jug. ext.

- „a“ bei keiner Stenose
- „b“ wenn Länge des Thrombus in etwa dem Gefäßdurchmesser entspricht,
- „c“ wenn eine etwa 25% größere Länge als der Gefäßdurchmesser vorliegt,
- „d“ wenn eine etwa 50% größere Länge als der Gefäßdurchmesser vorliegt,
- „e“ steht wenn eine Gesamtfüllung der Vene besteht.

Histologischer Lumenverschlußgrad

- „f“ wenn ein offenes Gefäß vorliegt,
- „g“ steht für eine Stenosierung, die etwa 50% beträgt,
- „h“ wenn Stenosierung von ca. 75% vorliegt (aber noch offen),
- „i“ wenn ein Gesamtverschluß der Venen vorliegt.

Histologischer Kollateralisationsgrad

- „j“ wenn keine Kollateralen sichtbar sind,
- „k“ wenn lokale Kollateralen sichtbar sind,
- „l“ wenn regionale Kollateralen sichtbar sind.

Histologischer Rekanalisationsgrad

- „m“ wenn keine Zeichen für eine Rekanalisation sichtbar sind,
- „n“ wenn geringe Zeichen für eine Rekanalisation sichtbar sind,
- „o“ wenn deutliche Zeichen für eine Rekanalisation sichtbar sind,
- „p“ wenn starke Zeichen für eine Rekanalisation zu sehen sind.

Im Folgenden wird anhand von exemplarischen Befunden die histologische Klassifikation demonstriert:

Haemostase („1“)

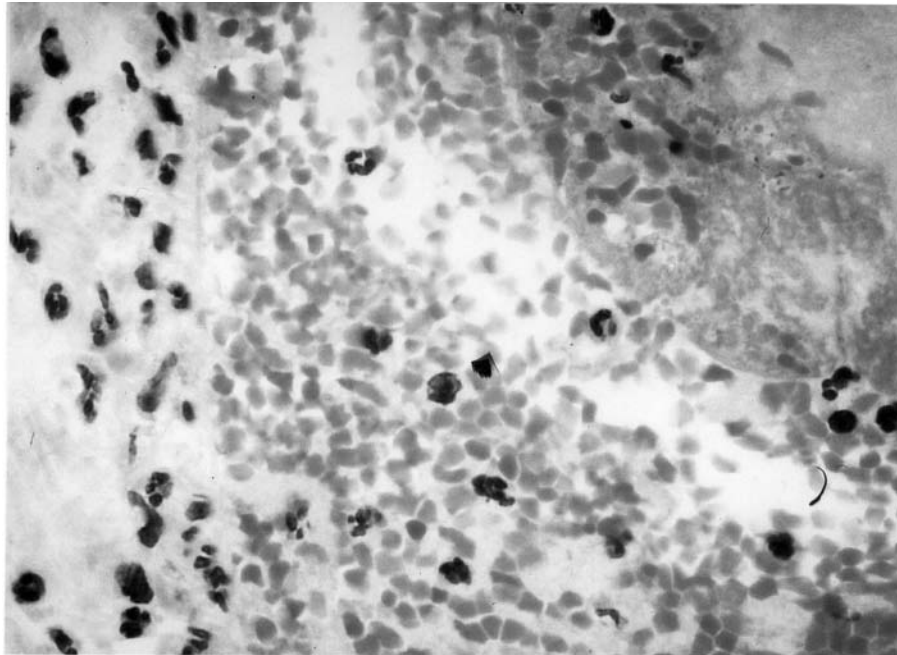


Abbildung 8: Thrombus, der vor einem Tag induziert wurde. Der Thrombus befindet sich im rechten oberen Bildabschnitt, die zellig infiltrierte Gefäßintima befindet sich auf der linken Seite und zwischen beiden erstreckt sich der haemostatische Bereich. (HE-Färbung). Die Erythrozyten sind deformiert (pflastersteinartig) und von Monozyten und neutrophilen Granulozyten begleitet.

Homogenisat („2“)

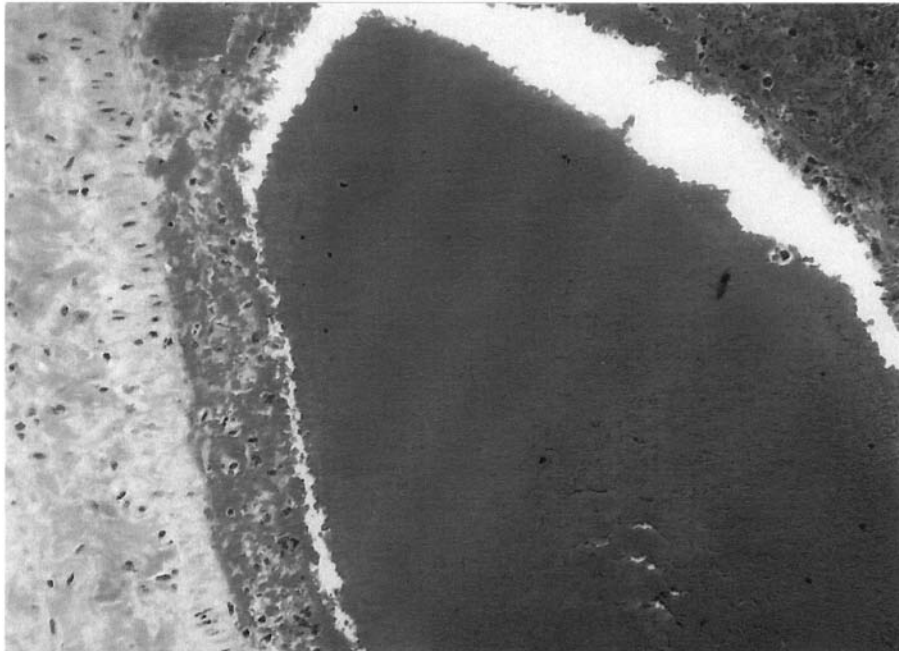


Abbildung 9: Thrombus, der vor fünf Tagen induziert wurde. Der Thrombus befindet sich zentral, die Gefäßintima umkränzt ihn nach links und rechts. Sie ist verbreitert und zellig infiltriert. Der Thrombus lässt kaum Zellgrenzen erkennen (HE-Färbung).

Organisat („3“)

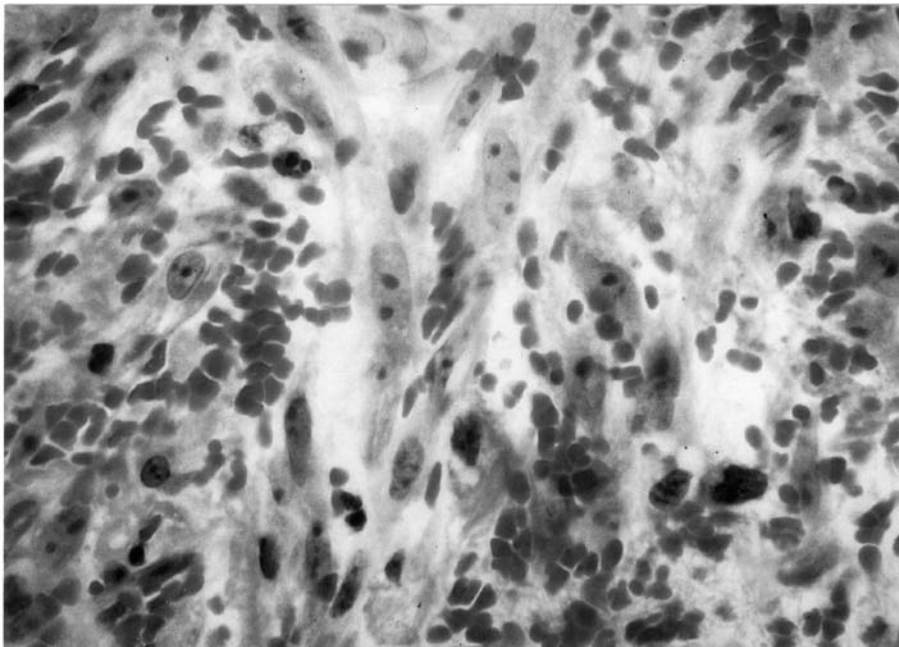


Abbildung 10: Thrombus, der vor elf Tagen induziert wurde. Neben veränderten Erythrozyten (polygonal) erkennt man auch Fibroblasten, Fibrozyten (langgezogene, mehrkernige Zellen), Monozyten (sphärische Zellen mit einem Kern) und kollagene Fasern (HE-Färbung).

3.2.2.3 *MR-angiographische Auswertung*

qualitativ:

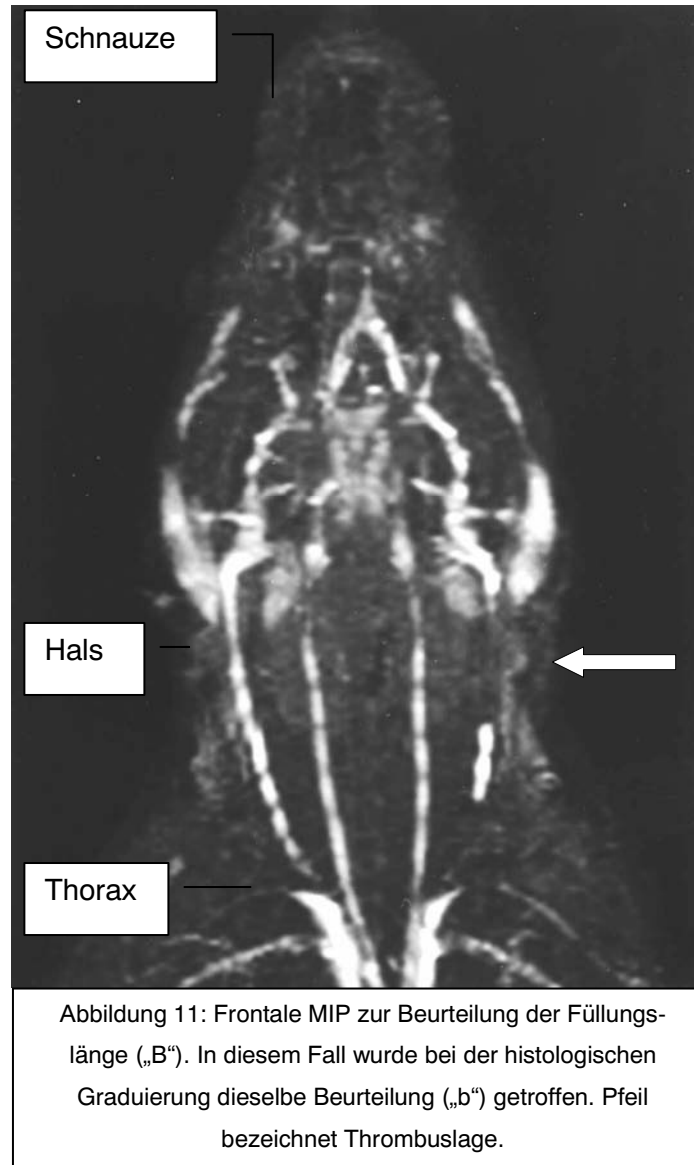
Anhand der 3D FISP wurden Maximum Intensity Projektionen erstellt (MIP). Hierbei werden die Pixel der Schichten einer Messung addiert, die über einem bestimmten Intensitätswert liegen. Dadurch erhält man ein Projektionsbild aus Einzelschichten, in dem die Gefäße in ihrem Gesamtverlauf dargestellt sind.

Mit Hilfe der MIP wurde das Ausmaß der Gefäßeinengung durch die Thromben festgelegt und mit den histologischen Befunden verglichen. Auch die Länge der Thromben, eventuelle Rekanalisation oder Kollateralenbildung wurden ermittelt und den histologischen Ergebnissen gegenüber gestellt. Die kernspintomographischen Bilder wurden in ihrer Bewertung analogen Kriterien wie die histologischen unterworfen.

Angiographische Füllungslänge der Vena jug.ext.

- 1) „A“ steht bei keiner Stenose,
- 2) „B“ steht für eine Thrombus-Länge, welche den Gefäßdurchmesser in etwa entspricht
- 3) „C“ steht für eine etwa 25% größere Thrombus-Länge als der Gefäßdurchmesser
- 4) „D“ steht für eine etwa 50% größere Thrombus-Länge als der Gefäßdurchmesser
- 5) „E“ bedeutet eine Gesamtfüllung des Gefäßes mit Thrombus

Die obige Abbildung 11 zeigt einen Ausschnitt aus der MI-Projektion mit der Thrombuslängeneinschätzung von „B“. Histologisch wurde bei diesem Tier 7 Tage nach Thrombusinduktion dieselbe Bewertung getroffen.



Angiographischer

Lumenverschlußgrad

- „F“ steht für ein offenes Gefäß
- „G“ steht für eine Stenosierung, die etwa 50% beträgt
- „H“ bedeutet eine Stenosierung von ca. 75% liegt vor
- „I“ zeigt einen Gesamtverschluß der Vene an

Die nebenstehende Abbildung (12) zeigt einen Ausschnitt aus der MI-Projektion mit der Einschätzung des Verschlußgrades von „H“.

Histologisch wurde bei diesem Tier 3 Tage nach Thrombusinduktion dieselbe Bewertung („h“) getroffen.



Abbildung 12: Frontale MIP zur Beurteilung des Verschlußgrades (hier „H“). In diesem Fall wurde bei der histologischen Graduierung dieselbe Beurteilung („h“) getroffen (Pfeile bezeichnen beurteilten Bereich).

Angiographischer Kollateralisationsgrad

- (1) „J“ steht für keine Kollateralen sind sichtbar
- (2) „K“ steht für lokale Kollateralen sind sichtbar
- (3) „L“ steht für regionale Kollateralen sind sichtbar

Die nebenstehende Abbildung (13) zeigt einen Ausschnitt aus der MIP-Projektion mit dem Beispiel „lokale Kollateralisation“ („K“).

Histologisch wurde bei diesem vor sieben Tagen operierten Tier dieselbe Bewertung („k“) getroffen. Aussagen über die Wandbeschaffenheit, die Morphe von Peripherie und Thrombuszentrum konnten im MR-Bild nicht getroffen werden.



Abbildung 13: MIP mit Beurteilung der Kollateralenausprägung: „K“. Bei dem untersuchten Tier wurde bei der histologischen Graduierung dieselbe Beurteilung („k“) getroffen. (Pfeile bezeichnen beurteilten Bereich)

Angiographischer Rekanalisationsgrad

- „M“ wenn keine Rekanalisationszeichen sichtbar sind,
- „N“ wenn geringe Rekanalisationszeichen sichtbar sind,
- „O“ wenn deutliche Rekanalisationszeichen sichtbar sind,
- „P“ wenn starke Rekanalisationszeichen zu sehen sind.

Zusätzlich wurde die Bildqualität der drei mit Kontrastmittel unterstützten Messungen (30', 60', 120') klassifiziert:

„0“ = ungenügende Bildgebung „1“ = ausreichende Bildgebung

„2“ = befriedigende Bildgebung „3“ = gute Bildgebung

quantitativ:

Signalintensitätsmessung

Anhand der frontalen MIP wurden die axialen Schichten ermittelt, in welchen der Thrombus sicher getroffen wurde.

In dieser Schicht wurden folgende Intensitätswerte gemessen:

⇒ Gesunde Vene

⇒ Thrombus

⇒ Hintergrund

⇒ Muskulatur

Mit Hilfe dieser Werte wurde für die verschiedenen Meßtechniken das Enhancement

berechnet: $\text{Enhancement} = (\text{Gef post} / \text{HG post}) : (\text{Gef prae} / \text{HG prae})$

Gef = offene kontralaterale Vene oder Thrombus

HG = Hintergrundrauschen

3.3 ERGEBNISSE

Die untersuchten Tiere tolerierten das chirurgisch-chemische Setzen des Thrombus sehr gut. Ihr Allgemeinbefinden wurde nicht beeinträchtigt. Die Hautwunde war bereits nach 3 Tagen gut verheilt.

3.3.1 Qualitative Auswertung der angiographischen Befunde

Die mr-tomographische Darstellung der Gefäße insbesondere der Venen gelingt ohne Kontrastmittel mit der 3-D-FISP Technik an der Ratte nicht. Mit Kontrastmittel kommen alle Gefäße (Venen und Arterien) signalreich zur Darstellung (Abb.11-13). Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung anhand des Scores (siehe Material und Methoden 3.2.2.3) ist in Tabelle 2 dargestellt. Es zeigt sich, daß das Kontrastmittel über den gesamten Untersuchungszeitraum in den Gefäßen zirkuliert und einen exzellenten Kontrast bietet. Es wurde bei keinem Tier ein Unterschied in der Gefäßdarstellung zwischen den Meßzeitpunkten 10, 30 und 90 Minuten nach Kontrastmittelinjektion beobachtet.

	Thrombuslänge					Lumen					Kollateralisation			Rekanalisation			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	
1d	0	3	1	2	1	0	0	1	6	7	0	0	7	0	0	0	
3d	0	1	5	1	0	0	0	2	5	6	0	1	7	0	0	0	
5d	0	0	6	1	0	0	1	1	5	6	1	0	0	7	0	0	
7d	0	0	4	0	3	0	1	2	4	4	3	0	0	4	2	1	
9d	0	0	2	0	5	2	0	2	3	4	2	1	0	2	5	0	
11d	0	1	1	2	3	1	0	2	4	0	6	1	0	1	4	2	

Tab. 3 : Gesamtübersicht der qualitativen Auswertung der MR-Untersuchung. Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten von bestimmten Merkmalen (A-P) in Relation zum Thrombenalter. Der zugrunde liegende Score ist in 3.2.2.3 erläutert.

Thrombuslänge (MR-angiographisch)

Anhand der qualitativen MRT-Auswertung sieht man, daß der Thrombus im Zeitverlauf an Länge bis zum neunten Tag zunimmt (mit einem Maximum 9 Tage nach Induktion) und danach leicht abnimmt. Signifikant sind die Unterschiede zwischen den 9 Tage alten Thromben und den 1, 3 und 5 Tage alten Thromben.

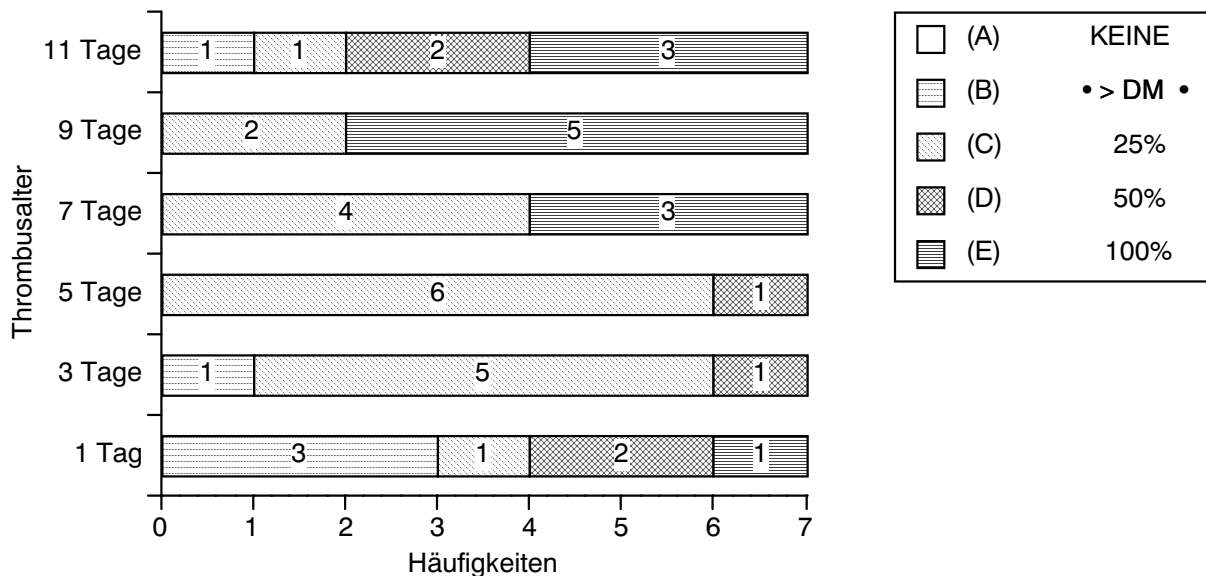


Diagramm 1: Vergleich der Thrombuslänge im MR-Bild von Ratten, die zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten (Ordinate) vor der Messung einen Thrombus in der linken Vena jugularis induziert bekommen hatten. Dargestellt sind absolute Häufigkeiten (Abszisse) der je 7 Tiere umfassenden Gruppen.

In der Abbildung 11 (S.37) sieht man eine Ratte, der vor 7 Tagen ein Thrombus induziert wurde.

Die Länge desselben wurde mit „C“ MR-angiographisch beurteilt. In dieser Maximum – Intensitäts - Projektion (MIP) von Bildern aus einer T1-gewichteten Fisp 3d-Sequenz ist 10 Minuten nach KM-Gabe in koronarer Schnitfführung eine nur partiell mit SPIO gefüllte Vena jugularis zu erkennen (Pfeil).

Lumeneinengung (MR-angiographisch)

In der qualitativen MRT-Auswertung sieht man, daß das freie Gefäßlumen im Zeitverlauf an Weite bis zum 9 Tage nach Induktion zunimmt und danach leicht abnimmt. Signifikante Abhängigkeiten treten nicht auf. Der initial kleiner werdende Thrombus nimmt final an Größe wieder zu.

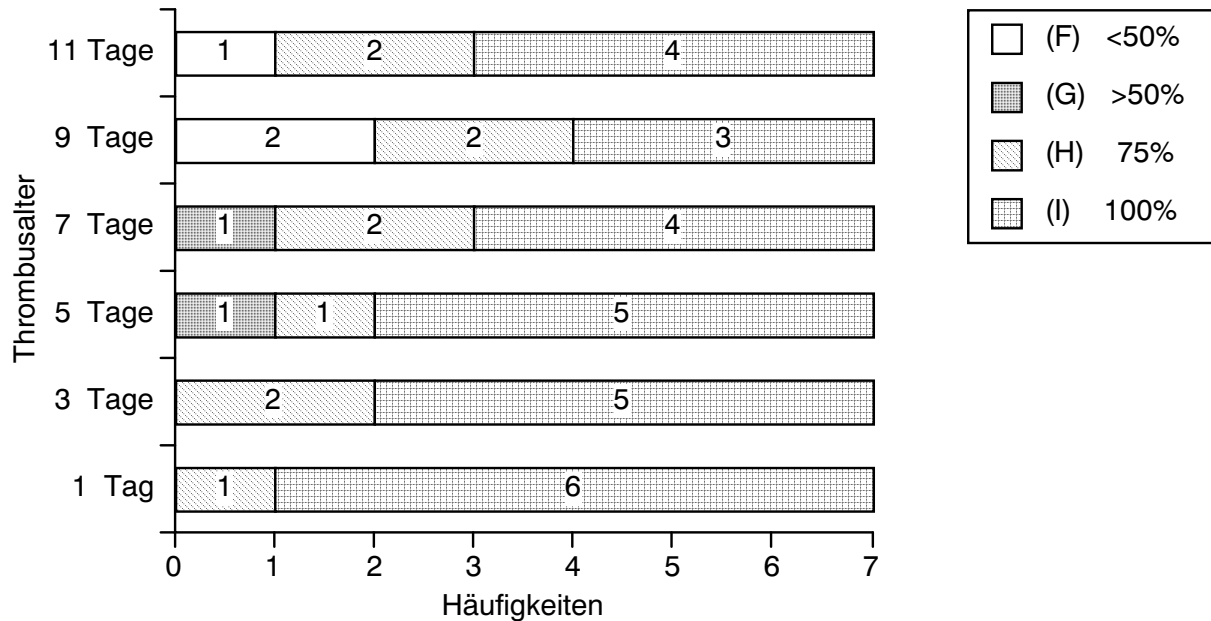


Diagramm 2: Vergleich der Lumeneinengung im MR-Bild von Ratten, die zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten (Ordinate) vor der Messung einen Thrombus in der linken Vena jugularis induziert bekommen hatten. Dargestellt sind absolute Häufigkeiten (Abszisse) der je 7 Tiere umfassenden Gruppen (Ordinate).

In der Abbildung 12 (S.38) sieht man eine Ratte, der vor 3 Tagen ein Thrombus induziert wurde.

Die Lumeneinengung wurde mr-angiographisch mit "H" beurteilt. In dieser Maximum-Intensitäts-Projektion (MIP) von Bildern aus einer T1-gewichteten Fisp 3d-Sequenz ist 10 Minuten nach KM-Applikation in koronarer Schnitfführung in der MR-Angiographie somit die selbe Beurteilung wie in der histologischen Untersuchung getroffen worden.

Kollateralisation (MR-angiographisch)

Mittels der qualitativen MRT-Auswertung sieht man, daß die Kollateralen im Zeitverlauf mengenmäßig zunehmen. Signifikant sind die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen: 1 Tag zu 11 Tagen, 3 Tage zu 11 Tagen, 5 Tage zu 11 Tagen und 7 Tage zu 11 Tagen. 11 Tage nach Induktion wurden bei jedem Tier Kollateralen gefunden.

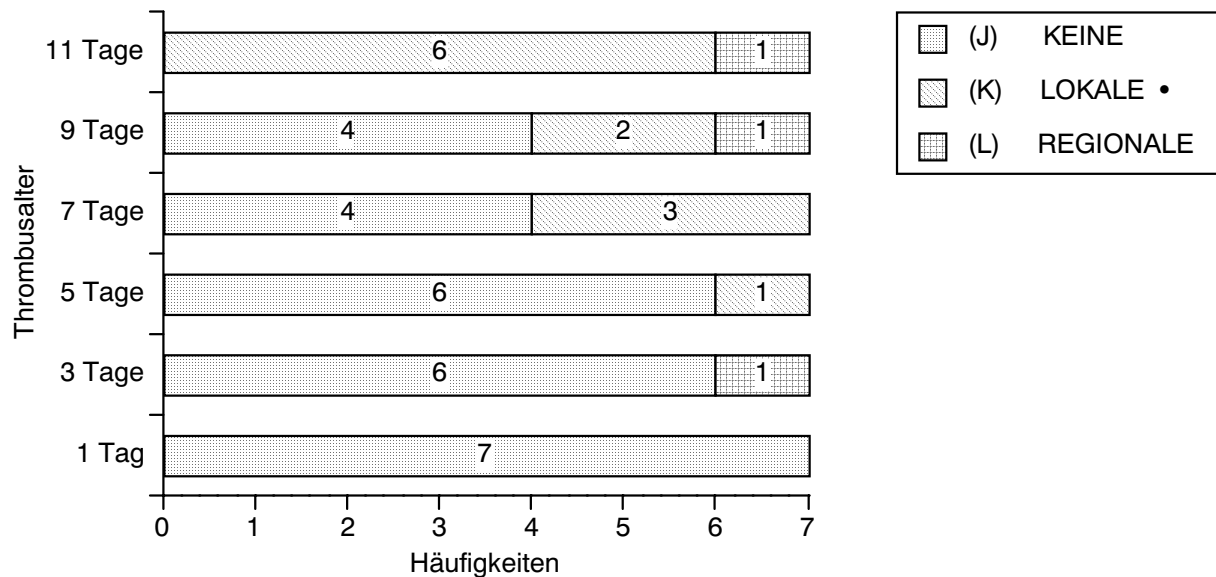


Diagramm 3: Vergleich der fortschreitenden Kollateralenbildung im MR-Bild von Ratten, die zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten (Ordinate) vor der Messung einen Thrombus in der linken Vena jugularis induziert bekommen hatten. Dargestellt sind absolute Häufigkeiten (Abszisse) der je 7 Tiere umfassenden Untersuchungsgruppen.

In der Abbildung 13 (S.39) sieht man eine Ratte, der vor 3 Tagen ein Thrombus induziert wurde.

Bei diesem sieht man eine lokale Kollateralenbildung ("K"). In dieser Maximum -Intensitäts-Projektion (MIP) von Bildern aus einer T1-gewichteten Fisp 3d-Sequenz ist 10 Minuten nach KM-Applikation in koronarer Schnitfführung in der MR-Angiographie somit dieselbe Einschätzung wie in der histologischen Untersuchung getroffen worden.

Rekanalisation (MR-angiographisch)

Als Ergebnis der qualitative MRT-Auswertung hat sich gezeigt, daß die Rekanalisation im Zeitverlauf fortschreitet. Signifikant ist der Unterschied von Thromben 1 Tag nach Thrombusinduktion zu 5,7,9 und 11 Tage alten, 3 Tage alte zu 5,7,9 und 11 Tage alten und 5 Tage alte zu 9 und 11 Tage alten Thromben.

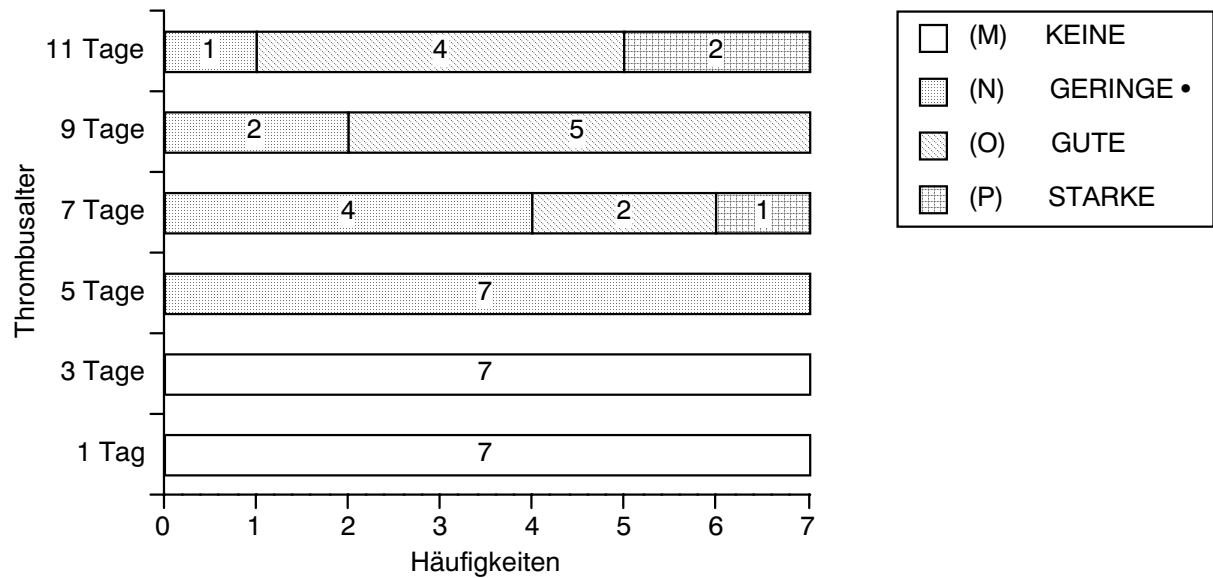


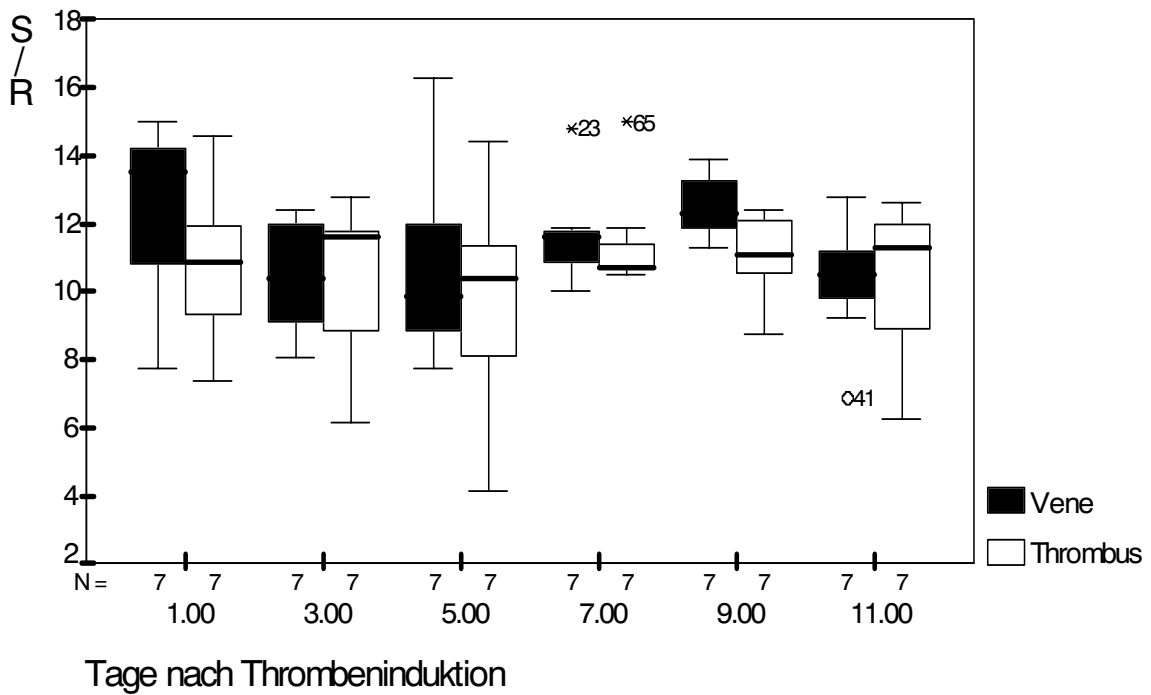
Diagramm4: Vergleich der Rekanalisation im MR-Bild von Ratten, die zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten (Abszisse) vor der Messung einen Thrombus in der linken Vena jugularis induziert bekommen hatten. Dargestellt sind absolute Häufigkeiten (Abszisse) der je 7 Tiere umfassenden Versuchsgruppen (Ordinate).

3.3.2 Quantitative Auswertung der angiographischen Befunde

Signalintensitäten vor der SPIO-Gabe

(Ausgangswerte)

Bei den sechs Gruppen mit verschieden alten venösen Thromben zeigen sich nur bei den vor einem Tag thrombosierten Gefäßen signifikante Unterschiede in der Signalintensität zu der gesunden gegenüberliegenden Vene, welche eine höhere Signalintensität aufweist.



Graphik 1: Signalintensitäten (SI / Rauschen) von unterschiedlich alten Thromben und kontralateralen durchgängigen Venen vor SPIO-Gabe

Signalintensitäten 10 Minuten nach SPIO-Gabe

(1. Untersuchung nach Kontrastmittelinjektion)

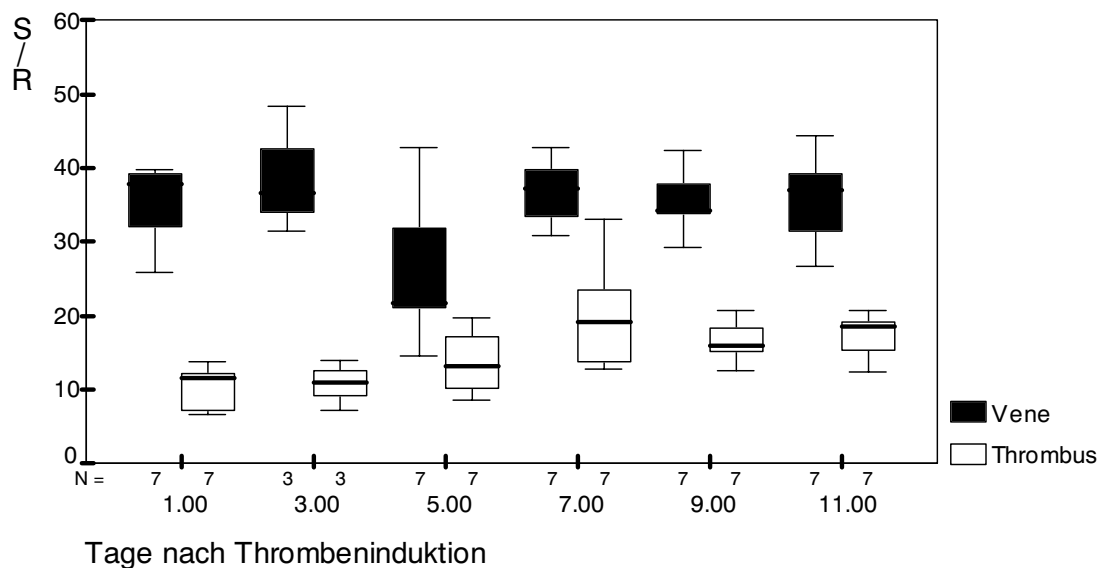
Der Wilcoxon matched pairs Test (WmpT) belegt, daß die Signalintensitäten in den kontralateralen unbeeinträchtigten Venen zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Induktion der Thromben signifikant während der ersten 10 Minuten in der Signalintensität ansteigen, wenn man sie in Relation zu den Ausgangswerten setzt.

Ebenso dokumentiert der WmpT, daß bei Tieren mit einem vor **5 Tagen** induziertem Thrombus, dieser signifikant in den ersten 10 Minuten an Signalintensität zugewinnt, wenn man ihn mit dem Ausgangswert vergleicht.

Deutlicher ist dieser Signalintensitätszugewinn bei vor **7, 9 und 11 Tagen** entstandenen Thromben.

Beim Vergleich zur kontralateralen Vene sind **5 und 7 Tage** alte Thromben signifikant dunkler, der Unterschied bei **1, 9 und 11 Tage** alten Thromben zum gesunden Gefäß auch signifikant unterschiedlich.

Auch ist nach drei Tagen dieser Unterschied signifikant.



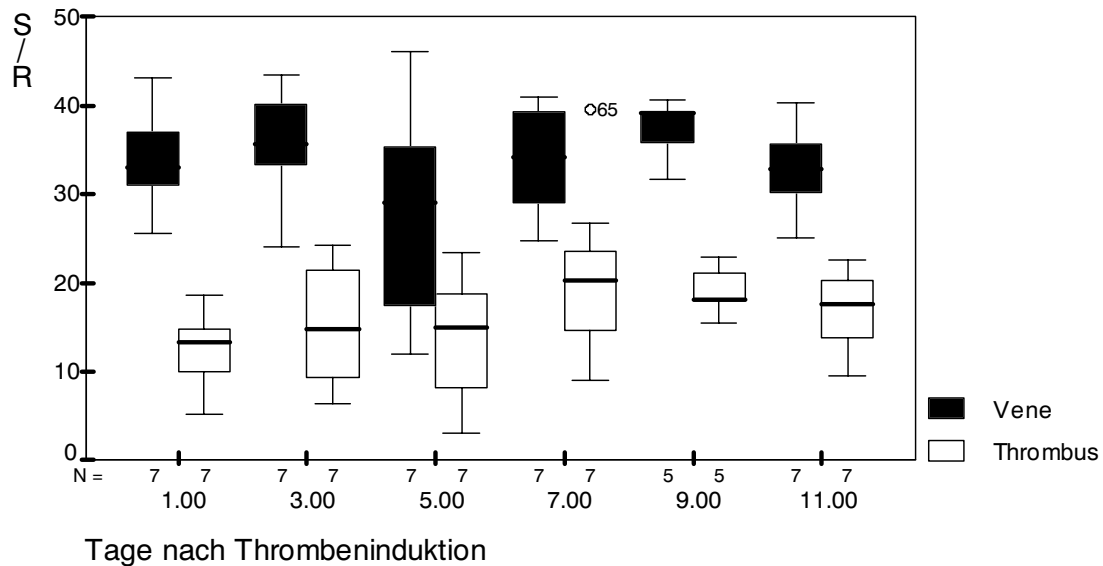
Graphik 2: Signalintensitäten (Signal/Rauschen) von unterschiedlich alten Thromben und kontralateralen durchgängigen Venen 10 min nach SPIO-Gabe

Signalintensitäten 30 Minuten nach SPIO-Gabe

(2. Messung nach Kontrastmittelinjektion)

Der Wilcoxon matched pairs Test (WmpT) belegt, daß die Signalintensitäten in den kontralateralen unbeeinträchtigten Venen zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Induktion der Thromben signifikant während der ersten halben Stunde in der Signalintensität ansteigen, wenn man sie mit dem Signal vor der SPIO-Gabe vergleicht.

Der WmpT beweist zusätzlich, daß es zu einem signifikanten Signalintensitätszuwachs in den 7, 9 und 11 Tage alten Thromben kommt, immer im Vergleich zum Ausgangswert. Einen intra-individuellen signifikanten Unterschied zwischen offenem und thrombosiertem Gefäß konnte man bei 1, 3, 5 und 11 und 7 und 9 Tage alten Thromben feststellen



Graphik 3: Signalintensitäten (Signal / Rauschen) von unterschiedlich alten Thromben und kontralateralen durchgängigen Venen 30 min nach SPIO-Gabe

Signalintensitäten nach 90 Minuten

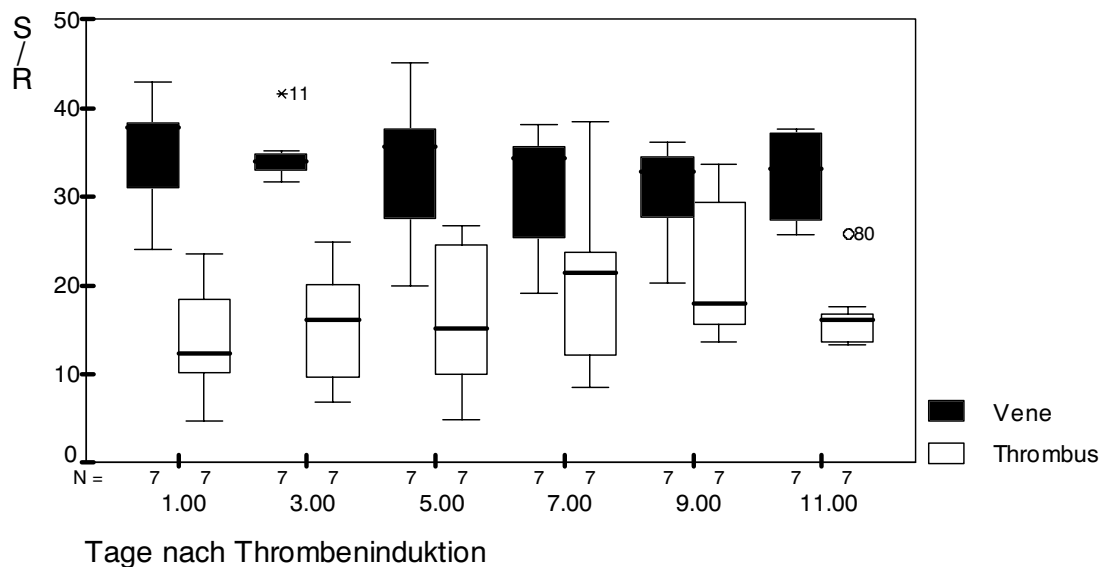
(3. Messung nach Kontrastmittelinjektion)

Der Wilcoxon matched pairs Test (WmpT) belegt, daß die Signalintensitäten in den kontralateralen unbeeinträchtigten Venen zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Induktion der Thromben signifikant während der ersten anderthalb Stunden in der Signalintensität ansteigen, wenn man sie mit den Ausgangswerten vergleicht.

Im WmpT sind **9 und 11** Tage alte Thromben signifikant signalreicher als vor der SPIO-Gabe.

Zwischen thrombosiertem und nicht-thrombosiertem Gefäß sind **1,5 und 7 Tage** alte

Thromben nach 90 Minuten signifikant weniger signalreich. **3 und 11 Tage** alte Thromben / Venen ist das Signifikanzniveau von $p=0,018$ noch deutlicher.

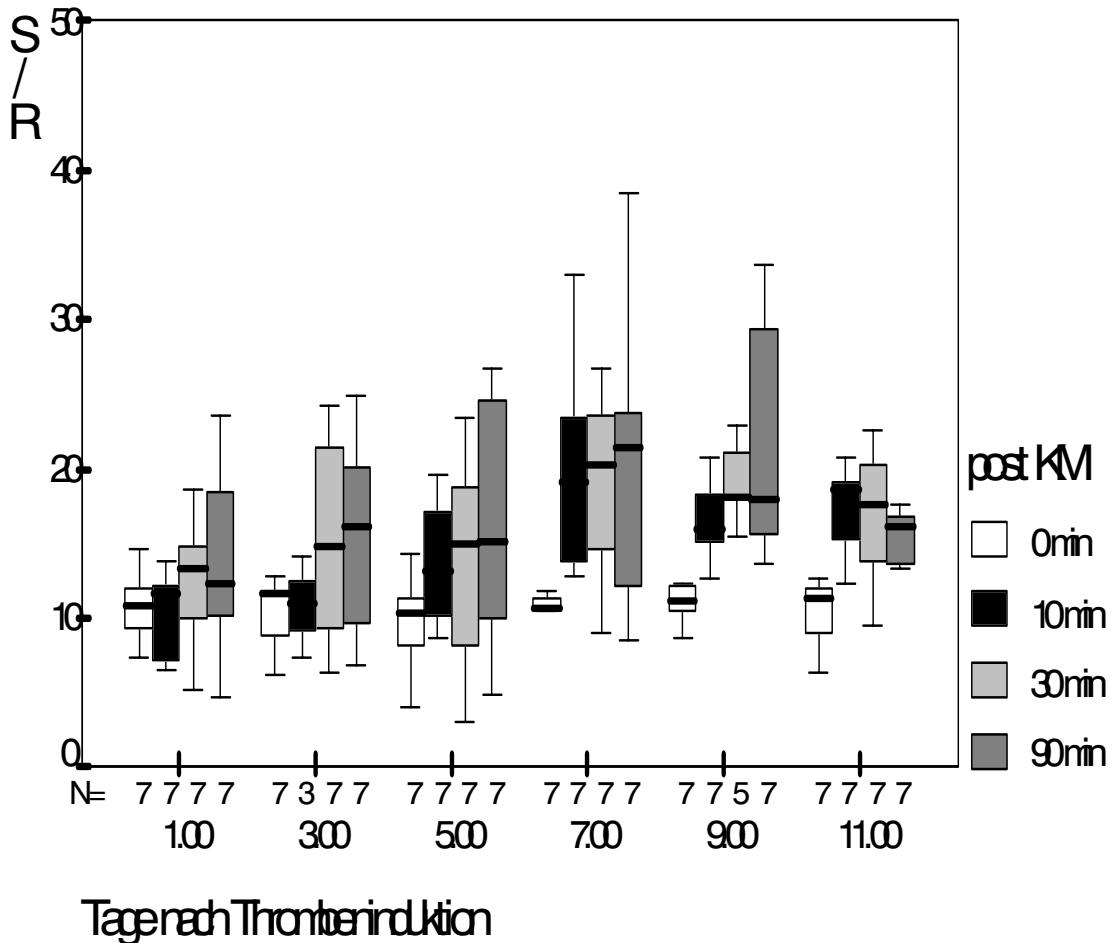


Graphik 4: Signalintensitäten (Signal / Rauschen) von unterschiedlich alten Thromben und kontralateralen durchgängigen Venen 90 min nach SPIO-Gabe

Synopse aller Signalintensitätsveränderungen

Auf der Ordinate ist in arbiträren Einheiten das Signal zu Rausch-Verhältnis (S/R) quantitativ skaliert. Auf der Abszisse ist der Zeitverlauf in Minuten nach der ersten ohne SPIO-Gabe erfolgten (Leer-) Messung aufgetragen.

Die älteren Gruppen (7, 9 und 11 Tage) haben eine signifikant höheres Signal/Rausch-Verhältnis als die jüngeren Thrombengruppen (1,3 und 5 Tage)



Graphik 5: Veränderungen der durchschnittlichen Signalintensitäten (Ordinate) nach unterschiedlich lange zurückliegender SPIO-Gabe (0-90 Minuten) für alle untersuchten Thromben verschiedenen Alters (Abszisse)

3.3.3 Qualitative Auswertung der histologischen Resultate

Die Darstellung der Gefäße insbesondere der Venen gelingt in der feingeweblichen Untersuchung mit Hilfe der Histoacryl-Technik. So kann man trotz Feinheit der Präparate (Durchmesser bis zu 2 mm) eine hinreichende Anzahl Schnitte erhalten. Problematisch ist die häufig inkomplette Darstellung des Thrombus, da 2 Mikrometer hohe Schnitte, immer wenn der Thrombus nicht exakt waagrecht eingebettet werden konnte, bei der ausschließlich horizontalen Schnittführung, im Schnitt Aussparungen zeigen. Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung anhand des Scores (s. Material und Methoden 3.2.2.2) ist in Tabelle 4 dargestellt. Es zeigen sich nur leicht differente Unterschiede zu den Ergebnissen der MR_angiographischen Untersuchung (siehe Tab. 2, S.41).

	Thrombuslänge					Lumen				Kollateralisation			Rekanalisation			
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
1d	0	1	5	1	0	0	1	1	5	7	0	0	7	0	0	0
3d	0	1	5	1	0	0	2	2	3	6	1	0	7	0	0	0
5d	0	3	3	1	0	1	2	2	2	6	1	0	0	5	2	0
7d	0	3	4	0	0	5	1	1	0	3	3	1	1	3	2	1
9d	0	0	4	3	0	2	2	1	2	4	2	1	0	2	5	0
11d	0	3	4	0	0	2	1	1	3	0	6	1	0	1	4	2

Tab. 4 : Gesamtübersicht der qualitativen Auswertung der feingeweblichen Untersuchung. Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten von bestimmten Merkmalen (A-P) in der jeweiligen Thrombusalters-Gruppe. Der zugrundeliegende Score ist in 3.2.10 erläutert.

Thrombuslänge (histologischer Befund)

Es findet sich histologisch ein Verhalten, welches der qualitativen MR - tomographischen Auswertung entspricht. Anhand der qualitativen Auswertung sieht man, daß der Thrombus im Zeitverlauf an Länge abnimmt, allerdings enthielten die nach 9 Tagen untersuchten Tiere relativ große Thromben.

Signifikant unterschiedlich ist dieses Verhalten zwischen 9 und 11 Tage alten und zwischen 7 und 9 Tage alten Thromben.

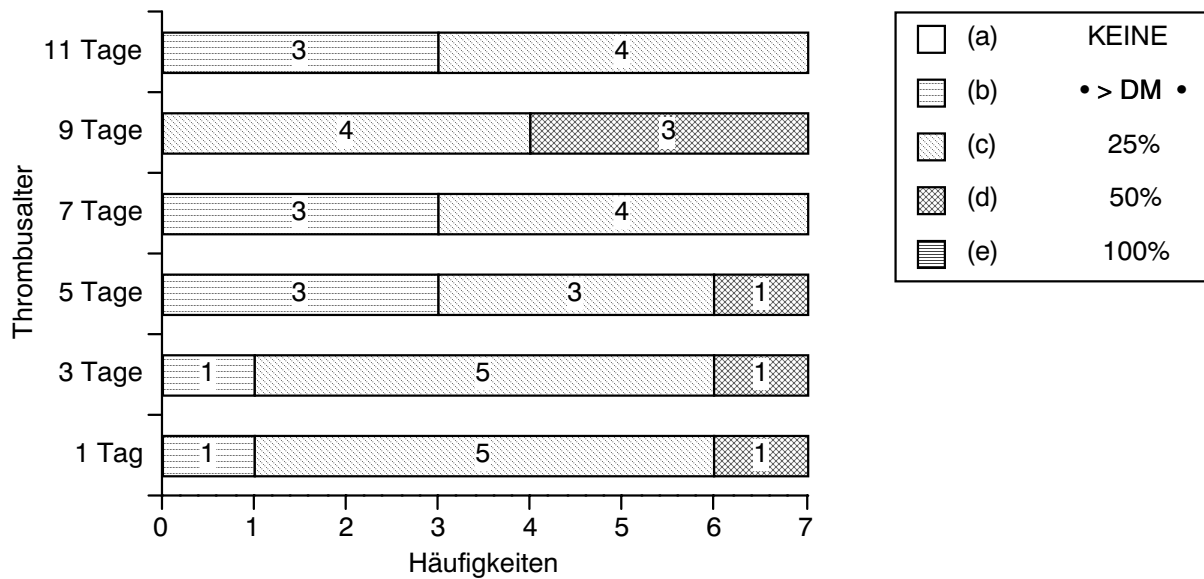


Diagramm 5: Vergleich der histologisch ermittelten Thrombuslänge von Ratten, die zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten (Ordinate) vor der Messung einen Thrombus in der linken Vena jugularis induziert bekommen hatten. Dargestellt sind absolute Häufigkeiten (Abszisse) der je 7 Tiere umfassenden Versuchsgruppen.

Lumeneinengung (histologischer Befund)

In der qualitativen histologischen Auswertung sieht man, daß das Gefäßlumen bei der Tiergruppe 7 Tage nach Thrombeninduktion besonders wenig eingengt ist.

Thromben weisen nach einem Tag ein signifikant stärker eingeschränktes Gefäßlumen auf als solche nach 7 Tagen. Auch 3 und 5 Tage unterscheiden sich signifikant von 7 Tage alte Thromben in ihrer eingeschränkten Lumenweite.

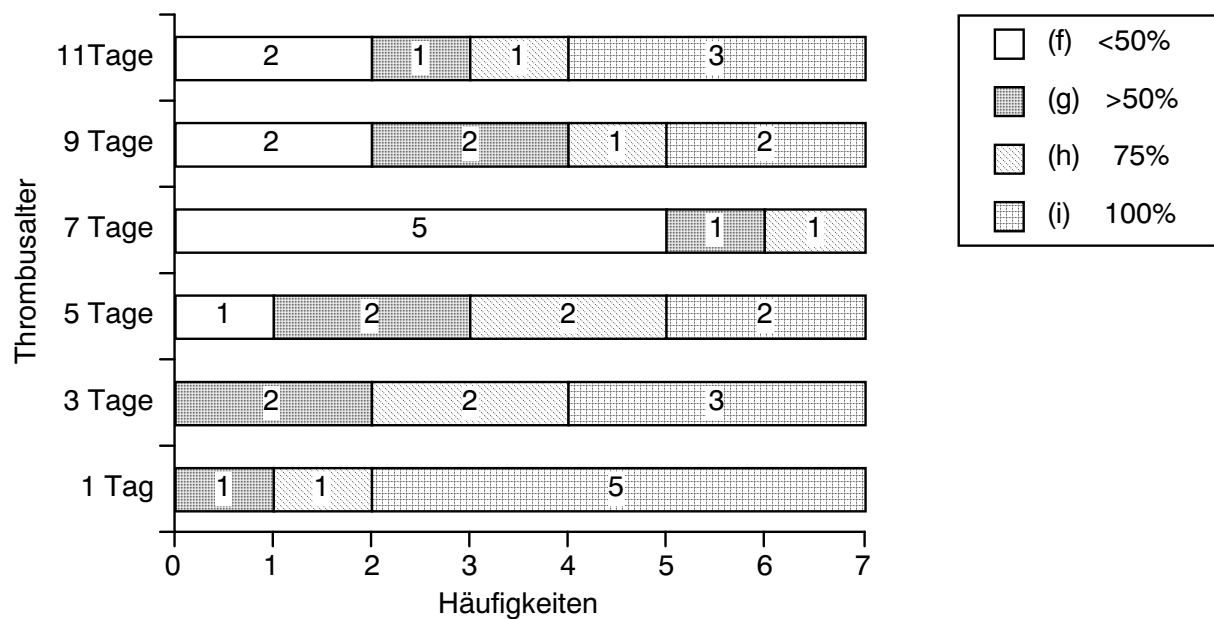


Diagramm 6: Vergleich der histologisch nachweisbaren Lumeneinengung der linken Vena jugularis von Ratten, die zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten (Ordinate) vor der Untersuchung einen Thrombus induziert bekommen hatten. Dargestellt sind absolute Häufigkeiten (Abszisse) der je 7 Tiere umfassenden Veruchsgruppen.

Kollateralisation (histologischer Befund)

Anhand der semiquantitativen histologischen Auswertung erkennt man, daß die Kollateralen im Zeitverlauf bis zum 7.Tag zahlreicher werden. Am 9. Tag ist ein leichter Rückgang zu verzeichnen und nach elf Tagen kein Thrombus mehr ohne Kollateralen.

Signifikant unterschiedlich ist das Ergebnis des Vergleichs zwischen Kollateralenzahl nach einem Tag und den am 7., 9. und 11. Tag untersuchten Tieren. Auch haben die 11 Tage alten Thromben signifikant mehr Kollateralen gebildet, als die 1, 3 und 5 Tage alten Thromben. Ebenso weisen 7 und 9 Tage alte Thromben mehr Kollateralen auf, als 3 und 5 Tage alte, welche bezüglich der Kollateralisation nicht differieren.

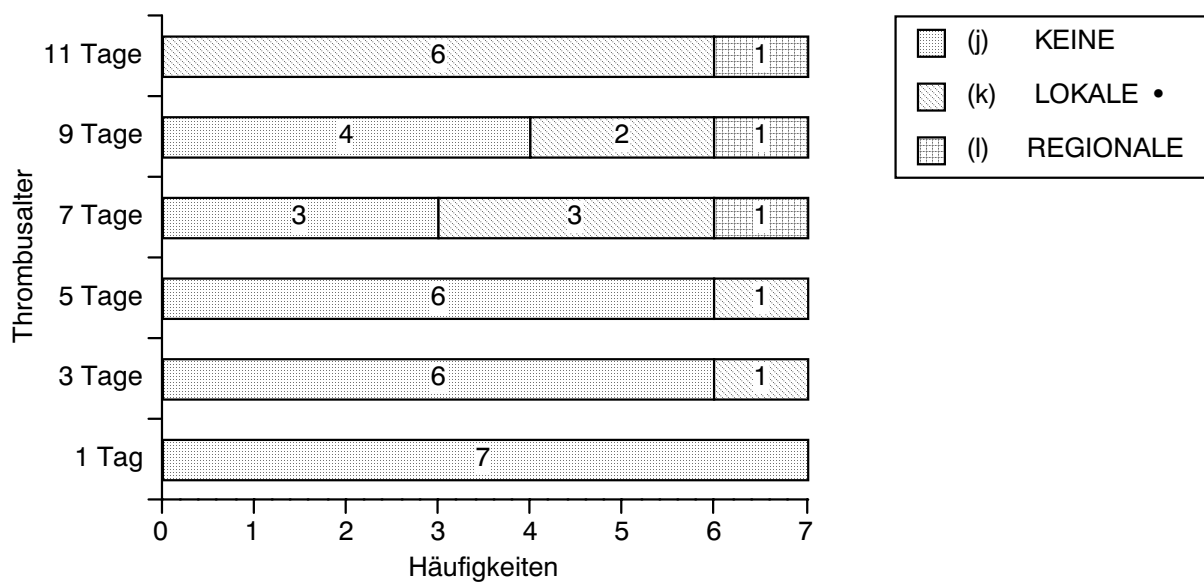


Diagramm 7: Vergleich der histologisch nachweisbaren Thrombuslänge von Ratten, die zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten (Ordinate) vor der Untersuchung einen Thrombus in der linken Vena jugularis induziert bekommen hatten. Dargestellt sind absolute Häufigkeiten (Abszisse) der je 7 Tiere umfassenden Gruppen.

Rekanalisation (histologischer Befund)

Durch die qualitative histologischen Auswertung sieht man, wie die Rekanalisation im Zeitverlauf fortschreitet.

Signifikant ist der Unterschied zwischen einen Tag alten Thromben und den drei ältesten Thromben (1 Tag zu 7 Tage alten Thromben, 1 Tag zu 9 Tagen und 1 Tag zu 11 Tagen). Signifikant ist ebenso der Unterschied zwischen 3 Tage alten Veränderungen und den drei vorgenannten ältesten Thromben (3 Tage zu 7 Tagen, 3 Tage zu 9 Tagen und 3 Tage zu 11 Tage alten Thromben). Auch die 5 Tage alten Thromben sind signifikant von den besagten drei Untersuchungsgruppen zu unterscheiden (5 Tage zu 7 Tagen, 5 Tage zu 9 Tagen und 5 Tage zu 11 Tage alten Thromben).

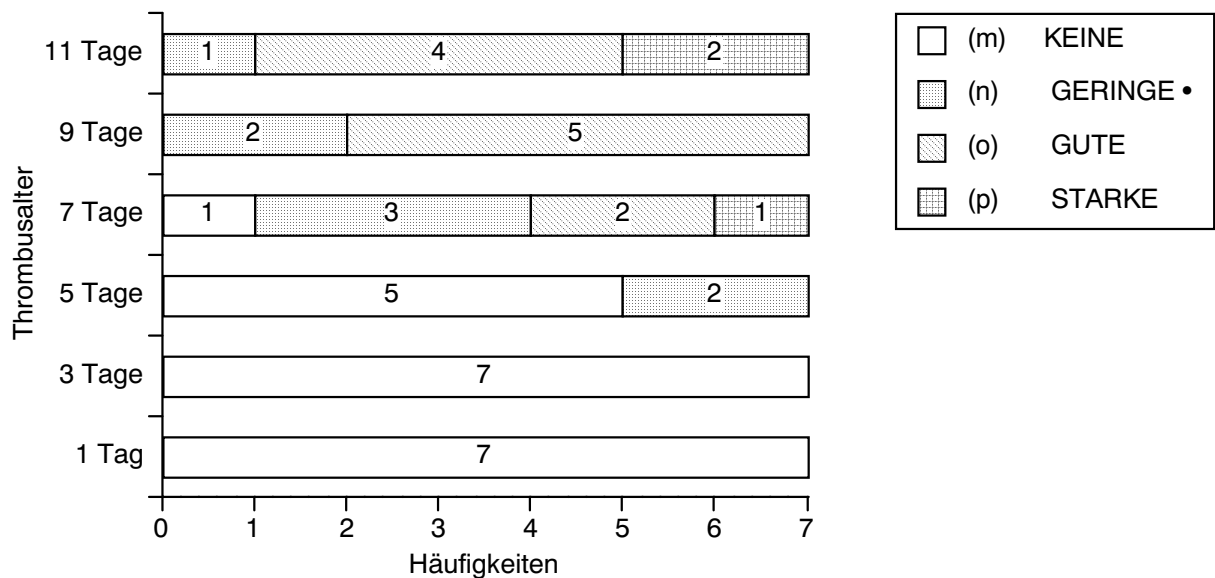


Diagramm 8: Vergleich der histologisch nachweisbaren Rekanalisation von Thromben, die bei Ratten zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten (Ordinate) vor der Untersuchung in der linken Vena jugularis induziert worden waren. Dargestellt sind absolute Häufigkeiten (Abszisse) der je 7 Tiere umfassenden Gruppen.

3.3.4 Semiquantitative histologische Auswertung

Thrombenbeurteilung von Hämostase bis Lyse

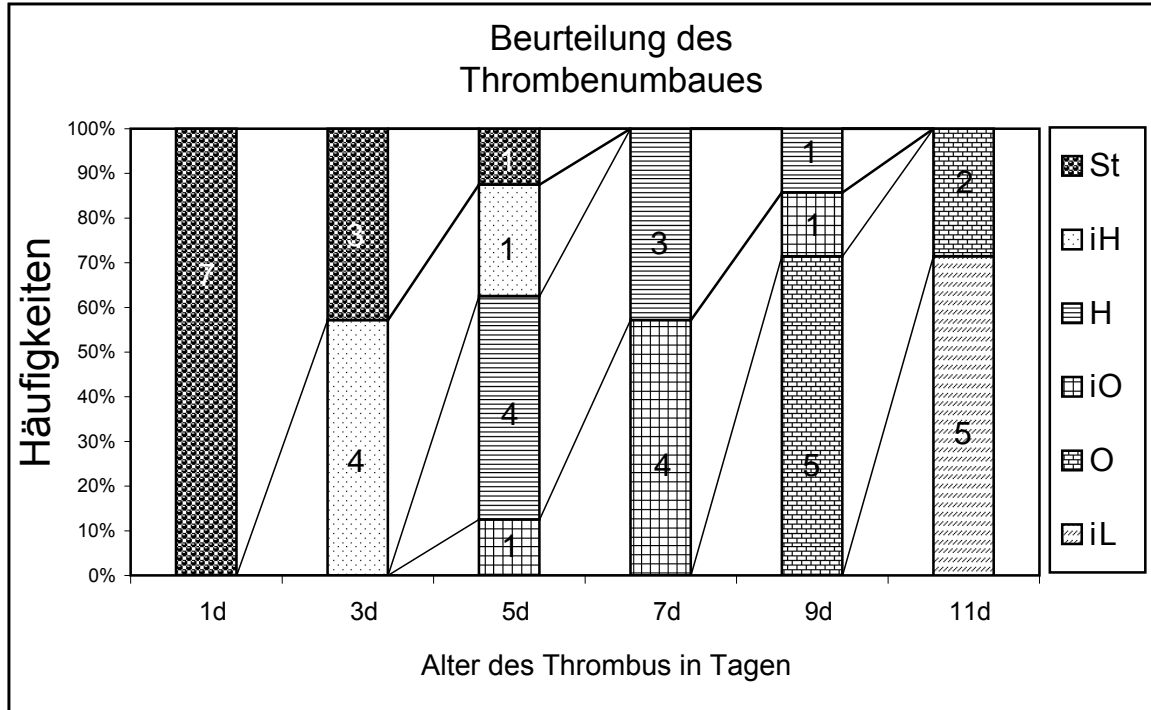


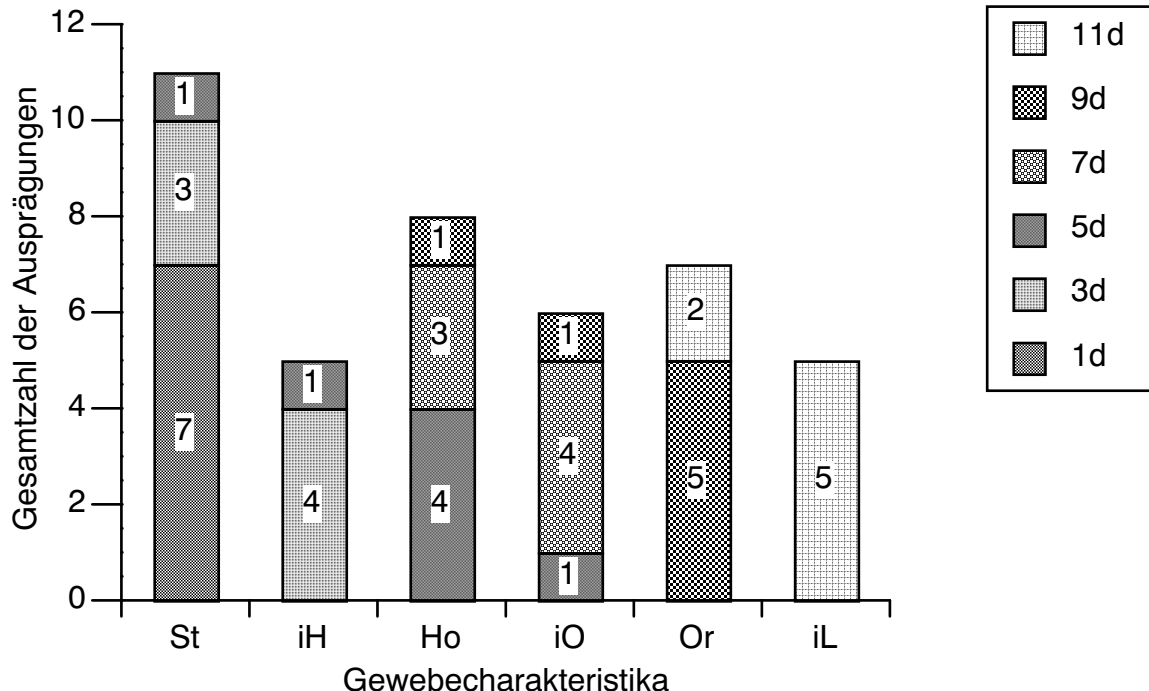
Diagramm 9:
Vergleich der im Zeitverlauf (Abszisse) auftretenden Schwankungen im Thrombenumbau (Ordinate, mit quantitativer Gewebekarakterisierung: **S**= Hämostase, **i.H**= in Homogenisierung begriffen, **Ho**= homogenisierter Thrombus, **i.O**= in Organisation begriffen, **O**= organisiert, **i.L**= in Lyse begriffen) für die in der histologischen Auswertung ermittelten Werte.

	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d
1 d		T	S	S	T	
3 d	T		T	S	S	S
5 d	S	T			S	S
7 d	S	S			T	S
9 d	T	S	S	T		S
11 d		S	S	S	S	

MATRIX 1:
Übergang von einer Gewebekarakteristik zu anderen im Zeitverlauf
"T" steht für einen tendenziellen Unterschied (p ist größer 0,01)
"S" steht für einen signifikanten Unterschied (p ist kleiner/gleich 0,01)

Das pathohistologische Fortschreiten der einheitlich "haemostatischen" **1 Tag** alten Thromben zu den "in Homogenisierung begriffenen" **3 Tage** alten Thromben hat eine Tendenz.

Das Erreichen des Homogenisat-Stadiums nach **5 Tagen** signifikant ausgeprägt. Gleichfalls signifikant ist nach **7 Tagen** die Stufe des sich " in Organisation befinden" erreicht. Nach neun Tagen hingegen gibt es nur eine Tendenz zum Vorliegen des fertig organisierten Zustandes. Das letzte Gewebebild, die Lyse, ist überhaupt nicht signifikant mit dem ersten Bild, der Haemostase, korreliert. Die übliche Entwicklungsstufe für **3 Tage** alte Rattenthromben " in Homogenisierung" ist mit der gewöhnlich mit **5 Tagen** erreichten "Homogenisat"-Stufe nur in tendenzieller Beziehung. Zur "werdenden Organisation" (**7.Tag**), "Organisat" (**9.Tag**) und "in Lyse" (**11.Tag**) steht der **3 Tage** alte Thrombus in signifikant unterschiedlicher Beziehung. **Fünf Tage** alte Thromben (Homogenisat) sind mit der nächsten Entwicklungsstufe (in Organisation) am **7. Tag** nicht statistisch verbunden. Der Vergleich von **5 Tage** alten Thrombusgeweben mit **9 Tage** alten (Organisat) ist aber signifikant different. **Sieben Tage** alte Thromben (in Organisation) haben nur eine Tendenz zum Übergang in die nächsten Stufe, nämlich der Organisation. Zum spätesten histologischen Gewebebild, der Lyse, ab dem **11.Tag** besteht eine signifikante Differenz. **Neun Tage** alte Thromben (Organisat) sind signifikant in ihrem Unterschied zu **11 Tage** alten , die sich in Lyse befinden.**Elf Tage** alte Thromben (in Lyse) besitzen einen signifikanten Unterschied zu den **5 Tage** alten Thromben.



Zusammenfassend kann man feststellen, daß der direkte Übertritt von einer Entwicklungsstufe zur nächsten immer nur tendenzielle Unterschiede im histologischen Vergleich hervorruft. Mit zunehmender Zeitdifferenz treten zwischen den Stadien Signifikanzen auf.