

Aus dem Charité Centrum 6 für diagnostische
und interventionelle Radiologie und Nuklearmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung von neu entwickelten, in vivo darstellbaren temporären Mikrosphären zur
transarteriellen renalen Embolisation beim Kaninchen

Evaluation of newly developed, in vivo visualizable temporary microspheres
for transarterial renal embolisation in rabbits

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Matthias Max Rudolf Stechele

aus Augsburg

Datum der Promotion: 18. Dezember 2020

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden unter dem Titel „Novel MR-visible, biodegradable microspheres for transcatheter arterial embolisation: Experimental study in a rabbit renal model“ am 8. Juni 2020 veröffentlicht in „Cardiovasc Intervent Radiol“. 2020. Online ahead of print. DOI: 10.1007/s00270-020-02534-1.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien und Methoden wie z.B. semiquantitative Scorings wurden in Teilen in einer weiteren Publikation unter dem Titel „Biodegradable polydioxanone microspheres for transcatheter arterial embolization: Proof of principle“ in „J Vasc Interv Radiol“ durch die Arbeitsgruppe am 7. Juni 2020 zur Revision eingereicht.

Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
TABELLENVERZEICHNIS	8
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	9
1. ABSTRAKT	13
1.1 Deutsch	13
1.2 Englisch	15
2. EINLEITUNG	17
2.1 Allgemeines zur Transarteriellen Embolisation	17
2.2 Indikationen für die Transarterielle Embolisation	18
2.3 Embolisatmaterialien: Einteilung und Übersicht	22
2.4 Das ideale Embolisatmaterial	24
2.5 Temporäre Materialien: Vorteile und Stand der Forschung	27
2.6 Nachteile aktuell verfügbarer temporärer Embolisatmaterialien	33
2.7 Arbeitshypothese und Ziel der Studie	36
3. MATERIAL UND METHODIK	37
3.1 Studiendesign	37
3.2 Material	38
3.2.1 Embolisatmaterial.....	38
3.2.2 Versuchstiere & Haltung.....	40
3.3 Methoden: Eingriffe und Prozeduren	41
3.3.1 Anästhesie & Interventionsvorbereitung.....	41
3.3.2 Embolisation.....	44
3.3.3 Postinterventionelle Bildgebung	47
3.3.4 Nachsorge.....	47
3.3.5 Kontrollbildgebung & Euthanasie.....	48
3.3.6 Makroskopische Aufarbeitungen	48

3.3.7	Mikroskopische und histopathologische Aufarbeitungen	49
3.3.8	Statistische Analysen.....	54
3.4	Methoden: Zielparameter.....	55
3.4.1	Durchführbarkeit und Sicherheit.....	55
3.4.2	Embolisationserfolg	56
3.4.3	Reperfusion	57
3.4.4	Sichtbarkeit der Embolisatpartikel in der MRT	58
3.4.5	Bioresorbierbarkeit.....	60
3.4.6	Biokompatibilität.....	61
4.	ERGEBNISSE	63
4.1	Durchführbarkeit und Sicherheit.....	63
4.2	Embolisationserfolg.....	68
4.3	Reperfusion	77
4.4	Sichtbarkeit der Embolisatpartikel in der MRT.....	80
4.5	Bioresorbierbarkeit.....	85
4.6	Biokompatibilität.....	93
4.6.1	Qualitative Analyse	93
4.6.2	Semi-quantitative Analyse	93
5.	DISKUSSION	99
5.1	Bewertung der Materialien und Methoden	99
5.1.1	Kaninchen-Nieren-Modell	99
5.1.2	Polydioxanon.....	100
5.2	Bewertung der Ergebnisse.....	100
5.2.1	Durchführbarkeit und Sicherheit.....	100
5.2.2	Embolisationserfolg	102
5.2.3	Reperfusion	104
5.2.4	Sichtbarkeit der Embolisatpartikel in der MRT	106
5.2.5	Bioresorbierbarkeit.....	108
5.2.6	Biokompatibilität.....	112
5.3	Einschränkungen.....	116

5.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	119
6.	LITERATURVERZEICHNIS	120
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	135
	ANTEILSERKLÄRUNG AN ETWAIGEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN.....	137
	LEBENS LAUF	138
	PUBLIKATIONS LISTE	141
	DANKSAGUNG.....	143

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria	HCC	Hepatozelluläres Karzinom (engl. Hepatocellular carcinoma)
Aa.	Arteriae	i.d.R.	in der Regel
AVM	Arteriovenöse Malformation	i.e.	id est
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer	i.R.	im Rahmen
BPH	Benigne Prostatahyperplasie	i.S.	im Sinne
bspw.	beispielsweise	insb.	insbesondere
bzw.	beziehungsweise	ISO	International Organization for Standardization
CBCT	Conebeam-CT	JMS	Jones' Methenamine Silber
CCM	Charité Campus Mitte	kg	Kilogramm
cm	Zentimeter	KG	Körpergewicht
CT	Computertomographie	KM	Kontrastmittel
cTACE	Conventional TACE	kPa	Kilopascal
DEB	Drug-eluting beads	MEE	Membrana elastica externa
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie	MEI	Membrana elastica interna
DSM	Degradable starch microspheres	mg	Milligramm
EVG	Elastica van Gieson	ml	Milliliter
F	French	mm	Millimeter
FDA	Food & Drug Administration	NET	Neuroendokriner Tumor
g	Gramm	nm	Nanometer
ggf.	gegebenenfalls	NOM	Non-operative management
GSP	Gelatin sponge particles	NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug
h	Stunde (engl. hour)		
H&E	Hämatoxylin und Eosin		

o.g.	oben genannt	TAE	Transarterielle Embolisation
OS	Overall survival	TARE	Transarterielle Radioembolisation
PAE	Prostatic Artery Embolisation	TGMS	Trisacryl-gelatin Microspheres
PAS	Periodic-Acid Schiff	u.a.	unter anderem
PFS	Progression-free survival	UK	United Kingdom
PLGA	Polylactic-co-glycolic-acid	USA	United States of America
RCC	Nierenzellkarzinom (engl. Renal cell carcinoma)	V.	Vena
SIRT	Selektive interne Radiotherapie	VAF	viral Antikörperfrei
SPF	spezifisch pathogenfrei	vs.	versus
SPIO	Super paramagnetic iron oxide	WSES	World Society of Emergency Surgery
TACE	Transarterielle Chemoembolisation	µm	Mikrometer

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Indikationsspektrum der transarteriellen Embolisation	19
Tabelle 2: Anforderungen an das ideale Embolisatmaterial, modifiziert nach A. Laurent (2007) (40)	25
Tabelle 3: Überblick über aktuell beforschte temporäre Embolisatmaterialien.....	31
Tabelle 4: Übersicht über die verschiedenen histologischen Färbemethoden	52
Tabelle 5: Übersicht über Zielparameter und entsprechende Modalitäten.....	55
Tabelle 6: Zielparameter Embolisationserfolg – Punktescore	56
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten MRT-Sequenzparameter	59
Tabelle 8: Zielparameter: Degradation – Morphologische Kriterien der Mikrosphären und das daraus resultierende Punktesystem zur Beurteilung des Degradationsgrades jedes einzelnen Partikels	61
Tabelle 9: Injektionsfähigkeit.....	64
Tabelle 10: Embolisationserfolg, evaluiert in den verschiedenen Modalitäten DSA, MRT und makroskopische Pathologie.....	70
Tabelle 11: Ergänzende Beobachtungen zum Embolisationserfolg in der Mikroskopie	73
Tabelle 12: Übersicht der Auswertungen des Reperfusionsscores	77
Tabelle 13: Sichtbarkeit: Übersicht aller MRT Sequenzen zu allen Zeitpunkten und die Abgrenzbarkeit der SPIO Signalalterationen	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erste beschriebene selektive arterielle Embolisation einer gastrointestinalen Blutung von Rösch, Dotter und Brown (2)	17
Abbildung 2: Übersichtsabbildung zur möglichen Einteilung von Embolisatmaterialien.....	23
Abbildung 3: Überblick des Studiendesigns	38
Abbildung 4: Größenverteilung von n = 200 Mikrosphären vor in vivo Gebrauch – nach Herstellerangaben Diameter 90-300 µm	39
Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahmen der Mikrosphären vor in vivo Gebrauch	40
Abbildung 6: Präparierung der <i>A. femoralis communis</i> im Kaninchen.....	43
Abbildung 7: Interventionstisch neben dem Angiographietisch unmittelbar vor dem Eingriff....	44
Abbildung 8: Aortographie in DSA Technik zur anatomischen Übersicht im zeitlichen Verlauf	45
Abbildung 9: Renales Angiogramm in DSA Technik vor Embolisation im zeitlichen Verlauf...	46
Abbildung 10: Fluoroskopische Aufnahmen des Embolisationsvorganges.....	47
Abbildung 11: Organentnahme nach Kontrollbildgebung und Euthanasie	49
Abbildung 12: Schnitttechnik nach Organentnahme am Beispiel einer linken Niere, adaptiert von Stampfl et al.	50
Abbildung 13: Einbettssystem von Leica mit Kälteplatte	51
Abbildung 14: Anordnung des Färbeautomaten zur standardisierten H&E Färbung	53
Abbildung 15: Korrelation der eingebetteten Präparate zum histopathologischen Schnitt auf dem Objektträger nach H&E Färbung	54
Abbildung 16: Reperfusion – Anatomische Zuordnung der Nierengefäße und semiquantitatives Punktesystem.....	58
Abbildung 17: Zielparameter: Biokompatibilität anhand eines Schemas der betroffenen geschädigten Gefäßwandschicht, adaptiert nach Schwartz et al. (138)	62
Abbildung 18: Initiale Katheterisierung einer Kapselarterie aus der <i>A. renalis sinistra</i> (DSA) und anschließend regelrechte Positionierung und Kontrastierung der Nierenarterien.....	63

Abbildung 19: Unselektive Embolisation der linken Niere nach forcierter Embolisatinjektion – Bildgebung: DSA und MRT	66
Abbildung 20: Unselektive Embolisation der linken Niere – Makroskopie	66
Abbildung 21: Dystope Verteilung des Embolisatmaterials im Bauchraum / Bauchwand im MRT	67
Abbildung 22: Embolisationscore 1 – Selektive Embolisation des kaudalen Nierenpols in DSA	68
Abbildung 23: Embolisationscore 2 – Selektive Embolisation des kaudalen Nierenpols sowie unselektive Embolisation angrenzender Nierenareale bei der DSA	69
Abbildung 24: Embolisationserfolg in den Modalitäten DSA, MRT und makroskopische Pathologie – Statistik.....	71
Abbildung 25: Embolisationserfolg in den Modalitäten DSA, MRT und makroskopische Pathologie – Bildgebung nach acht Wochen.....	72
Abbildung 26: Embolisationserfolg – Mikroskopisches Korrelat nach einer Woche (H&E Färbung)	74
Abbildung 27: Verkalkung – Mikroskopische Gradeinteilung (H&E Färbung).....	74
Abbildung 28: Embolisationserfolg – Korrelate in verschiedenen, späteren Zeitpunkten (JMS Färbung)	75
Abbildung 29: Embolisationserfolg – Ansammlung von Erythrozyten als Hinweis für obstruktiven Effekt der Mikrosphären nach einer Woche und im Akutversuch (H&E Färbung)	76
Abbildung 30: Embolisationserfolg – Ausbildung von thrombotischem Gewebe zwischen den Mikrosphären nach einer Woche (H&E Färbung)	76
Abbildung 31: Auswertung des Reperfusionsscores.....	78
Abbildung 32: Vollständige Reperfusion nach 16 Wochen.....	79
Abbildung 33: Partielle Reperfusion nach acht Wochen	79
Abbildung 34: Rekanalisation embolisierter Gefäße nach acht und 16 Wochen (H&E und EVG Färbung)	80
Abbildung 35: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T1 gewichteter TSE Sequenz ohne MRT-Kontrastmittel in koronarer Ebene	82

Abbildung 36: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T1 gewichteter TSE Sequenz ohne MRT-Kontrastmittel in transversaler Ebene	82
Abbildung 37: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T1 gewichteter TSE Sequenz nach MRT-Kontrastmittel in koronarer Ebene	83
Abbildung 38: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T1 gewichteter TSE Sequenz nach MRT-Kontrastmittel in transversaler Ebene	83
Abbildung 39: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T2 gewichteter TSE Sequenz in koronarer Ebene	84
Abbildung 40: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T2 gewichteter TSE Sequenz in transversaler Ebene	84
Abbildung 41: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T2* gewichteter Sequenz ohne MRT-Kontrastmittel in koronarer Ebene	85
Abbildung 42: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T2* gewichteter Sequenz ohne MRT-Kontrastmittel in transversaler Ebene	85
Abbildung 43: Abbau der SPIO-markierten Mikrosphären anhand des Embolisationscores	86
Abbildung 44: SPIO Partikel im Akutversuch – 0 Punkte / Degradationsscore 0 (H&E Färbung)	87
Abbildung 45: SPIO Partikel nach einer Woche – 1 Punkt / Degradationsscore 1 (H&E Färbung)	88
Abbildung 46: SPIO Partikel nach 4 Wochen – 1 bzw. 3 Punkte / Degradationsscore 1 bzw. 2 (H&E Färbung)	89
Abbildung 47: SPIO Partikel nach 8 Wochen – 4 Punkte / Degradationsscore 2 (H&E Färbung)	90
Abbildung 48: SPIO Partikel nach zwölf Wochen – 5 Punkte / Degradationsscore 3 (H&E Färbung)	91
Abbildung 49: SPIO Partikel nach 16 Wochen – 6 Punkte / Degradationsscore 3 (H&E Färbung)	92
Abbildung 50: Auswertung des durch die Embolisation mit SPIO markierten Mikrosphären entstandenen Gefäßwandschadens zur Evaluation der Biokompatibilität	94

Abbildung 51: Infiltration von Entzündungszellen um die Mikrosphäre zum Zeitpunkt zwölf Wochen (H&E Färbung)	95
Abbildung 52: Entstehung von Fremdkörperriesenzellen nach Embolisation im Ab- und Umbauprozess nach zwölf Wochen (JMS Färbung).....	96
Abbildung 53: SPIO-Partikel in arteriellem Gefäßscore des Gefäßwandschadens 0 (EVG Färbung)	97
Abbildung 54: Multiple SPIO-Partikel im Infarktareal – Gefäßwandschadensscore 3 (EVG Färbung)	98

1. Abstrakt

1.1 Deutsch

Ziel

Ziel der Arbeit war, die Durchführbarkeit und Sicherheit, Embolisationserfolg, Reperfusion, Bioresorbierbarkeit, Biokompatibilität und in vivo Nachweisbarkeit neuartiger Embolisatpartikel aus Polydioxanon zu untersuchen.

Material & Methoden

Die Versuchsreihe wurde im Tiermodell anhand von neun weiblichen Neuseelandkaninchen umgesetzt. Bei den Tieren wurde unter digitaler Subtraktionsangiographie (DSA) eine unilaterale, superselektive Segmentarienembolisation im kaudalen Nierenpol durchgeführt. Dazu wurden neuartige, mit superparamagnetischem Eisenoxid (superparamagnetic iron oxide / SPIO) imprägnierte resorbierbare Mikrosphären aus Polydioxanon (Größenbereich 90-500 µm) verwendet. Postinterventionell erfolgte eine Magnetresonanztomographie (MRT) zum in vivo Nachweis. Der Embolisationserfolg wurde mittels DSA, MRT und makroskopischer Pathologie bewertet. Ein Tier wurde direkt nach der Embolisation und MRT in Narkose euthanasiert (Akutversuch). Dies ermöglichte Einblicke in das Akutverhalten, Aussehen und die direkte Verteilung der Partikel. Die anderen acht Tiere wurden entsprechend verschiedener Beobachtungszeiträume nach dem Zufallsprinzip einem von fünf Zeitpunkten zugeordnet (eine, vier, acht, zwölf und 16 Wochen). Zu dem jeweiligen Euthanasiezeitpunkt wurde erneut eine Kontrollbildgebung mittels MRT und DSA durchgeführt, um die Reperfusion zu bestimmen. Nach der Euthanasie wurden anhand umfangreicher mikroskopischer Analysen die Bioresorbierbarkeit und Biokompatibilität bestimmt.

Ergebnisse

Bei allen Tieren konnte eine effektive renale Embolisation erzielt werden. Makro- und mikroskopische Ergebnisse bestätigten mittels Nekrose und Infarktarealen den erfolgreichen Gefäßverschluss. Eine superselektive Embolisation war in sieben von acht Tieren erfolgreich. Bei einem Tier wurde akzidentell die gesamte Niere embolisiert und es fanden sich in der MRT Partikel im Abdomen und in der Bauchwand. Technische Schwierigkeiten zeigten sich bei der Injektion der Partikel durch Verstopfung des Mikrokatheterlumens. Die Kontrollangiogramme wiesen Zeichen partieller Reperfusion auf, wobei in den MRT-Untersuchungen zu allen Zeitpunkten die SPIO-imprägnierten Mikrosphären in den Zielregionen nachweisbar waren. In der

histopathologischen Auswertung zeigten die Mikrosphären zu den verschiedenen Kontrollzeitpunkten eine unterschiedlich ausgeprägte Degradation mit einer deutlichen Tendenz zu progredientem Abbau zu späteren Beobachtungszeiträumen. Diese Beobachtungen gingen einher mit zunehmender Gefäßwandzerstörung und Riesenzellformierungen ohne Zeichen der Gewebeunverträglichkeit.

Schlussfolgerung

Neuartige SPIO-imprägnierte Mikrosphären aus Polydioxanon zeigten eine effektive Embolisation mit guter Biokompatibilität und in vivo Nachweisbarkeit mittels MRT sowie eine zunehmende Degradation und Resorption im Verlauf. Die Einschränkungen bei der Partikelinjektion erfordern Verbesserungen und weitere Forschung, um eine klinische Anwendbarkeit zu ermöglichen.

Teile dieses Abschnitts finden sich in übersetzter Form in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

1.2 Englisch

Purpose

The aim of this study was to assess feasibility and safety, embolisation success, reperfusion, bioresorbability, biocompatibility and in vivo visibility of a novel temporary embolic agent made of Polydioxanone.

Material & Methods

The experiments were performed in an animal model with nine female New Zealand white rabbits. Unilateral superselective embolisation of segmental arteries in the lower kidney pole using digital subtraction angiography (DSA) was performed with newly developed bioresorbable microspheres made of polydioxanone (size range 90-500 μm), impregnated with superparamagnetic iron oxide (SPIO). Additionally, magnetic resonance imaging (MRI) was performed post-interventionally to assess in vivo visibility. Embolisation success was assessed on DSA and MRI. One animal was sacrificed immediately after embolisation and MRI. This allowed assessment of original particle appearance and distribution. The other eight animals were randomly assigned to one of five time points, according to different observation periods (one, four, eight, twelve and 16 weeks). At this time point, control angiography and control MRI images were obtained to determine reperfusion. Following euthanasia, comprehensive histopathological analysis was performed to determine biodegradability and biocompatibility.

Results

Artery occlusion was achieved in all kidneys, cell necrosis and infarct areas in macro- and microscopic analysis confirmed embolisation success. Superselective embolisation was technically successful in seven of eight specimens. One animal accidentally received over-embolization of the whole kidney and non-target embolisation of the abdomen and abdominal wall. Due to catheter clogging, technical difficulties were shown during particle injection. Control angiograms showed evidence of partial reperfusion, whereas the SPIO loaded microspheres were visible on MRI at all time points in the target area. Histopathologically, the microspheres showed different grades of bioresorbability at different time points, with a clear trend towards extensive degradation at later time points. These observations went along with increasing vessel wall damage and giant cell formation without any signs of tissue incompatibility.

Conclusion

Novel, SPIO impregnated bioresorbable embolic agents consisting of polydioxanone showed effective embolisation with good biocompatibility and in vivo visibility, as well as increasing degradation over time. Injection of the microspheres through the microcatheters was hindered by recurrent obstruction. Therefore, further improvements and research is needed to provide clinical applicability.

*Teile dieses Abschnitts finden sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al.,
Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.*

2. Einleitung

2.1 Allgemeines zur Transarteriellen Embolisation

Die transarterielle Embolisation (TAE) ist ein häufig angewandtes und etabliertes endovaskuläres Therapieverfahren, welches seine Ursprünge in der heutigen Form in den 1960er-Jahren hat.

Wesentliche Voraussetzungen für die TAE waren die Einführung des perkutanen Gefäßzugangs nach Seldinger (1), die Katheterentwicklung mit koaxialen Mikrokathetern, die Entwicklung von Embolisatmaterialien und geeigneten intravaskulären Kontrastmitteln, die Röntgendurchleuchtung und Angiographie von der Blattfilmtechnik sowie die DSA und das Conebeam-CT (CBCT).

Die ersten Embolisationen wurden Ende der 1960er-Jahre zuerst bei spinalen arteriovenösen Malformationen (AVM) durchgeführt. Es folgten in den frühen 1970er-Jahren zerebrale, renale, gastrointestinale (2), bronchialarterielle und pulmonale Embolisationen. Das Organ- und Indikationsspektrum erweitert sich zunehmend; so wurden beispielsweise in den letzten Jahren auch vermehrt Prostataembolisationen (engl. prostatic artery embolisation, PAE) durchgeführt.

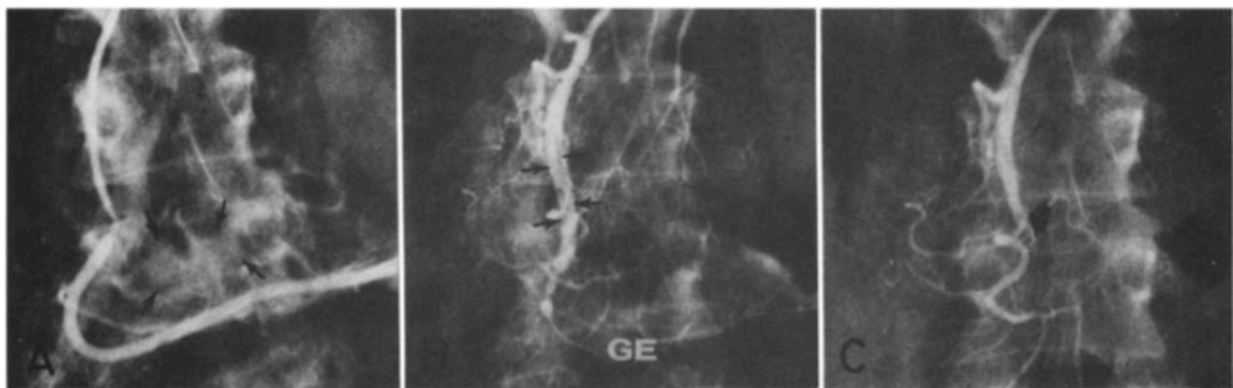


Abbildung 1: Erste beschriebene selektive arterielle Embolisation einer gastrointestinalen Blutung von Rösch, Dotter und Brown (2)

A. Selektives Arteriogramm der gastroepiploischen und gastroduodenalen Gefäße. Die Pfeile zeigen einen diffusen Kontrastmittelaustritt in das Magenantrum.

B. Nach Injektion vasokonstriktiver Substanzen und Blutclots zeigt sich die A. gastroepiploica (GE) deutlich verengt. Die Pfeile markieren Fülldefekte im Bereich des Katheters in der A. gastroduodenalis.

C. Zwei Wochen nach dem Ersteingriff zeigt sich ein Verschluss der A. gastroepiploica (Pfeil).

Mit freundlicher Genehmigung der Radiological Society of North America, RSNA®

Eine besondere Rolle spielte die Entwicklung von Embolisatmaterialien. Materialien waren ursprünglich z.B. autologe Blutkoagel und andere körpereigene Substanzen wie Faszien oder Muskelgewebe, welche ursprünglich noch offen chirurgisch implantiert wurden (3), sowie tierisch gewonnene Substanzen wie Gelatineschwämme (Gelfoam[®], Pfizer Inc., New York, New York, USA). Sukzessive weitete sich das Indikationsspektrum von der Behandlung von Blutungen und AVM bis hin zur Behandlung von benignen und malignen Tumoren, was zur Entwicklung entsprechender Therapieverfahren wie der Transarteriellen Chemoembolisation (TACE) oder der selektiven internen Radioembolisation (SIRT) geführt hat. Die stete Weiterentwicklung im technischen Bereich sowie auf dem Gebiet der Materialentwicklung eröffnet heute eine Vielzahl von Optionen für die Anwendung der Embolisation.

2.2 Indikationen für die Transarterielle Embolisation

Orientierend lässt sich das Indikationsspektrum entsprechend Tabelle 1 in verschiedene Kategorien einteilen:

- Kurative, symptomatische oder präoperative Behandlung bei vaskulären Anomalien
- Notfallmaßnahmen, z.B. im Rahmen akuter Blutungen
- Devaskularisation von nicht-neoplastischen Geweben
- Devaskularisation von neoplastischen Geweben
 - benigne
 - maligne
- Unterstützungsverfahren im Rahmen weiterer Therapiemaßnahmen, z.B. die Embolisation von gefährdeten gastrointestinalen Arterien vor einer SIRT
- Adjuvans vor weiteren Therapiemaßnahmen, z.B. Pfortaderembolisation vor Leberresektion
- Postoperative Verfahren, z.B. zur Versorgung von Endolecks

Die Vielfalt der Anwendungen unterstreicht die große Bedeutung des Verfahrens und erklärt zudem die weiteren Forschungsaktivitäten hinsichtlich neuer Embolisatmaterialien. Auf die wichtigsten Indikationen wird im Folgenden näher eingegangen.

Behandlungsziel	Entität / Klinische Anwendung
Kurative / symptomatische / präoperative Behandlung vaskulärer Anomalien	<ul style="list-style-type: none"> • Arteriovenöse Malformation
Notfallmaßnahmen Nicht-operatives Management	Akute Blutungen, traumatisch & nicht-traumatisch: <ul style="list-style-type: none"> • Beckenringfraktur • Leber-, Milz-, Nierenrupturen • Post-partum Blutungen • Hämorrhagische Neoplasien • Hämoptysen (Aspergillose, Zystische Fibrose)
Devaskularisation von nicht-neoplastischen Prozessen (4-9)	<ul style="list-style-type: none"> • Priapismus • Pelvines Kongestionssyndrom • Varikozele • Polyzystische Nierenerkrankung • Transplantatabstoßung • Hämorrhoiden
Kurative / symptomatische / palliative Behandlung benigner Neoplasien	<ul style="list-style-type: none"> • Uterusraumforderungen, z.B. Uterusmyom • Benigne Prostatahyperplasie • Renales Angiomyolipom • Osteoidosteom
Kurative / symptomatische / palliative Behandlung maligner Neoplasien	<ul style="list-style-type: none"> • Primärtumoren (HCC, RCC) • Metastasen, z.B. kolorektales Karzinom, Mammakarzinom, Neuroendokrine Tumoren
Schutz von Gewebe abweichend vom Zielgebiet vor einer Embolisation (10)	<ul style="list-style-type: none"> • SIRT-Vorbereitung
Adjuvans vor weiteren Therapiemaßnahmen (11)	<ul style="list-style-type: none"> • Pfortaderembolisation vor Leberresektion zur Induktion einer hepatischen Hypertrophie des kontralateralen Leberlappens
Postoperatives Management (12, 13)	<ul style="list-style-type: none"> • Endolecks • Arrosionen, z.B. nach Pankreaschirurgie
Aktuelle Forschung	<ul style="list-style-type: none"> • Bariatrische Embolisation bei Adipositas

Tabelle 1: Indikationsspektrum der transarteriellen Embolisation

Die Embolisation von AVM wurde bereits frühzeitig von interventionellen Radiologen durchgeführt. Diese pathologischen Zustände des Gefäßsystems können durch spontane Rupturen Blutungen mit fatalen Verläufen oder epileptische Anfälle hervorrufen und werden mit multimodalen Therapiekonzepten angegangen. Hier kommt u.a. der Embolisation eine Rolle zu,

z.B. in der Vorbereitung von radiochirurgischen Eingriffen wodurch bspw. die Verödungsrate erhöht werden konnte (14).

Auch akute, atraumatische Blutungen können zu einer erheblichen Gefährdung der Patientengesundheit führen. Die Quelle der behandelbaren Blutungen mittels Embolisation ist mannigfaltig und reicht von Hämoptysen, z.B. i.R. einer Aspergillose oder zystischen Fibrose (15, 16), den bereits von Rösch und Dotter 1970 erstmals behandelten und in nachfolgenden Jahren vielfach untersuchten gastrointestinalen Blutungen (17), post-partum-Blutungen, bis hin zu iatrogenen Blutungen oder Blutungen i.R. hämorrhagischer Neoplasien (18, 19).

Im Rahmen der Traumabehandlung hat sich die Embolisation ebenfalls als erfolgreiches Instrument der Akuttherapie durchgesetzt. Zu den häufigsten Verletzungsmustern von Polytraumapatienten zählen u.a. die Beckenringfraktur und die Milzruptur, z.B. im Rahmen stumpfer Bauchtraumata. Am Beispiel der Beckenringfraktur kann es zu rasch progredienten und lebensgefährlichen Blutungen kommen, welche teils erheblich zu Morbidität und Mortalität beitragen (20). Die Embolisation stellt hier ein gut etabliertes Verfahren dar, welches entweder direkten therapeutischen Vorteil durch einen erfolgreichen Gefäßverschluss erzielt oder zumindest zur vorübergehenden hämodynamischen Stabilität beiträgt (21).

Die Milz als sehr gut durchblutetes Organ stellt beim Trauma eine besondere Herausforderung dar. Während eine Milzverletzung in den letzten Jahrzehnten oftmals eine unmittelbare Splenektomie mit allen potenziell gravierenden Nebenwirkungen u.a. aufgrund der immunologischen Funktion der Milz zur Folge hatte, zeigte sich in den letzten Jahren ein Trend zu einer multidisziplinären Herangehensweise. Subsumiert unter dem Namen Non-operative-Management (NOM), wurde u.a. die Milzarterienembolisation als Option miteingeschlossen. Metaanalysen konnten zeigen, dass insbesondere bei WSES Grad II Verletzungen der Milz mit vorliegenden diagnostisch-radiologischen Anzeichen für eine akute Blutung (z.B. Kontrastmittelfahne) und allen Grad III Läsionen eine arterielle Embolisation in Erwägung gezogen werden sollte (22). Schwerwiegende Milzverletzungen mit hämodynamisch instabilen Patienten sollten weiterhin einer direkten Operation zugeführt werden.

Zum Indikationsspektrum der gutartigen Tumoren, welche mittels Embolisation behandelt werden, zählen allen voran das Uterusmyom oder die in jüngsten Studien zunehmend untersuchte benigne Prostatahyperplasie (BPH). In beiden Fällen unterscheiden sich die Evidenzen für mögliche Vorteile der Embolisation jedoch noch deutlich. Eine relativ neue Metaanalyse untersuchte die Rolle der Embolisation von Uterusmyomen bei über 1000 Patientinnen. Hier konnte eine Reduktion der Symptome aller Patientinnen und eine Reduktion des Tumolvolumens drei Monate nach der Embolisation gezeigt werden (23). Eine junge Metaanalyse von Forschern

der Universität St. Gallen konnte im Gegensatz dazu am Krankheitsbild der BPH keinen Vorteil der Embolisation gegenüber etablierten chirurgischen Verfahren aufzeigen. Trotz alledem kommen auch in dieser Studie teils allgemeingültige Vorteile der Embolisation zum Tragen, wie etwa eine geringere Komplikationsrate und eine verkürzte Krankenhausliegedauer oder – oftmals sehr entscheidend für ein jüngeres Patientenkontingent – ein verbessertes Ergebnis der Sexualfunktion (24).

Maligne Tumorerkrankungen wie das HCC, RCC oder Metastasen des kolorektalen Karzinoms stellen im klinischen Alltag weitere verbreitete Indikationen der Embolisation dar. Hier kristallisierten sich im Laufe der Jahre spezialisierte Varianten der TAE, wie TACE oder SIRT, heraus. Für die TACE wird die Rationale einer Tumordestruktion durch Kappung der arteriellen Versorgung kombiniert mit einer lokalen Applikation von verschiedenen chemotherapeutischen Substanzen.

Die SIRT oder auch Transarterielle Radioembolisation (TARE) verwendet deutlich kleinere Partikel, welche mit dem radioaktiven Isotop Yttrium-90 beladen sind. Beide Verfahren eint das Ziel der additiven Zerstörung von Tumorzellen mittels lokaler Hochdosistherapien bei gleichzeitig möglichst geringem Spektrum unerwünschter Nebenwirkungen, wie sie z.B. im Rahmen systemischer Chemotherapie entstehen. In hypervaskularisierten Tumoren basiert die Rationale zudem auf den anatomischen Gegebenheiten, da diese Art Malignome bis zu 95 % arteriell gespeist werden, während gesundes Lebergewebe hingegen zum Großteil über die *V. portae* versorgt wird (25). Somit kann durch eine Embolisation ein möglichst großer Effekt auf den Tumor bei gleichzeitig bestmöglicher Schonung des gesunden Gewebes erzielt werden, gerade bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion ein klinisch relevanter Faktor.

Im Falle des HCCs können mittels der TACE und TAE zwei Zwecke verfolgt werden: Zum einen bieten die minimal-invasiven Verfahren einen Überlebensvorteil (26, 27) und werden bei Patienten im Stadium B des am weitesten verbreiteten Staging Systems Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) als Erstlinientherapie und für Patienten mit irresektablen oder anderweitig behandelbaren Malignomen empfohlen und in internationale Leitlinien aufgenommen (28, 29). Zum anderen kann die arterielle Embolisation zu einem „Downstaging“ des Tumors führen. Dies ermöglicht für ausgewählte Patienten einen Eintrag auf der Warteliste für eine potenzielle Lebertransplantation, und somit eine kurative Therapieoption (30). Auch für Nierenkarzinome kann eine Embolisation für ausgewählte Patienten Vorteile bringen, z.B. ebenfalls als Vorbereitungseingriff für eine nachfolgende Operation. Eine retrospektive Studie zeigte sogar einen Fünf-Jahres-Überlebensvorteil für Patienten, welche vor Nephrektomie einer renalen Embolisation unterzogen wurden (31). Auch besteht die Möglichkeit einer renalen Embolisation im palliativen Setting zur

Symptomlinderung von Schmerz, Hämaturie und möglicherweise auch paraneoplastisch bedingter Hypokalziämie (32).

Nicht nur primäre Lebermalignome wie das HCC können mittels Embolisation therapiert werden, sondern auch Lebermetastasen verschiedener Primärtumoren, wie z.B. von kolorektalen Karzinomen, neuroendokrinen Tumoren (NET) oder Mammakarzinomen. Für das kolorektale Karzinom konnte eine randomisierte, kontrollierte prospektive Studie Vorteile der TACE gegenüber der reinen systemischen Therapie in der Erstlinientherapie in Bezug auf die Overall-response-Raten zeigen und zudem eine signifikant höhere Rate im „Downsizing“ der Tumoren für eine anschließende Resektion. Das progressionsfreie Überleben (engl. progression free survival, (PFS)) zeigte sich mehr als verdoppelt, jedoch nicht statistisch signifikant (33). In einer weiteren prospektiven Studie konnte ein Vorteil der TACE gegenüber systemischer Chemotherapie in Bezug auf Response Rate, PFS und medianem Gesamtüberleben (engl. overall survival, (OS)) gezeigt werden (34).

Neuroendokrine Tumoren zeigen häufig eine hepatische Metastasierung und sind somit ebenfalls potenziell zugänglich für eine Embolisationsbehandlung. Eine prospektive Studie aus dem Jahr 2017 konnte für hepatisch metastasierte NETs aus dem Dünndarm und Pankreas eine gute Effektivität und Verträglichkeit der TACE nachweisen (35). Retrospektive Daten von über 500 Patientinnen konnten auch für hepatische metastasierte Mammakarzinome eine Effektivität der TACE nachweisen (36).

Neben den dargelegten und teils gut untersuchten Indikationen läuft die Erforschung weiterer möglicher Anwendungsoptionen der transarteriellen Embolisation ständig weiter. Ein neues Feld hat sich bspw. in den letzten Jahren entwickelt: Die bariatrische Embolisation, welche adipösen Patienten zu Gewichtsverlust verhelfen soll. So zeigt eine aktuelle Studie die effektiven Ein-Jahres-Daten mit Appetit- und Gewichtsverlust in Adipositaspatienten bei gleichzeitig sicherer Durchführbarkeit (37). Die Entwicklung deutet insgesamt auf eine zunehmende Expansion der Indikationen für interventionell durchgeführte Embolisierungen hin, womit das Feld für zusätzliche Materialforschung weiter geöffnet wird.

2.3 Embolisatmaterialien: Einteilung und Übersicht

Das Konzept der perkutanen transarteriellen Embolisation basiert auf einer intravaskulären Applikation von Materialien, welche zu einem kontrollierten Gefäßverschluss führen. Da jede Indikation mit ihren speziellen Anforderungen an das zu embolisierende Gewebe verschiedener

Voraussetzungen bedarf, wird neben einer Anpassung der Technik eine konsequente Adaption des Materials benötigt.

Die Optionen an verfügbaren Embolisatmaterialien haben sich im Laufe der Jahre stark entwickelt, von anfänglich nur wenigen verfügbaren Ausgangssubstanzen hin zu einer Fülle an Materialien. Die verfügbaren Substanzen können auf verschiedene Weise eingeteilt werden (Abbildung 2). Die erste große Unterscheidung besteht zwischen mechanischen, z.B. metallische Coils, Plugs, und sogenannten flußgesteuerten Embolisatmaterialien (38). In der vorliegenden Arbeit werden letztere diskutiert. Flußgesteuerte Embolisatmaterialien können weiter in Subkategorien unterteilt werden, z.B. anhand ihres Aggregatzustandes (fest vs. flüssig), ihrer chemischen Zusammensetzung, ihrer Größenverteilung (kalibriert vs. unkalibriert) und Größenzugehörigkeit. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal für die vorliegende Arbeit ist die Differenzierung zwischen permanenten, also nicht-abbaubaren und im Körper verbleibenden Substanzen, auf der einen Seite, und degradierbaren Materialien, i.e. temporären Materialien auf der anderen Seite.

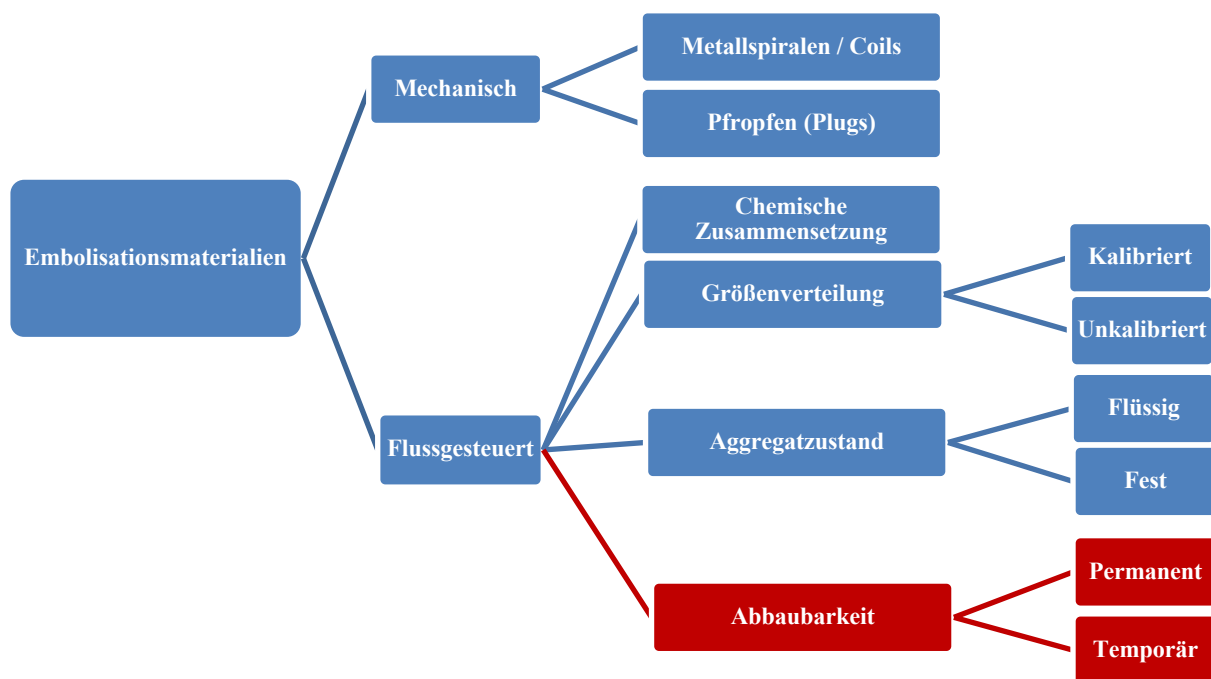


Abbildung 2: Übersichtsabbildung zur möglichen Einteilung von Embolisatmaterialien

Es können weitere Felder ergänzt werden; die Abbildung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

2.4 Das ideale Embolisatmaterial

In der Entwicklung neuartiger Biomaterialien zur klinischen Anwendung existieren internationale Standards, an welchen sich Forscher hinsichtlich der Erprobung neuer Materialien orientieren können. Für endovaskuläre Embolisationsmaterialien wurde 2004 von der U.S. Food & Drug Administration (FDA) das Dokument „Guidance for Industry and FDA Staff – Class II Special Controls Guidance Document: Vascular and Neurovascular Embolization Devices“ veröffentlicht (39). Dieses Dokument wird als Richtlinie zur Erprobung neuer Embolisatmaterialien angesehen und beinhaltet neben Empfehlungen zu präklinischen Untersuchungen auch Normempfehlungen für Tierstudien und klinischen Untersuchungen. Das Dokument empfiehlt ausdrücklich, in tierexperimentellen Studien folgende Parameter zu untersuchen:

1. Injizierbarkeit durch gängige Kathetersysteme, insb. in Hinblick auf Reibung und Schlängelung des Katheters
2. Akute Komplikationen, z.B. Ruptur oder Punktion von Blutgefäßen
3. Rekanalisation des Gefäßes bzw. Dauer des Gefäßverschlusses
4. Lokale und systemische Fremdkörperreaktionen
5. Migration des Materials
6. Effektivität

Darüber hinaus wird empfohlen, Nachfolgeuntersuchungen zum Ausschluss akuter und chronischer Toxizität durchzuführen. Bereits 2007 postulierte A. Laurent Anforderungen, welche das ideale Embolisatmaterial zu erfüllen habe (40). Auf acht, in Tabelle 2 zusammengefasste wesentliche Eigenschaften wird in diesem Kapitel eingegangen.

Anforderungen an das ideale Embolisatmaterial
1. Effektive Embolisation
2. Kalibrierung mit vorhersagbarer Eindringtiefe in die Zielregion
3. Maßgeschneiderter Zeitpunkt der Degradation
4. Gute Biokompatibilität
5. Injektionsfähigkeit
6. Physikalische Eigenschaften, z.B. Kompressibilität
7. Sichtbarkeit, im besten Fall multi-modal
8. Beladbarkeit mit Medikamenten

Tabelle 2: Anforderungen an das ideale Embolisatmaterial, modifiziert nach A. Laurent (2007) (40)

Eine der Basisvoraussetzungen eines idealen Embolisatmaterials ist die erfolgreiche Devaskularisation des Zielgefäßes, um dadurch eine Ischämie, einen Infarkt oder eine Nekrose im Zielgebiet hervorzurufen.

Die Mikrosphären bedürfen zudem einer genauen Größenkalibrierung für eine exakt vorhersehbare Eindringtiefe entsprechend der Zielanatomie. Dies verfolgt den Zweck eines jeweils speziell an den Gefäßdiameter angepassten Materials, das in der gewünschten Höhe des Gefäßes zur Okklusion führt. Ein zu weit proximaler Verschluss durch zu große Partikel ist ebenso unerwünscht wie die Wahl zu kleiner Embolisatmaterialien. Letztere können durch eine distale Penetration zu einer Reihe an Komplikationen führen, wie etwa einer Schädigung von Gallengängen, ungezielten Embolisationen durch arterio-venöse Shunts oder sogar Todesfolgen durch pulmonale Komplikationen (41, 42).

Nachdem ein Embolisatmaterial seinen therapeutischen Effekt erfüllt hat, soll es im Idealfall aus dem Körper ohne weitere Intervention und physiologisch wirksame Residuen entfernt werden. Nicht nur sollte ein ideales Embolisatmaterial auf natürliche Weise abbaubar sein, sondern darüber hinaus dessen Resorptionsverlauf vorhersehbar sein. Die Ischämiezeiten einzelner Organe sind unterschiedlich und können von Minuten bis Stunden variieren. Zudem werden bei unterschiedlichen Indikationen verschiedene Ziele verfolgt. So besteht bei akuten Blutungen die Notwendigkeit des unmittelbaren und mittelfristigen Verschlusses, während bei Tumorembolisationen meist ein langfristiger Effekt erwirkt werden soll. Den unterschiedlichen Ansätzen und Bedürfnissen in Form von jeweils exakt angepassten Resorptionszeiten des Embolisatmaterials muss entsprechend Rechnung getragen werden.

Der Zeitpunkt der Degradation hängt u.a. unmittelbar zusammen mit dem Grad der Gewebeerträglichkeit. Der Resorptionszeitpunkt muss neben der gewünschten Dauer der Ischämie entsprechend der jeweiligen Pathologie und Anatomie so konstruiert sein, dass die Resorption bestenfalls abgeschlossen ist, bevor eine mögliche Abwehrreaktion des Körpers, bspw. in Form einer chronischen Inflammation mit Umstrukturierung der Gefäßwände entstehen kann. Hierfür ist es u.a. notwendig, den genauen Abbaumechanismus des Materials (z.B. hydrolytisch, enzymatisch) sowie die klinischen Auswirkungen dieser Mechanismen und möglicher Abbauprodukte zu kennen. Weitere Parameter, welche die Biokompatibilität und die Antwortreaktion des Körpers auf Fremdmaterial beeinflussen sind bspw. die Blut-Material-Interaktion, das Ausmaß der Zellnekrose und eine vorläufige Matrix-Formation (43). Eine Richtlinie zur Beurteilung der Biokompatibilität bieten diverse Guidelines der International Organization for Standardization (ISO).

Für die klinische Anwendbarkeit ist eine technische Durchführbarkeit und Handhabung unabdingbar. Es ist notwendig, dass das Embolisatmaterial gut über gängig vorliegende Katheter zu injizieren ist. Eine Anwendbarkeit mittels Mikrokathetern ist nicht automatisch gegeben. Darüber hinaus muss das Material entsprechende physikalische Eigenschaften aufweisen. Diese Katheter haben teilweise nur einen Durchmesser von 0,35 mm und müssen für Partikel und Mikrosphären durchgängig sein. So wurde bspw. die Passagefähigkeit einzelner zum damaligen Zeitpunkt routinemäßig klinisch eingesetzter Partikel getestet, indem verschiedene Katheter zu einer Acht geformt wurden, um anschließend die Injektionsfähigkeit und das Ausmaß der Aggregation durch injizierte Partikel zu prüfen (44).

Die Komprimierbarkeit bzw. Kompressibilität der Mikropartikel kann in diesem Rahmen ebenfalls ein wesentlicher Faktor sein. Durch die Flexibilität kann sich das Material so temporär den äußeren Umständen, in diesem Fall den unterschiedlichen Kathetern, anpassen und nach Injektion in seine ursprüngliche Form zurückkehren. Dies ermöglicht eine gute Injizierbarkeit bei gleichzeitig unveränderten und somit vorhersagbaren Materialeigenschaften. In der oben erwähnten *in vitro* Studie von Lewis et al. (2006) wurden neben der Injektionsfähigkeit und Aggregationsneigung der Partikel in Kathetern auch physikalische Untersuchungen zur Kompressibilität unternommen. Hierzu wurden untersucht, welchem Druck in kPa die verschiedenen Partikel ausgesetzt werden müssen, um sie zu komprimieren. Die Kompressibilität spielt allerdings nicht nur eine Rolle in der technischen Durchführung, sondern hat auch wesentlichen Einfluss auf den Ort und die Art, in welcher Form die Partikel das Zielgefäß okkludieren (44). Ebenfalls von Bedeutung ist die Ladung der Partikel und die Glätte der Oberfläche mit Berücksichtigung hydrophiler und hydrophober Eigenschaften.

Ferner ist die (röntgenologische) Sichtbarkeit der Embolisatmaterialien für die Applikation wie für die Nachkontrolle von wesentlicher Bedeutung (45). Eine in vivo Nachvollziehbarkeit ermöglicht den Interventionalisten sowohl eine exakte Zuordnung der eingebrachten Materialien zum Zielgewebe, als auch ein unmittelbares Feedback über den möglichen Therapieerfolg in Echtzeit oder im kurzfristigen Verlauf.

Im Anwendungsgebiet von Pathologien der Leber gibt es bei der Technik der TACE zwei verschiedene Ansätze: die sogenannte konventionelle Transarterielle Chemoembolisation (cTACE) und die Durchführung mittels medikamentenfreisetzender Sphären („drug-eluting beads“ (DEB), (DEB-TACE)). In der cTACE wird nach einer intraarteriellen Injektion von Chemotherapeutika und einer röntgendichten öligen Substanz (Lipiodol®) zusätzlich ein Embolisatmaterial eingebracht. Dagegen vereinigen in der DEB-TACE medikamentenfreisetzende Partikel die zytotoxische und okklusive Wirkung in einem und werden mit wasserlöslichem Kontrastmittel vermischt injiziert.

Die Medikamentenbeladung von Mikrosphären mit allmählicher Medikamentenfreisetzung ist im Hinblick auf die hohe lokale Wirkung einerseits und prolongierte geringe systemische Wirkung andererseits von Bedeutung. In jüngsten Metaanalysen deutet sich ein Vorteil der DEB-TACE gegenüber der cTACE im Hinblick auf das Therapieansprechen und Drei-Jahres-Überlebensraten an (46).

2.5 Temporäre Materialien: Vorteile und Stand der Forschung

Im klinischen Alltag werden derzeit nach wie vor meist permanente Embolisatmaterialien verwendet. Permanent verbleibende Materialien können jedoch nachteilig zu einer langwierigen chronischen Entzündungsreaktion im Körper mit entsprechenden Folgen für die Patienten (47-49) führen.

Die Verwendung von bioresorbierbarem Material bietet hingegen diverse Vorteile. Durch die grundlegende Eigenschaft der Bioresorbierbarkeit der verwendeten Partikel verbleibt das Fremdmaterial nur vorübergehend im Körper. Zudem erlaubt eine lediglich kurzfristige Okklusion dem embolisierten Gefäß die Möglichkeit, nach Rekanalisation seine Funktion wieder aufzunehmen (50). Dies ermöglicht somit wiederholte Embolisationsvorgänge (51). Dieser Vorteil kommt etwa in onkologischen Indikationen zum Tragen, wenn bei Lebertumoren eine TACE repetitiv durchgeführt werden soll (52) oder bei Eingriffen, in welchen eine Erhaltung der Organfunktion und damit eine aufrechterhaltene Gefäßversorgung dringend gewünscht ist (53). Dies trifft z.B. auf Uterusmyomembolisationen zu; eine Wiederherstellung der Gefäßversorgung

nach Embolisation ist im Hinblick auf eine mögliche zukünftige Schwangerschaft wünschenswert (54, 55).

Ein lediglich vorübergehender Gefäßverschluss durch temporärere Embolisatmaterialien führt im Vergleich zu einem endgültigen Verschluss zu einer weniger ausgeprägten Ischämie. Die Konsequenz ist eine geringere Stimulation des Wachstumsfaktors „vascular endothelial growth factor“ (VEGF). Von diesem Wachstumsfaktor ist bekannt, dass er die Tumorneoangiogenese vorantreiben kann (56, 57). Dadurch kann es potenziell zu einer erhöhten Proliferation und Metastasierungsrate kommen oder im schlimmsten Falle sogar zu einem Tumorrezidiv mit beschleunigter Wachstumsrate (58, 59).

Die bedeutenden potenziellen Vorteile haben zu einer großen Anzahl von Forschungsarbeiten im Verlauf der vergangenen Jahre geführt (51, 53, 60-110). Tabelle 3 fasst eine Auswahl dieser Arbeiten zusammen. Auf einzelne Arbeiten und zwei besonders aussagekräftige und intensiv beforschte Materialien wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

Material	Forschungsgruppe, Jahr	Studienmodell	Degradationsintervall	Abbaumechanismus	Biokompatibilität	Sichtbarkeit	Potenzielle Medikamentenbeladung
Poly(ethylen-Glycol) Methacrylat (PEGMA)	Louguet et al., 2014 Maeda et al., 2013 Verret et al., 2014 Bédouet et al., 2015-2016	In vitro Kaninchen-Subkutan-Modell Schweine-Nieren-Modell Schaf-Uterus-Modell	24 Stunden bis sieben Tage	Hydrolyse	Keine Zytotoxizität in vitro Keine chronische Inflammation	Nicht berücksichtigt	Bevacizumab Sunitinib Doxorubicin Irinotecan NSAIDs
Carboxymethyl-Cellulose/ Chitosan	Weng et al., 2011-2018	In vitro Kaninchen-Nieren-Modell	Zu 95 % < zehn Tagen in vivo. Modifizierbar nach Grad der Quervernetzung	Hydrolyse Phagozytose Enzymatisch	Ruptur der Gefäßinnenwand Leichte lokale Entzündungsreaktion Keine unerwünschten systemischen Wirkungen	Nicht berücksichtigt	Doxorubicin
Chitosan	Kwak et al., 2005 Lee et al., 2005 Kim et al., 2007 Kang et al., 2009 & 2010 Chung et al., 2012 Zhou et al., 2014	In vitro Ratte-Muskel-Modell Kaninchen-Nieren-Modell Kaninchen-Ohren-Modell Kaninchen-Lebertumor-Modell (VX2)	16-24 Wochen	Unklar. Möglicherweise Enzymatische Hydrolyse	Keine Zytotoxizität in vitro Leichte bis moderate inflammatorische Reaktion mit Fremdkörperriesenzellen in vivo	SPIO Indocyanin-Grün	Doxorubicin
Polymilch-co-glycol-säure (PLGA)	Bastian et al., 1998 Chen et al., 2015 Choi et al., 2015 & 2017	Ratte-Lebertumor-Modell (MAT-B-III) Kaninchen-Lebertumor-Modell (VX2) Ratte-Lebertumor-Modell (Novikoff hepatoma)	Nach zwei Wochen Inkubation im Serum MS-Größe um 79,8 % reduziert. Poröse Oberflächenstruktur nach vier Wochen in Serum	Hydrolyse	Milde bis moderate Arteritis in vivo	2,3,5-Triiodbenzoesäure (CT-KM) Eisenoxid	Doxorubicin Sorafenib
Alginat	Eroglu et al., 2006 Forster et al., 2010 van Elk et al., 2015 Rong et al., 2015 & 2017 Xuan et al., 2017 Wang et al., 2015 & 2017	In vitro Kaninchen-Nieren-Modell Schaf-Uterus-Modell Kaninchen-Ohr tumor -Modell (VX2) Maus-intraperitoneal-Modell (Toxizität) Hund-Leber-Modell	In vitro > drei Monate In vivo kein vollständiger Abbau	Nicht berücksichtigt	Allenfalls leichte inflammatorische Reaktion nach einer Woche in vivo Kein Gefäßwandschaden nach zwölf Wochen in vivo Keine Zytotoxizität in vitro Keine DNA-Schädlichkeit Keine systemische	[Gd(HPDO3A)(H ₂ O)], (T ₁ MRT KM) und Holmium Ionen (T ₂ * MRT KM) SPIO Bariumsulfat (BaSO ₄)	Mitomycin-C Doxorubicin Thrombin Dual drug: 5-Fluorouracil und Doxorubicin-hydrochlorid

Material	Forschungsgruppe, Jahr	Studienmodell	Degradationsintervall	Abbaumechanismus	Biokompatibilität	Sichtbarkeit	Potenzielle Medikamenten-beladung
					Toxizität im Mausmodell innerhalb von 28 Tagen		
Polymilchsäure	Flandroy et al., 1990 Fujiwara et al., 2000 Wang et al., 2015	In vitro Kaninchen-Nieren-Modell Klinisch	Drei bis vier Wochen in vitro & in vivo	Nicht berücksichtigt	Gefäßwandschaden mit inflammatorischen Zellen und Intimahyperplasie	Teils Röntgendicht	Epirubicin Cisplatin Sorafenib
Hydroxy-ethyl-acrylat	Schwarz et al., 2004	Hund-Nieren-Modell Kaninchen-Ohr-Modell	Drei Wochen in vitro < zwei Wochen in vivo	Hydrolyse	Moderate inflammatorische Begleitreaktion, leichte Intimahyperplasie	Nicht berücksichtigt	Nicht berücksichtigt
Poly (ε-caprolacton)	Salis et al., 2017	In vitro Ex vivo: Isolierte Ratte-Leber-Modell	> 24 Monate	Hydrolyse	Nicht berücksichtigt	Nicht berücksichtigt	Ibuprofen
Oxalat – modifiziertes Oligopolycaprolacton	Chang et al., 2018	In vitro Ratte-subkutan-Modell	Sieben bis 28 Tage	Phagozytose Enzymatisch	Moderate inflammatorische Reaktion in vivo mit Lymphozyten und Makrophagen	Nicht berücksichtigt	Paclitaxel
Nicht weiter spezifizierte Materialmischung aus Lipiodol, Cetyl-alkohol, Glycol-monostearat, Stearinsäure, Polycaprolacton, Cholesterol	Liu et al., 2015	In vitro Schwein-Leber/Milz-Modell	> 28 Tage	Nicht berücksichtigt	Leukozyteninfiltration	Röntgendicht	Nicht berücksichtigt
Polyhydroxy-butyrat	Kassab et al., 1997 & 1999	In vitro Hund-Nieren-Modell	> sieben Tage	Nicht berücksichtigt	Keine inflammatorische Reaktion	Nicht berücksichtigt	Rifampycin
Abbaubare Polyvinylalkohol-Mikrosphären	Wang et al., 2014 Liang et al., 2017	In vitro Kaninchen-Lebertumor-Modell (VX2)	Eine Woche	Nicht berücksichtigt	Keine Zytotoxizität in vitro	SPIO	Doxorubicin
Wasserlösliche Polyvinylalkohol-Mikrosphären	Shomura et al., 2011	Schweine-Nieren-Modell	Wenige Stunden bis > 21 Tage	Nicht berücksichtigt	Kein Gefäßwandschaden, keine Riesenzellreaktion	Nicht berücksichtigt	Nicht berücksichtigt

Material	Forschungsgruppe, Jahr	Studienmodell	Degradationsintervall	Abbaumechanismus	Biokompatibilität	Sichtbarkeit	Potenzielle Medikamenten-beladung
Polyester-carbonat co-polymer	Stein et al., 2014	Schweine-Nieren-Modell	> 60 Tage	Nicht berücksichtigt	Nicht explizit berücksichtigt	Röntgendicht	Nicht berücksichtigt
Gelatine-Mikrosphären / Partikel	Ohta et al., 2007-2012 Nitta et al., 2009 & 2013 Ye et al., 2019	In vitro Kaninchen-Nieren-Modell Kaninchen-Lebertumor-Modell (VX2) Hunde-Leber-Modell Klinisch	Ye et al.: < 14 Tage Ohta et al. & Nitta et al.: 14 bis > 28 Tage, abhängig vom Grad der Quervernetzung	Enzymatisch	Leukozyten-infiltration der Gefäßwand, Intimarruptur mit Membrana elastica interna	Nicht berücksichtigt	Cisplatin
Gelatine-Mikrosphären	Hacking et al., 2020	Klinisch	Vier bis > zwölf Wochen	Nicht berücksichtigt	Nicht berücksichtigt	Nicht berücksichtigt	Nicht berücksichtigt
Neue Mikrosphären aus hydrolysiertes Kartoffelstärke	Sommer et al., 2017	Schweine-Nieren-Modell	Eine Woche	Amylase	Moderate Gefäßwandnekrose, leichte inflammatorische Reaktion, leichte Fremdkörperreaktion	Nicht berücksichtigt	Nicht berücksichtigt

Tabelle 3: Überblick über aktuell beforschte temporäre Embolisatmaterialien

Die Arbeitsgruppe um Laurent, Louguet, Bédouet Maeda, Verret, Moine et al. (2013-2016) hat in mehreren aufwändigen Testreihen *in vitro* und *in vivo* Mikrosphären aus Poly(ethylen-Glycol) Methacrylat (PEGMA) hergestellt. Dies kombiniert das Monomer PEGMA mit hydrolysierbaren Quervernetzungen aus PLGA-Polyethylen Glycol (PEG)-PLGA. Zusätzlich wurde ein Co-monomer, Methacrylsäure hinzugefügt, um eine ionische Beladbarkeit mit Medikamenten zu ermöglichen (53, 61, 62, 81, 96). Die verfügbaren Größen der Mikrosphären rangierten zwischen 300 und 500 μm . Getestet wurden die Mikrosphären in zwei präklinischen tierexperimentellen Studien mit Schafen bzw. Schweinen sowie *in vitro*. Als Kontrollmaterial wurden Trisacrylgelatine Mikrosphären (TGMS) Embosphere[®] bzw. per Hand zubereitete Gelatinschwamm-partikel (GSP) verwendet. Die Studiendauer der *in vivo* Versuche betrug sieben Tage. Die Mikrosphären zeigten keine Anzeichen von Katheterverstopfung unter Benutzung von 4French (F) bzw. 5F Kobra- oder kobraartig konfigurierten Kathetern und 2,7F Mikrokathetern. Die Resorption der Partikel soll laut *in vitro* Versuchen in Phosphat-gepufferter Salzlösung 24 Stunden betragen. *In vivo* ließen sich nach sieben Tagen keinerlei Materialien oder Fragmente nachweisen. Die initiale Degradation soll hydrolytisch verlaufen. Eine renale Ausscheidung der entstandenen Moleküle war maßgeblich für das Materialdesign. Die embolisierten Gefäße zeigten in der Angiographie nach sieben Tagen allesamt mindestens eine partielle, in der Schaf-Studie sogar eine vollständige Rekanalisation. Kleinere Partikel führten zu distalen Okklusionen, einem höheren Ausmaß an Nekrosen und einer verringerten Rekanalisationsrate. Veränderungen in der Gefäßwand oder Entzündungsreaktionen konnten *in vivo* nicht festgestellt werden und auch *in vitro* zeigten sich die Abbauprodukte der Mikrosphären nicht zytotoxisch.

Darüber hinaus können die Mikrosphären potenziell mit einer großen Auswahl an zytostatischen, angiogenetischen oder analgetischen Substanzen beladen werden, z.B. NSAIDs, eine außergewöhnliche Eigenschaft, welche sie von den meisten anderen in der Forschung befindlichen oder kommerziell erhältlichen Embolisatmaterialien abhebt.

Die Arbeitsgruppe um Weng et al. (2011-2018) hat degradierbare Mikrosphären aus Carboxymethyl-Cellulose/Chitosan entwickelt. Diese porösen Mikrosphären wurden in mehreren *in vitro* und *in vivo* Versuchen ausgiebig getestet (101-106). Das Material ist ein natürliches Polymer, was aus dem Exoskelett von Krustentieren gewonnen wird. Die Mikrosphären sind in einer Größe von 100 bis 1550 μm verfügbar und bieten eine potenzielle Medikamentenbeladbarkeit, z.B. mit Tetracyclin oder Doxorubicin. Bei der praktischen Handhabung zeigten sich keine Einschränkungen in Bezug auf 2,8F Mikrokatheter. Die *in vivo* Deformierung der Partikel wurde als zufriedenstellend bezeichnet und war vergleichbar mit der Kontrollgruppe TGMS. Zusätzlich wurden Schäden an den Gefäßwänden beobachtet. Der Zeitpunkt der Mikrosphärendegradation

variiert je nach Grad der Oxidation und kann zwischen einigen Tagen und mehreren Monaten betragen. In vivo zeigten sich 95 % der Mikrosphären im Zeitraum von unter zehn Tagen abgebaut. Der enzymatische, hydrolytische aber auch phagozytische Abbau ging mit einer progressiven Fibrose in den ersten vier Wochen nach Injektion einher. In Langzeituntersuchungen über sechs und zwölf Monate zeigten sich keine systemischen, unerwünschten Ereignisse im Hinblick auf die Biokompatibilität und die lokale Gewebereaktion in den embolisierten Nieren wurde im Tiermodell als minimal bis moderat mit einem stabilen Heilungsprozess beschrieben.

Die Ergebnisse der voran genannten beiden Arbeitsgruppen zeigt einerseits die Beforschung verschiedener Stoffe, andererseits konnte das ideale temporäre Embolisatmaterial noch nicht gefunden werden. Die Nachteile der bisher auf dem Markt verfügbaren Materialien werden im folgenden Kapitel diskutiert.

2.6 Nachteile aktuell verfügbarer temporärer Embolisatmaterialien

Das älteste und klinisch häufig angewendete temporäre Embolisatmaterial besteht aus Gelatineschwamm (Gelfoam[®], Pfizer Inc., New York, New York, U.S.A.). Bereits kurz nach dem zweiten Weltkrieg zunächst chirurgisch als hämostatisches Material getestet (111), wurde es im Jahr 1962 zum ersten Mal intravaskulär zur Behandlung einer traumatischen Carotis-Sinus-cavernosus-Fistel verwendet (112). Der Wirkmechanismus beruht auf mechanischer Obstruktion. Zusätzlich wirkt die injizierte Substanz als Gerüst für Thrombusformationen und unterstützt die Bildung von Blutgerinnseln.

Gelfoam[®] wird aus gereinigter Hautgelatine gewonnen und ist als Puder oder als Schwamm erhältlich (113). Vorteilhaft ist, dass der Puder in sehr kleinen Größen (40-60 µm) erhältlich ist. Nachteilhaft ist, dass die kleinen Partikel zu ungewollten Ischämien durch zu weit distale Migrationen führen, was bspw. in Gallengangsnekrosen (114) resultiert. Der Gelatineschwamm muss zunächst von Hand in kleinere Teile geschnitten werden. Teilweise wird, um die erhaltenen Fragmente noch einmal zu zerkleinern, eine Suspension mit Natriumchloridlösung angelegt und über einen Dreiwegehahn mit zwei Spritzen zu einem Brei miteinander vermischt. Zusätzlich muss das Gemisch aufgrund der fehlenden Röntgendichte mit Kontrastmittel angereichert werden. Die Vorbereitung ist zeitintensiv und das hergestellte Gemisch besteht im Ergebnis nur aus groben, unkalibrierten, nicht-sphärischen und ungleichmäßig geformten Fragmenten. Das gewonnene Material ist für einen vorab exakt definierten Verschluss des Zielgefäßes unzureichend (115, 116). Ein weiterer Nachteil ist, dass der genaue Zeitpunkt der Degradation trotz mannigfaltiger

Untersuchungen unklar bleibt. Dieser variiert zwischen einer Woche und mehreren Monaten bis hin zu dauerhaften Gefäßverschlüssen (117-121). Ein weiterer Mangel des Materials kann für die Patienten eine besondere Rolle spielen: Die Applikation des Materials wird begleitet von einer chronischen Entzündungsreaktion, welche mit Zerstörungen der Gefäßwand und konsekutiv fibrotischem Umbau einhergeht (86, 122, 123). Dies hat möglicherweise starke Auswirkungen auf den Grad der Rekanalisation, deren Eintreten und Umfang somit unklar bleibt. Studien zeigen eine sehr hohe Rate an permanenten Stenosen oder Verschlüssen nach ein- oder mehrmaliger Embolisation mit Gelatineschwammteilchen (124). Nicht zuletzt wurden u.a. Infektionen in Zusammenhang mit der Verwendung von Gelfoam[®] berichtet, welche auf Luftbeimischungen zurückgeführt werden, welche wiederum aerobe Organismen unterstützen (125, 126).

Als Modifikation von Gelfoam[®] wurde seit 2006 ein weiteres Produkt (Gelpart, Nippon Kayaku, Tokyo, Japan) entwickelt, welches in zwei verschiedenen Größen (1 und 2 mm) erhältlich ist (127). Diese Teilchen tragen jedoch dem Problem der unregelmäßigen Form und zu hohen Größenvariabilität nach Katheterpassage nicht ausreichend Rechnung (128).

Neben den auf Gelatine basierenden Substanzen existiert Embolisationsmaterial auf Grundlage abbaubarer Stärkepartikel (degradable starch microspheres / DSM) (Embocept[®] S, PharmaCept, Berlin, Deutschland). Hierbei handelt es sich um Mikrosphären aus dreidimensional quervernetzter und hydrophiler Stärke-Matrix, welche in Wasser stark anschwellen und eine sehr kurze Halbwertszeit (ca. 40 Minuten) aufweisen (129). Es konnte im Schweinemodell gezeigt werden, dass selbst nach kompletter Stase keine Ischämiezeichen und kein Schaden am gesunden Lebergewebe entstanden war (130). Der gefäßokkludierende Effekt ist daher nur sehr kurz und somit nicht ausreichend für eine Tumornekrose (131). Diese Eigenschaften machen die Mikrosphären zu geeigneten Substanzen zum Schutz von unbeteiligten Leberregionen bei TACE- oder SIRT-Eingriffen (132). Die Stärkemikrosphären werden klinisch vielfach zur Tumorembolisation in der Leber in einer Mischung mit verschiedenen Zytostatika verwendet (133), um die Kontaktzeit der Zytostatika in der Embolisationsregion zu verlängern. Die mit 50 µm relativ kleinen Stärkepartikel werden über α -Amylase abgebaut.

Weiterhin existiert ein synthetisches Polymer aus kollagenbeschichteter Polymilch-co-glykolsäure, engl. polylactic-co-glycolic-acid (PLGA) (EKOBI 500TM, IMBIOTECHNOLIGIES LTD., Edmonton, Kanada). Dieses Material ist nur in den USA sowie Kanada und dort nur für die Embolisation von benigner Prostatahyperplasie (BPH) und hypervaskularisierten Tumoren zugelassen. Das Material ist auf natürliche Weise durch Hydrolyse bei neutralem pH-Wert abbaubar. Die Resorptionszeit hängt von verschiedenen Faktoren wie seiner chemischen Zusammensetzung und Größe ab (54); dieser Prozess kann von drei bis zu sechs Monaten dauern.

Ein entscheidender Nachteil ist das jüngst zugelassene Material mit seinen prominenten Vorgängern: Eine Induktion einer chronischen Entzündungsreaktion mit Gefäßwandfibrose, die zu einem permanenten Verschluss des Gefäßes nach sechs Monaten führt (134). Darüber hinaus sind die Partikel nicht komprimierbar. Dieser Nachteil kann durch ihre kleine Größenkalibrierung (150-212 μm) teilweise ausgeglichen werden, um eine Injektion über gängige Mikrokatheter zu gewährleisten.

Trotz der hohen Anzahl und Vielfalt der klinisch verfügbaren und experimentell erforschten Substanzen bietet der Markt kein Produkt, welches alle angesprochenen Erfordernisse eines idealen Embolisatmaterials erfüllt.

2.7 Arbeitshypothese und Ziel der Studie

Die zugrunde liegende Arbeitshypothese lautete: Das synthetische Polymer Polydioxanon kann in der Form von SPIO-beladenen Mikrosphären als neuartiges, kalibriertes und temporäres Embolisatmaterial bei transarterieller Embolisation einen sicheren und effektiven Gefäßverschluss hervorrufen. Gleichzeitig soll im Hinblick auf die bekannten Reaktionen im Gewebe ein entsprechender Abbau auch im Gefäß in einem bestimmaren Zeitraum möglich sein. Weiterhin soll die Beladung der Mikrosphären mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (SPIO) eine in vivo Nachweisbarkeit im MRT ermöglichen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein neues, bioresorbierbares, größenkalibriertes Embolisatmaterial aus dem synthetischen Polymer Polydioxanon im Kaninchen-Nieren-Modell zu untersuchen. Entsprechend den hohen Anforderungen, welche das Material erfüllen muss, wurden im Einzelnen folgende Zielparameter definiert:

1. Grundsätzliche Durchführbarkeit und Sicherheit der Embolisation mit den neuartigen Mikrosphären als Grundlage für eine potenzielle spätere klinische Anwendbarkeit.
2. Effektive, zielgenaue Embolisation, welche zu einer Ischämie/Infarktnachweis im arteriellen Stromgebiet führt.
3. Nachweis eventueller Reperfusion nach Bioresorbierbarkeit der neuen Partikel.
4. In vivo Nachweisbarkeit durch Sichtbarkeit in der MRT zum Zwecke eines effektiven Therapiemonitoring.
5. Bestimmung des Resorptionszeitpunktes der temporären Mikrosphären zum Zwecke der exakten Indikationsstellung und Anwendbarkeit.
6. Nachweis einer adäquaten Biokompatibilität zur sicheren und langfristigen Anwendung im Menschen ohne sekundäre unerwünschte Folgeerscheinungen.

3. Material und Methodik

3.1 Studiendesign

In dieser tierexperimentellen Dissertation wurde bei neun weißen Neuseelandkaninchen eine unilaterale, superselektive Segmentembolisation der Niere unter fluoroskopischer Kontrolle durchgeführt. Die kontralaterale Seite blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. Eine digitale Subtraktionsangiographie (DSA) und eine anschließende MRT-Untersuchung wurden zur Kontrolle und Dokumentation der Embolisation durchgeführt.

Ein Versuchstier wurde unmittelbar nach der Embolisation und anschließenden MRT-Untersuchung euthanasiert (Akutversuch), um mittels makro- und mikroskopischer Untersuchungen unmittelbare Einblicke in die Originalstruktur, Morphologie, Verteilung und Auswirkungen der neuartigen Mikrosphären im Gefäßsystem und Nierenparenchym zu erlangen. Die verbliebenen acht Tiere wurden randomisiert einem von fünf Zeitpunkten zugeteilt, welche sich nach Beobachtungszeitraum und Euthanasiezeitpunkt unterscheiden (eine, vier, acht, zwölf und 16 Wochen). Nach dem gewählten Beobachtungszeitraum wurde erneut eine Kontrollangiographie und ein Kontroll-MRT durchgeführt, um die mittel- und langfristigen Auswirkungen der Embolisation festzuhalten. Anschließend wurden alle Tiere in tiefer Narkose euthanasiert und die Nieren nach chirurgischer Entnahme der makro- und mikroskopischen Untersuchung und Auswertung zugeführt. Das Studiendesign kann dem folgenden Schaubild entnommen werden (Abbildung 3).

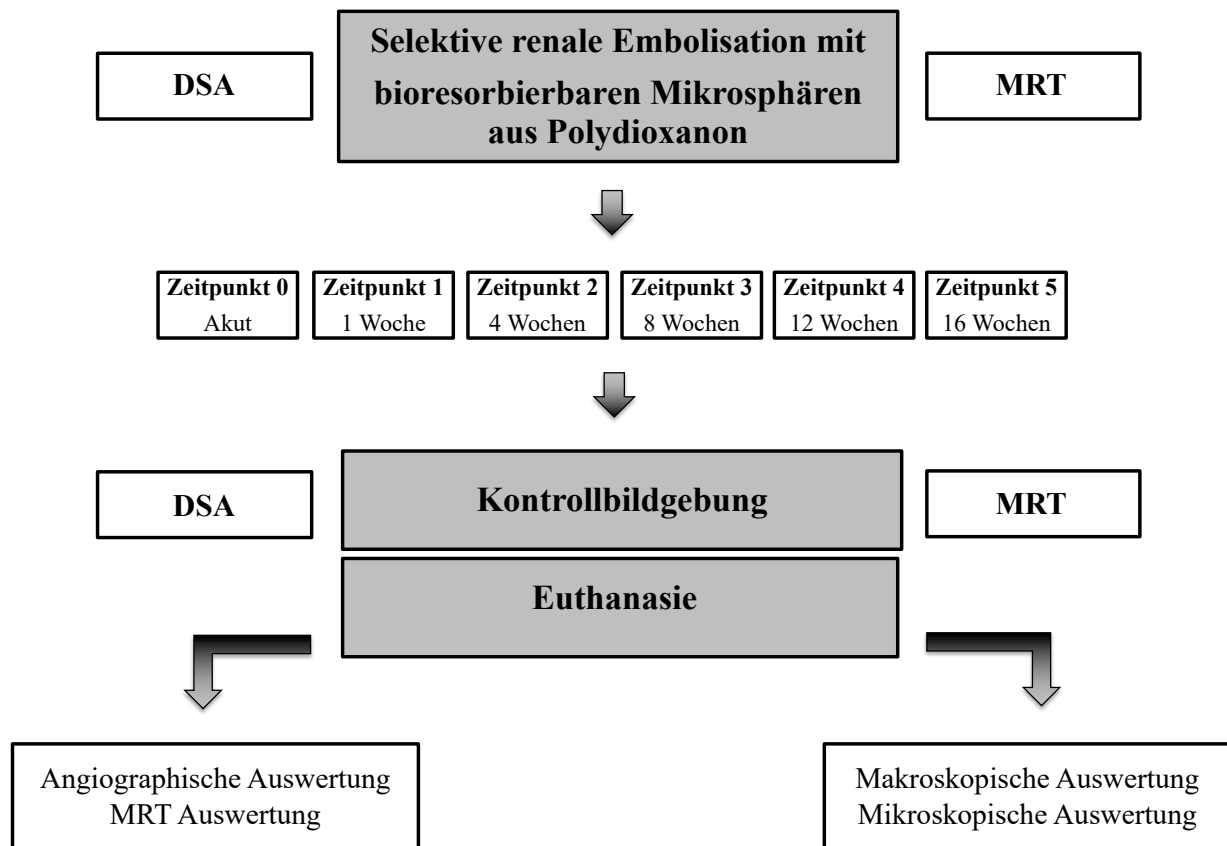


Abbildung 3: Überblick des Studiendesigns

Nach der Embolisation unter fluoroskopischer Führung erfolgte eine Kontrolle mittels DSA und MRT. Nach dem Zufallsprinzip erfolgte die Zuordnung zu einem Beobachtungsintervall entsprechend der jeweils festgelegten verschiedenen Zeiträume. Nach Ablauf des Beobachtungsintervalls erfolgte zunächst eine Kontrollbildgebung mittels DSA und MRT und schließlich die Auswertung der erhobenen Bildgebung mittels Makro- und Mikroskopie. *Die Abbildung findet sich angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.*

3.2 Material

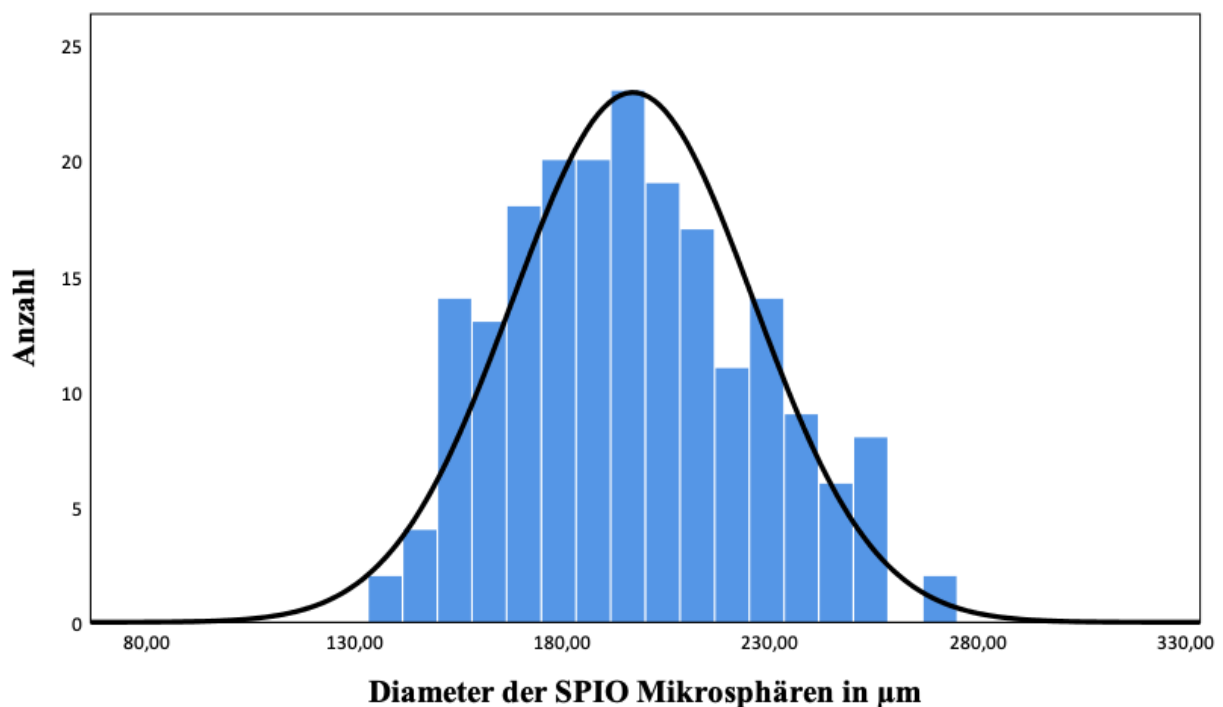
3.2.1 Embolisatmaterial

Es wurden speziell kalibrierte, sphärisch geformte Mikropartikel aus Polydioxanon hergestellt und mit Oleat-beschichtetem superparamagnetischem Eisenoxid (SPIO) markiert (Abbildung 5) (Fa. Microparticles, Adlershof / Berlin). Das Polydioxanon wurde von der Firma SMI Suture Materials (St. Vith, Belgien) als Fadenmaterial bezogen. Polydioxanon in der Menge von 0,7 g sowie SPIO Nanopartikel wurden in 15 ml heißem Dichlormethan gelöst und unter Rührung in 200 ml einer 0,5-prozentigen wässrigen Lösung von Polyvinylalkohol gegeben. Die gewünschte Tropfengröße wurde in Abhängigkeit von der Rührgeschwindigkeit erhalten. Danach wurde der Ansatz im offenen Becherglas bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, um die Abdampfung des

Dichlormethans zu ermöglichen. Anschließend wurden die Partikel entsprechend der gewünschten Größe nass gesiebt (10 % Toleranz) und bei 50°C im Trockenschrank getrocknet.

Es wurden Mikrosphären in zwei verschiedenen Größen produziert: 200-500 µm sowie 90-300 µm. Die Größe der kleineren, in den Mikrosphären fixierten SPIO-Elemente bewegte sich zwischen 0,01 und 0,03 µm. Nach dem Siebvorgang wurden die Partikel in eine Phiole mit Bohrung und Filter eingeführt und mit Ethylenoxid sterilisiert, ein anerkanntes Sterilisationsverfahren, mit dem bspw. auch Angioplastiekatheter sterilisiert werden (135).

Die Morphologie, Beschaffenheit und Größenverteilung der Mikrosphären wurde vor Anwendung im Tiermodell mit einem optischen Mikroskop (Axio Observer.Z1 Mikroskop, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) untersucht. Die Größenverteilung ist anhand von 200 Mikrosphären beispielhaft in Abbildung 4 aufgeführt und entsprach einer Normalverteilung – somit konnte von größenkalibrierten Mikrosphären ausgegangen werden.



**Abbildung 4: Größenverteilung von n = 200 Mikrosphären vor in vivo Gebrauch – nach Herstellerangaben
Diameter 90-300 µm**

Auf der Abszisse sind die Größen der Mikrosphären aufgetragen, auf der Ordinate die Anzahl im entsprechenden Größenintervall. Es zeigt sich eine relative Normalverteilung entlang der Gauß'schen Glockenkurve.

Die Abbildung findet sich angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

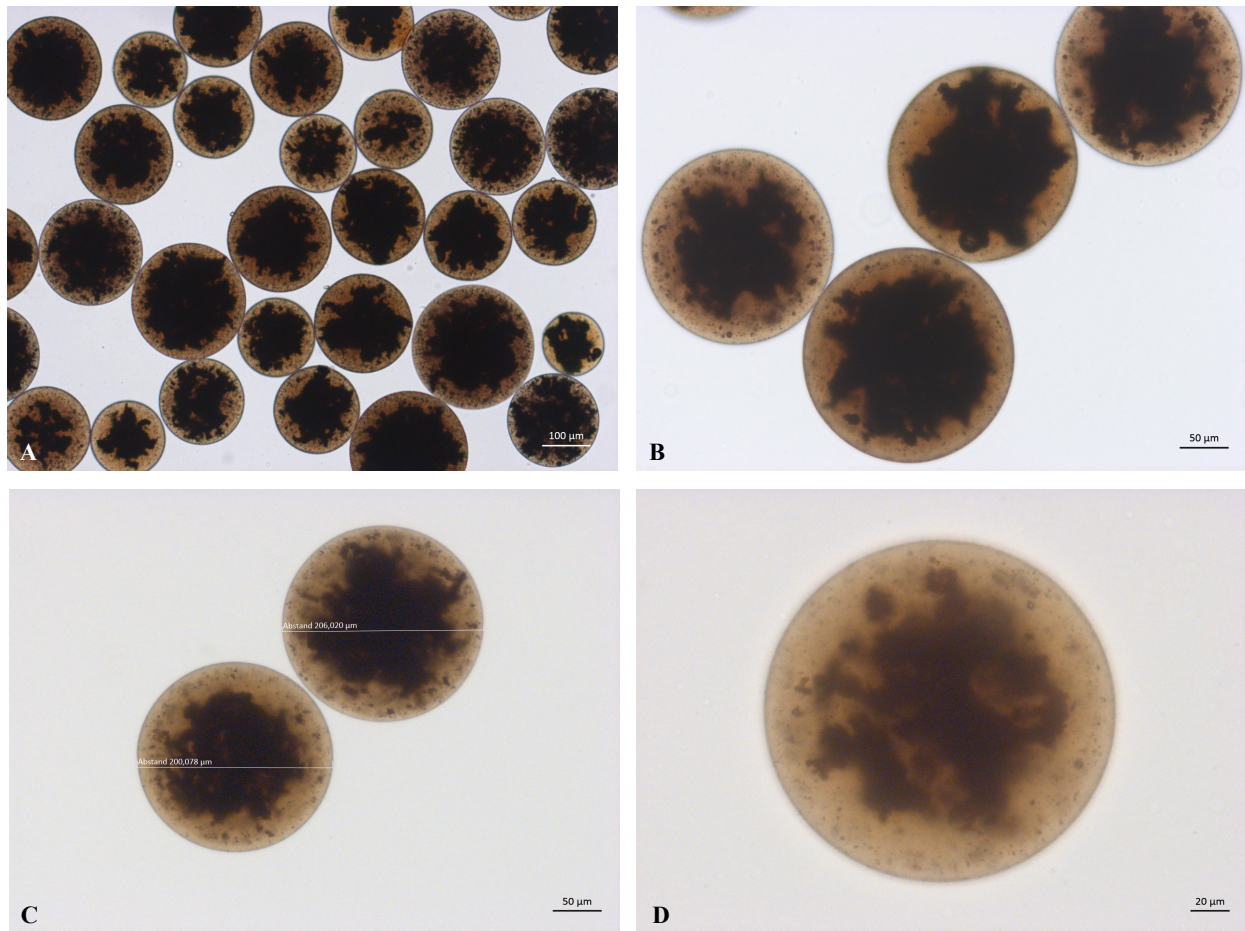


Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahmen der Mikrosphären vor in vivo Gebrauch

A. Übersichtsaufnahme.

B. Nahaufnahme.

C. Beispiel einer Ausmessung.

D. Ultranaufnahme. Die Mikrosphären zeigen sich vor der Intervention intakt mit sphärischer Form und glatter Oberfläche, homogener Binnenstruktur ohne Zerklüftungen oder Vakuolen.

Die Abbildung findet sich angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

3.2.2 Versuchstiere & Haltung

Die vorliegende Studie wurde an insgesamt neun weißen Neuseelandkaninchen durchgeführt. Herkunft der Tiere: Charles River Laboratories International Inc., Frankreich und Harlan Laboratories UK Ltd., Loughborough, Großbritannien. Die Tiere wurden als „spezifisch pathogenfrei“ (SPF) und „viral antikörperfrei“ (VAF) bezogen. Es wurden ausschließlich weibliche Kaninchen verwendet, um etwaige geschlechtsspezifische Wirkunterschiede auf die Versuchstiere auszuschließen. Die Tiere waren zum Ausgangszeitpunkt zwischen zwölf und 16 Wochen alt und wogen zwischen 3,15 und 4,80 kg (Mittelwert $3,96 \pm 0,56$ kg). Die Haltung der

Tiere erfolgte im Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum, Charité Campus Mitte, Charitéplatz 1, 10117 Berlin.

Die Tiere wurden zu standardisierten Laborbedingungen gehalten, die folgende Parameter implizierte: Eingewöhnungszeit für mindestens sieben Tage; Käfighaltung entsprechend GV-SOLAS Empfehlung; Haltung in Zweiergruppen. Konstanter 12-Stunden Tag/Nacht Lichtzyklus, Temperatur von $22 \pm 1^\circ\text{C}$; $50 \pm 5\%$ relative Luftfeuchtigkeit auf Basis der Empfehlung 2010/63/EU der europäischen Kommission; Futter pelletiert ad libitum unter Zufütterung von Heu; täglich gewechseltes Trinkwasser (Stadtwater in Flaschen). Eine angemessene Vorbereitung der Tiere auf den Versuch war durch die regelmäßige Gewöhnung und den direkten Umgang mit dem medizinischen Personal gewährleistet.

Die behördliche Genehmigung für die Tierversuche wurde am 18.08.2014 durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin erteilt. Die Anzeigennummer lautet G 0112/14. Aufzeichnungen über Versuchsvorhaben, in denen Wirbeltiere, Kopffüßer oder Zehnfüßkrebse verwendet werden (§ 9 Abs. 5 TierSchG und § 29 Abs. 1 TierSchVersV) wurden regelrecht und tagesaktuell geführt.

3.3 Methoden: Eingriffe und Prozeduren

3.3.1 Anästhesie & Interventionsvorbereitung

Zunächst erfolgte eine initiale subkutane Injektion von 35 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin (Ketamin 10 %, WDT, Garbsen, Deutschland) und 0,25 mg/kg KG Medetomidin (Domitor[®], Orion Pharma, Espoo, Finnland) in einer Mischspritze. Nach kurzer Wartezeit und Überprüfung der erfolgreichen Sedierung wurde das Tier mit Augensalbe zum Schutze der Cornea und Konjunktiven vor Reizung versorgt (Bepanthen[®], Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und nach Hautdesinfektion (Braunoderm[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit einer venösen Verweilkanüle (Vasofix[®] Braunüle[®] 0,90 x 25 mm G 22 blau, FEP, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in der *V. auricularis caudalis* versehen. Ein Drei-Wege-Hahn wurde angeschlossen und beides fixiert. Für eine adäquate perioperative Analgesie wurde intravenös 50 mg/kg KG Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm[®], Injektionslösung, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), verdünnt mit Wasser zu Injektionszwecken (Aqua ad iniectabilia, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) langsam (0,05 ml pro 15 Sekunden) sowie 0,5 mg/kg KG Butorphanol (Dolorex[®], Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc., Kenilworth, New Jersey, USA) subkutan verabreicht. Anschließend wurde die Zugangs-

region (Embolisation: rechte Leistenregion, Kontrollangiographie: linke Leistenregion) vorsichtig großflächig rasiert.

Zur Aufrechterhaltung der Narkose erhielten die Tiere eine fortlaufende Infusion über Perfusoren (IVAC® P 4000 Anästhesie-Spritzenpumpe, Cardinal Health, Baesweiler, Deutschland und Asena® Spritzenpumpe, ALARIS® Medical Systems Deutschland GmbH, Homberg (Ohm), Deutschland) mit Verlängerungsschlauch mit einer Flussrate 10 ml/h Ketamin/Medetomidin und 10 ml/kg/h Natriumchloridlösung (Isotone Kochsalz-Lösung, 0,9 %, Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

Die Tiere wurden in den Interventionsraum gebracht und in einer Schaumstoffmatte mit Vakuumpumpe mit ausgestreckten Hinterbeinen in Rückenlage auf dem Angiographietisch gelagert. Die Tiere wurden auf einer mehrschichtigen saugfähigen Unterlage gebettet und durch Anlegen des Vakuums in der Schaumstoffmatte in eine stabile, operations- und anästhesiegerechte Lagerung gebracht. Die Tiere atmeten Sauerstoff mit einer Flussrate von drei Liter pro Minute. Dies erfolgte über ein Plastikreservoir welches über die Nase gestülpt und mit Klebeband fixiert wurde. Während des nun folgenden gesamten Eingriffes wurde kontinuierlich ein klinisches Monitoring kardiovaskulärer und respiratorischer Vitalparameter durchgeführt. Es folgte eine ausgiebige und mehrfache Desinfektion des Operationsgebietes mit mehrminütiger Einwirkzeit. Parallel wurde ein steriler Operationstisch vorbereitet (Abbildung 7) und das Operationsgebiet steril abgeklebt. Nach sterilem Anreichen des Operationsbesteckes und Fadenmaterials erfolgte ein Hautschnitt von ca. 2-3 cm von medial nach lateral am Becken-Bein-Übergang. Nach stumpfer Präparation wurden Gefäß- und Nervenstamm freipräpariert und die *A. femoralis communis* auf 1 cm Länge exponiert (Abbildung 6). Ein 3/0 Vicrylfaden (Coated VICRYL® Suture, Ethicon, Johnson & Johnson, New Brunswick, New Jersey, USA) wurde unter der Arterie hindurchgezogen und ein Knoten vorgelegt.

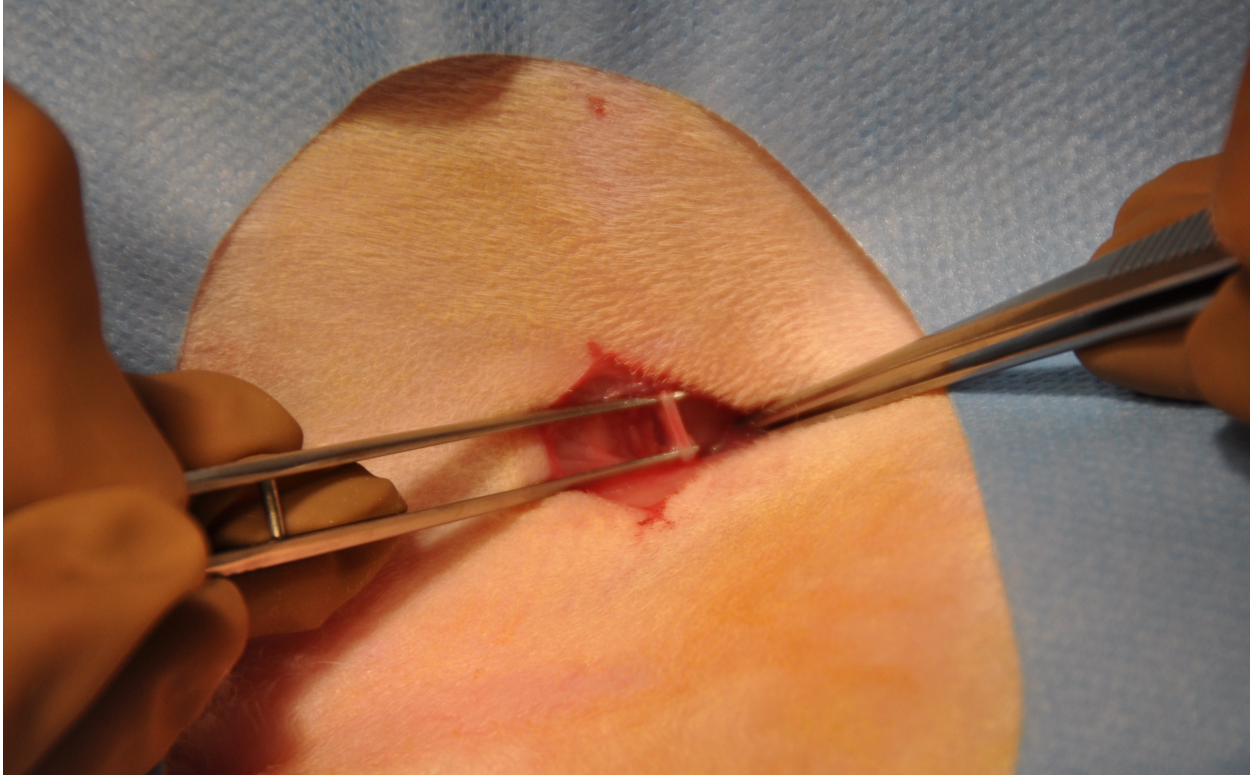


Abbildung 6: Präparierung der *A. femoralis communis* im Kaninchen

Exposition auf 1 cm Länge als Vorbereitung für einen vaskulären Gefäßzugang. Zwischen den Spitzen der anatomischen Pinzette wird die Arterie dargestellt.

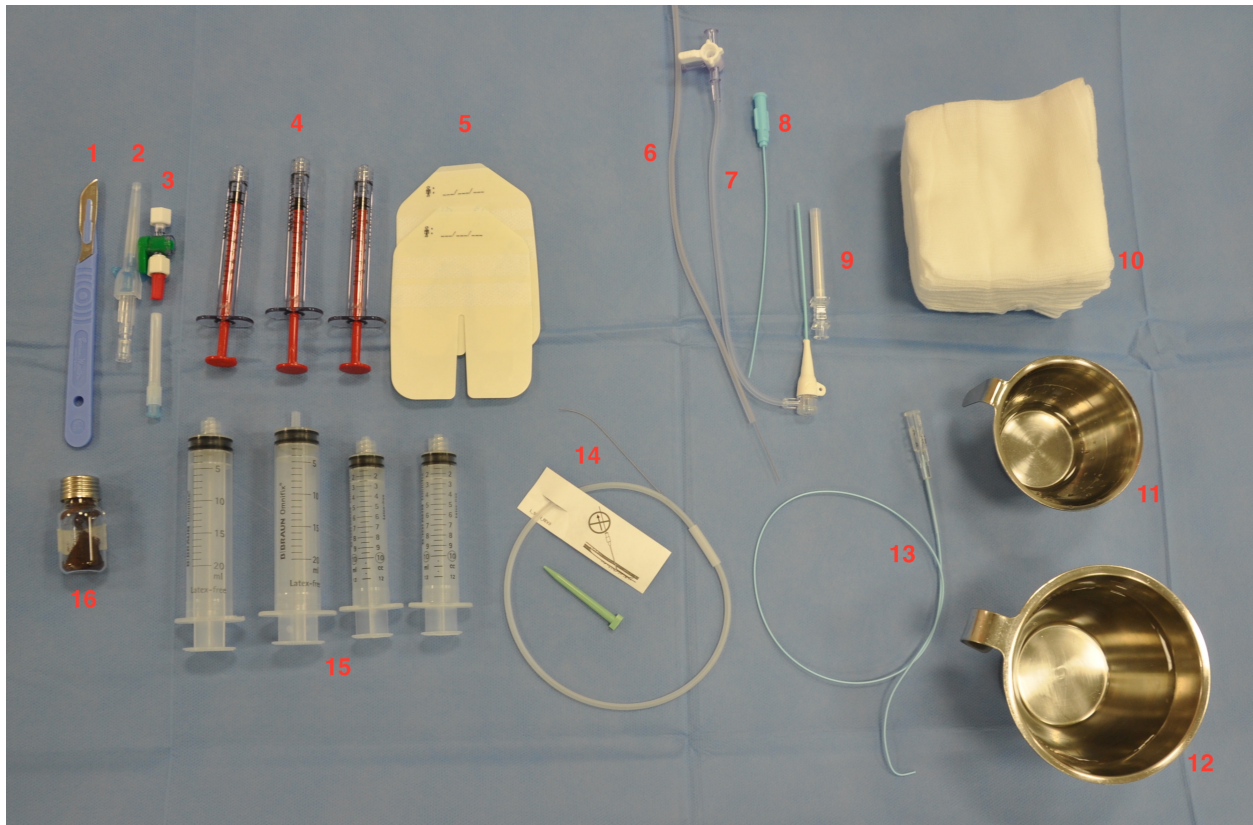


Abbildung 7: Interventionstisch neben dem Angiographietisch unmittelbar vor dem Eingriff

Sämtliche intravasculäre Materialien wurden vor Gebrauch mit isotoner Kochsalzlösung gespült.

1. Skalpell | 2. Intravenöse Kanüle | 3. 2-Wege-Hahn | 4. Medaillon-Spritzen (1 ml) | 5. Befestigungspflaster | 6.-8. Schleuse mit Mandrin und Draht | 9. Punktionskanüle | 10. Kompressen | 11. Kontrastmittel | 12. Kochsalzlösung | 13. 3F Cobra-Katheter | 14. Führungsdraht | 15. Spritzen (10 und 20 ml) | 16. SPIO-Mikrosphären

3.3.2 Embolisation

Mittels einer Punktionsnadel (Percutaneous Entry Thinwall needle, 20 G, 7 cm, Cook Incorporated, Bloomington, Indiana, USA) wurde die freigelegte Arterie punktiert. In Seldinger Technik (1) wurde nun ein 0,45 mm Führungsdraht über die Hohlneedle eingeführt und diese danach entfernt. Über den Führungsdraht wurde eine 3French (F) Schleuse (Haemostatic sheath introducers 3F, Länge 5 cm, Balt, Montmorency, Frankreich) eingewechselt und damit ein sicherer Gefäßzugang etabliert. Unter Durchleuchtung (Philips Allura Xper FD 20, Philips, Amsterdam, Niederlande & Siemens Artis Zee, Siemens Healthineers Global, Erlangen, Deutschland) wurde nun ein 3F Cobra Katheter (innerer Diameter 0,53 mm, 50 cm, Balt, Montmorency, Frankreich) und 0,46 mm Führungsdraht (Cope Mandril Wire Guide 60 cm, Cook Incorporated, Bloomington, Indiana, USA) in der Aorta platziert. Während der Injektion von 2-3 ml eines Röntgenkontrastmittels (Imeron[®] 300, Bracco Imaging Deutschland GmbH, Konstanz,

Deutschland bzw. Accupaque™, GE Healthcare Buchler, Braunschweig, Deutschland) wurde eine Übersichtsaortographie angefertigt (Abbildung 8).

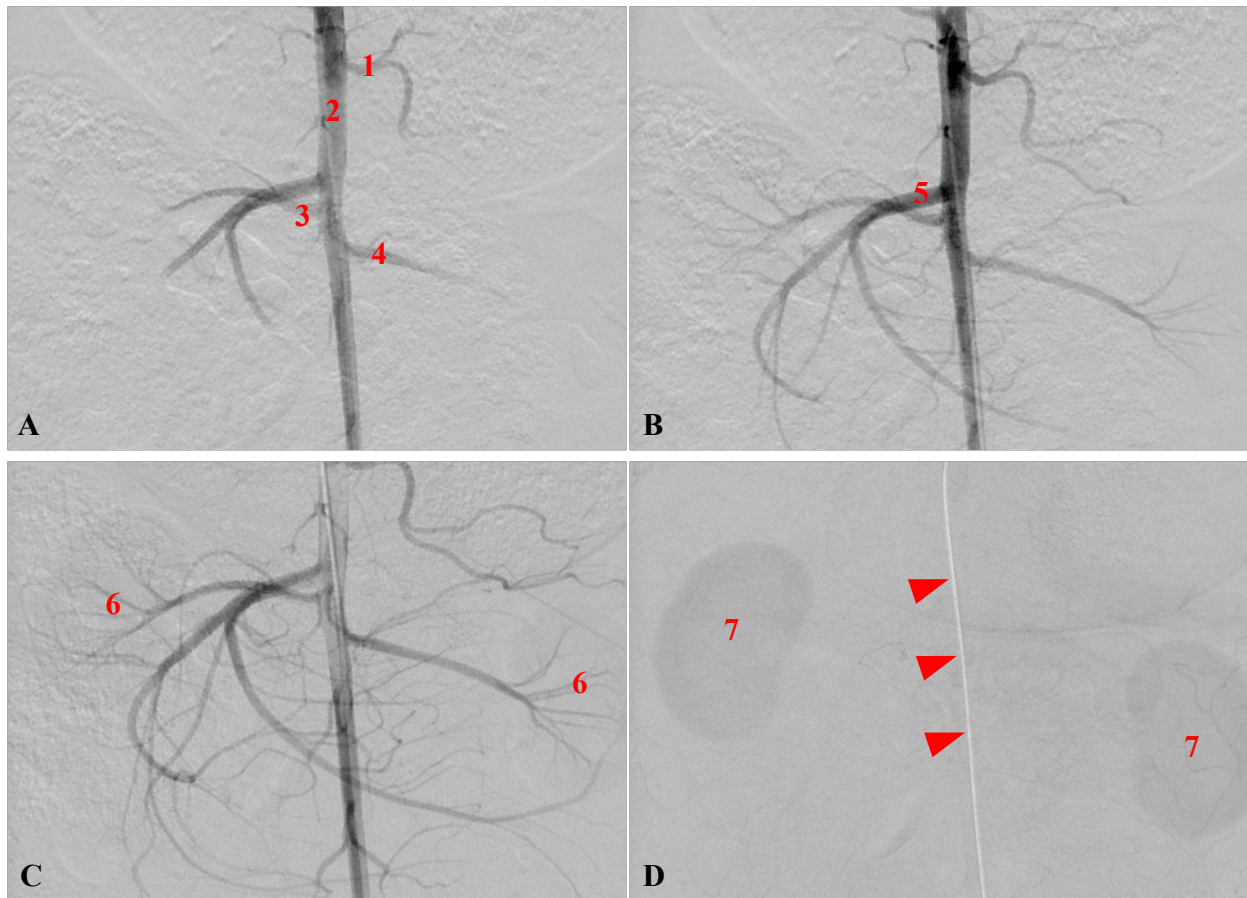


Abbildung 8: Aortographie in DSA Technik zur anatomischen Übersicht im zeitlichen Verlauf

A. Arterielle Phase mit Darstellung der Aorta

B. Beginnende Darstellung der bauchorganversorgenden Gefäße

C. Darstellung der Nierengefäße

D. Parenchymphase

1. *Truncus coeliacus* mit *A. splenica* | 2. *Aorta abdoominalis* | 3. *A. renalis dextra* | 4. *A. renalis sinistra* | 5. *A.*

mesenterica superior | 6. Nierensegment- und interlobararterien | 7. Nierenparenchym | Pfeile: 3F Cobra Katheter

Anschließend wurde eine der beiden Nierenarterien sondiert und in DSA Technik selektiv angiographiert (Abbildung 9). Nach Verschieben des Katheters bis in eine Segmentarterie des kaudalen Nierenpols wurden insgesamt 0,1 ml des Embolisatmaterials in einer 1:1 Mischung aus Kontrastmittel und Natriumchloridlösung (Plastipur® Fresenius Kabi AG, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) auf insgesamt 1 ml in einer Spritze (Medallion® Spritze, Merit Medical Systems, Inc., South Jordan, Utah, USA) aufgezogen. Durch sanftes Schwenken und langsames Schütteln wurden die Elemente der Suspension homogenisiert. Die Suspension wurde nun langsam unter

fluoroskopischer Kontrolle appliziert bis eine Stase festgestellt werden konnte. Eine Stase wurde definiert als Stillstand des Kontrastmittelflusses und eine dauerhafte Parenchymfärbung mit Kontrastmittel. Sobald dies erreicht war, wurde die Embolisation als erfolgreich angesehen und beendet. Abbildung 10 zeigt die Injektion des Embolisat-NaCl-Kontrastmittelgemisches und den Zustand der Stase zu Embolisationsende. Nach jedem abgeschlossenen Embolisationsvorgang wurde der Katheter gespült und notiert, wie leicht der Injektionsvorgang vonstatten ging. Wenige Minuten nach Beendigung der Embolisation wurde ein Abschluss-Angiogramm angefertigt, um den unmittelbaren Embolisationserfolg zu dokumentieren. Nach Entfernung des Kathetermaterials mitsamt Schleuse wurde das Gefäß mithilfe der vorgelegten Fäden ligiert und eine Wundspülung vorgenommen. Nach einer Subkutannaht (Safil® 3/0 Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) erfolgte der Hautverschluss (Supramid 3/0, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und abschließend eine Auftragung der Wundsalbe (Braunovidon® Salbe 10%, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

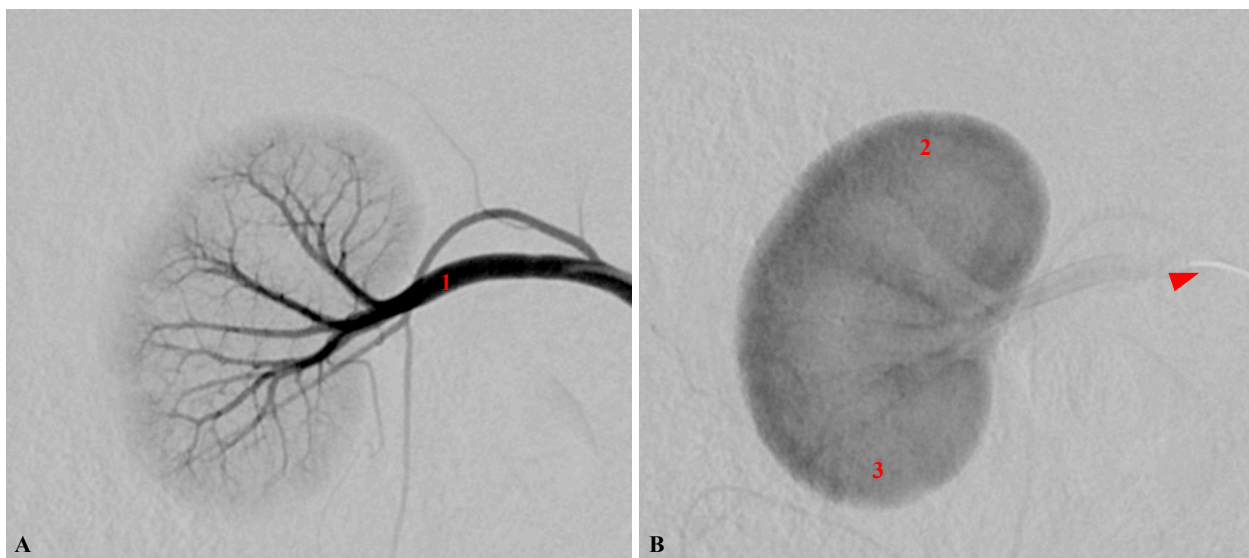


Abbildung 9: Renales Angiogramm in DSA Technik vor Embolisation im zeitlichen Verlauf

A. Arterielle Phase mit Darstellung der Äste der *A. renalis dextra*

B. Parenchymphase

1. *A. renalis dextra* | 2. Kranialer Nierenpol | 3. Kaudaler Nierenpol | Pfeil: Katheterspitze

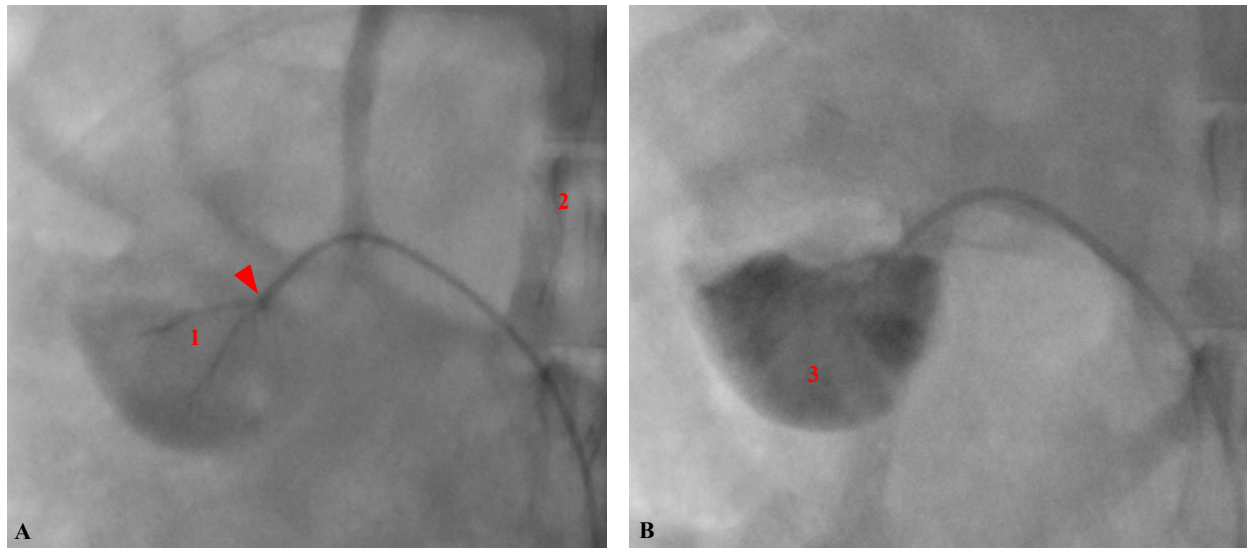


Abbildung 10: Fluoroskopische Aufnahmen des Embolisationsvorganges

A. Beginn der Embolisation mit Injektion des Mikrosphären / Kontrastmittelgemischs

B. Ende der Embolisation mit durchgeführter Auffüllung durch die Mikrosphären und persistierender Kontrastmittelanfärbung im embolisierten kaudalen Nierenpol

1. *Aa. interlobares* | 2. Anschnitt der Wirbelkörper | 3. Kaudaler Nierenpol | Pfeil: Katheterspitze

3.3.3 Postinterventionelle Bildgebung

Die Tiere wurden in den MRT-Vorraum gebracht. Anschließend wurden die Tiere in einen 1,5 Tesla Magnetresonanztomographen (Siemens, Sonata, Erlangen, Deutschland) gelegt. Hierzu wurde eine klinikübliche Extremitätenspule benutzt. Die anästhesiegerechte Lagerung umfasste eine Lagerung mit den Hinterbeinen voran, Bettung auf weichem Schaumstoffmaterial und saugfähigen Unterlagen sowie Abdeckung als Schutz gegen Hypothermie im Rahmen der Narkose. Mithilfe eines Laserstrahls und manueller computerunterstützter Liegensteuerung wurden die Tiere auf den signalreichsten Punkt der Spule positioniert. Nach Überprüfung der durch ein schmales Loch nach außen geleiteten Perfusorkabel wurde die Tür sicher verschlossen und im Steuerraum mit den Messungen begonnen.

3.3.4 Nachsorge

Sofern das Tier einem der Beobachtungszeitpunkte zugeteilt war, erhielt es direkt nach der Intervention und noch vor dem Transport in das MRT eine weitere Analgesie in Form von Carprofen i.v. 5 mg/kg (Rimadyl® Injektionslösung, Zoetis™, New Jersey, USA). Für weiterreichende Analgesie wurde im Abstand von jeweils 24 Stunden an zwei Tagen zusätzlich Rimadyl® subkutan appliziert. Während des Beobachtungszeitraumes wurden die Tiere tierärztlich

genau auf etwaige Komplikationen observiert. Die Hautnaht wurde täglich kontrolliert. Dabei wurde insbesondere auf Intaktheit der Naht sowie etwaige Schwellungen und Rötungen im Wundbereich geachtet, um z.B. einen verfrühten Fadenzug adäquat beurteilen und ggf. behandeln zu können. Zudem wurde auf Verhaltensänderungen der Tiere geachtet, um mögliche stärkere Schmerzreaktionen oder anderweitige Komplikationen frühzeitig erkennen zu können.

3.3.5 Kontrollbildgebung & Euthanasie

Nach Ablauf der Beobachtungsintervalle (eine, vier, acht, zwölf oder 16 Wochen) wurde erneut eine Angiographie der zuvor embolisierten Niere durchgeführt. Diesmal wurde ein arterieller Gefäßzugang auf der kontralateralen linken Seite verwendet. Das Prozedere der Vorbereitungen, Anästhesie und Angiographie glich ansonsten dem oben beschriebenen Ablauf. Nach der Kontrollangiographie erfolgte ebenso eine Kontroll-MRT-Untersuchung, analog zum Ersteingriff in Bezug auf Protokoll und Durchführung. Nach Beendigung aller Kontrollbildgebungen wurden die Tiere mittels intravenöser Injektion von Pentobarbital-Natrium euthanasiert (Narcoren[®], 160 mg/ml, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland). Die Bestätigung der effektiven letalen Injektion erfolgte durch eine Tierärztin sowie eine Begleitperson.

3.3.6 Makroskopische Aufarbeitungen

Nach der Euthanasie wurden die Tiere auf dem Rücken gelagert und das Abdomen durch einen Medianschnitt entlang der Linea alba vom Xiphoid bis zum unteren Mittelbauch eröffnet. Zur besseren Exposition des Situs wurden zwei Entlastungsschnitte entlang des Rippenbogens gesetzt. Abbildung 11 zeigt die Vorgehensweise der Abdomeneröffnung. Es erfolgte eine Inspektion des gesamten Abdomens für eventuelle Auffälligkeiten und Organschäden. Anschließend wurden beide Nieren aus dem umliegenden Gewebe freipräpariert und entnommen, um einen direkten Vergleich vornehmen zu können. Nach Entnahme der Nieren wurden diese von ventral und dorsal fotografiert. Besonderer Fokus der makroskopischen Beurteilung lag auf Veränderungen des Gewebes in Bezug auf Größe, Form und Kontur, insbesondere in Form von Einziehungen, Narben und Farbveränderungen.

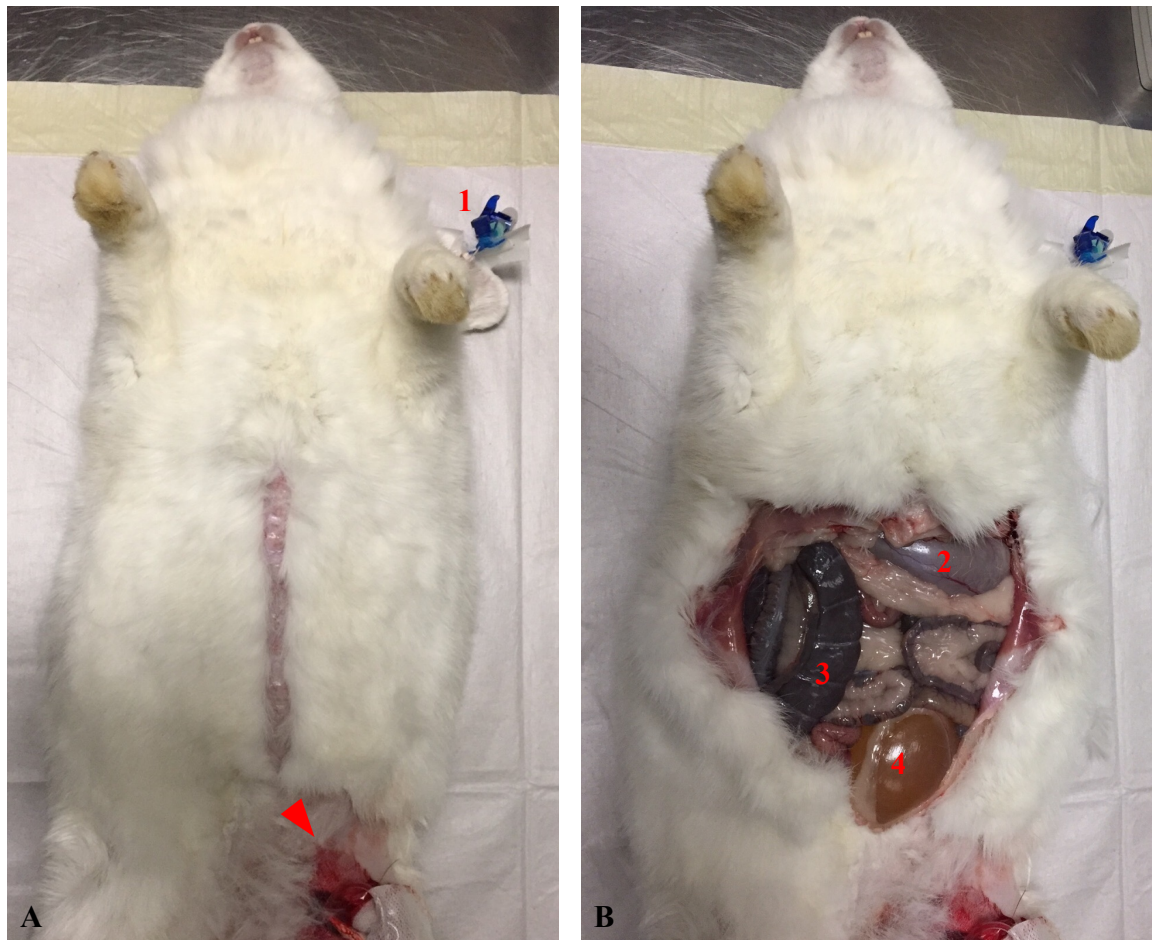


Abbildung 11: Organentnahme nach Kontrollbildgebung und Euthanasie

Mediane Laparotomie vom Xiphoid nach kaudal bis in den unteren Mittelbauch mit Entlastungsschnitt entlang der Rippenbögen beidseits.

1. Drei-Wege-Hahn in der *V. auricularis* des linken Ohres | 2. Magen | 3. Darmschlingen | 4. Harnblase |
Pfeil: Interventions-situs.

3.3.7 Mikroskopische und histopathologische Aufarbeitungen

Die behandelten Nieren wurden nun entsprechend der Methode von Stampfl et al. (2008) (136) (Abbildung 12) in acht Teile geschnitten. Zunächst erfolgte ein longitudinaler Schnitt durch die Hilusregion, resultierend in zwei Stücken. Anschließend erfolgte ein erneuter Longitudinalschnitt beider Stücke. Von diesen nun insgesamt vier Teilen insgesamt wurde jedes erneut vertikal geschnitten, so dass letztlich acht Stücke entstanden. Diese konnten nach den folgenden Kriterien unterschieden werden: ventral und dorsal, zentral und peripher sowie kranial und kaudal. Das folgende Schaubild illustriert die beschriebene Vorgehensweise.

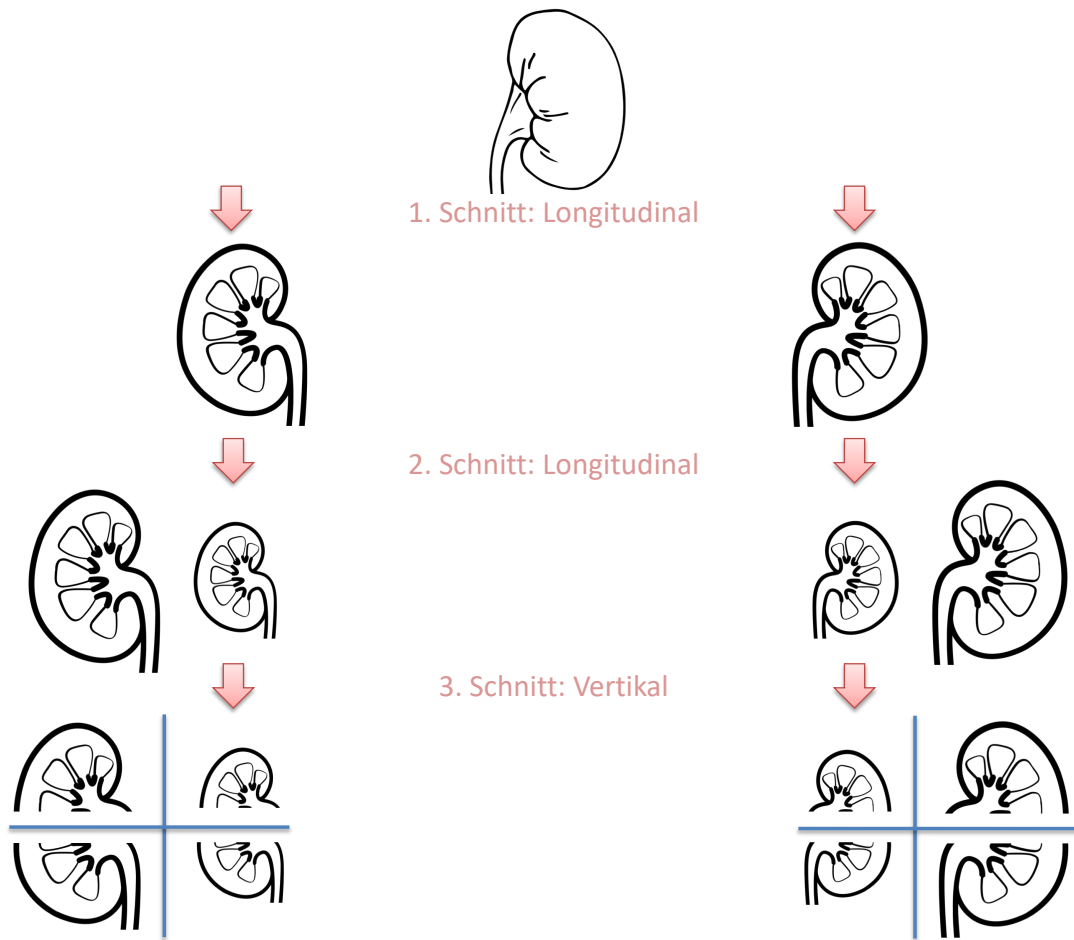


Abbildung 12: Schnitttechnik nach Organentnahme am Beispiel einer linken Niere, adaptiert von Stampfl et al.

Aus einer entnommenen Niere wurden acht Stücke angefertigt, welche sich in folgende anatomischen Zuordnungen aufteilen ließen: Ventral und dorsal durch 1. Schnitt. Zentral und peripher durch 2. Schnitt. Kranial und kaudal durch 3. Schnitt.

Die einzelnen Nierenteile wurden in 10 % Formaldehydlösung ((v/v) [= 4 % (w/v) neutralized] J.T. Baker, Polen) versetzt und für mindestens eine Woche gelagert. Daraufhin wurden die Stücke in Kassetten gelegt und vollautomatisch via Histokinette eingebettet (Leica TP 1020, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Für diesen häufig angewandten und gut etablierten Vorgang (137) wurden die Kassetten in einen Metallbehälter gesetzt. Das Material wurde in einem zwölf Stunden andauernden Prozess zunächst mit insgesamt zwölf Behältern (1 h pro Behälter) über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, im Intermediärmedium Xylol inkubiert und schließlich in Paraffin eingebettet. Die eingebetteten Präparate wurden nun aus den Plastikkassetten genommen, in kleine Metallbehälter umgebettet und aus einer halbautomatischen Gussmaschine (Leica EG 1150H, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) mit heißem Paraffin übergossen. Ein Teil der auseinandernehmbaren Plastikkassetten wurde

abgetrennt und in das noch heiße Wachs in der Metallplatte getränkt. Die Kombination aus Metallplatte (Unterteil), Präparat und Kassette (Oberteil) wurde nun zur Aushärtung und Fixierung auf eine Kälteplatte gelegt (Leica EG 1140C, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Hierbei war insbesondere auf eine zentrale Lage der Präparate zu achten, was durch leichtes Anfrieren des Präparates im Zentrum der Metallbehälters auf der kleinen zentrierten Kühlplatte erreicht wurde. Abbildung 13 zeigt die hierzu benutzte Vorrichtung.

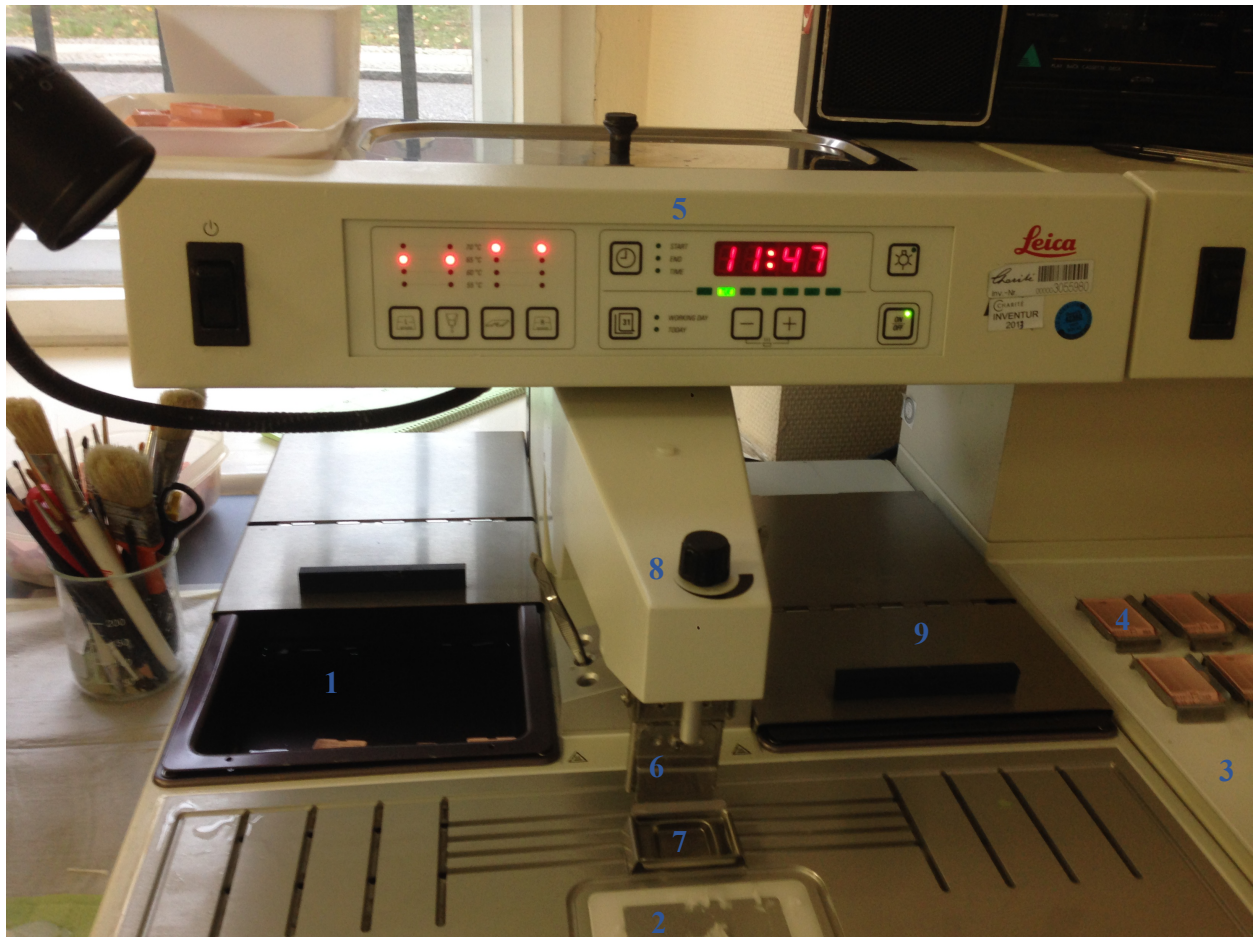


Abbildung 13: Einbettssystem von Leica mit Kälteplatte

1. Wärmeschublade zum Aufweichen des Paraffins in den Kassetten | 2. Zentrale kleine Kälteplatte im ansonsten warm-heißen umgebenden Untergrund | 3. Große Kälteplatte zum Abkühlen nach Eingießen | 4. Kombination fertig eingegossener Präparate aus Metallbehälter (Unterteil) und Kassettenstück (Oberteil) | 5. Bedienelemente, u.a. Timer, Temperatur, Licht | 6. Paraffinausgusshahn | 7. Bereitstehender Metallbehälter | 8. Mengeneinstellung des auslaufenden Paraffins | 9. Reservewärmeschublade, hier als Vorratsbehälter für Metallbehälter genutzt.

Nach dem Abkühlen waren die Präparate in den Wachsblöcken fixiert und nach Entnahme aus den Metallbehältern bereit für den Schneidevorgang. Hierzu wurden die Wachsblöcke in ein Rotationsmikrotom (Leica RM2125RT, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch,

Deutschland) eingespannt und Schnitte von einer Schichtdicke zwischen vier und fünf μm angefertigt. Unter Umständen mussten die Wachsblöcke erneut auf der Kälteplatte gekühlt werden, um kontinuierlich qualitativ gleichwertige Schnitte vom Wachsblock abtrennen zu können. Unmittelbar nach Anfertigung des Schnittes wurde dieser in ein 37°C warmes Wasserbad (Leica HI 1210, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) befördert und von dort mit vorab beschrifteten Objektträgern (Super Frost[®] Plus Objektträger, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) geborgen. Die Objektträger mit den aufgezogenen Schnitten wurden über Nacht in einem Wärmeschrank getrocknet (Heraeus Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland). Am nächsten Tag waren die Objektträger mit den aufgezogenen Gewebeproben bereit zum Färben. Vier verschiedene Färbemethoden wurden angewandt, um u.a. Nekroseareale, Partikelzustand und -abbau, Fibroseausmaß oder Schädigung und Veränderungen der Gefäßwände beurteilen zu können.

Als Standardmethode diente Hämatoxylin und Eosin (H&E). Für ausgewählte Schnitte wurden die folgenden ergänzende Spezialfärbungen vorgenommen: Elastica van Gieson, Jones' Methenamine Silber und Periodic-Acid Schiff. Die Einzelintentionen der Färbung können aus Tabelle 4 entnommen werden.

Färbemethode	Zweck
Hämatoxylin und Eosin (H&E)	Standardfärbung
Elastica van Gieson (EVG)	Spezialfärbung zur Beurteilung der Gefäßwände
Jones' Methenamine Silber (JMS)	Spezialfärbung zur Evaluation der Fibrose und chronischen Umwandlungsprozesse
Periodic-Acid Schiff (PAS)	Spezialfärbung zur ergänzenden Detektion der Mikrosphären im fortgeschrittenen Degradationsstadium

Tabelle 4: Übersicht über die verschiedenen histologischen Färbemethoden

H&E wurde als Standardfärbung eingesetzt, für spezielle zielgerichtete Fragestellungen wurden in Absprache mit dem Institut für Pathologie und nach nephropathologischer Konsultation ergänzende Zusatzfärbungen für ausgewählte Schnitte durchgeführt.

Die Hämatoxylin- und Eosinfärbung wurde im Labor für experimentelle Radiologie, Charitéplatz 1, CCM mit einem automatischen Färbeautomaten (Leica Autostainer XL, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) vorgenommen. Nach der Entparaffinierung durch zwei Behälter Xylol wurden die Schnitte mittels absteigender Alkoholreihe (100 % / 100 % / 96 % / 96 % / 70 %) und destilliertem Wasser rehydriert. Dem ersten Färbeschritt mittels Hämalaun folgte

nach einer Spülung mit fließendem Wasser der zweite Färbeschritt mit Eosin. Nun wurde wieder eine Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol in genau entgegengesetzter Reihenfolge vorgenommen. Im Anschluss an das standardisierte Programm wurden die Objektträger vollautomatisch von einem Glaseindeckautomaten eingedeckt (Leica CV5030, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Die Objektträger wurden in einem Abzug gelagert und waren dann bereit zur Mikroskopie. Abbildung 14 zeigt exemplarisch die Anordnung im Färbeautomaten und Abbildung 15 die Korrelation der eingebetteten Präparate zum histopathologischen Schnitt auf dem Objektträger nach H&E Färbung.



Abbildung 14: Anordnung des Färbeautomaten zur standardisierten H&E Färbung

1. Alkoholreihe | 2. Hämalun | 3. Objektträger im Wasserbad | 4. Fließendes Wasserbad | 5. Eosin | 6. Beginnende aufsteigende Alkoholreihe.



Abbildung 15: Korrelation der eingebetteten Präparate zum histopathologischen Schnitt auf dem Objektträger nach H&E Färbung

Links: Präparat eingebettet in Paraffin auf Kassette aufgezogen.

Rechts: 5 µm dicker Schnitt desselben Präparates auf Objektträger nach H&E Färbung.

Die ergänzenden Färbungen wurden in den Räumlichkeiten des Institutes für Pathologie, Charitéplatz 1, CCM durchgeführt. Alle histologischen Schnitte wurden nach Anwendung der verschiedenen Färbemethoden mit einem inversen Mikroskop (Axio Observer.Z1 Mikroskop, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) untersucht und dokumentiert.

3.3.8 Statistische Analysen

Alle quantitativen Daten (Embolisationsscore, Reperfusionsscore, Degradationsscore, Gefäßwandschadensscore) wurden in eine Datenbank eingepflegt (Excel® Ver. 14.4.2. Microsoft®, Redmond, USA). Daraus wurden deskriptive Statistiken errechnet und die Daten für jedes Tier und jeden Zeitpunkt als Mittelwert, Median und Quartilsabstand oder Anzahl (n) und Prozent (%) angegeben. Der Kappa Koeffizient nach Cohen wurde für die Fragestellung bestimmt, ob die erhobenen kategorialen Stichproben aus Bildgebung und makroskopischer Pathologie

übereinstimmen (Embolisationsscore). Der Wilcoxon signed-rank Test wurde angewandt, um zu prüfen, ob sich die zentralen Tendenzen gepaarter Stichproben unterscheiden (Reperfusionsscore). Um wiederum die zentralen Tendenzen von mehr als zwei unabhängigen Stichproben miteinander vergleichen zu können, wurde der Kruskal-Wallis Test angewandt (Degradationsscore, Gefäßwandschadensscore). Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die statistischen Auswertungen wurden mit SPSS Statistics, Ver. 25 (IBM, Armonk, USA) angefertigt.

3.4 Methoden: Zielparameter

Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die Zielparameter und die entsprechenden Modalitäten zur Beurteilung.

		Modalität				
		DSA	MRT	Makroskopie	Mikroskopie	
Outcome Parameter	I	Anwendbarkeit und Sicherheit	X	X		
	II	Effektivität & Embolisationserfolg	X	X	X	
	III	Rekanalisation / Reperfusion	X			
	IV	Sichtbarkeit		X		
	V	Bioresorbierbarkeit				X
	VI	Biokompatibilität				X

Tabelle 5: Übersicht über Zielparameter und entsprechende Modalitäten

Die Anwendbarkeit und Sicherheit wurden sowohl klinisch praktisch als auch anhand der Bildgebung evaluiert. Der Embolisationserfolg wurde mittels DSA, MRT und makroskopischer Pathologie erhoben. Das Ausmaß der Reperfusion wurde mittels Angiographie bewertet. Eine Sichtbarkeit der neuartigen Mikrosphären konnte im MRT untersucht werden. Bioresorbierbarkeit und Gewebeerträglichkeit wurden histopathologisch ausgewertet.

3.4.1 Durchführbarkeit und Sicherheit

Für den Zielparameter der Durchführbarkeit wurde zu jedem Embolisationsvorgang die Injizierbarkeit der Mikrosphären in einem dreistufigen Schema festgehalten: gute, moderate oder unbefriedigende Injizierbarkeit. Für die Beurteilung der Injizierbarkeit wurden die folgenden Parameter berücksichtigt: Anheftung der Partikel an Ampullen und Spritzen, Aggregation der Partikel im Katheterstutzen und benötigte Kraft für die Injektion der Mikrosphären-/Kontrastmittelsuspension. Die Beurteilung erfolgte durch zwei Professoren und Fachärzte für Radiologie mit über 15 Jahren Berufserfahrung (F.S. und R.G.) unmittelbar nach der Embolisation

in Konsensus. Zudem wurden die entsprechende applizierte Menge und Größenordnung der Mikrosphären erfasst.

Für den Parameter der Sicherheit wurden folgende intra- und postinterventionellen Vorkommnisse erfasst: Arterielle Fehlpunktion, Spasmus, Dissektion, Thrombose, arterielle Perforation, Pseudoaneurysma, Arteriovenöse Fistel, Kontrastmittelunverträglichkeit, Abschwemmung von Embolisatmaterial, Postembolisationssyndrom, Infektion, Abszess, Nahtdehiszenz, Kreislaufdysregulation.

3.4.2 Embolisationserfolg

Der Embolisationserfolg wurde grundsätzlich auf Basis der folgenden Modalitäten untersucht: DSA, MRT und makroskopische Pathologie. Es wurde im Laufe der Versuche und anhand der erhobenen Daten ein spezifisches, aus vier Graden bestehendes Punktesystem entwickelt, dessen Anwendung über alle drei verschiedenen Modalitäten hinweg eine Beurteilung des Embolisationserfolges in adäquater Weise ermöglichte. Tabelle 6 zeigt diesen Score. Als Zielscore wurde der Wert 1 (Selektive Embolisation des unteren Nierenpols) ausgegeben. Das Punktesystem wurde jeweils unabhängig durch zwei Fachärzte für Radiologie (F.S. und R.G.) sowie zwei Doktoranden (H.W. und M.S.) für jede der oben erwähnten Modalitäten angewandt und eine Konsensüberarbeitung vorgenommen, sofern eine Diskrepanz festgestellt wurde.

Definition	Embolisationsscore
Kein sichtbarer Embolisationserfolg	0
Selektive Embolisation des kaudalen Nierenpols	1
Selektive Embolisation des kaudalen Nierenpols + unselektive Embolisation angrenzender Nierenareale	2
Unselektive Embolisation der gesamten Niere	3

Tabelle 6: Zielparameter Embolisationserfolg – Punktescore

Score 0 wurde definiert als „Kein sichtbarer Embolisationserfolg“. Score 1 wurde als Zielscore ausgegeben, hier wurde genau der kaudale Nierenpol embolisiert. Score 2 überschreitet Score 1, indem zusätzliche Anteile angrenzend an den kaudalen Nierenpol embolisiert sind. Score 3 stellt eine unselektive Embolisation des gesamten Nierengewebes dar.

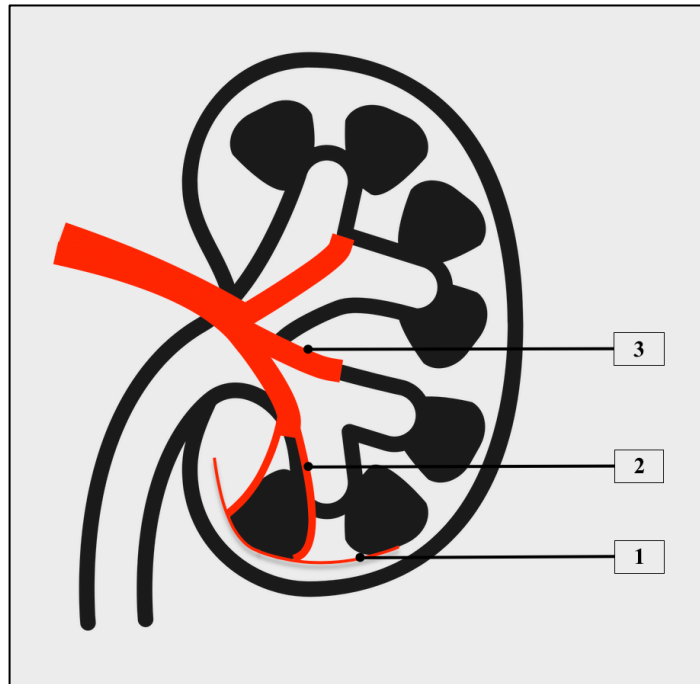
Zusätzlich zu den Modalitäten DSA, MRT und Makroskopie lieferten auch die mikroskopischen Auswertungen Hinweise zum Embolisationserfolg. Hierfür wurden die folgenden histopathologischen Parameter bewertet: Koagulationsnekrose, Fibrose und Verkalkung. Jeder Parameter wurde für jedes Versuchstier nach dem folgenden Stufenschema beurteilt: Keine, leicht,

moderat oder ausgeprägt. Als Koagulationsnekrose wurde wie auch bereits in der Arbeit von Weng et al. (2015) ein Verlust der Zellkernfärbung und verschwommene Zellgrenzen bei erhaltener Parenchymstruktur definiert (105). Zusätzlich demarkierte eine Einwanderung von Entzündungszellen in das Interstitium das Areal der Koagulationsnekrose.

3.4.3 Reperfusion

Um die Reperfusion bzw. Rekanalisation als bildmorphologischen Ausdruck der Bioresorbierbarkeit untersuchen zu können, wurde auf Basis der anatomischen Gegebenheiten der Niere und den angiographischen Entdeckungen ein weiterer, semiquantitativer Score entwickelt. Hierfür wurde in einem ersten Schritt die arterielle Gefäßversorgung der Kaninchenniere in drei Abschnitte unterteilt: *Aa. arcuatae*, *Aa. interlobares* und *Aa. segmenti*. Anhand dieses Schemas wurde nun ein vierstufiger Punktescore entwickelt, um die Ebene des Gefäßverschlusses anzugeben. Dieser Score wurde für jedes Tier in beiden durchgeführten Angiographien angewandt. Das Punktesystem wurde jeweils unabhängig durch zwei Fachärzte für Radiologie (F.S. und R.G.) angewandt und eine Konsensüberarbeitung vorgenommen, sofern eine Diskrepanz festgestellt wurde. Die Angiographien erfolgten zum einen unmittelbar nach Embolisation sowie als Kontrollangiogramm am Tag der Euthanasie.

Beurteilt wurde hierbei ausschließlich die Kontrastierung der Gefäße in der arteriellen Phase der Angiogramme. Eine Reperfusion wurde im entsprechenden Gefäßabschnitt als solche definiert, wenn eine zuvor nicht vorhandene Gefäßkontrastierung im Kontrollangiogramm wieder zu erkennen war. Die Werte wurden miteinander verglichen, um einen Eindruck für das Ausmaß der Rekanalisation im jeweiligen Beobachtungszeitraum zu bekommen. Konnte pro Kaninchen im Kontrollangiogramm ein Abfall des vorherigen Scores auf den Grad 0 (Kein Gefäßverschluss) festgestellt werden, wurde eine vollständige Reperfusion konstatiert. Bei Verminderung des Scores um jeglichen Wert außer auf den Grad 0, wurde eine partielle Reperfusion festgestellt. Waren beide Werte im Punktesystem gleich, lag keine Reperfusion vor. Abbildung 16 zeigt die Aufteilung anhand eines anatomischen Schemas und das daraus resultierende Punktesystem.



Level des Gefäßverschlusses	Score
Kein Gefäßverschluss	0
Aa. arcuatae verschlossen	1
Aa. interlobares verschlossen	2
Aa. segmenti verschlossen	3

Abbildung 16: Reperfusion – Anatomische Zuordnung der Nierengefäße und semiquantitatives Punktesystem

Oben. Aufteilung der anatomischen Gefäßstrukturen in drei Ebenen von distal nach proximal:

1. *Aa. arcuatae* | 2. *Aa. interlobares* | 3. *Aa. segmenti*

Unten. Score 0 wurde vergeben, wenn kein Gefäßverschluss im Angiogramm zu erkennen war. Score 1-3 entsprechen den jeweiligen anatomischen Strukturen von distal nach proximal.

3.4.4 Sichtbarkeit der Embolisatpartikel in der MRT

Aufgeführt ist das verwendete MRT-Standardprotokoll mit den durchgeführten Sequenzen direkt post-interventionell nach Embolisation und am Euthanasietag nach der Kontrollangiographie. Für die mit Kontrastmittel verstärkten Sequenzen wurde MultiHance® 0.5 M, Bracco Imaging Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland (0,5 M - 100 µmol/kg) verwendet. Alle Sequenzen wurden jeweils in koronarer und transversaler Schichtführung gefahren. Für jede der Sequenzen

erfolgte eine Beurteilung der erkennbaren Signalalterationen durch die SPIO-Nanopartikel.

Tabelle 7 fasst die Parameter der einzelnen Sequenzen zusammen. Diese waren:

- T1_TSE_koronar / T1_TSE_transversal (nativ und mit Kontrastmittel)
- T2_TSE_koronar / T2_TSE_transversal
- T2*_GRE_koronar / T2*_GRE_transversal

	T1_TSE	T2_TSE	T2*_GRE
Sequenzart	SE 2d	SE 2d	GRE 2d
Bezeichnung	T1_TSE_cor; T1_TSE_tra	T2_TSE_cor; T2_TSE_tra	T2*_GRE_cor; T2*_GRE_tra
Orientierung	koronar, transversal	koronar, transversal	koronar, transversal
Schichtgruppe	1	1	1
Schichtanzahl	9	15	21
Schichtdicke	3,0	3,0	2,0
Distanzfaktor [%]	0	20	10
Phasenkodierrichtung	R >> L	cor R >> L; tra A >> P	cor R >> L; tra A >> P
Phasenoversampling [%]	0	0	0
Field of View Auslese [mm]	115	cor:120; tra:140	cor:120; tra:180
Field of View Phase [%]	100,0	cor: 100,0; tra 75,0	cor: 100,0; tra 50,0
Repetitionzeit [ms]	1150	6580	200
Echozeit [ms]	14	72	5,4
Mitteilungen	3	4	8
Verknüpfungen	1	1	1
Filter	Keine	Keine	Keine
Spulenelemente	Extremitäten	Extremitäten	Extremitäten
Messzeit [min]	2:07	cor 5:50; tra 4:31	cor 6:51; tra 3:26

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten MRT-Sequenzparameter

TSE: Turbospinecho; SE: Spinecho; GRE: Gradientenecho; 2d: zweidimensional; cor: koronar; tra: transversal

3.4.5 Bioresorbierbarkeit

Nach Durchführung der o.g. Schritte konnte eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit überprüft werden: Die Zielgröße der Bioresorbierbarkeit und damit die Degradation der neu entwickelten Mikrosphären.

Um den Zeitpunkt der Degradation entsprechend einschätzen zu können, wurden auf Basis der histopathologischen Auswertungen wesentliche Merkmale der Partikel herausgearbeitet. Schließlich wurden sechs verschiedene morphologische Kriterien beurteilt (Tabelle 8). Dazu gehörten die Form (sphärisch vs. nicht-sphärisch), die Oberfläche (glatt vs. rau), die Binnenstruktur (homogen vs. vakuolisiert), Defekte (keine vs. Risse und Löcher) sowie der Grad der zellulären Beteiligung (keine vs. marginal vs. invasiv).

Für jedes einzelne Partikel im Nierengefäßsystem oder -parenchym wurden jedem Merkmal eine Anzahl von Punkten zugeteilt. Die zugeteilten Punkte wurden addiert und in ein weiteres vierstufiges Punktesystem übersetzt. Ein steigender Punktwert bedeutete somit eine zunehmende Degradation der Mikrosphären und dadurch konnte jeder Partikel einem entsprechende Abbaugrad zugeordnet werden, wobei zwischen Originalstruktur (d.h. keinen Veränderungen oder Um- und Abbauprozess des Partikels), leichter, mittelgradiger und extensiver Degradation unterschieden wurde (Tabelle 8). Sämtliche histopathologischen Analysen und die Anwendung des Punktesystems wurden unabhängig von zwei Doktoranden (H.W. und M.S.) unter der Supervision eines Facharztes für Pathologie (J.N.) durchgeführt und eine Konsensüberarbeitung vorgenommen, sofern eine Diskrepanz festgestellt wurde.

Form	Punkte	Oberfläche	Punkte	Binnenstruktur	Punkte
sphärisch	0	glatt	0	homogen	0
fragmentiert	1	rau	1	vakuolisiert	1

Defekte	Punkte	Zelluläre Beteiligung	Punkte
Artefakte	0	keine	0
Risse, Löcher	1	marginal	1
		invasiv	2



Punkte	Definition	Score
5-6	Extensive Degradation	3
3-4	Mittelgradige Degradation	2
1-2	Leichte Degradation	1
0	Originalstruktur	0

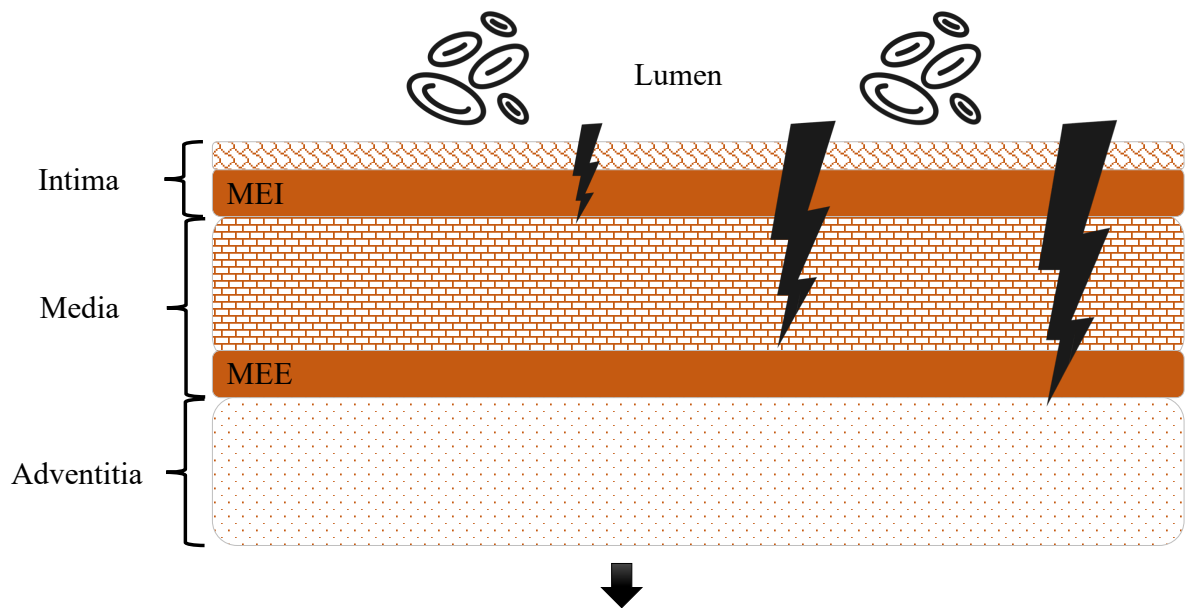
Tabelle 8: Zielparameter: Degradation – Morphologische Kriterien der Mikrosphären und das daraus resultierende Punktesystem zur Beurteilung des Degradationsgrades jedes einzelnen Partikels

Anhand der Erkenntnisse der histopathologischen Auswertungen kristallisierten sich oben angegebene Kriterien für eine adäquate Beurteilung der Mikrosphären heraus und wurden entsprechend in einen vierstufigen Score übersetzt. *Diese Tabelle ist eine Übersetzung der Tabelle aus der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.*

3.4.6 Biokompatibilität

Um die Biokompatibilität der neuen Mikrosphären einordnen zu können, orientierte sich die Arbeit an der Studie von Schwartz et al. (1992) (138). Diese Klassifikation wurde ursprünglich zur Untersuchung von Endothelschäden an Koronararterien angewandt, und ist bereits in tierexperimentellen Studien zur Analyse von histopathologischen Veränderungen nach Embolisationsvorgängen erfolgreich adaptiert (139). Demnach wurde wiederum ein viergradiges Punktesystem angewandt um den Grad der Gefäßwandschädigung einordnen und beurteilen zu können. Dieses Punktesystem basiert auf einer Unterscheidung der Gefäßwandschicht, welche durch externe, in diesem Fall iatrogen eingebrachte Partikel unterbrochen worden ist. In Kaninchen wie Menschen lassen sich die Gefäßwandschichten folgendermaßen aufteilen, von

innen nach außen: *Tunica intima* mit *Membrana elastica interna* (MEI), *Tunica media* mit *Membrana elastica externa* (MEE) und *Tunica adventitia*. Abbildung 17 illustriert anhand eines Schemas das ebenfalls abgebildete Punktesystem nach Schwartz et al.



Definition	Score
Unterbrechung der MEI, Tunica media, und Membrana elastica externa	3
Unterbrechung der MEI und Tunica media	2
Unterbrechung Membrana elastica interna (MEI)	1
Alle Gefäßwandschichten intakt	0

Abbildung 17: Zielparameter: Biokompatibilität anhand eines Schemas der betroffenen geschädigten Gefäßwandschicht, adaptiert nach Schwartz et al. (138)

Im besten Fall erschien die gesamte Gefäßwandschicht intakt (Score 0). Leichte Schäden betrafen zuerst die dem Lumen am nächsten gelegene *Tunica intima*, im histologischen Schnitt festzumachen an der prominenten *Membrana elastica interna*. Ein höherer Schädigungsgrad lag vor, wenn zusätzlich die *Tunica media* betroffen war. Der höchste Destruktionsgrad (Score 3) wurde vergeben, wenn der Schaden durch die *Membrana elastica externa* in die *Tunica adventitia* reichte.

4. Ergebnisse

4.1 Durchführbarkeit und Sicherheit

Eine erfolgreiche und effektive Embolisation konnte bei allen neun Tieren durchgeführt werden. In einzelnen Versuchen erschwerte der frühe Abgang der Nierenkapselarterie die Sondierung der Nierenhauptarterie (Abbildung 18). Insgesamt wurde bei sieben Tieren die rechte und bei zwei Tieren die linke Niere als Zielorgan gewählt. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Injektionsfähigkeit. In acht von neun Embolisationen (88,9 %) wurde ein Wert „moderat“, in einer Embolisation (11,1 %) der Wert „gut“ vergeben.

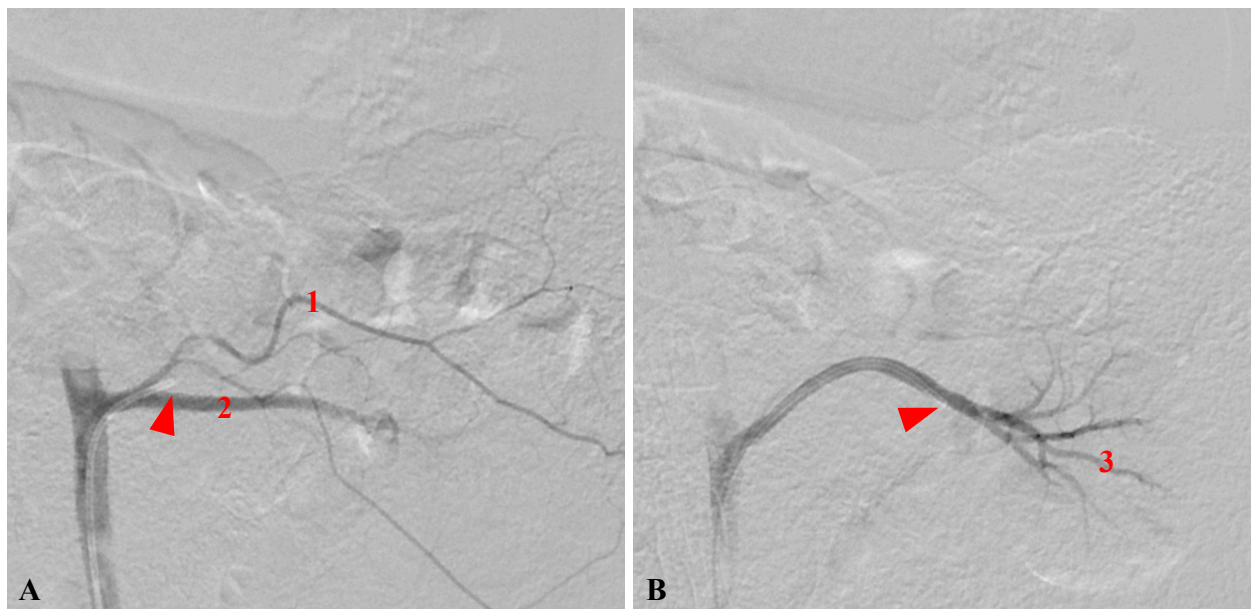


Abbildung 18: Initiale Katheterisierung einer Kapselarterie aus der *A. renalis sinistra* (DSA) und anschließend regelrechte Positionierung und Kontrastierung der Nierenarterien

A. Initiale Katheterspitzenposition (Pfeil) in der Kapselarterie (1) als Variante aus *A. renalis sinistra* (2).

B. Regelrechte Positionierung des Katheters in der *A. renalis sinistra* und somit Kontrastierung der Nierenarterienäste (3)

Tier	Partikelgrößenordnung [µm]	Applizierte Partikelmenge [ml]	Hilfsstoff	Injektions- fähigkeit
Kaninchen 1	90-300	0,075	-	moderat
Kaninchen 2	90-300	0,1	–	moderat
Kaninchen 3	200-500	0,05	Albumin	moderat
Kaninchen 4	200-500	0,03	Albumin	moderat
Kaninchen 5	200-500	0,02	Albumin	gut
Kaninchen 6	90-300	0,1	Lecithin	moderat
Kaninchen 7	90-300	0,15	Lecithin	moderat
Kaninchen 8	90-300	0,1	Albumin	moderat
Kaninchen 9	90-300	0,05	Albumin	moderat
Mittelwert		0,075		
Standardabweichung		0,042		

Tabelle 9: Injektionsfähigkeit

In acht von neun Embolisierungen wurde die Injektionsfähigkeit als „moderat“ festgehalten, in einer Embolisierung als „gut“. Eine unbefriedigende Injektionsfähigkeit wurde in keiner der Embolisierungen erzielt. Im Mittel wurden 0,075 ml Embolisatmaterial appliziert. Eine Vermengung des Gemisches mit Lecithin oder Humanalbumin ergab keine Verbesserung in der Applikation der Mikrosphären.

Teile dieser Tabelle finden sich in dieser oder angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

Bei sieben von neun Tieren wurde eine zielgerichtete Embolisation erreicht. Bei einem Tier kam es zu einer „Überembolisation“, d.h. einer Embolisation der Gesamtniere, welche im Embolisationscore (siehe Kapitel 3.4.2) einem Grad 3 entsprach. Dies war bei einem Kaninchen „G0112/14-5, Tät.-Nr. C44985“ des Beobachtungszeitraumes von vier Wochen der Fall. Dies konnte bereits intra-interventionell im Abschlussangiogramm festgestellt werden und bestätigte sich in allen weiteren Untersuchungsmodalitäten im Verlauf (siehe Abbildung 19 und 20). Daher wurden tierärztlich unmittelbar nach dem Eingriff für vier Tage zusätzlich Buprenorphin als Schmerzmittel verabreicht, um einer Schmerzentwicklung entgegenzuwirken. Beim selben Kaninchen konnten im MRT zusätzlich Auslöschungsartefakte in der Bauchwand festgestellt werden – bedingt durch abgeschwemmte SPIO-beladene Mikrosphären (Abbildung 21). Hierzu entwickelte sich kein klinisches Korrelat. Das Tier zeigte im gesamten Beobachtungszeitraum im Vergleich zu seinen Artgenossen keinerlei Auffälligkeiten.

Bei einem Tier „G0112/14-17, Tät.-Nr. LYNC“ wurde intra-interventionell ein Spasmus festgestellt, welcher spontan rückläufig war und keine klinischen Symptome hervorrief. Bei einem weiteren Tier „G0112/14-16, Tät.-Nr. D26418“ des Beobachtungszeitraumes von acht Wochen musste 14 Tage nach dem Eingriff aufgrund einer Krallenverletzung eine Krallenamputation in tiefer Narkose vorgenommen werden. Es wurde zusätzlich für zwei Tage das Schmerzmittel Buprenorphin (Temgesic® Ampullen 0,3 mg Injektionslösung, RB Pharmaceuticals Limited, Slough, Vereinigtes Königreich) und für fünf Tage Enrofloxacin (Baytril® 2,5 % Injektionslösung, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) als Antibiotikum verabreicht. Unter dieser Therapie erholte sich das Tier und zeigte keinerlei weitere pathologische Auffälligkeiten im restlichen Beobachtungsintervall von sechs Wochen.

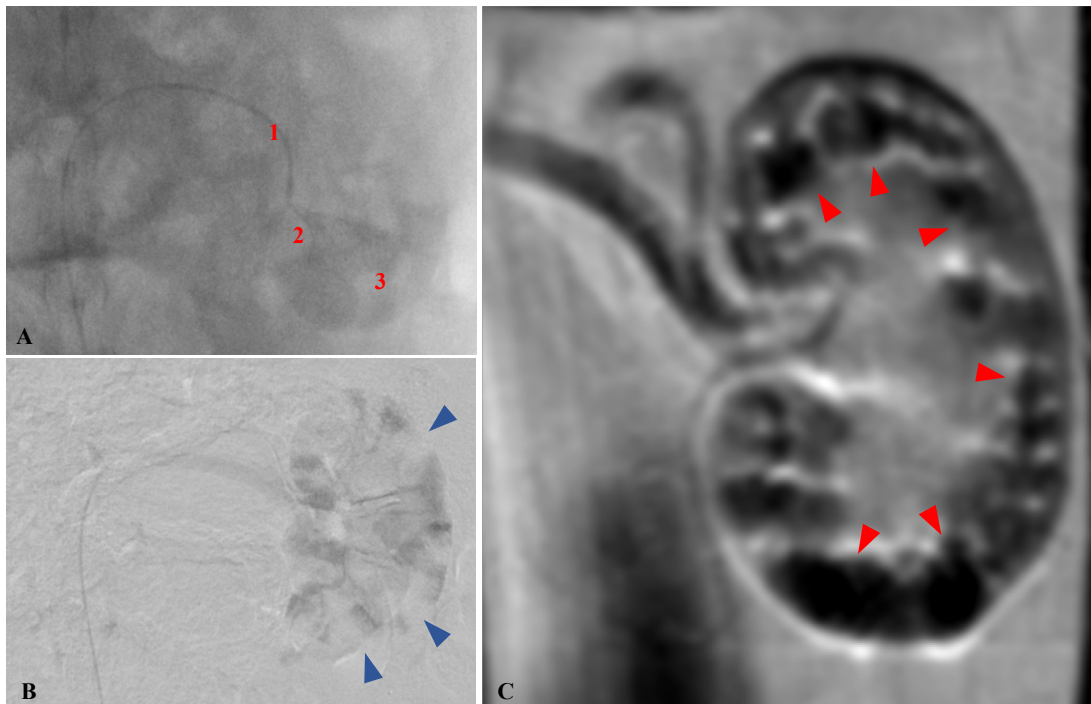


Abbildung 19: Unselektive Embolisierung der linken Niere nach forcierter Embolisatinjektion – Bildgebung: DSA und MRT

A. Unter Fluoroskopie war von einer selektiven Embolisierung des kaudalen Nierenpols auszugehen (3).

1. Katheter | 2. Segment- und Interlobararterien gefüllt mit dem Gemisch aus Kontrastmittel, Natriumchloridlösung und Embolisatmaterial.

B. Post-Embolisationsangiogramm: Die blauen Pfeile markieren die parenchymatösen Infarktareale.

C. Post-Embolisations-MRT, T2_TSE Sequenz in koronarer Schicht. Die roten Pfeile markieren die hypointensen Signale der SPIO Partikel. Erkennbar ist die unselektive Verteilung nicht nur im kaudalen Nierenpol, sondern im gesamten Nierenparenchym.

Teile dieser Abbildung finden sich in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

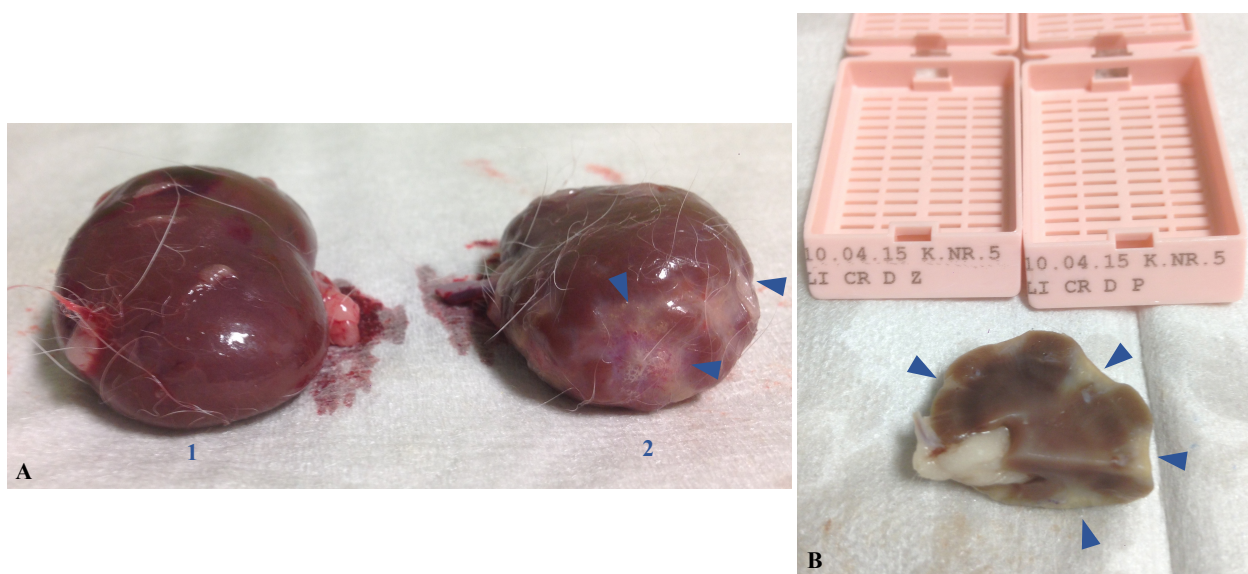


Abbildung 20: Unselektive Embolisierung der linken Niere – Makroskopie

A. Vergleich der beiden entnommenen Nieren, Fotografie von kaudal: Links die unbehandelte (1), rechts die embolisierte Niere (2) vier Wochen nach der Embolisation. Die blauen Pfeile markieren die weißlich-gelblichen Infarktareale als Korrelation zur Bildgebung in Abbildung 19 B.

B. Auch nach einwöchiger Behandlung mit Formaldehyd sind die infarktbedingten narbigen Einziehungen deutlich über das gesamte Nierenareal zu erkennen. Das abgebildete Gewebestück entstammt der anatomisch linken, kranialen dorsalen Niere.

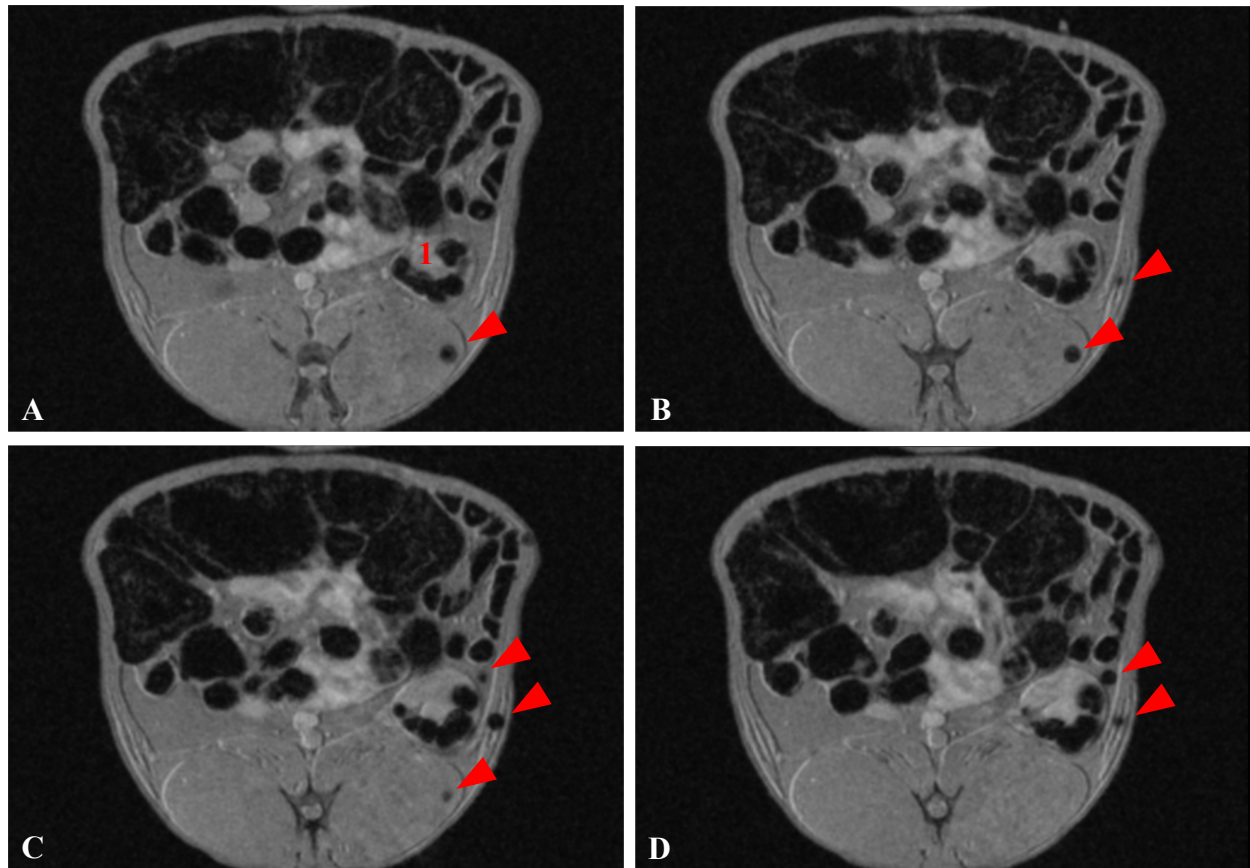


Abbildung 21: Dystope Verteilung des Embolisatmaterials im Bauchraum / Bauchwand im MRT

A. bis D. MRT Aufnahmen nach der Embolisation in axialer Schnittebene von kranial nach kaudal. Die Pfeile markieren das extrarenale Embolisat, welches sich in dieser T2* Sequenz hypointens zeigt.

1. markiert die unselektiv embolisierte linke Niere.

Teile dieser Abbildung finden sich in der Publikation Stechele et al., *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2020.

4.2 Embolisationserfolg

Eine grundlegende Anforderung, welche die neuartigen Mikrosphären zu erfüllen hatten, war eine effektive Okklusion der Gefäße, um eine suffiziente Ischämie bzw. Infarkt des nachgeschalteten Stromgebietes zu erreichen. In der DSA war ein Embolisationsbereich als solcher definiert, dass eine Kontrastmittelaussparung gegenüber dem restlichen Nierenparenchym zu erkennen war. Im MRT grenzte sich das Embolisationsareal nach Kontrastmittelgabe deutlich hypointens zum restlichen Nierenparenchym ab. Für die makroskopische Pathologie war ein embolisierter Bereich an weißlich-gelblichen Veränderungen zu erkennen. Zudem kam es zu einer Hypotrophie des Nierengewebes und Einziehungen durch die Bildung von Narbengewebe. Es zeigte sich dabei eine gute Übereinstimmung der verschiedenen Modalitäten (DSA, MRT und Makroskopie). Dieser Eindruck bestätigte sich in der Statistik. Abbildung 22 und 23 zeigen exemplarisch die Unterschiede zwischen Score 1 (Selektive Embolisation des kaudalen Nierenpols) und Score 2 (Selektive Embolisation des kaudalen Nierenpols sowie unselektive Embolisation angrenzender Nierenareale) in DSA.

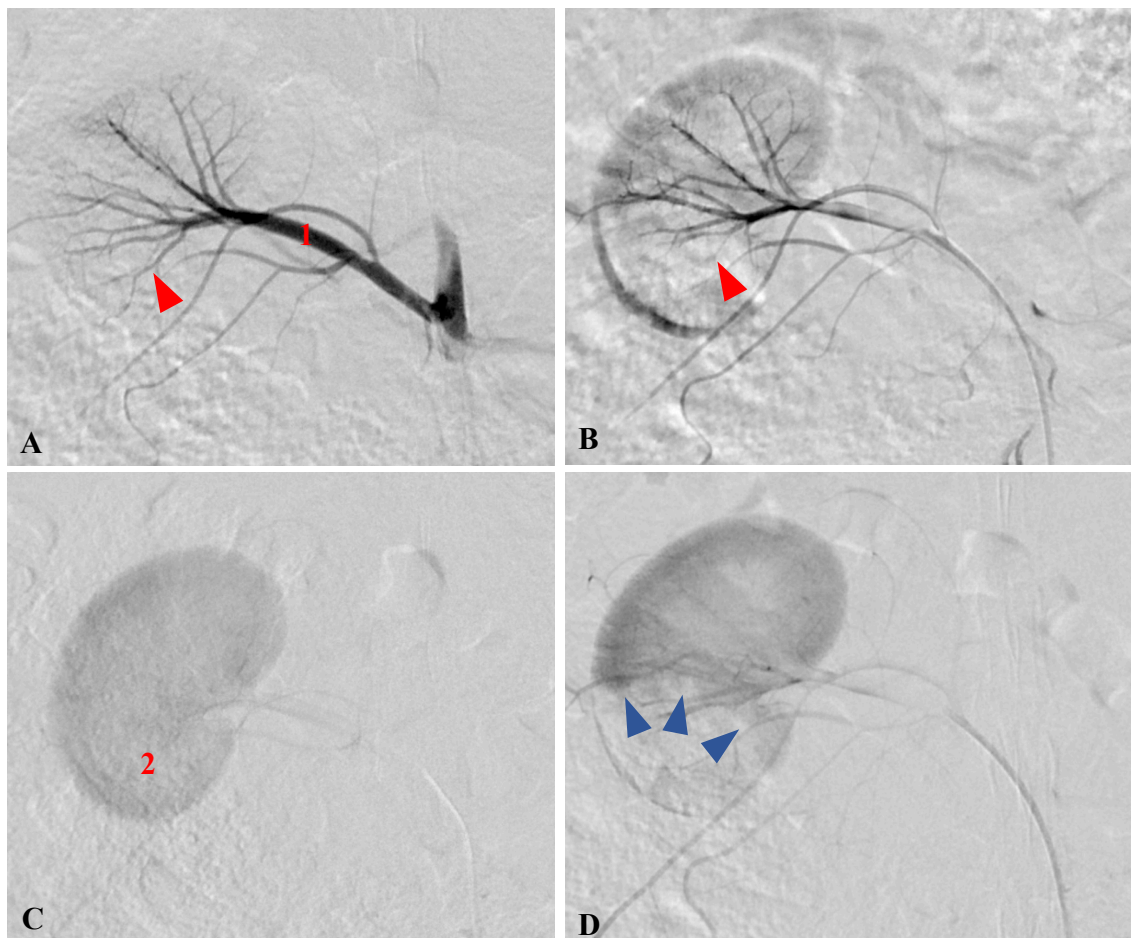


Abbildung 22: Embolisationscore 1 – Selektive Embolisation des kaudalen Nierenpols in DSA

Bilder links (A und C) zeigen DSA Aufnahmen vor der Embolisation, rechtsseitig (B und D) nach der Embolisation. In der oberen Reihe (A und B) sind jeweils vaskuläre Phasen zu sehen, während die untere Reihe (C und D) die parenchymale Phase darstellt. Die roten Pfeile markieren die intraparenchymalen arteriellen Gefäße, welche nach Embolisation nicht mehr perfundiert sind. Die blauen Pfeile zeigen das entsprechende parenchymale Korrelat im Sinne einer induzierten Devaskularisierung.

1. *A. renalis* | 2. Kaudaler Nierenpol

Teile dieser Abbildung finden sich in der Publikation Stechele et al., *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2020.

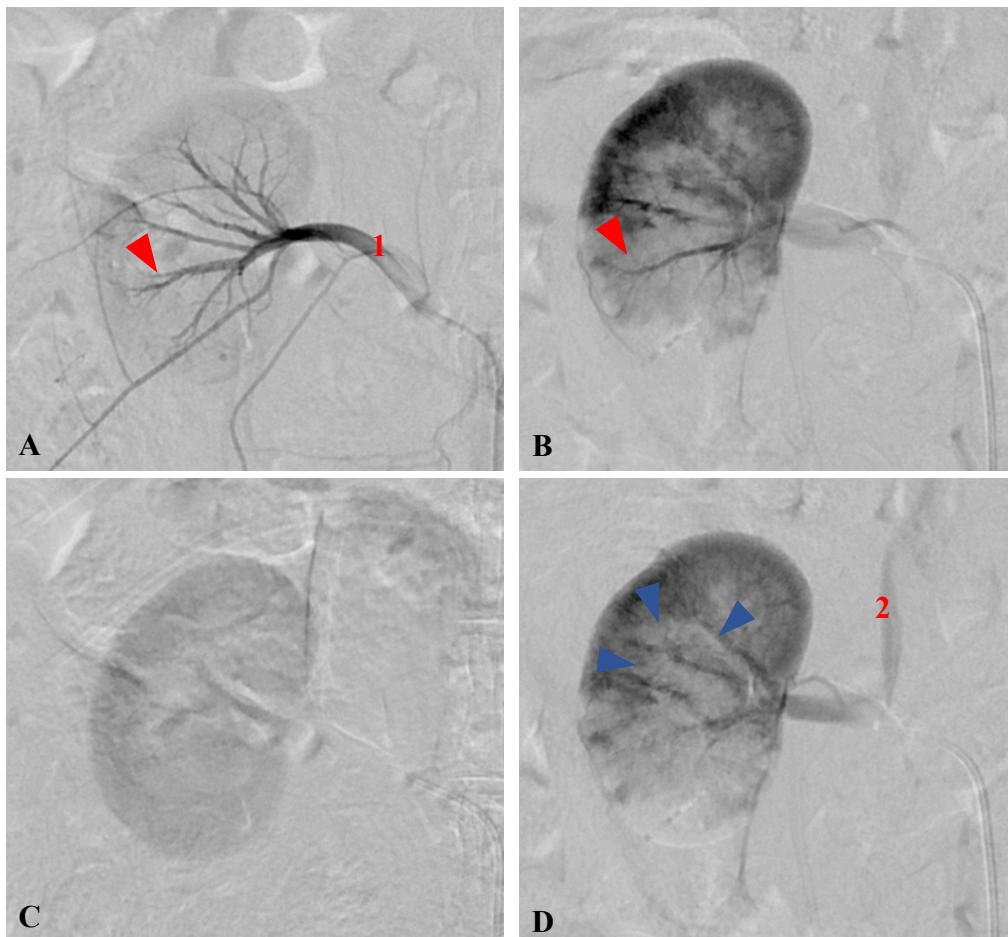


Abbildung 23: Embolisationscore 2 – Selektive Embolisation des kaudalen Nierenpols sowie unselektive Embolisation angrenzender Nierenareale bei der DSA

Bilder links (A und C) zeigen Aufnahmen vor der Embolisation, rechtsseitig (B und D) nach der Embolisation. In der oberen Reihe (A und B) sind jeweils vaskuläre Phasen zu sehen, während die untere Reihe (C und D) die parenchymale Phase darstellt.

Die roten Pfeile markieren die intraparenchymalen arteriellen Gefäße, welche nach Embolisation nicht mehr perfundiert sind. Diese sind im Vergleich zu Embolisationsgrad 1 nun kranialer über dem kaudalen Nierenpol lokalisiert. Die blauen Pfeile zeigen erneut das entsprechende parenchymale Korrelat mit einer weiter nach kranial reichenden Kontrastmittelaussparung durch die unselektive Embolisation.

1. *A. renalis* | 2. Venöser Abstrom des arteriell injizierten Kontrastmittels.

In keinem der Versuche – weder in DSA, MRT oder Makroskopie – wurde ein Score 0 (Keine erfolgreiche Embolisation) erfasst.

Der Versuch, in welchem in allen drei Modalitäten ein Score 3 (unselektive Embolisation der gesamten Niere) vergeben wurde, wird in Kapitel 4.1 ausführlich erläutert. Die Anwendung des entwickelten Punktesystems in allen drei Modalitäten DSA, MRT und makroskopische Pathologie zeigte somit kumulativ folgende Ergebnisse: Einen mittleren Score von 1,5 in DSA und MRT sowie einen Score von 1,375 in der makroskopischen Pathologie. Der Median ergab in DSA und MRT den Wert 1 bei einem Quartilsabstand von ebenfalls 1. In der makroskopischen Auswertung betrug der Median ebenfalls 1 bei einem Quartilsabstand von 0,75.

Abbildung 24 illustriert grafisch die Ergebnisse des Embolisations Scorings, Tabelle 10 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tier	DSA	MRT	Makroskopie
Kaninchen 1	1	1	1
Kaninchen 2	3	3	3
Kaninchen 3	1	1	1
Kaninchen 4	2	2	2
Kaninchen 5	1	1	1
Kaninchen 6	1	1	1
Kaninchen 7	1	1	1
Kaninchen 8	2	2	1
Zielscore erreicht (n/∑ n)	5/8	5/8	6/8
Zielscore erreicht [%]	62,5	62,5	75,0

Tabelle 10: Embolisationserfolg, evaluiert in den verschiedenen Modalitäten DSA, MRT und makroskopische Pathologie

Die Ergebnisse der Bildgebung DSA und MRT stimmen vollständig überein. In 62,5 % bzw. 75,0 % der Fälle wurde der Zielscore 1 (Selektive Embolisation des kaudalen Nierenpols) erreicht.

Teile dieser Tabelle finden sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

Die Auswertungen zeigten, dass die bildgebenden Verfahren DSA und MRT in den Analysen vollständig übereinstimmten. Die Ergebnisse beider Modalitäten zeigten, dass in fünf von acht Fällen (62,5 %) der Zielscore 1 (Selektive Embolisation des kaudalen Nierenpols) erreicht wurde. Insgesamt wurden für die DSA und MRT fünfmal der Score 1, zweimal der Score 2 und einmal der Score 3 vergeben. In der makroskopischen Pathologie wurde sechsmal der Score 1 vergeben, einmal jeweils Score 2 und Score 3. Die Auswertungen der makroskopischen Pathologie ergaben ein Erreichen des Zielscores in 75,0 % der Versuche (sechs von acht Tieren). Eine Überembolisation erfolgte in einem von acht Tieren (12,5 %). In der statistischen Auswertung resultierten diese Ergebnisse in einem Kappa-Wert von 0,742 bei einer Signifikanz von 0,004. Dies repräsentiert einen substantiellen Übereinstimmungsgrad (140) und bestätigt die erfolgreiche Embolisation.

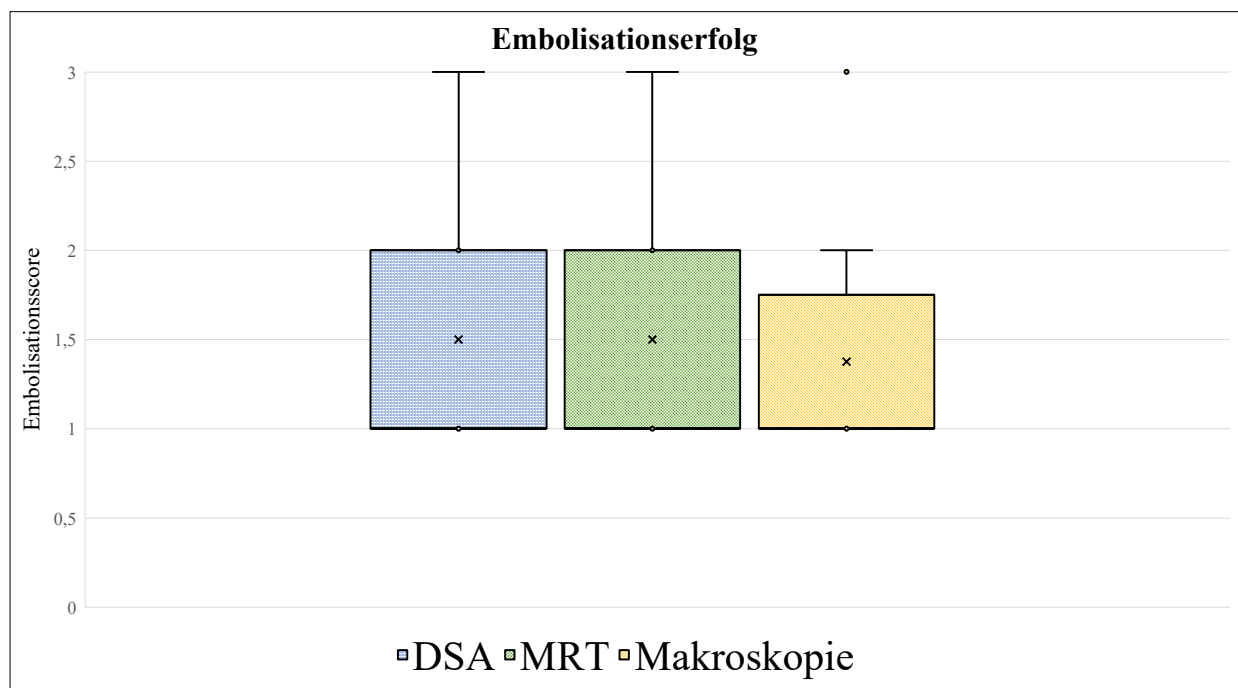


Abbildung 24: Embolisationserfolg in den Modalitäten DSA, MRT und makroskopische Pathologie – Statistik

Die Ordinate zeigt den Mittelwert (x) und Quartilsabstände in der jeweiligen Modalität, welche auf der Abszisse dargestellt ist. Als Zielscore wurde der Score 1 (Selektive Embolisation des kaudalen Nierenpols) definiert. Statistisch ergab sich ein Kappa-Koeffizient nach Cohen von 0,742.

Die Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

Abbildung 25 zeigt, wie sich auch nach dem Beobachtungsintervall die statistischen Ergebnisse in der Bildgebung und in den pathologischen Aufnahmen widerspiegeln. Das Tier im Akutversuch

wurde von allen Auswertungen ausgenommen, da hier eine nicht-selektive Embolisation beabsichtigt war.

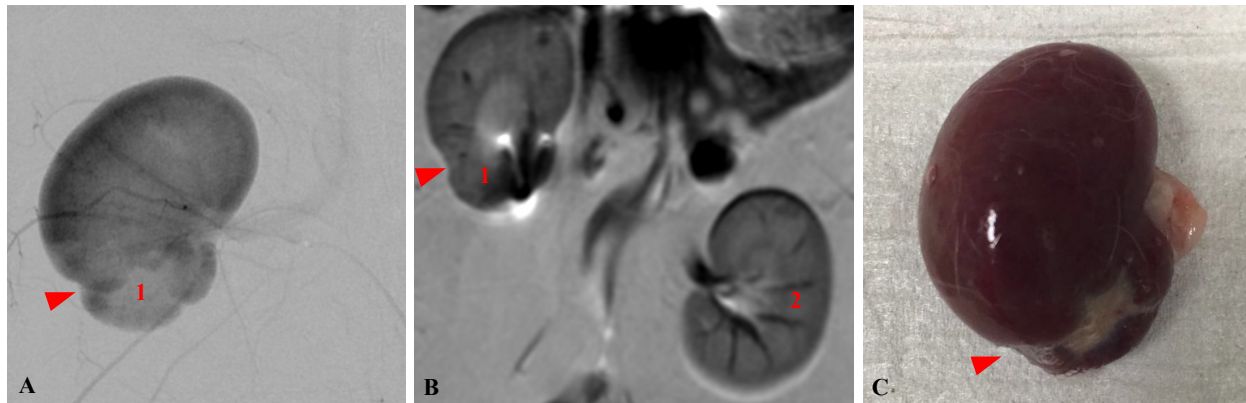


Abbildung 25: Embolisierungserfolg in den Modalitäten DSA, MRT und makroskopische Pathologie – Bildgebung nach acht Wochen

A. DSA in parenchymaler Phase. Eindrücklich sind die jeweils mit rotem Pfeil markierten Infarktareale mit narbigen Einziehungen im Bereich des kaudalen Nierenpols (1), welche in allen Modalitäten kongruent zu erkennen waren.

B. MRT in T2 gewichteter TSE Sequenz in koronarer Schnittführung. 1. Kaudaler embolisierter Nierenpol mit Nachweis der SPIO-beladenen Partikel | 2. Gesunde, nicht embolisierte kontralaterale Niere.

C. Makroskopische Pathologie: Deutlich zu erkennen ist der embolisierte Bereich des kaudalen Nierenpols. Hier ist es zu einer Hypotrophie mit Einziehungen und weißlichen Veränderungen gekommen, welche narbigen Veränderungen entsprechen (roter Pfeil beispielhaft).

Die Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

Die Histopathologie lieferte ergänzende aufschlussreiche Ergebnisse, welche mit dem Embolisierungsscore korrelierten. Abbildung 26 zeigt bspw. wie sich die Embolisation nach einer Woche noch nicht mit einem infarzierten, fibrotisch umgewandelten Areal, sondern mit hämorrhagischem Randsaum und devitalisiertem Gewebe sowie Verlust der Kernfärbbarkeit als Zeichen einer Koagulationsnekrose darstellte. In Tabelle 11 ist eine Übersicht zum Aufkommen der Koagulationsnekrose, Fibrose und Verkalkung zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten notiert.

Tier	Beobachtungsintervall	Koagulationsnekrose	Fibrose	Verkalkung
Kaninchen 1	4 Wochen	Ausgeprägt	Moderat - Ausgeprägt	Ausgeprägt
Kaninchen 2	4 Wochen	Ausgeprägt	Moderat - Ausgeprägt	Ausgeprägt
Kaninchen 3	8 Wochen	Leicht	Moderat	Ausgeprägt
Kaninchen 4	16 Wochen	Keine	Ausgeprägt	Ausgeprägt
Kaninchen 5	12 Wochen	Keine	Moderat - Ausgeprägt	Ausgeprägt
Kaninchen 6	12 Wochen	Keine	Moderat - Ausgeprägt	Ausgeprägt
Kaninchen 7	12 Wochen	Keine	Ausgeprägt	Ausgeprägt
Kaninchen 8	1 Woche	Moderat - Ausgeprägt	Keine - Leicht	Leicht - Moderat
Kaninchen 9	Akuttier	Keine	Keine	Keine

Tabelle 11: Ergänzende Beobachtungen zum Embolisationserfolg in der Mikroskopie

Während im Akuttier noch keine Veränderungen zu erkennen waren, zeigte sich insbesondere nach einer Woche eine ausgeprägte Koagulationsnekrose. Im Laufe der Beobachtungsintervalle bildeten sich zunehmend Fibrosierungen und Verkalkungen, insbesondere zu den Zeitpunkten von zwölf und 16 Wochen.

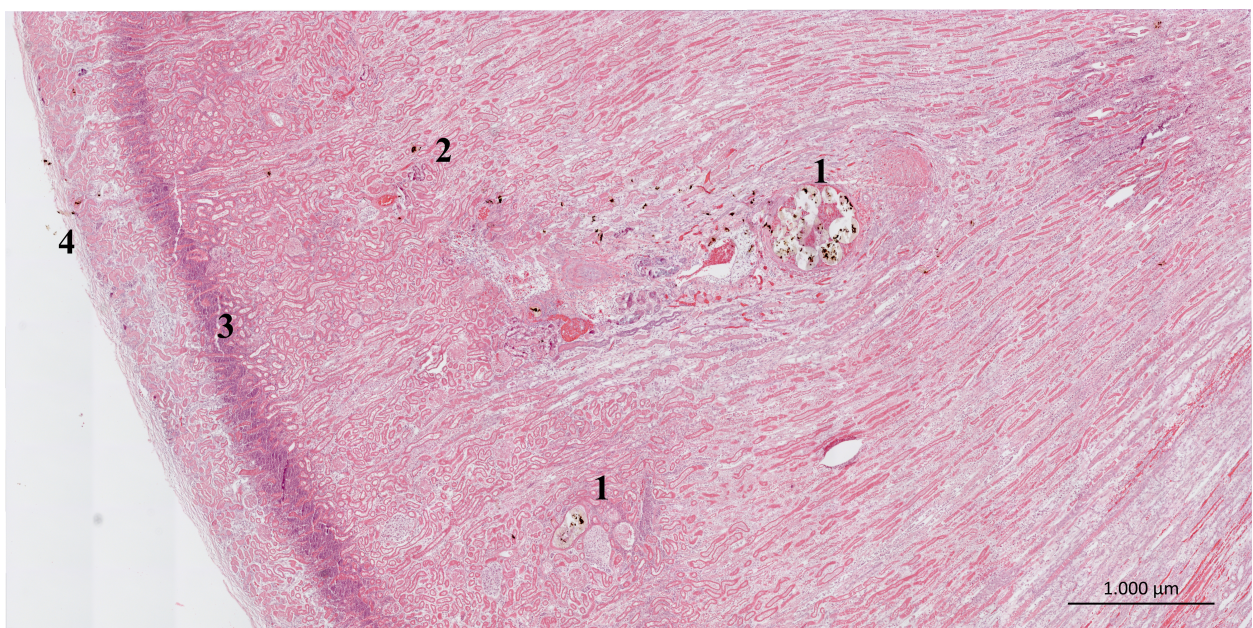


Abbildung 26: Embolisationserfolg – Mikroskopisches Korrelat nach einer Woche (H&E Färbung)

Nach einer Woche entstand noch kein fibrotischer Gewebeumbau mit narbiger Einziehung, jedoch lässt sich der Niereninfarkt histopathologisch abgrenzen.

1. Embolisatpartikel in Querschnitt eines arteriellen Gefäßes |
2. Einzelne Partikelreste, herausgebrochen durch den Schneidevorgang der histopathologischen Gewebeaufbereitung |
3. Hämorrhagischer Randsaum mit Einwanderung von Entzündungszellen zur Resorption und angrenzend devitalisiertes Parenchym mit Verlust der Kernfärbbarkeit |
4. Nierenkapsel

Abbildung 27 illustriert den Grad unterschiedlicher Verkalkungsgrade.

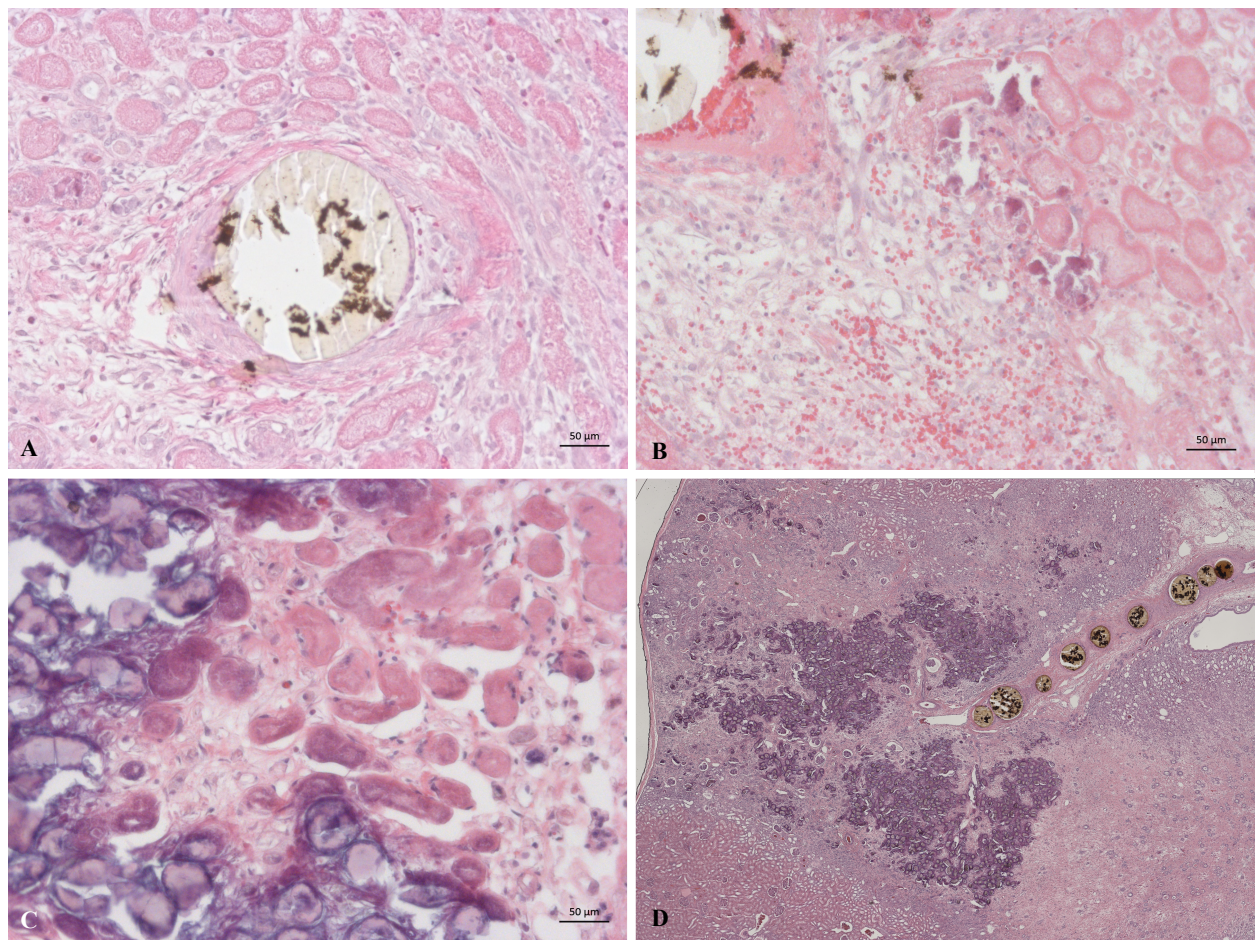


Abbildung 27: Verkalkung – Mikroskopische Gradeinteilung (H&E Färbung)

- A. Keine Verkalkung
- B. Leichte Verkalkung (dunkel-violett) mit jedoch Verlust der Kernfärbbarkeit der Tubuli (rosa) als akuter Ischämienachweis und Proteinpräzipitaten als Nekrosehinweis
- C. Moderate Verkalkung
- D. Ausgeprägte Verkalkungsformationen unmittelbar anschließend an eine „Straße“ aus aufgereihten Mikrosphären, welche das zuführende Gefäß komplett embolisiert haben

In Abbildung 28 zeigt sich, wie die makroskopischen Narbenstränge mit Volumenverlust aus Abbildung 25 C mit den histopathologischen fibrotischen Einziehungen übereinstimmten.

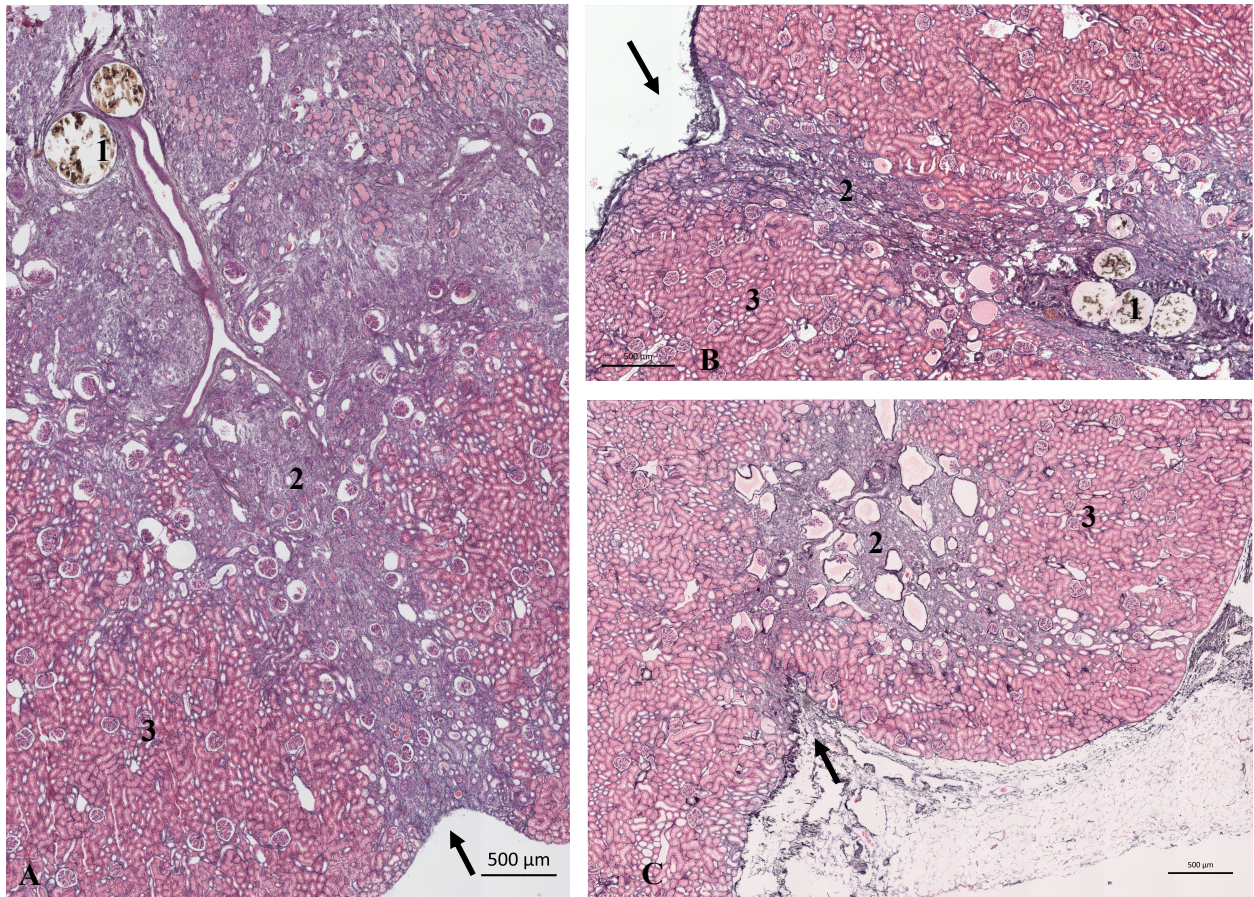


Abbildung 28: Embolisationserfolg – Korrelate in verschiedenen, späteren Zeitpunkten (JMS Färbung)

Für die Beurteilung der Fibrose erwies sich die Jones' Methenamine Silber Färbung als besonders geeignet. Bild A zeigt den Infarkt nach vier Wochen, B nach zwölf Wochen und Bild C nach 16 Wochen. Der fibrotisch umgebauter Bereich ist in der Jones' Methenamine Silber Färbung besonders gut zu erkennen und schwarz-violett angefärbt (2). Das gesunde Nierenparenchym, welches nicht vom Niereninfarkt betroffen war, zeigt sich rot (3). In Bild A und B sind die Embolisatpartikel zu erkennen (1), welche nach 16 Wochen nahezu vollständig abgebaut und in Aufnahme C nicht mehr nachweisbar sind. Deutlich zu erkennen und durch Pfeile markiert in allen Bildern sind die durch narbige Einziehungen bedingten Oberflächendefekte, welche mit den Defekten aus der Bildgebung und Makroskopie korrelierten.

In Abbildung 29 ist der obstruktive Effekt der Embolisatpartikel histopathologisch veranschaulicht. Zu einer effektiven Embolisation könnte auch die Formierung von thrombotischem Gewebe um die intravaskulären Mikrosphären (Abbildung 30) beigetragen haben.

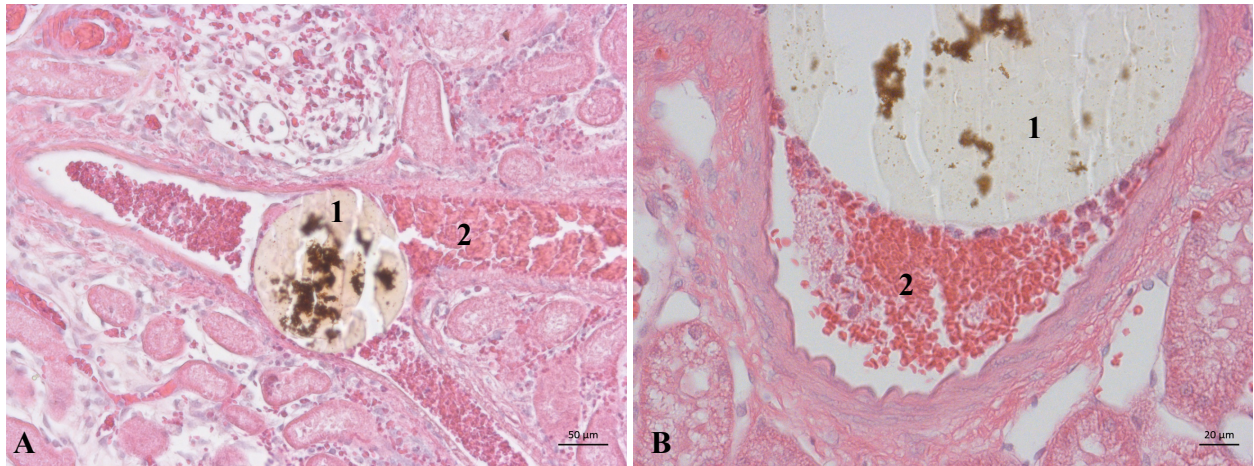


Abbildung 29: Embolisierungserfolg – Ansammlung von Erythrozyten als Hinweis für obstruktiven Effekt der Mikrosphären nach einer Woche und im Akutversuch (H&E Färbung)

1. SPIO-beladene Mikrosphäre; weiße Risse bedingt durch den Schneidevorgang der histopathologischen Gewebeaufbereitung | 2. Erythrozytenansammlung

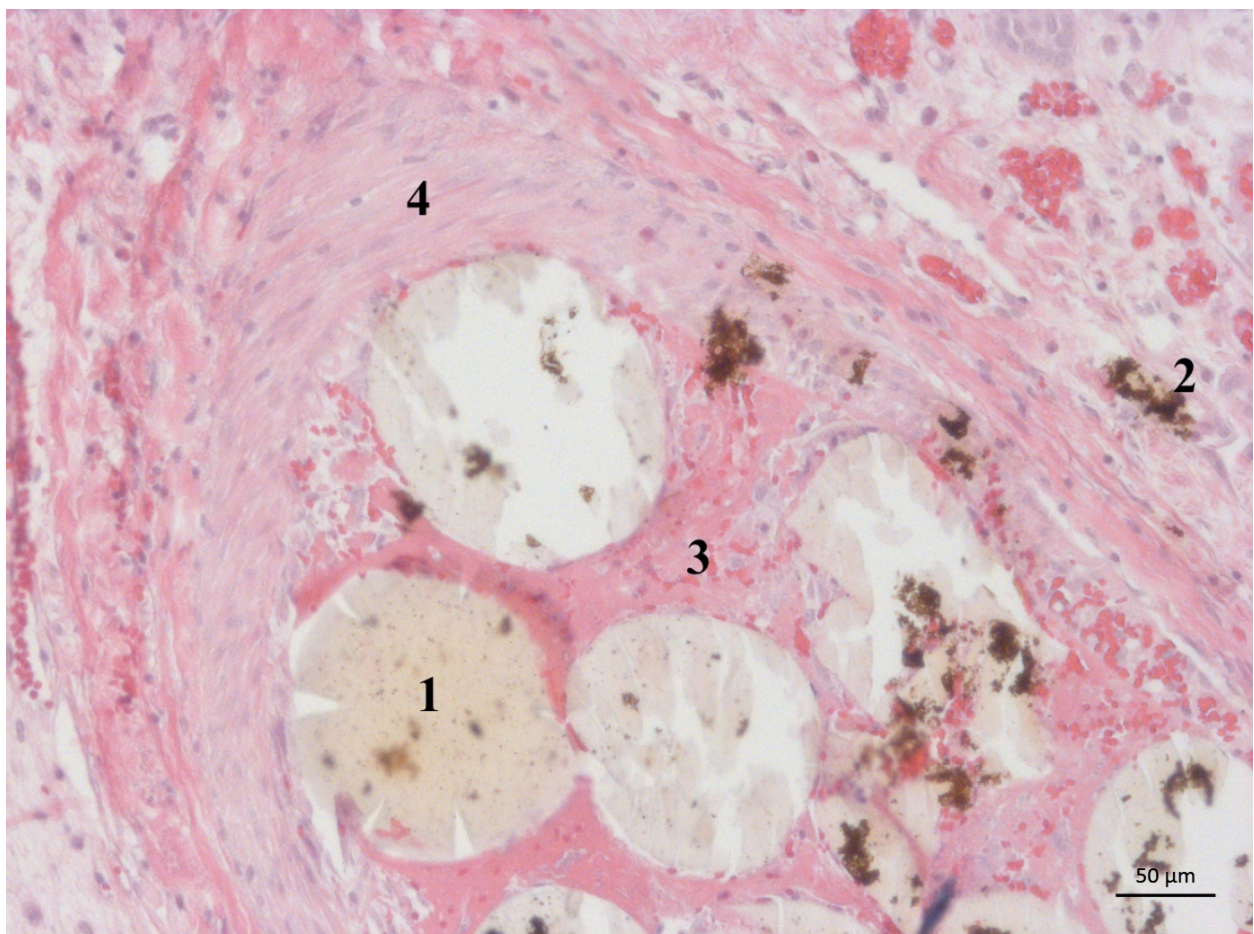


Abbildung 30: Embolisierungserfolg – Ausbildung von thrombotischem Gewebe zwischen den Mikrosphären nach einer Woche (H&E Färbung)

1. SPIO-beladene Mikrosphären | 2. Herausgebrochene Mikrosphärenanteile durch den Schneidevorgang der histopathologischen Gewebeaufbereitung | 3. Thrombotische Formationen aus Fibrin, Lymphozyten und Makrophagen | 4. *Tunica media*

4.3 Reperfusion

Die Ergebnisse des dritten Zielparameters basieren auf Auswertungen der Angiogramme nach der Embolisation und direkt vor der Euthanasie. In Tabelle 12 sind die einzelnen Werte des Punktesystems pro Tier und zugehörigem Beobachtungsintervall zusammengefasst.

Tier	Reperfusionsscore Post-embolisation	Reperfusionsscore Kontrollangiogramm	Qualität der Reperfusion	Beobachtungsintervall
Kaninchen 1	2	1	Partiell	4 Wochen
Kaninchen 2	2	1	Partiell	4 Wochen
Kaninchen 3	2	1	Partiell	8 Wochen
Kaninchen 4	1	0	Vollständig	16 Wochen
Kaninchen 5	2	0	Vollständig	12 Wochen
Kaninchen 6	2	0	Vollständig	12 Wochen
Kaninchen 7	2	0	Vollständig	12 Wochen
Kaninchen 8	2	2	Keine	1 Woche
Kaninchen 9	3	-	-	Akuttier

Tabelle 12: Übersicht der Auswertungen des Reperfusionsscores

Insgesamt wurden neun Kaninchen untersucht (Spalte 1, von links nach rechts). Bewertet wurden jeweils die Punkte im Angiogramm direkt nach der Embolisation (Spalte 2) und im Kontrollangiogramm vor der Euthanasie (Spalte 3); das Tier im Akutversuch erhielt keine Kontrollangiographie. Bewertet wurde zudem der Grad der Reperfusion (Spalte 5) in Korrelation zum jeweiligen Beobachtungsintervall (Spalte 5).

Teile dieser Tabelle finden sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

Für das Akuttier, welches unmittelbar nach der Embolisation euthanasiert wurde und kein Kontrollangiogramm erhalten hatte, wurde lediglich das Embolisationsangiogramm bewertet. Insgesamt zeigten vier Tiere eine vollständige Reperfusion, drei Tiere eine partielle Reperfusion und ein Tier keine Reperfusion der embolisierten Arterienäste. Die Tiere, welche eine vollständige

Reperfusion zeigten, waren allesamt im Beobachtungsintervall von zwölf bis 16 Wochen. Jene Tiere, welche eine partielle Reperfusion zeigten, waren im Beobachtungsintervall von vier bis acht Wochen. Über eine Woche Beobachtungszeitraum wurde keine Reperfusion festgestellt. Insgesamt wurde im Post-Embolisationsangiogramm in sieben von neun Tieren eine Embolisation auf Höhe der *Aa. interlobares* und je einmal auf Höhe der *Aa. segmenti* und der *Aa. arcuatae* erreicht. Im Kontrollangiogramm wurde insgesamt in einem von acht Tieren ein Verschluss auf Höhe der *Aa. interlobares* festgestellt sowie dreimal auf Höhe der *Aa. arcuatae*. Ein Verschluss der Segmentarterien wurde im Kontrollangiogramm nicht beobachtet. Die Anwendung des semiquantitativen Punktesystems ergab folgende Ergebnisse: Im Mittel wurde im Post-Embolisationsangiogramm ein Punktwert von 2,0 erreicht, was somit im Durchschnitt einer Embolisation auf Höhe der *Aa. interlobares* entspricht. Der Median betrug ebenfalls 2,0. Im Kontrollangiogramm verringerte sich der Mittelwert auf 0,625 Punkte, der Median betrug 0,5 bei einem Quartilsabstand von 1. Statistisch entsprach dies einem p-Wert von 0,015 im Wilcoxon signed-rank Test (Abbildung 31). Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen jeweils ein Bildbeispiel einer vollständigen bzw. partiellen Reperfusion.

In der ergänzenden histopathologischen Auswertung zeigten sich ebenfalls nach frühestens acht Wochen Zeichen der Rekanalisation (Abbildung 34). Inwiefern dieses Phänomen zu einer angiographischen Reperfusion beitragen kann, wird in Kapitel 5.2.3 diskutiert.

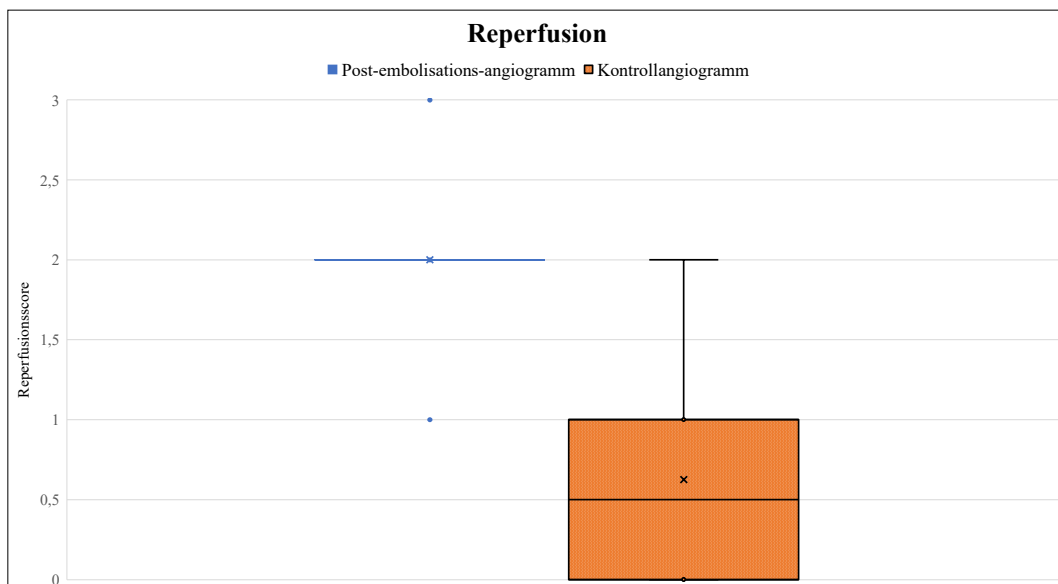


Abbildung 31: Auswertung des Reperfusionsscores

Auf der Ordinate ist der Punktwert aufgetragen, die Abszisse bildet die beiden Auswertungszeitpunkte ab. Der Mittelwert direkt nach der Embolisation betrug 2,0. Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes fiel der Wert auf 0,625. $p = 0,015$ (Wilcoxon signed-rank Test).

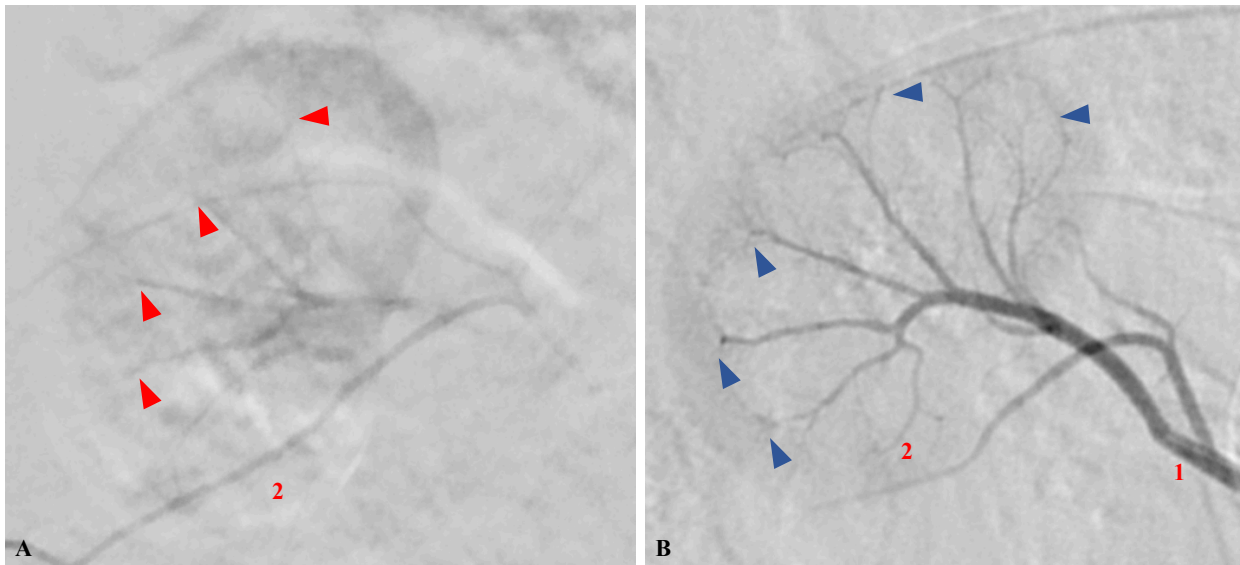


Abbildung 32: Vollständige Reperfusion nach 16 Wochen

Die roten Pfeile in Bild A zeigen auf einen Abbruch der *Aa. arcuatae*, die unmittelbar nach der Embolisation verschlossen und sich nicht mit Kontrastmittel füllten.

Im Kontrollangiogramm nach 16 Wochen Beobachtungzeit (B) scheinen alle Gefäße (blaue Pfeile) sowie, im Vergleich zu Bild A, das kaudale Nierenparenchym regelrecht perfundiert.

1. *A. renalis* mit Katheterspitze | 2. Kaudales Nierenparenchym

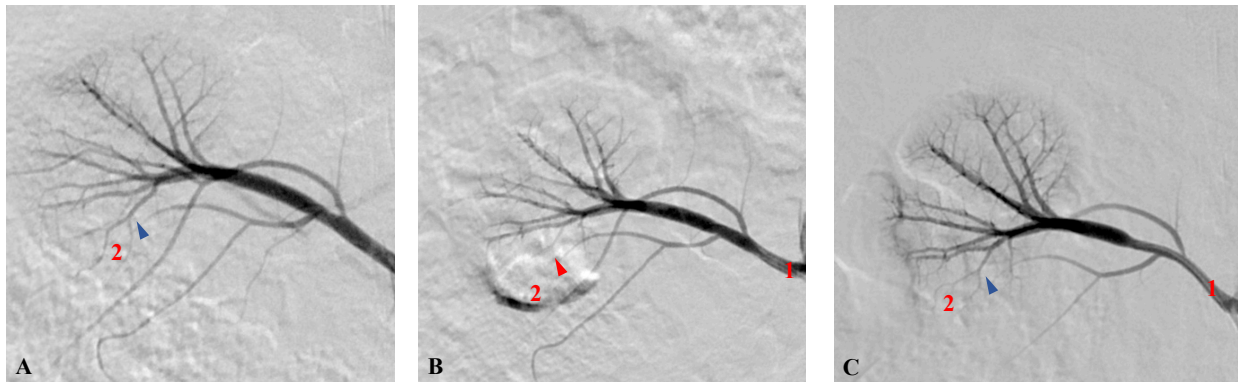


Abbildung 33: Partielle Reperfusion nach acht Wochen

A. Angiogramm vor der Embolisation. Der blaue Pfeil markiert ein gut perfundiertes Gefäß des Unterpols.

B. Angiogramm unmittelbar nach Embolisation. Der rote Pfeil zeigt auf einen Abbruch auf Höhe der Interlobararterien. Diese sind durch die Embolisation verschlossen und nicht mit Kontrastmittel gefüllt.

C. Im Kontrollangiogramm nach acht Wochen Beobachtungzeit scheinen die Gefäße auf dieser Höhe (blauer Pfeil) im Vergleich zu Bild B regelrecht perfundiert – jedoch auf Höhe der *Aa. arcuatae* noch nicht vollständig perfundiert, insbesondere im bildinternen Vergleich zum kranialen Nierenpol, wo sich mannigfaltige Verzweigungen erkennen lassen.

1. *A. renalis* mit Katheterspitze | 2. Kaudaler Nierenpol

Teile dieser Abbildung finden sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2020.

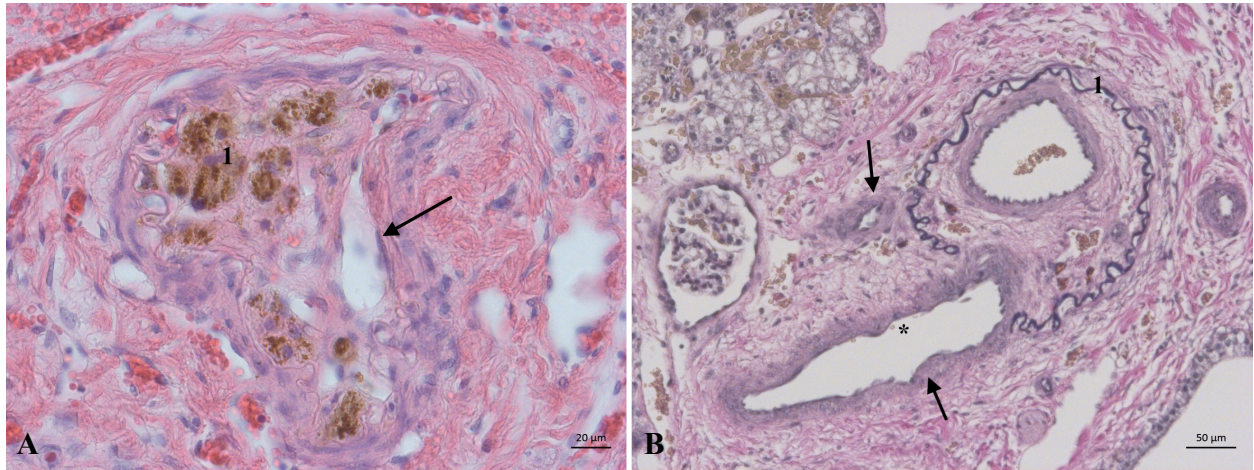


Abbildung 34: Rekanalisation embolisierter Gefäße nach acht und 16 Wochen (H&E und EVG Färbung)

A. H&E Färbung: Extensiver Abbau der Mikrosphäre mit lediglich residuellen SPIO-Elementen (1). Intravaskulär zeigt sich eine Einsprossung von kapillären Blutgefäßen und Lumenbildung im Sinne einer beginnenden Neoangiogenese (Pfeil).

B. EVG Färbung: Die Pfeile zeigen auf zwei teils dickwandigere sekundäre Lumina als Hinweis für eine Revaskularisation nach 16 Wochen. Der Stern im Gefäßlumen indiziert eine Perfusion des Gefäßes.

1. MEI des ursprünglich embolisierten Gefäßes.

Diese Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

4.4 Sichtbarkeit der Embolisatpartikel in der MRT

Bei einem von neun Tieren (Kaninchen 7, „G0112/14-20, Tät.-Nr. D36520“) wurde direkt nach der Embolisation eine leichte Tachypnoe festgestellt. Da diese auch nach Zuwarten von ca. 30 Minuten nicht selbstständig sistierte, wurde in diesem Fall auf die protokollgemäße Anfertigung einer post-interventionellen MRT-Untersuchung zugunsten einer raschen Beendigung der Narkose zum Wohle und zur Sicherheit des Versuchstieres verzichtet.

Für die T1_TSE Sequenz vor und nach Kontrastmittelgabe kann festgehalten werden: Die Nieren zeigten nach Kontrastmittelgabe ein starkes parenchymales Enhancement, sodass der Kontrast zwischen gesundem Nierengewebe und Niereninfarkt stärker ist als in der Nativ-Bildgebung. Die T2_TSE Sequenz eignete sich besonders gut, um das Nierenparenchym vom Nierenbeckenkelchsystem zu differenzieren.

Bei allen Kaninchen außer Kaninchen 7 wurde sowohl nach der Embolisation als auch vor der Euthanasie eine Kontroll-MRT durchgeführt. Zu allen Zeitpunkten und in allen Sequenzen waren in der embolisierten Niere ausnahmslos embolisatbedingte Signalalterationen zu erkennen (Tabelle 13).

MRT Sequenz									
Tier	Post-Embolisation				Prä-Euthanasie				
		T1 tse	T1 tse post KM	T2 tse	T2*	T1 tse	T1 tse post KM	T2 tse	T2*
	Kaninchen 1	ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
	Kaninchen 2	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
	Kaninchen 3	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
	Kaninchen 4	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
	Kaninchen 5	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
	Kaninchen 6	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
	Kaninchen 7	-	-	-	-	Ja	Ja	Ja	Ja
	Kaninchen 8	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Kaninchen 9	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	

Tabelle 13: Sichtbarkeit: Übersicht aller MRT Sequenzen zu allen Zeitpunkten und die Abgrenzbarkeit der SPIO Signalalterationen

Dies war insbesondere auch dann der Fall, wenn wie in Kapitel 4.3 beschrieben, angiographisch eine vollständige Reperfusion im Sinne einer kompletten Aufhebung des Gefäßverschlusses nachgewiesen wurde. Als sensitivste Sequenz für den Nachweis der SPIO-beladenen Mikrosphären stellte sich die T2* gewichtete Sequenz heraus, welche somit u.a. auch für die Fragestellung nach etwaigen Embolisationen außerhalb der Zielregion (Embolisatverschleppung) herangezogen wurde. Typisch für die T2* Sequenz ist die Darstellung eines starken Suszeptibilitätsartefakts, welches durch die SPIO verursacht wird.

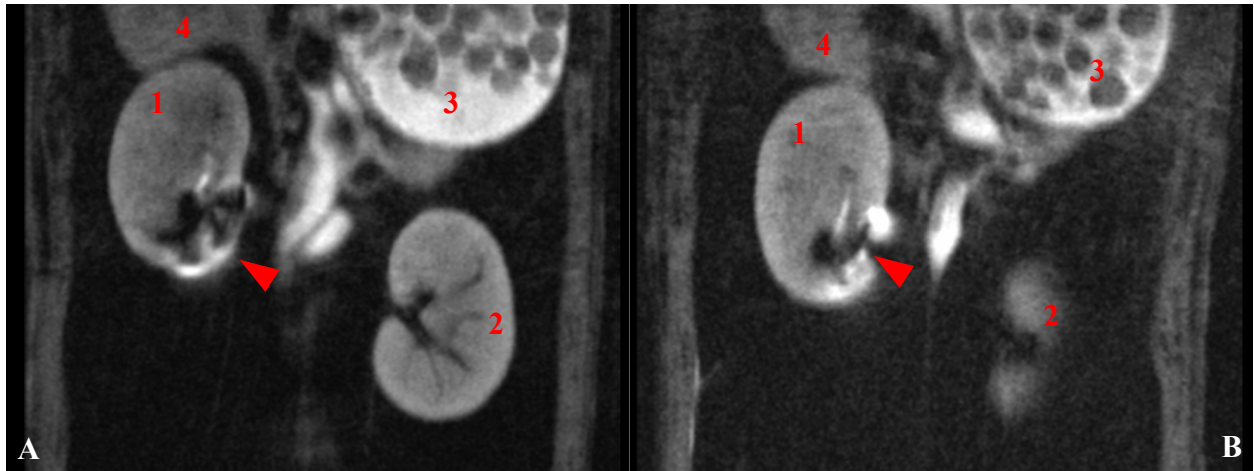


Abbildung 35: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T1 gewichteter TSE Sequenz ohne MRT-Kontrastmittel in koronarer Ebene

A. Aufnahmen am Tag Null direkt nach der Embolisation

B. Verlaufskontrolle nach zwölf Wochen

Die Pfeile markieren den embolisierten kaudalen Nierenpol, hier mit hypointensem Signal im Parenchym mit umgebender Hyperintensität

1. Rechte Niere | 2. Linke Niere (Anschnitt in B) | 3. Magen | 4. Leber (Anschnitt)

Diese Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

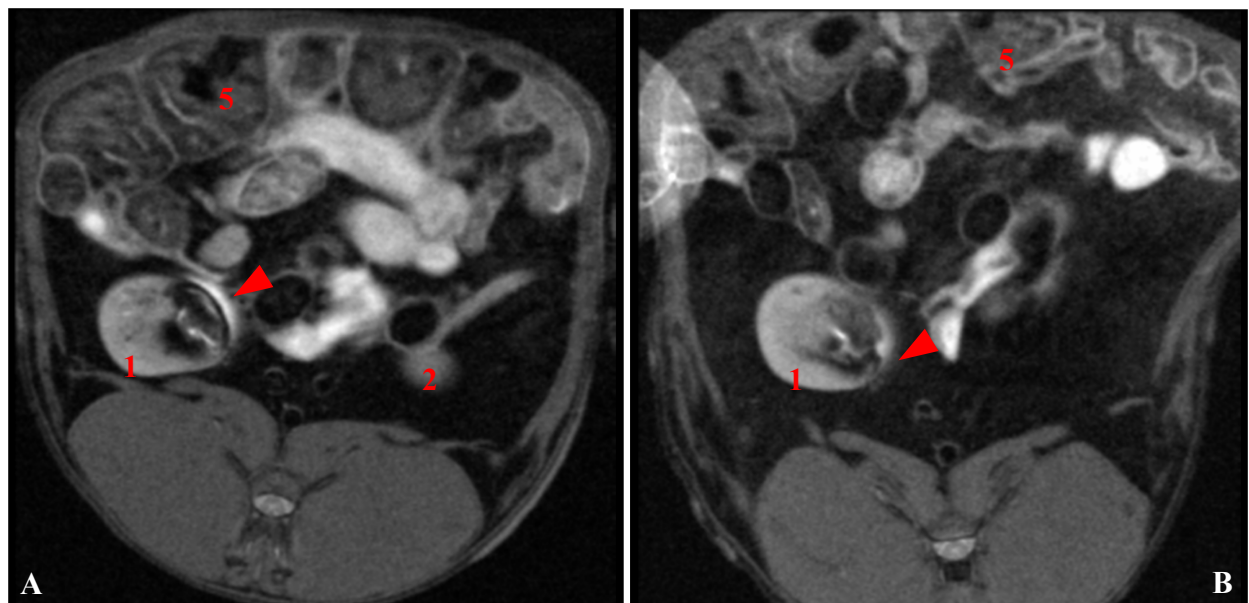


Abbildung 36: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T1 gewichteter TSE Sequenz ohne MRT-Kontrastmittel in transversaler Ebene

A. Aufnahmen am Tag Null direkt nach der Embolisation

B. Verlaufskontrolle nach zwölf Wochen

Die Pfeile markieren den embolisierten kaudalen Nierenpol, erneut mit hypointensem Signal im Parenchym mit umgebender Hyperintensität. 1. Rechte Niere | 2. Linke Niere (Anschnitt) | 5. Darmschlingen

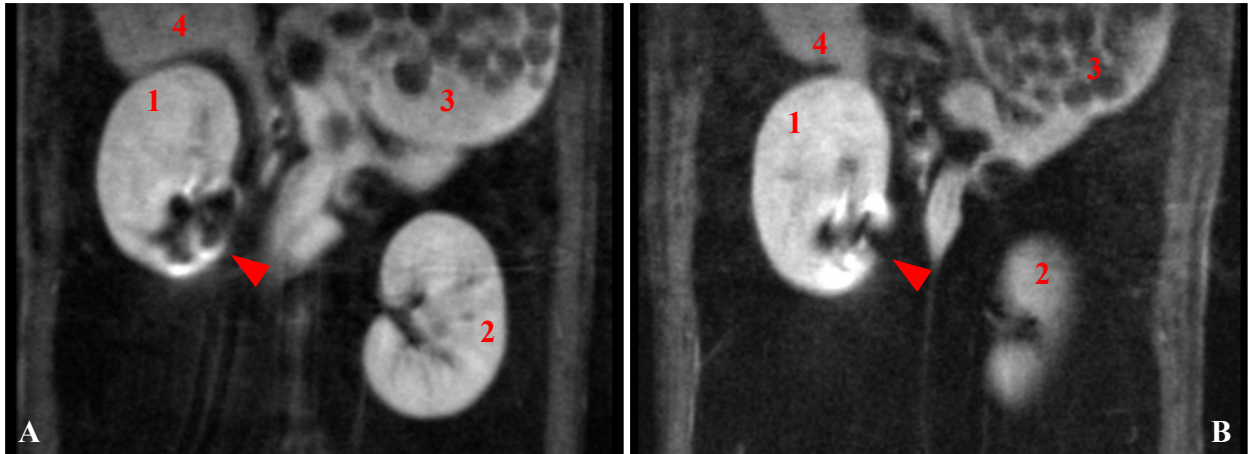


Abbildung 37: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T1 gewichteter TSE Sequenz nach MRT-Kontrastmittel in koronarer Ebene

Im Vergleich zur Nativbildgebung zeigt sich nach Kontrastmittelgabe eine starkes parenchymales Enhancement des gesunden Nierengewebes, was den Kontrast zum Embolisationsareal erhöht

A. Aufnahmen am Tag Null direkt nach der Embolisation

B. Verlaufskontrolle nach zwölf Wochen

Die Pfeile markieren den embolisierten kaudalen Nierenpol, erneut mit hypointensem Signal im Parenchym mit umgebender Hyperintensität

1. Rechte Niere | 2. Linke Niere (Anschnitt in B) | 3. Magen | 4. Leber (Anschnitt)

Diese Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

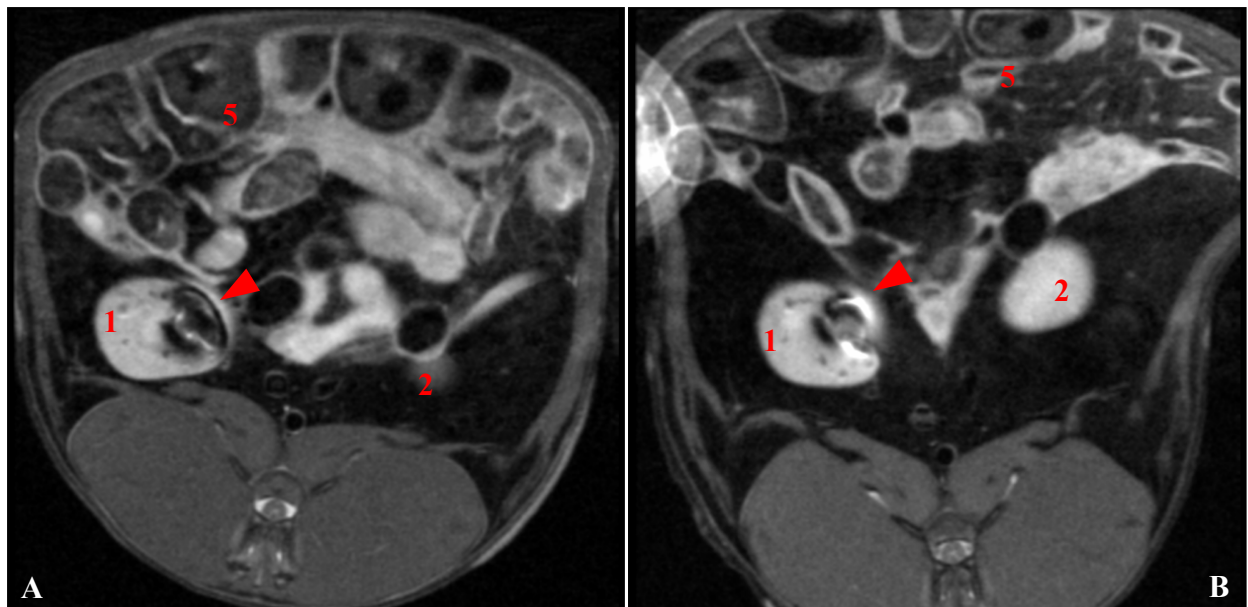


Abbildung 38: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T1 gewichteter TSE Sequenz nach MRT-Kontrastmittel in transversaler Ebene

A. Aufnahmen am Tag Null direkt nach der Embolisation

B. Verlaufskontrolle nach zwölf Wochen

Die Pfeile markieren den embolisierten kaudalen Nierenpol, wie in allen T1 Sequenzen mit oder ohne KM mit hypointensem Signal im Parenchym mit umgebender Hyperintensität

1. Rechte Niere | 2. Linke Niere (Anschnitt) | 5. Darmschlingen

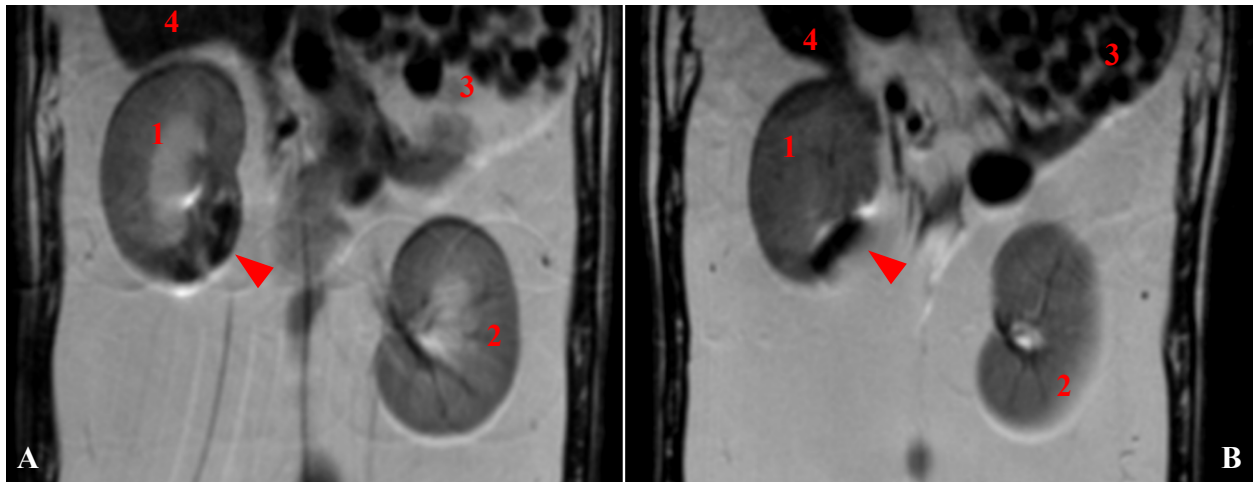


Abbildung 39: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T2 gewichteter TSE Sequenz in koronarer Ebene

In dieser Sequenz zeigt sich die gute Differenzierung von Nierenparenchym zum Nierenbeckenkelchsystem.

A. Aufnahmen am Tag Null direkt nach der Embolisierung

B. Verlaufskontrolle nach 12 Wochen

Die Pfeile markieren den embolisierten kaudalen Nierenpol, hier mit hypointensem Signal

1. Rechte Niere | 2. Linke Niere (Anschnitt in B) | 3. Magen | 4. Leber (Anschnitt)

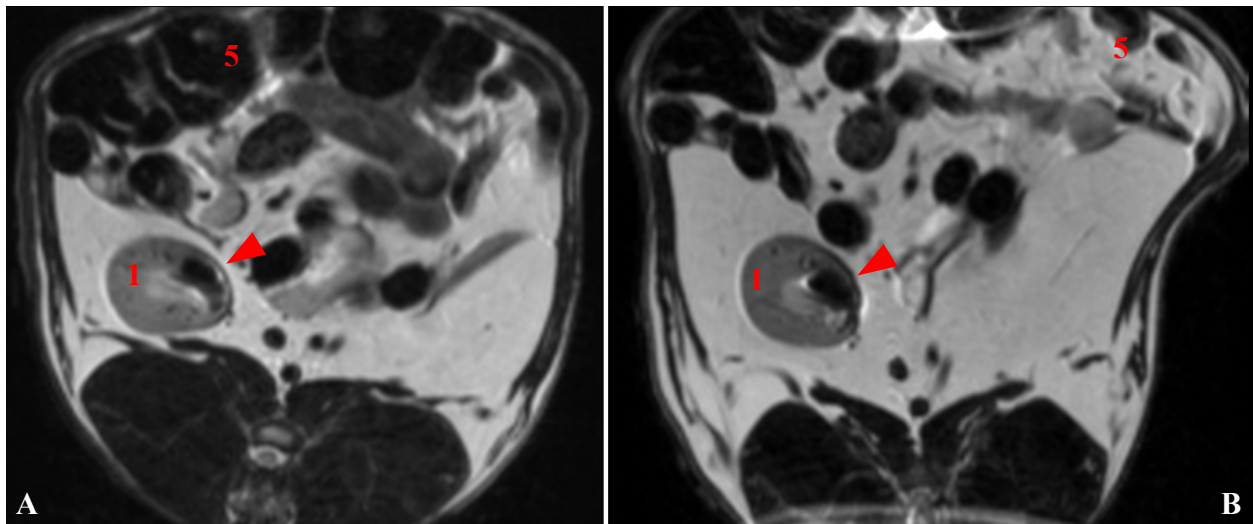


Abbildung 40: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T2 gewichteter TSE Sequenz in transversaler Ebene

A. Aufnahmen am Tag Null direkt nach der Embolisierung

B. Verlaufskontrolle nach 12 Wochen. Die Pfeile markieren den embolisierten kaudalen Nierenpol, hier mit hypointensem Signal

1. Rechte Niere | 5. Darmschlingen

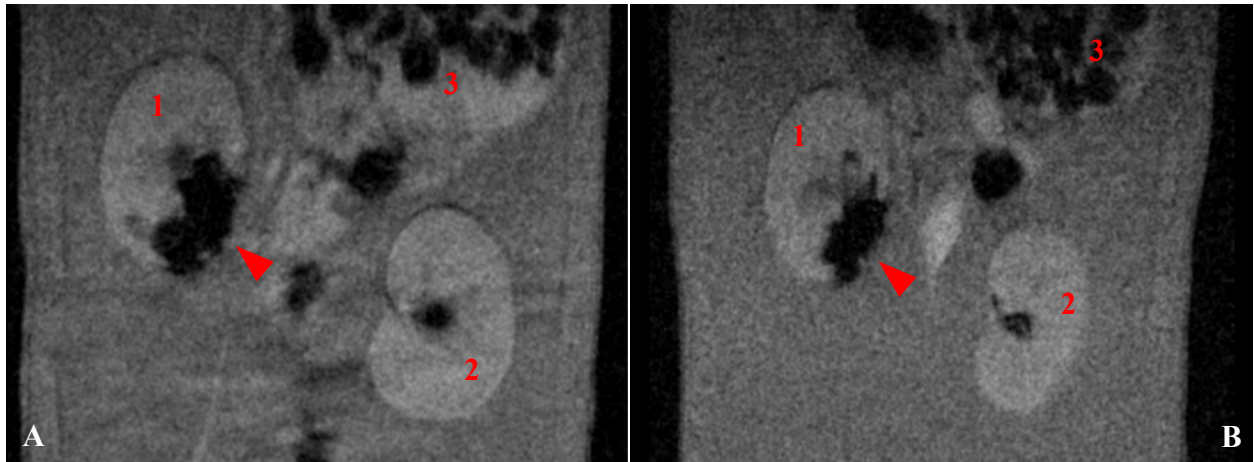


Abbildung 41: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T2* gewichteter Sequenz ohne MRT-Kontrastmittel in koronarer Ebene

A. Aufnahmen am Tag Null direkt nach der Embolisation

B. Verlaufskontrolle nach zwölf Wochen. Die Pfeile markieren den embolisierten kaudalen Nierenpol, hier mit deutlich hypointensem Signal, im Sinne eines SPIO-bedingten Suszeptibilitätsartefakts

1. Rechte Niere | 2. Linke Niere (Anschnitt in B) | 3. Magen

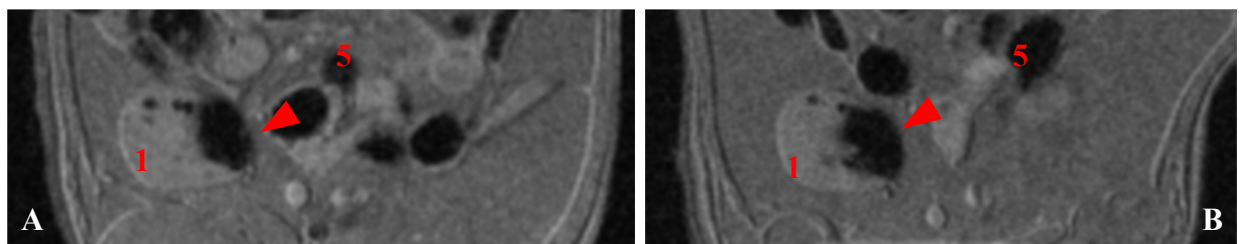


Abbildung 42: Sichtbarkeit des Embolisatmaterials: MRT in T2* gewichteter Sequenz ohne MRT-Kontrastmittel in transversaler Ebene

A. Aufnahmen am Tag null direkt nach der Embolisation

B. Verlaufskontrolle nach zwölf Wochen. Die Pfeile markieren den embolisierten kaudalen Nierenpol, erneut mit deutlich hypointensem Signal

1. Rechte Niere | 5. Darmschlingen

4.5 Bioresorbierbarkeit

Die Auswertung der Bioresorbierbarkeit der Embolisatpartikel – einschließlich dem Verhalten der SPIOs – erfolgte auf Basis des in Kapitel 3.4.5 erläuterten Punktesystems.

Mikrosphären ohne Degradationszeichen imponierten in sphärischer Form mit glatter Oberfläche, während Mikrosphären mit Abbaueichen in fragmentierter Form vorlagen und eine raue Oberfläche aufwiesen. Ferner zeigten Mikrosphären ohne Degradationszeichen eine homogene Binnenstruktur, während degradierte Mikrosphären vakuolisiert waren oder sogar Risse und

Löcher aufwiesen, die nicht etwaigen Schneideartefakten zuzuordnen waren. Mit zunehmender Resorption zeigte sich zudem eine gesteigerte zelluläre Beteiligung mit Infiltration inflammatorischer Zellen wie Lymphozyten, Fibroblasten sowie Monozyten und Makrophagen. Die folgenden Abbildungen zeigen anschaulich Beispiele der einzelnen Parameter, welche zu einer Veränderung des Scores führten. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich durch Auswertung von über 500 Mikrosphären eine Veränderung des Scores im Sinne einer zunehmenden Resorption der Partikel ($p < 0,001$), welche zunächst nahe der Originalstruktur erkennbar waren und mit zunehmenden Beobachtungsintervall zunächst einen leichten, dann einen moderaten und schließlich einen extensiven Abbau der Partikel zeigten. Abbildung 43 illustriert diesen fortschreitenden Degradationsprozess graphisch.

Die Auswertung mithilfe des entwickelten Scores bezieht sich auf den Abbau von Polydioxanon. Die SPIO-Elemente waren im gesamten Beobachtungszeitraum präsent und wurden im Zeitrahmen von 16 Wochen nicht vollständig abgebaut (siehe Kapitel 5.2.5).

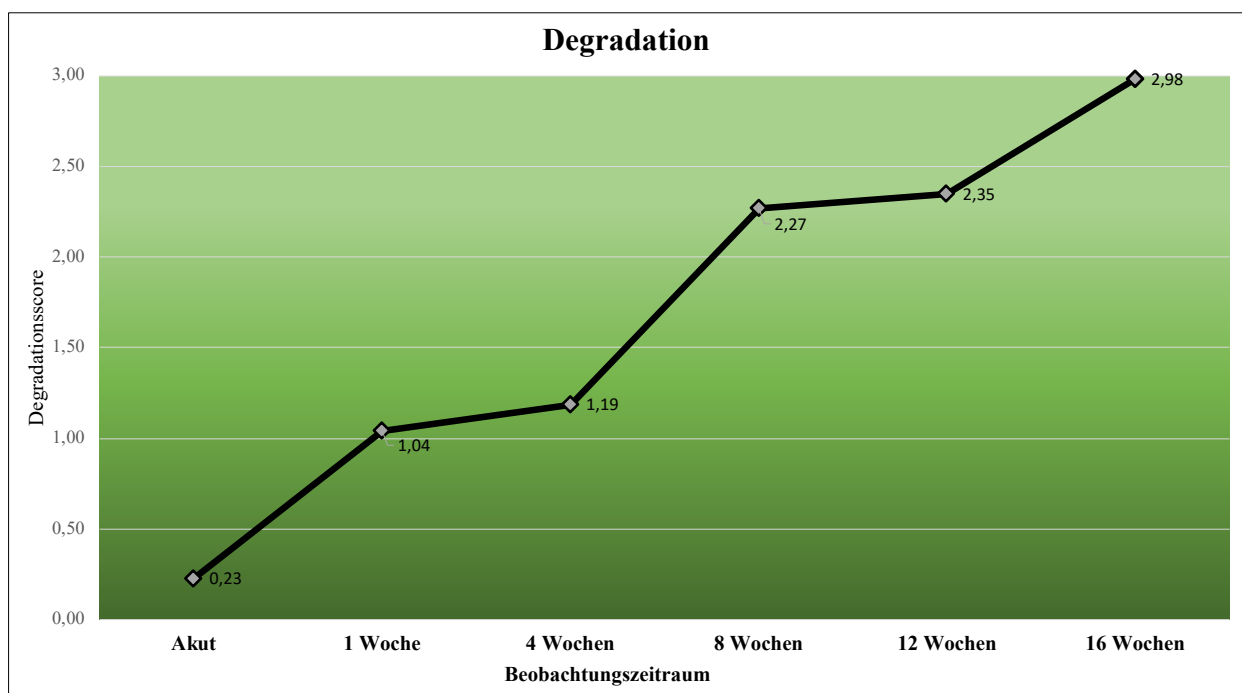


Abbildung 43: Abbau der SPIO-markierten Mikrosphären anhand des Embolisationsscores

Geringgradige Veränderungen nach einer Woche, deutliche Veränderungen im Zeitraum zwischen vier und acht Wochen, resultierend in einem Mittelwert von 2,27. Extensiver subtotaler Abbau zum Zeitpunkt von 16 Wochen. Der Farbverlauf spiegelt den Grad der Partikelstärke wider; Zu Beginn Originalstruktur (Dunkelgrün), im Verlauf zunehmender Abbau (Hellgrün).

Diese Abbildung findet sich in angelegter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

Während im Akutversuch nahezu keine Veränderungen nachgewiesen werden konnten (Degradationsscore 0,23; Median 0), waren zum Zeitpunkt von einer Woche leichte Veränderungen zu erkennen (Mittelwert 1,04; Median 1). Hier zeigten sich geringgradige Veränderungen der Form (nicht mehr gänzlich sphärisch) oder der Oberflächenbeschaffenheit (glatt zu rau, siehe Abbildung 45).

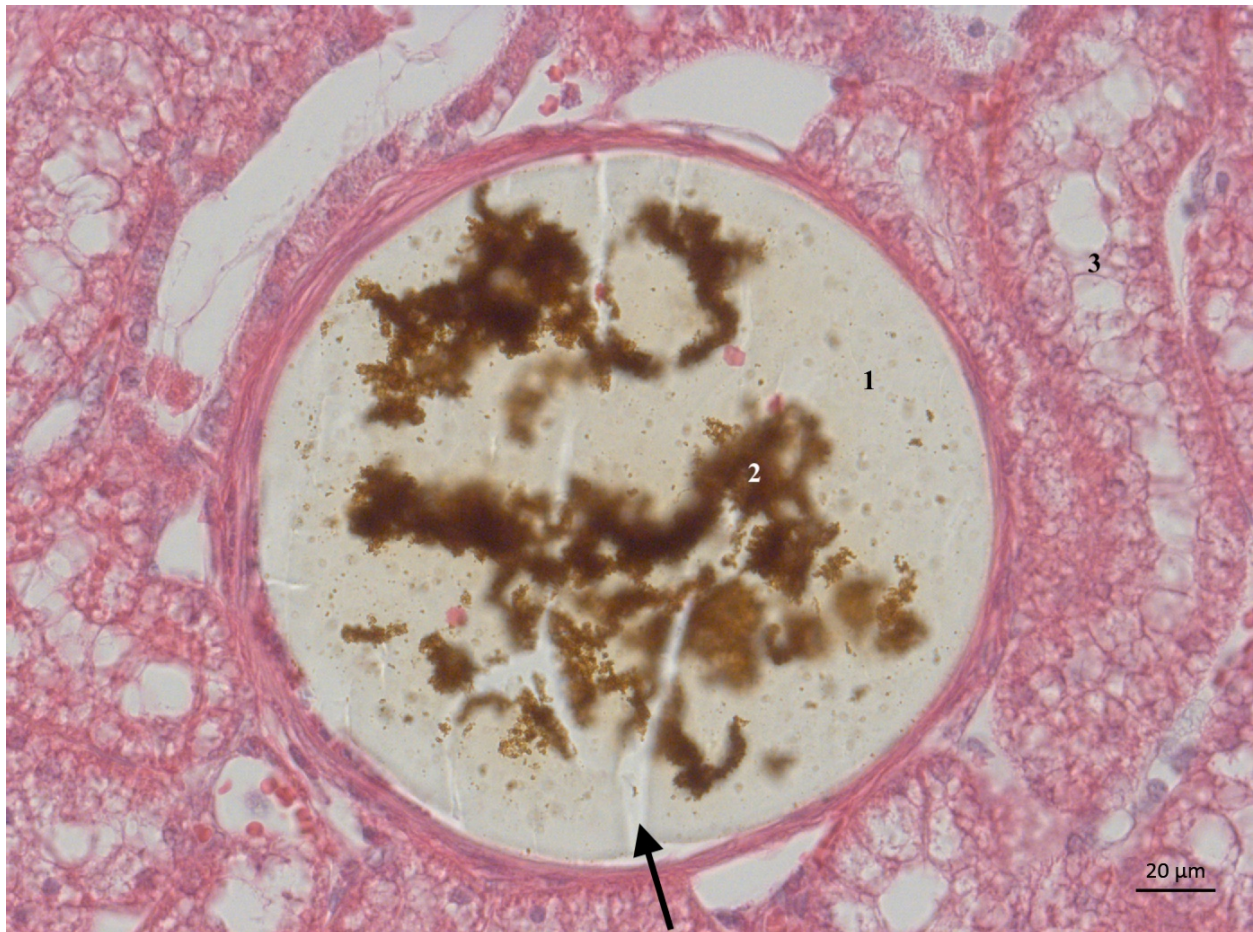


Abbildung 44: SPIO Partikel im Akutversuch – 0 Punkte / Degradationsscore 0 (H&E Färbung)

Die Nahaufnahme einer Mikrosphäre aus dem Akutversuch stellt sich hier in Originalstruktur dar. Die Form ist sphärisch. Es zeigen sich keine Veränderungen der Oberflächenbeschaffenheit, diese erscheint glatt. Die Binnenstruktur ist homogen. Die erkennbaren Defekte (Pfeil) wurden in der Gesamtschau als Schneideartefakte gewertet. Außerdem ließ sich keinerlei zelluläre Reaktion feststellen.

1. Normalstruktur des Embolisatmaterials | 2. SPIO-Elemente | 3. Nierenparenchym mit Tubulusstrukturen

Diese Abbildung findet sich in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

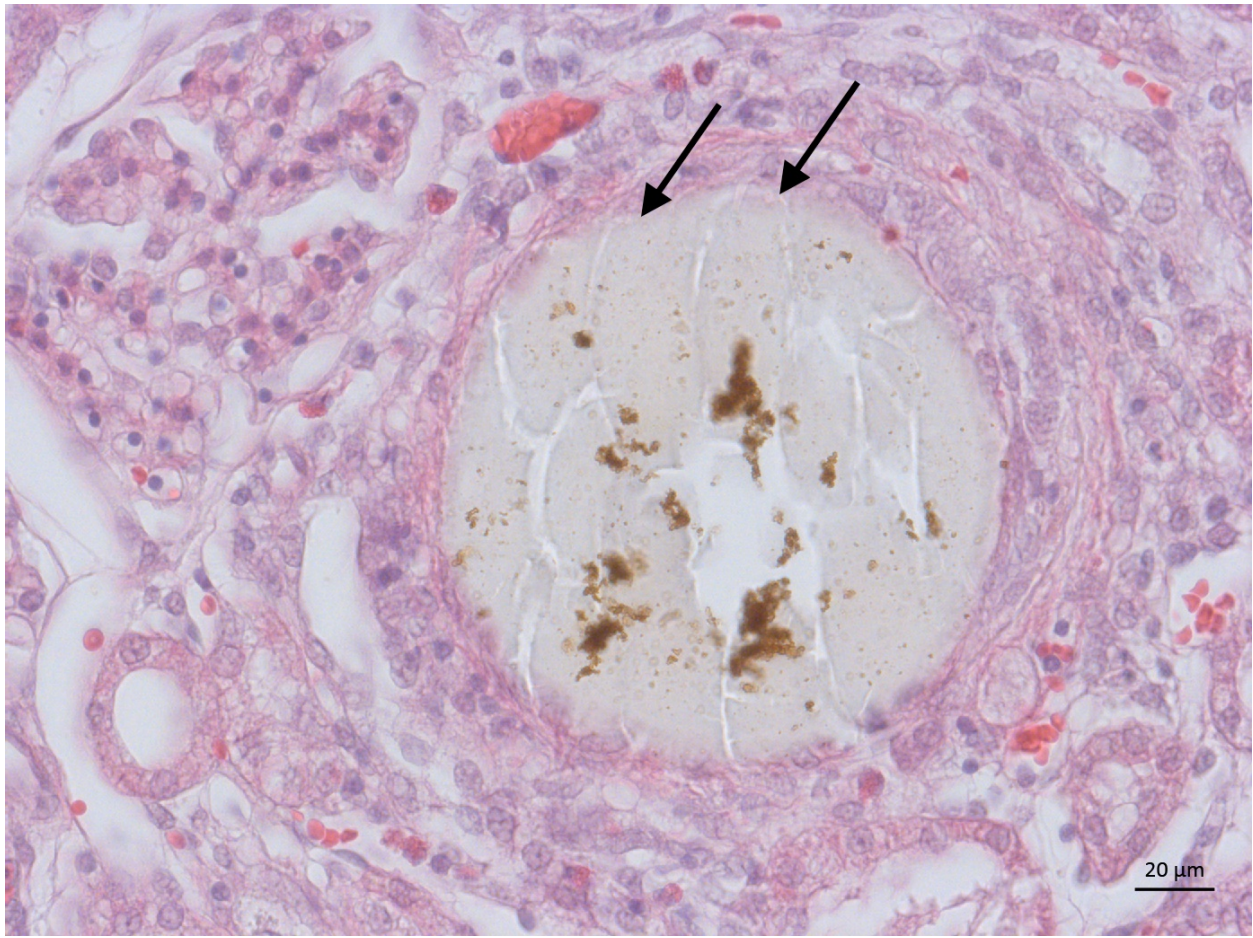


Abbildung 45: SPIO Partikel nach einer Woche – 1 Punkt / Degradationsscore 1 (H&E Färbung)

Die Nahaufnahme einer Mikrosphäre nach einer Woche Beobachtungsintervall zeigt beginnende Abbauanzeichen. Die Form ist weiterhin sphärisch. Die Oberfläche jedoch erscheint nun angeraut (Pfeile). Die Binnenstruktur ist unverändert homogen, wenn man von den bereits erwähnten Schneideartefakten absieht. Es lässt sich keine zelluläre Beteiligung i.S. einer Fremdkörperreaktion feststellen.

Diese Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

Innerhalb der nächsten drei Wochen konnte lediglich eine geringe Veränderung des Degradationsscores festgestellt werden (Mittelwert 1,19; Median 1).

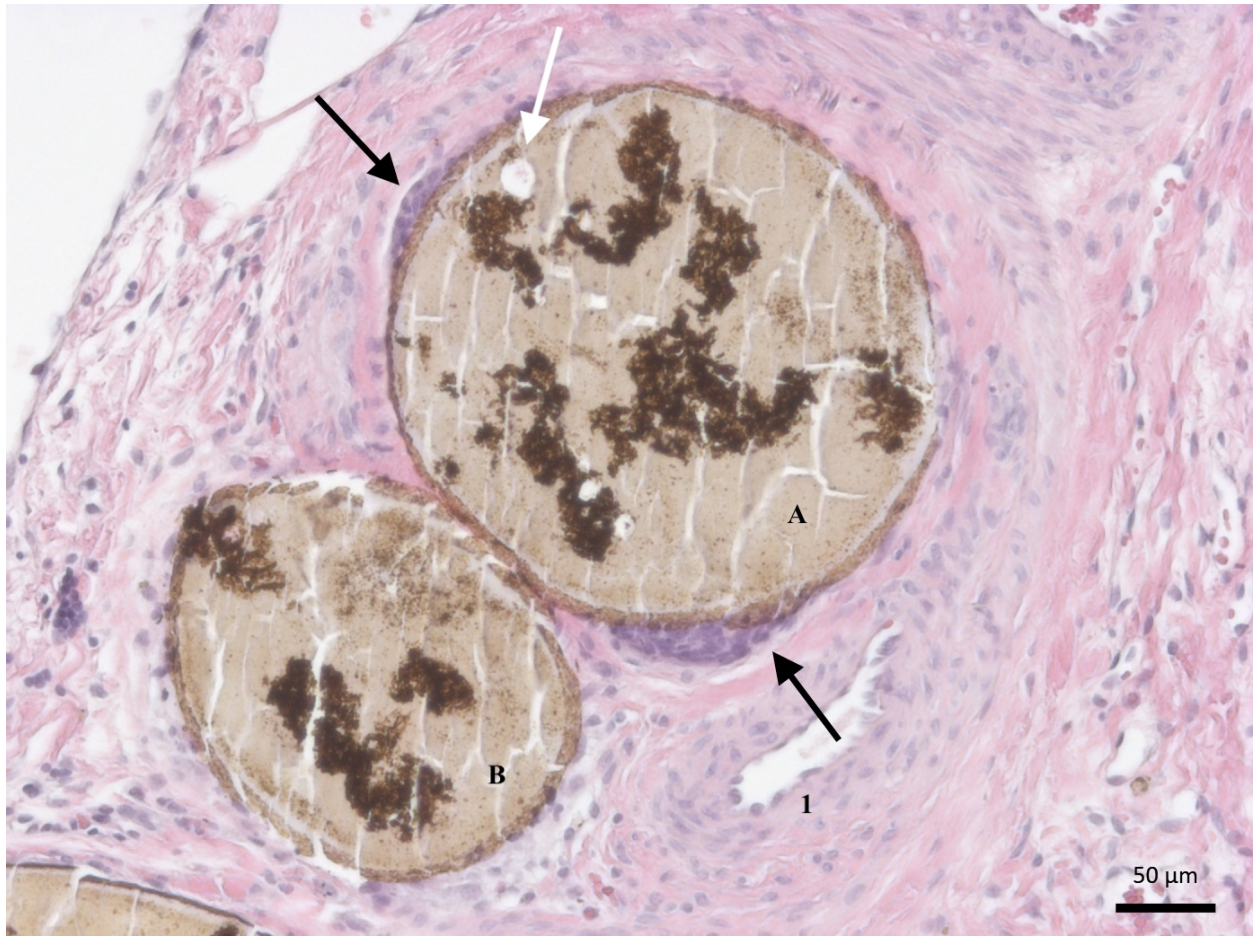


Abbildung 46: SPIO Partikel nach 4 Wochen – 1 bzw. 3 Punkte / Degradationsscore 1 bzw. 2 (H&E Färbung)

Aufnahmen zweier Mikrosphären und eines angeschnittenen Partikels am linken unteren Bildrand zum Zeitpunkt von vier Wochen. Die schwarzen Pfeile zeigen neben der erkennbaren angerauten Oberfläche eine leichte randständige zelluläre Beteiligung. Zudem ist im linken Oberfeld eine beginnende Vakuolisierung zu erkennen (weißer Pfeil). Partikel A wurde ein Punktwert 3 zugeteilt, Partikel B ein Punktwert 1.

1. Arteriole

Diese Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

Die Degradation setzte sich fort, sodass zum Zeitpunkt von acht Wochen bereits ein mittelgradiger Abbau zu erkennen war (Mittelwert 2,27; Median 2), bspw. zusätzlich determiniert durch eine progrediente, invasive zelluläre Beteiligung, oftmals von peripher nach zentral (Abbildung 46).

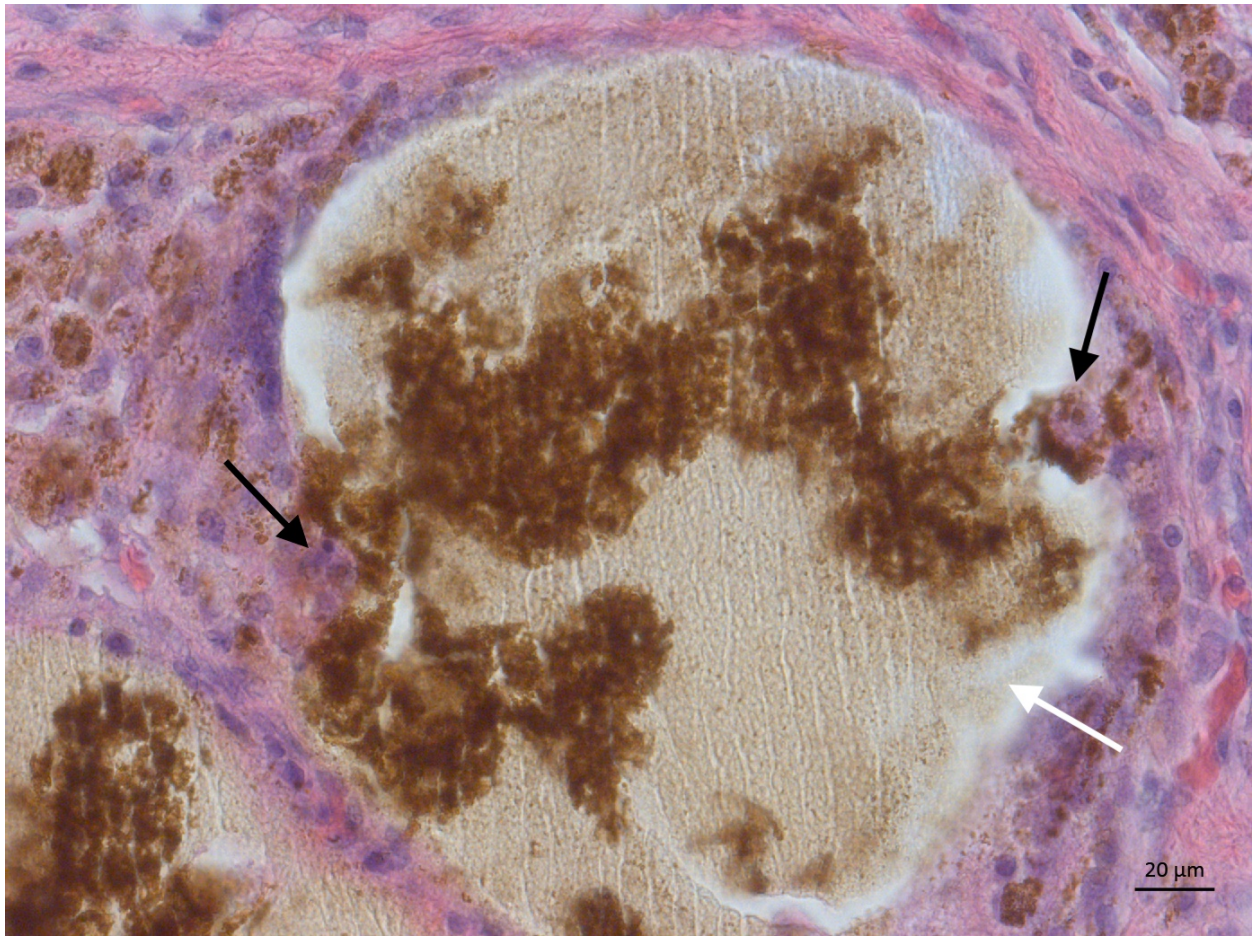


Abbildung 47: SPIO Partikel nach 8 Wochen – 4 Punkte / Degradationsscore 2 (H&E Färbung)

Aufnahmen eines zunehmend resorbierten Partikels zum Zeitpunkt von acht Wochen. Die schwarzen Pfeile zeigen neben der erneut erkennbaren angerauten Oberfläche eine zunehmende, invasive zelluläre Beteiligung. Der weiße Pfeil zeigt den Verlust der sphärischen Form. Insgesamt resultiert ein Punktwert von 4, was einem Degradationsgrad von 2 entspricht.

Diese Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

Der Score veränderte sich innerhalb des nächsten Beobachtungsintervalls nur marginal zum Zeitpunkt zwölf Wochen (Mittelwert 2,35; Median 2).

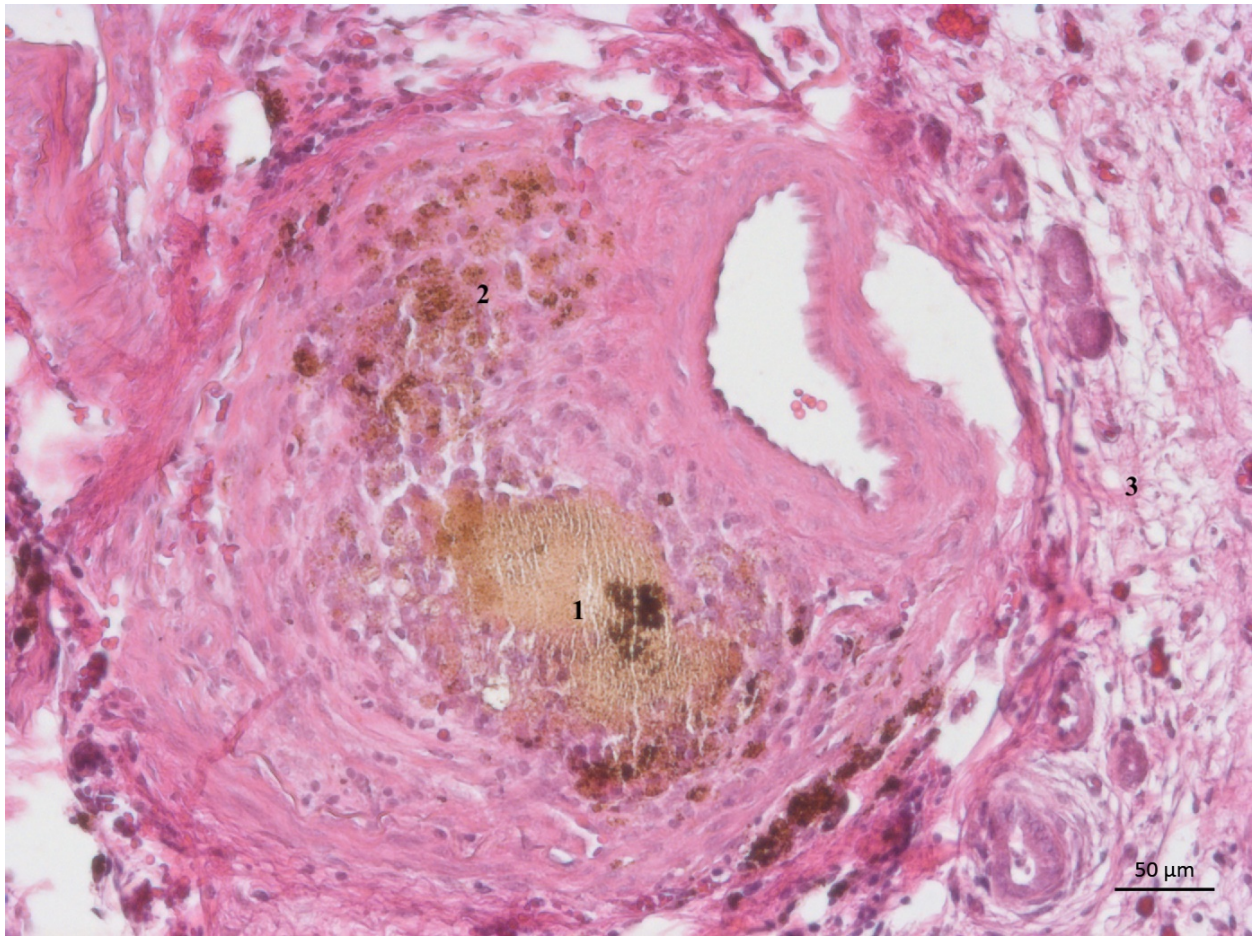


Abbildung 48: SPIO Partikel nach zwölf Wochen – 5 Punkte / Degradationsscore 3 (H&E Färbung)

Aufnahmen eines nahezu vollständig resorbierten Partikels zum Zeitpunkt von zwölf Wochen. Eine sphärische Form ist nicht mehr erkennbar, die Oberfläche und Binnenstruktur dadurch nahezu vollständig aufgehoben. Zudem zeigt sich in der Randzone eine Andeutung eines Lymphozytenwalls und eine ubiquitäre zelluläre Beteiligung als Zeichen eines extensiven Abbaus.

1. Verbliebener Partikelrest | 2. Phagozytierte SPIO Elemente | 3. Umliegendes Bindegewebe

Diese Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

Zum letzten erhobenen Zeitpunkt von 16 Wochen zeigte sich ein extensiver Abbau. Meist waren lediglich einzelne Fragmente der Partikel sichtbar. Zusätzlich zu den bereits erwähnten morphologischen Veränderungen kam es zu Rissen, voll ausgebildeten Löchern, einer Veränderung der Binnenstruktur (vakuolisierend) oder nahezu dem vollständigen Verlust der ehemals sphärischen Form. Oftmals waren die Partikel lediglich anhand der offensichtlich zuletzt abgebauten SPIO-Anteile identifizierbar (Abbildung 49). Dieser Eindruck spiegelte sich in einem gemittelten Degradationsscore von 2,98 (Median 3) wider.

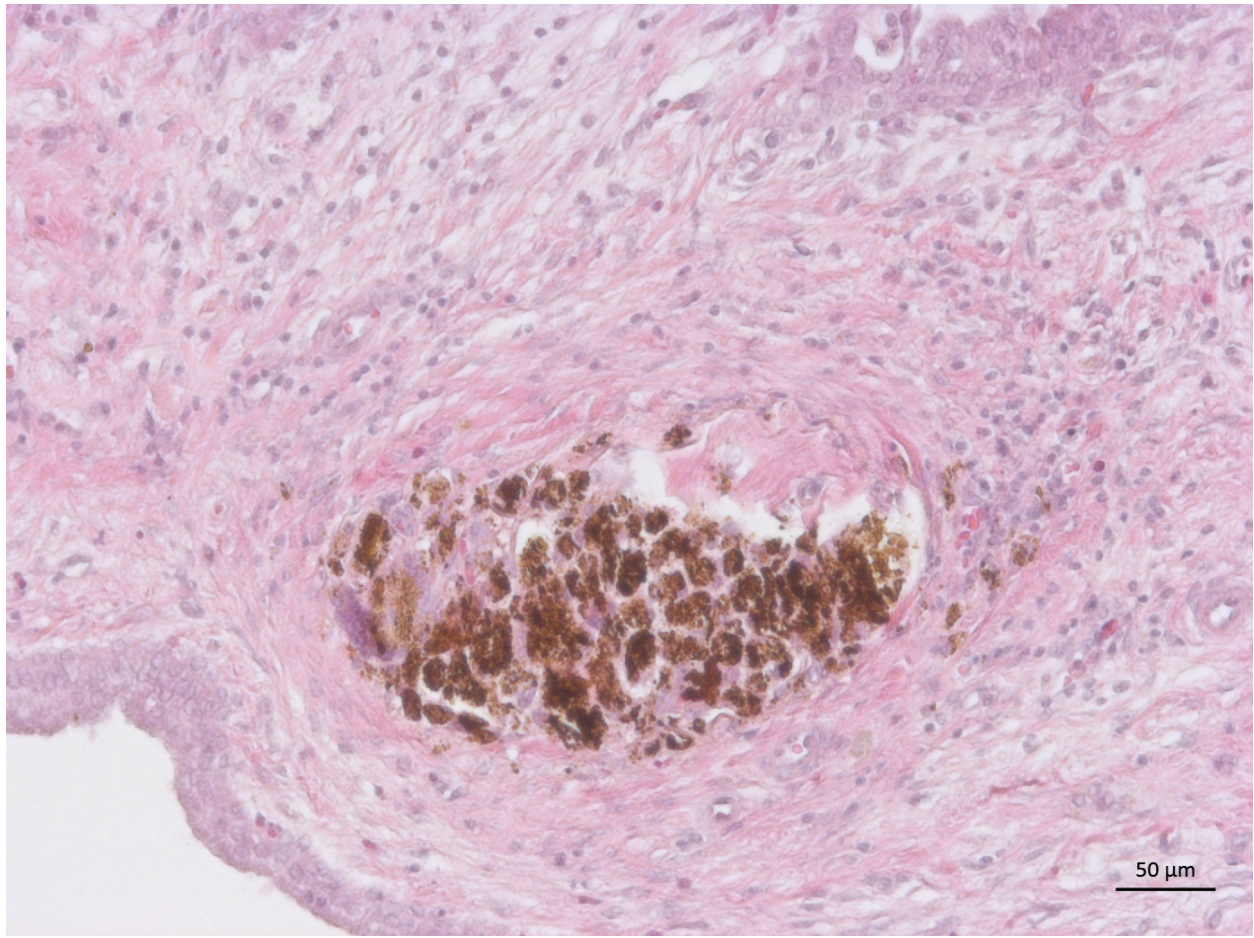


Abbildung 49: SPIO Partikel nach 16 Wochen – 6 Punkte / Degradationsscore 3 (H&E Färbung)

Aufnahmen eines vollständig resorbierten Partikels zum Zeitpunkt von 16 Wochen. Vollständige Aufhebung der sphärischen Form, Verlust der Oberflächenstruktur. Die ehemalige Binnenstruktur ist nicht mehr auszumachen. Das Partikel zeigt sich defekt und durchsetzt von zellulären Bestandteilen, welche die dunklen, bräunlich imponierenden SPIO-Elemente phagozytiert haben. Das umliegende Gewebe ist infarktbedingt nahezu vollständig bindegewebig umgebaut und umorganisiert. Eine physiologische parenchymale Struktur mit Glomeruli und Tubuli ist nicht zu erkennen.

Diese Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

4.6 Biokompatibilität

Wie in Kapitel 3.4.6 beschrieben, wurde die Evaluation der Gewebeerträglichkeit qualitativ und semi-quantitativ anhand des nach Schwartz et al. adaptierten Gefäßwandschadens beurteilt.

4.6.1 Qualitative Analyse

In der H&E Färbung wurde eine aufkommende inflammatorische Reaktion anhand von infiltrativen Entzündungszellen (Fibrozyten, Fibroblasten und Lymphozyten) und Makrophagen sowie zu späteren Zeitpunkten auch Fremdkörperriesenzellen beurteilt.

Im Akutversuch zeigten sich um die Mikrosphären geringfügig Fibrozyten und Fibroblasten sowie vereinzelte Kollagenfasern. Zu diesem Zeitpunkt konnte keine Fremdkörperriesenzellreaktion nachgewiesen werden. Eine solche Fremdkörperriesenzellreaktion erfolgte generell ausschließlich im Bereich des embolisierten Niereninfarktareals, jedoch zu keinem Zeitpunkt in den nicht-embolisierten Bereichen. Nach einer Woche zeigten sich um die SPIO-Partikel einzelne Lymphozyten und Makrophagen, i.e. ortsständige Histozyten, erneut ohne Nachweis einer Fremdkörperriesenzellreaktion. Nach vier Wochen bildeten sich zunehmend und deutlich vermehrte Kollagenfaserbündel und es zeigten sich ein anzahlvermehrtes Auftreten von Fibroblasten. Nach acht Wochen war die phagozytäre Reaktion vorangeschritten. Hier zeigten sich Makrophagen, welche infiltrativ, in die Mikrosphären wachsend, den Abbau vornahmen. Zum Zeitpunkt von zwölf und 16 Wochen zeigte sich eine extensive Ausdehnung der Kollagenfasern ohne Anzeichen einer chronischen Entzündung. Die Abbildungen 51 und 52 zeigen die Infiltration von Entzündungszellen bzw. das Auftreten von Fremdkörperriesenzellen.

4.6.2 Semi-quantitative Analyse

Für die semi-quantitative Auswertung wurde die EVG Färbung als etablierte Färbungsmethode herangezogen. Die Auswertungen von knapp 500 Mikrosphären in Gefäßen in der EVG Färbung zeigten, dass mit zunehmendem Beobachtungsintervall vom Akutversuch bis hin zu 16 Wochen eine zunehmende Zerstörung der Gefäßwände erkennbar war ($p < 0,001$). Der Score im Akutversuch lag bei einem Mittelwert von 0,08, d.h. einer nahezu vollständig intakten Gefäßwand. Nach einer Woche war allenfalls ein geringer Schaden entstanden (Mittelwert 0,54). Nach vier Wochen ließen sich erste deutlichere Veränderungen erkennen, resultierend in einem Score von 1,85. Dieser stieg zunehmend an und erreichte nach acht Wochen einen Mittelwert von 2,25 und steigerte sich im Zeitraum von zwölf Wochen zu einem Score von 3,0. Die Gefäßwandstruktur war in den beiden spätesten Zeitpunkten oftmals vollständig aufgehoben und nur teils schwer bis

gar nicht differenzierbar. Abbildung 50 illustriert diese Veränderungen graphisch im Zeitverlauf. Die Abbildungen 53 und 54 zeigen den Unterschied zwischen einer Gefäßwand aus dem Akutversuch und zum Zeitpunkt zwölf Wochen.

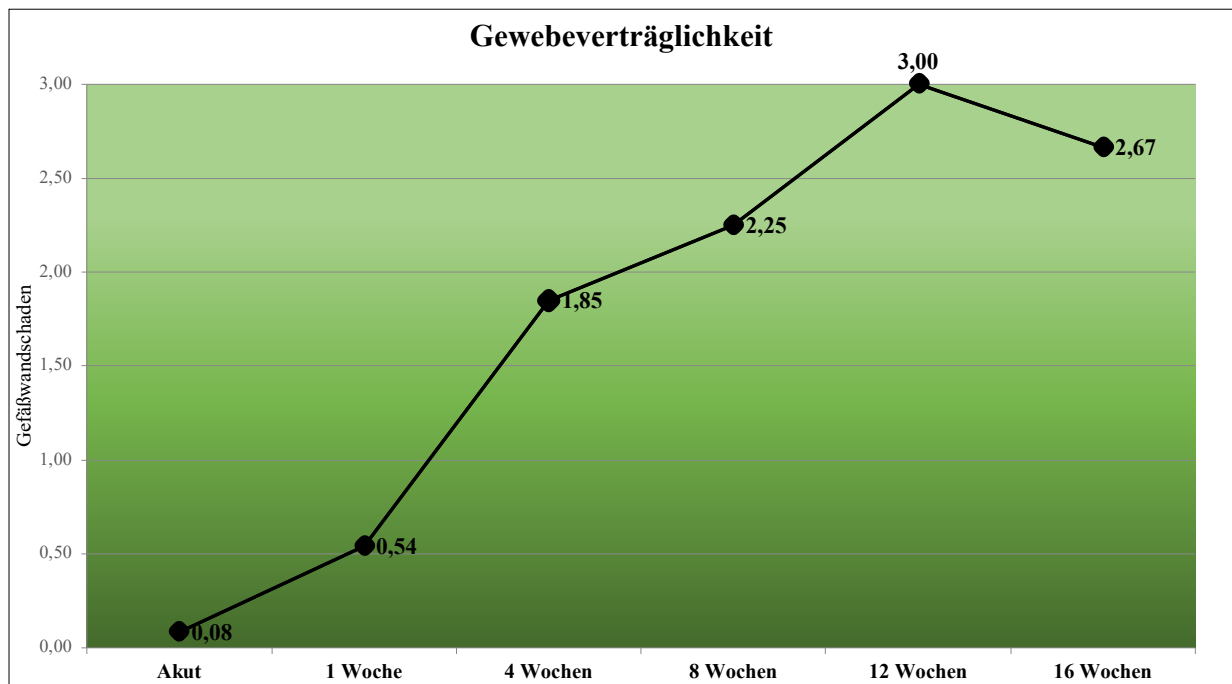


Abbildung 50: Auswertung des durch die Embolisation mit SPIO markierten Mikrosphären entstandenen Gefäßwandschadens zur Evaluation der Biokompatibilität

Mit zunehmender Zeitdauer zeigt sich eine signifikante Erhöhung des Gefäßwandschadens. Während im Akuttier eine nahezu vollständig intakte Gefäßwand zu beobachten war, so erschien diese zu späteren Zeitpunkten in annähernd allen Fällen zerstört oder zumindest rupturiert.

Diese Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

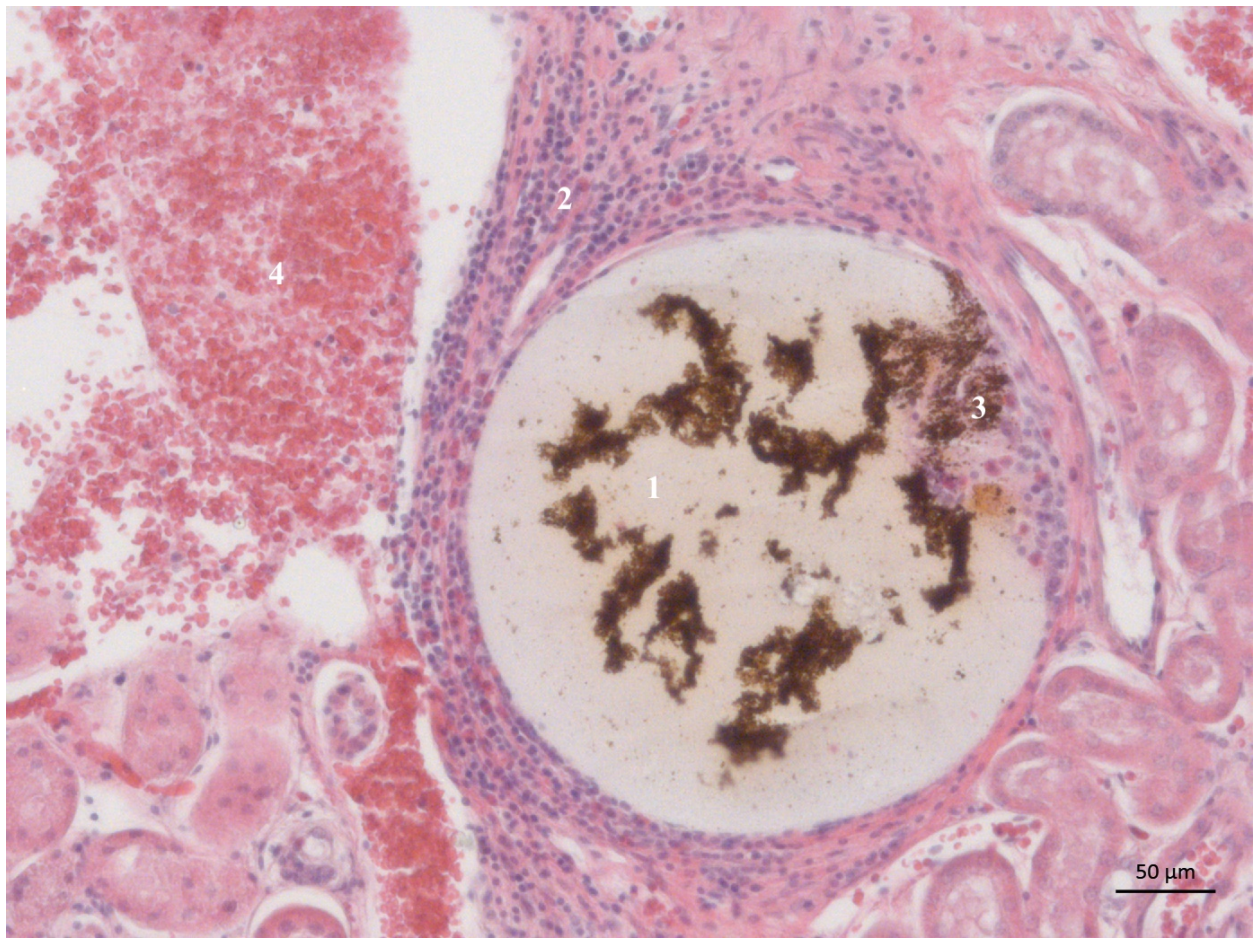


Abbildung 51: Infiltration von Entzündungszellen um die Mikrosphäre zum Zeitpunkt zwölf Wochen (H&E Färbung)

Vereinzelte Fibroblasten (katzenzungenartige Zellkerne und blasenförmiges Zytoplasma) infiltrieren das Gewebe um den Rand der Mikrosphäre (1).

2. Blau angefärbte Lymphozyten | 3. Beginnende Degradation | 4. Erythrozyten

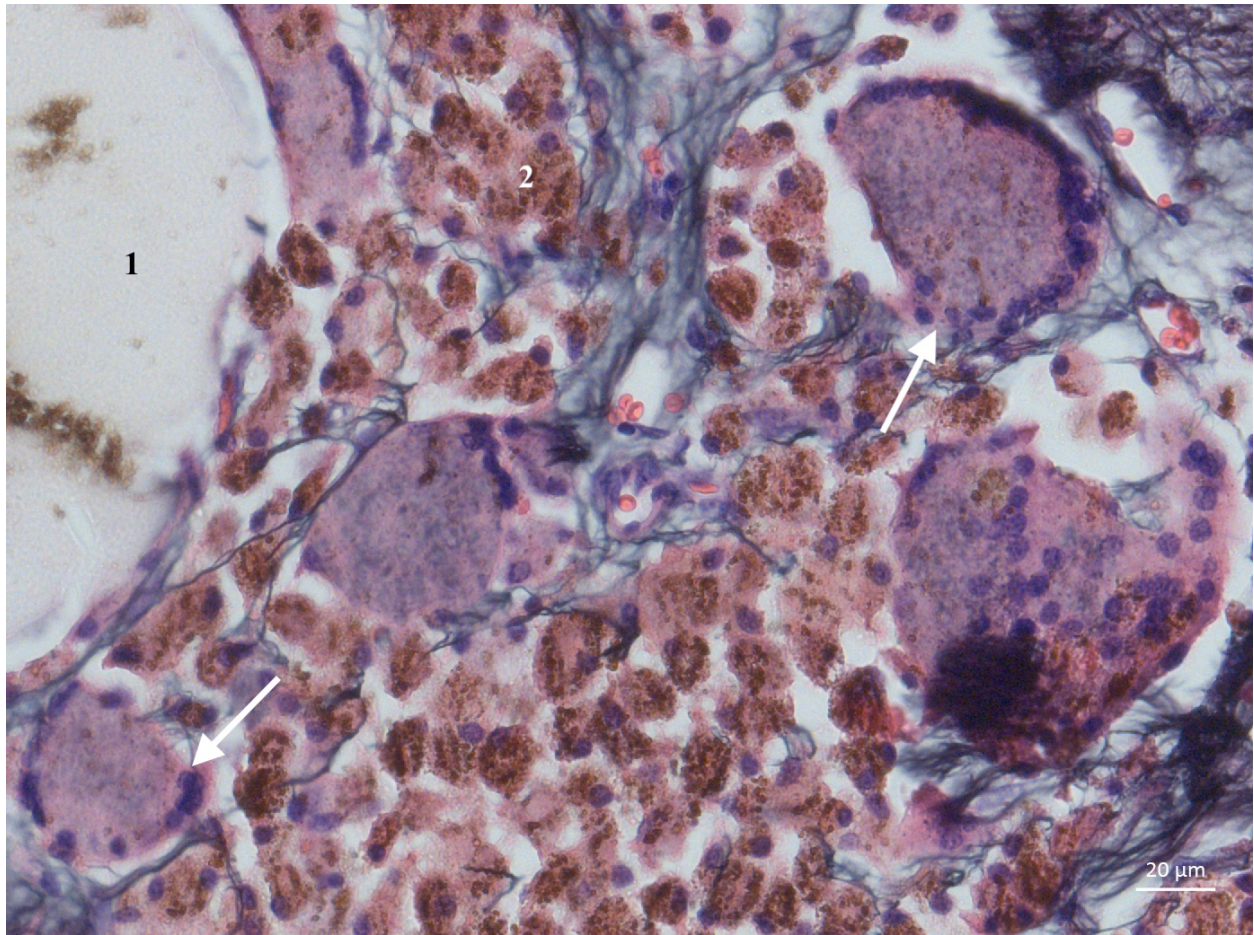


Abbildung 52: Entstehung von Fremdkörperriesenzellen nach Embolisation im Ab- und Umbauprozess nach zwölf Wochen (JMS Färbung)

Blau und violett angefärbte und mit weißen Pfeilen markierte Fremdkörperriesenzellen nach zwölf Wochen.

1. SPIO-Partikel | 2. Phagozytierte SPIO-Reste

Diese Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

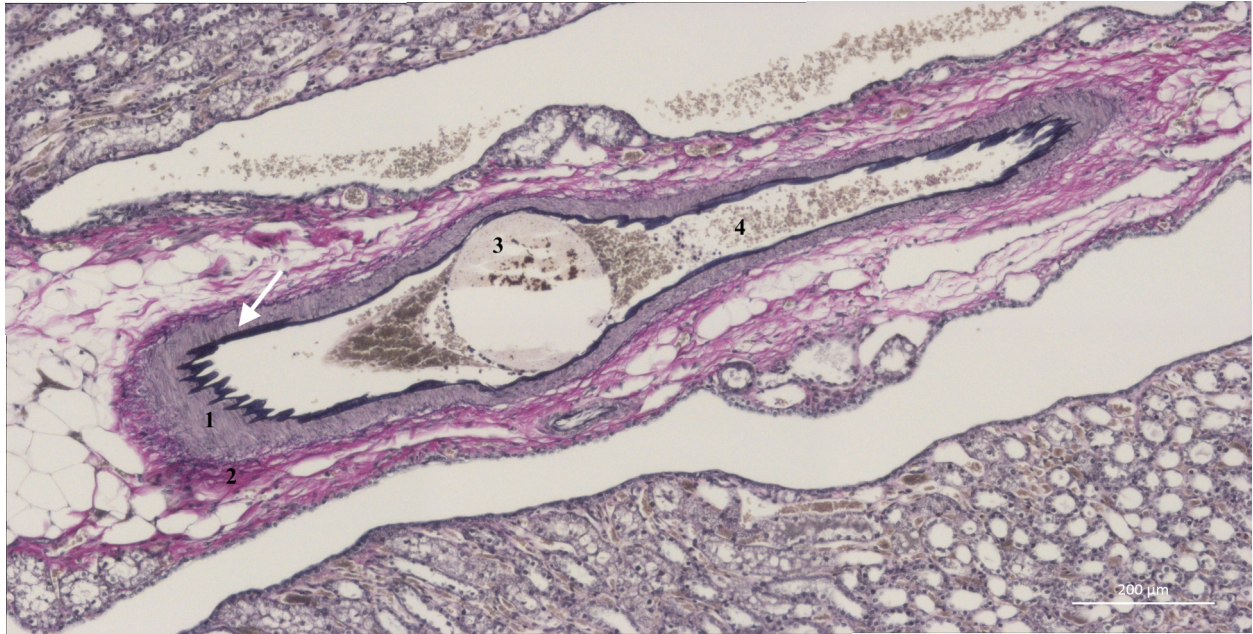


Abbildung 53: SPIO-Partikel in arteriellem Gefäßscore des Gefäßwandschadens 0 (EVG Färbung)

Die Aufnahme zeigt einen durch Schneideartefakte verändertes Partikel (3) mit Erythrozyten im Gefäßlumen (4) in einem vollständig intakten Gefäß mit regelrechter Dreiwandschichtung, bestehend aus der dunkel angefärbten *Membrana elastica interna* (Pfeil), *Tunica media* (1) und *Tunica adventitia* (2).

Diese Abbildung findet sich in angelehnter Weise in der Publikation Stechele et al., Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

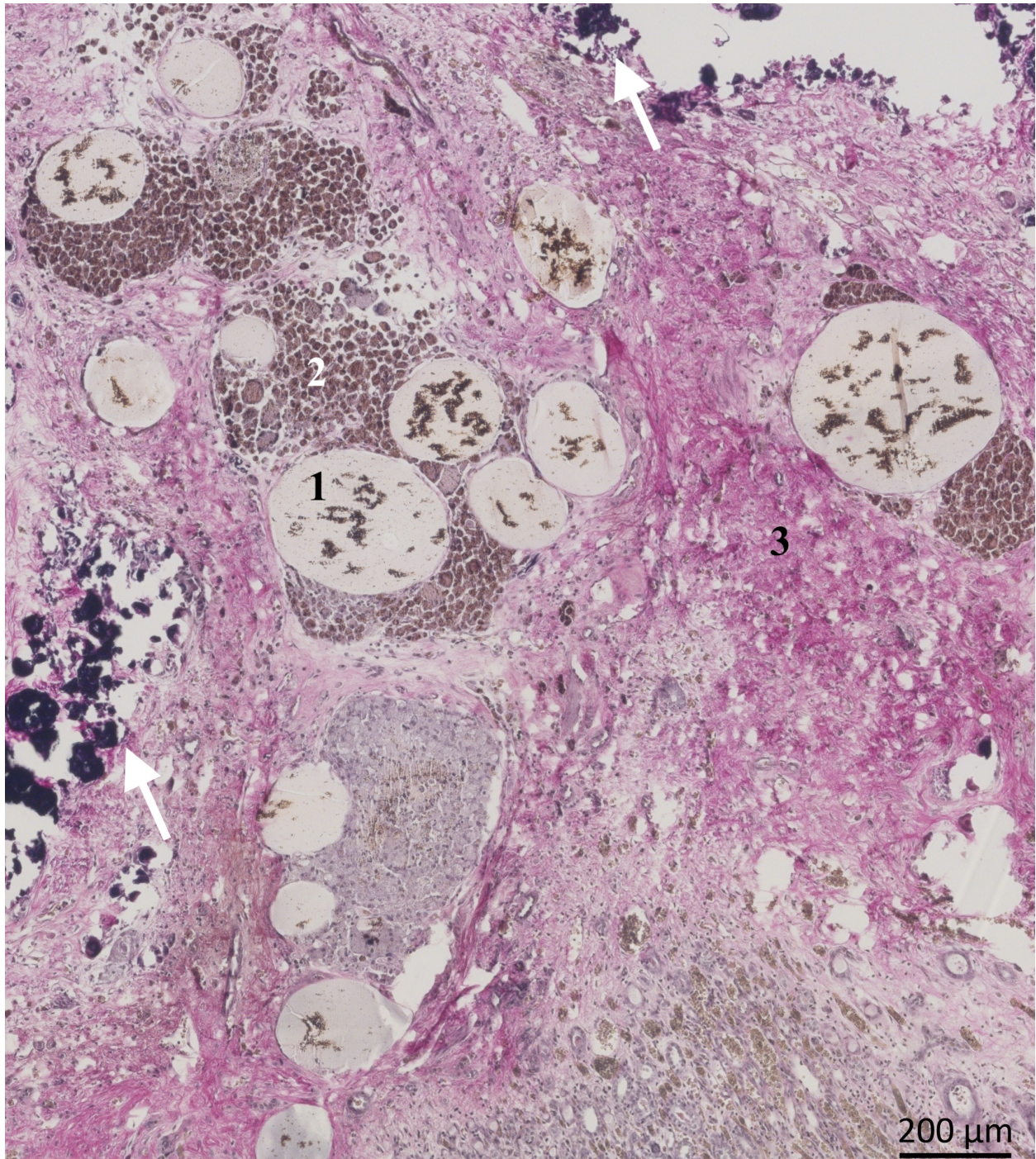


Abbildung 54: Multiple SPIO-Partikel im Infarktareal – Gefäßwandschadensscore 3 (EVG Färbung)

Die Aufnahme zeigt mehrere Partikel (1) in einem komplett destruiertem Infarktareal nach zwölf Wochen. Die Partikel sind nicht mehr eindeutig intravaskulär zu identifizieren, eine Gefäßwand mit Dreischichtung lässt sich nicht mehr abgrenzen: die Partikel imponieren durch die inflammatorische Abräumreaktion im periarteriellen Gewebe, welches komplett narbig umgebaut ist (3). Zudem zeigt sich um die Mikrosphären eine ausgeprägte Entzündungsreaktion aus Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen (2). Die Pfeile markieren Artefakte durch die Gewebefärbung und vereinzelte Verkalkungsformationen.

Diese Abbildung findet sich in angelehnter in der Publikation Stechele et al Cardiovasc Intervent Radiol. 2020.

5. Diskussion

In dieser als Pilotstudie angelegten experimentellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass neue Mikrosphären aus dem synthetischen Polymer Polydioxanon eine effektive Embolisation im Kaninchen-Nieren-Modell erzielen können. Das Embolisatmaterial ist durch seine Eigenschaft der Bioresorbierbarkeit von temporärer Natur und ermöglicht potenziell eine Rekanalisation des behandelten Blutgefäßes. Zudem sind die Mikrosphären durch die SPIO-Imprägnierung über einen langen Zeitraum *in vivo* nachweisbar. Es zeigten sich Schwierigkeiten in der praktischen Handhabung im Sinne einer Katheterverstopfung. Dies verhindert eine unmittelbare Übertragung in die klinische Praxis und erfordert weitere Verbesserungen.

5.1 Bewertung der Materialien und Methoden

5.1.1 Kaninchen-Nieren-Modell

Versuche an Tieren können niemals zur Gänze die Bedingungen im Menschen widerspiegeln. Deshalb ist es wichtig, ein Tiermodell zu finden, das für den jeweiligen Forschungszweck geeignet ist und sich ggf. bereits auf dem entsprechenden Gebiet bewährt hat.

Das Kaninchen-Nieren-Modell ist für eine präklinische Studie zur Überprüfung eines neuartigen Embolisatmaterials sehr gut geeignet. Die Wahl dieses Tiermodells basierte unter anderem auf der Tatsache, dass sowohl Anatomie wie Physiologie, aber auch morphologische und hämodynamische Eigenschaften dem Menschen ähnlich sind (141). Eine superselektive Embolisation mit kommerziell erhältlichen Mikrokathetern über das arterielle Gefäßsystem ist unter diesen Umständen anwendbar. Die Niere wurde als Zielorgan gewählt, da hier insbesondere im Vergleich zur Leber, wo es eine vaskuläre Doppelversorgung gibt, durch eine superselektive Embolisation mit Parenchymausschaltung ein entsprechender makroskopischer Nachweis möglich ist. Der Embolisationsbereich kann klein gehalten werden, sodass die Versuchstiere kaum Schmerzen erleiden. Ein weiterer Vorteil ist die Anwendbarkeit der Embolisationstechnik mit üblichen kommerziell erhältlichen Kathetersystemen, was eine spätere Umsetzung in die klinische Praxis erheblich erleichtert. Aus diesen Gründen wurde das Modell bereits mannigfaltig benutzt und ist in der Literatur ausführlich beschrieben (77, 142, 143).

5.1.2 Polydioxanon

Das verwendete Embolisatmaterial Polydioxanon ist ein farbloses, kristallines synthetisches Polymer und seit vielen Jahrzehnten als medizinisch verwendetes Material bekannt (144). Seinen hohen Bekanntheitsgrad hat es der extensiven Anwendung als resorbierbares Nahtmaterial zu verdanken. Aber auch im kardiovaskulären Bereich, bei Rekonstruktionsplatten in der plastischen Chirurgie, bei orthopädischen Pins, Gallengangstents oder als Trägersubstanz für Antibiotika bei Knochenentzündungen wird Polydioxanon als Ausgangsstoff benutzt und erforscht (145-149). Bereits seit dem Jahr 1981 sind die Eigenschaften von Polydioxanon als resorbierbares Nahtmaterial beschrieben. Die Fadenstärke beträgt im Gewebe nach vier Wochen noch 58 % und nach acht Wochen 14 % (150). Diese Grundeigenschaften eines langsamen, jedoch steten Abbaus machen das Material für Embolisatpartikel im Bereich der Tumorembolisation besonders interessant, da hier die angestrebte mittelfristige Dauer des Gefäßverschlusses realisiert werden kann.

5.2 Bewertung der Ergebnisse

5.2.1 Durchführbarkeit und Sicherheit

Neue, SPIO-beladene Mikrosphären aus Polydioxanon, ermöglichen eine technisch erfolgreiche, weitgehend sichere Embolisation im Kaninchen-Nieren-Modell. In zwei Tieren wurde wegen der besseren Sondierbarkeit auf die linke Niere als Zielorgan ausgewichen. Im Laufe der weiteren Eingriffe war bei allen restlichen Versuchstieren eine Katheterisierung der rechten Nierenarterie problemlos möglich.

Wie in Kapitel 4.1 dargelegt, wurde bei einem Tier („G0112/14-16, Tät.-Nr. D26418“) aufgrund einer Krallenverletzung eine Krallenamputation in tiefer Narkose vorgenommen. Eine derartige Komplikation kann grundsätzlich durch eine Ischämie nach Ligatur der *A. femoralis* bedingt sein. Dieses Prozedere wurde jedoch standardisiert in dieser und in anderen Studien erfolgreich angewandt (105). Die Krallenverletzung kann nicht eindeutig als verfahrensassoziierte Komplikation gewertet werden. Auch eine haltungsbedingte Verletzung ist denkbar. Zudem ist eine Verletzung durch Automutilation als Reaktion auf einen Femoralnervenreizung möglich. Dieses Phänomen wurde bereits in anderen Kleintiersversuchsreihen durch artifizielle Nervenschädigung nachgewiesen (151). Insgesamt wurde die Komplikation als nicht-interventions-assoziiert interpretiert, sondern am ehesten im Sinne einer infektiösen oder haltungsbedingten Genese gewertet.

Obwohl in jedem der Versuchstiere Polydioxanon-Mikrosphären nachgewiesen werden konnten, zeigten sich Schwierigkeiten in der Injizierbarkeit, sodass insgesamt in acht von neun Embolisationen eine moderate Injizierbarkeit attestiert wurde. Dennoch stellte die Katheterverstopfung durch das Mikrosphäremisch eine entscheidende Limitation in der Durchführbarkeit dar. Bei jeder der neun Embolisationen konnte nach initialer Beladung des Katheters ein vorläufiger Stopp festgestellt werden, sodass zunächst keine weiteren Partikel mehr appliziert werden konnten.

Dies ist insofern überraschend, da Mikrosphären grundsätzlich im Vergleich zu unkalibrierten Partikeln als leichter injizierbar gelten. Obwohl Polydioxanon als Material mit geringer Reibungskraft gilt, hefteten sich die Mikrosphären sowohl im Katheteransatzstutzen und vermutlich auch im Katheterlumen an. Eine Beimischung von Humanalbumin oder Lecithin in die 1:1 Lösung aus Kontrastmittel und Natriumchloridlösung erbrachte keine Abschwächung dieser Limitation. Versuche, dieser z.T. physikalisch bedingten Herausforderung durch mehrfaches Spülen des Katheters beizukommen, verbesserten das Ergebnis partiell. Das Durchspülen mit Kochsalzlösung war in den meisten Fällen unter Belassung des Katheters in der Zielposition ausreichend. In einzelnen Fällen musste jedoch der verstopfte Katheter außerhalb des Gefäßes mechanisch gereinigt werden. Insgesamt verlängerten derartige intra- und extrakorporale Spülversuche die Interventionsdauer. Außerdem war eine superselektive Embolisation zum Teil nicht möglich, da durch den erhöhten Injektionsdruck und die plötzliche, schrotschußartige Freisetzung der Partikel an der Katheterspitze eine ungezielte Verteilung erfolgte.

Das erschwerte Injektionsverhalten war möglicherweise bedingt durch das Anhaften der Partikel an der Katheterwand und das Zusammenklumpen der Partikel. Dies kann bspw. bedingt sein durch eine erhöhte Oberflächenspannung der Polydioxanon-Mikrosphären. Hydrogele hingegen haben einen geringen Reibungskoeffizienten und neigen nicht zur Verklumpung (152). Ferner könnten auch Ladungsunterschiede oder Anschwellen der Mikrosphären nach Anmischen der Injektionslösung hier eine Rolle gespielt haben (153).

Eine mögliche Lösung der Problematik könnte durch eine höhere Verdünnung oder langsamere Injektionsgeschwindigkeit der Mikrosphären erreicht werden (154). Wie bereits in Kapitel 2.4 angedeutet, könnte das Maß der Komprimierbarkeit der Mikrosphären ein entscheidender Schritt in der künftigen Materialentwicklung sein, sodass die Partikel nicht mehr aggregieren, um somit das Problem der Injizierbarkeit – auch bei Mikrokathetern mit sehr kleinen Lumendurchmessern – zu überwinden (44). Für eine präzise klinische Anwendung ist eine problemlose Injektion des Embolisatmaterials unabdingbar. Regelmäßige Verstopfungen des Katheters sind in der klinischen Handhabung nicht akzeptabel.

Obwohl bei allen Versuchstieren eine erfolgreiche Embolisation durchgeführt werden konnte, zeigte sich in einem Versuchstier eine Embolisation sowohl der gesamten Niere, (Embolisationsgrad 3) als auch partikelbedingte Signalanreicherungen in der Bauchwand in den MRT-Untersuchungen (Abbildung 21).

Da wegen der Verstopfungsneigung der Partikel ein stärkerer Druck ausgeübt werden musste, könnte ein möglicher Grund ein Reflux mit temporärer Umkehr der Flussverhältnisse durch forcierte Embolisation sein. Da in diesem Versuchstier Mikrosphären mit einem Größenunterschied von 200 bis 500 μm verwendet wurden, erscheint diese Erklärung durchaus plausibel. Größere Partikel okkludieren die Gefäße proximaler und sind damit anfälliger für Refluxverhalten und unselektive Embolisation (155). Auch kleinere Partikel hegen ein erhöhtes Komplikationspotenzial. Bastian et al. (1998) postulieren, dass Embolisatpartikel mindestens einen Durchmesser von 40 μm benötigen. Kleinere Partikel erreichen möglicherweise keine effektive Embolisation und bergen andererseits die Gefahr von ungewollter Verbreitung in andere Organe wie Milz oder Lunge (60). Ein Größenintervall von 90 bis 300 μm erscheint angemessen und wird, wie der Bereich von 300 bis 500 μm , in vergleichbaren Studien ebenfalls erfolgreich angewandt (104, 106). Eine weitere, stärkere Einschränkung des Größenbereichs sollte für weitere Studien jedoch diskutiert und in Betracht gezogen werden, da bereits ein Unterschied von 270 μm zu einer unvorhersehbaren Verteilung der Partikel im Gefäßsystem führt (139).

Insgesamt spielten die Injektionsgeschwindigkeit und Lage der Katheterspitze bei dieser in der MRT nachgewiesenen, klinisch jedoch nicht-relevanten Komplikation eine Rolle. Dies ist als ein wichtiger Hinweis auf eine sorgfältige Technik während der Embolisation von Partikeln zu sehen, um eine nicht-zielgerichtete Embolisation mit Beteiligung anderer Organe und Komplikationen zu vermeiden.

5.2.2 Embolisationserfolg

Eine Basisvoraussetzung für eine klinische Anwendbarkeit der neuartigen Mikrosphären ist eine erfolgreiche und effektive Embolisation. Eine erfolgreiche Embolisation wurde definiert als Zelltod von Nierenparenchym (Infarkt), welcher durch die Unterbrechung der Blutversorgung (Ischämie) durch die Mikrosphären bedingt ist. Die makroskopischen Ergebnisse bestätigten dies in allen Versuchstieren in Form von Bildung weißlicher, fibrotischer Narben und Einziehungen nach frühestens einer Woche. Diese Beobachtungen als typisches Phänomen einer renalen Embolisation sind in der Literatur mehrfach beschrieben und bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit (51, 103, 142).

Zur extensiven Bildung von Narbengewebe beigetragen haben könnte ebenso das verwendete Grundmaterial Polydioxanon. Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass nach Polydioxanonfaden-Implantation in Gewebe ein kollagenproduzierender Effekt einsetzt, welcher mindestens für 48 Wochen anhält. Im Bereich der Gesichtschirurgie schreibt man diesen Prozessen eine Verbesserung der Hautstrukturen und Revitalisierung des Teints nach Straffungsoperationen zu (156, 157).

Die makro- und mikroskopischen sowie bildmorphologischen narbenbedingten Einziehungen der Infarktareale korrelieren gut miteinander. Histopathologische Untersuchungen der Embolisationsregion liefern einen direkten Nachweis der Mikrosphären innerhalb der embolisierten Gefäße.

Die entstandenen ischämischen Defekte sind trotz des resorptiven Charakters der Mikrosphären zu erklären. In der Arbeit von Shomura et al. (2011) wird deutlich, dass lediglich Partikel, die in vorausgegangenen in vitro Versuchen eine längere Degradationszeit als 30 Minuten hatten, in Schweinenieren eine Nekrose nach Embolisation auslösten, während Partikel mit einer Degradationszeit bis zu 30 Minuten histopathologisch keine ischämischen Veränderungen induzierten (92). Da die SPIO-Mikrosphären, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, eine Resorptionszeit von mehreren Monaten zeigten, sind die entstandenen Gewebeschäden trotz ihres resorbierbaren Charakters gut zu erklären, da bereits eine Gefäßokklusion von drei bis sechs Stunden zu einer hämorrhagischen Nekrose in der Niere führen kann (81).

In dieser Arbeit sind die Infarktareale auch im Frühstadium deutlich zu erkennen. Der Verlust der Kernfärbbarkeit indiziert einen akuten Ischämienachweis bereits nach einer Woche. Zudem zeigen die abgeflachten Tubuli den Abwurf ihres Bürstensaumes und sind vereinbar mit einer akuten Ischämie. Da die Mikrosphären einen maximalen Durchmesser von 500 µm zeigten, wurden u.a. auch die *Aa. arcuatae* embolisiert, was durch die angiographischen und histopathologischen Auswertungen bestätigt wurde. Dadurch wurde ein potenzieller Kollateralkreislauf mit einer kompensatorischen Sauerstoff- und Nährstoffversorgung auf ein Minimum reduziert, was einen ausgeprägten Gewebeuntergang zur Folge hat.

Die histopathologischen Ergebnisse korrelierten mit den makroskopischen Resultaten sowie Ergebnissen aus MRT und DSA. Die Mikrosphären waren in den mikroskopischen Auswertungen auf verschiedene Arten aufzufinden. Meist verlegte die gefundene Mikrosphäre das Gefäß vollständig. Oftmals war eine Ansammlung von Erythrozyten mit Thrombusbildung proximal der Mikrosphären zu erkennen. Dies wurde als zusätzliches Indiz einer effektiven Gefäßobstruktion gewertet. In anderen Fällen zeigten sich trotz fehlender Mikrosphären deutliche Ausbuchtungen der Gefäßwand, insbesondere mit Ausbeulungen der Intima und Media. Diese Beobachtungen wurden als embolisierte Gefäße gewertet, jedoch nicht mit in die (semi-) quantitativen Erhebungen

miteinbezogen, sondern als Artefakte der histopathologischen Aufarbeitungen – am ehesten der Schneideprozesse mit dem Mikrotom – interpretiert.

Insgesamt lässt sich für den Zielparameter „Embolisationserfolg“ ein zufriedenstellendes Ergebnis festhalten: Die Polydioxanon-Mikrosphären führten zu einem erfolgreichen Gefäßverschluss, was durch die übereinstimmenden Daten der Bildgebung und den pathologischen Ergebnissen bestätigt wurde. Mithilfe der ergänzenden Histopathologie konnten zudem die ischämischen Prozesse mit Infarktarealen, Fibrose- und Kalkentwicklung nachgewiesen werden.

5.2.3 Reperfusion

Im Vergleich zu den Angiogrammen direkt nach der Embolisation zeigten die Kontrollangiogramme insgesamt einen Abfall des Scores ($p = 0,015$) im Sinne einer zunehmenden Reperfusion der Arterien, wobei nach vier bis acht Wochen eine partielle ($n = 3$) und nach zwölf und 16 Wochen eine vollständige ($n = 4$) Reperfusion festzustellen war. Für eine genauere statistische Aussage ist der Versuch an einer größeren Fallzahl nötig.

Während im Post-Embolisationsangiogramm in sieben von neun Tieren ein Verschluss auf Höhe der *Aa. interlobares* zu vermerken war, konnte diese Höhe des Gefäßverschlusses im Kontrollangiogramm nur in einem Tier nachgewiesen werden.

Diese Beobachtungen können auf verschiedene Art und Weise zu erklären sein. Zum einen ist eine Auflösung von Thrombusmaterial, was sich um die Partikel gebildet hat und damit den Blutfluss zumindest partiell wiederherstellt, möglich. Jedoch ist in der Literatur der Konsens zu entnehmen, dass bei Verwendung von sphärischen Materialien die Partikel selbst für den okkludierenden Effekt verantwortlich sind (158, 159).

Des Weiteren wäre eine tatsächliche Resorption der Partikel und damit eine Rekanalisation und Revaskularisation der arteriellen Nierengefäße denkbar. Der deutliche Trend der Mikrosphären-degradation in den histopathologischen Auswertungen steht mit diesen Überlegungen zwar in Teilen in Einklang, jedoch müssten für eine derart deutliche angiographische Reperfusion die Mikrosphären vollständig abgebaut worden sein. Histopathologisch wurden zwar zu Beobachtungszeiträumen, in welchen angiographisch eine vollständige Reperfusion festgestellt worden war, extensiv degradierte Mikrosphären aufgefunden. Grundsätzlich ist es jedoch denkbar, dass diese stark deformierten Mikrosphären mit zunehmender Zeit nach der Embolisation weiter nach peripher versetzt werden. Dies kann mechanisch-physikalisch durch Blutströmungen bedingt sein oder auch dadurch, dass mit zunehmender Degradation und Deformation über die Zeit die Partikel an Größe verlieren und somit in die weiter distal gelegeneren Gefäße gedrückt werden. Gegen den Erklärungsansatz der letzten Variante sprechen Beobachtungen der histopatho-

logischen Auswertungen. Die Mikrosphären waren mit fortschreitendem Beobachtungszeitraum zunehmend in eine Matrix aus verschiedenen Typen von Zellen eingebettet. Eine solche fibröse Einkapselung verankert die Mikrosphären während des Abbauprozesses und beugt dem oben beschriebenen Mechanismus vor (160). Zudem ist die Angiographie als zweidimensional bildgebendes Verfahren in der Beurteilung der Reperfusion eingeschränkt und erlaubt unter Umständen keine vollständige Beurteilung des Gefäßstatus.

In der Literatur ist auch bei nicht-resorbierbaren Materialien teilweise eine partielle Reperfusion beschrieben, sodass auch andere Mechanismen in Betrachtung gezogen werden müssen. Bilbao et al. (2008) erörterten, dass eine Rekanalisation auch durch eine „Exklusion“ der Partikel durch die Gefäßwand in das perivaskuläre Parenchym erfolgen kann (139).

Dies kann ebenfalls zum angiographischen Bild einer Reperfusion führen, obwohl histopathologisch kein vollständiger Abbau der Mikrosphären stattgefunden hat und somit keine klassische Reperfusion entstanden ist. Die insbesondere in den späteren Zeitpunkten vorgefundenen Ergebnisse der EVG-Färbung in dieser Arbeit legen nahe, dass derartige Prozesse eine Teilkomponente bei der Reperfusion spielen könnten.

Grundsätzlich haben auch die histologischen Auswertungen gezeigt, dass die Gefäßwände eine ausgeprägte Fähigkeit zur Adaption haben. Ausbuchtungen und Ausbeulungen der Gefäßwand wurden mehrfach beobachtet und auch in der Literatur beschrieben (47, 49), was eine Bildung von sackförmigen Ausbuchtungen erleichtert und nach der Hypothese von Bilbao et al. (2008) die „Exklusion“ weiter unterstützt. Denkbar wäre zudem, dass die Veränderungen der Gefäßwand nicht nur einen abbaubedingten Austritt der Partikel aus dem Gefäß begünstigten, sondern dass dieser Vorgang zudem Einfluss auf die perivaskuläre Abbaureaktion und damit die Revaskularisation hat.

Gefäßrekanalisation und Neoangiogenese könnten theoretisch ebenfalls zum Phänomen der Reperfusion beitragen haben. Obwohl die Niere ein Endorgan darstellt und somit aufgrund geringer Kollateralkreisläufe nicht zwingend von einer Rekanalisation oder Neoangiogenese auszugehen war, bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit diese Hypothesen und stehen in Einklang mit den Ergebnissen bei verschiedenen Arten von Embolisatmaterialien (139). Weng et al. (2018) konnten ebenfalls rekanalisierte Gefäße und Revaskularisation im Embolisationsgebiet nach sechs Monaten nachweisen (106). Weitere grundlegende Überlegungen, welche mit diesen Prozessen zusammenhängen können, werden in Kapitel 5.2.6 erläutert.

Insgesamt sind die langfristigen Auswirkungen genannter Prozesse auf die Rekanalisation jedoch unklar und das Phänomen der Reperfusion konnte in dieser Pilotstudie nicht abschließend bestätigt werden.

5.2.4 Sichtbarkeit der Embolisatpartikel in der MRT

Eine Limitation bei intraarteriellen Embolisierungen ist die fehlende Sichtbarkeit der Partikel. Eine Beurteilung mittels des Kontrastmittelflusses unter Fluoroskopie bei der Angiographie, wo die Embolisatmaterialien mit Kontrastmittel gemischt sind, ist zwar gängige Praxis im klinischen Alltag und wurde auch in dieser Arbeit angewandt, zeigt aber keine hundertprozentige Zuverlässigkeit. Das Kontrastmittel dringt bis in die Arteriolen und Venolen vor und fließt venös ab, während Partikel entsprechend ihrer Größe nicht so weit nach distal vordringen. Die entsprechende Embolisierungsebene und die Vollständigkeit eines erfolgreichen Verschlusses sind jedoch nicht sicher zu erkennen. So konnten Dorenberg et al. (2005) etwa bei der klinischen Embolisierungsbehandlung von Uterusmyomen zeigen, dass die Angiographie eine vollständige Tumorembolisation vortäuschte, während de facto über ein Fünftel der Gefäße nicht embolisiert waren (161). Ein Nachweis, ob die Mikrosphären sich innerhalb oder außerhalb des Tumorgewebes befinden, kann für den weiteren klinischen Verlauf von essentieller Bedeutung sein und stellt darüber hinaus für den interventionellen Radiologen einen wichtigen Parameter für die Sicherheit und Effektivität des Eingriffs dar (162). Eine Sichtbarkeit der Mikrosphären ist nicht nur als Therapiekontrolle geeignet, sondern es lassen sich auch potenziell weitere Indikationen finden. So untersuchten bspw. Porcu et al. (2017) fluoreszierende Chitosan-Mikrosphären, welche mit Indocyanin-Grün beladen sind, um eine intraoperative Auffindbarkeit von hepatozellulären Karzinomen in der Chirurgie zu ermöglichen (155).

Bei der konventionellen TACE wird das jodhaltige, ölige Kontrastmittel Lipiodol® sowohl als Trägersubstanz für die zytotoxischen Substanzen, wie auch – dank seiner Röntgendichte – als bildmorphologisches Kontrollmedium benutzt. Es wird postuliert, dass die Verteilung des Lipiodols eine örtliche Verteilung des Chemotherapeutikums widerspiegelt. Die Emulsion ist allerdings instabil und kann sich in vitro Studien zufolge schnell (d.h. innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden) in den Blutkreislauf verflüchtigen, erzielt also möglicherweise gerade nicht die gewünschte lokale Wirkung und kann somit nicht zwingend als Indikator einer erfolgreichen Chemoembolisation angewandt werden (163). Im Gegensatz zur cTACE kommt es bei der DEB-TACE potenziell zu einer besseren Abgabekinetik des Chemotherapeutikums. Die neuartigen röntgendichten DC Bead Lumi™ (BTG, Boston Scientific, London, UK) verbinden nach Beladung mit Doxorubicin die Vorteile geringer systemischer Toxizität mit der Darstellbarkeit in der Bildgebung. Die auf Basis von Polyvinylalkohol hergestellten Partikel wurden klinisch bereits erprobt, sind aber zum einen nicht biodegradierbar und zum anderen nur in röntgenbasierter Bildgebung (Fluoroskopie, DSA, CT, CBCT) sichtbar – nicht aber in der MRT (164).

Super-paramagnetisches Eisenoxid ist ein Nanokristall aus Eisenoxiden aus entweder Magnetit (Fe_3O_4) und / oder seiner oxidierten Form Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Ursprünglich wurde das Material zu verschiedenen diagnostischen und therapeutischen Zwecken entwickelt. Der Mechanismus beruht auf einer starken Proton-Relaxation, welche insbesondere in T_2/T_2^* gewichteten Bildern, durch einen Signalverlust durch Suszeptibilitätseffekte des Eisenoxidkerns zum Ausdruck kommt. Auch in T_1 gewichteten Sequenzen kommt es partiell zu Signalalterationen (165).

Diese Effekte fanden sich auch in dieser Arbeit wieder: die T_2^* gewichtete Sequenz zeigte sich am sensitivsten für die Ausprägung des Suszeptibilitätsartefakts der SPIO-beladenen Mikrosphären, was auch mit den Ergebnissen aus von Choi et al. (2015) im Kaninchen-Uterus-Modell in Einklang zu bringen ist (166). Somit war die ergänzende MRT-Untersuchung nicht nur ein suffizienter Beweis für eine nicht-invasive in vivo Nachweisbarkeit der Mikrosphären, sondern erwies sich darüber hinaus als sensitiver gegenüber der Standardbildgebung Angiographie zum Nachweis der neu entwickelten SPIO-Partikel.

Es konnte nicht nur eine generelle Durchführbarkeit mittels SPIO-Mikrosphären nachgewiesen werden, sondern die Mikrosphären dienten auch bereits in dieser tierexperimentellen Studie der Therapieerfolgs- und Sicherheitskontrolle. So ist es in Kaninchen 2 („G0112/14-5“) klinisch post-interventionell zu keinerlei klinischen Auffälligkeiten gekommen, obwohl angiographisch eine unselektive Embolisation der gesamten Niere zu erkennen war. Die Ergebnisse der anschließend durchgeführten MRT-Untersuchung bestätigten die ungezielte diffuse Embolisation der Niere und die refluxbedingte Embolisatdislokation in die Bauchwand und Rumpfmuskulatur. Diese blieb klinisch inapparent und wäre ohne die SPIO Imprägnierung der Mikrosphären nicht entdeckt worden. Die SPIO-Beladung zeigte daher einen Vorteil gegenüber nicht-markierten Partikeln und könnte in der klinischen Praxis das Ausmaß der Embolisation und den Therapieerfolg besser beurteilen lassen.

Einschränkend muss diskutiert werden, dass die Signalalterationen im MRT durchaus auch von freien SPIO-Nanopartikeln stammen könnten. Dies wäre insbesondere nach längeren Beobachtungsintervallen mit fortgeschrittener Degradation des Polydioxanons denkbar. Allerdings sprechen sowohl der Produktionshergang, als auch die histopathologischen Erkenntnisse gegen diese Annahme. In der Herstellung werden die 10-30 nm großen SPIO-Elemente physikalisch in der Polydioxanon-matrix fixiert. Dies verhindert eine unmittelbare Freisetzung der SPIO-Anteile und eine mögliche Dislokation. Ferner zeigten die histopathologischen Auswertungen, dass die SPIO-Nanopartikel durch Makrophagen aufgenommen werden. Es ist daher von einem Abtransport in das periarterielle Gewebe auszugehen, jedoch nicht von einer Verschleppung in entfernte Strukturen.

Eine Beladung von Partikeln mittels super-paramagnetischem Eisenoxid ist in der Literatur bereits beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Lee et al. (2005) beschrieb früh den Einsatz von SPIO-Chitosan-Partikeln im Rahmen der Embolisation im Kaninchen-Nieren-Modell (78). Zudem wurden SPIO beladene Mikrosphären ebenfalls im Lebermodell getestet und die Detektionsrate betrug analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit 100 % (167). Hier ist jedoch anzumerken, dass das Auflösungsvermögen der MRT nicht ausreichte, einzelne von mehreren aneinander liegenden SPIO-Mikrosphären zu differenzieren. In Untersuchungen unter dem Lichtmikroskop imponierten die in dieser Arbeit untersuchten SPIO-Mikrosphären vergleichbar mit anderen SPIO beladenen Mikrosphären, z.B. Chitosan-Mikrosphären in der Studie von Chung et al. (2012) (67). Auch bei in vivo Untersuchungen bei Neuseelandkaninchen deckten sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit den bildmorphologischen Eindrücken vergleichbarer SPIO beladener Mikrosphären mit ausgeprägten schwarzen Punkten, i.e. Auslöschungsartefakten in T2 gewichteten Sequenzen (78). In den letzten Jahren wurden SPIO-Partikel in einer Vielzahl an Mikrosphären erprobt (162, 166, 168, 169), sodass sich SPIO beladene Mikrosphären zu den mit am meisten untersuchten MRT-detektierbaren Embolisatmaterialien entwickelt haben.

Im Gegensatz zu röntgendichten Mikrosphären, welche in den letzten Jahren zunehmend entwickelt und inzwischen auch klinisch untersucht wurden (45, 163, 164), haben MRT-detektierbare Mikrosphären folgende Vorteile: Zum einen können Nachuntersuchungen durchgeführt werden, wobei z.B. die Leber-MRT bei interventionsonkologischen Therapien an diesem Organ den Goldstandard darstellt. Dies kann zudem erfolgen, ohne den Patienten einer wiederholten Strahlenbelastung auszusetzen. Ferner gereicht zum Vorteil, dass auch in sensiblen Patientengut (Schwangere, Kinder) eine Kontrolluntersuchung i.d.R. problemlos durchgeführt werden kann. Des Weiteren macht die allgemeine technische Entwicklung, zunehmend auch mittels MRT, bildgesteuerte Interventionen möglich, sodass Mikrosphären potenziell auch hier eingesetzt werden könnten (170, 171).

5.2.5 Bioresorbierbarkeit

Die Bioresorbierbarkeit der neuartigen Mikrosphären stellte einen der wesentlichen Zielparameter dieser Arbeit dar. Das angewandte Punktesystem für die Beurteilung des Mikrosphärenabbaus entwickelte sich zum einen aus den histopathologischen Beobachtungen und zum anderen anhand der Literatur. Während für einige Arbeitsgruppen die Präsenz von Zellen um die Embolisatmaterialien bereits der Beweis für eine Degradation der Partikel war (89), strebte die vorliegende Arbeit durch die Klassifizierung mittels Punktesystem nach einer umfänglicheren Methode zur

Bewertung der Abbauprozesse. Ähnliche Scores wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen entwickelt und angewandt (51).

Eine einfache Beurteilung der Mikrosphären anhand der Partikelgröße erscheint nicht ohne Weiteres anwendbar. Die Anfertigung histologischer Querschnitte aus in Formaldehyd fixiertem Gewebe resultiert in zufälligen Schnittebenen. Da die Partikel hier sowohl an ihrem breitesten (Mitte) als auch schmalsten (Rand) Durchmesser angeschnitten sein können, lässt sich keine adäquate Beurteilung hinsichtlich der Resorption vornehmen. Somit könnte der echte Durchmesser eines jeden Partikels unterschätzt werden und der tatsächliche Durchmesser um das bis zu 1,4-Fache größer sein als histologisch ausgemessen (154). Zudem können histopathologische Aufarbeitungsprozesse, z.B. Einbetten und Fixation, zu einer Reduktion von Mikrosphären und Gewebe führen und die echten Größenverhältnisse verfälschen (172). An einigen Stellen imponierten weiße Areale um die intravaskulären Mikrosphären, die im ersten Moment schlussfolgern lassen, dass möglicherweise keine vollständige Gefäßobstruktion durch die Mikrosphären erfolgte. Diese Beobachtungen wurden auch bei Embolisationen mit anderen Materialien wie Alginat, TGMS oder Carboxymethyl-Cellulose/Chitosan gemacht und ebenfalls den Veränderungen in der histopathologischen Gewebeaufbereitung zugeschrieben (104).

Die Zugfestigkeit von Polydioxanon-Fadenmaterial fällt nach vier bis elf Wochen auf unter 45 % (173). Dieser Zeitraum war auch als mögliches Zielintervall für eine in vivo Resorption von Embolisatmikrosphären sehr interessant, da zu diesem Zeitpunkt von einer adäquaten Ischämie bzw. einem Infarkt ausgegangen werden konnte. In der klinischen Praxis fällt in diesen Zeitraum häufig ein Wiederholungseingriff bei Tumorembolisationen wie der TAE und TACE bei Lebermalignomen. In frühen tierexperimentellen Studien wurde eine ähnlich lang wirksame Zugfestigkeit als Zeichen der Materialstabilität nachgewiesen. Bei Verwendung als Nahtmaterial für die Aorta ist ein vollständiger Abbau jedoch erst nach etwa sechs Monaten zu erwarten (173). Die Resorptionsrate in verschiedenen anatomischen Regionen mit unterschiedlichen metabolischen Aktivitäten kann stark variieren (174).

In der vorliegenden Arbeit wurde Polydioxanon erstmalig intravaskulär und als Mikrosphären angewandt. Die physikalischen und chemischen Umweltfaktoren im direkten Blutkreislauf ließen von einem rascheren Abbau ausgehen. In der Literatur wird von einer schnelleren Resorptionsrate von Polydioxanon im Knochenmark im Vergleich zur subkutanen Implantation berichtet (175). Die Beobachtungen der vorliegenden Studie weisen in dieselbe Richtung wie Ergebnisse der genannten Literatur. Es konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt von 16 Wochen lediglich noch Fragmente der SPIO-Mikrosphären nachweisbar waren.

Insgesamt war das Degradationsintervall von etwa 16 Wochen wie erwartet im Vergleich zu Literaturangaben von sechs Monaten deutlich kürzer. Für ein temporäres Embolisatmaterial bedeutet dies jedoch eine relativ lange Abbauzeit, besonders in Anbetracht dessen, dass es bis zur kompletten Resorption noch länger andauern kann. Hier stößt die Länge des Beobachtungszeitraums bei vorliegender Arbeit jedoch an ihre Grenzen (siehe Kapitel 5.3).

Gerade die lange in vivo Nachweisbarkeit der Mikrosphären kann sich in der klinischen Praxis jedoch als vorteilhaft erweisen. Durch die verlängerte Sichtbarkeit der Mikrosphären wird eine Kontrolle des Therapieerfolgs über eine längere Zeitspanne möglich.

Ein möglicher Grund für den prolongierten Zeitraum des Abbaus der Mikrosphären in dieser Arbeit könnte die Embolisation des kompletten Nierenareals darstellen. Die Arbeitsgruppe um Weng et al. (2011-2018) beschrieb, dass nach kompletter Embolisation keine zum Abbau beitragenden Zellen mehr in das Embolisationsgebiet strömen (105). Daraus ließe sich schlussfolgern, dass partielle Embolisationen möglicherweise zu einer beschleunigten und komplette Embolisationen von ganzen Nierensegmenten ohne residuelle Kollateralen zu einer verlangsamten Degradation führen könnten.

In der Literatur werden für verschiedene untersuchte bioresorbierbare Embolisatpartikel unterschiedliche Abbauzeiten beschrieben. Die Arbeiten von Weng et al. berichten, dass Partikel aus Carboxymethyl-Cellulose/Chitosan im Tiermodell zu 95 % innerhalb von zehn Tagen abgebaut wurden (105) und darüber hinaus auch anhand des Grades der Quervernetzung (103) modifizierbar waren. Im Vergleich zu Carboxymethyl-Cellulose/Chitosan und anderen in der Forschung befindlichen temporären Embolisatmaterialien bewegte sich der Abbau der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Polydioxanon-Mikrosphären demgegenüber am oberen Ende der Zeitskala, auch wenn einige Materialien ähnlich lange Degradationsintervalle aufzeigten. Während keine der von Forster et al. (2010) im Schaf-Uterus-Modell verwendeten Alginatepartikel nach zwölf Wochen komplett abgebaut waren (70), konnten Zhou et al. (2014) Chitosanmikrosphären sogar noch nach 24 Wochen nach intramuskulärer Injektion nachweisen (108). Owen et al. (2012) fanden im Schaf-Uterus-Modell auch nach drei Monaten Überreste der verwendeten PLGA-Mikrosphären (134), auch wenn PLGA-Mikrosphären in vitro durchaus auch schneller abgebaut werden konnten (65). Zum Abbauzeitpunkt des im klinischen Alltag häufig verwendeten Gelfoam® fanden sich in der Literatur keine eindeutigen Angaben: Das Degradationsintervall variiert zwischen einer Woche bis hin zu einem permanenten Verbleib (117-121). Gelatine Mikrosphären weisen je nach Grad der Quervernetzung und dem jeweiligen Produkt und Hersteller eine Abbauzeit zwischen sieben Tagen und einigen Wochen auf (87, 110). Auch Mikrosphären aus Poly(ethylen-Glycol) Methacrylat zeigen einen vergleichsweise raschen

Abbau und sind nach 24 Stunden bis zu sieben Tagen degradiert. Stärke-Mikrosphären (DSM) haben wiederum eine sehr kurze Halbwertszeit (ca. 40 Minuten) und werden dementsprechend rasch abgebaut (129).

In Kapitel 4.5 wird evident, dass das zuletzt abgebaute Material in dieser Studie die SPIO-Anteile der Mikrosphären waren (siehe Abbildung 49). Da diese SPIO-Anteile zwar in der Mikrosphäre gelöst, jedoch eine andere Grundstruktur als Polydioxanon aufwiesen, musste in Betracht gezogen werden, dass diese Elemente der Mikrosphären permanent im Körper verbleiben könnten. Die Untersuchungen von Yu et al. (2008) zeigten jedoch, dass die SPIO-Moleküle *in vivo* in nicht-toxische Eisenionen zerfallen und ebenfalls biodegradierbar sind (176). Die Auffindung der SPIO-Partikel innerhalb von Makrophagen deutet auf einen phagozytären Abbau der Partikel hin (siehe Abbildung 47).

In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Abbau von Polydioxanon hydrolytisch in zwei Stufen abläuft. Unmittelbar nach Wasser- oder Blutkontakt erfolgt nach dem Eindringen in die Poren eine Spaltung der Ketten. Dies hat noch keine unmittelbare Auswirkung auf die physikalischen Eigenschaften des Materials. Erst im zweiten Schritt, nach rund 15 Tagen beginnt sich die Zugfestigkeit zu ändern. Mit dem progredientem Zerfall wird der Abbau zudem dadurch beschleunigt, dass Phagozyten die entstandenen Fragmente aufnehmen und verarbeiten (177). Eine wichtige Beobachtung der histopathologischen Auswertungen waren die in den Phagozyten und Fremdkörperriesenzellen eingeschlossenen Reste der SPIO-Mikrosphären, was Anzeichen einer deutlichen Degradation darstellt, wie sie bereits von Forster et al. (2010) beschrieben wurden (70). Das mit der Zeit zunehmende Aufkommen von Fremdkörperriesenzellen in den Auswertungen dieser Studie bestätigte diese Beobachtungen. Der Abbau im Fall von Polydioxanon-Mikrosphären geschah im Sinne eines Zwei-Phasen-Modells nicht nur hydrolytisch, sondern ist in entscheidender Weise auch durch Phagozytose erfolgt.

Der Mechanismus des Abbaus von Polydioxanon resultiert in Glycoxyolat, was entweder über die Niere ausgeschieden wird oder über den Zwischenschritt Glycin in Kohlenstoffdioxid und Wasser übergeht. Polydioxanon wird in nicht-toxische Metaboliten abgebaut (178). Obwohl nicht im Fokus der vorliegenden Untersuchung, konnten auch in dieser Arbeit keine toxischen systemischen Effekte beobachtet werden.

Das Degradationsintervall ist weiterhin abhängig von Porosität, Kristallinität und Molekulargewicht (178), als auch von Materialdurchmesser und anatomischen wie metabolischen Gegebenheiten des umgebenden Gewebes (175). Für weitere Modifikationsmöglichkeiten des Abbaus gibt die Arbeit von Middleton und Tipton (2000) einige Optionen. Polymerdegradation kann generell, z.B. durch Hydrophilizität der Monomere, beschleunigt werden. Hydrophile

Materialien sind grundsätzlich für hydrolytische Abbauprozesse empfänglicher, was den Abbau beschleunigt (179). Dies kann bspw. durch die Substitution von Esterend-Gruppen durch Carbonsäureend-Gruppen geschehen. Dadurch werden die Hydrophilizität und die Aufnahme von Wasser erhöht. Dieser Prozess steigert z.B. die Degradationsrate in PLGA, einem Polymer, welches Polydioxanon chemisch ähnlich ist (180). Eine weitere Möglichkeit der Modifikation ist die Änderung der Materialgröße und die damit zusammenhängende Anpassung der Verhältnisse von Oberfläche zu Volumen. Eine Vergrößerung der Oberfläche exponiert vermehrt hydrophile Gruppen und kann somit die Degradation beschleunigen (179). In Chitosan/Cellulose-Mikrosphären konnte auch eine erhöhte Stabilität der Mikrosphären durch eine Erhöhung der Dichte im Grad der Quervernetzung erzeugt werden (104).

Zusammengefasst zeigten die Mikrosphären über den Beobachtungszeitraum von 16 Wochen einen deutlichen Trend zur Resorption. Trotz extensiver phagozytärer Degradation waren Partikelresiduen und SPIO-Elemente auch nach vier Monaten nachweisbar. Somit befinden sich die SPIO-beladenen Mikrosphären aus Polydioxanon, im Vergleich zu ähnlichen beforschten Produkten, eher an der oberen Grenze des Degradationsintervalls. Eine Adaption des Materials hinsichtlich einer kürzeren Resorptionsdauer kann auf vielfältige Art und Weise erfolgen, um z.B. für Tumorembolisationen passendere Resorptionszeiten gewährleisten zu können.

5.2.6 Biokompatibilität

Polydioxanon ist, wie bereits erläutert, mannigfaltig als medizinisches Material in Verwendung, wurde allerdings in dieser Arbeit erstmalig intravaskulär eingesetzt. Entscheidend im Hinblick auf die Biokompatibilität ist daher vor allem die Reaktion der Gefäßwand und die Gewebetoleranz gegenüber dem eingebrachten Material und dessen Abbauprodukten zu prüfen, da diese Prozesse maßgeblich eine spätere Rekanalisation und Reperfusion beeinflussen. So konnte durch den Abbau von temporären Mikrosphären aus Gelatine eine inflammatorische Reaktion ausgelöst werden, die konsekutiv das Gefäßlumen verengt, was klinisch sogar in einem Rückgang einer initialen Reperfusion zu späteren Zeitpunkten resultieren kann (87). Hierzu konnten diverse Erkenntnisse in den Ergebnissen vorliegender Arbeit festgehalten werden. Wie in Abbildung 54 erkennbar, führt ein extensiver Abbau einhergehend mit einer Entzündungsreaktion ebenfalls zu einer Destruktion der Gefäßwandarchitektur ohne erkennbares Restlumen. Diese Beobachtungen spiegelten sich in dieser Arbeit jedoch nicht in einem Rückgang der angiographischen Reperfusion wider. Die qualitativen Auswertungen zeigten im Gegenteil eine vollständige Reperfusion nach zwölf und 16 Wochen (Tabelle 11). Die Diskrepanz der Beobachtungen in dieser Arbeit, zwischen veränderter Gefäßwandstruktur und -lumen einerseits und intakter Reperfusion andererseits,

verdeutlicht den von Maeda et al. (2013) sowie Verret et al. (2011) beschriebenen wichtigen Aspekt der Unterscheidung zwischen Revaskularisation und Rekanalisation (81, 181). So können die Gefäße angiographisch rekanalisiert erscheinen. Dies kann bedingt sein durch die Resorption von thrombotischem Gebilde oder einzelner Zellen oder auch durch Extravasation der Partikel. Dennoch zeigten histopathologische Analysen – wie auch in dieser Arbeit –, dass die Gefäßwand meist beschädigt ist und die als Reperfusion anmutenden angiographischen Ergebnisse äußerst kritisch betrachtet werden müssen (siehe Kapitel 5.2.3).

Die hohe Relevanz einer zügigen Resorption der eingebrachten Mikrosphären wird auch von der Gruppe um Forster et al. (2010) unterstützt. Ein Degradationsintervall führe zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer ausreichenden Ischämie, sei aber womöglich zu lange, um eine Instandhaltung eines intakten Gefäßes zu gewährleisten (70). Als relevante Lokalisation einer entzündlichen Gewebereaktion war außer der Gefäßwand zudem auch das periarterielle Gewebe in Betracht zu ziehen. Wie oben dargelegt, soll das eingebrachte Fremdmaterial keine chronische Entzündung induzieren. Diese ist grundsätzlich charakterisiert durch die Anwesenheit von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten mit Proliferation von Blutgefäßen und Bindegewebe (43).

Weiter konnte gezeigt werden, dass die Inflamationsrate einen bedeutenden Effekt auf die lokale Pharmakokinetik hat. So kann die Wundheilungszone wie eine Barriere für die Medikamentendiffusion wirken. Dies kann im Falle von medikamentenbeladenen Partikeln zu entscheidenden Einschränkungen in der klinischen Anwendung führen und muss daher für eine Evaluation eines neuen, potenziell medikamentenbeladenem Embolisatmaterial bedacht werden.

Ferner muss auch ein möglicher Einfluss der Partikelgröße auf die lokale Entzündungsreaktion diskutiert werden. Dieser Aspekt der Partikelgröße sowie Partikelmenge wird bspw. von der Arbeitsgruppe um Stampfl et al. (2008) (159) diskutiert, konnte in dieser Arbeit jedoch aufgrund der kleinen Fallzahl nicht näher untersucht werden.

Im Allgemeinen wird für Polydioxanon in der Literatur eine ausgezeichnete Biokompatibilität, teilweise sogar ohne Immunogenität bei minimal inflammatorischer Antwort beschrieben (179, 182). Polydioxanon als Fadenmaterial zeigt im Vergleich zu Polymilchsäure und Polymilch-Co-Glycolsäure (beides aktuell experimentell verwendete Embolisatmaterialien) eine niedrigere Inflamationsrate (144). Eine Destruktion von elastischem Gewebe nach einigen Wochen und Zunahme von fibrotischem Gewebe wurde dennoch bereits in den mitunter ersten tierexperimentellen Studien zu Polydioxanon als Fadenmaterial beobachtet (173).

Der durch Polydioxanon induzierte inflammatorische Prozess ist entsprechend der Literatur auf zwölf Wochen beschränkt und zeigte im Tiermodell eine Reaktion mit Lymphozyteninfiltration

und späterem histiozytärer Reaktion mit Bildung von Granulationsgewebe und Fremdkörperriesenzellen (157). In der vorliegenden Arbeit besteht die inflammatorische Reaktion aus früher Infiltration von Lymphozyten und Fibroblasten, sowie späterer Entwicklung einer ausgeprägten Reaktion mit zunächst Monozyten, später Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen, Fibrose und Granulationsgewebe. Dies steht in Einklang mit grundsätzlichen pathologischen Beschreibungen wie in der Arbeit von James Anderson (2001) (43) und ist vergleichbar mit anderen Embolisatmaterialien wie Embosphere® oder Polyvinylalkohol-Partikeln. In letzterem Fall war die Fremdkörperriesenzellreaktion in einer klinischen Studie sogar bis über ein Jahr nach Uterusembolisation der Patientinnen nachweisbar (48).

Weiter zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit einen über zwölf Wochen hinausgehenden Prozess einer Immunantwort auf das eingebrachte Fremdmaterial mit Zerstörung der Gefäßwandarchitektur und Nachweis von Mikrosphären im periarteriellen Gewebe. Ähnliche Prozesse wurden auch bei Verwendung von TGMS und anderen permanenten Partikeln nachgewiesen (183). Auch Stampfl et al. (2007) postulieren in einer Studie über TGMS, dass eine Zerstörung von Gefäßwänden der treibende Faktor hinter Partikelwanderung ins perivaskuläre Gewebe ist (184). Am besten tragen die Beobachtungen von Verret et al. (2011) zu einer Erklärung des Phänomens bei. Die intraarterielle Applikation ruft einen Gefäßschaden hervor. Unmittelbar nach Einbringen des Fremdmaterials bildete sich eine provisorische umhüllende Matrix, welche sowohl chemokin als auch zytokin wirkte und somit eine Rekrutierung von inflammatorischen Zellen ermöglichte. Dies führte zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion im Lumen und Gefäßwand, was schließlich zur Partikelmigration durch abtransportierende Makrophagen in das perivaskuläre Gewebe und Veränderung der Gefäßwandstruktur resultierte (181).

Dieser Argumentation folgend, könnten die inflammatorischen Veränderungen somit nicht ausschließlich materialbedingt sein. Stattdessen könnte durch die mechanische Beanspruchung per se ein Gefäßschaden induziert worden sein. Für diese Argumentation spricht, dass (peri-)vaskuläre Entzündungsreaktionen bei einer Reihe an verschiedenen Materialien wie Gelatine-MS (87), PLGA (134) oder auch Trisacryl-Gelatine auftreten (185, 186). Gemäß der Tatsache, dass jede Embolisation eine Mini-Implantation darstellt, erscheint es ebenfalls wahrscheinlich, dass der Körper grundsätzlich auf Fremdkörper reagiert und die eigentliche Entzündungsreaktion auf die Nekrose und Ischämie zurückzuführen ist. In diesem Fall wäre die Wahl eines anderen Organmodells, ggf. mit zweifacher oder doppelseitiger Gefäßversorgung (Leber oder Uterus) denkbar. Dadurch könnte möglicherweise das Ausmaß der Nekrose limitiert werden und die entstehende inflammatorische Reaktion direkter mit dem eingebrachten Material in Verbindung gebracht werden (187).

Ferner könnte die Veränderung des pH-Wertes die Biokompatibilität beeinflussen. Durch eine verlangsamte Entfernung von säurehaltigen Metaboliten kann der pH-Wert verringert und eine lokale Gewebereaktion induziert werden (178).

In vergleichbaren tierexperimentellen Studien wurden zur Destruktion der inneren Gefäßwand-schicht unterschiedliche Beobachtungen gemacht. Sowohl eine rupturierte als auch eine intakte MEI wurde nachgewiesen (77). Auch über Jahrzehnte vielfach gebrauchte Gelatineschwämme induzieren eine akute nekrotisierende Arteriitis mit lokalem Ödem und Unterbrechung der MEI (158). In der Fachliteratur wird u.a. diskutiert, dass Unterschiede in der Vollständigkeit der Embolisation diese ungleichen Ergebnisse erklären, indem eine vollständige Embolisation zu einem kompletten Abbruch des arteriellen Zuflusses inklusive Entzündungszellen führt und somit keine ausgeprägte inflammatorische Reaktion entstehen kann (105).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stützen diese Auffassung, da in den meisten Fällen lediglich eine selektive Embolisation mit eng umschriebenem Infarktareal entstand, was wiederum die Chance der partiellen Einwanderung von Entzündungszellen über residuell offene Gefäße, wie nicht-embolisierte Gefäßbögen (*Aa. arcuatae*) an den Rändern des embolisierten Segmentes ermöglicht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass die induzierten inflammatorischen Reaktionen durch eine letztlich vollständige Resorption des eingebrachten Fremdmaterials selbstlimitierend sind (105). Der Beobachtungszeitraum von 16 Wochen war jedoch nicht lang genug, um einen vollständigen Abbau der Partikel und damit ein Sistieren der Gewebereaktion nachzuweisen.

Alle dargelegten inflammatorischen Prozesse waren lokal begrenzt und lediglich im embolisierten Bereich zu beobachten. Es zeigte sich in den histomorphologischen Befunden insgesamt kein Anhalt für eine Inkompatibilitätsreaktion, floride Komponente oder wesentliche granulozytäre Entzündungskomponente. Diese Feststellungen sowie das Ausbleiben fehlender systemischer Effekte oder Pathologien in den Versuchstieren legten nahe, dass die neuartigen Mikrosphären aus Polydioxanon insgesamt als gut biokompatibles und sicheres Langzeitimplantationsmaterial zu bewerten sind.

5.3 Einschränkungen

Die dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit müssen unter dem Gesichtspunkt einiger Limitationen betrachtet werden. Es handelt sich um eine experimentelle Pilotstudie im gesunden Kaninchen-Nieren-Modell mit entsprechenden Grenzen. Trotz aller in Kapitel 5.1.1 ausführlich dargelegten Vorteile des Kaninchen-Nieren-Modells, stellt das Tiermodell dennoch keine abschließende direkte Übertragbarkeit auf den Menschen dar.

Eine Anwendung im Tumormodell oder eine Kontrollgruppe in Form einer Scheinbehandlungsgruppe („Sham-treated control group“) war zu diesem frühen Zeitpunkt der Studie nicht geplant. Als Kontrolle dienten makroskopisch die kontralateralen, unbehandelten Nieren. Kontrollgruppen mit anderen degradierbaren Mikrosphären stellen hier den erwünschten Goldstandard dar.

Zudem ist die Fallzahl in der vorliegenden Arbeit zu gering und daher nicht ausreichend, um eine suffiziente Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu garantieren. Darüber hinaus bleibt die ungleichmäßige Verteilung der Versuchstiere über die verschiedenen Beobachtungszeiträume eine weitere Einschränkung. Insbesondere die Tieranzahl mit $n = 1$ / Beobachtungsgruppe kann den Grad der Zuverlässigkeit der Ergebnisse beeinflussen und liefert allenfalls erste Hinweise. In einer Pilotstudie wie der vorliegenden muss jedoch eine stete Abwägung zwischen Reproduzierbarkeit und Tierwohl erfolgen. Der Nachteil der niedrigen Fallzahl wird jedoch in Teilen durch die große Anzahl der analysierten Partikel ($n > 500$) und der insgesamt angefertigten histologischen Schnitte ($n = 936$) relativiert. Insbesondere die Zielparameter Degradation oder Biokompatibilität waren trotz der geringen Anzahl an Versuchstieren für diese Art Studie ausreichend beurteilbare Zielgrößen.

Ferner waren dieser tierexperimentellen Arbeit keine entsprechenden *in vitro* Versuche vorgeschaltet, um bspw. eine Zytotoxizität durch Einfluss der Mikrosphären auf humane Umbilikalvenen-Endothelzellen in einer Zellkultur oder die Mikrosphären auf Hämokompatibilität mit Hämolyse-Assays zu untersuchen. Andere Arbeitsgruppen hatten in vorgeschalteten *in vitro* Versuchen z.B. in Bezug auf die enzymatische Degradation irreführende Hinweise erhalten, welche sich im *in vivo* Modell nicht bestätigen ließen (105). Ein *in vitro* Modell vermag die komplexen, sich gegenseitig beeinflussenden Systeme, z.B. durch die Blutzirkulation mit mechanischen und chemisch-physiologischen Eigenschaften wie Enzymen oder infiltrierenden Entzündungszellen, nicht ausreichend widerzuspiegeln und liefert lediglich Hinweise auf das *in vivo* Verhalten.

Die Schwierigkeiten und Einschränkungen bei der Injizierbarkeit der Mikrosphären waren bei der Testung während der Produktionsphase nicht abzusehen. Vor einer Fortsetzung der Experimente

müssen daher Deformierbarkeit, Injizierbarkeit, Quell- und Schwebeverhalten der Mikrosphären sowie Tendenz zur Partikelverklumpung und Wandadhärenz näher untersucht und verbessert werden.

Verschiedene klinische Indikationen wie akute Blutungen, AVM oder Tumorembolisationen bedürfen entsprechend der Zielanatomie einer jeweils angepassten Größenordnung der Mikrosphären. Da diese in verschiedenen Größen intravaskulär unterschiedliches Verhalten zeigen können, müssten hierzu weitere Studien mit mehreren Vergleichsgruppen angefertigt werden, um mögliche unterschiedliche Auswirkungen verschiedener Partikelgrößen zu untersuchen.

Der Trend in der aktuellen Entwicklung von Embolisatmaterialien zeigt, wie in Kapitel 2.4 dargelegt, in die Richtung von medikamentenfreisetzenden Partikeln. Daher müssen für eine spätere klinische Anwendbarkeit Untersuchungen zur potenziellen Medikamentenbeladbarkeit ergänzt werden. Dies war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, in welcher es um die Erprobung eines neuen, abbaubaren Materials für Mikrosphären und um deren Handhabung zur Transkatheterembolisation sowie deren Verhalten intravaskulär im zeitlichen Verlauf ging. Die vorliegende Studie lieferte somit das erforderliche Grundlagenwissen, auf dessen Basis nun weitere Untersuchungen aufbauen können.

Die Rolle der Gefäßversorgung der Niere wurde in Kapitel 5.2.2 und 5.2.6 diskutiert. In dieser Studie wurde die Nierenarterie als Zielgefäß gewählt, da es angiographisch, makro- und mikroskopisch gut praktikabel ist, die superselektiv angegangene Embolisationsregion zu finden, zu untersuchen und damit die grundsätzlichen Fragen bezüglich der Abbaubarkeit und Gewebereaktion mit den neuen Mikrosphären zu beantworten. Die Niere als Organ mit Versorgung eines Endstromgebietes ohne Kollateralkreislauf stellt einen Gegensatz zu anderen Bauchorganen wie der Leber dar. Bei einer Anwendung im Bereich der Leber wäre es denkbar, dass durch Doppelversorgung möglicherweise die Gewebereaktion und die Abbaubarkeit beeinflusst werden (68).

Wie in Kapitel 5.2.6 angesprochen könnte für die Biokompatibilität ein anderes Tier- bzw. Organmodell eine geeignetere Methode darstellen, um den Grad der inflammatorischen Entzündungsreaktion eindeutiger dem eingebrachten Material zuschreiben zu können.

Zudem muss, um eine verlässliche Aussage über den Grad der Gewebeverträglichkeit treffen zu können, der exakte Zelltypus, die Menge und das Ausmaß der hauptsächlich an einer inflammatorischen Entzündungsreaktion beteiligten Zellen ggf. durch Spezialmethoden, z.B. mittels Immunhistochemie, untersucht werden. Der adaptierte Score der Gefäßwandverletzung kann hier lediglich eine Richtung vorgeben.

Letztlich muss mit Hinblick auf die Beobachtungszeiträume konstatiert werden, dass trotz eines für diese Studienart relativ lange bemessenen Beobachtungszeitraumes, ein Intervall von 16 Wochen nicht ausreichend war, um abschließend eine vollständige Resorption der Mikrosphären nachzuweisen.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In Anbetracht der gewonnenen Ergebnisse mitsamt den diskutierten Nachteilen und Einschränkungen lässt sich Folgendes abschließend festhalten: Die in dieser Arbeit eingesetzten neuartigen, SPIO-beladenen Mikrosphären aus Polydioxanon sind größenkalibrierbar und sorgen im Kaninchen-Nieren-Modell bei allen Versuchstieren für einen effektiven Gefäßverschluss mit konsekutiver Ischämie und Infarkt. Die Mikrosphären lassen sich in vivo nicht-invasiv mittels verschiedener MRT-Sequenzen nachweisen. Damit lässt sich das Ausmaß der Embolisation durch Nachweis der markierten Partikel innerhalb und außerhalb der Zielregion durch die MRT sichtbar machen. Unter Röntgendurchleuchtung sind die markierten Partikel nicht sichtbar, sondern müssen mit Röntgenkontrastmittel vermischt injiziert werden. Die Mikrosphären zeigten über den Beobachtungszeitraum von 16 Wochen einen deutlichen Trend zur Resorption; die angiographischen Auswertungen mit deutlichem Trend zur partiellen bis vollständigen Reperfusion der embolisierten Gefäße müssen in Anbetracht der histopathologischen Ergebnisse kritisch betrachtet werden und sind möglicherweise durch andere Phänomene wie Extravasationen der Partikel im Rahmen der lokalen Entzündungsreaktion oder Neoangiogenese zu erklären.

Die Abbauphase der untersuchten temporären Mikrosphären ist möglicherweise zu lang, um z.B. im Rahmen von Tumorembolisationen (TAE, TACE) einen zeitnahen Zweiteingriff über rekanalisierte Arterien zu ermöglichen.

Die entscheidende Einschränkung des Materials auf dem Weg zum klinischen Einsatz etwa bei PatientInnen mit Blutungen, benignen oder malignen Tumoren ist die erschwerte Injizierbarkeit der Partikel mit resultierender Katheterverstopfung und die damit schlechte Dosierbarkeit bei superselektiver Embolisation. Somit ist eine materialwissenschaftliche Optimierung der Mikrosphären notwendig, um die Degradationszeit zu beschleunigen und insbesondere, um deren Injektionsfähigkeit zu verbessern.

6. Literaturverzeichnis

1. Seldinger SI. Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography; a new technique. *Acta radiol.* 1953;39(5):368-76.
2. Rosch J, Dotter CT, Brown MJ. Selective arterial embolization. A new method for control of acute gastrointestinal bleeding. *Radiology.* 1972;102(2):303-6.
3. Hamby WB, Gardner WJ. Treatment of pulsating exophthalmos: with report of two cases. *JAMA Surgery.* 1933;27(4):676-85.
4. Cornelis F, Couzi L, Le Bras Y, Hubrecht R, Dodre E, Genevieve M, Perot V, Wallerand H, Ferriere JM, Merville P, Grenier N. Embolization of polycystic kidneys as an alternative to nephrectomy before renal transplantation: a pilot study. *Am J Transplant.* 2010;10(10):2363-9.
5. Delgado P, Diaz F, Gonzalez A, Sanchez E, Gutierrez P, Hernandez D, Torres A, Lorenzo V. Intolerance syndrome in failed renal allografts: incidence and efficacy of percutaneous embolization. *Am J Kidney Dis.* 2005;46(2):339-44.
6. Pei R, Yang M, Wang C, Wang J, Tong X, Zou Y. Superselective Transcatheter Artery Embolization in Patients with Non-ischemic Priapism. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2018;41(6):867-71.
7. Reyes BL, Trerotola SO, Venbrux AC, Savader SJ, Lund GB, Peppas DS, Mitchell SE, Gearhart JP, White RI, Jr., Osterman FA, Jr. Percutaneous embolotherapy of adolescent varicocele: results and long-term follow-up. *J Vasc Interv Radiol.* 1994;5(1):131-4.
8. Venbrux AC, Chang AH, Kim HS, Montague BJ, Hebert JB, Arepally A, Rowe PC, Barron DF, Lambert D, Robinson JC. Pelvic congestion syndrome (pelvic venous incompetence): impact of ovarian and internal iliac vein embolotherapy on menstrual cycle and chronic pelvic pain. *J Vasc Interv Radiol.* 2002;13(2 Pt 1):171-8.
9. Wan X, Yao HJ, Zheng DC, Liu C, Fu SB, Guo JH, Xie MK, Wang Z. Posttraumatic Arterial Priapism Treated with Superselective Embolization: Our Clinical Experience and a Review of the Literature. *Adv Ther.* 2019;36(3):684-90.
10. Vesselle G, Petit I, Boucebei S, Rocher T, Velasco S, Tasu JP. Radioembolization with yttrium-90 microspheres work up: Practical approach and literature review. *Diagn Interv Imaging.* 2015;96(6):547-62.
11. Abulkhir A, Limongelli P, Healey AJ, Damrah O, Tait P, Jackson J, Habib N, Jiao LR. Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg.* 2008;247(1):49-57.
12. Golzarian J, Struyven J, Abada HT, Wery D, Dussaussois L, Madani A, Ferreira J, Dereume JP. Endovascular aortic stent-grafts: transcatheter embolization of persistent perigraft leaks. *Radiology.* 1997;202(3):731-4.
13. Rosen RJ, Green RM. Endoleak management following endovascular aneurysm repair. *J Vasc Interv Radiol.* 2008;19(6 Suppl):S37-43.

14. van Beijnum J, van der Worp HB, Buis DR, Al-Shahi Salman R, Kappelle LJ, Rinkel GJ, van der Sprenkel JW, Vandertop WP, Algra A, Klijn CJ. Treatment of brain arteriovenous malformations: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011;306(18):2011-9.
15. Bookstein JJ, Moser KM, Kalafer ME, Higgins CB, Davis GB, James WS. The role of bronchial arteriography and therapeutic embolization in hemoptysis. *Chest*. 1977;72(5):658-61.
16. Remy J, Arnaud A, Fardou H, Giraud R, Voisin C. Treatment of hemoptysis by embolization of bronchial arteries. *Radiology*. 1977;122(1):33-7.
17. Lang EV, Picus D, Marx MV, Hicks ME. Massive arterial hemorrhage from the stomach and lower esophagus: impact of embolotherapy on survival. *Radiology*. 1990;177(1):249-52.
18. Wang YX, De Baere T, Idee JM, Ballet S. Transcatheter embolization therapy in liver cancer: an update of clinical evidences. *Chin J Cancer Res*. 2015;27(2):96-121.
19. Yamashita Y, Harada M, Yamamoto H, Miyazaki T, Takahashi M, Miyazaki K, Okamura H. Transcatheter arterial embolization of obstetric and gynaecological bleeding: efficacy and clinical outcome. *Br J Radiol*. 1994;67(798):530-4.
20. Ben-Menachem Y, Coldwell DM, Young JW, Burgess AR. Hemorrhage associated with pelvic fractures: causes, diagnosis, and emergent management. *AJR Am J Roentgenol*. 1991;157(5):1005-14.
21. Matalon TS, Athanasoulis CA, Margolies MN, Waltman AC, Novelline RA, Greenfield AJ, Miller SE. Hemorrhage with pelvic fractures: efficacy of transcatheter embolization. *AJR Am J Roentgenol*. 1979;133(5):859-64.
22. Coccolini F, Montori G, Catena F, Kluger Y, Biffi W, Moore EE, Reva V, Bing C, Bala M, Fugazzola P, Bahouth H, Marzi I, Velmahos G, Ivatury R, Soreide K, Horer T, Ten Broek R, Pereira BM, Fraga GP, Inaba K, Kashuk J, Parry N, Masiakos PT, Mylonas KS, Kirkpatrick A, Abu-Zidan F, Gomes CA, Benatti SV, Naidoo N, Salvetti F, Maccatrozzo S, Agnoletti V, Gamberini E, Solaini L, Costanzo A, Celotti A, Tomasoni M, Khokha V, Arvieux C, Napolitano L, Handolin L, Pisano M, Magnone S, Spain DA, de Moya M, Davis KA, De Angelis N, Leppaniemi A, Ferrada P, Latifi R, Navarro DC, Otomo Y, Coimbra R, Maier RV, Moore F, Rizoli S, Sakakushev B, Galante JM, Chiara O, Cimbanassi S, Mefire AC, Weber D, Ceresoli M, Peitzman AB, Wehlie L, Sartelli M, Di Saverio S, Ansaloni L. Splenic trauma: WSES classification and guidelines for adult and pediatric patients. *World J Emerg Surg*. 2017;12:40.
23. de Bruijn AM, Smink M, Lohle PNM, Huirne JAF, Twisk JWR, Wong C, Schoonmade L, Hehenkamp WJK. Uterine Artery Embolization for the Treatment of Adenomyosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Vasc Interv Radiol*. 2017;28(12):1629-42.e1.
24. Zumstein V, Betschart P, Vetterlein MW, Kluth LA, Hechelhammer L, Mordasini L, Engeler DS, Kessler TM, Schmid HP, Abt D. Prostatic Artery Embolization versus Standard Surgical Treatment for Lower Urinary Tract Symptoms Secondary to Benign Prostatic Hyperplasia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Focus*. 2019;5(6):1091-100.
25. Idee JM, Guiu B. Use of Lipiodol as a drug-delivery system for transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: a review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(3):530-49.

26. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. 2003;37(2):429-42.
27. Takayasu K, Arii S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Kojiro M, Makuuchi M, Yamaoka Y. Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology*. 2006;131(2):461-9.
28. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, Zhu AX, Murad MH, Marrero JA. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018;67(1):358-80.
29. Vogel A, Cervantes A, Chau I, Daniele B, Llovet JM, Meyer T, Nault JC, Neumann U, Ricke J, Sangro B, Schirmacher P, Verslype C, Zech CJ, Arnold D, Martinelli E. Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(5):871-3.
30. Gbolahan OB, Schacht MA, Beckley EW, LaRoche TP, O'Neil BH, Pyko M. Locoregional and systemic therapy for hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Oncol*. 2017;8(2):215-28.
31. Zielinski H, Szmigielski S, Petrovich Z. Comparison of preoperative embolization followed by radical nephrectomy with radical nephrectomy alone for renal cell carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 2000;23(1):6-12.
32. Muller A, Rouviere O. Renal artery embolization-indications, technical approaches and outcomes. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(5):288-301.
33. Martin RC, 2nd, Scoggins CR, Schreeder M, Rilling WS, Laing CJ, Tatum CM, Kelly LR, Garcia-Monaco RD, Sharma VR, Crocenzi TS, Strasberg SM. Randomized controlled trial of irinotecan drug-eluting beads with simultaneous FOLFOX and bevacizumab for patients with unresectable colorectal liver-limited metastasis. *Cancer*. 2015;121(20):3649-58.
34. Fiorentini G, Aliberti C, Tilli M, Mulazzani L, Graziano F, Giordani P, Mambrini A, Montagnani F, Alessandrini P, Catalano V, Coschiera P. Intra-arterial infusion of irinotecan-loaded drug-eluting beads (DEBIRI) versus intravenous therapy (FOLFIRI) for hepatic metastases from colorectal cancer: final results of a phase III study. *Anticancer Res*. 2012;32(4):1387-95.
35. Pelage JP, Fohlen A, Mitry E, Lagrange C, Beauchet A, Rougier P. Chemoembolization of Neuroendocrine Liver Metastases Using Streptozocin and Tris-acryl Microspheres: Embozar (EMBOsphere + ZAnosaR) Study. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2017;40(3):394-400.
36. Wang M, Zhang J, Ji S, Shao G, Zhao K, Wang Z, Wu A. Transarterial chemoembolisation for breast cancer with liver metastasis: A systematic review. *Breast*. 2017;36:25-30.
37. Weiss CR, Abiola GO, Fischman AM, Cheskin LJ, Vairavamurthy J, Holly BP, Akinwande O, Nwoke F, Paudel K, Belmustakov S, Hong K, Patel RS, Shin EJ, Steele KE, Moran TH, Thompson RE, Dunklin T, Ziessman H, Kraitchman DL, Arepally A. Bariatric

Embolization of Arteries for the Treatment of Obesity (BEAT Obesity) Trial: Results at 1 Year. *Radiology*. 2019;182354.

38. Poursaid A, Jensen MM, Huo E, Ghandehari H. Polymeric materials for embolic and chemoembolic applications. *J Control Release*. 2016;240:414-33.
39. Food and Drug Administration Center for Devices and Radiological Health. Guidance for Industry and FDA Staff: Class II Special Controls Guidance Document: Vascular and Neurovascular Embolization Devices Silver Spring, MD, USA: Food and Drug Administration Center for Devices and Radiological Health; 2004 [Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/class-ii-special-controls-guidance-document-vascular-and-neurovascular-embolization-devices-guidance>].
40. Laurent A. Microspheres and nonspherical particles for embolization. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2007;10(4):248-56.
41. Lewis AL, Dreher MR. Locoregional drug delivery using image-guided intra-arterial drug eluting bead therapy. *J Control Release*. 2012;161(2):338-50.
42. Massmann A, Rodt T, Marquardt S, Seidel R, Thomas K, Wacker F, Richter GM, Kauczor HU, Bucker A, Pereira PL, Sommer CM. Transarterial chemoembolization (TACE) for colorectal liver metastases--current status and critical review. *Langenbecks Arch Surg*. 2015;400(6):641-59.
43. Anderson JM. Biological Responses to Materials. *Annu Rev Mater Res*. 2001;31(1):81-110.
44. Lewis AL, Adams C, Busby W, Jones SA, Wolfenden LC, Leppard SW, Palmer RR, Small S. Comparative in vitro evaluation of microspherical embolisation agents. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(12):1193-204.
45. Kehoe S, Amensag S, Looney M, Abraham R, Boyd D. "Imageable" Zinc-Silicate Glass Microspheres For Transarterial Embolization: A Renal Artery Embolization Study. *Biomed glasses*. 2015;1.
46. Han T, Yang X, Zhang Y, Li G, Liu L, Chen T, Zheng Z. The clinical safety and efficacy of conventional transcatheter arterial chemoembolization and drug-eluting beads-transcatheter arterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Biosci Trends*. 2019;13(5):374-81.
47. Chiesa AG, Hart WR. Uterine artery embolization of leiomyomas with trisacryl gelatin microspheres (TGM): pathologic features and comparison with polyvinyl alcohol emboli. *Int J Gynecol Pathol*. 2004;23(4):386-92.
48. Colgan TJ, Pron G, Mocarski EJ, Bennett JD, Asch MR, Common A. Pathologic features of uteri and leiomyomas following uterine artery embolization for leiomyomas. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(2):167-77.
49. Weichert W, Denkert C, Gauruder-Burmester A, Kurzeja R, Hamm B, Dietel M, Kroencke TJ. Uterine arterial embolization with tris-acryl gelatin microspheres: a histopathologic evaluation. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(7):955-61.

50. Wiggermann P, Wohlgemuth WA, Heibl M, Vasilj A, Loss M, Schreyer AG, Stroszczyński C, Jung EM. Dynamic evaluation and quantification of microvascularization during degradable starch microspheres transarterial chemoembolisation (DSM-TACE) of HCC lesions using contrast enhanced ultrasound (CEUS): a feasibility study. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;53(4):337-48.
51. Ohta S, Nitta N, Takahashi M, Murata K, Tabata Y. Degradable gelatin microspheres as an embolic agent: an experimental study in a rabbit renal model. *Korean J Radiol.* 2007;8(5):418-28.
52. Sieghart W, Hucke F, Peck-Radosavljevic M. Transarterial chemoembolization: modalities, indication, and patient selection. *J Hepatol.* 2015;62(5):1187-95.
53. Louguet S, Verret V, Bedouet L, Servais E, Pascale F, Wassef M, Labarre D, Laurent A, Moine L. Poly(ethylene glycol) methacrylate hydrolyzable microspheres for transient vascular embolization. *Acta Biomater.* 2014;10(3):1194-205.
54. Laurent A, Moine L. The new biomaterials of embolization: the shift to degradable. *Med Sci (Paris).* 2017;33(1):25-31.
55. Palmer SK, Zamudio S, Coffin C, Parker S, Stamm E, Moore LG. Quantitative estimation of human uterine artery blood flow and pelvic blood flow redistribution in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1992;80(6):1000-6.
56. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011;146(6):873-87.
57. Sergio A, Cristofori C, Cardin R, Pivetta G, Ragazzi R, Baldan A, Girardi L, Cillo U, Burra P, Giacomini A, Farinati F. Transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma (HCC): the role of angiogenesis and invasiveness. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(4):914-21.
58. Tezuka M, Hayashi K, Kubota K, Sekine S, Okada Y, Ina H, Irie T. Growth rate of locally recurrent hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization: comparing the growth rate of locally recurrent tumor with that of primary hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2007;52(3):783-8.
59. Wu XZ, Xie GR, Chen D. Hypoxia and hepatocellular carcinoma: The therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(8):1178-82.
60. Bastian P, Bartkowski R, Kohler H, Kissel T. Chemo-embolization of experimental liver metastases. Part I: distribution of biodegradable microspheres of different sizes in an animal model for the locoregional therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998;46(3):243-54.
61. Bedouet L, Moine L, Servais E, Beilvert A, Labarre D, Laurent A. Tunable delivery of niflumic acid from resorbable embolization microspheres for uterine fibroid embolization. *Int J Pharm.* 2016;511(1):253-61.
62. Bedouet L, Verret V, Louguet S, Servais E, Pascale F, Beilvert A, Baylatry MT, Labarre D, Moine L, Laurent A. Anti-angiogenic drug delivery from hydrophilic resorbable embolization microspheres: an in vitro study with sunitinib and bevacizumab. *Int J Pharm.* 2015;484(1-2):218-27.

63. Chang SH, Lee HJ, Park S, Kim Y, Jeong B. Fast Degradable Polycaprolactone for Drug Delivery. *Biomacromolecules*. 2018;19(6):2302-7.
64. Chen J, White SB, Harris KR, Li W, Yap JW, Kim DH, Lewandowski RJ, Shea LD, Larson AC. Poly(lactide-co-glycolide) microspheres for MRI-monitored delivery of sorafenib in a rabbit VX2 model. *Biomaterials*. 2015;61:299-306.
65. Choi JW, Park JH, Baek SY, Kim DD, Kim HC, Cho HJ. Doxorubicin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared using the solid-in-oil-in-water method for the transarterial chemoembolization of a liver tumor. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;132:305-12.
66. Choi JW, Park JH, Cho HR, Chung JW, Kim DD, Kim HC, Cho HJ. Sorafenib and 2,3,5-triiodobenzoic acid-loaded imageable microspheres for transarterial embolization of a liver tumor. *Sci Rep*. 2017;7(1):554.
67. Chung EY, Kim HM, Lee GH, Kwak BK, Jung JS, Kuh HJ, Lee J. Design of deformable chitosan microspheres loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles for embolotherapy detectable by magnetic resonance imaging. *Carbohydr Polym*. 2012;90(4):1725-31.
68. Eroglu M, Kursaklioglu H, Misirli Y, Iyisoy A, Acar A, Isin Dogan A, Denkbas EB. Chitosan-coated alginate microspheres for embolization and/or chemoembolization: in vivo studies. *J Microencapsul*. 2006;23(4):367-76.
69. Flandroy P, Grandfils C, Collignon J, Thibaut A, Nihant N, Barbette S, Jerome R, Teyssie P. (D, L) polylactide microspheres as embolic agent. A preliminary study. *Neuroradiology*. 1990;32(4):311-5.
70. Forster RE, Thurmer F, Wallrapp C, Lloyd AW, Macfarlane W, Phillips GJ, Boutrand JP, Lewis AL. Characterisation of physico-mechanical properties and degradation potential of calcium alginate beads for use in embolisation. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(7):2243-51.
71. Fujiwara K, Hayakawa K, Nagata Y, Hiraoka M, Nakamura T, Shimizu Y, Ikada Y. Experimental embolization of rabbit renal arteries to compare the effects of poly L-lactic acid microspheres with and without epirubicin release against intraarterial injection of epirubicin. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2000;23(3):218-23.
72. Kang M-J, Oh I-Y, Choi B-C, Kwak B-K, Lee J-H, Choi Y-W. Development of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIOs) Embedded Chitosan Microspheres for Magnetic Resonance (MR) Traceable Embolotherapy. *Biomol Ther*. 2009;17(1):98-103.
73. Kang MJ, Park JM, Choi WS, Lee J, Kwak BK, Lee J. Highly spherical and deformable chitosan microspheres for arterial embolization. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2010;58(3):288-92.
74. Kassab AC, Pişkin E, Bilgiç S, Denkbaş EB, Xu K. Embolization with polyhydroxybutyrate (PHB) microspheres: In-vivo studies. *J Bioact Compat Pol*. 1999;14(4):291-303.
75. Kassab AC, Xu K, Denkbas EB, Dou Y, Zhao S, Piskin E. Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1997;8(12):947-61.

76. Kim JS, Kwak BK, Shim HJ, Lee YC, Baik HW, Lee MJ, Han SM, Son SH, Kim YB, Tokura S, Lee BM. Preparation of doxorubicin-containing chitosan microspheres for transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *J Microencapsul.* 2007;24(5):408-19.
77. Kwak BK, Shim HJ, Han SM, Park ES. Chitin-based embolic materials in the renal artery of rabbits: pathologic evaluation of an absorbable particulate agent. *Radiology.* 2005;236(1):151-8.
78. Lee HS, Hee Kim E, Shao H, Kook Kwak B. Synthesis of SPIO-chitosan microspheres for MRI-detectable embolotherapy. *J Magn Magn Mater.* 2005;293(1):102-5.
79. Liang Q, Wang YX, Ding JS, He W, Deng LL, Li N, Liao YJ, Li Z, Ye B, Wang W. Intra-arterial delivery of superparamagnetic iron-oxide nanoshell and polyvinyl alcohol based chemoembolization system for the treatment of liver tumor. *Discov Med.* 2017;23(124):27-39.
80. Liu YS, Lin XZ, Tsai HM, Tsai HW, Chen GC, Chen SF, Kang JW, Chou CM, Chen CY. Development of biodegradable radiopaque microsphere for arterial embolization-a pig study. *World J Radiol.* 2015;7(8):212-9.
81. Maeda N, Verret V, Moine L, Bedouet L, Louguet S, Servais E, Osuga K, Tomiyama N, Wassef M, Laurent A. Targeting and recanalization after embolization with calibrated resorbable microspheres versus hand-cut gelatin sponge particles in a porcine kidney model. *J Vasc Interv Radiol.* 2013;24(9):1391-8.
82. Nitta N, Ohta S, Sonoda A, Watanabe S, Otani H, Tomozawa Y, Nitta-Seko A, Tsuchiya K, Mukaisho K, Takahashi M, Murata K, Tabata Y. Evaluation of the embolic effect and degradability of gelatin microspheres and Gelpart particles. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2013;22(3):157-64.
83. Nitta N, Ohta S, Tanaka T, Takazakura R, Toyama T, Sonoda A, Seko A, Furukawa A, Takahashi M, Murata K, Kurumi Y, Tani T, Sakamoto T, Tabata Y. An initial clinical study on the efficacy of cisplatin-releasing gelatin microspheres for metastatic liver tumors. *Eur J Radiol.* 2009;71(3):519-26.
84. Ohta S, Nitta N, Sonoda A, Seko A, Tanaka T, Takahashi M, Kimura Y, Tabata Y, Murata K. Cisplatin-conjugated degradable gelatin microspheres: fundamental study in vitro. *Br J Radiol.* 2009;82(977):380-5.
85. Ohta S, Nitta N, Sonoda A, Seko A, Tanaka T, Takahashi M, Takemura S, Tabata Y, Murata K. Prolonged local persistence of cisplatin-loaded gelatin microspheres and their chemoembolic anti-cancer effect in rabbits. *Eur J Radiol.* 2009;72(3):534-40.
86. Ohta S, Nitta N, Sonoda A, Seko A, Tanaka T, Takazakura R, Furukawa A, Takahashi M, Sakamoto T, Tabata Y, Murata K. Embolization materials made of gelatin: comparison between Gelpart and gelatin microspheres. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2010;33(1):120-6.
87. Ohta S, Nitta N, Watanabe S, Tomozawa Y, Sonoda A, Otani H, Tsuchiya K, Nitta-Seko A, Yamamoto A, Takahashi M, Murata K. Gelatin microspheres: correlation between embolic effect/degradability and cross-linkage/particle size. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2013;36(4):1105-11.

88. Rong JJ, Liang M, Xuan FQ, Sun JY, Zhao LJ, Zhen HZ, Tian XX, Liu D, Zhang QY, Peng CF, Yao TM, Li F, Wang XZ, Han YL, Yu WT. Alginate-calcium microsphere loaded with thrombin: a new composite biomaterial for hemostatic embolization. *Int J Biol Macromol.* 2015;75:479-88.
89. Rong JJ, Liang M, Xuan FQ, Sun JY, Zhao LJ, Zheng HZ, Tian XX, Liu D, Zhang QY, Peng CF, Li F, Wang XZ, Han YL, Yu WT. Thrombin-loaded alginate-calcium microspheres: A novel hemostatic embolic material for transcatheter arterial embolization. *Int J Biol Macromol.* 2017;104(Pt A):1302-12.
90. Salis A, Porcu EP, Gavini E, Fois GR, Icaro Cornaglia A, Rassu G, Diana M, Maestri M, Giunchedi P, Nikolakakis I. In situ forming biodegradable poly(epsilon-caprolactone) microsphere systems: a challenge for transarterial embolization therapy. In vitro and preliminary ex vivo studies. *Expert Opin Drug Deliv.* 2017;14(4):453-65.
91. Schwarz A, Zhang H, Metcalfe A, Salazkin I, Raymond J. Transcatheter embolization using degradable crosslinked hydrogels. *Biomaterials.* 2004;25(21):5209-15.
92. Shomura Y, Tanigawa N, Shibutani M, Wakimoto S, Tsuji K, Tokuda T, Terada J, Kariya S, Kojima H, Komemushi A, Sawada S. Water-soluble polyvinyl alcohol microspheres for temporary embolization: development and in vivo characteristics in a pig kidney model. *J Vasc Interv Radiol.* 2011;22(2):212-9.
93. Sommer CM, Do TD, Schlett CL, Flechsig P, Gockner TL, Kuthning A, Vollherbst DF, Pereira PL, Kauczor HU, Macher-Goppinger S. In vivo characterization of a new type of biodegradable starch microsphere for transarterial embolization. *J Biomater Appl.* 2018;32(7):932-44.
94. Stein M. Radiopaque, bioresorbable embolic microspheres: an animal study to demonstrate feasibility and short term data. *J Vasc Interv Radiol.* 2014;25(3):S208.
95. van Elk M, Ozbakir B, Barten-Rijbroek AD, Storm G, Nijssen F, Hennink WE, Vermonden T, Deckers R. Alginate Microspheres Containing Temperature Sensitive Liposomes (TSL) for MR-Guided Embolization and Triggered Release of Doxorubicin. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141626.
96. Verret V, Pelage JP, Wassef M, Louguet S, Servais E, Bedouet L, Beaulieu T, Moine L, Laurent A. A novel resorbable embolization microsphere for transient uterine artery occlusion: a comparative study with trisacryl-gelatin microspheres in the sheep model. *J Vasc Interv Radiol.* 2014;25(11):1759-66.
97. Wang Q, Liu S, Yang F, Gan L, Yang X, Yang Y. Magnetic alginate microspheres detected by MRI fabricated using microfluidic technique and release behavior of encapsulated dual drugs. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:4335-47.
98. Wang Q, Qian K, Liu S, Yang Y, Liang B, Zheng C, Yang X, Xu H, Shen AQ. X-ray visible and uniform alginate microspheres loaded with in situ synthesized BaSO₄ nanoparticles for in vivo transcatheter arterial embolization. *Biomacromolecules.* 2015;16(4):1240-6.
99. Wang Y, Benzina A, Molin DG, Akker N, Gagliardi M, Koole LH. Preparation and structure of drug-carrying biodegradable microspheres designed for transarterial chemoembolization therapy. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2015;26(2):77-91.

100. Wang YX, Zhu XM, Liang Q, Cheng CH, Wang W, Leung KC. In vivo chemoembolization and magnetic resonance imaging of liver tumors by using iron oxide nanoshell/doxorubicin/poly(vinyl alcohol) hybrid composites. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(19):4812-5.
101. Weng L, Le HC, Talaie R, Golzarian J. Bioresorbable hydrogel microspheres for transcatheter embolization: preparation and in vitro evaluation. *J Vasc Interv Radiol.* 2011;22(10):1464-70.e2.
102. Weng L, Rostambeigi N, Zantek ND, Rostamzadeh P, Bravo M, Carey J, Golzarian J. An in situ forming biodegradable hydrogel-based embolic agent for interventional therapies. *Acta Biomater.* 2013;9(9):8182-91.
103. Weng L, Rostamzadeh P, Nooryshokry N, Le HC, Golzarian J. In vitro and in vivo evaluation of biodegradable embolic microspheres with tunable anticancer drug release. *Acta Biomater.* 2013;9(6):6823-33.
104. Weng L, Rusten M, Talaie R, Hairani M, Rosener NK, Golzarian J. Calibrated bioresorbable microspheres: a preliminary study on the level of occlusion and arterial distribution in a rabbit kidney model. *J Vasc Interv Radiol.* 2013;24(10):1567-75.
105. Weng L, Seelig D, Rostamzadeh P, Golzarian J. Calibrated Bioresorbable Microspheres as an Embolic Agent: An Experimental Study in a Rabbit Renal Model. *J Vasc Interv Radiol.* 2015;26(12):1887-94.e1.
106. Weng L, Seelig D, Souresrafil O. Long-Term Implantability of Resorbable Carboxymethyl Cellulose/Chitosan Microspheres in a Rabbit Renal Arterial Embolization Model. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2018;41(6):951-8.
107. Xuan F, Rong J, Liang M, Zhang X, Sun J, Zhao L, Li Y, Liu D, Li F, Wang X, Han Y. Biocompatibility and Effectiveness Evaluation of a New Hemostatic Embolization Agent: Thrombin Loaded Alginate Calcium Microsphere. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1875258.
108. Zhou X, Kong M, Cheng XJ, Feng C, Li J, Li JJ, Chen XG. In vitro and in vivo evaluation of chitosan microspheres with different deacetylation degree as potential embolic agent. *Carbohydr Polym.* 2014;113:304-13.
109. Hacking N, Maclean D, Vigneswaran G, Bryant T, Modi S. Uterine Fibroid Embolization (UFE) with Optisphere: A Prospective Study of a New, Spherical, Resorbable Embolic Agent. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2020;43(6):897-903.
110. Ye Y, Ren Y, Zeng H, He J, Zhong Z, Wu X. Characterization of Calibrated Gelatin Sponge Particles in a Rabbit Renal Embolization Model. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2019;42(8):1183-91.
111. Correll JT, Prentice HR, Wise EC. Biologic investigations of a new absorbable sponge. *Surg Gynecol Obstet.* 1945;81:585-9.
112. Speakman TJ. Internal occlusion of carotid-cavernous fistula. *J Neurosurg.* 1964;21:303-5.

113. Vaidya S, Tozer KR, Chen J. An overview of embolic agents. *Semin Intervent Radiol.* 2008;25(3):204-15.
114. Makuuchi M, Sukigara M, Mori T, Kobayashi J, Yamazaki S, Hasegawa H, Moriyama N, Takayasu K, Hirohashi S. Bile duct necrosis: complication of transcatheter hepatic arterial embolization. *Radiology.* 1985;156(2):331-4.
115. Abada HT, Golzarian J. Gelatine sponge particles: handling characteristics for endovascular use. *Tech Vasc Interv Radiol.* 2007;10(4):257-60.
116. Katsumori T, Kasahara T. The size of gelatin sponge particles: differences with preparation method. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2006;29(6):1077-83.
117. Barth KH, Strandberg JD, White RI, Jr. Long term follow-up of transcatheter embolization with autologous clot, oxycel and gelfoam in domestic swine. *Invest Radiol.* 1977;12(3):273-80.
118. Bracken RB, Johnson DE, Goldstein HM, Wallace S, Ayala AG. Percutaneous transfemoral renal artery occlusion in patients with renal carcinoma. Preliminary report. *Urology.* 1975;6(1):6-10.
119. Cho KJ, Reuter SR, Schmidt R. Effects of experimental hepatic artery embolization on hepatic function. *AJR Am J Roentgenol.* 1976;127(4):563-7.
120. Gold RE, Grace DM. Gelfoam embolization of the left gastric artery for bleeding ulcer: experimental considerations. *Radiology.* 1975;116(3):575-80.
121. Jander HP, Russinovich NA. Transcatheter gelfoam embolization in abdominal, retroperitoneal, and pelvic hemorrhage. *Radiology.* 1980;136(2):337-44.
122. Goldstein HM, Wallace S, Anderson JH, Bree RL, Gianturco C. Transcatheter occlusion of abdominal tumors. *Radiology.* 1976;120(3):539-45.
123. Louail B, Sapoval M, Bonneau M, Wasseff M, Senechal Q, Gaux JC. A new porcine sponge material for temporary embolization: an experimental short-term pilot study in swine. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2006;29(5):826-31.
124. Maeda N, Osuga K, Mikami K, Higashihara H, Onishi H, Nakaya Y, Tatsumi M, Hori M, Kim T, Tomoda K, Nakamura H. Angiographic evaluation of hepatic arterial damage after transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Radiat Med.* 2008;26(4):206-12.
125. Choo YC, Cho KJ. Pelvic abscess complicating embolic therapy for control of bleeding cervical carcinoma and simultaneous radiation therapy. *Obstet Gynecol.* 1980;55(3 Suppl):76s-8s.
126. Sakamoto I, Aso N, Nagaoki K, Matsuoka Y, Uetani M, Ashizawa K, Iwanaga S, Mori M, Morikawa M, Fukuda T, Hayashi K, Matsunaga N. Complications associated with transcatheter arterial embolization for hepatic tumors. *Radiographics.* 1998;18(3):605-19.
127. Sone M, Osuga K, Shimazu K, Higashihara H, Nakazawa T, Kato K, Tomabechi M, Ehara S, Nakamura H, Morii E, Aozasa K. Porous gelatin particles for uterine artery

- embolization: an experimental study of intra-arterial distribution, uterine necrosis, and inflammation in a porcine model. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2010;33(5):1001-8.
128. Osuga K, Anai H, Takahashi M, Miyayama S, Yamagami T, Sone M, Nakamura H. [Porous gelatin particles for hepatic arterial embolization; investigation of the size distribution and fragmentation before and after microcatheter passage]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2009;36(3):437-42.
129. Iezzi R, Pompili M, Rinninella E, Annicchiarico E, Garcovich M, Cerrito L, Ponziani F, De Gaetano A, Siciliano M, Basso M, Zocco MA, Rapaccini G, Posa A, Carchesio F, Biolato M, Giuliante F, Gasbarrini A, Manfredi R. TACE with degradable starch microspheres (DSM-TACE) as second-line treatment in HCC patients dismissing or ineligible for sorafenib. *Eur Radiol*. 2019;29(3):1285-92.
130. Pieper CC, Meyer C, Vollmar B, Hauenstein K, Schild HH, Wilhelm KE. Temporary arterial embolization of liver parenchyma with degradable starch microspheres (EmboCept(R)S) in a swine model. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2015;38(2):435-41.
131. Yoshikawa T, Kokura S, Oyamada H, Inuma S, Nishimura S, Kaneko T, Naito Y, Kondo M. Antitumor effect of ischemia-reperfusion injury induced by transient embolization. *Cancer Res*. 1994;54(19):5033-5.
132. Meyer C, Pieper CC, Ezziddin S, Wilhelm KE, Schild HH, Ahmadzadehfar H. Feasibility of temporary protective embolization of normal liver tissue using degradable starch microspheres during radioembolization of liver tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(2):231-7.
133. Schicho A, Pereira PL, Haimerl M, Niessen C, Michalik K, Beyer LP, Stroszczynski C, Wiggermann P. Transarterial chemoembolization (TACE) with degradable starch microspheres (DSM) in hepatocellular carcinoma (HCC): multi-center results on safety and efficacy. *Oncotarget*. 2017;8(42):72613-20.
134. Owen RJ, Nation PN, Polakowski R, Biliske JA, Tiege PB, Griffith IJ. A preclinical study of the safety and efficacy of Occlusin 500 Artificial Embolization Device in sheep. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2012;35(3):636-44.
135. Schmidt AM, Hoepflich PD. Cold Sterilization of Cardiac Catheterization Equipment with Ethylene Oxide Gas. *Circulation*. 1964;29:892-4.
136. Stampfl S, Stampfl U, Bellemann N, Sommer CM, Thierjung H, Radeleff B, Lopez-Benitez R, Berger I, Kauffmann GW, Richter GM. Biocompatibility and recanalization characteristics of hydrogel microspheres with polyzene-F as polymer coating. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2008;31(4):799-806.
137. Russell NL. A rapid double-embedding method for tissues, using an automatic tissue processing apparatus (histokinette-histokine). *J Med Lab Technol*. 1956;13(7):484-6.
138. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19(2):267-74.

139. Bilbao JI, de Luis E, Garcia de Jalon JA, de Martino A, Lozano MD, de la Cuesta AM, Sangro B. Comparative study of four different spherical embolic particles in an animal model: a morphologic and histologic evaluation. *J Vasc Interv Radiol*. 2008;19(11):1625-38.
140. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
141. Moreira PL, An YH. Animal models for therapeutic embolization. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2003;26(2):100-10.
142. Konya A, Stephens LC, Wright KC. Pure ethiodized oil as a capillary embolic agent with and without ethanol-ethiodol mixture in the rabbit kidney: embolic efficacy and temporal histopathologic findings. *J Vasc Interv Radiol*. 2010;21(7):1091-9.
143. Nitta N, Sonoda A, Nitta-Seko A, Ohta S, Tsuchiya K, Tanaka T, Kanasaki S, Mukaisho K, Takahashi M, Murata K. Basic investigation of vascular interventional radiology (IR) using large rabbits. *Exp Anim*. 2009;58(5):557-61.
144. Boland ED, Coleman BD, Barnes CP, Simpson DG, Wnek GE, Bowlin GL. Electrospinning polydioxanone for biomedical applications. *Acta Biomater*. 2005;1(1):115-23.
145. Baumann A, Burggasser G, Gauss N, Ewers R. Orbital floor reconstruction with an alloplastic resorbable polydioxanone sheet. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002;31(4):367-73.
146. Iizuka T, Mikkonen P, Pauku P, Lindqvist C. Reconstruction of orbital floor with polydioxanone plate. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1991;20(2):83-7.
147. Jensen CH, Jensen CM. Biodegradable pins versus Kirschner wires in hand surgery. *J Hand Surg Br*. 1996;21(4):507-10.
148. Siiki A, Rinta-Kiikka I, Sand J, Laukkarinen J. A pilot study of endoscopically inserted biodegradable biliary stents in the treatment of benign biliary strictures and cystic duct leaks. *Gastrointest Endosc*. 2018;87(4):1132-7.
149. Uskokovic V. Nanostructured platforms for the sustained and local delivery of antibiotics in the treatment of osteomyelitis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2015;32(1):1-59.
150. Ray JA, Doddi N, Regula D, Williams JA, Melveger A. Polydioxanone (PDS), a novel monofilament synthetic absorbable suture. *Surg Gynecol Obstet*. 1981;153(4):497-507.
151. Ganga MV, Coutinho-Netto J, Colli BO, Marques Junior W, Catalão CH, Santana RT, Oltramari MR, Carraro KT, Lachat JJ, Lopes Lda S. Sciatic nerve regeneration in rats by a nerve conduit engineering with a membrane derived from natural latex. *Acta Cir Bras*. 2012;27(12):885-91.
152. Abruzzo T, Cloft HJ, Shengelaia GG, Waldrop SM, Kallmes DF, Dion JE, Constantinidis I, Sambanis A. In vitro effects of transcatheter injection on structure, cell viability, and cell metabolism in fibroblast-impregnated alginate microspheres. *Radiology*. 2001;220(2):428-35.
153. Ping Ooi C, Cameron RE. The hydrolytic degradation of polydioxanone (PDSII) sutures. Part I: Morphological aspects. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(3):280-90.

154. Laurent A, Wassef M, Chapot R, Houdart E, Merland JJ. Location of vessel occlusion of calibrated tris-acryl gelatin microspheres for tumor and arteriovenous malformation embolization. *J Vasc Interv Radiol*. 2004;15(5):491-6.
155. Porcu EP, Salis A, Rasso G, Maestri M, Galafassi J, Bruni G, Giunchedi P, Gavini E. Engineered polymeric microspheres obtained by multi-step method as potential systems for transarterial embolization and intraoperative imaging of HCC: Preliminary evaluation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017;117:160-7.
156. Suh DH, Jang HW, Lee SJ, Lee WS, Ryu HJ. Outcomes of polydioxanone knotless thread lifting for facial rejuvenation. *Dermatol Surg*. 2015;41(6):720-5.
157. Yoon JH, Kim SS, Oh SM, Kim BC, Jung W. Tissue changes over time after polydioxanone thread insertion: An animal study with pigs. *J Cosmet Dermatol*. 2018;18(3):885-91.
158. Siskin GP, Dowling K, Virmani R, Jones R, Todd D. Pathologic evaluation of a spherical polyvinyl alcohol embolic agent in a porcine renal model. *J Vasc Interv Radiol*. 2003;14(1):89-98.
159. Stampfl S, Bellemann N, Stampfl U, Radeleff B, Lopez-Benitez R, Sommer CM, Thierjung H, Berger I, Richter GM. Inflammation and recanalization of four different spherical embolization agents in the porcine kidney model. *J Vasc Interv Radiol*. 2008;19(4):577-86.
160. Doucet J, Kiri L, O'Connell K, Kehoe S, Lewandowski RJ, Liu DM, Abraham RJ, Boyd D. Advances in Degradable Embolic Microspheres: A State of the Art Review. *J Funct Biomater*. 2018;9(1).
161. Dorenberg EJ, Novakovic Z, Smith HJ, Hafsahl G, Jakobsen JA. Uterine fibroid embolization can still be improved: observations on post-procedure magnetic resonance imaging. *Acta Radiol*. 2005;46(5):547-53.
162. Namur J, Chapot R, Pelage JP, Wassef M, Langevin F, Labarre D, Laurent A. MR imaging detection of superparamagnetic iron oxide loaded tris-acryl embolization microspheres. *J Vasc Interv Radiol*. 2007;18(10):1287-95.
163. Sharma KV, Dreher MR, Tang Y, Pritchard W, Chiesa OA, Karanian J, Peregoy J, Orandi B, Woods D, Donahue D, Esparza J, Jones G, Willis SL, Lewis AL, Wood BJ. Development of "imageable" beads for transcatheter embolotherapy. *J Vasc Interv Radiol*. 2010;21(6):865-76.
164. Reicher J, Mafeld S, Priona G, Reeves HL, Manas DM, Jackson R, Littler P. Early Experience of Trans-arterial Chemo-Embolisation for Hepatocellular Carcinoma with a Novel Radiopaque Bead. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2019;42(11):1563-70.
165. Wang YX. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quant Imaging Med Surg*. 2011;1(1):35-40.
166. Choi SY, Kwak BK, Shim HJ, Lee J, Hong SU, Kim KA. MRI traceability of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-embedded chitosan microspheres as an embolic material in rabbit uterus. *Diagn Interv Radiol*. 2015;21(1):47-53.

167. Lee KH, Liapi E, Vossen JA, Buijs M, Ventura VP, Georgiades C, Hong K, Kamel I, Torbenson MS, Geschwind JF. Distribution of iron oxide-containing Embosphere particles after transcatheter arterial embolization in an animal model of liver cancer: evaluation with MR imaging and implication for therapy. *J Vasc Interv Radiol*. 2008;19(10):1490-6.
168. Gupta T, Virmani S, Neidt TM, Szolc-Kowalska B, Sato KT, Ryu RK, Lewandowski RJ, Gates VL, Woloschak GE, Salem R, Omary RA, Larson AC. MR tracking of iron-labeled glass radioembolization microspheres during transcatheter delivery to rabbit VX2 liver tumors: feasibility study. *Radiology*. 2008;249(3):845-54.
169. Li ZY, Qin XY, Guo LY, Wang H, Liu XX, Zheng ZZ, Guan HT, Song L, Zou YH, Fan TY. Poly(acrylic acid) microspheres loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transcatheter arterial embolization and MRI detectability: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm*. 2017;527(1-2):31-41.
170. Kos S, Huegli R, Bongartz GM, Jacob AL, Bilecen D. MR-guided endovascular interventions: a comprehensive review on techniques and applications. *Eur Radiol*. 2008;18(4):645-57.
171. Lillaney PV, Yang JK, Losey AD, Martin AJ, Cooke DL, Thorne BR, Barry DC, Chu A, Stillson C, Do L, Arenson RL, Saeed M, Wilson MW, Hetts SW. Endovascular MR-guided Renal Embolization by Using a Magnetically Assisted Remote-controlled Catheter System. *Radiology*. 2016;281(1):219-28.
172. Dobrin PB. Effect of histologic preparation on the cross-sectional area of arterial rings. *J Surg Res*. 1996;61(2):413-5.
173. Myers JL, Waldhausen JA, Pae WE, Jr., Abt AB, Prophet GA, Pierce WS. Vascular anastomoses in growing vessels: the use of absorbable sutures. *Ann Thorac Surg*. 1982;34(5):529-37.
174. Bhatia S, Shalaby SW, Powers DL, Lancaster RL, Ferguson RL. The effect of site of implantation and animal age on properties of polydioxanone pins AU - *J Biomater Sci Polym Ed*. 1994;6(5):435-46.
175. Kimura S, Yasuda K, Hara N, Sakai T, Mikami S, Minami A, Tohyama H. Implantation sites and fiber diameters affect the rate of degradation in absorbable polydioxanone fibers. *Arthroscopy*. 2003;19(1):68-74.
176. Yu MK, Jeong YY, Park J, Park S, Kim JW, Min JJ, Kim K, Jon S. Drug-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and therapy in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2008;47(29):5362-5.
177. Pietrzak WS, Sarver DR, Verstynen ML. Bioabsorbable polymer science for the practicing surgeon. *J Craniofac Surg*. 1997;8(2):87-91.
178. Maurus PB, Kaeding CC. Bioabsorbable implant material review. *Operative Techniques in Sports Medicine*. 2004;12(3):158-60.
179. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2335-46.

180. Tracy MA, Ward KL, Firouzabadian L, Wang Y, Dong N, Qian R, Zhang Y. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro. *Biomaterials*. 1999;20(11):1057-62.
181. Verret V, Wassef M, Pelage JP, Ghegediban SH, Jouneau L, Moine L, Labarre D, Golzarian J, Schwartz-Cornil I, Laurent A. Influence of degradation on inflammatory profile of polyphosphazene coated PMMA and trisacryl gelatin microspheres in a sheep uterine artery embolization model. *Biomaterials*. 2011;32(2):339-51.
182. Molea G, Schonauer F, Bifulco G, D'Angelo D. Comparative study on biocompatibility and absorption times of three absorbable monofilament suture materials (Polydioxanone, Poliglecaprone 25, Glycomer 631). *Br J Plast Surg*. 2000;53(2):137-41.
183. Laurent A, Wassef M, Namur J, Martal J, Labarre D, Pelage JP. Recanalization and particle exclusion after embolization of uterine arteries in sheep: a long-term study. *Fertil Steril*. 2009;91(3):884-92.
184. Stampfl S, Stampfl U, Rehnitz C, Schnabel P, Satz S, Christoph P, Henn C, Thomas F, Kauffmann GW, Richter GM. Experimental evaluation of early and long-term effects of microparticle embolization in two different mini-pig models. Part I: kidney. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2007;30(2):257-67.
185. Bendszus M, Klein R, Burger R, Warmuth-Metz M, Hofmann E, Solymosi L. Efficacy of trisacryl gelatin microspheres versus polyvinyl alcohol particles in the preoperative embolization of meningiomas. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000;21(2):255-61.
186. Stampfl S, Stampfl U, Rehnitz C, Schnabel P, Satz S, Christoph P, Henn C, Thomas F, Richter GM. Experimental evaluation of early and long-term effects of microparticle embolization in two different mini-pig models. Part II: liver. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2007;30(3):462-8.
187. Wassef M, Laurent A. How to Quantify Inflammatory Tissue Reactions following Embolization? *J Vasc Interv Radiol*. 2011;22(2):258-60.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Matthias Max Rudolf Stechele, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchung von neu entwickelten, in vivo darstellbaren temporären Mikrosphären zur transarteriellen renalen Embolisation beim Kaninchen - Evaluation of newly developed, in vivo visualizable temporary microspheres for transarterial renal embolisation in rabbits“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Matthias Stechele hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Stechele M, Wittgenstein H, Stolzenburg N, Schnorr J, Neumann J, Schmidt C, Günther RW, Streitparth F. Novel MR-visible, biodegradable microspheres for transcatheter arterial embolisation: Experimental study in a rabbit renal model. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2020. Online ahead of print. DOI: 10.1007/s00270-020-02534-1.

Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherche, Erstellung & Analyse des Rohdatensatzes, Anfertigung des kompletten primären Manuskripts, Submission, Revision. Erstellung der Tabellen und Abbildungen in enger Zusammenarbeit mit der Co-autorin Helena Wittgenstein.

Die experimentelle Grundlage der vorliegenden Dissertation wurde zwischen den Jahren 2014 und 2018 am Forschungslabor für experimentelle Radiologie, Charité Centrum 6 für diagnostische und interventionelle Radiologie und Nuklearmedizin, Campus Charité Mitte erarbeitet. Unter der Leitung von Prof. Dr. Florian Streitparth und Prof. Dr. Rolf W. Günther wurden in diesem gemeinsamen Projekt insgesamt 24 Kaninchen-Nieren behandelt, wovon neun in den Auswertungen dieser Arbeit enthalten sind. Die Scores zur Evaluation der Zielparameter wurden in enger gemeinschaftlicher Zusammenarbeit mit der betreuenden Tierärztin des Projektes, Helena-Victoria zu Sayn-Wittgenstein-Berleburg entwickelt. Versuche und Methoden der Auswertungen als Grundlage der Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit den Co-Autoren angefertigt. Die Beiträge einzelner Autoren mit speziellen Zuständigkeiten etwa im Rahmen der Auswertung von histopathologischen oder angiographischen Ergebnissen, sind an den jeweiligen Stellen entsprechend gekennzeichnet.

Unterschrift, Datum und Stempel der/des betreuenden HochschullehrerIn

Unterschrift der/des DoktorandIn

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Peer-reviewed Publikationen:

Stechele M, Wittgenstein H, Stolzenburg N, Schnorr J, Neumann J, Schmidt C, Günther RW, Streitparth F. Novel MR-visible, biodegradable microspheres for transcatheter arterial embolisation: Experimental study in a rabbit renal model. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2020. Online ahead of print. DOI: 10.1007/s00270-020-02534-1.

Liao H, Ahmed M, Markezana A, Zeng G, **Stechele M**, Galun E, Goldberg SN. Thermal Ablation Induces Transitory Metastatic Growth by Means of the STAT3/c-Met Molecular Pathway in an Intrahepatic Colorectal Cancer Mouse Model. *Radiology*. 2020;294(2):464-472. DOI: 10.1148/radiol.2019191023.

Poster und Präsentationen:

Stechele M, Wittgenstein H, Breinl J, Stolzenburg N, Schnapauff D, Rudolph B, Schmidt C, Schnorr J, Hamm B, Günther R, Streitparth F. Entwicklung und Evaluation eines temporären Embolisationsmaterials zur arteriellen Transkatheter-Applikation im Kaninchenmodell. 98. Deutscher Röntgenkongress und 8. Gemeinsamer Kongress der DRG und ÖRG, 24.-27. Mai, 2017, Leipzig. *Rofo* 2017;189(S 01): S1-S124. DOI: 10.1055/s-0037-1600204.

H. Wittgenstein, **M. Stechele**, J. Breinl, J. Schnorr, B. Rudolph, C. Schmidt, B. Hamm, R. Günther, F. Streitparth. Evaluation of a newly developed biodegradable embolic agent for transcatheter arterial embolisation in a rabbit renal model. European Congress of Radiology, the annual meeting of European Society of Radiology March 1-5 2017, Vienna, Austria. *ECR 2017 – Book of Abstracts. Insights into Imaging* 2017;8(1):1-583. DOI: 10.1007/s13244-017-0546-5.

H. Wittgenstein, **M. Stechele**, J. Breinl, N. Stolzenburg, D. Geisel, J. Schnorr, B. Rudolph, C. Schmidt, B. Hamm, R.W. Günther, F. Streitparth. Entwicklung und Beurteilung eines temporären Embolisationsmaterials zur arteriellen Transkatheter-Applikation im Kaninchenmodell. IROS 2017, Dreiländertagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Interventionelle Radiologie (DeGIR, ÖGIR & SSVIR). 12 – 14. Januar 2017, Berlin. IROS 2017 Poster Abstracts and Author Index. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2016;39(4):387-98. DOI: 10.1007/s00270-016-1520-1.

H. Wittgenstein, **M. Stechele**, J. Breinl, N. Stolzenburg, D. Geisel, J. Schnorr, B. Hamm, R.W. Günther, F. Streitparth. Development and evaluation of a novel biodegradable embolic agent for transcatheter embolization in a rabbit kidney model: work in progress. CIRSE 2016, Annual meeting and postgraduate course of the Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe, September 10 – 14 2016, Barcelona, Spain. CIRSE 2016 Abstracts & Author Index. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2016;39(Suppl 3): 35. DOI: 10.1007/s00270-016-1405-3.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Florian Streitparth danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas und die Chance, diese Arbeit an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, in der Klinik für Radiologie durchführen zu können. Eine jahrelange intensive Zusammenarbeit trägt in dieser Arbeit ihre Früchte, wofür ich mich von ganzem Herzen bedanke. Die fortwährende, inzwischen freundschaftlich gewordene Zusammenarbeit über diese Arbeit hinaus bestätigen die herausragenden fachlichen und persönlichen Eigenschaften.

Herrn Prof. Dr. Rolf W. Günther, welcher mich nicht nur als Pionier der interventionellen Radiologie und mit seinem jahrzehntelang angesammelten Wissen beeindruckte, sondern immer wieder seine menschliche Qualität zeigte und persönlich sowie für die Entstehung dieser Arbeit stets eine Bereicherung war.

Helena Wittgenstein, für die fachlich exzellente sowie persönlich überaus bereichernde Zusammenarbeit, welche die langwierigen Versuche, Diskussionen und Auswertungen auf ganz besondere Weise erhellte. Eine tierexperimentelle Arbeit bedarf aufgrund der besonderen ethischen Anforderungen spezieller tierärztlicher Qualität und Einfühlsamkeit, die sie vorbildhaft vermittelte.

Janni Breinl, Dr. Jörg Schnorr, Dr. Nicola Stolzenburg sowie dem gesamten Laborteam der experimentellen Radiologie am Campus Charité Mitte für die Einweisung und stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung im Rahmen der Labortätigkeiten.

Zuletzt, meinen Eltern: Ohne sie wäre nichts möglich gewesen; danke für alles.

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Name, Vorname: Stechele Matthias Max Rudolf
Emailadresse: matthias.stechele@charite.de
Matrikelnummer: 223465
PromotionsbetreuerIn: Prof. Florian Streitparth
**Promotionsinstitution/ Klinik: Charité Centrum 6 für
diagnostische und interventionelle Radiologie und
Nuklearmedizin**

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Matthias Stechele innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 07.06.2019

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Lage- und Streuungsmaße für parametrisches und nicht-parametrisches Testen
- Graphische Darstellung von Lage- und Streuungsmaßen
- Interpretation von p-Werten

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 07.06.2019

Name der Beraterin: Carolin Herrmann

CHARITÉ
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie
und Klinische Epidemiologie
Institutsdirektorin
Prof. Dr. Geraldine Rauch
Campus Charité Mitte

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin
Besucheranschrift: Reinhardtstr. 58