

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Zeitlicher Ablauf der photodynamischen Therapie

Die photodynamische Therapie wurde folgendermaßen durchgeführt:

Die Injektion des Photosensibilisators mTHPC erfolgte zum Zeitpunkt t_0 . Um einem circadianen Rhythmus einzuhalten, wurde die Injektion immer zwischen 13 und 15 Uhr durchgeführt.

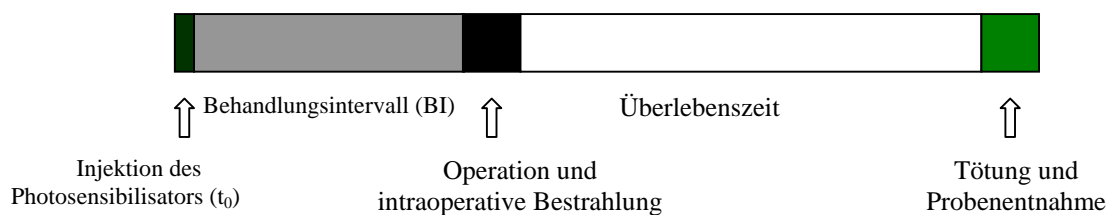


Abb. 4 Formaler Ablauf der photodynamischen Therapie

Das Intervall zwischen Injektion und Bestrahlung wurde als Behandlungsintervall (BI) definiert. Die Bestrahlung erfolgte während der Operation. Nach der jeweiligen Überlebenszeit der Tiere wurden diese getötet und die Biopsien entnommen. Diese wurden im Anschluss histologisch untersucht.

3.2. Methodik der Versuche

3.2.1. Kontrollgruppen

Um die histologischen Gegebenheiten unbehandelter Kaninchen zu untersuchen, wurden zwei klinisch gesunde Tiere ohne photodynamische Therapie und ohne Operation getötet (Kontrollgruppe K1). Diese Kaninchen durchliefen das identische Procedere der Probenentnahme wie die behandelten Tiere (vgl. 3.2.4., S.32).

Bei vier Tieren wurde jeweils eine Gegenseite als Kontrolle identisch operiert, ohne jedoch die betreffende Stelle zu bestrahlen. Von diesen Tieren wurden ebenfalls Proben histologisch untersucht, um die operationsbedingten Gewebsveränderungen zu quantifizieren (Kontrolluntersuchung K2).

3.2.2. Erster Versuchsteil

3.2.2.1. Versuch I/1

Im Versuch I/1 wurden 26 Tiere photodynamisch behandelt. Als Photosensibilisator-dosis wurde 0,3 mg/kg gewählt und das Behandlungsintervall (BI) variierte zwischen 24 Stunden (10 Tiere), 48 Stunden (6 Tiere), 72 Stunden (4 Tiere) und 96 Stunden (6 Tiere). 9 Tiere wurden mit einer Lichtintensität von 10 J/cm² und 17 Tiere mit einer Lichtintensität von 20 J/cm² photodynamisch bestrahlt.

Die Tiere wurden nach 2, 5, 10, 12, 20, 30 und 42 Tagen getötet und die Proben entnommen. Um mit einer möglichst kleinen Anzahl Tiere die optimale Überlebenszeit herauszufinden, wurden in jeder Gruppe unterschiedliche Überlebenszeiten gewählt. Dadurch entstanden die teilweise variierenden Gruppengrößen in diesem Versuch. Vier Tiere aus Gruppe I/1 verstarben vor Ablauf der Überlebenszeit bzw. mussten getötet werden. Die Gewebeproben dieser Tiere flossen nicht in die Auswertung ein (vgl. 4.2.1.2., S.68).

Gruppe	Dosis mTHPC	Lichtintensität	Behandlungsintervall (BI)	Anzahl behandelter Tiere
I/1 a	0,3 mg/kg	10 J/cm ²	24 Stunden	2
I/1 b	0,3 mg/kg	10 J/cm ²	48 Stunden	3
I/1 c	0,3 mg/kg	10 J/cm ²	72 Stunden	1
I/1 d	0,3 mg/kg	10 J/cm ²	96 Stunden	3
I/1 e	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	24 Stunden	8
I/1 f	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	48 Stunden	3
I/1 g	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	72 Stunden	3
I/1 h	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	96 Stunden	3

Tab. 1 Behandlungsparameter im Versuch I/1

3.2.2.2. Versuch I/2

Im Versuch I/2 wurden 4 Kaninchen photodynamisch behandelt. Jedes Tier bekam 0,3 mg/kg mTHPC injiziert und wurde nach 3 Minuten (2 Tiere) resp. 6 Stunden (2 Tiere) mit einer Lichtdosis von 20 J/cm² bestrahlt. Alle Tiere wurden 12 Tage nach der photodynamischen Therapie getötet, dann wurden die Proben entnommen und histologisch aufgearbeitet.

Gruppe	Dosis mTHPC	Lichtintensität	Behandlungsintervall (BI)	Überlebenszeit
I/2 a	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	3 Minuten	12 Tage
I/2 a	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	3 Minuten	12 Tage
I/2 b	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	6 Stunden	12 Tage
I/2 b	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	6 Stunden	12 Tage

Tab. 2 Behandlungsparameter im Versuch I/2

3.2.3. Zweiter Versuchsteil (Versuch II)

Aufgrund der Ergebnisse des ersten Versuchsteils (vgl. 4.2., S.57 ff) wurden die Behandlungsparameter für den Versuch II folgendermaßen gewählt: zwei Gruppen zu je 6 Tieren wurden photodynamisch behandelt. In Gruppe II a betrug das Behandlungsintervall (BI) zwischen Injektion des Photosensibilisator und der Bestrahlung 3 Minuten, in Gruppe II b 24 Stunden. Die Tiere wurden alle nach 12 Tagen getötet und die histologischen Veränderungen ausgewertet.

Der zweite Versuchsteil beinhaltete dementsprechend folgende Behandlungsprotokolle:

Gruppe	Tier Nr.	Dosis mTHPC	Lichtintensität	Behandlungsintervall (BI)	Überlebenszeit
II a	1	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	3 Minuten	12 Tage
	2	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	3 Minuten	12 Tage
	3	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	3 Minuten	12 Tage
	4	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	3 Minuten	12 Tage
	5	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	3 Minuten	12 Tage
	6	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	3 Minuten	12 Tage
II b	7	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	24 Stunden	12 Tage
	8	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	24 Stunden	12 Tage
	9	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	24 Stunden	12 Tage
	10	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	24 Stunden	12 Tage
	11	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	24 Stunden	12 Tage
	12	0,3 mg/kg	20 J/cm ²	24 Stunden	12 Tage

Tab.3 Behandlungsparameter im Versuch II

3.2.4. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Um die Lokalisation des Photosensibilisators im Gewebe darzustellen, wurde zusätzlich 4 Tieren mTHPC intravenös injiziert und diese nach 6 Minuten (zwei Tiere), nach 24 Stunden und nach 72 Stunden (jeweils ein Tier) getötet. Von diesen Tieren wurden dann sofort Proben für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Verteilung des Photosensibilisators entnommen und bearbeitet (vgl. 3.4.6., S.55).

Gruppe	Tier Nr.	mTHPC Dosis	Tötung nach
II d	15	0,3 mg/kg	6 Minuten
II d	16	0,3 mg/kg	6 Minuten
II e	17	0,3 mg/kg	24 Stunden
II f	18	0,3 mg/kg	72 Stunden

Tab. 4 Parameter für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen

3.3. Materialien

3.3.1. Photosensibilisator

Verwendet wurde der Photosensibilisator mTHPC (Handelsname: Foscan[®]). Die Substanz wurde von der Firma Scotia Pharmaceutics (UK) zur Verfügung gestellt.

Der Wirkstoff wurde in einer Dosierung von 0,3 mg/kg KG verabreicht. Dazu wurden 0,9 mg der pulverförmigen Reinsubstanz in 225,0 µl Ethanol gelöst. Auf einzelne Eppendorf-Gefäße verteilt, wurde die Mischung bis zum Verbrauchszeitpunkt bei - 30 °C aufbewahrt. Etwa 30 Minuten vor der Injektion wurde die Substanz aus der Kühltruhe entnommen und auf Zimmertemperatur erwärmt. Sodann erfolgte die Zugabe von 0,9 ml Polyethylenglycol 400 mit Wasser im Verhältnis 1:2 entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.3.2. Tiere

Für die Experimente wurden männliche weiße Neuseeland-Kaninchen mit einem Gewicht von ca. 3000 g aus einer Zuchtstation verwandt. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Über ein Lichtprogramm wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gewährleistet. In den ersten 48 Stunden nach der Injektion des Photosensibilisators wurden die Käfige mittels Tüchern abgedunkelt, um eine Reaktion der photosensibilisierten Haut zu vermeiden.

Die Verwendung der Tiere war durch die Bezirksregierung Köln unter dem Aktenzeichen 23.203.2-K 43, 37/00 vom 24.10.2000 genehmigt worden.

3.3.3. Laser

Der Laser wurde von der Fa. Diomed zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um einen Diodenlaser, der Licht der Wellenlänge 652 nm erzeugt. Das Licht wurde über ein Glasfaserkabel und eine Mikrolinse geleitet und bildete beim Austritt einen Lichtkegel.

3.4. Methoden

3.4.1. Injektion des Photosensibilisators

Die Injektion des Photosensibilisators erfolgte intravenös in die Ohrvene. Dazu wurden die Tiere von einem Helfer fixiert und die Ohrvene durch Druck mit Daumen und Zeigefinger angestaut. Anschließend wurde ein Butterfly - Infusionsset (W.I.N. 23G, Abbot Ireland, Irland) in die Vene eingeführt und das mTHPC langsam injiziert. Um eine übermäßige Reizung der Vene zu vermeiden, wurde mit ca. 3 ml 0,9% Natriumchlorid-Lösung (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland) nachgespült.

3.4.2. Intraoperative Bestrahlung

3.4.2.1. Anästhesie und Vorbereitung der Tiere

Die Tiere wurden ca. 20 Minuten nach einer subkutanen Prämedikation mit 0,05 mg/kg KG Atropin (Atropinsulfat[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit 60 mg/kg KG Ketamin (Ketavet[®] 100 mg/ml, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) und 6 mg/kg KG Xylazin (Rompun 2%[®], Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) in einer Mischspritze intramuskulär in die lange Sitzbeinmuskulatur anästhesiert. Sobald die Muskulatur relaxiert war, wurden die Kaninchen auf dem Operationstisch auf einer Wärmematte (38,4°C) in Rückenlage mit Bändern fixiert und die rechte mediale Schenkelregion sowie der ventrale Hals geschoren. Nach einer subkutanen Infiltrationsanästhesie mit 2,0 ml Lidocainhydrochlorid (Xylocain 2%[®], Astra GmbH, Wedel, Deutschland) wurde die Haut mit Cutasept F[®] (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) desinfiziert und die geschorenen und desinfizierten Bereiche durch sterile OP-Tücher (Foliodrape 50x50, Hartmann, Heidenheim, Deutschland) vom übrigen Bereich abgegrenzt.

Bei Bedarf wurde die Narkose mit Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) über den Verdampfer eines Beatmungsgerätes (Engström RS 300 LKB Medical, Bromma, Schweden) mit einer Dosierung von 3 l/min bei einem O₂-Druck von 1,5 l/min, verabreicht über eine Atemmaske für Kleintiere aufrechterhalten.

3.4.2.2. Operation

In der medialen Schenkelregion wurde ein ca. 6 cm langer Hautschnitt von der Mitte des Leistenspalts in Richtung Kniegelenk geführt. Mit einer Metzenbaumschere wurde das Unterhautgewebe stumpf gelöst und die Faszie über dem M. gracilis eröffnet. Durch stumpfes Trennen wurde ein ca. 4 cm langes Teilstück der A. femoralis, V. femoralis und des N. saphenus freigelegt. Die umliegende Muskulatur wurde mit einem Wundspreizer zur Seite verdrängt. Die anatomischen Verhältnisse der Hintergliedmaße eines Kaninchens veranschaulicht Abbildung 5 (S. 35).

Anschließend wurde am Hals etwa 3 cm rechts paramedian ein ca. 7 cm langer Hautschnitt angelegt. Ebenfalls mittels einer Metzenbaumschere wurde die in subkutanem Fettgewebe gelegene V. jugularis ext. stumpf freipräpariert. Anschließend konnte durch stumpfes Trennen der Muskelfaszien der Mm. sternohyoideus und sternocephalicus die der Trachea direkt anliegende A. carotis sowie der N. vagus und die V. jugularis int. freigelegt werden. Das umliegende Gewebe wurde ebenfalls mit einem Wundspreizer zur Seite gehalten (Abb. 8, S. 37). Die anatomischen Gegebenheiten des Kaninchenhalses werden in den Abbildungen 6 und 7 auf der folgenden Seite dargestellt.

Abb. 5 Hintergliedmaße des Kaninchens,
anatomische Gegebenheiten,
mediale Ansicht

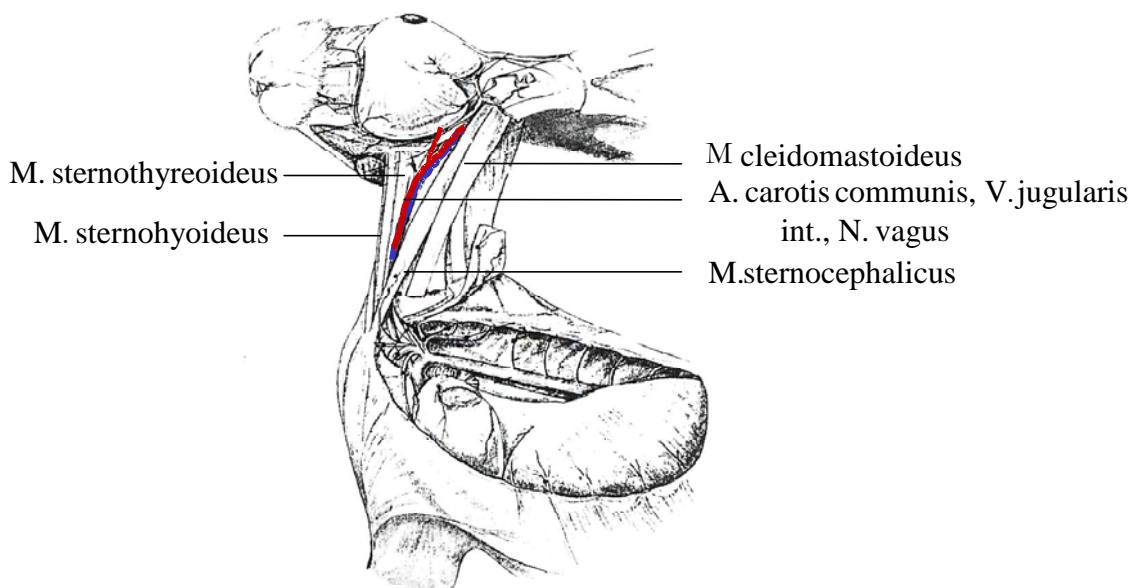
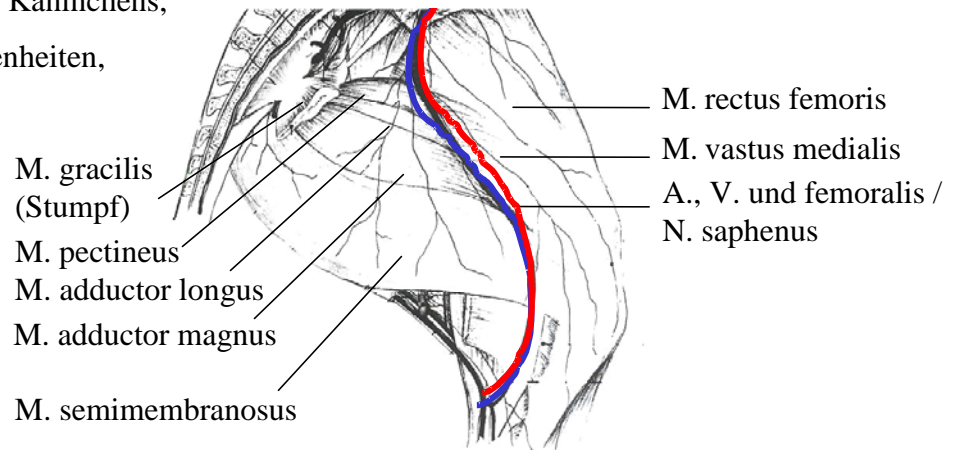


Abb. 6 Hals und Brust des Kaninchens, laterale Ansicht

Abb. 7 Hals des Kaninchens,
ventrale Ansicht

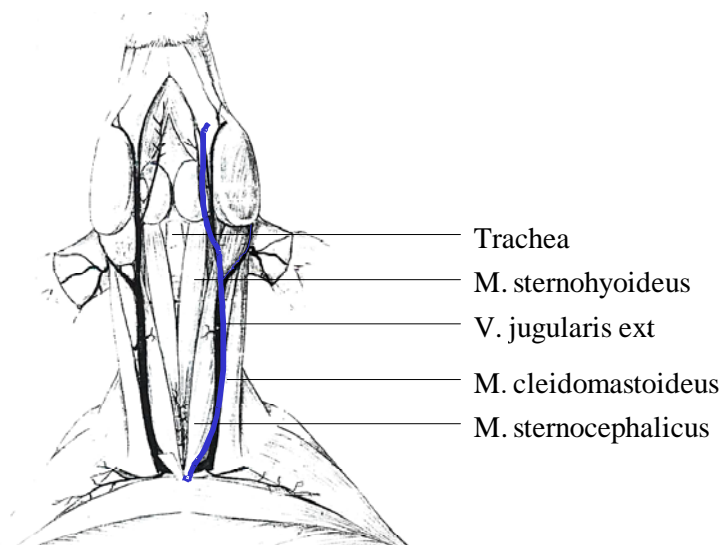


Abb. 5, 6 und 7 modifiziert aus:
Préface de P. Mornet, 1973

3.4.2.3. Photodynamische Behandlung / Bestrahlung

Die photodynamische Bestrahlung erfolgte über ein ca. 1,5 m langes Glasfaserkabel mit Mikrolinse senkrecht auf das Operationsfeld (Abb. 9, S. 37). Der an der Faserspitze (Mikrolinse) austretende Lichtkegel wurde durch Variation des Abstands des Kabelendes zur Gewebeoberfläche auf einen Durchmesser von 2 cm begrenzt, was mittels einer direkt auf die zu bestrahlende Stelle gehaltenen Schiebelehre kontrolliert wurde. Die exponierten Gefäße und Nerven am Hals und im Schenkelspalt wurden mit einer Leistungsdichte von 100 mW/cm² und einer Leistung von 10 bzw. 20 J/cm² 90 bzw. 180 Sekunden lang bestrahlt.

3.4.2.4. Abschluss der Operation

Nach der Bestrahlung erfolgte ein zweischichtiger Wundverschluss mit Einzelknopfnähten im Unterhautgewebe mit Vicryl[®] 3/0 (Ethicon, Johnson & Johnson Intl., Brüssel, Belgien) und Einzelknopfnähten der Haut ebenfalls mit Vicryl[®] 3/0. Die Wunden wurden abschließend zur Abdeckung mit Alu-Dermin[®] - Spray (Alvetra GmbH, Neumünster, Deutschland) besprüht. Im Anschluss erfolgte eine prophylaktische Antibiose mit 10 mg/kg KG Enrofloxacin (Baytril[®] 5%, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) subkutan in die seitliche Brustwand. Weiterhin erhielten die Tiere eine Schmerzmedikation mit 10 mg/kg KG Novalgin[®] Inj.- Lösung (Hoechst Marion Roussel GmbH, Bad Soden am Ts., Deutschland).

3.4.2.5. Weiterbehandlung

In den darauffolgenden 6 - 8 Tagen wurden die Tiere täglich prophylaktisch mit 10 mg/kg KG Baytril[®] 5% s.c. antibiotisch versorgt. Weiterhin wurden sie täglich auf Auffälligkeiten untersucht, sowie alle 2 – 3 Tage einer Gewichtskontrolle unterzogen.

Anfängliche Wundheilungsprobleme durch das Benagen der Operationswunden wurden verhindert, indem den Kaninchen für einige Tage ein Halskragen (BUSTER-Halskragen Gr. 5, Fa. Heiland, Hamburg, Deutschland) aufgezogen wurde.

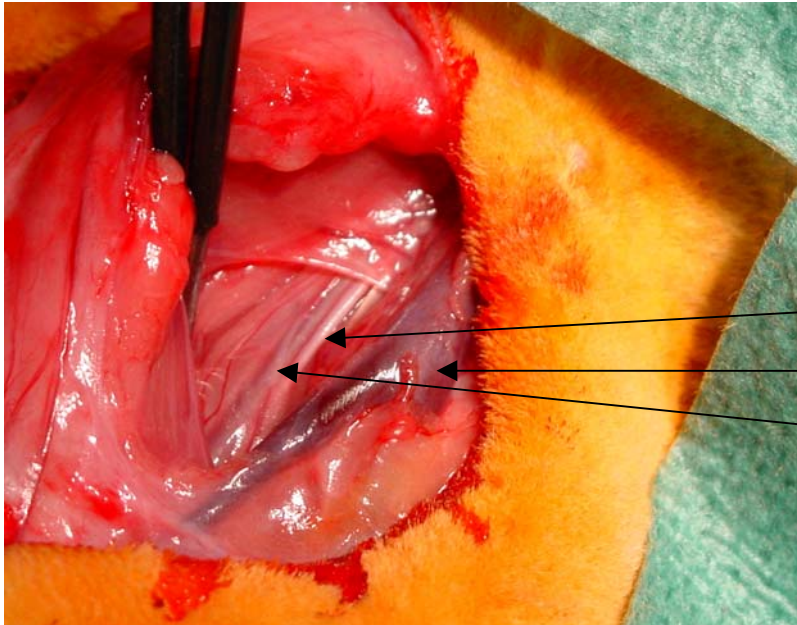


Abb. 8 OP- Situs
Halsregion

A. carotis comm..

V. jugularis ext.

V. jugularis int.

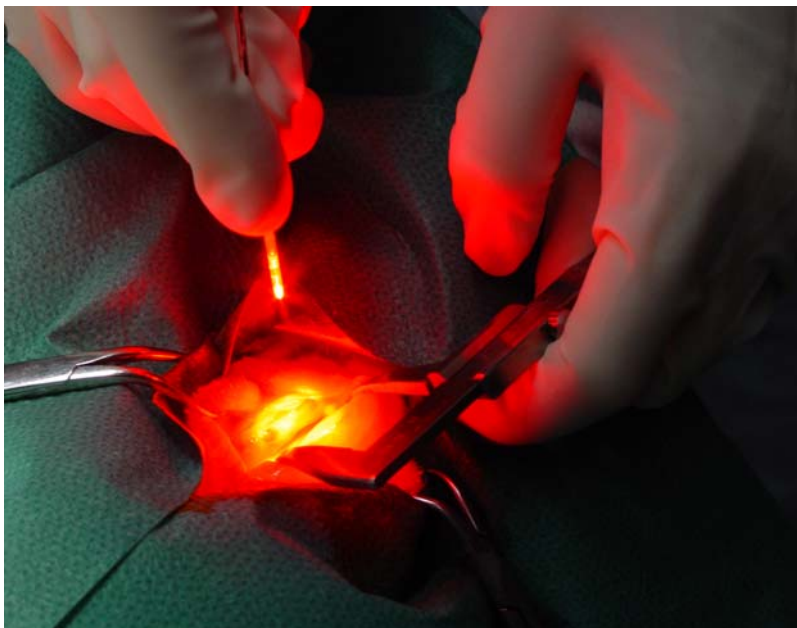


Abb. 9 Bestrahlung des
Operationsfeldes mit
rotem Licht (652 nm) aus
einem Glasfaserkabel.
Das kreisförmige
Bestrahlungsfeld wurde
mittels einer Schieblehre
auf einen Durchmesser
von 20 mm begrenzt.

3.4.3. Tötung und Entnahme der Gewebeproben

3.4.3.1. Tötung und Perfusion

Die Kaninchen wurden ebenfalls mit 60 mg/kg KG Ketamin[®] und 6 mg/kg KG Rompun[®] i.m. narkotisiert. Sobald eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war, wurden die Tiere wiederum auf dem Rücken auf dem Operationstisch fixiert und die mediale Halsregion mit Xylocain[®] 2% zur Infiltrationsanästhesie subkutan unterspritzt. Sodann wurde zuerst die intratracheale Intubation vorbereitet. Dazu wurde der Hals median inzidiert und die Trachea durch stumpfes Trennen der darübergelegenen Muskeln freigelegt. Die Trachea wurde nun zwischen zwei Trachealringen eröffnet, und ein Intubationskatheter Gr. 3,5 (Single Use Tracheal Tube, Fa. Portex, Hythe Kent, England) wurde eingeführt. Per Inhalationsnarkose wurde mit 1,5 l Sauerstoff und 3 l Isofluran bei einer Frequenz von 25 Stößen pro Minute beatmet.

Anschließend wurde die Haut in der Medianen auf ganzer Rumpflänge mittels einer Schere eröffnet und durch Aufspreizen der Schere stumpf vom Körper gelöst. Sodann konnte durch einen Schnitt in der Linea alba das Abdomen eröffnet werden und der gesamte Magen-Darm-Trakt zur Seite verlagert werden. Dies geschah nach der Durchführung von lateralen Entlastungsschnitten parallel zum Rippenbogen, etwa 1 cm caudal von diesem. Danach wurde die abdominale Aorta vom umliegenden Fettgewebe stumpf getrennt und kurz vor ihrer caudalen Aufzweigung in die A. iliaca ext. sin. und dext. mit einem ca. 10 cm langen Faden angeschlungen.

Nun wurde der Thorax eröffnet, dazu wurde zunächst das Zwerchfell von Rippenbogen abgetrennt und dann die Rippen auf beiden Seiten bis hin zur Apertura thoracis cranialis mit einer großen Knieschere durchgeschnitten. Dann wurde die Aorta descendens aufgesucht und kurz hinter dem Aortenbogen ebenfalls mit einem Faden angeschlungen.

Im Folgenden wurde die Aorta kurz vor ihrer caudalen Aufzweigung eröffnet und ein Katheter (Schlauch mit Luer-Konus eines Perfusionsbestecks, Nadel abgetrennt, Valu-Set[™], Becton Dickinson, Utah, USA) retrograd bis zum Aortenbogen vorgeschoben und mittels der Fadenschlinge fixiert. Analog wurde ein orthograder Katheter in die rechte A. iliaca ext. geschoben und dort fixiert. Die linke A. iliaca ext. wurde aufzweigungsnah abgeklemmt. Ebenso wurde die Aorta direkt an ihrem Ausgang vom Herzen abgeklemmt. Um einen Ablauf der Perfusionslösungen zu gewährleisten, wurden sowohl die V. cava caudalis als auch die V. cava cranialis eröffnet. Mittels Herzschnitt durch beide Kammern wurde sodann der Tod der Tiere herbeigeführt.

Hierauf erfolgte sofort die Perfusion der Gefäße zuerst mit isotonischer Kochsalzlösung 0,9% (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland), bis die Blutleere im Gewebe erreicht war. Dazu wurden mit Druck jeweils ca. 150 ml isotonische Kochsalzlösung über den caudal gerichteten Katheter in die A. iliaca ext. dext. und 250 ml isotonische Kochsalzlösung über den cranial gerichteten Katheter in die Hals- und Kopfmuskulatur (via A. carotis comm. dext. und sin. sowie aller anderen aus dem Aortenbogen entspringenden Arterien) injiziert.

Sofort im Anschluß wurde dieselbe Spülprozedur mit ca. 200 ml gepuffertem 4 %igem Formalin durchgeführt, bis das Gewebe fixiert war. Die gesamte Druckperfusion dauerte bis zur Fixation etwa 7 Minuten.

Von den vor Ablauf der Überlebenszeit verendeten Tieren wurden keine Proben entnommen.

3.4.3.2. Entnahme der Proben

Nach der Perfusion wurde aus der Schenkelmuskulatur eine ca. 4 x 6 cm große und 2 cm dicke Gewebeprobe mittels einem Skalpell herausgeschnitten. Die Schnitte wurden parallel zum Lauf der Femoralisgefäße bzw. des Nerven geführt, caudal durch den M. gracilis und cranial durch den M. sartorius sowie den M. vastus medialis, jeweils in Richtung des Faserverlaufs. Senkrecht dazu wurden die Schnitte durch den M. gracilis und M. adductor longus parallel zum Leistenspalt und quer zum Faserverlauf sowie distal durch die Mm. gracilis und vastus medialis geführt. Das entstandene rechteckige Gewebestück wurde über dem Femur horizontal herausgetrennt. Häufig konnten großflächige und tiefgehende Muskelnekrosen bereits makroskopisch an ihrer bräunlichen Verfärbung identifiziert werden. (Abb. 10 und 11, S. 40). Das entnommene Muskel- und Bindegewebestück wurde mittels Stecknadeln auf eine etwa ebensogroße dünne Styroporplatte geheftet, um eine optimale histologische Beurteilbarkeit nach der weiteren Fixierung zu gewährleisten. Anschließend wurde die Probe in gepuffertem 4 %igem Formalin in kleinen Plastikgefäßen gelagert.

Die Präparation der Probe aus dem Hals erfolgte durch einen Parallelschnitt zur Trachea durch den M. sternocleidomastoideus und den direkt der Trachea anliegenden M. sternohyoideus sowie senkrecht dazu durch die Mm. sternocephalicus, sternohyoideus und sternocleidomastoideus, die von Sternum zum Kopf verlaufen. Danach wurde die ca. 5 x 7 x 2 cm große Gewebeprobe ebenfalls mit Stecknadeln auf einem Styroporplättchen befestigt und in 4 %igem Formalin aufbewahrt.



Abb. 10 Gewebeprobe aus der Femoralismuskulatur; in situ und umgewendet. Die Nekrose der Muskulatur ist nach der Fixation mit Formalin 4% makroskop. als bräunliche Färbung sichtbar.

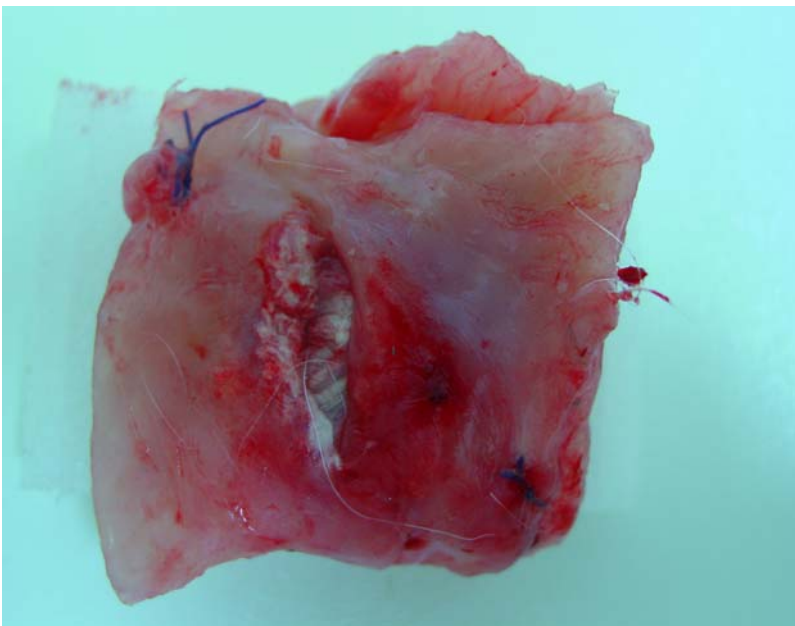


Abb. 11 Entnommene Gewebeprobe; Aufsicht;

3.4.3.3. Weitere Probenbehandlung

Die weitere Probenverarbeitung erfolgte im Institut für Neuropathologie der Universität zu Köln. Die Gewebestücke wurden nach ca. 48 Stunden Fixierung aus dem Formalin entnommen und in PBS (Instamed 9,55 g/l; PBS Dulbecco, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) bis zur Verarbeitung bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Proben wurden zugeschnitten und in dafür vorgesehene Einbettungskassetten eingebettet. Nach erneuter Lagerung in gepufferter 4%iger Formaldehyd-Lösung erfolgte das Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe unter Berücksichtigung von Zeit und Temperatur und die folgende Xylol-Behandlung. Die Gewebeproben in den Paraffinkassetten wurden dann in Paraffin (Paraplast, Sharwood Medical Co., St. Louis, Mo, USA) eingebettet. Zur weiteren histologischen Betrachtung wurden die Präparate mit dem Mikrotom (Hn 40, Reichert-Jung, München, Deutschland) zugeschnitten: Von jedem Paraffin-Block wurden Schnitte mit einer Dicke von 3 bis 4 µm angefertigt. Nach Entparaffinierung in Xylol und folgender absteigender Alkoholreihe sowie anschließender Rehydratation in Aqua dest. wurden die im Folgenden beschriebenen Färbungen durchgeführt.

Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin (HE) als Übersichtsfärbung:

Nach der Entparaffinierung erfolgte zuerst die Kernfärbung mit Hämalaun für 3 – 8 Minuten, danach wurde der Schnitt in Aqua dest. oder 0,1%iger Salzsäure gespült und anschließend in fließendem Leitungswasser gebläut. Darauf folgte die Färbung mit 0,1% Eosin in Aqua dest. über 1 Minute. Nach einem gründlichen Auswaschen in Wasser wurde der Schnitt in aufsteigender Alkoholreihe fixiert. Nachfolgend wurde der Schnitt 3 bis 5 Minuten in Xylol eingestellt und konnte sodann eingedeckt werden.

Trichromfärbung nach Masson als Spezialfärbung zur besseren Darstellung von Nervenfasern und kollagenem Bindegewebe:

Nach der Entparaffinierung erfolgte hierbei die Kernfärbung mit Weigertschem Eisenhämatoxylin für ca. 3 Minuten. Nach Spülen in Aqua dest. wurde die Differenzierung in 1%igem Pikrinsäure-Alkohol 10 bis 30 Minuten lang durchgeführt, bis das Protoplasma hell und die Kerne grau waren. Anschließend folgte die Bläuung in Leitungswasser und wiederum Spülung in Aqua dest. Es erfolgte nun die 5 Minuten dauernde Färbung in Säurefuchsin – Eisessig (1% Säurefuchsin in 1%iger Essigsäure gelöst) und die nachfolgende Spülung in Aqua

dest. Die Differenzierung in 1%iger Phosphorwolframsäure wurde anschließend solange durchgeführt, bis das Bindegewebe entfärbt war. Der Objektträger wurde dann ohne Abspülen sofort in Anilinblau-Eisessig eingestellt und ca. 5 Minuten gefärbt. Nach gründlichem Auswaschen in Aqua dest. erfolgte anschließend die Differenzierung in Äthanol-Essigsäure (0,1 ml Eisessig auf 100 ml Äthanol), in 70%igem Alkohol und die Fixierung in aufsteigender Alkoholreihe (Romeis, 1989).

3.4.4. Histologische Untersuchung

Die angefertigten Schnitte wurden im Institut für Neuropathologie der Universität zu Köln von Herrn Dr. Stenzel angesehen und von ihm ausgewertet. Hierzu bediente er sich eines eigens dafür entwickelten Scores, mittels diesem die Veränderungen, die im histologischen Schnitt zu sehen waren, bewertet und die Veränderungen quantifiziert werden konnten. Dieser Score umfasst pro untersuchter Struktur (Arterie, Vene, Nerv, kleinere Gefäße, Muskulatur und andere umliegende Gewebe) die Schädigungsgrade S0 bis S3, wobei mit S0 immer die physiologische, unveränderte Beschaffenheit beschrieben wurde und mit S3 die maximal aufgetretene Schädigung. Verschiedene Veränderungen stellen natürlich Grenzwerte dar, hierbei ist die Bewertung von Herrn Dr. Stenzel nach seiner Einschätzung vorgenommen worden.

Auf den Seiten 47 bis 53 sind einige histopathologische Fotos zu sehen. Diese stellen Veränderungen der untersuchten Strukturen dar, die jeweils exemplarisch für den jeweiligen Scorewert sind. Die abgebildeten Veränderungen sind jedoch nur eine Auswahl.

Die Schnitte wurden mittels eines Olympus BX 51 Mikroskopes untersucht und mit einer dem Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera fotografiert.

3.4.5. Detaillierte Bewertung der Veränderungen (Score)

3.4.5.1. Beurteilung der Arterien, Venen und Nerven

In der Biopsie aus dem Halsbereich wurden die A. carotis comm. und V. jugularis interna sowie der N. vagus histologisch untersucht, die sich meist nebeneinander eingebettet in losem Fett- und Bindegewebe befinden. Weiterhin in diesem Bereich befindet sich die V. jugularis externa, die sich jedoch aufgrund ihrer abseits gelegenen Position im subkutanen Binde- und Fettgewebe nicht in jedem Falle im histologischen Schnitt darstellte und nicht bewertet wurde. In der Probe aus der Hintergliedmaße befinden sich die A. und V. femoralis, die gemeinsam mit dem N.

saphenus ein so genanntes Trias bilden. Die drei Strukturen liegen dicht beieinander im Bindegewebe eingepackt in einen festen Muskelverband.

3.4.5.1.1. Beurteilung der großen Arterien (Score)

Die histologische Begutachtung der großen Gefäße bezog sich vornehmlich auf die Wandbeschaffenheit, bzw. Thrombosierung, sofern vorhanden. Nachfolgend wird der Bewertungsscore für die großen Arterien dargelegt:

Der **Scorewert 0** bezeichnete gesunde, unveränderte Gefäßwände mit einer einschichtigen Lage Endothelzellen, die der Basalmembran flach aufliegen (vgl. Abb. 12, S. 47).

Mit dem **Scorewert 1** wurden minimale Veränderungen bewertet. Hierzu gehörten kopfsteinpflasterartige Abrundung der Endothelzellen (vgl. Abb. 13, S. 47), eine fokale Endothelhyperplasie ohne signifikante Lumeneinengung sowie eine proliferative oder ödematöse geringfügige Mediaverdickung.

Eine Bewertung mit dem **Scorewert 2** erfuhren Arterien mit einer konzentrischen Endothelhyperplasie, die eine mittelgradige Lumeneinengung ohne funktionelle Relevanz zur Folge hatte (vgl. Abb. 14 und 15, S. 47). Zum Teil ging diese mit einer Verdickung der Media und/oder der Adventitia einher.

Die maximale Schädigung in Form von Obliteration (vgl. Abb. 16, S. 48) oder Thrombose (vgl. Abb. 17 und 18, S. 48) drückte der **Scorewert 3** aus.

Scorewert 0	Physiologisch	unveränderte Arterie
Scorewert 1	minimale Schädigung	fokale Endothelhyperplasie oder kopfsteinpflasterartige Endothelzell-abrundung
Scorewert 2	mittelgradige Schädigung	konzentrische Endothelhyperplasie mit oder ohne Media- und Adventitia-verdickung
Scorewert 3	hochgradige / maximale Schädigung	Obliteration der Arterie durch massive Zellproliferation oder Thrombosierung

3.4.5.1.2. Beurteilung der Venen (Score)

Gesunde Venen, die mit dem **Scorewert 0** beurteilt wurden, lagen glatt im Bindegewebe. Ein einschichtiges homogenes Endothel lag der Basalmembran auf und die Adventitia stellte sich regelrecht dar (vgl. Abb. 19, S. 49).

Die minimale Schädigung, bewertet mit dem **Scorewert 1**, bezeichnete Venen, die mit deutlich gefältelter Venenwand im Gewebe lagen, ohne dass jedoch lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen im Wandaufbau zu erkennen waren (vgl. Abb. 20, S. 49).

Eine Bewertung mit dem **Scorewert 2** erhielten Venen, die eine fokale Ablösung des Endothels (vgl. Abb. 21, S. 49) oder eine fokale Endothelhyperplasie und/oder Mediahypertrophie aufwiesen.

Lag eine komplette Endothelablösung oder -zerstörung vor, so dass das Lumen nicht mehr eindeutig abgrenzbar war, oder war die Vene thrombosiert (vgl. Abb. 22, S. 50), so wurden sie mit **Scorewert 3** bewertet.

Scorewert 0	Physiologisch	unveränderte Vene
Scorewert 1	minimale Schädigung	Venenwand gefältelt, Wandaufbau lichtmikroskopisch unverändert
Scorewert 2	Mittelgradige Schädigung	fokale Endothelablösung oder fokale Endothelhyperplasie mit aufgelockerter Media
Scorewert 3	Hochgradige / maximale Schädigung	komplette Endothelablösung Thrombosierung

3.4.5.1.3. Beurteilung der Nerven (Score)

Bezüglich der Nervschädigung wurde der Demyelinisierungsgrad beurteilt.

Gesunden, normal myelinisierten Nerven wurde der **Scorewert 0** zugeordnet (vgl. Abb. 23, S. 51).

Geringgradig demyelinisierte Nerven, mit einer Demyelinisierung der Nervenfasern von ca. 5 bis 25% wurden mit dem **Scorewert 1** bewertet (vgl. Abb. 24, S. 51).

Mittelgradig demyelinisierte Nerven mit einer Demyelinisierung der Nervenfasern von 26 bis 75% erfuhren eine Bewertung mit dem **Scorewert 2** (vgl. Abb. 25, S. 51).

Stark bis maximal demyelinisierte Nerven (Demyelinisierung der Nervenfasern 76 bis 100%) wurden mit dem **Scorewert 3** bewertet (vgl. Abb. 26, S. 51).

Scorewert 0	Physiologisch	Vollständige Myelinisierung
Scorewert 1	minimale Schädigung	Demyelinisierungsgrad 5 – 25 %
Scorewert 2	mittelgradige Schädigung	Demyelinisierungsgrad 26 - 75%
Scorewert 3	hochgradige / maximale Schädigung	Demyelinisierungsgrad 76 - 100%

3.4.5.1.4. Beurteilung der kleinen Gefäße (Score)

Die kleineren Arterien, Venen, Arteriolen und Venolen in der Nekrosezone wurden ebenfalls beurteilt. Da hier immer mehrere Gefäße in die Bewertung einfließen, wurde die Reaktion von über 50% der in einem Schädigungsgebiet eines untersuchten Schnittes sichtbaren Gefäße angegeben, auch wenn nicht alle Gefäße derartig stark verändert waren.

Unveränderte Gefäße wurden mit 0 bewertet (vgl. Abb. 31, S. 53).

Eine minimale Schädigung lag vor, wenn das Endothel um eine Schicht hyperplasiert war. Dies wurde mit dem **Scorewert 1** bewertet.

Mäßig geschädigte Gefäße (**Scorewert 2**) wiesen eine deutliche Endothelhyperplasie um mindestens zwei Endothelzelllagen sowie eine Mediaverdickung auf. Entsprechend der Definition des Scorewertes 2 war dabei immer ein Restlumen vorhanden.

Die maximale Schädigung (bewertet mit **Scorewert 3**) zeigte sich in Form von komplett durch Zellproliferation obliterierten oder thrombosierte Gefäßen (vgl. Abb. 28, S. 52). Weiterhin wurden Gefäße mit nekrotischen Wänden mit Scorewert 3 bewertet.

Scorewert 0	Physiologisch	offenes Gefäß, einschichtiges Endothel
Scorewert 1	minimale Schädigung	Endothelhyperplasie um eine Schicht
Scorewert 2	mittelgradige Schädigung	deutliche Endothelhyperplasie, Restlumen vorhanden
Scorewert 3	hochgradige / maximale Schädigung	obliterierte oder thrombosierte Gefäße bzw. Gefäßwandnekrose

3.4.6. Beurteilung der Muskulatur, des Binde- und Fettgewebes (Score)

Aufgrund der Tatsache, dass sich die Schädigung im Falle des Muskel-, Binde- und Fettgewebes immer in einer kompletten Nekrose der genannten Zelltypen äußerte, wurde hier die Ausdehnung der Schädigung und nicht die Stärke beurteilt.

Ein **Scorewert 0** bezeichnete normale, gesunde Muskulatur.

Nur in eine Tiefe von wenigen Zehntelmillimetern zerstörte Gewebe wurden mit dem **Scorewert 1** bewertet (vgl. Abb. 27, S. 52).

Eine Bewertung mit dem **Scorewert 2** erfuhren Biopsien, welche eine Schädigung des Muskel-, Binde- und Fettgewebes von wenigen Millimetern Ausmaß aufwiesen.

Als stark geschädigt (**Scorewert 3**) wurden Schnitte beurteilt, die eine Nekrose ab 8 mm Tiefe zeigten (vgl. Abb. 29, S. 52 und 31, S. 53).

Die quergestreifte Skelettmuskulatur wies überwiegend starke Schäden auf. Gewöhnlich ablaufende Entzündungsvorgänge, mesenchymale Reaktionen und Narbenbildung die regulär auf Gewebszerstörungen folgen, wurden nicht gesondert bewertet (vgl. Abb. 29, S. 52).

Das Fettgewebe im Bestrahlungsfeld zeigte sich so gut wie immer entzündlich verändert und nekrotisch. Das Bindegewebe war in unterschiedlicher Ausprägung ebenfalls entzündlich verändert und ödematös mit Nekrosearealen.

Scorewert 0	Physiologisch
Scorewert 1	Nekrose nur wenige Zehntelmillimeter in die Tiefe gehend
Scorewert 2	Nekrose wenige Millimeter in die Tiefe gehend
Scorewert 3	Nekrose ab 8 mm in die Tiefe gehend

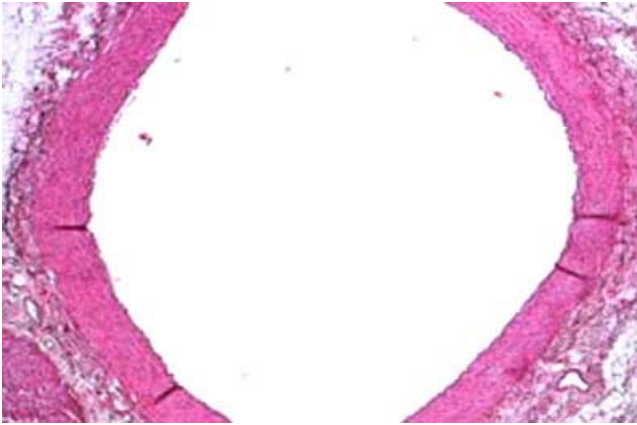


Abb. 12 Arterie unverändert,
Scorewert 0
(HE-Färbung,
Originalvergrößerung x 5)



Abb. 13 Arterienwand mit
Kopfsteinpflasterendothel
Exemplarisch für **Scorewert 1**
(HE-Färbung,
Originalvergrößerung x 10)

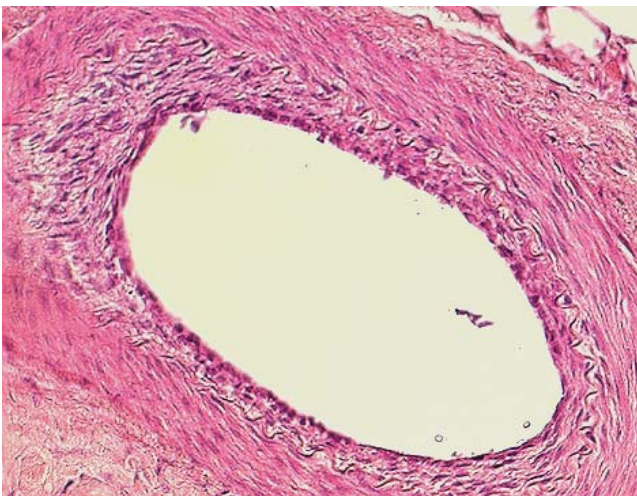


Abb. 14 Arterie mit konzentrischer
Endothelhyperplasie und
darausfolgender mittelgradiger
Lumeneinengung.
Exemplarisch für **Scorewert 2**
(HE-Färbung,
Originalvergrößerung x 10)

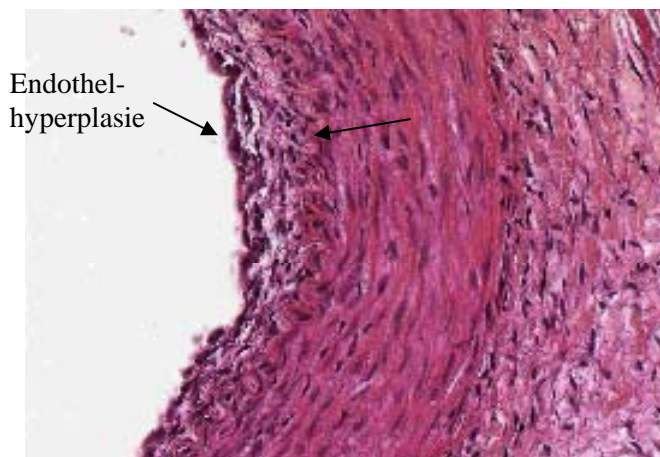


Abb. 15 Ausschnitt aus Abb. 14.
Deutliche Endothelhyperplasie
um mehrere Zellschichten.
(HE-Färbung,
Originalvergrößerung x 20)

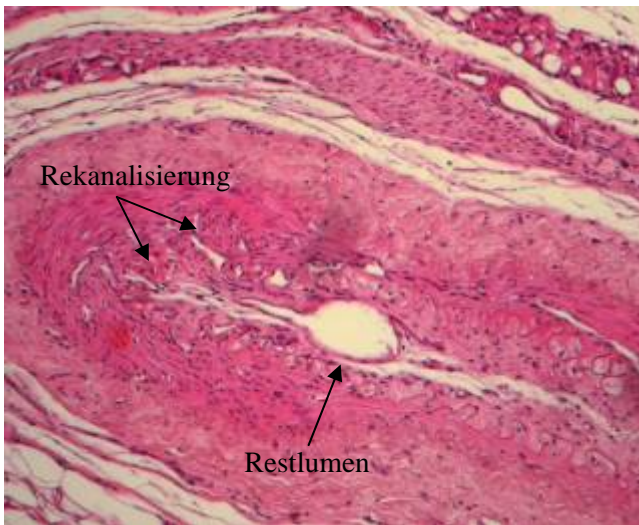


Abb. 16 Obliterierte Arterie mit kleinem Restlumen bzw. Rekanalisierung in der Thrombusorganisation. Exemplarisch für **Scorewert 3** (HE-Färbung, Originalvergrößerung x 10)

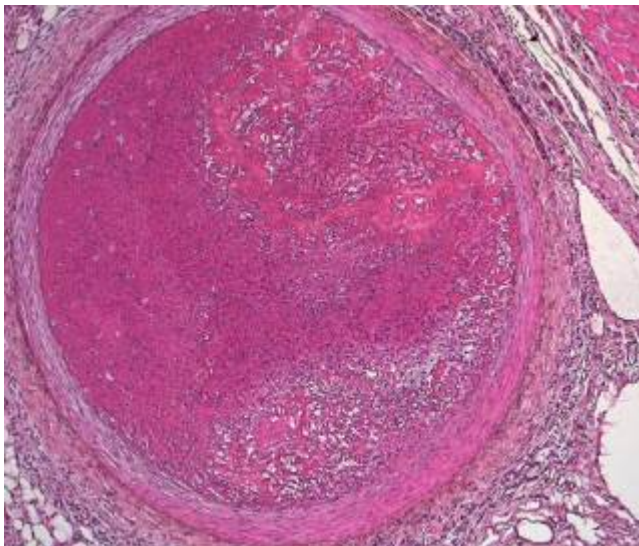


Abb. 17 Arterie mit Thrombus in Organisation; Arterienwand nicht verdickt. **Scorewert 3** (HE-Färbung, Originalvergrößerung x 5)

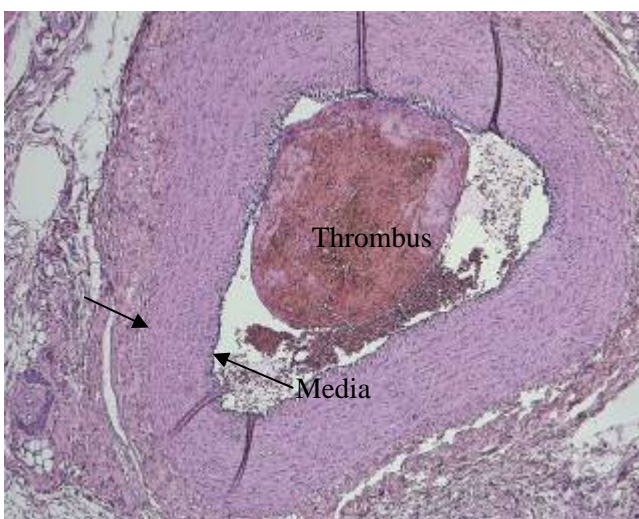


Abb. 18 Thrombosierte Arterie; Thrombus in Organisation. deutliche Mediahypertrophie (vgl. mit Abb. 17). **Scorewert 3** (HE-Färbung, Originalvergrößerung x 5)

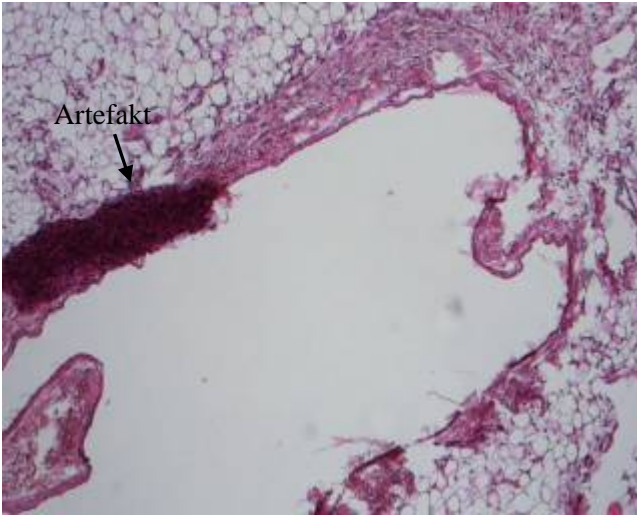


Abb. 19 Regelrechte Vene; Venenwand
glatt.
Scorewert 0
(HE-Färbung,
Originalvergrößerung x 10)

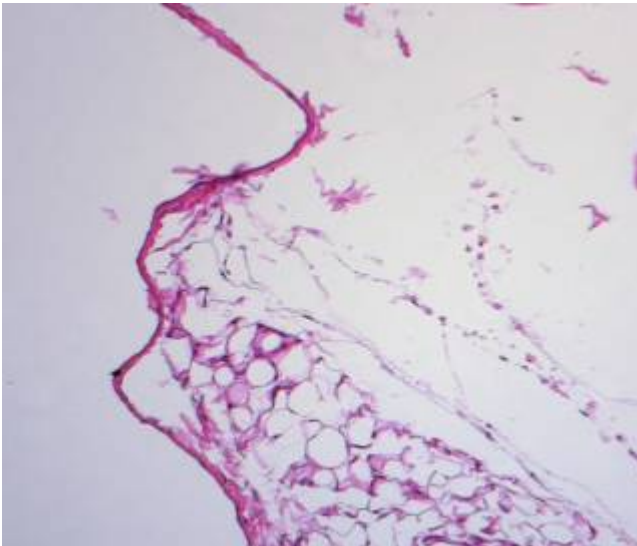


Abb. 20 Venenwand deutlich gefältelt;
Endothel gesund (Ausschnitt).
Exemplarisch für **Scorewert 1**
(HE-Färbung,
Originalvergrößerung x 20)

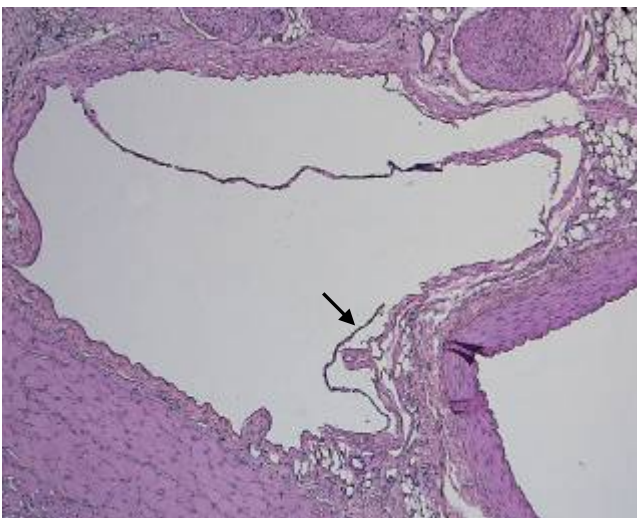


Abb. 21 Auffällige fokale
Endothelablösung (↑) ohne
Thrombenbildung.
Exemplarisch für **Scorewert 2**
(HE-Färbung,
Originalvergrößerung x 5)

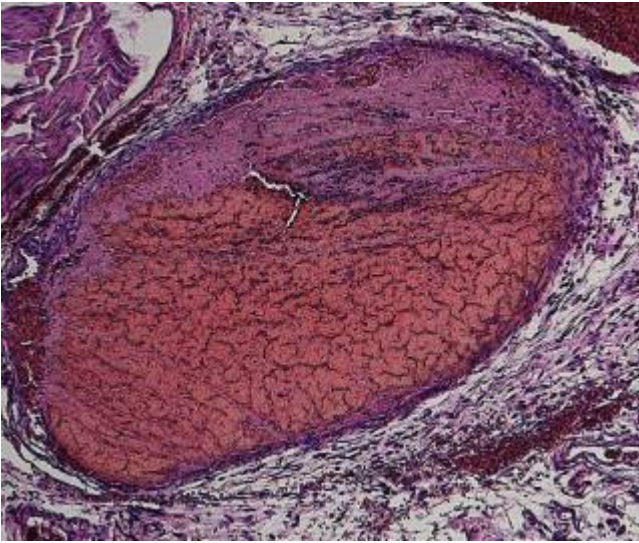


Abb. 22 Thrombosierte Vene;
Thrombus in Organisation.
Scorewert 3
(HE-Färbung,
Originalvergrößerung x 5)

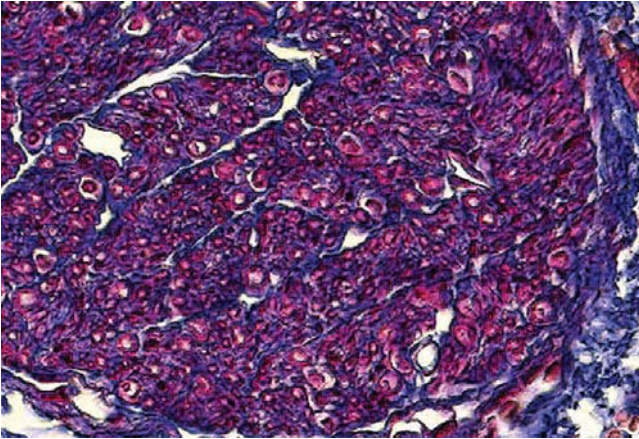


Abb. 23 Nervenfasern regelrecht myelinisiert.
Scorewert 0
(Färbung nach Masson, Originalvergrößerung x 10)

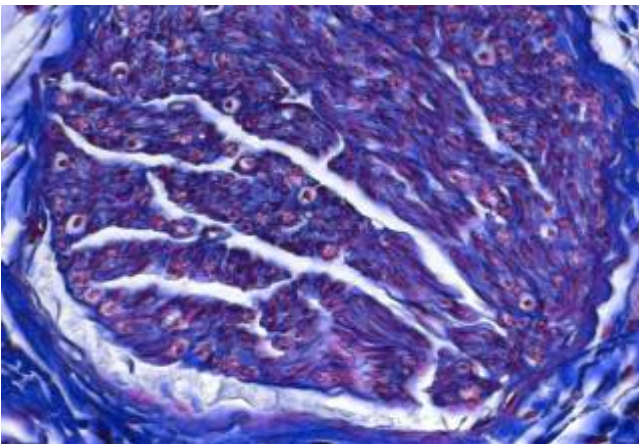


Abb. 24 Nervenfasern geringfügig demyelinisiert.
Scorewert 1
(Färbung nach Masson, Originalvergrößerung x 20)

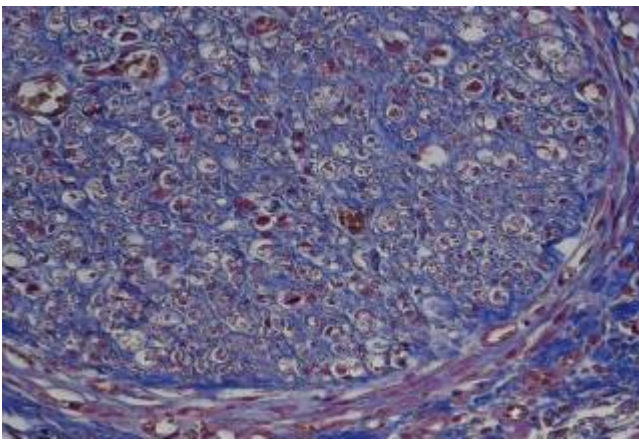


Abb. 25 Nervenfasern mittelgradig demyelinisiert.
Scorewert 2
(Färbung nach Masson, Originalvergrößerung x 10)

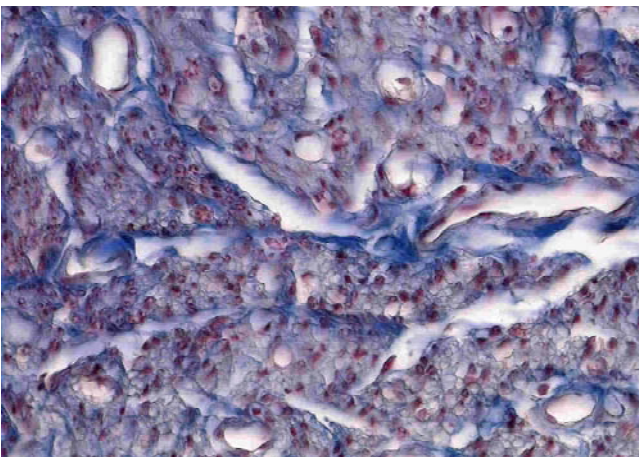


Abb. 26 Nervenfasern hochgradig demyelinisiert.
Scorewert 3
(Färbung nach Masson, Originalvergrößerung x 20)

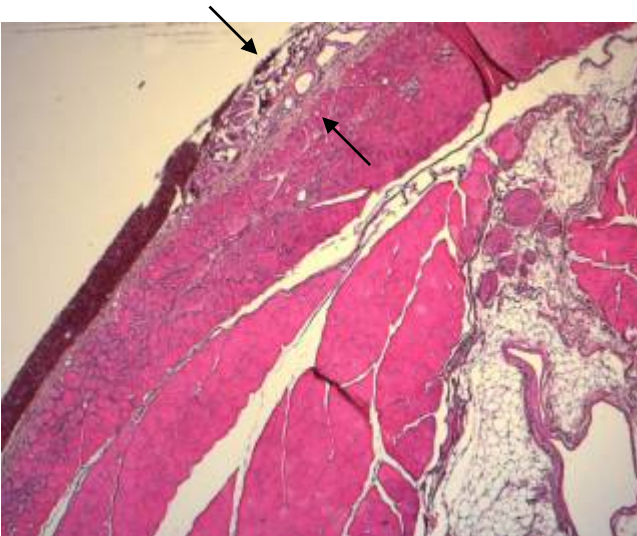


Abb. 27 Flache Muskelnekrose.
Scorewert 1
(HE-Färbung,
Originalvergrößerung x 2,5)

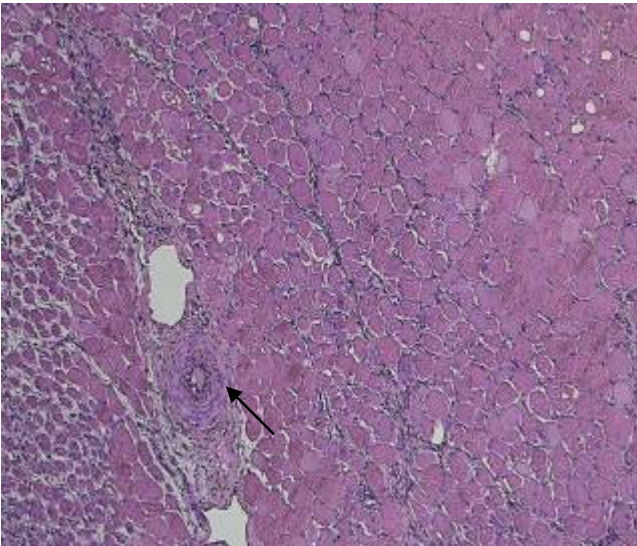


Abb. 28 Muskelnekrose ausgeprägt.
Scorewert 3
Arterie thrombosiert und partiell
nekrotisch (↑) (S3)
(HE-Färbung,
Originalvergrößerung x 5)

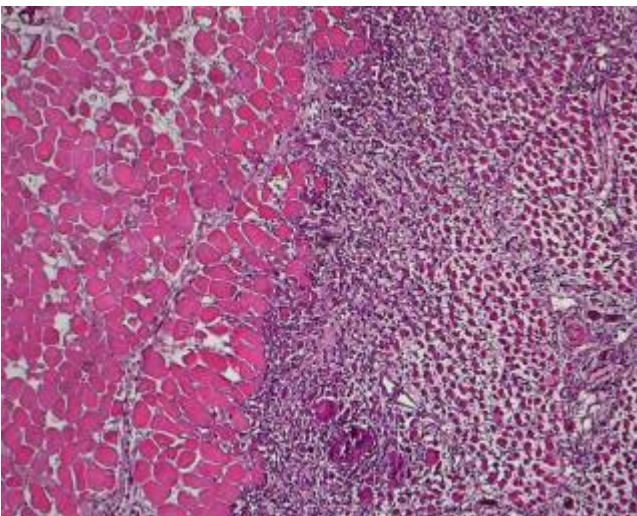


Abb. 29 Mesenchymale Reaktion.
(HE-Färbung,
Originalvergrößerung x 5)

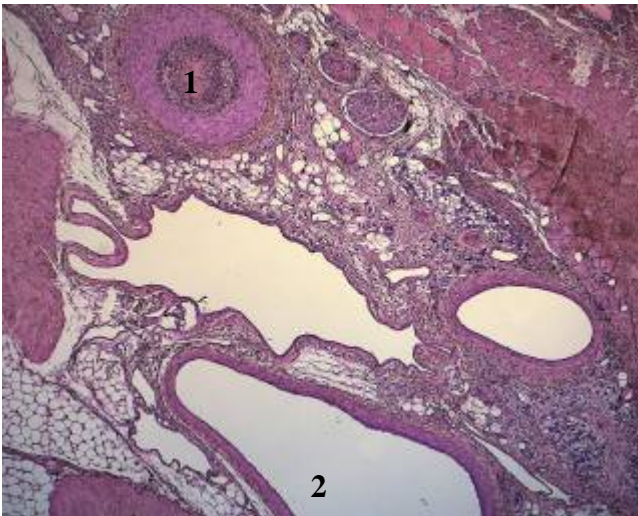


Abb. 30 Obliterierte Arterie (1), bewertet mit S3 neben einer unveränderten Arterie (2), bewertet mit S0. (HE-Färbung, Originalvergrößerung x 5)

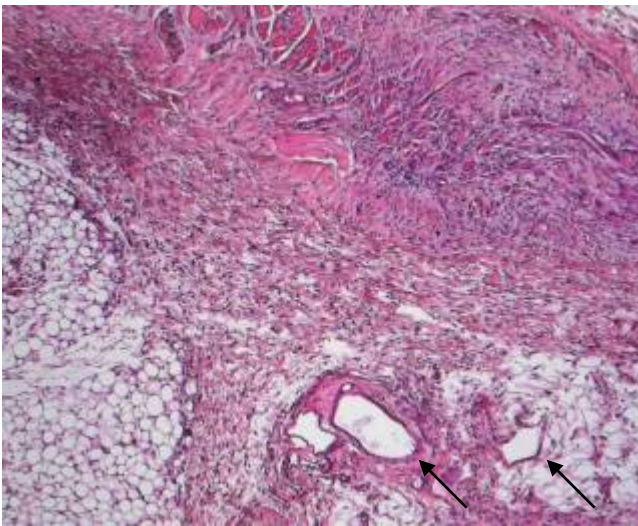


Abb. 31 Regelrechte Gefäße (↑) (S0), Muskelnekrose ausgeprägt (S3). (HE-Färbung, Originalvergrößerung x 10)

3.4.6.1. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des Versuchs II wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Als Signifikanzschranke wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,05$ angenommen. Aufgrund der geringen und variierenden Anzahl Tiere pro Parameter im ersten Versuchsteil konnten die Versuche I/1 und I/2 nicht statistisch ausgewertet werden.

3.4.7. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

3.4.7.1. Probenentnahme für die Fluoreszenzmikroskopie

Analog Abschnitt 3.4.1. (S.33) wurde vier Tieren 0,3 mg/kg KG des vorbereiteten Photosensibilisators (vgl. Abschnitt 3.3.1., S.32) in die Ohrvene injiziert, ohne eine nachfolgende photodynamische Bestrahlung vorzunehmen. Gewebeproben von diesen Tieren wurden fluoreszenzmikroskopisch auf Gehalt und Lokalisation von mTHPC untersucht. Zwei Tiere wurden 6 Minuten nach der Injektion getötet und die Proben entnommen und bei jeweils einem Tier wurde die Tötung und Entnahme 24 bzw. 72 Stunden nach der Injektion vorgenommen.

Am Tag der Probenentnahme wurden die Tiere wie folgt vorbereitet. Sie wurden mit 60 mg/kg KG Ketamin[®] und 6 mg/kg KG Rompun 2%[®] anästhesiert und bei ausreichender Muskelrelaxation in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Die Haut über dem rechten Schenkelspalt sowie die Haut am Hals wurden ebenso wie zur Operation mittels Skalpell eröffnet.

Am Hals wurden die der Trachea anliegenden Muskelstränge durch stumpfes Aufspreizen einer Schere der Länge nach voneinander getrennt, so dass die A. carotis comm. mit anliegender V. jugularis int. frei lagen.

Ebenso wurde die Trias im Schenkelspalt vorbereitet, dazu wurde die Muskulatur etwa 7 mm rechts und links der A., V. femoralis parallel zu diesen Strukturen mit dem Skalpell durchschnitten.

Anschließend wurden diese Tiere durch intracardiale Injektion von 3,0 ml T61[®] (Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) getötet. Sobald diese Injektion abgeschlossen war, wurden die vorbereiteten Gefäßabschnitte mit Halstedt-Klemmen jeweils herznah und ca. 5 cm weiter herzfern abgeklemmt um zu gewährleisten, dass die Gefäße mit Blut gefüllt blieben. Durch Herzauskultation wurde der Zeitpunkt des Todes festgestellt und danach konnten die Proben

entnommen werden. Dazu wurden die vorbereiteten Gefäße an den Klemmen durchgeschnitten und sofort weiterverarbeitet.

3.4.7.2. Aufbereitung der Biopsien

Die Aufbereitung erfolgte direkt im Anschluss an die Probenentnahme. Zuerst wurden die Gefäßbiopsien in ca. 5 mm lange Blöcke geschnitten. Diese wurden mittels eines Gewebeklebers (Tissue Tek[®], Fa. Sahura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) hochkant, d.h. die Gefäße standen senkrecht auf kleinen Pappen, befestigt. In einem sich schwimmend in flüssigem Stickstoff befindlichen Glas mit Isopentan wurden die aufmontierten Gewebelöcke aufgefroren und danach konnten sie in flüssigem Stickstoff bzw. einem Tiefkühlschrank bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden. Die Bearbeitung musste sofort nach der Entnahme geschehen und die Proben aufgrund der Lichtempfindlichkeit der photosensibilisierenden Substanz (Bleaching) auch unmittelbar in einen lichtundurchlässigen Aufbewahrungsort überführt werden. Die Aufbereitung und Weiterverarbeitung erfolgte wiederum im Institut für Neuropathologie der Universität zu Köln unter Aufsicht von Herrn Dr. Stenzel.

3.4.7.3. Weiterverarbeitung der gefrorenen Biopsien

Von diesen Gewebestücken wurden unter Lichtausschluss 10 µm dicke Kryo-Schnitte (Kryo-Cut) angefertigt, welche unmittelbar lichtgeschützt gelagert wurden und noch am selben Tag fluoreszenzmikroskopisch begutachtet wurden.

3.4.7.4. Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen dienten der Sichtbarmachung des mTHPC im Gewebe (vgl. 2.2.3.1.2, S.13 und 2.4., S. 26). Die Exzitations-Frequenz, mit der die maximale Anregung erreicht wird, liegt bei 415 nm. Der Photosensibilisator emittiert nach Anregung rotes Licht der Wellenlänge 652 nm (MORLET et al., 1995). Wir verwendeten ein Zeiss Axiophot-Mikroskop (Zeiss, Unterkochen, Deutschland) und einen Dapi CY 3 Filter, der nur Licht der Wellenlänge 420 nm (violett) weiterleitet. Die Gefäße und das Muskelgewebe zeigten grüne Autofluoreszenz, dadurch konnten organische Strukturen identifiziert werden. Da lediglich eine

qualitative Bestimmung des Photosensibilisators vorgenommen werden sollte, konnte auf eine Subtraktion der Autofluoreszenz, wie es beispielsweise bei ANDREJEVIC-BLANT et al. (1997) beschrieben wird, verzichtet werden.

Die Schnitte wurden mit 20 facher oder 40 facher Vergrößerung betrachtet.

Mittels einer dem Mikroskop angeschlossenen Kamera (Axiocam; Zeiss, Unterkochen, Deutschland) und einem Kodak EPJ 320 T –Film wurden die Fluoreszenz-Schnitte fotografiert (Abb. 40 – 45, S.79-81). Die Belichtungszeit betrug hierbei 100 Sekunden.