

4. ERGEBNISSE

4.1. Kontrollgruppen

Die Tiere aus der Kontrollgruppe, die keiner intraoperativen photodynamischen Therapie unterzogen wurden (K1), und die Tiere, die auf der kontralateralen Seite ohne photodynamische Bestrahlung nur operiert wurden (K2), zeigten keine histologischen Veränderungen der Gefäßwände oder der Nerven (Scorewert 0). Bei den Tieren aus Gruppe K2 wurde eine mesenchymale Reaktion beobachtet, die durch eine Einwanderung von Entzündungszellen sowie eine Einsprossung von Fibroblasten und Endothelzellen in das mechanisch zerstörte bzw. gereizte Operationsfeld gekennzeichnet ist. Diese Organisationsvorgänge sorgen für eine Vernarbung der Operationswunde. Die Wunden verheilten innerhalb 10 Tagen per primam mit makroskopisch sichtbarer Narbe.

4.2. Erster Versuchsteil

Die Veränderungen an den Gefäßen, Nerven und der Muskulatur sind anhand der oben beschriebenen Bewertungsskala mit den Werten für den Scorewert (S) von 0 – 3 in den Tabellen 5 und 6 (S. 59 und 69) wiedergegeben und werden in den folgenden Abschnitten auch detailliert beschrieben.

Der Übersicht halber wurden für die Strukturen Abkürzungen erstellt, die sowohl im Text als auch in den Tabellen Verwendung fanden:

- A. carotis comm. (AC), A. femoralis (AF),
- V. jugularis int. (VJ), V. femoralis (VF),
- N. vagus (NV), N. saphenus (NS),
- Kleine Halsgefäße (KIHG), Kleine Femoralisgefäße (KIFG)
- Halsmuskulatur (HM), Femoralismuskulatur (FM)D
- Der Behandlungsparameter Behandlungsintervall wurde mit BI abgekürzt.

In den Tabellen wurden immer zuerst die Scorewerte für die Strukturen aus der Halsregion aufgelistet (A. carotis comm. (AC), V. jugularis int. (VJ), N.vagus (NV), kleine Halsgefäße (KIHG), und Halsmuskulatur (HM)) und dann die Scorewerte für die Strukturen aus der Femoralisregion (A. femoralis (AF), V. femoralis (VF), N. saphenus (NS) und die kleinen Gefäße (KIFG) sowie die Muskulatur aus der Femoralisregion (FM)).

4.2.1. Versuch I/1

Im Versuch I/1 wurden 26 Tiere mit einem Behandlungsintervall von 24 bis 96 Stunden und einer Lichtintensität von 10 oder 20 J/cm² photodynamisch behandelt und überlebten 2 bis 30 Tage bis zur Probenentnahme. Vier Tiere aus Gruppe I/1 e verstarben vorzeitig an einer Atemwegsinfektion und wurden nicht ausgewertet (vgl. 4.2.1.2., S.67).

4.2.1.1. Histopathologische Resultate

Grundlegend zeigte sich bei allen photodynamisch behandelten Tieren eine Veränderung des histopathologischen Bildes.

Die Schädigung der Arterien und Venen sowie der Nerven und des umliegenden Muskel- und Bindegewebes mit den Arteriolen, Venolen und Kapillaren war unterschiedlich, eine Abhängigkeit von der Lichtintensität sowie von dem Behandlungsintervall (BI) ließ sich teilweise feststellen. Die Werte sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Ergebnisse

Unter- gruppe	Tier Nr.	mTHPC Dosis in mg/kg	Laser- intens. in J/cm ²	BI in Std.	getötet nach Tagen	AC	VJ	NV	KIHG	HM	AF	VF	NS	KIFG	FM
I/1 a	1.7.	0,3	10	24	20	1	1	0	3	3	2	2	3	3	3
I/1 a	1.9.	0,3	10	24	30	1	1	2	1	3	2	2	2	3	3
I/1 b	2.1.	0,3	10	48	2	1	1	1	3	3	-	-	-	1	3
I/1 b	2.5.	0,3	10	48	10	-	-	-	-	3	1	1	2	3	3
I/1 b	2.7.	0,3	10	48	20	2	3	0	2	3	0	2	0	1	3
I/1 c	3.9.	0,3	10	72	30	1	0	0	2	3	1	2	1	1	3
I/1 d	4.1.	0,3	10	96	2	0	0	0	2	2	0	1	0	2	3
I/1 d	4.5.	0,3	10	96	10	0	1	0	2	3	1	1	0	2	3
I/1 d	4.7.	0,3	10	96	20	1	1	0	1	2	2	2	2	2	2
I/1 e	5.1.	0,3	20	24	(2)	†									
I/1 e	5.3.	0,3	20	24	(5)	†									
I/1 e	5.5.	0,3	20	24	10	2	2	1	3	3	2	3	3	3	3
I/1 e	5.11.	0,3	20	24	12	1	1	1	1	3	2	2	2	3	3
I/1 e	5.13.	0,3	20	24	(42)	†									
I/1 e	5.14.	0,3	20	24	(42)	†									
I/1 e	5.15.	0,3	20	24	42	2	2	2	2	3	2	2	2	1	3
I/1 e	5.16.	0,3	20	24	42	2	1	1	3	3	3	2	2	1	3
I/1 f	6.5.	0,3	20	48	10	1	2	1	1	3	1	2	2	3	3
I/1 f	6.11.	0,3	20	48	12	1	1	1	1	3	3	1	2	2	3
I/1 f	6.7.	0,3	20	48	20	2	2	1	1	3	2	1	2	1	3
I/1 g	7.3.	0,3	20	72	5	1	3	1	2	3	1	1	1	2	3
I/1 g	7.5.	0,3	20	72	10	1	1	0	1	3	1	3	2	2	3
I/1 g	7.9.	0,3	20	72	30	1	2	0	1	3	3	2	2	1	3
I/1 h	8.1.	0,3	20	96	2	1	1	0	1	3	3	2	0	1	3
I/1 h	8.5.	0,3	20	96	10	1	1	0	1	3	1	1	0	1	3
I/1 h	8.9.	0,3	20	96	30	1	2	0	1	3	2	2	1	1	3

Tab. 5 Versuch I/1; Scorewerte der A. carotis comm. (AC), V. jugularis int. (VJ), des N. vagus (NV), der kleinen Halsgefäße (KIHG) und der Halsmuskulatur (HM) sowie der A. femoralis (AF), V. femoralis (VF) und des N. saphenus (NS), der kleinen Femoralisgefäße (KIFG) und der Muskulatur der Femoralisregion (FM)

4.2.1.1.1. Gruppe I/1 a – d (BI 24 – 96 Std., 10 J/cm²)

4.2.1.1.1.1. Arterien, Venen, Nerven

Bei jeweils einem von 9 Schnitten der Biopsien aus der Hals- sowie aus der Femoralisregion konnten die großen Gefäße und Nerven aufgrund artefizieller Veränderungen durch die Verarbeitung der Proben nicht beurteilt werden.

Arterien: Bei zwei der acht bewertbaren AC wurde ein unveränderter physiologischer Zustand gefunden (S0), beide bei einem BI von 96 Std. Ebenfalls S0 wiesen zwei von acht AF auf. Gering geschädigt (S1) zeigten sich fünf der acht AC, nur in einem Fall fand sich eine Thrombosierung (S3) bei einem BI von 48 Std. Drei von acht AF zeigten eine geringe Reaktion (S1). Eine mittelgradige Schädigung (S2) wiesen ebenfalls drei von acht AF auf, zwei mit einem BI von 24 Std. behandelten Tiere sowie eines mit einem BI von 96 Std.

Venen: Zwei der acht VJ (einmal BI 72 Std., einmal 96 Std.) zeigten sich unverändert (S0).

Weiterhin waren fünf VJ und drei VF geringgradig geschädigt (S1). Als S2 konnten fünf VF beurteilt werden. Eine maximale Schädigung der Venen analog S3 war nur bei einer VJ mit einem BI von 48 Std. zu verzeichnen. Diese Vene war thrombosiert. Bei demselben Tier war auch die A. carotis comm. thrombosiert.

Nerven: Der NV zeigte sich in sechs von acht Fällen physiologisch (S0). In jeweils einem Fall wiesen die NV Demyelinisierungen S1 resp. S2 auf. Veränderungen traten nur in den Untergruppen I/1 a und I/1 b mit einem BI von 24 bzw. 48 Std. auf.

Drei von acht NS erschienen ungeschädigt, zwei davon bei einem BI von 96 Std. In jeweils einem Fall zeigte sich eine geringgradige Schädigung (S1) bei einem BI von 72 Std., bzw. eine maximale Schädigung (S3) bei einem BI von 24 Std. Drei der NS wiesen eine mittelgradige Demyelinisierung (S2) auf.

4.2.1.1.1.2. Kleine Gefäße

Es wurden weiterhin die Veränderungen der kleineren arteriellen und venösen Gefäße untersucht. Diese stellten sich in diesem Versuch nach jeder photodynamischen Therapie verändert dar.

Die Reaktionen der KIHG und KIFG waren in den Untergruppen I/1 a und b (BI 24 und 48 Std., 10 J/cm²) in zwei von vier Fällen der KIHG und drei von fünf Fällen der KIFG maximal (S3), sonst S1 und einmal S2. Bei einem BI von 72 und 96 Std. war die Schädigung jeweils dreimal S2 und einmal S1, hier traten keine maximalen Schädigungen auf.

4.2.1.1.2. Gruppe I/1 e – h (BI 24 – 96 Std., 20 J/cm²)

4.2.1.1.2.1. Arterien, Venen und Nerven

Von 17 behandelten Tieren konnten jeweils 13 Biopsien aus dem Behandlungsfeld Hals sowie dem Behandlungsfeld Hintergliedmaße untersucht werden. In allen untersuchten Proben dieser Gruppen wiesen sowohl die AC und AF, als auch die VJ und VF Veränderungen auf.

Arterien: Die AC wiesen in neun von 13 Fällen eine geringe Schädigung (S1) auf. In dieser Fraktion befanden sich alle Tiere, die mit einem BI länger als 48 Std. photodynamisch behandelt wurden. Bei allen anderen Tieren stellte sich die AC mittelgradig geschädigt (S2) dar.

Die AF wurden in vier der 13 Fälle mit S1 und in fünf der 13 Fälle mit S2 beurteilt. Ein Schädigungsgrad 3 trat bei ebenfalls vier AF auf. In zwei Fällen (BI 24 und 48 Std.) war diese Bewertung auf die Thrombosierung der A. femoralis zurückzuführen, in den anderen beiden Fällen (BI 72 und 96 Std.) handelte es sich um durch massive Zellproliferation obliterierte Gefäße. Im ersten Fall war der Thrombus bereits organisiert. Eine Arterie stellte sich infolge Narbenzugs geschrumpft dar. Sie wies zusätzlich subendotheliale Einblutungen auf.

Auffällig erschien, dass die Tunica muscularis der großen Arterien niemals nekrotisch war, die direkt angrenzende Skelettmuskulatur in den meisten Fällen jedoch eindeutig einer Nekrose unterlag (vgl. Abschnitt 4.2.1.1.3., S.62).

Venen: Die VJ zeigten in sechs von 13 Fällen eine geringe Schädigung (S1), ebenfalls sechs VJ wiesen Schädigungsgrad 2 auf. In einem Fall war eine Thrombosierung (S3) zu beobachten (BI 72 Std.). Die VF konnte in vier Fällen als gering geschädigt beurteilt werden (S1), mäßige Schäden (S2) waren bei sieben VF zu verzeichnen. Zwei VF zeigten maximale Veränderungen, einmal Thrombosierung (BI 72 Std.), einmal Obliteration (BI 24 Std.).

Nerven: Der NV stellte sich in 5 Fällen physiologisch unverändert dar (S0), alle hatten ein BI von 72 oder 96 Std. Sieben Nerven wiesen geringe Demyelinisierungen auf (S1), lediglich ein NV mit einem BI von 24 Std. war mittelgradig geschädigt (S2). Die NS konnten in zwei Fällen, jeweils bei Tieren mit einem BI von 96 Std. als vollständig myelinisiert (S0) beurteilt werden. Ebenfalls in zwei Fällen zeigte sich eine geringe Schädigung (S1), bei einem BI von 72 bzw. 96 Std. Acht der 13 Nerven wiesen eine mittelgradige Demyelinisierung (S2) sowie ein Nerv (BI 24 Std.) eine hochgradige Schädigung (S3) auf.

4.2.1.1.2.2. Kleine Gefäße

Die KIHG und KIFG der Tiere mit einem BI von 24 und 48 Std. und 20 J/cm² zeigten in zwei von sechs Fällen (KIHG) bzw. drei von sechs Fällen (KIFG) maximale Reaktionen wie Gefäßverschluss und Nekrose.

Die Veränderungen der kleinen arteriellen und venösen Gefäße in den Untergruppen g und h (BI 72 und 96 Std., 20 J/cm²) konnten in einem von sechs (KIHG) bzw. zwei von sechs (KIFG) Fällen nur als S1 beurteilt werden, die restlichen fünf KIHG und vier KIFG dieser Untergruppen waren mittelgradig geschädigt (S2). In diesen Gruppen war kein S3 zu beobachten.

4.2.1.1.3. Muskulatur, Binde- und Fettgewebe (Versuch I/1)

In jedem Falle einer durchgeführten PDT wurden ausgeprägte Nekrosen der Muskulatur und des Binde- und Fettgewebes im Bestrahlungsfeld beobachtet.

In drei Fällen war die Nekrose des umgebenden Gewebes begrenzt auf maximal 2 mm Tiefe (S2). In allen anderen Fällen erstreckten sich die nekrotischen Areale auf den gesamten Schnitt (S3). Die geringere Reaktion (S2) war bei Tieren zu verzeichnen, die mit dem BI von 96 Std. und einer Lichtintensität von 10 J/cm² photodynamisch behandelt wurden.

Alle untersuchten Schnitte wiesen einen bereits makroskopisch sichtbaren Schädigungsbereich auf. Dieser stellte sich in der Übersicht überwiegend eosinophil dar und wurde begrenzt von einer basophilen Demarkationslinie aus Granulozyten, Makrophagen und anderen Entzündungszellen sowie Fibroblasten und Neovaskularisation. Die Muskelzellen waren zum Teil kernlos aber noch im normalen Verbund, teilweise lagen die Muskelfasern in Form von hyalinen Schollen vor oder bestanden nur noch aus Zelltrümmern. Das Fettgewebe im Bestrahlungsfeld war im Vergleich zur Muskulatur nicht immer komplett nekrotisch, aber doch massiv geschädigt und entzündlich verändert.

Die mesenchymale Reaktion stellte sich je nach Überlebenszeit mehr oder weniger fortgeschritten dar, dementsprechend war die Gewebenekrose bei den Tieren, die lange Zeit überlebt hatten (20 bis 42 Tage) fast völlig resorbiert und organisiert.

4.2.1.1.4. Zusammenfassung des Versuchs I/1

4.2.1.1.4.1. Schädigungen in Abhängigkeit von der Lichtintensität

Unter Vernachlässigung des Behandlungsintervalls und der verschiedenen Überlebenszeiten wurden hier nur die Lichtintensitäten miteinander verglichen. In Abbildung 32 und 33 (S.64) sind die Scorewerte der Gefäße und Nerven bzw. der kleinen Gefäße für 10 und 20 J/cm² gegenübergestellt.

Arterien: Die Bestrahlung mit 10 J/cm² rief in 4 von 16 Fällen ($4/16 = 25\%$) Schädigungen S2 oder S3 hervor, die Bestrahlung mit 20 J/cm² schädigte dagegen 13 von 26 Arterien ($13/26 = 50\%$) S2 oder S3.

Venen: Die Venenwände zeigten auf eine Bestrahlung mit 10 J/cm² in 6 von 16 Fällen ($6/16 = 37,5\%$) Veränderungen S2 oder S3, auf eine Bestrahlung mit 20 J/cm² hingegen in 16 von 26 Fällen ($16/26 = 61,5\%$) .

Nerven: Schädigungen analog S2 oder S3 fanden sich bei 4 von 16 ($4/16 = 25\%$) der mit 10 J/cm² bestrahlten Nerven und bei 10 von 26 ($10/26 = 38,5\%$) der mit 20 J/cm² bestrahlten Nerven.

Kleine Gefäße: Die Bestrahlung mit einer Lichtintensität von 10 J/cm² rief in 10 von 15 Fällen ($10/15 = 66\%$) S2 oder S3 Schädigungen hervor, eine Bestrahlung mit 20 J/cm² führte in 10 von 26 Fällen ($10/26 = 38\%$) zu einer Schädigung analog S2 oder S3.

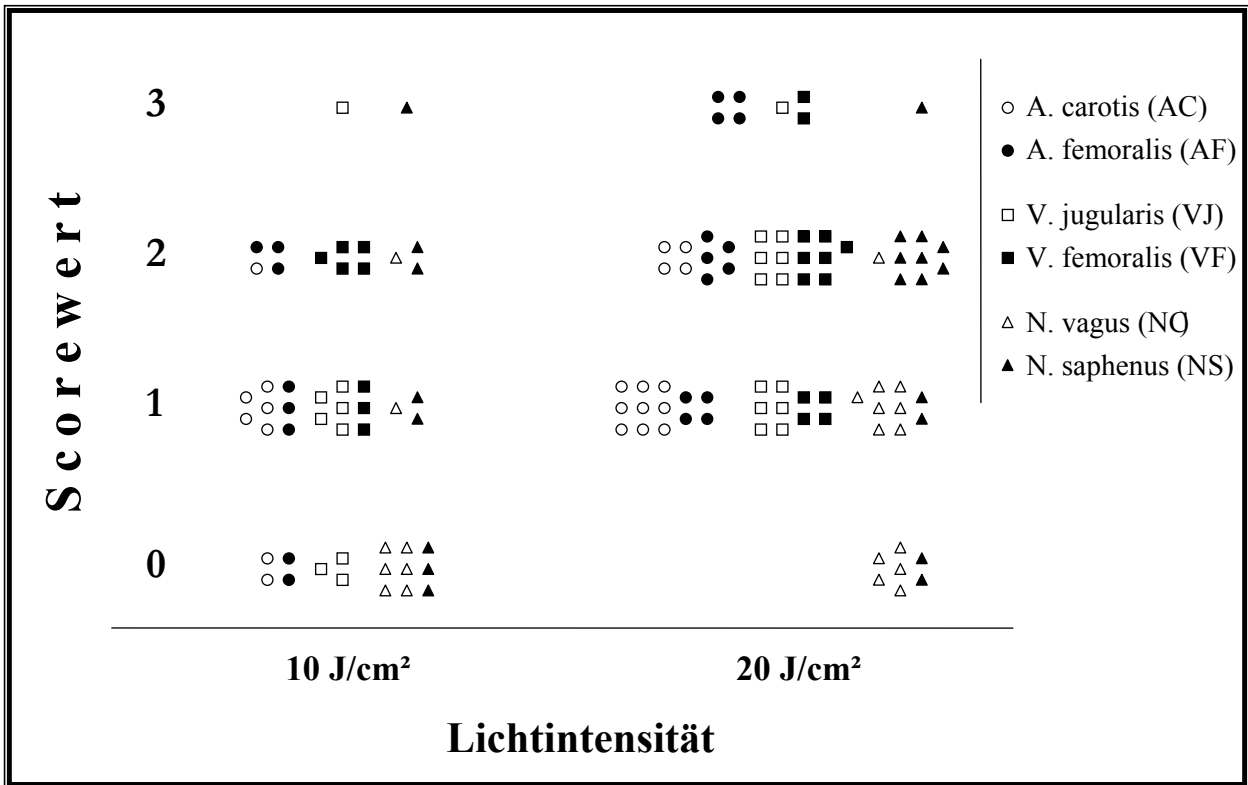


Abb. 32 Schädigung der großen Gefäße und Nerven in Abhängigkeit von der Lichtintensität (Versuch I/1)

Jedes Symbol bezeichnet den Scorewert einer Probe.

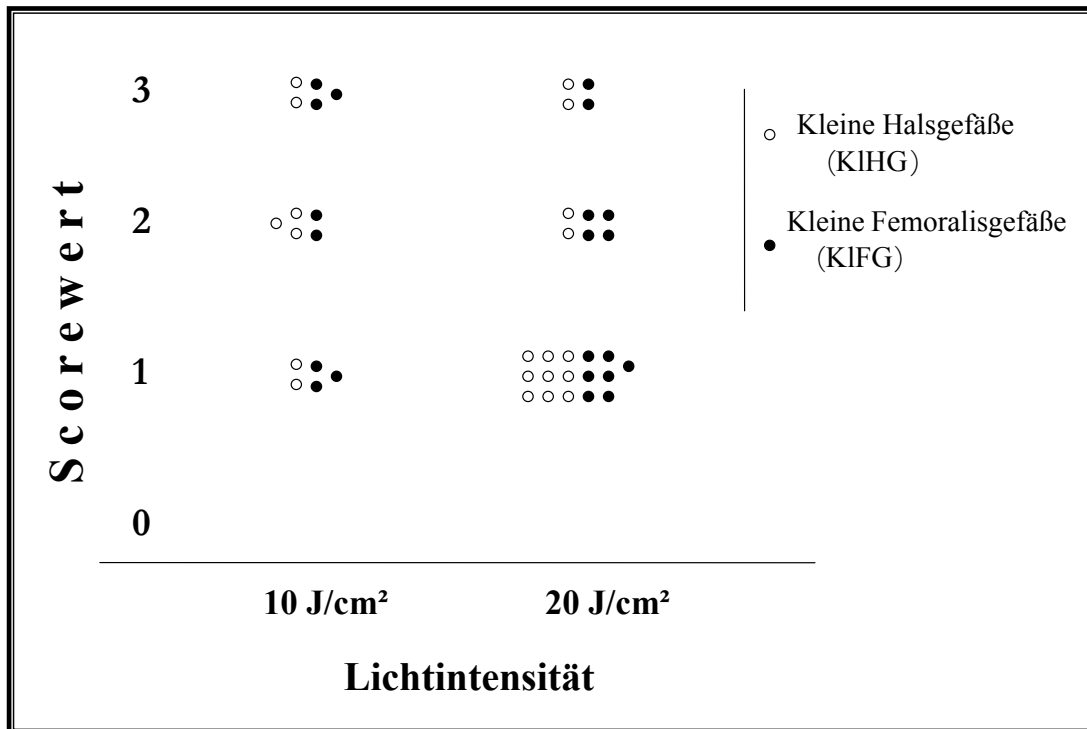


Abb. 33 Schädigung der kleinen Gefäße in Abhängigkeit von der Lichtintensität (Versuch I/1)

4.2.1.1.4.2. Schädigungen in Abhängigkeit vom Behandlungsintervall

Der direkte Vergleich des kürzesten (24 Stunden) und des längsten BI (96 Stunden) erfolgte hier wiederum unter Vernachlässigung der Lichtintensitäten und der Überlebenszeiten.

In den Abbildungen 34 bis 37 sind ferner die Scorewerte für die großen Arterien, Venen, Nerven und die kleinen Gefäße für die vier Behandlungsintervalle grafisch dargestellt.

Arterien: Bei einem BI von 24 Std. waren 9 von 12 Arterien ($9/12 = 75\%$) S2 oder S3, demgegenüber nur 3 ($3/12 = 25\%$) bei einem BI von 96 Stunden (Abb. 33).

Venen: Die Venen zeigten bei einem BI von 24 Stunden in 8 von 12 Fällen ($8/12 = 66\%$) Schädigungsgrad S2 oder S3, hingegen nur in 4 Fällen ($4/12 = 33\%$) bei einem BI von 96 Stunden (Abb. 34).

Nerven: Bei einem BI von 24 Stunden reagierten 8 von 12 Nerven ($8/12 = 66\%$) S2 oder S3, jedoch nur einer ($1/12 = 8,3\%$) mittelgradig (S2) bei einem BI von 96 Stunden (Abb. 35).

Kleine Gefäße: Bei einem BI von 24 Stunden zeigten die kleinen Gefäße in 8 der 12 Proben ($8/12=66\%$) eine mittelgradige und starke Reaktion, bei einem Intervall von 96 Stunden nur in 5 der 12 Proben ($5/12 =42\%$) (Abb. 36, S.67).

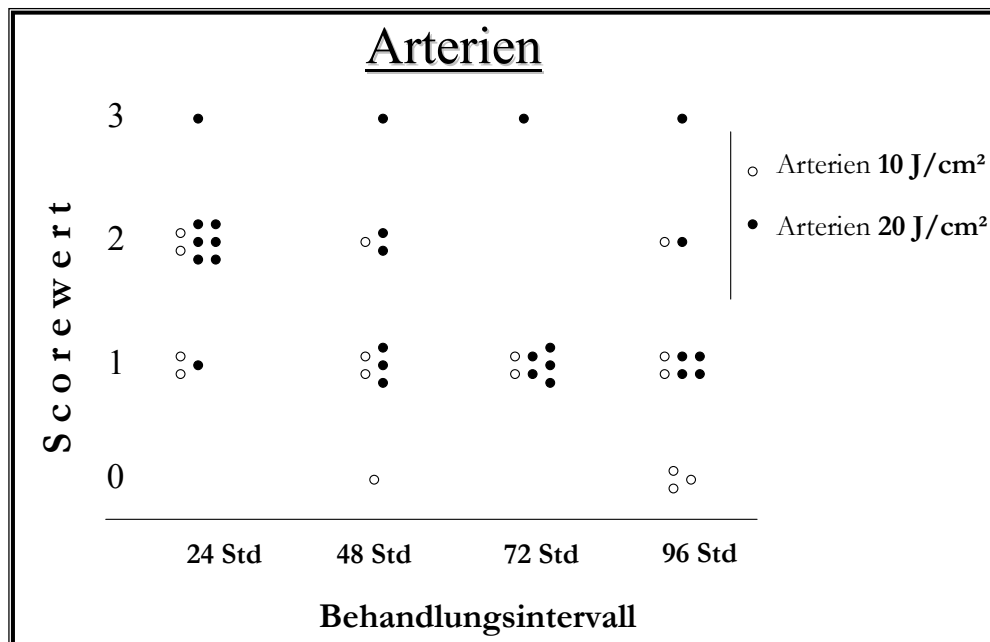


Abb. 34 Schädigung der Arterien in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern Behandlungsintervall und Lichtintensität (Versuch I/1)

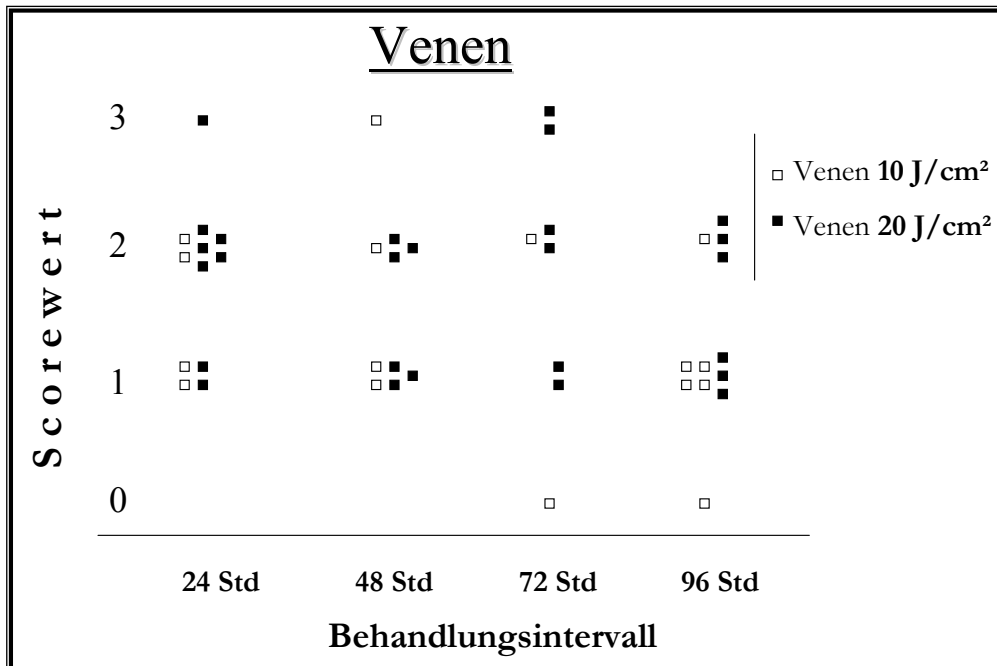


Abb. 35 Schädigung der Venen in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern
Behandlungsintervall und Lichtintensität (Versuch I/1)

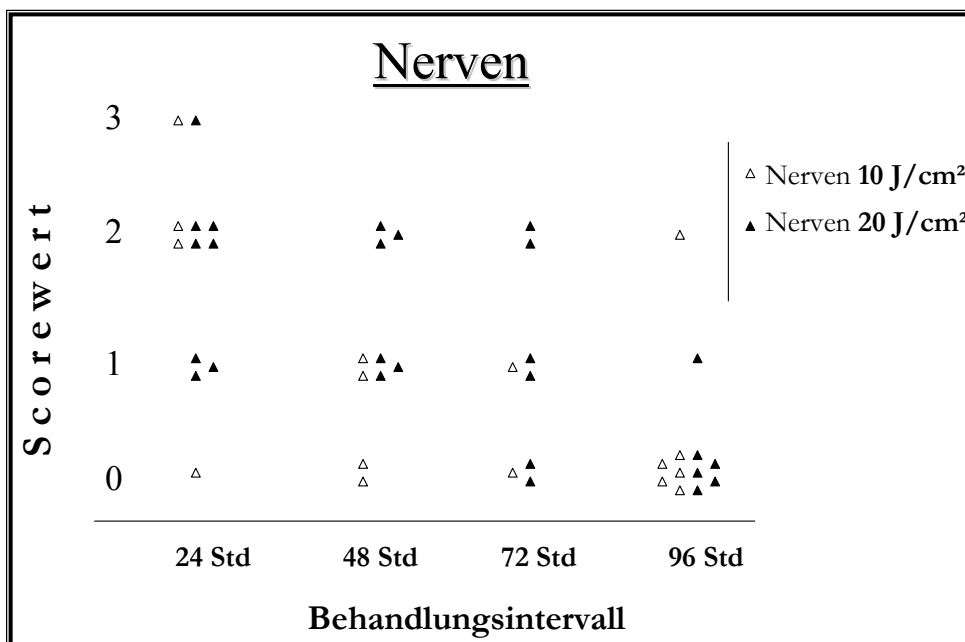


Abb. 36 Schädigung der Nerven in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern
Behandlungsintervall und Lichtintensität (Versuch I/1)

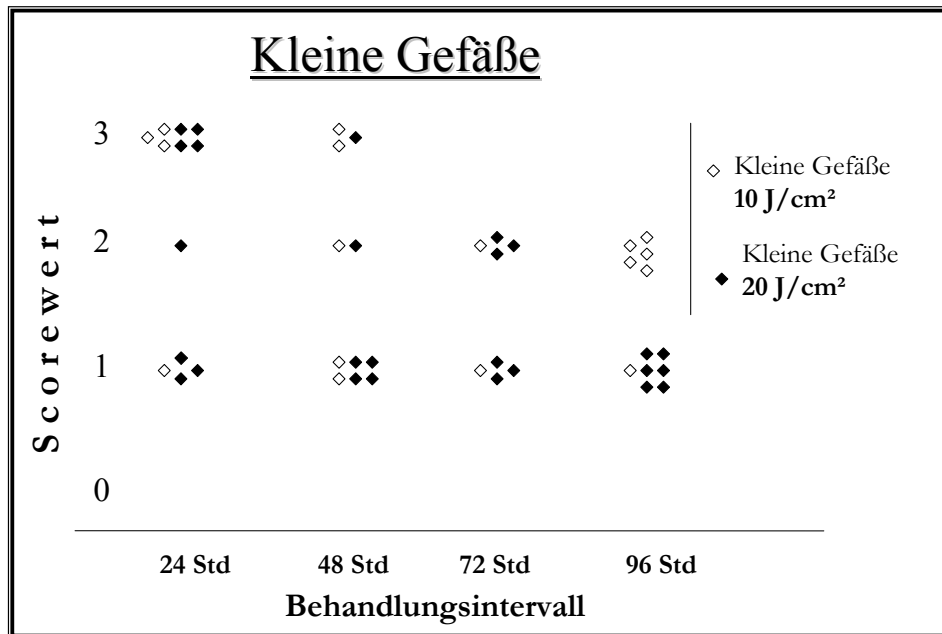


Abb. 37 Schädigung der kleinen Gefäße in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern Behandlungsintervall und Lichtintensität (Versuch I/1)

4.2.1.2. Nebenwirkungen

Die Kaninchen zeigten leichte Schmerzreaktionen während der Injektion des Photosensibilisators in die Ohrvene. Ruckartige Bewegungen wurden durch adäquates Handling vermieden, jedoch konnte der Assistent eine eindeutige Reaktion im Verlauf der Injektion im Sinne von Abwehr- und Fluchtverhalten spüren.

Einmal gelangte infolge dieser Bewegungen des Tieres etwas Flüssigkeit paravenös, woraufhin dieses Ohr ödematös anschwell und sich um die Injektionsstelle dunkelrot verfärbte. Innerhalb weniger Tage verschwanden diese Rötungen und das Ohr nahm wieder physiologische Farbe und Form an.

Die Beschwerden, die während der postoperativen Phase auftraten, sind detailliert Tabelle I (Anhang S. 122) zu entnehmen.

Über die Hälfte der photodynamisch behandelten Kaninchen zeigten Neigung zur Mutilation der operierten Wunden, dies führte in 4 Fällen zu einer Nahtdehiszenz bzw. Abszessbildung. Dieses Verhalten war unabhängig von den Behandlungsparametern zu beobachten. Die Tiere wurden anästhesiert und der Abszessinhalt entfernt und gespült und die Tiere bekamen einen Halskragen.

Weiterhin wurden in 4 Fällen, ebenfalls unabhängig vom Behandlungsintervall, Weichteilschwellungen über dem Operationsfeld beobachtet.

Es wurden klinisch keine phototoxischen Wirkungen auf die Haut festgestellt. Die Tiere wurden für 48 Stunden nach der Operation im Dunkeln gehalten (vgl. Abschnitt 3.3.2., S.32).

Der Gewichtsverlauf der Tiere wurde regelmäßig kontrolliert. In der ersten Woche nach der intraoperativen PDT wurden bei 3 Tieren Gewichtsabnahmen festgestellt, am jeweiligen Zeitpunkt der Tötung wiesen 6 Tiere einen Gewichtsverlust von 3 bis 21 Prozent auf. Die genauen Daten sind Tabelle IV (Anhang S.124) zu entnehmen.

Sechs Kaninchen litten während der postoperativen Phase unter einer unspezifischen Infektion des Respirationstraktes. Die Tiere zeigten Dyspnoe und Nasenausfluß sowie Apathie und Inappetenz. Zwei dieser Tiere wurden mit einer Lichtintensität von 10 J/cm² photodynamisch behandelt, das erste Tier mit einem BI von 24 Std., Tier 2 mit einem BI von 96 Std. Bei der Sektion wies das erste Tier einen Pyothorax und eine purulente Pneumonie auf, das zweite eine hochgradig verschleimte Trachea ohne Pneumonie.

Die anderen vier erkrankten Tiere stammten aus der Gruppe I/1 e (24 Std., 20 J/cm²). Drei erlagen vermutlich aufgrund einer perakuten bis akuten Bronchopneumonie am 1., 3. und 9. Tag nach der photodynamischen Behandlung trotz intensiver therapeutischer Maßnahmen mit Antibiotika, Mukolytika und Paramunitätsinducer. Ein weiteres Tier mußte am 28. Tag postoperativ euthanasiert werden, weil eine 13 Tage nach der photodynamischen Behandlung aufgetretene Atemwegsinfektion trotz ebenfalls intensiver Therapiemaßnahmen nicht zu beheben war.

4.2.2. Versuch I/2

Im Versuch I/2 wurden vier Kaninchen photodynamisch behandelt. Alle wurden mit 20 J/cm² bestrahlt und bei je zwei Tieren war das Behandlungsintervall 3 Minuten resp. 6 Stunden. Alle Kaninchen wurden 12 Tage nach der Behandlung getötet und die Proben entnommen.

4.2.2.1. Histopathologische Resultate

Die Ergebnisse aus den histologischen Untersuchungen sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Untergruppe	Tier Nr.	BI	getötet nach Tagen	AC	VJ	NV	KIHG	HM	AF	VF	NS	KIFG	FM
I / 2 a	3 min(1)	3 Minuten	12	0	1	0	0	2	0	1	0	0	2
I / 2 a	3 min(2)	3 Minuten	12	1	1	1	1	3	0	1	0	0	2
I / 2 b	6 Std.(1)	6 Stunden	12	1	1	2	2	3	0	3	2	1	3
I / 2 b	6 Std.(2)	6 Stunden	12	1	1	1	1	3	2	2	2	3	3

Tab. 6 Versuch I/2; Schädigungs-Scorewerte für Arterien, Venen, Nerven, kleine Gefäße und Muskulatur (Erklärung der Abkürzungen auf S. 57)

4.2.2.1.1. Arterien, Venen und Nerven

Die Biopsien der Tiere aus den Kurzzeitversuchen mit einem **BI** von **3 Minuten** zwischen der Injektion des Photosensibilisators und der intraoperativen Bestrahlung (Gruppe I/2 a) zeigten ein gänzlich anderes histologisches Bild als alle Tiere aus dem Versuch I/1.

Arterien: In beiden Fällen waren sowohl AC als auch AF unverändert bis auf eine gering geschädigte AC (S1), die eine fokale Endothelhyperplasie aufwies.

Venen: Die VJ und VF zeigten nicht mehr als eine Fältelung ihrer Wand ohne Endothelablösung oder Zellproliferation und wurden dementsprechend mit S1 bewertet.

Nerven: Die NV und NF wiesen außer dem NV in einem Fall keine Schädigungen (S0) auf und auch in diesem Fall war die Schädigung lediglich S1.

Stärkere Reaktionen wiesen die beiden Tiere auf, die mit einem **BI** von **6 Stunden** photodynamisch behandelt wurden (Gruppe I/2 b) (siehe Abb. 38).

Arterien: Die AC wiesen bei beiden Tieren geringgradige Schädigungen (S1) auf. Die AF zeigte sich in einem Fall physiologisch unverändert (S0), im anderen Fall jedoch mittelgradig geschädigt (S2).

Venen: Die ebenfalls im Bereich des Halses gelegenen VJ waren bei beiden Tieren analog den AC geringgradig geschädigt (S1). Bezüglich der VF konnte jedoch in einem Fall eine mittelgradige (S2) und in einem Fall eine maximale Schädigung (S3) beobachtet werden. Diese Vene zeigte eine nekrotische Venenwand mit Einblutungen ins umliegende Gewebe, jedoch keine Thrombenbildung.

Nerven: Die Nerven bei beiden Tieren wiesen eine leichte (S1) bis mittlere (S2) Demyelinisierung auf.

Abbildung 38 stellt die Scorewerte für die Gruppen I/2 a und b grafisch dar.

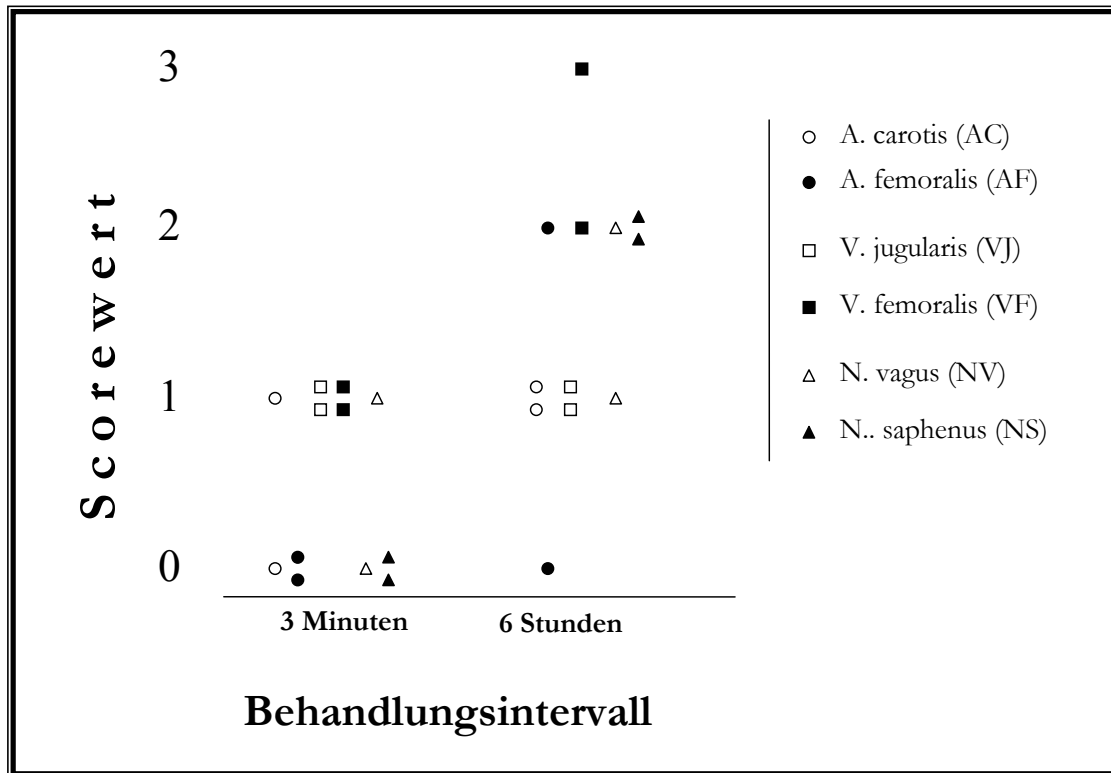


Abb. 38 Schädigung der großen Gefäße und Nerven bei einem BI von 3 Minuten und 6 Stunden (Versuch I/2)

4.2.2.1.2. Kleine Gefäße

Die kleinen Arterien und Venen sowie Arteriolen und Venolen der beiden Tiere der Gruppe I/2 a (**BI 3 Minuten**) zeigten sich mitten in der Nekrosezone völlig intakt (S0) bis auf eine Ausnahme, bei der bei einigen KIHG ein zweischichtiges Endothel und eine minimale Mediaauflockerung ohne ausgeprägte Einengung des Lumens (S1) zu beobachten war.

Die Tiere aus Gruppe I/2 b, die mit einem **BI** von **6 Stunden** photodynamisch behandelt wurden, wiesen in zwei Fällen geringe (S1) und in jeweils einem Fall mäßige (S2) bzw. schwere Reaktionen (S3) der KIHG und KIFG auf.

4.2.2.1.3. Muskulatur, Binde- und Fettgewebe

Die Tiere, die mit einem **BI von 3 Minuten** behandelt wurden (Gruppe I/2 a), wiesen ein absolut anderes Schädigungsbild der Muskulatur sowie des Binde- und Fettgewebes gegenüber den Tieren aus dem Versuch I/1 auf. Die Nekrose war fokal begrenzt und flach und wurde als S2 bewertet. Unterhalb der Nekrosezone, die ca. 1 bis 4 mm in die Tiefe reichte, befand sich völlig intakte Muskulatur bzw. Binde- oder Fettgewebe. Die geschädigten Gebiete wurden ebenfalls von einem Demarkationswall aus Entzündungszellen und ersten Fibroblasten begrenzt. Nur in einem Fall war die Nekrose der HM S3, bei diesem Tier trat auch die oben genannte geringe Reaktion der KIHG auf.

Beide Tiere der Gruppe I/2 b (**BI 6 Stunden**) zeigten ausgeprägte Nekrosen der HM und FM analog S3, die von einer breiten Demarkationslinie begrenzt wurden.

4.2.2.2. Nebenwirkungen

Bei einem Tier mit BI 6 Stunden trat eine Abszedierung sowohl des Operationsfeldes am Hals als auch der Operationswunde am Oberschenkel auf (siehe Tabelle II, S.123 im Anhang).

Die Gewichtsentwicklungen sind in Tabelle V (Anhang S. 125) ausführlich dargestellt.

4.3. Zweiter Versuchsteil

Im zweiten Versuchsteil wurden zwei Gruppen untersucht. Jeweils sechs Tiere wurden 3 Minuten (II a) resp. 24 Stunden (II b) nach der Injektion des Photosensibilisators mit einer Lichtintensität von 20 J/cm² bestrahlt.

4.3.1. Histopathologische Ergebnisse

Die Ergebnisse sind detailliert nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Gruppe	Tier Nr.	BI	getötet nach Tagen	AC	VJ	NV	KIHG	HM	AF	VF	NS	KIFG	FM
II a	1	3 Minuten	12	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
	2	3 Minuten	12	0	2	0	0	1	0	1	0	0	1
	3	3 Minuten	12	0	0	0	0	1	0	1	0	0/2*	1
	4	3 Minuten	12	0	0	0	0	2	1	1	2	2	2
	5	3 Minuten	12	-	1	1	0/3*	2	0	1	1	0	2
	6	3 Minuten	12	1	1	1	0/2*	2	0	1	1	0/2*	2
II b	7	24 Stunden	12	1	2	2	3	2	2	1	2	3	2
	8	24 Stunden	12	1	1	2	3	2	3	2	2	3	3
	9	24 Stunden	12	1	1	1	1	2	2	1	3	3	2
	10	24 Stunden	12	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3
	11	24 Stunden	12	1	2	1	2	3	2	2	2	2	3
	12	24 Stunden	12	1	2	2	3	3	2	2	2	2	3

* jeweils 1 Arteriole geschädigt, alle anderen unverändert

Tab. 7 Versuch II; Schädigungs-Scorewerte für Arterien, Vene, Nerven, kleine Gefäße und Muskulatur (Erklärung der Abkürzungen auf S. 57)

4.3.1.1. Gruppe II a (BI 3 Minuten)

Arterien: Bis auf zwei Ausnahmen waren die Arterien aller Tiere der Gruppe II a unverändert (S0). Jeweils eine AC und eine AF wiesen eine fokale Endothelhyperplasie (S1) auf. Bei zwei Tieren wurde eine fokale Abrundung der Endothelzellen zum sogenannten Kopfsteinpflasterendothel beobachtet, diese wurde jedoch nicht als Schädigung gewertet, da sie nur auf einem kleinen, lokal begrenzten Bereich des Endothels auftrat.

Venen: Die VJ konnten zu 50% als ungeschädigt beurteilt werden (S0). Eine geringgradige Schädigung (S1) trat bei zwei von sechs VJ auf. In einem Fall lag eine mittelgradig geschädigte Vene vor (S2), vermutlich handelte es sich hier jedoch um ein Artefakt durch die Bearbeitungsprozedur. Alle VF wiesen geringe Veränderungen analog Scorewert 1 auf.

Nerven: Vier der sechs NV und drei der sechs NS dieser Tiere zeigten intakte Myelinscheiden (S0). In je zwei Fällen lag eine geringgradige Demyelinisierung (S1) des NV bzw. des NS vor. Diese geringe Schädigung trat bei Tieren auf, die auch eine Schädigung von Arterien und Venen aufwiesen (s.o.). Bei einem weiteren Tier konnte eine mittelgradige Demyelinisierung (S2) des NS

beobachtet werden. Diese Reaktion des Nerven ging mit Veränderungen S1 von AF und VF (Tier Nr. 4) einher.

Kleinere, in der Nekrosezone befindliche Nerven waren zum Teil mäßig demyelinisiert, zum Teil jedoch vollständig intakt.

Die Abbildung 39 gibt die Scorewerte der Arterien, Venen und Nerven bei dem Behandlungsintervall 3 Minuten grafisch wieder.

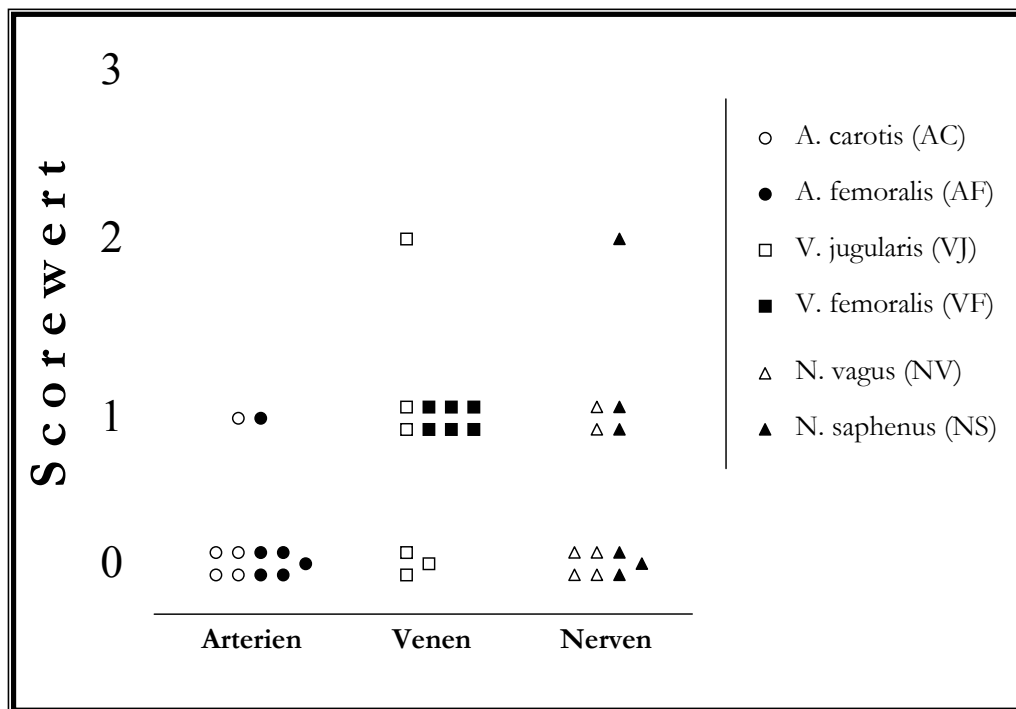


Abb. 39 Schädigung der großen Gefäße und Nerven bei einem BI von 3 Minuten (Versuch II)

Kleine Gefäße: Die kleinen Arterien und Venen, Arteriolen sowie Venolen wiesen bei allen 6 Tieren nur selten Veränderungen auf. Die Schädigungszone beschränkte sich in dieser Gruppe jedoch auf einen sehr begrenzten Bereich, in dem ohnehin nur eine geringe Anzahl an kleineren Gefäßen vorhanden war. In drei Fällen waren im gesamten histologischen Schnitt neben intakten nur jeweils ein oder zwei mittelgradig geschädigte (S2) Gefäße auffindbar (KIHG Tier Nr. 6, KIFG Tier Nr. 4 und Tier Nr. 6; in Tabelle 7 mit * gekennzeichnet). Diese befanden sich neben unveränderten kleinen Gefäßen (S0) in der Schädigungszone. Ein Tier (Tier Nr. 5; KIHG) zeigte eine thrombosierte Venole mit einer aufgelockerten Media (S3). Alle anderen KIHG stellten sich ausnahmslos unverändert dar.

In zwei Biopsien fand sich jeweils eine mittelgradig geschädigte Arterie (Scorewert 2) in direkter Nachbarschaft zum Hauptgefäß, welches selbst nicht geschädigt war (vgl. Abb. 30, S. 53).

Muskulatur: Die HM und FM wiesen bei 3 Tieren nur eine oberflächliche Nekrose (S1) auf. Diese erstreckte sich longitudinal über die Breite des Bestrahlungsbereichs (ca. 2 cm) und reichte ca. 0,8 bis 1 mm in die Muskelfaszie und die oberflächliche Muskulatur. Die großen Gefäße lagen außerhalb dieser Areale. Die anderen drei Tiere wiesen eine stärkere Nekrose der HM und FM auf, diese erstreckte sich longitudinal fast über die gesamte Schnittfläche und reichte bis zu 1 cm in die Tiefe (S2). In diesen Fällen befanden sich die Hauptgefäße inmitten der Nekrosezone.

4.3.1.2. Gruppe II b (BI 24 Stunden)

Arterien: Die Veränderungen der AC beschränkten sich in 5 von 6 Fällen auf eine fokale Endothelhyperplasie mit geringfügiger Mediaauflockerung (S1). In einem Falle allerdings zeigte die AC eine stärkere Schädigung mit konzentrischer Endothelhyperplasie und ausgeprägter Mediahypertrophie (S2). Das Lumen des Gefäßes war deutlich gegenüber dem Normalzustand verkleinert. Dieses Tier (Nr. 10) wies jedoch am Hals einen Abszess auf, was die Beurteilung des Schnittes aufgrund der massiven Ansammlung von neutrophilen Granulozyten insgesamt nur eingeschränkt möglich machte (vgl. Tabelle III, S.123 im Anhang). Die AF wies bei vier der sechs Tiere Zellproliferation und ödematöse Auflockerung auf (S2). Zusätzlich führten Strukturveränderungen der Muskelzellen zu einer Schrumpfung des Gefäßes, das in einer weiteren Lumeneinengung mündete. In einem Fall (Nr. 8) war die AF durch die Endothelhyperplasie und Mediahypertrophie nahezu komplett obliteriert und in einem Fall (Nr. 10) wies sie einen Thrombus auf (jeweils S3).

Venen: Die VJ wie auch die VF stellten sich zu jeweils zwei Dritteln geringgradig geschädigt dar (S1). Alle anderen Venen wiesen eine mittelgradige Schädigung mit Endothelablösung auf (S2). Eine Ausnahme bildete Tier Nr. 9, dessen VF thrombosiert war (S3). Dieses Tier wies einen Abszess an der Hintergliedmaße auf (vgl. Tabelle III; S. 123 im Anhang).

Nerven: Zwei von sechs NV wiesen eine geringe Demyelinisierung auf (S1), drei waren S2 und ein NV war S3. Die NF konnten zu zwei Dritteln als mittelgradig geschädigt (S2) beurteilt werden. In zwei Fällen lag eine hochgradige Demyelinisierung (S3) vor. Die Nerven von zwei Tieren wiesen Einblutungen auf (Tier Nr. 8 NF und Tier Nr. 11 NF) und in der Halsbiopsie von Tier Nr. 7 war ein zentralnekrotisches Ganglion zu beobachten.

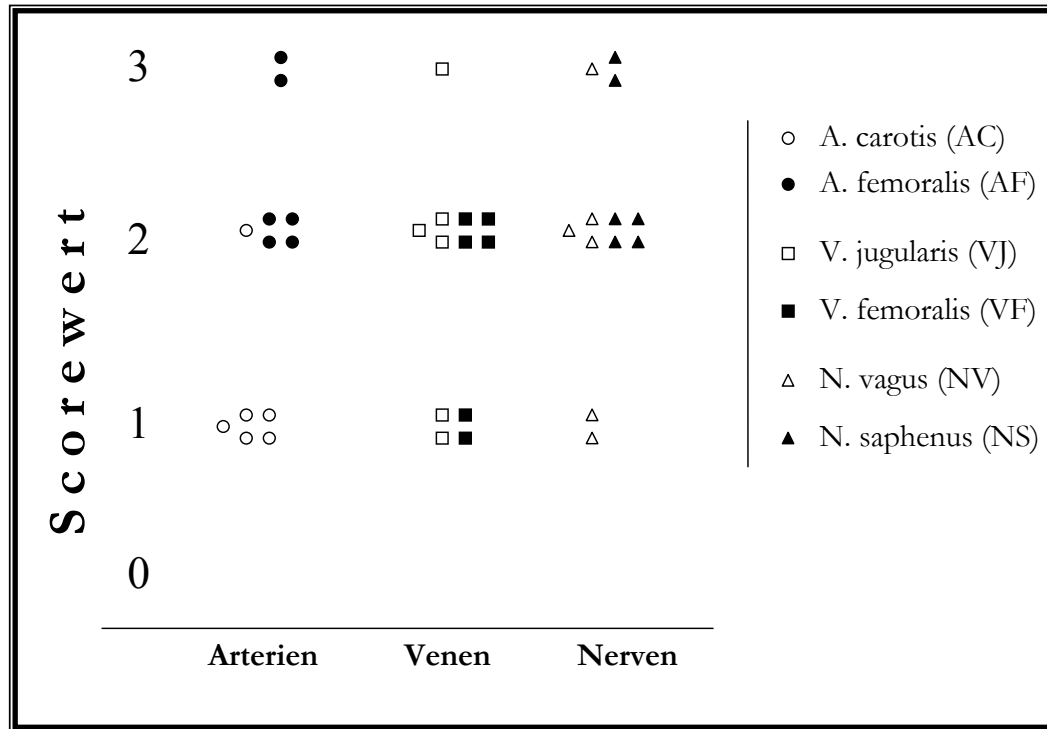


Abb. 40 Schädigung der großen Gefäße und Nerven bei einem BI von 24 Stunden (Versuch II)

Kleine Gefäße: Die KIHG und KIFG waren in fast allen Proben in großer Anzahl geschädigt. Bei den kleineren Gefäßen, die sich in absolut nekrotischen Bereichen befanden, war eine Nekrose der gesamten Gefäßwand zu beobachten (S3), die sich in diesen Fällen nur noch als eosinophile Ringe darstellten und jeglichen Wandaufbau vermissen ließen. Die kleineren Gefäße im zerstörten Gewebe zeigten zumeist Endothelhyperplasien und Mediaverdickungen (S2), häufig waren diese Gefäße zusätzlich thrombosiert (S3).

Muskulatur: Die HM und FM stellte sich in 50% der untersuchten Schnitte bis in eine Tiefe von mehreren Millimetern (S2) und in 50% auf der gesamten Fläche bis zu 3 cm in die Tiefe nekrotisch (S3) dar. Die Muskelfasern lagen nur noch als eosinophile Schollen oder Zelltrümmer vor. Auch das Fettgewebe, vor allem um die AC und VJ gelegen, stellte sich größtenteils völlig nekrotisch dar, es waren keine Zellkerne mehr vorhanden, die Zellen waren jedoch noch im normalen Verband. Lymphatisches Gewebe, welches in diesen Arealen vorhanden war, zeigte sich komplett zerstört.

Vom Rand her wurden die zerstörten Gebiete ebenfalls durch eine Demarkationslinie begrenzt, von der aus Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten in das Perimysium

einwanderten und eine tiefgreifende mesenchymale Reaktion mit beginnender Neovaskularisation auslösten (siehe Abb. 29; S. 52).

Alle histologischen Schnitte dieser Gruppe wiesen einen stark geschädigten Gesamteindruck auf. Bereits makroskopisch war eine deutlich abgegrenzte eosinophile Schädigungszone umgeben von einer basophilen Demarkationslinie sichtbar, die sich über den gesamten Schnitt erstreckte.

4.3.1.3. Zusammenfassung des Versuch II

Die histologische Untersuchung dieser Proben zeigte bei den Kaninchen der Gruppe II b mit einem BI von 24 Stunden eine signifikant stärkere Schädigung der Arterien, Venen und Nerven, sowie der umliegenden Gewebe und kleinen Gefäße als in Gruppe II a ($p < 0,05$).

4.3.2. Nebenwirkungen

Die detaillierte Auflistung der Nebenwirkungen findet sich in Tabelle III (Anhang S. 123).

4.3.2.1. Gruppe II a

Nur bei einem Tier (Nr. 4) dieser Gruppe trat eine eindeutig auf die photodynamische Therapie zurückführbare lokale Reaktion über dem Operationsfeld an der Hintergliedmaße auf. Die Hautwunde darüber war per primam verheilt, zwischen Haut und Muskulatur befand sich jedoch eine Blase mit ca. 5-6 ml seröser Flüssigkeit. Das unterliegende Muskelgewebe stellte sich zudem bereits makroskopisch sichtbar nekrotisch dar.

Infolge Automutilation trat wiederum bei einem Kaninchen (Nr. 3) eine Nahtdehiszenz auf, die konservativ behandelt wurde.

Alle anderen Tiere wiesen keinerlei klinische Symptome oder makroskopisch sichtbare pathologische Veränderungen auf.

Die Gewichtsentwicklung verlief in dieser Gruppe, wie in Tabelle VI (Anhang S.126) zu sehen ist. Vier von sechs Kaninchen wiesen am 6. Tag nach der intraoperativen PDT niedrigere Gewichte als das Ausgangsgewicht auf (maximal – 8,8%). Zwei Tiere hatten auch 12 Tage nach der intraoperativen PDT ihr Ausgangsgewicht noch nicht wieder erreicht. Im Mittel wurde jedoch eine Gewichtszunahme um 1,5% erreicht.

4.3.2.2. Gruppe II b

Alle Tiere überlebten die photodynamische Therapie ohne schwerwiegende Symptome.

Ein Tier (Nr. 11) wies großflächige Hautnekrosen auf, sowohl über dem Operationsfeld am Hals, als auch im Bauchbereich. Hier hatte die Hautnekrose ein Ausmaß von ca. 10 x 10 cm. Dieses Tier zeigte ebenfalls eine tiefe, makroskopisch sichtbare Nekrose des Muskelgewebes an der bestrahlten Region der Hintergliedmaße. Weiterhin ließ ein Kaninchen (Nr. 12) eine makroskopisch sichtbare lokale Reaktion auf die photodynamische Therapie in Form einer äußerlich sichtbaren, derben Schwellung des behandelten Halsbereiches erkennen.

Drei Tiere (Nr. 7, Nr. 9 und Nr. 10) litten unter Wundheilungsstörungen in Form von Nahtdehiszenzen, wobei es in zwei Fällen zur Abszessbildung (Nr. 9 über dem OP-Feld der Hintergliedmaße, Nr. 10 über dem OP-Feld des Halses) kam. Das einzige Symptom einer Allgemeinstörung war eine geringgradige Dyspnoe mit leichten Atemgeräuschen bei einem Tier (Nr. 10).

Die Kaninchen dieser Gruppe wiesen in den ersten 6 Tagen nach der OP einen Gewichtsverlust von durchschnittlich 7,3% auf. Insgesamt fünf der sechs Tiere wogen am 6. Tag nach der OP weniger als am Tag der OP. Bei vier Kaninchen stieg das Gewicht jedoch wieder an. Drei Tiere wiesen zum Tötungszeitpunkt am 12. Tag nach der OP eine absolute Gewichtszunahme um durchschnittlich 6% auf, die restlichen unterlagen jedoch einem Gewichtsverlust von durchschnittlich 6%. Das Endgewicht der Kaninchen entsprach somit im Mittel dem Ausgangsgewicht. Detaillierte Angaben finden sich in Tabelle VI (Anhang S. 126).

4.4. Fluoreszenzmikroskopie

Die kryokonservierten Proben wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskopes untersucht, um den Photosensibilisator im Gewebe nachzuweisen.

Die stärkste Fluoreszenz wurde in den Proben gefunden, die **6 Minuten** nach der Injektion des Photosensibilisators entnommen wurden. Hier war fluoreszierender Photosensibilisator sowohl in den Gefäßen als auch im Gewebe vorhanden. Sowohl die großen Gefäße als auch Arteriolen oder Venolen im perimysialen Bindegewebe zeigten in ihrem Lumen den Photosensibilisator diffus in Form von wolkigen roten Schleiern. Auf der dem Lumen zugewandten Seite befand sich direkt an der Gefäßwand eine rot fluoreszierende Schicht (Abb. 41, S. 79). Mit unseren Mitteln konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, ob sich die innen an die Gefäßwand angelagerte fluoreszierende Substanz in den Endothelzellen oder im Extrazellulärraum um die Endothelzellen

befand. Media und Adventitia wiesen Spuren roter Fluoreszenz auf. Auch hier war jedoch keine Zugehörigkeit zu einzelnen Zellen zu ermitteln. An einigen Stellen schien die Substanz auch in die Venenwände eingedrungen zu sein und sie durchdrungen zu haben. Im perivaskulären Bindegewebe von Arterien und Venen war ebenfalls eine rot fluoreszierende Substanz erkennbar, diese ließ sich jedoch wiederum nicht exakt einer Zellspezies zuordnen. Die Muskulatur wies zwischen den Muskelfasern und im Perimysium ebenfalls den fluoreszierenden Photosensibilisator auf (Abb. 42, S.79).

Generell lässt sich sagen, dass 6 Minuten nach der Injektion intraluminal und perivaskulär die größten Mengen der rot leuchtenden Substanz gefunden wurden.

Die Proben, die **24 Stunden** nach der Injektion des Photosensibilisators entnommen wurden, wiesen im Vergleich eine deutlich geringere Fluoreszenz auf. Diese lag im Lumen der großen Gefäße und auf Höhe des Endothels vor und war schwach diffus über das Bindegewebe und Muskelgewebe verteilt (Abb. 43 und 44, S. 80). Die Adventitia und Media der Gefäße war frei von roter Fluoreszenz.

Weiterhin wurden Proben **72 Stunden** nach der Injektion von mTHPC entnommen und untersucht. In diesen Schnitten konnte fast keine Fluoreszenz beobachtet werden. Allenfalls im Lumen einer Arteriole und um dieses Gefäß herum war ein leicht rötlicher Schleier erkennbar. Auch das Perimysium wies nur eine minimale Fluoreszenz auf (Abb. 45 und 46, S. 81).

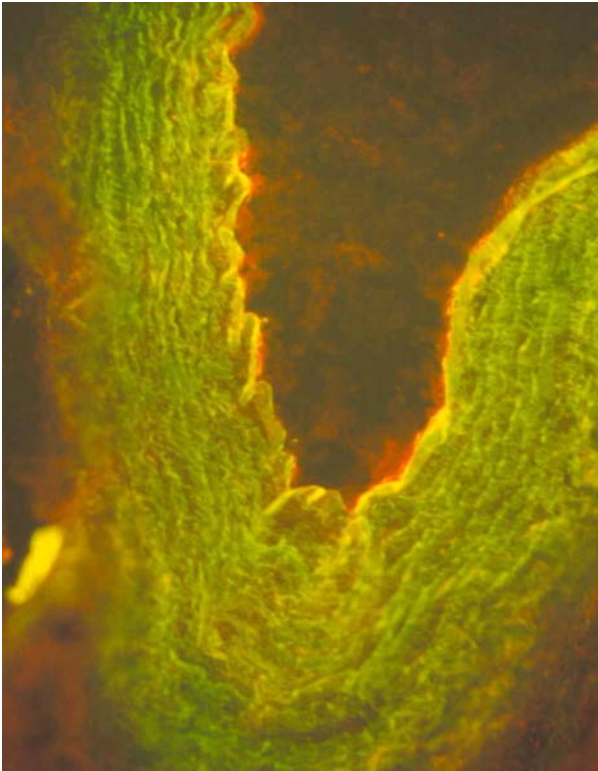


Abb. 41 Arterienwand (grüne
Autofluoreszenz);
rot fluoreszierendes
mTHPC in Lumen
und perivaskulär;
6 Minuten nach der
Injektion

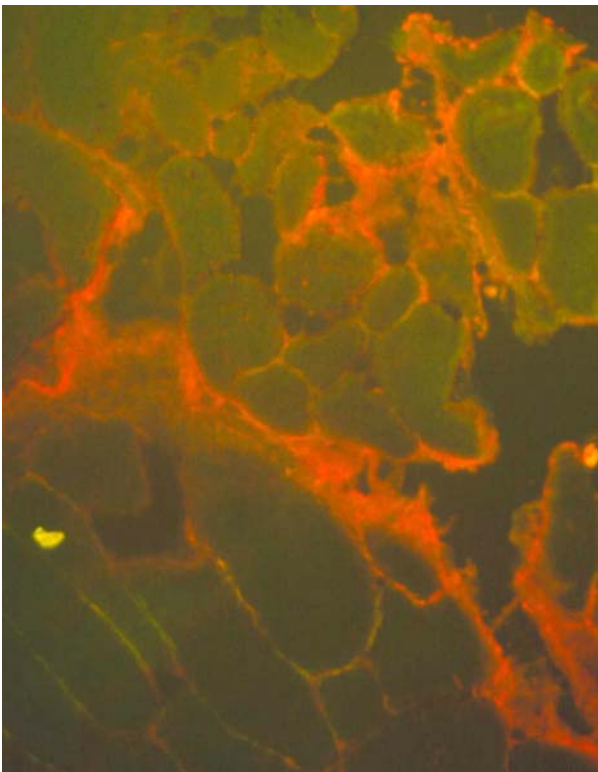


Abb. 42 Skelettmuskulatur;
rot fluoreszierendes
mTHPC im
perimysialen Raum;
6 Minuten nach der
Injektion

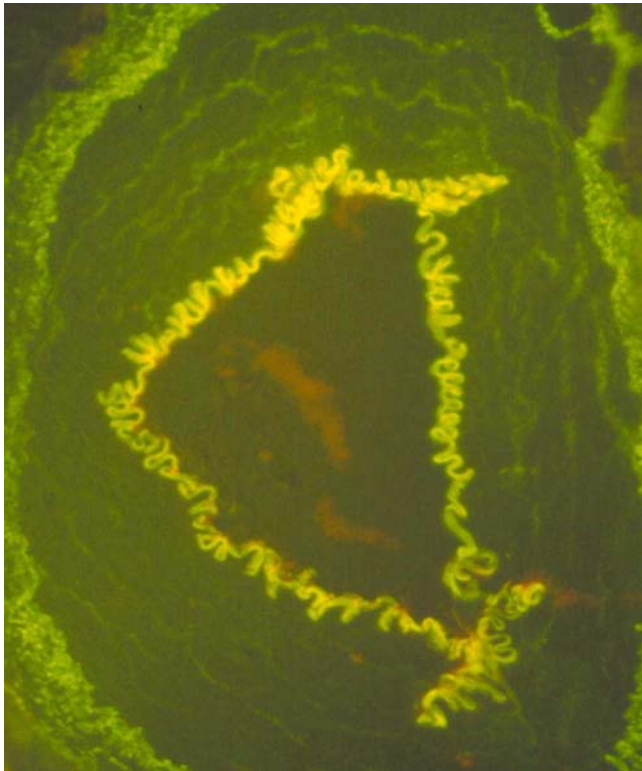


Abb. 43 Arterienwand;
mTHPC im
Lumen;
24 Stunden
nach der
Injektion

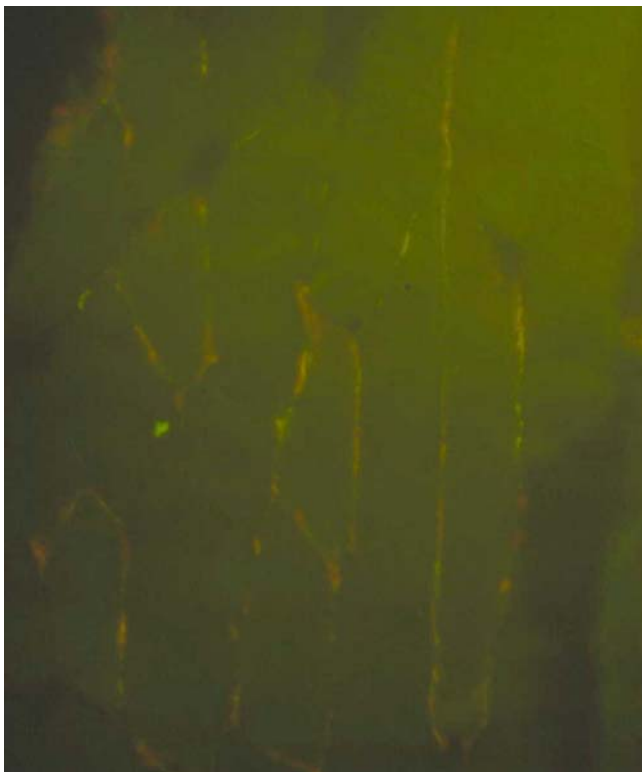


Abb. 44 Skelettmuskulatur;
minimal mTHPC
perimysial;
24 Stunden nach
der Injektion

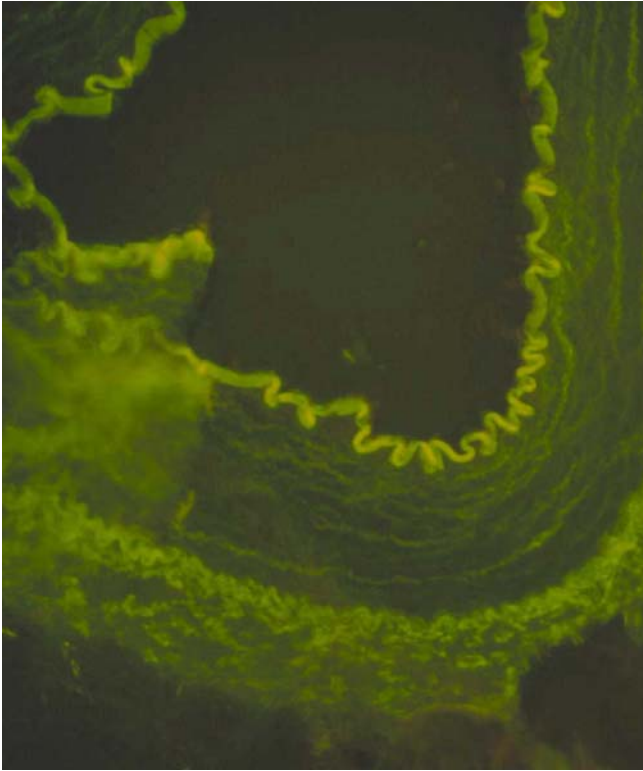


Abb. 45 Arterienwand;
kein mTHPC im
Lumen oder
perivaskulär sichtbar;
72 Stunden nach der
Injektion

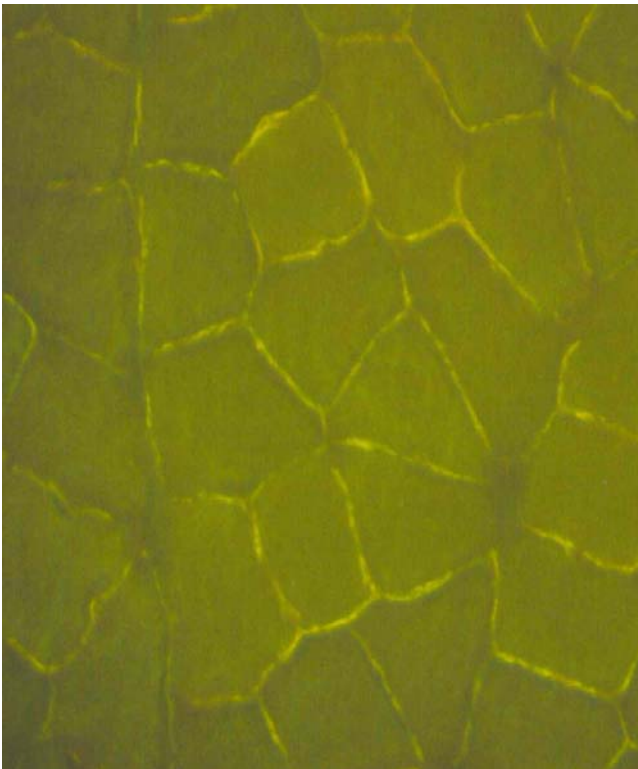


Abb. 46 Skelettmuskulatur;
kein mTHPC
sichtbar;
72 Stunden nach der
Injektion