

Aus der Universitätsklinik für Urologie

Inaugural-Dissertation

**Eindringtiefe und Verteilung von Nanopartikel nach
Injektion in die porcine Urethra mittels einer neuen
Wasserstrahltechnologie**

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Beck, Florian Wolfgang

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor Dr. W. K. Aicher
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Traub, Ph.D.

Tag der Disputation: 27.05.2020

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Geräte.....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.3 Reagenzien	12
2.1.4 Software	12
2.2 Methoden	13
2.3 Sprühapplikation.....	13
2.3.1 Präparation des Gewebes	13
2.3.2 Versuchsaufbau.....	14
2.3.3 Applikation und Weiterverarbeitung	17
2.3.4 Schneiden der Gefrierblöcke.....	19
2.3.5 Färbungen	19
3 Ergebnisse.....	20
3.1 Injektion mit Druckprofil A.....	20
3.1.1 Versuchsreihe mit Druckprofil A an der präparierten Harnröhre der Versuchstiere Schwein GI-VI	21
3.1.2 Versuchsreihe mit Druckprofil A an der präparierten Harnröhre des Versuchstieres Schwein JI-IV	31
3.2 Injektion mit Druckprofil B	39
3.2.1 Versuchsreihe mit Druckprofil B an der präparierten Harnröhre des Versuchstieres Schwein HI-VI.....	39
3.2.2 Versuchsreihe mit Druckprofil B an der präparierten Harnröhre des Versuchstieres Schwein KI-IV	47
4 Übersicht und Vergleich der Ergebnisse.....	54
5 Diskussion	60

5.1	Abhängigkeit von der individuellen Muskelbeschaffenheit und Auswirkungen auf die Muskulatur	60
5.2	Eindringtiefe und Ausdehnung der injizierten Partikel	61
5.3	Nebeneffekte einer Wasserstrahlinjektion	64
5.3.1	Ausdehnung der Partikelsuspension	64
5.4	Injektion von Nanopartikeln zur Medikamentenapplikation.....	67
5.5	Injektion von Nanopartikeln als vorbereitende Untersuchung für eine Stammzellinjektion.....	69
6	Zusammenfassung	70
7	Literaturverzeichnis.....	73
8	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	79
9	Danksagung	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 präparierte Harnblase vor der Wasserstrahlinjektion am Beispiel von Schwein HI	13
Abbildung 2 Höhenmessgerät mit befestigter Düse; auf dem Boden liegend: zwischengeschaltete Füllkammer	15
Abbildung 3 Düse auf dem Gewebe aufgesetzt und bei Höhe 5 cm positioniert.....	16
Abbildung 4 Fertiger Versuchsaufbau: Rechts zu sehen der Erbe Jet© mit voreingestelltem Injektionsdruck; darüber das Steuergerät für die Injektionsrate; mittig zu sehen das Höhenmessgerät an seiner Halterung befestigt und die Füllkammer auf dem Tisch liegend; links: das präparierte Gewebe mit Schaumstoff unterpolstert und aufgesetzter Düse.....	16
Abbildung 5 präparierte Harnblase des Schweins HIII unmittelbar nach dem Sprühversuch mit gebildeten Blasen bei H5 und H10	18
Abbildung 6 präparierte Harnblase des Schweins HIII nach dem Herausschneiden der Injektionsbereiche H5 und H10 inklusive Blasen	18
Abbildung 7 präparierte Harnblase mit längs eröffneter Urethra des Versuchstieres Schwein GIV; links: vor der Wasserstrahlinjektion, rechts: nach der Wasserstrahlinjektion mit typischer Blasenbildung.....	21
Abbildung 8 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H5 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/ Druckprofil A	23
Abbildung 9 Auftreten von Nanopartikeln in der Muskulatur der Urethra bei den Versuchstieren Schwein GI-VI bei H5/ Druckprofil A.....	23
Abbildung 10 Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein GIV nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung Azan); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 57 mit sich braun darstellenden Nanopartikeln und typischer Lokalisierung zwischen den aufgefächerten Muskelfasern (Maßstabsbalken = 1000µm); rechts: Detailaufnahme des Objektträgers 57 mit grün fluoreszierenden Nanopartikeln (Maßstabsbalken = 500µm).....	24
Abbildung 11 Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein GV nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung Azan); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 59 mit sich braun darstellenden Nanopartikeln und typischer Lokalisierung zwischen den aufgefächerten Muskelfasern und tieferer muskulärer Infiltration (Maßstabsbalken = 1000µm); rechts: Detailaufnahme des Objektträgers 59 mit grün fluoreszierenden Nanopartikeln (Maßstabsbalken = 500µm).....	25
Abbildung 12 Vergleich der Eindringbreiten der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/ Druckprofil A.....	26
Abbildung 13 Vergleich der Eindringtiefen der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/ Druckprofil A.....	27
Abbildung 14 Vergleich der Partikelclusterhöhen zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/Druckprofil A	27

Abbildung 15 Vergleich der Partikelclusterbreiten zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/Druckprofil A	28
Abbildung 16 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H10 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/Druckprofil A	28
Abbildung 17 Auftreten von Nanopartikeln in der Muskulatur der Urethra bei den Versuchstieren Schwein GI-VI bei H10/Druckprofil A	29
Abbildung 18 Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein GV nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H10 (Färbung Azan); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 43 mit sich braun darstellenden Nanopartikeln und typischer basal komprimierter Muskelschicht, die lumenwärts aufgefächert erscheint (Maßstabsbalken = 1000µm); rechts: Detailaufnahme des Objektträgers 43 mit grün fluoreszierenden Nanopartikeln (ohne Muskelbeteiligung/ Maßstabsbalken = 500µm).....	29
Abbildung 19 Übersicht der Versuchsreihe mit den Schweinen GI-VI mit Druckprofil A; links: Injektionsbereich H5; rechts: Injektionsbereich H10; der Maßstabsbalken in den einzelnen Bildern ist mit 1000µm beschriftet.....	30
Abbildung 20 untypische Kadaverprobe des Schweins JIII; bei H5: Durchschuss, Suspension im Randbereich neben der Urethra; bei H10: in sich verwundenes Gewebe post injectionem	31
Abbildung 21 präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein JII nach der Wasserstrahlinjektion mit klar erkennbaren blau gefärbten Blasen	32
Abbildung 22 Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein JIII nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung HE); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 68 mit deutlich erkennbarer verbreiteter Muskulatur und Partikelverteilung basal der Muskulatur (Maßstabsbalken = 1000µm); rechts: Detailaufnahme des Objektträgers 68 mit fluoreszierenden Partikeln innerhalb und außerhalb der basalen Muskelauffächerung nach dem Durchschuss (Maßstabsbalken = 500µm)	33
Abbildung 23 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H5 bei den Versuchstieren Schwein JI-IV/Druckprofil A.....	34
Abbildung 24 Vergleich der Eindringbreiten der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein JI-IV/Druckprofil A.....	35
Abbildung 25 Vergleich der Eindringtiefen der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein JI-IV/Druckprofil A.....	35
Abbildung 26 Vergleich der Partikelclusterhöhen zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein JI-IV/Druckprofil A.....	36
Abbildung 27 Vergleich der Partikelclusterbreiten zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein JI-IV/Druckprofil A.....	36

Abbildung 28 Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein JII nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H10 (ohne Färbung); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 52 mit sich blau darstellenden Nanopartikeln und ungefärbten Kadavergewebe (Maßstabsbalken = 1000 μ m); rechts oben: Detailaufnahme der blau gefärbten Nanopartikel; rechts unten: fluoreszierende Nanopartikel, die sich mit der blauen Färbung decken; (Maßstabsbalken bei den Detailaufnahmen = 500 μ m).....	37
Abbildung 29 Übersicht der Versuchsreihe mit den Schweinen JI-IV mit Druckprofil A; links: Injektionsbereich H5 (mit HE Färbung und ohne Färbung); rechts: Injektionsbereich H10 (mit HE-Färbung und ohne Färbung); der Maßstabsbalken in den einzelnen Bildern ist mit 1000 μ m beschriftet.....	38
Abbildung 30 links: Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein HII nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung Azan) mit deutlich erkennbarem intramuskulärem Durchschussskanal (Maßstabsbalken = 1000 μ m); Rechts: präparierte Harnblase mit längs eröffneter Urethra des Versuchstieres Schwein HII, deutlich erkennbare Blasenbildung nach der Wasserstrahlinjektion	39
Abbildung 31 Histologische Präparate der Urethra der Versuchstiere Schwein HI, HIV und HV nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung Azan); links: lumenwärtige Auffächerung mit basaler Kompression, mittig: starke Auffächerung und Verbeiterung der Muskelschicht, rechts: kombinierte basale Kompression mit Verbeiterung der Muskelschicht im Bereich der bräunlichen Nanopartikel; Maßstabsbalken = 1000 μ m.....	40
Abbildung 32 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H5 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B.....	41
Abbildung 33 Auftreten von Nanopartikeln in der Muskulatur der Urethra bei den Versuchstieren Schwein HI-VI bei H5/Druckprofil B.....	41
Abbildung 34 Histologische Präparate der Urethra der Versuchstiere Schwein HIV und HVI nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H10 (Färbung Azan); links und rechts: jeweils starke Auffächerung mit daraus resultierender muskulärer Verbreiterung (Maßstabsbalken = 1000 μ m).....	42
Abbildung 35 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H10 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B.....	43
Abbildung 36 Vergleich der Eindringtiefen der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B.....	43
Abbildung 37 Vergleich der Eindringbreiten der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B.....	44
Abbildung 38 Vergleich der Partikelclusterhöhen zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B.....	44
Abbildung 39 Vergleich der Partikelclusterbreiten zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B.....	45

Abbildung 40 Übersicht der Versuchsreihe mit den Schweinen HI-VI mit Druckprofil B (Färbung Azan); links: Injektionsbereich H5; rechts: Injektionsbereich H10; der Maßstabsbalken in den einzelnen Bildern ist mit 1000 μ m beschriftet	46
Abbildung 41 links: histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein KIII nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung HE) mit deutlich erkennbarem intramuskulärem Durchschussskanal (Maßstabsbalken = 1000 μ m); rechts: präparierte Harnblase mit längs eröffneter Urethra des Versuchstieres Schwein KIII mit Durchschuss im Bereich H5/ keine Blasenbildung; im Bereich H10 deutlich erkennbare Blasenbildung.....	47
Abbildung 42 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H5 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B.....	48
Abbildung 43 histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein KII nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H10 (Färbung HE); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 47 mit starker Auffächerung lumenwärts und basaler Kompression der Muskulatur; blau gefärbte Nanopartikel zwischen den aufgefächerten Muskelfasern und im Bereich der submukösen Bindegewebsblase (Maßstabsbalken = 1000 μ m); rechts: Detailaufnahme mit grün fluoreszierenden Nanopartikeln zwischen den aufgefächerten Muskelfasern (Maßstabsbalken = 500 μ m)	49
Abbildung 44 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H10 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B.....	50
Abbildung 45 Vergleich der Eindringtiefen der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B.....	51
Abbildung 46 Vergleich der Eindringbreiten der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B.....	51
Abbildung 47 Vergleich der Partikelclusterhöhen zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B.....	52
Abbildung 48 Vergleich der Partikelclusterbreiten zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B.....	52
Abbildung 49 Übersicht der Versuchsreihe mit den Schweinen KI-IV mit Druckprofil B; links: Injektionsbereich H5 (mit HE Färbung und ohne Färbung); rechts: Injektionsbereich H10 (mit HE-Färbung und ohne Färbung); Die Einzelbilder von Schwein KIV H5 OT56 und Schwein KIV H10 OT77 konnten nicht zu einer Übersichtsaufnahme zusammengefügt werden; der Maßstabsbalken in den einzelnen Bildern ist mit 1000 μ m beschriftet.....	54
Abbildung 50 Vergleich der histologischen Präparate der Urethra der Versuchstiere Schwein GII, HIV und HV nach der Wasserstrahlinjektion (Färbung Azan); links oben: Übersichtsaufnahme mit typischer leichter lumenwärtiger Auffächerung und basaler Kompression mit DP A; rechts oben: stark ausgeprägte Auffächerung mit DP B und starker basaler Kompression; links unten: typische Verbreiterung der Muskulatur durch starke Auffächerung mit DP B; rechts unten: zusätzliches Phänomen mit DP B,	

<i>kombinierte Verbreiterung der Muskulatur im Bereich der Partikel und basale Kompression im restlichen Bereich; (Maßstabsbalken = 1000µm);</i>	56
<i>Abbildung 51 Auftreten von Nanopartikeln in der Muskulatur der Urethra bei Druckprofil A und B in der Übersicht</i>	57
<i>Abbildung 52 Übersicht der maximalen Eindringtiefen der Nanopartikel in den Muskel der Urethra für die Druckprofile A und B</i>	57
<i>Abbildung 53 Übersicht der mittleren Eindringtiefen der Partikelsuspension in den submukösen Bereich für die Druckprofile A und B</i>	58
<i>Abbildung 54 Übersicht der mittleren Eindringbreiten der Partikelsuspension in den submukösen Bereich für die Druckprofile A und B</i>	58
<i>Abbildung 55 Übersicht der mittleren Breiten des Partikelclusters für die Druckprofile A und B</i>	59
<i>Abbildung 56 Übersicht der mittleren Höhen des Partikelclusters für die Druckprofile A und B</i>	60
<i>Abbildung 57 relative Verteilung der Zelldepots in den porcinen Sphinkter nach der Injektion mit einer 4 mm und einer 8 mm langen Nadel; Quelle: (Amend et al., 2017)</i>	62
<i>Abbildung 58 Verteilung des Binde- und Muskelgewebes in der Urethra des Schweins von proximal nach distal (von links nach rechts); Azan: blau Bindegewebe, rot Muskulatur; Desmin: braun gefärbte glatte Muskulatur; fast myosin: braun gefärbte quergestreifte Muskulatur nur im distalen Teil der Urethra; Quelle: (Amend et al., 2017)</i>	64
<i>Abbildung 59 3D-Rekonstruktion der weiblichen Schweineharnröhre; pink glatte Muskulatur; rot quergestreifte Muskulatur; A: laterale Ansicht mit grau gefärbter Vagina; B: ventrale Ansicht; C: dorsale Ansicht; D: verletzte Urethra mit zerstörtem externen Sphinkter von ventral; Quelle (Zini et al., 2006)</i>	65
<i>Abbildung 60 Polymerketten als „Torwächter“; links: Polymer deprotoniert und hydrophob, Poren verschlossen; rechts: Polymerketten protoniert und hydrophil, Poren geöffnet; rot: gespeichertes Medikament; Quelle:(Abbaszad Rafi et al., 2016)</i>	68

Abkürzungsverzeichnis

ADSC	adipose-derived stem cell
bmMSC	bone marrow-derived mesenchymal stem cell
cm	Zentimeter (Längeneinheit)
DP A	Druckprofil A
DP B	Druckprofil B
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
ISD	intrinsic sphincter deficiency
MCM-41	mobile composition of matter No.41
ml	Milliliter
mm	Millimeter (Längeneinheit)
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	mesenchymal stem cell
MSN	mesoporous silica nanoparticles
MUCP	maximal urethral closing pressu
n	Anzahl
PDGF	platelet-derived growth factor
sec	Sekunden
SUI/SI	stress urinary incontinence
µm	Mikrometer (Längeneinheit)

1 Einleitung

Eines der größten Gesundheitsprobleme der heutigen Gesellschaft ist mit über 200 Millionen Betroffenen weltweit die Harninkontinenz. Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung steigt die Prävalenz für Harninkontinenz in der westlichen Zivilisation stetig an und wird zunehmend zu einem sozialen und ökonomischen Problem. (Herrera-Imbroda et al., 2015)

Man unterscheidet hierbei verschiedene Formen der Inkontinenz. Die Dranginkontinenz, die Stress- bzw. Belastungsinkontinenz, die Überlaufinkontinenz aufgrund einer Harnretention und die extraurethrale Inkontinenz. (Braun and Pfisterer, 2008, Amend et al., 2013)

Zu einem beträchtlichen Anteil leiden die betroffenen Personen dabei an der stressbedingten Inkontinenz (stress urinary incontinence/ SUI). Sie definiert sich, laut der International Continence Society, als unwillkürlicher Austritt von Urin nach körperlicher Belastung, Niesen oder Husten. Bezieht man sich auf die Hauptursache der SUI bei Männern, so ist vorrangig eine iatrogene Schädigung durch Prostataoperationen wie zum Beispiel die radikale Prostatektomie oder eine transurethrale Prostatektomie zu erwähnen. Aber auch eine Strahlentherapie wird als Ursache beschrieben. (Herrera-Imbroda et al., 2015)

Vor allem die radikale Prostatektomie kann zu Schnittverletzungen oder zu einem kompletten Durchtrennen des urethralen Sphinktermuskels führen. Auch eine Kombination aus diesen beiden Verletzungen ist möglich. Außerdem können bei der Anwendung dieser invasiven Operationsmethoden indirekt neuromuskuläre Schäden entstehen. (Gerullis et al., 2011)

Bei Frauen steigt das Risiko an Beckenbodenstörungen, beziehungsweise SUI zu erkranken vorwiegend durch Schwangerschaften, vaginale Geburten und zunehmendes Alter. Dabei sind die genauen Mechanismen allerdings noch nicht ausgiebig erforscht. Man geht von einem multifaktoriellen Geschehen aus, das möglicherweise mechanische und neurovaskuläre Verletzungen miteinbezieht. Das Risiko erhöht sich bei Frauen vor allem nach vaginalen Erstgeburten über dem 30. Lebensjahr beziehungsweise nach vaginalen Geburten zwischen dem 35. und 40. Lebensjahr beträchtlich. (Memon and Handa, 2013, Altman et al., 2008)

Betrachtet man nun die ältere Bevölkerungsschicht, erkennt man eine mit dem Alter steigende Zahl an Inkontinenzpatienten, was die Altersharninkontinenz mehr und mehr zum Paradethema der Geriatrie macht. Bei einem Anteil der Erkrankten von bis zu 85%, abhängig von Alter und Ausmaß der Gebrechlichkeit, ist die Harninkontinenz neben der Demenz und Diabetes mellitus eines der Themen der Zukunft in der geriatrischen Urologie. (Wiedemann, 2016)

Die Dranginkontinenz, also ein ungewollter Urinverlust durch die verringerte Miktionskontrolle, kommt mit 60% Prozent Anteil als häufigste Ursache für eine Altersinkontinenz zum Tragen. Da sie oft in Kombination mit der stressbedingten Inkontinenz auftritt, spricht man in diesem Fall von einer Mischinkontinenz. Bestehen bei sehr gebrechlichen Patienten starke Einschränkungen der geistigen Leistungsfähigkeit und eine mangelnde Mobilität, so bezeichnet man dies als eine funktionelle Inkontinenz. (Braun and Pfisterer, 2008)

Als Ursachen für die Dranginkontinenz werden häufig Faktoren wie eine Detrusorüberaktivität, also unwillkürliche Detrusorkontraktionen oder eine verringerte Sensibilität für den Füllungszustand der Blase gehandelt. Jedoch zeigt sich, dass im Alter neben der Blasensensibilität auch die Detrusorkontraktibilität, der urethrale Druck und die urethrale Sphinkterfunktion sinken. Lediglich die Blasenkapazität bleibt gleich. (Pfisterer et al., 2006)

So reduziert sich einerseits, bedingt durch die verminderte Sensibilität, die Zeitspanne vom initialen Gefühl des Miktionsdranges bis hin zur bewussten Entleerung der Blase. Andererseits nimmt im Alter die Muskelmasse des quergestreiften Sphinkters und der maximale urethrale Verschlussdruck (maximal urethral closing pressure/ MUCP) der Harnröhre ab. Demzufolge ist bei Frauen vor allem am Blasen Hals und an der dorsalen Harnröhrenwand eine Atrophie des Rhabdosphinkters erkennbar. Diese damit verbundene reduzierte Sphinkterfunktion kann wiederum für die Dranginkontinenz im Alter verantwortlich sein. (Pfisterer et al., 2006, Perucchini et al., 2002)

Auch reversible Geschehnisse können zur Altersinkontinenz führen. Hierzu zählen Harnwegsinfektionen und Östrogenmangel bei Frauen, Depressionen, Pharmaka wie Muskelrelaxantien und Opioide, eine übermäßige

Flüssigkeitszufuhr, Obstipation, eine reduzierte Mobilität sowie geistige Verwirrtheit. (Braun and Pfisterer, 2008)

Aufgrund der Vielzahl der genannten Risikofaktoren geht man auch hier von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Weitere Ursachen wie Diabetes mellitus, frühere Beckenbodenoperationen und ein erhöhter Body Mass Index waren Ansätze der Forschung und werden ebenfalls als Ursachen diskutiert. Am Ende führen wahrscheinlich die einzelnen Aspekte in Summation zu den Problemen im Alter und der damit verbundenen Inkontinenz. (Chen, 2007)

Um die pathophysiologischen Mechanismen zu erforschen und kausale Therapieansätze zu entwickeln, müssen zuerst die anatomischen Strukturen verstanden und erklärt werden.

Damit ein ausreichender urethraler Verschluss und Kontinenz erreicht wird, muss ein Zusammenspiel zwischen dem externen quergestreiften Sphinktermuskel, dem internen glatten Sphinktermuskel in der Harnröhrenwand, der gut durchbluteten Schleimhaut, der Submukosa und bei Frauen der vaginalen Unterstützung stattfinden (Karam et al., 2005).

Der externe quergestreifte Sphinkter besteht beim weiblichen Geschlecht aus mehreren Teilen. Ein Teil umgibt im mittleren Drittel die Urethra, ein zweiter, der urethrovaginale Sphinkter, umschließt sowohl die Urethra als auch den vaginalen Vorhof. Ein Musculus compressor urethrae bildet einen Bogen quer über die ventrale Seite der Urethra. Diese einzelnen Teile des quergestreiften Sphinkters verbinden sich auf der ventralen Seite der Urethra und liegen in der Beckenhöhle, im Hiatus urogenitalis des Beckenbodendiaphragmas und im Perineum. (Oelrich, 1983)

Der männliche Sphinkterkomplex setzt sich ebenfalls aus einem internen Lissosphinkter aus glatter Muskulatur und einem externen quergestreiften Rhabdosphinkter zusammen. Dabei ist der externe Sphinkter hauptsächlich in der pars membranacea der Urethra zu finden und prägt sich in Richtung Blasenöffnung weniger deutlich aus. Der glatte Lissosphinkter befindet sich größtenteils an der Blasenöffnung und dünnt sich im weiteren Verlauf der Urethra in Richtung Perineum aus. (Koraitim, 2008)

Bemerkenswert ist, dass der externe Sphinkter eine Doppelaufgabe besitzt. Im Gegensatz zum internen Lissosphinkter, der für die Kontinenz im Ruhezustand zuständig ist, sorgt der Rhabdosphinkter für die Kontinenz in Stresssituationen und gewährleistet eine anterograde Samenpropulsion bei der Ejakulation des Mannes. (Koraitim, 2008)

Betrachtet man nun die Ätiologie der Stressinkontinenz genauer, so liegen dieser vor allem zwei Hauptursachen zugrunde. Durch eine vaginale Geburt kann es zu einer Enervation des Beckenbodens kommen, was von einer Hypermobilität der Urethra begleitet wird. Man spricht dann von einer Stressinkontinenz Typ 2 (SI 2). Besteht eine Schwäche des intrinsischen Sphinkters (ISD), so spricht man von der Typ 3 Stressinkontinenz. Bei den meisten Patienten sind bei dieser Form der SI ebenfalls myogene Schäden des quergestreiften Sphinkters zu beobachten. (Takahashi et al., 2000)

Dabei kommt es neben strukturellen Veränderungen in der Muskelzusammensetzung zu einem Verlust an Muskelzellen, einem Überschuss an kollagen-fibrösem Bindegewebe und zu einer Veränderung der mechanischen Belastung der Urethra (Aicher et al., 2014).

Hinsichtlich der gängigen Behandlungsmethoden werden nicht-invasive Methoden wie muskuläres Training, elektrische Stimulation und die Gabe von Medikamenten vorgeschlagen, um die neuronale Aktivierung des Sphinktermuskels zu verbessern. In der modernen urologischen Chirurgie können artifizielle Schlingen bzw. Bänder, Fäden oder Netze aus Polypropylen eingebracht werden, um die Urethra mechanisch zu unterstützen. Dabei ist auffällig, dass vor allem die Insertion von Schlingen erhebliche Langzeitnebenwirkungen mit sich bringt, weshalb man sich immer mehr davon distanziert. Eine weitere Behandlungsmöglichkeit stellt das Einbringen von artifiziellen Verschlussapparaten oder die Injektion von biokompatiblen Füllstoffen, sogenannte „bulking agents“ zur Unterspritzung der Urethra dar. (Aicher et al., 2014, Vaegler et al., 2014, Carlson, 2008, Chermansky and Winters, 2012)

Das Ziel dieser „bulking agents“ ist die Koaptation bzw. ein Verschluss der Urethra während der Füllungsphase der Blase und in Situationen, in denen ein

erhöhter intraabdominaler Druck herrscht. Dabei werden Materialien wie autologes Fettgewebe, Silikonperlen, Kollagen, Carbonpartikel, Polytetrafluoroethylenpasten, Calciumhydroxylapatit und Hyaluronsäuregel verwendet, die entweder periurethral oder, wie in den meisten Fällen, transurethral injiziert werden. Wichtig dabei ist, dass die Patienten in ihrer Blasenentleerung nicht eingeschränkt sind, aber trotzdem eine lange effiziente Wirkdauer ohne bzw. mit geringen Nebenwirkungen gewährleistet wird. (Kerr, 2005, Achtari et al., 2006, Mamut and Carlson, 2017)

Die genannten Operationen werden entweder offen, sprich transabdominal, vaginal, laparoskopisch oder, wie beim transurethralen Injektionsverfahren von „bulking agents“, endoskopisch durchgeführt (Vaegler et al., 2014).

Fasst man nun all diese Methoden ins Auge, so werden zwar Verbesserungen der Symptomatik bei den behandelten Patienten beobachtet, jedoch wird die Ursache der Krankheit, nämlich die Fehlfunktion des Sphinkterkomplexes, nicht behandelt (Aicher et al., 2014).

Damit aber neue kausale Therapien für die Stressinkontinenz entwickelt werden können, müssen zuerst die pathophysiologischen Vorgänge reproduziert werden.

Hierfür wurden diverse Studien durchgeführt, jedoch stellt der Mangel an angemessenen, repräsentativen Tierversuchen ein großes Problem dar. In früheren experimentellen Modellen wurde die intrinsische Sphinkterschwäche iatrogen durch chirurgisch verursachte Verletzungen simuliert. Diese wurde durch eine Überdehnung der Vagina, Elektrotomie, Kryoverletzungen, Transsektion des Ischiasnerves oder des Nervus pudendus, Injektion von Myotoxinen sowie durch eine Teilsphinkterektomie nachgeahmt. Versuchstiere waren dabei hauptsächlich Ratten, deren Größe aber zu beträchtlichen Problemen und Ungenauigkeiten führte. Im Zuge dessen wurden nachfolgende Studien an größeren Tieren wie Schweinen durchgeführt. Diese sind groß genug, um uroynamische Evidenzen, wie am Menschen, mittels transurethralen Kathetern oder Sonden zu ermitteln. (Burdzinska et al., 2012, Pan et al., 2007, Watanabe et al., 2011, Chermansky et al., 2004, Kim et al., 2007, Peng et al., 2006, Yiou et al., 2002, Eberli et al., 2009)

Außerdem haben Mensch und Schwein gemein, dass der externe urethrale Sphinkter zu einem hohen Prozentsatz aus langsamen roten Muskelfasern (ST-Typ) besteht, was zum Beispiel bei Nagern und Hunden nicht der Fall ist (Zini et al., 2006).

Eine vielversprechende, neuere Methode am Schwein, die eine Schwäche des intrinsischen Sphinkters realitätsnah imitiert, ist die Überdehnung der Urethra. Ein Ballonkatheter mit einem Volumen von 80ml wird hierbei in die Harnröhre eingeführt, mit 40ml Luft aufgeblasen und für fünf Minuten in der Urethra belassen. Es entsteht dadurch keine Ruptur des Muskels mit dem damit verbundenen Verlust der Muskelkontinuität, aber trotzdem ein lokaler Schaden. Somit kann diese Methode herangezogen werden, um neue Therapieansätze für die ISD respektive der Stressinkontinenz zu ermitteln. (Burdzinska et al., 2012) Spricht man von neuen Therapieansätzen, so führt kein Weg am sogenannten „Tissue engineering“ vorbei.

Die rekonstruktive Urologie verbesserte im letzten Jahrzehnt ihre chirurgischen Methoden einerseits durch spezialisiertes Equipment, andererseits wesentlich durch die Verwendung von autologem oder allogenen Gewebe. Vor allem das hochkontroverse Thema des „Tissue Engineerings“ mit Stammzellen zielt darauf ab, urologische Strukturen zu regenerieren und anschließend ihre volle physiologische Funktion wiederherzustellen. Dabei werden heute aus biologischen, aber auch aus ethischen bzw. moralischen Gründen keine omnipotenten embryonalen Stammzellen verwendet, sondern adulte Vorläufer- oder Stammzellen. Diese Zellen können aus verschiedensten Geweben wie dem Knochenmark, der quergestreiften Muskulatur, dem Fettgewebe oder dem Fruchtwasser entnommen werden. (Sievert et al., 2007, Jiang et al., 2002, Lee et al., 2000, Zuk et al., 2001, De Coppi et al., 2007)

Für die Behandlung einer Belastungsinkontinenz kommen aufgrund der zellulären Eigenschaften im Kern zwei Zelltypen in Frage. Einerseits muskelabgeleitete, myogene Vorläuferzellen (=Myoblasten) und Satellitenzellen (=Muskelstammzellen), andererseits mesenchymale Stromazellen. Beide Zelltypen sind für die Regeneration des Sphinkters geeignet. Sie wirken aber in unterschiedlicher Weise. So regenerieren Satellitenzellen, Myoblasten oder

andere myogene Vorläuferzellen die quergestreifte Muskulatur und tragen somit zur Regeneration des urethralen Sphinkterkomplexes und des externen Sphinkters der Harnblase bei. Mesenchymale Stromazellen hingegen können zu glatten Muskelzellen differenziert werden. (Vaegler et al., 2014, Furuta et al., 2007).

So können sie zumindest theoretisch zur Regeneration des Lissosphinkters beitragen. Ob dies in vivo möglich ist, bleibt nach wie vor offen. Exakte Studien dazu gibt es aktuell nicht.

Stromazellen setzen aber in situ Wachstumsfaktoren und Zytokine frei und aktivieren dadurch lokale Regenerations- und Wundheilungsprozesse (Hung et al., 2007).

Eine Studie bei der 222 Männern nach einer iatrogenen Verletzung, wie unter anderem einer radikalen Prostatektomie, autologe muskelabgeleitete Zellen transplantiert wurden zeigt, dass weitergehende Versuche mit Myoblasten gerechtfertigt sind (Gerullis et al., 2012).

Hierbei wurde den Versuchsteilnehmern Muskelgewebe aus dem Deltoidmuskel entnommen. Muskelzellen wurden im Labor kultiviert, immunzytochemisch markiert und in den urethralen Sphinkter injiziert. Ein Zehntel der Männer war nach durchschnittlich fünf Monaten kontinent und bei 42% Prozent konnte eine wesentliche Verbesserung der Inkontinenz beobachtet werden. Außerdem zeigten die immunzytochemisch markierten Zellen in 49% der Fälle α -Sarkomer-Aktin, was für eine Regeneration der quergestreiften Muskulatur spricht. Somit zeigt diese Studie, dass die Transplantation autologer Myoblasten eine moderate Verbesserung der Funktionalität des externen Rhabdosphinkters bewirkt. (Gerullis et al., 2012)

Laut einer weiteren Studie, in der 63 Patienten nach einer radikalen Prostatektomie, autologe Myoblasten und Fibroblasten ultraschallgesteuert in den Sphinkter injiziert wurden, konnten bei 89% der Patienten im Verlauf eines Jahres eine Verbesserung der SUI festgestellt werden (Mitterberger et al., 2008a).

Angesichts dieser Studien scheint die Therapie mit muskelabgeleiteten Vorläuferzellen durchaus eine interessante therapeutische Option darzustellen.

Jedoch ist die Regeneration vom Schweregrad der Inkontinenz abhängig und lässt aus heutiger Sicht zumindest auf eine graduelle Verbesserung der SUI durch eine Stammzelltherapie hoffen. (Vaegler et al., 2014)

Auch der Einsatz von mesenchymalen Stromazellen (MSC) gilt als vielversprechender Therapieansatz.

Die aus dem adulten Knochenmark stammenden Vorläuferzellen (bmMSCs/ bone marrow-derived stromal cells) gelten als multipotent und können als undifferenzierte Zellen repliziert werden. Anschließend können sie sich zumindest in vitro in mesenchymale Gewebe wie Knochen-, Knorpel-, oder Fettgewebe differenzieren. Aber auch die Differenzierung in Sehnengewebe, Nerven und Knochenmarksstroma wurden beschrieben. (Pittenger et al., 1999, Du et al., 2013)

Ein großer Vorteil der bmMSCs liegt darin, dass sie ein neuroregeneratives und neuroprotektives Potential besitzen, weshalb sie auch bei neurologisch bedingten Inkontinenzfällen eingesetzt werden könnten (Vaegler et al., 2014).

Trotz des breiten Differenzierungspotentials der bmMSCs versucht man aber eher Stammzellen aus anderen Geweben zu gewinnen. Grund dafür ist das hohe Potential der bmMSCs in vitro und in vivo spontan zu Osteoblasten zu differenzieren, was in der Folge im Sphinkterkomplex der Urethra kontraproduktiv wäre. (Breitbach et al., 2007, Vaegler et al., 2014)

Folglich wurde nach anderen Zellquellen wie der Plazenta oder dem autologen Fettgewebe gesucht. Die MSCs der Plazenta neigen sehr wenig bzw. nicht zur Spontandifferenzierung in Osteoblasten, was wiederum im Sphinkter der Urethra von Vorteil ist (Pilz et al., 2011).

Da autologe Plazenta für die meisten Patienten nicht zur Verfügung steht, gilt das extramedulläre Fettgewebe als geeignete Quelle für eine zellbasierte Therapie des urethralen Sphinkters. Es ist zum einen leicht zugänglich, zum anderen können in der Folge größere Mengen an fettgewebsabgeleiteten Stammzellen (ADSCs/ adipose-derived stromal cells), beispielsweise aus dem humanen Bauchfett durch Liposuktion, gewonnen werden. (Vaegler et al., 2014, Zannettino et al., 2008, Furuta et al., 2007, Zuk et al., 2001)

Verglichen mit der Applikation von Muskelprogenitorzellen, wie Satellitenzellen und Myoblasten eröffnen sich bei Verwendung von ADSCs und bmMSCs zahlreiche Vorteile. Schon bei der Stammzellgewinnung dominieren ADSCs und bmMSCs, da diese ohne größere Nebenwirkungen in ausreichender Menge sowie Qualität zu gewinnen sind. Im Gegensatz dazu muss für eine Therapie beispielsweise mit Satellitenzellen eine sehr große Menge an Zellmaterial gewonnen werden, was wiederum an der Donorstelle, also an der gesunden Muskulatur zu einem größeren Schaden führt. (Aicher et al., 2014, Lin et al., 2010)

Ein weiterer Faktor, der für eine Zelltherapie mit mesenchymalen Stromazellen spricht, ist die kurze Expansionszeit bei der in vitro Kultivierung. Stromazellen aus der humanen Plazenta sind für Frauen nach Geburten eine interessante Option, da die Stressinkontinenz, wie oben erwähnt, oft Folge einer vaginalen (Zangen-)Geburt ist. So könnten Plazentastromazellen aus dem Bereich des Endometriums gewonnen und bei Bedarf gegen eine SUI injiziert werden. (Aicher et al., 2014, Persson et al., 2000)

Da nicht nur die Art der Zellen von entscheidender Bedeutung ist, sondern auch deren präzise Injektion und deren Überlebensrate, wurden diverse Untersuchungen durchgeführt.

In einer Studie, in der muskelabgeleitete Zellen mittels Urethrozytoskop in den Sphinkter injiziert wurden, zeigte sich, dass die injizierten Zellen sowohl in der Muskelschicht als auch in der Submukosa und der äußeren Schicht der Urethrawand zu finden waren. Auffällig dabei war, dass die Zellen im submukösen Bereich keine organisierte Struktur aufwiesen, mononuklear blieben und willkürlich verteilt waren. Im Gegensatz dazu verteilten sich Zellen, die in der Muskelschicht zu finden waren, entlang der Muskelfasern, exprimierten Desmin und waren mit Muskelfasern, die Acetylcholinrezeptoren besaßen, verflochten. Somit lässt sich ableiten, dass Zellen, die in die Submukosa injiziert wurden, zwar überleben, aber sich nicht zu Muskelzellen differenzieren können. (Burdzinska et al., 2013)

Ferner wurde nachgewiesen, dass Muskelprogenitorzellen nur dann überleben und nachweisbar sind, wenn sie direkt in den Rhabdosphinkter injiziert wurden.

Zellen, die nur in den glatten Muskel deponiert wurden, konnten nicht nachgewiesen werden und überlebten daher nicht. (Peyromaure et al., 2004)

Diese Studien unterstützen die Wichtigkeit einer hochpräzisen Injektionstechnik, mit welcher Stammzellen kontrolliert in den gewünschten Bereich der Harnröhrenwand injiziert werden können.

So hat sich gezeigt, dass die sich seit über 20 Jahren schnell entwickelnde Ultraschalldiagnostik sehr hilfreich ist. So können Injektionslösungen mittels endoluminaler Ultraschallkontrolle um einiges präziser an den gewünschten Ort injiziert werden als unter endoskopischer Kontrolle. (Mitterberger et al., 2008b)

Allerdings ist die Injektion mithilfe von Nadeln mit einigen Nachteilen verbunden. Da der humane Sphinktermuskel nur wenige Millimeter in seiner Stärke misst, kann es durch die Nadelinjektion zu Gewebsschäden kommen, die Blutungen nach sich ziehen könnten (Wallner et al., 2009, Aicher et al., 2014).

Ferner könnte die Nadel zu tief inseriert werden und Zellen in den peritonealen Bereich deponieren. Um diese Risiken einer Nadelinjektion auf ein Minimum zu reduzieren, könnte in Zukunft vor der Injektion eine individuelle dreidimensionale Karte der anatomischen Situation des Patienten mittels MRT und Ultraschall erstellt werden. Somit könnten bei der Injektion simultan das endoskopisch erstellte Bild mit der MRT-Karte überlappt und somit eine hochpräzise Injektion ermöglicht werden. Ein weiterer neuer Ansatz sind druckimpulsgesteuerte Applikationsmethoden, bei denen mittels einer endoskopisch eingebrachten Düse, Zellen in den Sphinkter „geschossen“ werden. (Aicher et al., 2014)

Genau diese Methode wurde in einer neuen Studie (AG Aicher, nicht publizierte Doktorarbeit Johanna Schreiber) erstmals an porcinem Kadavergewebe unter anwendungsnahen Bedingungen systematisch entwickelt. Hierbei wurden fluoreszierende Mikropartikel in die längs eröffnete Urethra von Schlachtsauen mittels Wasserstahl injiziert. Dabei wurde untersucht, bei welchem Druck die Mikropartikel die Muskulatur der Urethra erreichen und wie sie sich verteilen.

Die Größe (20µm Durchmesser) und Dichte ($\rho=1.05\text{g/ml}$) der verwendeten Partikel entsprach dabei in etwa der, der für die präklinischen Injektionsversuche vorhergesehen Zellen, den ADSCs und Myoblasten.

In meiner Dissertation wurde diese Versuchsreihe erweitert, indem zur Injektion fluoreszierende Nanopartikeln verwendet wurden. Auch hier wurde porcines Kadavergewebe von jungfräulichen deutschen Landrasseschweinen verwendet. Nach der ebenfalls orthogonalen Injektion mit verschiedenen Drücken und Volumina, wurde anschließend das Verteilungsmuster der Partikel in der Tiefe und Breite in Kryoschnitten des Gewebes untersucht und die Eindringtiefe beziehungsweise die Eindringbreite der injizierten Suspension ermittelt. Die Werte werden an jeweils zwei Injektionsbereichen ermittelt und danach miteinander verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- **Gefrierschrank:** VIP Series -86°, Sanyo Denki K.K.
- **Kamera:** AxioCam HRc, Carl Zeiss Microscopy GmbH
- **Kryostat:** Leica CM1860 UV, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
- **Mikroskop:** Axiovert 200M, Carl Zeiss Microscopy GmbH
- **Erbe Jet** incl. Wasserstrahlsystem Entwicklungsmuster Konzept 1
- **Höhenmessgerät:** Mitutoyo
- **Herdplatte:** IKAMAG RTC Bachhofer Reutlingen
- **Gefriertruhe:**
 - SANYO Ultra Low Temperature Freezer MDF-U53V, SANXO Electric Co.
- **Kühlschrank:** Liebherr
- **Chirurgische Schere:** F:S:T:
- **Anatomische Pinzette:** Martin

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- **Einbettmedium:** Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems GmbH
- **Eindeckmedium:** VectaMount Permanent Mounting Medium, Vector Laboratories

- **Deckgläser:** Deckgläser 24x50 mm (Glasdicke 0,08-0,12), R. Langenbrinck
- **Entsorgungsbeutel:** Entsorgungsbeutel PP, Brand
- **Handschuhe:** Purple Nitrile Powder Free Exam Gloves L, Halyard Health Inc.
- **Objektträger:** SuperFrost Plus, R. Langenbrinck
- **Einmalkatheter:** Biçakcilar, Nelaton Katheter, Female, 14 Charrière
- **Gefriermittel:** Stickstoff flüssig
- **Transportgefäß für den flüssigen Stickstoff:** KGW Isotherm
- **Klarsichtfolie:** DOW Saran
- **Alufolie:** Carl Roth
- **Bechergläser:** Vitlab

2.1.3 Reagenzien

- **0,1 % Kernechtrot:** FärbeKit Morphisto
- **5 % Phosphorwolframsäure:** FärbeKit Morphisto
- **Gebrauchslösung Anilinblau-Orange-G:** FärbeKit Morphisto
- **Ampuwa Spüllösung:** Fresenius Kabi
- **PBS:** bioMérieux sa IVD
- **Hämatoxylin QS:** Vector Laboratories, Inc. Burlingame H-3403
- **Certistain Eosin G (gelblich):** Merck, 1.15935.0025
- **Tinte:** TMD, Tissue Marking Dye, Cat # TMD –BL, Triangle Biomedical Sciences Inc.
- **Nanopartikel:** PS-FluoGrün-Partikel (0,450 μm / SD = 0.01 μm), abs/em= 502/518 nm, 2,5 % w/v wässrige Lösung, Lot: PS-FluoGrün-Fi166

2.1.4 Software

- **AxioVS 40 V 4.8.2.0:** © 2006-2010 Carl Zeiss Microimaging GmbH
- **Image Composite Editor:** Version 2.0.3.0 (64bit) © 2015 Microsoft Corporation
- **Inpaint:** Version 6.2 Herausgeber Teorex

2.2 Methoden

2.3 Sprühapplikation

Bei der Sprühapplikation wurde bei jedem Versuchstag stets der gleiche Versuchsaufbau sichergestellt, wobei lediglich die Effektstärken variierten. Unter dem Begriff „Effekt“ verstehen die Ingenieure den Druck, abzüglich der minimalen Kompression des Wassers, den die Pumpen im offenen System des Wasserstrahlinjektors mit den in meinem Ansatz verwendeten Injektionslanzen und Schläuchen erzeugen (ERBE Jet 2). Bei den Wasserstrahlinjektionen der vorliegenden Studie wurden zwei Druckprofile angewendet.

2.3.1 Präparation des Gewebes

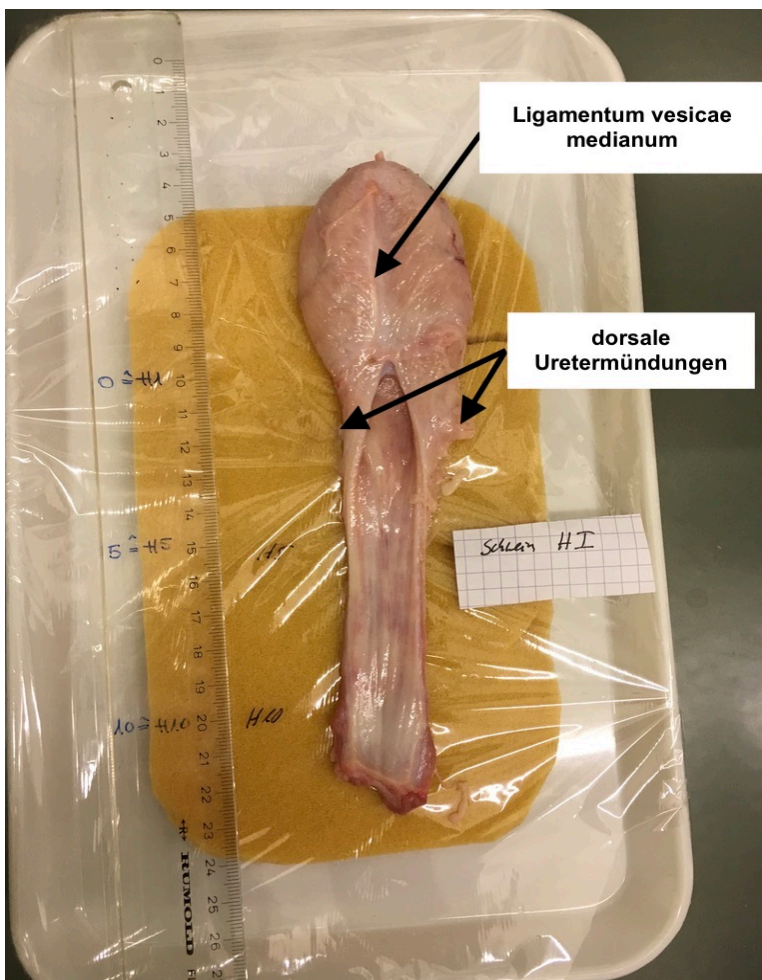


Abbildung 1 präparierte Hamblase vor der Wasserstrahlinjektion am Beispiel von Schwein HI

Das Versuchsgewebe stammte stets von jungen weiblichen Schweinen, die am Versuchstag geschlachtet wurden. Die Anzahl der Versuchstiere pro Druckprofil betrug stets $n = 6$. Die mittlere Länge der Harnröhren betrug 100 mm (Abb. 1). Nach Anlieferung des Gewebes wurden Fett- und Bindegewebe entfernt und die Harnblase samt Harnröhre von den Ureteren und der Vagina getrennt. Dabei war darauf zu achten, dass die Urethra möglichst weit distal am Übergang zur Vagina abgetrennt wurde, da sowohl der Uterus als auch die Urethra mit dem Musculus sphinkter urethrae externum in die Vagina münden. Im Anschluss wurde die Urethra von ventral, längsseits mit einer chirurgischen Schere aufgeschnitten. Um dabei die dorsale Harnröhrenwand zu schonen, wurde vor dem Auftrennen ein Katheter in die Urethra eingeführt. Zur Orientierung wurden die beiden dorsal in Harnblase mündenden Ureteren und das ventral liegende Ligamentum medianum vesicae herangezogen (Abb. 1).

Die für den Versuchsaufbau präparierte Harnröhre wurde auf einem Schaumstoffpolster gelagert, um die natürliche Weichgewebsumgebung der Harnröhre im lebenden Schwein zu imitieren.

2.3.2 Versuchsaufbau

Das präparierte Gewebe wurde bis zur Injektion auf Eis oder in einem Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, um die natürliche Autolyse zu verzögern und eine Schädigung durch den sauren Harn zu unterbinden. Dadurch sollte einer der in vivo Situation ähnlicher Zustand des Gewebes beibehalten werden.

Wie in den Abbildungen 2 - 4 zu sehen ist, besteht der Versuchsaufbau aus dem Erbe Jet©, einem Wasserstrahlinjektionsgerät und einem darauf liegenden Steuergerät.

In das Wasserstrahlinjektionsgerät Erbe Jet© wurde eine bestimmte Effektstärke, also der Druck in einem offenen System, abzüglich der minimalen Kompression des Wassers eingegeben. Im Steuergerät wurde eine Injektionsrate für ein Gesamtvolumen der Injektionsflüssigkeit von 2 ml programmiert, wobei nach der Injektion ein Restvolumen von 1 ml im Gerät verblieb. Über einen Schlauch wurde das Wasserstrahlinjektionsgerät mit einer Düse verbunden, die zur Applikation der Partikelsuspension ins Gewebe dient. Dabei war, wie aus Abbildung 2 und 4

zu entnehmen ist, eine Füllkammer zwischengeschaltet, in die 2 ml Partikelsuspension mittels Pipette eingefüllt wurden. Die im Sprühversuch applizierte Suspension wurde mit einer Verdünnung von 1:10 angesetzt. Dabei wurden 21,6 ml PBS mit 2,4 ml reiner Partikelsuspension vermengt. Das Schlauchsystem wurde dabei vom Erbe Jet© mit Wasser gefüllt. Die Düse war an einem Höhenmessgerät befestigt, das auf eine Höhe von 2mm, bei auf dem Gewebe aufsitzender Düse, eingestellt wurde (Abb. 2 und 3).

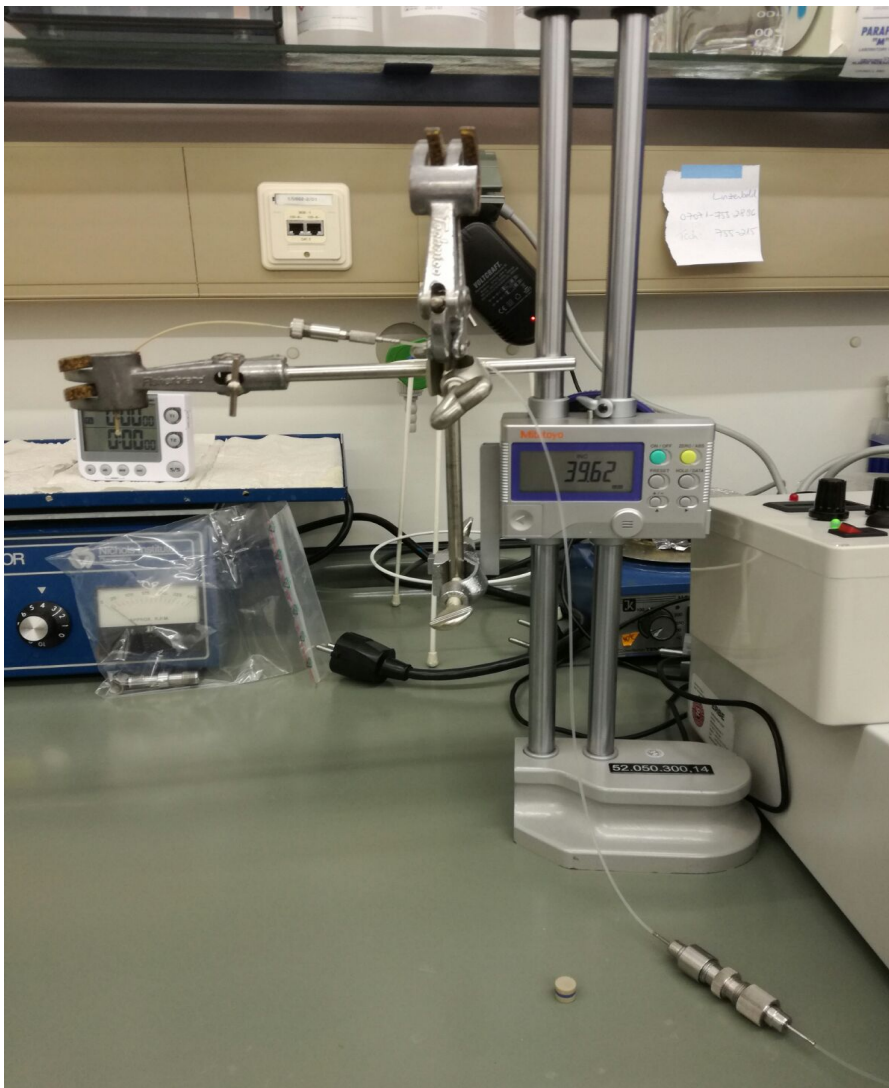


Abbildung 2 Höhenmessgerät mit befestigter Düse; auf dem Boden liegend: zwischengeschaltete Füllkammer

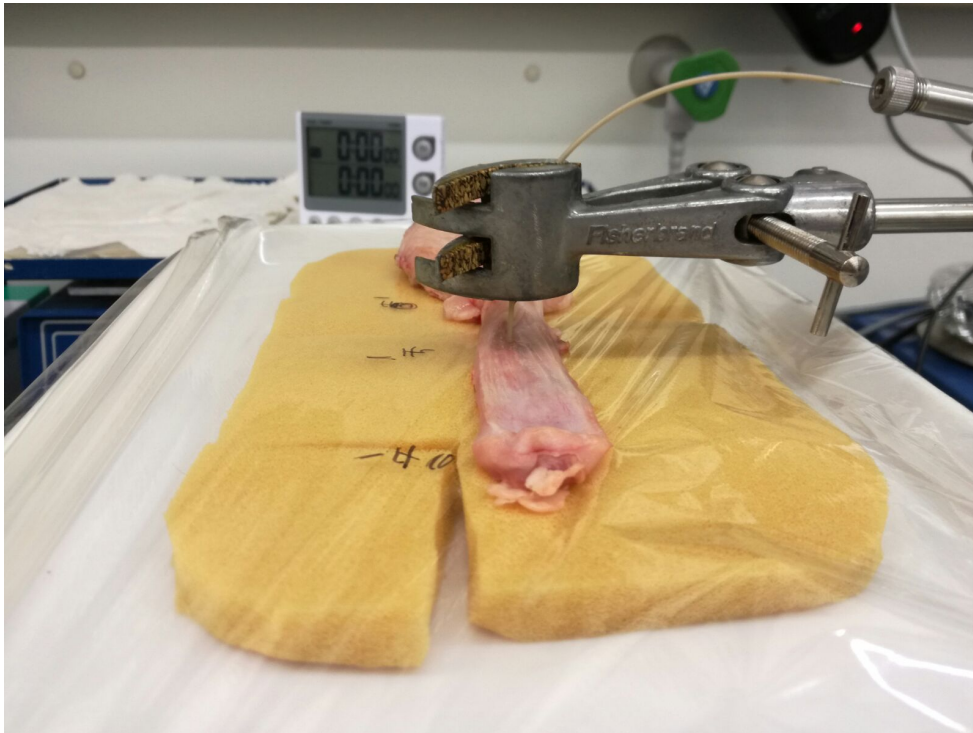


Abbildung 3 Düse auf dem Gewebe aufgesetzt und bei Höhe 5 cm positioniert

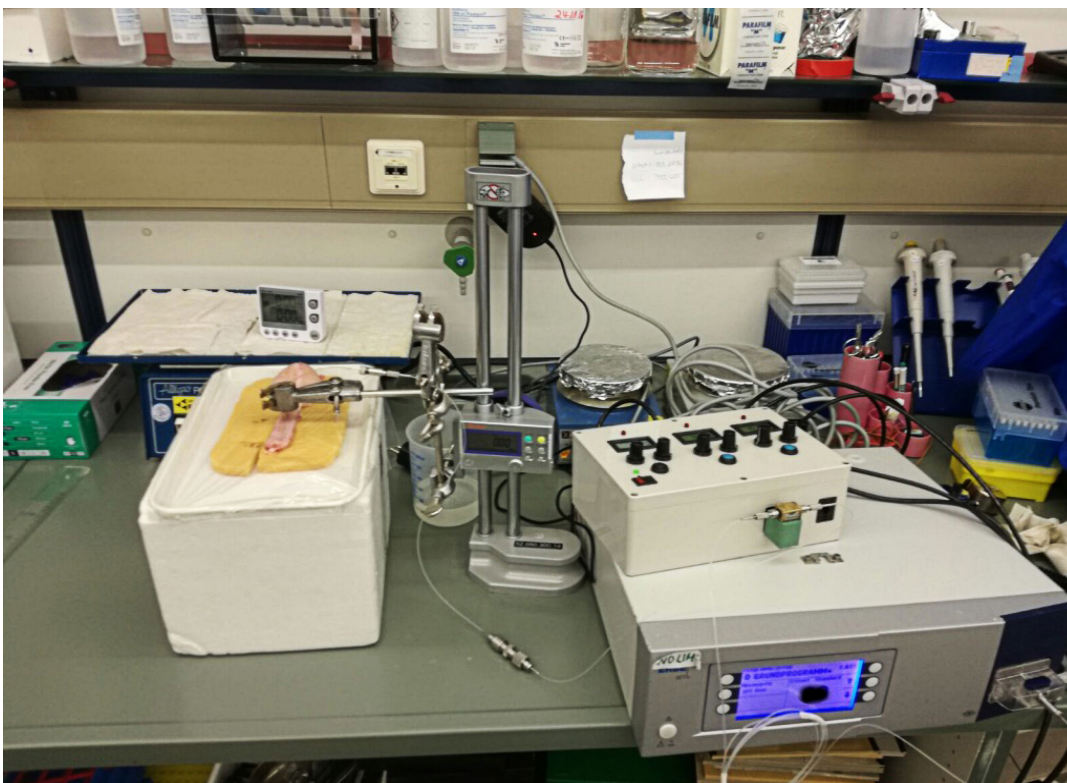


Abbildung 4 Fertiger Versuchsaufbau: Rechts zu sehen der Erbe Jet® mit voreingestelltem Injektionsdruck; darüber das Steuergerät für die Injektionsrate; mittig zu sehen das Höhenmessgerät an seiner Halterung befestigt und die Füllkammer auf dem Tisch liegend; links: das präparierte Gewebe mit Schaumstoff unterpolstert und aufgesetzter Düse

2.3.3 Applikation und Weiterverarbeitung

Mit Auslösen der Wasserstrahlinjektion konnte man auf der Harnröhrenoberfläche, sprich der Schleimhaut, zwei Phänomene beobachten. In der Regel kam es zur sofortigen Blasenbildung (Abb. 5). Das bedeutet, dass sich zeitgleich mit der Injektion gelbliche Blasen auf der Schleimhaut bildeten, in denen sich die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markierten Nanopartikel suspendiert in der Injektionsflüssigkeit angesammelt hatten.

Ebenfalls, jedoch seltener, kam es dazu, dass sich die injizierte Flüssigkeit sowohl auf der Schleimhaut, als auch auf der Trägerfolie des Gewebes unterhalb der Urethra verteilte. Eine Blasenbildung blieb hierbei aber aus.

In beiden Fällen wurden die Injektionsbereiche möglichst schnell mit einer chirurgischen Schere ausgeschnitten und in ein Kunststoffschälchen zusammen mit einem Gefriermedium positioniert (Abb. 6). Dabei war darauf zu achten, dass die ausgeschnittene Urethra anatomisch korrekt, sprich mit aneinander adaptierten Längsschnitträndern, eingelegt wurde. Anschließend wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, in Alufolie eingewickelt, nummeriert und in einer Tiefkühltruhe bei -80°C zwischengelagert.

Alle Arbeitsschritte wurden stets möglichst rasch durchgeführt, um die Gewebe- und Partikelsituation direkt nach der Injektion zu bewahren. Trotzdem kam es dazu, dass sich die Blasen innerhalb kürzester Zeit leicht zurückbildeten. Dies ist damit zu erklären, dass einerseits die injizierte Flüssigkeit ins umliegende Gewebe abdiffundiert, andererseits fließt die Lösung durch die plötzlich auftretende Gewebsspannung aus dem Einschussloch wieder heraus.



Abbildung 5 präparierte Hamblase des Schweins HIII unmittelbar nach dem Sprühversuch mit gebildeten Blasen bei H5 und H10



Abbildung 6 präparierte Hamblase des Schweins HIII nach dem Herausschneiden der Injektionsbereiche H5 und H10 inklusive Blasen

2.3.4 Schneiden der Gefrierblöcke

Die Schnittdicke für Kryoschnitte wurde auf 30 µm festgelegt, damit Mikropartikel (Ø 20 µm), mit welchen parallel zu dieser Arbeit ähnliche Tests durchgeführt wurden, durch zu dünne Schnitte nicht im Gewebe verschoben werden. Die tiefgefrorenen Gewebsblöcke wurden mittels einem Gefriermedium im Kryotom befestigt, geschnitten und anschließend auf einen Objektträger übertragen. Nach einer Trocknungszeit von 30 Minuten bei 40°C auf einer Heizplatte, wurden die Schnitte gefärbt und eingedeckelt.

2.3.5 Färbungen

Um die Verteilung und die Eindringtiefe der fluoreszierenden Nanopartikel im Gewebe darzustellen, wurden die Schnitte mit zwei verschiedenen Färbungen gefärbt. Bei den Sprühversuchen an den Versuchstieren Schwein GI-VI und Schwein HI-VI wurden die Schnitte mit Azan gefärbt. Bei Sprühversuchen an Versuchstieren JI-IV und KI-IV mit beigemischter Histofarbe in der Partikelsuspension, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Zusätzlich wurde hierbei jeweils ein Objektträger ohne jegliche Färbung eingedeckelt, um die Verteilung der in der Injektionsflüssigkeit gelösten Histofarbe mit der Verteilung der Nanopartikel vergleichen zu können. Die verschiedenen Färbungen wurden entsprechend den nachfolgenden Protokollen durchgeführt.

2.3.5.1 Azanfärbung

- 30 min trocknen bei 40°Celsius auf der Heizplatte, um die Kryoschnitte an dem Objektträger zu befestigen
- 5 min Inkubation in 0,1% Kernecht Rot
- 1 min Waschen in Leitungswasser
- 5 min Inkubation in 5% Phosphor Wolfram Säure
- 1 min Waschen in Leitungswasser
- 8 sec Inkubation in Anilinblau Orange G
- 1 min Waschen in Leitungswasser
- Schnitte bei Raumtemperatur unter dem Abzug trocken

- Präparate in Vectamount eindeckeln

2.3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die HE-Färbung musste 0,1% Eosin hergestellt werden.

Dafür wurden 0,1 g Certistain Eosin G in 100 ml 99% Alkohol gelöst und ein Tropfen Eisessig dazugegeben.

- Kryoschnitte 30 min auf der Heizplatte bei 40°C trocknen
- Hämatoxylin auf den Schnitt auftropfen und 45 Sekunden färben
- Objektträger 10 min unter fließendem Leitungswasser in einer Kuvette waschen
- Objektträger 5 sec in destilliertes Wasser eintauchen
- Objektträger in eine Kuvette mit 0,1 % Eosin stellen und 5 min färben
- Objektträger 5 sec in destilliertes Wasser eintauchen
- Schnitte bei Raumtemperatur unter dem Abzug trocknen
- Präparate in Vectamount eindeckeln

3 Ergebnisse

3.1 Injektion mit Druckprofil A

Bei den Versuchen mit orthogonaler Düsenausrichtung und Druckprofil A, sowie in den nachfolgenden Versuchen mit Druckprofil B, wurden die Kadaverproben makroskopisch und die Kryoschnitte mikroskopisch im histologischen Präparat beurteilt. Dabei wurde die Blasenbildung direkt nach der Wasserstrahlinjektion makroskopisch geprüft und mikroskopisch die Eindringtiefe und die Breite der Partikelsuspension berücksichtigt. Weiterhin wurden die Größe des Partikelclusters, die muskuläre Veränderung und die Eindringtiefe in die glatte Muskulatur der Urethra erfasst. Dabei gab es hauptsächlich Variationen in Abhängigkeit von den Injektionshöhen H5 und H10. Hierbei bezeichnet H5 den Bereich der Urethra, der ungefähr 5 cm distal vom Blasen Hals entfernt ist, H10 analog den Bereich 10 cm distal.

3.1.1 Versuchsreihe mit Druckprofil A an der präparierten Harnröhre der Versuchstiere Schwein GI-VI

3.1.1.1 Injektionsbereich H5

3.1.1.1.1 Makroskopische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere GI-GVI

Bei jeder Kadaverprobe (n = 6) konnte stets im Injektionsbereich 5 cm kaudal der Harnblasenmündung (H5) simultan mit der Injektion eine Blasenbildung beobachtet werden. Ein Durchschuss blieb dabei aus.



Schwein GIV

Schwein GIV

Abbildung 7 präparierte Hamblase mit längs eröffneter Urethra des Versuchstieres Schwein GIV; links: vor der Wasserstrahlinjektion, rechts: nach der Wasserstrahlinjektion mit typischer Blasenbildung

Gleiches gilt für den Bereich H10 sowie für alle der folgenden Versuchstiere in der Versuchsreihe mit Druckprofil A. Im Zuge dessen entfällt die makroskopische Beurteilung bei allen weiteren Versuchen mit Druckprofil A (Abb. 7).

3.1.1.1.2 Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere GI-GVI bei H5

Bei Injektionen von Nanopartikeln in den Bereich H5 hat sich die Muskulatur typischerweise in Richtung Lumen aufgefächert dargestellt (Abb. 11).

Lediglich auf einem Objektträger konnte keine Veränderung der glatten Muskulatur der Urethra festgestellt werden. Im Zuge dessen hat sich die Muskulatur am Fundus der entstandenen submukösen Bindegewebsblase entweder leicht ausgedünnt oder bei stärkerer Auffächerung sogar verbreitert. Letzteres ist mit einer erhöhten Traumatisierung der Muskulatur zu bewerten, da die Auffächerung bis tief in die basale Muskelschicht reicht. Außerdem wurde die Muskulatur durch die Gewebsspannung entweder im Falle einer stärkeren Auffächerung nur basal oder bei geringerer Auffächerung über einen größeren Querschnitt hinweg komprimiert.

Die Größe dieser submukösen Blase, also die Eindringtiefe und Breite der Partikelsuspension wurde vermessen und ergab eine mittlere Eindringtiefe von 6,3 mm und eine mittlere Eindringbreite von 10,64 mm. Das Partikelcluster hingegen stellte sich im Durchschnitt mit einer Höhe von 4,1 mm und einer Breite von 2,6 mm dar.

Im Falle einer muskulären Beteiligung wurde für die Eindringtiefe in die glatte Muskulatur der Urethra ein Mittelwert von 0,94 mm gemessen (Abb. 8).

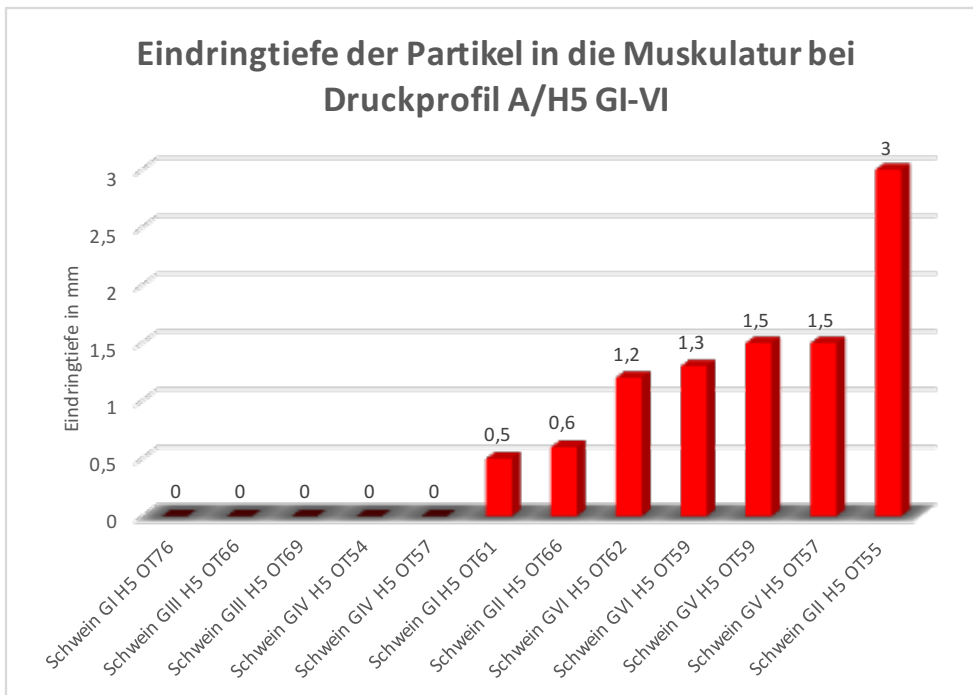


Abbildung 8 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H5 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/ Druckprofil A

Weiterhin waren bei der gewählten Anzahl von (n = 6) Versuchstieren nicht in allen Fällen Polystyrolpartikel im Muskel zu finden (Abb. 9).

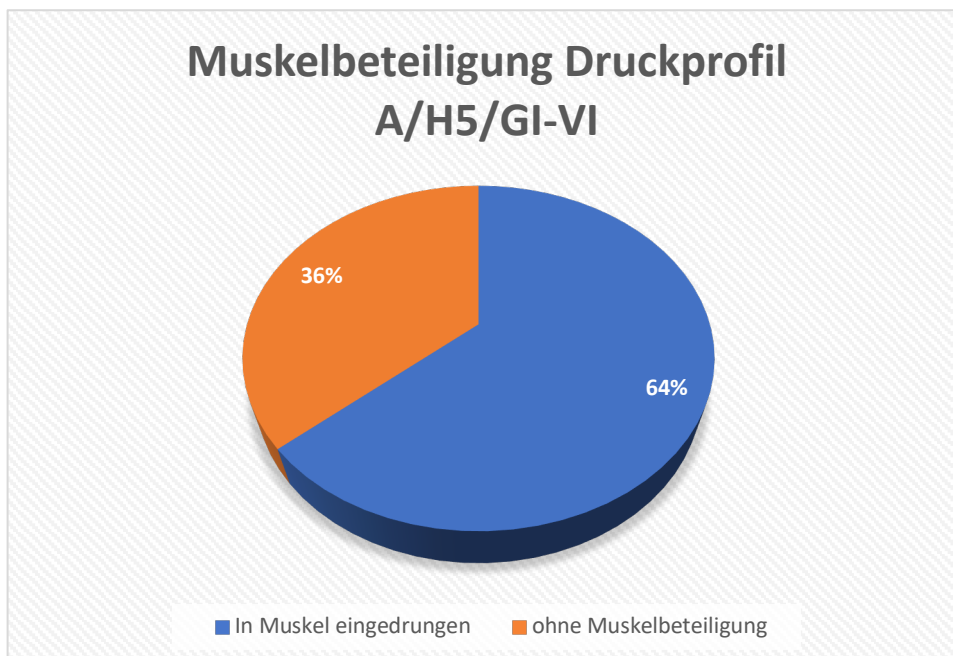
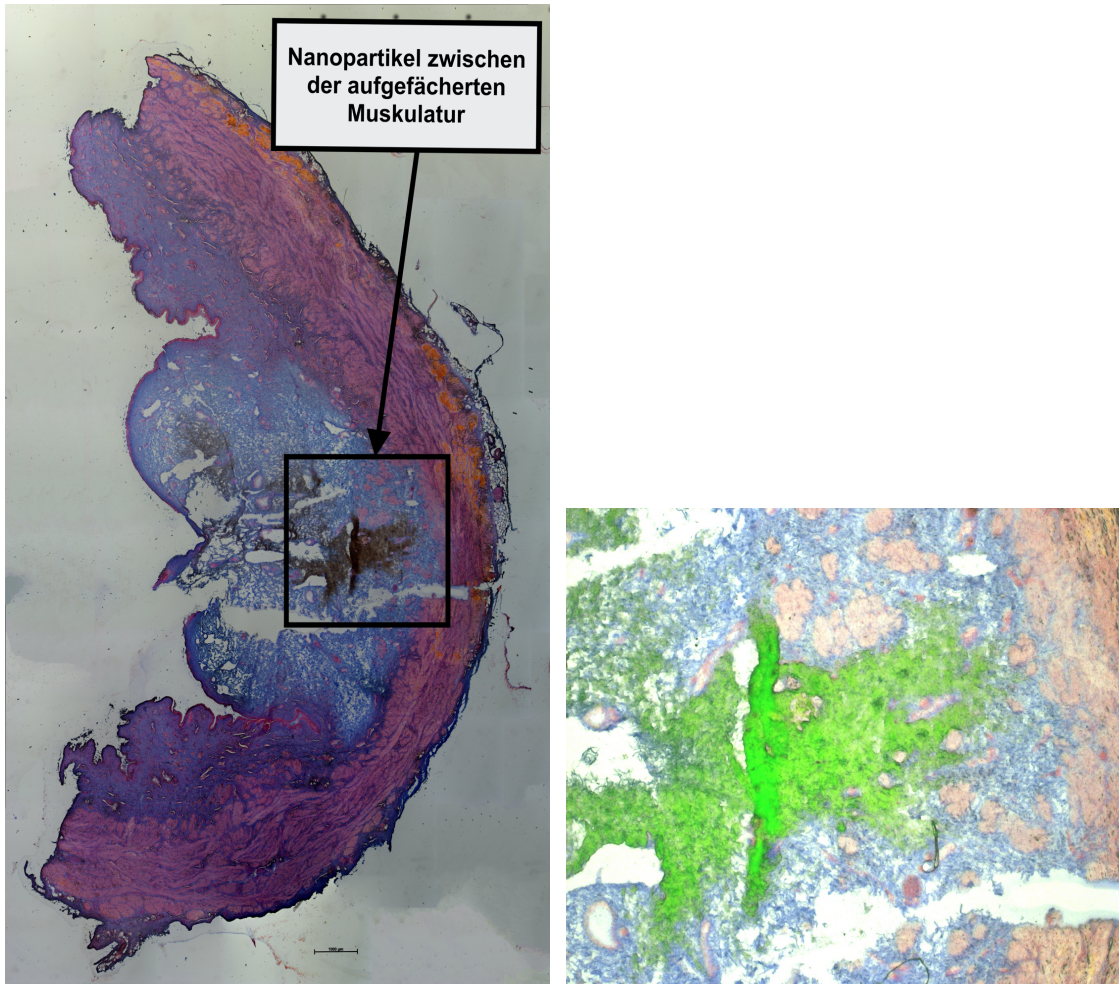


Abbildung 9 Auftreten von Nanopartikeln in der Muskulatur der Urethra bei den Versuchstieren Schwein GI-VI bei H5/ Druckprofil A

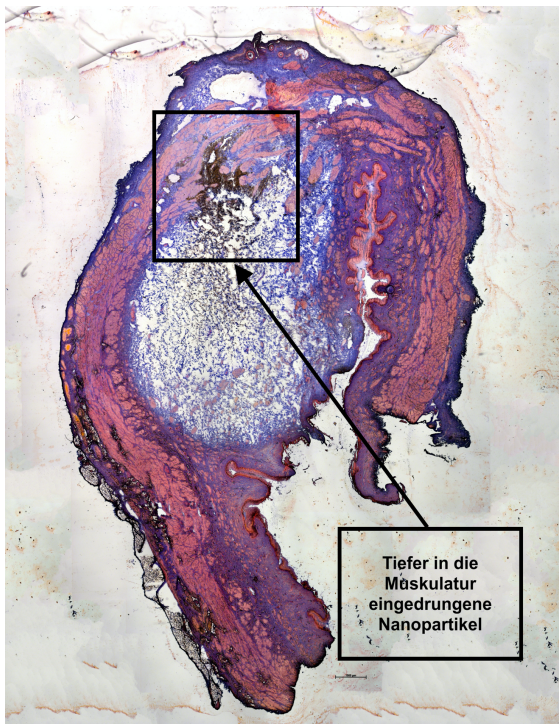
Dabei waren typischerweise Nanopartikel zwischen den apikal aufgefächerten Muskelsträngen (Abb. 10), aber auch in tieferen Regionen der Muskulatur zu finden (Abb. 11).



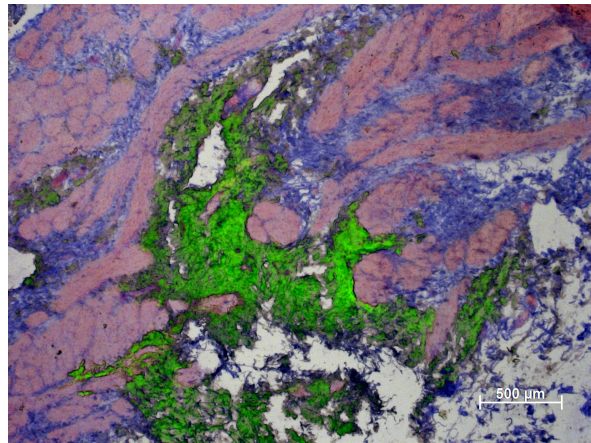
Versuchstier GIV H5 OT57 Übersicht

Versuchstier GIV H5 OT57 Detailaufnahme

Abbildung 10 Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein GIV nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung Azan); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 57 mit sich braun darstellenden Nanopartikeln und typischer Lokalisierung zwischen den aufgefächerten Muskelfasern (Maßstabsbalken = 1000 μ m); rechts: Detailaufnahme des Objektträgers 57 mit grün fluoreszierenden Nanopartikeln (Maßstabsbalken = 500 μ m)



Schwein GV H5 OT 59 Übersicht



Schwein GV H5 OT 59 Detail

Abbildung 11 Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein GV nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung Azan); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 59 mit sich braun darstellenden Nanopartikeln und typischer Lokalisierung zwischen den aufgefächerten Muskelfasern und tieferer muskulärer Infiltration (Maßstabsbalken = 1000µm); rechts: Detailaufnahme des Objektträgers 59 mit grün fluoreszierenden Nanopartikeln (Maßstabsbalken = 500µm)

3.1.1.2 Injektionsbereich H10

3.1.1.2.1 Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere GI-GVI bei H10 und Vergleich mit H5

Auch bei Injektionen von Nanopartikeln in die Zone H10 hat sich die Muskulatur der Urethra stets lumenwärts aufgefächert und ausgedünnt. Ebenfalls konnte auf einem Objektträger keine Veränderung festgestellt werden. Hier haben folglich die Partikel die Muskulatur nicht erreicht. Die bei H5 cm festgestellte Kompression der Muskelstränge setzt sich auch im Injektionsbereich H10 cm fort (Abb. 18). Dies lässt auf eine durch den Injektionsdruck entstandene, gleichzeitige Quetschung und daraus resultierende Auffächerung der lumenwärts liegenden Muskelfasern schließen. Je nach individueller Muskelstärke und Widerstandsfähigkeit prägen sich diese Phänomene unterschiedlich stark aus.

Für die Eindringtiefe und Eindringbreite der Suspension ergaben sich jeweils die Mittelwerte 8,3 mm und 7,8 mm. Für die Partikelclusterhöhe und Breite konnten je 4,8 mm und 1,6 mm gemessen werden.

Im Vergleich zum Injektionsbereich H5 war auffällig, dass sich die injizierte Flüssigkeit mehr in horizontaler Richtung verteilte und sich dadurch durchschnittlich eine breitere submuköse Blase bildete (Abb. 12). Im Gegenzug dehnte sich die Partikelsuspension im Bereich H10 in vertikaler Richtung stärker aus als bei H5 (Abb. 13). In Folge dessen war hier die submuköse Eindringtiefe größer.

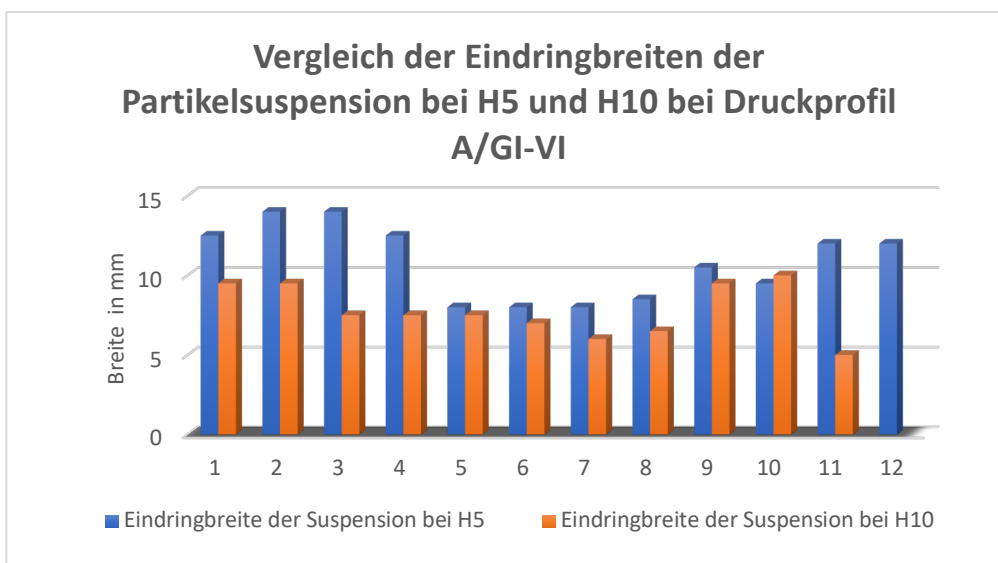


Abbildung 12 Vergleich der Eindringbreiten der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/ Druckprofil A

Hinsichtlich der Partikelclustermorphologie ergaben sich für die Höhe durchschnittlich ein Wert von 4,8 mm und für die Breite 1,6 mm. Im Vergleich zum Injektionsbereich H5 erscheint das Cluster bei H10 in der Höhe ausgedehnter. Im Bereich H5 stellt sich das Cluster im Schnitt breiter dar als bei H10 (Abb. 14 und 15).

Vergleich der Eindringtiefen der Partikelsuspension bei H5 und H10 bei Druckprofil A/GI-VI

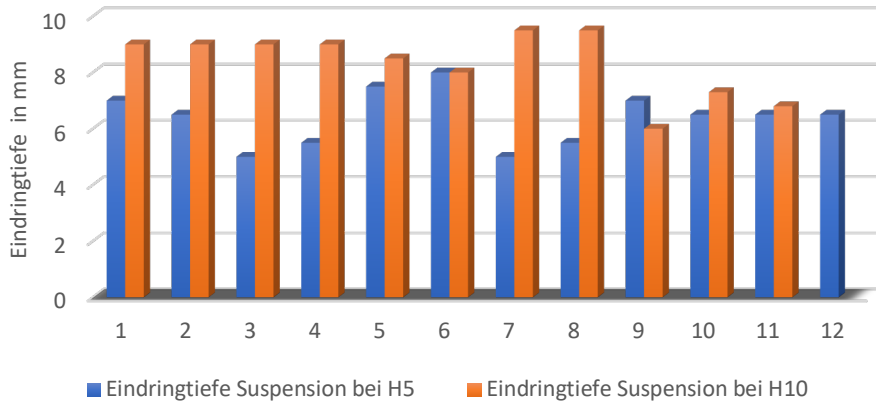


Abbildung 13 Vergleich der Eindringtiefen der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/ Druckprofil A

Vergleich der Höhen des Partikelclusters bei H5 und H10 bei Druckprofil A/GI-VI

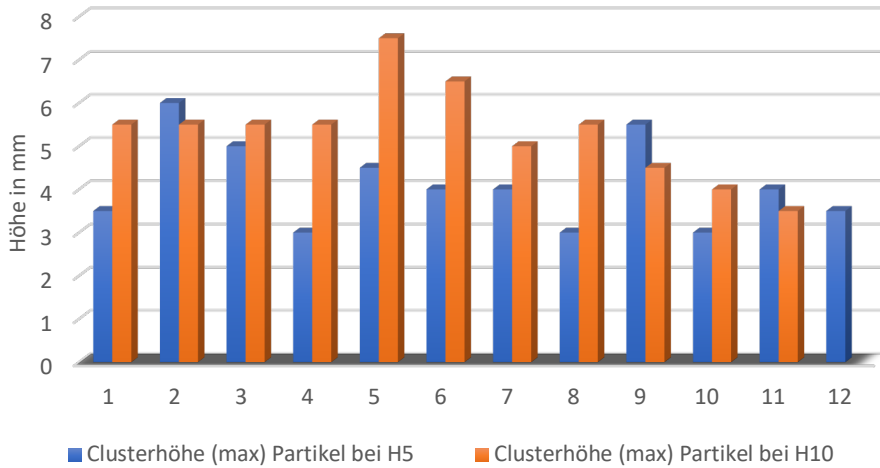


Abbildung 14 Vergleich der Partikelclusterhöhen zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/Druckprofil A

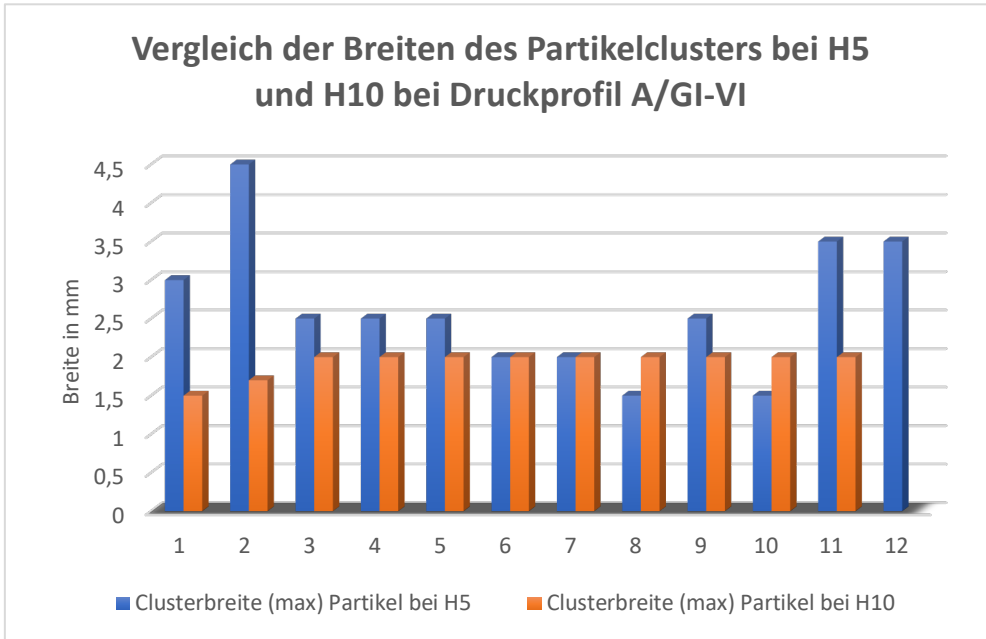


Abbildung 15 Vergleich der Partikelclusterbreiten zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/Druckprofil A

Bei genauerer Untersuchung der Eindringtiefe der Nanopartikel in die Muskulatur der Urethra war ersichtlich, dass die Eindringtiefe wesentlich geringer war als bei H5 (Abb. 16).

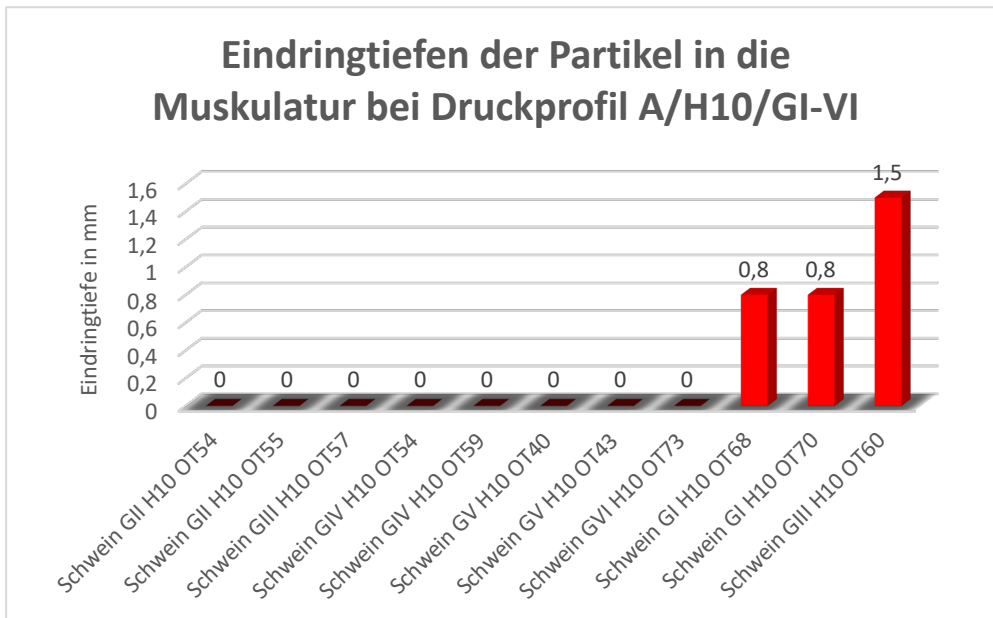


Abbildung 16 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H10 bei den Versuchstieren Schwein GI-VI/Druckprofil A

Auch kann man ableiten, dass die Partikel in einer wesentlich geringeren Fallzahl als bei H5 in den Muskel eingedrungen sind (Abb. 17).

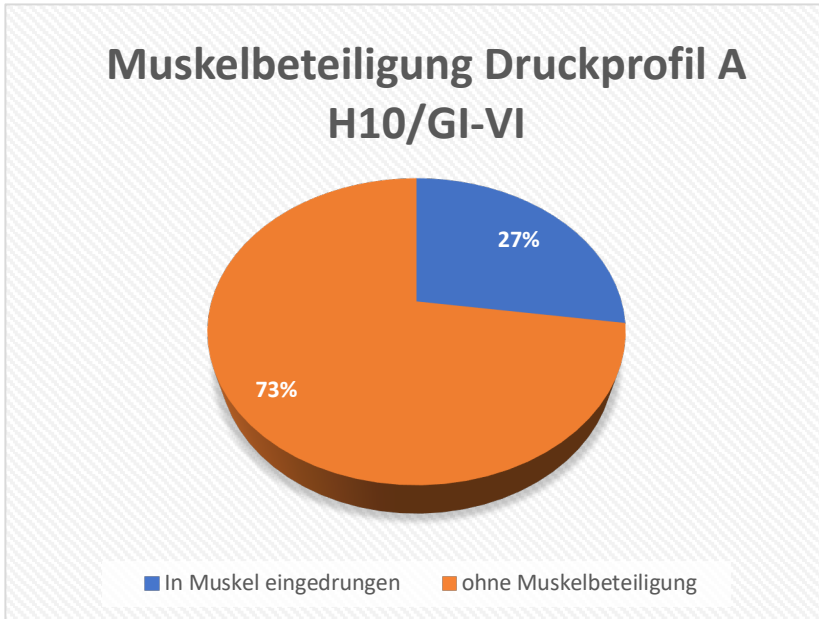
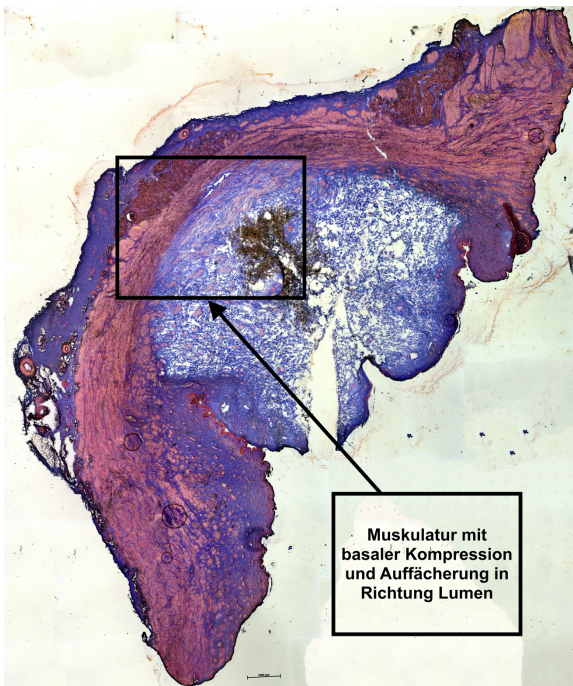
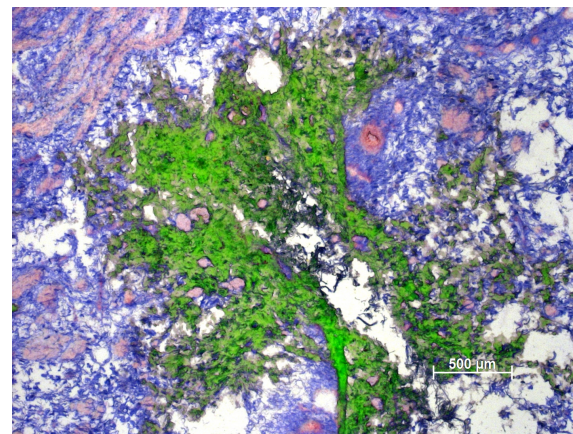


Abbildung 17 Auftreten von Nanopartikeln in der Muskulatur der Urethra bei den Versuchstieren Schwein GI-VI bei H10/Druckprofil A



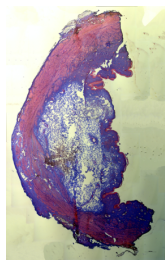
Schwein GV H10 OT 43 Übersicht



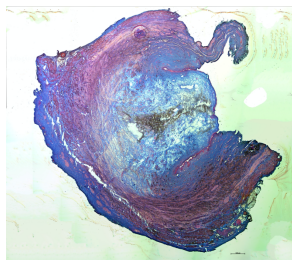
Schwein GV H10 OT 43 Detailaufnahme

Abbildung 18 Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein GV nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H10 (Färbung Azan); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 43 mit sich braun darstellenden Nanopartikeln und typischer basal komprimierter Muskelschicht, die lumenwärts aufgefächert erscheint (Maßstabsbalken = 1000µm); rechts: Detailaufnahme des Objektträgers 43 mit grün fluoreszierenden Nanopartikeln (ohne Muskelbeteiligung/ Maßstabsbalken = 500µm)

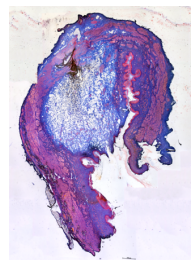
3.1.1.3 Übersicht der mit Druckprofil A durchgeführten Wasserstrahlinjektion an den Versuchstieren Schwein GI-VI



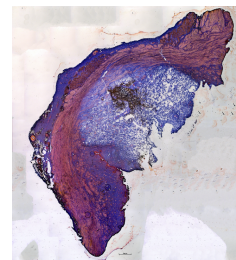
Schwein GI H5
OT61



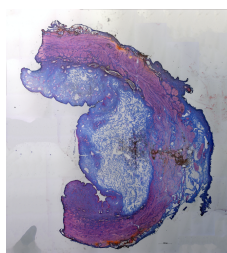
Schwein GI H10 OT70



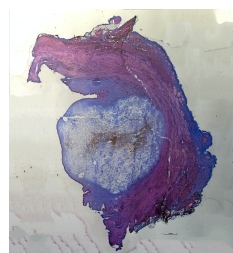
Schwein GV H5
OT57



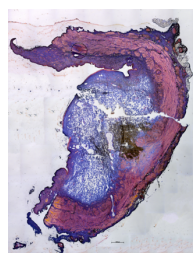
Schwein GV H10
OT40



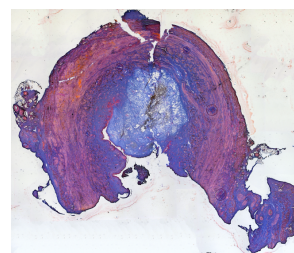
Schwein GII H5
OT55



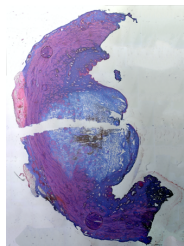
Schwein GII H10
OT55



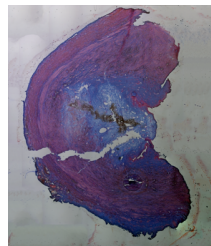
Schwein GVI H5
OT62



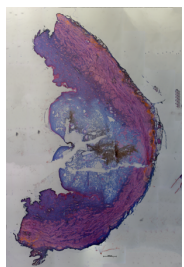
Schwein GVI H10 OT73



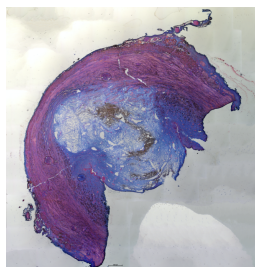
Schwein GIII H5
OT66



Schwein GIII H10
OT60



Schwein GIV H5
OT54



Schwein GIV H10
OT54

Abbildung 19 Übersicht der Versuchsreihe mit den Schweinen GI-VI mit Druckprofil A; links: Injektionsbereich H5; rechts: Injektionsbereich H10; der Maßstabsbalken in den einzelnen Bildern ist mit 1000 μ m beschriftet

3.1.2 Versuchsreihe mit Druckprofil A an der präparierten Harnröhre des Versuchstieres Schwein JI-IV

3.1.2.1 Injektionsbereich H5

3.1.2.1.1 Makroskopische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere JI-IV bei H5 und H10

Bei jeder Kadaverprobe (n = 4), ausgenommen der Injektionsstellen bei der Kadaverprobe Schwein JIII, konnte die typische Blasenbildung dokumentiert werden. Hier ereignete sich an der Injektionsstelle H5 ein Durchschuss, weshalb sich die injizierte Suspension unterhalb des Gewebes auf der Folie verteilte (Abb. 20)



Abbildung 20 untypische Kadaverprobe des Schweins JIII; bei H5: Durchschuss, Suspension im Randbereich neben der Urethra; bei H10: in sich verwundenes Gewebe post injectionem

Weiterhin löste sich die Urethra bei Höhe 10 cm sehr untypisch vom Untergrund ab und windete sich während der Injektion. Eine Blasenbildung blieb folglich aus (Abb. 20).

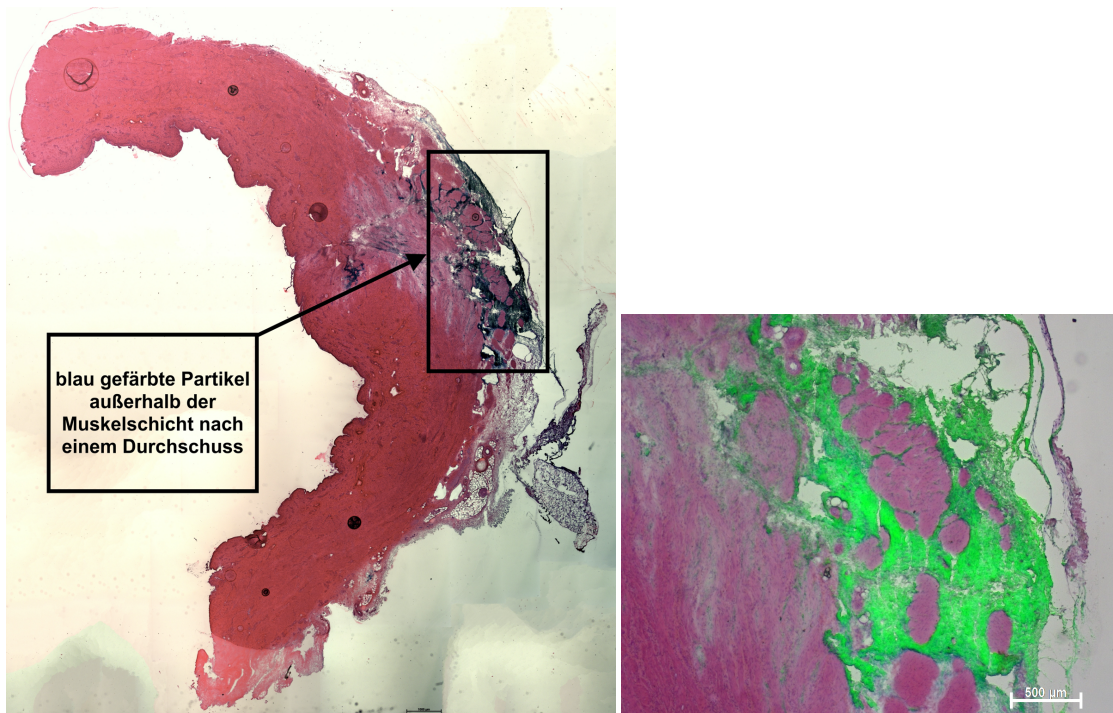
Bei den Injektionsversuchen mit Histofarbe stellte sich die gebildete Blase blau dar (Abb 21).



Abbildung 21 präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein JII nach der Wasserstrahlinjektion mit klar erkennbaren blau gefärbten Blasen

3.1.2.1.2 Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere JI-IV bei H5

Auch hier stellte sich die Muskulatur lumenwärts aufgefächert und basal komprimiert dar. Im Falle des Durchschusses bei dem Versuchstier JIII an der Injektionsstelle H5 war die Muskulatur im Gesamten verbreitert. Die Partikel waren hierbei vor allem im Bereich der Adventitia, also außerhalb der Muskelschicht im Bindegewebe, zu finden (Abb. 22).



Übersichtsaufnahme Schwein JIII H5 OT68

Detailaufnahme Schwein JIII H5 OT 68

Abbildung 22 Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein JIII nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung HE); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 68 mit deutlich erkennbarer verbreiteter Muskulatur und Partikelverteilung basal der Muskulatur (Maßstabsbalken = 1000µm); rechts: Detailaufnahme des Objektträgers 68 mit fluoreszierenden Partikeln innerhalb und außerhalb der basalen Muskelauffächerung nach dem Durchschuss (Maßstabsbalken = 500µm)

Hinsichtlich der submukösen Eindringtiefe der Suspension konnte ein Mittelwert von 6,7 mm und für die Eindringbreite von 10,3 mm ermittelt werden. Das Partikelcluster ergab mittelwertig eine Höhe von 5,6 mm und eine Breite von 5,02 mm. Im Falle der Muskelbeteiligung ergab sich eine mittlere Eindringtiefe von 2,13 mm in die glatte Muskulatur der Urethra. Auffällig hierbei war, dass bei jeder Wasserstrahlinjektion Polystyrolpartikel die Muskelschicht erreichten (Abb. 23).

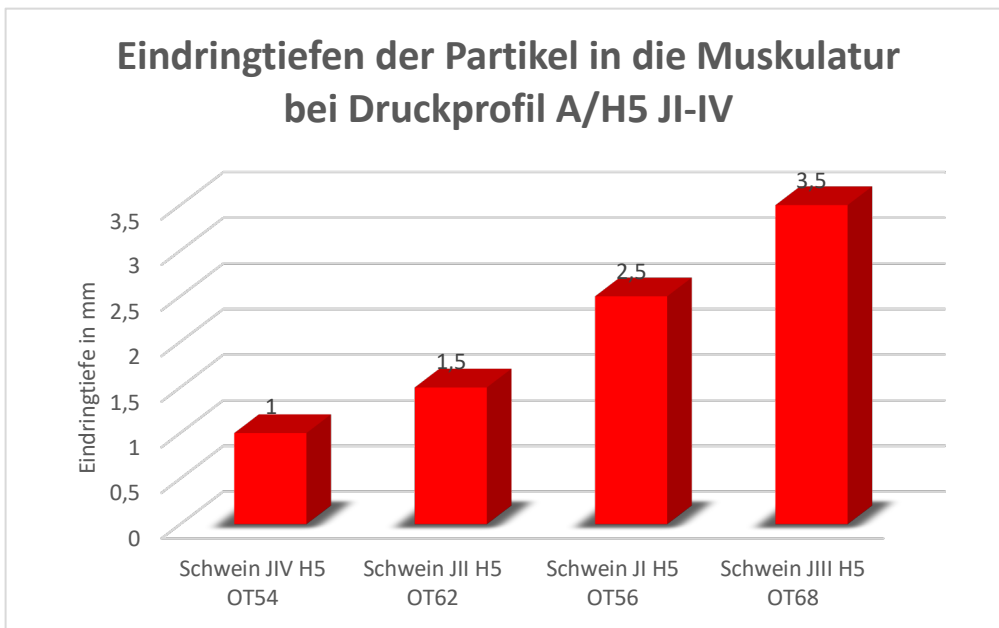


Abbildung 23 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H5 bei den Versuchstieren Schwein JI-IV/Druckprofil A

3.1.2.2 Injektionsbereich H10

3.1.2.2.1 Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere JI-IV bei H10 und Vergleich mit H5

Im Injektionsbereich war wiederum die typische Kompression und lumenwärtige Auffächerung der glatten Muskulatur ersichtlich. Auffällig war jedoch bei H10, dass die Polystyrolpartikel bei keinem Injektionsversuch in die Muskulatur eingedrungen sind. Weiterhin betragen die Mittelwerte für Eindringtiefe und Eindringbreite 8,95 mm und 8,25 mm. Das Partikelcluster erstreckte sich durchschnittlich 11,7 mm in vertikaler und 3,27 mm in horizontaler Richtung.

Im Vergleich zum Injektionsbereich H5 zeigt sich, wie schon bei der Versuchsreihe mit den Versuchstieren Schwein GI-VI, dass die Eindringbreite der Partikelsuspension im Schnitt größer ist als bei H10 (Abb. 24). Ebenso, analog zur Versuchsreihe Schwein GI-VI, verhalten sich die Werte für die Eindringtiefe. Auch hier sind für den Bereich H10 größere Werte messbar (Abb. 25).

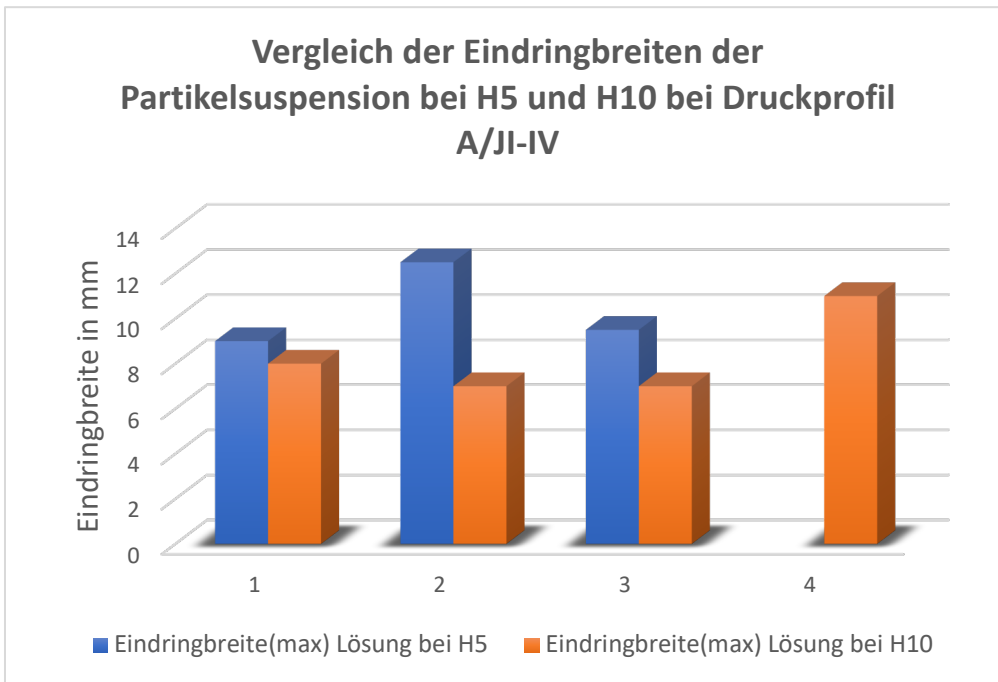


Abbildung 24 Vergleich der Eindringbreiten der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein JI-IV/Druckprofil A

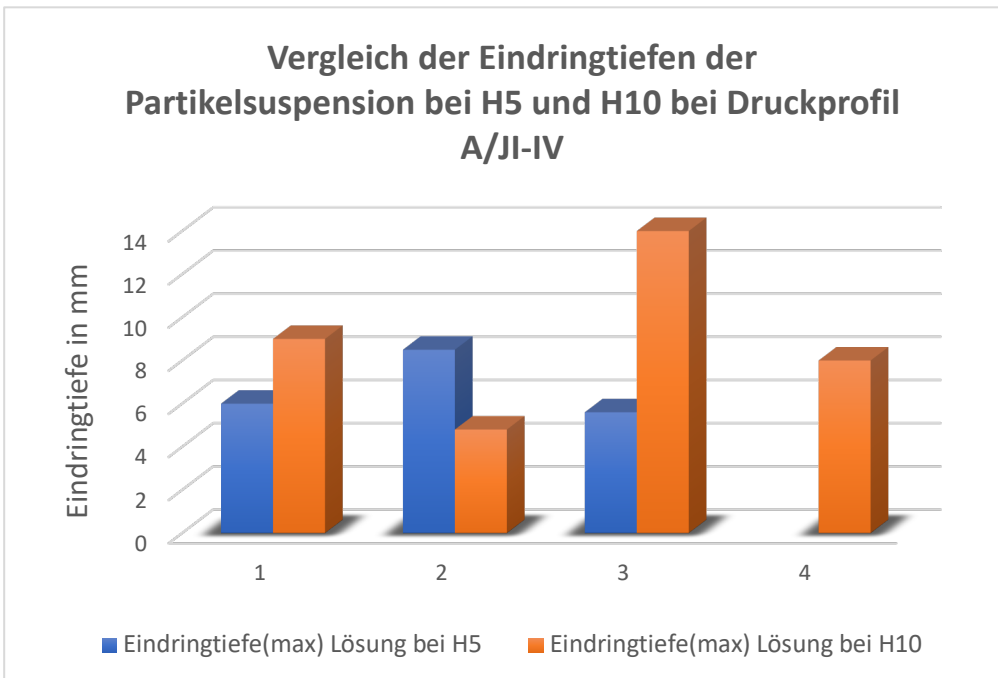


Abbildung 25 Vergleich der Eindringtiefen der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein JI-IV/Druckprofil A

Demzufolge herrschen ebenso gleiche Verhältnisse bezüglich des Partikelclusters.

Wie bei der vorherigen Versuchsreihe mit Druckprofil A, wies die Clusterhöhe bei H10 größere Werte als bei H5 auf. Genau umgekehrt haben sich die Werte für die Clusterbreite verhalten (Abb. 26 und 27).

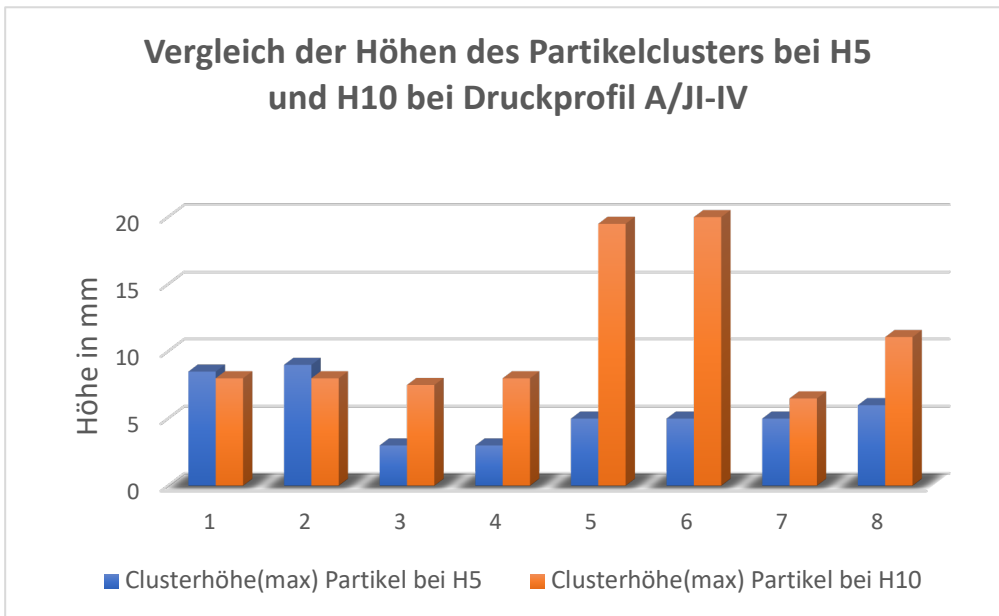


Abbildung 26 Vergleich der Partikelclusterhöhen zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein JI-IV/Druckprofil A

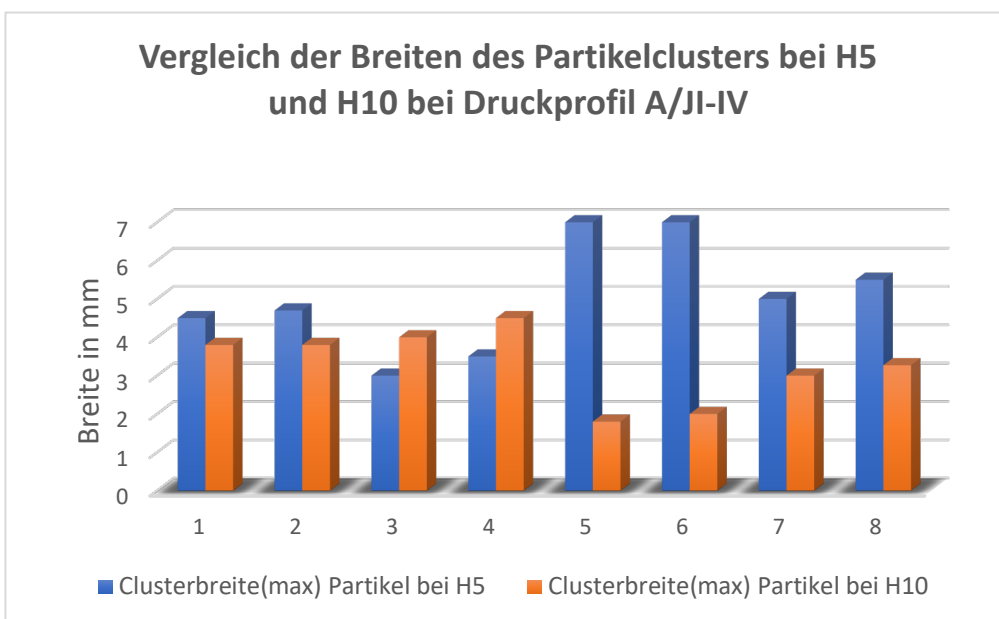


Abbildung 27 Vergleich der Partikelclusterbreiten zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein JI-IV/Druckprofil A

3.1.2.3 Ergebnisse der Wasserstrahlinjektion mit beigemischter Histofarbe bei der Versuchsreihe Schwein JI-IV

Um die genaue Verteilung der Partikelsuspension im submukösen Gewebe beurteilen zu können, wurde in die Injektionsflüssigkeit, zusätzlich zu den Nanopartikeln, ein gewisser Anteil an Histofarbe hinzugefügt (siehe Material und Methodik). Dabei zeigte sich auf jedem ausgewerteten Kryoschnitt das gleiche Ergebnis. Der beigemengte Farbstoff färbte ausschließlich die Polystyrolpartikel blau an. Die Suspensionsflüssigkeit blieb nach der Injektion farblos. Dies könnte durch eine eventuelle elektrostatische Anziehung zwischen den Nanopartikeln und dem blauen Farbstoff erklärt werden. Alternativ denkbar wäre, dass die Schichtdicke der Schnitte nicht ausreicht, um die blaue Tinte im Durchlicht erkennen zu können. Weiterhin wäre es möglich, dass durch das „Eindeckeln“ der Schnitte der gelöste Farbstoff verdünnt wird und dadurch verschwindet. In der Folge deckt sich der Anfärbereich der Histofarbe exakt mit der Verteilung der Nanopartikel (Abb. 28).

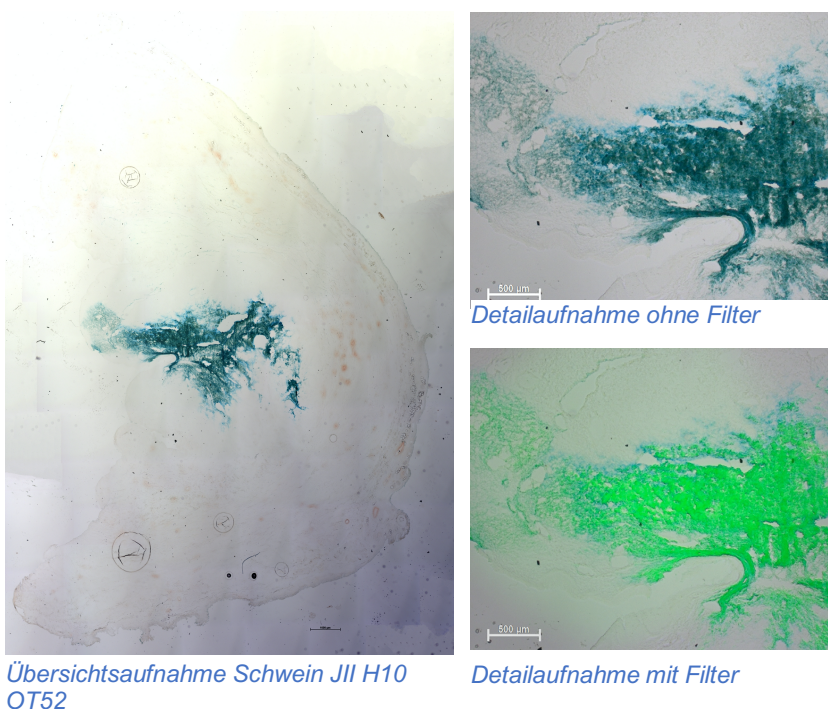
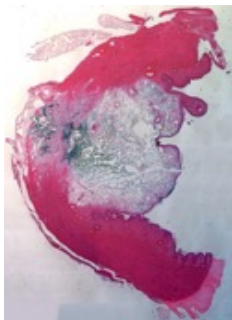


Abbildung 28 Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein JII nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H10 (ohne Färbung); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 52 mit sich blau darstellenden Nanopartikeln und ungefärbten Kadavergewebe (Maßstabsbalken = 1000µm); rechts oben: Detailaufnahme der blau gefärbten Nanopartikel; rechts unten: fluoreszierende Nanopartikel, die sich mit der blauen Färbung decken; (Maßstabsbalken bei den Detailaufnahmen = 500µm)

3.1.2.4 Übersicht der mit Druckprofil A durchgeführten Wasserstrahlinjektion an den Versuchstieren Schwein JI-IV



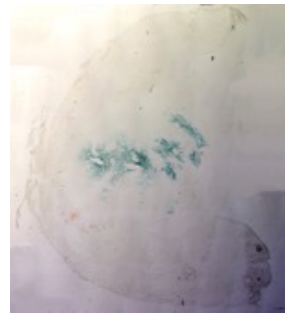
Schwein JI H5 OT56



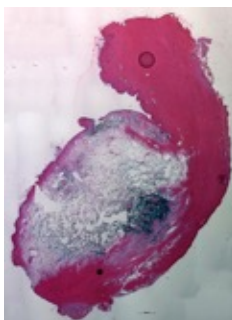
Schwein JI H5 OT55



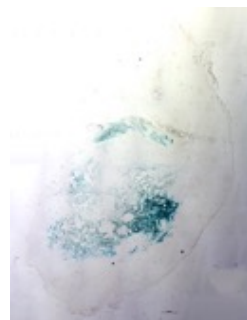
Schwein JI H10 OT54



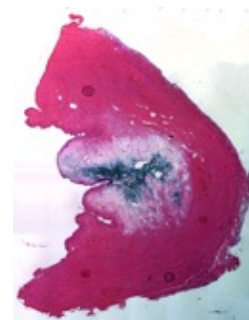
Schwein JI H10 OT53



Schwein JII H5 OT62



Schwein JII H5 OT61



Schwein JII H10 OT53



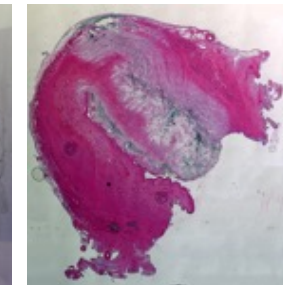
Schwein JII H10 OT52



Schwein JIII H5 OT68



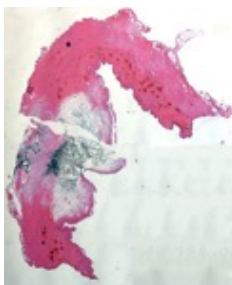
Schwein JIII H5 OT67



Schwein JIII H10 OT43



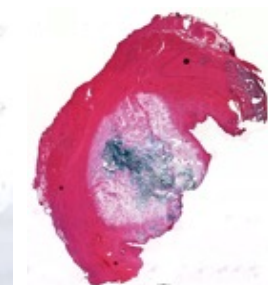
Schwein JIII H10 OT44



Schwein JIV H5 OT54



Schwein JIV H5 OT53



Schwein JIV H10 OT65

Abbildung 29 Übersicht der Versuchsreihe mit den Schweinen JI-IV mit Druckprofil A; links: Injektionsbereich H5 (mit HE Färbung und ohne Färbung); rechts: Injektionsbereich H10 (mit HE-Färbung und ohne Färbung); der Maßstabsbalken in den einzelnen Bildern ist mit 1000 μ m beschriftet

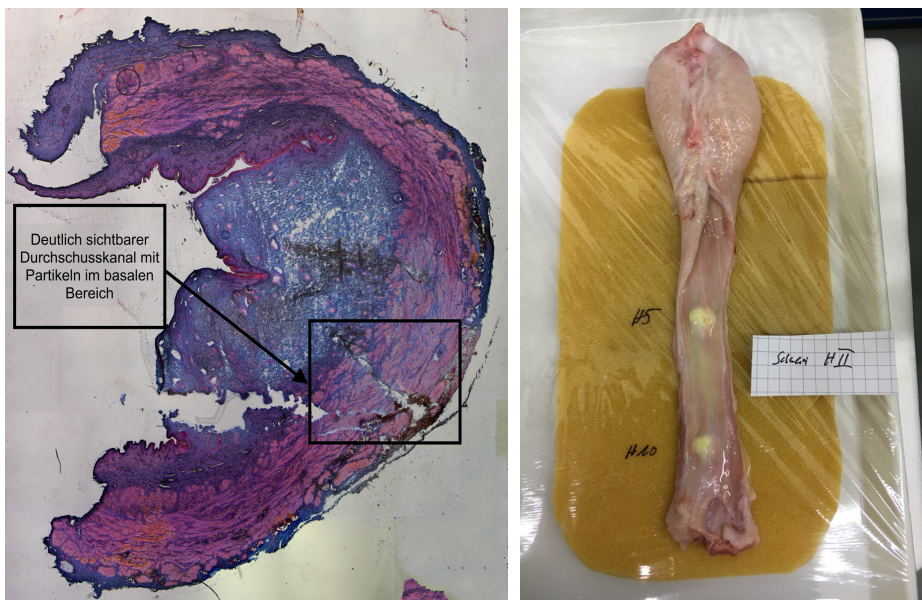
3.2 Injektion mit Druckprofil B

3.2.1 Versuchsreihe mit Druckprofil B an der präparierten Harnröhre des Versuchstieres Schwein HI-VI

3.2.1.1 Injektionsbereich H5

3.2.1.1.1 Makroskopische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere HI-VI bei H5 und H10

In dieser Versuchsreihe war besonders auffällig, dass im Injektionsbereich H5 an vier Kadaverproben (n = 6) ein Durchschuss bei simultaner Blasenbildung zu beobachten war (Abb. 30). Bei der Injektionsstelle 10 cm kaudal der Harnblasenmündung jedoch, also im Bereich, in der die Muskelschicht dicker ist, war stets eine Blasenbildung ohne Durchschuss erkennbar. Folglich ist zu vermuten, dass die dünnere Muskelschicht der Urethra im kranialen Bereich beim Schwein dem hohen Druck mit Druckprofil B nicht standhält und es mehrheitlich zu Durchschüssen kommt. Infolgedessen wird wiederum eine starke Traumatisierung der Muskulatur und des zirkulären Bindegewebes hervorgerufen.



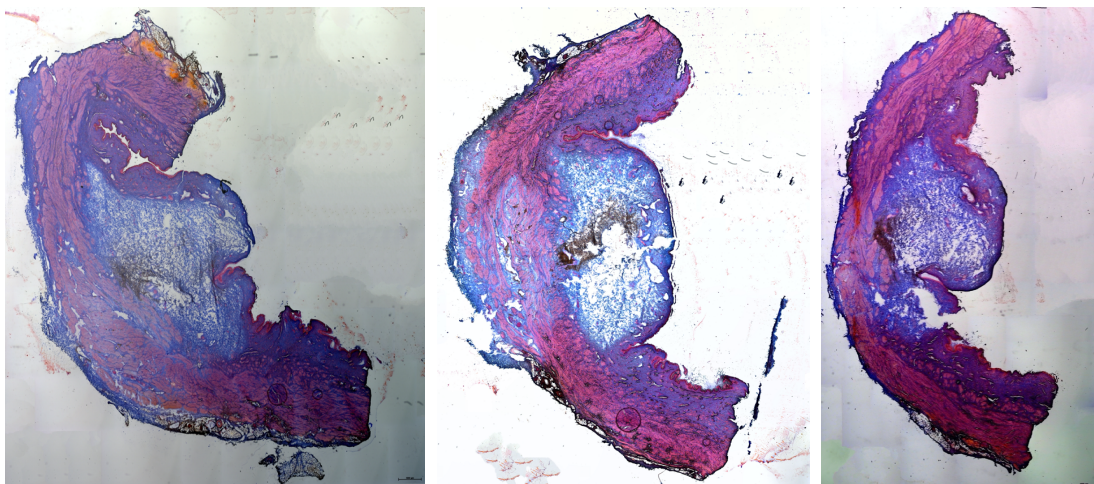
Übersichtsaufnahme Schwein HIII H5 OT37

Präparierte Harnröhre post
injectionem des Schweins HIII

Abbildung 30 links: Histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein HIII nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung Azan) mit deutlich erkennbarem intramuskulärem Durchschusskanal (Maßstabsbalken = 1000µm); Rechts: präparierte Harnblase mit längs eröffneter Urethra des Versuchstieres Schwein HII, deutlich erkennbare Blasenbildung nach der Wasserstrahlinjektion

3.2.1.1.2 Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere HI-VI bei H5

Die glatte Muskulatur bei der Versuchsreihe Schwein HI-VI stellte sich im proximalen Injektionsbereich hauptsächlich aufgefächert dar. Je nach individueller Muskelbeschaffenheit konnte in einem ausgeglichenen Verhältnis, entweder eine lumenwärtige Auffächerung mit basaler Kompression oder eine stärkere Auffächerung mit einer daraus resultierenden muskulären Verbreiterung festgestellt werden. In wenigen Fällen waren die beiden Situationen miteinander kombiniert vorzufinden. Einer basalen Muskelkompression schließt sich eine stärkere Auffächerung bzw. eine Verbreiterung der Muskulatur im Bereich der injizierten Partikel an, der wiederum eine basale Kompression folgt (Abb. 31). Die durch die Wasserstrahlinjektion mit Druckprofil B bedingten Veränderungen sind in der Folge ausgeprägter als in den vorherigen Versuchsreihen bei H5.



Übersicht Schwein HI H5 OT49

Übersicht Schwein HIV H5 OT46

Übersicht Schwein HV H5 OT46

Abbildung 31 Histologische Präparate der Urethra der Versuchstiere Schwein HI, HIV und HV nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung Azan); links: lumenwärtige Auffächerung mit basaler Kompression, mittig: starke Auffächerung und Verbreiterung der Muskelschicht, rechts: kombinierte basale Kompression mit Verbreiterung der Muskelschicht im Bereich der bräunlichen Nanopartikel (Maßstabsbalken = 1000 μ m)

Für die Eindringtiefen und Eindringbreiten der Partikelsuspension wurden die Mittelwerte 5,2 mm (Tiefe) und 8,3 mm (Breite) errechnet. Das Partikelcluster erstreckt sich im Mittel 2,8 mm in die Höhe und 1,7 mm in die Breite. Ferner konnte von den meisten Objektträgern ein Eindringen der Nanopartikel in die

glatte Muskulatur abgeleitet werden (Abb. 33). Die injizierten Polystyrolpartikel drangen durchschnittlich 1,83 mm in die Muskelschicht der Urethra ein (Abb. 32).

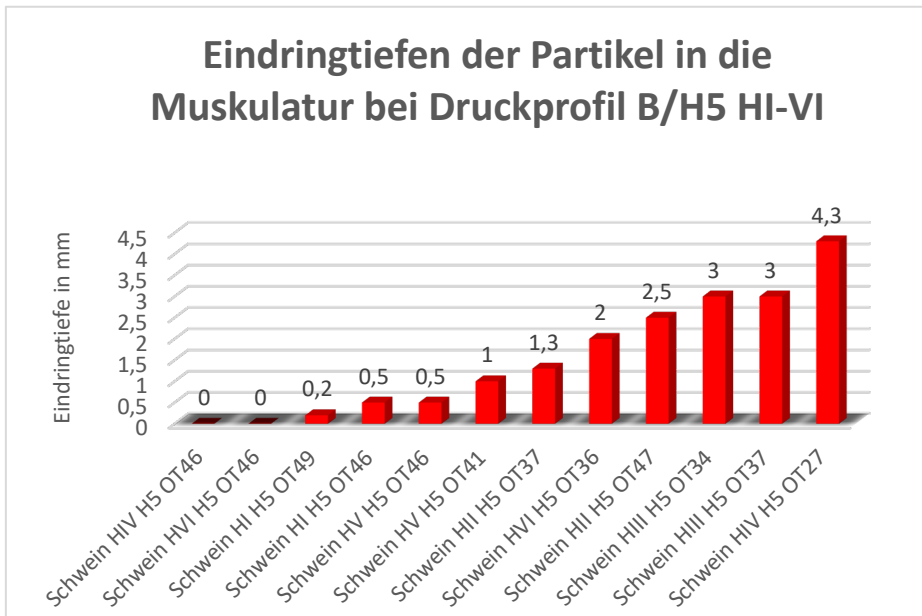


Abbildung 32 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H5 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B

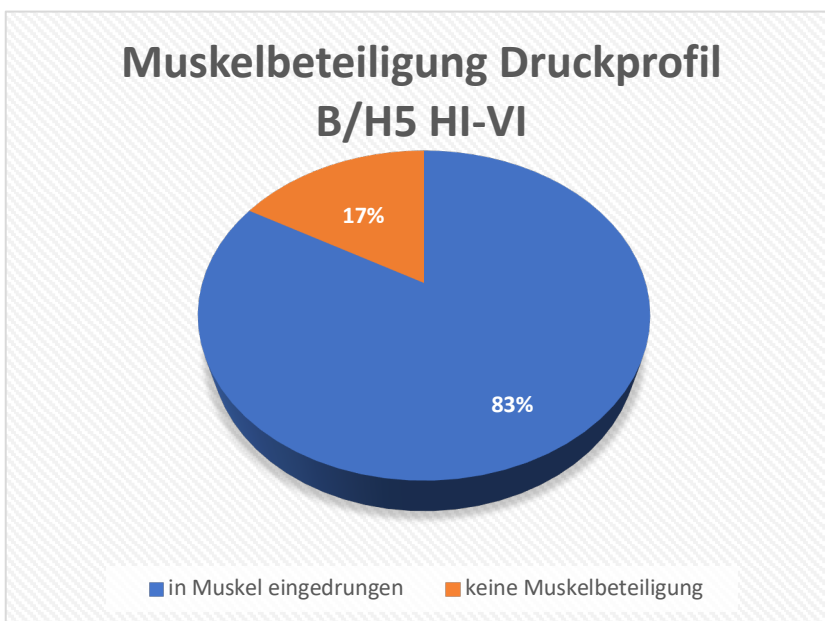


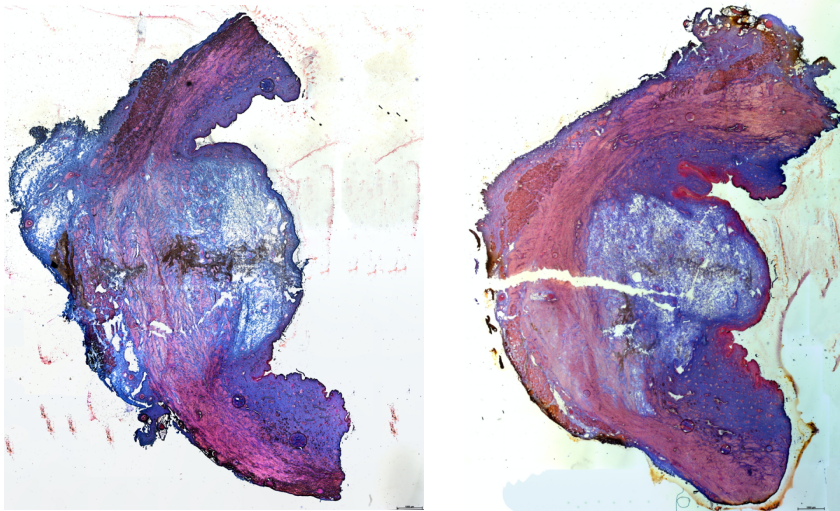
Abbildung 33 Auftreten von Nanopartikeln in der Muskulatur der Urethra bei den Versuchstieren Schwein HI-VI bei H5/Druckprofil B

3.2.1.2 Injektionsbereich H10

3.2.1.2.1 Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere HI-VI bei H10 und Vergleich mit H5

Im Injektionsbereich H10 stellte sich die Muskulatur lumenwärts stark aufgefächert dar. Dabei war auf mehr als doppelt so vielen Objektträgern eine, durch die starke Auffächerung bedingte Verbreiterung der Muskelschicht erkennbar. Zum geringeren Anteil konnte eine gleichzeitige Kompression der Muskulatur nachgewiesen werden. Die injizierten Nanopartikel drangen dabei stets in die Muskelschicht ein, wobei in drei Fällen eine genaue Messung aufgrund der Überlagerung der Eindringtiefe mit der starken Auffächerung der Muskulatur nicht exakt möglich war.

Diese mehrheitlich festgestellte Verbreiterung könnte auf die ohnehin dickere Muskelschicht zurückgeführt werden. Durch die höhere Anzahl an Muskelfasern und durch den größeren Widerstand, den die Muskulatur dem Injektionsdruck entgegenbringt, wird vermutlich die kinetische Energie des Wasserstrahls auf die gesamte Muskelbreite übertragen und führt zur Verbreiterung der Muskulatur (Abb. 34).



Übersicht Schwein HIV H10 OT37

Übersicht Schwein HVI H10 OT39

Abbildung 34 Histologische Präparate der Urethra der Versuchstiere Schwein HIV und HVI nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H10 (Färbung Azan); links und rechts: jeweils starke Auffächerung mit daraus resultierender muskulärer Verbreiterung (Maßstabsbalken = 1000 μ m)

Für die Eindringtiefe und Eindringbreite der Partikelsuspension wurden die Mittelwerte 8,2 mm und 9,8 mm ermittelt. Für die mittlere Ausdehnung des

Partikelclusters in Höhe und Breite wurden die Werte 5,5 mm und 2,3 mm errechnet. Weiterhin sind die injizierten Nanopartikel durchschnittlich 2,4 mm in die glatte Muskulatur der Urethra eingedrungen (Abb. 35).

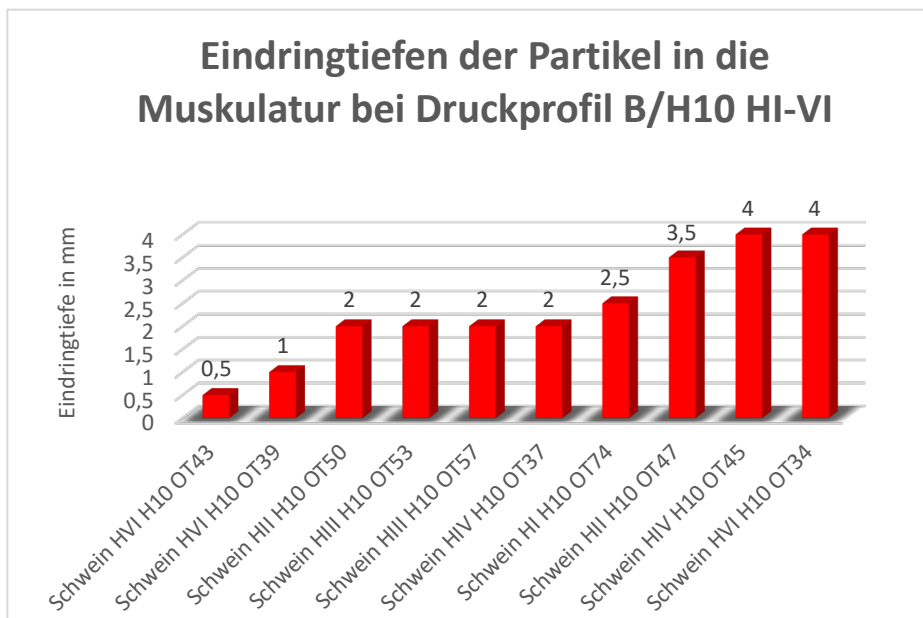


Abbildung 35 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H10 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B

Vergleicht man die Mittelwerte der Suspensionsausdehnung sowie der Größe des Partikelclusters mit denen des Injektionsbereiches H5, so wird ersichtlich, dass die Werte des distalen Bereiches dominieren (Abb. 36-39).

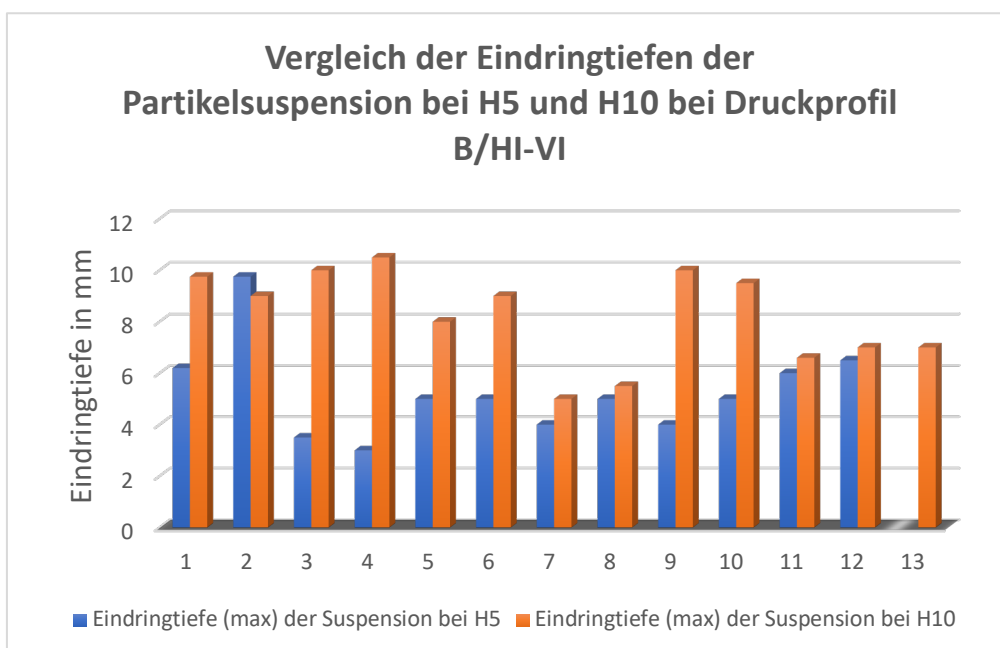


Abbildung 36 Vergleich der Eindringtiefen der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B

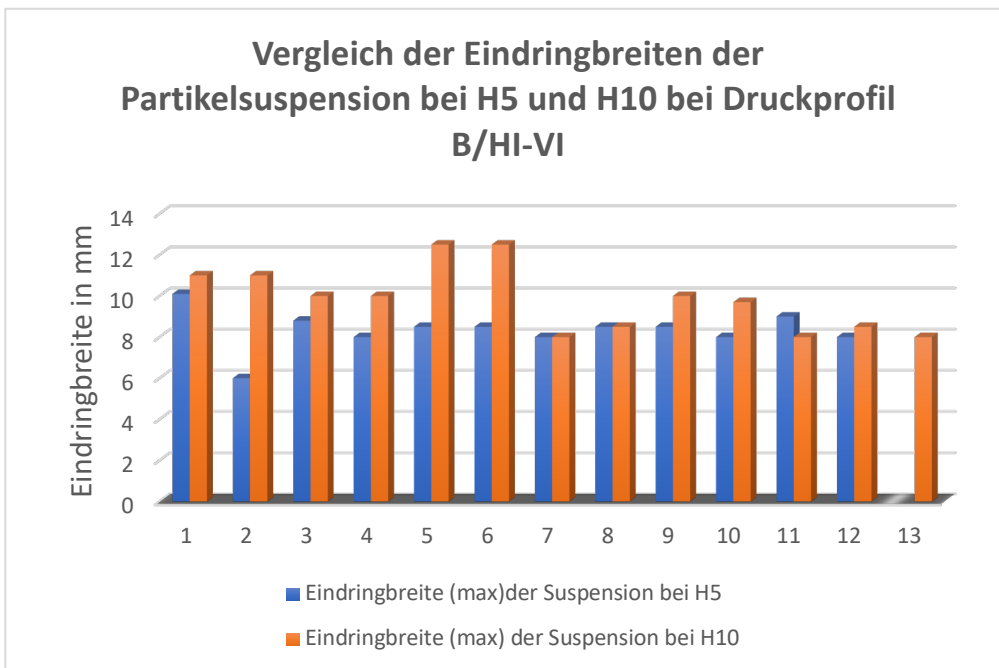


Abbildung 37 Vergleich der Eindringbreiten der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B

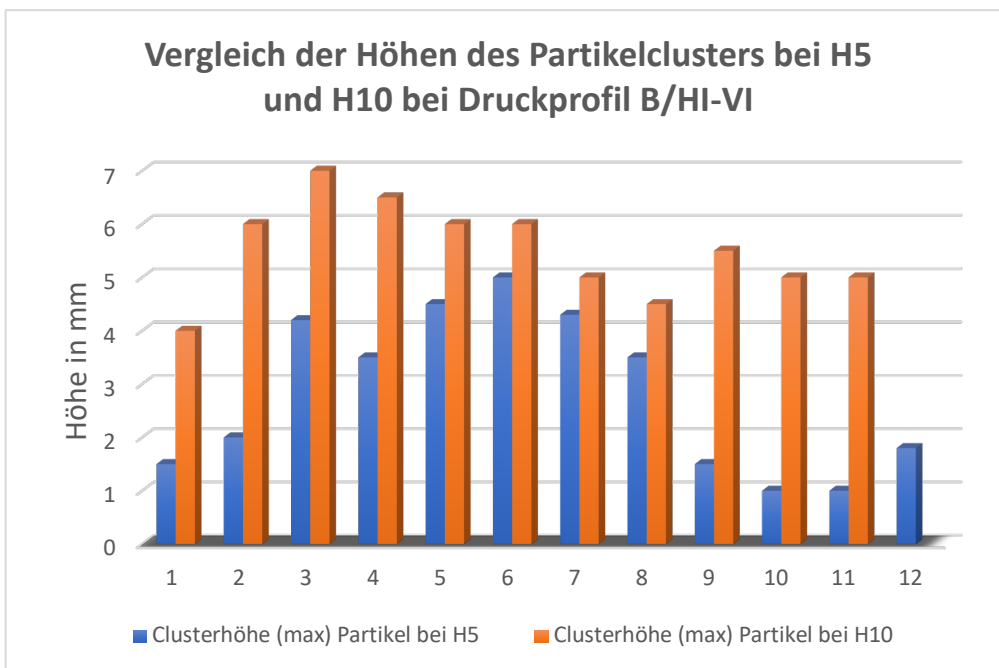


Abbildung 38 Vergleich der Partikelclusterhöhen zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B

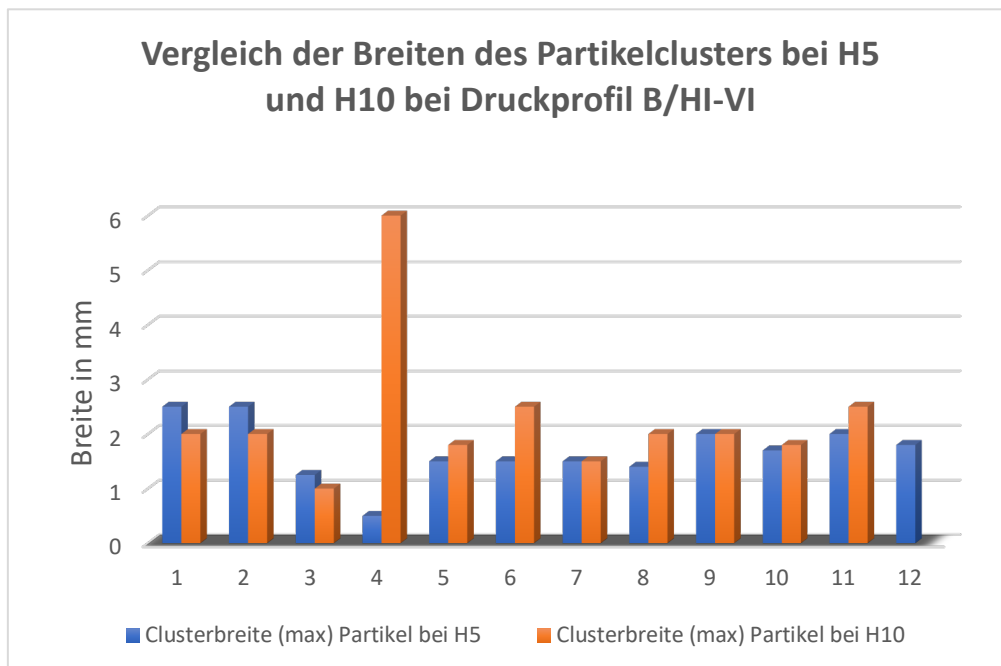
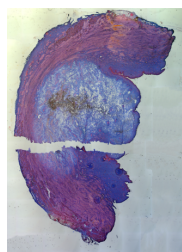


Abbildung 39 Vergleich der Partikelclusterbreiten zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein HI-VI/Druckprofil B

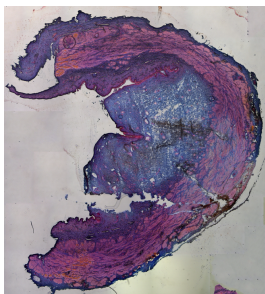
3.2.1.3 Übersicht der mit Druckprofil B durchgeführten Wasserstrahlinjektion an den Versuchstieren Schwein HI-VI



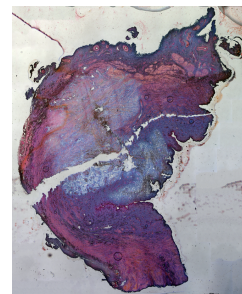
Schwein HI H5 OT46



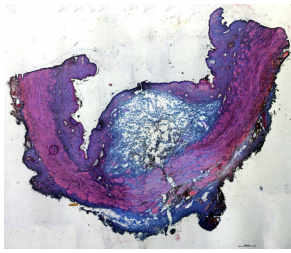
Schwein HI H10 OT71



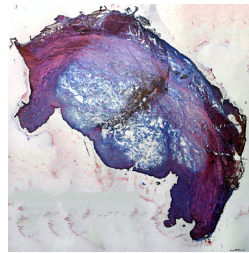
Schwein HII H5 OT37



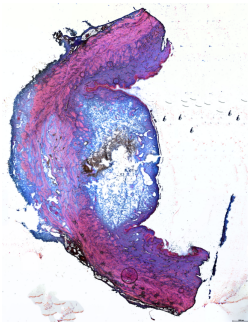
Schwein HII H10 OT47



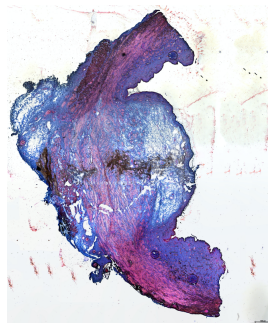
Schwein HIII H5 OT37



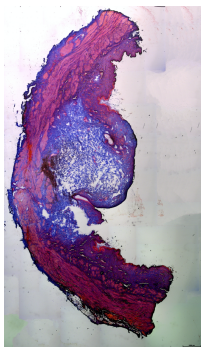
Schwein HIII H10
OT53



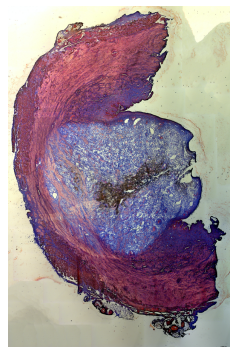
Schwein HIV H5 OT46



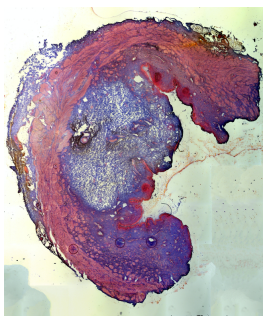
Schwein HIV H10 OT37



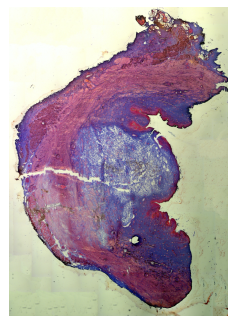
Schwein HV H5
OT46



Schwein HV H10
OT62



Schwein HVI H5 OT46



Schwein HVI H10
OT43

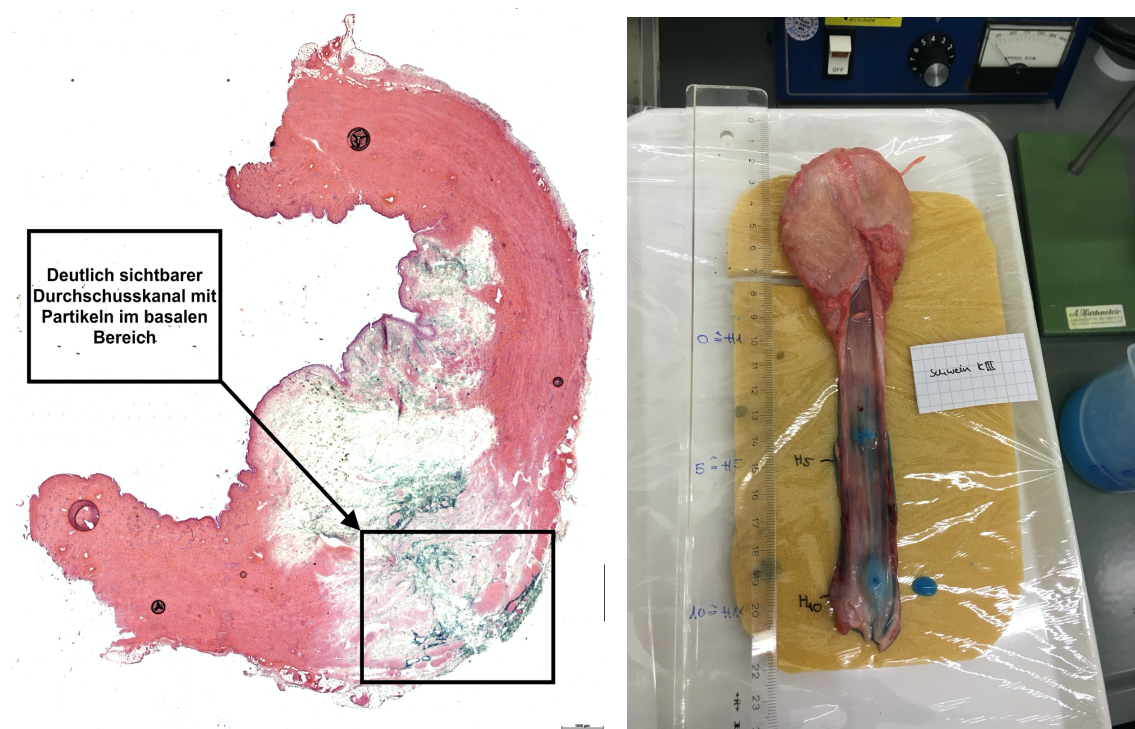
Abbildung 40 Übersicht der Versuchsreihe mit den Schweinen HI-VI mit Druckprofil B (Färbung Azan); links: Injektionsbereich H5; rechts: Injektionsbereich H10; der Maßstabsbalken in den einzelnen Bildern ist mit 1000 μ m beschriftet

3.2.2 Versuchsreihe mit Druckprofil B an der präparierten Harnröhre des Versuchstieres Schwein KI-IV

3.2.2.1 Injektionsbereich H5

3.2.2.1.1 Makroskopische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere KI-IV bei H5 und H10

Auch bei der letzten Versuchsreihe mit den Kadaverproben der Schweine KI-IV konnte fast immer die typische submuköse Blasenbildung beobachtet werden. Lediglich bei dem Gewebe des Versuchstieres Schwein KIII konnte an der Injektionsstelle H5 schon makroskopisch, gleichzeitig mit der Wasserstrahlinjektion, ein Durchschuss verzeichnet werden (Abb. 41).



Übersichtsaufnahme Schwein KIII H5 OT50

präparierte Harnröhre des Schweins KIII post injectionem

Abbildung 41 links: histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein KIII nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H5 (Färbung HE) mit deutlich erkennbarem intramuskulärem Durchschussskanal (Maßstabsbalken = 1000µm); rechts: präparierte Harnblase mit längs eröffneter Urethra des Versuchstieres Schwein KIII mit Durchschuss im Bereich H5/ keine Blasenbildung; im Bereich H10 deutlich erkennbare Blasenbildung

3.2.2.1.2 Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere KI-IV bei H5

Die Muskulatur stellte sich in dieser Versuchsreihe im gleichen Verhältnis einerseits stark aufgefächert und dadurch verbreitert dar, andererseits war eine starke Auffächerung im Bereich der Partikel, kombiniert mit einer basalen Kompression im restlichen Bereich der submukösen Blase, vorzufinden (Abb. 31). Zudem gelangten Nanopartikel bei jeder Wasserstrahlinjektion mit einer mittleren Eindringtiefe von 4,25 mm in die Muskulatur (Abb. 42). Die durchschnittliche Eindringtiefe der Suspension lag bei 8,58 mm. Die mittlere Eindringbreite belief sich auf 9 mm. Das Partikelcluster erstreckte sich durchschnittlich 6,53 mm in die Höhe und 6,76 mm in die Breite.

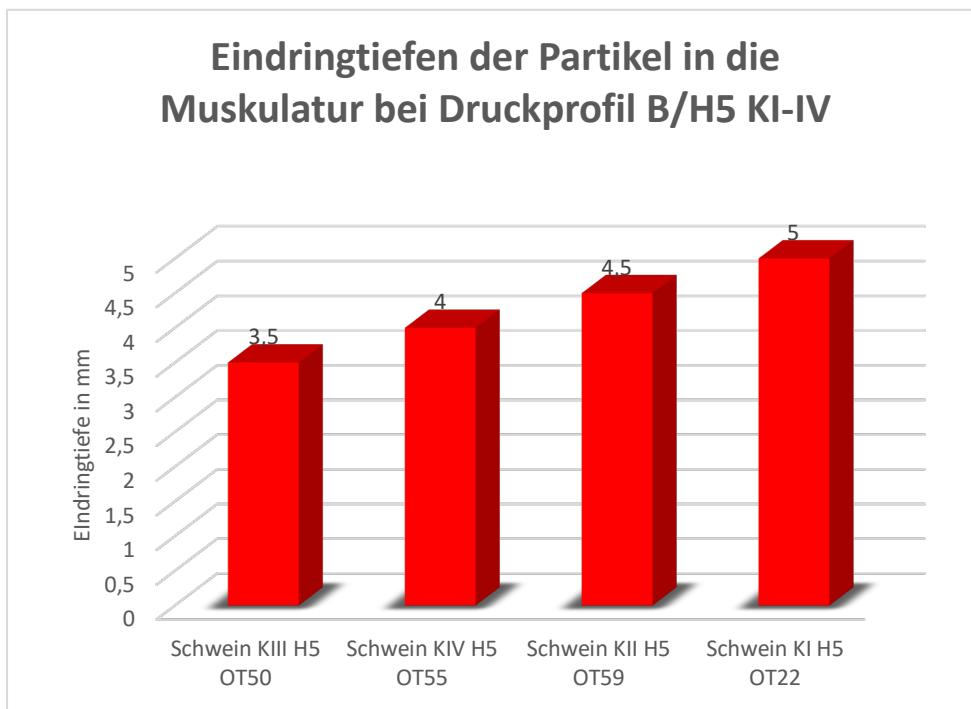
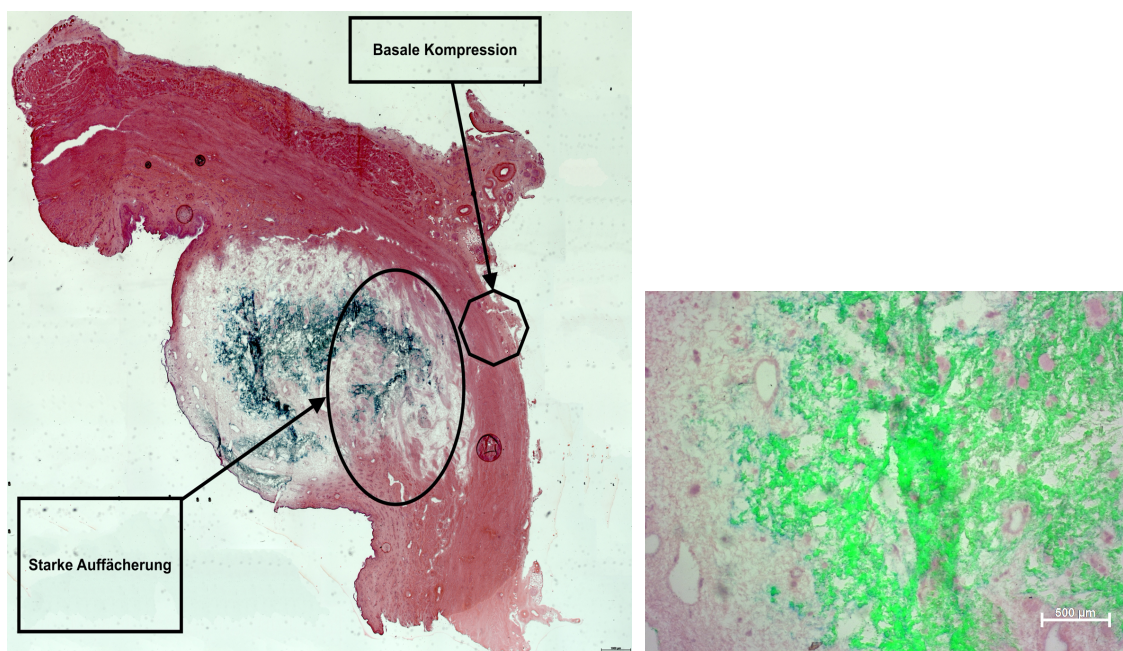


Abbildung 42 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H5 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B

3.2.2.2 Injektionsbereich H10

3.2.2.2.1 Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra der Versuchstiere KI-IV bei H10 und Vergleich mit H5

Im Injektionsbereich H10 erschien die Muskulatur in drei Viertel der Fälle nicht nur in der Region unmittelbar nahe der Partikel, sondern durchgehend lumenwärts stark aufgefächert und gleichzeitig basal komprimiert (Abb. 43). Lediglich bei einer Injektion war, neben einer leichten Auffächerung, eine intakte unveränderte Muskulatur erkennbar. Partikel waren in nur 50 % der Fälle im Muskel vorzufinden. Die mittlere Eindringtiefe belief sich auf 2,75 mm (Abb. 44).



Übersichtsaufnahme Schwein KII H10 OT47

Detailaufnahme Schwein KII H10 OT47

Abbildung 43 histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein KII nach der Wasserstrahlinjektion im Bereich H10 (Färbung HE); links: Übersichtsaufnahme des Objektträgers 47 mit starker Auffächerung lumenwärts und basaler Kompression der Muskulatur; blau gefärbte Nanopartikel zwischen den aufgefächerten Muskelfasern und im Bereich der submukösen Bindegewebsblase (Maßstabsbalken = 1000µm); rechts: Detailaufnahme mit grün fluoreszierenden Nanopartikeln zwischen den aufgefächerten Muskelfasern (Maßstabsbalken = 500µm)

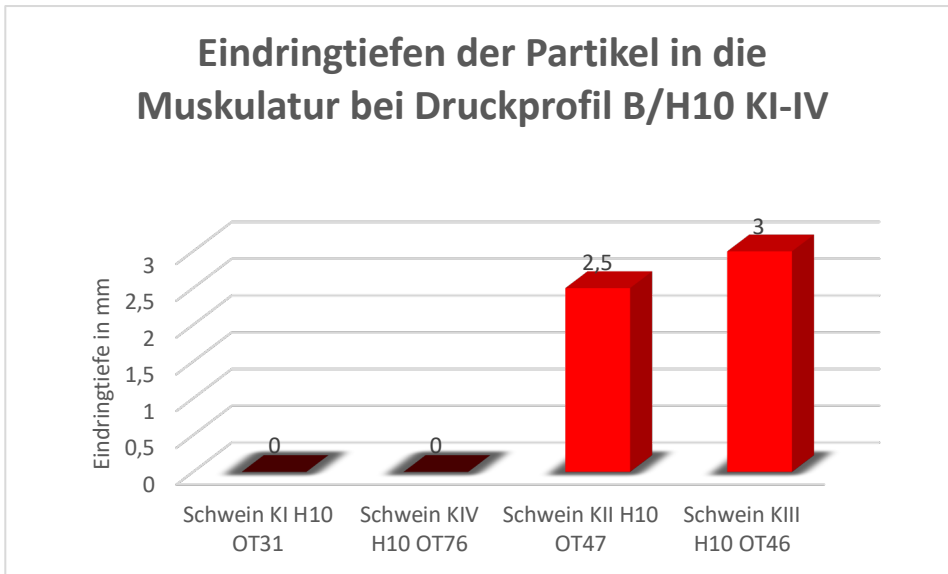


Abbildung 44 Maximale Eindringtiefen in den Muskel der Urethra im Injektionsbereich H10 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B

Die Partikelsuspension drang im Mittel 8,63 mm in vertikaler Richtung und 7,34 mm in horizontaler Richtung ein. Hinsichtlich des Partikelclusters ergaben sich die Mittelwerte 7,64 mm für die Höhe und 3,44 mm für die Breite.

Vergleicht man die Mittelwerte mit dem Injektionsbereich 5 cm kaudal der Harnblasenmündung, so zeigt sich, im Gegensatz zur Versuchsreihe HI-VI, dass bezüglich der Eindringtiefe der Partikelsuspension ein ausgeglichenes Verhältnis herrscht (Abb. 45). Andere Umstände ergeben sich bei der Auswertung der Eindringbreite der Partikelsuspension. Hier dominieren die Werte des Injektionsbereiches H5 (Abb. 46).

Vergleicht man die Ausdehnung des Partikelclusters bei H10 mit der Ausdehnung des Clusters im proximalen Bereich, ist feststellbar, dass hinsichtlich der Clusterhöhe die Werte bei H5 denen von H10 unterliegen. Bezüglich der Clusterbreite überwiegen die Werte von H5 (Abb. 47 und 48).

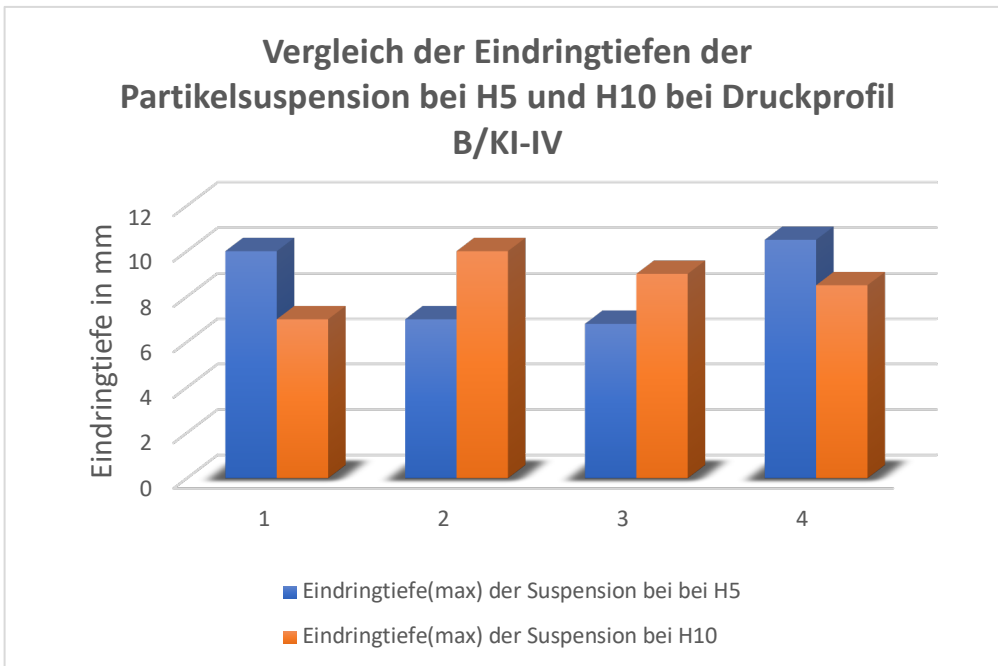


Abbildung 45 Vergleich der Eindringtiefen der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B

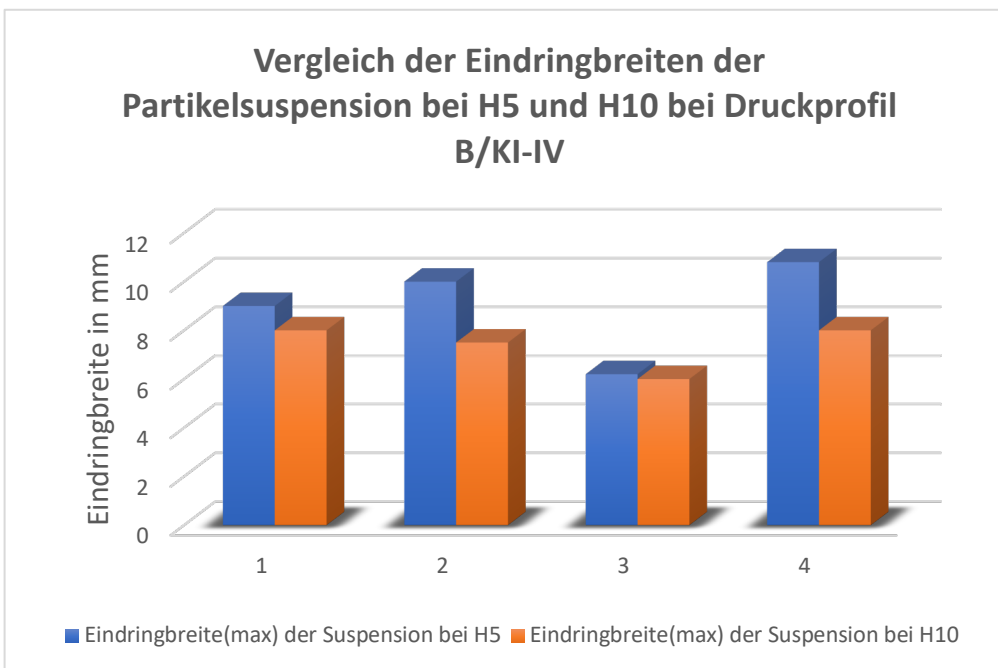


Abbildung 46 Vergleich der Eindringbreiten der Partikelsuspension zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B

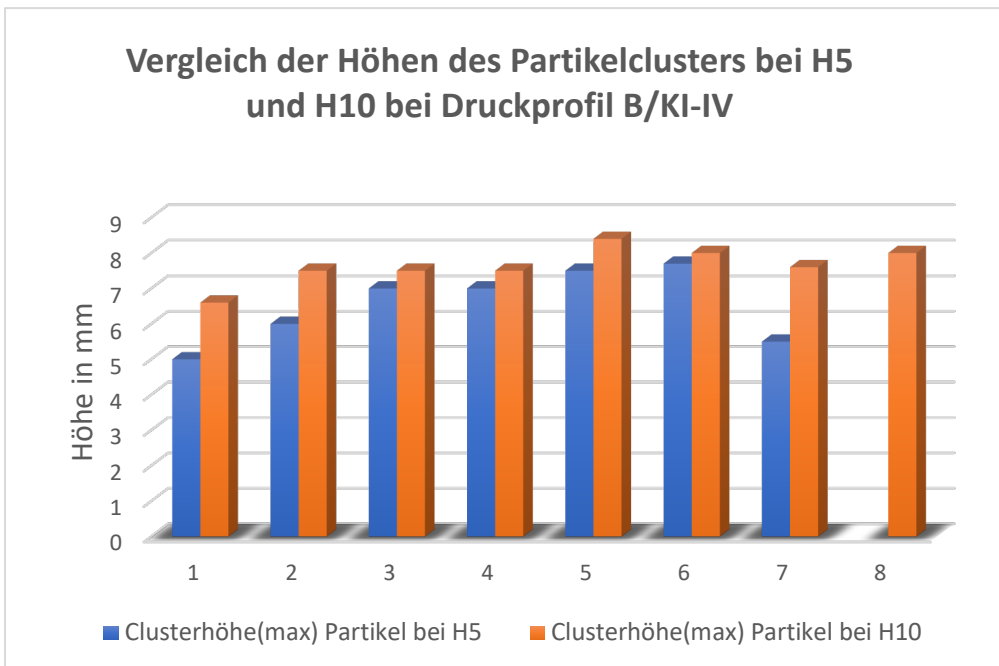


Abbildung 47 Vergleich der Partikelclusterhöhen zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B

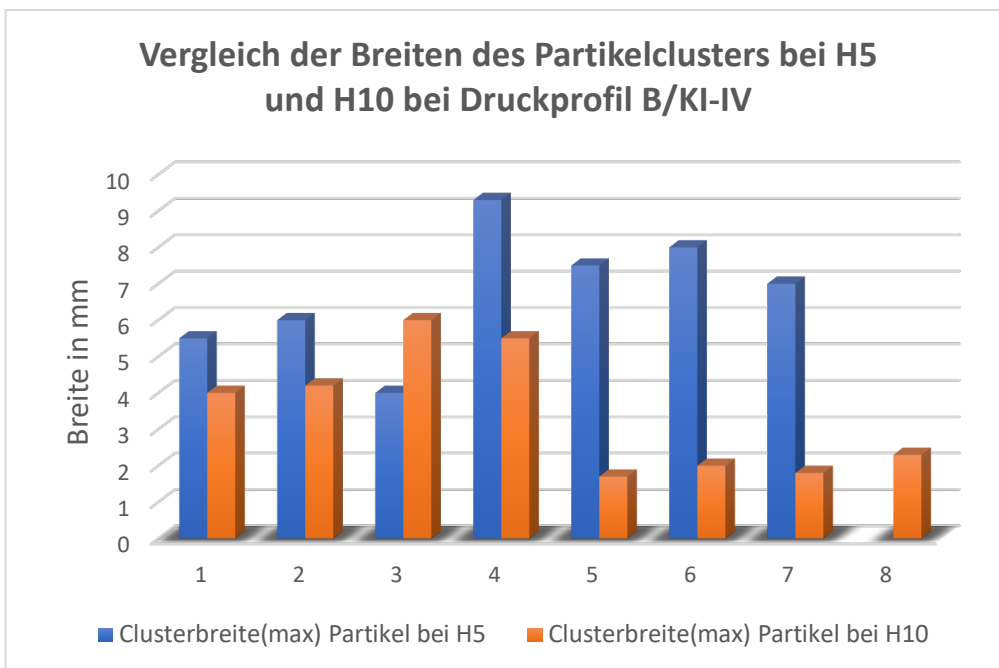
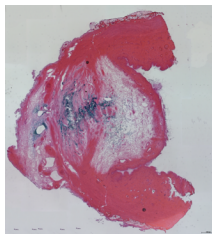


Abbildung 48 Vergleich der Partikelclusterbreiten zwischen dem Injektionsbereich H5 und H10 bei den Versuchstieren Schwein KI-IV/Druckprofil B

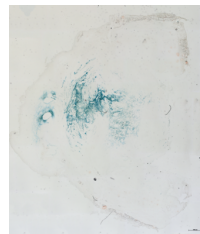
3.2.2.3 Ergebnisse der Wasserstrahlinjektion mit beigemischter Histofarbe der Versuchsreihe Schwein KI-IV

Auch in dieser Versuchsreihe führt die beigefügte Histofarbe dazu, dass der Farbstoff ausschließlich die Nanopartikel anfärbt. Folglich deckt sich auch hier, wie schon in der Versuchsreihe mit den Schweinen JI-IV, die Verteilung der Partikel mit dem Anfärbebereich des blauen Farbstoffes (Abb. 28). Der flüssige Anteil der injizierten Suspension blieb folglich ebenfalls ohne blaue Färbung.

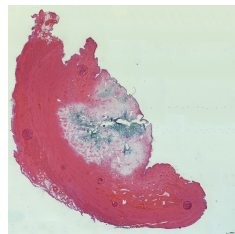
3.2.2.4 Übersicht der mit Druckprofil B durchgeführten Wasserstrahlinjektion an den Versuchstieren Schwein KI-IV



Schwein KI H5
OT22



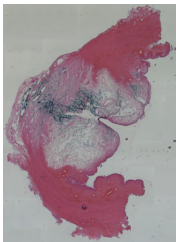
Schwein KI H5
OT23



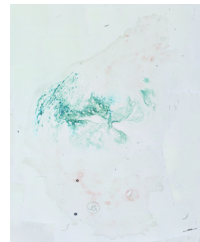
Schwein KI H10
OT31



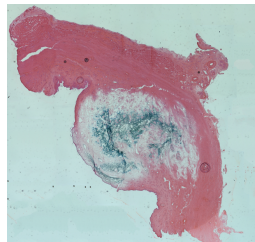
Schwein KI H10
OT32



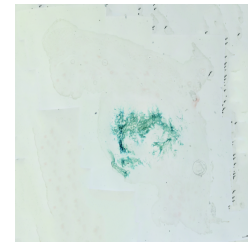
Schwein KII H5
OT59



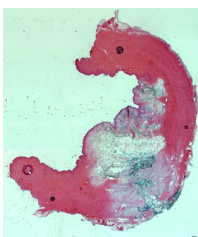
Schwein KII H5 OT
58



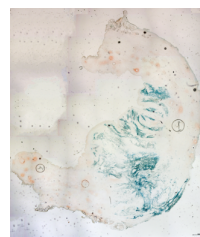
Schwein KII H10
OT47



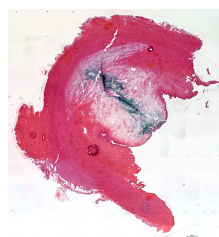
Schwein KII H10
OT46



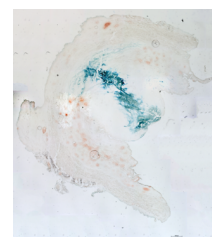
Schwein KIII H5
OT50



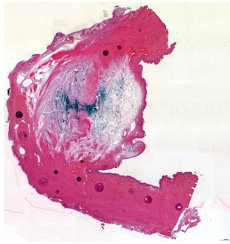
Schwein KIII H5
OT49



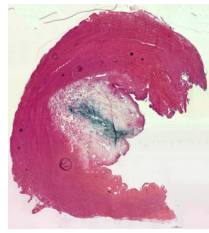
Schwein KIII H10
OT46



Schwein KIII H10
OT 47



Schwein KIV H5
OT55



Schwein KIV H10
OT76

Abbildung 49 Übersicht der Versuchsreihe mit den Schweinen KI-IV mit Druckprofil B; links: Injektionsbereich H5 (mit HE Färbung und ohne Färbung); rechts: Injektionsbereich H10 (mit HE-Färbung und ohne Färbung); Die Einzelbilder von Schwein KIV H5 OT56 und Schwein KIV H10 OT77 konnten nicht zu einer Übersichtsaufnahme zusammengefügt werden; der Maßstabsbalken in den einzelnen Bildern ist mit 1000 μ m beschriftet

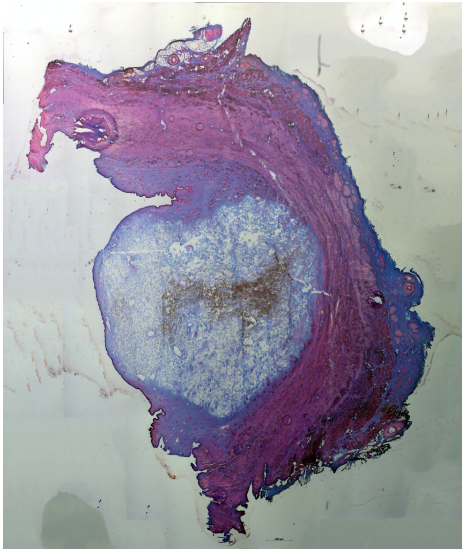
4 Übersicht und Vergleich der Ergebnisse

Betrachtet man alle Versuchsreihen und vergleicht die Veränderungen der Muskulatur, die nach der Wasserstrahlinjektion entstanden sind, so ist auffällig, dass bei beiden Druckprofilen (DP A und DP B) die gleichen muskulären Variationen auftreten. Je nach individueller Muskelbeschaffenheit kommt es zu einer Auffächerung der glatten Muskulatur in Richtung Lumen und zu einer basalen Kompression. Diese wird wahrscheinlich durch die Gewebsspannung verursacht, die durch die submuköse Blase bedingt ist. Ist die Traumatisierung ausgeprägter, erkennt man eine markantere Auffächerung lumenwärts, die zu einer Dehnung der Muskulatur führt. Dieses Phänomen lässt sich bei beiden Druckprofilen vor allem im Injektionsbereich H5 feststellen. Im direkten Vergleich zwischen Druckprofil A und B sind die muskulären Variationen von gleicher Qualität, jedoch sind diese bei Druckprofil B stärker ausgeprägt. Zusätzlich dazu zeigt sich bei Injektionen mit DP B sowohl bei H5, als auch bei H10 ein weiteres Phänomen: Neben der basalen Kompression findet sich nur unmittelbar im Bereich der injizierten Partikel eine Auffächerung in Richtung Lumen (Abb. 50). Des Weiteren konnten mit DP B vier Durchschüsse im Bereich H5 dokumentiert werden, was mit DP A nur einmal beobachtet wurde. Folglich führt die Wasserstrahlinjektion mit DP B bei dünneren Muskelschichten zu keiner sicheren Applikation der Partikel in den Sphinkterkomplex von Kadaverproben. Bei dieser Druckstärke ist mit einem Durchschuss zu rechnen. Somit ist eine gezielte Applikation von Flüssigkeiten in die Muskulatur nicht sichergestellt. Da der

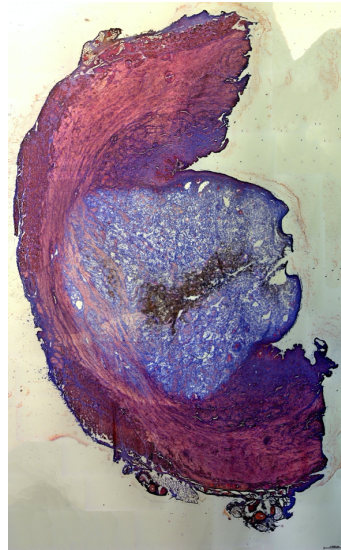
Durchschuss mit DP A nur im proximalen Anteil der Harnröhre mit ohnehin dünner Muskelschichtstärke und nur einmal stattfand, kann man davon ausgehen, dass in diesem einen Fall eine individuell wenig widerstandsfähige Urethra vorlag und somit die Durchschusswahrscheinlichkeit mit DP A geringer ist. Diese positive Auswirkung hinsichtlich der Traumatisierung der Muskulatur wirkt sich jedoch ungünstiger auf das Eindringen der Nanopartikel in die Muskelschicht aus.

Die Muskelbeteiligungsrates bei DP A ist vor allem im distalen Injektionsbereich H10 mit maximal 27 % signifikant geringer. Vergleicht man die Werte mit denen von DP B, so wurden bei jeder Injektion, unabhängig vom Injektionsbereich, deutlich höhere Prozentwerte erzielt oder stets die Muskelschicht erreicht (Abb. 51). Bezüglich der Eindringtiefe der Partikel scheint sich die Injektion mit höheren Druckwerten positiver auszuwirken. Mit Druckprofil B wurden durchgehend größere Tiefen erreicht, wobei die höchsten Werte im Injektionsbereich H5 gemessen wurden (Abb. 52).

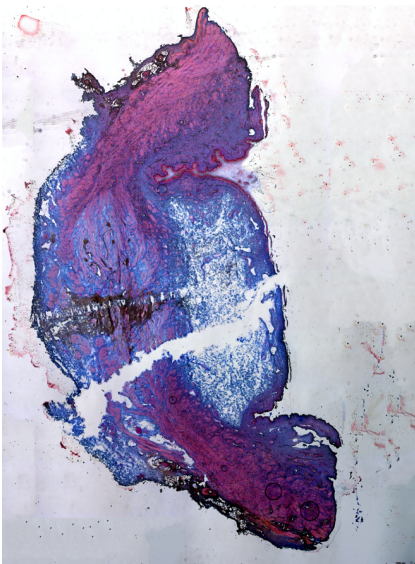
Bewertet man versuchsübergreifend die Eindringtiefen der flüssigen Phase der Partikelsuspension, kristallisieren sich ähnliche Verteilungsmuster für die Injektionsbereiche H5 und H10 mit DP A und B heraus (Abb. 53). Unabhängig von der Effektstärke zeichnet sich jedoch ab, dass stets höhere Werte bei gleichem Injektionsdruck im Bereich H10 im Vergleich zu H5 auftreten. Auch hinsichtlich der Auswertung der Eindringbreite gleichen sich die Verteilungsmuster für die beiden Injektionsbereiche mit den Druckprofilen A und B. Das Maximum wird mit DP A im Bereich H5 erreicht (Abb. 54). Passend dazu dominieren, gegensätzlich zu den Werten für die maximale Eindringtiefe, in drei der vier Versuchsreihen die Werte am Injektionsbereich H5. Die beiden Phänomene könnten durch die massivere Muskulatur im Bereich H10 erklärt werden. Durch den sich hier vorfindenden erhöhten muskulären Widerstand, könnte die kinetische Energie des Wasserstrahls stärker reflektiert werden und dadurch zu einer höheren submukösen Blase führen. Gegensätzlich dazu wird, gemäß dieser Hypothese, bei der relativ geringen Muskelstärke im proximalen Teil der Urethra, die Bewegungsenergie absorbiert und in eine horizontale Richtung weitergeleitet, weshalb sich eine breitere Blase bildet.



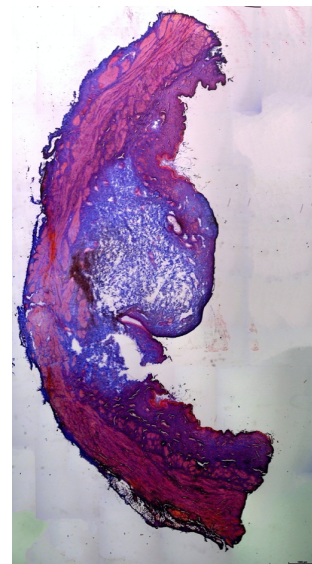
Übersichtsaufnahme Schwein GII H10 OT54



Übersichtsaufnahme Schwein HV H10 OT62



Übersichtsaufnahme Schwein HIV H5 OT27



Übersichtsaufnahme Schwein HV H5 OT46

Abbildung 50 Vergleich der histologischen Präparate der Urethra der Versuchstiere Schwein GII, HIV und HV nach der Wasserstrahlinjektion (Färbung Azan); links oben: Übersichtsaufnahme mit typischer leichter lumenwärtiger Auffächerung und basaler Kompression mit DP A; rechts oben: stark ausgeprägte Auffächerung mit DP B und starker basaler Kompression; links unten: typische Verbreiterung der Muskulatur durch starke Auffächerung mit DP B; rechts unten: zusätzliches Phänomen mit DP B, kombinierte Verbreiterung der Muskulatur im Bereich der Partikel und basale Kompression im restlichen Bereich; (Maßstabsbalken = 1000µm);

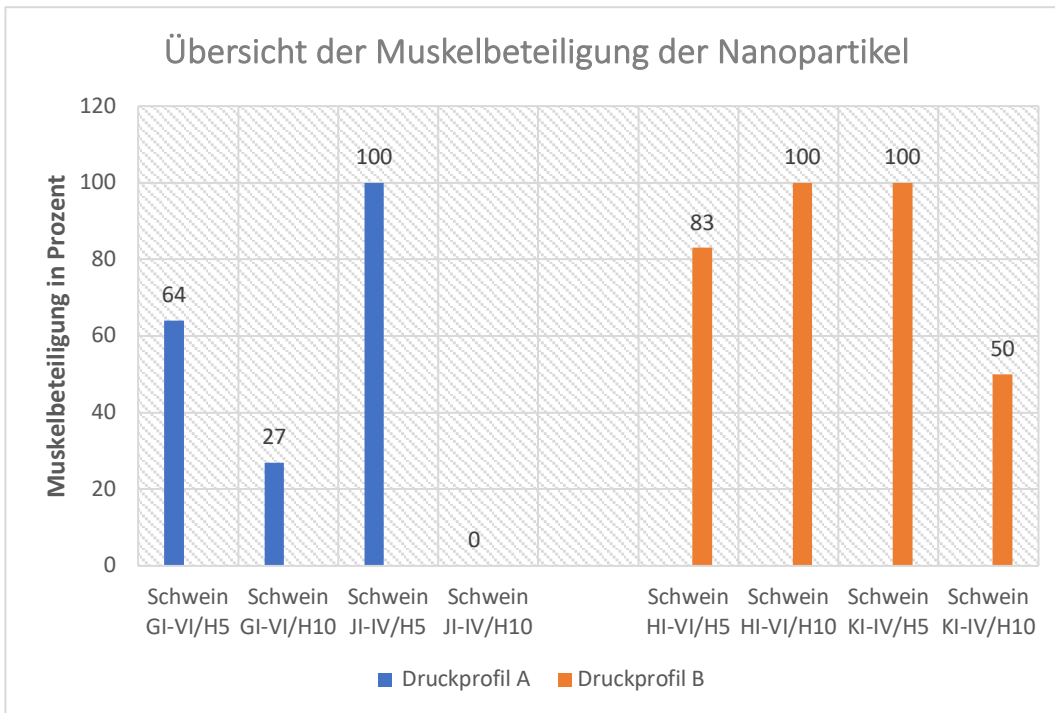


Abbildung 51 Auftreten von Nanopartikeln in der Muskulatur der Urethra bei Druckprofil A und B in der Übersicht

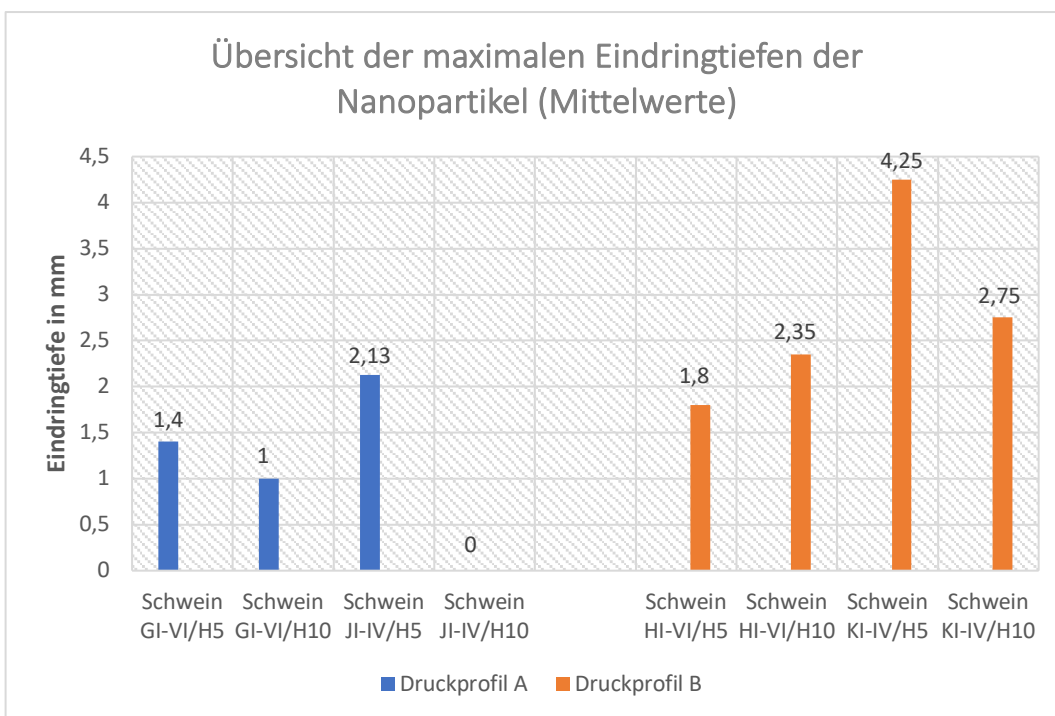


Abbildung 52 Übersicht der maximalen Eindringtiefen der Nanopartikel in den Muskel der Urethra für die Druckprofile A und B

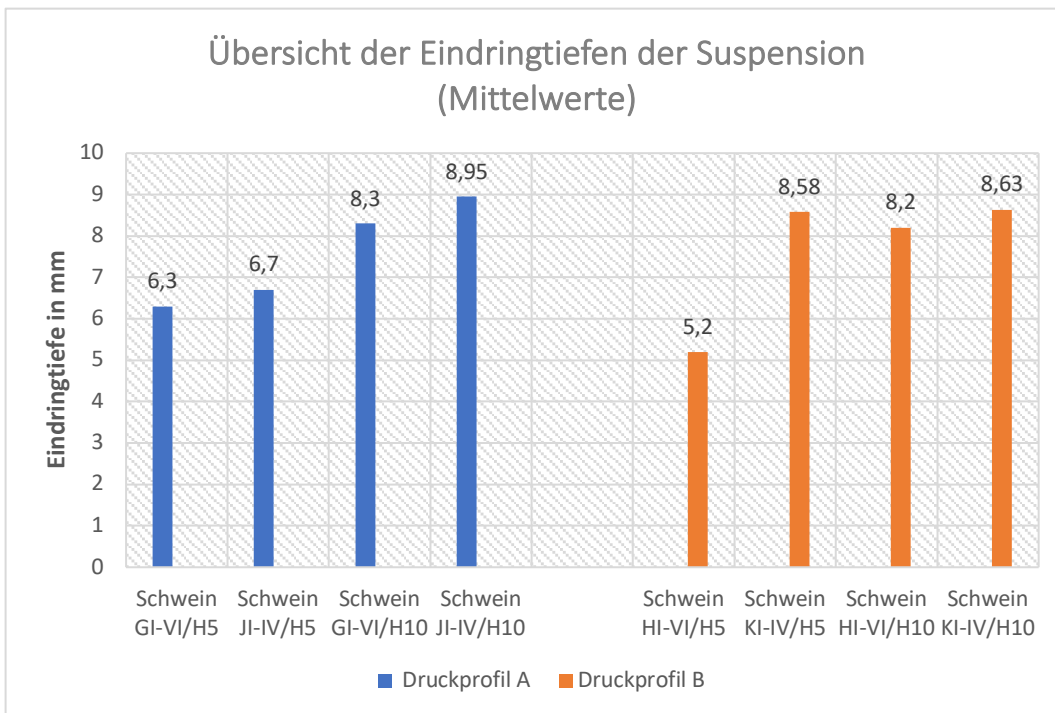


Abbildung 53 Übersicht der mittleren Eindringtiefen der Partikelsuspension in den submukösen Bereich für die Druckprofile A und B

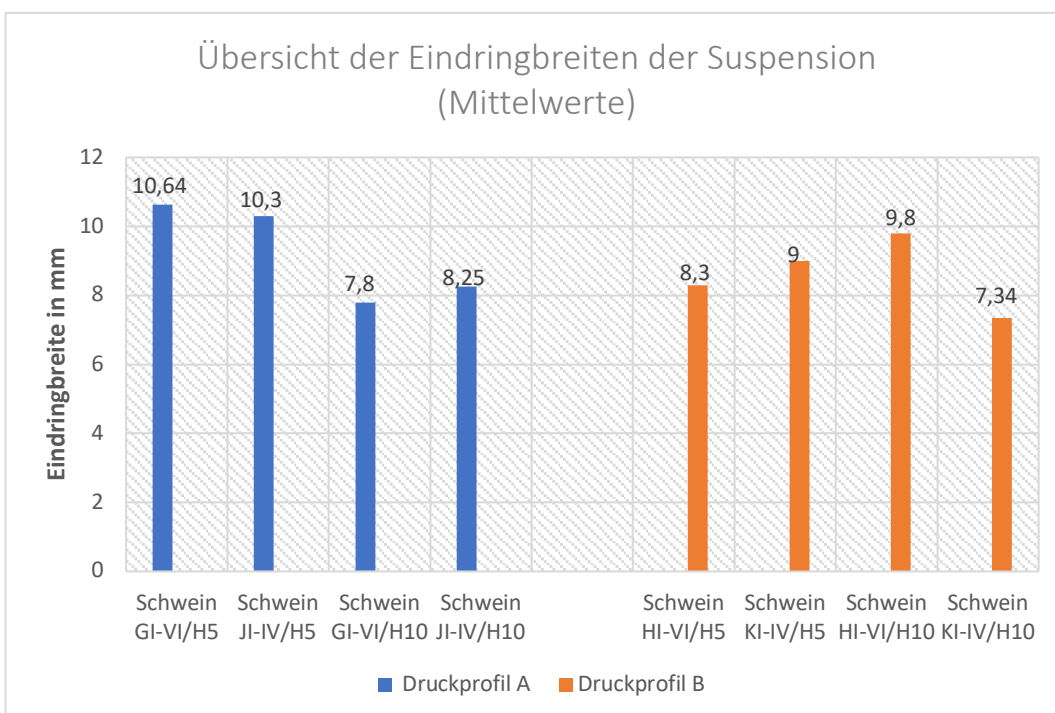


Abbildung 54 Übersicht der mittleren Eindringbreiten der Partikelsuspension in den submukösen Bereich für die Druckprofile A und B

Die genaue Analyse der Ausdehnung des Partikelclusters ergab keine klaren Tendenzen. Hierfür ist möglicherweise die begrenzte Anzahl an Einzelversuchen verantwortlich. Jedoch war auffällig, dass hinsichtlich der Breite des Clusters sowohl bei DP A als auch bei DP B das Maximum im Injektionsbereich H5 in den Versuchsreihen mit beigemischter Tinte erreicht wurde (Abb. 55). Ähnlich verhalten sich die Mittelwerte für die Partikelclusterhöhe. Hier wurde das Maximum jeweils im Injektionsbereich H10 bei den Injektionen mit Histofarbe erreicht (Abb. 56).

In allen Versuchsreihen mit beigemischter Histofarbe war erkennbar, dass sich der blaue Farbstoff an die injizierten Partikel anheftete und sich dadurch entsprechend der Ausdehnung des Partikelclusters im submukösen Bindegewebe und der Muskulatur verteilte. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den Injektionen mit DP A und B festgestellt werden.

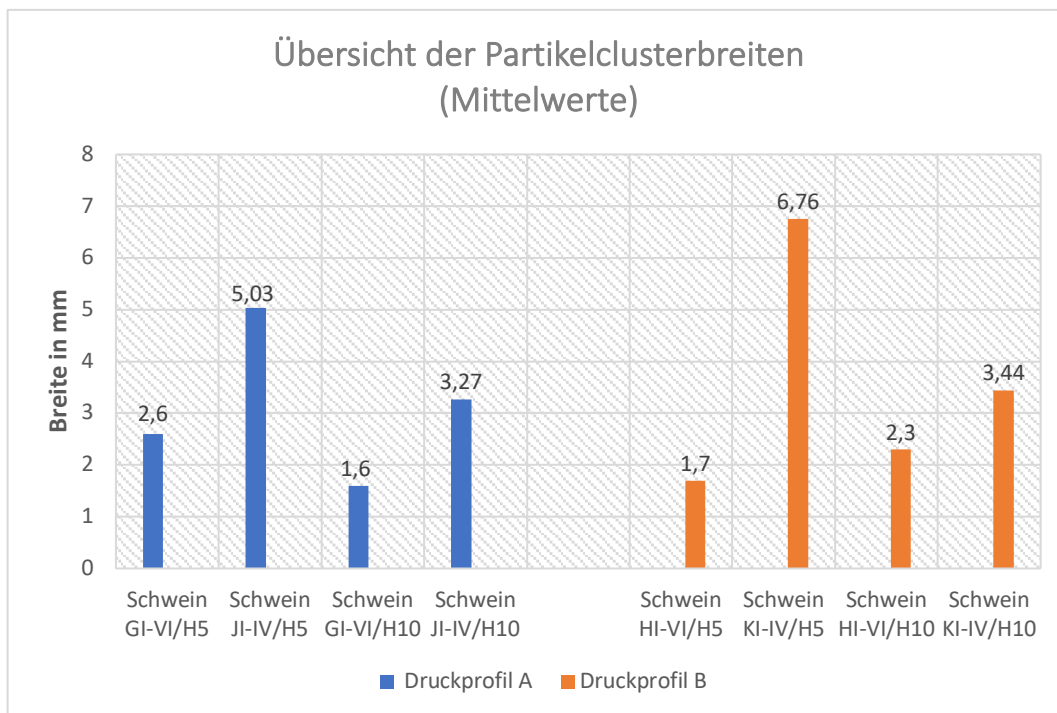


Abbildung 55 Übersicht der mittleren Breiten des Partikelclusters für die Druckprofile A und B

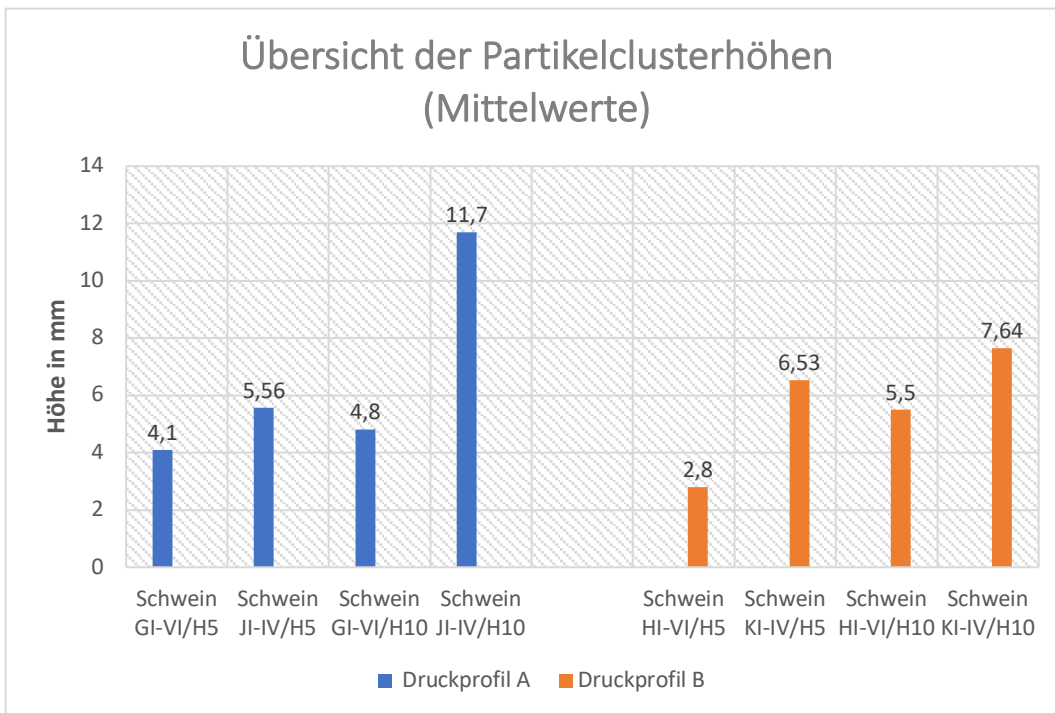


Abbildung 56 Übersicht der mittleren Höhen des Partikelclusters für die Druckprofile A und B

5 Diskussion

Beurteilt man die gewonnenen Ergebnisse, so stellen sich im Hinblick auf die klinische Anwendung und die anatomischen Veränderungen, die durch die Wasserstrahlinjektion entstehen, einige Fragen, die diskutiert werden müssen.

5.1 Abhängigkeit von der individuellen Muskelbeschaffenheit und Auswirkungen auf die Muskulatur

Vergleicht man die Auswirkungen der Wasserstrahlinjektion, unabhängig vom angewendeten Druck, so stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß die individuelle Struktur der Muskulatur des Patienten oder der Patientin das Ergebnis einer Wasserstrahlinjektion beeinflusst. So kann ein relativ stark ausgeprägter interner Sphinkter dazu führen, dass höhere Drücke benötigt werden, um Flüssigkeiten, Partikel oder Zellen in die optimale Schichttiefe zu transportieren.

In der vorliegenden Studie also nahe oder in den externen Sphinktermuskel. Natürlich dürfen wiederum dabei die entstehenden Schäden des Urothels, der

Submukosa und der Muskulatur selbst nicht außer Acht gelassen werden. Andererseits könnte ein widerstandsfähiger dicker interner Sphinktermuskel bei einer SUI Typ 3 von Vorteil sein, da hier ein Durchschuss bei eingestelltem Druckprofil B relativ unwahrscheinlich ist und Partikel oder auch Flüssigkeiten bzw. Zellen in der glatten Muskulatur der Urethra vorzufinden wären. Außerdem wäre durch den größeren Querschnitt der Muskelschicht des internen Sphinkters die Fehlerquote geringer, da eine große Streuung der injizierten Partikel nicht zwangsläufig zu einer fehlerhaften Applikation in unerwünschte Strukturen führt. Eine Injektion mit hohem Druck könnte daher risikoärmer durchgeführt werden. Um jedoch diese individuellen Faktoren in eine Wasserstrahlinjektion miteinbeziehen zu können, müsste präoperativ eine genaue Analyse der anatomischen Strukturen des jeweiligen Patienten durchgeführt werden. Dies würde ermöglicht werden, indem man eine dreidimensionale „Karte“ mittels MRT und Ultraschall erstellt (Aicher et al., 2014). Anschließend könnte man, basierend auf diesen Daten, ein jeweils individuell angepasstes Druckprofil erstellen und somit eine hochpräzise Wasserstrahlinjektion durchführen.

5.2 Eindringtiefe und Ausdehnung der injizierten Partikel

Die durchgeführten Injektionen zeigen hinsichtlich der Nanopartikellokalisierung deutliche Unterschiede auf, die abhängig vom angewendeten Druckprofil waren. Bei Injektionen mit DP A wurde beobachtet, dass die injizierten Partikel zu einem deutlich geringeren Prozentsatz in den Muskel eingedrungen sind beziehungsweise den Muskel gar nicht erreicht haben. Zwar wurde bei der Anwendung von Druckprofil B hingegen stets die Muskelschicht erreicht, jedoch kam es auch zu einigen Durchschüssen der Urethra. Somit kann mit der Effektstärke von DP B keine sichere Wasserstrahlinjektion in die Muskelschicht der Urethra von porcinen Kadavergewebe gewährleistet werden, ohne dabei das Risiko ausschließen zu können, dass Partikel oder andere Stoffe in den „periurethralen Bereich appliziert“ werden, d.h. durch das Gewebe hindurchgesprüht werden. Weiterhin könnte ein Durchschuss weitere Schäden im Gewebe außerhalb der Urethra bewirken. So könnte dies zur Schädigung von nervalen Strukturen oder Gefäßen führen, woraus periurethrale Hämatome und

Nervenausfälle resultieren könnten. Somit wäre ein Durchschuss kontraproduktiv und würde die Symptomatik einer SUI sogar verschlechtern.

Um eine risikoarme und gleichzeitig sichere Injektion an den gewünschten Ort gewährleisten zu können, müssen bei einer Injektion am Patienten verschiedene Parameter miteinander berechnet werden.

So wurde in einer in vivo Studie am Modell „Göttinger Minischwein“, in welcher Zellinjektionen mit einer Zytoskopienadel (William’s Nadel, Cook) durchgeführt wurden, festgestellt, dass bei den verwendeten Nadellängen (4 mm und 8 mm) eklatante Unterschiede hinsichtlich der Zelldepotposition in und außerhalb der Urethra zu sehen waren (Abb. 57).

Localization	Close to lumen/urothelial cells (%)	Connective tissue/intermediate (%)	Muscular layer (%)	Outside urethra (%)
8 mm	8	20	13	59
4 mm	12	45	16	27

Abbildung 57 relative Verteilung der Zelldepots in den porcinen Sphinkter nach der Injektion mit einer 4 mm und einer 8 mm langen Nadel; Quelle: (Amend et al., 2017)

Deshalb wurde für die nachfolgenden Injektionen im Tierversuch die Nadellänge auf 5 mm gekürzt. (Amend et al., 2017)

Dieser Wert könnte auch als grobe Orientierung für künftige Wasserstrahlinjektionen im selben Tiermodell verwendet werden. Jedoch muss, wie bei 5.1 beschrieben, unter Umständen die individuelle Muskelbeschaffenheit einzelner Tiere miteinander berechnet werden, weshalb vor allem bei späteren klinischen Studien dreidimensionale Bildgebungsverfahren simultan zur Injektion herangezogen werden sollten, um eine sichere, zielgenaue Applikation von Stoffen oder Zellen in den Sphinkter gewährleisten zu können.

Die Partikel selbst sind im injizierten Bereich und in der entstandenen Blase bei Kadaverinjektionen nicht homogen verteilt, sondern bilden Partikelcluster, die in ihrer Ausdehnung variieren. Zwar konnten bei hoher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop im gesamten Bereich der submukösen Blase einzelne versprengte Partikel gefunden werden, jedoch findet sich der Hauptteil aneinander gedrungen in einem Cluster.

Dieses Phänomen widerspricht den eigentlichen Eigenschaften von Polystyrolnanopartikeln, die durch eine Sulfatgruppe an der Oberfläche negativ geladen sind. Durch die daraus resultierenden Abstoßungskräfte entsteht in der Folge eine Dispersion. (Stein, 2014)

Weshalb sich die Partikel trotzdem zu einem Agglomerat zusammenfügen, ist nicht zu erklären. Eine Hypothese würde annehmen, dass die Reflexion der eindringenden Druckwelle am Randgewebe die Partikel oder auch Tinte in die Mitte der Injektionsblase schwemmen. Genau dieses Phänomen könnte ein Vorteil der Wasserstrahlinjektion sein. Somit könnte stets gewährleistet werden, dass am gewünschten Injektionsort immer eine sehr hohe Partikeldichte vorzufinden ist. Die unterschiedlichen Variationen in der Ausdehnung des Partikelclusters sollten die Partikeldichte nur wenig beeinflussen und können hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit vernachlässigt werden. Diese Annahme müsste jedoch in weiteren Untersuchungen verifiziert werden. Weiterhin hat sich bei den Versuchen mit beigemengter Histofarbe gezeigt, dass sich Partikel und Farbpigmente annähernd gleich verteilen. Dieses Phänomen könnte wiederum auf die negative Oberflächenladung der Partikel zurückgeführt werden. Anscheinend werden die Farbpigmente durch die elektrostatische Anziehung der Partikel angezogen und heften sich an diese an, weshalb das Verteilungsmuster der blauen Farbe, dem der fluoreszierenden Partikel entspricht. Eine weitere Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass eine zu geringe Schichtdicke der Schnitte auf den Objektträgern bewirkt, dass die blaue Farbe der Tinte unter dem Durchlicht nicht sichtbar ist. Auch eine Kombination aus beiden genannten Begründungen wäre denkbar. Weiterhin könnte durch das „Eindeckeln“ der Objektträger der gelöste Farbstoff verdünnt werden und dadurch nicht mehr sichtbar sein. Dagegen spricht jedoch, dass auch vor dem Fixieren mit Deckgläsern sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch die gleiche Verteilung der Histofarbe erkennbar war wie nach dem „Eindeckeln“. Jeder Objektträger, der später gefärbt wurde, wurde vor der Färbung unter dem Lichtmikroskop ausgewählt und begutachtet. Somit können Auswascheffekte beim Färben und „Eindeckeln“ ebenfalls ausgeschlossen werden, da keine

Unterschiede in der Farbverteilung vor und nach dem Färben und „Eindeckeln“ festzustellen waren.

5.3 Nebeneffekte einer Wasserstrahlinjektion

5.3.1 Ausdehnung der Partikelsuspension

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Flüssigkeit, in der sich die Partikel befinden, nach der Injektion ins Gewebe stärker in Höhe und Breite ausdehnt als die Partikel selbst. In der Folge entstand eine submuköse Blase, die auch makroskopisch prominent sichtbar war. Auffällig dabei war das tendenziell im Bereich H10 höhere Blasen unabhängig vom Druckprofil entstanden sind. Im Gegensatz dazu sind im proximalen Bereich tendenziell breitere Blasen beobachtet worden.

Dieses Phänomen könnte auf verschiedene anatomische Begebenheiten zurückgeführt werden. So wurde in einer vorherigen Studie über Zellinjektionen in die Schweineharnröhre von einer nach distal zunehmenden Dicke der Muskulatur berichtet (Abb. 58) (Amend et al., 2017).

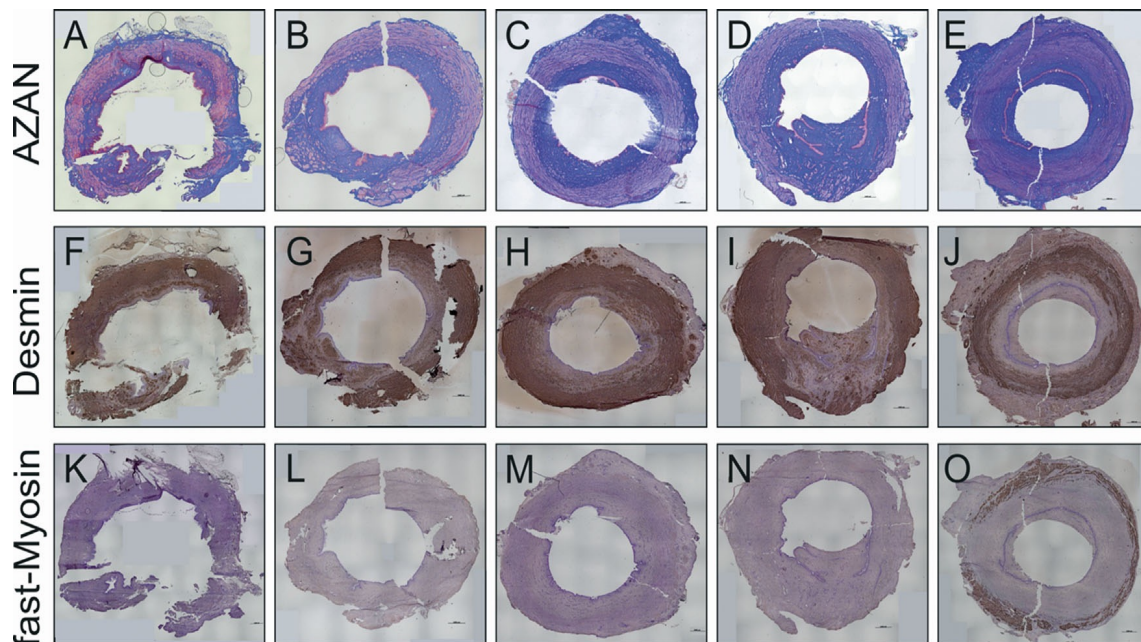


Abbildung 58 Verteilung des Binde- und Muskelgewebes in der Urethra des Schweins von proximal nach distal (von links nach rechts); Azan: blau Bindegewebe, rot Muskulatur; Desmin: braun gefärbte glatte Muskulatur; fast myosin: braun gefärbte quergestreifte Muskulatur nur im distalen Teil der Urethra, Quelle:(Amend et al., 2017)

Außerdem verändert sich die Muskelkonfiguration der Urethra von proximal nach distal. So befindet sich der quergestreifte Sphinkter beim Schwein vor allem ventral und lateral der Harnröhre im distalen Drittel, wohingegen der glatte Muskel im gesamten Bereich der Schweineharnröhre zu finden ist (Abb. 59). Dieser dominiert in den proximalen zwei Dritteln und verliert nach distal hin an Stärke. Im distalen Drittel überwiegt anteilig der externe, quergestreifte Sphinkter. (Zini et al., 2006)

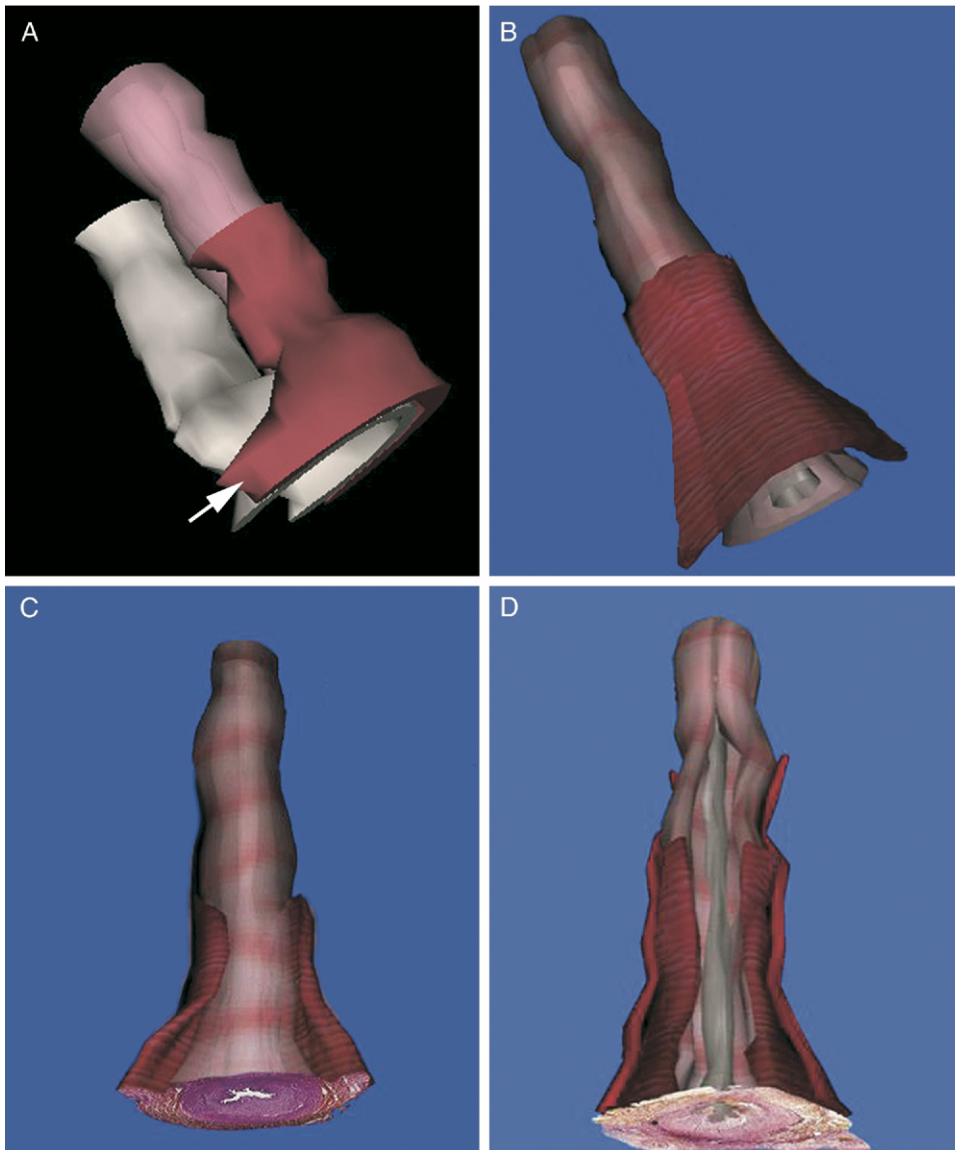


Abbildung 59 3D-Rekonstruktion der weiblichen Schweineharnröhre; pink glatte Muskulatur; rot quergestreifte Muskulatur; A: laterale Ansicht mit grau gefärbter Vagina; B: ventrale Ansicht; C: dorsale Ansicht; D: verletzte Urethra mit zerstörtem externem Sphinkter von ventral; Quelle: (Zini et al., 2006)

So könnte die unterschiedliche Morphologie der submukös entstandenen Blase auf diese anatomische Grundlage zurückgeführt werden. Womöglich absorbiert der glatte Muskel im proximalen Bereich H5 die kinetische Energie anders als im distalen Bereich H10.

In der Zone H5 wurde bei Schweinen in den meisten Fällen auch die höchste Wanddruckstärke sowohl mit einer normalen, urodynamischen Sonde (Aquarius TT, Laborie) als auch mit einem Prototyp einer hochempfindlichen Sonde gemessen, obwohl quergestreifte Muskulatur beim weiblichen Schwein nur distal nachweisbar war (Kelp et al., 2017, Amend et al., 2017).

Folglich könnten die in Zone H5 kräftig ausgebildeten glatten Muskelfasern einen auftreffenden Wasserstrahl in horizontaler Richtung umlenken, wodurch eine breitere Blase entsteht. Im Gegensatz dazu, kommt es bei einem höheren Anteil an quergestreifter Muskulatur, wie im Bereich H10, beziehungsweise bei einer dünneren glatten Muskelschicht zu einer Reflexion der kinetischen Energie. Im Zuge dessen könnten sich höhere submuköse Blasen bilden. Folglich liegt die Befürchtung nahe, dass vor allem Blasen im distalen Anteil eine Art unkontrollierten „bulking effect“ verursachen könnten, wie es bei der iatrogenen Unterspritzung mit Kollagen zu therapeutischen Zwecken gehandhabt wird.

Jedoch zeigt schon die Injektion am Kadaver, dass sich die Blase nach wenigen Minuten verkleinert und es sich eher um ein in vitro Artefakt handelt.

Zudem zeigt die oben erwähnte Studie, in der Stammzellsuspensionen mit einer Nadel in die Urethra injiziert wurden, dass eine Blasenbildung zu keinem erhöhten Wanddruck führt und ein „bulking effect“ erst ab einem Injektionsvolumen von 20 ml festzustellen ist (Amend et al., 2017).

Da bei meiner Versuchsreihe lediglich ein Volumen von 1 ml per Wasserstrahl injiziert wurde, ist diese Problematik bei zukünftigen in vivo Experimenten zu vernachlässigen.

5.4 Injektion von Nanopartikeln zur Medikamentenapplikation

Die durchgeführten Experimente sollten als vorbereitende Untersuchung neue Erkenntnisse für eine künftige Stammzelltherapie oder medikamentöse Therapie für die Belastungsinkontinenz gewinnen.

So könnten Medikamente, verpackt in Nanokapseln, ins Gewebe per Wasserstrahl injiziert werden, die dann zeitverschoben, im Sinne einer „Retardkapsel“ wie bei oral aufgenommenen Medikamenten, freigesetzt werden.

So könnte nach der Resorption der entstandenen Bindegewebsblase eine Freisetzung der verpackten Stoffe oder eine Aufnahme der Nanokapsel selbst in die Zelle über Pinozytose erfolgen, um dann direkt intrazellulär wirken zu können. Eine geeignete Transportform von Wirkstoffen, sogenannte „drug carrier“ könnten nach Chen et al. beispielsweise mesoporöse Nanosilikonpartikel (MSNs) sein. Diese Silikonpartikel lassen sich mit einer bestimmten Konzentration Pluronic F127 derart manipulieren, dass eine maximale Oberfläche mit einer maximalen Porengröße erreicht wird. In diesen stäbchenförmigen Poren können Medikamente wie Ibuprofen mittels Adsorption gespeichert und zeitversetzt freigesetzt werden. Dabei spielen die Länge und die Biegung der stäbchenförmigen Mesoporen eine entscheidende Rolle, in welchem Zeitraum eine Medikamentenfreisetzung erfolgt. (Chen et al., 2012)

Eine Weiterentwicklung dieser „drug carrier“ sind mesoporöse Nanosilikonpartikel mit der Funktion einer pH-sensitiven Medikamentenfreisetzung. Hierfür wurden an den Poreneingängen der MSNs des Typs MCM 41 pH-sensitive Polymerketten befestigt. Diese Polymerketten sind im neutralen und basischen Bereich deprotoniert und hydrophob. Durch van der Waals-Kräfte verkleben die Ketten untereinander und verschließen die Poreneingänge. Im Säuren hingegen werden die Ketten durch Protonierung hydrophil und öffnen die Poren, wodurch es zur Freisetzung der gespeicherten Wirkstoffe kommt (Abb. 60). (Abbaszad Rafi et al., 2016)

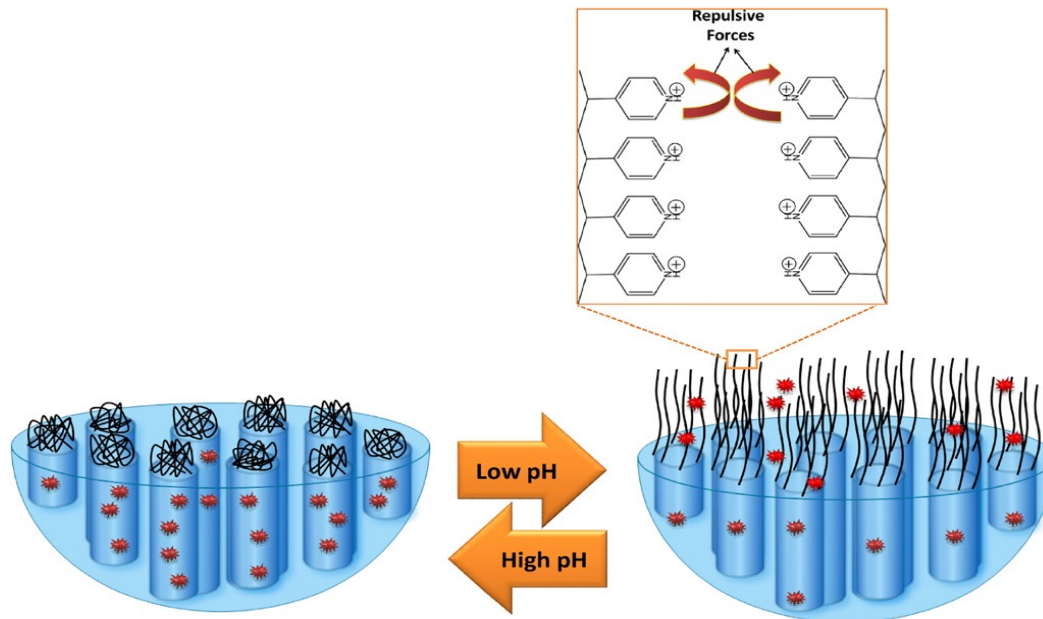


Abbildung 60 Polymerketten als „Torwächter“; links: Polymer deprotoniert und hydrophob, Poren verschlossen; rechts: Polymerketten protoniert und hydrophil, Poren geöffnet; rot: gespeichertes Medikament; Quelle:(Abbaszad Rafi et al., 2016)

Vor allem diese Modifikation könnte für Injektionstechniken mit Wasserstahl interessant sein, da durch den Einschuss ins Gewebe eine Mikroverletzung entsteht, die, wie jede Art einer Verletzung, eine Entzündungsreaktion hervorruft, gefolgt von einem abfallenden pH-Wert. So könnte es genau dann zu einer gesteuerten Freisetzung von Medikamenten kommen.

Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Verpackung von Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet derived growth factor) aus dem Granulomer von Thrombozyten in die oben genannten Nanokapseln, um eine SUI mit Hilfe der Wasserstrahlinjektion zu behandeln.

PDGFs sind Polypeptidketten, die als heterodimer oder homodimer an α - oder β -Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und dann über Tyrosinkinase intrazelluläre, mitogene Signale senden (Heldin and Westermark, 1999).

Dabei spielt PDGF vor allem in der Wundheilung eine entscheidende Rolle. So wird die Chemotaxis von Fibroblasten, glatten Muskelzellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen stimuliert. Durch letztere werden wiederum weitere Wachstumsfaktoren gebildet und sezerniert, wodurch die Gewebsregeneration weiter unterstützt wird. Auch bei Verletzungen von Gefäßen wird dem PDGF eine tragende Rolle zugeschrieben. PDGF-Rezeptoren

werden von den kapillären Endothelzellen exprimiert, wodurch nach der Bindung des Wachstumsfaktors die Angiogenese angestoßen wird. (Heldin and Westermark, 1999)

Des Weiteren ist die Injektion partikelgebundener, neuroprotektiver und neuroregenerativer Stoffe sowie die Injektion von myoregenerativen Substanzen denkbar.

5.5 Injektion von Nanopartikeln als vorbereitende Untersuchung für eine Stammzellinjektion

Neben der Verteilung von Nanopartikeln wurden, wie oben beschrieben, die Injektionstiefen und Auswirkungen auf die Muskulatur bei den verschiedenen Druckprofilen diskutiert. Bezogen auf die Injektion von Zellen können einige wichtige Schlüsse gezogen werden: So zeigt sich, dass die Injektion mit Druckprofil B keine Sicherheit bietet, durchschussfrei Partikel respektive Zellen in den, im Schwein distal gelegenen, quergestreiften Sphinkter zu injizieren. Mit Druckprofil A hingegen kann man nicht garantieren, dass Partikel überhaupt in diesem Modell den Muskel erreichen. So müsste in den geplanten Tierversuchen ein Druckprofil gewählt werden, das zwischen DP A und DP B liegt und die individuelle Muskelbeschaffenheit mitberücksichtigt, um Zellen zielgerichtet in den externen Sphinkter zu applizieren.

Aufgrund früherer Wanddruckmessungen an Schweinen wird bei in vivo Injektionen von Partikeln oder Zellen mit Wasserstrahl als Injektionsort der Bereich H5 favorisiert werden (Kelp et al., 2017).

Allerdings haben frühere Studien gezeigt, dass bei hohen Drücken wie bei DP A und DP B die Zellüberlebensrate sehr gering ist. Schon bei Druckstärken unterhalb der Drücke von DP A und DP B, kam es zu einer beträchtlichen Verringerung der Zellüberlebensrate. (Carolin Gillmann, 2017)

Folglich müssen neue Wege gefunden werden, wie Zellen per Wasserstrahl ausreichend tief injiziert werden können und gleichzeitig eine klinisch relevante Zellüberlebensrate von über 80% zu gewährleisten werden kann.

Hierfür hat sich in einer vor kurzem durchgeführten Studie ein spezielles Druckprofil bewährt. Dabei wurden GFP transduzierte HeLa-Zellen mittels

Wasserstrahl in Kadavergewebe injiziert, wonach hohe Überlebensraten dokumentiert werden konnten (nicht publizierte Ergebnisse AG Aicher; aktuelle Bachelorarbeit Marcel Spring, Universität Tübingen; aktuelle med. Doktorarbeit Vera Rothfuß, Universität Tübingen). Mit zwischenzeitlich nochmals weiterentwickelten Druckprofilen wurden, im Rahmen einer Machbarkeitsstudie der AG Aicher, ADSCs transurethral in den Sphinkter von jungen weiblichen Landschweinen gesprüht. Adverse Effekte wie Blut im Urin, Harnverhalt, Miktionsstörungen oder Verhaltensstörungen nach diesen Behandlungen wurden bei den bislang 20 Schweinen nicht beobachtet. Vorläufige histologische Analysen unmittelbar und bis zu drei Tagen nach den Zellinjektionen mit der Wasserstrahltechnologie lassen den Schluss zu, dass morphologisch intakte Zellen nachweisbar waren.

Mit diesen vielversprechenden Ergebnissen könnte in Zukunft eine Kombinationsinjektion ein weiterer Ansatz für eine Therapie der SUI sein: Die Injektion von Zellen mit in Nanokapseln verpackten Medikamenten oder mit gelösten Zytokinen im Injektionsmedium.

Interessant wäre vor allem die Erforschung der Kombinationswirkung von MSCs und PDGFs. Diese Doppelwirkung könnte einerseits postoperative Beschwerden aufgrund der gesteigerten Wundheilung durch die Wirkung der Wachstumsfaktoren lindern und gleichzeitig zu einer schnelleren Regeneration des Sphinkters durch die Wirkung der mesenchymalen Stammzellen führen.

6 Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde die Injektion von Nanopartikeln mit Wasserstrahl in die Urethra von Schlachtschweinen untersucht. Die Injektion wurde hierbei mit zwei verschiedenen Druckprofilen durchgeführt. Es wurden Kryoschnitte hergestellt, gefärbt und histologisch ausgewertet, um die Eindringtiefe der Nanopartikel in die Mukosa und in den Muskel, die Verteilung und die Größe der Partikelcluster und die muskulären Veränderungen nach Wasserstrahlanwendung genauer zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Druckprofil A nicht sicher gewährleistet werden kann, dass Partikel überhaupt den Muskel erreichen. Wenn injizierte

Nanopartikel die Muskelschicht erreicht haben, genügt die erreichte Eindringtiefe in den meisten Fällen nicht, um Partikel in die quergestreifte Muskulatur des externen Sphinkters zu applizieren.

Bei Anwendung des Druckprofils B hingegen werden zwar stets Partikel in die Muskelschicht injiziert, jedoch kommt es zu einem deutlich höheren Anteil an Durchschüssen und dadurch zu Partikeldepots im Bindegewebe außerhalb der Urethra. Außerdem spielt die individuelle Muskeldicke eine entscheidende Rolle. Insofern sollten vor allem bei künftigen in vivo Studien dreidimensionale Karten als Optimierung der Bildgebung und der individuellen Druckanpassung als Hilfsmittel herangezogen werden.

Weiterhin zeigte sich nach der Injektion eine gewisse Traumatisierung der Muskulatur. Dabei konnten vorrangig eine Auffächerung der Muskelstränge in Richtung Lumen mit einer gleichzeitigen basalen Kompression festgestellt werden. Auch war eine Verbreiterung der Muskulatur, bedingt durch eine sehr starke Auffächerung, des Öfteren erkennbar. Zudem konnte in einigen Fällen eine Kombination aus muskulärer Auffächerung, Verbreiterung und Kompression dokumentiert werden. Diese Phänomene sollten ebenfalls in künftigen Studien in Bezug auf die Regenerationsfähigkeit der Muskulatur, vor allem bei der Injektion von Zellen und Wachstumsfaktoren, genauer untersucht werden.

Die Partikelcluster im Kadavergewebe weisen eine sehr unterschiedliche Morphologie auf, die in ihrer Ausdehnung keinem bestimmten Muster folgt. Lediglich ein kompaktes, dichtes Partikelagglomerat konnte entweder in der Mitte der Injektionsblase oder, im Falle der Injektion in die Muskulatur, innerhalb des Muskels dokumentiert werden. Dieses weist unter dem Fluoreszenzfilter im Durchlicht eine starke grüne Färbung auf, was auf eine hohe Partikeldichte schließen lässt. In der Folge kann man die Verteilung der Partikel und die Morphologie des Partikelclusters im Hinblick auf klinische Studien vernachlässigen, da stets hohe Partikeldichten in den injizierten Bereichen beobachtet wurden und der Applikationsort mehr vom voreingestellten Druckprofil abhängig ist.

Bei Injektionsversuchen mit beigemischter Histofarbe war erkennbar, dass sich der blaue Farbstoff analog zum Partikelcluster verteilte.

Prinzipiell ist eine Injektion von Nanopartikeln per Wasserstrahl ein interessanter Ansatz, der durchaus in Zukunft von klinischer Bedeutung sein kann und in Hinblick auf eine Therapieoption einer Stressinkontinenz eine wesentliche Rolle spielen könnte. Vor allem die Kombinationsinjektion von Stromazellen und Nanomedikamenten beziehungsweise von Wachstumsfaktoren ist ein interessanter Ansatzpunkt. Speziell die Fortschritte mit nochmals verbesserten Druckprofilen in den laufenden in vivo Studien mit Zellinjektionen scheinen vielversprechend zu sein und lassen auf künftige Erfolge hoffen.

7 Literaturverzeichnis

ABBASZAD RAFI, A., MAHKAM, M., DAVARAN, S. & HAMISHEHKAR, H. 2016. A Smart pH-responsive Nano-Carrier as a Drug Delivery System: A hybrid system comprised of mesoporous nanosilica MCM-41 (as a nano-container) & a pH-sensitive polymer (as smart reversible gatekeepers): Preparation, characterization and in vitro release studies of an anti-cancer drug. *Eur J Pharm Sci*, 93, 64-73.

ACHTARI, C., MEYER, S. & DE GRANDI, P. 2006. [Bulking agents and their place in the treatment of urinary stress incontinence]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch*, 46, 39-44.

AICHER, W. K., HART, M. L., STALLKAMP, J., KLUNDER, M., EDERER, M., SAWODNY, O., VAEGLER, M., AMEND, B., SIEVERT, K. D. & STENZL, A. 2014. Towards a Treatment of Stress Urinary Incontinence: Application of Mesenchymal Stromal Cells for Regeneration of the Sphincter Muscle. *J Clin Med*, 3, 197-215.

ALTMAN, D., FORSMAN, M., FALCONER, C. & LICHTENSTEIN, P. 2008. Genetic influence on stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Eur Urol*, 54, 918-22.

AMEND, B., KELP, A., VAEGLER, M., KLUNDER, M., FRAJS, V., KLEIN, G., SIEVERT, K. D., SAWODNY, O., STENZL, A. & AICHER, W. K. 2017. Precise injection of human mesenchymal stromal cells in the urethral sphincter complex of Gottingen minipigs without unspecific bulking effects. *Neurourol Urodyn*, 36, 1723-1733.

AMEND, B., KRUCK, S., BEDKE, J., RITTER, R., ARENAS DA SILVA, L., CHAPPLE, C., STENZL, A. & SIEVERT, K. D. 2013. [Urinary incontinence in the elderly: what can and should be done?]. *Urologe A*, 52, 805-12.

BRAUN, A. K. & PFISTERER, M. H. 2008. [Urinary incontinence]. *Ther Umsch*, 65, 449-54.

BREITBACH, M., BOSTANI, T., ROELL, W., XIA, Y., DEWALD, O., NYGREN, J. M., FRIES, J. W., TIEMANN, K., BOHLEN, H., HESCHELER, J., WELZ, A., BLOCH, W., JACOBSEN, S. E. & FLEISCHMANN, B. K. 2007. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*, 110, 1362-9.

BURDZINSKA, A., CRAYTON, R., DYBOWSKI, B., IDZIAK, M., GALA, K., RADZISZEWSKI, P. & PACZEK, L. 2013. The effect of endoscopic administration of autologous porcine muscle-derived cells into the urethral sphincter. *Urology*, 82, 743 e1-8.

BURDZINSKA, A., CRAYTON, R., DYBOWSKI, B., KOPERSKI, L., IDZIAK, M., FABISIAK, M., PACZEK, L. & RADZISZEWSKI, P. 2012. Urethral distension as a novel method to simulate sphincter insufficiency in the porcine animal model. *Int J Urol*, 19, 676-82.

CARLSON, K. V. 2008. Suburethral slings for postprostatectomy stress urinary incontinence. *Can Urol Assoc J*, 2, 532-5.

CHEN, G. D. 2007. Pelvic floor dysfunction in aging women. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 46, 374-8.

CHEN, Z., LI, X., HE, H., REN, Z., LIU, Y., WANG, J., LI, Z., SHEN, G. & HAN, G. 2012. Mesoporous silica nanoparticles with manipulated microstructures for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 95, 274-8.

CHERMANSKY, C. J., TARIN, T., KWON, D. D., JANKOWSKI, R. J., CANNON, T. W., DE GROAT, W. C., HUARD, J. & CHANCELLOR, M. B. 2004. Intraurethral muscle-derived cell injections increase leak point pressure in a rat model of intrinsic sphincter deficiency. *Urology*, 63, 780-5.

CHERMANSKY, C. J. & WINTERS, J. C. 2012. Complications of vaginal mesh surgery. *Curr Opin Urol*, 22, 287-91.

DE COPPI, P., CALLEGARI, A., CHIAVEGATO, A., GASPAROTTO, L., PICCOLI, M., TAIANI, J., POZZOBON, M., BOLDRIN, L., OKABE, M., COZZI, E., ATALA, A., GAMBA, P. & SARTORE, S. 2007. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. *J Urol*, 177, 369-76.

DU, X. W., WU, H. L., ZHU, Y. F., HU, J. B., JIN, F., LV, R. P., SUN, S., WANG, H. Y. & XU, J. W. 2013. Experimental study of therapy of bone marrow mesenchymal stem cells or muscle-like cells/calcium alginate composite gel for the treatment of stress urinary incontinence. *Neurourol Urodyn*, 32, 281-6.

EBERLI, D., ANDERSSON, K. E., YOO, J. J. & ATALA, A. 2009. A canine model of irreversible urethral sphincter insufficiency. *BJU Int*, 103, 248-53.

FURUTA, A., JANKOWSKI, R. J., PRUCHNIC, R., YOSHIMURA, N. & CHANCELLOR, M. B. 2007. The potential of muscle-derived stem cells for stress urinary incontinence. *Expert Opin Biol Ther*, 7, 1483-6.

GERULLIS, H., EIMER, C., GEORGAS, E., HOMBURGER, M., EL-BAZ, A. G., WISHAHI, M., BOROS, M., ECKE, T. H. & OTTO, T. 2012. Muscle-derived cells for treatment of iatrogenic sphincter damage and urinary incontinence in men. *ScientificWorldJournal*, 2012, 898535.

GERULLIS, H., QUAST, S., EIMER, C., BAGNER, J. W. & OTTO, T. 2011. Sphincter lesions after radical prostatectomy-evaluation and classification. *J Endourol*, 25, 1075-80.

GILLMANN, C. 2017. Evaluation and optimization of a multi fluid nozzle for the transport of living cells.

HELDIN, C. H. & WESTERMARK, B. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 79, 1283-316.

HERRERA-IMBRODA, B., LARA, M. F., IZETA, A., SIEVERT, K. D. & HART, M. L. 2015. Stress urinary incontinence animal models as a tool to study cell-based regenerative therapies targeting the urethral sphincter. *Adv Drug Deliv Rev*, 82-83, 106-16.

HUNG, S. C., POCHAMPALLY, R. R., CHEN, S. C., HSU, S. C. & PROCKOP, D. J. 2007. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells*, 25, 2363-70.

JIANG, Y., JAHAGIRDAR, B. N., REINHARDT, R. L., SCHWARTZ, R. E., KEENE, C. D., ORTIZ-GONZALEZ, X. R., REYES, M., LENVIK, T., LUND, T., BLACKSTAD, M., DU, J., ALDRICH, S., LISBERG, A., LOW, W. C., LARGAESPADA, D. A. & VERFAILLIE, C. M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41-9.

KARAM, I., DROUPY, S., ABD-ALSAMAD, I., KORBAGE, A., UHL, J. F., BENOIT, G. & DELMAS, V. 2005. The precise location and nature of the nerves to the male human urethra: histological and immunohistochemical studies with three-dimensional reconstruction. *Eur Urol*, 48, 858-64.

KELP, A., ALBRECHT, A., AMEND, B., KLUNDER, M., RAPP, P., SAWODNY, O., STENZL, A. & AICHER, W. K. 2017. Establishing and monitoring of urethral sphincter deficiency in a large animal model. *World J Urol*, 35, 1977-1986.

KERR, L. A. 2005. Bulking agents in the treatment of stress urinary incontinence: history, outcomes, patient populations, and reimbursement profile. *Rev Urol*, 7 Suppl 1, S3-S11.

KIM, Y. T., KIM, D. K., JANKOWSKI, R. J., PRUCHNIC, R., USIENE, I., DE MIGUEL, F. & CHANCELLOR, M. B. 2007. Human muscle-derived cell injection in a rat model of stress urinary incontinence. *Muscle Nerve*, 36, 391-3.

KORAITIM, M. M. 2008. The male urethral sphincter complex revisited: an anatomical concept and its physiological correlate. *J Urol*, 179, 1683-9.

LEE, J. Y., QU-PETERSEN, Z., CAO, B., KIMURA, S., JANKOWSKI, R., CUMMINS, J., USAS, A., GATES, C., ROBBINS, P., WERNIG, A. & HUARD, J. 2000. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol*, 150, 1085-100.

LIN, G., WANG, G., BANIE, L., NING, H., SHINDEL, A. W., FANDEL, T. M., LUE, T. F. & LIN, C. S. 2010. Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*, 12, 88-95.

MAMUT, A. & CARLSON, K. V. 2017. Periurethral bulking agents for female stress urinary incontinence in Canada. *Can Urol Assoc J*, 11, S152-S154.

MEMON, H. U. & HANDA, V. L. 2013. Vaginal childbirth and pelvic floor disorders. *Womens Health (Lond)*, 9, 265-77; quiz 276-7.

MITTERBERGER, M., MARKSTEINER, R., MARGREITER, E., PINGGERA, G. M., FRAUSCHER, F., ULMER, H., FUSSENEGGER, M., BARTSCH, G. & STRASSER, H. 2008a. Myoblast and fibroblast therapy for post-prostatectomy urinary incontinence: 1-year followup of 63 patients. *J Urol*, 179, 226-31.

MITTERBERGER, M., PINGGERA, G. M., PELZER, A., BARTSCH, G., COLLESELLI, D., NEUWIRT, H., GRADL, J., PALLWEIN, L., AIGNER, F., FRAUSCHER, F. & STRASSER, H. 2008b. Comparison of the precision of transurethral endoscopic versus ultrasound-guided application of injectables. *BJU Int*, 101, 245-9.

OELRICH, T. M. 1983. The striated urogenital sphincter muscle in the female. *Anat Rec*, 205, 223-32.

PAN, H. Q., KERNS, J. M., LIN, D. L., LIU, S., ESPARZA, N. & DAMASER, M. S. 2007. Increased duration of simulated childbirth injuries results in increased time to recovery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292, R1738-44.

PENG, C. W., CHEN, J. J., CHANG, H. Y., DE GROAT, W. C. & CHENG, C. L. 2006. External urethral sphincter activity in a rat model of pudendal nerve injury. *Neurourol Urodyn*, 25, 388-96.

PERSSON, J., WOLNER-HANSEN, P. & RYDHSTROEM, H. 2000. Obstetric risk factors for stress urinary incontinence: a population-based study. *Obstet Gynecol*, 96, 440-5.

PERUCCHINI, D., DELANCEY, J. O., ASHTON-MILLER, J. A., GALECKI, A. & SCHAER, G. N. 2002. Age effects on urethral striated muscle. II. Anatomic location of muscle loss. *Am J Obstet Gynecol*, 186, 356-60.

PEYROMAURE, M., SEBE, P., PRAUD, C., DEROCLE, G., POTIN, N., PINSET, C. & SEBILLE, A. 2004. Fate of implanted syngenic muscle precursor cells in striated urethral sphincter of female rats: perspectives for treatment of urinary incontinence. *Urology*, 64, 1037-41.

PFISTERER, M. H., GRIFFITHS, D. J., SCHAEFER, W. & RESNICK, N. M. 2006. The effect of age on lower urinary tract function: a study in women. *J Am Geriatr Soc*, 54, 405-12.

PILZ, G. A., ULRICH, C., RUH, M., ABELE, H., SCHAFER, R., KLUBA, T., BUHRING, H. J., ROLAUFFS, B. & AICHER, W. K. 2011. Human term placenta-derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev*, 20, 635-46.

PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S. & MARSHAK, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.

SIEVERT, K. D., AMEND, B. & STENZL, A. 2007. Tissue engineering for the lower urinary tract: a review of a state of the art approach. *Eur Urol*, 52, 1580-9.

TAKAHASHI, S., HOMMA, Y., FUJISHIRO, T., HOSAKA, Y., KITAMURA, T. & KAWABE, K. 2000. Electromyographic study of the striated urethral sphincter in type 3 stress incontinence: evidence of myogenic-dominant damages. *Urology*, 56, 946-50.

VAEGLER, M., DASILVA, L. A., BENZ, K., AMEND, B., MOLLENHAUER, J., AICHER, W. K., STENZL, A. & SIEVERT, K. D. 2014. [Cell-based therapy to treat stress urinary incontinence: which cell type at what cost?]. *Urologe A*, 53, 354-61.

WALLNER, C., DABHOIWALA, N. F., DERUITER, M. C. & LAMERS, W. H. 2009. The anatomical components of urinary continence. *Eur Urol*, 55, 932-43.

WATANABE, T., MARUYAMA, S., YAMAMOTO, T., KAMO, I., YASUDA, K., SAKA, Y., OZAKI, T., YUZAWA, Y., MATSUO, S. & GOTOH, M. 2011. Increased urethral resistance by periurethral injection of low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells in rats. *Int J Urol*, 18, 659-66.

WIEDEMANN, A. 2016. Wer Ältere Menschen urologisch behandeln will, muss umdenken. *URO-News*, 20(4), 42-46.

YIOU, R., DREYFUS, P., CHOPIN, D. K., ABBOU, C. C. & LEFAUCHEUR, J. P. 2002. Muscle precursor cell autografting in a murine model of urethral sphincter injury. *BJU Int*, 89, 298-302.

ZANNETTINO, A. C., PATON, S., ARTHUR, A., KHOR, F., ITESCU, S., GIMBLE, J. M. & GRONTHOS, S. 2008. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*, 214, 413-21.

ZINI, L., LECOEUR, C., SWIEB, S., COMBRISSE, H., DELMAS, V., GHERARDI, R., ABOU, C., CHOPIN, D. & YIOU, R. 2006. The striated urethral sphincter of the pig shows morphological and functional characteristics essential for the evaluation of treatments for sphincter insufficiency. *J Urol*, 176, 2729-35.

ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P. & HEDRICK, M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7, 211-28.

8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Labor der Klinik für Urologie der Universität Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. W. K. Aicher durchgeführt.

Ich versichere hiermit, dass ich die folgende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet habe.

Sämtliche Versuche wurden von mir selbst in Zusammenarbeit mit Luise Jäger von der Firma Erbe Elektromedizin GmbH durchgeführt.

Die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken entnommenen Aussagen und/oder Inhalte sind als solche gekennzeichnet.

Die eingereichte Arbeit war weder vollständig noch in Teilen Inhalt eines anderen Prüfungsverfahrens oder einer Veröffentlichung.

Name: Florian Wolfgang Beck

Ort/Datum:

Unterschrift:

9 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. W.K. Aicher bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses Thema bearbeiten zu dürfen. Man traf mit allen Fragen und Problemen, die sich über die Zeit angesammelt haben, stets auf ein offenes Ohr. Vielen Dank für die tolle und freundliche Betreuung.

Des Weiteren möchte ich mich beim Team des Forschungslabors bedanken, das mir bei sämtlichen Laborangelegenheiten eine große Hilfe war.

Ein besonderer Dank gilt Luise Jäger von der Firma Erbe und Johanna Schreiber, die mich bei sämtlichen Versuchen unterstützt bzw. in die Thematik eingearbeitet haben.

Auch möchte ich der Firma Erbe Elektromedizin GmbH für die gute Zusammenarbeit und für die Bereitstellung der Geräte meinen Dank aussprechen.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, meinem Onkel Wolfgang und meiner Tante Ricarda für die unermüdliche Unterstützung und dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Ein letzter, besonderer Dank möchte ich der Familie Kocher, insbesondere Herrn Richard Kocher aussprechen, der mich über all die Jahre im Studium unterstützt hat und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.