

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.- Prof. Dr. Köstlin

angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern

Direktor Prof. Dr. med Burkhard Göke

(Prof. Dr. med. J. Schirra)

und

aus dem Laser-Forschungslabor des Klinikums Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Dr. rer. nat. Ronald Sroka)

Untersuchung zur Wundheilungsmodulation durch lokal integrierte Betastrahler am Gallengangstenosemodell - Schwein

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Henrike Otto

aus Celle

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Köstlin

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Poulsen-Nautrup

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	X
II.	EINLEITUNG	1
III.	SCHRIFTTUM.....	3
1.	Anatomie des Gallengangsystems	3
1.1.	Makroskopische Anatomie des Gallengangsystems	3
1.1.1.	Mensch	3
1.1.2.	Schwein	4
1.2.	Mikroskopische Anatomie des Gallengangsystems des Menschen	4
1.3.	Mikroskopische Anatomie des Gallengangsystems des Schweines	5
2.	Gallengangstenosen	6
2.1.	Definition	6
2.2.	Ätiologie.....	6
2.2.1.	Benigne Gallengangstenosen.....	6
2.2.2.	Maligne Gallengangstenosen.....	7
2.3.	Klassifikation der Gallengangstriktur.....	8
2.4.	Klinik der Gallengangstenosen.....	8
2.5.	Diagnostik	9
2.5.1.	Endoskopische retrograde Cholangiographie (ERC)	10
3.	Therapiemöglichkeiten der Gallengangstenosen.....	11
3.1.	Drainage, Bougierung und Ballondilatation : Problematik.....	12
3.2.	Gallengangstents - Modelle und Materialien.....	12
3.2.1.	Erfahrungen mit beschichteten Stents zur Behandlung maligner und benigner Gallengangstenosen	13
4.	Wundheilung	16
4.1.	Allgemein	16
4.2.	Myofibroblasten	18
5.	Radioaktive Bestrahlung	20
5.1.	Strahlentherapie allgemein.....	20
5.2.	Teletherapie und Brachytherapie	20
5.3.	Betastrahler allgemein.....	22
5.4.	Radioaktivität und Zellwirkung	22

5.5.	Phosphor-32	23
5.6.	Betastrahler in der Medizin	24
5.6.1.	Edge Effekt.....	26
6.	Nebenwirkungen der Strahlentherapie.....	26
7.	Das Stenoseinduktionsmodell im Gallengang.....	28
IV.	MATERIAL UND METHODEN	29
1.	Zielsetzung/Problemstellung	29
2.	Untersuchungsgut	30
2.1.	Materialien, Geräte und Chemikalien	30
2.2.	Das Schwein als Tiermodell.....	30
2.3.	Versuchstiere	30
2.4.	Studiendesign	31
3.	Zuständigkeiten	34
4.	Versuchsvorbereitung.....	34
4.1.	Dosisfindung	34
4.2.	Dosisverteilung im Zielvolumen.....	35
4.3.	Implantat - der radioaktive Stent.....	38
4.4.	Strikturinduktionsmodell.....	42
5.	Versuchsdurchführung.....	44
5.1.	Narkose und Überwachung	44
5.2.	Postoperative Versorgung	45
5.3.	Operatives Vorgehen.....	46
5.3.1.	Untersucher	46
5.3.2.	Tag 0: Endoskopie – Stenoseinduktion.....	46
5.3.3.	Tag 14: Endoskopie – Stenteinlage.....	48
5.3.4.	Tag 21: Stentkontrolle.....	50
5.3.5.	Tag 35: Endoskopie – Stententfernung – Euthanasie.....	50
5.3.6.	Gewebeentnahme	52
6.	Histologische Untersuchung.....	54
6.1.	Probengewinnung und Probenaufbereitung	54
6.2.	Färbungen zur histologischen Untersuchung	55
6.2.1.	Haematoxilin-Eosin-Färbung (HE).....	55

6.2.2.	Elastica van Giesson - Färbung (EvG).....	55
6.2.3.	SMA Färbung (α -SMA).....	56
7.	Auswertung.....	57
7.1.	Stenosecharakterisierung in-vivo: Kontrastmitteldarstellung.....	57
7.2.	Stenosecharakterisierung ex-vivo: makroskopisches Gallengangspräparat...	59
7.3.	Blutbild und klinische Chemie.....	60
7.4.	Histomorphometrische Auswertung.....	60
7.4.1.	Bindegewebsfläche – histologischer Stenosegrad.....	61
7.4.2.	Dicke des Bindegewebes.....	62
7.5.	Histopathologische Auswertung.....	62
7.5.1.	Fibroseggrad.....	63
7.5.2.	SMA-Gehalt.....	63
7.5.3.	Kollagene Fasern.....	64
7.5.4.	Elastische Fasern.....	65
7.5.5.	Entzündung im gesamten Bindegewebe.....	65
7.5.6.	Entzündung im Epithel.....	66
7.5.7.	Strahlenschäden.....	66
8.	Statistische Auswertung der Daten.....	67
V.	ERGEBNISSE.....	68
1.	Überlebensrate.....	68
1.1.	P-Reihe (P 101-P 112).....	68
1.2.	W-Reihe (W 101-W 130).....	69
2.	Klinische Untersuchung.....	69
3.	Ergebnisse der Stenosecharakterisierung in vivo: Kontrastmitteldarstellung.....	70
4.	Ergebnisse der Stenosecharakterisierung ex vivo: makroskopisches Gallengangspräparat.....	73
5.	Blutwerte Ergebnisse.....	75
6.	Histomorphometrische Ergebnisse.....	77
6.1.	Effekt der LDR-Brachytherapie auf die Gallengangsstenose.....	77
6.1.1.	morphometrische Ergebnisse – Bindegewebsmessungen in dem	

Stenoseblock I	77
6.1.1.1. Stenosefläche - histologischer Stenosegrad	77
6.1.1.2. Durchschnittliche Dicke des Bindegewebes im Block I – Stenoseblock...	80
6.1.1.3. Maximale Werte des Bindegewebes im Block I - Stenoseblock	81
6.1.2. Histopathologische Ergebnisse	84
6.1.2.1. Fibrosegrad.....	84
6.1.2.2. α -SMA-Färbung	86
6.1.2.3. Kollagene Fasern im Stenoseblock I.....	89
6.1.2.4. Elastische Fasern	92
6.1.2.5. Entzündung im gesamten Präparat.....	94
6.1.2.6. Entzündung im Epithel.....	96
6.1.2.7. Strahlenschäden im Stenosebereich (Block I).....	97
6.2. Effekt der LDR- Brachytherapie auf den gesunden Gallengang außerhalb der Stenose	99
6.2.1. Referenzdicke des Bindegewebes im Block IV außerhalb der Stenose....	99
6.2.2. Vergleich aller Bindegewebsmessungen.....	100
6.2.3. Kollagene Fasern im Referenzblock	101
6.2.4. Strahlenschäden im Referenzblock außerhalb der Stenose (Block IV) ...	103
VI. DISKUSSION	105
1. Diskussion der Versuchsvorbereitung.....	105
1.1. Das radioaktive Implantat	105
1.1.1. Die Wahl der Strahlenquelle	105
1.1.2. Das Target	106
1.1.3. Die Höhe der Dosis	106
1.1.4. Der „Edge Effekt“	108
1.1.5. Das Einsetzen eines radioaktiven Stents im Gallengang	109
2. Diskussion der Versuchsdurchführung.....	109
2.1. Das Schwein als Versuchstier	109
2.2. Die Operation	111
2.2.1. Die Endoskopie	111
2.2.2. Die Stenoseinduktion	112
2.3. Die Überlebensrate.....	113
3. Diskussion der histologischen Aufbereitung.....	114

3.1.	Zuschnitt des Gewebes.....	114
3.2.	Herstellung des Präparates	115
4.	Diskussion der statistischen Auswertung.....	115
5.	Diskussion der Ergebnisse	116
5.1.	Diskussion der Stenosecharakterisierung anhand der Kontrastmitteldarstellung	116
5.2.	Diskussion der Stenosecharakterisierung anhand des makroskopischen Gallengangspräparats	117
5.3.	Diskussion der Ergebnisse der Blutwerte.....	118
5.4.	Diskussion der morphometrischen Ergebnisse	119
5.4.1.	Bindegewebsdicke: Messung im Stenoseblock I	119
5.4.2.	Stenosefläche.....	119
5.5.	Diskussion der histologischen Ergebnisse	120
5.5.1.	Fibrosegrad.....	121
5.5.2.	α -SMA Färbung	122
5.5.3.	Kollagen	125
5.5.4.	Elastische Fasern	126
5.5.5.	Entzündung gesamt und Entzündungszellen im Epithel.....	126
5.5.6.	Strahlenschäden.....	127
5.6.	Diskussion: Einfluss der LDR-Brachytherapie auf Normalgewebe	128
5.6.1.	Bindegewebe	129
5.6.2.	Kollagen	129
5.6.3.	Strahlenschäden.....	129
6.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	130
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	132
VIII.	SUMMARY.....	135
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	137
X.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	151
XI.	DIAGRAMMVERZEICHNIS.....	154
XII.	TABELLENVERZEICHNIS.....	156
XIII.	BEZUGSQUELLENVERZEICHNIS.....	160

1.1.	Narkosemittel	160
1.2.	Sonstige Medikamente	160
1.3.	Operationsmaterialien	161
1.4.	Operationsgeräte.....	162
1.5.	Chemikalien und Reagenzien.....	162
1.6.	Immunhistologie.....	163
1.7.	Laborverbrauchsmaterialien.....	163
1.8.	Laborgeräte – Großgeräte.....	163
1.9.	Sonstiges.....	164
XIV.	ANHANG	165
1.	Detaillierte Auflistung der Tiere.....	165
2.	Daten der radiologischen Auswertung.....	167
3.	Daten der makroskopischen Auswertung.....	171
XV.	DANKSAGUNG	172

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotranferase
bzw.	beziehungsweise
CO ₂	Kohlendioxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EvG	Elastica van Giesson
et al.	und andere (et alii)
F	French
Gy	Gray
GPT	Glutamat-Pyrovat-Transaminase
GOT	Glutamat-Oxalavetat-Transaminase
HDR	High dose rate
HE	Hämatoxilien-Eosin
i. v.	intravenös
i. m.	intramuskulär
J	Joule
LDR	Low dose rate
IL	Interleukin
KCl	Kalium-Chlorid
KGW	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
N	Anzahl der proben
NaCl	Natrium-Chlorid-Kochsalzlösung
MCH	mean corpuscular haemoglobin
MCHC	mean corpuscular haemoglobin concentration
MCV	mean cell volume
MF	mitotically active progenitor fibroblasts
MW	Mittelwert
OCT	optische Kohärenztomographie
OP	Operation
PDGF	platelet derived growth factor

Abkürzungsverzeichnis

PMF	post-mitotic fibroblasts
per os	oral
s.c	subkutan
SMA	Smooth-Muscle-Aktin
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
V.	Vena
°C	Grad Celcius
γ -GT	gamma-Glutamyl-Transferase
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
z. B.	zum Beispiel

II. EINLEITUNG

Postentzündliche narbige Stenosen der ableitenden Gallengänge sind meist ein chronisches Behandlungsproblem. Gallengangsstenosen führen zu Galleaufstau (Cholestase). Die Behandlungspflicht ergibt sich aus dem hohen Risiko für eine Cholangitis durch bakterielle Infektion, welche in einer Sepsis oder einem Organversagen münden kann. Gegenwärtige mechanische Behandlungsstrategien mit endoskopischer Dilatation und Drainage sind häufig nicht geeignet, ein Rezidiv zu verhindern. Der mutmaßliche Grund ist, dass durch die mechanische Dehnung erneute Gewebeschäden entstehen, die ihrerseits zu Vernarbungen führen.

In diesem Versuchsvorhaben wird der Effekt einer Low-Dose-Rate (LDR)-Brachytherapie untersucht, die in anderen medizinischen Indikationen zur Behandlung gutartiger und entzündlicher Erkrankungen bereits mit Erfolg eingesetzt wird. Ziel dieser Arbeit ist es, erstmals in einem kontrollierten, randomisierten und verblindeten Studiendesign den dosisabhängigen lokalen Effekt einer LDR-Brachytherapie auf die Entwicklung eines Rezidivs einer mit Ballondilatation behandelten Gallengangsstenose zu untersuchen. Hierbei werden temporär mit dem radioaktiven β -Strahler Phosphor-32 versehene Kunststoffdrainagen („Stents“) in die Stenose eingesetzt. Mit diesem Ansatz wird erstmals überhaupt die Dosisabhängigkeit einer Brachytherapie benigner Gallengangsstenosen eines inneren Hohlorgans untersucht. Das Studiendesign imitiert dabei die klinische Problematik: nicht die primäre Prophylaxe einer Stenose ist das Ziel, sondern das Verhindern der Rezidivstenose. Die entzündlich-narbigen Stenosen werden auf endoskopischem Weg durch kontrollierte Gewebekoagulation induziert. Die sich entwickelnden Stenosen werden dann dilatiert und verblindet mit radioaktiven oder mit üblichen nicht-radioaktiven Drainagen drainiert. Neben anatomisch-morphometrischen Messungen am Gallengang fokussiert die Studie auf die Histopathologie der behandelten Gallengänge, um Auskunft zu erhalten über die Pathophysiologie der β -Strahlung im Gewebe.

Aufgrund der basiswissenschaftlichen Fragestellung ist das Großtiermodell geeignet. Die Studie ist eine elementare Vorbereitung für eine klinische Studie bei

Patienten. Sehr wichtige Teil-Ziele der Studie sind deshalb die Anwendbarkeit und Sicherheit der lokalen Brachytherapie mit einem β -Strahler.

Phosphor-32 ist ein reiner Betastrahler, welcher für das Versuchsvorhaben unter anderem den Vorteil bietet, dass er im Gegensatz zu einer externen Bestrahlung nur das unmittelbar benachbarte Gewebe erreicht. Eine kurzfristige High-Dose-Brachytherapie wiederum überdeckt nicht die kritische Wundheilungsphase. Dies ist unter anderem deshalb von Bedeutung, da es nicht klar ist, welcher zeitliche Abschnitt der Wundheilung und auf welche Weise sie durch Strahlung beeinflusst wird. Die LDR-Brachytherapie wird darüber hinaus der ohnehin erforderlichen längeren Drainagepflicht der Stenosen gerecht.

Bisher liegen keinerlei Erfahrungen bei der Verwendung einer strahlentherapeutischen LDR-Brachytherapie zur Behandlung narbiger Gallengangsstenosen vor. Es stehen keine geeigneten Strahlenapplikatoren für Liegezeiten von mehreren Tagen zur Verfügung. Auch die Methode der Induktion der narbigen Stenose musste für diese Studie neu etabliert werden. Schließlich bleibt festzuhalten, dass trotz jahrzehntelanger Mutmaßungen über die potentiell günstige Wirkung einer Brachytherapie bei gutartigen Erkrankungen bedauerlicherweise kaum wissenschaftliche prä-klinische Studien mit einem hochwertigen Studiendesign existieren, die die dosisabhängige Wirkung von Brachytherapie im Gewebe *in vivo* in einem eigentlich zu fordernden randomisierten, verblindeten und Placebo-kontrollierten Studiendesign untersucht haben.

Die aktuelle Studie ist Teil eines interdisziplinären Forschungsprojekts zur Evaluierung der LDR-Brachytherapie bei Stenosen innerer röhrenförmiger Organe („BetaMod-Projekt“, <http://www.betamod.de>; Aktenzeichen 712/06). Das BetaMod-Projekt wird von der Bayerischen Forschungstiftung gefördert.

III. SCHRIFTTUM

1. Anatomie des Gallengangsystems

1.1. Makroskopische Anatomie des Gallengangsystems

1.1.1. Mensch

Die Gallenwege dienen dem Transport und der physikalisch-chemischen Änderung der Galle (Dancygier, 2003).

Die Gallenwege unterteilen sich in einen intra- und einen extrahepatischen Abschnitt. An der Berührungsstelle zweier benachbarter Leberzellen entstehen als Gallengangskapillaren die intrahepatischen Gallenwege. Die Gallenkapillaren sind Spalträume ohne eigene Wandauskleidung. Sie sind begrenzt von dem Plasmalemm der Leberzellen. Die benachbarten Leberzellen sondern ihr Sekret in den Spalt ab. Diese Gallengangskapillaren vereinigen sich in der Läppchenperipherie zum *Ductus biliferus*. Dieser *Ductus*, auch *Ductus interlobularis* genannt, bildet zusammen mit der Arterie und der Vene das „Glisson-Trias“. Dieses verläuft im Bindegewebe und wird vom kubischen Epithel ausgekleidet. Im späteren Verlauf vereinigen sich die *Ductuli biliferi* zu den *Ductuli hepatici*, welche über Vereinigung gemeinsamer Gänge der Lebersegmente V/VI, VII/VIII, IVa/IVb, II/III und I über die beiden *Ductus hepaticus dexter* und *sinister* zur Leberpforte ziehen. Das Epithel der *Ductuli hepatici* besteht aus einem einschichtigen Zylinderepithel (Dörfer, 2008).

An der Leberpforte entsteht der *Ductus hepaticus communis* aus der Vereinigung der *Ductus hepaticus dexter* und *sinister*. Der *Ductus hepaticus communis* ist ca. 3-4 cm lang und verläuft ca. 2-4 cm extraparenchymatös. Das Infundibulum der Gallenblase mündet im *Ductus cysticus*, der sich mit dem *Ductus hepaticus communis* zum *Ductus choledochus* im *Ligamentum hepatoduodenale* vereinigt. Der *Ductus choledochus* unterteilt sich in eine *Pars supraduodenalis* und eine *Pars retroduodenalis*. In die *Papilla duodeni major* oder *Papilla Vateri* (eine kleine Erhebung im Dünndarm) mündet der Gallengang im mittleren Duodenum. In 95 % der Fälle münden *D. choledochus* und *D. pancreaticus* gemeinsam, in 5 % getrennt. An der Mündungsstelle der beiden befindet sich der *Sphinkter Oddi*, ein Schließmuskel aus glatter Muskulatur (Dörfer, 2008, Dancygier, 2003).

1.1.2. Schwein

Der Aufbau des oberen Gastrointestinaltraktes des Schweines ähnelt dem des Menschen. Unterschiede bestehen in der separaten Mündung von Gallengang und Pankreasgang in das Duodenum. Die Einmündung des *D. choledochus* in das Duodenum erfolgt im Gegensatz zum Menschen bereits sehr kurz (1,5-2 cm) kleinkurvaturseits auf der *Papilla duodeni major*. Eine polypenähnliche Struktur am Pylorus, der *Torus pylorus*, sowie die bereits kurz dahinter liegende Einmündung des *D. choledochus* erschweren die Endoskopie der Gallenwege (ERC) beim Schwein (Hochberger, 2004). Im Gegensatz zum Menschen mündet der Pankreasgang (*Ductus pancreaticus accessorius*) beim Schwein einige Zentimeter distal des Gallenganges minorseitig des absteigenden Duodenum auf der *Papilla duodeni minor*. Somit ist eine durch die ERC iatrogene verursachte akute Pankreatitis – eine typische Komplikation beim Menschen – beim Schwein ausgeschlossen.

Der Aufbau der Gallengänge des Schweins gleicht dem des Menschen, jedoch münden die Gallengänge der rechts gelegenen Lappen einzeln in den *Ductus hepaticus communis*, ein *Ductus hepaticus dexter* fehlt (Dahme, 2007).

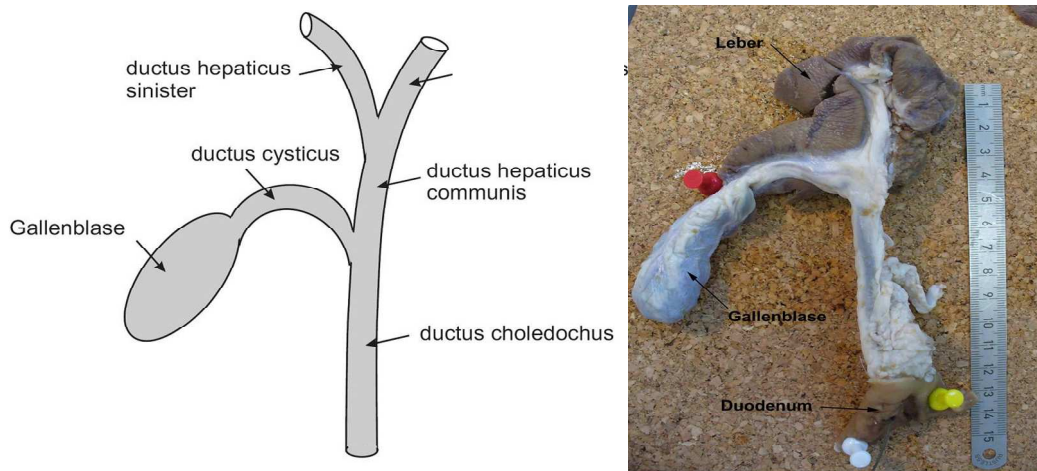


Abbildung 1: Gallengangssystem des Schweins; linkes Bild: schematische Darstellung der Strukturen, rechtes Bild: in Formalin fixierter Gallengang (Püls, 2008)

1.2. Mikroskopische Anatomie des Gallengangsystems des Menschen

Die Wand der extrahepatischen Gallengänge besteht aus kollagenen, elastischen und glatten Muskelfasern. In dieses Geflecht sind Drüsen, Nerven und Gefäße eingebettet. Die extrahepatischen Gallenwege bestehen aus drei Schichten, der *Tunica mucosa*, der *Tunica muscularis* und der *Tunica serosa*. Die *Tunica mucosa* besteht aus dem Epithel und der *Lamina propria*. Das Epithel ist einschichtig und

hochprismatisch. Falten und Zotten sind im Gegensatz zur Gallenblase in den extrahepatischen Gallengängen nicht präsent. Das Epithel setzt sich aus den Oberflächenepithelzellen und aus epithelassoziierten Zellen zusammen und liegt einer fibromuskulären Schicht auf. Direkt unter dem Epithel befindet sich die *Lamina propria*, die relativ viele Drüsen, die *Glandulae mucosae biliosae* enthält. Einzelne Becherzellen und regelmäßig Lymphozyten befinden sich in diesem Abschnitt. Die locker angeordneten Bündel glatter Muskulatur sind klein und nehmen einen spiraligen Verlauf (Denk, 2000, Dancygier, 2003). Der Anteil der glatten Muskulatur nimmt papillenwärts zu und formiert sich im Papillenbereich zum biliären Sphinkter. Die intramuralen Drüsen sind vermehrt in der papillären Region ausgebildet. Die Gefäßdichte ist in allen Teilen ungefähr konstant (Dancygier, 2003).

1.3. Mikroskopische Anatomie des Gallengangsystems des Schweines

Die mikroskopische Anatomie des Schweinegallenganges ist der des Menschen sehr ähnlich. Das Epithel ist einschichtig und hochprismatisch. Die *Lamina propria* (in der folgenden Abbildung mit LP beschriftet) enthält relativ viele Drüsen (*Glandulae mucosae biliosae*, D). Die sich anschließende *Tunica muscularis* (MUS) besteht zum größten Teil aus glatten Muskelzellen (Hees, 2000).

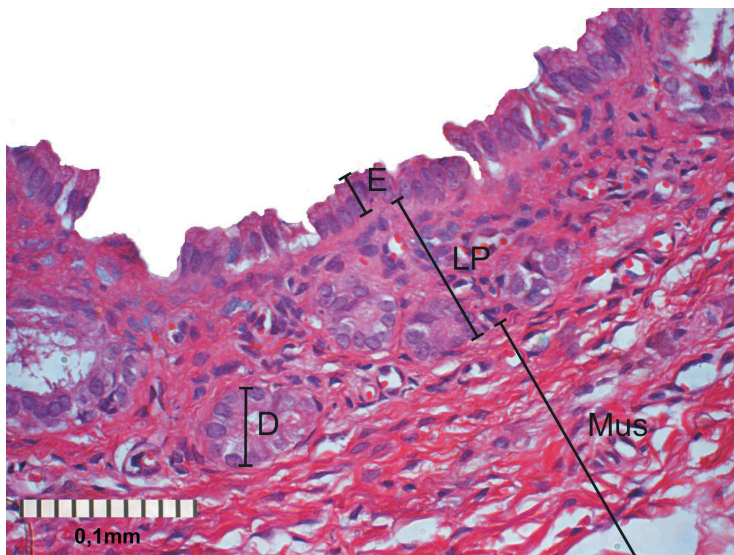


Abbildung 2: Aufbau des Schweine-Gallenganges; E=Lamina epithelialis, LP= Lamina propria; MUS= Lamina Muscularis; D= Drüsen (*Glandulae mucosae biliosae*), 40x Vergrößerung, HE- Färbung; Spezies: Schwein (Püls, 2008)

2. Gallengangsstenosen

2.1. Definition

Der Ausdruck Gallengangsstenose beschreibt eine Einengung des Gallenganges, hervorgerufen durch Vernarbung, Entzündung, Tumor oder externe Kompression (Bailen, 2000). Sie führt zu einer Störung des Galleabflusses und u. U. zu einer prästenotischen Dilatation der Gallenwege.

2.2. Ätiologie

Die Ursachen einer Gallengangsstenose sind vielfältig. Man unterscheidet benigne von malignen Stenosen.

2.2.1. Benigne Gallengangsstenosen

Benigne Stenosen lassen sich in postoperative und postentzündliche Stenosen unterteilen.

In über 70 % der Fälle sind Operationen an den Gallengängen vorausgegangen (Schilling, 2008 Dancygier, 2003). Die Cholezystektomie ist die am häufigsten durchgeführte Operation (Sikora et al., 2006). Nach konventioneller Cholezystektomie treten in ca. 0,5 % der Fälle gutartige Stenosen des *D. choledochus* auf und vermehrt nach intraoperativen Gallengangsrevisionen. Mit dem Aufkommen der laparoskopischen Cholezystektomie sind sie häufiger geworden (Casparly, 2001). Es wird diskutiert, ob die erhöhte Häufigkeit auf die Anfangsschwierigkeiten in der Lernphase dieser Operationsform zurückzuführen ist oder ob die laparoskopische Methode generell mit einer erhöhten Komplikation behaftet ist (Born et al., 1999, Sikora et al., 2006).

Nach einer orthotopen Lebertransplantation kann bei 7-29 % der Patienten eine Gallengangsstenose an der Anastomose zwischen Spender- und Empfängercholedochus auftreten (Fogel et al., 2005). Anastomotische Stenosen werden ebenfalls häufig nach Gallengangsrekonstruktionen im Rahmen von Leberteileresektionen beobachtet (Judah and Draganov, 2007).

Nach einem direkten Trauma, einer Einklemmung des Gallenganges, nach lokaler Hitzeapplikation oder einer lokalen Entzündung, entstanden durch eine Infektion oder eine Perforation, können sich frühe Stenosen entwickeln. Eine späte Stenoseentwicklung, die unter Umständen auch erst nach Monaten oder Jahren

klinisch relevant werden kann, kann aus einer periduktalen Entzündung mit Fibrose nach Gallengangsp perforation entstehen (Rauws and Gouma, 2004). Ein weiterer typischer Mechanismus ist die chronische oder rezidivierende Choledocholithiasis mit mechanischer und entzündlicher Alteration und konsekutiver Vernarbung des *Ductus hepatocholedochus* (Bailen, 2000).

Chronische Pankreatitiden führen bei 5-40 % der Patienten zu extrahepatischen Gallengangsstenosen (Yamaguchi et al., 2006). Hauptsächlich werden diese durch Vernarbung des intrapankreatisch verlaufenden Gallenganges oder Kompression durch einen vergrößerten, z. B. entzündlich angeschwollenen Pankreaskopf, oder aber durch eine Pankreaspseudozyste hervorgerufen (Schilling, 2008). Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist charakterisiert durch chronisch entzündliche Gallengangsstenosen sowohl intra- als auch extrahepatisch. Diese haben ein relativ hohes Entartungsrisiko zum Gallengangskarzinom (Lebenszeitrisiko ca. 10-20 %) (Schilling, 2008).

Weiterhin können auch benigne Tumore die Lichtung des Gallenganges verlegen: Papillome und Adenome, seltener Lipome, Zystadenome und Myeloblastome (Nicolas, 2006).

2.2.2. Maligne Gallengangsstenosen

Malignes Tumorwachstum ist die häufigste Ursache für eine Gallengangsstenose. In den meisten Fällen führt ein Pankreaskopfadeno karzinom zu einer Kompression oder Infiltration des *D. choledochus* (Bailen, 2000). Cholangiocarzinoma (Gallengangskarzinome) hepatozelluläre Karzinome und maligne Neubildungen an der *Papilla Vateri* gehören ebenfalls zu den malignen Tumoren, die zu einer Einengung von Gallenwegen führen (Vitale et al., 1996). Bei den primären Gallengangskarzinomen unterscheidet man das solitäre, infiltrativ wachsende Karzinom, das zentral, im Leberhilus wachsende, fokale stenosierende Karzinom oder das diffus sklerosierende, an den Gallengängen entlang vorwachsende Karzinom (Nicolas, 2006). Intrahepatische Fernmetastasen anderer maligner Tumore können intrahepatische Gallenwege destruieren und Lymphome können die extrahepatischen Gallenwege komprimieren.

2.3. Klassifikation der Gallengangsstriktur

In der Literatur werden verschiedene Arten der Klassifikation vorgeschlagen.

Häufig verwendet wird die Klassifikation nach Bismuth-Corlette (Bismuth and Corlette, 1975). Sie richtet sich nach der Lokalisation der Stenose und bezieht sich streng genommen auf die Stenosen durch das Cholangiokarzinom. Nach Bismuth-Corlette werden die Gallengangsstenosen in vier Typen eingeteilt.

- Typ I: Tumorstenose nur im Bereich des Ductus hepatocholedochus
- Typ II: Der Tumor betrifft die Hepatikusgabel
- Typ III: Eine intrahepatische Seite ist bis an die Segmentabgänge betroffen (rechts: IIIa, links: IIIb)
- Typ IV: beide intrahepatischen Seiten sind inklusive der Segmentabgänge betroffen.

Typ IV ist in der Regel inoperabel.

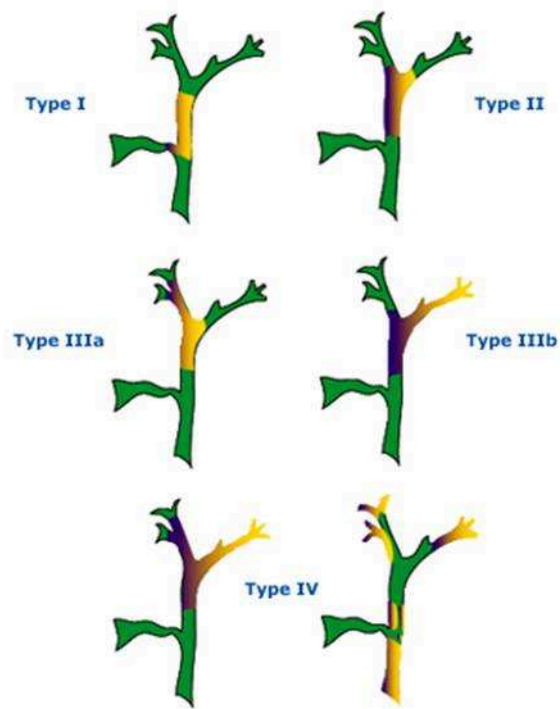


Abbildung 3: Bismuth-Corlette Klassifikation der Gallengangsstenosen

2.4. Klinik der Gallengangsstenosen

Eine Gallengangsstenose verursacht eine Cholestase, einen Aufstau von Galle. Konsekutiv kommt es zu einer Dilatation der prästenotischen Gallenwege.

Laborchemisch typischerweise erhöht sind das veresterte Bilirubin, die Alkalische Phosphatase (AP), die gamma GT (γ -GT), meistens auch aber diskreter die Transaminasen (GOT, GPT). Das klinische Bild ist charakterisiert durch Ikterus und Pruritus. Rechtsseitige Oberbauchschmerzen entstehen eher bei einem akuten Verschluss der ableitenden Gallenwege, typischerweise bei der Choledocholithiasis. Chronische Stenosen hingegen führen meist nicht zu Schmerzen (schmerzloser Ikterus) (Schilling, 2008, Caspary, 2001).

Nicht behandelte Stenosen können zu einer eitrigen Cholangitis führen, oberhalb der Engstelle können sich durch den Aufstau Steine oder Abszesse bilden oder sich das Krankheitsbild einer sekundär sklerosierenden Cholangitis entwickeln (Caspary, 2001). Wegen des Risikos einer Cholangiosepsis stellt die Cholangitis ein lebensbedrohliches Krankheitsbild dar. Eine sekundär sklerosierende Cholangitis kann unbehandelt zur sekundär biliären Leberzirrhose führen.

2.5. Diagnostik

Zur Diagnose einer Gallengangsstenose lassen sich mehrere bildgebende Verfahren einsetzen.

Die transabdominelle Sonographie ist als Screening-Methode die Untersuchungsmethode der ersten Wahl. Sie kann eine Dilatation der peripheren und zentralen Gallengänge darstellen als Hinweise auf eine Stenose. Sie ist ein sensitives Verfahren zur Detektion von Steinen bei einer Choledocholithiasis. Das sensitivste nicht-invasive Verfahren zur Detektion von Gallenwegsstenosen ist die MRCP (Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie). In Verbindung mit einem MRT der Leber ist sie die Methode der Wahl, neben den Gallenwegsstenosen auch mögliche Raumforderungen als Ursache der Stenosen zu diagnostizieren. Das sensitivste Verfahren zur Detektion von Steinen im Ductus choledochus (Choledocholithiasis) ist neben der MRCP vor allem die Endosonographie. Die Stärke der Computertomographie (CT) liegt vor allem in der Diagnostik von Leberabszessen und Tumoren. Diese Verfahren weisen keine Morbidität oder Mortalität auf (Bailen, 2000, Schulz, 2008).

Als invasive diagnostische und therapeutische Verfahren für die intra- und extrahepatischen Gallengänge sind die endoskopische retrograde Cholangiographie (ERC), die perkutane transhepatische Cholangiographie (PTC) oder die Cholangioskopie zu nennen (Schilling, 2008, Caspary, 2001). Da

invasive Verfahren auch mit Komplikationen behaftet sind, spielen sie heutzutage nur noch eine eher geringe Rolle in der reinen Diagnostik, sondern werden ganz überwiegend als therapeutische Verfahren eingesetzt. Allerdings sind sie geeignet, eine Gewebediagnostik von unklaren Gallenwegsstenosen zu ermöglichen. Trotz der relativ geringen Sensitivität von etwa 60-80 % sind die ERC-gesteuerte Biopsie und Bürstenzytologie unverändert der „Goldstandard“ zur feingeweblichen Diagnostik unklarer Gallenwegsstenosen (Schilling, 2008, Caspary, 2001, Stolz, 2005, Schulz, 2008).

2.5.1. Endoskopische retrograde Cholangiographie (ERC)

Die endoskopische retrograde Cholangiographie wird als diagnostische Methode, insbesondere aber aus therapeutischen Gründen eingesetzt. Eine Sondierung und Darstellung der Gallenwege wird unter anderem zur Abklärung einer extrahepatischen Cholestase durch Stenosen oder mobilierbare Abflussstörungen (z. B. Konkremente, Koagel) eingesetzt (Faiss, 2007).

Die ERC ist eine Kombination einer endoskopischen und einer radiologischen Untersuchung. Mithilfe eines Videoendoskops mit Seitblickoptik (Duodenoskop) wird die *Papilla Vateri* endoskopisch in der *Pars descendens duodeni* dargestellt und sondiert. Nachfolgend werden die Gallenwege durch retrograde Kontrastmittelgabe dargestellt. Mithilfe einer Durchleuchtungsvorrichtung (z. B. C-Bogen) wird die Verteilung des Kontrastmittels in den Gallenwegen beobachtet (Güthoff and Harrer, 2010). Die genauen anatomischen Verhältnisse wie auch pathologische Veränderungen können so verifiziert werden.

Die ERC ist die Methode der (Haber and Sandha, 2004) Wahl zur

- Entfernung intraduktaler Konkremente (Choledocholithiasis)
- Feingeweblichen Diagnostik unklarer Gallenwegsstenosen (Biopsie, Bürstenzytologie)
- Dilatation und Drainage aller klinisch relevanten benignen Gallenwegsstenosen
- Palliative Therapie und Drainage aller klinisch relevanten malignen Gallenwegsstenosen

Beim Menschen bedarf es vor einer therapeutischen ERC meist einer biliären Sphinkterotomie. Therapeutisches Instrumentarium kann im Bereich des

D. hepatocholedochus meist direkt eingebracht werden. Die gezielte Sondierung von Stenosen oder der intrahepatischen Gallenwege erfolgt in der Regel über einen steuerungsfähigen Draht (Terumo) unter Durchleuchtung. Nach erfolgter Sondierung wird dieser Draht gegen einen führungsstabilen Draht ausgetauscht, über den das geeignete Instrumentarium in die Gallenwege eingebracht wird (Seldinger-Technik: z. B. Bougies, Ballonkatheter, Drainagen, Cholangioskope).

Sollte aus anatomischen Gründen die Möglichkeit nicht gegeben sein, eine ERC durchzuführen zu können (Papille nicht erreichbar oder Stenose nicht passierbar), muss eine perkutan-transhepatische Cholangiographie zum Einsatz kommen (Rösch, 2003).

Risiken der ERC sind eingriffsspezifische Komplikationen wie die akute Pankreatitis (bei Erst-ERCP 3-4 %), Blutung und Perforation im Bereich der *Papilla Vateri* (selten bei therapeutischen Ersteingriffen mit Durchtrennung des biliären Sphinkters) oder die Verletzung der ableitenden Gallenwege (selten) (Güthoff and Harrer, 2010). Ursache der relativ hohen Rate akuter Pankreatitiden beim Ersteingriff ist die nicht-intendierte Manipulation am Pankreasabfluss, da beim Menschen der Pankreasgang in ca. 95 % gemeinsam mit dem Gallengang in das Duodenum mündet.

3. Therapiemöglichkeiten der Gallengangsstenosen

Erstes Ziel bei Gallenwegsstenosen ist die Klärung der Dignität. Im Rahmen der ERC kann dies erfolgen unter Durchleuchtung per Zangenbiopsie und Bürstenzytologie oder auch unter direkter Sicht per Cholangioskopie.

Therapeutisches Ziel bei allen Gallenwegsstenosen ist die Behebung der Cholestase durch Wiederherstellung des Galleabflusses zur Prophylaxe bzw. Therapie einer Cholangitis (Bailen, 2000, Wiedmann et al., 2006). Speziell bei benignen, in der Regel postentzündlich narbigen Stenosen ist das Ziel die Behebung der Stenose durch Dilatation und möglichst passagere Einlage von Drainagen. Bei malignen Stenosen durch Cholangiokarzinome kann die Drainage durch eine palliative, lokal photodynamische Lasertherapie unterstützt und verbessert werden.

Operative Methoden zur Behandlung benignen biliärer Stenosen werden gescheut, da sie komplikationsträchtig sind und das Risiko von Re-Stenosen implizieren.

Einzig die Resektion maligner Gallenwegsstenosen in kurativer Intention bzw. die Lebertransplantation ist natürlich eine Domäne der Leberchirurgie.

3.1. Drainage, Bougierung und Ballondilatation : Problematik

Die endoskopische Behandlung von Gallenwegsstenosen besteht in der Dilatation und Drainage. Benigne Stenosen werden durch Bougierung (bis max. 11.5 F) oder Ballondilatation (4 bis max. 10 mm) aufgedehnt. Die Ziel-Weite hängt dabei von der Lokalisation ab: etwa 4 mm bei Stenosen der intrahepatischen Gallenwege, 6-10 mm bei solchen der extrahepatischen Gallenwege. Das Hauptproblem dieser Behandlung besteht in den Rezidiven (Re-Stenose), die sehr häufig auftreten. Sie sind zum Teil Folge der durch die Dilatation selbst induzierten Entzündung. Meist erfolgt deshalb im Anschluss an die Dilatation die Überbrückung der Stenose mit einer oder mehreren Kunststoff-Stents, um eine Drainage zu erreichen und ein „Re-Modeling“ der Stenose zu verhindern (Costamagna et al., 2003). Erforderlich sind jedoch meistens wiederholte Behandlungen im Abstand von 8-12 Wochen, die oft über Jahre erfolgen müssen. Problem der wiederholten endoskopischen Therapie ist die Keimverschleppung mit dem Risiko der Cholangitis, eine Blutung, Perforation oder Pankreatitis. Plastikdrainagen sind aufgrund einer medianen Verschluss-Wahrscheinlichkeit von 3-4 Monaten keine Dauerlösung und müssen regelmäßig gewechselt werden. Der Verschluss erfolgt dabei durch eingedickte Galle. Schon die einmalige ERC ist aufgrund hoher Personal- und Materialanforderungen sehr kostenintensiv. Die wiederholte Behandlung geht mit einem hohen Morbiditätsrisiko der Patienten und erheblichen Kosten einher (Schilling, 2008, Rösch, 2003).

3.2. Gallengangsstents - Modelle und Materialien

Zur Überbrückung von Gallengangsstenosen werden sogenannte Gallengangsendoprothesen (Stents, Drainagen) eingesetzt. Generell finden diese Stents Verwendung bei benignen wie auch bei malignen Stenosen.

Die ersten Gallengangsendoprothesen wurden durch Soehendra und Reynders-Frederix im Jahre 1979 etabliert. Heutzutage sind für verschiedene Indikationen verschiedene Stents im Gebrauch.

Generell kann man zwischen Kunststoff- und Metallstents unterscheiden.

Zu den Kunststoffstents zählen gerade Stents und Pigtail-Stents. Pigtail-Stents

tragen ihren Namen wegen der Krümmung der Enden. Sie werden über einen Führungskatheter in einer begradigten Form in die gewünschte Position verbracht und gelangen nach der Entfernung des Drahtes wieder in ihre ursprüngliche Form. Endständig und an den seitlichen Enden befinden sich Löcher für den Galleabfluss. Aufgrund der Pigtail-Form verankern sich die Drainagen in ihrer Position, und es besteht nicht die Gefahr, dass sie nach proximal oder distal verrutschen. Ein anderes Modell ist der gerade Stent (Amsterdam-Typ Design). Er kann leicht gebogen sein, um sich der Anatomie anzupassen. An den Enden befinden sich kleine Klappen sogenannte „Flaps“, die eine Dislokation verhindern sollen. Vorteile dieses Stents sind der bessere Galleabfluss durch die gerade Form und die einfachere Handhabung beim Einsetzen über den Führungskatheter. Die bessere Verankerung und die Drainage intrahepatischer Stenosen sind Vorteile der Pigtail-Drainagen. Die Materialien der Kunststoffstents sind u. a. Polyäthylen und Teflon. Typische Querdurchmesser der Gallenwegsdrainagen sind 7 F bis 11.5 F (2.3 bis 3.8 mm) (Faiss, 2007, Binmoeller, 1999).

Metallstents für Gallenwegsstenosen sind in der Regel selbstexpandierende Stents, meist aus Nitinol („Memory-Metall“), seltener Edelstahl. Es handelt sich um Maschengeflecht- und Spiralstents, die in gefaltetem Zustand auf einem Trägerkatheter in die Stenose eingebracht werden, und nach Freisetzung selbstständig ihre endgültige Form annehmen. Gecoverte Stents sind ausgekleidet durch eine Kunststoffschicht, um das Einwachsen von Tumoren zu verhindern. Da das Metallgitter den Abfluss seitlich einmündender Gallenwege behindert, ist ihr Einsatz bei Stenosen der Hepatikusgabel und bei intrahepatischen Stenosen sehr limitiert. Einmal entfaltet ist ein Metallstent meist fest verankert und kann kaum noch bewegt bzw. entfernt werden deshalb werden Metallstents hauptsächlich zur Behandlung maligner Stenosen eingesetzt. Metallstents sind kostenintensiver als Kunststoff-Drainagen. Sie haben eine mediane Verschlusszeit von etwa 6 Monaten. Verschlüsse können aber meist endoskopisch revidiert werden (Binmoeller, 1999, Classen, 2004).

3.2.1. Erfahrungen mit beschichteten Stents zur Behandlung maligner und benigner Gallengangsstenosen

Weltweit werden Anstrengungen unternommen, um die Stenoseproblematik im Gallengang ursächlich anzugehen. Bisher sind medikamentenbeladene Stents (drug-eluting stents) und eine geringe Anzahl radioaktiver Stents in Studien zu

finden. Allerdings kann festgestellt werden, dass radioaktive Stents hauptsächlich für die Behandlung maligner Stenosen im Gallengang untersucht werden. Weiterhin muss man zwischen dem HDR- und LDR-Brachytherapieverfahren unterscheiden. Bisherige Studien zur Rezidivprophylaxe konzentrierten sich eher auf die HDR-Brachytherapie (Schmidt, 1999, Herfarth, 2006).

Gerade bei dem HDR-Brachytherapieverfahren ist aber auf die Toleranzdosis der umliegenden Gewebe Rücksicht zu nehmen. Die Strahlentoleranz des Leberparenchyms, des Pankreas, des Querkolons, des Magens und des Rückenmarks liegen bei 45-50 Gray, die des Nierenparenchyms ist mit 20 Gray geringer (Schmidt, 1999).

Guin-Jin He et al. untersuchten in einer präklinischen Studie den Einsatz eines Palladium-103-haltigen Metallstent (γ -Strahler) zur Verhinderung einer Restenose im Gallengang. In dieser Studie wurde jedoch lediglich die Aktivität des radioaktiven Stoffes (3,4 mCi) und nicht die Dosis angegeben. Durch einen operativen Eingriff wurde durch eine Ballondilatation eine Stenose im Gallengang induziert. Bei 6 Tieren wurde ein Palladium-103-Stent eingesetzt, 6 Tiere dienten als Kontrollgruppe und erhielten einen gebräuchlichen Stent. Nach 30 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und das Gewebe untersucht. Diese Studie zeigt, dass im Gallengang durch LDR-Brachytherapie der Lumenverlust aufgrund einer Restenosierung signifikant reduziert werden kann. Die Expression von SMA konnte signifikant gesenkt werden, was sich in einer verminderten Kollagenexpression äußerte. Die Ausprägung der Narbe und die damit verbundene Kontraktur wurden somit reduziert (He et al., 2006).

Liu et al. setzten Iod-125-Plastikstents (γ -Strahler) in den Gallengang von Schweinen ein. Es ging keine Stenoseinduktion voraus. In den 4 Dosis-Gruppen (30 Gray n=3, 60 Gray n=3, 90 Gray n=3 und 0 Gray n=2 in 5 mm Entfernung vom Axenmittelpunkt) wurden nach 14-30 Tagen histologische Untersuchungen vorgenommen. Die Kontrollgruppe zeigte Hyperplasien, in den radioaktiven Gruppen wurden Nekrosen der Mucosa beobachtet. Die 30 Gray-Gruppe zeigte eine geringgradige Hyperplasie der Drüsen und Fibrosen im subnekrotischen Areal. Mukosadrüsen waren bei höheren Dosisleistungen nicht mehr aufzufinden. Diese Ergebnisse sollen der Behandlung extrahepatischer Gallengangskarzinome dienen (Liu et al., 2009).

Brambs et al. beschreibt die HDR-Afterloadingbestrahlung (Iridium-192, Gammastrahler, HWZ: 73,83 d) des gesunden Gallenganges. In dieser Studie werden bei 16 Schweinen chirurgisch Stents in den Gallengang implantiert und Dosen von 7,5 und 15 Gray über einen Zeitraum von 2-3 Monaten appliziert. Nach dieser Zeit findet die Exstirpation der Gallengänge statt. In beiden Gruppen, im größeren Ausmaße in der 15 Gray-Gruppe, wurden erhebliche Schrumpfung, ausgedehnte Nekrosen und Sklerosen beobachtet, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Höhe der einmaligen Dosis niedriger gewählt werden muss (Brambs et al., 1993).

Bei einer anderen Studie wurde eine radioaktive Folie auf einen Metallstent aufgebracht. Hier wurde Holmium-166 - ein β -Strahler mit einer Halbwertszeit von 26,8 Stunde - verwendet. Mittels Laparotomie wurde der Stent im Hundemodell eingesetzt. Diese Studie soll der Erforschung der Behandlung maligner Tumore im Gallengang dienen, eine vorherige Stenoseinduktion erfolgte nicht, auch gab es keine kanzerogene Gruppe. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt (<50 Gy, n=4; 50-100 Gy, n=9; >100 Gy, n=7), eine vierte Gruppe (n=3) diente als Kontrollgruppe. Der Gallengang wurde mit Dosen von 23-148 Gy (im Mittel 85 Gy) in 1 mm Abstand von der Folie bestrahlt. Die Hunde wurden nach 3 bzw. 6 Monaten euthanasiert und das Gewebe histopathologisch untersucht. Niedrige Dosen (im Mittel 36 Gy) zeigten hierbei eine minimale Fibrose. Bei höheren Kontaktdosen (bis zu 148 Gy) war eine extensive Fibrose zu beobachten. Eine Hyperplasie der Mucosa wurde lediglich in der Kontrollgruppe beobachtet (Won et al., 2005).

Ein erheblicher Nachteil dieser bisherigen Studien ist, dass entweder keine Stenose als Kontrolle induziert wurde, dass die Tiere einem operativen transabdominellen Eingriff unterzogen wurden mit den entsprechenden Nebenwirkungen und dass die Zahl der Tiere pro Dosisgruppe als Fallzahl zu niedrig ist, um die Dosiseffekte valide zu erfassen. In den wenigen erwähnten Studien sind darüber hinaus überwiegend Gammastrahler zum Einsatz gekommen. Wesentlich schonender für das Gewebe ist an Stelle eines Gammastrahlers ein Betastrahler, der eine geringere Eindringtiefe (wenige Millimeter) in das Gewebe hat und somit das angrenzende gesunde Gewebe schont. In den beschriebenen Studien traten bereits bei den jeweils niedrigsten Dosen (30-40 Gy) unerwünschte Effekte wie Fibrose und Nekrosen auf. Es war

eine der Rationalen für die Dosisauswahl der vorliegenden Studie, zur Vergleichbarkeit eine ähnliche Dosis als höchste Dosis zu wählen.

4. Wundheilung

4.1. Allgemein

Die Wundheilung ist ein komplexer und gut orientierter Prozess, der primär in drei Phasen abläuft:

1. Entzündungsphase/Exsudationsphase
2. Proliferationsphase
3. Differenzierungsphase/Reparationsphase

Diese Phasen lassen sich nicht strikt voneinander trennen, sondern überlappen sich zeitlich. Das Ziel der Wundheilung ist es, ein dem ursprünglichen Gewebe möglichst ähnliches Gewebe zu bilden.

Die Exsudationsphase (Tag 0-4) beginnt direkt nach dem Setzen der Verletzung. Es kommt durch die Freisetzung von Gewebsthromboplastin und die Thrombozytenadhäsion an freigelegten Kollagenfasern zur Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade. Es erfolgt eine Thrombozytenaggregation und -Degranulation und Vasokonstriktion. Durch die Thrombozytendegranulation werden chemotaktische Wachstumsfaktoren und Zytokine wie Transforming growth factor- β (TGF- β), Platelet-derived growth factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF) und Vascular Endothelia Growth Factor (VEGF) ausgeschüttet. Diese Faktoren bewirken die Einwanderung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Fibroblasten in das Gewebe.

Die neutrophilen Granulozyten, welche als erste Zelltypen 6-12 Stunden nach dem Trauma in das Wundgebiet wandern, produzieren proinflammatorische Zytokine wie Tumor necrosis factor- α (TNF- α) und Interleukine (IL). Außerdem phagozytieren sie das Fremdmaterial. Die Monozyten wandern in das Wundareal ein und differenzieren sich innerhalb von 1-2 Tagen zu aktivierten Makrophagen.

Die Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und verschiedene Interleukine. Zudem synthetisieren sie zahlreiche Wachstumsfaktoren wie PDGF, FGF und TGF- β und sorgen für den Abbau nekrotischen Gewebes. Die Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der

Einleitung der Kollagensynthese. Sie haben eine generell längere Lebensdauer als die neutrophilen Granulozyten (Kramer, 2004, Velnar et al., 2009, Eming et al., 2007).

Im Anschluss an die Exsudationsphase folgt etwa am 3. Tag nach Verletzung die Proliferationsphase. Diese Phase dauert ca. 2 Wochen und ist dadurch gekennzeichnet, dass durch die freigesetzten Wachstumsfaktoren und Zytokine (v.a. PDGF und TGF- β) Fibroblasten aus dem umliegenden Gewebe in die Wunde einwandern. Diese produzieren die Gewebematrix durch Synthese von Kollagen.

Fibroblasten lassen sich in zwei funktionell unterschiedliche Zell-Kompartimente unterteilen: Zum einen ein regeneratives, teilungsaktives Progenitorzellkompartiment (Vorläuferfibroblasten) mit drei unterschiedlichen Formen: MF-1, MF-2 und MF-3 (mitotically active progenitor fibroblasts)-Fibroblasten. Zum anderen existiert ein teilungsinaktives, produktives Fibrozyten- oder Funktionskompartiment. Hier lassen sich ebenfalls drei Ausdifferenzierungsstufen unterteilen: (PMFI-4, PMF-5 und PMF-6 (post-mitotic fibroblasts)). Die mitotischen Fibroblasten differenzieren sich zu den postmitotischen Funktionsfibrozyten, deren Aufgabe die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen, Kollagenen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen ist. Terminal ausdifferenzierte Zellen sind die PMF-6-Fibrozyten (Rodemann and Bamberg, 1995a, Hakenjos et al., 2000).

Aus den aktivierten Fibroblasten, dem Proto-Myofibroblast, differenzieren sich am Ende der ersten 7 Tage die Myofibroblasten. Diese Myofibroblasten spielen eine wichtige Rolle in der Wundkontraktion (Velnar et al., 2009, Lorena et al., 2002).

Die Differenzierungs- oder Reparationsphase schließt sich den genannten Phasen an. In dieser werden die Wundfestigkeit und ein definitives Narbengebilde durch die Umwandlung des neu gebildeten Kollagens gebildet. Diese letzte Phase kann Monate bis Jahre andauern (Velnar et al., 2009).

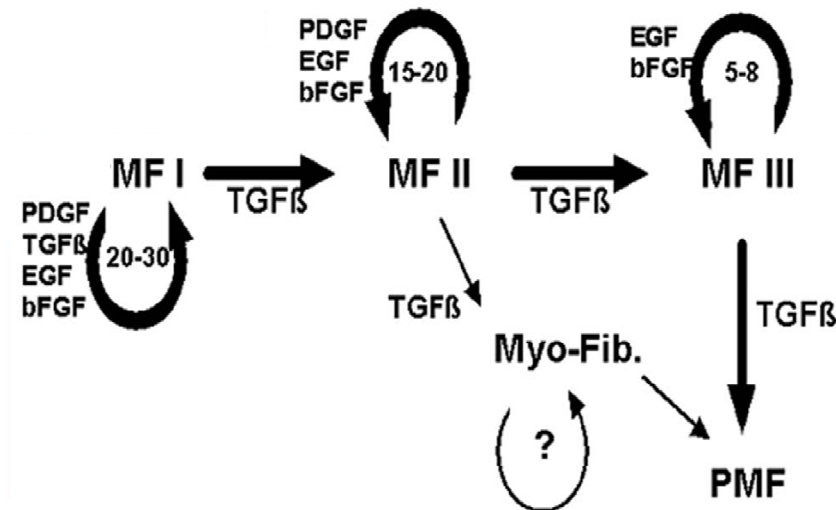


Abbildung 4: Fibroblasten-Fibrozyten System, Die Vorläuferfibroblasten (MF) differenzieren sich zu postmitotischen Fibrozyten (PMF) (Rodemann, 2006)

4.2. Myofibroblasten

Die Wundkontraktion ist ein notwendiger Prozess bei der Heilung einer Verletzung. Diese Kontraktion resultiert vor allem aus dem Vorhandensein von Fibroblasten und Myofibroblasten, die kontraktile Eigenschaften besitzen. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle in der physiologischen Rekonstruktion des Bindegewebes nach Verletzungen sowie im fibrosierten Gewebe (Hinz, 2007).

Erstmals wurde die Existenz von Myofibroblasten von G. Majno und G. Gabbiani beschrieben, die nachwies, dass die Fibroblasten sich unter bestimmten Umständen modifizieren und diese modifizierten Zellen durch reichlich Mikrofilamente und ihre Ähnlichkeit zu Muskelzellen auffielen. Ursprünglich wollten Gabbiani und Majno diese modifizierten Fibroblasten „Fibrospasten“ nennen. Man einigte sich aber dann auf „Myofibroblasten“ (Majno, 1979).

Myofibroblasten lassen sich auch unter normalen Umständen in Lungengewebe, Lymphknoten, in der Milz und in anderen Geweben finden (Meister, 1998).

Die Myofibroblasten, die im Narbengewebe zu finden sind, differenzieren sich in einem zweistufigen Prozess: Entzündungsmediatoren in Folge einer Verletzung stimulieren die Fibroblasten, in dieses Gewebe einzuwandern. Die Fibroblasten differenzieren sich im geschädigten Gewebe zu Proto-Myofibroblasten (siehe Abbildung 5). Dies geschieht unter anderem dadurch, dass durch die Migration Zugkraft auf die Wunde ausgelöst wird. Die Proto-Myofibroblasten sind durch aktin-haltige Stressfasern gekennzeichnet (Tomasek et al., 2002, Hinz, 2007).

Wie in Abbildung 5 beschrieben, entwickeln sich die Proto-Myofibroblasten im weiteren Verlauf der Wundheilung zu Myofibroblasten. Auslöser dieser Umwandlung ist das Vorhandensein von inflammatorischen Zytokinen wie TGF β 1,2, hoher extrazellulärer Stress und Fibronektinspaltprodukte. TGF- β 1 wird von Platelets, den weißen Blutkörperchen, insbesondere den Makrophagen, oder Parenchymzellen gebildet. Die Myofibroblasten exprimieren Alpha-glattmuskuläres Aktin (α -SMA) und können im Gegensatz zu ihren Vorläuferzellen eine stärkere Kontraktion ausüben. Die Myofibroblasten sind untereinander über Gap Junctions verbunden, sie formen somit eine multizelluläre kontraktile Einheit. α -SMA gilt als Myofibroblastenmarker. Es hat seinen Peak ca. am Tag 9 nach der Verletzung (Hinz et al., 2001b, Tomasek et al., 2002, Hinz, 2007, Hinz et al., 2007).

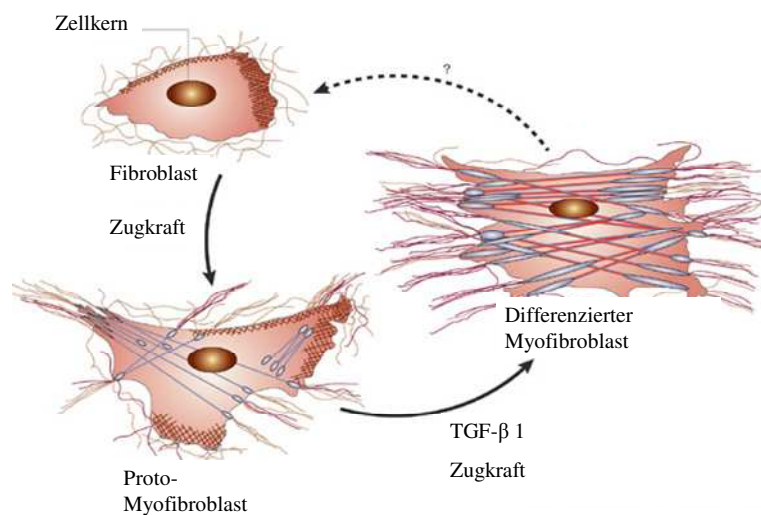


Abbildung 5: Umwandlung der Fibroblasten zu ausdifferenzierten Myofibroblasten

Die Bildung von Fibronektin, Laminin, Tenascin und Kollagenen und die Bildung von Basalmembran ist vergleichbar mit den Wechselwirkungen zwischen Zellen und Matrix der glatten Muskulatur. So scheinen Myofibroblasten einen Phänotyp zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen darzustellen (Meister, 1998).

Wenn die Wundheilung abgeschlossen ist, unterliegen die Myofibroblasten physiologischerweise der Apoptose. Falls eine Störung der Apoptose-Prozesse vorliegt, verschwinden die Myofibroblasten nicht, sondern bilden weiterhin extrazelluläre Matrix, aus welcher eine Fibrose resultieren kann (Lorena et al., 2002).

Die Kontraktilität der Myofibroblasten richtet sich nach der Menge von smooth muscle cells. Je mehr SMA, desto stärker ist die Kontraktion. Dementsprechend ist es gewünscht, die Expression von SMA einzuschränken. Dranoff et al. beschreibt den Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von α -SMA exprimierenden Myofibroblasten und einer Fibrose der Gallengänge (Hinz et al., 2001a, Dranoff and Wells, 2010).

5. Radioaktive Bestrahlung

5.1. Strahlentherapie allgemein

Verschiedene Arten ionisierender Strahlung sind klinisch relevant. Zum einen spielt die Photonenstrahlung (γ - und Röntgenstrahlung) strahlentherapeutisch eine wichtige Rolle. Diese Photonen- oder Quantenstrahlung ist eine elektromagnetische Wellenstrahlung, die zur Ionisation von Atomen führen kann. Des Weiteren existiert die Korpuskularstrahlung. Diese Teilchen können geladen (z. B. β -, α -Strahlung) oder ungeladen (z. B. Neutronenstrahlung) sein (Richter and Feyerabend, 2002, Lohr and Wenz, 2007).

Die Zellen reagieren in ihren verschiedenen Zellzyklen unterschiedlich auf die Strahleneinwirkung. Eine Bestrahlung über einen längeren Zeitraum (protrahierte Bestrahlung) triggert andere Mechanismen als eine einmalige hochdosierte Bestrahlung.

5.2. Teletherapie und Brachytherapie

In der Strahlentherapie wird zwischen Teletherapie und Brachytherapie unterschieden. Diese beiden Begriffe lassen sich aus dem Griechischen ableiten und bedeuten fern bzw. nah. Die beiden Methoden unterscheiden sich in dem Abstand zwischen Strahlenquelle und dem zu therapierenden Gewebe (Zielvolumen).

Während man bei der Teletherapie von außen durch die Haut (perkutan) hindurch strahlt, wird bei der Brachytherapie versucht, eine Belastung des gesunden Gewebes zu vermindern, indem man die Strahlungsquelle direkt in die zu behandelnde Umgebung verbringt.

Bei der Teletherapie werden als Strahlung hauptsächlich Photonen und Elektronen, neuerdings auch Ionen, eingesetzt, welche mit Hilfe eines

Beschleunigers erzeugt werden. Die Energie der Strahlung beträgt einige MeV. Ein Nachteil der Teletherapie ist, dass die Strahlung erst durch das gesunde Gewebe hindurch muss, um an den Zielort zu gelangen. Beim Einbringen der Strahlung in das Zielvolumen ist man also in der Wahl der maximal applizierten Dosis begrenzt.

Durch die direkte Bestrahlung mit Hilfe ionisierender Strahlung in der Brachytherapie erzielt man eine bessere Konzentration der Dosis auf das Zielvolumen. Durch den radioaktiven Zerfall bestimmter Isotope mit geeigneten Halbwertszeiten und Zerfallsenergien wird die ionisierende Strahlung gewonnen. Der Dosisabfall in das angrenzende Gewebe ist steil, dies ermöglicht eine bessere Konzentration der Dosis und somit eine geringere Strahlenbelastung für das umgebende Gewebe. Je nach Indikation werden Betastrahler wie z. B. Phosphor-32 und Strontium-90 oder Gammastrahler wie z. B. Iridium-192 oder Kobalt-60 eingesetzt (Richter and Feyerabend, 2002).

Man unterscheidet verschiedene Applikationsarten: die intraluminale oder intrakavitäre, die interstitielle oder die Oberflächentherapie. Bei der intraluminalen oder intrakavitären Therapie wird die Strahlenquelle in Körperhöhlen direkt neben den zu bestrahlenden Bereich eingesetzt, wohingegen bei der interstitiellen Therapie die Strahlenquelle direkt in das Gewebe verbracht wird. Die Oberflächentherapie bezeichnet die Bestrahlung der Haut oder Schleimhaut. Darüber hinaus kann man eine permanente von einer temporären Implantation unterscheiden (Richter and Feyerabend, 2002).

Die Dosisrate, mit welcher die Strahlung an das umgebende Medium abgegeben wird, wird in Gray pro Stunde (Gy/h) angegeben.

In der Brachytherapie werden die LDR (Low-Dose-Rate) Brachytherapie mit 0,4 bis 2 Gy/h, die MDR (Medium-Dose-Rate) Brachytherapie von 2 bis 12 Gy/h und die HDR (High-Dose-Rate) mit bis zu 12 Gy/h voneinander unterschieden. Eine Sonderform der HDR stellt die PDR (gepulste HDR) Brachytherapie dar. Hierbei wird mit 0,5 Gy/h und mit Pulslängen von 10 bis 30 min auf das Gewebe eingewirkt (Lohr and Wenz, 2007).

Die Brachytherapie wird in der Humanmedizin im Allgemeinen zur Behandlung von Glaukomen, Cervixcarzinomen, Hautkrebs, Mammakarzinomen, In-Stent-Restenosen in der Kardiologie oder Prostatakarzinomen angewendet (Held, 2007,

Waksman et al., 1995, Herfarth, 2006).

In der Gastroenterologie werden die Teletherapie und die Brachytherapie einzeln oder in Kombination eingesetzt. Für die intraluminale Brachytherapie stehen die HDR-, die LDR und PDR- Brachytherapie in unterschiedlichem Ausmaß zur Verfügung (Schmidt, 1999). Einzige praktische Anwendung der Brachytherapie in der Gastroenterologie ist derzeit allerdings nur die HDR-Brachytherapie im Afterloading-Verfahren zur palliativen Stenosebehandlung des Ösophaguskarzinoms.

Laut Holmes et al. ist die Brachytherapie ein vielversprechender Ansatz, nach Teirstein et al. sogar die einzig effektive Maßnahme zur Behandlung einer In-Stent-Restenose (Holmes, 1997, Teirstein, 2001).

5.3. Betastrahler allgemein

Der Beta-Zerfall ist der radioaktive Zerfall eines Atomkerns. Man spricht von Beta-Strahlung, wenn ein energiereiches Elektron oder Positron als Folge des Zerfallvorgangs den Kern verlässt. Hierbei unterscheidet man, je nachdem welche Teilchen ausgesendet werden, einen Beta-minus-Zerfall (β^-) (ein Elektron wird abgestrahlt), oder einen Beta-plus-Zerfall (β^+) (ein Positron wird abgestrahlt) (Krieger, 2004, Richter and Feyerabend, 2002).

Beta-Strahler haben eine sehr geringe Reichweite, sie beträgt nur wenige Millimeter im Gewebe. Sie kann mit einfachen Abschirmungen (nur eine dünnwandige Plexiglaswand) in der Therapie eingesetzt werden. Typische Beta-Radioisotope sind Phosphor-32, Strontium-90, Thallium-204, Yttrium-90. Einige Beta-Strahler geben zusätzlich auch γ -Strahlung ab (Stolz, 2005).

5.4. Radioaktivität und Zellwirkung

Es können mehrere Mechanismen der Strahlenwirkung unterschieden werden. Zum Einen kann man die Energieübertragung in Gewebe in vier Phasen einteilen:

- Der physikalische Prozess der Absorption führt durch die Energieabsorption zu Ionisation, Molekulanregung und Wärme.
- Bei der physikalisch-chemischen Phase kommt es zu direkten Schäden an organischen Molekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren oder indirekten Schäden durch Radikale.

- In der biochemischen Phase entstehen durch Oxidation, Reduktion oder Hydroxylierung Veränderungen an organischen Molekülen.
- Als letzte Phase tritt die Biologische ein, in der morphologische und funktionelle Veränderungen festgestellt werden können (Richter and Feyerabend, 2002).

Durch eine Strahlentherapie können verschiedene radiobiologische Effekte auf zellulärer Ebene hervorgerufen werden:

- Gesamtdosen über 10 Gy haben einen antiproliferativen Bestrahlungseffekt. Dieser spielt eine wichtige Rolle bei der Vorbeugung von Restenosen, der Keloidbildung, bei der Behandlung von Fibromen und gegen das Fortschreiten des Morbus Dupuytren. Des Weiteren hat diese Dosis einen immunmodulatorischen Bestrahlungseffekt, welcher die Langzeitunterdrückung von autoimmunologischen Prozessen gewährleisten soll. Diese werden z. B. in der endokrinen Orbitopathie eingesetzt (Trott and Kamprad, 1999).
- Gesamtdosen von 2 bis 6 Gy haben antiinflammatorische Bestrahlungseffekte, die auch analgetische Wirkungen aufweisen können. Das macht man sich bei der Radiotherapie von Periarthritiden, Arthritiden, Spondylosen und Ankylosen zu Nutze (Trott and Kamprad, 1999).
- Gesamtdosen unter 2 Gy führen zu funktionellen Bestrahlungseffekten (Modulation der Genexpression) (Trott and Kamprad, 1999).

5.5. Phosphor-32

In dieser Studie wird ein reiner Betastrahler eingesetzt. Die Strahlendosis bleibt somit auf die unmittelbare Nähe des Strahlers beschränkt. Gewählt wurde hierbei Phosphor-32, welches für die LDR-Brachytherapie besonders geeignet ist. Es zerfällt zu 100 % im β^- Zerfall. Die Halbwertszeit dieses Strahlers beträgt 14,3 Tage. Er ermöglicht eine relativ gleichmäßige Dosisabgabe über den therapeutischen Behandlungszeitraum von 7 Tagen.

Über einen Neutroneneinfang wird aus dem stabilen Phosphor-31 das Phosphor-32 gewonnen. Unter Aussendung eines Elektrons mit maximal 1,7 MeV zerfällt das Phosphor-32 zu dem stabilen Schwefel-32.

Phosphor-31 ist das einzig stabile Isotop des Phosphors. Die anderen acht bekannten Radionuklide unterscheiden sich durch die verschiedenen Halbwertszeiten, bei dem das Phosphor-33 die längste Halbwertszeit mit 25,3 Tagen hat. Die maximale Reichweite der emittierten Elektronen von Phosphor-32 beträgt in Luft 710 cm, in Plexiglas 0,78 cm, in Glas 0,4 cm. Aufgrund dieser Daten ist eine Abschirmung mit einem Plexiglas der Stärke 1 cm ausreichend.

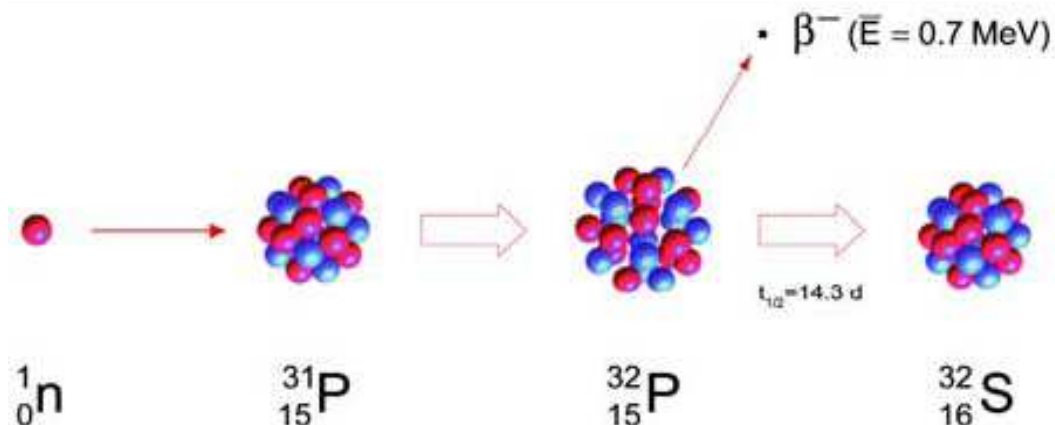


Abbildung 6: Zerfall des stabilen Phosphor-31 nach Neutronenbeschuss. Phosphor-32 geht über einen β^- -Zerfall in den Grundzustand des Schwefel-32 über.

5.6. Betastrahler in der Medizin

Zu den Einsatzgebieten der reinen Betastrahler in der Medizin zählen die Dermatologie, die Ophtalmologie, Afterloading-Anwendungen oder Seeds für die Prostata-spickung (Krieger, 2005).

In der Ophthalmologie werden Betastrahler zur Behandlung des Pterygiums und des Glaukoms erfolgreich eingesetzt (Kirwan et al., 2003, Held, 2007). Die Arbeitsgruppe um Held zeigt im Tierversuch (New Zealand white rabbit), dass Dosisleistungen von 5 und 15 Gray, berechnet auf eine Liegedauer von 7 Tagen (verwendeter Strahler Phosphor-32, LDR-Brachytherapie, Liegedauer des Implantates: 21 bzw. 35 Tage), einen signifikant erniedrigten Augeninnendruck und eine geringere Anzahl Entzündungszellen gegenüber einer placebokontrollierten Gruppe aufweisen (Held, 2007).

Die Dupuytren'sche Kontraktur ist eine Erkrankung des Bindegewebes, welche langfristig zu einer Beugekontraktur der Finger und zu funktionellen Einschränkungen führen kann. Histologisch finden sich vermehrt Fibroblasten und Myofibroblasten. Einzeldosen von 5x3 Gray pro Woche und 30 Gray Gesamtdosis scheinen im Frühstadium der Krankheit zu einem therapeutischen

Erfolg zu führen (Adamietz et al., 2001).

Des Weiteren existieren jahrelange Erfahrungen im Bereich der Rezidivstenosenbehandlung in der Kardiologie. Die hier verwendeten Strahler sind einmal Gammastrahler (Iridium-192) und Betastrahler (Yttrium-90, Phosphor-32) (Dietz et al., 2001).

Die Rezidivrate der In-Stent-Restenose nach Ballondilatation ist das Hauptproblem der interventionellen Kardiologie, die Rezidivrate liegt bei 50-70 %. Dies ist auf die Narbenbildung zurückzuführen, welche durch Intimahyperproliferation entsteht (Baumgart et al., 2002).

Im Jahre 1996 wurde in Michigan der erste Phosphor-32 Stent beim Menschen implantiert (der Aktivitätsbereich ist mit 0,5-1,0 μCi angegeben, eine Dosis wird nicht genannt). Die darauf folgende Studie zeigte, dass ähnlich gute Ergebnisse wie mit nicht-radioaktiven Stents erzielt werden konnten. In Heidelberg waren 1997 die Ergebnisse mit einem Phosphor-32 Stent (ebenfalls ist nur der Aktivitätsbereich mit 1,5-3 μCi angegeben) deutlich vielversprechender als die Ergebnisse der Arbeitsgruppe aus Michigan, da die Behandlung zu einer 50 %igen Reduktion der behandelten Neointima im Vergleich zu nicht behandelten Neointima geführt hat. Jedoch trat 3-12 Monate nach Implantation an den Enden der im Folgenden beschriebene Edge-Effekt auf (Hehrlein, 2002).

Durch die Erfahrungen aus Tierversuchen (Schwein) wird eine mittlere Dosisleistung von 12-18 Gray in 2 mm Gewebetiefe als Richtwert angegeben (Dietz et al., 2001). Verschiedene Studien am Menschen (PREVENT-Studie 16, 20, 24 Gy in 1 mm Gewebetiefe, START-Studie 16, 20 Gy in 2 mm Gewebetiefe, INHIBIT-Studie 20 Gy in 1 mm Gewebetiefe, START- und INHIBIT-Studie Placebokontrolliert) erzielen mit den genannten Dosen Erfolge in der Senkung der Restenoserate (Baumgart et al., 2002). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass das Target in den verschiedenen Studien verschieden definiert wurde. Die Frage ist, ob die Zellen der Adventitia oder der Media in ihrer Proliferation gehemmt werden müssen oder ob eine Bestrahlung der Endothelzellen ausreicht (Dietz et al., 2001, Baumgart et al., 2002). Außerdem wird in einer Langzeitstudie (SCRIPPS-1-Studie) über 3 Jahre eine Intimahyperplasie („late-loss“) zwischen 6 Monaten und 3 Jahren beobachtet. Die Theorie dahinter ist, dass durch eine Brachytherapie die In-Stent-Rezidivstenose zwar zeitlich verschoben, nicht aber

komplett unterbunden werden kann, was aber die Zeitintervalle zwischen den notwendigen Interventionen verlängert (Dietz et al., 2001).

5.6.1. Edge Effekt

Bei der Verwendung von radioaktiven Stents in der Kardiologie ist das Phänomen eines sogenannten „Edge-Effektes“ oder „Candy Wrapper“ aufgetreten.

Die Theorie, die hinter der Hyperproliferation an den proximalen und distalen Enden (ca. 1-3 mm nach dessen Ende) des Stents steht, ist jene, dass dort ein zu starker Dosisabfall stattfindet. Diese Dosis liegt dann eher in einem Bereich, bei dem die Zellen zur metabolischen Aktivität angeregt werden (ca. 2 Gy), man liegt in einem subtherapeutischen Bereich. Des Weiteren wird die Kombination mit einem Gewebeschaden, der durch das Einsetzen des Stents und durch eine überhöhte Ballondilatation entstanden ist, angenommen (Albiero et al., 2000, Serruys and Kay, 2000, van Der Giessen et al., 2001, Voisard et al., 2006, Dietz et al., 2001, Baumgart et al., 2002).

Man kann bei diesen Schäden nicht immer von sichtbaren Verletzungen ausgehen. Es reichen kleinste, meist unsichtbare Gewebeschäden, die einen Edge-Effekt begünstigen. Der gebräuchliche Begriff des „Geographic miss“, der eine Verfehlung des Zielbereiches suggeriert, ist in diesem Fall missverständlich (Silber, 2002).

Um den Edge-Effekt verhindern zu können, sollte der Stent länger sein als die Verletzung, die behandelt wird. Außerdem muss der Stent gegen ein Verrutschen gesichert werden und sollte frei von Plaques sein, die der Stentwand anheften könnten.

Aufgrund der ähnlich hohen Raten an Restenosen wie bei herkömmlichen Stents und des erst späten Entdeckens des Edge-Effekts durch eine weltweite Analyse ist der Einsatz von radioaktiven Stents in der Kardiologie zurückgegangen (Hehrlein, 2002).

6. Nebenwirkungen der Strahlentherapie

Auf zellulärer Ebene findet eine Schädigung der sich teilenden Zellen statt (vorwiegend in der Mitose- und in der G2-Phase). Sich schnell teilende Zellen wie z. B. hämatopoetische Stammzellen weisen eine höhere Strahlensensibilität auf als

sich weniger schnell teilende. Die Schädigung der DNA (Einzel- und Doppelstrangbrüche) nimmt mit der applizierten Dosisleistung linear zu (Sauer, 2003).

Strahlenbedingte Veränderung des Endothels der kleinen bis mittleren Gefäße führen zu einer Gefäßdurchlässigkeit. Blutplasma kann in das angrenzende Gewebe gelangen und eine Intimafibrose und Durchblutungsstörungen bewirken. Generell sind akute von chronischen Strahlenschäden zu unterscheiden. Zu den akuten gehören gerade im Magen-Darmtrakt Erosionen und Ulzerationen, zu den chronischen infolge der Vaskulopathie Vernarbungen und Fistelbildung (Thomas, 2003).

Bei einer Strahlenbehandlung muss auch der Aspekt in Betracht gezogen werden, dass Patienten, die aufgrund gutartiger Erkrankungen bestrahlt worden sind, auch einen strahleninduzierten Krebs entwickeln können. Das Risiko richtet sich nach dem Gebiet der Behandlung. Somit ist es bei peripheren Indikationen wie z. B. bei Morbus Dupuytren deutlich geringer als z. B. in Gebieten wie Thorax, Knochenmark oder Pelvis (Trott and Kamprad, 2006).

Ebenfalls kann nach einer Strahlentherapie eine strahleninduzierte Fibrose auftreten. Fibrotisches Gewebe beinhaltet eine erhöhte Anzahl von Entzündungszellen, Fibroblasten und extrazellulärer Matrix.

Im bestrahlten Gewebe werden spezifische Zytokine wie z. B. TGF- β , PDGF und IL-1 α vermehrt synthetisiert (Langberg et al., 1994).

TGF- β beeinflusst eine Vielzahl von Zellvorgängen. Es stimuliert die Kollagenproduktion, hemmt die epitheliale Zellproliferation, hemmt die Proliferation und die Funktion von B-Zellen, T-Zellen und natural killer cells und hat eine chemotaktische Wirkung auf Fibroblasten, Monozyten und Makrophagen (Denham and Hauer-Jensen, 2002, Du et al., 2010).

TGF- β ist das Hauptzytokin, welches durch eine exogene Noxe, in diesem Fall die Strahlung eine Verschiebung innerhalb der Vorläuferfibroblasten hinzu mehr späten Ausdifferenzierungsformen der Fibroblasten bewirkt. Diese post-mitotischen Fibrozyten produzieren mehr Kollagen als Fibroblasten (Rodemann and Bamberg, 1995b, Yarnold and Brotons, 2010, Lara et al., 1996).

Aufgrund einer neueren Studie wird angenommen, dass sich eine

strahleninduzierte Fibrose durch Gabe von Vitamin E und Pentoxifylline (antioxidative und antiinflammatorische Wirkung) reduzieren lässt. Dieses ist bisher nur ein Ansatz, weitere Untersuchungen müssen folgen (Anscher, 2005).

7. Das Stenoseinduktionsmodell im Gallengang

Generell ist sehr wenig Literatur über eine Stenoseinduktion im Gallengang vorhanden.

Erstmal beschreibt Vorwerk et al. eine Stenoseinduktion mit Hilfe eines Nd:YAG-Lasers. Im Hundemodell wurde mittels perkutaner Cholezystotomie der Gallenblase im Gallengang eine Metallspitze am Ende einer Faser durch den Laser erhitzt (5 bis 10 W für 1 Sekunde, 3-5 Wiederholungen). 12 Hunde schloss diese Studie ein, von diesen entwickelten 7 einen kompletten Verschluss, 5 hatten eine hochgradige Stenose. 3 Hunde entwickelten diese Stenose nach 3 Tagen, 6 Hunde nach 7 Tagen, und 2 12-15 Tage nach Koagulation (Vorwerk et al., 1989).

Eine weitere Studie von Rumalla et al beschreibt die Verwendung einer monopolaren Heater-Probe (7 F, Olympus) und einer multipolaren Sonde (7 F Gold Probe) zur Stenoseinduktion beim Schwein. Hierfür wurde eine Leistung für die Heater probe von 5, 10 und 15 W (1 J=1 Ws) für 1 Sekunde und für die multipolare Probe von 12, 16, 20, und 24 W für 2 Sekunden verwendet. Im Gegensatz zu Vorwerk et al. findet hier anstelle einer Operation der Zugang zum Gallengang über den endoskopischen Weg statt. Nach Aspiration wird versucht, einen zirkulären Schaden zu setzen. Die Heater-Probe erzielte bessere Ergebnisse als die multipolare Sonde. Insgesamt erzielte Rumalla et al. eine geringere Stenoserate als Vorwerk et al. 9 Tiere wurden in der Studie mit insgesamt 13 Hitzeapplizierungen behandelt. Davon entwickelten insgesamt 7 Tiere eine Stenose. Dieses Ergebnis ist auch auf die eventuell zu gering applizierte Leistung zurückzuführen (Rumalla et al., 2003).

Basierend auf diesen Erfahrungen soll im Rahmen des BetaMod-Projektes der Gallengang mit einer monopolaren Heater-Probe zirkulär auf eine Länge von ca. 0,5-1 mm koaguliert werden. Stenoseinduktionsrate, erforderliche Dosisleistung und Nebenwirkungen sind Fragestellung der Studie.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Zielsetzung/Problemstellung

In vorliegender Arbeit soll die Modulation der Wundheilung nach Dilatation einer benignen narbigen Gallengangsstenose durch eine dosisabhängige LDR-Brachytherapie mit einem P32-beschichteten Gallengang-Stent im Rahmen einer konventionellen ERC bei Schweinen untersucht werden. Die Studie ist eine präklinische Studie zur Erfassung der Wirksamkeit und der Sicherheit einer LDR-Brachytherapie vor einem potentiellen Einsatz beim Menschen.

Dies beinhaltet folgende Partialziele:

1. Induktion einer narbigen benignen Gallengangsstenose durch monopolaren Hochfrequenz (HF)-Strom.
2. Ballondilatation der Stenose mit anschließender Drainage durch P32-beschichtete Gallengang-Stents, die innerhalb der ersten Woche eine Dosis von 0 Gy, 15 Gy oder 30 Gy abgeben, in einem randomisierten und verblindeten Versuchsdesign.
3. Untersuchung des Effekts der LDR-Brachytherapie auf die behandelte Stenose
 - (a) die klinisch-radiologische Ausprägung der Stenose in-vivo
 - (b) die makroskopische Ausprägung der Stenose am explantierten Gallengang
 - (c) die histopathologische Ausprägung der Stenose
 - (d) histopathologische Merkmale der Entzündung, Kollagenproduktion, des Gehalts an α -SMA und auf vaskuläre Strahlenschäden im Bereich der Stenose
4. Histopathologische Untersuchung des Effekts der LDR-Brachytherapie auf gesundes Gallengangsgewebe
5. Strahlenschutzaspekte im Hinblick auf die potentiell spätere klinische Anwendung in einer humanen klinischen Studie.

2. Untersuchungsgut

Der Tierversuch wurde unter der Antragsnummer 55.2-1-54-2531-11-08 und dem Titel: „Wundheilungsmodulation durch integrierte Brachytherapie bei benignen Gallengangsstenose“ von der Regierung von Oberbayern genehmigt und nach den Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.05.1998 § 8 Abs.1 durchgeführt.

2.1. Materialien, Geräte und Chemikalien

Alle verwendeten Materialien, Geräte und Chemikalien werden im Bezugsquellenverzeichnis unter Kapitel XIII zusammengestellt.

2.2. Das Schwein als Tiermodell

Das Schwein weist im Gegensatz zu anderen Modelltierarten wie Ratte, Meerschweinchen, Maus und Hund Besonderheiten und Vorteile bezüglich der morphologischen und physiologischen Ähnlichkeit zum Menschen. Untersuchungen an Kleintieren sind in der vorliegenden Studie aus technischen Gründen nicht möglich.

Die Ähnlichkeit des Schweinegallengangs mit dem humanen Gallengang in Bezug auf Größe, Physiologie und Biochemie ermöglichen eine gute Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen.

2.3. Versuchstiere

Als Versuchstiere werden klinisch gesunde Schweine „Deutsche Landrasse“ beiderlei Geschlechts verwendet (Alter ca. 3 Monate, Gewicht ca. 20-30 kg). Die Tiere entstammen der Versuchsstation Thalhausen der Technischen Universität München, Ampertshausen 15, 85402 Kranzberg, Deutschland und werden mindestens drei Tage vor dem Versuch zur Akklimatisierung in den Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung (Walter-Brendel-Zentrum, Marchioninstr. 27, 81377 München) verbracht und eingestallt.

Dort erfolgt die standardisierte Boxenhaltung der Tiere in Gruppen von 2-3 Tieren in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Der Boden der Bestallung ist mit rutschfesten Gummimatten versehen, die Tiere haben freien Zugang zu den Außenboxen, die Zuluft im Stall erfolgt durch eine Zwangsbelüftung. Die Tiere erhalten spezielles Schweinefutter in pelletierter Form und Wasser ad libitum, 42

Stunden vor der Intervention werden sie 2-mal täglich mit flüssiger Nahrung (Fresubin) gefüttert, 24 Stunden vor der Operation erhalten die Tiere nur noch Wasser ad libitum.

Die Tiere verbleiben während der gesamten Versuchsreihe im Institut und werden täglich durch Fachpersonal des Institutes und Tierärzte, angestellt im BetaMod-Projekt, überwacht. Die Haltung der Tiere erfolgt nach den aktuellen EU-Richtlinien (86/609).

2.4. Studiendesign

Es sollen drei Gruppen verglichen werden: Behandlung mit einem nicht-radioaktiven Stent (Kontrollstent 0 Gy), mit einem 15 Gy-Stent und einem 30 Gy-Stent. Nach einer Fallzahlberechnung sind acht Tiere in jeder Gruppe erforderlich, um bei einer Standardabweichung von etwa 7 mm Gallengangsweite (Rumalla et al., 2003) einen Unterschied von wenigstens 1 mm auf einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ mit einer Power von wenigstens 0.8 zu erfassen. Ausgehend von einer Stenoseinduktionsrate von 90 % und einer drop-out Rate von weiteren 10 % waren nach initialer Schätzung 30 Tiere zur Durchführung der Studie erforderlich. Da sich gerade im ersten Drittel der Studie eine höhere drop-out Rate zeigte, die hauptsächlich bedingt war durch Probleme bei der Stenoseinduktion (z. B. Perforation des Gallengangs durch zu hohen Energieeintrag), durch die Entwicklung von Cholangitiden durch Stentverschluss oder auch durch spontanen Stentverlust, musste die Gesamtzahl der Tiere auf insgesamt 42 erhöht werden, um eine Gruppenstärke von wenigstens acht Tieren zu erhalten. Die Erhöhung der Tierzahl wurde durch die Regierung von Oberbayern auf Antrag genehmigt.

Abbildung 7 zeigt das initiale Studiendesign, nach dem die ersten 12 Tiere untersucht wurden (sogenanntes Studienprotokoll der P-Reihe: P 101 bis P 112).

Ein Versuchsdurchlauf dauert 35 Tage. Wie in Abbildung 7 beschrieben, wird jedes einzelne Tier 4 Eingriffen unterzogen. Am Tag 0 wird via ERC eine Stenose induziert, 14 Tage später wurde erneut eine ERC durchgeführt, bei der die Ausbildung einer Stenose verifiziert wurde. Bei einer signifikanten Stenose mit konsekutiver prästenotischer Gangdilatation wurde diese mit einem Ballonkatheter aufgedehnt, und es wurde ein Stent eingesetzt, wobei die Wahl des Stents entsprechend einer Randomisierungsliste (0 Gy, 15 Gy oder 30 Gy) gewählt wurden. Untersucher, Endoskopieassistenz und Tierärzte waren

verblindet. Jeder Stent wurde aus Sicherheitsgründen so gehandhabt, als wäre er radioaktiv. Am Tag 21 erfolgte die Stententfernung mittels einer dritten ERC mit Verifizierung der Stenose. Bei Fortbestand einer signifikanten Stenose wurde ein nicht-radioaktiver Stent eingesetzt, um eine Drainage zu gewährleisten und eine Cholangitis zu vermeiden. Am Tag 35 wurde eine vierte ERC durchgeführt; bei der ein etwaiger Stent extrahiert und der Gallengang mit Kontrastmittel dargestellt wurde. Anschließend wurden die Tiere operiert, euthanasiert und der Gallengang präpariert.

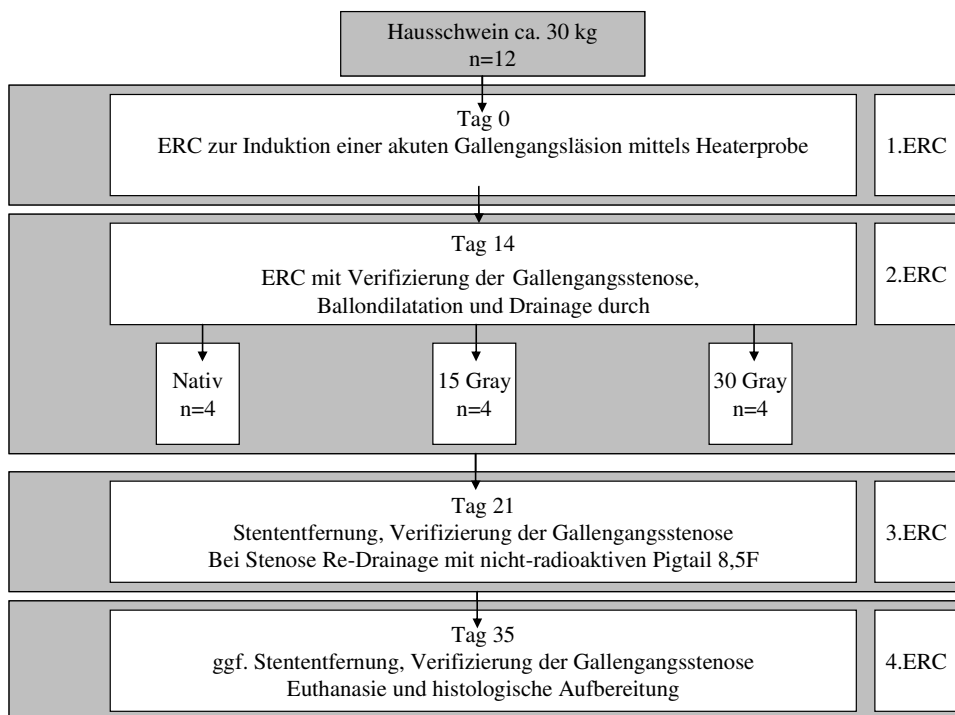


Abbildung 7: Studienprotokoll der P-Reihe

Bei diesem Vorgehen zeigte sich eine hohe Gesamt drop-out Rate, denn 8 von 12 Tieren konnten nicht ausgewertet werden. Nur vier Tiere konnten per Protokoll behandelt und somit später ausgewertet werden (P 104, 105, 106, 112). Gründe waren u.a. Gallengangsperforationen durch zu hohen Energieeintrag und die Entwicklung von Cholangitiden. Nach kritischem Review aller Komponenten durch Untersucher und Tierärzte wurde der Energieeintrag drastisch reduziert. Da die ERC per se mit Intervention am Gallengang und auch die damit verbundene Narkose als eine der Komplikationsquellen in Frage kam, wurde entschieden, das Protokoll dadurch abzuändern, dass man auf die dritte ERC verzichtete und stattdessen den an Tag 14 eingelegten Stent bis zum Tag 35 beließ. Zusammen mit einem Standardprotokoll für die periinterventionelle Antibiose und einer

strikten Begrenzung der Endoskopiezeiten auf etwa 45 min konnte die drop-out Rate deutlich reduziert werden.

Abbildung 8 zeigt das geänderte Versuchsdesign, mit dem 30 Tiere untersucht wurden. 20 Tiere konnten per Protokoll ausgewertet werden. Die drop-out Rate lag somit bei 30 %. Im Folgenden beziehen sich alle Hinweise auf das Versuchsprotokoll auf dieses Design der sogenannten W-Reihe (Tiere W 101-W 130). Nach diesem optimierten Studienprotokoll behandelt (Abbildung 8). wurde der Stent, der am Tag 14 eingelegt wurde, nicht entfernt. Er verbleibt die restliche Versuchsdauer im Tier. Am Tag 21 fand nun eine Durchleuchtung der Tiere unter Kurznarkose statt, um zu überprüfen, dass sich der Stent in der richtigen Position im Gallengang befand. Am Tag 35 wurden die Tiere einer dritten ERC unterzogen, bei der der einliegende Stent entfernt und der Gallengang unter Durchleuchtung mit Kontrastmittel vermessen wurde. Es folgte die Operation, die Euthanasie und die Präparation des Gallengangs.

An jedem Operationstag wurden Blutproben entnommen zur Messung von Cholestaseparametern, Entzündungsparametern und Blutbild.

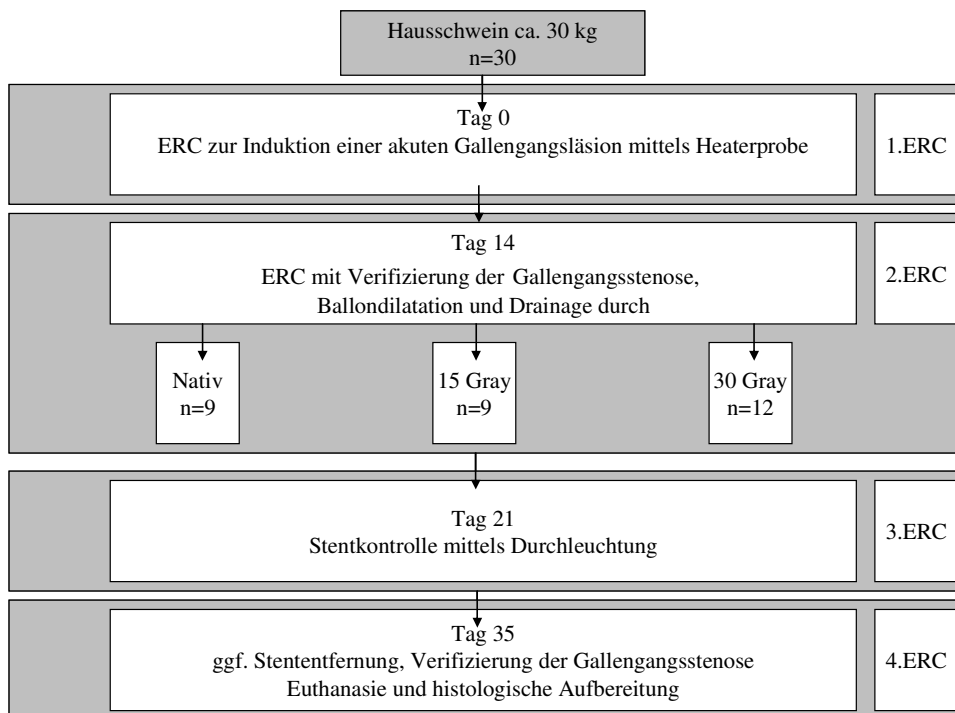


Abbildung 8: Studienprotokoll der W-Reihe

3. Zuständigkeiten

Diese Arbeit ist Teil eines interdisziplinären Forschungsprojekts. Innerhalb dieses Teilprojektes herrscht eine intensive Zusammenarbeit der verschiedenen Institute. Die Betreuer der einzelnen Bereiche werden im Folgenden mit den dazugehörigen Instituten aufgelistet.

- Studienleitung, Endoskopie und radiologische Auswertung: Prof. Dr. med. Jörg Schirra, Ltd. Oberarzt, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Campus Großhadern, Klinikum der Universität München
- Proben-Aufbereitung für die histologische Auswertung sowie Kontrolle der Stenoseinduktion via HF-Gerät: Dr. rer. nat. Ronald Sroka, Leiter des Laserforschungslabors, Campus Großhadern, Klinikum der Universität München
- Stentherstellung, strahlenphysikalische Zuständigkeit: PD Dr. rer. nat. habil. Walter Assmann, Medizinphysik und Materialforschung, Fakultät für Experimentalphysik/Kernphysik, Arbeitsgruppe LMU München, Garching.
- Beratung bei der histopathologischen Auswertung: PD Dr. med Doris Mayr, Oberärztin des Pathologischen Instituts der LMU München

4. Versuchsvorbereitung

4.1. Dosisfindung

Im Vorfeld der Studie gibt es keinerlei Angaben über die Effektivität einer LDR-Brachytherapie mit einem Beta-Strahler in Abhängigkeit von der Dosisleistung, also der Dosis pro Zeitraum. Die Erfahrungsberichte der intrakoronaren LDR-Brachytherapie beschreiben gute Behandlungserfolge bei einer Gesamtdosis von 20 Gray (HDR-Verfahren und LDR-Verfahren mit permanenten Stents). Allerdings wurden die entsprechenden Metallstents auch nicht mehr entfernt. Diese Ergebnisse lassen allenfalls eine Eingrenzung der Dosisleistung zu, können aber aufgrund der unbestimmten Zeit und der unterschiedlichen Gewebearten nicht als konkreter Anhalt für die Wahl einer optimalen Dosisleistung dienen. Im Tierversuch muss getestet werden, zu welchen Wechselwirkungen es zwischen dem Gallengangsgewebe und der Dosisleistung des radioaktiven Stents kommt.

Im Vorläuferprojekt „RadBioMat“ stellte sich heraus, dass eine Dosis in Höhe von 15 Gy über 3 bzw. 5 Wochen eine positive Wirkung in der Glaukombehandlung hat (Held, 2007) im Gegensatz zu 5 Gy. Unter Bezugnahme auf diese Studie und nach Rücksprache mit erfahrenen Strahlenbiologen wird im BetaMod-Projekt ebenfalls eine Dosisleistung von 15 Gray und zusätzlich eine höhere Leistung von 30 Gray gewählt, um die mögliche schädigende Wirkung einer hohen Dosis zu untersuchen. Diese Dosis wird binnen einer Woche appliziert, weil in dieser Zeit die mutmaßlich prägenden Effekte der Wundheilung erfolgen. Da es bei Planung der Studie nahezu keinerlei Hinweise auf einen für die Wundheilung optimalen Bereich der Dosisleistung gibt, wird im Hinblick auf humane klinische Folgestudien bewusst in Kauf genommen, dass der Dosisbereich für positive Effekte auf die Wundheilung möglicherweise zu hoch ist, um wenigstens eine unschädliche bzw. toxische Dosisleistung charakterisieren zu können.

4.2. Dosisverteilung im Zielvolumen

Wichtig ist es, das Zielvolumen, also das „Target“ zu bestimmen (in welcher Gewebeschicht soll die gewünschte Strahlendosis appliziert werden). Die abgegebene Gesamtdosis wird in 1 mm Gewebetiefe berechnet. Auf der Oberfläche des Gewebes herrscht eine höhere Kontaktdosis, das heißt, die oberste Schicht ist einer höheren Gesamtdosis (ca. 80 Gray) ausgesetzt. Bereits in einer Tiefe von 6 mm treten aufgrund der Eigenschaften eines Betastrahlers keine Strahlenwirkungen mehr auf. Die Berechnungen des Targets erfolgt von der Stentmitte, von dieser sind es ca. 1,42 mm bis zur Oberfläche des Stents. Dementsprechend wird die Dosis in einem Abstand von ca. 2,42 mm von der Kathetermitte aus im Gewebe appliziert (siehe Abbildung 9).

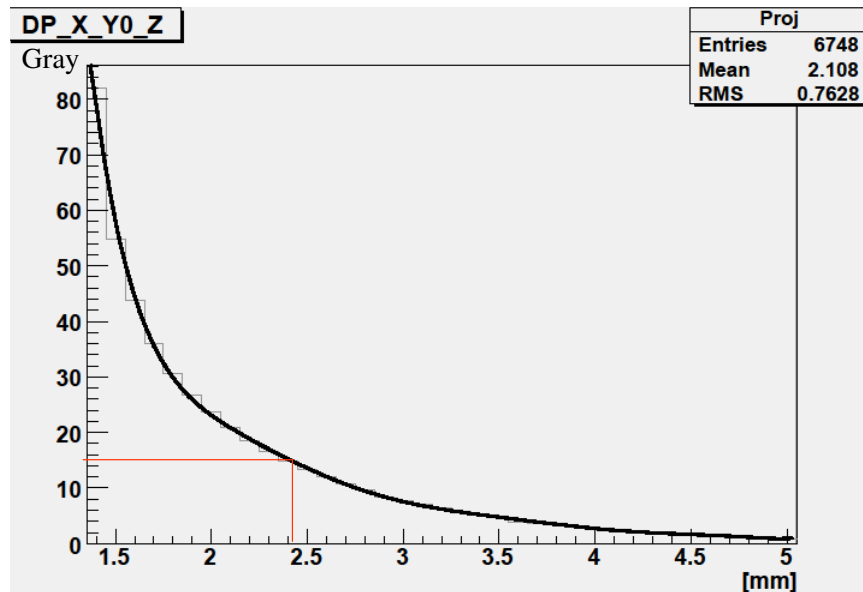


Abbildung 9: Dosisverteilung eines 8,5 F Stents im Gallengangsgewebe rote Linie: die 15 Gray Dosis wird in 2,42 mm von der Stentmitte aus appliziert.

Die Graphik beschreibt die Dosisverteilung der 8,5 F Folie mit 15 Gray in 1 mm Abstand der Stentoberfläche. Die Abstandsskala läuft von der Stentmitte. Diese Daten sind für eine Liegedauer von 7 Tagen berechnet und wurden zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. habil. Walter Assmann, Fakultät für Physik, LMU München.

Am Anfang der Versuchsreihe (P-Reihe, siehe 2.4) wird der Stent nach einer Woche entfernt. Die genannten 15 und 30 Gray beziehen sich auf diese erste Woche. Wie unter 2.4 begründet, wird nach 12 Tieren das Design geändert. Bei den folgenden 30 Tieren wird der Stent nicht nach 7 Tagen entfernt, sondern statt 7 Tage insgesamt 21 Tage im Tier belassen.

Da der Stent nun zusätzliche 14 Tage zu den am Anfang per Protokoll festgelegten 7 Tage im Gallengang verbleibt, erhöht sich die applizierte Gesamtleistung laut der nachfolgenden Gleichung (Abbildung 10) um den Faktor 2,22. Dementsprechend wird eine Gesamtdosis von 33,3 anstatt 15 Gray bzw. 66,6 anstatt 30 Gray über die Gesamtdauer appliziert. Da der Einfluss der LDR-Brachytherapie auf die Wundheilung während der ersten Woche nach Dilatation der Stenosen Hauptziel vorliegender Arbeit ist, wird die in der ersten Woche applizierte Dosis in allen Versuchen konstant gehalten.

$$E_{\text{appl}} = \int_0^{\tau} dt P_0(P^{32}) \cdot e^{-t/14,3d \cdot \ln(2)}$$

$$\frac{E_{\text{appl}}(21d)}{E_{\text{appl}}(7d)} = \frac{\int_0^{21d} dt P_0(P^{32}) \cdot e^{-t/14,3d \cdot \ln(2)}}{\int_0^{7d} dt P_0(P^{32}) \cdot e^{-t/14,3d \cdot \ln(2)}}$$

$$\frac{E_{\text{appl}}(21d)}{E_{\text{appl}}(7d)} = \frac{-\frac{14,3d}{\ln(2)} \cdot (e^{-21d/14,3d \cdot \ln(2)} - 1)}{-\frac{14,3d}{\ln(2)} \cdot (e^{-7d/14,3d \cdot \ln(2)} - 1)} = 2,2196$$

Abbildung 10: Umrechnung der applizierten Gesamtdosis für 21 Tage Liegedauer, Ausgangswert der Berechnung: 7 Tage

Aufgrund des steilen Dosisabfalls ist eine exakte Dosisbestimmung im Zielgebiet entscheidend. In diesem Projekt wurde zur Dosisberechnung die GEANT4-Simulationsrechnung angewendet, die eine Ortsauflösung im Submillimeterbereich ermöglicht. In der Abbildung 11 ist die Dosisverteilung um den Stent zu sehen.

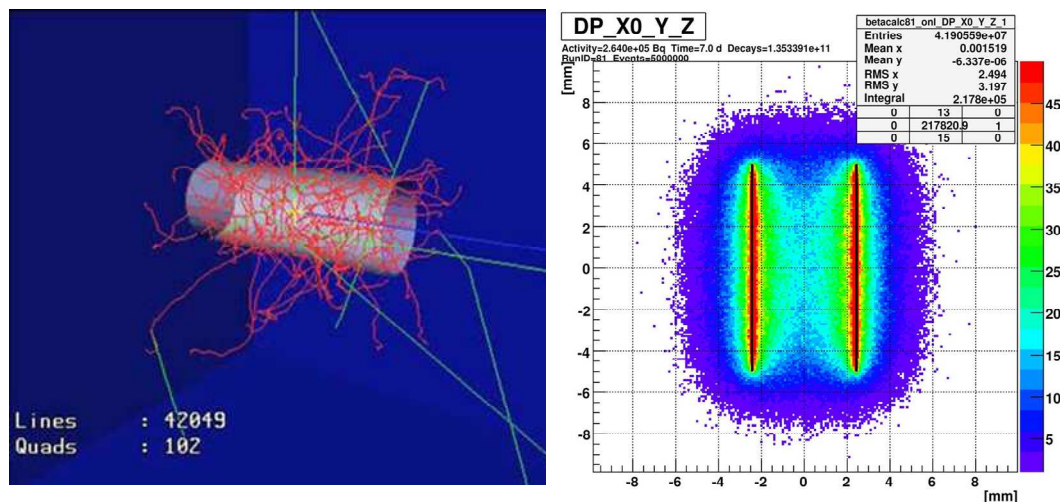


Abbildung 11: Simulationsrechnung der Dosisverteilung eines ^{32}P -Folienzylinders nach GEANT4-Simulation im Wasser. Der Stent ist mit einer Phosphor-32 Folie umwickelt. Schnitt durch die Mittelebene des Stents. Die unterschiedlichen Dosen in Gray sind farblich dargestellt. Schwarz: die Position der radioaktiven Folie. Linkes Bild: Zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. habil. Walter Assmann, Fakultät für Physik, LMU München, rechtes Bild: (Püls, 2008).

4.3. Implantat - der radioaktive Stent

Die Herstellung des radioaktiven Implantats ist eine Leistung von Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Assmann, Medizinphysik und Materialforschung, Lehrstuhl für Experimentalphysik/Kernphysik, Arbeitsgruppe LMU München, Garching. In die üblicherweise eingesetzten Stents wird zusätzlich eine Strahlenquelle mit Phosphor-32 integriert. Eine radioaktive Polymerfolie wird hierbei auf einen Stent aufgewickelt. Zuerst wird eine Folie mit einem stabilen Phosphor-31 produziert, da das Phosphor-32 eine kurze Halbwertszeit hat und somit nicht lange lagerungsfähig ist. Ein strahlenfestes Polymer, Polyetheretherketon (PEEK), mit einem Schmelzpunkt bei 334 °C, wird verwendet. Dieses übersteht unbeschadet ohne große Materialveränderungen die Neutronen- und Gammastrahlung, die während der Aktivierung im Reaktor freigesetzt wird. Der Entscheidung für Phosphor-32 liegt die Halbwertszeit zugrunde, die lange genug ist um Verarbeitung und Transport zu gewährleisten. In Abbildung 12 sind die Komponenten des Gallengangstents beschrieben. Es wird ein PEEK-Compound mit maximal 10 % Phosphorgehalt entwickelt, welches sich zu einer 50µ dicken Folie (1.) weiterverarbeiten lässt. Diese Folie wird nach Aufbringen auf einen 8,5 F-Stent (4.) mit zwei Schrumpfschläuchen (2.) fixiert und versiegelt, um eine geschlossene radioaktive Quelle zu gewinnen. Zusätzlich werden 2 radioaktive Markierungen (am proximalen und distalen Ende der Folie) aufgebracht (3.), um die Lokalisation der Folie bzw. des Stents im Tierkörper darstellen zu können.

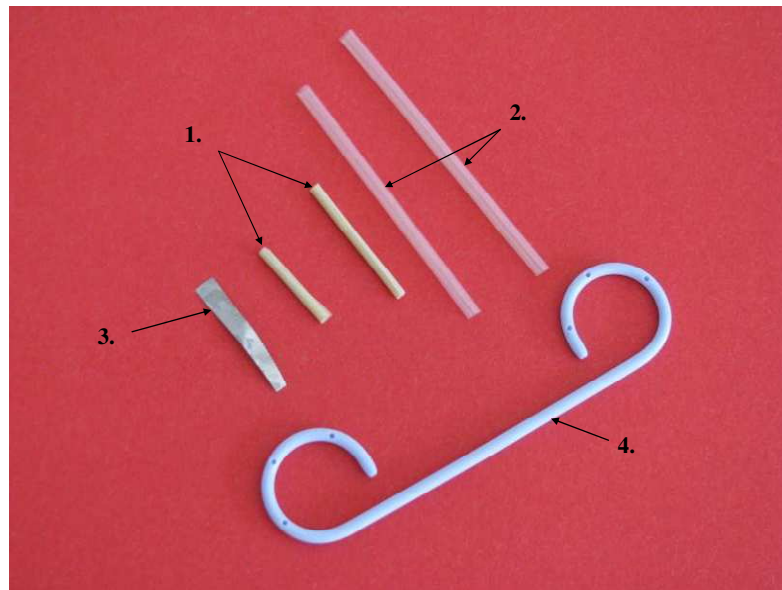


Abbildung 12: Komponenten des Gallengang-Stents, 1. 2 gerollte ^{32}P -PEEK-Folien (zusammen 5 cm), 2. 2 dünne Schumpfschläuche, 3. Röntgenmarkierung, 4. Doppel-Pig-Tail-Stent

Die bestrahlten und aktivierten Polymerfolien werden Auswaschversuchen unterzogen, um einen eventuellen Austritt von Phosphor-32 zu dokumentieren. Hierzu werden die Stents in 37 °C warmer Ringerlösung eine Woche einem Schüttelexperiment unterzogen. Der gemessene Auswasch liegt im strahlenbiologisch vernachlässigbaren Bereich weniger Promille.

Nach Aufbringen der Folie und des Schumpfschlauches muss der Stent noch genügend biegsam sein, um am Ende des Endoskops eine ca. 90 Grad Biegung zu ermöglichen, damit er in den Gallengang eingeführt werden kann.

PEEK- Folien mit 3 cm und 2 cm Länge (Gesamtlänge 5 cm) werden auf den Stent aufgebracht, damit der chirurgische Bereich auch abgedeckt wird, falls nach dem Einsetzen der Stent verrutscht oder ein axiales Schrumpfen des Gallenganges nach Stenoseausbildung auftreten sollte. Außerdem soll durch eine längere Folie das Phänomen des „Edge-Effektes“ verhindert werden.

Am Anfang der Versuchsreihe (P-Reihe, siehe 1.4) werden Mono-Pig-Tail-Stents verwendet (P 101-P 112) mit intrahepatischer Lage des PigTail. Der gerade Anteil mündet im Dünndarm. Nachdem Vorversuche gezeigt haben, dass Doppel-PigTail-Drainagen beim Schwein (im Gegensatz zum Menschen) dazu neigen, in den Dünndarm zu dislozieren, soll der Dünndarmperistaltik weniger Widerstand entgegengesetzt werden. In der P-Reihe zeigt sich jedoch, dass bei Fehlen eines

duodenalen PigTails die Drainagen dazu neigen, in den Gallengang hineingezogen zu werden. Deshalb werden in der W-Reihe (siehe 1.4) nur noch Doppel-Pig-Tail-Drainagen verwendet (W 101-W 130). Der Vergleich beider Stents wird in folgender Abbildung 13 gezeigt.

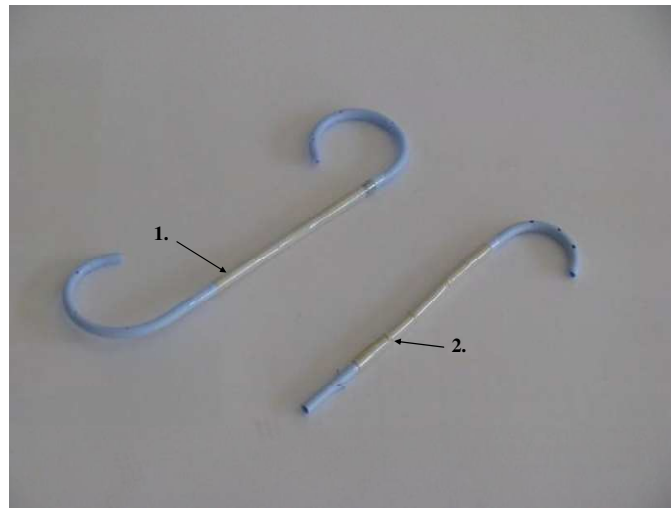


Abbildung 13: (1.) Doppel-Pig-Tail, (2.) Mono-Pig-Tail

In der Versuchsreihe wird strengstens auf die Einhaltung der Richtlinien der Strahlenschutzverordnung Wert gelegt. Das radioaktive Material wird in dafür vorgesehenen Behältern transportiert und in speziellen Räumen gelagert. Unmittelbar vor der Versuchsdurchführung gelangen die Stents in den Operationssaal, zu diesem Zeitpunkt noch in eingeschweißten Folien und in einem Plexiglaskasten (Abbildung 14). Um die Stents für den Versuch vorzubereiten und zu desinfizieren, werden sie, abgeschirmt durch eine Plexiglaswand (Dicke 10mm), zunächst in 95 %igen Alkohol, dann in eine mit sterilem NaCl 0.9 % gefüllte Nierenschale getaucht.

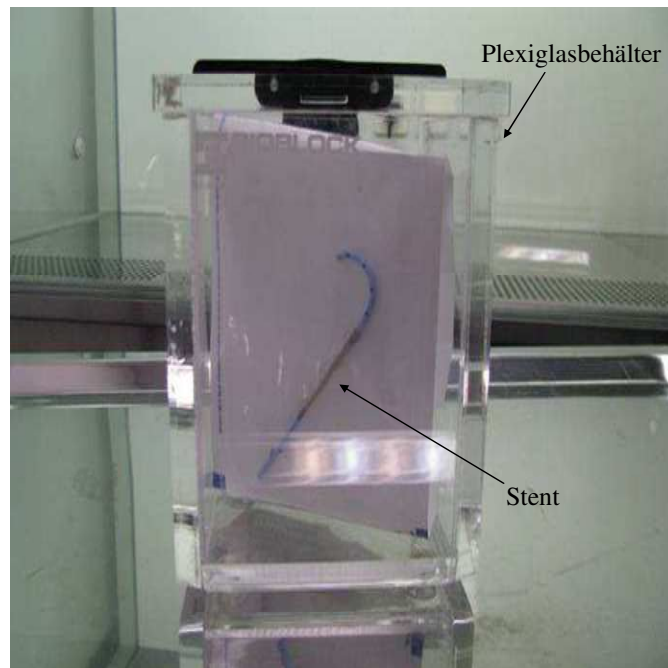


Abbildung 14: Plexiglasbehälter für den Strahlenschutz, darin der am Anfang der Versuchsreihe verwendete Mono-Pigtail.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, erhalten die Stents zusätzlich eine Plexiglasabschirmung in Form eines Zylinders, die als Einführhilfe für den Operateur dient. Der durch die radioaktive Folie umwickelte Anteil des Stents wird so abgeschirmt. Plexiglas wird aufgrund der niedrigen Ordnungszahl zur Abschirmung gewählt, da im Gegensatz z. B. zu einer Bleiabschirmung die Bremsstrahlung viel geringer ist.

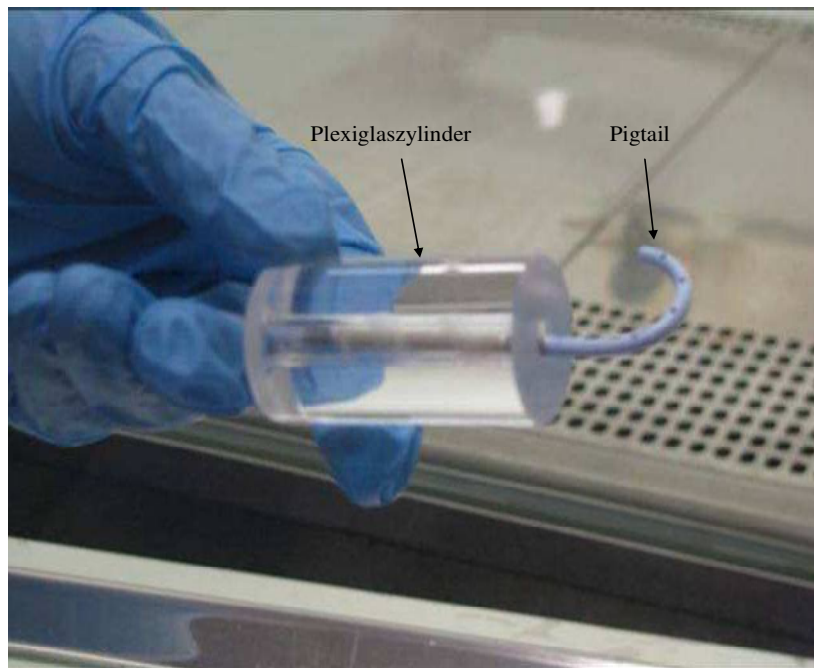


Abbildung 15: Strahlenschutz während der Stentübergabe. Gezeigt ist der Plexiglaszylinder, der zur Strahlenabschirmung über einen Stent gestülpt ist.

Während der Versuchsdurchführung wird die Strahlungsabgabe der Stents mit Hilfe eines Geigerzählers überprüft. Generell sollte der Abstand zum Implantat so groß wie möglich gewählt werden.

Der radioaktive Stent wurde in Zusammenarbeit mit den Industriepartnern (Firma Acri.Tec, Firma Seidel, Firma Urotech, Firma NTTF compounds) und der Fakultät für Physik, LMU München (PD Dr. rer. nat. habil. Walter Assmann) entwickelt. Die Aktivierung der Folie erfolgt in Garching, Forschungsreaktor München 2 der TU München. In 2 Fällen musste aufgrund von Wartungsarbeiten am Reaktor auf den Forschungsreaktor Geesthacht 1 des GKSS-Forschungszentrums in Geesthacht ausgewichen werden.

4.4. Strikturinduktionsmodell

In den Vorversuchen wurde versucht, mit einer Lasersonde eine Stenose zu induzieren, da damit der Energieeintrag im Gewebe am genauesten definiert werden kann. Bei dem Versuch der Sondierung bzw. Platzierung der Glasfasersonde kam es im Vorversuch in 2 Fällen zum Bruch der Sonde mit anschließender Gallengangspforation. Auf einen weiteren Einsatz der Lasersonde wurde aus diesem Grund verzichtet.

Wie im Kapitel „Das Stenoseinduktionsmodell im Gallengang“ beschrieben, erfolgt die Stenoseinduktion im distalen Drittel des *D. choledochus* daraufhin mittels Hochfrequenz-Koagulation. Dazu wird eine mono-polare 10 F Hochfrequenz (HF)-Sonde zusammen mit einem HF-Prototyp-Gerät der Firma ERBE verwendet.



Abbildung 16: linke Abbildung ERBE-Gerät, rechte Abbildung 10 F Hochfrequenz-Sonde, die in den Gallengang eingeführt wird.

Durch eine spannungsbegrenzte separate Einstellung von Energie und Zeit erlaubt dieses Gerät einen definierten Energieeintrag in das Gewebe und zusätzlich wird dessen zeitlicher Verlauf vom Gerät aufgezeichnet. Eine Überprüfung der Koagulation wird unter Röntgenkontrolle mittels Kontrastmittel durchgeführt. Vor Applikation der Hitze muss Kontrastmittel und Flüssigkeit im Gallengang abgesaugt werden, um einen guten Kontakt der HF-Sonde mit dem Gallengang zu erhalten, da sonst die thermische und elektrische Leitfähigkeit zwischen Gewebe und Sonde beeinflusst werden kann. Um eine möglichst langstreckige Stenose zu erzeugen, wird die Stenoseinduktion im Abstand von ca. 5-10 mm wiederholt. Anschließend wird unter Röntgenkontrolle nach Kontrastmittelgabe festgestellt, ob eine Perforation des Gallenganges aufgetreten ist.

Die Leistung bzw. der Energieeintrag von 1200 J (60 W, 20 sec), die in den Vorversuchen verwendet wurde, führte allerdings bei 4 von 5 Tieren in der P-Reihe zu einer Perforation. Diese Gefahr hängt offensichtlich sowohl von der Initial-Leistung als auch von dem Gesamtenergieeintrag ab. Zusätzlich ist der Kontakt der HF-Sonde mit dem Gallengangsgewebe ein entscheidender Faktor. Die oben erwähnte Dosis schädigte nicht nur das Gallengangsgewebe, sondern setzte den Schaden auch in tieferen Bindegewebsschichten, was zu einer

erheblichen axialen Schrumpfung des Gallengangs um bis zu 2 cm führte. Aufgrund dieser Erfahrungen wird der Energieeintrag in der W-Reihe auf 100 J (20 W, 5 sec) begrenzt.

5. Versuchsdurchführung

5.1. Narkose und Überwachung

Die Tiere erhalten 42 Stunden vor der Intervention 2-mal täglich flüssige Nahrung (Fresubin), haben jedoch freien Zugang zu Wasser. 12 Stunden vor dem Eingriff (über Nacht) bekommen die Tiere kein Futter mehr.

Es erfolgt eine Gewichtskontrolle und eine kurze klinische Untersuchung, bei der der Schwerpunkt auf einem ungestörten Allgemeinbefinden liegt. Zur sedativen und anticholinergen Prämedikation werden im Tierstall als Bolusinjektion Ketaminhydrochlorid (10-25 mg/kg Körpergewicht), Azaperon (2 mg/kg Körpergewicht) und Atropinsulfat (0,02-0,04 mg/kg Körpergewicht) aus einer Mischspritze intramuskulär in die seitliche Halsmuskulatur injiziert.

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe (etwa 8 bis 10 Minuten) werden die Tiere in den Operationssaal verbracht. Hier wird den Tieren ein Venenverweilkatheter in die *V. auricularis lateralis* gelegt. Ein Dreiwegehahn wird angeschlossen. Eine hierbei entnommene Blutprobe dient der Erstellung eines kleinen Blutbildes und der klinischen Chemie. Um bei einigen Tieren eine gesicherte Intubationsfähigkeit zu erzielen, erhalten sie eine einmalige Gabe von Midazolam (0,2ml i. v.) Die Tiere werden mit einem Endotrachealtubus intubiert, in Rückenlage auf den Operationstisch verbracht und an eine Injektionsnarkose angeschlossen. Die Narkose wird mittels perfusorgesteuerter intravenöser Applikation von Propofol (10-20 mg/kg/h) aufrecht erhalten und individuell so bemessen, dass das Tier seine Spontanatmung verliert und an ein Beatmungsgerät angeschlossen werden kann. Weiterhin erhalten die Tiere zur Analgesie Fentanyl (Fentanylcitrat 2-7 µg/kg) intravenös verabreicht.

Die Herzfrequenz wird mittels Elektrokardiogramm (EKG) über drei Klebeelektroden und die Sauerstoffsättigung sowie der Puls mittels Pulsoxymeter, befestigt an der Schwanzspitze des Schweins, kontinuierlich gemessen. Als intraoperative antibiotische Prophylaxe dient Cefuroxim-Natrium (750 mg/Tier). Zur Flüssigkeitssubstitution während des Eingriffs dient eine Dauertropfinfusion

von 0,9%ige Natrium-Chlorid-Lösung (ca. 10-15 ml/kg/h).

Die Extubation des Tieres nach der Operation erfolgt bei Einsetzen des Schluckreflexes. Nachfolgend wird es zunächst bis zum vollständigen Erwachen in eine Einzelbox verbracht. Während dieser Zeit stehen die Tiere unter tierärztlicher Beobachtung. Danach werden sie in der vorherigen Gruppe eingestallt und erst 12 Stunden nach Narkoseende wird die Fütterung wieder aufgenommen.

5.2. Postoperative Versorgung

Nachdem die Tiere von der Narkose genommen werden und wieder einen Schluckreflex zeigen, werden sie extubiert und zurück in den Tierstall verbracht.

Zur Schmerzlinderung nach der Operation erhalten die Tiere während der Aufwachphase intramuskulär Metamizol-Natrium-Monohydrat (15-50 mg/kg). Sollten die Schmerzen weiter anhalten, wird eine weitere analgetische Abdeckung mit Metamizol-Natrium-Monohydrat über das Trinkwasser (3750 mg pro Eimer (40 Liter) verteilt auf 3 Tiere) erreicht.

Die Tiere werden hinsichtlich der Symptome einer Cholangitis (Ikterus, Fieber und Stuhlgang) und im Allgemeinen auf Appetitlosigkeit, Änderung des Allgemeinbefindens, erhöhte Reizbarkeit hin untersucht.

Zur Vermeidung einer Cholangitis oder periinterventionellen Infektionen erhalten alle Tiere täglich eine prophylaktische Antibiotikatherapie mit Ciprofloxacin (Ciprobay 200-500 mg per os).

Sollten dennoch Anzeichen einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens auftreten, wird die Therapie zusätzlich mit der Gabe von Gentamicin i. m. (0,08 ml/kg) und weiterführend mit Dexamethasondihydrogenphosphat i. m. (0,2-2 mg/kg) unterstützt.

Es findet täglich die Sammlung des Kots der Tiere statt, um einen eventuellen Abgang eines Stents feststellen zu können. Dazu werden die Kotbeutel durchleuchtet, um anhand der Röntgenmarkierung einen Stent zu identifizieren. Außerdem wird Kot und Stallbereich auf Radioaktivität gemessen.

5.3. Operatives Vorgehen

5.3.1. Untersucher

Alle endoskopischen Untersuchungen werden von drei Endoskopeuren durchgeführt (Prof. Dr. J. Schirra, PD Dr. C. Schäfer, Prof. Dr. A. Wagner). Als Endoskopieoberärzte der Medizinischen Klinik II hat jeder der Untersucher ausgiebige Erfahrung mit der ERC (JS und AW je >1000 ERCPs, CS >700 ERCPs). Die Besonderheiten der ERC beim Schwein bestehen vor allem in der Lageinstabilität des Endoskops durch die unmittelbar postpylorische Lage der Papille. Die ERC beim Schwein wird von den drei Untersuchern in Vorversuchen entsprechend trainiert.

5.3.2. Tag 0: Endoskopie – Stenoseinduktion

Die Tiere werden nach dem oben genannten Protokoll in Narkose gelegt, zur späteren Stenoseinduktion wird nach dem Rasieren zwischen dem Rücken der Tiere und dem OP-Tisch eine Erdungselektrode geschoben. Den Schweinen wird als Mundstück eine gekürzte Perfusorspritze in die Maulhöhle geführt, durch die das Endoskop eingeführt wird. Sie werden mit einem Standard- Duodenoskop vom Typ Olympus TJF 140 in Rückenlage endoskopierte. Nach Passieren des Magens wird die *Papilla duodeni major* im Bereich des *Bulbus duodeni* eingestellt. Der Gallengang wird mittels eines 5 F- ERC-Katheters sondiert und die extra- und intrahepatischen Gallenwege werden unter Röntgendurchleuchtung mit Kontrastmittel dargestellt.



Abbildung 17: Schwein während Endoskopie

Nach Austausch des ERC-Katheters durch einen stabilen Führungsdraht wird über diesen ein 10 F HF-Katheter (Fa. Boston Scientific) eingeführt (Seldingertechnik). Der im Gallengang einliegende Führungsdraht enthält röntgendichte Markierungen im Abstand von 5cm, die eine korrekte Längenabschätzung unbeeinflusst von der Vergrößerung durch das Röntgenbild erlauben. Die Koagulation des Gallengangs erfolgt etwa in einem Abstand von 3-4 cm von der Papille. Die Koagulation wird ca. 5-10 mm weiter distal wiederholt. Der zeitliche Verlauf und der Energieeintrag in das Gewebe werden von dem HF-Gerät computergestützt aufgezeichnet. Aufgrund dieser Hitzeapplikation wird im *D. choledochus* eine Läsion erwirkt, die sich binnen 14 Tagen zu einer benignen Gallengangsstenose entwickelt. Der Ausschluss einer akuten Perforation erfolgt durch Kontrastmittel-Gabe unter Durchleuchtung.

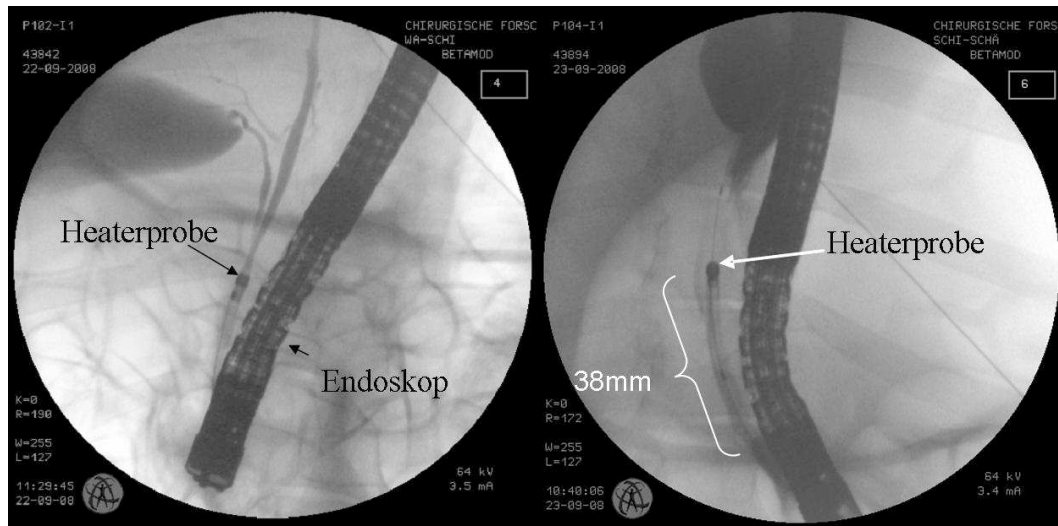


Abbildung 18: Heater-Probe (HF-Katheter) im Ductus choledochus

5.3.3. Tag 14: Endoskopie – Stenteinlage

Am Tag 14 werden die Tiere nach o.g. Protokoll erneut in Narkose gelegt und in Rückenlage endoskopiert.

Die Gallengangsstenosen werden morphologisch mittels Kontrastmittelgabe und Durchleuchtung verifiziert. Tiere, die keine Stenose ausgebildet haben, werden erneut einer Hitzeapplikation unterzogen. Bei diesen Tieren verschiebt sich die Versuchsdauer. Man wartet erneut zwei Wochen ab, ob sich eine Stenose entwickelt.

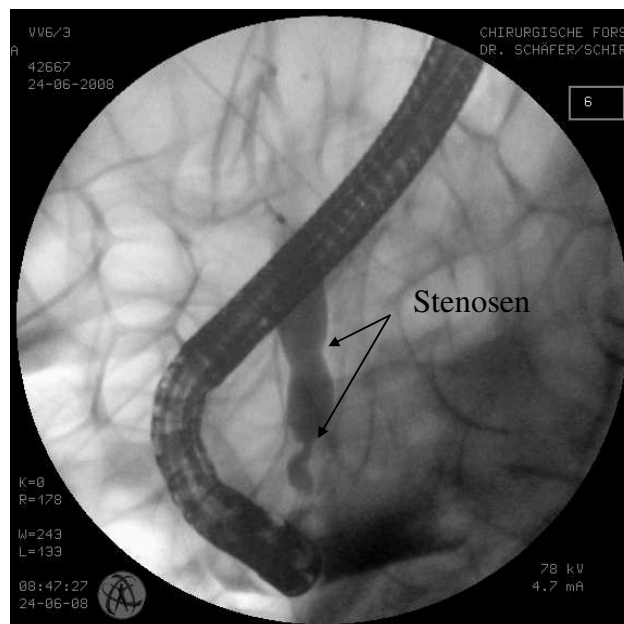


Abbildung 19: Cholangiogramm, die 2 Pfeile zeigen die induzierten Stenosen

Die Stenose wird mittels Ballondilatation gesprengt. Ein 6mm-Dilatationsballon wird über den zuvor platzierten Führungsdraht in den Gallengang über die Stenose vorgeschoben und mit Hilfe eines Kontrastmittel-Inflators mit Manometer aufballoniert (Abbildung 20). Wie beim Menschen orientiert sich die Wahl des maximalen Ballondiameters an der Weite des proximalen Gallenganges, der bei den jungen Schweinen ca. 6mm ist. Bei allen Tieren wurde zweimal über je ca. 15-30 sec dilatiert.

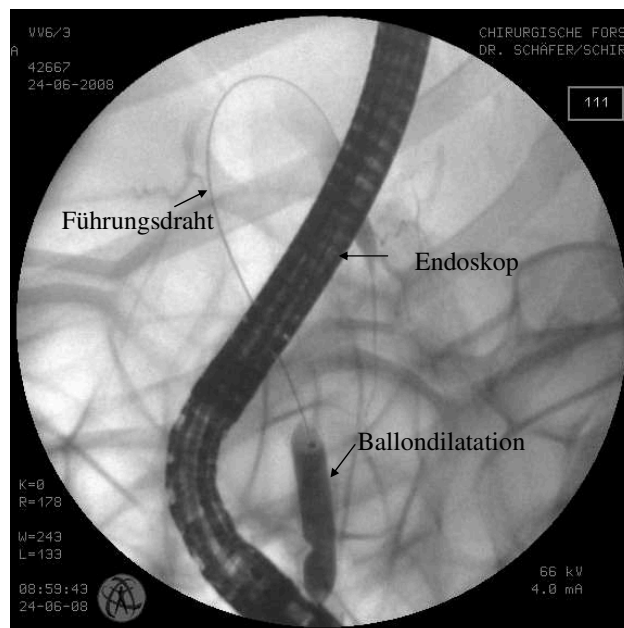


Abbildung 20: Ballondilatation der Stenose

Um den Galleabfluss zu sichern, wird nun ein 8,5 F-Plastikstent (nativ, 15 Gy, 30 Gy nach zuvor festgelegtem Randomisierungsplan) vorbereitet. Hinter einer Plexiglasabschirmung wird der Stent nach Desinfektion mit Alkohol in eine NaCl-Lösung getaucht und mit der zylindrischen Plexiglasvorrichtung dem Endoskopieur übergeben. Der Stent muss so eingeführt werden, dass die Strahlenbelastung für das anwesende Personal auf ein Minimum beschränkt wird.

Die Drainage wird drahtgeführt mit einem Metallpusher durch den Arbeitskanal des Endoskops vorgeschoben und unter Durchleuchtung so positioniert, dass die beiden röntgendichten Markierungen die Stenose möglichst mittig einschließen (Abbildung 21).

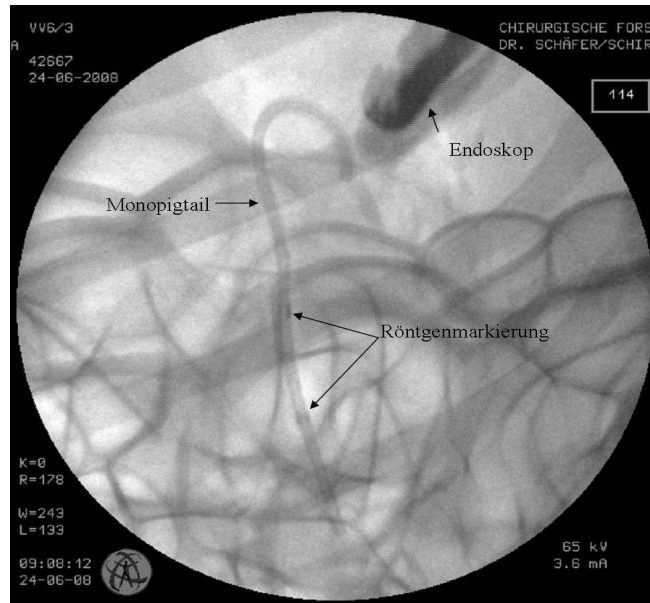


Abbildung 21: Stenteinlage, zu sehen sind 2 Röntgenmarkierungen

5.3.4. Tag 21: Stentkontrolle

Die Stentposition wird am Tag 21 - eine Woche nach Dilatation und Drainageeinlage – per Durchleuchtung kontrolliert. Dazu werden die Tiere in eine Kurznarkose mit Ketaminhydrochlorid (10-25 mg/kg Körpergewicht), Azaperone (2 mg/kg Körpergewicht) und Atropinsulfat (0,02-0,04 mg/kg Körpergewicht) aus einer Mischspritze versetzt. Diese wird intramuskulär in die seitliche Halsmuskulatur injiziert.

Alle Tiere, bei denen die Drainage sich nicht mehr auf die Gallenwege projiziert - die Drainage somit nicht wenigstens 1 Woche in situ war - werden von der Auswertung ausgeschlossen.

5.3.5. Tag 35: Endoskopie – Stententfernung – Euthanasie

Am Tag 35 wird die Drainage endoskopisch entfernt, die Stenose mit Kontrastmittel dargestellt, die Tiere werden operiert, dann euthanasiert und der Gallengang wird präpariert.

Die Tiere werden wie oben beschrieben narkotisiert und in Rückenlage endoskopiert. Am Rücken des Tieres wird eine Erdungselektrode für eine spätere Kauterisation befestigt. Der Stent wird nach der Endoskopie mit einer Zange aus dem Gallengang entfernt und in einen Plexiglasbehälter verbracht. Abschließend wird zur Verifizierung der Stenose eine Kontrastmittelaufnahme gemacht.

Um die Zeit für eine Autolyse der empfindlichen Gallengangsstrukturen möglichst kurz zu halten, wurde zunächst der Situs mit Präparation von Magen, Duodenum und Leberpforte operativ dargestellt. Erst danach wurden die Tiere euthanasiert. Um ein tieferes Narkosestadium zu erlangen, wird das Inhalationsnarkotikum Isofluran (0,8-1 Vol %) hinzugeschaltet. Nachdem die Schweine zur vollständigen Relaxation Pancuroniumbromid (0,04-0,1 mg/kg) i. v. und für eine ausreichende Analgesie eine weitere Dosis Fentanyl (Fentanylcitrat 2-7 µg/kg) i. v. verabreicht bekommen haben, erfolgt durch eine mediane Laparotomie mittels Kauter und Skalpell die Eröffnung des Abdomens. Die Elektrokoagulation wird zur Blutstillung eingesetzt. Über die *V. auricularis lateralis* wird den Tieren für ein späteres Untersuchungsverfahren 1 ml Fluorescein 10 % i. v. injiziert (ein Fluoreszenzmarker für die konfokale Laserendomikroskopie des Gallengangs, CFE, nicht Bestandteil vorliegender Arbeit). Der caudale Anteil des Magens (im *Antrum pyloricum* oberhalb des *Torus pylorus*) und der craniale Anteil des Duodenums (ca. 10 cm entfernt vom Pylorus) werden ligiert.

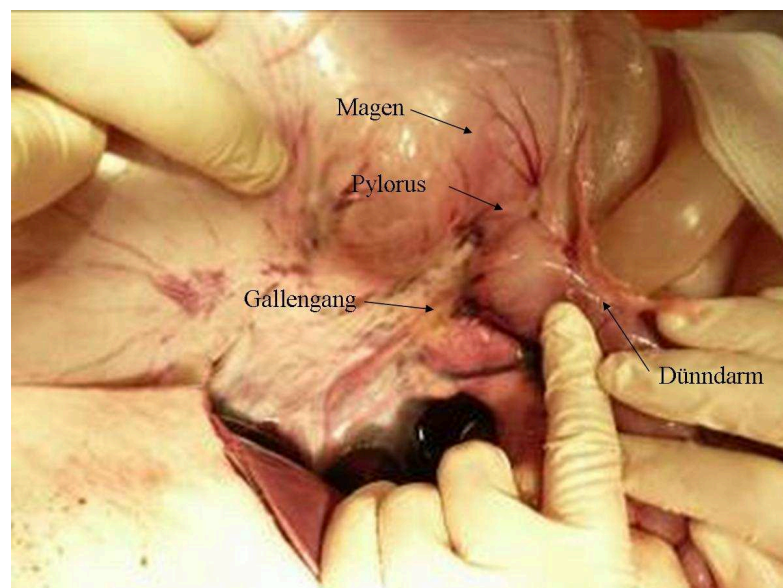


Abbildung 22: Übersicht der anatomischen Strukturen nach erfolgter Laparotomie.

Nach intracardialer Gabe von 20 ml 7,45 % Kaliumchlorid-Lösung wird der Herzstillstand abgewartet und alsbald die *V. cava cranialis* eingeschnitten, um das Tier mit Hilfe einer Absaugvorrichtung ausbluten zu lassen.

5.3.6. Gewebeentnahme

Die ligierten Enden des Magens und des Darms werden durchtrennt, die Anteile der Leber von dem restlichen Gewebe befreit, mitsamt der Darm- und Magenanteile aus der Bauchhöhle des Schweins entnommen und auf eine Arbeitsfläche gelegt (Abbildung 23). Dabei ist darauf zu achten, dass der Gallengang nicht beschädigt wird. Die Bauchhöhle wird auf eventuelle pathologische Veränderungen wie Verwachsungen untersucht.

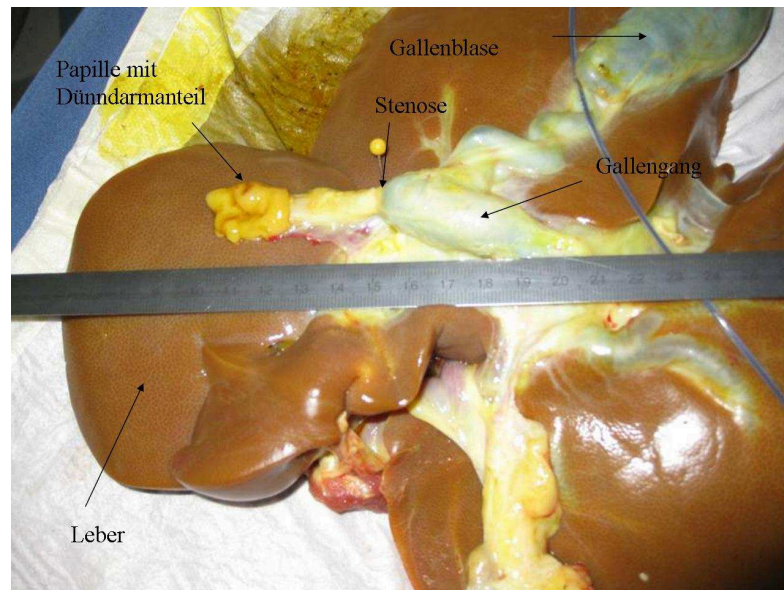


Abbildung 23: Leberpforte mit Darstellung der extrahepatischen Gallenwege. Zu beachten ist die ausgeprägte prästenotische Dilatation des *Ductus choledochus* sowie des zur Gallenblase führenden *Ductus cysticus*.

Mit einer Schere wird der Darm bis auf Höhe der Papille aufgeschnitten. In diese wird, wie in der Abbildung 24 demonstriert, in Richtung Leber ein Sondierungsdraht vorgeschoben, welcher als Richtungsführung zur Schnittführung dient.

Entlang des Sondierungsdrahts wird der Gallengang längs bis zur Abzweigung des *Ductus cysticus/ Ductus hepaticus communis* aufgeschnitten. Andere nicht benötigte Gewebeteile werden entfernt. Der Gallengang wird zur Fixation auf eine stabile Korkplatte verbracht und mit Pins befestigt. Die makroskopisch sichtbare Stenose wird mittels farbiger Pins markiert (Abbildung 25).

An dieser Stelle wird die „probe-based Confocal Laser Endomicroscopy“ (pCFE) der Firma Mauna Kea Technologie (Paris) eingesetzt. Dieses Gerät ermöglicht die direkte Betrachtung der zellulären Strukturen am Computer. Zu diesem Zwecke

führt der Untersucher mit einer Sonde an zwei Stellen (im Stenosegebiet und im unbehandelten Gebiet papillenwärts) oberflächlich über das Gewebe. Die Prozedur dauert etwa 5 min. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in einer separaten Doktorarbeit dargestellt.

Nach dieser Untersuchung wird das Gewebe noch weiter zurechtgeschnitten und in einem mit Formalin gefüllten Behältnis zur Fixierung 24 h eingelegt.

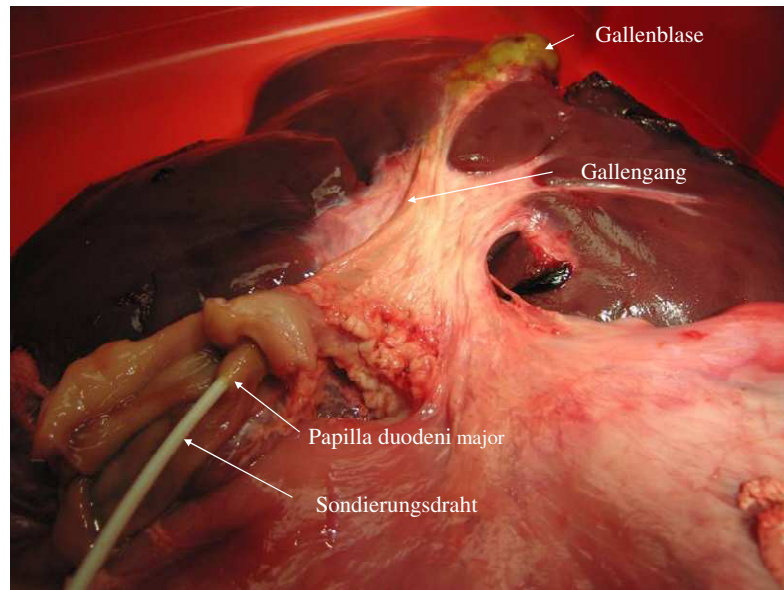


Abbildung 24: Sondierung des Gallengangs

6. Histologische Untersuchung

6.1. Probengewinnung und Probenaufbereitung

Die gewonnenen Proben werden zur histologischen Untersuchung 24 h in 4 %igem Formaldehyd fixiert und danach nach Protokoll zugeschnitten.

Es werden jeweils 4 Proben aus dem Gewebe (ca. 1x1 cm) entnommen. In Abbildung 25 wird die Schnittführung aufgezeigt.

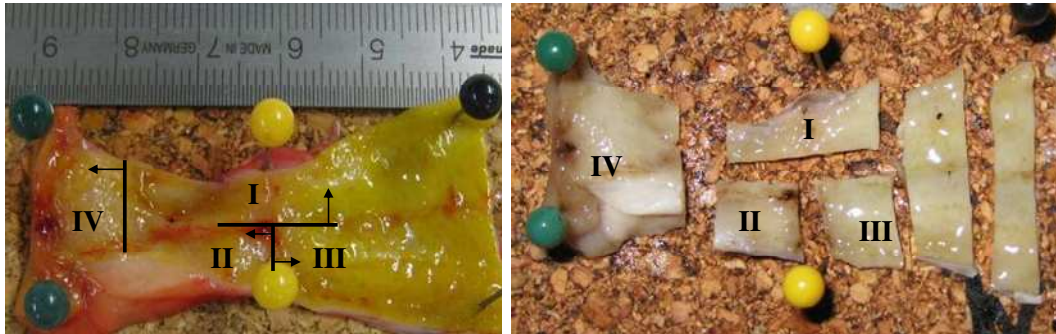


Abbildung 25: Schnittführung der Histoblöcke, linkes Bild vor, rechtes Bild nach Formalinfixierung, I, II und III im Stenosebereich, Referenzblock IV außerhalb des Stenosebereiches

Die Blöcke I, II und III liegen im Stenosebereich. Block IV dient als Referenzblock. Dieser Block liegt außerhalb des stenosierten Bereiches im distalen Gallengang, wurde also keiner Hitzeapplikation unterzogen, jedoch liegt die 5 cm lange Folie (radioaktiv oder nicht radioaktiv) über diesem Bereich. Dieses ermöglicht, die strahlenbiologische Wirkung an nicht behandelten Gallengangsabschnitten zu untersuchen.

Um die Schnittführung nach der Entwässerung nachvollziehen zu können, werden die Gewebeschnitte mit einem Einzelheft aus chirurgischem Nahtmaterial an der gegenüberliegenden Schnittseite markiert. Die Gewebestücke werden in weißen Histokassetten 2 Stunden unter kaltem, fließendem Wasser gewässert und anschließend mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert.

Dazu werden die Proben jeweils für eine Stunde in 50 %, 70 %, 96 % und 3 x 100 % Ethanol gegeben. Nach der Entwässerung folgt die Einbettung in Paraffin.

Nach Abkühlen und Aushärten der Paraffinblöckchen werden aus diesen mit Hilfe eines Schlittenmikrotomes 2-4 µm dicke Schnitte angefertigt, jeweils 10 Schnitte, danach 1 mm Gewebe verworfen (Nummerierung 1.1-1.10.) Dieser Vorgang wird

3-mal wiederholt, sodass man von jedem Block 30 Schnitte gewinnen kann (von 1.1 bis 3.10.) Diese werden in einem 35 °C warmen Wasserbad gestreckt und anschließend auf Objektträger aufgezogen. Danach werden diese Objektträger zum Trocknen ausgelegt (Costamagna et al., 2003).

Insgesamt erhält man pro Tier 120 histologische Präparate. Vor dem Färben werden die Objektträger bei 60 °C hitzefixiert. Danach wird von jedem Block jeweils der 3. Schnitt HE, der 4. Schnitt mit Elastica van Giesson und der 5. Schnitt mit SMA im Färbeautomaten oder per Hand gefärbt. Damit ist gewährleistet, dass jeweils die Folgeschnitte des Präparates untersucht werden. Bei minderwertigen Schnitten wird der Folgende ausgewählt, um möglichst einen identischen Bereich zu analysieren.

6.2. Färbungen zur histologischen Untersuchung

6.2.1. Haematoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung als Standard-Übersichtsfärbung wird zur morphologischen Beurteilung verwendet. Die Zellkerne werden blau, das Cytoplasma und die Intercellularsubstanz rosa bis rot angefärbt. Bevor die Schnitte gefärbt werden können, muss zunächst die Paraffinschicht entfernt werden. Um dies zu realisieren, verwendet man für 6 min eine Roti-Histol-Lösung. Da es sich bei der HE-Färbung um wässrige Farblösungen handelt, werden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % (6 min), 95 % (3 min), 70 % (3 min) Ethanol auf die Farblösungen vorbereitet. Die entparaffinierten Schnitte werden 9 min in einer Hämatoxylin-Eosin Lösung gefärbt. Anschließend werden die angefärbten Schnitte 6 min unter fließendem Wasser von überschüssigem Farbstoff befreit. Danach werden sie in einer Eosinlösung 3 min gefärbt. Bevor die Objektträger 9 min in 100 %-igem Ethanol entwässert werden, werden sie 3 min in Aqua dest. gespült. Zum Schluss erfolgt erneut das 6-minütige Tauchen in Roti-Histol. Die so gefärbten Gewebeschnitte werden mit DPX Mountant eingebettet.

6.2.2. Elastica van Giesson - Färbung (EvG)

Bei dieser Färbung stellen sich die Zellkerne dunkelblau bis schwarz, das Bindegewebe rot, die Muskulatur gelb und elastische Fasern dunkelviolet bis schwarz dar. Dadurch kann man Veränderungen an dem Verhältnis von kollagenen und elastischen Fasern erkennen und Veränderungen an der

Gefäßarchitektur sichtbar machen. Hierbei erfolgt die Entparaffinierung wieder in Roti-Histol (6 min) und in Alkoholen (12 min) mit zunehmender Hydrophilie. Nach 20 minütiger Färbung in Resorcin-Fuchsin nach Weigert-Lösung werden die Objektträger für 20 sec in HCl-Alkohol differenziert und danach für 10 sec in 70 %igem Alkohol gewaschen. Die weitere Färbung erfolgt für 6 min mit Eisenhämatoxylin. Die Schnitte werden ebenfalls in HCl-Alkohol differenziert (davor und danach für jeweils 10 sec in Aqua dest. getaucht), bevor sie zum Bläuen 13 min unter fließendes Leitungswasser gestellt werden. Nach einer weiteren Spülung mit Aqua dest. (10 sec) werden die Schnitte für 6 min in van-Gieson-Picrofuchsin-Lösung belassen und danach in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (96 % 10 min, 100 % 5 min). Die gefärbten Präparate werden 20 min in Roti-Histol getaucht, bevor sie wie die HE-Färbungen mit DPX Mountant eingebettet werden.

Sowohl die HE- als auch die EvG-Präparate werden ca. 2 Tage flach unter dem Abzug gelagert, bis das Roti-Histol weitestgehend verdampft und die DPX-Eindeck-Lösung getrocknet ist. Erst danach kann mit der mikroskopischen Auswertung begonnen werden.

6.2.3. SMA Färbung (α -SMA)

Die alpha-SMA Färbung (α - smooth muscle actin) dient zur Darstellung der Myofibroblasten.

Da es sich bei der SMA Färbung um eine immunhistologische Färbung handelt, werden die Gewebeschnitte nach Entparaffinierung in der Mikrowelle bei 750 W und einer Kochzeit von 2x 15 min mit der Target Retrieval Solution vorbehandelt. Danach lässt man die Schnitte 20 min bei RT abkühlen. Anschließend werden die Schnitte 2 x 5 min in TRIS-Puffer (pH 7,5) gespült. Nachdem die Blockierung der endogenen Peroxidase 10 min in 7,5 %iger wässriger Wasserstoffperoxidase bei RT erfolgt ist, wird sie 10 min unter fließendem Wasser gewässert und vor dem Proteinblock erneut 2 x 5 min mit TRIS-Puffer gespült. Den folgenden Proteinblock muss man 10 min inkubieren und den Überstand anschließend abkippen. Den Primär-Antikörper Actin haben wir 1:300 verdünnt und 60 min bei RT inkubiert. Erneut wird er 2 x 5 min mit TRIS-Puffer gespült. Nachdem das immuno-peroxidase Polymer für 30 min inkubiert wurde, werden anschließend die Schnitte wieder 2 x 5 min mit TRIS-Puffer gespült. Als Chromogen haben wir

3 min DAB+ verwendet. Nach weiteren 10 min fließendem Wässern haben wir 10 sec mit Hematoxylin gegengefärbt und schließlich erneut 10 min fließend gewässert und mit Kaisers Glyceringelantine eingedeckt.

7. Auswertung

Die Stenose wird auf drei voneinander unabhängige Arten untersucht: in-vivo anhand der Kontrastmitteldarstellung, ex-vivo anhand des makroskopischen Präparats und histomorphologisch anhand der Vermessung der bindegewebigen Raumforderung (HE-Färbung) im Block I. Diese Methoden erfassen unterschiedliche Aspekte, haben differente Fehlerquellen und müssen daher nicht zwingend korrelieren. Zusätzlich werden im Block I (Längsschnitt der Stenose) die histopathologischen Merkmale für Entzündung (HE-Färbung), kollagene Fasern (EvG-Färbung) und Myofibroblasten (α -SMA-Färbung) erfasst. Entsprechende Untersuchungen im Block IV (distaler nicht stenosierter, gesunder Gallengang) erfolgen zur Kontrolle der Strahlenwirkung in gesundem Gewebe. Biologische Strahlenschäden werden dabei anhand spezifischer Gefäßveränderungen bestimmt.

7.1. Stenosecharakterisierung in-vivo: Kontrastmitteldarstellung

Röntgendaten incl. Kontrastmittelaufnahmen existieren von Tag 0, Tag 14 und Tag 35. Zur röntgenologischen Auswertung werden Aufnahmen von allen 3 Tagen verwendet. Die Auswertung erfolgt durch zwei Mitglieder der Arbeitsgruppe, die zu diesem Zeitpunkt verblindet sind (J. Schirra, B. Lutz). Zur Kalibrierung dienen als interner Größenmaßstab zum einen die Röntgenmarkierungen des Führungsdrahtes (50 mm), zum anderen die Breite des Endoskops unterhalb der Spitze (12 mm) oder auch die Breite des ERC-Katheters (5 F = 1.7 mm). Die Auswahl der zu vermessenen Bilder erfolgt nach folgenden Kriterien:

- Je nach Kontrastmittelfärbung werden die Aufnahmen gewählt, die eine nicht zu schwache Färbung (Nachteil: undeutliche Darstellung) aber auch keine zu starke Färbung (Nachteil: Überdehnung des Gallenganges durch Kontrastmittelgabe) aufweisen.
- Am Tag 14 findet die Vermessung an Aufnahmen statt, die vor der Ballondilatation erfolgt sind.

- Die Aufnahme am Tag 35 erfolgt nach Entfernung des Stents.

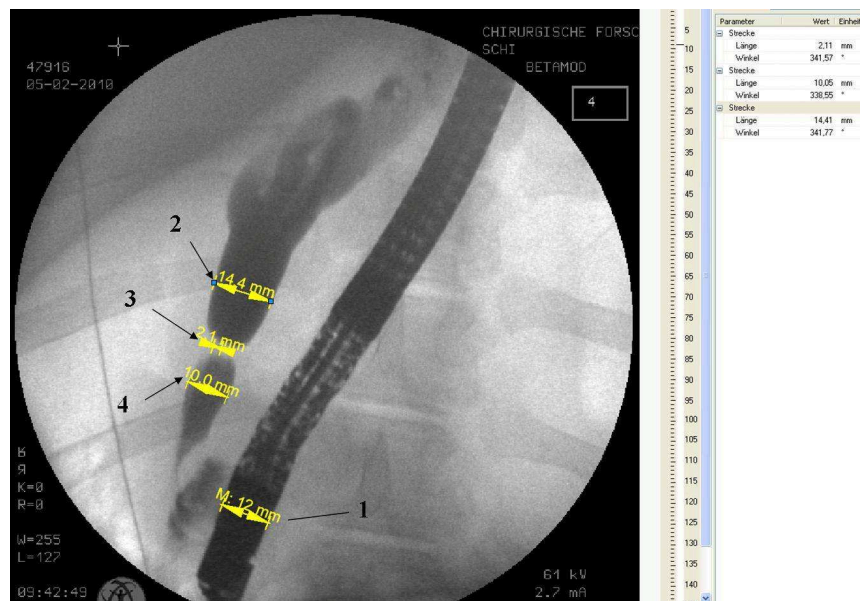


Abbildung 26: Vermessung der radiologischen Aufnahmen am Beispiel des Tag 14 (Verifizierung der Stenose und Stenteinlage): 1. Maßstab, in diesem Fall Durchmesser des Endoskops, 2. Durchmesser 1 cm proximal der Stenose, 3. Durchmesser der Stenose, 4. Durchmesser 1 cm distal der Stenose.

Folgende Parameter werden wie in Abbildung 26 beschrieben vermessen:

- Durchmesser und Länge der Stenose in mm
- Durchmesser des Gallenganges ca. 1cm proximal der Stenose in mm
- Durchmesser des Gallenganges ca. 1cm distal der Stenose in mm

Die Gradeinteilung der Stenose erfolgt nach folgender Berechnung:

$$\text{Stenose} = 1 - (\text{Diameter Stenose} / \text{Diameter proximaler Gallengang})$$

- $\leq 0,5$: keine Stenose, Score 0
- $> 0,5$: geringgradig, Score 1
- $> 0,75$: mittelgradig, Score 2
- $> 0,9$: hochgradig, Score 3

Die Vermessung der radiologischen Aufnahmen erfolgt anhand der Freeware Datinf@Measure (Datinf@measure, DatInf GmbH, Tübingen). Die Einheit wird in mm angegeben. Vorteil der Methode ist die Quantifizierung der klinisch relevanten Stenose in-vivo entsprechend der klinischen Bestimmung beim Menschen. Nachteil sind Ungenauigkeiten durch flauere Kontrastmitteldarstellung,

Überdehnung durch Kontrastmittel und projektionsbedingte Artefakte.

7.2. Stenosecharakterisierung ex-vivo: makroskopisches Gallengangspräparat

Am Tag 35 wird der ausgebaute Gallengang, auf einer Korkplatte befestigt, hinsichtlich folgender Parameter vermessen:

- Stenosebreite in mm = der Durchmesser zwischen der sichtbaren und tastbaren Wulstung der Gallengangswand
- Breite des Gallenganges 1 cm proximal der Stenose in mm
- Breite des Gallenganges 1 cm distal der Stenose in mm
- Abstand Papille – Stenose in mm

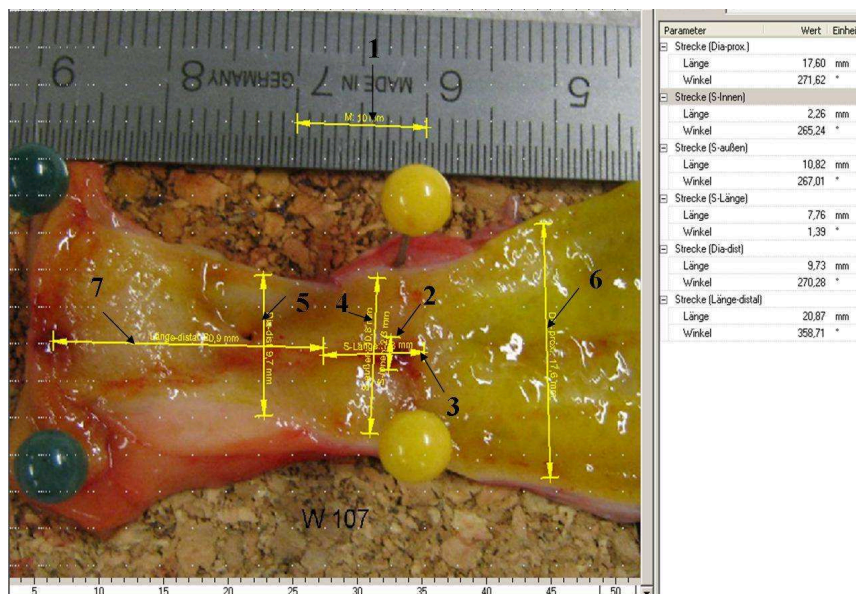


Abbildung 27: Vermessung des Gallenganges, 1. Breite der Stenose, 2. Stenoselänge, 3. Breite des Gallenganges proximal der Stenose, 4. Breite des Gallenganges distal der Stenose, 5. Abstand Papille – Stenose

Die Gradeinteilung der Stenose erfolgt nach folgender Berechnung:

$$\text{Stenose} = 1 - (\text{Breite Stenose} / \text{Breite proximaler Gallengang})$$

- $\leq 0,5$: keine Stenose, Score 0
- $> 0,5$: geringgradig, Score 1
- $> 0,75$: mittelgradig, Score 2
- $> 0,9$: hochgradig, Score 3

Vorteil ist die projektionsunabhängige und direkte Beurteilbarkeit. Nachteil ist die

Beurteilung des wahren Lumens in der Stenose durch die Verdickung der Wandung.

7.3. Blutbild und klinische Chemie

An den jeweiligen Operationstagen wird den Tieren über die *V. auricularis lateralis* Blut entnommen. EDTA: ca. 2ml und Serum: ca. 3ml. Die Befunde werden von dem Institut für klinische Chemie, Klinikum der Universität München, Prof. Dr. Michael Vogeser (komm. Leiter) erhoben.

Folgende Parameter werden an den jeweiligen Tagen bestimmt: Klinische Chemie: Bilirubin ges. (mg/dl), γ -GT (37°, U/l), GPT [ALT] (37°, U/l), GOT [AST] (37°, U/l), kleines Blutbild: Leukozyten (G/l), Erythrozyten (T/l), Hämoglobin (g/dl), Hämatokrit, MCV (fl), MCH (pg), MCHC (g/dl), Thrombozyten (G/l).

In der Auswertung werden nur folgende Parameter betrachtet; Bilirubin, AST, ALT, γ -GT und Leukozyten.

Der Referenzbereich für Bilirubin liegt beim Schwein bei 0,006-0,241 mg/dl, für AST bei 8-35 U/l, für ALT bei 7-70, für γ -GT bei 10-40 U/l und für die Leukozyten bei 10,5-21,3 G/l. (Heinritzi and Plonait, 2004)

7.4. Histomorphometrische Auswertung

Eine histomorphometrische Auswertung wird an den Blöcken I (Längsschnitt Stenose) und IV (nicht-stenotischer gesunder Gallengang) vorgenommen. Die metrische Auswertung erfolgt - wiederum verblindet - mit Hilfe eines Leica Mikroskops. Die Schnitte werden mit einer Schrittmotorensteuerung und einem Abrasterprogramm in 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Aus den ca. 500 Einzelbildern wird ein Gesamtbild zusammengesetzt. Der Maßstab wird in Pixel angegeben, daraus lässt sich mit Hilfe der Freeware Datinf®Measure eine exakte Längen- und Flächenbestimmung realisieren.

Das Programm „Schrittmotorensteuerung“ wurde in Zusammenarbeit mit dem Laser-Forschungslabor der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Folgende Parameter werden bestimmt:

7.4.1. Bindegewebsfläche – histologischer Stenosegrad

Die Fläche des fibrosierten Areals in der Stenose in mm² wird aus dem Umfang (mm) berechnet. Die Stenosefläche wird durch die stärkere Fibrosierung des Bindegewebes von dem nicht stenosierte Bereich im Stenoseblock I abgegrenzt. Mit Hilfe des Vermessungsprogrammes wird an dieser Grenze entlanggefahren und eine Flächenbestimmung durchgeführt (Abbildung 28).

Aus diesen numerischen Daten erfolgt nach unten stehender Tabelle eine Einteilung in folgendes Score-System: 0=keine bzw. geringgradige, 1= mittelgradige, 2 hochgradige Stenose. Diese Einteilung wurde anhand der Häufigkeitsverteilung der Bindegewebsareale festgelegt. Der Grad 0 war durch Fehlen einer typischen Bindegewebsvermehrung charakterisiert. Die Grade 1 und 2 orientierten sich je zur Hälfte an der Häufigkeitsverteilung der übrigen Tiere: 10 Tiere zeigten Grad 1 und 9 Tiere Grad 2.

Graduierung	Stenosefläche
0	kein-geringer Gewebeeffekt im Präparat erkennbar $A \leq 0,05 \text{ mm}^2$
1	$0,05 \text{ mm}^2 < A \leq 0,7 \text{ mm}^2$
2	$A > 0,7 \text{ mm}^2$

Tabelle 1: Stenosegradeinteilung (0/1/2) anhand der Flächen

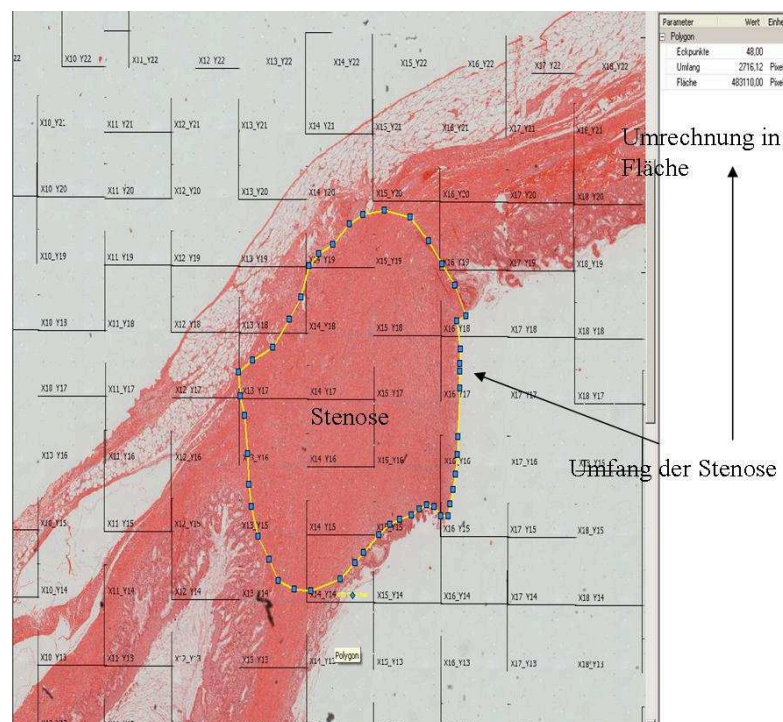


Abbildung 28: Ausmessen der Stenosefläche, 10x Vergrößerung, HE-Färbung

7.4.2. Dicke des Bindegewebes

Die Dicke des Bindegewebes wird im Stenoseblock I (dünnster und dickster Bereich) und im Referenzblock IV des gesunden Gallengangs in mm bestimmt (Abbildung 29).

Die Bindegewebisdicken-Messung wird ebenfalls mithilfe der Freeware Datinf@Measure vorgenommen.

- In dem Stenoseblock I erfolgt die erste Messung innerhalb der Stenose. Es wird die maximale Bindegewebsdicke ermittelt.
- Eine zweite Messung erfolgt außerhalb des stenosierte Bereiches, nämlich in einem Bereich, der die durchschnittliche Dicke des Bindegewebes außerhalb der Stenose in dem Stenoseblock I widerspiegelt.
- Die Messungen im Block IV außerhalb der Stenose dienen als Referenzmessungen. Hierfür erfolgt an drei Stellen pro Präparat die Vermessung des Bindegewebes. Der Mittelwert dieser Werte wird für die Auswertung herangezogen.

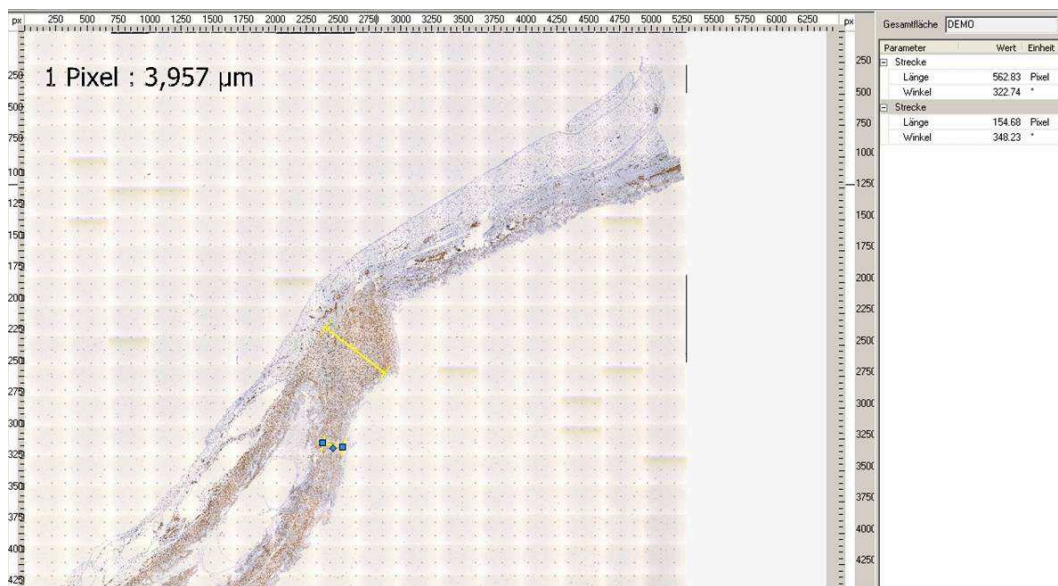


Abbildung 29: Ausmessen des Bindegewebes im Stenoseblock I an der dicksten Stelle und außerhalb der Stenose, 10x Vergrößerung, SMA-Färbung

7.5. Histopathologische Auswertung

Die im Folgenden beschriebene histopathologische Untersuchung findet ohne Kenntnis der jeweiligen Dosisgruppen statt. Alle genannten Parameter werden nach einer ersten Untersuchung der Schnitte mit Frau PD Dr. med D. Mayr,

Pathologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, festgelegt.

Es werden ein HE-Schnitt, ein EvG-Schnitt und ein SMA-Schnitt des Stenoseblocks I untersucht. Die Beurteilung der Schnitte erfolgt für die Übersichtsbeurteilung in 10-facher Vergrößerung und für die Detailansicht in 40-fache Vergrößerung. Eine semiquantitative Auswertung wird nach folgendem Score-System vorgenommen, wobei die semiquantitative Auswertung der oben genannten Parameter hier als Methode der Wahl gilt:

SCORE	Histopathologische Definition
0	Merkmal nicht vorhanden
1	Merkmal geringgradig vorhanden
2	Merkmal mittelgradig vorhanden
3	Merkmal hochgradig vorhanden

Tabelle 2: Definition des semiquantitativen Scorings

Folgende Parameter werden histopathologisch untersucht:

7.5.1. Fibrosegrad

Anhand der HE- und EvG-Färbung wird der Fibrosegrad im Stenosegebiet bestimmt und semiquantitativ in Scores eingeteilt. Er ist ein aus mehreren Einzelparametern zusammengesetzter Score (Vermehrung des Bindegewebes, erhöhter Anteil kollagener Fasern, Veränderung der Struktur der kollagenen Fasern) (1/2/3) im Stenoseblock I.

7.5.2. SMA-Gehalt

Anhand der SMA-Färbung wird der SMA-Gehalt und somit der Myofibroblastengehalt im gesamten Präparat (Stenoseblock I) bestimmt, der Gehalt an Myofibroblasten wird semiquantitativ Scores eingeteilt (0/1/2/3).

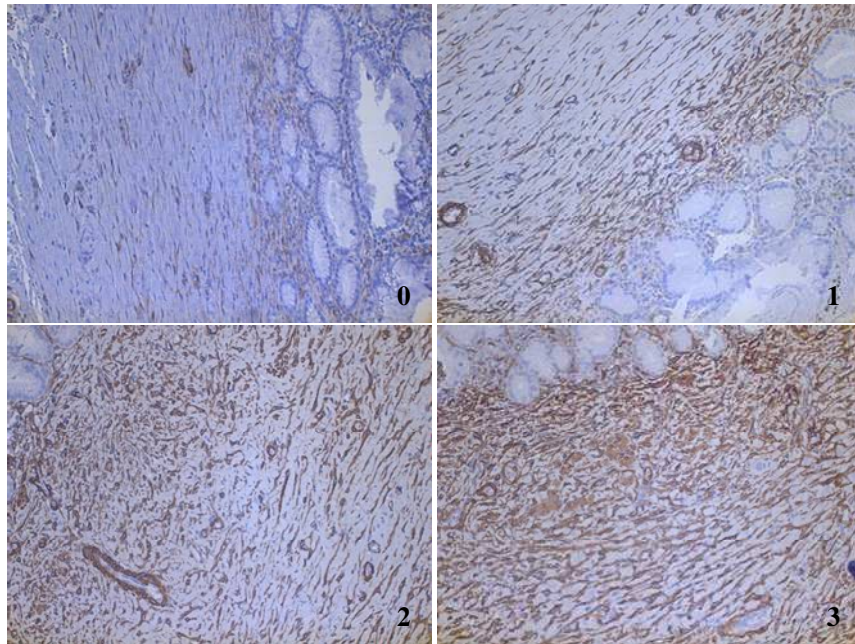


Abbildung 30: α -SMA-Score (0/1/2/3), bräunliche Färbung in den Abbildungen spiegelt die Ausprägung der Myofibroblastenwider, 20x Vergrößerung, α -SMA-Färbung

7.5.3. Kollagene Fasern

Anhand der EvG-Färbung wird der Gehalt an kollagenen Fasern im gesamten Präparat (Stenoseblock I) sowie im Referenzblock IV außerhalb der Stenose bestimmt, der Gehalt wird semiquantitativ Scores eingeteilt (0/1/2/3).

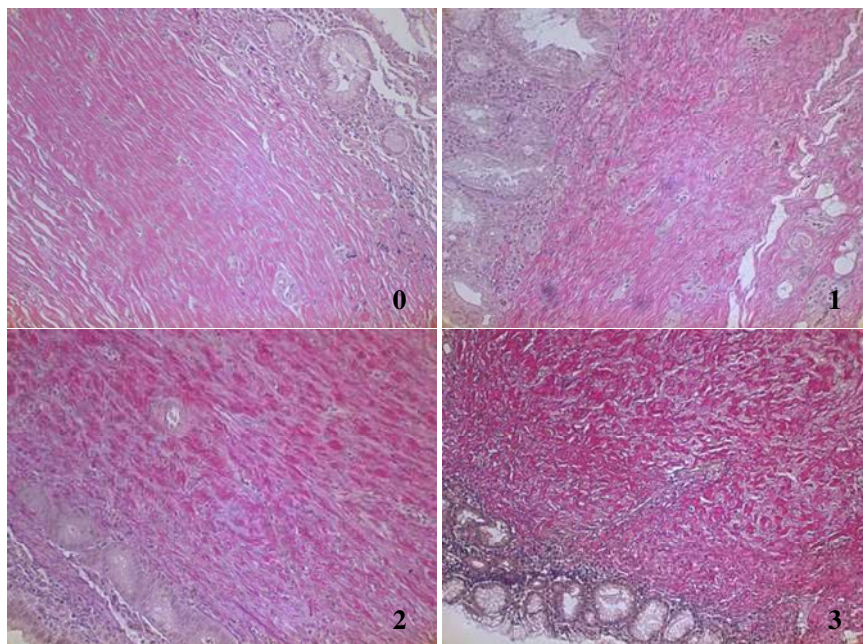


Abbildung 31: kollagene Fasern-Score (0/1/2/3), 20x Vergrößerung, EvG-Färbung

7.5.4. Elastische Fasern

Anhand der EvG-Färbung werden die elastischen Fasern in der Stenoseregion des Stenoseblockes I bestimmt, der Gehalt wird semiquantitativ Scores eingeteilt (0/1/2/3).

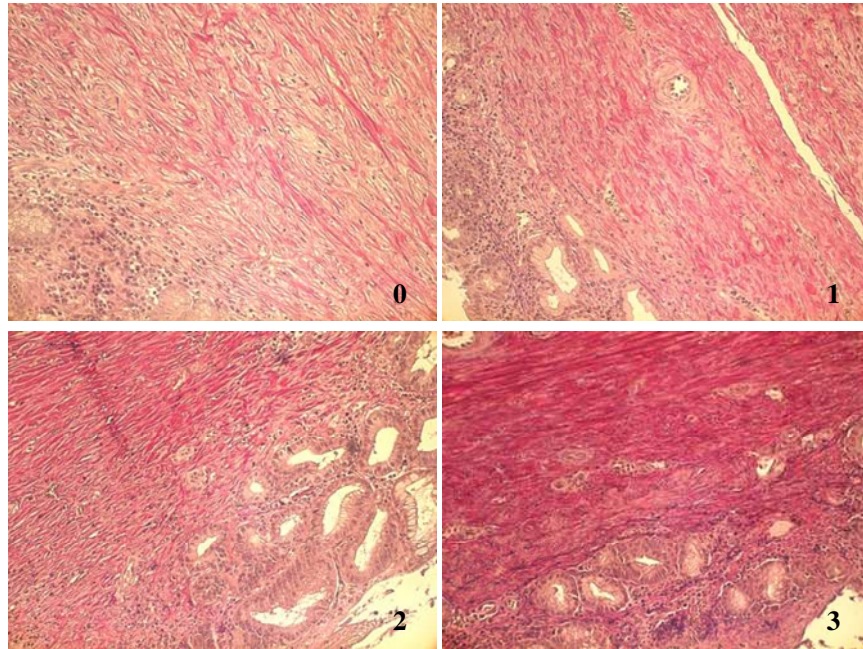


Abbildung 32: elastische Fasern Score (0/1/2/3), 20x Vergrößerung, EvG-Färbung

7.5.5. Entzündung im gesamten Bindegewebe

Anhand der HE-Färbung wird die Entzündung im gesamten Bindegewebe im Stenoseblock I (*Lamina propria* und Submukosa; Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen, Granulozyten) bestimmt. Das Ausmaß der Entzündung wird semiquantitativ gescored (0/1/2/3).

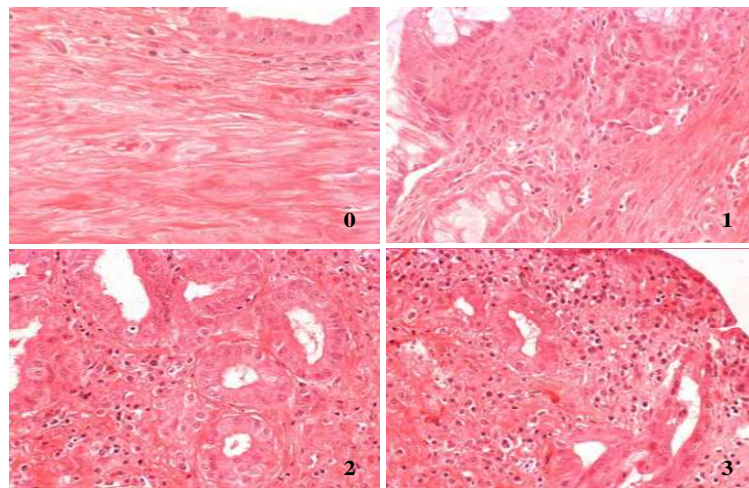


Abbildung 33: Entzündungsscore (0/1/2/3), 40x Vergrößerung, HE-Färbung

7.5.6. Entzündung im Epithel

Anhand der HE-Färbung werden die Entzündungszellen im Epithel im Stenoseblock I bestimmt, das Ausmaß der Entzündungszellen im Epithel wird semiquantitativ Scores eingeteilt (0/1/2/3).

7.5.7. Strahlenschäden

Ausprägung des Strahlenschadens im Stenoseblock I und vergleichend im Referenzblock (Block IV) außerhalb der Stenose (0=kein Befund, 1=Strahlenschaden vorhanden).

Ein Strahlenschaden wird definiert durch pathologische Veränderungen an den Gefäßen (Strahlenvaskulopathie, Intimafibrose, Lumenverschluß).

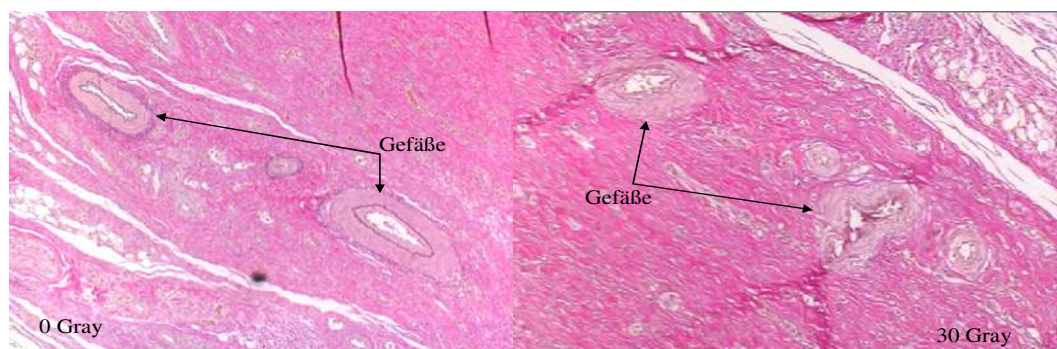


Abbildung 34: Strahlenschaden: linkes Bild ein unbestrahlter Gallengang, rechtes Bild: Strahlenschäden in Form einer Intimafibrose bei einem bestrahlten Gallengang (30 Gray); 40x Vergrößerung, EvG Färbung

8. Statistische Auswertung der Daten

Alle Daten werden mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 18,0, Inc, USA) ausgewertet und die Ergebnisse in verbaler, tabellarischer, graphischer und photographischer Form dargestellt.

Die quantitativen und semiquantitativen Daten sind als Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD), qualitative Daten als absolute und relative Häufigkeiten angegeben. Ein Zusammenhang zwischen den Daten wird durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman geschätzt. Die Normalverteilung wird anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests getestet. Der Effekt der LDR-Brachytherapie (0, 15 und 30 Gy) auf die verschiedenen quantitativen und semiquantitativen Parameter wird durch die Kruskal-Wallis-One Way Analysis of Variance (ANOVA) on Ranks für unverbundene Stichproben untersucht. Im Falle eines signifikanten Unterschieds erfolgt der Gruppenvergleich mit dem Tukey Test als posthoc-Test.

Mit multivariaten Korrelationsverfahren wird geprüft, welche Parameter mit einer Besserung der klinisch-radiologisch fassbaren Stenose einhergehen.

Alle Tests erfolgen zweiseitig mit einem 5 % igen Signifikanzniveau. Ein Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant angesehen.

V. ERGEBNISSE

1. Überlebensrate

1.1. P-Reihe (P 101-P 112)

Die ersten 12 Tiere (P-Reihe) dieses Versuchsvorhabens werden 4-mal einer ERC unterzogen. Von diesen 12 Tieren können 4 Tiere per Protokoll behandelt werden. Die Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Tiere, die nicht ausgewertet werden konnten.

Anzahl der Tiere	Ursache
n=4	Perforation/Krankheit
n=2	Todesursache unbekannt
n=2	Liegedauer nicht eingehalten

Tabelle 3: Tiere der P-Reihe, die nicht in das Protokoll genommen werden konnten mit Angabe der jeweiligen Ursache

Folgende Maßnahmen werden innerhalb der P-Reihe ergriffen, um eine Verbesserung der drop-out Rate zu gewährleisten:

- Der Energieeintrag wird gesenkt

Die ersten 5 Tiere erhalten einen Wärmeeintrag in Höhe von 2x 1200 J (2x60 W; 20 sec). Von diesen Tieren versterben 2 aufgrund einer Perforation, bei einem weiteren Tier kann die Todesursache nicht festgestellt werden. 2 Tiere können in den Versuch aufgenommen werden.

Die folgenden 4 Tiere werden mit einem Energieeintrag von 2x 800 J (2x40 W; 20 sec) behandelt. 1 Tier wird aufgrund einer Perforation euthanasiert, bei einem weiteren Tier liegt zwar keine Perforation vor, jedoch wird dieses Tier aufgrund einer Kachexie und eines hochgradigen Ikterus euthanasiert. 1 Tier kann nicht in die Versuchsreihe aufgenommen werden, da die Liegedauer von mind. einer Woche nicht eingehalten wird. 1 Tier wird in die Versuchsreihe aufgenommen.

Bei 3 weiteren Tieren wird die Stenose mit 2x 600 J (2x30 W; 20 sec) induziert. 1 Tier wird euthanasiert, die Ursache für die Verschlechterung des Allgemeinbefindens des Tieres ist unklar. 1 weiteres Tier wird aufgrund nicht eingehaltener Liegedauer aus dem Versuch genommen. 1 Tier wird per Protokoll behandelt.

1.2. W-Reihe (W 101-W 130)

Folgende Maßnahmen werden nach Abschluss der P-Reihe in der W-Reihe ergriffen, um eine Verbesserung der drop-out Rate zu gewährleisten:

- Der Energieeintrag wird weiter gesenkt

Bei den Tieren der W-Reihe wird die Stenose mit einem Wärmeeintrag von 2x 100 J (2x20 W; 5 sec) induziert.

- Die Anzahl der operativen Eingriffe (somit Senkung des ERC-Risikos und des Narkoserisikos) wird von 4 auf 3 reduziert.

In der W-Reihe wird der am Tag 14 eingelegte Stent nicht wie in der P-Reihe entfernt, er verbleibt bis zum Tag 35 im Tierkörper.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die in der W-Reihe (n=30) eingesetzten Tiere, die nicht per Protokoll behandelt werden können:

Anzahl der Tiere	Ursache
n=5	Perforation/Krankheit
n=5	Liegedauer nicht eingehalten

Tabelle 4: Tiere der W-Reihe, die nicht in das Protokoll genommen werden konnten mit Angabe der jeweiligen Ursache (Liegedauer nicht eingehalten= <7 Tage)

Folgende Tabelle zeigt in einer Übersicht die beschriebenen HF-Leistungen:

Tiernummer	Leistung	Anzahl der Tiere
P 101 – P 105	2x60 W; 20 sec	5 Tiere
P 106 – P 109	2x40 W; 20 sec	4 Tiere
P 110 – P 112	2x30 W; 20 sec	3 Tiere
W 101 – W 130	2x20 W; 5 sec	30 Tiere

Tabelle 5: applizierte HF-Leistungen und die dazugehörige Tierzahl

Für die Auswertung stehen 24 Tiere zur Verfügung. Im Anhang XIV. erfolgt eine detaillierte Auflistung der in diesem Versuchsvorhaben eingesetzten Tiere.

2. Klinische Untersuchung

Die Schweine zeigen 1-2 Tage nach Strikturinduktion ein geringgradig gestörtes Allgemeinbefinden. Dies äußert sich in einer herabgesetzten Futter- und Wasseraufnahme.

Komplikationen in der weiterführenden Versuchsphase sind: Fieber, eitrige

Cholangitiden und Peritonitiden aufgrund einer Perforation und Ikterus. Manche Tiere zeigen sich zum Versuchsende hin zunehmend apathisch, haben einen aufgekrümmten Rücken und reagieren bei der Palpation des Abdomens mit einer erhöhten Anspannung. Medikamentös werden die Tiere mit Analgetika, Antibiotika, und in einigen Fällen mit Glucocorticoiden (14 von 24 Tieren) behandelt. Der Einfluss der Glukokortikoidgabe auf die Entzündung wird in Kapitel IV.6.6.1.2.5 dargestellt.

3. Ergebnisse der Stenosecharakterisierung in vivo: Kontrastmitteldarstellung

An allen operativen Tagen (0; 14; 35) werden Kontrastmitteldarstellungen des Gallenganges durchgeführt. Die Ergebnisse beziehen sich auf das in Kapitel III.7.1 festgelegte Schema zur Auswertung der Daten.

Die radiologische Vermessung zeigt im Gegensatz zur makroskopischen und histologischen Untersuchung die Entwicklung der Stenose, da hier für die Bewertung der Stenosegradentwicklung Kontrastmitteldarstellungen von Tag 14 (Stenteinlage) und Tag 35 (Euthanasie) vorliegen.

In der folgenden Tabelle sind die Messdaten der Operationstage (0/14/35) mit Mittelwerten und Standardabweichungen dargestellt, eingeteilt in die Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. in die Kontrollgruppe (0 Gray). Zusätzlich werden die jeweiligen Signifikanzen angegeben.

Parameter	Tag 0: Stenoseinduktion			Statistik
	0 (n=8)	15 (n=8)	30 (n=8)	
Dosis in Gray				
Diameter Stenose in mm	5,7 ± 2,3	6,5 ± 0,9	6,3 ± 1,9	
Diameter prox. in mm	5,9 ± 2,9	6,5 ± 1,1	6,0 ± 1,5	
Diameter dist. in mm	6,1 ± 2,1	6,8 ± 1,3	6,2 ± 1,4	
	Tag 14: 14 Tage nach Stenoseinduktion			
Diameter Stenose in mm	1,8 ± 1,0	1,7 ± 0,6	1,8 ± 2,0	
Diameter prox. in mm	14,2 ± 5,1	18,3 ± 10,0	15,1 ± 4,0	
Diameter dist. in mm	7,7 ± 2,7	9,3 ± 3,2	6,9 ± 3,4	
Stenoselänge in mm	5,5 ± 5,7	2,4 ± 1,1	4,6 ± 3,0	
% Stenose	86 ± 9	88 ± 7	85 ± 20	
Signifikanz Tag 0-14	p=<0,001	p=<0,001	p=0,001	
Einteilung in Grade/Scores				
keine <= 0,5	0	n=0	n=0	n=1
geringgradig >= 0,5	1	n=1	n=0	n=0
mittelgradig >= 0,75	2	n=3	n=5	n=3
hochgradig >= 0,9	3	n=4	n=3	n=4
	Tag 35: 21 Tage nach Stenosebehandlung			
Diameter Stenose in mm	3,1 ± 1,3	2,7 ± 1,1	2,2 ± 1,7	p=0,222
Diameter prox. in mm	11,8 ± 4,5	15,1 ± 4,1	11,3 ± 6,4	p=0,143
Diameter dist. in mm	7,0 ± 1,7	8,0 ± 2,8	8,2 ± 2,2	p=0,593
Stenoselänge in mm	5,6 ± 4,7	3,5 ± 2,6	5,3 ± 4,0	p=0,669
% Stenose	71 ± 13	82 ± 5	80 ± 18	p=0,114
Signifikanz Tag 14-35	p=0,036	p=0,067	p=0,456	
Einteilung in Grade/Scores				
keine <= 0,5	0	n=1	n=0	n=1
geringgradig >= 0,5	1	n=3	n=1	n=2
mittelgradig >= 0,75	2	n=4	n=7	n=3
hochgradig >= 0,9	3	n=0	n=0	n=2
Entwicklung Stenose				
	Tag 14-Tag 35			
Δ Stenose in mm	1,4 ± 1,5	1,0 ± 1,3	0,3 ± 1,2	p=0,531
Δ Stenosegrad (Score)	-1,0 ± 0,9	-0,5 ± 0,8	-0,5 ± 0,5	p=0,403
% Δ Stenose	15 ± 14	6 ± 8	5 ± 9	p=0,402
Grad der Verbesserung				
um 0 Grade	n=3	n=5	n=4	
um -1 Grad	n=2	n=2	n=4	
um -2 Grade	n=3	n=1	n=0	

Tabelle 6: Gallengangsdiаметer am Tag 0/14/35, Einteilung in die Kontrollgruppe 0 Gray und Dosisgruppen 15/30 Gray, Gradeinteilung der Stenose:= 1 - (Diameter Stenose / Diameter proximaler Gallengang), Δ= Veränderung

Die Ergebnisse der radiologischen Auswertung am Tag 0 (Tag der Stenoseinduktion) zeigen, dass die Tiere ohne Vorerkrankung der Gallengänge bzw. der Leber in den Versuch gestartet sind. Dies bestätigen ebenfalls die in Kapitel IV.5 ausgewerteten leberspezifischen Blutwerte von Tag 0.

Ergebnisse der Stenoseinduktion (Tag 14):

Betrachtet man die Entwicklung der Stenose am Tag 14, so wird deutlich, dass es außer bei einem Tier (W 126) bei allen Tieren gelungen ist, eine klinisch relevante Stenose zu induzieren. Diese Stenoseausbildung ist in allen 3 Gruppen signifikant

zu Tag 0. Bei 11 Tieren kann am Tag 14 eine hochgradige Stenose gemessen werden, weitere 11 Tiere haben an diesem Tag eine mittelgradige Stenose. Ein Tier hat am Tag 14 eine geringgradige Stenose.

Stenoseentwicklung (Tag 14-Tag 35):

Die Entwicklung der Stenose von Tag 14 zu Tag 35 zeigt, dass in der Kontrollgruppe die Ballondilatation mit anschließender Drainage ohne zusätzliche Bestrahlung zu einem signifikanten Behandlungserfolg geführt hat ($p=0,036$), der Durchmesser nimmt um 15 % zu, im Mittel 1,4 mm, 3 Tiere verbessern sich um 2 Stenosegrade. Zusätzliche Bestrahlung in Form von 30 Gray führt nicht zu einem solchen Ergebnis. Der Durchmesser der Stenose verbessert sich in diesem Fall von Tag 14 zu Tag 35 im Mittel um 0,3 mm, am Tag 35 sind 2 hochgradige Stenosen nachzuweisen. Unter 15 Gray nimmt der Durchmesser deutlich zu, im Mittel um 1 mm ($p=0,067$). Wie auch in der Kontrollgruppe sind in der 15 Gray Gruppe keine hochgradigen Stenosen am Tag 35 nach erfolgter Behandlung nachzuweisen. Die Veränderung des Durchmessers der Stenose in Prozent in den Dosisgruppen (15/30 Gray) sowie in der Kontrollgruppe (0 Gray) wird in folgendem Diagramm 1 dargestellt.

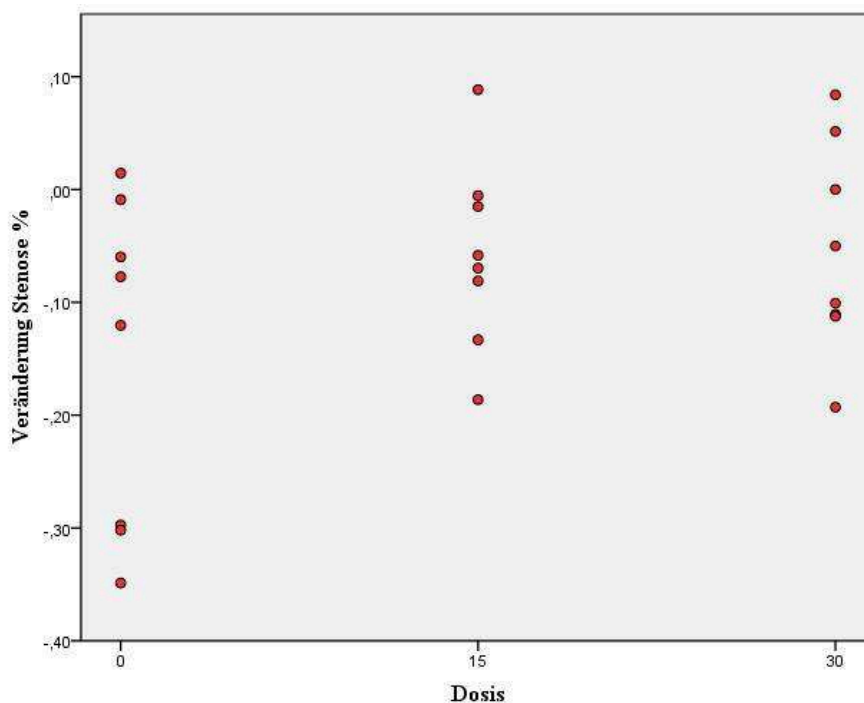


Diagramm 1: radiologische Stenose: Veränderung des Durchmessers unter Therapie von Tag 14 zu Tag 35 (%) ($p=0,158$)

In folgendem Diagramm wird der Durchmesser der Stenose am Tag 35 unterteilt in die Dosisgruppen und die Kontrollgruppe dargestellt.

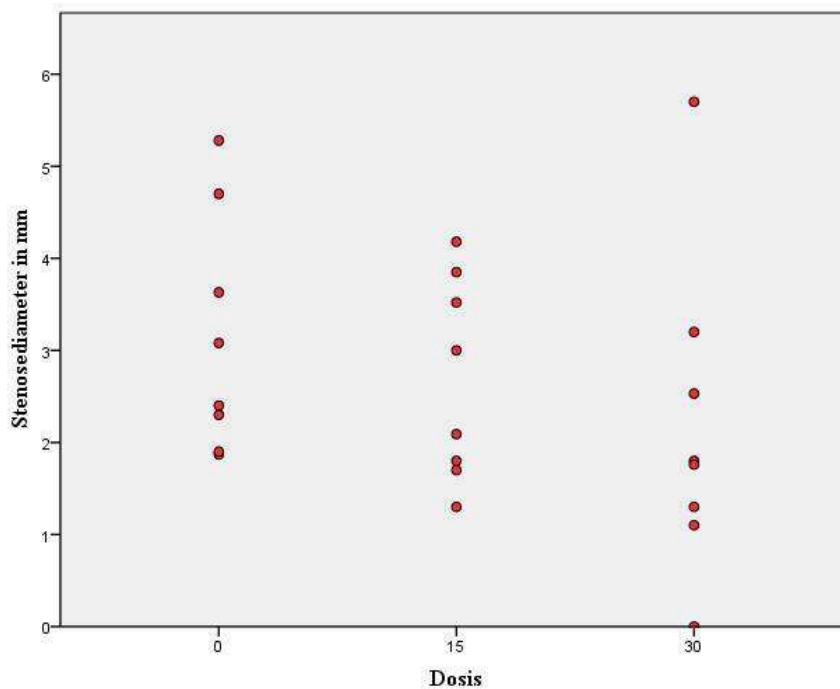


Diagramm 2: radiologische Stenose (Diameter in mm). Effekt der LDR-Brachytherapie am Tag 35

Die radiologisch gemessenen Durchmesser der Stenose am Tag 35 korrelieren höchst signifikant mit dem am explantierten Gallengang gemessenen makroskopischen inneren und dem äußeren Stenosedurchmesser ($p < 0,001$).

4. Ergebnisse der Stenosecharakterisierung ex vivo: makroskopisches Gallengangspräparat

Die Ergebnisse beziehen sich auf das in Kapitel III.7.2 festgelegte Schema zur Auswertung der Daten. Folgende Abbildung stellt die Messungen am makroskopischen Präparat dar.

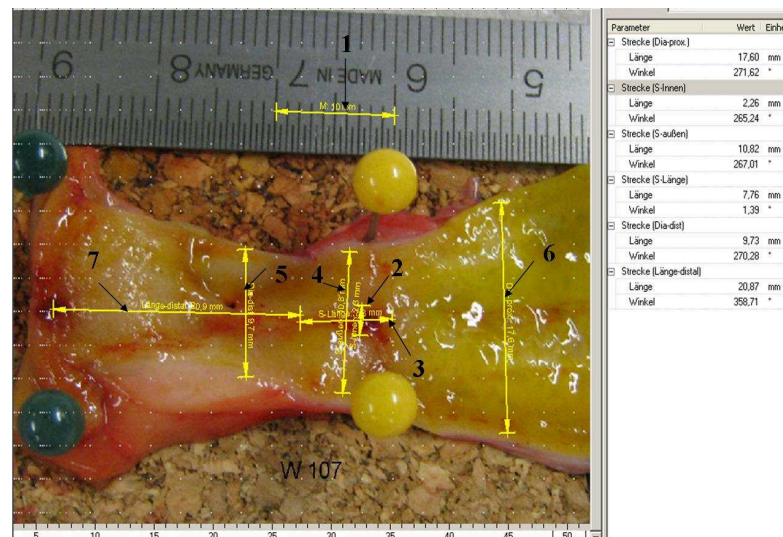


Abbildung 35: makroskopische Gallengangsvermessung ex-vivo: 1: Referenzmessung, 2: Innendurchmesser Stenose (ID), 3: Länge Stenose, 4: Außendurchmesser Stenose (OD), 5: Durchmesser distal der Stenose, 6: Durchmesser prox. der Stenose, 7: Länge Stenose-Papille, Angabe in mm.

In folgender Tabelle erfolgt eine Auflistung aller Messergebnisse der makroskopischen Gallengangsvermessungen mit zugehöriger Statistik.

	Tag 35: 21 Tage nach Stenosebehandlung			Statistik
Anzahl Tiere	n=8	n=8	n=8	
Dosis in Gray	0	15	30	
ID Stenose in mm	3,7 ± 0,9	3,4 ± 1,2	2,8 ± 1,4	p=0,228
OD Stenose in mm	11,0 ± 1,9	9,8 ± 2,0	10,4 ± 5,0	p=0,561
Länge Stenose in mm	4,8 ± 2,5	5,6 ± 2,7	8,4 ± 4,2	p=0,137
Breite prox. in mm	12,63 ± 4,37	15,5 ± 11,46	10,56 ± 5,35	p=0,352
Breite dist. in mm	19,5 ± 6,4	19,1 ± 7,0	21,9 ± 3,3	p=0,565
Stenose-Papille in mm	29,7 ± 10,4	26,9 ± 16,5	28,2 ± 10,6	

Tabelle 7: Gallengangsmessungen am makroskopischen Präparat Tag 35, Einteilung in die Kontrollgruppe 0 Gray und Dosisgruppen 15/30 Gray. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen, ID= Innendurchmesser Stenose, OD= Außendurchmesser Stenose, Breite prox.: Breite des Gallengangs ca. 1 cm proximal der Stenose, Breite dist.: Breite des Gallengangs ca. 1 cm distal der Stenose.

Anhand der Messergebnisse des Wertes „Stenose-Papille“ wird die Reproduzierbarkeit der Stenosehöhe dargestellt. Die Stenose liegt bei den Gruppen in 28,27 mm ± 12,32 Entfernung von der Papille.

Im Bezug auf die Mittelwerte ergibt sich, dass sowohl der innere als auch der äußere Durchmesser der Kontrollgruppe im Gegensatz zu den Dosisgruppen am weitesten ist. Die Länge der Stenose ist im Mittel bei der 30 Gray Gruppe am deutlichsten ausgeprägt. Jedoch ergibt die statistische Auswertung bei allen Parametern bezogen auf die Dosisgruppen bzw. die Kontrollgruppe keine

Signifikanzen.

Die radiologisch gemessenen Durchmesser der Stenose am Tag 35 korrelieren höchst signifikant mit dem am explantierten Gallengang gemessenen makroskopischen inneren und dem äußeren Stenosedurchmesser ($p < 0,001$).

5. Blutwerte Ergebnisse

Die Ergebnisse beziehen sich auf das in Kapitel III.7.3 festgelegte Schema zur Auswertung der Daten.

Parameter	Tag 0: Stenoseinduktion		
	0 (n=8)	15 (n=8)	30 (n=8)
Bilirubin (mg/dl)	0,32 ± 0,25	0,4 ± 0,24	0,4 ± 0,2
γ-GT (U/l)	55,3 ± 19,2	56,2 ± 24,4	61,3 ± 8
GOT/AST (U/l)	44 ± 9,1	48,4 ± 26,1	53,3 ± 11,9
GPT/ALT (U/l)	49,5 ± 12	46,1 ± 17,4	50 ± 16,7
Leukozyten (G/l)	17,5 ± 5,1	16,6 ± 4,6	16,2 ± 3,4
	Tag 14: 14 Tage nach Stenoseinduktion		
Bilirubin (mg/dl)	1,1 ± 1,2	1,6 ± 2,4	1,2 ± 1,5
γ-GT (U/l)	69,5 ± 29,9	79,6 ± 37,8	82 ± 19,6
GOT/AST (U/l)	57,3 ± 15,2	63,5 ± 27,7	53,8 ± 15,3
GPT/ALT (U/l)	49 ± 10,4	49 ± 13,6	58,5 ± 21,5
Leukozyten (G/l)	19,2 ± 8,9	17,6 ± 5,6	17 ± 3
	Tag 35: 21 Tage nach Stenosebehandlung		
Bilirubin (mg/dl)	0,28 ± 0,21	0,69 ± 1,1	2,1 ± 1,9
γ-GT (U/l)	63,1 ± 28,7	65,4 ± 23,6	92,1 ± 28,4
GOT/AST (U/l)	46,9 ± 13,4	52,4 ± 18,4	72,3 ± 79,8
GPT/ALT (U/l)	50 ± 8,9	41,8 ± 12,5	44,3 ± 24,8
Leukozyten (G/l)	14,01 ± 2,2	17,9 ± 6,9	15,8 ± 5,1

Tabelle 8: Blutbild und klinische Chemie am Tag 0/14/35, Einteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und Dosisgruppen (15/30 Gray), Angabe der Mittelwerte und Standardabweichung.

Es bestehen keine Signifikanzen zwischen den Werten des Blutbildes bzw. der klinischen Chemie und den Dosisgruppen bzw. der Kontrollgruppe. Im Weiteren wird das Augenmerk auf das Bilirubin gelegt.

Als Referenzwerte dienen die Werte der Messung am Tag 0: im Mittel 0,39 mg/dl ($\pm 0,21$ mg/dl). Das Minimum beträgt 0,1 mg/dl, das Maximum 0,7 mg/dl.

Parameter	Tag 0: Stenoseinduktion		
	0 (n=8)	15 (n=8)	30 (n=8)
Dosis in Gray			
Bilirubin (mg/dl)	0,32 ± 0,25	0,4 ± 0,24	0,4 ± 0,2
Tag 14: 14 Tage nach Stenoseinduktion			
Bilirubin (mg/dl)	1,1 ± 1,2	1,6 ± 2,4	1,2 ± 1,5
Signifikanz Tag 0-14	p=0,111	p=0,196	p=0,129
Tag 35: 21 Tage nach Stenosebehandlung			
Bilirubin (mg/dl)	0,28 ± 0,21	0,69 ± 1,1	2,1 ± 1,9
Signifikanz Tag 14-35	p=0,087	p=0,292	p=0,347

Tabelle 9: Serum Bilirubin am Tag 0/14/35, Einteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und Dosisgruppen (15/30 Gray), Angabe der Mittelwerte und Standardabweichung und die statistischen Signifikanzen von Tag 0 zu Tag 14 und von Tag 14 zu Tag 35.

- **Bilirubin – Dosis**

Bei dem Bilirubingehalt Tag 35 zeigt sich im statistischen Vergleich bezogen auf die verschiedenen Dosisgruppen bzw. Kontrollgruppe keine Signifikanz ($p=0,224$). Auch ist die Entwicklung des Bilirubinwertes nicht signifikant innerhalb der drei Operationstage. Die Mittelwerte der Gruppen zeigen, dass bei allen Tieren ein Anstieg der Bilirubinwerte nach Stenoseinduktion erfolgt ist. Die Kontrollgruppe und die 15 Gray Gruppe zeigen nach Ballondilatation und Drainage der Stenose eine deutliche Reduktion des Serum-Bilirubins am Tag 35. In der 30 Gray Gruppe hingegen steigt der Wert von Tag 14 zu Tag 35.

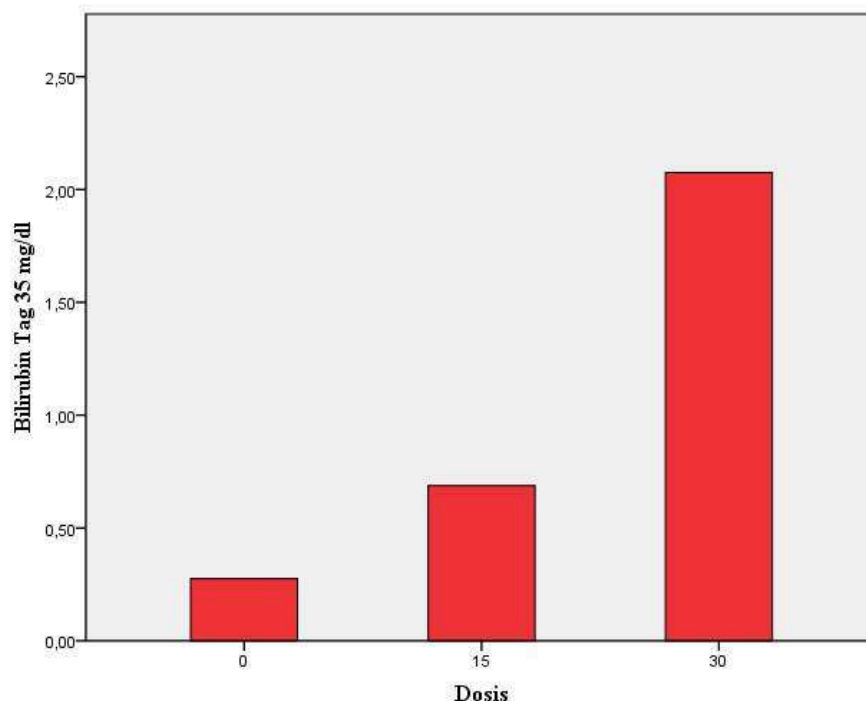


Diagramm 3: Das Diagramm zeigt die Bilirubinwerte (Mittelwert am Tag 35) in Abhängigkeit der verschiedenen Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe. Es besteht keine Signifikanz.

- **Bilirubin – radiologischer Stenosegrad**

Der Bilirubingehalt von Tag 14 und Tag 35 ist bezüglich der radiologischen Stenosegrade nicht signifikant ($p=0,233$; $p=0,115$).

Betrachtet man das Wolkendiagramm wird jedoch eine Tendenz deutlich: je höher der Stenosegrad desto höher sind die Bilirubinwerte am Tag 14 vor Behandlung:

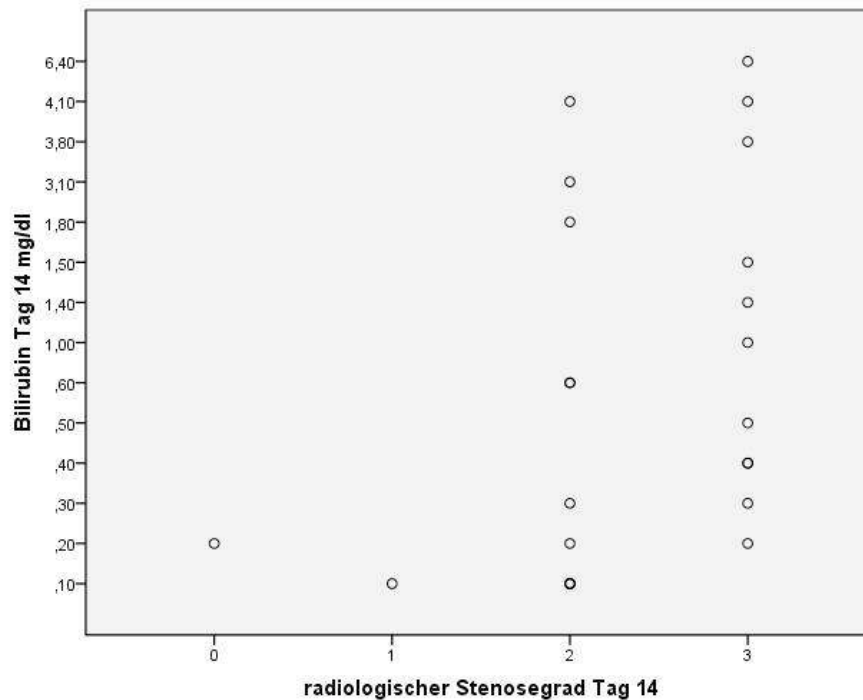


Diagramm 4: Bilirubin Tag 14 bezogen auf den radiologischen Stenosegrad Tag 14

6. Histomorphometrische Ergebnisse

6.1. Effekt der LDR-Brachytherapie auf die Gallengangsstenose

6.1.1. morphometrische Ergebnisse – Bindegewebmessungen in dem Stenoseblock I

6.1.1.1. Stenosefläche - histologischer Stenosegrad

Wie in Kapitel IV.4., IV.5. und diesem Kapitel beschrieben, stehen 3 verschiedene Messmethoden zur Bestimmung des Stenosegrades zur Verfügung: der radiologische, der makroskopische und der histologische Stenosegrad (die Stenosefläche wird durch die stärkere Vermehrung/Fibrosierung des Bindegewebes von dem nicht stenosierte Bereich im Stenoseblock I abgegrenzt).

Im nachfolgenden Diagramm werden die Stenoseflächen der einzelnen Tiere dargestellt. Aus den numerischen Daten erfolgt wie in Kapitel III.7.4.1 beschrieben, die Einteilung in ein Score-System: 0=keine bzw. geringgradige, 1=mittelgradige, 2=hochgradige Stenose. Der Grad 0 wird durch Fehlen einer typischen Bindegewebsvermehrung charakterisiert (5 Tiere, 20,8 %). Die Grade 1 und 2 orientieren sich je zur Hälfte an der Häufigkeitsverteilung der übrigen Tiere, somit haben 10 Tiere eine Grad 1 (41,7 %) und 9 Tiere Grad 2 (37,5 %) Stenose

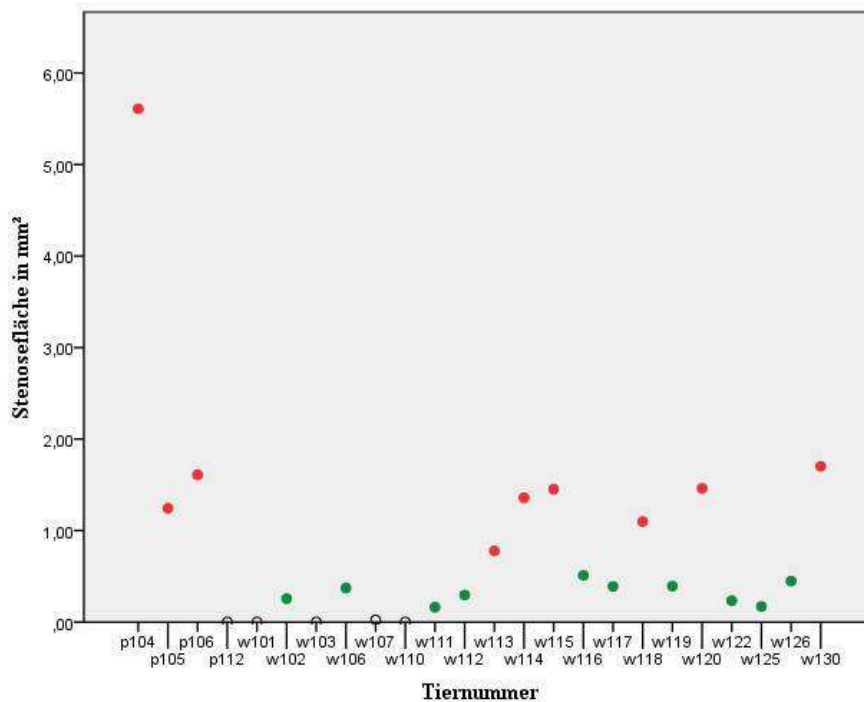


Diagramm 5: Stenosegradberechnung. Das Wolkendiagramm zeigt alle im Versuch stehenden Tiere mit dem zugehörigen Ausmaß der Stenosefläche (rot= Stenosegrad 2; grün= Stenosegrad 1; schwarzer Kreis= Stenosegrad 0)

- **Stenosefläche – Dosis**

In nachfolgender Tabelle zeigt sich, dass die Stenosefläche der 30 Gray Gruppe deutlich gegenüber der Kontroll- und 15 Gray Gruppe erhöht ist. Die 15 Gray Gruppe zeigt die geringste fibrosierte Gewebefläche. Zwischen den Gruppen besteht im Kruskal-Wallis-Test keine Signifikanz ($p=0,065$).

Parameter	Tag 35			Statistik
Dosis	0	15	30	Dosis
Stenosefläche mm ²	0,86 (±1,9)	0,54 (±0,64)	1,04 (±0,51)	p=0,065

Tabelle 10: histologische Stenoseflächen Tag 35, Unterteilung in die Dosisgruppen (15/30 Gray) und Kontrollgruppe (0 Gray); angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung, ebenso die auf die Dosis bezogene Signifikanz.

Im Folgenden wird die Anzahl der Tiere mit den verschiedenen Stenosegraden in Abhängigkeit von den jeweiligen Dosisgruppen (15/30 Gray) und Kontrollgruppe (0 Gray) tabellarisch dargestellt:

Parameter									
Dosis	0 Gy			15 Gy			30 Gy		
Stenosegrad	0	1	2	0	1	2	0	1	2
Anzahl Tiere	2	5	1	3	3	2	-	2	6
%	25	62,5	12,5	37,5	37,5	25	-	25	75

Tabelle 11: Einteilung der Tiere in die verschiedenen Stenosegrade und Dosisgruppen mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.

In der 0 Gray Gruppe haben 25 % der Tiere eine Grad 0 Stenose, dieser Grad ist in der 30 Gray Gruppe nicht vorhanden. Der Stenosegrad 2 ist in der 30 Gray Gruppe bei 75 % der Tiere nachzuweisen.

- **Korrelation Stenosefläche – Dosis**

Im Spearman Test besteht eine Korrelation zwischen dem Parameter Stenosefläche und den Dosisgruppen bzw. der Kontrollgruppe (p=0,021; r=0,469)

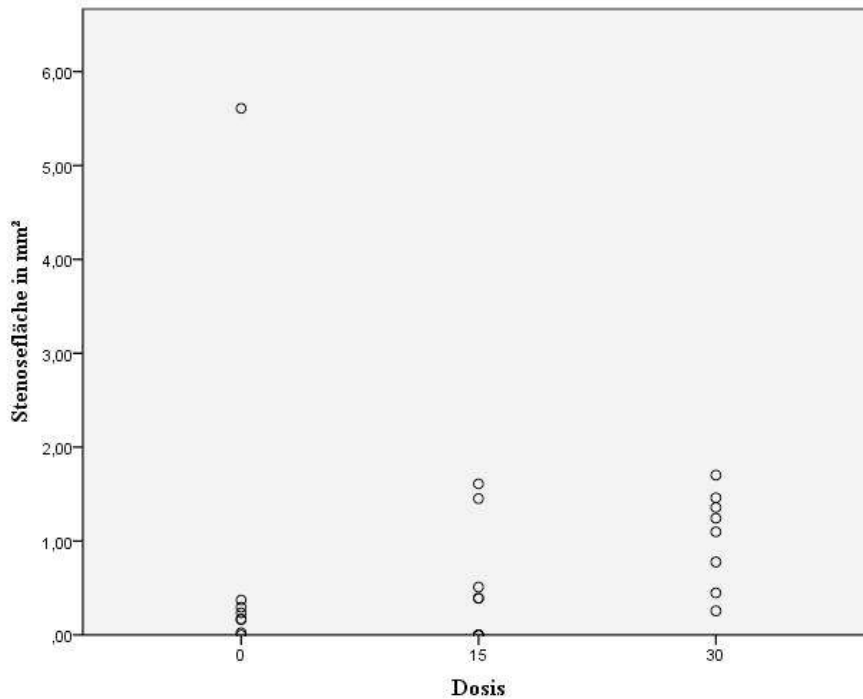


Diagramm 6: Stenoseflächen (mm²) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray).

6.1.1.2. Durchschnittliche Dicke des Bindegewebes im Block I – Stenoseblock

Die Messungen der durchschnittlichen Bindegewebsticke erfolgen außerhalb des stenosierte Bereiches im Stenoseblock I. Sie richten sich nach den im Kapitel III.7.4.2 beschriebenen Schemata.

- Durchschnittliche Dicke des Bindegewebe im Block I – Dosis**

Parameter				Statistik
Dosis	0	15	30	Dosis
Bindegewebe N in mm	0,55 (±0,20)	0,65 (±0,29)	1,26 (±0,59)	p=0,002*
Signifikanz	x		x	p=0,005*
Signifikanz		x	x	p=0,015*

Tabelle 12: durchschnittliche Bindegewebsticke im Stenoseblock I (N), Unterteilung in die Dosisgruppen (15/30 Gray) und Kontrollgruppe (0 Gray); angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung, ebenso die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen

Anhand der Werte wird deutlich, dass die Gewebesticken der 30 Gray Gruppe bezogen auf die 0 und 15 Gray Dosis ungefähr den zweifachen Wert aufweisen. Es besteht ein signifikanter Anstieg der Werte gegenüber der Dosis (p=0,002). Im lokalen Vergleich zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der 0 und

30 Gray-Gruppe ($p=0,005$) und der 15 und 30 Gray-Gruppe ($p=0,0015$).

Im Folgenden wird in einem Boxplot die Abhängigkeit der durchschnittlichen Bindegewebsdicke (Stenoseblock I) von den Dosisgruppen (15; 30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) dargestellt:

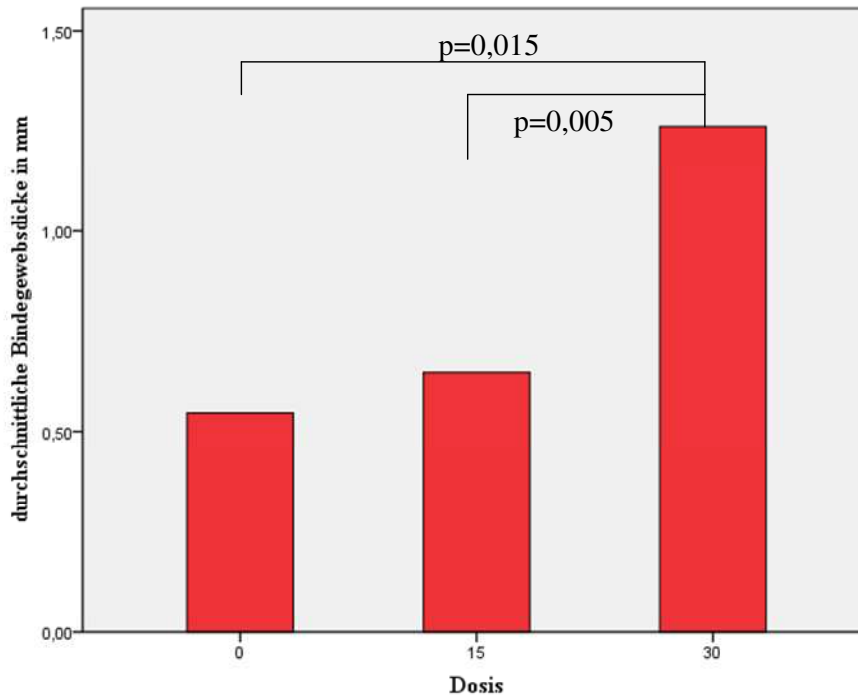


Diagramm 7: Das Diagramm zeigt die durchschnittlichen Bindegewebsmessungen im Stenoseblock I außerhalb der Stenose in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) und der Kontrollgruppe (0 Gray). Signifikanzen sind mit ihrem Signifikanzniveau angegeben.

6.1.1.3. Maximale Werte des Bindegewebes im Block I - Stenoseblock

In dem Stenoseblock I erfolgt die Ermittlung der maximalen Bindegewebsdicke anhand der Messung innerhalb der Stenose. Die histologischen Stenosegrade (bestimmt anhand der fibrosierten Bindegewebsfläche) korrelieren höchst signifikant mit den maximalen Bindegewebsmessungen ($p<0,001$; $r=0,697$).

- Maximale Werte des Bindegewebes – Dosis

Parameter				Statistik
Dosis	0	15	30	Dosis
Bindegewebe M in mm	1,53 ($\pm 0,73$)	1,81 ($\pm 0,79$)	2,64 ($\pm 0,82$)	p=0,012*
Signifikanz	x		x	p=0,004*
Signifikanz		x	x	p=0,020*

Tabelle 13: maximale Bindegewebedicke im Stenoseblock I (M), Unterteilung in die Dosisgruppen (15/30 Gray) und die Kontrollgruppe (0 Gray); angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung, ebenso die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen.

Die 0 Gray Gruppe hat mit 1,53 mm den niedrigsten Mittelwert bei der Bindegewebssmessung. Als Folge der Bestrahlung mit 30 Gray kommt es zu einer deutlichen Verdickung des Bindegewebes (2,64mm). Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen den zwei Parametern (p=0,012). Im lokalen Vergleich zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der 0 und 30 Gray-Gruppe (p=0,004) und der 15 und 30 Gray-Gruppe (p=0,020).

Im Folgenden wird in einem Boxplot die Abhängigkeit der maximalen Bindegewebssdicke im Stenoseblock I von den Dosisgruppen (15; 30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe dargestellt.

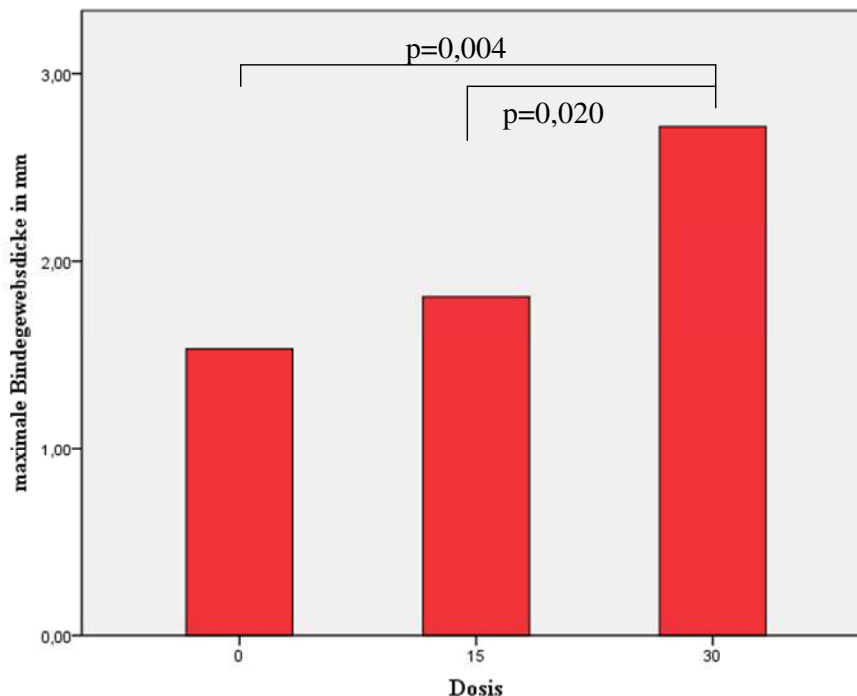


Diagramm 8: Das Diagramm zeigt die maximalen Bindegewebssmessungen im Stenoseblock I in der Stenose in Abhängigkeit der verschiedenen Dosen (0/15/30 Gray). Signifikanzen sind mit ihrem Signifikanzniveau angegeben.

- **Maximale Werte des Bindegewebes – histologischer Stenosegrad**

Parameter				Statistik
Stenosegrad	0	1	2	Stenosegrad
Bindegewebe M in mm	1,12 ($\pm 0,59$)	1,86 ($\pm 0,66$)	2,91 ($\pm 0,83$)	p=0,004*
Signifikanz	x		x	p=0,001*
Signifikanz		x	x	p=0,011*

Tabelle 14: maximale Bindegewebedicke im Stenoseblock I (M), Unterteilung in die Stenosegrad-Gruppen; angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung, ebenso die auf den Stenosegrad bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen.

Die Stenosegrad 0 Gruppe hat mit 1,12 mm den niedrigsten Mittelwert bei der Bindegewebsmessung. Der Wert Stenosegrad Gruppe 2 ist mit 2,91 mm deutlich erhöht (p=0,004). Im lokalen Vergleich zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen dem Stenosegrad 1 und 2 (p=0,011) und den Stenosegraden 0 und 2 (p=0,001).

Im Folgenden wird in einem Boxplot die Abhängigkeit der maximalen Bindegewebsdicke im Stenoseblock I von den verschiedenen Stenosegraden (0; 1; 2) dargestellt:

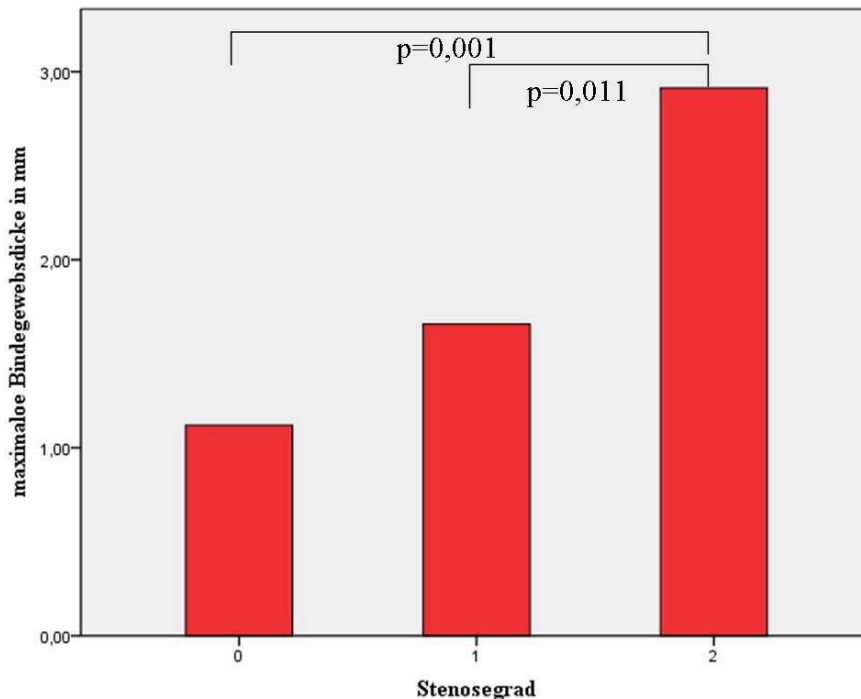


Diagramm 9: Das Diagramm zeigt die Bindegewebsmessungen im Stenoseblock I außerhalb der Stenose „normale Bindegewebe“ in Abhängigkeit der verschiedenen Stenosegrade (0/1/2). Signifikanzniveaus sind mit ihrem Signifikanzniveau angegeben.

6.1.2. Histopathologische Ergebnisse

6.1.2.1. Fibrosegrad

Die Ergebnisse beziehen sich auf die in Kapitel III.7.5.1. festgelegten Schemata zur Auswertung der Daten.

- **Fibrosegrad – Dosis**

Die Bewertung des Ausmaßes der Fibrose ergibt eine signifikante Zunahme des Fibrosegrades in der 30 Gray Gruppe ($p=0,023$).

Parameter										Statistik
Dosis in Gray	0 (n=8)			15 (n=8)			30 (n=8)			Dosis
Median FG	1,0 (1,0;2,75)			2,5 (1,25;3,0)			3,0 (3,0;3,0)			$p=0,023^*$
Signifikanz	x						x			$p=0,010^*$
Score FG	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Anzahl Tiere	5	1	2	2	2	4	-	1	7	
%	62,5	12,5	25	25	25	50	-	12,5	87,5	

Tabelle 15: Fibrosegrade (FG): Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Tiere in die verschiedenen Fibrosegrade und Dosisgruppen mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.

Der Vergleich des Median in den verschiedenen Dosisgruppen zeigt, dass 30 Gray mit einer stärkeren Fibrosierung des Gewebes einhergeht. Die Kontrollgruppe 0 Gray zeigt im Vergleich zu den Dosisgruppen die geringsten fibrotischen Veränderungen. Die 30 Gray Gruppe liegt mit einem Fibrosegrad-Score von 3 deutlich über dem der 0 Gray Gruppe. Der statistische Vergleich zwischen der 0 und der 30 Gray Gruppe zeigt, dass ein signifikanter Unterschied besteht ($p=0,010$).

Betrachtet man den prozentualen Anteil innerhalb der Gruppen haben 62,5 % der Tiere der Kontrollgruppe einen Fibrosegrad 1-Score, dieser Score ist in der 30 Gray Gruppe nicht vorhanden. In der 30 Gray Gruppe hingegen ist der Fibrosegrad 3 bei 87,5 % der Tiere nachzuweisen.

Im Folgenden wird in einem Wolkendiagramm die Abhängigkeit des Fibrosegrades von den Dosisgruppen (15; 30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) dargestellt. Die Fibrosegrade korrelieren mit den Dosisgruppen bzw. der Kontrollgruppe ($p=0,003$; $r=0,572$).

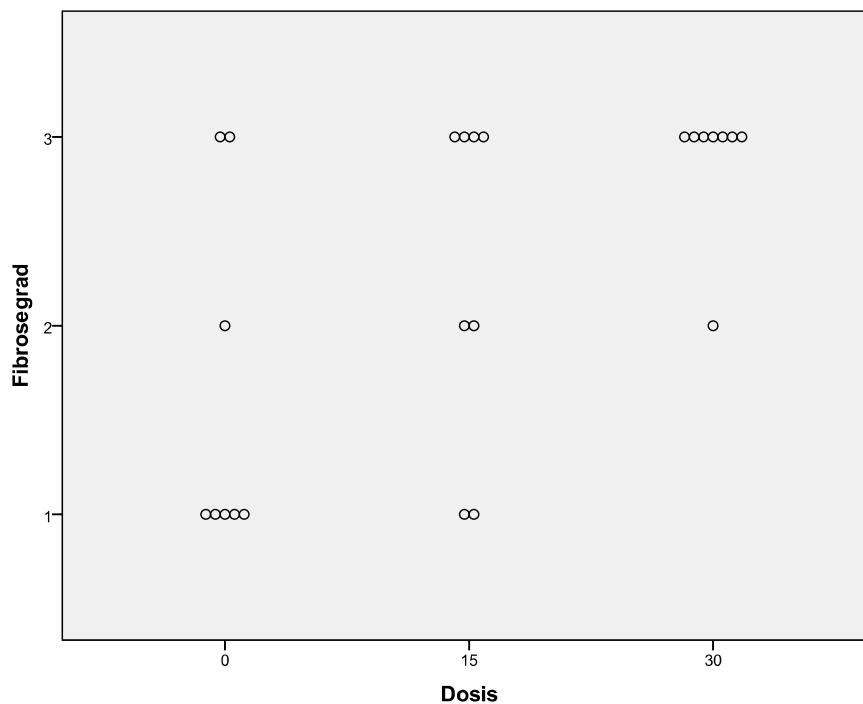


Diagramm 10: Fibrosegrad (1/2/3) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) und der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,003$).

- Fibrosegrad – histologischer Stenosegrad**

Parameter										Statistik
Stenosegrad	0 (n=5)			1 (n=10)			2 (n=9)			Stenosegrad
Median FG	2,0 (1,0;3,0)			1,5 (1,0;3,0)			3,0 (3,0;3,0)			$p=0,023^*$
Signifikanz				x			x			$p=0,015^*$
Score FG	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Anzahl Tiere	2	1	2	5	2	3	-	1	9	
%	40	20	40	50	20	30	-	11,1	88,9	

Tabelle 16: Fibrosegrad (FG): Unterteilung in die Stenosegrad-Gruppen; angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf den Stenosegrad bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen, ebenso erfolgt die Einteilung der Tiere in die verschiedenen Fibrosegrade und Stenosegrad-Gruppen mit Angabe der Anzahl und dem prozentualen Anteil.

Bei dem Vergleich des Median der Fibrosegrade zeigt sich in der Stenosegrad-Gruppe 2 der höchste Fibrosegrad mit einem Score von 3. Der Wert der Stenosegrad-Gruppe 1 ist am niedrigsten, jedoch ist hier die unterschiedliche Anzahl der Tiere innerhalb der Gruppe zu berücksichtigen. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich signifikant im Kruskal-Wallis Test ($p=0,023$), der lokale Vergleich zeigt eine Signifikanz zwischen der Stenosegrad-1 und Stenosegrad-2 Gruppe ($p=0,015$). In der Stenosegrad-Gruppe 2 ist bei 88,9 % der

Tiere ein Score 3 an fibrotischer Veränderung nachzuweisen. Ein Score 1 ist in dieser Stenosegrad-Gruppe nicht vorhanden. Der Fibrosegrad korreliert mit den Stenosegraden ($p=0,020$; $r=0,473$).

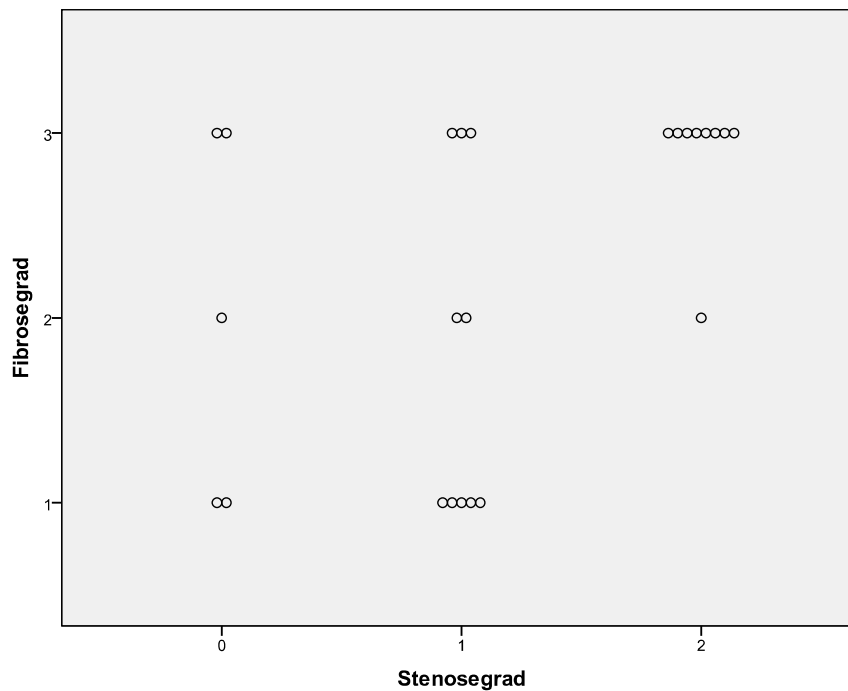


Diagramm 11: Fibrosegrad (1/2/3) in Abhängigkeit der Stenosegrad-Gruppen (0/1/2) ($p=0,020$).

6.1.2.2. α -SMA-Färbung

Die Ergebnisse beziehen sich auf die in Kapitel III.7.5.2. festgelegten Schemata zur Auswertung der Daten.

- **α -SMA-Färbung –Dosis**

Bei den Ergebnissen der α -SMA-Färbung wird der Einfluss radioaktiver Strahlung auf die Ausprägung des α -SMA-Gehaltes deutlich.

Parameter													Statistik
Dosis	0 (n=8)				15 (n=8)				30 (n=8)				Dosis
Median	0,5 (0,0;2,0)				2,0 (2,0;3,0)				3,0 (1,5;3,0)				p=0,008*
	x				x								p=0,014*
	x								x				p=0,004*
Score	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
n	4	1	-	3	-	1	4	3	-	2	-	6	
%	50	12,5	-	37,5	-	12,5	50	37,5	-	25	-	75	

Tabelle 17: α -SMA: Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikanter Unterschiede innerhalb der Gruppen, des Weiteren die Einteilung der Tiere in die verschiedenen α -SMA-Scores und Dosisgruppen mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.

Die Kontrollgruppe 0 zeigt im Vergleich zu den Dosisgruppen den geringsten α -SMA-Gehalt, die 30 Gray Gruppe weist den höchsten α -SMA-Gehalt auf. Es wird deutlich, dass bereits eine Bestrahlung in Höhe von 15 Gray die Expression der Myofibroblasten induziert. Statistisch ergibt sich im Kruskal-Wallis-Test innerhalb der Gruppen eine Signifikanz ($p=0,008$). Zwischen der Kontrollgruppe und der 30 Gray Gruppe ($p=0,004$) bzw. zwischen der Kontrollgruppe und der 15 Gray Gruppe ($p=0,014$) bestehen signifikante Unterschiede. Umseitig wird mit Hilfe eines Balkendiagramms der lokale Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der 30 Gray Gruppe dargestellt.

Betrachtet man den prozentualen Anteil innerhalb der Gruppen haben 50 % der Tiere in der Kontrollgruppe (0 Gray) einen α -SMA-Score 0, dieser Score ist in der 30 Gray Gruppe nicht vertreten. 75 % der Tiere in der 30 Gray Gruppe weisen einen α -SMA-Score 3 auf. Der α -SMA-Gehalt und die Dosisgruppen (15/30) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) korrelieren miteinander ($p=0,01$; $r=0,620$).

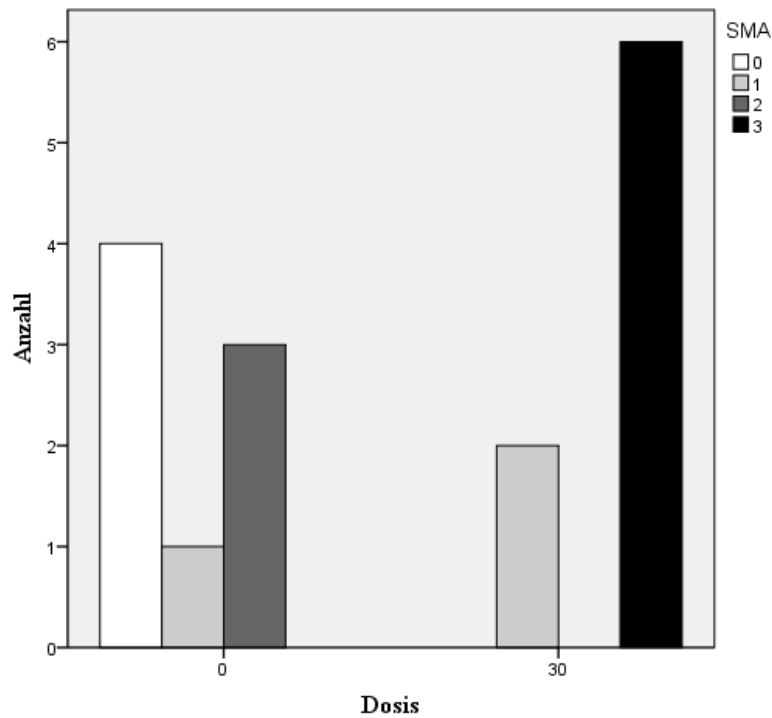


Diagramm 12: α -SMA-Färbung: Vergleich der Kontrollgruppe und der 30 Gray Gruppe ($p=0,001$).

Im Folgenden wird in einem Punktediagramm die Abhängigkeit der α -SMA-Färbung von den Dosisgruppen (15; 30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) dargestellt:

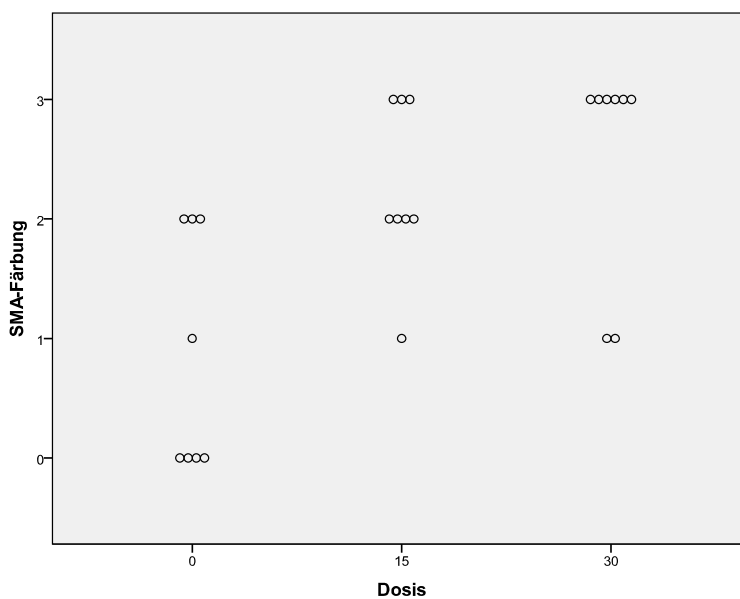


Diagramm 13: α -SMA-Färbung (0/1/2/3) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) und der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,01$).

- **α -SMA-Färbung- histologischer Stenosegrad**

Parameter													Statistik
Stenosegra	0 (n=5)				1(n=10)				2(n=9)				Stenosegra
Median	1,0 (0,0;2,0)				2,0 (1,0;3,0)				3,0 (1,5;3,0)				p=0,076
Score	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
n	2	1	2	-	1	2	4	3	1	1	1	6	
%	4	12,	4	-	1	2	4	3	11,	11,	11,	66,	

Tabelle 18: α -SMA; Unterteilung in die Stenosegrad-Gruppen; angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), ebenso die auf den Stenosegrad bezogene Signifikanz, des Weiteren erfolgt die Einteilung der Tiere in die verschiedenen α -SMA-Scores und Stenosegrad-Gruppen mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.

Die Stenosegrad Gruppe 2 hat mit einem Median von 3 die höchste Ansammlung der Myofibroblasten, die Stenosegrad Gruppe 0 die geringste Menge im Gewebe, das heißt mit steigendem Stenosegrad nimmt die Menge an α -SMA zu. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant ($p=0,076$). Der Grad der α -SMA-Färbung korreliert mit den Stenosegraden ($p=0,023$; $r=0,462$).

6.1.2.3. Kollagene Fasern im Stenoseblock I

Die Ergebnisse beziehen sich auf die in Kapitel III.7.5.3. festgelegten Schemata zur Auswertung der Daten.

- **Kollagene Fasern – Dosis**

Die Bestrahlungsdosis nimmt auf die Menge der kollagenen Fasern im Stenoseblock Einfluss. Innerhalb der Gruppen besteht eine Signifikanz ($p=0,015$).

Parameter													Statistik
Dosis Gray	0 (n=8)				15 (n=8)				30 (n=8)				Dosis
Median	1,0 (0,25;1,0)				0,5 (0,0;2,0)				2,0 (0,0;3,0)				p=0,015*
Signifikanz	x								x				p=0,014*
Signifikanz					x				x				p=0,026*
Score	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
Anzahl	2	5	1	-	4	1	2	1	-	1	4	3	
%	25	62,5	12,5	-	50	12,5	25	12,5	-	12,5	50	37,5	

Tabelle 19: kollagene Fasern: Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil) und die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen, des Weiteren erfolgt die Einteilung der Tiere in die verschiedenen Scores kollagener Fasern und Dosisgruppen mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.

Die Untersuchung der kollagenen Fasern zeigt, dass sich der Median der 15 Gray Gruppe mit einem Wert von 0,5 deutlich von dem der 30 Gray Gruppe mit einem

Wert von 2 unterscheidet. Die Kontrollgruppe hingegen zeigt eine leichte Zunahme der kollagenen Fasern in Bezug auf die 15 Gray Gruppe. Im lokalen Vergleich ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der 30 Gray Gruppe ($p=0,014$) (dargestellt im nachfolgenden Balkendiagramm) bzw. innerhalb der Dosisgruppen 15 und 30 Gray ($p=0,026$). Betrachtet man den prozentualen Anteil innerhalb der Gruppen haben 50 % der Tiere in der Dosisgruppe 15 Gray einen Score 0, in der 0 Gray Gruppe existiert nicht der Score 3, in der 30 Gray Gruppe ist der Score 0 nicht vertreten.

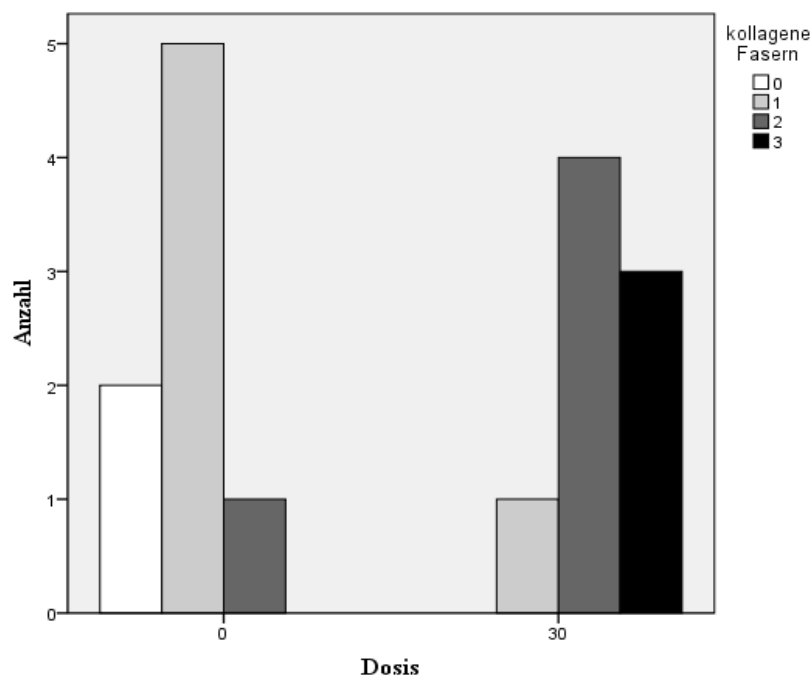


Diagramm 14: kollagene Fasern im Stenoseblock I: Vergleich der Kontrollgruppe und der 30 Gray Gruppe ($p=0,023$).

Wie in dem nachfolgenden Diagramm dargestellt besteht zwischen der Ansammlung der kollagenen Fasern und der Kontrollgruppe (0 Gray) bzw. der Dosisgruppen (15/30 Gray) eine positive Korrelation ($p=0,006$; $r=0,546$).

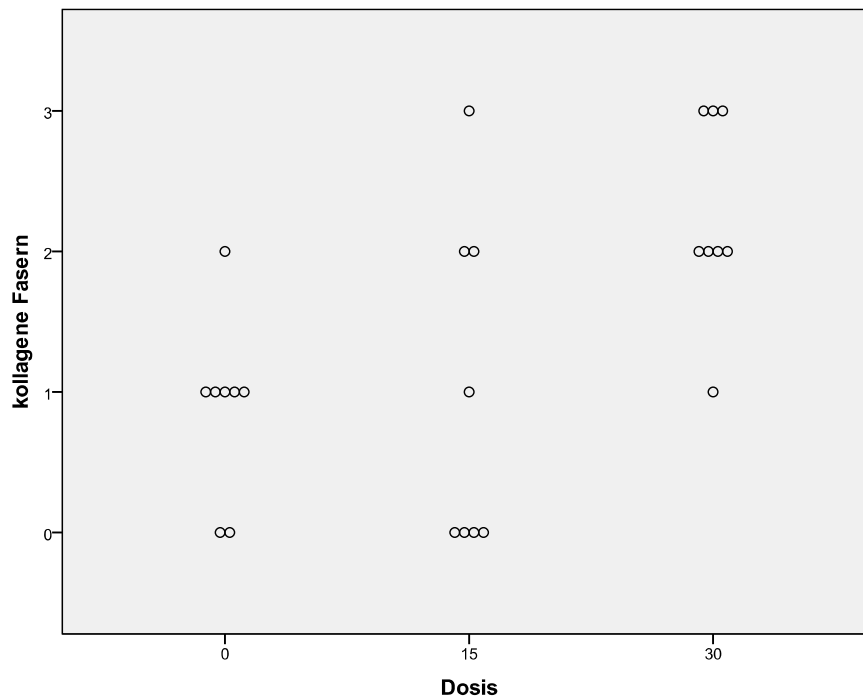


Diagramm 15: kollagenen Fasern (0/1/2/3) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,006$).

- **Kollagene Fasern – histologischer Stenosegrad**

Zwischen dem Parameter kollagene Fasern und dem Stenosegrad besteht ein signifikanter Unterschied.

Parameter													Statistik
Stenosegrad	0 (n=5)				1 (n=10)				2 (n=9)				Stenosegrad
Median KF	0,0 (0,0;0,0)				1,0 (1,0;2,0)				2,0 (2,0;3,0)				$p=<0,001^*$
Signifikanz	x				x								$p=0,006^*$
Signifikanz	x								x				$p=<0,001^*$
Signifikanz					x				x				$p=0,020^*$
Score KF	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
Anzahl Tiere	5	-	-	-	1	6	2	1	-	1	5	3	
%	100	-	-	-	10	69	20	10	-	11,1	55,6	33,3	

Tabelle 20: kollagene Fasern (KF): Unterteilung in die Stenosegrad-Gruppen; angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf den Stenosegrad bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen, ebenso erfolgt die Einteilung der Tiere in die Scores kollagene Fasern und Stenosegrad-Gruppen mit Angabe der Anzahl und dem prozentualen Anteil.

Bei den Tieren, die keine Stenose ausgebildet haben, lässt sich keine vermehrte Ansammlung kollagener Fasern nachweisen, wohingegen in der 30 Gray Gruppe die meisten kollagenen Fasern nachzuweisen sind. Die Zunahme des Kollagens führt zu der Ausprägung des Stenosegrades. Die Signifikanz liegt in diesem Fall

bei $p=0,000$. Im lokalen Vergleich zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, wobei zwischen der Stenosegrad-Gruppe 0 und der Stenosegrad-Gruppe 2 die höchste Signifikanz besteht ($p<0,001$). Zwischen den beiden Merkmalen besteht eine positive Korrelation ($p<0,001$; $r=0,786$).

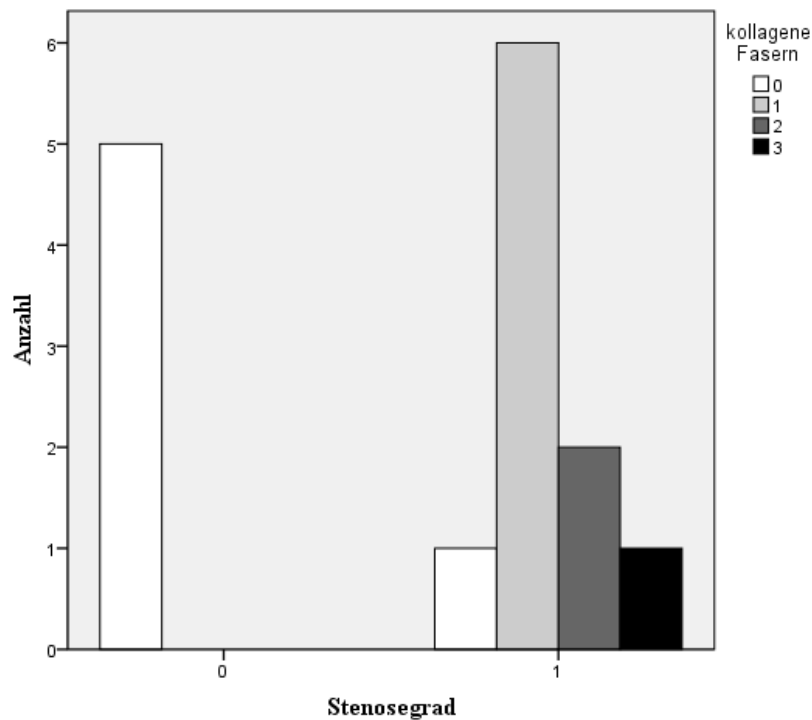


Diagramm 16: kollagenen Fasern im Stenoseblock I: Vergleich des Stenosegrades 0 und 1 ($p=0,004$).

6.1.2.4. Elastische Fasern

Die Ergebnisse beziehen sich auf die in Kapitel III.7.5.4. festgelegten Schemata zur Auswertung der Daten.

- **Elastische Fasern – Dosis**

Die Höhe der Dosis nimmt keinen Einfluss auf die Ansammlung elastischer Fasern. Die Kontrollgruppe zeigt im Median denselben Wert wie die Dosisgruppen. Eine Signifikanz ist nicht gegeben ($p=0,772$).

Parameter													Statistik
Dosis in Gray	0 (n=8)				15 (n=8)				30 (n=8)				Dosis
Median	1,0 (0,25;2,0)				1,0 (1,0;2,0)				1,0 (1,0;1,0)				p=0,772
Score EF	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
Anzahl Tiere	2	3	2	1	-	5	3	-	-	7	-	1	
%	25	37,5	25	12,5	-	62,5	37,5	-	-	87,5	-	12,5	

Tabelle 21: elastische Fasern (EF): Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Tiere in die Scores elastische Fasern (0/1/2/3) und Dosisgruppen bzw. Kontrollgruppe mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.

Im Spearman Test besteht zwischen der Ansammlung elastischer Fasern und den Dosisgruppen bzw. der Kontrollgruppe keine Korrelation ($p=0,906$; $r=-0,26$).

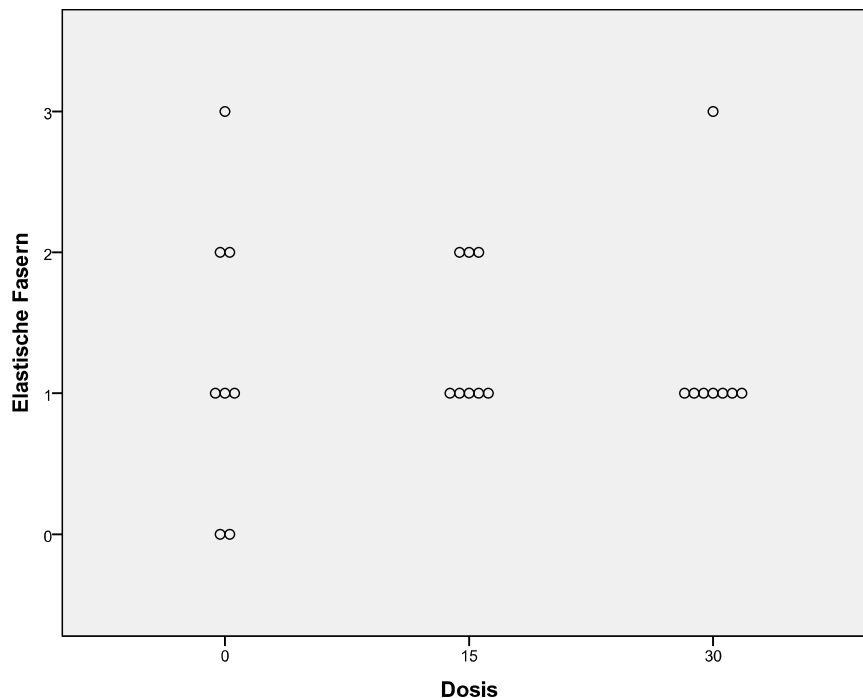


Diagramm 17: elastische Fasern (0/1/2/3) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,906$).

- Elastische Fasern – histologischer Stenosegrad**

Die Stenosegrade unterscheiden sich im Anteil der elastischen Fasern nicht signifikant.

Parameter													Statistik
Stenosegrad	0 (n=5)				1 (n=10)				2 (n=9)				Stenosegrad
Median EF	1,0 (1,0;1,0)				1,5 (1,0;2,0)				1,0 (1,0;1,5)				p=0,354
Score EF	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
Anzahl	-	1	-	-	1	4	4	1	1	6	1	1	
%	-	100	-	-	10	40	40	10	11,1	66,6	11,1	11,1	

Tabelle 22: Unterteilung in die Stenosegrad-Gruppen; angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf den Stenosegrad bezogene Signifikanz, ebenso erfolgt die Einteilung der Tiere in die Scores elastische Fasern und Stenosegrad-Gruppen mit Angabe der Anzahl und dem prozentualen Anteil.

Die Stenosegruppe 1 weist den höchsten Gehalt elastischer Fasern auf, die anderen Gruppen haben mit einem Wert von 1 einen identischen Score elastischer Fasern. Im Spearman Test besteht keine Korrelation zwischen den zwei Parametern ($p=0,910$; $r=0,024$).

6.1.2.5. Entzündung im gesamten Präparat

Die Ergebnisse beziehen sich auf die in Kapitel III.7.5.5. festgelegten Schemata zur Auswertung der Daten. Bei der Entzündung des Bindegewebes handelt es sich um eine eitrig-fibrinös, lymphoplasmazelluläre Entzündung, die nicht direkt von einer akuten Entzündung abzugrenzen ist.

- **Entzündung im gesamten Präparat – Dosis**

Zwischen der Entzündung im gesamten Präparat und den Dosisgruppen bzw. der Kontrollgruppe besteht ein signifikanter Unterschied ($p=0,029$).

Parameter													Statistik
Dosis (Gy)	0 (n=8)				15 (n=8)				30 (n=8)				Dosis
Median EG	1,0 (1,0;1,75)				2,5 (1,25;3,0)				3,0 (2,0;3,0)				p=0,029*
Signifikanz	x								x				p=0,020*
Score EG	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
n	1	5	1	1	-	2	2	4	-	1	2	5	
%	12,5	62,5	12,5	12,5	-	25	25	50	-	12,5	25	62,5	

Tabelle 23: Entzündung gesamt (EG): Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Tiere in die Scores Entzündung gesamt (0/1/2/3) und Dosisgruppen bzw. Kontrollgruppe mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.

Die Kontrollgruppe weist die geringste Entzündung im gesamten Präparat auf. Vergleicht man die Mediane der Dosisgruppen mit dem Median der Kontrollgruppe, wird der Einfluss der Bestrahlung auf das Ausmaß der

Entzündung deutlich. Die Kontrollgruppe zeigt einen signifikanten Unterschied zu der 30 Gray Gruppe ($p=0,020$). 62,5 % der Tiere in der 30 Gray Gruppen haben einen Score 3 Entzündung im Bindegewebe, bei der 15 Gray Gruppe sind es 50 %, wohingegen in der 0 Gray Gruppe nur 12,5 % der Tiere einen Score 3 aufweisen.

Im Spearman Test besteht eine Korrelation zwischen den zwei Parametern ($p=0,008$; $r=0,526$)

Im Folgenden wird in einem Wolkendiagramm die Abhängigkeit der Entzündung im gesamten Präparat von den Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) dargestellt:

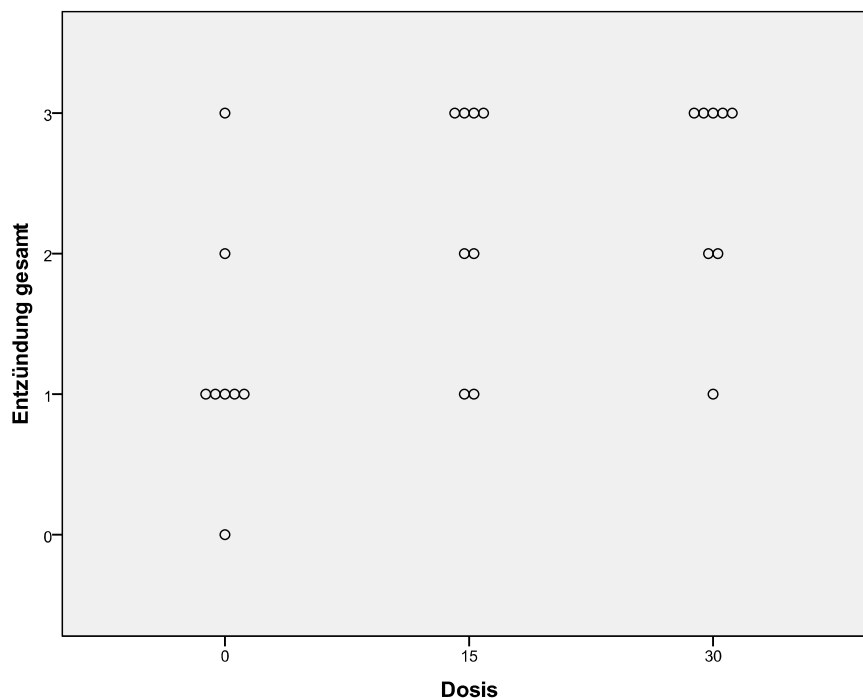


Diagramm 18: Entzündung im gesamten Präparat (0/1/2/3) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,008$).

- **Korrelation Entzündung – Dexamethasongabe**

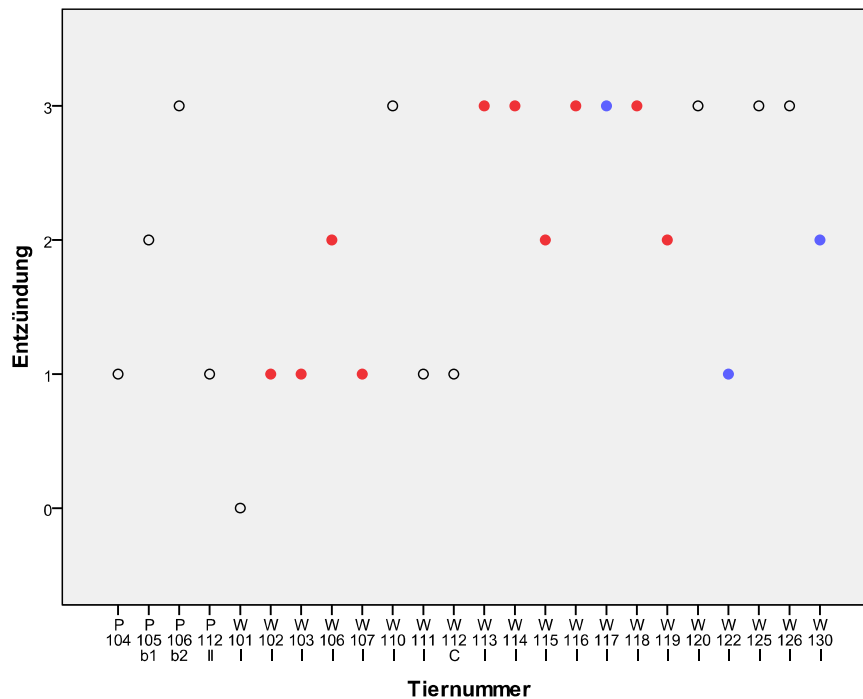


Diagramm 19: Dexamethasongabe (rot= mehrmalige Gabe; blau= einmalige Gabe) in Abhängig der Entzündung im gesamten Präparat (0/1/2/3) (nicht ausgefüllte Punkte=keine Glucocorticoid-Gabe).

Das Diagramm zeigt, dass die einmalige bzw. die mehrmalige Gabe von Dexamethason keinen Einfluss auf das Ausmaß der Entzündung im Gallengang nimmt.

6.1.2.6. Entzündung im Epithel

Die Ergebnisse beziehen sich auf die in Kapitel III.7.5.6. festgelegten Schemata zur Auswertung der Daten.

- **Entzündung im Epithel – Dosis**

Parameter													Statistik
Dosis in Gray	0 (n=8)				15 (n=8)				30 (n=8)				Dosis
Median EE	0,0 (0,0;0,75)				1,0 (0,25;1,75)				2,0 (0,25;3,0)				p=0,030*
Signifikanz	x								x				p=0,015*
Score EE	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
n	6	2	-	-	2	4	1	1	2	1	2	3	
%	75	25	-	-	25	50	12,5	12,5	25	12,5	25	37,5	

Tabelle 24: Entzündung im Epithel (EE): Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Tiere in den Score Entzündung im Epithel (0/1/2/3) und Dosisgruppen bzw. Kontrollgruppe mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.

Das Ausmaß der Entzündung im Epithel verhält sich ähnlich zu dem Ausmaß der Entzündung im gesamten Präparat. Auch in diesem Fall weist die Kontrollgruppe keine Entzündung im Epithel auf. Die 30 Gray Gruppe zeigt mit einem Median von 2 die höchste Entzündung auf, die geringere Dosis von 15 Gray verursacht eine Entzündung mit einem Median von 1. Die 30 Gray Gruppe unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe ($p=0,015$). Im Spearman Test besteht eine positive Korrelation zwischen der Entzündung im Präparat und den Dosisgruppen bzw. der Kontrollgruppe ($p=0,006$; $r=0,541$).

Im Folgenden wird in einem Wolkendiagramm die Abhängigkeit der Entzündungszellen im Epithel von den Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe dargestellt:

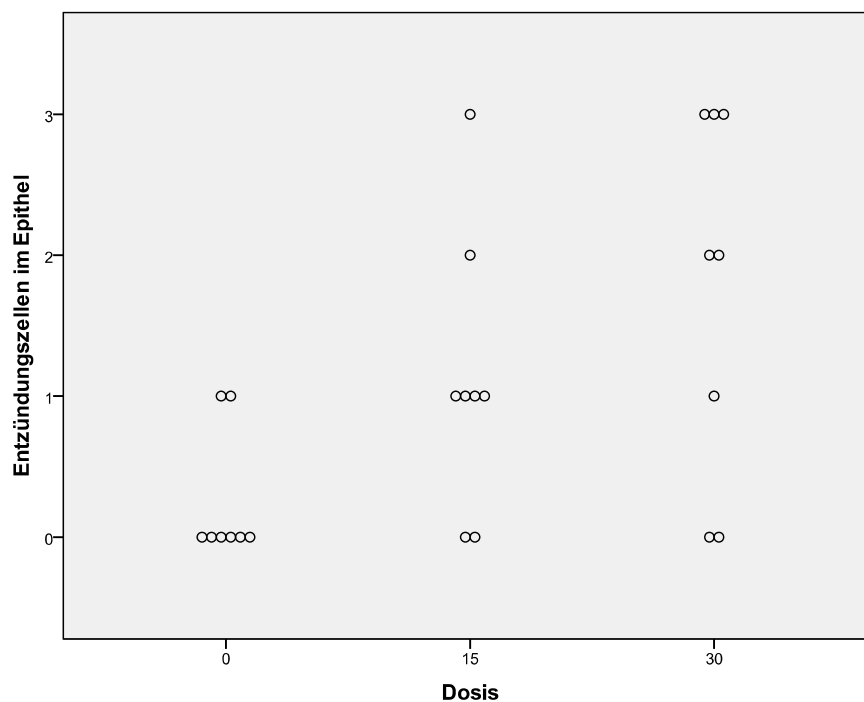


Diagramm 20: Korrelation zwischen den Entzündungszellen im Epithel (0/1/2/3) und den Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,006$).

6.1.2.7. Strahlenschäden im Stenosebereich (Block I)

Von 24 Tieren haben 14 einen sichtbaren Strahlenschaden (58,3 %). Ein Strahlenschaden wird definiert durch pathologische Veränderungen an den Gefäßen (Strahlenvaskulopathie, Intimafibrose, Lumenverschluss). 10 Tiere haben keinen erkennbaren Strahlenschaden (41,7 %). In der 0 Gray Gruppe ist bei 6 von 8 Tieren kein offensichtlicher Schaden erkennbar (75 %), in der 15 Gray

Gruppe und in der 30 Gray Gruppe kann man bei je 6 von 8 Tieren einen deutlichen Strahlenschaden erkennen (75 %). Das Ergebnis ist innerhalb der Gruppen nicht signifikant ($p=0,072$). Allerdings zeigen 2 von 8 Tieren der Kontrollgruppe „Strahlenschäden“, so dass dieses Kriterium aufgrund der geringen Spezifität mit Einschränkungen zu bewerten ist.

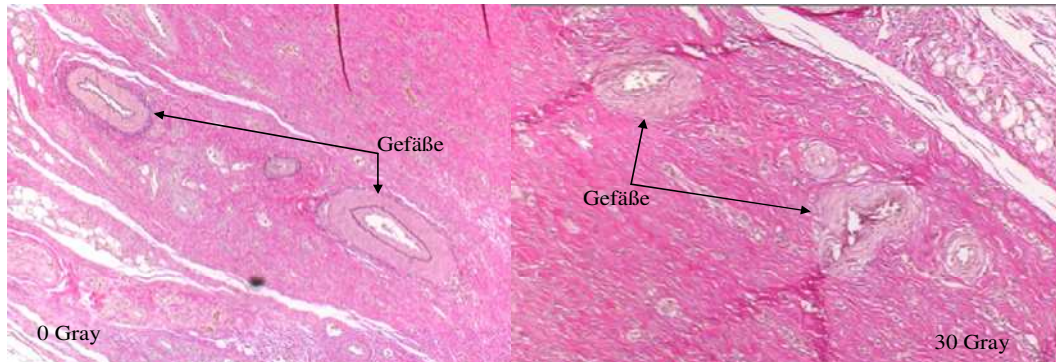


Abbildung 36: Strahlenschaden, links 0 Gray, rechts 30 Gray (Intimafibrose der Gefäße)

Im Folgenden wird in einem Wolkendiagramm die Abhängigkeit des Strahlenschadens auf die Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. die Kontrollgruppe (0 Gray) dargestellt:

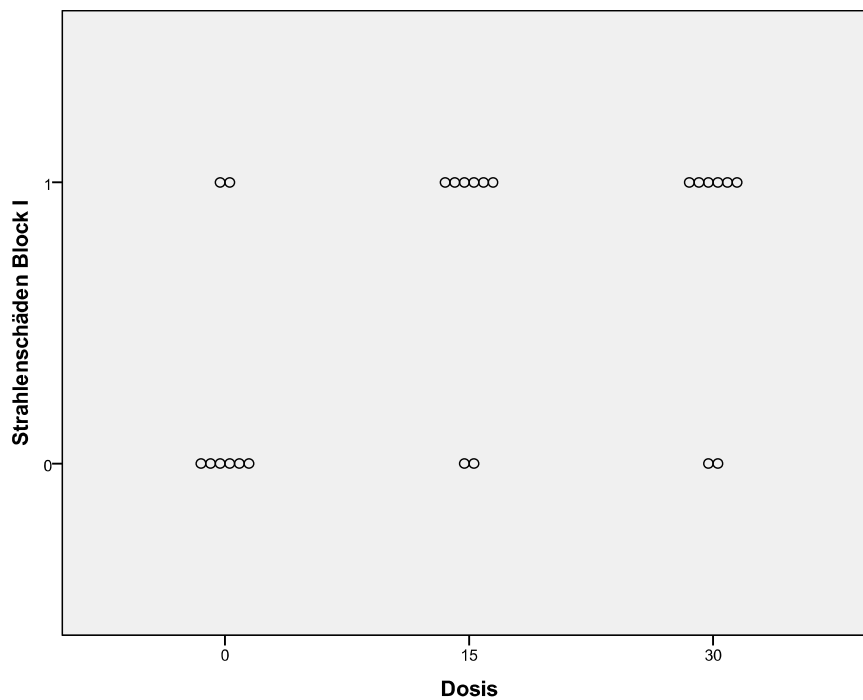


Diagramm 21: Strahlenschäden (0/1) aus Block I in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,044$).

6.2. Effekt der LDR- Brachytherapie auf den gesunden Gallengang außerhalb der Stenose

Die folgenden Parameter beziehen sich auf die Tiere der W-Reihe. Die Schnittführung wurde nach der P-Reihe optimiert, es wurde zusätzlich zu den Blöcken aus der Stenoseregion ein Gewebeblock aus dem nicht stenosierte aber dennoch bestrahlten Gewebe entnommen und histologisch aufbereitet.

6.2.1. Referenzdicke des Bindegewebes im Block IV außerhalb der Stenose

Die Ergebnisse beziehen sich auf die in Kapitel III.7.4.2. festgelegten Schemata zur Auswertung der Daten. Die Messungen im Block IV außerhalb der Stenose dienen als Referenzmessungen. Hierfür erfolgt an drei Stellen pro Präparat die Vermessung des Bindegewebes. Der Mittelwert dieser Werte wird für die Auswertung herangezogen.

- **Referenzdicke des Bindegewebes im Block IV - Dosis**

Parameter				Statistik
Dosis	0	15	30	Dosis
Bindegewebe RD in mm	0,63 ($\pm 0,27$)	0,72 ($\pm 0,21$)	0,84 ($\pm 0,22$)	p=0,373

Tabelle 25: Bindegewebedicke im Referenzblock IV (RD), Unterteilung in die Dosisgruppen (15/30 Gray) und Kontrollgruppe (0 Gray); angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung, ebenso die auf die Dosis bezogene Signifikanz.

Anhand der gebildeten Mittelwerte wird der Einfluss der Bestrahlung auf das gesunde Gewebe deutlich: mit zunehmender Dosis findet eine geringe Verdickung des Bindegewebes statt. Diese Erhöhung ist jedoch auch in der höchsten Dosis nicht signifikant ($p=0,373$).

Im Folgenden wird in einem Wolkendiagramm die Abhängigkeit der Dicke des Bindegewebes (Referenzwert aus Block IV) von den verschiedenen Dosisgruppen (15; 30 Gray) und der Kontrollgruppe (0 Gray) dargestellt. Tendenziell hat die 30 Gray Gruppe einen stärkeren Einfluss auf die Bindegewebszunahme in Referenzblock IV als die Kontrollgruppe 0 Gray.

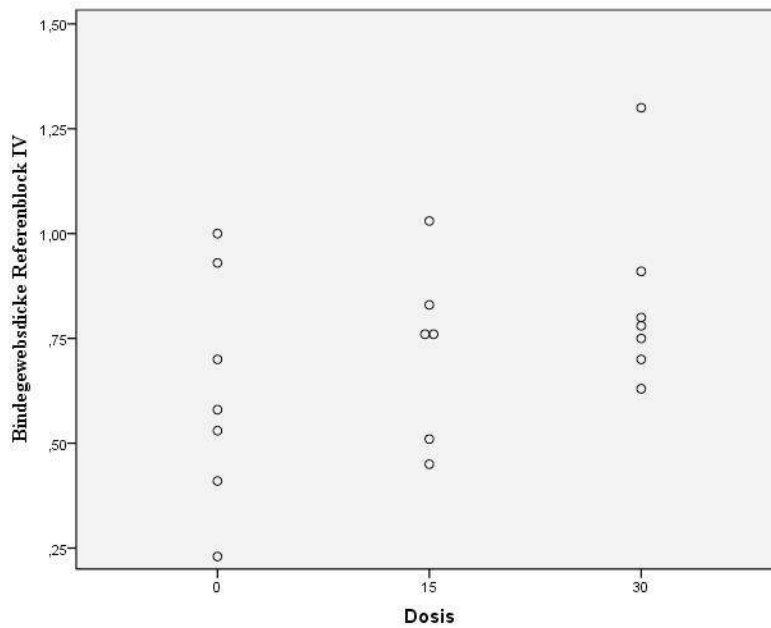


Diagramm 22: Bindegewebsdücker Referenzblock IV in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) und der Kontrollgruppe (0 Gray).

6.2.2. Vergleich aller Bindegewebsdücker

Im Folgenden wird mittels Boxplot ein Vergleich aller Bindegewebsdücker in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) angestellt.

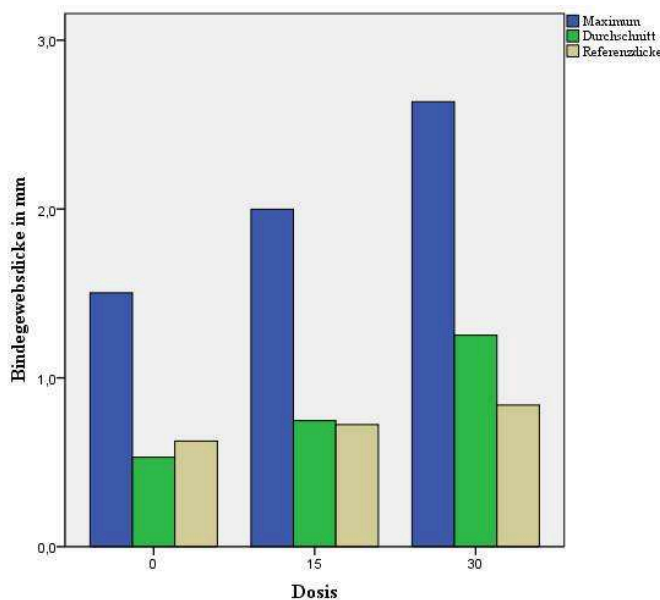


Diagramm 23: Das Diagramm zeigt die Werte aller Bindegewebsdücker in mm (blau: maximale Werte, Stenoseblock I; grün: durchschnittliche Werte, Stenoseblock I; grau: Referenzwerte Block IV) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. Kontrollgruppe (0 Gray).

6.2.3. Kollagene Fasern im Referenzblock

Die Ergebnisse beziehen sich auf die in Kapitel III.7.5.3. festgelegten Schemata zur Auswertung der Daten. Im Referenzblock IV liegen aufgrund einer Änderung in dem Zuschnitt nur 20 Präparate (W 101-W 130) vor.

- **Kollagene Fasern – Dosis**

Zwischen dem Parameter kollagenen Fasern im Referenzblock und den Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe besteht ein signifikanter Unterschied ($p=0,008$).

Parameter													Statistik	
Dosis in Gray	0 (n=7)				15 (n=6)				30 (n=7)				Dosis	
Median KFR	1,0 (0,0;2,0)				1,0 (1,0;1,25)				2,0 (2,0;3,0)				$p=0,008^*$	
Signifikanz	x								x				$p=0,004^*$	
Signifikanz					x				x				$p=0,014^*$	
Score KFR	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3		
n	3	1	3	-	-	5	1	-	-	-	-	4	3	
%	42,9	14,3	42,9	-	-	83,3	16,7	-	-	-	-	57,1	42,9	

Tabelle 26: kollagene Fasern Referenzblock (KFR): Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Tiere in die Scores elastische Fasern (0/1/2/3) und Dosisgruppen bzw. Kontrollgruppe mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.

Der Vergleich des Median zwischen der Kontrollgruppe und der 15 Gray Dosisgruppe zeigt, dass im Referenzblock außerhalb der Stenose eine Bestrahlung in der genannten Höhe den Gehalt an kollagenen Fasern nicht beeinflusst. Höhere Dosen wie die gewählten 30 Gray führen zu einer Vermehrung kollagener Fasern. Signifikanzen bestehen zwischen der Kontrollgruppe und der 30 Gray Dosis ($p=0,004$) und wie im folgenden Diagramm dargestellt zwischen den Dosisgruppen ($p=0,014$). In der 30 Gray Gruppe sind im Referenzblock kein Score 0 und Score 1 Score kollagene Fasern aufzufinden. Der Score 3 ist in der Kontrollgruppe und 15 Gray Gruppe nicht nachzuweisen. In der 15 Gray Gruppe haben 83,3 % der Tiere einen Score 1 kollagene Fasern.

Im Spearman Test besteht eine Korrelation zwischen den kollagenen Fasern im Referenzblock und den Dosisgruppen bzw. der Kontrollgruppe ($p=0,003$; $r=0,632$).

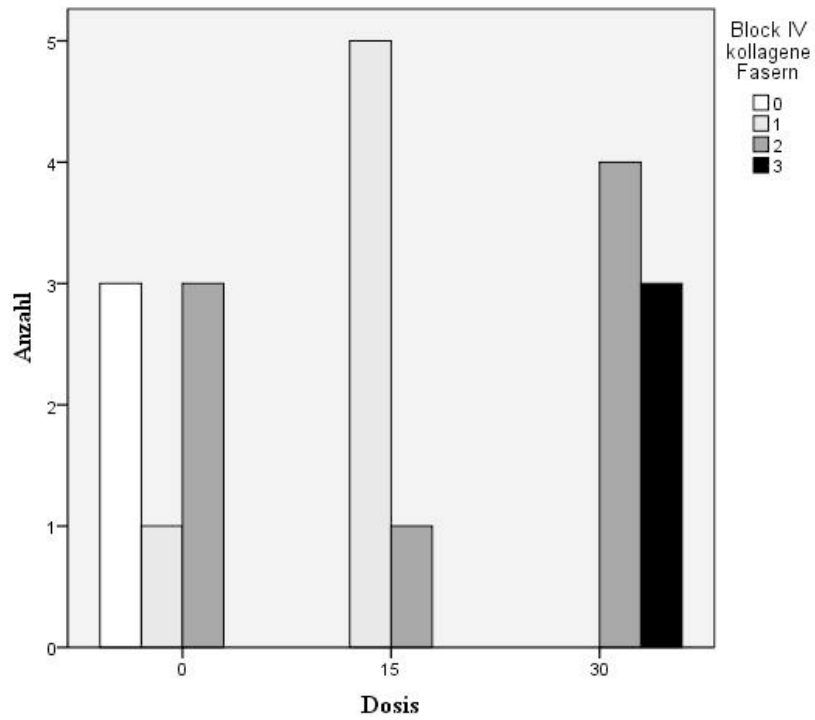


Diagramm 24: Vergleich der kollagenen Fasern in den Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. in der Kontrollgruppe (0 Gray)

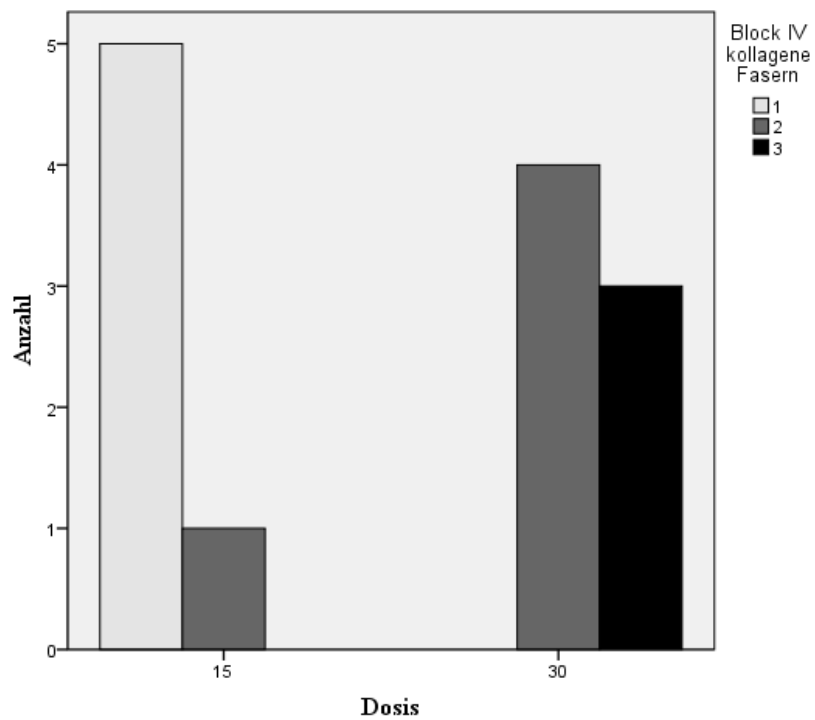


Diagramm 25: kollagene Faser: Vergleich der 15 und 30 Gray Gruppe ($p=0,005$)

Im Folgenden wird in einem Wolkendiagramm die Abhängigkeit der kollagenen Fasern von den Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) dargestellt:

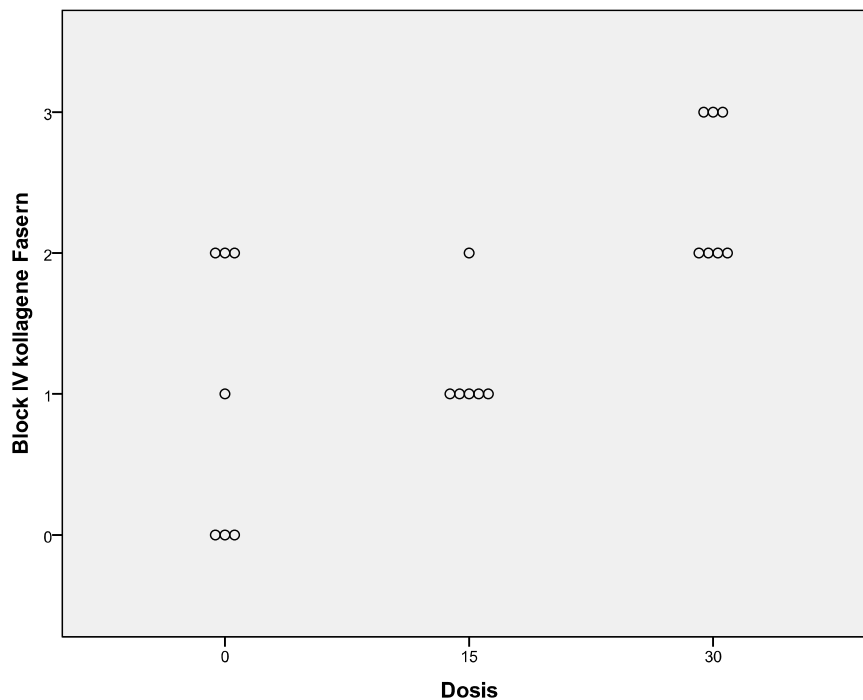


Diagramm 26: kollagene Fasern (0/1/2/3) aus Referenzblock IV in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,003$).

- **kollagene Fasern Stenoseblock I – kollagene Fasern Referenzblock IV**

Im Spearman Test besteht eine Korrelation zwischen den Parametern kollagene Fasern im Stenoseblock I und kollagene Fasern im Referenzblock IV ($p=0,033$; $r=0,477$)

6.2.4. Strahlenschäden im Referenzblock außerhalb der Stenose (Block IV)

Im Referenzblock IV (außerhalb des Stenosebereiches) wird aufgrund der Länge der Folie Strahlung in das Gewebe abgegeben. Für den Einsatz in eine klinische Folgestudie ist das Vorhandensein eines Strahlenschadens in dem gesunden Gewebe von großer Wichtigkeit. Der Schaden wird definiert durch pathologische Veränderungen an den Gefäßen (Strahlenvaskulopathie, Intimafibrose, Lumenverschluß) und verblindet ausgewertet. Von 20 Tieren haben 12 Tiere

einen sichtbaren Strahlenschaden, 8 Tiere haben keinen erkennbaren Strahlenschaden.

In der Kontrollgruppe ist bei 5 von 7 Tieren (71 %) kein offensichtlicher Schaden erkennbar. In der 30 Gray Gruppe ist bei 7 von 7 Tieren (100 %), in der 15 Gray Gruppe bei 3 von 6 Tieren (50 %) eine Intimafibrose nachzuweisen. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der 30 Gray Gruppe ($p=0,025$), eine Dosis in Höhe von 15 Gray hat keinen signifikanten Effekt auf den Parameter „Strahlenschaden“.

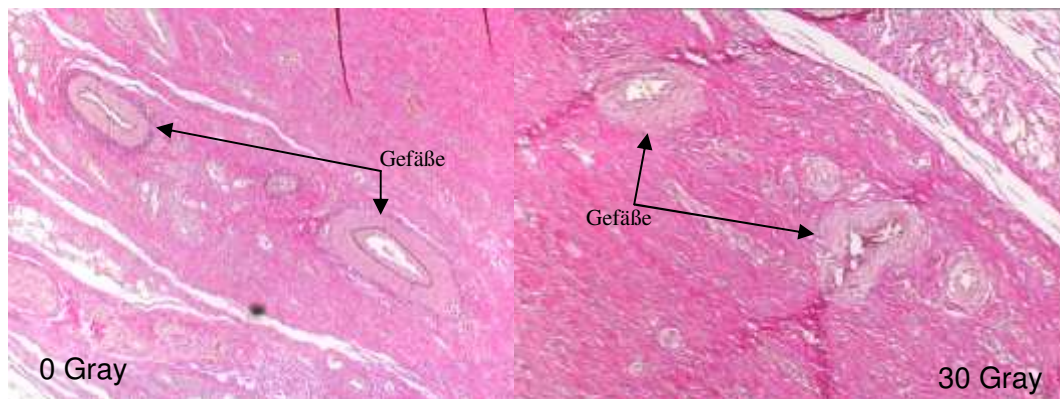


Abbildung 37: Strahlenschaden, links 0 Gray, rechts 30 Gray (Intimafibrose der Gefäße)

Im Folgenden ist im Wolkendiagramm die Abhängigkeit Strahlenschäden zu den Dosisgruppen und der Kontrollgruppe dargestellt.

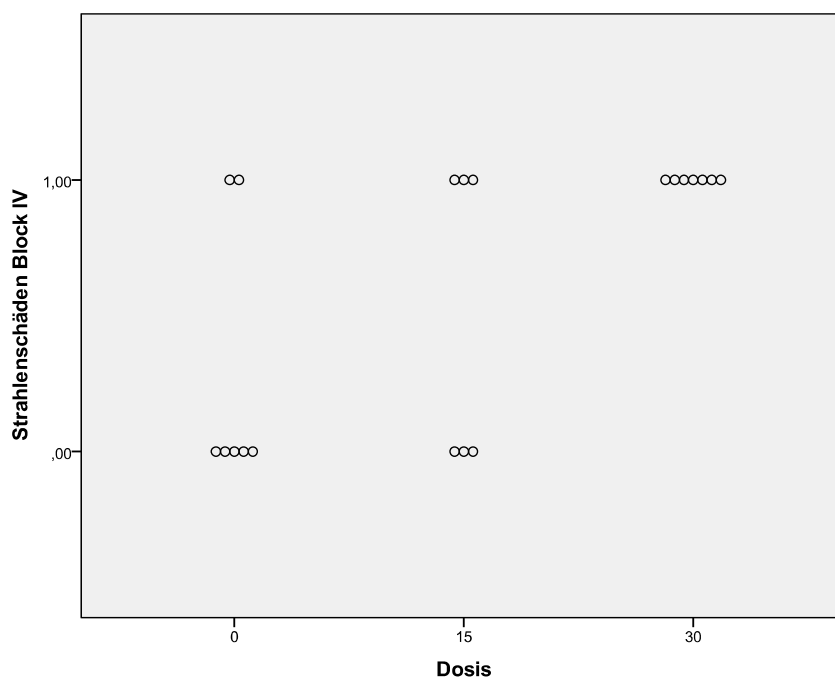


Diagramm 27: Strahlenschäden (0/1) aus Block IV in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,004$).

VI. DISKUSSION

1. Diskussion der Versuchsvorbereitung

1.1. Das radioaktive Implantat

1.1.1. Die Wahl der Strahlenquelle

Es existieren bedeutende Unterschiede in Bezug auf die Art der Strahlenquellen. Zu diesen gehören unter anderem die Halbwertszeit, die Energie und die daraus resultierende Dosisverteilung im Gewebe und die Eindringtiefe in das Gewebe. Bei der Wahl, ob man eine LDR- oder HDR-Brachytherapie vollzieht, muss man die jeweiligen Vor- und Nachteile gegeneinander abwägen. Eine HDR-Brachytherapie ist bei in der Nähe befindlichen strahlenempfindlichen Organen kritisch zu betrachten. Außerdem überdeckt diese bei einmaliger Applikation u. U. nicht ausreichend die kritische Wundheilungsphase. Die Bestrahlungsart muss von der Eigenschaft des Gewebes abhängig gemacht werden. Mitotisch aktivere Zellen sind strahlensensibler als Zellen mit niedriger Teilungsrate. Somit kann man sagen, dass z. B. Zellen der Darmschleimhaut oder des Knochenmarkes, aber auch Leukämiezellen wesentlich sensibler auf ionisierende Strahlung reagieren. Bei malignem Gewebe wird vermehrt eine fraktionierte Bestrahlung (HDR-Brachytherapie) aufgrund der gerade verlaufenden Dosisüberlebenskurve als Standardverfahren eingesetzt (Pötter, 2006, Manimaran, 2007). Die Höhe der Dosis beeinflusst das Zellsterben. Dabei kommt es auf den gegenwärtigen Zellzyklus der Zellen an: Befinden sich Zellen in der G1-Phase, sind sie strahlenresistenter als in der G2-Phase (Sauer, 2003).

Im BetaMod Projekt werden benigne Stenosen im Gallengang und in der Urethra behandelt. Hierfür wird eine protrahierte LDR-Brachytherapie gewählt, die für langsam teilendes Gewebe als sinnvoll zu erachten ist. Es wird ein Strahler mit einer kurzen Reichweite eingesetzt, um das umliegende Gewebe zu schonen. In der koronaren Brachytherapie kommen Gamma- und Betastrahler zum Einsatz. Vergleichsstudien zu deren Einsatz existieren in der Literatur nicht. Bei dem eingesetzten Betastrahler Phosphor-32 tritt in 6 mm Gewebetiefe keine Strahlenwirkung mehr auf. Laird et al. gibt an, dass 95 % der Strahlung bereits in den ersten 3-4 mm absorbiert werden (Laird et al., 1996).

Bisher gibt es keine vergleichbaren Studien zur Rezidivprophylaxe der benignen Gallengangsstenose. Die angewandte Low-Dose-Brachytherapie stellt eine sichere und geeignete Methode dar.

1.1.2. Das Target

Eine genaue Bestimmung des Targets kann den Schaden des umliegenden Gewebes reduzieren (Dormand et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit liegt das Target der Bestrahlung in 1 mm Gewebetiefe. Ein Vergleich der Studien wird erschwert, da in diesen unterschiedliche Angaben zum Target gemacht werden. Es wird oft mit 1 mm, häufig aber auch mit 2 oder 5 mm Gewebetiefe angegeben (Silber, 2002, Liu et al., 2009, Dietz et al., 2001). Um aber einen direkten Vergleich zwischen den Studien anstellen zu können, wäre das identische Target entscheidend. 1 mm Gewebetiefe liegt im Gallengang unterhalb der *Lamina propria*, in der *Lamina muscularis*. Aber durch die Koagulation und die daraus resultierende Schrumpfung des Gewebes ist ein genau definiertes und in allen Versuchstieren gleiches Target schwer zu realisieren. Es muss bedacht werden, dass bei einer Dosis von 15 bzw. 30 Gray in 1 mm Gewebe die Kontaktdosis an der Epitheloberfläche um ein Vielfaches höher liegt, bei ca. 80 bzw. 150 Gray liegt. Diese Höhe der Dosis muss bei einem eventuellen klinischen Einsatz bedacht werden.

1.1.3. Die Höhe der Dosis

Bei der Wahl der Strahlendosis richtet sich das BetaMod-Projekt nach den Erfahrungen der Kardiologie. In der Literatur werden Standarddosen von 20 Gray beschrieben, die zu einer signifikanten Reduktion der Stenosen führen (Dietz et al., 2001, Raizner et al., 2000). Andere Autoren empfehlen Dosen zwischen 14-26 Gray (Kaluza et al., 2001), 16-25 Gray (Baumgart et al., 2002) oder 15-25 Gray (Quast et al., 2002). Jedoch ist ein Vergleich dieser Studien schwierig, da oftmals die Zeitspanne nicht angegeben wird, in der die genannten Dosen appliziert werden. Außerdem kommen in diesen Studien verschiedene Radioisotope zum Einsatz (Silber, 2002). Ferner wird ein Vergleich der Studien erschwert, da oftmals nur die Aktivität der verschiedenen radioaktiven Stents in Curie und nicht die Dosis, das heißt pro Masse absorbierte Energie in Gray angegeben wird. Für den 8,5 F Stent (bestehend aus einer 5 cm langen Folie) ist eine Aktivität von 833 kBq für 15 Gray angegeben. Diese entsprechen einer

Aktivität von 2,24 μCi . ($0,83 \cdot 10^6 \text{ Bq} \cdot 2,7 \cdot 10^{-11}$) (persönliche Mitteilung PD. Dr. rer. nat. habil. W. Assmann). Guin-Jin He et al. beschreiben im Tierversuch bei 3,4 μCi nach 30 Tagen einen positiven Effekt zur Verhinderung einer Restenose im Gallengang (He et al., 2006). In der Kardiologie werden Studien beschrieben, die mit einer Aktivität von 1,5-3 μCi eine Reduktion der Neointima an Koronargefäßen des Schweines bewirken (Hehrlein, 2002).

In dieser Pilotstudie werden 2 verschiedene Dosen eingesetzt. Da es sich um eine explorative Orientierungsstudie handelt, werden 30 Gray verwendet, um die Grenze zu einer toxischen Dosis zu untersuchen. Sie spiegelt die negativen Auswirkungen einer Strahlentherapie wider. Die 15 Gray Dosis soll die positiven Wirkungen radioaktiver Strahlung untersuchen. Die applizierte Gesamtdosis ist auf eine Woche Liegedauer im Tierkörper berechnet. Die ersten Tiere (P-Reihe) des Versuches werden nach einem anderen Protokoll als die W-Reihe behandelt. In der P-Reihe wird der Stent nach einer Woche entfernt und gegen eine nicht-radioaktive Drainage ausgetauscht. Auf diese zusätzliche ERC mit ihren interventionellen Risiken und dem zusätzlichen Narkoserisiko wird in der W-Reihe zum Wohle der Tiergesundheit verzichtet. Das optimierte Studienprotokoll belässt den Stent insgesamt 21 Tage im Tierkörper. Die Gesamtdosis ist bei einer Liegedauer von 21 Tagen höher als bei 7 Tagen. Bei einer vorherigen Dosis von 15 Gray (0,09 Gray/h) bzw. 30 Gray (0,18 Gray/h) in einer Woche ist die Dosis, gerechnet auf die 21 Tage auf 33,3 Gray (0,06 Gray/h) bzw. 66,59 (0,13 Gray/h) Gray gestiegen. Das urologische Teilprojekt, welches eine benigne Strikturen der Harnröhre mittels Laserapplikation induziert und bei dem ebenso wie in der vorliegenden Studie das Ziel besteht, die Wundheilung durch eine lokale LDR-Brachytherapie zu modulieren, belässt den Katheter für eine Woche im Tierkörper (3 Gruppen, n=6, 0, 15 und 30 Gray). Da bei beiden Applikatoren (Stent/Katheter) von demselben logarithmischen Abfall des Phosphor-32 ausgegangen werden kann, wird in der ersten Woche dieselbe Dosis und dieselbe Dosis pro Zeit in das Gewebe abgegeben. Diese erste Woche (akute Phase) spielt eine entscheidende Rolle in der Wundheilung. Im Vergleich beider Arbeiten, die zu ähnlichen Ergebnissen führen, wird deutlich, dass die über die erste Woche hinaus zusätzlich applizierte Leistung einen niedrigeren Stellenwert bei dem Versuch einer Wundheilungsmodulation zu haben scheint (R. Becker, 2011). Da es sich bei diesem Vergleich jedoch um verschiedene Gewebearten handelt, ist ein

Übertrag der Ergebnisse von einem auf das andere Gewebe schwierig.

In der vorliegenden Studie werden 4 Tiere nach dem ersten Studienprotokoll (P-Reihe) behandelt und ausgewertet. 1-mal wurde ein 0 Gray Stent, 2-mal ein 15 Gray Stent und 1-mal ein 30 Gray Stent eingesetzt. Die histologischen Untersuchungen vor Entblindung zeigen im Vergleich zu den nach neuem Protokoll behandelten Präparaten keinen Unterschied hinsichtlich der erhöhten Gesamtdosis.

Da bisher keine Dosisfindungsstudien auf dem Gebiet der benignen Gallengangsstenosen existieren, kann durch diese explorative Orientierungsstudie nur eine Dosisengrenzung stattfinden. Einzelne Parameter betrachtend scheint die 15 Gray Dosis tendenziell die Dosis zu sein, unterhalb der möglicherweise positive Effekte entstehen, 15 Gray sollten nicht überschritten werden. Zusätzlich zeigt diese Arbeit den negativen Effekt einer radioaktiven Bestrahlung. In weiterführenden klinischen Studien muss das Dosisoptimum im niedrigeren Dosisbereich genauer eingegrenzt werden.

1.1.4. Der „Edge Effekt“

Dass der radioaktive Stent nicht weiter zur Verhinderung der Rezidivstenosenbehandlung in der Kardiologie eingesetzt wird, ist zum größten Teil auf den „Edge-Effekt“ zurückzuführen. Der „Edge-Effekt“ beschreibt eine überschießende Wundheilung, also eine Hyperproliferation des Gewebes (Albiero et al., 2000). Diese resultiert aus einer vorausgegangenen, wenn auch nicht immer sichtbaren Verletzung des Epithels oder tieferer Schichten, die sich im Bereich des Dosisabfalls am Ende der Folie befinden. Hier führen Gesamtdosen von ca. 2 Gray zu einer Anregung zur metabolischen Aktivität der Zellen. Der Edge-Effekt kann dadurch umgangen werden, dass die Folien über einen eventuellen Gewebeschaden hinausreichen (Hehrlein, 2002, Serruys and Kay, 2000). Die in den Vorversuchen verwendeten 3 cm langen PEEK-Folien werden im Hauptversuch gegen 5 cm (eine 3 cm, die andere 2 cm) lange PEEK-Folien ausgetauscht. Somit ist ein eventuell verletztes Areal keinem Dosisabfall ausgesetzt, und die radioaktive Folie reicht sicher über die Verletzung hinaus. Die Ballonlänge zur Dilatation der Stenose muss innerhalb dieser 5 cm langen Folie liegen.

1.1.5. Das Einsetzen eines radioaktiven Stents im Gallengang

Die Aktivierung der Folie kann zum größten Teil in Garching, Forschungsreaktor München 2 der TU München vollzogen werden. In 2 Fällen muss aufgrund von Wartungsarbeiten im Garchinger Forschungsreaktor auf den Forschungsreaktor Geesthacht 1, GKSS-Forschungszentrum, Geesthacht ausgewichen werden. Dies stellt keine Nachteile in der zeitnahen Aktivierung der Folien dar.

Die Strahlenbelastung des Personals ist als vernachlässigbar einzustufen. Plexiglasabschirmung und Plexiglaszylinder sind einfache Abschirmmethoden, die den Umgang mit der radioaktiven Strahlung in der klinischen Anwendung erleichtern. Mit den Strahlendosimetern wird keine erhöhte Strahlungsaktivität gemessen, was eine Übertragbarkeit in den humanmedizinischen Bereich möglich macht.

Das Handling der Schweine mit den radioaktiv beschichteten Stents stellt sich als weitestgehend unproblematisch dar. Es findet keine messbare Strahlung außerhalb des Tierkörpers statt, auch der Kot dieser Tiere strahlt nicht mehr als das Untergrundniveau. Ausgeschiedene Stents werden anhand eines Strahlendetektors sicher identifiziert und können so sachgerecht entsorgt werden. Am Anfang der Versuchsreihe wird der Kot der Tiere auf die Aktivität hin untersucht, später wird der Kot in Plastiktüten verpackt und durchleuchtet, um evtl. abgegangene Stents anhand der Röntgenmarkierung zu identifizieren.

Der Einsatz des radioaktiven Stents zeigt, dass die Aktivierung und das Handling dieser Strahlenquelle in der vorliegenden Studie komplikationslos möglich sind.

2. Diskussion der Versuchsdurchführung

2.1. Das Schwein als Versuchstier

Generell ist in einem tierexperimentellen Versuch die Frage zu klären, ob ein solcher Versuch nicht durch einen in-vitro Versuch ersetzt werden könnte, weiterhin ob eine Übertragung auf den Menschen erfolgen kann. Das chirurgische Problem in seiner drei-dimensionalen Komplexität kann sicher nicht in einem Zellversuch dargestellt werden. Die Strahlentoxizität der Radioaktivität im Gallengang ist bisher nicht bekannt und kann dementsprechend nicht in einem in-vitro Versuch durchgeführt werden. Zwar existieren bereits etablierte klinische Anwendungen der Strahlentherapie bei gutartigen Erkrankungen anderer

Organsysteme, da aber für die spezielle Einsatzform der Low-Dose-Rate Brachytherapie die Wirksamkeit und der Dosisbereich zur Behandlung von benignen Stenosen im Gallengang noch nicht nachgewiesen sind, sind vorausgehende Tierversuche notwendig.

Das Schwein mit seinem Gallengang von ähnlicher Größe (beim Menschen 6-7 cm lang, 4-8 mm weit), Funktion, Physiologie und Biochemie erweist sich als geeignetes Versuchstier und lässt eine Übertragbarkeit auf den Menschen zu. Aufgrund der anatomischen Ähnlichkeit des Gallengangs zwischen Mensch und Schwein ist es möglich, dass Gallengangstents aus der Humanmedizin zum Einsatz kommen. Juvenile Tiere haben den Vorteil, dass die Tiere noch relativ leicht und mit zwei Personen leicht zu handhaben sind. Die anatomischen Verhältnisse am Gallengang von ca. 3 Monate (ca. 45 kg) alten Schweinen unterscheiden sich kaum von 5 Monate (ca. 90 kg) alten Tieren. Wie bereits publizierte Versuche gezeigt haben, kann an Schweinen mit einem Gewicht von ca. 45 kg eine Stenoseinduktion im Gallengang erzielt werden (Rumalla et al., 2003). Auch Histologisch ist der Gallengang des Schweins dem des Menschen sehr ähnlich, was eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zulässt.

Aufgrund der schnellen Gewichtszunahme der verwendeten Schweine „Deutsche Landrasse“ und der daraus resultierenden Größenzunahme ist eine Versuchsdauer von 35 Tagen als maximaler Zeitraum zu wählen. Längere Follow-ups sind nicht möglich. Die Durchführung der Endoskopie wird schon aus rein materialtechnischen Gründen bei der enormen Größenzunahme schwierig, da die Maul-Magen-Distanz zunimmt und somit auch der endoskopische Totraum. Jüngere Tiere sind aufgrund des zu filigranen Gallengangs und aufgrund der Größe des Magens in Relation zur Flexibilität der Endoskopiespitze nicht geeignet (Franz, 2004). Für längere Versuchsreihen wären daher Minipigs geeigneter, da sie keiner so großen Größenschwankung unterliegen. Jedoch sind diese in ihrer Anschaffung erheblich teurer als die Schweine „Deutsche Landrasse“.

Die Gruppenhaltung kann in diesem Fall empfohlen werden. Weibliche und männliche Tiere können in einer Box gehalten werden. Das tägliche Handling der Tiere lässt sich nach einer anfänglichen Gewöhnungszeit der Tiere an den Menschen ohne Probleme und größeren Stress für die Tiere durchführen. Die für die Versuchsdurchführung erforderliche Vollnarkose der Schweine ist gut realisierbar, Nebenwirkungen der Anästhesie treten nicht auf.

2.2. Die Operation

2.2.1. Die Endoskopie

In den Vorversuchen zur Stenoseinduktion können hilfreiche Erfahrungen in Bezug auf die Vorbereitung des Schweins für eine Operation incl. der Endoskopie gesammelt werden. Zu Anfang besteht das Problem, dass die Sicht bei der Durchführung der Endoskopie aufgrund von Futterresten im Magen erschwert wird. Zur Abhilfe dieses Problems werden die Schweine anstatt auf Stroh auf Gummimatten eingestallt, um eine Kontrolle über die Futtermaufnahme gewährleisten zu können. Außerdem erhalten die Tiere 2 Tage vor dem Operationstag ausschließlich flüssige Nahrung in Form von Fresubin, 12 Stunden vor der Operation werden die Tiere nüchtern gehalten. Ein noch gefüllter Magen führt zum sofortigen Abbruch der Operation. Ein weiteres Kriterium für einen Abbruch der Operation ist eine zu starke, gesundheitsgefährdende Aufblähung des Abdomens aufgrund einer zu langen Endoskopiedauer. Hier wird ein Richtwert von maximal 45 Minuten Endoskopiedauer festgesetzt.

Trotz ähnlicher anatomischer Verhältnisse des Gallengangs bei Mensch und Schwein ist für einen erfahrenen Operateur ein intensives Endoskopietraining vonnöten. Schwierigkeiten hierbei bestehen zum einen in der Lageinstabilität des Endoskops. Um die endoskopische Untersuchung zu erleichtern, wird in erschwerten Fällen eine medikamentöse Ruhigstellung der Peristaltik mit einem Spasmolytikum (Buscopan) gewährleistet. Zum anderen liegt die biliäre Papille sehr proximal im Duodenum und ist aufgrund ihrer geringen Größe oft schwer zu finden. Der *Torus pylorus* kann zusätzlich die Endoskopie erschweren (Hochberger, 2004). Wiederholte endoskopische Untersuchungen am Tier stellten in dieser Studie kein Problem dar. Wie in der Arbeit von Franz et al. beschrieben, wird das Zeitintervall zwischen zwei Sitzungen durch die Verträglichkeit der Narkose bestimmt (Franz, 2004). Generell sollten solche Versuche immer durch ein und denselben Endoskopeur durchgeführt werden. Da dies aber aufgrund des zeitlichen Aufwands und klinischer Verpflichtungen nicht immer zu gewährleisten ist, werden die operativen Eingriffe von den 3 erwähnten Endoskopeuren durchgeführt. Allerdings war ein Endoskopeur (JS) bei fast allen Endoskopien anwesend, was die qualitative Kontinuität gewährleistete.

Eine typische Komplikation der Gallengangsstenose ist die eitrig-cholangitische Cholangitis.

Ursächlich dafür ist wie beim Menschen die Keimverschleppung aus dem Darm durch den Eingriff und die unzureichende Gallengangsdrainage. Dieses Risiko kann durch die Gabe von Antibiotika (Cefuroxim) während und nach der Operation (Ciprofloxacin) gesenkt werden.

2.2.2. Die Stenoseinduktion

In der Literatur sind nur sehr wenige Stenoseinduktionsmodelle im Gallengang beschrieben. Vorwerk et al. verwendet im Hundemodell einen Nd:YAG-Laser zur Erhitzung einer Metallspitze am Ende einer Faser (Vorwerk et al., 1989). Von einer Stenoseinduktion unter Verwendung einer Glasfaser wird in der vorliegenden Studie abgesehen, da es in zwei Fällen zu einem Bruch der Glasfasersonde kommt. Ein weiteres Modell wird von Rumalla et al beschrieben. Diese Arbeitsgruppe verwendet zur Stenoseinduktion eine mono-polare HF-Sonde mit einer Leistung von 6,8,10,12 W für 2 sec. Bei 5 von 7 Behandlungen resultiert eine Stenose innerhalb von spätestens 21 Tagen. Die induzierten Stenosen fallen jedoch geringgradig aus, was vermutlich auf die zu niedrig applizierte Leistung oder den ungenügenden Kontakt von Sonde und Gewebe zurückzuführen ist (Rumalla et al., 2003). Da keine weitere Literatur zur Stenoseinduktion im Gallengang existiert, wird in dieser Studie die Stenoseinduktion mithilfe der beschriebenen mono-polaren HF-Sonde induziert, jedoch wird die Leistung im Gegensatz zu der beschriebenen Studie deutlich höher angesetzt. An Gallengangsgewebe ex-vivo werden erste Versuche durchgeführt, um eine adäquate Leistung einzugrenzen. Der Hauptversuch wird mit einer Höhe von 60 Watt, 20 sec. gestartet. Vor Applikation der Hitze wird das Kontrastmittel und eventuell im Gallengang befindliche Flüssigkeit abgesaugt, um die thermische und die elektrische Leitfähigkeit zwischen Gewebe und Sonde zu gewährleisten. Dieser Energieeintrag stellt sich als zu hoch heraus, es resultieren 2 Perforationen aus 5 Behandlungen. Daraufhin wird der Energieeintrag auf 40 Watt, 20 sec. gesenkt: dies resultiert in einer Perforation bei 4 Anwendungen. Sukzessiv wird die Dosisleistung heruntersetzt, so dass man die 30 Tiere der W-Reihe mit einem Energieeintrag von 20 Watt, 5 sec. behandelt, von diesen 30 Tieren zeigen 4 Tiere eine Perforation.

Jedoch muss bedacht werden, dass aus einem geringeren Energieeintrag auch schwächer ausgebildete Stenosen resultieren. Somit steigt das Risiko, dass ein Stent vorzeitig abgeht, da ein Halt im Gallengang nicht gewährleistet ist. So kann

die Liegedauer nicht eingehalten werden. 5 von 30 Tiere, bei denen die Stenose mit 20 Watt, 20 sec. induziert wurde, können somit laut Protokoll nicht in den Versuch aufgenommen werden.

Dieses Projekt zeigt, dass die auf endoskopischem Weg induzierte Stenoseinduktion mit einer mono-polaren HF-Sonde ein geeignetes Modell ist, um reproduzierbare benigne Gallengangsstenosen zu induzieren. Applikationsdosen von 100 J (20 W, 5 sec) führen innerhalb von 14 Tagen zu Stenosen. Von den 24 im Versuch eingesetzten Tieren haben 11 Tiere am Tag 14 eine hochgradige Stenose (45,8 %), 11 Tiere eine mittelgradige und lediglich ein Tier (4,2 %) eine geringgradige Stenose. Bei einem Tier wird erneut eine Stenose induziert. Hierbei ist jedoch zu hinterfragen, wie sich eine erneute Stenoseinduktion auf das Gewebe und die Wundheilung auswirkt.

Das Verfahren kann mit standardisiertem Equipment durchgeführt werden, größere technische Probleme treten nicht auf. Ein chirurgischer Eingriff (z. B. eine Laparotomie, um eine Ligatur oder eine Kompression des Gallengangs zu ermöglichen) ist in der vorliegenden Studie zur Stenoseinduktion nicht notwendig. Durch die spannungsbegrenzte separate Einstellung von Leistung und Zeit ist ein definierter Energieeintrag in das Gewebe gewährleistet.

Das vorliegende erfolgreiche Stenoseinduktionsmodell am Schweinegallengang kann auch für andere Arbeitsgruppen eine Bereicherung sein. Bislang erfolgten die Beurteilungen oder die Erkundung neuer Stentmaterialien am nativen Gallengang. Dabei bestand häufig das Problem, dass die Stents keinen Halt im Gallengang hatten (Van Os et al., 1999). Mit diesem einfach zu handelnden und reproduzierbaren Stenosemodell könnten weitere Studien auf diesem Gebiet folgen und gelingen.

2.3. Die Überlebensrate

Generell ist die hohe Ausfallrate kritisch zu sehen. Bei dem Umfang dieser explorativen Orientierungsstudie einschließlich der Etablierung eines entsprechenden Stenoseinduktionsmodells im Schwein und dem neuartigen Einsatz einer radioaktiven Strahlenquelle in das Gallengangssystem wurde eine erhöhte Ausfallrate angesetzt.

Trotz der nicht erfolgten Stenteinlage in den Gallengang beschreiben Rumalla et al. in der Stenoseinduktions-Studie von 2003 keinerlei Komplikationen aufgrund

einer Cholestase oder Ähnlichem. Die geringe Komplikationsrate ist jedoch eher auf die geringgradige Stenoseausbildung in dieser Studie zurückzuführen (Rumalla et al., 2003). Die Ausfallrate aufgrund von Krankheit als Folge einer Perforation oder zu hochgradigen Stenosen kann wie oben beschrieben durch eine weitere Drosselung des Energieeintrages reduziert werden. Aufgrund der möglichen Komplikation eines endoskopischen Eingriffs (z. B. eitrige Cholangitis durch Keimverschleppung) werden die Tiere antibiotisch während und nach der Operation abgedeckt. Weitere Folgeerscheinungen einer Obstruktion oder Perforation der Gallengänge kann durch Gabe von Glucocorticoiden in den meisten Fällen eingedämmt werden. In der statistischen Auswertung ergibt sich kein Zusammenhang zwischen der Gabe von Dexamethason und einer histologisch relevanten Reduzierung der Entzündung.

Trotz der Behandlungsstrategien wie Antibiotika- oder Glucocorticoidtherapie ist der zeitliche Rahmen der Studie als maximal einzuordnen. Die Versuchsdauer von insgesamt 35 Tagen ist jedoch für die Betrachtung des Verlaufes der Wundheilung zeitlich sehr eng bemessen, wurde aber zur Schonung der Tiere nicht höher angesetzt.

3. Diskussion der histologischen Aufbereitung

3.1. Zuschnitt des Gewebes

Der Gallengang wird für die histologische Aufbereitung längs aufgeschnitten. Vorteil dieses Schnittschemas ist die direkte Aufsicht auf das Präparat und der vorherrschenden Gegebenheiten. So kann die Stenoseregion genau festgelegt und mit Pins markiert werden. Zudem gewinnt man durch diese Schnittführung eine weitere Messmethode, nämlich die Vermessung am makroskopischen Gallengang ex-vivo. Es werden 4 Blöcke aus dem Gewebe gewonnen. 3 Blöcke in der Stenoseregion und ein vierter aus dem definitiv unstenosierten, jedoch bestrahlten Bereich (Referenzblock IV). Der Vorteil des Stenoseblock I ist, dass man an ihm den Übergang von stenosierte zu nicht stenosierte Gewebe histologisch nachvollziehen kann. Der Referenzblock IV ist für eine eventuell weiterführende klinische Studie von enormer Bedeutung, da er gesundes Gewebe widerspiegelt, welches einer Bestrahlung unterliegt. So können die Nebenwirkungen einer Strahlentherapie untersucht werden.

Bei dieser Zuschnittsmethode wird auf einen zusätzlichen Parameter zur Quantifizierung der Stenose verzichtet. Wird der Gallengang quer zur Röhre aufgeschnitten, kann anhand eines computergesteuerten Messprogrammes der Umfang des Lumens bestimmt werden und aus diesem eine Stenosegradeinteilung vorgenommen werden. Jedoch stellt sich diese Methode des Zurechtschneidens als problematisch dar: es besteht die Gefahr, dass sich der Schnitt nicht 100 %ig in der Stenose befindet, da die Aufsicht auf die Stenose nicht gewährleistet ist. Es kann der Fall sein, dass Schnitte am proximalen oder am distalen Ende der Narbe ausgewählt werden, die nicht das Maximum der Stenose widerspiegeln. Außerdem findet die Messung nach Formalinfixierung und Alkoholentwässerung statt, die das Gewebe wie nachfolgend beschrieben schrumpfen lässt (R.Becker, 2011). Somit ist die in der vorliegenden Arbeit verwendete Schnittführung einem Röhrenschnitt zu bevorzugen.

3.2. Herstellung des Präparates

Bei der Herstellung der histologischen Präparate ist zu bedenken, dass das Gewebe in Ethanol entwässert wird. Alkohol lässt das Gewebe schrumpfen (ca. 10-15 %) und härten. Dieser Schritt ist aber notwendig, damit das Gewebe in Paraffin eingebettet werden kann. Paraffin ist ein homophobes Medium, würde sich also nicht mit einem wässrigen Medium (Lagerung und Fixierung in Formalin) mischen (Lang, 2006). Diese Nebenwirkung kann Einfluss auf die morphometrischen Ergebnisse nehmen.

4. Diskussion der statistischen Auswertung

Die Analyse der Daten muss unter dem kritischen Aspekt gesehen werden, dass eine geringe Fallzahl (3 Gruppen: 0 Gray; 15 Gray; 30 Gray; n=8) die Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen kann, jedoch ist die Gruppenstärke auf Grundlage von Fallzahlberechnungen korrekt gewählt. Nach dieser sind acht Tiere in jeder Gruppe erforderlich, um bei einer Standardabweichung von etwa 0.7 mm Gallengangweite einen Unterschied von wenigstens 1 mm auf einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ mit einer Power von wenigstens 0.8 zu erfassen. Unterschiede unter 1 mm werden bei dieser Fallzahlstärke nicht erfasst.

Die zu den jeweiligen Parametern vorgenommenen Korrelationen sind allerdings kritisch zu hinterfragen. So kann bei einer LDR-Brachytherapie nicht von einem linearen Effekt der Dosis-Wirkungsbeziehung ausgegangen werden, das heißt,

dass aufgrund einer doppelten Dosisapplikation kein doppelter Strahleneffekt folgt.

Betrachtet man die Auswertung nach den Stenosegrad-Gruppen muss berücksichtigt werden, dass in der Stenosegrad-Gruppe 0 5 Tiere, in der Stenosegrad-Gruppe 1 10 Tiere und in der Stenosegrad-Gruppe 2 9 Tiere zusammengefasst sind. Die gewonnenen Ergebnisse müssen somit hinsichtlich ihrer Aussagekraft kritisch hinterfragt werden. Andererseits war es auch nicht die primäre Intention der Studie, die histologischen Korrelationen einer Zunahme der Stenose zu untersuchen.

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1. Diskussion der Stenosecharakterisierung anhand der Kontrastmitteldarstellung

Diese Messmethode birgt den Vorteil, dass sie die einzige der drei erwähnten ist, die den Verlauf der Stenoseentwicklung zeigt. Die Ergebnisse von Tag 14 zu Tag 35 zeigen den Erfolg der Behandlung. Sie spiegelt eine Methode wider, die bei der klinischen Bestimmung zur Stenosequantifizierung beim Menschen eingesetzt wird. Nachteil dieser Methode ist die Ungenauigkeit der Messung aufgrund einer Überdehnung durch Kontrastmittel oder einer flauen Kontrastmitteldarstellung. Störend können auch projektionsbedingte Artefakte sein. In der vorliegenden Studie wird nur eine Ebene angefertigt (*ventro-dorsal*), eine zweite Ebene würde weitere Informationen zum Ausmaß der Stenose geben ist aber aus technischen Gründen nicht möglich. Innerhalb der Messmethoden (radiologisch, makroskopisch, histologisch) bestehen Unterschiede bzgl. des Stenosegrades. Der radiologische Durchmesser am Tag 35 korreliert allerdings höchstsignifikant mit dem makroskopischen inneren und äußeren Durchmesser, nicht aber mit dem histologischen Stenosegrad (= der Bindegewebsfläche).

Durch die HF-Koagulation werden in allen Gruppen signifikante Stenosen induziert ohne Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Die Ballondilatation mit anschließender Drainage führt in der Kontrollgruppe zu einer signifikanten Besserung der Stenose. Dies wird sowohl anhand des absoluten Stenosedurchmessers deutlich als auch anhand der prozentualen Stenose, die auch die prästenotische Dilatation des Gallengangs berücksichtigt. Allerdings verbleibt

auch nach Dilatation eine signifikante Rest-Stenose im Vergleich zum Tag 0 vor Stenoseinduktion. Dies verdeutlicht und bestätigt die klinische Situation beim Menschen, dass Gallengangsstenosen durch einmalige Dilatation und Drainage nicht behebbar sind.

Die LDR-Brachytherapie mit 30 Gray verhindert eindeutig den Behandlungserfolg der Ballondilatation: trotz Dilatation ändert sich die Stenose nur marginal und die meisten Tiere behalten mittelgradige und hochgradige Stenosen.

Die LDR-Brachytherapie mit 15 Gray verbessert nicht den Behandlungserfolg der Dilatation. Allerdings wird der Dilatationserfolg im Gegensatz zur 30 Gray Dosis nicht behindert: auch unter 15 Gray verbessert die Ballondilatation die Stenose deutlich, der Stenosediameter nimmt im Mittel um 1 mm zu ($p=0,067$).

In der aktuellen Studie wird somit keine Strahlendosis gefunden, die den Erfolg der Dilatationsbehandlung verbessert und die Rezidivstenose verhindert. Während 30 Gray die Situation verschlechtert, haben 15 Gray kaum Effekt. Zukünftige Studien sollten bevorzugt eine Strahlendosis unter 15 Gray untersuchen.

5.2. Diskussion der Stenosecharakterisierung anhand des makroskopischen Gallengangspräparats

Vorteil dieser Messmethode ist im Gegensatz zu der radiologischen Kontrastmitteldarstellung die projektionsunabhängige Vermessung des Gallenganges. Sie kann direkt nach der Explantation stattfinden und gibt unter anderem den Parameter „Abstand Papille – Stenose“ wider, der nur bei dieser Vermessungsmethode sichergestellt werden kann und die Reproduzierbarkeit der Stenoseinduktion dokumentiert. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist die Vermessung der Stenose noch vor der Formalinfixierung und Alkoholbehandlung, was zu Schrumpfungsprozessen führt. Nachteil dieser Methode am längs-eröffneten Präparat ist die nicht genaue Abgrenzbarkeit des wahren Lumens. So werden zwei Durchmesser angegeben: zum einen der innere Durchmesser, der zwischen der Verdickung der Wandung vollzogen wird und zum anderen der äußere Durchmesser, der die gesamte Breite des Gallenganges in der Stenose beschreibt.

Die makroskopische Vermessung des Gallengangs ist wie die histologische Auswertung eine Momentaufnahme von Tag 35. Zwischen den Dosisgruppen bzw. der Kontrollgruppe bestehen keine Signifikanzen. Betrachtet man hingegen

die Mittelwerte des inneren Durchmessers der Stenose ist in der Kontrollgruppe tendenziell der weiteste Durchmesser nachzuweisen. Die Bestrahlung in Form der 30 Gray Dosis zeigt im Gegensatz zu 15 Gray den negativen Einfluss radioaktiver Strahlung auf die Gallengangsstenose. Das Gewebe ist in diesem Fall mutmaßlich stärkeren Zugkräften ausgesetzt. Der innere Durchmesser der Stenose ist enger. Die Wundheilung ist ein multifunktionaler Prozess. Sobald keine Zugbelastung mehr auf der Wunde liegt und somit die mechanische Belastung abnimmt, gehen die Myofibroblasten durch Apoptose zugrunde. Myofibroblasten sind maßgeblich an der Bildung von Kollagenen beteiligt, welche wiederum die Festigkeit einer Narbe ausmachen (Hinz, 2007). Im Folgenden werden die beteiligten Faktoren der Narbenbildung eingehend diskutiert. Die Länge der Stenose fällt in der 30 Gray Gruppe ausgeprägter aus als in den beiden anderen Gruppen mit 15 und 0 Gray. Die makroskopische Vermessung der Länge stimmt allerdings nicht mit der radiologischen Auswertung der Länge am Tag 35 überein. Von den beiden Messmethoden ist die makroskopische der radiologischen Methode vorzuziehen, da bei dieser die erwähnte direkte Aufsicht auf das Präparat gewährleistet ist.

Die Stenose wird bei den 24 Tieren im Mittel 28 mm entfernt von der Papille induziert. Sie ist in ihrer Lage stabil und somit ist das gewählte Induktionsmodell auch in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Stenosehöhe als geeignet anzusehen.

5.3. Diskussion der Ergebnisse der Blutwerte

Im Punktediagramm der Werte des Tags 14 zeigt sich, dass die Bilirubinwerte bei höheren Stenosegraden erhöht sind. Davon kann bei einer Obstruktion der Gallengänge ausgegangen werden (Khan et al., 2005). Erst am Tag 14 wird die Stenose mit der Einlage einer Drainage behandelt.

Rumalla et al. beschreibt, dass 1 von 9 Tieren eine Cholestase entwickelt hat. Die Bilirubinwerte stiegen innerhalb von 21 Tagen von 0,3 mg/dl auf 3,7 mg/dl. Dieses Tier wurde mit der höchsten applizierten Energie von 15 J koaguliert (Rumalla et al., 2003). Nach Induktion der Stenose steigt das Serum-Bilirubin in allen Gruppen um den Faktor 3 bis 4 an. In der Kontrollgruppe und unter 15 Gray bewirkt die Ballondilatation der Stenose eine deutliche Reduktion des Bilirubins. Hingegen nimmt das Bilirubin in der 30 Gray-Gruppe auch nach Dilatation und Drainage sogar zu. Da das Bilirubin die Effizienz der Stenosebehandlung

widerspiegelt, zeigt auch dieser Parameter die Effizienz der Behandlung auch unter 15 Gray LDR-Brachytherapie. Die 30 Gray-LDR führt hingegen zu einem schlechteren Ergebnis.

5.4. Diskussion der morphometrischen Ergebnisse

5.4.1. Bindegewebsdicke: Messung im Stenoseblock I

Die Dicke des Bindegewebes und die Stenosefläche werden mithilfe des Messprogrammes DatInfMeasure technisch erfolgreich ausgemessen. Die Bindegewebsmessungen im Stenoseblock I sind wichtig für die Beurteilung des Einflusses einer LDR-Brachytherapie auf stenosiertes Gewebe.

Die Übereinstimmung zwischen der Dicke des Bindegewebes und der Stenoseflächenberechnung bedeutet, dass durch die jeweiligen Messmethoden eine zuverlässige Aussage bzgl. der Stenosegradeinteilung getätigt werden kann. Die Bindegewebsdicke korreliert mit den Stenosegraden.

Der bei He et al. beschriebene Effekt, die Bindegewebsdicke im stenosierten Gallengang mit Hilfe eines mit Palladium-106 versehenen Stents innerhalb 30 Tagen zu senken, lässt sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen (He et al., 2006). Die maximale Bindegewebsdicke ist unter der 30 Gray Dosis im Vergleich zur Kontrollgruppe und 15 Gray Gruppe sogar signifikant erhöht. Dies belegt die schädigende Wirkung der 30 Gray Dosis. Die LDR-Brachytherapie mit 15 Gray führt jedoch zu keinem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe, das heißt, dass eine Strahlendosis von 15 Gray nicht zu einer Zunahme des Bindegewebes führt. Die Bindegewebszunahme ist ein multifaktorieller Prozess. Generell ist eine Zunahme des Bindegewebes auf die Umbauprozesse während der Wundheilung und auf die resultierende Narbenbildung zurückzuführen. Kollagene, gebildet von Fibroblasten, sind die Hauptkomponenten in diesem Gewebe (Dormand et al., 2005). Diese und weitere Komponente, die zu einer Zunahme des Bindegewebes führen und der eventuelle Einfluss der LDR-Brachytherapie auf diese Komponente werden im Folgenden diskutiert.

5.4.2. Stenosefläche

Die quantitative Stenosefläche wird zusätzlich für die Einteilung in semiquantitative Stenosegrade genutzt. Bei dieser Festlegung der Stenosefläche besteht eine Schwankungsbreite, da nicht immer eine genaue Abgrenzung von

stenosiertem zu nicht-stenosiertem Bereich festgelegt werden kann. Hochgradige Stenosen lassen sich aufgrund der ausgeprägten Fibrosierung des Gewebes eindeutiger von nicht stenosiertem Gewebe abgrenzen, der Übergang des fibrosierten Bindegewebes ist bei einer geringen Stenosegradausprägung oft nicht eindeutig festzulegen.

In der statistischen Analyse besteht keine Signifikanz zwischen der Stenosefläche und den Dosisgruppen bzw. der Kontrollgruppe. Betrachtet man hingegen die einzelnen Mittelwerte der Stenoseflächenberechnung wird deutlich, dass die 15 Gray Gruppe die geringste Fläche aufweist. Dies liegt darin begründet, dass nach Entblindung 3 Tiere der 15 Gray Gruppe zufälligerweise eine Stenosefläche von 0 mm² haben, da sich keine eindeutige Stenosefläche abgrenzen lässt. Der erhöhte Mittelwert der 30 Gray Gruppe spiegelt das Ergebnis der Bindegewebsmessungen wider und zeigt den schädigenden Einfluss der LDR-Brachytherapie. Die Gewebezunahme beruht auf einem Zusammenspiel mehrerer Faktoren, u.a. resultiert sie aus der Ausbildung einer Fibrose, die durch eine vermehrte Bildung und Anreicherung kollagener Fasern entsteht. Aufgrund der kontraktilen Eigenschaften des Kollagens entsteht die Narbe und somit die Stenose (Tang et al., 1994). Im Folgenden werden die einzelnen Parameter diskutiert, die zu der vermehrten Kollagensynthese und dementsprechend zur Entstehung einer Stenose beitragen. Der Einfluss der LDR-Brachytherapie auf diese Parameter wird aufgezeigt.

5.5. Diskussion der histologischen Ergebnisse

Nachfolgend werden die histologischen Ergebnisse diskutiert. Dabei ist festzuhalten, dass aus der Literatur keine Scores abzuleiten sind, die die ausgewählten Parameter im Gallengang beschreiben. Ein histologisches Scoresystem ist unabdingbar, um die Auswertungen miteinander vergleichen zu können und sie statistisch darzustellen. Mit Unterstützung durch das Pathologische Institut der LMU München, Campus Großhadern, legt man nach mehrmaliger Durchsicht der Präparate die semiquantitativen Scores für die einzelnen Parameter fest. Nachteil dieses Scoresystems besteht darin, dass die Einteilungen subjektiv getroffen werden. Weiterfolgende histologische Untersuchungen von unabhängigen und verblindeten Gutachtern könnten die Aussagekraft des in dieser Arbeit verwendeten semiquantitativen Scoringsystems untermauern.

5.5.1. Fibrosegrad

Als eine Fibrose wird eine Kollagenfaservermehrung im Gewebe bezeichnet. Bei der hier vorliegenden Fibrose handelt es sich um eine sekundäre Fibrose. Sie wird durch exogene Noxen wie in dem vorliegenden Fall durch Koagulation des Gewebes oder eine Bestrahlung ausgelöst. Es erfolgt eine vermehrte Ansammlung kollagener Fasern in diesem Bereich (Wynn, 2008). Tang et al. untersucht die Zellpopulation im ligierten Gallengang. In der entstandenen biliären Fibrose kann eine Umwandlung der Fibroblasten in Myofibroblasten festgestellt werden, was zu einer Zunahme der extrazellulären Matrix führt (Tang et al., 1994). Das besagt, dass schon die alleinige Ligatur und somit die benigne Schädigung des Gallenganges zu einer Fibrosierung des Gewebes führt, welches mit den gewonnenen Ergebnissen übereinstimmt, die Kontrollgruppe weist gegenüber den Dosisgruppen den geringsten Fibrosegrad auf. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der 30 Gray Gruppe ist signifikant. Das bedeutet, dass die alleinige Stenoseinduktion mit der Einlage eines nicht-radioaktiven Katheters zwar zu einer Fibrosierung führt, jedoch mit geringer Ausprägung. Es kann also spekuliert werden, ob die LDR-Brachytherapie in Kombination mit einer zuvor gesetzten Verletzung einen Einfluss auf das Ausmaß der Fibrose hat. Die Tatsache, dass zwischen der Kontrollgruppe und der 30 Gray Gruppe eine Signifikanz besteht, jedoch nicht zwischen der Kontrollgruppe und der 15 Gray Gruppe, zeigt, dass auch die Höhe der Strahlung Einfluss auf den Fibrosegrad nimmt. Die 30 Gray Dosis demonstriert eine zu hoch applizierte Dosis auf das Gallengangsgewebe bei vorheriger Stenoseausbildung. Künftige Untersuchungen müssen zeigen, ob zwischen 0 und 15 Gray die gewünschte Dosis liegt, die zu einer Reduzierung der fibrosebeeinflussenden Faktoren führt.

Eine weitere Ursache der Fibrose stellt die strahlenbedingte Endothelschädigung dar. Durch den Austritt von Blutplasma in die Gefäßwände und einer entzündlichen Immunreaktion mit Einwanderung von Lymphozyten in das Gewebe wird dieses geschädigt (Trott, 2008b). Die Ergebnisse der Strahlenschäden aus dem Stenoseblock I zeigen, dass bei 75 % der Tiere, die bestrahlt wurden, ein Strahlenschaden nachzuweisen ist. Das heißt, dass im bestrahlten Gewebe aufgrund der Gefäßverletzungen eine Fibrose entstehen kann.

Die strahleninduzierte Differenzierung von Myofibroblasten in postmitotische Fibrozyten ist ein entscheidender Faktor in der Ausbildung einer Fibrose. Die

aktivierten Fibrozyten exprimieren vermehrt Kollagene, die zu einer Zunahme des Bindegewebes führen (Herskind et al., 2000, Dormand et al., 2005). Der erhöhte Anteil der α -SMA und kollagene Fasern in den bestrahlten Präparaten bestätigt dies und wird nachstehend diskutiert.

Makrophagen nehmen nicht nur an der Entzündungsreaktion im Gewebe und an der immunologischen Reaktionen teil sondern spielen auch eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer Fibrose (Geng et al., 2005, Xu et al., 2003). TGF- β spielt eine Schlüsselrolle als Modulator dieses und weiterer zellulärer Prozesse wie die Aktivierung spezifischer Cytokine und Wachstumsfaktoren, die ebenfalls ursächlich für die Ausbildung einer Fibrose sind (Rodemann and Bamberg, 1995a, Rodemann et al., 1996, Desmouliere et al., 2005). In den mit 30 Gray bestrahlten Präparaten ist eine erhöhte Entzündungsrate festzustellen, welche ebenfalls im Folgenden diskutiert wird.

Für eine weiterführende Dosisfindungsstudie ist die Aussage Rubins entscheidend: radioaktive Bestrahlung ist paradoxerweise in der Lage, eine Fibrose zu verhindern und zu induzieren (Rubin et al., 1999). Die 30 Gray Dosis fördert signifikant die Fibrose, die 15 Gray Dosis tendenziell. Für zukünftige Untersuchungen sollten 15 Gray unterschritten werden.

5.5.2. α -SMA Färbung

α -SMA wird von Myofibroblasten gebildet und dient als Marker zum histologischen Nachweis der Myofibroblasten. Eine Kontraktion der Wunde ist ein gewöhnliches und notwendiges Ereignis bei der Heilung einer Wunde im Gallengang. Myofibroblasten spielen dabei eine wichtige Rolle: Fibroblasten werden bei der normalen Wundheilung zu Myofibroblasten umgewandelt. Diese ermöglichen die Expression von Kollagenen. Ist die Wundheilung abgeschlossen, treten Rückkopplungsmechanismen in Kraft, die die Aktivität der Myofibroblasten herunterfahren und zur Apoptose führen. Funktioniert dieser Rückkopplungsmechanismus nicht, kommt es zu einer dauerhaften Myofibroblastenaktivität (Martin et al., 2000). Je mehr SMA im Gewebe nachzuweisen ist, desto stärker ist die Kontraktur (Tomasek et al., 2002).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kontrollgruppe mit 0,5 die geringste Menge an α -SMA aufweist. Die Dosisgruppen liegen mit 2 bzw. 3 deutlich über der Kontrollgruppe, dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Die 30 Gray Gruppe

unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe, was erneut die schädigende Wirkung der hohen Strahlenapplikation demonstriert. Zwischen der Kontrollgruppe und der 15 Gray Gruppe besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Das besagt, dass durch die angewendete LDR-Brachytherapie eine Reduzierung der Myofibroblasten nicht erreicht wird. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe He et al. Sie postuliert eine Senkung der α -SMA Expression nach der Behandlung (30 Tage) einer benignen Gallengangsstenose mit Palladium-103 gegenüber einer Kontrollgruppe. Durch die Bestrahlung konnte in diesem Fall die Myofibroblastendifferenzierung verhindert werden. Sie bewirkte die Apoptose der Myofibroblasten und somit die Verhinderung der Restenosierung des Gallengangsgewebes. Jedoch wird in dieser Studie nicht die Höhe der Dosis sondern nur die Aktivität angegeben, die einen Vergleich zu der vorliegenden Studie nicht zulässt (He et al., 2006).

Fibroblasten differenzieren sich in in-vitro Versuchen an humanem Bindegewebe bei Dosen von >5 Gray innerhalb von ca. 21-25 Tagen nahezu vollständig zu irreversibel postmitotischen Fibrozyten. Diese Zellen produzieren vermehrt Kollagen. Dies bestätigt zum einen die Arbeitsgruppe von Rodemann (Bumann et al., 1995, Rodemann and Bamberg, 1995a, Burger et al., 1998, Herskind et al., 1998, Hakenjos et al., 2000), zum anderen die Arbeitsgruppe von Begg (Russell et al., 2000, Lara et al., 1996). Das Zell-Kompartiment der Fibroblasten lässt sich wie bereits beschrieben zum einen in das Progenitorzellkompartiment und zum anderen in das Funktionskompartiment unterscheiden. Postmitotische Funktionsfibrozyten (PMF) entstehen einerseits durch terminale Differenzierungsteilung aus den Progenitorfibroblasten MF III, andererseits aus einer Differenzierungsteilung des Progenitorfibroblasten MF II zu MF III. Bei dieser Teilung entwickeln sich unterschiedliche Anteile der Myofibroblasten, die durch die Expression des α -SMA charakterisiert werden können (Rodemann, 2006) (Rodemann 2011, persönliche Mitteilung). Diese Myofibroblasten halten sich in Abhängigkeit des gewebespezifischen physiologischen oder pathophysiologischen Status im Gewebe auf, bis sie in das terminale Stadium der postmitotischen Funktionsfibrozyten übergehen. Die Ausdifferenzierung in das terminale Stadium ist deutlich dosis-und vermutlich auch dosisratenabhängig. Nicht veröffentlichte Befunde der AG Rodemann zeigen, dass niederdosierte Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (0,2-1,0 Gray) das Auftreten von

Myofibroblasten minimieren kann (Rodemann, 2006). Strahlenexpositionen im Hochdosisbereich (>10 Gray) steigern den Anteil von Myofibroblasten und deren Verweildauer bis zum Differenzierungsschritt in die postmitotischen Funktionsfibrozyten (Rodemann 2011, persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Myofibroblasten am Tag 35 im Gewebe nachzuweisen sind. Dies könnte durch das strahleninduzierte Differenzierungsgeschehen der Progenitorfibroblasten (MF) zu den postmitotischen Funktionsfibrozyten (PMF) zurückzuführen sein. Die in dieser explorativen Orientierungsstudie angewendete Strahlenexposition liegt im Hochdosisbereich (15/30 Gray). Da sich die Kontrollgruppe signifikant von den Dosisgruppen unterscheidet, kann tendenziell von einer Einflussnahme der Bestrahlung auf den Myofibroblastengehalt ausgegangen werden. Brenner et al beschreibt, ebenfalls in einer in-vitro Studie, dass die Brachytherapie nicht die gesamte Population der glatten Muskelzellen eliminiert. Bei einer Dosis von 8-13 Gray überleben 0,01-1 % der Zellen. Diese besitzen das Potential, zu einem späteren Zeitpunkt eine Restenose herbeizuführen. Jedoch muss der Vergleich zwischen den in-vitro Studien und der hier vorliegenden in-vivo Studie kritisch gesehen werden, da man nicht ohne weiteres von in-vitro Studien auf die Komplexität der verschiedenen Einflussfaktoren eines Organismus schließen kann.

Wie sich ein längerer Nachbeobachtungszeitraum auf den Anteil der Myofibroblasten im Gewebe auswirkt, ist nur schwer vorauszusagen. Dass jedoch ohne eine zusätzliche Strahleneinwirkung der Myofibroblastengehalt im Gewebe erhöht ist, belegen auch andere Studien. Geng et al. postuliert, dass der Myofibroblastengehalt 3 Wochen nach einer Verletzung des Gallenganggewebes ohne zusätzliche Strahleneinwirkung am höchsten ist und über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten wird (bis zu 6 Monate) (Geng et al., 2005).

Welchen Einfluss die Bestrahlung in bereits entzündlich infiltriertem Gewebe auf die SMA-Expression hat, ist bislang nicht vollständig geklärt. TGF- β , welches eine zentrale Rolle in der Entzündungskaskade inne hat, ist ebenfalls maßgeblich an der Umwandlung der Myofibroblasten beteiligt (Hinz et al., 2001b, Velnar et al., 2009). Für nachfolgende Studien wäre es von Interesse, das inflammatorische Cytokin TGF- β 1 zu bestimmen, welches Rückschlüsse auf die ablaufende Phase der Wundheilung geben könnte (Berndt et al., 1995, Desmouliere et al., 2005).

Auch ist der Einfluss der mechanischen Reizung, in diesem Falle die Ballondilatation der Stenose am Tag 14, auf die eventuell noch nicht abgeschlossene Wundheilung nach der Stenoseinduktion und insofern auf das Ausmaß der Myofibroblasten, nicht vollständig geklärt (Trott, 2008a).

Die Verhinderung der Narbenbildung durch eine gezielte antiproliferative Bestrahlung in Form einer LDR-Brachytherapie ist unter anderem ein Ziel dieser präklinischen Studie. Die Ergebnisse zeigen, dass die Gesamtdosis, die Dosisrate und die Dauer der Strahlenbehandlung für den Einsatz zur Behandlung benigner Gallengangsstenosen noch gefunden werden muss. 30 Gray zeigen die toxische Eigenschaft der Bestrahlung, jedoch führen die gewählten 15 Gray ebenfalls nicht zu dem gewünschten Rückgang der Myofibroblasten. Eventuell kann nach einer längeren Nachbeobachtungszeit (wie bereits in der Literatur beschrieben wenigstens 6 Monate nach Stenoseinduktion) und einer geringeren Dosis als 15 Gray eine zuverlässige Aussage über die erfolgte Wundheilung getroffen werden und somit der Bestrahlungserfolg nachgewiesen werden.

5.5.3. Kollagen

Dieser Parameter steht in einem engen Zusammenhang zu den zwei bisher diskutierten Parametern: dem Fibrosegrad und der α -SMA Färbung, die den Gehalt der Myofibroblasten widerspiegelt. Eine vermehrte Ansammlung von Myofibroblasten führt zu einer vermehrten Kollagenanreicherung im Gewebe, welche schließlich in einer Fibrose mündet (Denham and Hauer-Jensen, 2002).

Die Ausbildung der kollagenen Fasern ändert sich signifikant mit der Brachytherapie und die nimmt signifikant zu mit den Stenosegraden. Wiederum ist bei diesen Ergebnissen festzustellen, dass in der 30 Gray Gruppe im Gegensatz zu der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Kollagenanreicherung im Gewebe nachzuweisen ist. Dies belegt erneut die schädigende Wirkung der erhöhten Dosis. Die 15 Gray Gruppe zeigt die geringste Kollagenansammlung im Gewebe, die Kontrollgruppe liegt gering (nicht signifikant) über diesem Wert. Da jedoch eine vermehrte Ansammlung von α -SMA nachweislich zu einer vermehrten Kollagenexpression führt und die α -SMA Expression in der 15 Gray Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ist, liegen die Effekte von der 15 Gray Dosis im Bereich der Ungenauigkeit des semiquantitativen Nachweises.

Der Anteil kollagener Fasern steigt auch ohne Strahleneinwirkung

pathologischerweise im Gallengang aufgrund einer vorausgegangenen Verletzung (Geng et al., 2005). In der Gallengangsfibrose ist nach Tang et al. die Ausprägung von Kollagen Typ I in dem fibrotischen Gebiet auffällig (Tang et al., 1994). Weitere immunhistochemische Kollagenanfärbungen können zu einer Unterscheidung der in dem stenosierten und bestrahlten Areal vorhandenen Kollagentypen führen.

5.5.4. Elastische Fasern

Bei der Betrachtung der elastischen Fasern wird deutlich, dass weder die Bestrahlung noch das Ausmaß der Stenose einen Einfluss auf die Ansammlung der elastischen Fasern hat. Die Kontrollgruppe weist den gleichen Wert wie die Dosisgruppen auf. Leider kann keine Literatur gefunden werden, die die Datenlage der Expression elastischer Fasern nach Bestrahlung im Gallengang beschreibt, ihre Bedeutung bleibt unklar.

5.5.5. Entzündung gesamt und Entzündungszellen im Epithel

Ziel dieses Projektes ist es, die Einwanderung von Entzündungszellen in das stenosierte Gebiet durch den Einsatz der LDR-Brachytherapie zu vermindern und somit eine gesteigerte Narbenbildung vermeiden zu können. Rubin et al. beschreibt eine Verminderung der Makrophagenaktivität nach Bestrahlung. Die Strahlenschädigung der Makrophagen und die daraus resultierende Unterdrückung von Signalketten bewirken eine Verminderung der Entzündungsreaktion (Rubin et al., 1998). Auch das Vorläuferprojekt „RadBioMat“ belegt diesen Effekt. Hier ist das Ausmaß von Plasmazellen, Makrophagen und Heterophile in den radioaktiv bestrahlten Geweben (15 Gray) nach 3 bzw. 5 Wochen geringer als in nicht bestrahlten Gewebe (Held, 2007).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit spiegeln ein anderes Bild wider. Die Entzündung, sowohl im gesamten Präparat als auch im Epithel nimmt in den bestrahlten Gallengängen im Vergleich zu der Kontrollgruppe zu. Bei dieser Entzündung sind neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen nachzuweisen. Die Mediane der verschiedenen Gruppen vergleichend hat die Kontrollgruppe einen Wert von 1, die Dosisgruppe 15 Gray einen von 2,5 und die 30 Gray Gruppe einen Wert von 3. Die Kontrollgruppe unterscheidet sich signifikant von der 30 Gray Gruppe, was erneut die toxische Dosis aufzeigt. Das Ausmaß der Entzündung deutet darauf hin, dass die

Bestrahlungsdosis unerwünscht proinflammatorisch wirkt. Trott et al. gibt Bestrahlungsdosen in Höhe von 2-6 Gray an, die einen antiinflammatorischen Effekt induzieren sollen (Trott and Kamprad, 1999).

Eine generell gesteigerte Entzündung in allen Präparaten kann mit einer Entzündungsreaktion infolge der Gallengangsverletzung durch die Heater-Probe, durch die erfolgte Ballondilatation, die Fremdkörpereinwirkung des Stents und die ständige Aussetzung reizender Galleflüssigkeit begründet werden. In der Studie um Xu et al. wird der Mechanismus einer biliären Stenose nach einem Trauma beschrieben. In diesem Fall wird ebenfalls eine erhöhte Expression entzündlicher Mediatoren nachgewiesen, die ihr Peak 1-3 Wochen nach Verletzung haben (Xu et al., 2003). Auch die Versuchsdauer spielt eine Rolle bei der Erfassung der Entzündung. Erst 6 Monate nach Einwirkung einer exogenen Noxe (Trauma) kommt es laut Xu et al. zu einem Abfall der Makrophagen und inflammatorischen Cytokinen im Gewebe (Xu et al., 2003).

Das Ziel, die Einwanderung der entzündlichen Mediatoren zu verhindern, kann in dieser explorativen Orientierungsstudie nicht realisiert werden. Vermutlich befindet sich die 15 Gray Dosis nicht in dem gewünschten anti-inflammatorischen Bereich. Der genaue Wirkungsmechanismus der Bestrahlung auf die Komplexität der Entzündungsreaktion ist jedoch bisher nicht genau belegt. Weitere Dosisfindungsstudien müssen folgen.

5.5.6. Strahlenschäden

Die Präparate werden verblindet hinsichtlich der Gefäßveränderungen untersucht. Hier wird das Hauptaugenmerk auf die durch einen Strahlenschaden resultierende Vaskulopathie und Intimafibrose gelegt. Das Ausmaß der Strahlenschäden ist abhängig von der Intensität und der Dauer der applizierten Strahlung (Thomas, 2003). Durch den Austritt von Blutplasma in die Gefäßwände und eine daraus resultierende entzündliche Immunreaktion mit Einwanderung von Lymphozyten in das Gewebe wird dieses geschädigt und kann ursächlich für eine entstehende Fibrose sein (Trott, 2008b). Das heißt, dass im bestrahlten Gewebe aufgrund der Gefäßverletzungen eine Fibrose entstehen kann.

Bei der verblindeten mikroskopischen Untersuchung kann keine definitive Unterscheidung getroffen werden, um welche Strahlendosis es sich handelt (15 oder 30 Gray). Jedoch kann bei 75 % der bestrahlten Gewebe ein Strahlenschaden

nachgewiesen werden. Das heißt, dass sich durch die Gefäßverletzungen eine Fibrose ausbilden kann, was die Signifikanz des Fibrosegrades bezogen auf die Dosisgruppen bzw. Kontrollgruppe bestätigt. Auf der anderen Seite ist nicht in allen Fällen eine definitive Unterscheidung zwischen bestrahlten und unbestrahlten Gewebe eindeutig auszumachen. So kann nur bei 6 von 8 Tieren ein definitives Nichtvorhandensein radioaktiver Intimaschädigung in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Spezifität des Parameters „Strahlenschäden“ nicht sehr hoch ist.

Dosen zwischen 6 und 40 Gray führen in 100 % der bestrahlten iliakalen Gefäße und in 51 % der bestrahlten Koronargefäße zu Strahlenschäden des Gewebes. Hierbei bestehen die Strahlenschäden aus einer nekrotisierenden Vaskulitis der bis zu ca. 2 mm entfernten Arteriolen (Fajardo L-G et al., 2002). Dies bestätigt die vorliegende Untersuchung. Für den Einsatz einer klinische Studie ist die Frage zu klären, ob die erwähnten Strahlenschäden der Gefäße reversibel sind. Fajardo et al. gibt hier einen Zeitraum von 6 Monaten für die Heilung der Vaskulitis nach Strahlenexposition in 46 % der Fällen an (Fajardo L-G et al., 2002). Hierbei ist jedoch die Vergleichbarkeit der beschriebenen Gewebearten kritisch zu hinterfragen.

5.6. Diskussion: Einfluss der LDR-Brachytherapie auf Normalgewebe

Im Folgenden wird der Einfluss der LDR-Brachytherapie auf den nicht stenosierten, aber dennoch bestrahlten (16 von 24 Tieren) Gallengang diskutiert. Hierzu stehen die Daten von 20 W-Tieren zur Verfügung: 7 Tiere unbestrahlt, 6 Tiere unter 15 Gray und 7 Tiere unter 30 Gray.

Einschränkend muss festgestellt werden, dass dieser Referenzblock dem prästenotischen Gallengang entstammt, der somit, im Gegensatz zum poststenotischen Gewebe, der chronischen Cholestase ausgesetzt war.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bereits eine Dosis von 15 Gray im Bereich eines gesunden Gallengangs weder einen Einfluss auf die Dicke des Bindegewebes noch auf den Kollagengehalt hat. Ebenso werden Strahlenschäden im Gegensatz zu der 30 Gray Gruppe nicht häufiger beobachtet als im nicht-bestrahlten Gewebe

5.6.1. Bindegewebe

Die Ergebnisse der Bindegewebmessungen im Referenzblock IV außerhalb der Stenose zeigen, dass sich die Mittelwerte der drei Gruppen (Kontrollgruppe, 15 Gray und 30 Gray Gruppe) leicht voneinander, aber nicht signifikant unterscheiden. Die Bestrahlung hat keinen Einfluss auf die Dicke des Bindegewebes im unverletzten Gallengang.

5.6.2. Kollagen

Die Untersuchungen der kollagenen Fasern in dem Referenzblock IV zeigen, dass sich eine Bestrahlung in Höhe von 30 Gray signifikant auf die Anreicherung kollagener Fasern im Normalgewebe auswirkt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der 15 Gray Gruppe, jedoch innerhalb der Dosisgruppen. Bei der strahlentherapeutischen Behandlung einer benignen oder auch malignen Stenose soll das umgebende gesunde Gewebe möglichst geschont werden. Die gleichen Werte in der Kontrollgruppe und in der 15 Gray Gruppe zeigen, dass die Dosis in diesem Fall tendenziell in die richtige Richtung weist. 15 Gray führen nicht noch zu einer Anreicherung von Kollagen.

TGF- β scheint in diesem Zusammenhang ein wichtiges Cytokin zu sein, auch in der Bestrahlung von Normalgewebe zu sein (Rodemann and Bamberg, 1995b). Daher wäre die Bestimmung in nachfolgenden Studien sinnvoll.

5.6.3. Strahlenschäden

Mit Hilfe der LDR-Brachytherapie soll in diesem Falle die Wundheilung der benignen Stenose gefördert werden. Ein zusätzlicher Schaden ist bei einem solchen Einsatz im Hinblick auf den Einsatz in einer klinischen Studie zu vermeiden. 30 Gray erzeugen bei 7 von 7 Tieren einen vaskulären Strahlenschaden. Diese Dosis muss vermieden werden. Unter 15 Gray wird ein Strahlenschaden in 3 von 6 unverletzten Gallengängen gefunden. Dies ist vergleichbar mit Strahlenschäden in 2 von 7 Gallengängen der nicht bestrahlten Tiere und muss als Ausdruck der ungenügenden Spezifität des Parameters gewertet werden.

In künftigen Studien sollten somit unter einer Strahlendosis von 15 Gray keine strahlungsbedingten Schäden am unverletzten Gallengang zu erwarten sein.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

Bisher liegen keinerlei Erfahrungen bei der Verwendung einer LDR-Brachytherapie zur Behandlung einer narbigen Gallengangsstenose vor. Ziel des BetaMod-Projektes ist es, in einer randomisierten, kontrollierten und verblindeten Studie die wundheilungsmodulierende Wirkung eines lokal integrierten Betastrahlers (Phosphor-32) in der Behandlung der benignen Gallengangsstenose zu untersuchen. Partialziel ist die Induktion einer narbigen benignen Gallengangsstenose durch monopolarer Hochfrequenz (HF)-Strom. Die radiologisch vermessene Stenoseausbildung am Tag 14 zeigt, dass dieses Teilziel erfolgreich umgesetzt wurde. Der erhöhten Perforationsrate wird durch entsprechende Drosselung der applizierten Energie entgegengewirkt.

Die Ballondilatation der benignen Stenose am Tag 14 kann erfolgreich durchgeführt werden. Die Einlage der Stents (0 Gray/15 Gray/30 Gray) erfolgt unter Strahlenschutzaspekten komplikationslos. Die Liegedauer der Stents von mindestens einer Woche kann in 7 Fällen (von der gesamten Tierzahl=42) nicht eingehalten werden, was zu einem Ausschluss der Tiere führt. Dies kann an der Modellwahl des Stents oder an einer nicht ausreichenden Stenose liegen.

In dieser explorativen Orientierungsstudie werden drei verschiedene Messmethoden herangezogen, die Ausprägung der Stenose in-vivo und ex-vivo zu quantifizieren. Jede dieser Messmethoden hat ihre individuellen Vor- und Nachteile. Der radiologische Stenosegrad korreliert mit dem makroskopischen Stenosegrad. Die Stenose wird durch die Ballondilatation und Drainage signifikant verbessert, allerdings verbleibt eine signifikante Rest-Stenose. Die Rest-Stenose kann durch die LDR-Brachytherapie nicht verbessert werden, weder mit 15 Gray noch mit 30 Gray. Dies ist mit allen drei Messmethoden belegbar. Unter 30 Gray nimmt der histologische Stenosegrad tendenziell aber nicht signifikant zu. 15 Gray führen nicht zu einer Verschlechterung der radiologischen, makroskopischen oder histologischen Stenose.

Die Untersuchung der histopathologischen Merkmale in der 30 Gray Gruppe spiegelt die schädigende Wirkung radioaktiver Bestrahlung im Gallengang wider: die Gewebefibrose, das vermehrte Auftreten von α -SMA, der erhöhte Kollagengehalt und die vermehrte Entzündung zeigen die toxische Strahlenwirkung. Bei den entscheidenden Parametern, die die Wundheilung

charakterisieren (Fibrose, α -SMA und Entzündung) zeigen 15 Gray verglichen mit der Kontrollgruppe keinen positiven Effekt. Der Gehalt der α -SMA ist sogar signifikant gesteigert, allerdings im Kontrast zu einer (nicht-signifikanten) Senkung des Kollagengehalts. Dies bedeutet, dass die 15 Gray Dosis nicht die Parameter unterdrückt, die für eine erfolgreiche Umsetzung des Projektziels sprechen würden. Weitere histologische bzw. immunhistologische Färbungen können durchgeführt werden um einen tieferen Einblick in die Komplexität der Wundheilung zu bekommen.

Die Untersuchungen der Referenzblöcke außerhalb der Stenose, die lediglich der Strahleneinwirkung unterliegen, zeigen einen strahlungsabhängigen Gewebeschaden unter 30 Gray, nicht aber unter 15 Gray. Die Intimafibrose der Gefäße zeigt die Nebenwirkungen der Strahlentherapie von 30 Gray im gesunden Gewebe. Nach vorliegenden Ergebnissen sind Strahlenschäden bei einer Dosis ≤ 15 Gray nicht zu erwarten.

Die Strahlenschutzaspekte bzgl. des Handlings in dem vorliegenden Tierversuch können eingehalten werden und ermöglichen eine potenzielle Anwendung in einer klinischen Studie. Dies muss das Ziel weiterer Studien sein. 15 Gray führen weder zu einer Verbesserung noch zu einer Verschlechterung der klinischen oder histologischen Stenose. Für einen positiven Effekt muss ein Dosisbereich unter 15 Gray untersucht werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

„Untersuchung zur Wundheilungsmodulation durch lokal integrierte Betastrahler am Gallengangsstenosemodell - Schwein“

Hintergrund: Postentzündliche narbige Stenosen der ableitenden Gallengänge sind meist ein chronisches Behandlungsproblem. Derzeitige mechanische Behandlungsmethoden wie die endoskopische Dilatation und die Drainage führen oftmals nicht zum gewünschten Therapieerfolg. Eine LDR-Brachytherapie mit einem geeigneten kurzreichweitigen Betastrahler könnte eine neuartige Behandlungsstrategie darstellen, um die Rezidivbildung der Gallengangsstenose zu verhindern. In der vorliegenden tierexperimentellen explorativen Orientierungsstudie wird der dosisabhängige Einfluss der LDR-Brachytherapie auf die Wundheilung der benignen Gallengangsstenose untersucht. Voraussetzung hierfür ist zum einen die Etablierung eines Tiermodells zur Induktion einer narbigen benignen Gallengangsstenose zum anderen die Entwicklung eines geeigneten Applikators für die Durchführung der LDR-Brachytherapie im Gallengang.

Methode: Bei 42 Schweinen „Deutsche Landrasse“ wird am Tag 0 eine endoskopisch retrograde Cholangiographie durchgeführt. Nach Sondierung des Gallengangs wird mit einer monopolaren 10 F Hochfrequenz (HF)-Sonde eine narbige benigne Stenose im distalen Drittel des *D. choledochus* induziert. Von den ersten 12 Tieren können 8 Tiere nicht eingeschlossen werden (Perforation (n=4), Stentdislokation (n=2), Tod wg. Cholangitis (n=2)). Daraufhin erfolgt eine grundlegende Designänderung mit Reduktion der HF-Energie (20 W, 5 sec) und Reduktion der Anzahl der Endoskopien von 4 auf 3, nach der die folgenden 30 Tiere untersucht werden. Am Tag 14 findet die radiologische Evaluation des Stenosegrades, die Ballondilatation der Stenose und anschließend die randomisierte, kontrollierte und verblindete Einlage einer Kunststoffdrainage („Stent“) statt (3 Gruppen= Kontrollgruppe 0 Gray; LDR-Dosis 15 und 30 Gray). Die 30 Gray Dosis wird eingesetzt, um die toxische Strahlenwirkung aufzuzeigen. Die Stents verbleiben 21 Tage im Tierkörper. Am Tag 35 werden die Stents entfernt und die Stenose wird abschließend radiologisch evaluiert, es folgt die Entnahme des Gewebes mit anschließender histologischer Aufbereitung

(Färbungen: HE, EvG, α -SMA). Zur Beurteilung der Stenose werden die radiologischen und die makroanatomischen Vermessungen dokumentiert sowie histomorphometrische (Bindegewebmessungen) und histopathologische Untersuchungen (Fibrosegrad, α -SMA, kollagene und elastische Fasern, Entzündung im Bindegewebe und Epithel und Strahlenschäden) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgt mit einem One Way ANOVA und wird mit einem Post Hoc Test spezifiziert.

Ergebnisse: 18 Tiere können wegen Nichteinhaltung der Liegedauer (n=7), Perforation (n=7) oder Tod (n=4) nicht in die Per-Protocol Auswertung aufgenommen werden. An Tag 14 haben 45,8 % der verbleibenden 24 Tiere (3 Gruppen, n=8) eine hochgradige und 45,8 % der Tiere eine mittelgradige Gallengangsstenose ausgebildet. Die Ballondilatation mit anschließender Drainage bewirkt eine signifikante Reduktion der Stenose, allerdings verbleibt eine signifikante Rest-Stenose. Unter der LDR-Brachytherapie wird der Dilatationserfolg abgeschwächt: er ist unter 15 Gray noch deutlich, unter 30 Gray aber nicht mehr signifikant nachweisbar. Das Ausmaß der an Tag 35 verbleibenden Rest-Stenose ist tendenziell unter 30 Gray höher, allerdings weder radiologisch noch makroskopisch oder histomorphometrisch signifikant durch die Brachytherapie beeinflusst. Histopathologisch sind unter 30 Gray an Tag 35 Fibrose, Kollagengehalt, α -SMA und die Dichte an Entzündungszellen in der Stenose signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe als Ausdruck einer gewebeschädigenden Strahlenwirkung gesteigert. Die 15 Gray Dosis führt zu einer geringfügigen numerischen, aber nicht signifikanten Steigerung von Fibrose und Entzündung, darüber hinaus einerseits zu einer nicht-signifikanten Reduktion des Kollagengehalts, andererseits zu einer signifikanten Vermehrung von α -SMA als Hinweis auf eine Vermehrung der Myofibroblastenmenge in der Stenose. Die Intimafibrose der kleinen und mittleren Gefäße als Hinweis auf einen Strahlenschaden in der Stenose ist in beiden bestrahlten Gruppen deutlich ausgeprägt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im gesunden Gallengangsgewebe zeigen 15 Gray im Gegensatz zu 30 Gray hingegen keine schädigende Wirkung.

Schlussfolgerung: Innerhalb des BetaMod-Projektes können mehrere Teilziele verwirklicht werden. Die Etablierung eines Tiermodells zur Induktion einer fibrotischen Stenose im *D. choledochus* ist gelungen und kann zur Evaluation neuer experimenteller Therapien genutzt werden. Erstmals wurde gezeigt, dass

eine lokale LDR-Brachytherapie im Gallengang unter Verwendung eines klinisch üblichen Kunststoffstents mit integrierter Phosphor-32 haltigen Folie praktikabel und auch unter Strahlenschutz-Aspekten sicher durchführbar ist. Die Ergebnisse zeigen, dass eine LDR-Brachytherapie mit den in dieser Studie gewählten Dosen (15 und 30 Gray) in einer klinischen Studie nicht zu empfehlen ist. Während 30 Gray eindeutig gewebeschädigend sind, sind aber bereits unter 15 Gray schädigende Effekte nicht mehr zu sehen. Für künftige Studie sollte eine Dosis unter 15 Gray untersucht werden.

VIII. SUMMARY

“Investigation of the effects of β -particle-emitting stent assisted LDR-brachytherapy on wound healing in a biliary restenosis pig model”

Introduction: Postinflammatory benign strictures of the biliary tract represent a chronic treatment problem. Current methods of mechanical treatment like endoscopic dilatation or stenting usually do not lead to the desired success. LDR-brachytherapy with a special designed β -particle-emitting stent could offer a new treatment approach for prevention of bile duct restenosis. In the present exploratory animal study the dose-dependent influence of the LDR-brachytherapy on wound healing is investigated. Prerequisites for the current study were to establish a large animal model of benign bile duct stenosis by intraductal thermal injury with endoscopic retrograde cholangiography and to develop an innovative LDR-brachytherapy device.

Methods: On day 0 endoscopic retrograde cholangiography is performed in 42 pigs with a side-viewing endoscope (Olympus). A 10 F monopolar probe is inserted in the *D. choledochus* and thermal injury is applied for inducing of a benign stenosis. 8 of the first 12 animals cannot be included (perforation (n=4), stent dislocation (n=2), death because of Cholangitis (n=2)). As a result, the design is changed by reducing the HF-energy (20 W, 5 sec) and reducing the number of endoscopies from 4 to 3. On the basis of this change the next 30 animals are investigated. On day 14 the stenosis is evaluated with a baseline cholangiogram. Afterwards, ballondilatation of the stenosis is performed and a special stent is inserted in a randomized, controlled and blinded fashion (3 groups= control group 0 Gray, LDR-dosis 15 and 30 Gray). The 30 Gray group shows the toxic effect of radiation. The stent remains in the animal for 21 days. On day 35 the development of restenosis is evaluated by cholangiography and the bile duct is harvested and prepared for histological staining (HE, EvG, α -SMA). Cholangiography and macroscopical analyses are documented and histomorphometric (measuring the connective tissue) and histopathological studies (fibrosis, kollagens, α -SMA, inflammation in connective tissue and epithelia and radiation injury) are performed. The statistical evaluation of the differences between the test groups is made by variance analysis (One way

ANOVA) and specified with a post hoc-test.

Results: 18 animals need to be excluded from the per-protocol evaluation because of perforation (n=7), stent dislocation (n=7) or death (n=4). Therefore 24 animals are evaluated (3 groups n=8). On day 14 45.8 % of the animals have developed a high-grade biliary stenosis and 45.8 % have developed an intermediate-grade stenosis. The balloon dilatation followed by drainage causes a significant but not complete reduction of the stenosis. The success of the dilatation is reduced by the LDR-brachytherapy: under 15 Gray it is clearly but under 30 Gray only little detectable. The extent of the remaining stenosis on day 35 tends to be higher in the 30 Gray group, though it is neither influenced radiologically nor macroscopically nor histomorphometrically by the brachytherapy. On day 35 in the 30 Gray group fibrosis, collagen content, α -SMA and the density of the inflammatory cells in the stenosis increased significantly compared to the control group as an expression of radiation damage. The 15 Gray dose leads to a minor increase of fibrosis and inflammation and to a non-significant reduction of the collagen content as well as to a significant increase of α -SMA as an indication of the increase of the quantity of myofibroblasts in the stenosis. The intimal fibrosis of the smaller vessels indicating radiation damage is significantly more pronounced in the stenosis in those two irradiated groups than in the control group. 15 Gray unlike 30 Gray do not show any harmful effects in the healthy tissue of the bile duct.

Conclusions: In this pilot study some subgoals can be achieved: An animal model for induction of a fibrotic stenosis in *D. choledochus* could be established and can now be used to evaluate new experimental therapies. For the first time a local LDR-brachytherapy with an innovative application device consisting of a special Phosphor-32-foil was performed successfully always observing the aspects of radiation protection. The results show that brachytherapy with doses of 15 and 30 Gray cannot be recommended for a clinical study. 30 Gray definitely damage the tissue, whereas damaging effects cannot be seen in the 15 Gray group. In future studies a dose of less than 15 Gray should be investigated.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

ADAMIETZ, B., KEILHOLZ, L., GRÜNERT, J. & SAUER, R. 2001. Die Radiotherapie des Morbus Dupuytren im Frühstadium. *Strahlentherapie und Onkologie*, 177, 604-610.

ALBIERO, R., ADAMIAN, M., KOBAYASHI, N., AMATO, A., VAGHETTI, M., DI MARIO, C. & COLOMBO, A. 2000. Short- and intermediate-term results of ³²P radioactive beta-emitting stent implantation in patients with coronary artery disease: The Milan Dose-Response Study. *Circulation*, 101, 18-26.

ANSCHER, M. S. 2005. The irreversibility of radiation-induced fibrosis: fact or folklore? *J Clin Oncol*, 23, 8551-2.

BAILEN, L. S. L., E.D. 2000. The Management of Benign and Malignant Biliary Strictures. In: AFDHAL, N. H. (ed.) *Gallbladder and biliary tract diseases*. New York [u.a.]: Dekker, 843-867

BAUMGART, D., SAUERWEIN, W., NABER, C., KAISER, C., MEUSERS, P., QUAST, U., LANGNER, I., FLÜHS, D., STUSCHKE, M. & ERBEL, R. 2002. Strahlentherapie der Herzkranzgefäße. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg 99, 2252-2256.

BERNDT, A., KOSMEHL, H., MANDEL, U., GABLER, U., LUO, X., CELEDA, D., ZARDI, L. & KATENKAMP, D. 1995. TGF beta and bFGF synthesis and localization in Dupuytren's disease (nodular palmar fibromatosis) relative to cellular activity, myofibroblast phenotype and oncofetal variants of fibronectin. *Histochem J*, 27, 1014-20.

BINMOELLER, K. F., DEVEREAUX, C.E., SHAD, J.A. 1999. Biliäre und Pankreasgangendoprothesen (Stents). In: CLASSEN, M. (ed.) *Gastroenterologische Endoskopie das Referenzwerk zur endoskopischen Diagnostik und Therapie; mit 198 Tabellen*. 4., komplett überarb. Aufl. ed. Berlin [u.a.]: Springer, 365-376.

BISMUTH, H. & CORLETTE, M. B. 1975. Intrahepatic cholangioenteric anastomosis in carcinoma of the hilus of the liver. *Surg Gynecol Obstet*, 140, 170-8.

BORN, P., ROSCH, T., BRUHL, K., SANDSCHIN, W., ALLESCHER, H. D., FRIMBERGER, E. & CLASSEN, M. 1999. Long-term results of endoscopic and percutaneous transhepatic treatment of benign biliary strictures. *Endoscopy*, 31, 725-31.

BRAMBS, H. J., FREUND, U., BRUGGMOSER, G., LAAFF, H., KLUGER, U. W., ROTH, R. & WANNENMACHER, M. 1993. [Radiation sensitivity of the normal bile duct during high dose rate afterloading irradiation with Iridium 192. Experimental studies in pigs]. *Strahlenther Onkol*, 169, 721-8.

BUMANN, J., SANTO-HOLTJE, L., LOFFLER, H., BAMBERG, M. & RODEMANN, H. P. 1995. Radiation-induced alterations of the proliferation dynamics of human skin fibroblasts after repeated irradiation in the subtherapeutic dose range. *Strahlenther Onkol*, 171, 35-41.

BURGER, A., LOFFLER, H., BAMBERG, M. & RODEMANN, H. P. 1998. Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. *Int J Radiat Biol*, 73, 401-8.

CLASSEN, M. 2004. 200 Jahre Endoskopie des Verdauungstraktes- ein konziser Bericht. In: CLASSEN, M. (ed.) *Gastroenterologische Endoskopie das Referenzwerk zur endoskopischen Diagnostik und Therapie ; 198 Tabellen*. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2-11

COSTAMAGNA, G., SHAH, S. K. & TRINGALI, A. 2003. Current management of postoperative complications and benign biliary strictures. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 13, 635-48, ix.

DAHME, E. 2007. *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere 5 Tabellen*, Stuttgart, Enke.

DANCYGIER, H. 2003. Erkrankungen der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge - Makroskopische und mikroskopische Anatomie der extrahepatischen Gallenwege. In: *Klinische Hepatologie Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen ; mit 257 Tabellen*, Berlin [u.a.], Springer, 825-827

DENHAM, J. W. & HAUER-JENSEN, M. 2002. The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. *Radiother Oncol*, 63, 129-45.

DENK, H. 2000. *Pathologie der Leber und Gallenwege 37 Tabellen*, Berlin [u.a.], Springer.

DESMOULIERE, A., CHAPONNIER, C. & GABBIANI, G. 2005. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*, 13, 7-12.

DIETZ, R., SILBER, S., BAUMGART, D., HEHRLEIN, C. & TEBBE, U. 2001. [Position paper on intracoronary brachytherapy]. *Z Kardiol*, 90, 875-80.

DÖRFER, J. H., W. 2008. Grundlagen zu Gallenwegen und Gallenblase - Embryologie, Anatomie, angeborene Anomalien. In: RIEMANN, J. F. (ed.) *Gastroenterologie das Referenzwerk für Klinik und Praxis*. Stuttgart [u.a.] ed. Thieme, 1643-1648.

DORMAND, E. L., BANWELL, P. E. & GOODACRE, T. E. 2005. Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J*, 2, 112-27.

DRANOFF, J. A. & WELLS, R. G. 2010. Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology*, 51, 1438-44.

DU, S.-S., QIANG, M., ZENG, Z.-C., ZHOU, J., TAN, Y.-S., ZHANG, Z.-Y., ZENG, H.-Y. & ZHONG-SHAN, L. 2010. Radiation-Induced Liver Fibrosis Is Mitigated by Gene Therapy Inhibiting Transforming Growth Factor-[beta] Signaling in the Rat. *International Journal of Radiation*

*Oncology*Biology*Physics*, 78, 1513-1523.

EMING, S. A., KRIEG, T. & DAVIDSON, J. M. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*, 127, 514-25.

FAISS, S. 2007. Biliopankreatische Interventionen. In: KAHL, S. (ed.) *Interventionelle Endoskopie Lehrbuch und Atlas*. 1. Aufl. ed. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.

FAJARDO L-G, L. F., PRIONAS, S. D., KALUZA, G. L. & RAIZNER, A. E. 2002. Acute vasculitis after endovascular brachytherapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 53, 714-719.

FOGEL, E. L., MCHENRY, L., SHERMAN, S., WATKINS, J. L. & LEHMAN, G. A. 2005. Therapeutic biliary endoscopy. *Endoscopy*, 37, 139-45.

FRANZ, S. 2004. Ösophagogastroduodenoskopie beim Schwein – Technik, Methode, Indikationen –. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschrift*, 117, 153-159.

GENG, Z. M., YAO, Y. M., LIU, Q. G., NIU, X. J. & LIU, X. G. 2005. Mechanism of benign biliary stricture: a morphological and immunohistochemical study. *World J Gastroenterol*, 11, 293-5.

GÜTHOFF, S. & HARRER, P. 2010. Viszeralchirurgie. In: GÜTHOFF, S. & HARRER, P. *Die 50 wichtigsten Fälle Chirurgie [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch]*, München, Elsevier, Urban & Fischer, 101-104

HABER, G. B. & SANDHA, G. S. 2004. Endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie. In: CLASSEN, M. (ed.) *Gastroenterologische Endoskopie das Referenzwerk zur endoskopischen Diagnostik und Therapie ; 198 Tabellen*. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 120-129

HAKENJOS, L., BAMBERG, M. & RODEMANN, H. P. 2000. TGF-beta1-

mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. *Int J Radiat Biol*, 76, 503-9.

HE, G. J., GAO, Q. Y., XU, S. H., GAO, H., JIANG, T., DAI, X. W. & MA, K. 2006. 103Pd radioactive stent inhibits biliary duct restenosis and reduces smooth muscle actin expression during duct healing in dogs. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 5, 595-8.

HEES, H. 2000. *Histologie Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie ; [mit 12 Schemata und 15 Tabellen]*, Köln, Dt. Ärzte-Verl.

HEHRLEIN, C. 2002. Radioaktive Stents - Problematik und Lösungsmöglichkeiten. *Herz*, 27, 17-22.

HEINRITZI, K. & PLONAIT, H. 2004. Blutkrankheiten. In: WALDMANN, K.-H. (ed.) *Lehrbuch der Schweinekrankheiten 63 Tabellen*. 4., Aufl. ed. Stuttgart: Parey.

HELD, A. C. E. 2007. *Beurteilung des Einsatzes eines radioaktiven, resorbierbaren Implantats in der filtrierenden Glaukomchirurgie anhand verschiedener Augeninnendruckmessmethoden und der Histologie - experimentelle Untersuchungen am Kaninchen*, München, Hut.

HERFARTH, K. K. K., T.W. 2006. Hepatobiliäre Tumoren und Lebermetastasen. In: WANNENMACHER, M. (ed.) *Strahlentherapie mit 306 Tabellen*. Berlin [u.a.]: Springer, 537-553

HERSKIND, C., BENTZEN, S. M., OVERGAARD, J., OVERGAARD, M., BAMBERG, M. & RODEMANN, H. P. 1998. Differentiation state of skin fibroblast cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *Radiother Oncol*, 47, 263-9.

HERSKIND, C., JOHANSEN, J., BENTZEN, S. M., OVERGAARD, M., OVERGAARD, J., BAMBERG, M. & RODEMANN, H. P. 2000. Fibroblast

differentiation in subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Acta Oncol*, 39, 383-8.

HINZ, B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*, 127, 526-37.

HINZ, B., CELETTA, G., TOMASEK, J. J., GABBIANI, G. & CHAPONNIER, C. 2001a. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*, 12, 2730-41.

HINZ, B., MASTRANGELO, D., ISELIN, C. E., CHAPONNIER, C. & GABBIANI, G. 2001b. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol*, 159, 1009-20.

HINZ, B., PHAN, S. H., THANNICKAL, V. J., GALLI, A., BOCHATON-PIALLAT, M. L. & GABBIANI, G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 170, 1807-16.

HOCHBERGER, J. 2004. Aus- und Weiterbildung in der gastrointestinalen Endoskopie. In: CLASSEN, M. (ed.) *Gastroenterologische Endoskopie das Referenzwerk zur endoskopischen Diagnostik und Therapie ; 198 Tabellen*. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 72-78.

HOLMES, D. R. 1997. Preventing Coronary Restenosis and Complications. *New England Journal of Medicine*, 336, 1748-1749.

JUDAH, J. R. & DRAGANOV, P. V. 2007. Endoscopic therapy of benign biliary strictures. *World J Gastroenterol*, 13, 3531-9.

KALUZA, G. L., RAIZNER, A. E., MAZUR, W., SCHULZ, D. G., ZYMEK, P. T., NGUYEN-HO, P., TIO, F. O., FAJARDO, L. F. & ALI, N. M. 2001. Dose-response study of intracoronary beta-radiation with ³²P in balloon- and stent-injured coronary arteries in swine. *Cardiovasc Radiat Med*, 2, 225-30.

KHAN, S. A., THOMAS, H. C., DAVIDSON, B. R. & TAYLOR-ROBINSON, S. D. 2005. Cholangiocarcinoma. *The Lancet*, 366, 1303-1314.

KIRWAN, J. F., CONSTABLE, P. H., MURDOCH, I. E. & KHAW, P. T. 2003. Beta irradiation: new uses for an old treatment: a review. *Eye (Lond)*, 17, 207-15.

KRAMER, M. 2004. Wunden, Wundbehandlung, Wundheilung. In: DIETZ, O. (ed.) *Lehrbuch der allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner 14 Tabellen*. 6., völlig neu bearb. Aufl. ed. Stuttgart: Enke, 1-36

KRIEGER, H. 2004. Radioaktivität. In: *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*, Stuttgart [u.a.], Teubner, 82-148.

KRIEGER, H. 2005. Überblick über die Strahlungsquellen. In: *Strahlungsquellen für Technik und Medizin*, Wiesbaden, Teubner, 9-16.

LAIRD, J. R., CARTER, A. J., KUFS, W. M., HOOPES, T. G., FARB, A., NOTT, S. H., FISHELL, R. E., FISHELL, D. R., VIRMANI, R. & FISHELL, T. A. 1996. Inhibition of neointimal proliferation with low-dose irradiation from a beta-particle-emitting stent. *Circulation*, 93, 529-36.

LANG, G. 2006. Einbettungsprozess. In: LANG, G. (ed.) *Histotechnik Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik ; [für MTA und biomedizinische Analytikerinnen]*. Wien [u.a.]: Springer, 86-122.

LANGBERG, C. W., HAUER-JENSEN, M., SUNG, C. C. & KANE, C. J. 1994. Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation. *Radiother Oncol*, 32, 29-36.

LARA, P. C., RUSSELL, N. S., SMOLDERS, I. J., BARTELINK, H., BEGG, A. C. & COCO-MARTIN, J. M. 1996. Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen production. *Int J Radiat Biol*, 70, 683-92.

LIU, Y., LIU, J. L., CAI, Z. Z., LU, Z., GONG, Y. F., WU, H. Y., MAN, X. H., JIN, Z. D. & LI, Z. S. 2009. A novel approach for treatment of unresectable extrahepatic bile duct carcinoma: design of radioactive stents and an experimental trial in healthy pigs. *Gastrointest Endosc*, 69, 517-24.

LOHR, F. & WENZ, F. 2007. Biologische Grundlagen der Radioonkologie. In: LOHR, F. & WENZ, F. *Strahlentherapie kompakt*, München [u.a.], Elsevier, Urban & Fischer, 303-314.

LORENA, D., UCHIO, K., COSTA, A. M. & DESMOULIERE, A. 2002. Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen*, 10, 86-92.

MAJNO, G. 1979. The story of the myofibroblasts. *Am J Surg Pathol*, 3, 535-42.

MANIMARAN, S. 2007. Radiobiological equivalent of low/high dose rate brachytherapy and evaluation of tumor and normal responses to the dose. *Radiat Med*, 25, 229-35.

MARTIN, M., LEFAIX, J. & DELANIAN, S. 2000. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 47, 277-90.

MEISTER, P. 1998. [Myofibroblasts. Review out outlook]. *Pathologe*, 19, 187-93.

NICOLAS, V. 2006. Gallenblase und Gallenwege. In: Bücheler, E. *Einführung in die Radiologie, Diagnostik und Interventionen*, Stuttgart [u.a.], Thieme, 417-431.

PÖTTER, R. D., K. 2006. Strahlentherapie. In: GADNER, H. (ed.) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie mit 281 Tabellen*. Heidelberg: Springer, 578-594.

PÜLS, M. 2008. *Optische Kohärenztomographie an biologischen Proben*. Ludwig-Maximilians-Universität.

QUAST, U., KAULICH, T. W. & LORENZ, J. 2002. Optimale intravaskuläre Brachytherapie. *Herz*, 27, 7-16.

R.BECKER 2011. Wundheilungsmodulation durch lokal integrierte Betastrahler am Harnröhrenstrikturmodell des Kaninchens.

RAIZNER, A. E., OESTERLE, S. N., WAKSMAN, R., SERRUYS, P. W., COLOMBO, A., LIM, Y. L., YEUNG, A. C., VAN DER GIESSEN, W. J., VANDERTIE, L., CHIU, J. K., WHITE, L. R., FITZGERALD, P. J., KALUZA, G. L. & ALI, N. M. 2000. Inhibition of restenosis with beta-emitting radiotherapy: Report of the Proliferation Reduction with Vascular Energy Trial (PREVENT). *Circulation*, 102, 951-8.

RAUWS, E. A. & GOUMA, D. J. 2004. Endoscopic and surgical management of bile duct injury after laparoscopic cholecystectomy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 18, 829-46.

RICHTER, E. & FEYERABEND, T. 2002. Grundlagen der Strahlenwirkung. In: RICHTER, E. & FEYERABEND, T. *Grundlagen der Strahlentherapie mit 86 Tabellen*, Berlin [u.a.], Springer, 61-104

RODEMANN, H. P. (ed.) 2006. *Radiobiologische Mechanismen von niedrigen Bestrahlungsdosen am Bindegewebe*: Dipodocus Verlag.

RODEMANN, H. P. & BAMBERG, M. 1995a. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiotherapy and Oncology*, 35, 83-90.

RODEMANN, H. P. & BAMBERG, M. 1995b. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol*, 35, 83-90.

RODEMANN, H. P., BINDER, A., BURGER, A., GUVEN, N., LOFFLER, H. & BAMBERG, M. 1996. The underlying cellular mechanism of fibrosis. *Kidney Int Suppl*, 54, S32-6.

RÖSCH, T. 2003. Bildgebende Verfahren - Endoskopisch-retrograde Cholangiopankreatographie und perkutane transhepatische Cholangiographie. In: DANCYGIER, H. (ed.) *Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen*, Berlin [u. a.], Springer, 266-273.

RUBIN, P., SONI, A. & WILLIAMS, J. P. 1999. The molecular and cellular biologic basis for the radiation treatment of benign proliferative diseases. *Seminars in Radiation Oncology*, 9, 203-214.

RUBIN, P., WILLIAMS, J. P., RIGGS, P. N., BARTOS, S., SARAC, T., POMERANTZ, R., CASTANO, J., SCHELL, M. & GREEN, R. M. 1998. Cellular and molecular mechanisms of radiation inhibition of restenosis. Part I: role of the macrophage and platelet-derived growth factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 40, 929-41.

RUMALLA, A., PETERSEN, B. T., BARON, T. H., BURGART, L. J., HERMAN, L. J., WIERSEMA, M. J. & GOSTOUT, C. J. 2003. Development of a swine model for benign stenosis of the bile duct by endoscopic application of intraluminal thermal injury. *Gastrointest Endosc*, 57, 73-7.

RUSSELL, N. S., LARA, P. C., GRUMMELS, A., HART, A. A., COCOMARTIN, J. M., BARTELINK, H. & BEGG, A. C. 2000. In vitro differentiation characteristics of human skin fibroblasts: correlations with radiotherapy-induced breast fibrosis in patients. *Int J Radiat Biol*, 76, 231-40.

SAUER, R. 2003. Strahlenbiologie. In: SAUER, R. (ed.) *Strahlentherapie und Onkologie mit 58 Tabellen*. 4. überarb. Aufl. ed. München [u.a.]: Urban & Fischer, 103-128.

SCHILLING, D. 2008. Benigne Gallenwegsstenosen. In: RIEMANN, J. F. (ed.) *Gastroenterologie: das Referenzwerk für Klinik und Praxis*. Stuttgart [u.a.] ed. Stuttgart: Thieme, 1713-1718.

SCHMIDT, B. F. 1999. Strahlentherapie bei malignen Tumoren der zentralen

Gallenwege. *Onkologe*, 5, 506-514.

SCHULZ, H. J. 2008. Unklare Gallengangsstenosen. *Der Gastroenterologe*, 3, 6-13.

SEIFERT, H. 2001. Anomalien der Gallenwege und Strikturen. In: CASPARY, W. F. 2001. *Therapie von Leber- und Gallekrankheiten*, Berlin [u.a.], Springer, 247-256.

SERRUYS, P. W. & KAY, I. P. 2000. I like the candy, I hate the wrapper: the (32)P radioactive stent. *Circulation*, 101, 3-7.

SIKORA, S. S., POTTAKKAT, B., SRIKANTH, G., KUMAR, A., SAXENA, R. & KAPOOR, V. K. 2006. Postcholecystectomy benign biliary strictures - long-term results. *Dig Surg*, 23, 304-12.

SILBER, S. 2002. [Intracoronary radiation therapy in controlled and open clinical trials with afterloading systems and "hot" balloon catheters. Analysis of 6,692 patients]. *Herz*, 27, 30-55.

STOLZ, W. 2005. Radioaktive Strahlungsquellen. In: STOLZ, W. (ed.) *Radioaktivität: Grundlagen, Messung, Anwendungen*. 5., überarb. und erw. Aufl. ed. Wiesbaden: Teubner, 79-83.

TANG, L., TANAKA, Y., MARUMO, F. & SATO, C. 1994. Phenotypic change in portal fibroblasts in biliary fibrosis. *Liver*, 14, 76-82.

TEIRSTEIN, P. S. 2001. Living the dream of no restenosis. *Circulation*, 104, 1996-8.

THOMAS, C. 2003. Exogene Noxen. In: BÜTTNER, R. (ed.) *Allgemeine Pathologie mit 15 Tabellen*. 3., erw. Aufl. ed. Stuttgart [u.a.]: Schattauer. 79-99.

TOMASEK, J. J., GABBIANI, G., HINZ, B., CHAPONNIER, C. & BROWN, R. A. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 349-63.

TROTT, K. R. 2008a. Radiobiological Principles. *In: SEEGENSCHMIEDT, M. H. (ed.) Radiotherapy for non-malignant disorders with 200 tables*. Berlin [u.a.]: Springer, 3-28.

TROTT, K. R. & KAMPRAD, F. 1999. Radiobiological mechanisms of anti-inflammatory radiotherapy. *Radiother Oncol*, 51, 197-203.

TROTT, K. R. & KAMPRAD, F. 2006. Estimation of cancer risks from radiotherapy of benign diseases. *Strahlenther Onkol*, 182, 431-6.

TROTT, K. R., KAMPRAD, F.-H. 2008b. Side Effects and Long-Term Risks from Radiotherapy of Benign Diseases. *In: SEEGENSCHMIEDT, M. H. (ed.) Radiotherapy for non-malignant disorders with 200 tables*. Berlin [u.a.]: Springer, 29-43.

VAN DER GIESSEN, W. J., REGAR, E., HARTEVELD, M. S., COEN, V. L., BHAGWANDIEN, R., AU, A., LEVENDAG, P. C., LIGTHART, J., SERRUYS, P. W., DEN BOER, A., VERDOUW, P. D., BOERSMA, E., HU, T. & VAN BEUSEKOM, H. M. 2001. "Edge Effect" of (32)p radioactive stents is caused by the combination of chronic stent injury and radioactive dose falloff. *Circulation*, 104, 2236-41.

VAN OS, E. C., PETERSEN, B. T. & BATTIS, K. P. 1999. Spiral nitinol biliary stents in a porcine model: evaluation of the potential for use in benign strictures. *Endoscopy*, 31, 253-9.

VELNAR, T., BAILEY, T. & SMRKOLJ, V. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*, 37, 1528-42.

VITALE, G. C., GEORGE, M., MCINTYRE, K., LARSON, G. M. & WIEMAN, T. J. 1996. Endoscopic management of benign and malignant biliary strictures. *Am J Surg*, 171, 553-7.

VOISARD, R., HOB, J., BAUR, R., HERTER, T., HANNEKUM, A. & HOMBACH, V. 2006. Edge restenosis: impact of low dose irradiation on cell proliferation and ICAM-1 expression. *BMC Cardiovasc Disord*, 6, 32.

VORWERK, D., GUENTHER, R. W., KUEPPER, W. & KISSINGER, G. 1989. Thermal laser-induced stenosis of the common bile duct. An alternative model for experimental research. *Invest Radiol*, 24, 758-61.

WAKSMAN, R., ROBINSON, K. A., CROCKER, I. R., WANG, C., GRAVANIS, M. B., CIPOLLA, G. D., HILLSTEAD, R. A. & KING, S. B., 3RD 1995. Intracoronary low-dose beta-irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in the swine restenosis model. *Circulation*, 92, 3025-31.

WIEDMANN, M., HAUSS, J., WITZIGMANN, H. & MÖSSNER, J. 2006. Stellenwert spezieller palliativer Therapieverfahren beim extrahepatischen Gallengangskarzinom. *Der Onkologe*, 12, 1237-1248.

WON, J. H., LEE, J. D., WANG, H. J., HAN, J. H., KIM, J. H., KIM, K. H., PARK, K. B. & ITKIN, M. 2005. Effects of a holmium-166 incorporated covered stent placement in normal canine common bile ducts. *J Vasc Interv Radiol*, 16, 705-11.

WYNN, T. A. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 214, 199-210.

XU, J., GENG, Z. M. & MA, Q. Y. 2003. Microstructural and ultrastructural changes in the healing process of bile duct trauma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2, 295-9.

YAMAGUCHI, T., ISHIHARA, T., SEZA, K., NAKAGAWA, A., SUDO, K., TAWADA, K., KOUZU, T. & SAISHO, H. 2006. Long-term outcome of endoscopic metallic stenting for benign biliary stenosis associated with chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 12, 426-30.

YARNOLD, J. & BROTONS, M. C. 2010. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol*, 97, 149-61.

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Gallengangssystem des Schweins; linkes Bild: schematische Darstellung der Strukturen, rechtes Bild: in Formalin fixierter Gallengang (Püls, 2008)</i>	<i>4</i>
<i>Abbildung 2: Aufbau des Schweine-Gallenganges; E=Lamina epithelialis, LP= Lamina propria; MUS= Lamina Muscularis; D= Drüsen (Glandulae mucosae biliosae), 40x Vergrößerung, HE- Färbung; Spezies: Schwein (Püls, 2008).....</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 3: Bismuth-Corlette Klassifikation der Gallengangsstenosen</i>	<i>8</i>
<i>Abbildung 4: Fibroblasten-Fibrozyten System, Die Vorläuferfibroblasten (MF) differenzieren sich zu postmitotischen Fibrozyten (PMF) (Rodemann, 2006)</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 5: Umwandlung der Fibroblasten zu ausdifferenzierten Myofibroblasten</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 6: Zerfall des stabilen Phosphor-31 nach Neutronenbeschuß. Phosphor-32 geht über einen β^--Zerfall in den Grundzustand des Schwefel-32 über.</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 7: Studienprotokoll der P-Reihe.....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 8: Studienprotokoll der W-Reihe</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 9: Dosisverteilung eines 8,5 F Stents im Gallengangsgewebe rote Linie: die 15 Gray Dosis wird in 2,42 mm von der Stentmitte aus appliziert.....</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 10: Umrechnung der applizierten Gesamtdosis für 21 Tage Liegedauer, Ausgangswert der Berechnung: 7 Tage.....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 11: Simulationsrechnung der Dosisverteilung eines ^{32}P-Folienzylinders nach GEANT4-Simulation im Wasser. Der Stent ist mit einer Phosphor-32 Folie umwickelt. Schnitt durch die Mittelebene des Stents. Die unterschiedlichen Dosen in Gray sind farblich dargestellt. Schwarz: die Position der radioaktiven Folie. Linkes Bild: Zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. habil. Walter Assmann, Fakultät für Physik, LMU München, rechtes Bild: (Püls, 2008).</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 12: Komponenten des Gallengang-Stents, 1. 2 gerollte ^{32}P-PEEK-Folien (zusammen 5 cm), 2. 2 dünne Schrumpfschläuche, 3. Röntgenmarkierung, 4. Doppel-Pig-Tail-Stent</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 13: (1.) Doppel-Pig-Tail, (2.) Mono-Pig-Tail.....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 14: Plexiglasbehälter für den Strahlenschutz, darin der am Anfang der Versuchsreihe verwendete Mono-Pigtail.</i>	<i>41</i>

<i>Abbildung 15: Strahlenschutz während der Stentübergabe. Gezeigt ist der Plexiglaszylinder, der zur Strahlenabschirmung über einen Stent gestülpt ist.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 16: linke Abbildung ERBE-Gerät, rechte Abbildung 10 F Hochfrequenz-Sonde, die in den Gallengang eingeführt wird.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 17: Schwein während Endoskopie.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 18: Heater-Probe (HF-Katheter) im Ductus choledochus.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 19: Cholangiogramm, die 2 Pfeile zeigen die induzierten Stenosen... </i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 20: Ballondilatation der Stenose.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 21: Stenteinlage, zu sehen sind 2 Röntgenmarkierungen.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 22: Übersicht der anatomische Strukturen nach erfolgter Laparotomie.</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 23: Leberpforte mit Darstellung der extrahepatischen Gallenwege. Zu beachten ist die ausgeprägte prästenotische Dilatation des Ductus choledochus sowie des zur Gallenblase führenden Ductus cysticus.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 24: Sondierung des Gallengangs.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 25: Schnittführung der Histoblöcke, linkes Bild vor, rechtes Bild nach Formalinfixierung, I, II und III im Stenosebereich, Referenzblock IV außerhalb des Stenosebereiches.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 26: Vermessung der radiologischen Aufnahmen am Beispiel des Tag 14 (Verifizierung der Stenose und Stenteinlage): 1. Maßstab, in diesem Fall Diameter des Endoskopes, 2. Diameter 1 cm proximal der Stenose, 3. Diameter der Stenose, 4. Diameter 1 cm distal der Stenose.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 27: Vermessung des Gallenganges, 1. Breite der Stenose, 2. Stenoselänge, 3. Breite des Gallenganges proximal der Stenose, 4. Breite des Gallenganges distal der Stenose, 5. Abstand Papille – Stenose</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 28: Ausmessen der Stenosefläche, 10x Vergrößerung, HE-Färbung..</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 29: Ausmessen des Bindegewebes im Stenoseblock I an der dicksten Stelle und außerhalb der Stenose, 10x Vergrößerung, SMA-Färbung</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 30: α-SMA-Score (0/1/2/3), bräunliche Färbung in den Abbildungen spiegelt die Ausprägung der Myofibroblasten wider, 20x Vergrößerung, α-SMA-Färbung.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 31: kollagene Fasern-Score (0/1/2/3), 20x Vergrößerung, EvG-Färbung.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 32: elastische Fasern Score (0/1/2/3), 20x Vergrößerung, EvG-Färbung.....</i>	<i>65</i>

<i>Abbildung 33: Entzündungsscore (0/1/2/3), 40x Vergrößerung, HE-Färbung</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 34: Strahlenschaden: linkes Bild ein unbehandelter Gallengang, rechtes Bild: Strahlenschäden in Form einer Intimafibrose bei einem bestrahlten Gallengang (30 Gray); 40x Vergrößerung, EvG Färbung</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 35: makroskopische Gallengangsvermessung ex-vivo: 1: Referenzmessung, 2: Innendurchmesser Stenose (ID), 3: Länge Stenose, 4: Außendurchmesser Stenose (OD), 5: Durchmesser distal der Stenose, 6: Durchmesser prox. der Stenose, 7: Länge Stenose-Papille, Angabe in mm.</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 36: Strahlenschaden, links 0 Gray, rechts 30 Gray (Intimafibrose der Gefäße).....</i>	<i>98</i>
<i>Abbildung 37: Strahlenschaden, links 0 Gray, rechts 30 Gray (Intimafibrose der Gefäße).....</i>	<i>104</i>

XI. DIAGRAMMVERZEICHNIS

<i>Diagramm 1: radiologische Stenose: Veränderung des Diameters unter Therapie von Tag 14 zu Tag 35 (%) (p=0,158)</i>	72
<i>Diagramm 2: radiologische Stenose (Diameter in mm). Effekt der LDR-Brachytherapie am Tag 35</i>	73
<i>Diagramm 3: Das Diagramm zeigt die Bilirubinwerte (Mittelwert am Tag 35) in Abhängigkeit der verschiedenen Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe. Es besteht keine Signifikanz.</i>	76
<i>Diagramm 4: Bilirubin Tag 14 bezogen auf den radiologischen Stenosegrad Tag 14</i>	77
<i>Diagramm 5: Stenosegradberechnung. Das Wolkendiagramm zeigt alle im Versuch stehenden Tiere mit dem zugehörigen Ausmaß der Stenosefläche (rot= Stenosegrad 2; grün= Stenosegrad 1; schwarzer Kreis= Stenosegrad 0)</i>	78
<i>Diagramm 6: Stenoseflächen (mm²) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray).</i>	80
<i>Diagramm 7: Das Diagramm zeigt die durchschnittlichen Bindegewebsmessungen im Stenoseblock I außerhalb der Stenose in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) und der Kontrollgruppe (0 Gray). Signifikanzen sind mit ihrem Signifikanzniveau angegeben.</i>	81
<i>Diagramm 8: Das Diagramm zeigt die maximalen Bindegewebsmessungen im Stenoseblock I in der Stenose in Abhängigkeit der verschiedenen Dosen (0/15/30 Gray). Signifikanzen sind mit ihrem Signifikanzniveau angegeben.</i>	82
<i>Diagramm 9: Das Diagramm zeigt die Bindegewebsmessungen im Stenoseblock I außerhalb der Stenose „normale Bindegewebe“ in Abhängigkeit der verschiedenen Stenosegrade (0/1/2). Signifikanzen sind mit ihrem Signifikanzniveau angegeben.</i>	83
<i>Diagramm 10: Fibrosegrad (1/2/3) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) und der Kontrollgruppe (0 Gray) (p=0,003).</i>	85
<i>Diagramm 11: Fibrosegrad (1/2/3) in Abhängigkeit der Stenosegrad-Gruppen (0/1/2) (p=0,020).</i>	86
<i>Diagramm 12: α-SMA-Färbung: Vergleich der Kontrollgruppe und der 30 Gray Gruppe (p=0,001).</i>	88
<i>Diagramm 13: α-SMA-Färbung (0/1/2/3) in Abhängigkeit der Dosisgruppen</i>	

<i>(15/30 Gray) und der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,01$).</i>	88
<i>Diagramm 14: kollagene Fasern im Stenoseblock I: Vergleich der Kontrollgruppe und der 30 Gray Gruppe ($p=0,023$).</i>	90
<i>Diagramm 15: kollagenen Fasern (0/1/2/3) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,006$).</i>	91
<i>Diagramm 16: kollagenen Fasern im Stenoseblock I: Vergleich des Stenosegrades 0 und 1 ($p=0,004$).</i>	92
<i>Diagramm 17: elastische Fasern (0/1/2/3) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,906$).</i>	93
<i>Diagramm 18: Entzündung im gesamten Präparat (0/1/2/3) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,008$).</i>	95
<i>Diagramm 19: Dexamethasongabe (rot= mehrmalige Gabe; blau= einmalige Gabe) in Abhängig der Entzündung im gesamten Präparat (0/1/2/3) (nicht ausgefüllte Punkte=keine Glucocorticoid-Gabe).</i>	96
<i>Diagramm 20: Korrelation zwischen den Entzündungszellen im Epithel (0/1/2/3) und den Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,006$).</i>	97
<i>Diagramm 21: Strahlenschäden (0/1) aus Block I in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,044$).</i>	98
<i>Diagramm 22: Bindegewebmessungen im Referenzblock IV in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) und der Kontrollgruppe (0 Gray).</i>	100
<i>Diagramm 23: Das Diagramm zeigt die Werte aller Bindegewebmessungen in mm (blau: maximale Werte, Stenoseblock I; grün: durchschnittliche Werte, Stenoseblock I; grau: Referenzwerte Block IV) in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. Kontrollgruppe (0 Gray).</i>	100
<i>Diagramm 24: Vergleich der kollagenen Fasern in den Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. in der Kontrollgruppe (0 Gray)</i>	102
<i>Diagramm 25: kollagene Faser: Vergleich der 15 und 30 Gray Gruppe ($p=0,005$)</i>	102
<i>Diagramm 26: kollagene Fasern (0/1/2/3) aus Referenzblock IV in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,003$).</i>	103
<i>Diagramm 27: Strahlenschäden (0/1) aus Block IV in Abhängigkeit der Dosisgruppen (15/30 Gray) bzw. der Kontrollgruppe (0 Gray) ($p=0,004$).</i>	104

XII. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Stenosegradeinteilung (0/1/2) anhand der Flächen</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 2: Definition des semiquantitativen Scorings</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 3: Tiere der P-Reihe, die nicht in das Protokoll genommen werden konnten mit Angabe der jeweiligen Ursache</i>	<i>68</i>
<i>Tabelle 4: Tiere der W-Reihe, die nicht in das Protokoll genommen werden konnten mit Angabe der jeweiligen Ursache (Liegedauer nicht eingehalten= <7 Tage)</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 5: applizierte HF-Leistungen und die dazugehörige Tierzahl</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 6: Gallengangsdiameter am Tag 0/14/35, Einteilung in die Kontrollgruppe 0 Gray und Dosisgruppen 15/30 Gray, Gradeinteilung der Stenose:= $1 - (\text{Diameter Stenose} / \text{Diameter proximaler Gallengang})$, Δ= Veränderung.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 7: Gallengangsmessungen am makroskopischen Präparat Tag 35, Einteilung in die Kontrollgruppe 0 Gray und Dosisgruppen 15/30 Gray. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen, ID= Innendurchmesser Stenose, OD= Außendurchmesser Stenose, Breite prox.: Breite des Gallengangs ca. 1 cm proximal der Stenose, Breite dist.: Breite des Gallengangs ca. 1 cm distal der Stenose.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabelle 8: Blutbild und klinische Chemie am Tag 0/14/35, Einteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und Dosisgruppen (15/30 Gray), Angabe der Mittelwerte und Standardabweichung.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabelle 9: Serum Bilirubin am Tag 0/14/35, Einteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und Dosisgruppen (15/30 Gray), Angabe der Mittelwerte und Standardabweichung und die statistischen Signifikanzen von Tag 0 zu Tag 14 und von Tag 14 zu Tag 35.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabelle 10: histologische Stenoseflächen Tag 35, Unterteilung in die Dosisgruppen (15/30 Gray) und Kontrollgruppe (0 Gray); angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung, ebenso die auf die Dosis bezogene Signifikanz.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabelle 11: Einteilung der Tiere in die verschiedenen Stenosegrade und Dosisgruppen mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil..</i>	<i>79</i>
<i>Tabelle 12: durchschnittliche Bindegewebedicke im Stenoseblock I (N),</i>	

<i>Unterteilung in die Dosisgruppen (15/30 Gray) und Kontrollgruppe (0 Gray); angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung, ebenso die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen</i>	80
<i>Tabelle 13: maximale Bindegewebedicke im Stenoseblock I (M), Unterteilung in die Dosisgruppen (15/30 Gray) und die Kontrollgruppe (0 Gray); angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung, ebenso die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen.</i>	82
<i>Tabelle 14: maximale Bindegewebedicke im Stenoseblock I (M), Unterteilung in die Stenosegrad-Gruppen; angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung, ebenso die auf den Stenosegrad bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen.</i>	83
<i>Tabelle 15: Fibrosegrade (FG): Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Tiere in die verschiedenen Fibrosegrade und Dosisgruppen mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.</i>	84
<i>Tabelle 16: Fibrosegrad (FG): Unterteilung in die Stenosegrad-Gruppen; angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf den Stenosegrad bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen, ebenso erfolgt die Einteilung der Tiere in die verschiedenen Fibrosegrade und Stenosegrad-Gruppen mit Angabe der Anzahl und dem prozentualen Anteil.</i>	85
<i>Tabelle 17: α-SMA: Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikanter Unterschiede innerhalb der Gruppen, des Weiteren die Einteilung der Tiere in die verschiedenen α-SMA-Scores und Dosisgruppen mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.</i>	87
<i>Tabelle 18: α-SMA:, Unterteilung in die Stenosegrad-Gruppen; angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), ebenso die auf den Stenosegrad bezogene Signifikanz, des Weiteren erfolgt die Einteilung der Tiere in die verschiedenen α-SMA-Scores und Stenosegrad-Gruppen mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.</i>	89
<i>Tabelle 19: kollagene Fasern: Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und</i>	

<i>die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil) und die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen, des Weiteren erfolgt die Einteilung der Tiere in die verschiedenen Scores kollagener Fasern und Dosisgruppen mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.....</i>	<i>89</i>
<i>Tabelle 20: kollagene Fasern (KF): Unterteilung in die Stenosegrad-Gruppen; angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf den Stenosegrad bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen, ebenso erfolgt die Einteilung der Tiere in die Scores kollagene Fasern und Stenosegrad-Gruppen mit Angabe der Anzahl und dem prozentualen Anteil.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabelle 21: elastische Fasern (EF): Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Tiere in die Scores elastische Fasern (0/1/2/3) und Dosisgruppen bzw. Kontrollgruppe mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.</i>	<i>93</i>
<i>Tabelle 22: Unterteilung in die Stenosegrad-Gruppen; angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf den Stenosegrad bezogene Signifikanz, ebenso erfolgt die Einteilung der Tiere in die Scores elastische Fasern und Stenosegrad-Gruppen mit Angabe der Anzahl und dem prozentualen Anteil.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabelle 23: Entzündung gesamt (EG): Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Tiere in die Scores Entzündung gesamt (0/1/2/3) und Dosisgruppen bzw. Kontrollgruppe mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabelle 24: Entzündung im Epithel (EE): Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Tiere in den Score Entzündung im Epithel (0/1/2/3) und Dosisgruppen bzw. Kontrollgruppe mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.</i>	<i>96</i>
<i>Tabelle 25: Bindegewebedicke im Referenzblock IV (RD), Unterteilung in die Dosisgruppen (15/30 Gray) und Kontrollgruppe (0 Gray); angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung, ebenso die auf die Dosis bezogene</i>	

Signifikanz.....	99
<i>Tabelle 26: kollagene Fasern Referenzblock (KFR): Unterteilung in die Kontrollgruppe (0 Gray) und die Dosisgruppen (15/30 Gray); angegeben ist der Median (25./75. Perzentil), die auf die Dosis bezogene Signifikanz und signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Tiere in die Scores elastische Fasern (0/1/2/3) und Dosisgruppen bzw. Kontrollgruppe mit Angabe der Anzahl und dem jeweiligen prozentualen Anteil.</i>	<i>101</i>
<i>Tabelle 27: Übersichtstabelle aller im Versuch eingesetzten Tiere.....</i>	<i>166</i>
<i>Tabelle 28: Tag 0: Messdaten der radiologischen Auswertung. Maßstab= Führungsdraht oder Endoskop; Dist: Diameter ca. 1 cm distal der Stenose in mm, Heater: Messung in der Heaterposition vor Hitzeapplikation Diameter in mm, prox: Diameter ca. 1 cm proximal der Stenose in mm.....</i>	<i>167</i>
<i>Tabelle 29: Tag 14: Messdaten der radiologischen Auswertung. R= Radioaktivität; Maßstab= Führungsdraht oder Endoskop; Dist: Diameter ca. 1 cm distal der Stenose in mm, Stenose: Diameter der Stenose in mm, prox: Diameter ca. 1 cm proximal der Stenose in mm ; Stenoselänge in mm, % Stenose= 1-(Stenose/Prox.) Score= <= 0,5: keine Stenose: Score 0; >= 0,5: geringgradig: Score 1; >= 0,75: mittelgradig: Score 2; >= 0,9: hochgradig: Score 3</i>	<i>168</i>
<i>Tabelle 30: Messdaten der radiologischen Auswertung. R= Radioaktivität; Maßstab= Führungsdraht oder Endoskop; Dist: Diameter ca. 1 cm distal der Stenose in mm, Stenose: Diameter der Stenose in mm, prox: Diameter ca. 1 cm proximal der Stenose in mm ; Stenoselänge in mm, % Stenose= 1-(Stenose/Prox.) Score= <= 0,5: keine Stenose: Score 0; >= 0,5: geringgradig: Score 1; >= 0,75: mittelgradig: Score 2; >= 0,9: hochgradig: Score 3.....</i>	<i>169</i>
<i>Tabelle 31: Veränderung der Stenose von Tag 14 zu Tag 35.....</i>	<i>170</i>
<i>Tabelle 32: makroskopische Auswertung Tag 35: R= Radioaktivität; Dist: Breite ca. 1 cm distal der Stenose in mm, S-ID= innere Breite der Stenose in mm; S-OD: äußere Breite der Stenose in mm, prox: Breite ca. 1 cm proximal der Stenose in mm; S-Länge= Stenoselänge in mm, % Stenose= 1-(Stenose/Prox.), Score= <= 0,5: keine Stenose: Score 0; >= 0,5: geringgradig: Score 1; >= 0,75: mittelgradig: Score 2; >= 0,9: hochgradig: Score 3.....</i>	<i>171</i>

XIII. BEZUGSQUELLENVERZEICHNIS

1.1. Narkosemittel

- **Azaperon** (Stresnil®), 40 mg/ml) Janssen-Cilag GmbH
- **Ketaminhydrochlorid** (Ketamin Inresa 10ml, 50 mg/ml) Inresa Arzneimittel GmbH
- **Midazolamhydrochlorid** (Midazolam-ratiopharm®, 5 mg/ml) ratiopharm GmbH
- **Propofol** (Propofol 2 %, MCT Fresenius, 20 mg/ml) Fresenius Kabi Deutschland GmbH
- **Isofluran** (Forene®) Abott GmbH & Co. KG

1.2. Sonstige Medikamente

- **Natriumchlorid** (Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Braun, 9 mg/ml) B. Braun Melsungen AG
- **Fluorescein Alcon® 10 %**, Alcon Pharma GmbH, 79108 Freiburg, Deutschland
- **Kontrastmittel Iomeprol** (Imeron®) Bracco Imaging Deutschland GmbH
- **Metamizol-Natrium-Monohydrat** (Novaminsulfon-ratiopharm® 2,5, 0,5 g/ml) ratiopharm GmbH
- **Fentanylcitrat** (Fentanyl®)-JANSSEN 0,5 mg, 50 µg/ml) JANSSEN CILAG GmbH
- **Piritramid** (Dipidolor 15 mg/2ml, 7,5 mg/ml) JANSSEN CILAG GmbH
- **Pancuroniumbromid** (Pancuronium Inresa 4 mg/2ml, 2 mg/ml) Inresa Arzneimittel GmbH
- **Cefuroxim-Natrium** (Cefuroxim Hikma 1500 mg Trockensubstanz) Hikma Pharma GmbH
- **Dexamethasondihydrogenphosphat** (Dexa-ratiopharm 40 mg Injektionslösung

- **Kaliumchlorid, 1M-Kaliumchlorid-Lösung**, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

1.3. Operationsmaterialien

- **Ethicon® Perma-Hand Seide**, (1(4 Ph.Eur.), schwarz, geflochten, nicht resorbierbar) Johnson-Johnson Intl.
- **Suprolene**, (0 USP (3,5 metric), grün, nicht resorbierbar) Resorba
- **Venenverweilkanüle Introcan Safety®-W**, Fa. B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
- **Endotrachealtuben**
Rüschelit® Super Safety Clear, 5.0-7.5, Rüsch GmbH, 71394 Kernen, Deutschland
Mallinckrodt® MLT Tube 5.0-7.5, Mallinckrodt Medical, Atlone, Ireland
- **Einmalspritzen 100 Sterican®**, div. Größen, Fa. B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
- **diverse chirurgische Instrumente**
- **Dreiwegehahn Diskofix®**, C Pressure/ blau LL steril, Fa. B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
- **EKG Elektroden mit Gel Skintact®**, Leonhard Lang GmbH, 6020 Innsbruck, Österreich
- **Laryngoskop-Spatel McIntosh**, P.J.Dahlhausen & Co. GmbH, 50996 Köln, Deutschland
- **Laryngoskopgriff LED**, , P.J.Dahlhausen & Co. GmbH, 50996 Köln, Deutschland
- **Absaughandstück Medi-Vac Yankauer Suction Handle REF KEX 80**, Cardinal Health, Inc.; Medizinisches Lager Klinikum Großhadern
- **Absaugschlauch, Medi-Vac REF NEX 610**, Cardinal Health, Inc.; Medizinisches Lager Klinikum Großhadern

1.4. Operationsgeräte

- **Erbe VIO 300D**, Bipolar, Elektromedizin GmbH, Waldhörnlestrasse 17, 72072 Tübingen, Deutschland
- **Knickstabiler Führungsdrat NITINOL®**, MTW Endoskopie, 46476 Wesel, Deutschland
- **Inflator mit Manometer**, 30 bar, 3-Wege Hochdruck-Hahn, MTW Endoskopie, 46476 Wesel, Deutschland
- **Doppelpigtail-Endoprothese**, Polyethylen, 8,5F, MTW Endoskopie, 46476 Wesel, Deutschland
- **Duodenoskop** (Olympus TJF 160), Olympus Deutschland GmbH, Medizinische Endoskopie, 20097 Hamburg, Deutschland
- **C-Bogen EXOSCOP 8000**, Ziehm Imaging GmbH, 90451 Nürnberg, Deutschland
- **OCT-System**, Fa LightLab, St. Paul, MN 55117, USA
- **probe-based Confocal Laser Endomicroscopy Cellvisio®**, Fa. Mauna Kea Technologie, 75010 Paris, Frankreich
- **Pulsoxymeter Ohmeda BIOX 3700e**, Louisville, CO, USA

1.5. Chemikalien und Reagenzien

- **Roti-Histol**, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- **Ethanol**, alle Alkohole werden in der Hausapotheke der Ludwig-Maximilians-Universität/Innenstadt hergestellt
- **Hämalaunlösung**, Hausapotheke der Ludwig-Maximilians-Universität/Innenstadt
- **Eosin Färblösung**, Sigma-Adrich Chemie GmbH, Steinheim
- **Resorcin-Fuchsin nach Weigert**, Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe
- **HCl Alkohol (Ethanol 70 % + 1Tr. HCl)**, Alkohol s.o. / HCl Merck KGaA 69271 Darmstadt
- **Eisenhämatoxylin (Lsg. A+B)**, Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe

- **Van Gieson Pikrofuchsin**, Morphisto GmbH 60314 Frankfurt am Main

1.6. Immunhistologie

- **Mikrowelle 750W Target Retrieval Solution**, Firma Dako, Cat.No.S1699
- **Protein Block**, Firma Dako, Cat.No.X0909
- **DAB+ Chromogen**, Firma Dako, Cat.No. K3467
- **Hematoxylin Gill's Formula**, (Firma Vector, Cat.No.H-3401)
- **Kaisers Glyceringelatine**, Firma Merck, Cat.No.1.09242.0100

1.7. Laborverbrauchsmaterialien

- **Klingen A35 und N35**, Firma Feather bezogen über die Firma pfm AG, 50996 Köln, Deutschland
- **Objektträger Superfrost plus OT**, Menzel GmbH & Co. KG, 38116 Braunschweig, Deutschland
- **Deckgläser**, Menzel GmbH & Co. KG, 38116 Braunschweig, Deutschland
- **Einbettkassetten**, Menzel GmbH & Co. KG, 38116 Braunschweig, Deutschland
- **Paraffin Paraplast Plus**, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- **Scalpell Feather Disposable Scalpel**, Firma Feather bezogen über die Firma pfm AG, 50996 Köln, Deutschland
- **Kästen für OT 222x171x33 100St./Kasten**, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

1.8. Laborgeräte – Großgeräte

- **Ausgießstation EG 1160**, Firma Leica, 35578 Wetzlar, Deutschland
- **Einbettautomat Hypercenter XP**, Firma Shadon, jetzt Firma Fisha Scientific GmbH, 58239 Schwerte, Deutschland
- **Färbeautomat Histolab Products Combined Slide Stainer 4009**, Firma

Vogel GmbH & Co. KG, 35396 Gießen, Deutschland

- **Microtom, Leica 2035 Jung Biokutt**, Firma Leica Mikroskopsystem GmbH, Nusslich, Deutschland
- **Wasserbad HI 1210**, Firma Leica, 35578 Wetzlar, Deutschland
- **Leica Mikroskop DM IRBE**, Fa. Leica Microsystems, 35578 Wetzlar, Deutschland

1.9. Sonstiges

- **Fresubin®Original, Schokolade**, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 61346 Bad Homburg v.d.H., Deutschland
- **Schweinepelettfutter ssniff**, ssniff Spezialitäten GmbH, 59494 Soest, Deutschland
- **Vermessungsprogramm, freeware**, Datinf@measrure, DatInf GmbH, Tübingen

Tiernummer		Stenoseinduktion	Daten der Untersuchung	per Protokoll	nicht Protokoll	per	Anmerkung
W 110	15	2x20W;5 sec	21.09.09	per Protokoll			
			05.10.09				
			28.10.09				
W 111	0	2x20W;5 sec	21.09.09	per Protokoll			
			05.10.09				
			28.10.09				
W 112	0	2x20W;5 sec	21.09.09	per Protokoll			
			05.10.09				
			28.10.09				
W 113	30	2x20W;5 sec	21.09.09	per Protokoll			
			05.10.09				
			26.10.09				
W 114	30	2x20W;5 sec	21.09.09	per Protokoll			
			05.10.09				
			26.10.09				
W 115	15	2x20W;5 sec	22.09.09	per Protokoll			
			05.10.09				
			26.10.09				
W 116	15	2x20W;5 sec	22.09.09	per Protokoll			
			06.10.09/15.10.09				
			27.10.09				
W 117	15	2x20W;5 sec	22.09.09	per Protokoll			
			06.10.09				
			27.10.09				
W 118	30	2x20W;5 sec	22.09.09	per Protokoll			
			06.10.09				
			27.10.09				
W 119	15	2x20W;5 sec	09.11.09	per Protokoll			
			23.11.09				
			14.12.09				
W 120	30	2x20W;5 sec	09.11.09	per Protokoll			
			23.11.09				
			14.12.09				
W 121	0	2x20W;5 sec	09.11.09		nicht Protokoll	per	Liegedauer nicht eingehalten
			23.11.09/30.11.09				
			14.12.09				
W 122	0	2x20W;5 sec	10.11.09/16.11.09	per Protokoll			
			30.11.09				
			18.12.09				
W 123	30	2x20W;5 sec	10.11.09		nicht Protokoll	per	Euthanasie; Perforation
W 124	0	2x20W;5 sec	16.11.09		nicht Protokoll	per	Liegedauer nicht eingehalten
			30.11.09				
			18.12.09				
W 125	0	2x20W;5 sec	18.01.10	per Protokoll			
			01.02.10				
			22.02.10				
W 126	30	2x20W;5 sec	18.01.10/19.01.10	per Protokoll			
			01.02.10				
			22.02.10				
W 127	15	2x20W;5 sec	18.01.10		nicht Protokoll	per	Liegedauer nicht eingehalten
			01.02.10/05.02.10				
			22.02.10				
W 128	30	2x20W;5 sec	18.01.10		nicht Protokoll	per	Euthanasie; Peritonitis
			23.01.10				
			19.01.10				
W 129	30	2x20W;5 sec	02.02.10/08.02.10		nicht Protokoll	per	Liegedauer nicht eingehalten
			23.02.10				
			19.01.10				
W 130	30	2x20W;5 sec	02.02.10/08.02.10	per Protokoll			
			23.02.10				
			19.01.10				

Tabelle 27: Übersichtstabelle aller im Versuch eingesetzten Tiere.

2. Daten der radiologischen Auswertung

Die folgenden drei Tabellen zeigen die Daten der radiologischen Auswertung aufgeteilt in die drei Operationstage.

Tiernummer	Radioaktivität	Massstab	Dist.	Heater	Prox.	Qual Stenosegrad
P104	0	13,2	5,4	2,5	3,1	keine
W101	0	13,2	10,7	10,1	12,5	keine
W106	0	13,2	5,5	5,5	4,8	keine
W107	0	13,2	6,1	6,5	6,5	keine
W111	0	50,0	3,3	3,4	3,7	keine
W112	0	13,2	6,6	5,6	6,2	keine
W122	0	50,0	6,2	6,4	5,9	keine
W125	0	13,2	5,2	5,4	4,6	keine
P106	15	13,2	8,0	7,5	7,8	keine
P112	15	50,0	8,3	6,4	7,3	keine
W103	15	50,0	6,4	5,5	5,3	keine
W110	15	13,2	8,1	6,4	6,6	keine
W115	15	13,2	6,1	6,7	5,9	keine
W116	15	13,2	5,6	6,9	5,9	keine
W117	15	13,2	4,7	5,1	5,1	keine
W119	15	13,2	6,9	7,5	7,8	keine
P105	30	50,0	7,8	10,0	9,2	keine
W102	30	50,0	4,4	4,9	5,4	keine
W113	30	50,0	5,3	3,5	4,9	keine
W114	30	13,2	4,5	5,2	5,4	keine
W118	30	13,2	5,7	6,3	5,5	keine
W120	30	13,2	7,4	7,6	4,5	keine
W126	30	50,0	7,9	6,4	6,8	keine
W130	30	13,2	6,9	6,4	6,3	keine

Tabelle 28: Tag 0: Messdaten der radiologischen Auswertung. Maßstab= Führungsdraht oder Endoskop; Dist: Diameter ca. 1 cm distal der Stenose in mm, Heater: Messung in der Heaterposition vor Hitzeapplikation Diameter in mm, prox: Diameter ca. 1 cm proximal der Stenose in mm

Tiern.	R	Mass- stab	Dist.	Stenose	Prox.	Stenose- länge	% Stenose	Qual. Stenosegr.	Score
P104	0	13,2	13,8	2,1	12,1	18,7	0,83	mittel	2,0
W101	0	13,2	9,4	3,9	14,0	2,9	0,72	gering	1,0
W106	0	13,2	7,5	1,5	22,4	7,5	0,93	hoch	3,0
W107	0	13,2	6,0	1,3	19,6	4,0	0,93	hoch	3,0
W111	0	13,2	6,2	0,6	10,8	4,3	0,95	hoch	3,0
W112	0	13,2	6,5	2,2	10,5	1,1	0,79	mittel	2,0
W122	0	13,2	6,4	1,4	7,2	1,7	0,80	mittel	2,0
W125	0	13,2	6,2	1,3	16,9	4,2	0,92	hoch	3,0
P106	15	13,2	14,4	1,3	16,6	4,2	0,92	hoch	3,0
P112	15	13,2	12,2	2,3	18,3	3,7	0,87	mittel	2,0
W103	15	13,2	6,8	2,7	19,6	2,1	0,86	mittel	2,0
W110	15	13,2	5,9	1,8	7,4	1,7	0,76	mittel	2,0
W115	15	13,2	10,7	1,4	13,1	1,7	0,89	mittel	2,0
W116	15	13,2	7,1	1,1	7,1	1,7	0,85	mittel	2,0
W117	15	13,2	6,4	1,3	27,2	3,0	0,95	hoch	3,0
W119	15	13,2	11,0	1,5	36,8	1,0	0,96	hoch	3,0
P105	30	13,2	10,1	4,1	19,8	5,4	0,79	mittel	2,0
W102	30	13,2	0,0	0,0	18,6	3,6	1,00	hoch	3,0
W113	30	13,2	7,5	2,6	12,5	1,2	0,79	mittel	2,0
W114	30	13,2	5,8	0,0	19,7	5,8	1,00	hoch	3,0
W118	30	13,2	10,1	2,3	15,6	9,6	0,85	mittel	2,0
W120	30	13,2	6,4	0,6	11,6	5,5	0,95	hoch	3,0
W126	30	13,2	9,7	5,2	8,9	1,1	0,42	keine	0,0
W130	30	13,2	5,6	0,0	14,3		1,00	hoch	3,0

Tabelle 29: Tag 14: Messdaten der radiologischen Auswertung. R= Radioaktivität; Maßstab= Führungsdraht oder Endoskop; Dist: Diameter ca. 1 cm distal der Stenose in mm, Stenose: Diameter der Stenose in mm, prox: Diameter ca. 1 cm proximal der Stenose in mm ; Stenoslänge in mm, % Stenose= 1-(Stenose/Prox.) Score= <= 0,5: keine Stenose: Score 0; >= 0,5: geringgradig: Score 1; >= 0,75: mittelgradig: Score 2; >= 0,9: hochgradig: Score 3

Tiern	R	Mass- stab	Dist	Stenose	Prox	Stenose- länge	% Stenose	Qual. Stenosegrad	Score
P104	0	13,2	6,6	1,9	7,5	16,6	0,75	mittel	2,0
W101	0	13,2	9,5	4,7	17,8	3,2	0,74	gering	1,0
W106	0	13,2	5,3	1,9	15,0	5,6	0,87	mittel	2,0
W107	0	13,2	5,5	2,4	6,6	6,4	0,64	gering	1,0
W111	0	13,2	6,8	5,3	15,0	1,3	0,65	gering	1,0
W112	0	13,2	7,8	3,6	6,5	4,8	0,44	keine	0,0
W122	0	13,2	9,2	3,1	14,7	2,9	0,79	mittel	2,0
W125	0	13,2	5,3	2,3	11,6	4,0	0,80	mittel	2,0
P106	15	13,2		4,2	15,7	7,2	0,73	gering	1,0
P112	15	13,2	12,4	2,1	15,8	5,7	0,87	mittel	2,0
W103	15	13,2	9,5	3,0	15,3	1,4	0,80	mittel	2,0
W110	15	13,2	5,5	1,3	8,4	3,2	0,85	mittel	2,0
W115	15	13,2	8,0	3,9	20,2	1,3	0,81	mittel	2,0
W116	15	13,2	6,1	1,7	10,0	1,3	0,83	mittel	2,0
W117	15	13,2	4,5	3,5	19,4	1,4	0,82	mittel	2,0
W119	15	13,2	9,8	1,8	16,3	6,6	0,89	mittel	2,0
P105	30	1,7	9,2	1,8	14,8	12,2	0,88	mittel	2,0
W102	30	13,2	8,6	1,3	12,9	4,2	0,90	mittel	2,0
W113	30	13,2	12,0	2,5	6,3	1,2	0,60	gering	1,0
W114	30	13,2	6,9	1,1	22,0	5,9	0,95	hoch	3,0
W118	30	13,2	7,7	3,2	12,4		0,74	gering	1,0
W120	30	13,2	5,2	1,8	11,0	6,7	0,84	mittel	2,0
W126	30	13,2	10,2	5,7	10,7	1,8	0,47	keine	0,0
W130	30	13,2	6,2	0,0	0,0		1,00	hoch	3,0

Tabelle 30: Messdaten der radiologischen Auswertung. R= Radioaktivität; Maßstab= Führungsdraht oder Endoskop; Dist: Diameter ca. 1 cm distal der Stenose in mm, Stenose: Diameter der Stenose in mm, prox: Diameter ca. 1 cm proximal der Stenose in mm ; Stenoselänge in mm, % Stenose= 1-(Stenose/Prox.) Score= <= 0,5: keine Stenose: Score 0; >= 0,5: geringgradig: Score 1; >= 0,75: mittelgradig: Score 2; >= 0,9: hochgradig: Score 3

Die folgende Tabelle beschreibt die Veränderung der Stenose von Tag 14 zu Tag 35.

Tiernummer	Radioaktivität	Δ Stenose mm	Δ % Stenose	Δ Stenosegrad
P104	0	-0,22	-0,08	0
W101	0	0,80	0,01	0
W106	0	0,40	-0,06	-1
W107	0	1,10	-0,30	-2
W111	0	4,73	-0,30	-2
W112	0	1,43	-0,35	-2
W122	0	1,65	-0,01	0
W125	0	0,98	-0,12	-1
P106	15	2,86	-0,19	-2
P112	15	-0,22	-0,01	0
W103	15	0,30	-0,06	0
W110	15	-0,50	0,09	0
W115	15	2,42	-0,08	0
W116	15	0,60	-0,02	0
W117	15	2,20	-0,13	-1
W119	15	0,30	-0,07	-1
P105	30	-2,27	0,08	0
W102	30	1,30	-0,10	-1
W113	30	-0,11	-0,19	-1
W114	30	1,10	-0,05	0
W118	30	0,90	-0,11	-1
W120	30	1,21	-0,11	-1
W126	30	0,50	0,05	0
W130	30	0,00	0,00	0

Tabelle 31: Veränderung der Stenose von Tag 14 zu Tag 35

3. Daten der makroskopischen Auswertung

Tiernummer	R	Länge Stenose-	Dist.	S-ID	S-OD	S- Länge	Prox.	Stenose %	Qual. Stenosegrad	Score
P104	0	22,3	10,3	4,5	10,4	3,1	17,8	0,75	gering	1
W101	0	25,8	13,6	4,9	14,3	4,8	19,7	0,75	mittel	2
W106	0	41,1	12,3	3,0	9,0	4,4	28,5	0,89	mittel	2
W107	0	20,9	9,7	2,3	10,8	7,8	17,6	0,87	mittel	2
W111	0	50,2	13,9	3,9	13,4	2,7	29,1	0,87	mittel	2
W112	0	24,5	22,9	2,8	9,4	9,2	14,1	0,80	mittel	2
W122	0	28,8	7,0	3,5	9,3	2,4	10,5	0,67	gering	1
W125	0	23,8	10,0	4,6	11,3	3,7	18,7	0,75	mittel	2
P106	15	9,6	10,7	4,4	12,0	11,0	23,5	0,81	mittel	2
P112	15	9,9	11,2	3,5	8,9	6,9	31,0	0,89	mittel	2
W103	15	4,9	10,6	2,3	6,4	4,4	18,8	0,88	mittel	2
W110	15	26,1	11,0	2,3	8,2	4,2	12,3	0,81	mittel	2
W115	15	38,8	10,8	5,8	11,8	4,0	11,0	0,47	keine	0
W116	15	38,4	8,1	3,1	9,1	6,8	24,7	0,87	mittel	2
W117	15	43,9	7,8	2,8	10,1	1,9	18,2	0,85	mittel	2
W119	15	43,6	13,1	3,2	11,6	5,9	13,1	0,76	mittel	2
P105	30	18,1	6,1	2,5	6,8	8,6	25,5	0,90	hoch	3
W102	30	7,8	11,1	3,1	9,3	15,5	28,0	0,89	mittel	2
W113	30	26,4	17,5	2,4	9,7	11,2	17,9	0,87	mittel	2
W114	30	33,5	11,5	1,2	6,9	8,8	21,5	0,94	hoch	3
W118	30	40,5	11,1	3,1	11,7	4,8	20,0	0,85	mittel	2
W120	30	30,9	16,8	2,7	12,7	11,1	22,6	0,88	mittel	2
W126	30	34,0	23,2	5,8	21,2	3,7	19,7	0,70	gering	1
W130	30	34,6	7,1	1,5	5,2	3,7	20,1	0,93	hoch	3

Tabelle 32: makroskopische Auswertung Tag 35: R= Radioaktivität; Dist: Breite ca. 1 cm distal der Stenose in mm, S-ID= innere Breite der Stenose in mm; S-OD: äußere Breite der Stenose in mm, prox: Breite ca. 1 cm proximal der Stenose in mm; S-Länge= Stenosenlänge in mm, % Stenose= 1-(Stenose/Prox.), Score= <= 0,5: keine Stenose: Score 0; >= 0,5: geringgradig: Score 1; >= 0,75: mittelgradig: Score 2; >= 0,9: hochgradig: Score 3

XV. DANKSAGUNG

- Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. R. Köstlin danke ich herzlich für die Übernahme der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Bei Herrn Dr. rer. nat. Walter Assman (Lehrstuhl für Experimentalphysik/Kernphysik Fakultät für Physik der LMU München) möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas, die stets freundliche und liebevolle Unterstützung und Beratung während all der Phasen des Projektes und die engagierte Korrekturlesung der Arbeit bedanken.
- Ein großes Dankeschön gilt der Medizinischen Poliklinik II der LMU München für die fachspezifische Betreuung. An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Schirra für die Durchführung der Tierversuche, die Hilfsbereitschaft und das große Engagement, das Projekt zu einem erfolgreichen Ergebnis zu führen. Hervorzuheben die stets konstruktive Kritik, die intensive Betreuung dieser Dissertation und die detaillierte Korrekturlesung dieser Arbeit.
- Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Claus Schäfer und Prof. Dr. Andreas Wagner (Medizinischen Poliklinik II der LMU München) für ihr Engagement und die Durchführung der Tierversuche.
- Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. Ronald Sroka (Laser-Forschungslabor im LIFE-Zentrum, LMU München) für die Aufnahme in dem Laser-Forschungslabor und seine menschliche Hilfe und Unterstützung, die mir in dieser Zeit sehr geholfen haben.
- Weiterhin möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. D. Mayr (Pathologisches Institut der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern) ganz herzlich bedanken, die mir bei der Auswertung der histologischen Präparate stets mit Rat und Tat zur Seite stand.
- Prof. Dr. med. K.-R. Trott, University College London Cancer Institute und PD Dr. med. J. Kummermehr, Strahlenbiologisches Institut der LMU München danke ich für die freundliche und engagierte Beratung und die

Anregungen beim Erstellen dieser Arbeit.

- Frau Kathrin Siegrist, (MTA, Laser-Forschungslabor im LIFE-Zentrum, LMU München) für das Schneiden der Gewebeblöcke, die Anleitung zur histologischen Aufbereitung der Präparate, die persönliche Betreuung sowie für ihre jederzeit freundliche und engagierte Hilfe und ihre Freundschaft.
- Ein großes Dankeschön geht an die liebe Endoskopieschwester Silke Hermann und die betreuenden Tierärzte Michael Thormann und Christine Rothe.
- Der Bayerischen Forschungsstiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung des BetaMod-Projektes und dementsprechend meiner Unterstützung in den letzten Jahren.
- Meiner Doktorarbeitskollegin aber vor allem Freundin Ricarda Becker danke ich für ihre Kollegialität, die immer wiederkehrenden Aufmunterungen, ihre Unterstützung und vor allem ihre Freundschaft.
- Besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken. Ohne ihre liebevolle Unterstützung in dieser Zeit, ihr uneingeschränktes Vertrauen und ihre Geduld wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ich habe ihnen nahezu alles zu verdanken!