

Universitätsklinik für Urologie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. A. Stenzl

Untersuchung der Eindringtiefe von Micropartikeln durch
Wasserstrahlapplikation in porciner Urethra

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu
Tübingen

Vorgelegt von

Schreiber, Johanna

2020

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Wilhelm K. Aicher

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. Karl-Ernst Grund

Tag der Disputation: 29.04.2020

Inhalt

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	15
2.1. Material	15
2.1.1. Geräte.....	15
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.3. Reagenzien	16
2.1.4. Software	16
2.2. Methoden	17
2.2.1. Sprühapplikation	17
2.2.1.1. Präparation des Gewebes	17
2.2.1.2. Versuchsaufbau	19
2.2.1.3. Applikation und Weiterverarbeitung.....	21
2.2.1.4. Schneiden der Gefrierblöcke	22
2.2.2. Färbungen	22
2.2.3. Azan Färbung.....	23
2.2.4. Antikörperfärbung mit α -fast Myosin und Desmin	23
2.2.5. Mikroskopische Auswertung und Beurteilung der Schnitte.....	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Etablierungsversuch mit verschiedenen Druckstärken im Bereich von Injektionsprotokoll 1, 2 und 3	26
3.2. Injektionsversuche mit Injektionsprotokoll 1	27
3.2.1. Injektionsversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 1 an der präparierten Harnröhre von Versuchstier Schwein H	27
3.2.1.1. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein H nach Applikation mit Injektionsprotokoll 1, auf Höhe H5	28
3.2.1.2. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein H nach Applikation mit Injektionsprotokoll 1, auf Höhe H10	29
3.3. Injektionsversuche mit Injektionsprotokoll 2	30
3.3.1. Fehlversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 2	30
3.3.2. Injektionsversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 2 an der präparierten Harnröhre von Versuchstier Schwein U	31

3. 3. 2. 1.	Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein U nach Applikation mit Injektionsprotokoll 2, auf Höhe H5	32
3. 3. 2. 2.	Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein U nach Applikation mit Injektionsprotokoll 2, auf Höhe H10	33
3. 3. 2. 3.	Übersicht über die mit Injektionsprotokoll 2 durchgeführte Versuchsreihe	34
3. 4.	Injektionsversuche mit Injektionsprotokoll 3	36
3. 4. 1.	Injektionsversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 3 an der präparierten Harnröhre von Versuchstier Schwein W	37
3. 4. 1. 1.	Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein W nach Applikation mit Injektionsprotokoll 3, auf Höhe H5	38
3. 4. 1. 2.	Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein W nach Applikation mit Injektionsprotokoll 3, auf Höhe H10	39
3. 4. 2.	Injektionsversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 3 an der präparierten Harnröhre von Versuchstier Schwein V	40
3. 4. 2. 1.	Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein V nach Applikation mit Injektionsprotokoll 3, auf Höhe H5	41
3. 4. 2. 2.	Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein V nach Applikation mit Injektionsprotokoll 3, auf Höhe H10	42
3. 4. 3.	Übersicht über die mit Injektionsprotokoll 3 durchgeführte Versuchsreihe	43
3. 5.	Injektionsversuchsreihe mit Histofarbe und Injektionsprotokoll 2	45
3. 5. 1.	Injektionsversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 2 an der präparierten Harnröhre von Versuchstier Schwein B1 und Versuchstier Schwein C1	46
3. 5. 2.	Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein B1 nach Applikation mit Injektionsprotokoll 2, auf Höhe H5	48
3. 5. 3.	Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein B1 nach Applikation mit Injektionsprotokoll 2, auf Höhe H10	49
3. 5. 4.	Übersicht über die Versuchsreihe mit Histofarbe	50
3. 6.	Übersicht über die Ergebnisse	51
4.	<i>Diskussion</i>	52
4. 1.	Erster Fehlversuch bei der Versuchsreihe mit Injektionsprotokoll 2	52
4. 2.	Orientierung der quergestreiften Muskelschicht	52
4. 3.	Anatomische Unterschiede zwischen Mensch und Schwein und die damit verbundenen Komplikationen beim Experiment	55

4. 4.	Partikelverteilung im Gewebe	59
4. 5.	Mögliche Gewebsschädigungen	61
4. 6.	Zellüberlebensrate bei verschiedenen Injektionsprotokollen	63
4. 7.	Mechanische Obstruktion durch Gewebsschwellung	63
5.	<i>Zusammenfassung</i>	64
6.	<i>Danksagungen</i>	66
	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	67
	<i>Literaturverzeichnis</i>	72
	<i>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift</i>	77

Für meine Eltern Christine und Klaus und meine Schwester Magdalena.

Ich danke euch für eure Unterstützung.

1. Einleitung

Inkontinenz ist ein weitverbreitetes medizinisches Problem, ein Problem, das oft als nicht kausal behandlungsbedürftige Alterserscheinung abgetan wird. Über den Zeitraum des Lebens betrifft Inkontinenz ca. 15% der Frauen und 10% der Männer.¹ Mit der steigenden Lebenserwartung steigt auch der Anteil an Patienten und Patientinnen, die unter dieser Problematik leiden, da es zu den klassischen Krankheitsbildern des Alters gehört.

Inkontinenz hat viele Ursachen. Bei Frauen sind diese oft die Spätfolgen von Geburtstraumata und Schwangerschaft. Jedoch trägt auch Übergewicht zur vermehrten Belastung und Senkung des Beckenbodens bei.² Besonders bei der weiblichen Bevölkerung konnte man feststellen, dass oft eine geschwächte und asymmetrische Kontraktionsfähigkeit des Beckenbodens eine Rolle bei der Entwicklung einer Stressinkontinenz spielt.³ Stressinkontinenz oder auch Belastungsinkontinenz bezeichnet den unwillkürlichen Urinverlust bei körperlicher Belastung oder erhöhtem intraabdominalem Druck ohne Detrusorkontraktion, wie zum Beispiel beim Husten oder Lachen. Es ist die häufigste Ursache für unfreiwilligen Urinverlust bei Frauen. Weitere Formen der Inkontinenz umfassen die Dranginkontinenz, welche definiert ist als unwillkürlicher Urinverlust in Begleitung von imperativem Harndrang. Dabei kommt es zu einer gesteigerten Blasenentleerungsfrequenz und auch nächtlichem Harndrang, hierbei ist auch eine gesteigerte Detrusorkontraktion zu beobachten. Des Weiteren kann auch die neurogene Detrusorhyperaktivität mit Harninkontinenz ein Grund für ungewollten Urinverlust sein, wenn eine urodynamisch gesicherte Detrusorhyperaktivität in Kombination mit einem neurologischen Korrelat vorliegt. Im Übrigen sind auch Mischformen der verschiedenen Inkontinenzarten möglich.^{4,5}

¹ Aicher *et al.* (2014, p. 197)

² Amend *et al.* (2015, p. 2171)

³ Wallner *et al.* (2009, p. 933)

⁴ Gasser (2014, p. 146)

⁵ Hautmann and Gschwend (2014, p. 117)

Aber auch Veränderungen der Zusammensetzung des Gewebes, wie der Verlust an Muskel- und Nervenzellen spielen eine Rolle für die Entstehung.⁶ Bei Männern liegen zur Entstehung der Blaseninkontinenz primär die Folgen nach chirurgischen Resektionen nach Benigner Prostata Hyperplasie und Prostata Karzinomen im Fokus.⁷ Das Prostata-Karzinom ist immer noch das häufigste Malignom beim Mann und die zweithäufigste Krebserkrankung weltweit.⁸ Die Prävalenz für das Prostata-Karzinom ist stark gestiegen in den letzten Jahren; dies liegt einerseits an der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung und andererseits an den verbesserten und weitläufig durchgeführten Screeningmethoden.⁹ Nachdem radikale Resektionsoperationen oder auch vollständige Prostatektomien immer noch der Standard einer Behandlung sind, kommt es häufig, trotz immer weiter verbesserter OP-Techniken, zu schwerwiegenden Schädigungen des umliegenden Gewebes und auch der Nerven- und Gefäßbahnen. Oft resultieren diese Gewebsschädigungen schlussendlich in einer Fibrose des quergestreiften Sphinktermuskels, der maßgeblich an der Kontinenzhaltung beteiligt ist.¹⁰ Des Weiteren haben ältere Männer in unserer Gesellschaft oft mit Vernarbungen und Strikturen im Bereich des unteren Harntraktes zu kämpfen. Da das Problem meist durch chirurgische Eingriffe eher verschlimmert wird, wird auch in diesem Bereich große Hoffnung auf Tissue Engineering und Stammzellen, daher eine Regeneration mittels biologischer Hilfsmitteln und körpereigener Mechanismen, gesetzt.¹¹ Aber auch nervale Schädigungen durch Bestrahlung oder anders bedingter Nervenschädigungen spielen eine Rolle.¹² Oft ist die strukturelle Veränderung des Gewebes ein Prozess, der über längere Zeit erfolgt. Muskelzellen atrophieren und werden durch Bindegewebe ersetzt. Der ganze Halte- und Entleerungsapparat verliert somit an Stabilität und Funktion.¹³ Besonders da der äußere Sphinktermuskel keinerlei knöcherne Verankerungspunkte besitzt,

⁶ Aicher *et al.* (2014, p. 198)

⁷ Amend *et al.* (2017, p. 1723)

⁸ Yiu *et al.* (2016, p. 392)

⁹ Gotoh *et al.* (2018)

¹⁰ Yiu *et al.* (2016, p. 393)

¹¹ Aufderklamm *et al.* (2017, p. 1125)

¹² Amend *et al.* (2017, p. 1723)

¹³ Aicher *et al.* (2014, p. 197)

sondern seine Stabilität lediglich durch die enge Verbindung mit der Beckenbodenmuskulatur und dem *M. levator ani* erhält, kann es durch Erschlaffung und Schwächung des umliegenden Gewebes zu einer Dysfunktion kommen.¹⁴ Der *M. levator ani* selbst besteht hauptsächlich aus Typ 1 Muskel Fasern, so genannten S-Fasern oder auch „*slow twitch*“ Fasern, welche langsam ermüden und generell vom Alterungsprozess weniger betroffen sind. Typ 2 Muskelfasern hingegen werden auch F-Fasern, kurz für „*fast twitch*“ Fasern genannt. Sie zeichnen sich durch eine schnelle Kontraktionsfähigkeit aus, ermüden jedoch auch schnell.^{15,16} Der externe Sphinkter hat beim Menschen ebenfalls einen Anteil von fast 66% Typ 1 Fasern, im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Zusammensetzung stark von anderen Säugetieren, wie zum Beispiel dem Hund, bei dem Typ 1 Fasern am externen Sphinkter lediglich einen Anteil von 24% ausmachen.¹⁷ Bei einer Studie an jungen, nulliparen und älteren, multiparen Hasen wurde die Annahme gestärkt, dass im Alter eine selektive Atrophie der Typ 2 Fasern oder sogar eine Umwandlung von Typ 2 zu Typ 1 Fasern erfolgen könnte.¹⁸ Eine weitere Theorie zur Entstehung von Inkontinenz besagt, dass die vaginale Wand, die pubourethralen Ligamente und der *M. Pubococcygeus* zusammen wirken und bei der Blasenhalsoffnung und -schließung eine Rolle spielen. Bei fortgeschrittener Erschlaffung der vaginalen Wand im Rahmen von verändertem Kollagen oder Elastin kann die Urethra nicht gegen die pubourethralen Ligamente gezogen werden und somit resultiert ein unzureichender urethraler Druck der in einer Stressinkontinenz enden kann.¹⁹ Des Weiteren gibt es Studien, die zeigen, dass bei einigen Patienten erhöhte Expressionsraten von Kollagen abbauenden Proteinen gefunden wurden, welche zusätzlich eine Schwächung des Beckenbodens herbeiführen können.²⁰ Inkontinenz birgt jedoch viele medizinische und nicht medizinische Problematiken in sich, die den Alltag der Betroffenen sehr einschränken können.

¹⁴ Wallner *et al.* (2009, p. 942)

¹⁵ Chermansky and Moalli (2016, p. 46)

¹⁶ Christiansen *et al.* (2019)

¹⁷ Rodriguez-Veiga *et al.* (2004)

¹⁸ Sohei Tokunaka, Hiromitsu Fujii, Hiroshi Hashimoto, Sunao Yachik (1992)

¹⁹ Chermansky and Moalli (2016, p. 47)

²⁰ Eberli *et al.* (2012, p. 2096)

Durch körperliche Veränderungen wie benigne Prostatahyperplasie beim Mann und östrogenmangelbedingte Schleimhautatrophie bei der postmenopausalen Frau steigt das Infektionsrisiko. Auch die Sturzgefahr durch Nykturie wird besonders bei älteren Patienten zu einer Gefahr.^{21,22} Auch durch die weitestgehend noch nicht vollständig geklärten Arzneimittelinteraktionen sind besonders ältere, multimorbide Patienten gefährdet, einen gesundheitlichen Nachteil von multifaktoriellen pharmazeutischen Therapien zu erleiden. Im Schnitt haben Patienten ab ihrem 80. Lebensjahr bis zu 8,4 Organdiagnosen vermerkt und über 50% der über 85-Jährigen nehmen regelmäßig mehr als vier verschiedene Medikamente ein. Die Zahl der tatsächlichen Interaktionen zwischen Medikamenten liegt bereits bei 4 verschiedenen Wirkstoffen bei 30%.²³ Dabei gibt es ein großes Spektrum an Medikamenten, die durch ihren Wirkstoff auch in die Funktion des Harntraktes eingreifen und die Kontinenzlage beeinflussen. So wird zum Beispiel die Detrusorkontraktilität durch nicht steroidale Antirheumatika und Morphine bereits reduziert. Benzodiazepine tragen dazu bei, dass der Beckenboden relaxiert ist. Zusätzliche Substanzgruppen wie auch Antidementiva, die am synaptischen Spalt wirken, greifen auch maßgeblich in die Detrusorfunktion ein.²⁴ In Anbetracht dessen, dass die Nieren- und Leberfunktion im fortgeschrittenen Alter häufig reduziert ist, liegt auch nahe, dass die Verstoffwechslung dieser Substanzen mehr Zeit in Anspruch nimmt und daher die Halbwertszeit im Körper sich deutlich verlängert.²⁵

Aber auch der soziale Aspekt, der mit dieser Erkrankung einhergeht, ist nicht zu vernachlässigen. Oft bedeutet der unwillentliche Verlust von Urin im Alltag für Betroffene gesellschaftlichen Ausschluss. Da dieses Thema oft schambesetzt ist, entziehen sich viele Personen dem sozialen Leben.²⁶ Zusätzlich zu diesen Faktoren kommen auch die Kosten hinzu, die dadurch verursacht werden. Nicht nur in der Medizin wird durch Physiotherapie, Medikamentengaben und anderen Behandlungsmaßnahmen viel Geld in diesem Bereich verbraucht, sondern auch

²¹ Wiedemann (2016, p. 44)

²² Wiedemann (2016, p. 44)

²³ Wiedemann (2016, p. 43)

²⁴ Wiedemann (2016, p. 43)

²⁵ Wiedemann (2016, p. 43)

²⁶ Aicher *et al.* (2014, p. 198)

privat müssen Betroffene mit hohen Kosten für Einlagen und andere Verbrauchsmaterialien rechnen. Die Kosten für Vorlagen, Windeln, Betteinlagen und Ähnliches werden in der Bundesrepublik Deutschland auf ca. eine halbe Milliarde Euro pro Jahr geschätzt.²⁷

Zu den Behandlungsmethoden, die im Moment verfügbar sind, zählen die medikamentöse Therapie, Physiotherapie, Elektrostimulation und chirurgische Eingriffe. Physiotherapie und Elektrostimulation haben den Hintergrund, dass die vorhandene Muskulatur gestärkt und die Innervation durch neuronale Aktivierung verbessert wird.²⁸ Dies setzt jedoch eine gewisse Compliance voraus und muss frühzeitig begonnen werden. Jedoch spielen auch Gewichtsreduktion und die lokale Applikation von Hormonen eine Rolle in den konservativen Therapiekonzepten. Zusätzlich sind auch Pessare, die ebenfalls mit einer Östrogencreme eingeführt werden, in Gebrauch.²⁹

Wenn die konservativen Methoden nicht mehr helfen, wird auf chirurgische Maßnahmen zurückgegriffen. Dazu zählen Injektionen mit sogenannten Bulking Agents, die atrophiertes Gewebe aufpolstern sollen und somit für mehr Halt sorgen und dem Absinken der Beckenorgane entgegenwirken sollen. Dabei werden unter zystoskopischer Kontrolle, drei bis vier kleine Depots paraurethral unter lokaler Betäubung eingespritzt, die den Verschluss der Urethra fördern sollen.³⁰ In Europa ist dabei Polyacrylamidhydrogel (PAHG) die am häufigsten verwendete Substanz.³¹ Weitere Substanzen, die als Bulking Agents eingesetzt werden, sind Polytetrafluoroethylene, Rinderkollagen, Silikonpartikel und autologes Fett.³² Neuere Studien zeigen jedoch die eher niedrige Effizienz einer Behandlung mit Bulking Agents auf.³³ Dies begründet sich einerseits durch die zeitliche Begrenzung der Wirksamkeit und andererseits durch die potenziellen Nebenwirkungen der Behandlung. Dabei kann es zu chronischen Entzündungen,

²⁷ Vaegler *et al.* (2014, p. 354)

²⁸ Amend *et al.* (2015, pp. 2171–2172)

²⁹ Rautenberg *et al.* (2017)

³⁰ Rautenberg *et al.* (2017)

³¹ Rautenberg *et al.* (2017)

³² Kim *et al.* (2011, p. 110)

³³ Burdzińska *et al.* (2013, p. 743)

allergischen Reaktionen, periurethralen Abszessen, Arrosionen der Harnblase oder Urethra und Obstruktionen kommen.³⁴

Aber auch Operationen zur Straffung des Bandhalteapparates bei Frauen werden durchgeführt. Sogenannte Tensionfree Vaginal Tapes oder Slings kommen zum Einsatz und sollen die Kontinenz unterstützen oder wiederherstellen.³⁵ Auch wenn diese Operationen mittlerweile zum Goldstandard bei gescheiterten konservativen Therapieversuchen geworden sind, bergen sie einige mögliche Komplikationen. Neben der Gefahr einer Blasenperforation, Blutungen, Infektionen, Harnverhalt und weiterhin bestehender Stressinkontinenz, klagen Patientinnen und Patienten im Verlauf oft über chronische Schmerzen und Dyspareunie, die häufig durch eine falsche Lage des eingesetzten Bandes verursacht werden.³⁶ Zusätzlich wurden artifizielle Sphinkter entwickelt, die den spontanen Harnfluss durch Druck auf die Urethra unterbinden sollen. Jedoch sind diese artifiziellen Sphinktere oft eine technische Herausforderung für ältere Menschen und mit drastischen Lebensstiländerungen einhergehend.³⁷ All diese Behandlungsmethoden zeigen gewisse Erfolge, sind jedoch auch mit zahlreichen Risiken verbunden. Jede Operation und jeder Eingriff in die Anatomie des Menschen kann Reizungen, Entzündungen und andere Reaktionen auf das körperfremde Material hervorrufen. Im schlimmsten Fall müssen die eingesetzten Materialien auf Grund dieser Reaktionen bei einem zusätzlichen Eingriff wieder entfernt werden. Und doch behandeln diese Methoden nicht den eigentlichen Grund für die Inkontinenz, den Untergang von Nerven- und Muskelzellen.³⁸

Der neue Ansatz, Harninkontinenz mit dem Einsatz von mesenchymalen Stromazellen (MSC) behandeln zu können, gibt dabei Hoffnung. Als kausale Therapie des Untergangs von Muskelzellen könnte die Platzierung von Stromazellen in diesem Bereich nicht nur eine Linderung der Symptomatik bringen, sondern sogar Heilung.

³⁴ Mitterberger *et al.* (2007, p. 1740)

³⁵ Amend *et al.* (2015, pp. 2171–2172)

³⁶ Rautenberg *et al.* (2017)

³⁷ Yiou *et al.* (2016, p. 393)

³⁸ Vaegler *et al.* (2014, p. 355)

Zum jetzigen Zeitpunkt wurden bereits zahlreiche Studien zu diesem Thema durchgeführt. Dabei ergaben sich jedoch verschiedene Probleme. Einerseits stellt sich die Frage, welches Versuchstier sich am besten eignet, um sowohl die Problematik der Inkontinenz, als auch die möglichen Therapieversuche darstellen zu können und andererseits ergibt sich das Problem, wie sich eine iatrogen hervorgerufene Inkontinenz, die der im klinischen Alltag vorkommenden Schädigung beim Menschen am nächsten kommt, am Versuchstier umsetzen lässt. So wurden bereits Versuche an Ratten, bei denen die Inkontinenz durch beidseitige Durchtrennung des *N. pudendus* hervorgerufen wurde, durchgeführt. Hierbei wurde bei den Versuchstieren, die mit mesenchymaler Stammzellinjektion in den äußeren Sphinkter behandelt wurden, eine deutliche Verbesserung des Leak Point Pressure, also jenem Druck, bei dem eine sichtbare Leckage der Urethra bei konstanter Befüllungsrate der Blase auftritt, festgestellt.^{39,40} Eberli et al. führten eine Versuchsreihe an Hunden durch, bei welchen durch mikrochirurgische Entfernung des Sphinkters Inkontinenz hervorgerufen wurde. Hierbei war besonders die Größe der Tiere, als auch die Gewebserneuerungsrate von Vorteil. Während die Gewebswachstumsrate bei Schweinen und Schafen sich rasch steigert, bleibt die Wachstumsrate beim Hund konsistent über das adulte Leben. Die Gewebserneuerungsrate ist ein Faktor, der das Monitoring der Inkontinenz deutlich erschwert.⁴¹ Eine weitere Versuchsreihe wurde mit Ziegen durchgeführt. Da Stressinkontinenz häufig eine Alterserscheinung ist, wurden hierzu 6 Jahre alte Tiere ausgewählt, um die Umstände der klinischen Situation am ähnlichsten zu gestalten. Ähnlich wie bei Menschen, Hunden und Schweinen besteht auch bei der Ziege keine direkte Verbindung zwischen dem äußeren Sphinkter und dem Beckenboden. Zusätzlich beträgt die durchschnittliche Länge der Urethra bei der Ziege ca. 4cm und ist somit eher mit der Länge der weiblichen Harnröhre beim Menschen vergleichbar.⁴²

Das Schwein ist für die Forschung unter verschiedenen Blickpunkten interessant

³⁹ Corcos *et al.* (2011, p. 447)

⁴⁰ Kinebuchi *et al.* (2010, pp. 360–361)

⁴¹ Eberli *et al.* (2009, p. 251)

⁴² Burdzinska *et al.* (2017, p. 583)

als Versuchstier. Ausgewachsene Exemplare des Landrasseschweines können bis zu über 100kg wiegen und dies bereits nach wenigen Monaten. Dadurch ist die Anatomie vergleichbarer bezüglich der Größe zum Menschen. Zusätzlich können durch diesen Vorteil auch die gleichen Operationsinstrumente genutzt werden. Ein weiterer Faktor, der das Schwein zu einem geeigneten Versuchstier für die Stammzellinjektionen macht, ist die Faserzusammensetzung des quergestreiften Sphinkters der Urethra. Ähnlich wie beim Menschen sind hier vorwiegend Typ 1 Fasern, also langsam und tonisch kontraktierende Fasern vorzufinden. Bei anderen Säugetieren und besonders Nagetieren können hier weitaus größere prozentuale Anteile an Typ 2 Fasern gefunden werden.⁴³ Des Weiteren bot sich für die von uns durchgeführte Versuchsreihe dabei an, Kadavergewebe von Schlachttieren aus einem lokal gelegenen Schlachthof zu beziehen. Bezüglich der Fragestellung, wie der Sphinkterapparat idiopathisch so geschädigt wird, dass es dem klinischen Bild einer Stressinkontinenz entspricht, wurden ebenfalls mehrere Studien durchgeführt. Bisher erprobte Ansätze sind die Elektrokauterisierung und die mikrochirurgische, partielle Sphinkterektomie. Jedoch sind beide Methoden mit einer rein lokalen Schädigung verbunden, die nur selten im klinischen Alltag auftritt. Die Urethradistension, meist mittels Ballonkatheter, der durch die Urethra gezogen wird, ruft eine zirkuläre Schädigung hervor. Dies wäre ein vergleichbares Trauma zur vaginalen Geburt und somit weitaus näher an der klinischen Situation.^{44,45} Es wurden auch Versuchsreihen mit dem Ansatz, den Muskel chemisch durch ein Myotoxin zu schädigen, durchgeführt.⁴⁶ Ziel bei all diesen Studien ist es, endlich eine geeignete Therapie für die Stressinkontinenz zu finden. Es wurden auch Therapieversuche am Menschen mit bereits vorbestehender Inkontinenz in einem kurativen Ansatz unternommen. In einer in Kanada durchgeführten Studie wurden bei 8 an Inkontinenz leidenden Frauen Injektionsversuche zirkulär in der Harnröhre unternommen. 3 Probandinnen schieden frühzeitig aus der Studie aus. Bei allen verbleibenden

⁴³ Zini *et al.* (2006, p. 2734)

⁴⁴ Burdzińska *et al.* (2012, pp. 680–681)

⁴⁵ Eberli *et al.* (2009, p. 252)

⁴⁶ Yiou *et al.* (2002, p. 298)

Probandinnen konnte eine Verbesserung, nachgewiesen durch einen Pad Test, bestätigt werden. Der Pad Test umfasst das Wiegen von Inkontinenzeinlagen um die Menge des unabsichtlich verlorenen Urins zu messen. Bei einer Patientin wurde sogar eine komplette Kontinenz wiederhergestellt.⁴⁷ Gotoh et al. führten 2014 eine Studie mit 11 Patienten mit Zustand nach Prostata-Resektion durch. Hierbei wurden von Adipozyten abgeleitete, regenerative Zellen im Bereich des Rhabdosphinkters und der Submukosa injiziert. Nach einem Jahr zeigte sich in der Folgeuntersuchung eine deutliche Verbesserung der Kontinenzlage. Zusätzlich konnte in dieser Studie eine gesteigerte Durchblutung im Bereich der Injektion auch nach einem Jahr noch im Ultraschall nachgewiesen werden. Und auch ein Bulking Effekt wurde festgestellt, der durch das injizierte Fettgewebe paraurethral im MRT für 3 Monate nach der Behandlung sichtbar war.⁴⁸ Eine spätere Studie zeigt bei 10 von 13 Patienten mit Inkontinenz nach Prostata-Resektion, welche periurethrale Injektionen mit von Adipozyten-abstammenden, regenerativen Zellen erhielten, eine deutliche Verringerung des Gewichts im Pad Test und somit eine deutliche Verbesserung der Inkontinenz.⁴⁹ Yamamoto et al. zeigten in einer Studie 2012 auf, dass die von Adipozyten abstammenden, regenerativen Zellen sich nicht nur nach der Injektion zu reifem Fettgewebe entwickeln können, sondern eventuell sogar zu kontraktile Zellen mit Eigenschaften von glatter Muskulatur. Auch eine Reihe anderer, möglicherweise hilfreicher Eigenschaften, die den Heilungsprozess unterstützen könnten, wie zum Beispiel die Freisetzung von Zytokinen, welche die Angiogenese fördern, werden diskutiert.⁵⁰ Lee et al. untersuchten bereits im Jahr 2001, ob es einen Unterschied zwischen der Injektion von reifem Fettgewebe und der Injektion von Salzlösung gibt, und kamen zu dem Ergebnis, dass kein Unterschied zu finden ist.⁵¹ Andere Studien haben sich mehr auf muskuläre Stammzellen fokussiert. Eine weitere Studie konnte zusätzlich nach 2 Jahren eine 75% Verbesserungsrate bei 16 Patienten, die mit aus dem Oberarm gewonnenen vom Muskel abgeleiteten Zellen bei bestehender Inkontinenz behandelt wurden,

⁴⁷ Carr *et al.* (2008, p. 882)

⁴⁸ Gotoh *et al.* (2014, p. 297)

⁴⁹ Gotoh *et al.* (2018)

⁵⁰ Yamamoto *et al.* (2012, p. 657)

⁵¹ Lee PE, Kung RC, Drutz HP (no date)

berichten.⁵² In einer Studie von Kwon et al. wird davon ausgegangen, dass sich im Skelettmuskel auch pluripotente Stammzellen befinden, die nicht einer Zelllinie zugehörig sind. Diese könnten sich daher potenziell auch zu Nervengewebe umwandeln. Besonders bei männlichen Patienten, bei denen das Gefäß-Nervenbündel durch eine radikale Prostatektomie geschädigt wurde, wäre dieser Ansatz vielversprechend. Es würde aber auch Therapieoptionen im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen eröffnen.⁵³ Behandlungsversuche im Bereich mit muskulären Progenitorzellen gibt es bereits bezüglich Muskeldystrophien und Myokarderkrankungen.⁵⁴ Bei einer anderen Studie wurde die Auswirkung einer Transplantation von einem Streifen aus dem *M. Gracillis* des Oberschenkels, der zirkulär um die Urethra gelegt wurde, getestet. Bei dieser Studie wurden 5 Männer und 5 Frauen behandelt, mit dem Hintergrund, dass der Streifen des Muskels sowohl Muskelfasern, als auch muskuläre Vorläuferzellen lokal zur Verfügung stellen kann. In der Studie wurde der Erfolg der Behandlung einerseits mit einem EMG kontrolliert, um die Muskelaktivität zu überprüfen und auch der maximale urethrale Verschlussdruck wurde überwacht. Die Kontinenz wurde des Weiteren mit einem 24h-Pad-Test und durch Fragebögen über einen Zeitraum von 12 Monaten erfasst. Bei 4 von 5 Frauen wurde eine deutliche Verbesserung der Kontinenzlage bemerkt, 2 davon erreichten komplette Kontinenz. Bei den Männern wurde im EMG eine gesteigerte Muskelaktivität gesehen, jedoch war die Kontinenzlage bei den Probanden nicht deutlich gesteigert.⁵⁵ In einer Studie von Lecoeur et al. wurde ebenfalls der Ansatz mit einer Muskeltransplantation aus dem *M. gracillis* verfolgt, jedoch war hier nicht das Ziel, den schon bestehenden Sphinkter zu regenerieren, sondern einen zusätzlichen Sphinkter zu generieren. Lecoeur et al. verfolgten unter anderem diesen Ansatz, weil es sich zeigte, dass die Satellitenzellen, die für die Regeneration des Muskels verantwortlich sind, deutlich wirksamer sind, wenn sie nicht von den parentalen Muskelfasern getrennt werden.⁵⁶ Satellitenzellen zeigen auch die Eigenschaft, dass sie nicht

⁵² Stangel-Wojcikiewicz *et al.* (2014, p. 328)

⁵³ Kwon *et al.* (2005, p. 1250)

⁵⁴ Sèbe *et al.* (2011, p. 184)

⁵⁵ Yiou *et al.* (2013, p. 1109)

⁵⁶ Lecoeur *et al.* (2007, p. 337)

nur zu neuen Muskelfasern werden können, sondern ein Teil der transplantierten Zellen wieder als Progenitorzellen im Gewebe verweilen und sie somit die Regenerationsfähigkeit des behandelten Gewebes im weiteren Verlauf sichern können.⁵⁷ Es zeigt sich also sowohl bei den Therapieversuchen mit muskulären, als auch mit den von Adipozyten abgeleiteten, regenerativen Zellen eine deutliche Verbesserungstendenz bei behandelten Patienten. Bisher wurden bereits präklinische Zellinjektionsversuche und klinische Zelltherapiestudien mit Nadeln durchgeführt. Transurethrale Zellinjektionen mit Nadeln unter visueller Kontrolle weisen jedoch einige OP-technische Schwierigkeiten auf, da es kompliziert ist, die Nadel so zu platzieren und die Eindringtiefe zu kontrollieren, dass die Zellen schlussendlich tatsächlich in den delikaten Sphinktermuskel gelangen.⁵⁸ Trotz ständiger Ultraschallkontrolle und Orientierung anhand einer MRT Karte, die zeigt wo der Muskel liegt, erschweren unter anderem interindividuelle Unterschiede die korrekte Applikation.⁵⁹ Zusätzlich ist es fraglich, ob die injizierten Zellen tatsächlich auch an dem Ort der Applikation verweilen oder nach dem Entfernen der Nadel durch den Injektionskanal wieder austreten. Bisher konnte dies jedoch nicht beobachtet werden.⁶⁰ Des Weiteren steht zur Diskussion, wie sich die Zellen in dem Gewebe verteilen, wenn sie je nach Studie in Aliquots von 200 – 500 µL und in einem Gesamtvolumen von wenigen Millilitern an einen bestimmten Ort appliziert werden.

Im Labor waren erste Versuche, Zellen nicht durch Nadeln sondern mittels Wasserstrahl zu applizieren vielversprechend, weil sie genau an diesen Punkten angreifen. Durch eine Düse, die auf dem Gewebe aufgesetzt wird, sollen die Zellen durch den Wasserstrahl direkt in den Muskel getragen werden und sich dort gleichmäßig zwischen den Fasern verteilen. Zusätzlich kann man über den Druck, mit dem der Wasserstrahl in das Gewebe dringt, auch die Eindringtiefe kontrollieren und man könnte dies maschinell vereinfachen und normen, ohne

⁵⁷ Balashov *et al.* (2005)

⁵⁸ Aicher *et al.* (2014, p. 203)

⁵⁹ Aicher *et al.* (2014, p. 203)

⁶⁰ Amend *et al.* (2017, p. 1725)

auf die extrem feine händische Arbeit eines Menschen, der eine Nadel führt, zurückgreifen zu müssen.

Bisher wurde festgestellt, dass die Behandlung mit mesenchymalen Stromazellen potentiell zwei verschiedene Wirkungsweisen haben könnte; zum einen die Differenzierung, also die Umwandlung in einen gewebesansässigen Zelltyp, und zum anderen die Freisetzung von Gewebsbotenstoffen. Darunter waren zytoprotektive Faktoren gegen Apoptose, Stoffe zur Förderung der Gefäßneubildung, Stoffe, die zur Neubildung der Extrazellulärmatrix beitragen und weitere Faktoren, die die Stammzellrekrutierung aus dem Knochenmark aktivierten.⁶¹

In dieser Dissertation wurde an porcinem Kadavergewebe versucht, die Eindringtiefe und Verteilung der fluoreszierenden Micropartikel, die mittels Wasserstrahl in das Gewebe eingebracht wurden, nachzuverfolgen. Bei der Versuchsreihe lag die Wahl des Gewebes auf weiblichen deutschen Landrasseschweinen, da die Größe des Versuchstieres eher mit dem Menschen vergleichbar ist und bessere Voraussetzungen für die Versuchsreihe bot. Mit verschiedenen Druckstärken wurden Mikropartikel auf zwei Höhen der Harnröhre appliziert. Die Höhen wurden durch vorrausgehende Experimente bestimmt und beziehen sich auf den höchsten intraluminalen Druck beim Versuchstier und die größte Muskeldicke.

Auf Abbildung 1 ist eine repräsentative Darstellung der einzelnen Abschnitte der porcinen Urethra zu sehen. Die Schnitte haben eine Schnittdicke von 7µm und stammen aus verschiedenen Regionen der in 10 Unterteilungen gegliederten 1cm dicken Abschnitte der porcinen Urethra. Bilder A-E repräsentieren die Abschnitte von proximal (A) zu distal (E). Die Schnitte A-E wurden mit Azan gefärbt, die bindegewebigen Anteile sind blau, während die muskulären Anteile rot gefärbt sind. Die Schnitte F-O wurden immunohistochemisch gefärbt. Desmin-Färbung zeigt das Vorhandensein von glattem Muskel an (F-I). Fast-Myosin Färbung zeigt den Omega-förmigen quergestreiften Muskel um die Urethra an (K-L), der erst gegen Ende der Harnröhre nachgewiesen werden kann.

⁶¹ Yiou *et al.* (2016, p. 393)

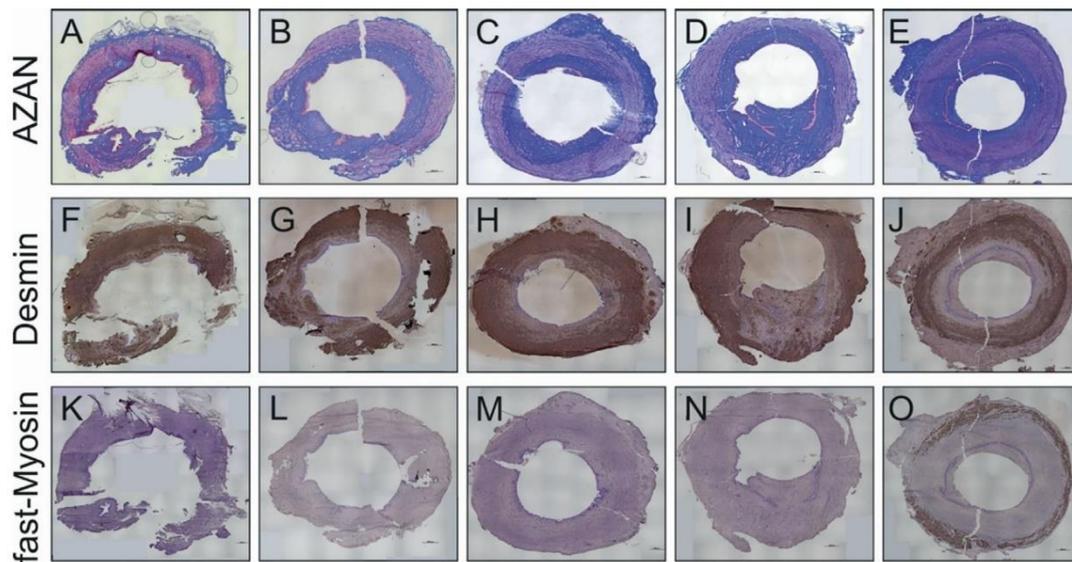


Abbildung 1: Verteilung des Bindegewebes und der Muskulatur im Verlauf der porcinen Urethra (Quelle: Kelp, Amend; Precise injection of human mesenchymal stroma cells in the urethral sphincter complex of Göttingen minipigs without unspecific bulking effects)⁶²

Zusätzlich kann man auf dem Schema aus Abbildung 2 erkennen, wo sich die Höhenmarkierungen H5 und H10 im Bezug zur Harnblase befinden.

⁶² Amend *et al.* (2017, p. 1726)

Für die Injektionsversuche am frischen Kadavergewebe wurden Polymerpartikel mit einem Durchmesser von 20µm und einer Dichte von ca. 1.07 g/L verwendet. Sie entsprachen in etwa der Größe und Dichte von mesenchymale Stromazellen in Suspension. Im Anschluss wurde diese Versuchsreihe histologisch ausgewertet.

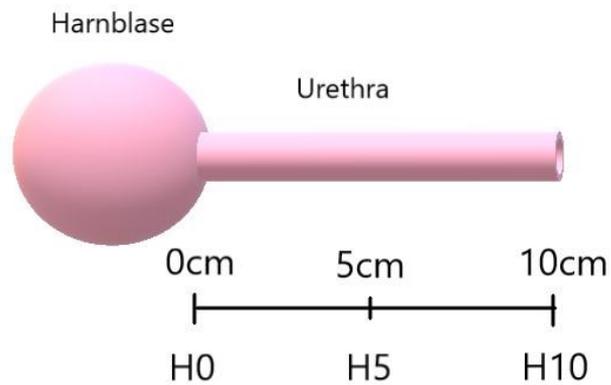


Abbildung 2: Schema einer Harnblase und Urethra mit markierten Messeinheiten H0, H5 und H10

2. Material und Methoden

2. 1. Material

2. 1. 1. Geräte

Gefrierschrank: VIP Series -86°, Sanyo Denki K.K.

Kamera: AxioCam HRc, Carl Zeiss Microscopy GmbH

Kryostat: Leica CM1860 UV, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH

Mikroskop: Axiovert 200M, Carl Zeiss Microscopy GmbH

Erbe Jet

Wasserstrahldüse Konzept 1, hergestellt von Erbe

Höhenmessgerät von Mitutoyo

Herdplatte: IKAMAG RTC Bachhofer Reutlingen

Gefriertruhe: SANYO Ultra Low Temperature Freezer MDF-U53V, SANXO Electric Co.

Kühlschrank: Liebherr

Chirurgische Schere: Fine Science Tools (FST)

Anatomische Pinzette: Martin

2. 1. 2. Verbrauchsmaterialien

Einbettmedium: Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems GmbH

Eindeckmedium: VectaMount Permanent Mounting Medium, Vector Laboratories

Deckgläser: Deckgläser 24x50 mm (Glasdicke 0,08 - 0,12), R. Langenbrinck

Entsorgungsbeutel: Entsorgungsbeutel PP, Brand

Handschuhe: Purple Nitrile Powder Free Exam Gloves S, Halyard Health Inc.

Objektträger: SuperFrost Plus, R. Langenbrinck

Einmalkatheter: Biçakcilar, Nelaton Katheter, Female, 14 Charrière

Gefriermittel: Stickstoff flüssig

Transportgefäß für den flüssigen Stickstoff: KGW Isotherm

Klarsichtsfolie: DOW Saran

Alufolie: Carl Roth

Bechergläser: Vitlab

2. 1. 3. Reagenzien

0,1% Kernechtrot: FärbeKit Morphisto

5% Phosphorwolframsäure: FärbeKit Morphisto

Gebrauchslösung Anilinblau-Orange-G: FärbeKit Morphisto

Ampuwa Spüllösung: Fresenius Kabi

PBS: bioMérieux sa IVD

Haematoxylin: Vector Laboratories, Inc. Burlingame H-3403

DAKO EnVision Dual Link System – HRP, Edition 07/2015, Code K4065

NGS Normal Goat Serum: Sigma-Aldrich / Merck

2. 1. 4. Software

AxioVS 40 V 4.8.2.0: © 2006-2010 Carl Zeiss MicroImaging GmbH

Image Composite Editor: Version 2.0.3.0 (64bit) © 2015 Microsoft Corporation

Adobe Photoshop CS3 Extended: Version 10.0, © 1990-2007 Adobe Systems Incorporated

2. 2. Methoden

2. 2. 1. Sprühapplikation

Für die Sprühapplikation der fluoreszierenden Micropartikel mittels verschiedener Effektstärken wurde der Versuchsaufbau immer nach denselben Schritten durchgeführt.

2. 2. 1. 1. Präparation des Gewebes

Die am Tag der Schlachtung entfernten Harnblasen und Urethrae der Versuchstiere mit der Zahl insgesamt $n = 6$ pro Effektstärke wurden direkt präpariert und von umliegendem Fett- und Bindegewebe befreit. Da die Harnröhre bei weiblichen Schweinen in die Vagina übergeht, um von dort einen gemeinsamen Ausführungsgang zu bilden, wurde versucht, möglichst am Übergang von Urethra zu Vagina das Gewebe zu durchtrennen. Nach der Präparation verschiedener Harnröhren ergab sich eine mittlere Durchschnittslänge von ca. 10cm (siehe Abbildung 12).

Die Harnröhren wurden auf der ventralen Seite aufgeschnitten. Zur Orientierung dienten dazu die von dorsoventral kommenden Ureter und das ventral angelegte Ligament auf der Blasenvorderwand.

Mit Hilfe eines Katheters wurde sichergestellt, dass die hintere Wand der Urethra nicht beschädigt wurde und der ventrale Bereich wurde mit einer Schere eröffnet (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4).



Abbildung 3: präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein F1 vor dem Eröffnen



Abbildung 4: präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein F1 nach dem Eröffnen mit der chirurgischen Schere

2. 2. 1. 2. Versuchsaufbau

Um den Prozess der Verwesung und die Schädigung des Gewebes durch den sauren Harn zu minimieren, wurden die Blasen bei 4° Celsius in einem Kühlschrank bis zum Versuchsstart aufbewahrt.

Für den Versuchsablauf wurde ein Höhenmessgerät (siehe Abbildung 5) aufgebaut, an dem die Düse befestigt wurde. Die Düse war mit einem Schlauchsystem, das durch den Erbe Jet mit Wasser befüllt wurde, verbunden. Durch das System konnte so eine bestimmte Effektstärke, also ein Druck abzüglich der minimalen Kompression des Wassers aufgebaut werden, mit der die Partikellösung in der Füllkammer in das Gewebe geschossen wurde.

Auf Abbildung 5 ist rechts der Erbe Jet zu sehen. Auf dem Erbe Jet befindet sich ein Steuergerät, mit welchem die Injektionsrate für 2ml Gesamtvolumen der Injektionsflüssigkeit bei den verschiedenen Effektstärken eingegeben werden kann. In den Sphinkter wurde dabei 1ml appliziert, der Rest der Partikellösung verblieb im Schlauchsystem. Auf dem Tisch kann man die Füllkammer liegen sehen. Unter der Düse sieht man auf Schaumstoff gebettet eine präparierte Schweineblase.

Mit dem Höhenmessgerät wurde bei aufsitzender Düse auf dem Gewebe eine weitere Eindringtiefe von 2mm gemessen. Wie man auf Abbildung 5 erkennen kann, liegt die präparierte Harnblase auf einem Stück weichen Schaumstoff. Dieser Schaumstoff dient dazu, das physiologisch weiche Gewebe, welches sich um die Harnblase im Körper befindet, zu imitieren.

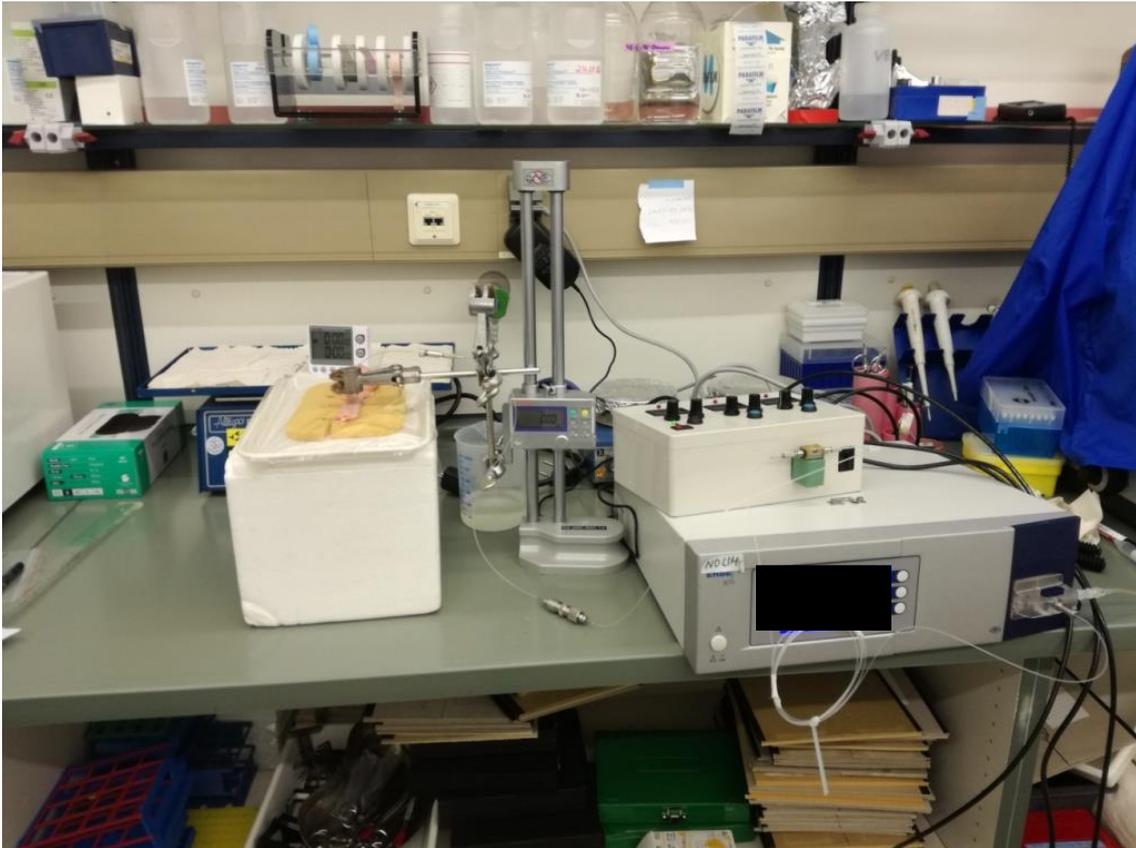


Abbildung 5: Links: Erhöhung aus Styropor mit daraufliegender, mit Schaumstoff gepolsterter Schale, auf der die offen präparierte Harnröhre liegt, darüber die bereits aufgesetzte Einsprühdüse. Mitte: Verstellbares Höhenmessgerät mit Halterung für die Düse. Rechts: Erbe Jet©, darauf ist das Steuerungsmodul, das die Injektionsrate bestimmt. Versuchsaufbau für einen Sprühversuch mit Injektionsprotokoll 2

2. 2. 1. 3. Applikation und Weiterverarbeitung

Schon während der Applikation konnte man beobachten, wie sich eine Blase in dem Gewebe bildete (siehe Abbildung 7). Oft konnte man sogar eine deutliche gelbe Stelle innerhalb der Blase, in der sich der Großteil der Partikel fand, sehen. Im Anschluss wurde die Blase so schnell wie möglich ausgeschnitten (siehe Abbildung 8), in Gefriermedium eingebettet und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Trotz der schnellst möglichen Durchführung dieser Arbeitsschritte konnte ein leichtes Diffundieren der Flüssigkeit in das umliegende Gewebe nicht verhindert werden. Daher konnte man meistens eine gewisse Schrumpfung der Applikationsblase in den Minuten nach dem Versuch beobachten.



Abbildung 6: offen präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein Q vor dem Sprühversuch



Abbildung 7: offen präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein Q nach Sprühversuch, auf Höhe H5 und H10 deutlich erkennbare flüssigkeitsgefüllte Blasen nach der Injektion



Abbildung 8: präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein Q nach dem Ausschneiden der Blasen im Gewebe

2. 2. 1. 4. Schneiden der Gefrierblöcke

Auf Grund der Partikelgröße von 20µm wurde eine Schnittdicke von 30µm für das Kryotom festgelegt, da so sichergestellt werden konnte, dass die Polystyrolpartikel nicht an der Klinge des Kryotoms elektrostatisch bedingt haften bleiben und so aus dem Gewebe gelöst werden.

2. 2. 2. Färbungen

Für die Darstellung der Eindringtiefe in die verschiedenen Gewebsschichten wurden die Gewebsschnitte mit verschiedenen Methoden angefärbt. Wegen der 30µm dicken Schnitte wurden die sonst üblichen Inkubationszeiten der Färbungen verändert.

Im Verlauf der Versuchsreihen wurde auf die Färbung von Desmin durch Antikörper verzichtet, da die gesamte Muskelschicht mit Azan ausreichend dargestellt werden konnte und der quergestreifte Muskel durch die α-fast-Myosin Färbung gezeigt werden konnte.

Des Weiteren wurde in einem Etablierungsversuch zur Fixierung mit Aceton gezeigt, dass auch nur kurze Einwirkungszeiten die Fluoreszenz der Partikel erheblich beeinträchtigen.

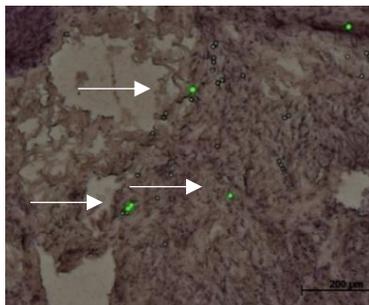


Abbildung 9: Schnittpräparat aus der Harnröhre des Versuchstieres Schwein D, 10min Inkubation in Aceton; die Pfeile deuten auf vereinzelt Partikel, die die Fluoreszenz beibehielten, die meisten Partikel sind durch die Exposition in Aceton verblasst

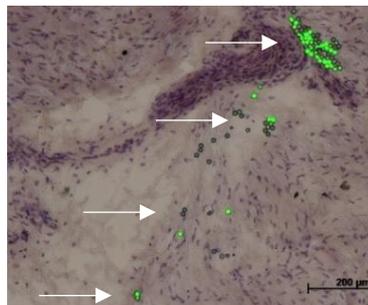


Abbildung 10: Schnittpräparat aus der Harnröhre des Versuchstieres Schwein D, 30sec Inkubation in Aceton; die Pfeile deuten auf mehrere fluoreszierende Partikel im Gewebe, daneben sind auch Partikel zu sehen, die Ihre Fluoreszenz verloren haben

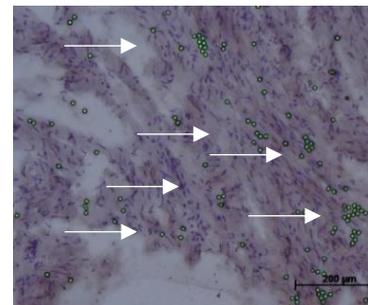


Abbildung 11: Schnittpräparat aus der Harnröhre des Versuchstieres Schwein G, kein Kontakt mit Aceton, alle fluoreszierenden Partikel leuchten gleichmäßig

Alle Arbeitsschritte, bei denen keine Temperaturangabe angegeben ist, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2. 2. 3. Azan Färbung

- 30min trocknen bei 40°Celsius auf der Herdplatte, um die histologischen Schnitte an dem Objektträger zu befestigen
- 5min Inkubation in 0,1% Kernecht Rot
- 1min Waschen in Leitungswasser
- 5min Inkubation in 5% Phosphorwolframsäure
- 1min Waschen in Leitungswasser
- 10sec Inkubation in Anilinblau Orange G
- 1min Waschen in Leitungswasser

2. 2. 4. Antikörperfärbung mit α -fast Myosin und Desmin

- 30min Trocknen der Objektträger bei 40°Celsius auf der Herdplatte, um eine bessere Haftung der histologischen Schnitte an den Objektträger zu erreichen
- 1 x 5min in PBS waschen
- 10 min Blocking der endogenen Peroxidase aus dem Dako Kit
- 3 x 5min in PBS waschen
- Blocking in 10% NGS (Normal goat serum) in PBS für 30min in der Küvette
- 1°Antikörper:
 - o α - Desmin (Clone D33, Dako, M0760), Verdünnung: 1:100 in PBS
 - o α - fast-myosin (abcam, ab 91596), Verdünnung 1:500 in PBS
- 1h in der feuchten Kammer inkubieren
- 3 x 5min in PBS waschen
- 2° Antikörper:
 - o Für Desmin Peroxidase Konjugat: goat- α -ms Antikörper (Dako Kit)
 - o Für fast-myosin Peroxidase Konjugat: goat- α -ms Antikörper (Dako Kit)
- 1h Inkubation
- 3 x 5min in PBS waschen

- DAB aus dem Kit (K4065) ansetzen (auf 1ml DAB dilution-buffer kommt 1 Tropfen DAB)
- DAB Entwicklung bei folgenden Zeiten:
 - o 30sec bei Desmin
 - o 40sec bei fast-Myosin
- Reaktionsstopp in destilliertem Wasser
- Je 30sec Hämatoxylin auf einen Schnitt pro Objektträger geben
- 10min unter fließendem Leitungswasser bläuen
- Eindeckeln mit einem Deckglas und Eindeckmedium

2. 2. 5. Mikroskopische Auswertung und Beurteilung der Schnitte

Bereits vor der Färbung wurden alle Schnitte, die gemacht wurden, einmal im Mikroskop mit Durchlicht ohne Färbung und mit Fluoreszenz durch den FITC Filter des Mikroskops gesichtet und beurteilt. Die repräsentativsten Schnitte wurden markiert und später gefärbt, um anschließend noch einmal mikroskopiert zu werden. Mit dem Axiovert 200M Mikroskop von Zeiss wurde bei 2,5-facher Vergrößerung das Präparat sowohl in der Fluoreszenz-Phase als auch mit Durchlicht betrachtet. Für die Detailaufnahmen wurde in beiden Phasen ein Bild gemacht und mit der Software AxioVS 40 V 4.8.2.0 von Zeiss übereinandergelegt, so dass in einem Bild sowohl die fluoreszierenden Partikel als auch das gefärbte Gewebe sichtbar sind. Für die Übersichtsaufnahmen wurden 80-150 Einzelbilder eines Schnittes in 2,5-facher Vergrößerung aufgenommen und mit dem Microsoft Programm „Image Composite Editor“ zu einem Bild zusammengestellt.

3. Ergebnisse

3. 1. Etablierungsversuch mit verschiedenen Druckstärken im Bereich von Injektionsprotokoll 1, 2 und 3

Bei der ersten Versuchsreihe wurde ein Vergleich von Eindringtiefe und Partikelverteilung in Abhängigkeit von Druck zwischen den Injektionsprotokollen 1, 2, und 3 erstellt. Bei orthogonalem Winkel wurden bei den variierenden Druckstärken die gleiche Menge an Partikeln in 3 unterschiedlichen Höhen in die präparierten Urethrae mittels Wasserstrahl gesprüht. Für die Partikellösung wurden fluoreszenz-markierte Polystyrolpartikel verwendet, die in PBS eine Konzentration von $1 \cdot 10^6/\text{ml}$ hatten. Pro Schuss wurden 2ml der Lösung gebraucht, 1ml davon wurde tatsächlich appliziert, 1ml verblieb im Schlauchsystem der Einsprühvorrichtung.

Die verschiedenen Höhen wurden, vom Übergang der Harnblase zur Harnröhre ausgehend, gemessen. Diese Landmarken wurden H1 am Übergang, H5 bei 5cm distal des Überganges und H10 bei 10cm distal des Überganges genannt. Da bereits vorhergegangene Untersuchungen gezeigt haben, dass sich das Wanddruckmaximum des Verschlussapparates der Urethra beim Landschwein auf der Höhe von H5 befindet und die Muskeldicke nach distal immer weiter zunimmt, wurden für die folgenden Versuchsreihen nur die Schnittpräparate aus H5 und H10 ausgewertet.^{63,64} Die Muskelverteilung nimmt beim Schwein nach distal an Dicke zu. Zusätzlich wurde in vorhergegangenen Experimenten die These aufgestellt, dass der quergestreifte Muskel beim Schwein erst ab ca. Höhe H5 vorhanden ist und auch nach distal zunimmt.

⁶³ Amend *et al.* (2017, p. 1731)

⁶⁴ Amend *et al.* (2017, p. 1726)

3. 2. Injektionsversuche mit Injektionsprotokoll 1

3. 2. 1. Injektionsversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 1 an der präparierten Harnröhre von Versuchstier Schwein H

Bei dem Einsprühversuch in die Urethra von Schwein H konnte beobachtet werden, dass bei Versuchen mit Injektionsprotokoll 1 auf Höhe H5 der größte Teil der Partikellösung nicht in das Gewebe gelangte (siehe Abbildung 13).

Eine Blasenbildung war nicht erkennbar. Bei H10 hingegen konnte die Bildung einer Blase mit Partikellösung gesehen werden.

Somit kann daraus geschlossen werden, dass auch bei Injektionsprotokoll 1 ein erheblicher Teil der Suspension im Gewebe verbleibt. Auf diese Annahme wird in der Diskussion näher eingegangen.

In der mikroskopischen Auswertung wurde festgestellt, dass sich maximal 20-30 Partikel in den entnommenen Proben befanden.



Abbildung 12: offen präparierte Harnblase von Versuchstier Schwein H, vor Sprühversuch



Abbildung 13: offen präparierte Harnblase von Versuchstier Schwein H, nach Sprühversuch; deutlich sichtbare Blase bei der Markierung H10, weniger große Blase bei der Markierung H5

3. 2. 1. 1. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein H nach Applikation mit Injektionsprotokoll 1, auf Höhe H5

Bei Injektionsprotokoll 1 konnten auf Höhe H5 kaum Partikel gefunden werden. Zusätzlich sind jene Partikel, die in das Gewebe gelangt sind, weit vom Muskel entfernt und befinden sich sehr geballt auf einer Stelle.

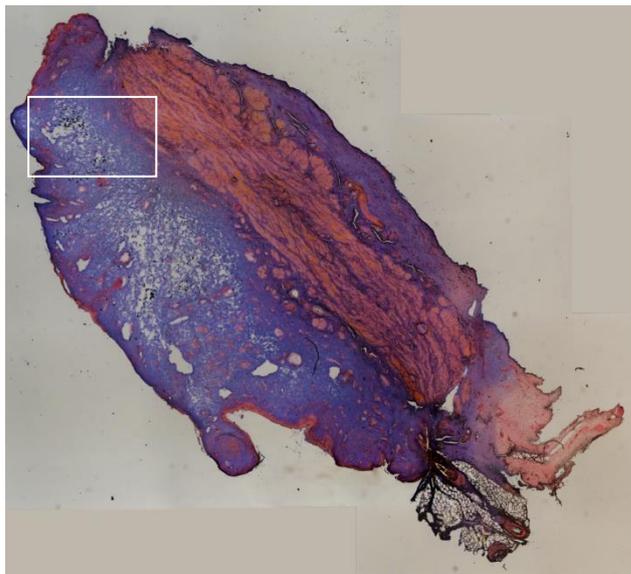


Abbildung 14: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Harnröhre nach dem Injektionsversuch bei Versuchstier Schwein H mit Injektionsprotokoll 1 (Schwein H_H5_OT27)

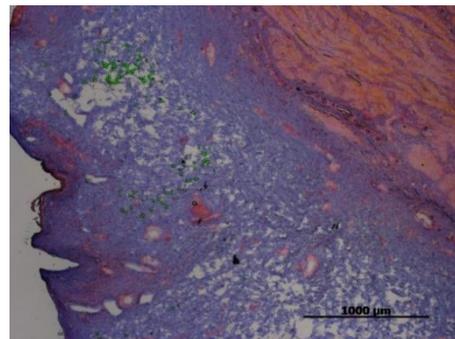


Abbildung 15: Detailaufnahme aus Abbildung 14 (Schwein H_H5_OT27_Detail)

3. 2. 1. 2. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein H nach Applikation mit Injektionsprotokoll 1, auf Höhe H10

Auf Höhe H10 konnten ebenfalls kaum Partikel gefunden werden.

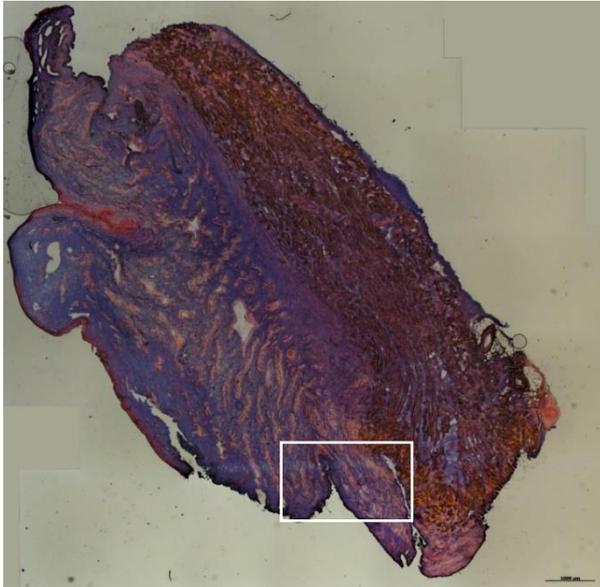


Abbildung 16: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Harnröhre nach dem Injektionsversuch bei Versuchstier Schwein H mit Injektionsprotokoll 1 (Schwein H_H10_OT32)



Abbildung 17: Detailaufnahme von Abbildung 16 (Schwein H_H10_OT32_Detail)

3. 3. Injektionsversuche mit Injektionsprotokoll 2

Bei der Applikation der Styroporpartikel mit dem Injektionsprotokoll 2 gab es sehr große Variationen in der Eindringtiefe.

Im Vergleich zu Injektionsprotokoll 1 konnte hier jedoch bei jeder Sprühapplikation eine Blasenbildung beobachtet werden, die man auch in der mikroskopischen Auswertung als gedehntes submuköses Bindegewebe beobachten kann. Die Partikel befanden sich bei einem Großteil der Schweine in einer geballten Wolke in Mitte der Blase und teilweise an dem Lumen zugewandten Teil des Muskels. Eine tatsächliche

Penetration des Muskels konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Für Injektionsprotokoll 2 wurden mit einer Fallzahl von n=6 Kadaverproben gearbeitet.

Bei der ersten Versuchsreihe für Injektionsprotokoll 2 schlug die Sprühapplikation bei 4 von 5 Versuchstieren fehl, daher wurden diese nicht ausgewertet.

3. 3. 1. Fehlversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 2

Nach der ersten Versuchsreihe mit dem Injektionsprotokoll 2 ließ sich nach einer größeren Zeitverzögerung und einem anhaltenden technischen Problem mit dem Erbe Jet© keine Sprühapplikation mehr erfolgreich durchführen. Gründe dafür werden in dem Abschnitt Diskussion bearbeitet (siehe Seite 52).

3. 3. 2. Injektionsversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 2 an der präparierten Harnröhre von Versuchstier Schwein U

Bei der Applikation von Styroporpartikeln mit Injektionsprotokoll 2 konnte man sowohl auf Höhe H5, als auch auf Höhe H10 beobachten, wie sich eine deutliche Partikelblase im Gewebe gebildet hat.



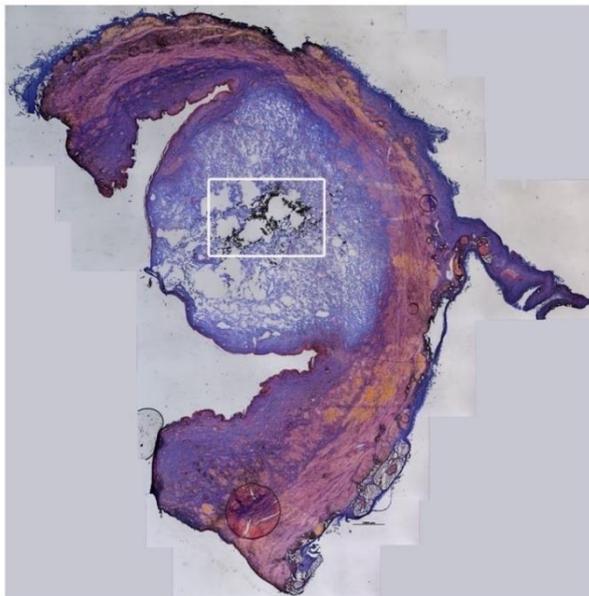
Abbildung 18: offen präparierte Harnblase von Versuchstier Schwein U vor dem Sprühversuch



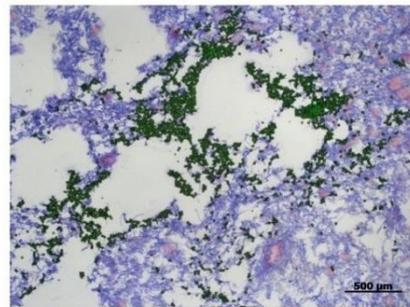
Abbildung 19: offen präparierte Harnblase von Versuchstier Schwein U nach Sprühversuch, sichtbare Blasenbildung bei den Markierungen H5 und H10 im Gewebe

3. 3. 2. 1. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein U nach Applikation mit Injektionsprotokoll 2, auf Höhe H5

Wie man an den untersuchten histologischen Gewebeproben von Schwein U sehr gut sehen kann, ist mittig eine große Aufhellung im Bereich des Bindegewebes der Submucosa zu sehen, die durch das Auseinanderdrücken der bindegewebigen Fasern durch die Flüssigkeit zustande kommt. Auch deutlich zu sehen ist, dass die Fluoreszenzpartikel sich mittig in besagter Blase befinden und sich nicht in die Peripherie verteilt haben.



Schwein U_H5_OT79

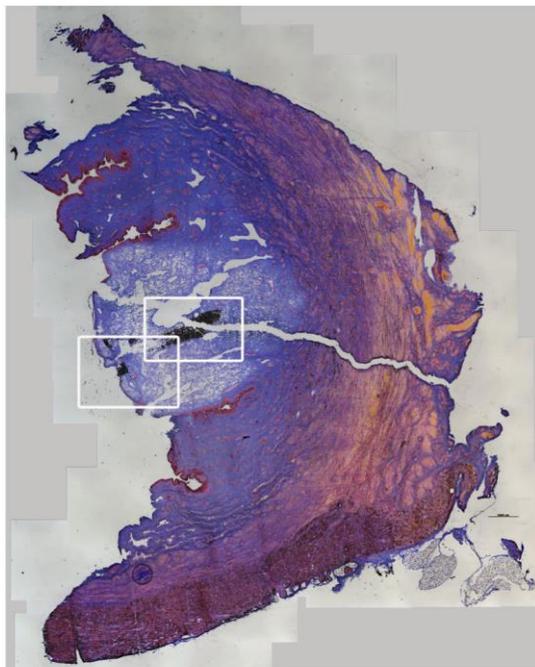


Schwein U_H5_OT79_Detail

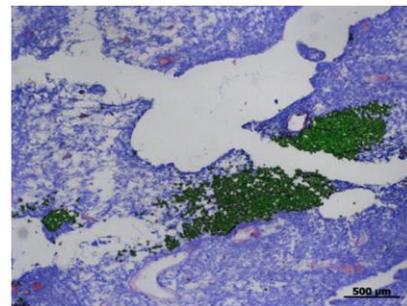
Abbildung 20: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Harnröhre nach dem Injektionsversuch bei Versuchstier Schwein U (Schwein U_H5_OT79), Links: Übersichtsaufnahme mit weißer Umrandung, Rechts: Detailaufnahme aus der Übersichtsaufnahme

3. 3. 2. 2. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein U nach Applikation mit Injektionsprotokoll 2, auf Höhe H10

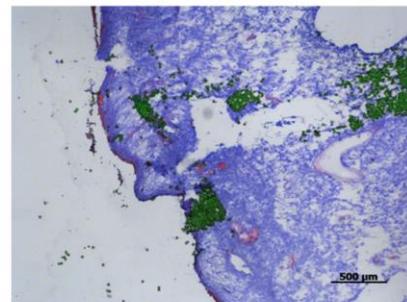
Nach der Applikation der Fluoreszenzpartikel mit Injektionsprotokoll 2 auf Höhe H10 beobachtet man bei diesem histologischen Präparat der Urethra die durch Flüssigkeit bedingte Auflockerung der Fasern im Zentrum. Die Partikel befinden sich auch hier strahlenartig in der Mitte der Blase angeordnet und gelangen ebenfalls nicht bis zur Muskelschicht. Des Weiteren kann man bei den folgenden Bildern ebenfalls gut erkennen, dass die Muskeldicke von H5 zu H10 deutlich zugenommen hat.



Schwein U_H10_OT80



Schwein U_H10_OT80_Detail1



Schwein U_H10_OT80_Detail2

Abbildung 21: mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein U (Schwein U_H10_OT80) auf Höhe H10; Links: Übersichtsaufnahme des kompletten Präparates, man sieht deutlich mittig eine aufgehellte Zone, an der die Applikation erfolgt ist; Rechts oben und unten: Detailaufnahmen aus der Übersichtsaufnahme, die Fluoreszenzpartikel verteilen sich nicht homogen im Gewebe sondern bleiben strahlartig im Bindegewebe dicht aufeinander liegen

3. 3. 2. 3. Übersicht über die mit Injektionsprotokoll 2 durchgeführte Versuchsreihe

In Abbildung 22 kann man die Gegenüberstellung der 6 mit Injektionsprotokoll 2 in Gewebeproben von frischen Schlachtschweinen injizierten Partikel miteinander vergleichen. In der linken Reihe befinden sich die Übersichtsbilder der histologischen Präparate der Applikationsversuche der Partikel auf Höhe H5, in der rechten die Übersichtsbilder auf Höhe H10.

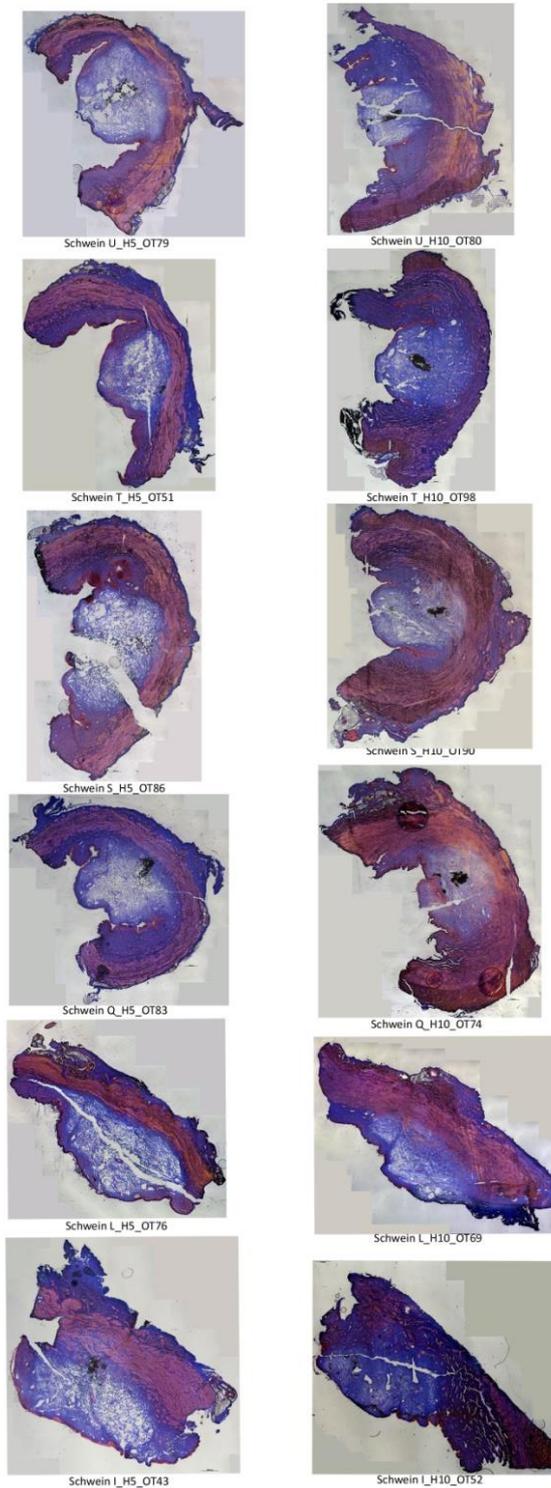


Abbildung 22: Übersicht über die Applikationsversuchsreihe, die mit Injektionsprotokoll 2 durchgeführt wurde; Links: Die Präparate der Versuchsreihe, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H5 erfolgte; Rechts: Die Präparate der Versuchsreihe, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H10 erfolgte

3. 4. Injektionsversuche mit Injektionsprotokoll 3

Auch bei der Applikation von Partikeln mit Injektionsprotokoll 3 ergaben die Auswertungen ein sehr breites Ergebnisspektrum. Anders als bei Injektionsprotokoll 2 wurden hier jedoch die meisten Partikel bis zum Muskel gespritzt. Bei manchen Präparaten kann man sogar beobachten, dass die Partikel in die Muskelschicht eingedrungen sind oder sogar durch den Muskel durchgeschossen wurden.

3. 4. 1. Injektionsversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 3 an der präparierten Harnröhre von Versuchstier Schwein W

Wie bereits bei Injektionsprotokoll 2 beschrieben, konnte man auch bei Injektionsprotokoll 3 bei allen Präparaten eine sofortige Blasenbildung im Gewebe erkennen (siehe Abbildung 24). Teilweise war sogar makroskopisch sichtbar, dass diese Gewebserweiterung sich hierbei jedoch nicht nur im Bindegewebe abspielte, sondern auch in der Muskelschicht.



Abbildung 23: offen präparierte Harnröhre des Versuchstieres Schwein W, vor Sprühversuch



Abbildung 24: offen präparierte Harnröhre des Versuchstieres Schwein W, nach Sprühversuch; deutlich erkennbare Blasenbildung auf Höhe H5 und H10

3. 4. 1. 1. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein W nach Applikation mit Injektionsprotokoll 3, auf Höhe H5

Nach der Applikation der Fluoreszenzpartikel in die Urethra des Versuchstieres Schwein W auf Höhe H5 kann man zusätzlich zu den aufgedehnten Fasern im Bindegewebe auch sehen, wie die Muskelfasern des Ringmuskels durch die Flüssigkeit auseinandergedrängt wurden. Man kann hier im Vergleich zu den mit Injektionsprotokoll 2 behandelten Präparaten zudem erkennen, dass sich Partikel zwischen den Muskelfasern verteilt haben. Trotzdem sammelt sich der Großteil der Partikel vor der Muskelschicht im Bindegewebe (siehe Abbildung 25).

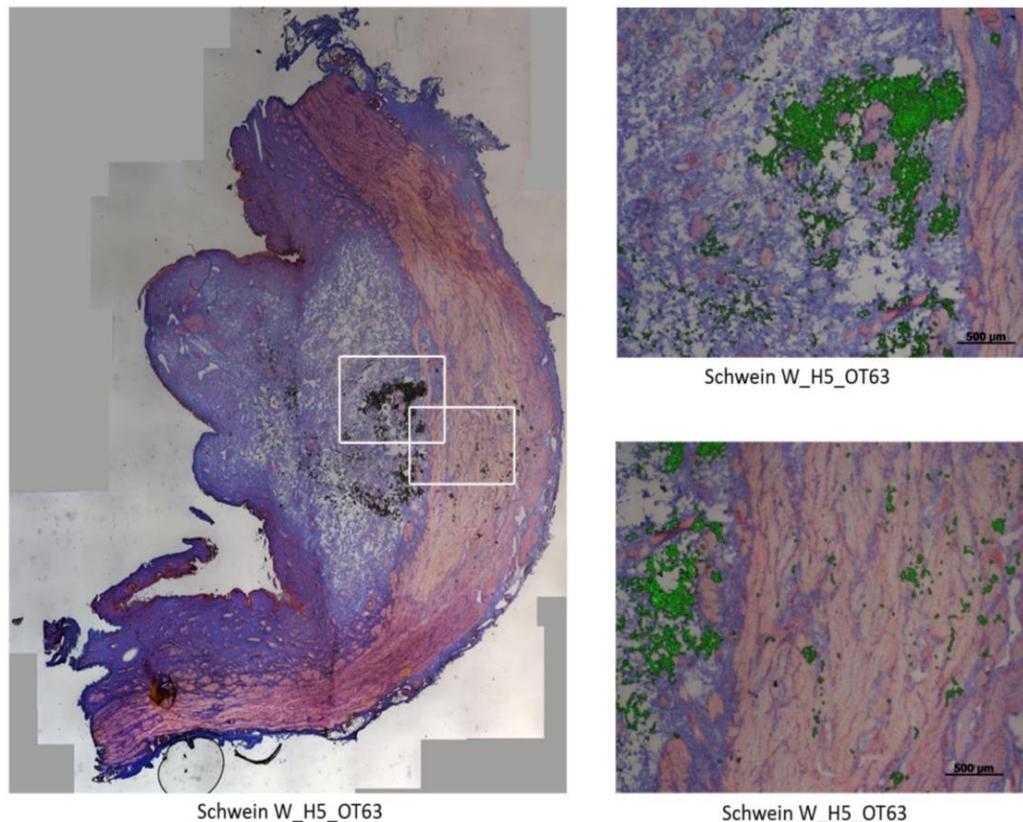


Abbildung 25: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein W (Schwein W_H5_OT63); Links: Übersichtsaufnahme über den kompletten Schnitt, mittig ist durch eine Aufhellung des Gewebes sichtbar, dass eine Auflockerung zwischen den Fasern stattgefunden hat; Rechts oben: eine Ansammlung von Partikeln vor der Muskelschicht; Rechts unten: Die einzelnen Partikel haben sich zwischen den aufgelockerten Muskelfasern festgesetzt

3. 4. 1. 2. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein W nach Applikation mit Injektionsprotokoll 3, auf Höhe H10

Bei Partikelinjektionen in die Urethrae mehrerer Versuchstiere konnte bei den distalen Sprühversuchen auf Höhe H10 beobachtet werden, dass die Partikel sich lumennah im Bindegewebe auf einem Fleck befinden. Im Gegensatz zu den Schnittpräparaten aus Höhe H5 kann man hier kein Eindringen der Partikel in den Muskel sehen (siehe Abbildung 26).

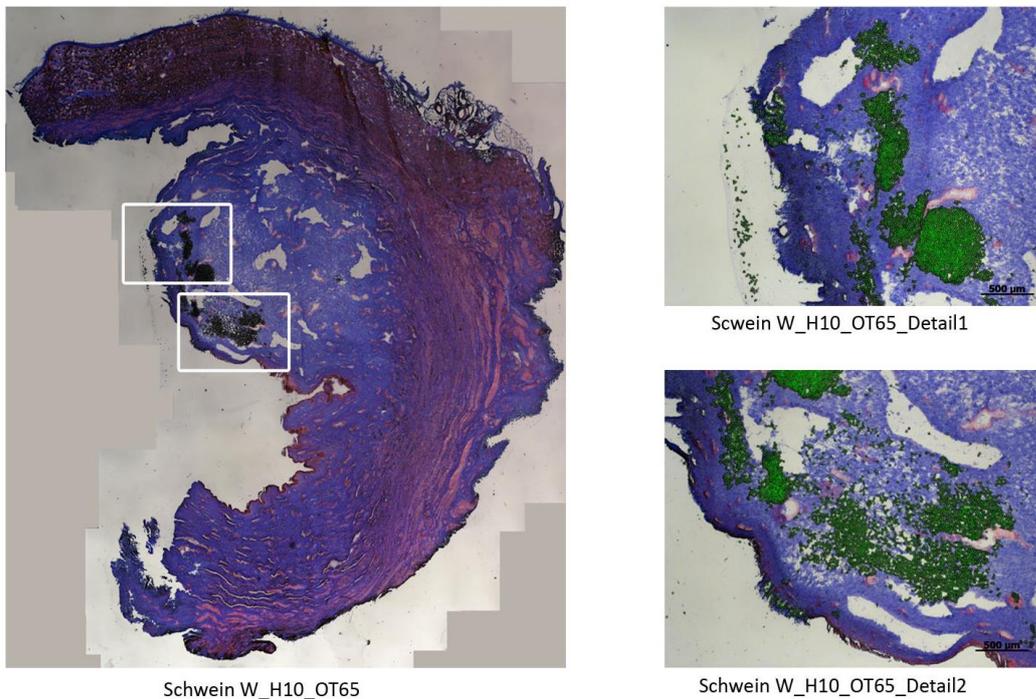


Abbildung 26: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Urethra von Versuchstier Schwein W (Schwein W_H10_OT65); Links: Übersichtsaufnahme des kompletten Präparats, lumennah weiß umrandet sieht man zwei Partikelwolken, die in dem aufgelockerten Bindegewebe der Submucosa stecken; Rechts oben und unten: Detailaufnahme der Partikel im Gewebe

3. 4. 2. Injektionsversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 3 an der präparierten Harnröhre von Versuchstier Schwein V

Bei der Versuchsreihe mit der Urethra von Schwein V ließ sich besonders im Vergleich zu der Versuchsreihe mit dem Gewebe von Schwein W bei der distalen Sprühapplikation auf Höhe H10 der Unterschied erkennen, dass die Partikelwolke sich sowohl zwischen den Muskelfasern verteilt, als auch die Muskelfasern auseinandergedrängt hat (siehe Abbildung 28).

3. 4. 2. 1. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein V nach Applikation mit Injektionsprotokoll 3, auf Höhe H5

Wie schon zuvor kann man bei dem Gewebe von Schwein V sehen, dass die Partikel nach Injektion mit Protokoll 3 bis in den Muskel der Urethra eindringen.

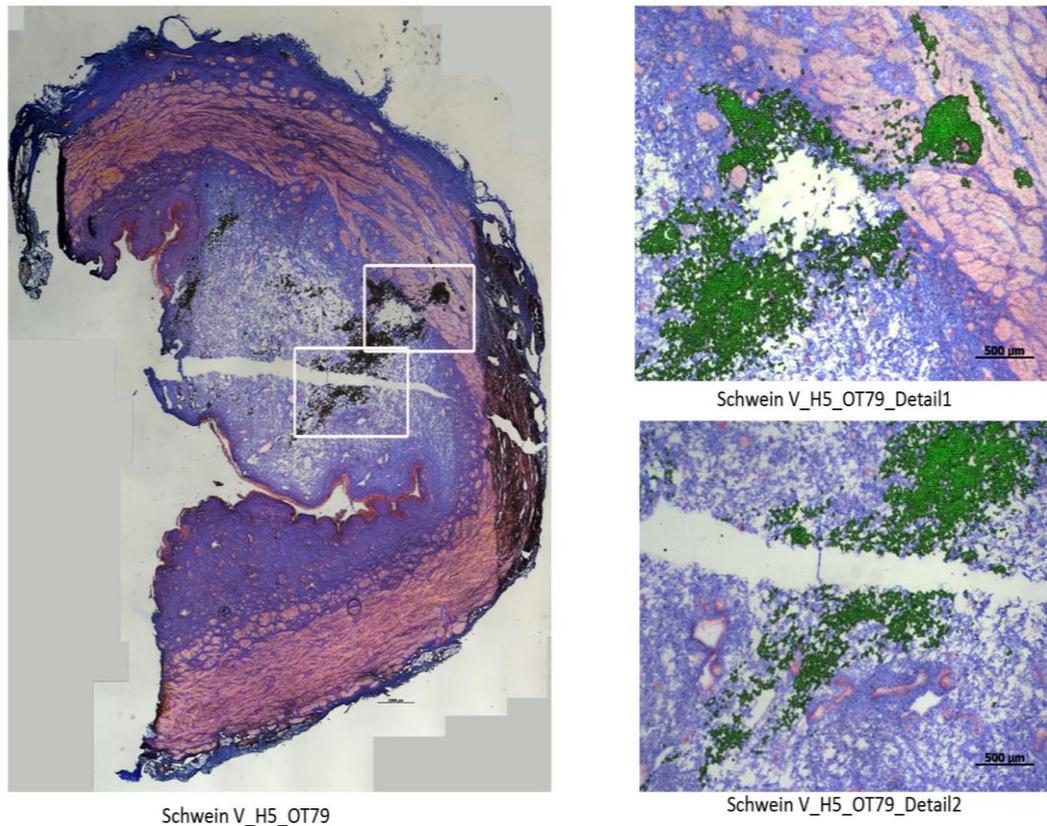
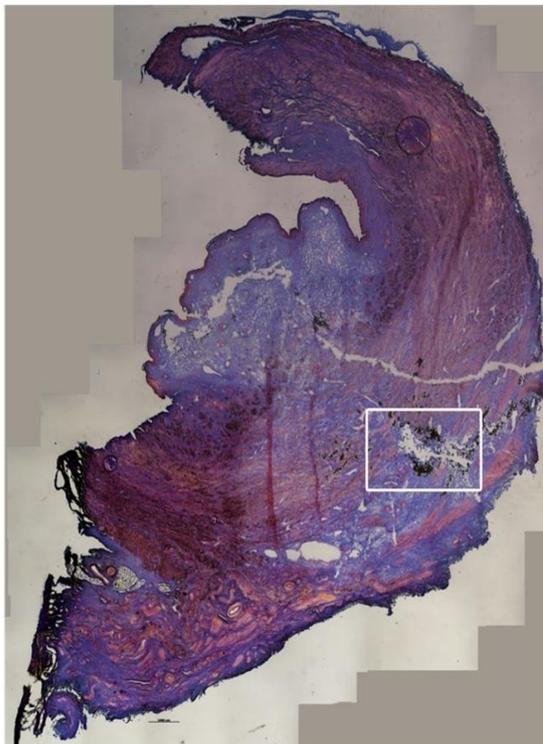


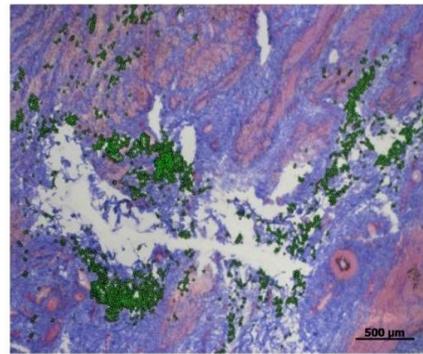
Abbildung 27: mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Urethra von Schwein V (Schwein V_H5_OT79); Links: Übersichtsaufnahme des kompletten Präparates, weiß umrandet: die Fluoreszenzpartikel, die sowohl im Bindegewebe als auch in der Muskelschicht stecken; Rechts oben: Einige Partikel, die durch die Muskelschicht gedrungen sind; Rechts unten: Ansammlung von Partikeln im Bindegewebe

3. 4. 2. 2. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein V nach Applikation mit Injektionsprotokoll 3, auf Höhe H10

Im Gegensatz zu dem Bildbeispiel des Injektionsversuches von Partikeln in Gewebe aus Schwein W (siehe Abbildung 25) sieht man bei Schwein V den Befund, dass die Partikel nicht nur in die Muskelschicht eindringen, sondern diese teilweise komplett durchqueren. Besonders eindrücklich sieht man in Abbildung 28, wie die Fasern weit auseinandergedehnt wurden und teilweise den Kontakt zueinander verloren haben.



Schwein V_H10_OT72



Schwein V_H10_OT72_Detail

Abbildung 28: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein V (Schwein V_H10_OT72); Links: Übersichtsaufnahme des kompletten Schnittes, mittig weite Auseinanderdehnung der rot gefärbten Muskelfasern zu erkennen; Rechts: Detailaufnahme in der erkennbar ist, wie die Muskelfasern vereinzelt stehen und die Fluoreszenzpartikel zwischen den Fasern sich gesammelt haben

3. 4. 3. Übersicht über die mit Injektionsprotokoll 3 durchgeführte Versuchsreihe

In Abbildung 29 ist die Gegenüberstellung der 6 Versuche zu sehen, bei denen Partikel mit Injektionsprotokoll 3 in porcines Kadavergewebe injiziert wurden. In der linken Reihe befinden sich die Übersichtsbilder der Schweine auf Höhe H5, in der rechten die Übersichtsbilder auf Höhe H10.

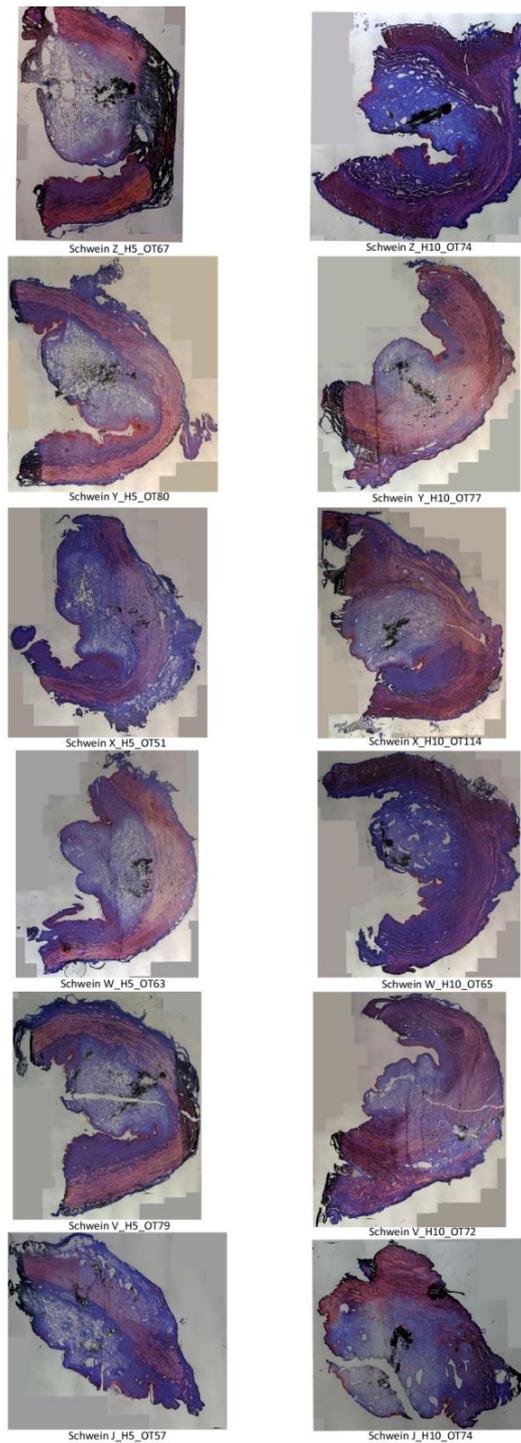


Abbildung 29: Übersicht über die Versuchsreihe, die mit Injektionsprotokoll 3 durchgeführt wurde; Links: Die Präparate der Versuchsreihe, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H5 erfolgte; Rechts: Die Präparate, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H10 erfolgte

3. 5. Injektionsversuchsreihe mit Histofarbe und Injektionsprotokoll 2

Nachdem bei den bisherigen Versuchsreihen der Eindruck entstand, dass die Polystyrolpartikel möglicherweise bedingt durch elektrostatische Kräfte aneinanderhaften und sich daher nicht gleichmäßig im Gewebe verteilen, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt. In dieser wurde zu dem Partikelgemisch, das in der gleichen Verdünnung hergestellt wurde, Histofarbe in einer Konzentration von 1 zu 1000 hinzugegeben. Dazu wurden die Schnittpräparate mit einer α -fast-Myosin Antikörper Färbung gefärbt, mit der dargestellt werden kann, wo sich der quergestreifte Muskel befindet. Bei dieser Versuchsreihe wurden Harnröhren von 3 Schweineblasen mit Injektionsprotokoll 2 bearbeitet.

3. 5. 1. Injektionsversuchsreihe mit Injektionsprotokoll 2 an der präparierten Harnröhre von Versuchstier Schwein B1 und Versuchstier Schwein C1

Bei der Versuchsreihe mit Histofarbe konnte man schon während des Sprühversuches die Verteilung der Partikellösung anhand der leuchtend blauen Farbe gut nachvollziehen. Man sieht auch hier, wie sich jedoch die Farbe zentral in der Blase im Gewebe sammelt und sich nicht wie erwartet überall gleich verteilt (siehe Abbildung 31).

Des Weiteren konnte man bei dieser Versuchsreihe sehr gut sehen, dass es in der Zeit zwischen Sprühversuch und Einfrieren zu keiner bzw. nur einer minimalen späteren Umverteilung der Flüssigkeit kam.



Abbildung 30: offen präparierte Harnröhre des Versuchstieres Schwein B1, vor Sprühversuch



Abbildung 31: offen präparierte Harnröhre des Versuchstieres Schwein B1, nach Sprühversuch, deutlich erkennbare blaue Verfärbungen im Bereich der erfolgten Applikation

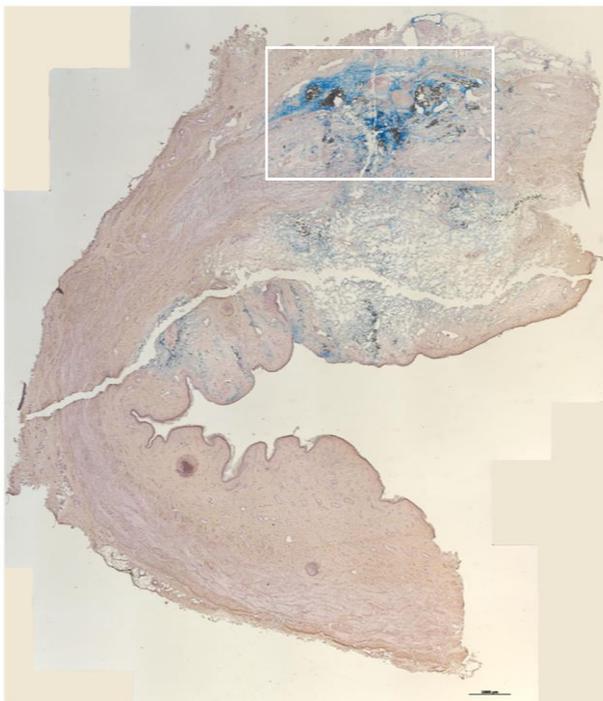
Bei einer Detailaufnahme der eröffneten Urethra von Schwein C1 nach dem Partikelinjektionsversuch mit Injektionsprotokoll 2 kann man erkennen, dass die mit Histofarbe versetzte Suspension direkt in der Gewebsblase sitzt. Weiter distal sieht man ebenfalls, dass die Flüssigkeit bereits ins Gewebe darunter diffundiert.



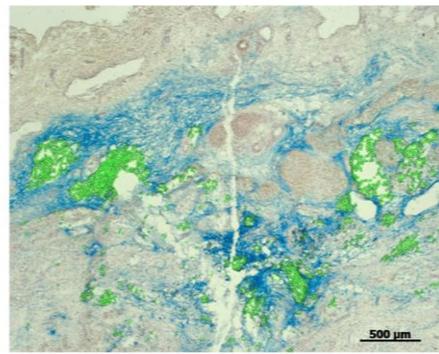
Abbildung 32: Nahaufnahme aus der präparierten Harnröhre des Versuchstieres Schwein C1, Detailaufnahme der blauen Partikelblase

3. 5. 2. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein B1 nach Applikation mit Injektionsprotokoll 2, auf Höhe H5

Nach der kombinierten Injektion von Farbstoff und Partikel auf Höhe H5 kann man sehen, wie beide Komponenten bis in den Muskel vordringen und sich dann längs zwischen den Fasern verteilen. Eine große Abweichung von der Verteilung der Partikel zur Verteilung der Farbe gibt es jedoch nicht.



Schwein B1_H5_OT27

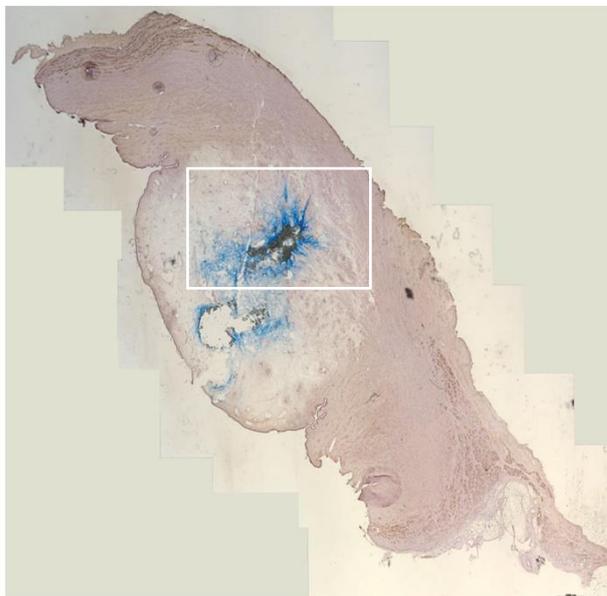


Schwein B1_h5_OT27_Detail1

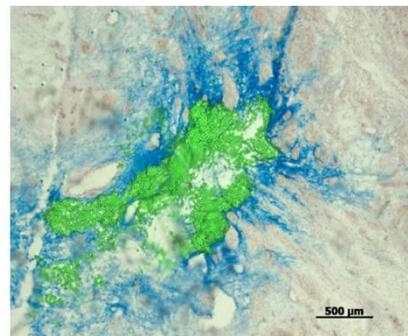
Abbildung 33: mit α -fast Myosin Immunhistochemie gefärbtes Schnittpräparat des Versuchstieres Schwein B1 (Schwein B1_H5_OT27); Links: Übersichtsaufnahme des kompletten Präparates, die blaue Histofarbe und die Partikel verteilen sich ähnlich im Gewebe; Rechts: Detailaufnahme der Verteilung von Histofarbe und Fluoreszenzpartikeln im Gewebe

3. 5. 3. Histologische Auswertung der Schnittpräparate der Urethra von Versuchstier Schwein B1 nach Applikation mit Injektionsprotokoll 2, auf Höhe H10

Wie bei den bisher hergestellten Präparaten zu Injektionsprotokoll 2 sieht man auch bei den Tests an Gewebe von Schwein B1, dass sich die Partikel gedrängt im Zentrum der Blase im Bindegewebe befinden. Der vom injizierten Volumen gedehnte Gewebereich ist in Abbildung 34 als helle Zone deutlich zu erkennen. Entgegen der Erwartung ist jedoch nicht die gesamte helle Zone blau gefärbt, sondern tatsächlich nur der Bereich um die Partikel.



Schwein B1_H10_OT27



Schwein B1_H10_OT27_Detail1

Abbildung 34: Mit α -fast Myosin Immunhistochemie angefärbtes Präparat der Urethra von Versuchstier Schwein B1 (Schwein B1_H10_OT27), Links: Deutlich sichtbare mittige Aufhellung in der Submucosa bedingt durch die Aufweitung des Gewebes, zentral kompakt im Gewebe sitzend, sind sowohl die Histofarbe als auch die Partikel erkennbar; Rechts: Partikel und Histofarbe sitzen kompakt zusammengedrängt im Gewebe

3. 5. 4. Übersicht über die Versuchsreihe mit Histofarbe

Ähnlich wie bei den bisherigen Proben kann man erkennen, dass auch bei Injektionsprotokoll 2 das Eindringen von Partikeln in die Muskelschicht möglich ist, jedoch stark von der Muskeldicke an den jeweiligen Stellen in der Harnröhre abhängt. Während es möglich scheint, dass die Partikel auf Höhe H5 den mittelmäßig stark ausgeprägten Muskel durchdringen, scheint es, als ob die Partikel bei H10 kaum in die Nähe der Muskelschicht kommen und sehr geballt im submukösen Bindegewebe verharren.

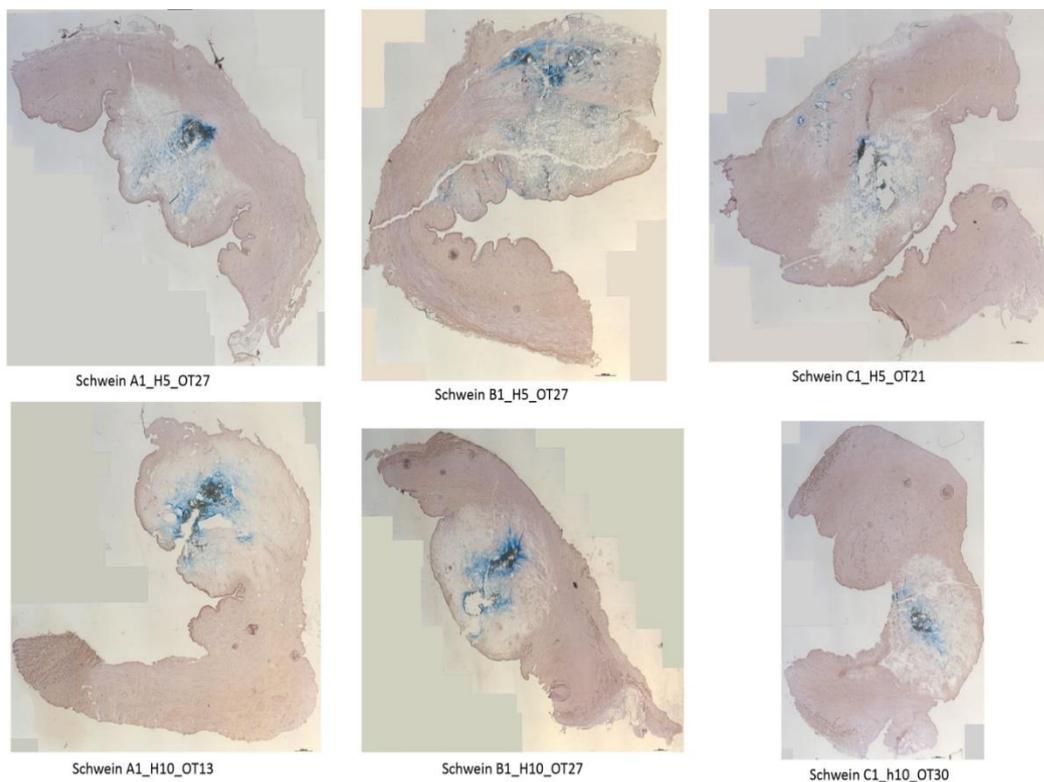


Abbildung 35: Übersicht über die Versuchsreihe, die mit Injektionsprotokoll 2, Fluoreszenzpartikeln und Histofarbe durchgeführt wurde; Oben: Die Präparate der Versuchsreihe, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H5 erfolgte; Unten: Die Präparate, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H10 erfolgte

3. 6. Übersicht über die Ergebnisse

Die histologische Auswertung der Schnittpräparate lieferte verschiedene Ergebnisse. Zum einen zeigte die Versuchsreihe mit Injektionsprotokoll 2, dass die Partikel kaum weiter als in das submuköse Bindegewebe vordringen. Bei der Versuchsreihe mit Injektionsprotokoll 3 kann beobachtet werden, dass viele Partikel bis in die Muskelschicht und teilweise sogar durch die Muskelschicht gespritzt werden. Jedoch fällt bei dieser Versuchsreihe auch auf, dass die hohen Druckstärken mit einer weitgehenderen Gewebsveränderung einhergehen. Besonders der Befund der auseinandergedrängten Muskelfasern fällt in der Versuchsreihe mit Injektionsprotokoll 3 auf (siehe Abbildung 27). Bei beiden Druckstärken wurde festgestellt, dass die Micropartikel sich nicht wie erhofft homogen im Gewebe verteilen, sondern eher zusammengedrängt in einer länglichen Form im Gewebe verharren. Um diesem Befund nachzugehen, wurde eine weitere Versuchsreihe veranlasst, in der zusätzlich zu den Partikeln Histofarbe zu dem Injektionsgemisch hinzugegeben wurde, um die genaue Verteilung der injizierten Flüssigkeit im Gewebe besser nachvollziehen zu können. Bei der Versuchsreihe mit Histofarbe und Fluoreszenzpartikel wurde jedoch erkennbar, dass dieses Phänomen der inhomogenen Verteilung nicht nur auf die Partikel, sondern auch auf die gefärbte Flüssigkeit zutrifft (siehe Abbildung 35). Woher diese verschiedenen Befunde resultieren, wird in der Diskussion im Anschluss besprochen.

4. Diskussion

Nach den hier an Kadavergeweben durchgeführten Versuchsreihen stellen sich nun einige Fragen, besonders in Hinblick auf die Anwendung der Wasserstrahltechnologie zur Injektion vitaler Zellen am Menschen.

4. 1. Erster Fehlversuch bei der Versuchsreihe mit Injektionsprotokoll 2

Zuerst ist die Problematik des gescheiterten Experiments mit Injektionsprotokoll 2 zu diskutieren. Bei dem ersten Einsprühversuch mit Injektionsprotokoll 2 kam es bei nur einem von sechs Versuchstieren zu der Blasenbildung, die anzeigte, dass die Partikellösung tatsächlich in das Gewebe gelangt ist. Es ist zu erwähnen, dass an diesem Versuchstag die Zeitspanne von der Schlachtung bis zur Laborarbeit am Präparationstisch aufgrund von Verkehrsproblemen deutlich verlängert war. Auch beim Versuchsaufbau gab es zuerst technische Probleme mit dem Erbe Jet©, wodurch die Harnblasen länger bei Raumtemperatur verweilten als die Harnblasen bei den anderen Experimenten. Fraglich ist, ob z.B. die Verwesung deutlich weiter fortschreiten konnte aufgrund der längeren Zeit bei zu warmen Temperaturen, und damit die histologischen und physikalischen Parameter des Kadavergewebes zu weit vom Zustand *ex vivo* abgewichen sind. Zusätzlich könnte auch der saure Restharn in der Blase und Urethra zu einer Zersetzung der Strukturen des Gewebes geführt haben. Bei der Wiederholung des Versuchs und der schnelleren Verarbeitung des Gewebes waren solche Effekte nicht mehr zu sehen.

4. 2. Orientierung der quergestreiften Muskelschicht

Wie bereits im Versuchsaufbau beschrieben, wurde für die Versuche die Harnröhre auf der ventralen Seite aufgeschnitten, in der Annahme, dass der Omega-förmige Muskel sich auf der dorsalen Seite befindet. Diese Annahme begründete sich durch eine anatomische Fehlinterpretation, die sich leider bereits

bei vorhergegangenen Experimenten etabliert hatte. Im Folgenden werden die tatsächliche Ausrichtung der Muskulatur und die Bedeutung dieser Fehlannahme für meine Versuchsreihe diskutiert.

Der hufeisenförmige Muskel besitzt eine Öffnung, die nach dorsal gerichtet ist. Er schließt sich daher von ventral und lateral um die Urethra.⁶⁵

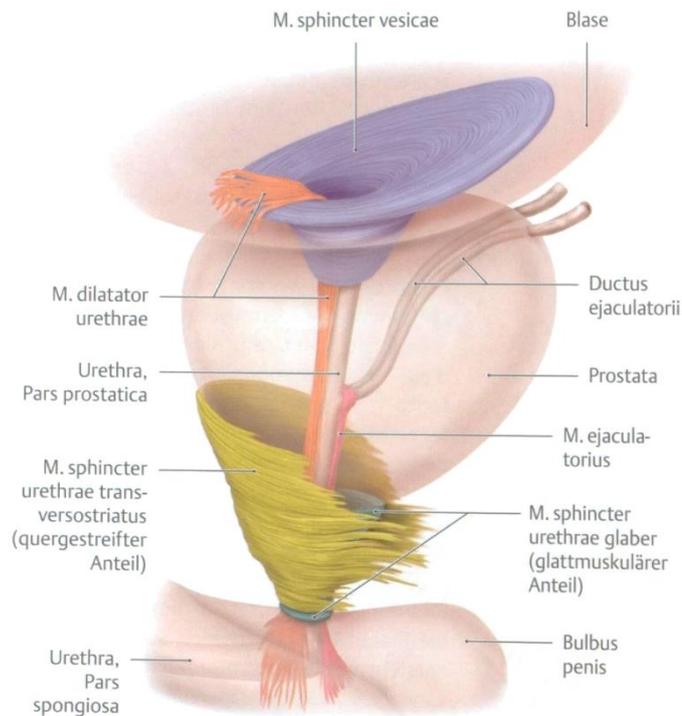


Abbildung 36: Schema zum funktionellen Muskelaufbau der Urethra und Harnblase beim Mann (Quelle: modifiziert nach Prometheus LernAtlas der Anatomie, Innere Organe (Schünke, Schulte and Schumacher, 2012, p. 395) Illustrationen von Markus Voll, Karl Wesker)⁶⁶

Um die Relevanz für die hier durchgeführten Experimente zu zeigen, wird erneut Bezug auf die Grafik von Dr. Kelp, die bereits in meiner Einleitung gezeigt wird, genommen (siehe Abbildung 1). Wie man an der immunhistochemischen Färbung des quergestreiften Muskels erkennen kann, ist diese Schicht sehr dünn und auch nicht bei jedem Tier darstellbar.

⁶⁵ Wallner *et al.* (2009, p. 936)

⁶⁶ Schünke, Schulte and Schumacher (2012)

Nachdem die anatomischen Belastungen beim Schwein durch waagrechte Körperlage anders als beim Menschen sind, hat der quergestreifte Rhabdosphinkter eine weniger tragende Rolle und ist dementsprechend weniger stark ausgeprägt als beim Menschen (vgl. Kapitel 4.3).

Des Weiteren wurden bereits mehrere Messungen des intraurethralen Druckes vorgenommen, die die verschiedene Verteilung der Druckmaxima bei Schwein und Mensch zeigen. Wie später in meiner Arbeit besprochen wird, befindet sich das Druckmaximum beim Menschen direkt am Übergang der Harnblase zur Urethra, während sich das Druckmaximum beim Schwein vorwiegend im mittleren und distalen Abschnitt zeigt.⁶⁷

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass immer der komplette Abschnitt der Urethra ausgeschnitten und ausgewertet wurde. Bei den immunhistochemischen Färbungen mit Desmin wurden jedoch nur vereinzelte Abschnitte mit angefärbter, quergestreifter Muskulatur gefunden und der Omega-förmige Muskel konnte leider bei keinem Tier so wie in der Literatur beschrieben dargestellt werden. Somit konnte man aus diesen Experimenten auch nicht ableiten, dass die angenommene Ausrichtung des Muskels falsch ist.

Des Weiteren ist die Relevanz dieser Information für die durchgeführten Experimente zu diskutieren. Da sehr schnell erkennbar wurde, dass die Muskelschicht nur mit enorm hohen Druckstärken durchbrochen werden kann, die meist große Veränderungen im Gewebe hinterlassen, die potenziell im *in vivo* Experiment Schaden hinterlassen könnte, ist es sehr wahrscheinlich, dass das Ziel, die Partikel in den quergestreiften Muskel zu befördern, nicht erfüllt werden kann.

Durch die genannten Punkte spielt die Ausrichtung des quergestreiften Muskels um die Urethra im experimentellen Modell Schwein eine untergeordnete Rolle in dieser Versuchsreihe.

⁶⁷ Amend *et al.* (2017, p. 1731)

4. 3. Anatomische Unterschiede zwischen Mensch und Schwein und die damit verbundenen Komplikationen beim Experiment

Als Nächstes muss in die Diskussion eingebracht werden, dass es schwerwiegende Unterschiede bezüglich des anatomischen Aufbaus des Urogenitaltraktes zwischen Mensch und Schwein gibt. Da besonders hier zum Tragen kommt, dass das Schwein ein Vierbeiner und der Mensch ein Zweibeiner ist, muss beachtet werden, dass die Belastungen auf den Beckenboden bei Schweinen ganz andere sind. Da die Harnblase beim Schwein tiefer liegt als der Harnröhrenausgang, ist es zudem erschwert, Inkontinenz experimentell zu simulieren (vgl. Abbildung 37 und Abbildung 38).

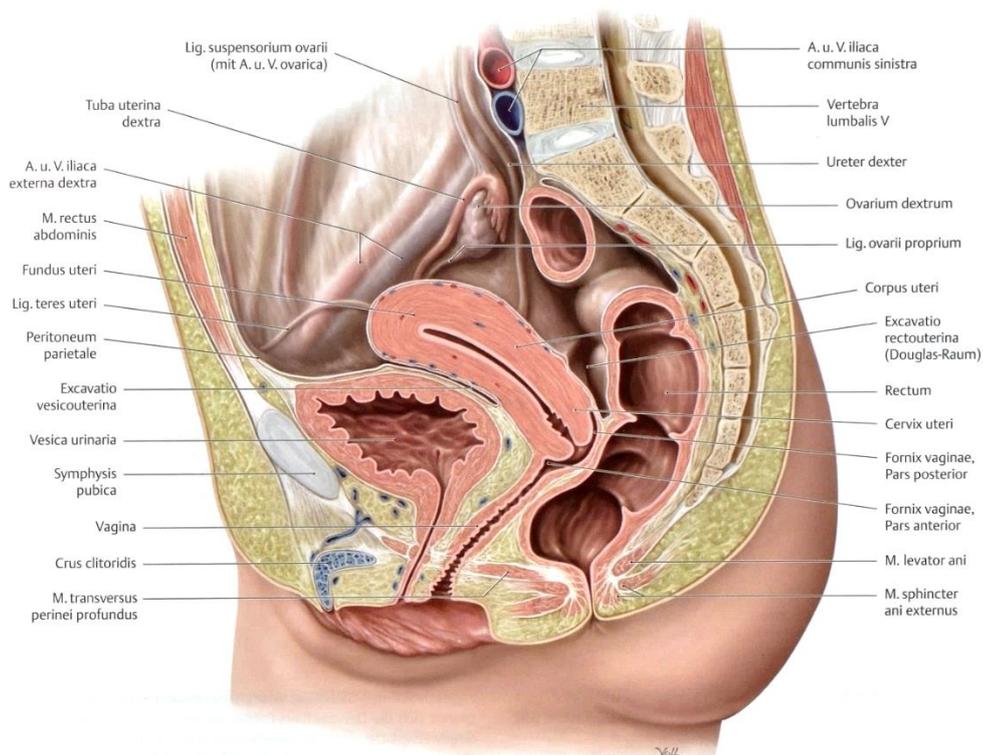


Abbildung 37: Lage der weiblichen Beckenorgane im Mediansagittalschnitt (Quelle: modifiziert nach Prometheus LernAtlas der Anatomie, Innere Organe (Schünke, Schulte and Schumacher, 2012, p. 395) Illustrationen von Markus Voll, Karl Wesker)⁶⁸

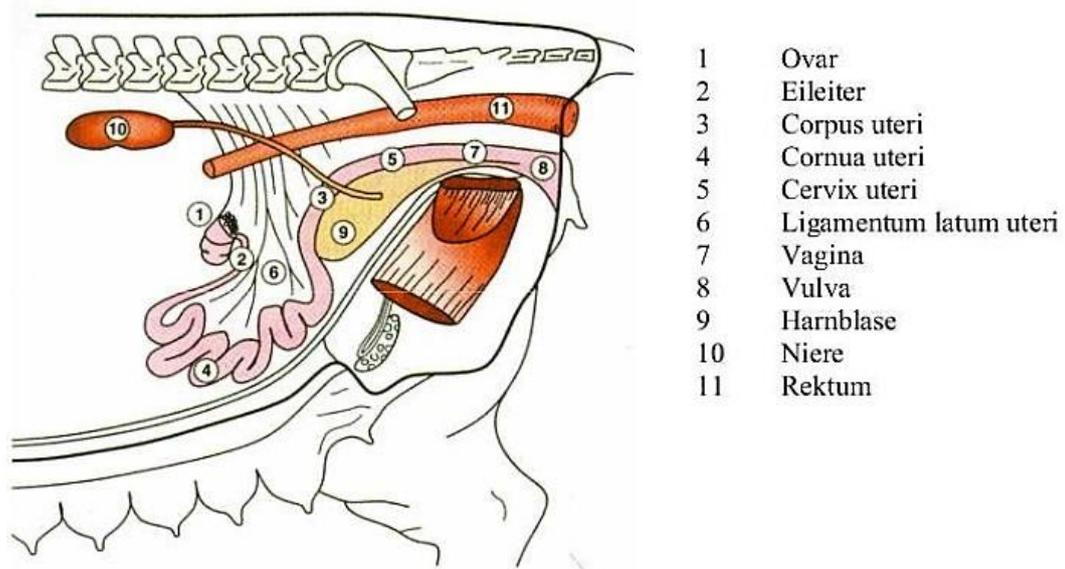


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Beckenorgane des weiblichen Schweins (Quelle: von Memento de l'éleveur de porc-Edition 2000, zitiert nach Gmeiner 2007, S.2)⁶⁹

⁶⁸ Schünke, Schulte and Schumacher (2012)

⁶⁹ Gmeiner (2007)

Zusätzlich ist dadurch auch die Verteilung der Muskulatur um die Urethra zu erklären; während beim Menschen die dickste Muskulatur direkt im Anschluss an den Blasen Hals zu finden ist, nimmt die Muskulatur beim Schwein immer weiter Richtung distal zu und erreicht ihre maximale Breite beim weiblichen Tier am Übergang zur Vagina (Siehe Abbildung 1). Dabei findet sich beim Schwein im Vergleich zum Menschen ein relativ schmaler Rhabdosphinkter. Dies kann ebenfalls dadurch erklärt werden, dass das Schwein durch die anatomische tiefere Lage der Harnblase einen Vorteil bezüglich der Kontinenzhaltung hat (siehe Abbildung 38).

Im Gegensatz zum Schwein, bei dem die Schwerkraft keine negative Auswirkung auf die Belastung und Kontinenz hat, hat der Mensch jedoch erheblich größere Belastung auf der Beckenbodenmuskulatur, da das Gewicht des gesamten Rumpfes, bedingt durch den aufrechten Gang, darauf ein Leben lang lastet.

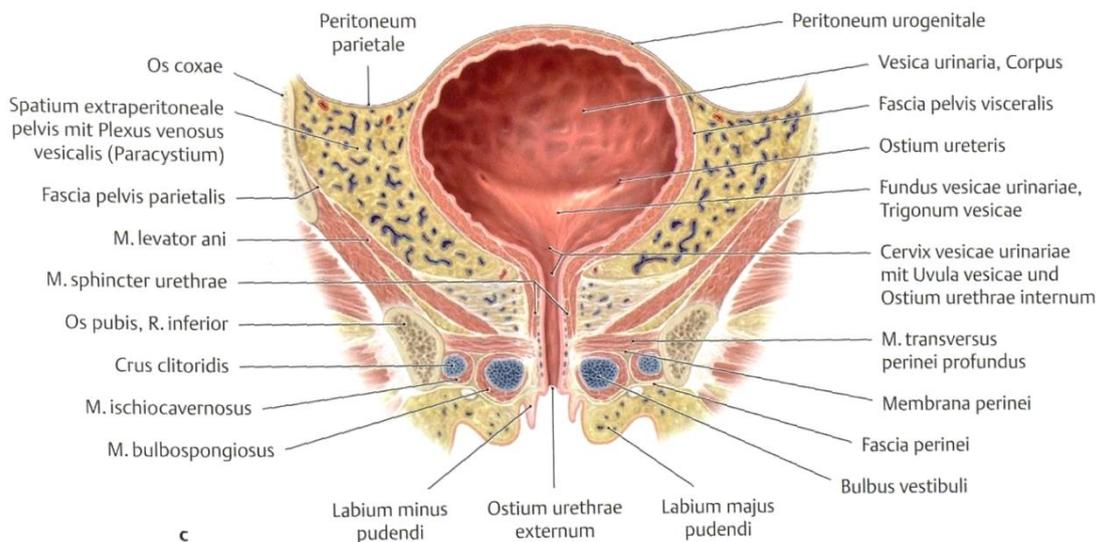


Abbildung 39: Lage der Harnblase bei der Frau, Frontalschnitt (Quelle: modifiziert nach Prometheus LernAtlas der Anatomie, Innere Organe (Schünke, Schulte and Schumacher, 2012, p. 395) Illustrationen von Markus Voll, Karl Wesker)⁷⁰

⁷⁰ Schünke, Schulte and Schumacher (2012)

Zu dem kommt hinzu, dass das weibliche Landschwein eine Urethra mit einer Länge von durchschnittlich 10cm hat, während die Länge der weiblichen Harnröhre beim Menschen bei ca. 3-5cm liegt.⁷¹ Außerdem ist beim Schwein die Muskulatur unterteilt, sodass erst ab der distalen Hälfte der Anteil von quergestreiftem Muskel zunimmt. Der proximale Teil ist nur von glattem Muskel umgeben.⁷² Auch die Druckverhältnisse in der Urethra des Schweines sind anders als beim Menschen. Während der höchste Druck beim Menschen blasennah zu finden ist, ist der Druck beim Schwein in der Mitte der Harnröhre am höchsten.⁷³ Mittels der High-Definition urethralen Druckmessung wird der Druck zirkulär in der Harnröhre durch 9 Sensoren erfasst. Nach der Messung kann ein visuell intuitiv interpretierbares Ergebnis in Form eines farbcodierten Bildes berechnet werden. Auch die Möglichkeit durch Algorithmen den genauen Ort des Sphinkters durch das Druckprofil auszurechnen ist damit möglich, so stellt die HD-urethrale Druckmessung eine attraktive Möglichkeit auch für ärztliches Personal bei der Orientierung in der Harnröhre dar.⁷⁴ Das Schwein zeichnet sich als Versuchstier durch die Größenverhältnisse, die dem Menschen nahe kommen, in diesem Punkt aus, da urodynamische Messungen an Kleintieren oft schwer durchzuführen sind. So kann auf Grund der Ermangelung eines passenden Katheters eine Flow Zystometrie, welche entscheidende Informationen bei der Diagnose einer Inkontinenz liefert, nur unter Verletzung der Harnblase bei Nagetieren durchgeführt werden. Dies wiederum verfälscht jedoch die zu erhebenden Werte.⁷⁵

Ein weiteres Problem, das bei dem Modell am Schwein aufkommt, ist, dass für alle Versuche relativ junge, regenerationsfähige Tiere verwendet wurden. Da Inkontinenz meist ein Problem des alten Menschen ist, ist es schwierig, diese Problematik auf junge, regenerationsfähige Tiere zu übertragen.⁷⁶ Bei Versuchen ein valides Inkontinenzmodell am Schwein herzustellen, gelang es erst durch die Kombination von urethraler Dilatation und Kauterisierung den Sphinkter so weit

⁷¹ Schünke, Schulte and Schumacher (2012, p. 301)

⁷² Amend *et al.* (2017, p. 1726)

⁷³ Amend *et al.* (2017, p. 1731)

⁷⁴ Klünder *et al.* (2016)

⁷⁵ Yang *et al.* (2017, p. 2501)

⁷⁶ Albrecht (2017)

zu schädigen, dass eine mindestens 3-wöchige messbare Sphinkterdefizienz erreicht wurde.⁷⁷

4. 4. Partikelverteilung im Gewebe

Des Weiteren wird die Partikelverteilung im Gewebe in Abhängigkeit der Injektionsprotokolle diskutiert.

Trotz des Verbleibens von ausreichend Suspension im Gewebe wurde durch die zu geringe Eindringtiefe Injektionsprotokoll 1 als nicht zielführend gewertet und die Versuchsreihe wurde nach den ersten Vorversuchen abgebrochen.

Bei Injektionsprotokoll 2 konnte man trotz des mittelgradigen Injektionsdruckes beobachten, dass das Bindegewebe unter der Schleimhaut stark auseinandergedrängt wurde und sich eine Art Blase gebildet hat. Obwohl zu vermuten gewesen wäre, dass die Partikel sich gleichmäßig in der PBS Lösung verteilen, sieht man bei den meisten histologischen Präparaten, dass der Großteil der Partikel sich in der Mitte der Blase befindet. Es wirkt, als wären die Partikel zusammengedrängt. Dies könnte durch eine Art der „Reflexion“ der eindringenden Druckwelle am nicht durchspülten Rand des Gewebes erklärt werden. Beides, Partikel und gelöste Farbstoffe werden gewissermaßen zurückgeschleudert. Alternativ könnte eine gewisse „Siebwirkung“ des Bindegewebes erklären, warum die Partikel vor allem im Hauptinjektionsstrom des Wasserstrahls zu finden waren. Nur ein kleiner Teil an Histofarbe und Partikel verteilt sich im Gewebe und nur einzelne Partikel schaffen es bis in die Muskelschicht.

Fraglich war, ob die Polystyrol Micropartikel aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte in der PBS Lösung zusammenhaften. Dazu wurde in einem Nebenexperiment getestet, ob die Partikel sich in einer Lösung mit Gelatine anders verhalten. Dies war jedoch nicht der Fall. Auch vor der Versuchsreihe gelöst in PBS waren sie mit freiem Auge sichtbar homogen verteilt und nicht verklumpt.

⁷⁷ Kelp *et al.* (2017, p. 1985)

Sowohl bei Injektionsprotokoll 2 als auch bei Injektionsprotokoll 3 war die zusammenhaftende Ansammlung der Partikel zu sehen. Bei Injektionsprotokoll 3 drangen jedoch einige Partikel auch zwischen die Muskelschicht und verteilten sich dort. Dieser Befund unterstützt die „Reflexionstheorie“ der inhomogenen Partikelverteilung im Kadavergewebe: nur Partikel mit ausreichender Energie können die „Gewebewand“ durchdringen, langsamere werden zurückgeworfen. Es stellt sich dennoch die Frage, wieso die Partikel auch bei Injektionsprotokoll 3 zumindest in den Fällen, in denen kein Durchschuss beobachtet worden ist, trotz höherer Energie nur vereinzelt in den Muskel eingedrungen sind. Aus den mikroskopischen Betrachtungen kann man bei einigen Präparaten sehen, dass die Partikel aussehen, als würden sie abgebremst und sogar durch einen Rückstoß anders verteilt werden. Dazu wurde die Theorie aufgestellt, dass sich die enger liegenden Muskelzellen möglicherweise wie ein Netz verhalten, das die Partikel abfängt und sich nicht so erweitern lässt wie die lockere Bindegewebschicht. Dadurch könnte es zu einem Rückstoß des Wassers beim Eindringvorgang gekommen sein, der die Partikel wieder von der Muskelwand wegstoßt, sodass sie in dem locker aufgeweiteten Bindegewebe verharren. Zusätzlich stellt sich die Frage, ob die helle Zone, bei der wir von der Flüssigkeitsblase sprechen, tatsächlich nur durch die Menge an Flüssigkeit entsteht, die die Gewebsstrukturen auseinander drängt, oder ob noch weitere Faktoren eine Rolle spielen. Dazu wurde die Zusatzversuchsreihe mit Histofarbe durchgeführt. Bei der Auswertung der Tests mit Histofarbe fiel jedoch auf, dass die gefärbten Strukturen, also die Stellen, an denen man das Flüssigkeitsreservoir vermuten würde, sich nicht mit der aufgehellten Struktur überschneidet (siehe Abbildung 34). Die gefärbten Stellen stimmen mit den Stellen, an denen sich die Fluoreszenzpartikel befinden, überein. Auch bei der Nachfolgearbeit, in der mit Nanopartikeln statt Micropartikeln gearbeitet wurde, fiel dasselbe Ergebnis auf. Ein Zusammenhang mit der Größe der Partikel erscheint daher unwahrscheinlich. Dies kann aufgrund der erhöhten Dichte der Histofarbe geschehen, jedoch ist das eher unwahrscheinlich, da keine Trennung von Histofarbe und PBS in Lösung außerhalb des Gewebes beobachtet wurde und die Trennung eher nicht erst nach der Applikation

geschieht. Darüber hinaus kann man in Erwägung ziehen, dass das Gewebe nicht durch die Menge an Wasser, die einströmt, auseinander gedrängt wird, sondern durch den Druck, mit dem das Wasser in das Gewebe appliziert wird. Wie man bei Injektionsprotokoll 1 bei Schwein H auf Höhe H10 nachverfolgen kann, hat sich zwar eine mäßig große Blase gebildet, trotz der gleichen Menge an Lösung, die appliziert wurde, sind jedoch nicht die gleichen Effekte des Auseinanderdrängens des Bindegewebes im mikroskopischen Schnitt zu sehen wie bei höheren Effektstärken.

Möglich wäre, dass der große Druck die Flüssigkeit aus den Zellen in den Extrazellulärraum drückt und dadurch die Flüssigkeitsansammlung entsteht. Es ist nicht davon auszugehen, dass größeren Mengen an Luft in das Gewebe eingebracht wurden, da man dies durch die Einfrierartefakte später gesehen hätte.

Zuletzt wurde bei einigen Experimenten beobachtet, wie Teile der Partikellösung nach Absetzen der Düse wieder nach außen austraten. Dies kann man auf die abrupt geänderten Druckverhältnisse in dem Gewebe zurückführen. Hilfreich könnte sein, die Düse noch einige Sekunden auf der Applikationsstelle verweilen zu lassen.

4. 5. Mögliche Gewebsschädigungen

Der nächste Punkt, auf den ich eingehen möchte, ist die mögliche Verletzung des Gewebes durch die Applikation mit Wasserstrahl. Bei einigen Präparaten zeigte sich in der Auswertung, dass das Urothel an der Stelle der Applikation wie abgeschält wirkt. Dies kann sowohl bei Injektionsprotokoll 2 (siehe Abbildung 20) als auch Injektionsprotokoll 3 (siehe Abbildung 25) beobachtet werden. Fraglich sind die Folgen der Abschälung des Urothels bei Anwendung der Wasserstrahltechnologie *in vivo*. Es ist möglich, dass das darunterliegende Gewebe durch den Eintritt des sauren Urins geschädigt wird. Besonders die frisch applizierten Zellen, die noch nicht verankert sind, könnten sehr empfindlich darauf reagieren. Durch die Reizung und eine mögliche Inflammation, bedingt durch den sauren Urin und den Verlust der natürlichen Schutzschicht, könnten die Bedingungen für die Stroma- oder Stammzellen, in das Gewebe

einzuwachsen, suboptimal sein. Im Gegensatz dazu könnte es aber auch die Irritation des Gewebes sein, die den Metabolismus anregt und somit sogar förderlich auf das Einwachsen der Zellen wirkt.⁷⁸

Darüber hinaus ist zu diskutieren, ob es durch die Auseinanderdrängung des Gewebes zu einer Schädigung an den Nervenendigungen kommt. Ähnlich wie beim Geburtstrauma wird das Gewebe unter extremer Belastung aufgedehnt. Dadurch könnte es zu einem ähnlichen Effekt kommen, der unter anderem als Ursache der Inkontinenzentstehung gewertet wird. Und zwar zu dem Absprennen der Nervenenden an der neuronalen Endplatte am Muskel, was zu einer Schädigung der neurovaskulären Strukturen führt.⁷⁹ Vorhergegangene Versuche ein Inkontinenzmodell am Schwein zu erstellen, zeigten jedoch, dass die alleinige Überdehnung der Harnröhre mit einem Dilatationskatheter zumindest bei jungen Tieren nicht dauerhaft zu Inkontinenz führt.⁸⁰

Zusätzlich ist auch zu erwähnen, dass bei präklinischen vitalen Modellen oder bei späteren klinischen Studien eine Abwanderung injizierter Zellen durch aktive Migration oder passiv durch die Bewegungen des Gewebes nicht auszuschließen ist. Es steht zudem zur Diskussion, welche Voraussetzungen die zu applizierenden Zellen erfüllen müssen, um zur Therapie zugelassen zu werden. Wenn autologe Stammzellen oder induzierte pluripotente Stammzellen zur Anwendung kommen sollten, wäre unter Umständen eine genetische Untersuchung bezüglich des Potenzials der malignen Entartung indiziert.⁸¹ Bei der Anwendung von autologen mesenchymalen Stromazellen oder Myoblasten wird, nach aktuellem Stand der Technik, ein Entartungsrisiko allerdings als gering eingeschätzt. In Studien wurde bereits über Chromosomenabweichungen in mesenchymalen Stromazellen Kulturen berichtet, eine tatsächliche Tumorentstehung wird jedoch nie beschrieben.⁸²

⁷⁸ Amend *et al.* (2017, p. 1726)

⁷⁹ Amend *et al.* (2017, pp. 1723–1724)

⁸⁰ Kelp *et al.* (2017, p. 1977)

⁸¹ Vaegler *et al.* (2014, p. 359)

⁸² Yiou *et al.* (2013, p. 1114)

4. 6. Zellüberlebensrate bei verschiedenen Injektionsprotokollen

Außerdem muss für klinische Studien die aktuell (Stand Sommer 2018) im Laborversuch noch relativ geringe Überlebensrate der Zellen nach der Applizierung mit hohen Effektstärken durch die Standard-Wasserstrahl-Düse berücksichtigt werden. Schon beim Versprühen von Zellen mit Injektionsprotokoll 1 liegt die Überlebensrate der Zellen je nach Düse unter 10%. Die für spätere klinische Anwendungen notwendige Überlebensrate von 80% vitalen Zellen konnte bislang nur bei einzelnen Tests mit verschiedenen Prototypen und bei sehr niedrigen Druckstärken beobachtet werden.⁸³ Hier sind weitere technische Verbesserungen angezeigt, welche unter Umständen dann auch andere Verteilungsmuster bzw. Eindringtiefen der Histofarbe und Partikel in das Kadavergewebe ermöglichen können.

4. 7. Mechanische Obstruktion durch Gewebsschwellung

Zuletzt möchte ich auch noch auf den Punkt des mechanischen Verschlusses durch die Gewebsblase, die bei der Wasserstrahlapplikation entsteht, eingehen. Schon während des Einspritzversuchs bildete sich bei den Gewebeproben, die mit Injektionsprotokoll 2 und Injektionsprotokoll 3 behandelt wurden, eine große Blase im Gewebe. Es stellt sich also die Frage, ob diese bei der Anwendung im *in vivo* Experiment nicht zwingend zu einem Harnverhalt durch mechanische Obstruktion führen müsste, besonders wenn man an mehreren Stellen appliziert. Dazu ist zu erwähnen, dass die sichtbare Schwellung schon nach ein paar Sekunden an Höhe abnahm. Vermutlich geschieht dies durch Diffundieren der Flüssigkeit tiefer in das Gewebe. Es ist also anzunehmen, dass sich die Gewebsschwellung durch die Blase schnell verringert. In einer Studie von Amend et al. wird auch darüber berichtet, dass das Druckprofil in der Harnröhre von Göttinger Minipigs sich nicht wesentlich durch die Injektion verändert hat und auch dass eine Menge von bis zu 20ml Applikationsvolumen bei größeren Säugern toleriert wurde.⁸⁴

⁸³ Gillmann (2017)

⁸⁴ Amend et al. (2017, pp. 1729–1731)

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Versuche mit mesenchymalen Stromazellen großes Potenzial für die Anwendung am Menschen haben. Ob der Schaden, der durch die hohen Effektstärken hervorgerufen wird, tatsächlich bleibende strukturelle Beeinträchtigungen hinterlässt, kann nicht am Kadavermodell oder im Labor, sondern nur durch einen *in vivo* Versuch am Tier verifiziert werden.

Im Allgemeinen haben die Partikel mit Injektionsprotokoll 3, also mit etwas höheren Druckstärken, tiefere Regionen im Gewebe erreicht und dabei zum Teil auch die Muskelschicht penetriert. Bei der histologischen Auswertung fällt jedoch auf, dass die umliegenden Strukturen auch stärker geschädigt wirken als bei Partikelapplikationen nach Injektionsprotokoll 2. Bei höheren Druckstärken kam es teilweise sogar zu einer Durchbrechung aller Schichten durch den Wasserstrahl bis außerhalb der Adventitia, der äußersten Organschicht. Darüber hinaus konnte man sehen, dass Muskelfasern durch die Kraft des Wasserstrahls auseinandergedrängt wurden. Auch der Urothelschaden ist bei den Versuchstieren mit Injektionsprotokoll 3 stärker zu sehen.

Bei Injektionsprotokoll 2 wurden nicht alle Partikel weit in das Gewebe transportiert, sondern verharrten tendenziell mittig in der aufgehellten Zone im Bindegewebe. Vereinzelt trafen die Partikel bis an den Rand der Muskelschicht, jedoch drangen kaum Partikel in die Muskelschicht ein. Dadurch wurde jedoch die Muskelzellschicht nicht auseinandergedrängt und wirkt dadurch weniger beeinträchtigt als nach der Behandlung mit Injektionsprotokoll 3.

Durch die größere strukturelle Veränderung, die der Wasserstrahl mit hohen Effektstärken am Muskel bedingt, wären geringere Effektstärken schonender für das Gewebe und auch für die applizierten Zellen. Dadurch könnte man eventuell auch verhindern, dass durch die Auseinanderdehnung der Muskelzellen die Nervenzellköpfchen abgerissen werden. Somit wäre es sogar sinnvoller als Ort der optimalen Platzierung den Rand der Muskelschicht anzupeilen. Dies war schon bei mittleren Effektstärken mit Injektionsprotokoll 2 möglich.

Auch wenn es direkt nach dem Experiment so scheint, als könnte es durch die Wandschwellung zu Obstruktionsbeschwerden der Harnröhre kommen, ist es wahrscheinlich, dass sich diese Schwellung *in vivo* durch die schnelle Diffusion des Mediums in tieferliegende Gewebsschichten, ähnlich wie bei einer Quaddel, spontan und rasch wieder auf Urothelniveau zurückbildet. Auch wenn später in der klinischen Situation eine Schwellung in den ersten Stunden nach Wasserstrahlapplikation bei Patientinnen oder Patienten auftreten sollte, könnte diese Zeitspanne mit einer Einmalkatheterisierung überbrückt werden und würde so auch die Einsprühstellen zusätzlich in dieser Zeit vor dem Angriff des sauren Urins schützen.

6. Danksagungen

Ich möchte mich von Herzen für die Unterstützung und die wunderbare Zusammenarbeit bei meiner Betreuerin Frau Dr. Alexandra Kelp bedanken. Ich durfte viel von ihr über wissenschaftliches Arbeiten lernen und konnte dadurch meine Begeisterung für die Arbeit im Labor entdecken.

Des Weiteren gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilhelm Aicher, der mir ermöglicht hat, dieses spannende Thema zu bearbeiten.

Zusätzlich möchte ich mich bei dem Team seines Forschungslabors bedanken. Dabei gilt mein besonderer Dank Frau Tanja Abruzzese und Frau Cornelia Bock für die wertschätzende und konstruktive Zusammenarbeit.

Als Nächstes möchte ich auch meinen Dank der Firma Erbe aussprechen, für die außerordentlich gute Zusammenarbeit und die großzügige Bereitstellung Ihres Labors und Ihrer Geräte.

Schlussendlich ist es mir auch ein Anliegen, meinen Dank gegenüber dem BMBF kund zu tun, die durch die finanziellen Mittel diese Forschung möglich machten.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung des Bindegewebes und der Muskulatur im Verlauf der porcinen Urethra (Quelle: Kelp, Amend; Precise injection of human mesenchymal stroma cells in the urethral sphincter complex of Göttingen minipigs without unspecific bulking effects)	13
Abbildung 2: Schema einer Harnblase und Urethra mit markierten Messeinheiten H0, H5 und H10.....	14
Abbildung 3: präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein F1 vor dem Eröffnen.....	18
Abbildung 4 präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein F1 nach dem Eröffnen mit der chirurgischen Schere	18
Abbildung 5: Links: Erhöhung aus Styropor mit daraufliegender, mit Schaumstoff gepolsterter Schale, auf der die offen präparierte Harnröhre liegt, darüber die bereits aufgesetzte Einsprühdüse. Mitte: Verstellbares Höhenmessgerät mit Halterung für die Düse. Rechts: Erbe Jet®, darauf ist das Steuerungsmodul, das die Injektionsrate bestimmt. Versuchsaufbau für einen Sprühversuch mit Injektionsprotokoll 2	20
Abbildung 6: offen präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein Q vor dem Sprühversuch	21
Abbildung 7: offen präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein Q nach Sprühversuch, Auf Höhe H5 und H10 deutlich erkennbare flüssigkeitsgefüllte Blasen nach der Injektion	21
Abbildung 8: präparierte Harnblase des Versuchstieres Schwein Q nach dem Ausschneiden der Blasen im Gewebe.....	21
Abbildung 9: Schnittpräparat aus der Harnröhre des Versuchstieres Schwein D, 10min Inkubation in Aceton; die Pfeile deuten auf vereinzelt Partikel, die die Fluoreszenz beibehielten, die meisten Partikel sind durch die Exposition in Aceton verblasst.....	22
Abbildung 10: Schnittpräparat aus der Harnröhre des Versuchstieres Schwein D, 30sec Inkubation in Aceton; die Pfeile deuten auf mehrere fluoreszierende	

Partikel im Gewebe, daneben sind auch Partikel zu sehen, die Ihre Fluoreszenz verloren haben	22
Abbildung 11: Schnittpräparat aus der Harnröhre des Versuchstieres Schwein G, kein Kontakt mit Aceton, alle fluoreszierenden Partikel leuchten gleichmäßig	22
Abbildung 12: offen präparierte Harnblase von Versuchstier Schwein H, vor Sprühversuch	27
Abbildung 13: offen präparierte Harnblase von Versuchstier Schwein H, nach Sprühversuch; deutlich sichtbare Blase bei der Markierung H10, weniger große Blase bei der Markierung H5.....	27
Abbildung 14: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Harnröhre nach dem Injektionsversuch bei Versuchstier Schwein H mit Injektionsprotokoll 1 (Schwein H_H5_OT27)	28
Abbildung 15: Detailaufnahme aus Abbildung 14 (Schwein H_H5_OT27_Detail)	28
Abbildung 16: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Harnröhre nach dem Injektionsversuch bei Versuchstier Schwein H mit Injektionsprotokoll 1 (Schwein H_H10_OT32)	29
Abbildung 17: Detailaufnahme von Abbildung 16 (Schwein H_H10_OT32_Detail)	29
Abbildung 18: offen präparierte Harnblase von Versuchstier Schwein U vor dem Sprühversuch	31
Abbildung 19: offen präparierte Harnblase von Versuchstier Schwein U nach Sprühversuch, sichtbare Blasenbildung bei den Markierungen H5 und H10 im Gewebe	31
Abbildung 20: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Harnröhre nach dem Injektionsversuch bei Versuchstier Schwein U (Schwein U_H5_OT79), Links: Übersichtsaufnahme mit weißer Umrandung, Rechts: Detailaufnahme aus der Übersichtsaufnahme.....	32
Abbildung 21: mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein U (Schwein U_H10_OT80) auf Höhe H10; Links: Übersichtsaufnahme des kompletten Präparates, man sieht deutlich mittig eine	

aufgehellte Zone wo die Applikation erfolgt ist; Rechts oben und unten: Detailaufnahmen aus der Übersichtsaufnahme, die Fluoreszenzpartikel verteilen sich nicht homogen im Gewebe sondern bleiben strahlartig im Bindegewebe dicht aufeinander liegen.....	33
Abbildung 22: Übersicht über die Applikationsversuchsreihe, die mit Injektionsprotokoll 2 durchgeführt wurde; Links: Die Präparate der Versuchsreihe, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H5 erfolgt; Rechts: Die Präparate der Versuchsreihe, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H10 erfolgte.....	35
Abbildung 23: offen präparierte Harnröhre des Versuchstieres Schwein W, vor Sprühversuch	37
Abbildung 24: offen präparierte Harnröhre des Versuchstieres Schwein W, nach Sprühversuch; deutlich erkennbare Blasenbildung auf Höhe H5 und H10.....	37
Abbildung 25: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein W (Schwein W_H5_OT63); Links: Übersichtsaufnahme über den kompletten Schnitt, mittig ist durch eine Aufhellung des Gewebes sichtbar, dass eine Auflockerung zwischen den Fasern stattgefunden hat; Rechts oben: eine Ansammlung von Partikeln vor der Muskelschicht; Rechts unten: Die einzelnen Partikel haben sich zwischen den aufgelockerten Muskelfasern festgesetzt.....	38
Abbildung 26: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Urethra von Versuchstier Schwein W (Schwein W_H10_OT65); Links: Übersichtsaufnahme des kompletten Präparats, lumennah weiß umrandet sieht man zwei Partikelwolken, die in dem aufgelockerten Bindegewebe der Submucosa stecken; Rechts oben und unten: Detailaufnahme der Partikel im Gewebe.....	39
Abbildung 27: mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Urethra von Schwein V (Schwein V_H5_OT79); Links: Übersichtsaufnahme des kompletten Präparates, weiß umrandet: die Fluoreszenzpartikel, die sowohl im Bindegewebe als auch in der Muskelschicht stecken; Rechts oben: Einige Partikel, die durch die Muskelschicht gedrungen sind; Rechts unten: Ansammlung von Partikeln im Bindegewebe	41

Abbildung 28: Mit Azan gefärbtes histologisches Präparat der Urethra des Versuchstieres Schwein V (Schwein V_H10_OT72); Links: Übersichtsaufnahme des kompletten Schnittes, mittig weite Auseinanderdehnung der rot gefärbten Muskelfasern zu erkennen; Rechts: Detailaufnahme in der erkennbar ist, wie die Muskelfasern vereinzelt stehen und die Fluoreszenzpartikel zwischen den Fasern sich gesammelt haben	42
Abbildung 29: Übersicht über die Versuchsreihe, die mit Injektionsprotokoll 3 durchgeführt wurde; Links: Die Präparate der Versuchsreihe, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H5 erfolgte; Rechts: Die Präparate, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H10 erfolgte.....	44
Abbildung 30: offen präparierte Harnröhre des Versuchstieres Schwein B1, vor Sprühversuch	46
Abbildung 31: offen präparierte Harnröhre des Versuchstieres Schwein B1, nach Sprühversuch, deutlich erkennbare blaue Verfärbungen im Bereich der erfolgten Applikation.....	46
Abbildung 32: Nahaufnahme aus der präparierten Harnröhre des Versuchstieres Schwein C1, Detailaufnahme der blauen Partikelblase	47
Abbildung 33: mit α -fast Myosin Immunhistochemie gefärbtes Schnittpräparat des Versuchstieres Schwein B1 (Schwein B1_H5_OT27) Links: Übersichtsaufnahme des kompletten Präparates, die blaue Histofarbe und die Partikel verteilen sich ähnlich im Gewebe; Rechts: Detailaufnahme der Verteilung von Histofarbe und Fluoreszenzpartikeln im Gewebe	48
Abbildung 34: Mit α -fast Myosin Immunhistochemie angefärbtes Präparat der Urethra von Versuchstier Schwein B1 (Schwein B1_H10_OT27), Links: Deutlich sichtbare mittige Aufhellung in der Submucosa bedingt durch die Aufweitung des Gewebes, zentral kompakt im Gewebe sitzend, sind sowohl die Histofarbe als auch die Partikel erkennbar; Rechts: Partikel und Histofarbe sitzen kompakt zusammengedrängt im Gewebe.....	49
Abbildung 35: Übersicht über die Versuchsreihe, die mit Injektionsprotokoll 2, Fluoreszenzpartikeln und Histofarbe durchgeführt wurde; Oben: Die Präparate der Versuchsreihe, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H5 erfolgte;	

Unten: Die Präparate, bei der die Applikation der Partikel auf Höhe H10 erfolgte	50
Abbildung 36: Schema zum funktionellen Muskelaufbau der Urethra und Harnblase beim Mann (Quelle: modifiziert nach Prometheus LernAtlas der Anatomie, Innere Organe (Schünke, Schulte and Schumacher, no date, p. 395) Illustrationen von Markus Voll, Karl Wesker).....	53
Abbildung 37: Lage der weiblichen Beckenorgane im Mediansagittalschnitt (Quelle: modifiziert nach Prometheus LernAtlas der Anatomie, Innere Organe (Schünke, Schulte and Schumacher, no date, p. 395) Illustrationen von Markus Voll, Karl Wesker).....	56
Abbildung 38: Schematische Darstellung der Beckenorgane des weiblichen Schweins (Quelle: von Memento de l'éleveur de porc-Edition 2000, zitiert nach Gmeiner 2007, S.2).....	56
Abbildung 39: Lage der Harnblase bei der Frau, Frontalschnitt (Quelle: modifiziert nach Prometheus LernAtlas der Anatomie, Innere Organe (Schünke, Schulte and Schumacher, no date, p. 395) Illustrationen von Markus Voll, Karl Wesker).....	57

Literaturverzeichnis

Aicher, W.K. *et al.* (2014) 'Towards a Treatment of Stress Urinary Incontinence: Application of Mesenchymal Stromal Cells for Regeneration of the Sphincter Muscle', *Journal of Clinical Medicine*, 3(1), pp. 197–215.

doi: 10.3390/jcm3010197

Albrecht, A. (2017) 'Präklinische Untersuchung am Großtiermodell zur Verbesserung der Diagnose von Harninkontinenz'.

Amend, B. *et al.* (2015) 'Regeneration of degenerated urinary sphincter muscles: Improved stem cell-based therapies and novel imaging technologies', *Cell Transplantation*, 24(11), pp. 2171–2183. doi: 10.3727/096368915X686229

Amend, B. *et al.* (2017) 'Precise injection of human mesenchymal stromal cells in the urethral sphincter complex of Göttingen minipigs without unspecific bulking effects', *Neurourology and Urodynamics*, 36(7), pp. 1723–1733.

doi: 10.1002/nau.23182

Aufderklamm, S. *et al.* (2017) 'Collagen cell carriers seeded with human urothelial cells for urethral reconstructive surgery: First results in a xenograft minipig model', *World Journal of Urology*, 35(7), pp. 1125–1132.

doi: 10.1007/s00345-016-1959-3

Balashov, S.P. *et al.* (2005) 'Xanthorhodopsin: A proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna', *Science (New York, N.Y.)*, 309(5743),

pp. 2061–2064. doi: 10.1126/science.1118046

Burdzińska, A. *et al.* (2012) 'Urethral distension as a novel method to simulate sphincter insufficiency in the porcine animal model', *International Journal of Urology : Official Journal of the Japanese Urological Association*, 19(7),

pp. 676–682. doi: 10.1111/j.1442-2042.2012.02994.x

Burdzińska, A. *et al.* (2013) 'The effect of endoscopic administration of autologous porcine muscle-derived cells into the urethral sphincter', *Urology*,

82(3), 743.e1-8. doi: 10.1016/j.urology.2013.03.030

- Burdzinska, A. *et al.* (2017) 'The Anatomy of Caprine Female Urethra and Characteristics of Muscle and Bone Marrow Derived Caprine Cells for Autologous Cell Therapy Testing', *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 300(3), pp. 577–588. doi: 10.1002/ar.23498
- Carr, L.K. *et al.* (2008) '1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence', *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction*, 19(6), pp. 881–883. doi: 10.1007/s00192-007-0553-z
- Chermansky, C.J. and Moalli, P.A. (2016) 'Role of pelvic floor in lower urinary tract function', *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*, 200, pp. 43–48. doi: 10.1016/j.autneu.2015.06.003
- Christiansen, D. *et al.* (2019) 'A fast, reliable and sample-sparing method to identify fibre types of single muscle fibres', *Scientific Reports*, 9(1), p. 6473. doi: 10.1038/s41598-019-42168-z
- Corcos, J. *et al.* (2011) 'Bone marrow mesenchymal stromal cell therapy for external urethral sphincter restoration in a rat model of stress urinary incontinence', *Neurourology and Urodynamics*, 30(3), pp. 447–455. doi: 10.1002/nau.20998
- Eberli, D. *et al.* (2009) 'A canine model of irreversible urethral sphincter insufficiency', *BJU International*, 103(2), pp. 248–253. doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.08001.x
- Eberli, D. *et al.* (2012) 'Muscle precursor cells for the restoration of irreversibly damaged sphincter function', *Cell Transplantation*, 21(9), pp. 2089–2098. doi: 10.3727/096368911X623835
- Gasser, T. (2014) *Basiswissen Urologie Gasser*. 6th edn.: Springer Verlag.
- Gillmann, C. (2017) 'Evaluation and optimization of a multi fluid nozzle for the transport of living cells'.
- Gmeiner, K. (2007) 'Ultraschallgraphische Charakterisierung der gesunden und kranken Harnblase bei der Sau (Dissertation). Universität Leipzig (Veterinärmedizinische Fakultät): Leipzig.'

- Gotoh, M. *et al.* (2014) 'Regenerative treatment of male stress urinary incontinence by periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells: 1-year outcomes in 11 patients', *International Journal of Urology : Official Journal of the Japanese Urological Association*, 21(3), pp. 294–300. doi: 10.1111/iju.12266
- Gotoh, M. *et al.* (2018) 'Treatment of male stress urinary incontinence using autologous adipose-derived regenerative cells: Long-term efficacy and safety', *International Journal of Urology : Official Journal of the Japanese Urological Association* (6pp). doi: 10.1111/iju.13886
- Hautmann, R. and Gschwend, J.E. (2014) *Urologie Hautmann Gschwend*. 4th edn.
- Kelp, A. *et al.* (2017) 'Establishing and monitoring of urethral sphincter deficiency in a large animal model', *World Journal of Urology*, 35(12), pp. 1977–1986. doi: 10.1007/s00345-017-2088-3
- Kim, S.-O. *et al.* (2011) 'Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation enhances closing pressure and leak point pressure in a female urinary incontinence rat model', *Urologia Internationalis*, 86(1), pp. 110–116. doi: 10.1159/000317322
- Kinebuchi, Y. *et al.* (2010) 'Autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation into injured rat urethral sphincter', *International Journal of Urology : Official Journal of the Japanese Urological Association*, 17(4), pp. 359–368. doi: 10.1111/j.1442-2042.2010.02471.x
- Klünder, M. *et al.* (2016) 'Signal processing in urodynamics: Towards high definition urethral pressure profilometry', *Biomedical Engineering Online*, 15, p. 31. doi: 10.1186/s12938-016-0145-6
- Kwon, D. *et al.* (2005) 'Neurologic recovery and improved detrusor contractility using muscle-derived cells in rat model of unilateral pelvic nerve transection', *Urology*, 65(6), pp. 1249–1253. doi: 10.1016/j.urology.2005.01.037
- Lecoeur, C. *et al.* (2007) 'Intraurethral transfer of satellite cells by myofiber implants results in the formation of innervated myotubes exerting tonic

contractions', *The Journal of Urology*, 178(1), pp. 332–337.

doi: 10.1016/j.juro.2007.02.044

Lee PE, Kung RC, Drutz HP 'Periurethral autologous fat injection as treatment for female stress urinary incontinence: a randomized double-blind controlled trial', *J. Urol.* 2001, 165: 153–8.

Mitterberger, M. *et al.* (2007) 'Functional and histological changes after myoblast injections in the porcine rhabdosphincter', *European Urology*, 52(6), pp. 1736–1743. doi: 10.1016/j.eururo.2007.05.007

Rautenberg, O. *et al.* (2017) 'Current Treatment Concepts for Stress Urinary Incontinence', *Praxis*, 106(15), 829e-836e. doi: 10.1024/1661-8157/a002843

Rodriguez-Veiga, E. *et al.* (2004) 'Stereological Study of the External Urethral Sphincter in the Female Urethra of the Lamb: A New Model for Studies on Urinary Continence'.

Schünke, M., Schulte, E. and Schumacher, U. (2012) 'Prometheus: Lern Atlas der Anatomie'. Innere Organe, 2012.

Sèbe, P. *et al.* (2011) 'Intrasphincteric injections of autologous muscular cells in women with refractory stress urinary incontinence: A prospective study', *International Urogynecology Journal*, 22(2), pp. 183–189. doi: 10.1007/s00192-010-1255-5

Sohei Tokunaka, Hiromitsu Fujii, Hiroshi Hashimoto, Sunao Yachik (1992) 'Proportions of fiber types in the external urethral sphincter of young nulliparous and old multiparous rabbits'.

Stangel-Wojcikiewicz, K. *et al.* (2014) 'Autologous muscle-derived cells for the treatment of female stress urinary incontinence: A 2-year follow-up of a Polish investigation', *Neurourology and Urodynamics*, 33(3), pp. 324–330.

doi: 10.1002/nau.22404

Vaegler, M. *et al.* (2014) 'Zellbasierte Therapie der Belastungsinkontinenz: Welche Zelle zu welchen Kosten?' *Der Urologe. Ausg. A*, 53(3), pp. 354–361.

doi: 10.1007/s00120-013-3353-8

- Wallner, C. *et al.* (2009) 'The anatomical components of urinary continence', *European Urology*, 55(4), pp. 932–943. doi: 10.1016/j.eururo.2008.08.032
- Wiedemann, A. (2016) 'Wer ältere Patienten urologisch behandeln will, muss umdenken', *Uro-News*, 20(4), pp. 42–47. doi: 10.1007/s00092-016-0910-7
- Yamamoto, T. *et al.* (2012) 'Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress urinary incontinence: Report of three initial cases', *International Journal of Urology : Official Journal of the Japanese Urological Association*, 19(7), pp. 652–659. doi: 10.1111/j.1442-2042.2012.02999.x
- Yang, Y. *et al.* (2017) 'Minimal Invasive Cystometry and Intra-Abdominal Pressure Assessments in Rodents: A Novel Animal Study', *Medical Science Monitor*, 23, pp. 2500–2507. doi: 10.12659/MSM.904760
- Yiou, R. *et al.* (2002) 'Muscle precursor cell autografting in a murine model of urethral sphincter injury', *BJU international*, 89(3), pp. 298–302. doi: 10.1046/j.1464-4096.2001.01618.x
- Yiou, R. *et al.* (2013) 'Periurethral skeletal myofibre implantation in patients with urinary incontinence and intrinsic sphincter deficiency: A phase I clinical trial', *BJU International*, 111(7), pp. 1105–1116. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11682.x
- Yiou, R. *et al.* (2016) 'Delivery of human mesenchymal adipose-derived stem cells restores multiple urological dysfunctions in a rat model mimicking radical prostatectomy damages through tissue-specific paracrine mechanisms', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 34(2), pp. 392–404. doi: 10.1002/stem.2226
- Zini, L. *et al.* (2006) 'The striated urethral sphincter of the pig shows morphological and functional characteristics essential for the evaluation of treatments for sphincter insufficiency', *The Journal of Urology*, 176(6 Pt 1), pp. 2729–2735. doi: 10.1016/j.juro.2006.07.135

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die experimentellen Arbeiten wurde in der Universitätsklinik für Urologie der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen unter der Leitung und Betreuung von Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte im Rahmen eines BMBF-geförderten Projekts (Multimorb-INKO) und in enger Zusammenarbeit mit der Firma Erbe Medizintechnik.

Sämtliche Versuche wurden, nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Dr. Alexandra Kelp, Tanja Abruzzese und Cornelia Bock, eigenständig von mir durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet zu haben.



Johanna Schreiber

Regensburg, den 01.07.2019