

Entwicklung eines Gewebeersatzes für postoperative Weichgewebedefekte

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Carina Syring
aus Berlin

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Helmut Schubert

Berichter: Prof. Dr.-Ing. Peter Götz

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Lauster

Berichter: Prof. Dr. med. Peter Hohenberger

Tag der wissenschaftliche Aussprache: 17.05.2004

Berlin 2004

D 83

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Deutschen Institut für Zell- und Gewebeersatz (DIZG). Der Anstoß für die Auseinandersetzung mit dieser klinisch wichtigen Problemstellung wurde durch Herrn Prof. Dr. P. Hohenberger – dem Leitenden Oberarzt der Klinik für Chirurgie und Chirurgische Onkologie der Robert-Rössle-Klinik – gegeben. Ohne die Unterstützung von vielen Seiten wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen und ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen, um meine Wertschätzung dafür zum Ausdruck zu bringen.

Herrn Prof. Dr. P. Götz – dem Leiter des Fachgebiets Bioverfahrenstechnik am Institut für Biotechnologie der TU Berlin – danke ich herzlich für die Betreuung der Arbeit und die vielen nützlichen Hinweise, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beitrugen. Bei Herrn Prof. Dr. R. Lauster – dem Leiter des Fachgebiets Medizinische Biotechnologie am Institut für Biotechnologie – bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferates und die kritische Durchsicht des Manuskriptes. Ferner gebührt auch Herrn Prof. Dr. P. Hohenberger Dank für seine Gutachtertätigkeit. Darüber hinaus hat er durch Anregung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine vielfältige Unterstützung der Arbeit diese maßgeblich beeinflusst. Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Schubert – dem Leiter des Fachgebiets Keramische Werkstoffe am Institut für Werkstoffwissenschaften und -technologien für die Bereitschaft, den Vorsitz des Promotionsausschusses zu übernehmen. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen im DIZG, für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung meiner Arbeit. Hier sind zu nennen Herr Dr. habil. R. von Versen, Herr Dipl.-Phys. H.-J. Mönig, Herr Dr. H.-J. Jacker, Frau G. Dietz, Frau R. Meyer sowie Frau M. Lein. Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. W. Schneider – dem Leiter des Pathologischen Institutes des Klinikums Berlin-Buch – und seinen Mitarbeiterinnen für die Durchführung der histologischen Untersuchungen zu Dank verpflichtet. Dank gebührt auch der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie am Virchow-Klinikum Berlin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. S. Bachmann für die Durchführung der Elektronenmikroskopie. Bei Frau Dr. M. Seifert – der Leiterin der AG Tissue Engineering am Institut für Medizinische Immunologie der Charité – und ihrem Team bedanke ich mich herzlich für die umfangreiche Unterstützung bei der Gewinnung der tierexperimentellen Daten und die Durchführung der Transplantation.

Schließlich möchte ich meinen Eltern Dank sagen, die mir durch Ihre Zuwendung und Unterstützung das Studium ermöglichten und damit den Grundstein für meinen Werdegang legten. Besonders herzlich möchte ich meinem Partner Norbert für seine liebevolle Unterstützung danken und dafür, dass er diese Arbeit mit großem Engagement begleitet hat.

Abstract

Bei der Entfernung von Sarkomen werden ausgedehnte Weichgewebsdefekte geschaffen, die wegen ihrer Größe und aufgrund einer präoperativen Bestrahlung eine niedrige Reparaturtendenz aufweisen und schwere Heilungsstörungen verursachen. Aufgrund der Wundprobleme kann eine Nachbehandlung, wie z.B. Strahlen- oder Chemotherapie, nur verzögert, möglicherweise überhaupt nicht vorgenommen werden, was die Überlebenschancen der Patienten reduziert. Da die Behandlung dieser Weichgewebsschäden gegenwärtig nur unbefriedigend gelöst ist, war es Ziel, einen Weichgewebssersatz herzustellen, der eine längerfristige Defektfüllung gestattet, durch Transfer aktiver autologer Zellen die Heilungsprobleme ausgleicht sowie die rechtlichen Anforderungen für den klinischen Einsatz in der Bundesrepublik Deutschland erfüllt.

Mit Hilfe eines eigens entwickelten Trägermaterials in Form einer humanen, sterilisierten azellulären Dermis sowie humaner dermaler Fibroblasten konnte ein komplexer Weichgewebssersatz geschaffen werden. Das Vorliegen typischer dermaler Strukturen, einer großen Durchlässigkeit für Modellsubstanzen, einer hohen Biokompatibilität sowie Materialstabilität zeigte, dass die hergestellte azelluläre Dermis gute Voraussetzungen für die Zellbesiedelung bietet. Durch Anwendung eines validierten Virusinaktivierungsverfahrens erfüllt diese Matrix die Anforderungen an Arzneimittel humanen Ursprungs. Die azelluläre Dermis wurde unter Nutzung der Methoden des Tissue Engineering mit den zuvor *in vitro* vermehrten Fibroblasten kombiniert. Dabei war das Einsaatverfahren entscheidend für die Zelleinwanderung in die Matrix, am besten eignete sich eine dynamische Zelleinsaat. Um ein Ersatzgewebe zu erzeugen, wurden die besiedelten Präparate in Kultursystemen geführt. Neben statischen Ansätzen fand dafür auch ein Bioreaktor Anwendung, in dem die Präparate mit Medium durchströmt wurden. Die Träger-basierten Fibroblasten zeichneten sich durch eine gute Proliferation und Stoffwechselaktivität aus. Aufgrund nur geringer Kollagenasefreisetzung und Kontraktion besiedelter Präparate wurde ein hoher Struktur- und Volumenerhalt des Gewebssersatzes sichergestellt. Mit Hilfe eines Hypoxiemodells konnten *in vitro* Aussagen zu den guten Transplantateigenschaften getroffen und nachfolgend *in vivo* durch ein Rattenmodell verifiziert werden. Nach sechswöchiger subkutaner Transplantation war dabei eine hohe Akzeptanz und Stabilität der mit autologen (Ratten)Fibroblasten besiedelten humanen azellulären Dermis beobachtbar. Die Fibroblastenbesiedelung stimulierte das Einwachsen von Blutgefäßen erheblich.

Die Transplantation dieses aktiven und stabilen Ersatzgewebes kann einen wichtigen Beitrag zur verbesserten Therapie von Patienten mit postoperativen Weichgewebsdefekten darstellen und eröffnet die Möglichkeit, Heilungsstörungen entgegenzuwirken und die Gewebsstabilität und -funktionalität wiederherzustellen.

Abstract

The surgical removal of sarcomas results in massive soft tissue defects which show a low healing tendency and cause serious healing problems due to their pre-operative irradiation and the extended size of defect. A post-operative treatment like radio- or chemotherapy can only be initiated with delay – potentially not at all – because of the local wound situation thus, reducing the survival rate of the patients. Since there is no satisfactory approach for the treatment of these soft tissue defects available today, the aim of this doctoral thesis was to develop a soft tissue replacement which allows a long-term tissue augmentation, reduces healing problems in transferring active autologous cells and fulfills legal requirements for the clinical application in the Federal Republic of Germany. A complex soft tissue replacement was successfully created by using a carrier made of human sterilized acellular dermis, which was specifically developed for this purpose, and human dermal fibroblasts. That the generated acellular dermis offers good preconditions for the population with cells could be concluded from the presence of typical dermal structures, a high permeability, a good biocompatibility as well as a high stability of the material. When treated with a validated virus inactivation method, the acellular dermis meets the requirements on drugs of human origin. The human acellular dermis was combined with *in vitro* expanded fibroblasts by using methods of tissue engineering. Comparative tests showed that the type of seeding procedure was critical for the migration of the cells into the matrix; a dynamic method generated the best results. Populated carriers were further cultivated in different culture systems in order to produce a tissue replacement. Beside static systems also a bioreactor was utilized in which the grafts were perfused with medium. Carrier-based fibroblasts were characterized by a good proliferation and a high metabolic activity. The very limited collagenase release and contraction observed in populated carriers ensured a high structural and volume stability of the tissue replacement. Evidence for the good properties of the graft could be given *in vitro* by using a hypoxia model and were verified consecutively in a rat model. A high acceptance and stability of the human acellular dermis populated with autologous (rat) fibroblasts was observed after transplanting it subcutaneously for a period of 6 weeks. The pre-seeding of the graft with fibroblasts stimulated the ingrowth of blood vessels remarkably. The transplantation of this active and stable tissue replacement created within the scope of this thesis can deliver a substantial contribution for the advanced treatment of patients with post-operative soft tissue defects. It opens the possibility of reducing the risk of healing failures and restoring tissue stability as well as functionality.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Stand des Wissens	2
2.1 Allgemeine Ansätze zur Behandlung von Gewebsdefekten durch Transplantation....	2
2.1.1 Autologe Transplantate	2
2.1.1.1 Anwendungseigenschaften und Einsatzgebiete.....	2
2.1.1.2 Biologische Sicherheit.....	3
2.1.2 Allogene Gewebstransplantate	3
2.1.2.1 Anwendungseigenschaften und Einsatzgebiete.....	3
2.1.2.2 Biologische Sicherheit.....	4
2.1.3 Xenogene Transplantate.....	7
2.1.3.1 Anwendungseigenschaften und Einsatzgebiete.....	7
2.1.3.2 Biologische Sicherheit.....	7
2.1.4 Synthetischer und semisynthetischer Gewebersatz	8
2.1.4.1 Anwendungseigenschaften und Einsatzgebiete.....	8
2.1.4.2 Biologische Sicherheit.....	10
2.1.5 Anwendung des Tissue Engineering.....	11
2.1.5.1 Ansätze des Tissue Engineering.....	11
2.1.5.1 Trägermaterialien.....	12
2.1.5.3 Möglichkeiten und Grenzen.....	15
2.2 Spezifik der Weichgewebe und Behandlung von Weichgewebsdefekten	18
2.2.1 Aufbau und Funktion von Weichgewebe	18
2.2.1.1 Definition Weichgewebe.....	18
2.2.1.2 Hautaufbau und -funktion.....	18
2.2.1.2.1 Epidermis.....	19
2.2.1.2.2 Dermis.....	20
2.2.1.2.3 Interzellulärsubstanzen.....	21
2.2.1.2.4 Transdermalen Stofftransport.....	25
2.2.2 Reparatur von Weichgewebe	27
2.2.2.1 Reparaturpotential einzelner Weichgewebe.....	27
2.2.2.1.1 Muskelgewebe.....	27
2.2.2.1.2 Bindegewebe.....	28
2.2.2.2 Wundheilung.....	28
2.2.3 Fibroblasten	31
2.2.3.1 Beteiligung an der Wundheilung.....	31
2.2.3.2 Matrixsynthese.....	31

2.2.4	Weichgewebsdefekte	35
2.2.4.1	Erfahrungen aus der Behandlung oberflächlicher Weichgewebsdefekte....	35
2.2.4.2	Weichgewebssarkome.....	36
2.2.4.3	Behandlungsmöglichkeiten von Gewebsschäden nach Exzision von Weichgewebssarkomen.....	37
2.3	Anwendung der Zellkultur für das Tissue Engineering	39
2.3.1	Kulturparameter	39
2.3.2	Anzüchtung dreidimensionaler Zellstrukturen	40
2.3.2.1	Problematik.....	40
2.3.2.2	Kultursysteme.....	42
2.3.2.3	Einflüsse der Strömung auf Zellen.....	44
2.3.2.4	Dreidimensionale Fibroblastenkulturen.....	45
3.	Problemstellung	46
4.	Material	48
4.1	Geräte und Hilfsmaterialien	48
4.2	Chemikalien	50
4.3	Formulierung von Medien und Lösungen	52
4.3.1	Fibroblastenmedium.....	52
4.3.2	Keratinozyteneinsaatmedium.....	52
4.3.3	Keratinozytenwachstumsmedium.....	53
4.3.4	Lymphozytenmedium.....	53
4.3.5	Transportmedium für Hautproben.....	53
4.3.6	Waschpuffer für Hautproben.....	53
4.3.7	Kollagenaselösung zur Zellisolierung.....	53
4.3.8	Trypsin-Lösung zur Epidermiszellgewinnung.....	54
4.3.9	Trypsin-EDTA-Lösung zum Passagieren von Zellen.....	54
4.3.10	Einfriermedium.....	54
4.3.11	Kollagenaselösung zur Bestimmung der Kollagenaseresistenz.....	54
4.4	Trägermaterialien	55
5.	Methoden	56
5.1	Gewinnung von biologischem Ausgangsmaterial	56
5.1.1	Spalthaut zur Präparation humaner azellulärer Dermis	56
5.1.2	Humane Vollhaut zur Isolierung von Zellen	56
5.1.3	Rattenhaut zur Isolierung von Zellen	56
5.2	Präparation humaner azellulärer Dermis	57

5.2.1	Zellentfernung	57
5.2.2	Sterilisation	57
5.2.3	Konservierung	57
5.3	Prüfmethoden	58
5.3.1	Untersuchungen von Zellproliferation, -vitalität und –aktivität	58
5.3.1.1	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität.....	58
5.3.1.2	LDH-Assay.....	58
5.3.1.3	BrDU-Assay.....	59
5.3.1.4	MTT-Assay.....	59
5.3.1.5	Proteinbestimmung.....	60
5.3.1.6	Kollagennachweis.....	60
5.3.1.7	Laktatbestimmung.....	60
5.3.1.8	Glukosebestimmung.....	61
5.3.1.9	Kollagenaseaktivität.....	61
5.3.2	Untersuchung biophysikalischer Parameter	62
5.3.2.1	Sauerstoffdurchlässigkeit von Materialien.....	62
5.3.2.2	Wasserdampfpermeabilität von Materialien.....	62
5.3.2.3	Proteinpermeabilität.....	62
5.3.2.4	Gelöstsauerstoffkonzentration.....	63
5.3.2.5	pH-Wert.....	63
5.3.3	Untersuchung der Materialstabilität	63
5.3.3.1	In vitro Degradation.....	63
5.3.3.2	Größenerhalt.....	64
5.3.3.3	Kollagenaseresistenz.....	64
5.3.4	Gewebscharakterisierung	64
5.3.4.1	Bestimmung synthetisierten Kollagens.....	64
5.3.4.2	Histologische Untersuchung.....	65
5.3.4.3	Allgemeine histologische Färbemethoden.....	65
5.3.4.4	Immunhistochemische Methoden.....	65
5.3.1.5	Rasterelektronenmikroskopie und Semidünnschnitte.....	66
5.4	Zellisolierung	67
5.4.1	Gewinnung von Keratinozyten	67
5.4.2	Gewinnung von dermalen Fibroblasten	68
5.4.2.1	Gewinnung von humanen Fibroblasten.....	68
5.4.2.2	Gewinnung von Fibroblasten der Ratte.....	68
5.4.3	Gewinnung von Lymphozyten aus venösem Blut	68
5.5	Zellexpansion in zweidimensionaler Kultur	69
5.5.1	Allgemeine Kulturbedingungen für die Zellkultur	69

5.5.2	Expansion von Keratinozyten	68
5.5.3	Expansion von Fibroblasten	69
5.5.3.1	Expansion von humanen Fibroblasten.....	69
5.5.3.2	Expansion von Fibroblasten der Ratte.....	70
5.5.4	Wachstumskinetik	70
5.6	Biokompatibilität	70
5.6.1	Lymphozytenproliferationsassay	70
5.6.2	Untersuchung der cytotoxischen Wirkung von Materialien auf Zellen <i>in vitro</i>	71
5.7	Anzüchtung trägerbasierter Kulturen	71
5.7.1	Vorbereitung des Materials	71
5.7.2	Besiedelung mit humanen Keratinozyten zur Evaluierung des Erhalts der Oberflächenstruktur	71
5.7.3	Zelladhäsionskinetik zur Untersuchung der geeigneten Einsaatfläche	72
5.7.4	Testung verschiedener Verfahren zur Zelleinsaat	72
5.7.5	Vergleichskulturen in Kollagengelen	73
5.8	Besiedelung des Trägers in statischer Kultur	73
5.8.1	Zelleinsaat	73
5.8.2	Kulturführung	73
5.9	Besiedelung des Trägers in Perfusionskultur	73
5.9.1	Ermittlung des geeigneten Volumenstroms für die Perfusion	73
5.9.2	Zelleinsaat	74
5.9.3	Kulturführung	74
5.10	In vitro Hypoxiemodell	74
5.10.1	Besiedelung unter Hypoxie	74
5.10.2	Einfluss der Hypoxie auf besiedelte Präparate.....	74
5.11	Transplantation ins Rattenmodell	75
5.12	Statistik	75
6.	Ergebnisse	76
6.1	Herstellung einer humanen sterilisierten azellulären Dermis als Trägermaterial für dreidimensionale Fibroblastenkulturen	76
6.1.1	Entwicklung des Präparationsverfahrens	76
6.1.1.1	Verfahren zur Zellentfernung.....	76
6.1.1.2	Nachweis der Zellfreiheit.....	77
6.1.1.3	Sterilisation.....	78
6.1.1.4	Konservierung.....	78
6.1.1.5	Nachweis des Erhalts von Gewebsstrukturen.....	79

6.1.1.6	<i>Untersuchung biophysikalischer Parameter.....</i>	82
6.1.1.7	<i>Fixierung des endgültigen Präparationsverfahrens.....</i>	83
6.1.2	Untersuchung der Biokompatibilität	85
6.1.2.1	<i>Lymphozytenproliferationsassay.....</i>	85
6.1.2.2	<i>Cytotxische Wirkung von Trägermaterialien auf Zellen in vitro.....</i>	86
6.1.2.3	<i>Eignung der Oberflächenstruktur für die Zellbesiedelung.....</i>	87
6.1.3	Eignung azellulärer Dermis zur Reparatur größervolumiger Gewebsdefekte.....	87
6.1.3.1	<i>Materialdicke.....</i>	87
6.1.3.2	<i>Proteinpermeabilität.....</i>	88
6.1.3.2.1	<i>Diffusionsexperiment.....</i>	88
6.1.3.2.2	<i>Stofftransport nach Anlegen eines hydrostatischen Druckes...</i>	98
6.1.4	Testung der Stabilität des Trägermaterials	99
6.1.4.1	<i>In vitro Degradation.....</i>	100
6.1.4.2	<i>Größenerhalt.....</i>	100
6.1.4.3	<i>Kollagenaseresistenz.....</i>	101
6.1.5	Wertigkeit azellulärer Dermis beim Vergleich mit anderen Trägermaterialien	102
6.2	<i>Gewinnung von Fibroblastenkulturen</i>	104
6.2.1	Zellisolation aus Vollhautproben	104
6.2.1.1	<i>Zellausbeute.....</i>	104
6.2.1.2	<i>Zellidentität.....</i>	105
6.2.2	Zellexpansion in zweidimensionaler Kultur	106
6.2.2.1	<i>Kulturmedium.....</i>	106
6.2.2.2	<i>Expansionspotential.....</i>	106
6.3	<i>Anzüchtung trägerbasierter Fibroblastenkulturen</i>	107
6.3.1	Zelleinsaat	107
6.3.1.1	<i>Quantifizierung der Zellzahl auf dem Trägermaterial.....</i>	107
6.3.1.2	<i>Statische Zelleinsaat.....</i>	108
6.3.1.3	<i>Einsaatzelldichte.....</i>	108
6.3.1.4	<i>Auswahl der Einsaatfläche.....</i>	109
6.3.1.5	<i>Dynamische Zelleinsaat.....</i>	110
6.3.2	Besiedelung des Trägermaterials nach statischer Zelleinsaat	113
6.3.2.1	<i>Zellproliferation.....</i>	113
6.3.2.2	<i>Stoffwechselaktivität.....</i>	114
6.3.2.3	<i>Stabilität des Trägermaterials.....</i>	117
6.3.2.4	<i>Charakterisierung der besiedelten Präparate.....</i>	119
6.3.3	Etablierung eines Perfusionssystems	120
6.3.3.1	<i>Technische Umsetzung.....</i>	120
6.3.3.2	<i>Perfusionsoptimierung.....</i>	122

6.3.3.2.1	Berechnungsformeln für perfundierte, zellbesiedelte Dermis...	122
6.3.3.2.2	Einfluss der Strömung auf die Zellen.....	128
6.3.4	Besiedelung des Trägermaterials in Perfusionskultur nach statischer Zelleinsaat	129
6.3.4.1	Zellproliferation.....	129
6.3.4.2	Stoffwechselaktivität.....	130
6.3.4.3	Stabilität des Trägermaterials.....	132
6.3.4.4	Charakterisierung der besiedelten Präparate.....	132
6.3.5	Besiedelung des Trägermaterials in Perfusionskultur nach dynamischer Zelleinsaat..	133
6.3.5.1	Zellproliferation und Stoffwechselaktivität.....	133
6.3.5.2	Charakterisierung der Präparate.....	133
6.4	In vitro Modell zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf die Präparate	134
6.4.1	Besiedelung unter hypoxischen Bedingungen zur Adaptation an die <i>in vivo</i> Situation	134
6.4.1.1	Zellproliferation.....	134
6.4.1.2	Stoffwechselaktivität.....	135
6.4.2	Auswirkung hypoxischer Bedingungen auf besiedelte Träger	136
6.4.2.1	Zellvitalität.....	136
6.4.2.2	Stoffwechselaktivität.....	137
6.5	Transplantation ins Rattenmodell	137
6.5.1	Stabilität der Präparate	137
6.5.2	Gewebsreaktion	138
7.	Diskussion	141
7.1	Herstellung einer humanen sterilisierten azellulären Dermis als Trägermaterial für dreidimensionale Fibroblastenkulturen	141
7.2	Gewinnung von Fibroblastenkulturen	155
7.3	Anzüchtung trägerbasierter Fibroblastenkulturen	156
7.4	In vitro Modell zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf die Präparate	168
7.5	Transplantation ins Rattenmodell	170
8.	Ausblick	174
8.1	Optimierung der Besiedelung der azellulären Dermis	174
8.2	Beschleunigung der Vaskularisierung	174
8.3	Validierung der Transplantate	175
8.4	Weitere Indikationen	175
8.5	Mögliche Praxis der Herstellung eines Weichgewebersatzes	176

9. Zusammenfassung	178
10. Literatur	182
11. Anhang	208
11.1 Berechnungsformeln	208
11.1.1 Sauerstoffpermeabilität (OPERM)	208
11.1.2 Wasserdampfdurchlässigkeit (MVP)	210
11.1.3 Generationszeit	210
11.2 Abkürzungen	212

1. Einleitung

Bei der operativen Entfernung von Weichgewebstumoren (Sarkomen) werden ausgedehnte Defekte des Weichgewebes geschaffen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird in der Regel eine präoperative Bestrahlung angewandt, die das Auftreten von Tumorrezidiven verringern soll. Dieser positiven Wirkung für die Tumorbekämpfung steht jedoch oftmals eine negative Auswirkung auf die Defektheilung gegenüber, die sich in Wundheilungsstörungen äußert sowie das kosmetische und funktionelle Ergebnis der Behandlung herabsetzt (Ferguson 1999; Hohenberger 2002). Maßgeblich dafür ist ein Radioschaden gewebständiger Fibroblasten, der die Bildung eines funktionalen Bindegewebes einschränkt (Ferguson 1999; Schaeffer 2001). Aufgrund der Wundprobleme kann eine adäquate Nachbehandlung, wie z.B. Strahlen- oder Chemotherapie, nur verzögert, möglicherweise überhaupt nicht vorgenommen werden, was die Überlebenschancen der Patienten reduziert (Langstein 1999).

Die Weichgewebsdefekte bedürfen dringend einer Behandlung, um die Gewebstabilität wiederherzustellen sowie die Heilung zu verbessern (Moley 2000; Hohenberger 2002). Aufgrund des Defektausmaßes sowie des begrenzten Reparaturpotentials der betroffenen Gewebe muss hierfür ein langzeitstabiler Gewebersatz Anwendung finden.

Die Transplantation von körpereigenen (autologen) Muskellappen ist mit ästhetischen und funktionellen Beeinträchtigungen verbunden, schafft einen zusätzlichen Entnahmedefekt und stellt aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von geeignetem Muskelgewebe nur bedingt eine Option für die Patienten dar. Alternative Methoden zeigten sich jedoch bislang nicht Erfolg versprechend. So vermochten Gewebersatzmaterialien aufgrund ihres geringen Volumens und schnellen Abbaus nicht, die ausgedehnten Defekte längerfristig zu füllen (West 1998).

Das Tissue Engineering eröffnet die Möglichkeit, ausgehend von einer geringen Zellzahl ein autologes Ersatzgewebe zu schaffen. Leider gibt es bisher keine ermutigenden Ansätze für diese Art der Gewebsdefekte; erste Schritte beinhalteten lediglich die Verwendung von Zellsuspensionen bzw. von besiedelten, niedrigkomplexen synthetischen oder semisynthetischen Matrizen (Marler 2000; Patrick 2002).

Aus diesen Gründen soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Weichgewebersatz unter Anwendung der Methoden des Tissue Engineering hergestellt werden, der eine längerfristige Füllung von subkutanen Defekten nach Exzision von Sarkomen gestattet und darüber hinaus durch den Transfer aktiver Zellen die bestrahlungsbedingten Heilungsprobleme ausgleichen kann.

2. Stand des Wissens

2.1 Allgemeine Ansätze zur Behandlung von Gewebsdefekten durch Transplantation

Eine wichtige Form der Behandlung von Gewebsdefekten stellt die Transplantation von Gewebe oder Gewebersatz dar. Hierzu werden generell vier verschiedene Transplantatarten eingesetzt:

1. Autologe Transplantate
2. Allogene Gewebstransplantate
3. Xenogene Transplantate
4. Synthetischer und semisynthetischer Gewebersatz

Über diese vier gängigen Grundformen hinaus ist auch der Einsatz von Transplantaten, die mit Hilfe des Tissue Engineering erzeugt wurden, möglich. Die jeweiligen Gewebe bzw. Gewebersatzmaterialien unterscheiden sich jedoch deutlich hinsichtlich ihrer Eigenschaften, den möglichen Einsatzgebieten sowie ihrer biologischen Sicherheit.

2.1.1 Autologe Transplantate

2.1.1.1 Anwendungseigenschaften und Einsatzgebiete

Die Transplantation von autologen, d.h. körpereigenen Geweben, hat sich aufgrund der guten Akzeptanz und der sofortigen Verfügbarkeit der Transplantate klinisch bewährt. So werden z.B. Spalthaut, Beckenkammpongiosa und Muskellappen angewendet, um umschriebene Gewebsschäden zu behandeln (Rennekampff 1996; Sorensen 1998; Langstein 1999).

Die Technik der autologen Transplantation stößt jedoch bei ausgedehnten Defekten, beispielsweise bei großflächigen Verbrennungen oder Traumen, an ihre Grenzen, da in diesem Falle nicht mehr ausreichend bzw. nicht geeignetes Gewebe für die Transplantation zur Verfügung steht (Navsaria 1995; Cranin 2002).

Problematisch kann des Weiteren sein, dass teilweise erhebliche Entnahmedefekte geschaffen werden, die mit Schmerzen, dem Risiko von Infektionen, Wundheilungsstörungen, der Instabilität der Entnahmeregion und Narben verbunden sind (Yannas 1994; Ebraheim 2001). Die Häufigkeit des Auftretens entsprechender

Komplikationen ist signifikant; so beziffert *Bettin* die Anzahl der Entnahmekomplikationen bei Gewinnung von autologer Beckenkammspongiosa auf 20 % (Bettin 2003).

2.1.1.2 Biologische Sicherheit

Aufgrund der Verwendung körpereigenen Gewebes spielt die biologische Sicherheit bei autologen Transplantaten keine Rolle.

2.1.2 Allogene Gewebstransplantate

2.1.2.1 Anwendungseigenschaften und Einsatzgebiete

Allogene Gewebstransplantate wie spongiöse und kortikale Knochen (Friedlaender 1984; Czitrom 1986), Sehnen, Bänder sowie biologische Wundverbände werden bereits seit geraumer Zeit für die Behandlung von Gewebsdefekten eingesetzt (Herndon 1985; Cuono 1987; Tseng 1997). Mit der Verwendung von allogenem, d.h. von Fremdspendern stammendem Gewebe sind auch ausgedehnte Gewebsdefekte wie Gewebsschäden nach Tumorexzision, nichtheilende Areale sowie ausgedehnte Wunden für eine Behandlung zugänglich (Cuono 1987; Hickerson 1994; Sheridan 1999).

Zur Erhöhung der Transplantatakzeptanz werden allogene Gewebstransplantate in der Regel verschiedenen Bearbeitungsschritten unterzogen, die das Herausspülen von Blutbestandteilen und/oder die Extraktion von Fett beinhalten (Tomford 1987). Darüber hinaus finden Konservierungsmethoden wie die Gefriertrocknung, Tieftemperaturkonservierung, Kryokonservierung oder Glycerinkonservierung Anwendung, um die Präparateigenschaften auch bei der Lagerung aufrechtzuerhalten (Wachtel 1979; May 1985; Richters 1996; Snyder 1999). Während bei Applikation von kaum zellhaltigen allogenen Gewebstransplantaten, wie z.B. Knochen, das Transplantat vollständig in den Defekt integriert wird, muss bei stark zellhaltigen Präparaten wie z.B. Haut und Amnion (biologische Wundverbände), mit einer Transplantatabstoßung gerechnet werden. Trotz allem hat allogene Haut einen unverzichtbaren Platz bei der Behandlung von ausgedehnten Verbrennungen gefunden (Hansbrough 1992; Brans 1994; Germann 1995). Biologische Wundverbände werden in der Regel nur temporär zur Wundheilungsstimulierung und Anregung der Gefäßneubildung eingesetzt (Koller 2001). Im Verlauf des Heilungsprozesses – genauer nach vaskulärem Graftanschluss – wird die allogene Haut im Allgemeinen vom Empfänger abgestoßen. Um diese Abstoßung zu vermeiden und insbesondere die Eigenschaften des dermalen Anteils der Haut permanent nutzen zu können, gibt es

Bestrebungen, die Immunantwort hervorrufenden zellulären Elemente aus der Haut zu entfernen, also eine azelluläres Transplantat in Form einer humanen azellulären Dermis herzustellen (Livsey 1995; Chakrabarty 1999).

2.1.2.2 Biologische Sicherheit

In der Bundesrepublik erfolgt die Gewebespende unter der Maßgabe des Transplantationsgesetzes (TPG). Zudem werden alle allogenen Gewebstransplantate durch das Arzneimittelgesetz (AMG) unter der Kategorie Blut und Blutprodukte reguliert, welches die biologische Sicherheit der Transplantate, vor allem den Ausschluss einer Viruskontamination, zwingend vorschreibt. Die biologische Sicherheit von allogenen Gewebstransplantaten wird insbesondere durch Nutzung validierter Virusinaktivierungs- oder -abreicherungsverfahren sichergestellt (Pruss 2001 b).

In vielen europäischen Ländern und in den USA, obwohl diese mit 800.000 Transplantationen pro Jahr der Spitzenreiter für die Anwendung von allogenen Gewebstransplantaten sind, werden keine Sterilisationsverfahren oder lediglich Desinfektionsmaßnahmen mit nicht validierter Effektivität angewendet (Hodde 2002; Pauli 2003; Pruss 2003). Damit ist das Problem der durch die Transplantate auf den Empfänger übertragbaren Infektionen nicht in einem zufrieden stellenden und dem gegenwärtigen Erkenntnisstand entsprechenden Maß gelöst.

Im Zeitraum von 1998-2002 wurden in den USA 37 Fälle Transplantat-assoziiierter Infektionen mit Bakterien, Pilzen und dem Hepatitis C-Virus, teilweise mit tödlichem Verlauf, gemeldet (Pruss 2003). Für die Bundesrepublik gibt es keine entsprechenden Berichte (Pauli 2003).

Prinzipiell können durch Gewebstransplantate neben Bakterien und Pilzen insbesondere Viren wie das HI-Virus (Humanes Immundefizienz Virus - HIV) und Hepatitis auslösende Viren (Hepatitis B-Virus - HBV, Hepatitis C-Virus - HCV) übertragen werden, die ein hohes Risiko für den Empfänger darstellen. Einige andere Viren rufen bei Patienten mit bestimmter Prädisposition (Schwangere, Kinder, ältere und immunsupprimierte Patienten) Probleme hervor; zu nennen sind hierbei CMV (Cytomegalievirus), EBV (Eppstein-Barr-Virus), HAV (Hepatitis A-Virus) sowie das Parvovirus B19 (Kamarasinghe 2001; Pauli 2003).

In der Bundesrepublik sind das infektionsserologische Spenderscreening sowie der Ausschluss von HIV, HBV und HCV in Arzneimitteln humanen Ursprungs vorgeschrieben. Ein vollkommener Ausschluss einer Viruskontamination des Gewebstransplantates kann allein durch das infektionsserologische Screening nicht gewährleistet werden, da nicht für

alle potentiell übertragbaren Viren routinemäßig Untersuchungen durchgeführt werden und auch für die permanent getesteten Viren Nachweisgrenzen existieren.

Einige Viren werden erst nach einem bestimmten Zeitraum, dem so genannten diagnostischen Fenster, anhand der vom Infizierten gebildeten Antikörper nachgewiesen, obwohl bereits in dieser Phase der Betroffene die Infektion weiter übertragen kann. Für HIV beträgt die Fensterphase 21 bis 42 Tage, für HBV 40 Tage und für HCV 69 bis 90 Tage (Pauli 2003). Auch die neuesten PCR-Tests zum Nachweis des Virusgenoms weisen ein, obgleich auch stark reduziertes, diagnostisches Fenster auf. Für HIV und HCV kann das Virusgenom erst nach 11 Tagen (ausgehend vom Infektionstag) detektiert werden, jedoch liegt in dieser Zeit bereits die Infektiösität vor (Pauli 2003).

Probleme bereiten auch neue bzw. in neuen Verbreitungsgebieten auftretende Viren, die durch Routinetests nicht erfasst werden (Diringer 1990a). Dazu ist das durch Gewebstransplantate übertragbare West-Nil-Virus zu zählen, welches in den USA und auch zunehmend in Europa Verbreitung findet und ernste, teilweise auch tödlich verlaufende Krankheitsbilder hervorruft (Pauli 2003). All das unterstreicht, dass allein durch infektionsserologisches Screening keine absolute Sicherheit für allogene Gewebstransplantate zu schaffen ist, sondern dass die Anwendung validierter Abreicherungs- bzw. Inaktivierungsverfahren für Infektionserreger, insbesondere Viren, unverzichtbar ist.

Für Gewebstransplantate sind prinzipiell verschiedene Sterilisationsmethoden verfügbar. Problematisch ist jedoch, dass diese Verfahren die Transplantateigenschaften negativ beeinflussen und damit seine Akzeptanz und Wirksamkeit beim Empfänger herabsetzen können (Tab. 1).

	Wirksamkeit	Nebeneffekte und Kommentar
1.) Thermische Verfahren „Marburger System“	Viren inaktiviert, Bakterien und Sporen nicht inaktiviert	Keine Nebeneffekte, System nur für intraoperativ gewonnene Hüftköpfe validiert (Pruss 2003)
2.) Strahlensterilisation	Bakterien, Sporen, Pilze, Viren bei Dosen >34 kGy inaktiviert (Pruss 2002)	Erhebliche Nebeneffekte, Strukturveränderungen bei biologischen Wundverbänden (von Versen-Höynck 2003), Herabsetzung der Stabilität von Transplantaten, potentielle Produktion toxischer Radikale (Pruss 2001b)
3.) Chemische Verfahren a) Ethylenoxid b) Formaldehyd c) Beta-Propionolacton d) Peressigsäure	Für a) bis c) gilt: Bakterien, Sporen, Pilze, Viren inaktiviert Bakterien, Sporen, Pilze, Viren inaktiviert	Für a) bis c) gilt: Carcinogene und mutagene Effekte (Noah 2002), Reduktion der Osteoinduktion (Pruss 2001), Strukturveränderungen bei Haut (Chakrabaty 1999) Keine Nebeneffekte (Pruss 2002)

Tab. 1: Verfahren zur Sterilisation von Gewebstransplantaten

Hinsichtlich der Durchführung von Validierungsstudien zum Nachweis der Abreicherung bzw. Inaktivierung von Infektionserregern in Gewebstransplantaten existieren verschiedene Standards. Die gemeinsam vom Paul-Ehrlich-Institut und dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) entwickelte Norm fordert den Einsatz bestimmter Modellviren, mit denen das Gewebe bei der Validierungsstudie initial gespikt werden muss, sowie eine durch das Verfahren sichergestellte Virusabreicherung bzw. -inaktivierung um mindestens 4 log₁₀-Stufen (Pruss 2001 b). Nur wenn dieser Nachweis erbracht ist, kann das Verfahren als validiert und damit sicher gelten.

Für allogene glyzerinkonservierte Haut wurde mehrfach der „sterilisierende Effekt“ des Glycerins postuliert, da jedoch keine Validierungsstudien vorliegen, kann dieses Verfahren nicht als Virusinaktivierungsmethode akzeptiert werden (van Baare 1994; Marshall 1995). Die Übertragung von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) durch Blut,

Blutprodukte und Gewebe kann nicht sicher ausgeschlossen werden (11; 12; 13). Es liegen so Berichte über die Diagnose von nvCJD (new variant of Creutzfeldt-Jacob Disease) nach Transplantation von *Dura mater* oder Corneatransplantaten vor (Kamarasinghe 2001). Spender mit einem erhöhten Risiko für TSE werden aus diesem Grunde von der Gewebespende ausgeschlossen (12; Pauli 2003).

Darüber hinaus dienen die Aktivitäten europäischer und internationaler Fachgesellschaften, wie der EATB (European Association of Tissue Banks), EAMST (European Association of Musculoskeletal Transplantation) und AATB (American Association of Tissue Banks) zur Qualitätssicherung, Standardisierung und Validierung im Tissue Banking der Erhöhung der Transplantatsicherheit (von Versen 1999).

2.1.3 Xenogene Transplantate

2.1.3.1 Anwendungseigenschaften und Einsatzgebiete

Xenogene, d.h. von Tieren stammende Materialien, werden aufgrund ihrer leichten Gewinnung und gegenüber synthetischen Materialien oftmals überlegenen Eigenschaften in der Form von Nahtmaterial, Xenografts und kollagenbasierten Biomaterialien in der Humanmedizin eingesetzt (Michaeli 1990; Elson 1995; Pachence 1996; Sacks 1999; Chen, F. 1999). Eine Immunantwort auf das tierische Material kann jedoch nicht immer sicher ausgeschlossen werden (Michaeli 1990; Sung 1997a).

Xenografts, zum Beispiel Herzklappen, müssen oftmals vor klinischer Anwendung mit quervernetzenden Substanzen, wie Glutaraldehyd, Formaldehyd, Polyepoxykomponenten oder Carbodiimiden, fixiert werden, um die Autolyse und Antigenizität zu reduzieren und damit die Transplantatstabilität zu erhöhen (Huang-Lee 1990; Sung 1997; Khor 1997; Steinhoff 2000). Diese Fixierungsagenzien können jedoch zu einem hohen Prozentsatz in das Transplantatlager freigesetzt werden und die Proliferation ortsständiger Zellen hemmen (Huang-Lee 1990). Darüber hinaus initiieren noch im Graft enthaltene reaktive Gruppen der Agens die Kalziumablagerung und bewirken damit ein Langzeitversagen des Transplantates durch Kalzifizierung (Sung 1997b; Lee, W.K. 2001). Des Weiteren kann eine Fibrosebildung induziert werden (Owen 1997).

2.1.3.2 Biologische Sicherheit

Bei Xenotransplantation besteht die Gefahr der Übertragung tierspezifischer endogener Retroviren und Herpesviren (Pauli 2003). Auch das Risiko der Infektion des Empfängers mit

TSE durch tierisches, v.a. bovines Gewebe bzw. daraus hergestellte Arzneimittel ist nicht gebannt (Diringer 1990 b; 11). Bislang enthalten 85 % aller pharmazeutischen Produkte bovines Material (Holmes 2002). Gewebe mit hoher und mittlerer Infektiosität, wie z.B. Gehirn, Rückenmark, Hypophyse und Nebenniere, werden jedoch für die Arzneimittelherstellung vermieden (14; 15; 16).

2.1.4 Synthetischer und semisynthetischer Gewebsersatz

2.1.4.1 Anwendungseigenschaften und Einsatzgebiete

Synthetische Materialien finden aufgrund ihrer chemischen und mechanischen Eigenschaften sowie ihrer gerichtet modifizierbaren Struktur breite Anwendung als Implantatmaterialien (Goldstein 2002). Derzeit werden zu 85 % Polyolefine einschließlich Polyvinylchlorid, zu 13 % Polycarbonat und Polyester sowie zu 2 % Polyurethane und andere Polymere in der Klinik als synthetischer Gewebsersatz zur Reparatur von Hart- und Weichgewebsdefekten eingesetzt (Henze 1999).

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Materialien sind jedoch nicht immer dazu geeignet, nach Transplantation eine optimale Interaktion mit dem umgebenden Gewebe zu gewährleisten (Angelova 1999). Aus diesem Grunde wird eine Modifikation mit biologischen Materialien, z.B. eine Beschichtung mit Proteinen der extrazellulären Matrix oder mit Peptidsequenzen, vorgenommen (Hu 2001; Burdick 2002; Goldstein 2002). Zur Erhöhung der Biokompatibilität sowie der Interaktion mit gewebsständigen Zellen werden bei der Gruppe des semisynthetischen Gewebsersatzes synthetische und biologische bzw. rein biologische Materialien miteinander kombiniert. Biologische Komponenten wie Kollagene und Proteoglykane werden dafür aus humanen oder tierischen Geweben gewonnen oder gentechnisch erzeugt (Clubb 1999; Goldstein 2002). Gewebsersatzmaterialien werden neben der Applikation zur Defektreparatur auch als Materialien zum Drug-Delivery, z.B. von Antibiotika, Wachstumsfaktoren und Hormonen eingesetzt (Murphy, W.L. 2000; Whang 2000; Maquet 2001; Okumu 2002).

Klassifizierung	Beispiele	Quelle
1. Synthetischer Gewebersatz		
<i>1a Aliphatische Polyester</i>	PGA, PLA und Copolymere Polyhydroxybutyrat Polycaprolacton	Athanasiou 1996; Hoerstrup 2000; Cheng, B. 2002 Hoerstrup 2001 Hutmacher 2001
<i>1b Polyamide</i>	Nylon	Hansborough 1994; Angelova 1999
<i>1c Polyorthoester</i>		Angelova 1999
<i>1d Polycyanoacrylate</i>		Angelova 1999, Shimitzu 2002
<i>1e Thermoplastische Urethane</i>		Henze 1999, Radley 2003
<i>1f Polyethylen, Poylvinyalkohol</i>		Hu 2001; Nguyen 2002
<i>1g Teflon</i>		Maas 1997; Angelova 1999
2. Semisynthetischer Gewebersatz		
<i>2a Natürliche Polymere</i>		
2a1 Proteine	Kollagen-Schwämme/-Filme Gelatine	Anselme 1990; Geiger 2002 DeLustro 1986
2a2 Polyaminosäuren	RGD	Dai 1996
2a3 Polysaccharide und Derivate	Cellulosesulfat Agarose Alginat Dextran Chitosan Hyaluronsäure	Angelova 1999 Bellamkonda 1995 Marler 2000; Leor 2002 Chen, S. 1996 Vassiere 2000 Myers 1997; Zacchi 1998
2a4 Kombination verschiedener natürlicher Polymere	Kollagen-Chondroitin-6-Sulfat	Boyce 1988, Yannas 1994
<i>2b Kombinierte synthetische und natürliche Polymere</i>		
	Kollagen-Polymethacrylat Kollagen-Poly-ε-caprolacton	Egbert 1997 Coombes 2002

Tab. 2: Synthetischer und semisynthetischer Gewebersatz

Eine Implantation von synthetischen Polymeren kann zu einer durch Material-Gewebe-Interaktion bedingten Fremdkörperreaktion führen. Als auslösende Mechanismen dafür werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert: a) die Konformationsänderung oder Degradierung einzelner körpereigener Proteinmoleküle durch Kontakt mit Kunststoffen, die aufgrund der Strukturveränderung zu einer immunologischen Reaktion führt; b) die direkte Auslösung einer humoralen oder zellulären Abwehrreaktion durch freiliegende Oberflächenstrukturen des Polymers oder c) Degradationsprodukte des Polymers, die als

Antigen selbst oder als an körpereigenes Protein gebundenes Hapten eine Immunreaktion provozieren (Athanasίου 1996; Henze 1999).

Die Ausprägung der Immunantwort ist von den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Materials, seiner Degradation *in vivo* sowie seiner Oberflächenstruktur abhängig (Henze 1999). Auch semisynthetische Materialien können eine humorale Antwort auf tierische Bestandteile oder bei der Herstellung verwendete Hilfsstoffe (z.B. Enzyme) hervorrufen (DeLustro 1986; Egbert 1997; Chevally 2000 b). Unerwünschte Gewebsreaktionen wie Entzündung, Thrombose oder Fibrose sind in vielen Fällen mit der schnellen Akkumulation phagozytischer Zellen auf der Oberfläche von Gewebersatzmaterialien assoziiert (Clubb 1999; Hu 2001).

Nachteilig für eine längerfristige Defektreparatur ist der schnelle Abbau vieler synthetischer und semisynthetischer Matrizen, der oftmals binnen weniger Wochen beobachtet werden kann (Yannas 1994; Sheridan 1994; Pachence 1996; Hoerstrup 2000). Natürliche Polymere werden enzymatisch angegriffen, nachfolgend von Zellen aufgenommen und weiter verdaut (Koide 1993; Pachence 1996; Göpferich 1996; Geiger 2002). Die Degradation von synthetischen Polymeren erfolgt durch Hydrolyse, jedoch können auch körpereigene Enzyme dazu beitragen (Göpferich 1996).

Problematisch bei degradierenden Polymeren sind die sich zunehmend ändernden physikalischen, chemischen und mechanischen Eigenschaften der Matrix, welche das umgebende Gewebe sowie die Stabilität der Defektreparatur negativ beeinflussen können (Athanasίου 1996; Göpferich 1996; Harringer 1997). Degradationsprodukte wirken sich darüber hinaus teilweise toxisch auf Zellen aus (Athanasίου 1996; Göpferich 1996).

2.1.4.2 Biologische Sicherheit

Im Falle von Substanzen, die aus tierischen oder humanen Geweben isoliert wurden (z.B. Kollagen und Gelatine), besteht potentiell das Risiko der Übertragung von Viren und TSE. Aufgrund der beim Polymerextraktions- und Weiterverarbeitungsprozess angewandten hohen Temperaturen und aggressiven Chemikalien wird jedoch von einer Erregerinaktivierung ausgegangen, damit wird die Gefahr der Krankheitsübertragung minimiert (Pauli 2003; 11).

2.1.5 Anwendung des Tissue Engineering

2.1.5.1 Ansätze des Tissue Engineering

Das Tissue Engineering eröffnet die Möglichkeit, ausgehend von einer kleinen Zellmenge ein autologes Ersatzgewebe zu schaffen. Unter Tissue Engineering versteht man *“an disciplinary field that incorporates and applies the principles of engineering and life sciences towards the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue or organ function”* (Langer 1993). Das Tissue Engineering ist sehr komplex und umfasst die Kultivierung von Zellen bzw. die *in vitro* Erzeugung von Ersatzgeweben zur Transplantation in beschädigte Areale des menschlichen Körpers sowie den *in situ* Transfer von bioaktiven Substanzen, die allein oder in Kombination mit Zellen die Gewebsreparatur und –regeneration induzieren.

Zentrale Arbeitsschritte bei der Erzeugung eines Gewebsersatzes durch das Tissue Engineering sind

- a) Zellisolierung;
- b) Zellvermehrung und –differenzierung (ggf. auch weitere Manipulation wie Transformation);
- c) Gewebsneubildung;
- d) Transplantatintegration und Histogenese (1).

Ziel der Gewebsneubildung ist es, ein funktionelles Ersatzgewebe für den Defekt zu schaffen. Dieses kann bereits *in vitro* gezüchtet und anschließend als hochkomplexe Struktur transplantiert werden (Black 1998; Shimizu 2002; Sikavitsas 2002) oder wächst nach Transplantation eines niedrigkomplexen Ansatzes, z.B. einer Zellsuspension, im Körper heran (Kaiser 1994; Britberg 1994). Wird die Gewebsstruktur bereits *in vitro* geschaffen, werden die Zielzellen in der Regel mit einem Trägermaterial kombiniert.

Im Rahmen der Transplantatintegration und Histogenese muss sich das Ersatzgewebe in die Empfängerregion (Transplantatlager) integrieren, mit ihm interagieren und ähnliche Gewebsqualitäten wie das Transplantatlager annehmen. Beeinflussende Faktoren sind dabei die Gefäßneubildung, die Stimulierung durch Wachstumsfaktoren, die Zelldifferenzierung aber auch die Gewebsremodellierung (Yannas 1989; Hafemann 1999; Burg 2000; Lamme 2000).

Obwohl intensive Studien zum Tissue Engineering verschiedenster Gewebsstrukturen unternommen werden (vgl. Abb. 1), hat sich bislang klinisch vor allem die Transplantation von gezüchtetem Epidermisersatz (Compton 1992; McArree 1993; Munster 1997) sowie Knorpelersatz (Britberg 1994; Peterson 1996; Grande 1997) bewährt. Dabei handelt es sich

per se um nicht vaskularisierte Gewebe. Diese können diffusiv versorgt werden und unterliegen damit nicht dem Risiko eines Transplantatversagens aufgrund eines unzureichenden Gefäßanschlusses (vgl. 2.1.5.3).

Cornea (Minami 1993; Lu 2001; Singh 2001)

Nerven (Oudega 2001; Cheng, B. 2002; Fansa 2002)

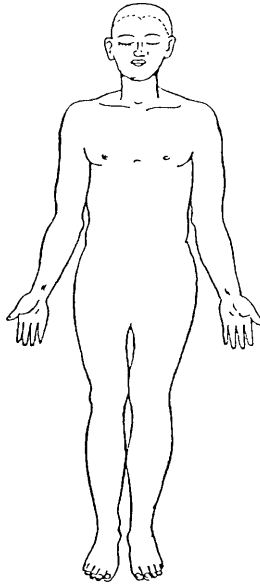
Atemwege (Lee, C.J. 2002; Doolin 2002; Kojima 2003)

Herzmuskelgewebe (Kellar 2001; Shimizu 2002; Leor 2002)

Herzklappe (Sodian 2002; Rotheburger 2002)

Gefäße (Lelkes 1991; Hoerstrup 2001)

Knorpel (LeBaron 2000; Gooch 2001; Ibusiki 2003)



Bauchspeicheldrüse (Papas 1999)

Harnwege (Gustafson 1998; Fossum 2003)

Fettgewebe (von Heimbürg 2000; Borges 2002)

Leber (Bhandari 2001; Torok 2001; Powers 2002)

Niere (Humes 1996)

Sehne / Band (Altman 2002; Chun 2003)

Haut / Wundheilung (Naughton 1997; Pollak 1997; Coloumb 1998)

Knochen (Ishaug 1997; Glowacki 2001; Sikavitsas 2002)

Abb. 1: Ansätze des Tissue Engineering

2.1.5.2 Trägermaterialien

Für das Tissue Engineering werden bislang überwiegend synthetische und semi-synthetischen Polymere (vgl. 2.1.4) mit Zellen kombiniert.

Semisynthetische Matrizen bieten den Vorteil der Erkennung durch Zellen, da sie über natürliche Anheftungsstrukturen verfügen. Darüber hinaus werden sie unter Nutzung nativer Stoffwechselwege abgebaut (Koide 1993; Pachence 1996; Göpferich 1996; Geiger 2002). Bei ihnen muss jedoch unter Umständen mit einer Immunantwort gerechnet werden (Chevally 2000 a), darüber hinaus kann teilweise eine erhebliche Batch-Variabilität beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu können synthetische Materialien mit hoher Batch-Konsistenz hergestellt werden. Ihre Biokompatibilität ist hingegen nicht immer befriedigend und darüber hinaus kann bei einigen Materialien, wie z.B. PGA/PLA-Polymeren, die schnelle Degradation ihren Einsatz einschränken (Sheridan 1994; Pachence 1996; Hoerstrup 2000).

Trägermaterial	Genutzte Zellen	Quelle
1. Synthetischer Gewebersatz		
PGA, PLA und Copolymere	Osteoblasten Chondrozyten Muskelzellen Herzmuskelzellen Nervenzellen Fibroblasten Epithelzellen	Laurencin 1996; Ishaug 1997 Freed 1994; Grande 1997 Kim 1998 Carrier 1999; Sikavitsas 2002 Cheng 2002 Halberstadt 1994 Lu 2001
Nylon	Fibroblasten, Keratinozyten Chondrozyten	Hansborough 1994 Grande 1997
2. Semisynthetischer Gewebersatz		
Fibrin	Keratinozyten Adipozyten	Kaiser 1994 Borges 2002
Alginat	Herzmuskelzellen	Leor 2002
Agarose	Nervenzellen Fibroblasten	Bellamkonda 1995 Marler 2000
Kollagen	Epithelzellen Fibroblasten	Minami 1993 Xhu 1997; West 1998
Kollagen-Glykosaminoglykan	Fibroblasten, Keratinozyten	Murphy, G.F. 1990
Hyaluronsäure	Adipozyten Keratinozyten	von Heimbürg 2000 Rennekamp 1996; Galassi 2000

Tab. 3: Anwendungsbeispiele für Trägermaterialien im Tissue Engineering

Das Trägermaterial agiert im Tissue Engineering als provisorische extrazelluläre Matrix. Es muss die Adhäsion und Migration der Zielzellen unterstützen, einen Raum für die Gewebsneubildung und –reifung schaffen sowie die korrekte Genexpression erlauben (Putnam 1996; Hillmann 2002). Darüber hinaus muss das Trägermaterial dem neu entstehenden Gewebe Stütze, Form und Schutz bieten.

Geht es darum, eine Barrierefunktion (z.B. Protektion von Transplantaten gegen Immunantwort) oder Leitungsfunktion (Nerven, Blutgefäße) wiederherzustellen, werden unporöse Materialien in Form von Membranen und Röhren genutzt (Lelkes 1991; Hoerstrup 2001; Fansa 2002). Ist das Einwandern von Zellen in das Trägermaterial erwünscht, werden poröse Matrizen herangezogen (Mikos 1993; Mooney 1994; Rivard 1995).

Insbesondere die Materialstruktur nimmt großen Einfluss auf die Gewebsneubildung (Putnam 1996; Hillmann 2002). Matrixgeometrie und -zusammensetzung bestimmen so Zelladhäsion, -migration und -proliferation aber auch die Syntheseleistung der Zellen (Ehrlich 1995; Grande 1997; Chevally 2000 a, b). Für das Einwandern von Zellen muss das Material

eine bestimmte, zellspezifische Porengröße aufweisen (Ishaug 1997; Mooney 1997; Besseau 2002).

Die Materialstruktur kann durch moderne Herstellungsverfahren wie das 3D-Printing, die Nanotechnologie oder textile Technologien zunehmend besser an diese Bedürfnisse angepasst werden (Wintermantel 1996; Hutmacher 2001). Darüber hinaus sind jedoch bei der Auswahl eines Trägermaterials eine Vielzahl von anderen Faktoren zu berücksichtigen, die Auskunft über das Verhalten der Matrix *in vitro* und *in vivo* liefern (Tab. 4).

- Niedrige Antigenizität
- Biokompatibilität
- Vermittlung von Zelladhäsion, -proliferation und -funktion
- Stabilität
- Biologisch sicher
- Keine Freisetzung toxischer Abbauprodukte
- Gute Integration in das Transplantatlager

Tab. 4: **Anforderungen an Trägermaterialien für das Tissue Engineering** (modifiziert nach Pruitt 1984)

Durch das Tissue Engineering hergestellte Produkte können statusrechtlich als Medizinprodukte (i.S.v. § 3 Nr. 1 MPG) oder Arzneimittel (i.S.v. § 2 Abs. 1 Nr. 1, 5 o. 2 Nr. 1 AMG) aufgefasst werden. Die Abgrenzung wird entsprechend der Hauptwirkung des Präparates getroffen, leider bestehen bislang erhebliche Unsicherheiten bei der Zuordnung (Rath 2003). In der EU gibt es derzeit keine einheitliche Regulierung für Tissue Engineering-Produkte, die Zulassung erfolgt auf nationalem Niveau (Schutte 2002). In der Bundesrepublik findet das Arzneimittelgesetz Anwendung, eine Vermarktungsautorisierung wie bei anderen Arzneimitteln ist aber hier nicht erforderlich (Schutte 2002). Aus der statusrechtlichen Zuordnung leitet sich ab, dass das für das Tissue Engineering eingesetzte Trägermaterial ebenfalls die Auflagen des Arzneimittelgesetzes erfüllen muss.

2.1.5.3 Möglichkeiten und Grenzen

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt vermag das Tissue Engineering nicht, für alle klinisch bedeutsamen Indikationen ein geeignetes und funktionelles Ersatzgewebe zu erzeugen.

Ursachen dafür können sein, dass

- a) es nicht gelingt, die Zielzellen oder Gewebe in der entsprechenden Qualität und Quantität anzuzüchten;
- b) das Präparat unmittelbar nach der Transplantation seine Funktion nicht aufnehmen kann oder es
- c) seine Funktion nicht über einen längeren Zeitraum stabil erfüllen kann.

a) Das Anzüchten der Zielzellen oder Gewebe in ausreichender Qualität und Quantität ist aufgrund mehrer Faktoren eingeschränkt.

Das Proliferationspotential humaner Zellen variiert beträchtlich. So sind bei Hautzellen, hematopoetischen Zellen und Tumorzellen hohe Proliferationsraten zu finden. Im Gegensatz dazu zeigen jedoch Zellen des Nierenparenchyms und der Leber *in vitro* eine geringe bzw. gar keine Proliferation (Strehl 2002). Suboptimale Kulturbedingungen sowie Dedifferenzierung können eine atypische Proteinexpression der Zellen verursachen. Insbesondere Parenchymzellen verlieren mit fortschreitender Mitose ihre zelltypischen Charakteristika (Strehl 2002), aber auch bei Chondrozyten kann in bestimmten Kulturansätzen ein Verlust der ursprünglichen Proteinausschüttung beobachtet werden (Sittinger 1994; Bujia 1994; Grande 1997). Diese veränderte Proteinexpression kann nachfolgend zu einer Fehl- oder Untersekretion physiologisch wichtiger Substanzen führen (Papas 1999) sowie die Bildung eines minderwertigen Ersatzgewebes nach sich ziehen (Robinson 1990; Mueller, P.K. 1995; Peterson 1996). Bei Chondrozyten geht die Dedifferenzierung *in vitro* mit einer Änderung der Kollagensynthese einher; anstelle des knorpeltypischen Kollagens II wird nun verstärkt Kollagen I produziert (Sittinger 1994; Martin, I. 2000). Da dieses jedoch andere biomechanische Eigenschaften aufweist, ist das entstehende Ersatzgewebe (Faserknorpel) von geringerer Belastbarkeit und damit für eine klinische Anwendung nicht geeignet (Peterson 1996; Rudert 1998).

Bei bestimmten Zellen, z.B. Chondrozyten, ist der Prozess der Dedifferenzierung reversibel. Werden die Zellen in eine geeignete Matrix und insbesondere auch in eine dreidimensionale Anordnung überführt, kann die gewebsspezifische Differenzierung zurück erlangt werden (Bujia 1994; Rudert 1998; Martin, I. 2000).

Für ausgedehnte Volumendefekte wie z.B. Knochenläsionen (Sikavitsas 2002) oder kardiovaskuläre Muskeldefekte (Jockenhoevel 2002; Sodian 2002) muss ein großvolumiges Ersatzgewebe bereitgestellt werden. Aufgrund von Stofftransportlimitationen ist die

Anzüchtung dieser Gewebe jedoch oftmals erschwert (vgl. 2.3.2) (Langer 1995; Bader 1995; Peng 1996; Ishaug 1997; Galban 1999).

b) Nach erfolgreicher Anzüchtung schränkt die Situation im Transplantatlager die Überlebensfähigkeit des Transplantats ein.

Gelingt es, *in vitro* ein geeignetes Ersatzgewebe anzuzüchten, muss sich dieses nach der Transplantation in den Defekt (Transplantatlager) integrieren und seine vorbestimmte Funktion übernehmen. Problematisch für das Überleben des Grafts ist die oftmals inadäquate Nährstoffversorgung im Transplantatlager (Papas 1999; Burg 2000; Borges 2002). Bis zum Anschluss an das Gefäßsystem kann das Ersatzgewebe nur diffusiv versorgt werden (Mikos 1993). Der Gefäßanschluss nimmt in der Regel mindestens eine Woche in Anspruch (Koller 2001; Borges 2002); in der Zwischenzeit ist von einer suboptimalen Versorgung, insbesondere einer schlechten Sauerstoffzufuhr auszugehen. Die zeitweise fehlende Blutversorgung wird bei Geweben mit hohen Nährstoffansprüchen als Ursache für das schlechte Anwachsen (Take) des Transplantates benannt (Black 1998; Papas 1999; Burg 2000; Koller 2001). Aus diesem Grunde gibt es Bestrebungen, durch Schaffung eines komplexeren, bereits mit Gefäßen versehenen Ersatzgewebes den Gefäßanschluss zu beschleunigen und damit den Take zu verbessern (Mikos 1993; Black 1998; Germain 2000). Temporäre Zustände mit geringer Sauerstoffversorgung (Hypoxie) können auch bei heilenden Gewebsdefekten entstehen, da die an der Gewebsreparatur beteiligten Zellen sehr aktiv sind und damit viel Sauerstoff verbrauchen (vgl. 2.2.2.2) (Hunt 1972; Herrick 1996; Falanga 2002). Neben ihren Auswirkungen auf die Zellvitalität können hypoxische Bedingungen eine Veränderung der sekretorischen Leistung der Zellen induzieren (Papas 1999; Dissemont 2001; Falanga 2002; Falanga 2002).

Inwieweit transplantierte Zellen *in vivo* zur Bildung eines funktionalen Ersatzgewebes befähigt sind, hängt auch von ihrer dreidimensionalen Organisation und dem Vorhandensein von Träger- bzw. Leitstrukturen für die Gewebsneubildung ab (Langer 1995; Grande 1997; Chevally 2000 a). Nach Transplantation von Zellsuspensionen wird oftmals ein unbefriedigendes Ergebnis festgestellt, da sich die Zellen nicht im Defekt verankern können und darüber hinaus keine matrix-assoziierten Stimuli für die Differenzierung und Gewebsreparatur vorfinden (Langer 1995; Ferguson 1999; West 1998; Marler 2000).

c) Von einer erfolgreichen Transplantation kann letztlich nur gesprochen werden, wenn das Transplantat seine Funktion über einen längeren Zeitraum stabil erfüllen kann.

Entscheidende Faktoren, die die längerfristige Integration und Funktionalität eines noch fragilen Ersatzgewebes einschränken oder gar verhindern, sind durch das Transplantatlager ausgeübte mechanische bzw. biochemische Einflüsse (Yannas 1994). Mechanische Kräfte wirken v.a. auf kardiovaskulären Gewebersatz (Jockenhoevel 2002), auf Knorpelersatz nach Transplantation in Gelenkregionen (Britberg 1994) aber auch auf Hautersatz (McAree 1993; Munster 1997). Diese mechanischen Kräfte behindern die Integration des fragilen Ersatzgewebes in das Transplantatlager oder führen zu einer direkten Zerstörung der Zellen durch Druck- und Scherkräfte. Bei den biochemischen Einflüssen ist das Wirken gewebsständiger Enzyme zu nennen. Diese können durch Verdau eines trägerbasierten Gewebersatzes seinen beschleunigten Abbau hervorrufen (Murphy, G.F. 1990; Hafemann 1999). Semisynthetische Kollagenmatrizen unterliegen so dem Angriff durch Kollagenase (vgl. 2.2.5.2) und können damit nur über kurze Zeiträume im Gewebsdefekt persistieren (Ries 1995; Middelkoop 1995; Creemers 1998; Kerkvliet 1999). Darüber hinaus wird nach Transplantation kollagenbasierter Präparate oftmals eine kristalline Ansammlung von Kalzium- und Phosphationen auf den Kollagenfibrillen beobachtet. Diese Kalzifizierung kann durch Veränderungen der dreidimensionalen Architektur sowie Flexibilität des Grafts zu Funktionseinschränkungen führen (Lee, W.K. 1997; Sung 1997 a).

Erwähnt werden muss hier auch, dass es nicht immer gelingt, alle morphologischen und funktionellen Aspekte eines nativen Gewebes durch das Tissue Engineering zu rekonstruieren. So stellen Keratinozytentransplantate, obwohl vergleichsweise lange klinisch angewandt, einen Hautersatz mit eingeschränkter Funktionalität dar (Green 1979; O'Connor 1981). Ihnen fehlen Hautanhangsgebilde, zudem können auch sensorische Funktionen nicht vollkommen wiedererlangt werden (Compton 1992; Munster 1997). In diesem Zusammenhang stellt sich jedoch die Frage nach der notwendigen Komplexität; auch ein nicht vollständig dem natürlichen Vorbild entsprechender Gewebersatz kann eine Therapieoption darstellen. So wird durch Keratinozytentransplantate ein effektiver Epithelersatz geschaffen und damit die Barrierefunktion der Haut wiederhergestellt. Bei Schwerbrandverletzten stellt das eine lebensrettende Maßnahme dar (Munster 1997). Auch der Verschluss einer lange bestehenden chronischen Wunde bringt eine erhebliche Verbesserung für den Patienten (Leigh 1986; Schönfeld 1993).

2.2 Spezifik der Weichgewebe und Behandlung von Weichgewebsdefekten

2.2.1 Aufbau und Funktion von Weichgewebe

2.2.1.1 Definition Weichgewebe

Nach Definition der WHO handelt es sich bei Weichgewebe um das gesamte nicht-epitheliale Gewebe des Körpers (ca. 50 % der Gesamtkörpergewebsmasse) mit Ausnahme des reticulo-endothelialen Systems, der Glia und des Stützgewebes besonderer Organe und Viscera (Weiss 1993). Zum Weichgewebe zählen damit beispielsweise Bindegewebe, wie der dermale Anteil der Haut, Muskelgewebe und Fettgewebe.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein aus humaner Haut hergestelltes Gewebstransplantat (azelluläre Dermis) als Trägermaterial für Hautzellen zur Behandlung von Weichgewebsdefekten Anwendung findet, wird nachfolgend näher auf den Aufbau und die Funktion der Haut eingegangen.

2.2.1.2 Hautaufbau und -funktion

Die Haut ist mit einer Fläche von 1,5 bis 1,8 m² das größte Organ. Sie trägt zur Regulation von Temperatur-, Wasser- und Elektrolythaushalt bei, schützt den Körper vor unerwünschten äußeren Einflüssen und beherbergt Sinnesorgane. Die Haut im engeren Sinne (*Kutis*) setzt sich aus Epidermis (Oberhaut) und Dermis (*Corium*, Lederhaut) zusammen (Abb. 2).

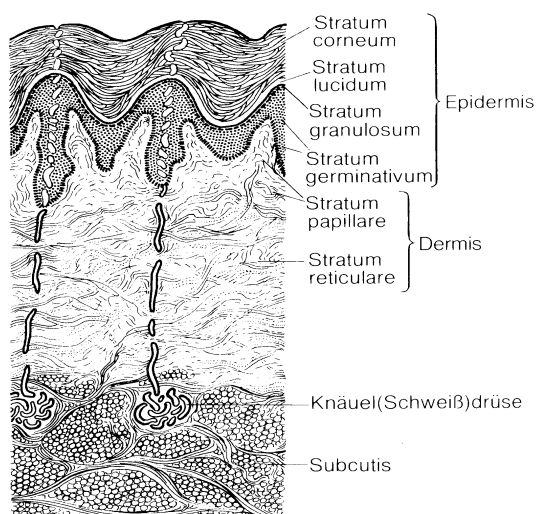


Abb. 2: **Aufbau der Haut** (Junqueira 1996)

2.2.1.2.1 Epidermis

Die Epidermis bildet als Gewebe ektodermalen Ursprungs ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel. Die Keratinozyten stellen mit ca. 85 % den Großteil der epidermalen Zellen, die übrigen ca. 15 % setzen sich zusammen aus Melanozyten, Langerhans-Zellen sowie Merkelzellen. Im Laufe ihrer Differenzierung wandern Keratinozyten von *Stratum basale* zur Hautoberfläche (Hornschicht, *Stratum corneum*) (Junqueira 1996).

Im ***Stratum basale*** sind teilungs- und syntheseaktive Keratinozyten anzutreffen, die über Desmosomen mit Nachbarzellen verknüpft sind. In dieser Schicht finden sich auch die Melanozyten, welche für die Bildung des Pigments Melanin verantwortlich sind. Letzteres schützt die Haut vor ultravioletter Licht. Darüber hinaus liegen hier auch die Merkelzellen vor, die über Mechanosensoren für Druckkräfte verfügen.

Das ***Stratum spinosum*** (Stachelzellschicht) kann mikroskopisch am Vorhandensein von Keratinozyten mit stacheliger Zellmembran erkannt werden. Dieses Bild entsteht durch die Anwesenheit cytoplasmatischer Ausläufer mit Desmosomenendungen. Bündel intermediärer Filamente (Tonofibrillen) dienen der Stabilisierung der Epidermis gegen Scherkräfte (Junqueira 1996). Nach 4 bis 10tägiger transepithelialer Wanderung erreichen Keratinozyten das ***Stratum granulosum***, in dem sie als abgeflachte Zellen mit stark verdichteten Tonofibrillen, Keratohyalin und lamellärer Granula vorliegen. In tieferen Schichten des *Stratum granulosum* findet man die Langerhans-Zellen, die Antigene aufnehmen und anschließend lokal oder in regionalen Lymphknoten T-Lymphozyten aktivieren können (Janeway 1995; Junqueira 1996).

Das ***Stratum corneum*** setzt sich aus abgeflachten Hornzellen zusammen, die eng übereinander geschichtet sind. In den Hornzellen sind praktisch alle Zellbestandteile abgebaut, stattdessen liegen große Mengen Keratin vor. Dieses zysteinreiche Skleroprotein weist eine hohe Elastizität und Festigkeit auf und ist resistent gegen enzymatischen Abbau sowie gegen Säuren. In den obersten Schichten der Epidermis sind abdichtende Substanzen in den Interzellularräumen aufzufinden, die eine Permeabilitätsbarriere aus Ceramiden, Cholesterin und Fettsäuren bilden (Bowser 1985; Junqueira 1996).

2.2.1.2.2 Dermis

An der *dermo-epidermalen junction* sind über eine Basalmembran Epidermis und Dermis verbunden (Abb. 3). Beide Schichten sind über Papillen verzahnt, was die Berührungsfläche zwischen Epidermis und Dermis vergrößert und damit die Stabilität der Verbindung sowie die Austauschfläche für den Stofftransport erhöht. Über Hemidesmosomen und Wurzelfüßchen haften die Basalzellen der Epidermis an der Basalmembran, die wiederum von unten durch Kollagen-III-Fasern mit der Dermis verankert wird.

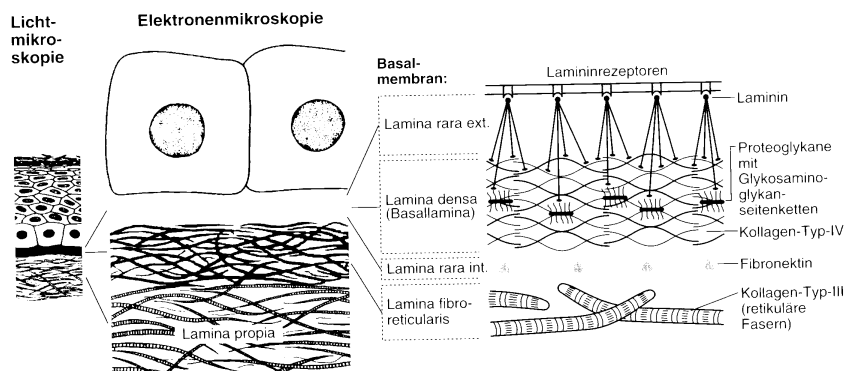


Abb. 3: **Aufbau der Basalmembran an der *dermo-epidermalen junction*** (Junqueira 1996)

Die Dermis ist mesodermalen Ursprungs und setzt sich aus **Bindegewebe** zusammen. Sie stabilisiert die Haut und reguliert den Hautturgor. Im Gegensatz zur 0,04 bis 0,15 mm dicken Epidermis stellt die Dermis mit einer Dicke von bis zu 3 mm das Hauptvolumen der Haut. Anders als bei der Epidermis bilden die ortständigen und mobilen Bindegewebszellen keine Verbände und sind von großen Mengen Interzellulärsubstanz (vgl. 2.2.1.2.3) umgeben. Hinsichtlich der Art und Zusammensetzung der Bindegewebsfasern unterscheidet man das *Stratum papillare* und das *Stratum reticulare*. Obwohl keine eindeutige Abgrenzung beider Schichten vorliegt, können papilläre und retikuläre Dermis anhand von Strukturmerkmalen unterschieden werden (Tab. 5).

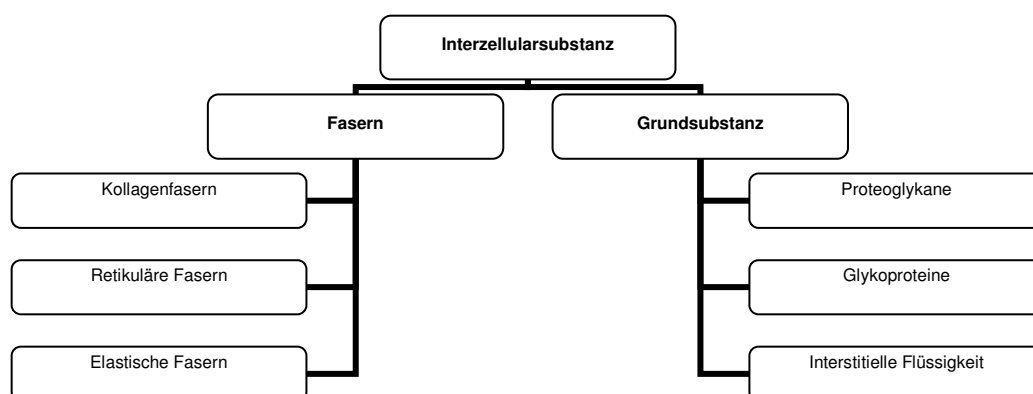
Fibroblasten und Fibrozyten gehören zu den permanent im Bindegewebe vorliegenden (ortständigen) Zellen. Sie sorgen im Rahmen der Wundheilung für die Bildung und Ablagerung von Interzellulärsubstanz sowie für die Remodellierung des neuen Gewebes (vgl. 2.2.3). Freie Bindegewebszellen wie Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen können die Blutbahn verlassen und in das Bindegewebe eindringen. Diese Beweglichkeit ist bedeutsam für ihre Aufgaben bei der Abwehr sowie Wundheilung (Raghow 1994; Ehrlich 1995).

Strukturmerkmale	<i>Stratum papillare</i> (papilläre Dermis)	<i>Stratum retikulare</i> (retikuläre Dermis)
Kollagenfasern	Lose und fein	Dicht und intermediär
Kollagentypen	I, III, Typ I Prokollagen	I
Sonstige Fasern	Unreife Oxytalanfasern	Elastinfasern
Faseranordnung	Lineare Anordnung, konzentriert an <i>dermo-epidermaler junction</i>	Überkreuzt, korbgeflechtartig, regional unterschiedlich
Vorkommen von Zellen	Zahlreiche und aktive Zellen (Lymphozyten, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen); Fibroblasten	Weniger und geringer aktive Zellen
Sonstige Elemente	Nerven und Kapillaren	Nerven, zahlreiche Gefäße

Tab. 5: **Strukturmerkmale der Dermis** (Smith 1982; Junqueira 1996)

2.2.1.2.3 Interzellulärsubstanzen

Interzellulärsubstanzen (Abb. 4) bestimmen entscheidend die Eigenschaften des Gewebes.

Abb. 4: **Zusammensetzung der Interzellulärsubstanz**

Mit einem Anteil von ca. 30 % des Gesamtproteins bildet Kollagen das häufigste Protein der Interzellulärsubstanz. Die Aminosäuren Glycin (33,5 %), Prolin (12 %) und Hydroxyprolin (10 %) sind stark an der Zusammensetzung des Kollagenmoleküls beteiligt (Junqueira 1996). Die Kollagensubtypen liegen zu einem unterschiedlichen Anteil im Gewebe vor und weisen verschiedene Eigenschaften auf (Tab. 6). Mengenmäßig dominiert Kollagen I (Burgeson 1992; van der Rest 1993).

Kollagentyp	Vorkommen	Interaktion mit Glykosaminoglykanen	Funktion
I	Dermis, Faszien, Sehnen, Organkapseln, Knochen	Gering, v.a. mit Dermatansulfat	Zugfest
II	Hyaliner und elastischer Knorpel, Glaskörper	Intensiv, v.a. mit Dermatansulfat	Widerstand gegen intermittierende Drücke
III	Basalmembranen, retikuläre Fasern	Mittel, v.a. mit Heparansulfat	Strukturerhaltung in Organen, die sich ausdehnen
IV	Basallaminae	Mit Heparansulfat	Zellhaftung, Permeabilitätsbarriere

Tab. 6: **Charakteristika der wichtigsten Kollagentypen** (modifiziert nach Junqueira 1996)

Kollagenfasern stellen den größten Anteil der Fasern des Bindegewebes. Sie sind aus parallel angeordneten Kollagen-I-Molekülen zusammengesetzt und haben mit 6 kp/mm² eine höhere Zugfestigkeit als Stahl (Junqueira 1996). Diese beeindruckenden mechanischen Eigenschaften sind durch die hoch organisierte Anordnung der Moleküle bedingt (Abb. 5).

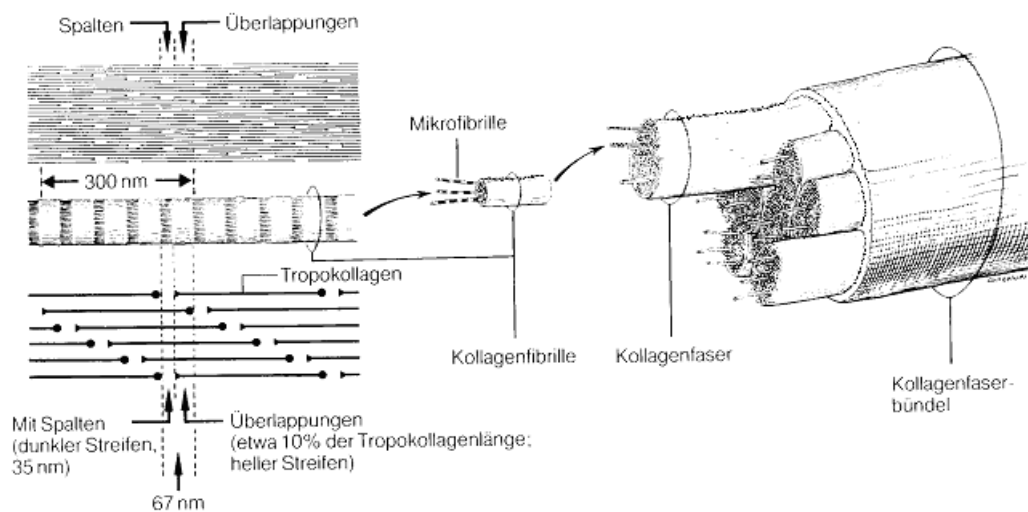


Abb. 5: **Aufbau von Kollagenfasern** (Junqueira 1996)

Retikuläre Fasern bestehen überwiegend aus Kollagen III und bilden feine, flexible Netze. **Elastische Fasern** sind im Gegensatz zu Kollagenfasern verzweigt und formen netzartige Strukturen. Im Gegensatz zu Kollagenfasern (Dehnbarkeit 5 %) weisen sie mit einer Dehnbarkeit von 100 bis 150 % eine außerordentlich Zugelastizität auf. **Grundsubstanzen** füllen den Großteil der Interzellularräume auf. Mengenmäßig überwiegen dabei die hochmolekularen **Proteoglykane** (Molekulargewicht bis zu 1.000.000).

An den Proteinkernen der Proteoglykane sind unterschiedlich zusammengesetzte Glykosaminoglykanseitenketten gebunden (Tab. 7). Der Aufbau und Polymerisationsgrad der

Glykosaminoglykane (GAG) definiert die Festigkeit der Grundsubstanz (Sage 1992; Junqueira 1996).

Glykoproteine bestehen aus einem Proteinkern und kovalent gebundenen Kohlenhydraten. Über Adhäsionsrezeptoren (Integrine) können Zellen an Glykoproteine adhären. Durch die Zellmembran-ständigen Integrine ist nachfolgend eine Signalweiterleitung ins Zellinnere möglich, damit kann die extrazelluläre Matrix wichtige Prozesse wie z.B. die Proliferation, Migration und Differenzierung beeinflussen (Abb. 6) (Hynes 1992; Juliano 1993; Giancotti 1999; Zerveola 2000). Da das Glykoprotein *Fibronektin* sowohl eine hohe Affinität zu Adhäsionsrezeptoren als auch zu anderen Substanzen der Interzellulärsubstanz aufweist, kann es verschiedene Strukturen miteinander verbinden (van der Rest 1993). *Laminin* ist das wichtigste Glykoprotein der Basalmembran (Sage 1992; Raghoebar 1994; Junqueira 1996).

GAG	Disaccharideinheit		Vorkommen
	Hexuronsäure	Hexosamin	
Hyaluronsäure	D-Glukuronsäure	D-Glukosamin	Nabelschnur, Synovia, Glaskörper, Knorpel
Chondroitin-4-Sulfat	D-Glukuronsäure	D-Galaktosamin	Knorpel, Knochen, Kornea, Haut, Aorta
Chondroitin-6-Sulfat	D-Glukuronsäure	D-Galaktosamin	Knorpel, Nabelschnur, Haut, Aorta
Dermatansulfat	L-Iduronsäure o. D-Glukuronsäure	D-Galaktosamin	Haut, Sehne, Aorta
Heparansulfat	L-Iduronsäure o. D-Glukuronsäure	D-Galaktosamin	Aorta, Lunge, Leber, Basallamina
Keratansulfat	D-Galaktose	D-Galaktosamin	Kornea, Knorpel

Tab. 7: Glykosaminoglykane (GAG) des Bindegewebes (modifiziert nach Junqueira 1996)

Interstitielle Flüssigkeit ist reich an Ionen und niedrigmolekularen Substanzen und liegt vor allem in gebundener Form vor.

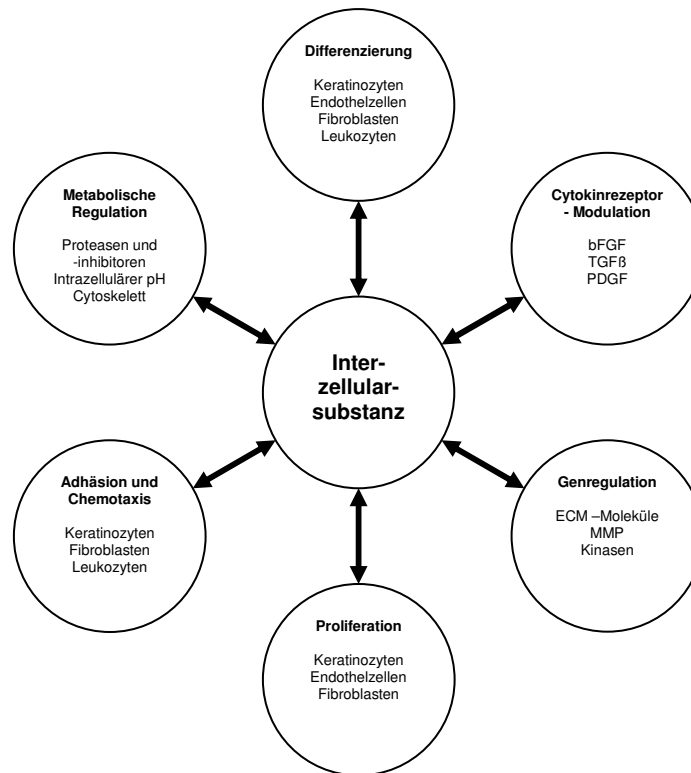


Abb. 6: **Einfluss der Interzellularsubstanz auf zelluläre Ereignisse** (modifiziert nach Raghow 1994)

Die Interzellularsubstanz ist an vielen zellulären Ereignissen beteiligt (Abb. 6), darüber hinaus ist sie äußerst wichtig für die mechanische Struktur, den Stoffaustausch sowie die Wasserspeicherung des Gewebes. Sie gewährleistet die notwendige Gewebestabilität, Flexibilität und Verschiebbarkeit. Die extrazelluläre Matrix bildet eine Leitbahn für Nerven und Gefäße und unterstützt die gerichtete Strukturbildung, z.B. im Rahmen der Gefäßneubildung (Form 1986; Sieminski 2000).

Aufgrund ihrer ausgeprägten Hydrophilie binden Glykosaminoglykane freies Wasser, damit liegt im Bindegewebe ein für die Regulierung des Wasserhaushaltes wichtiges Depot vor. Die interstitielle Flüssigkeit vermittelt den Transport von Substanzen zwischen Bindegewebszellen und Gefäßen. Die räumliche Anordnung und Hydratation der Proteoglykane beeinflusst dabei Diffusionsvorgänge ausschlaggebend (Mueller, P.K. 1995; Junqueira 1996).

Interzellularsubstanzen bilden wegen ihrer Viskosität eine Keimbarriere und tragen damit auch zur Infektionsabwehr bei. Darüber hinaus binden insbesondere Glykosaminoglykane Wachstumsfaktoren und Zytokine. Dadurch wird ein Rückhalt im Gewebe sowie eine optimale dreidimensionale Ausrichtung der Moleküle für die Zellen ermöglicht (Junqueira 1996; Naughton 1997).

2.2.1.2.4 Transdermaler Stofftransport

Sauerstoff und oberflächliche applizierte Substanzen (z.B. Arzneimittel) werden, bis sie das Gefäßsystem erreichen, mittels Diffusion durch die Haut transportiert. Die Haut kann bei Beschreibung der Transportvorgänge als Membran angesehen werden; die transdermale Diffusion wird im Allgemeinen mit dem ersten Fickschen Gesetz beschrieben (Forth 1996):

$$\dot{n}_i = -D_i * A * \frac{\partial c_i}{\partial r} \quad (1)$$

$\dot{n}_i$	diffundierter Molenstrom des Stoffes i [mol/h]
D_i	Diffusionskoeffizient des Stoffes i [m ² /h]
A	für die Diffusion zur Verfügung stehende Fläche [m ²]
$\frac{\partial c_i}{\partial r}$	Konzentrationsgradient des Stoffes i [mol/m ⁴]

An der Beziehung von STOKES-EINSTEIN kann man die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von verschiedenen Parametern erkennen. Der Diffusionskoeffizient wird vom hydrodynamischen Teilchenradius der Substanz, der Viskosität des Diffusionsmediums und der Temperatur beeinflusst.

$$D_i = \frac{k * T}{6 * \pi * \eta * r_i} \quad (2)$$

k	Boltzmannkonstante [1,38E-23 J/K]
T	Temperatur [K]
η	Viskosität des Diffusionsmedium [Ns/m ²]
r_i	hydrodynamischer Teilchenradius der Substanz i [m]

Die Diffusionsgeschwindigkeit hängt neben dem Konzentrationsgradienten auch vom Verteilungskoeffizienten zwischen Membranmaterial und der umgebenden Flüssigkeit ab (Forth 1996). Der Verteilungskoeffizient ist insbesondere für den transdermalen Transport von Arzneimitteln von Bedeutung, da im *Stratum corneum* das Agens ständig Verteilungsvorgängen zwischen Phasen mit unterschiedlicher Lipophile unterworfen ist (Huschka 1998; Krause 1999). Der Verteilungskoeffizient ist ein Maß zur Einschätzung der Affinität eines Stoffes zu einer von zwei nicht mischbaren Phasen.

Verteilungskoeffizient:

$$V_k = \frac{c_1}{c_2} \quad (3)$$

V_k Verteilungskoeffizient

c_1 Konzentration des Stoffes in der Phase 1 [mol/l]

c_2 Konzentration des Stoffes in der Phase 2 [mol/l]

Die Diffusion einer Substanz bei ihrer Passage durch die Haut kann entweder durch das *Stratum corneum* selbst oder durch die Hautanhangsgebilde (transglandulär, transfollikulär) erfolgen (Abb. 7). Letzteres spielt aufgrund des geringen Anteils von Schweiß- und Talgdrüsen sowie Haarfollikeln an der Hautoberfläche (0,1 bis 1 %) nur eine sehr untergeordnete Rolle. Dominierend ist die interzelluläre Route (Bodde 1991) (Abb. 8).

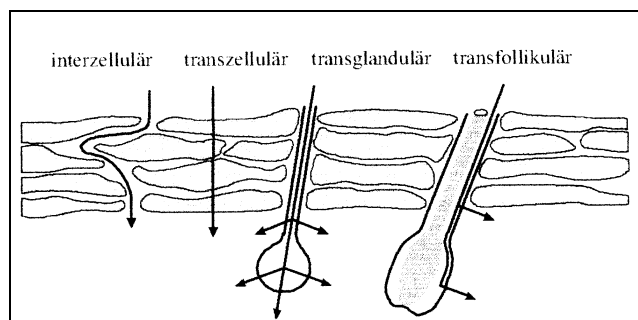


Abb. 7: **Prinzipielle Transportwege zur Substanzpassage durch das *Stratum corneum*** (aus Huschka 1998)

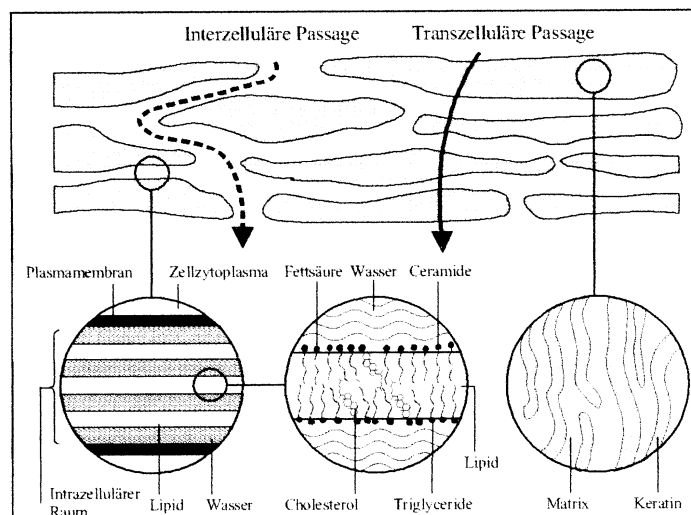


Abb. 8: **Intra- und transzelluläre Passage** (aus Huschka 1998)

Der Widerstand gegen den Stofftransport setzt sich bei der Haut aus den Einzelwiderständen der verschiedenen Hautkomponenten zusammen. Dominierend ist der Transportwiderstand des *Stratum corneum* (Elias 2001).

$$R_t = R_1 + R_2 + R_3 \quad (4)$$

R_t	Gesamtdiffusionswiderstand [h/m]
R_1, R_2, R_3	Diffusionswiderstand der einzelnen Hautkomponenten (<i>Stratum corneum</i> , Epidermis, Dermis)

Der Diffusionswiderstand entspricht dem Reziproken des Permeationskoeffizienten:

$$R = \frac{1}{P} = \frac{d}{D * V_K} \quad (5)$$

P	Permeationskoeffizient [m/h]
-----	------------------------------

Die hohe Barrierefunktion des *Stratum corneum* leitet sich aus seinem Aufbau aus dicht gepackten Keratinozyten und einem komplexen Gemisch aus abdichtenden Substanzen ab (vgl. 2.2.1.2.1).

2.2.2. Reparatur von Weichgewebe

Nachfolgend wird das Reparaturpotential von Weichgeweben betrachtet, dazu sind das Muskelgewebe und das Bindegewebe zu rechnen.

2.2.2.1 Reparaturpotential einzelner Weichgewebe

2.2.2.1.1 Muskelgewebe

Skelettmuskulatur weist trotz fehlender Mitoseaktivität der Zellkerne eine Regenerationsfähigkeit auf, wenn die unter der Basalmembran der Muskelfasern liegenden Satellitenzellen erhalten sind. Die Gewebsregeneration geht dann von diesen Zellen aus. Satellitenzellen proliferieren und fusionieren nach Aktivierung und formen durch Anschluss an unbeschädigte Faserabschnitte neue Muskelfasern. Sind die Basalmembran der betroffenen Muskelzellen und damit auch die Satellitenzellen beschädigt, wird die zerstörte Region durch Bindegewebe ersetzt und nachfolgend zur Narbe umgebaut. Wird der gesamte Muskel entfernt oder zerstört, kann nachfolgend eine Reparatur kaum erfolgen (Junqueira 1996).

Darüber hinaus zeigten experimentelle Untersuchungen am Skelettmuskel von Ratten, dass auch bei minder ausgeprägter Muskelschädigung mit einem massiven Untergang von

Muskelgewebe zu rechnen ist. Dieser wird von Schaser auf eine Zerstörung der Mikrozirkulation zurückgeführt, durch die nachfolgend die Versorgung der Muskelzellen unterbunden wird, was schließlich zum Zelltod führt (Schaser 1999).

2.2.2.1.2 Bindegewebe

Bindegewebe, z.B. die Dermis, weist ein eingeschränktes Reparaturpotential auf, da in der Regel ein nicht-physiologisches Gewebe mit veränderter Morphologie – die Narbe – synthetisiert wird (Sedlarik 1993; Yannas 1994). Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass das Bindegewebskollagen unvollkommen wieder hergestellt ist und im Gegensatz zur natürlichen Morphologie (vgl. 2.2.1.2.2) eine stark parallel ausgerichtete, komprimierte Anordnung aufweist. Darüber hinaus werden Elastinfasern, die der Dermis neben den Kollagenfasern die Elastizität geben, erst zu einem sehr späten Zeitpunkt der Gewebsreparatur und oftmals in geringerem Ausmaß gebildet (Daly 1982; Compton 1992; Wainwright 1995). Als Konsequenz daraus ist die Elastizität des Gewebes reduziert. Darüber hinaus muss mit einer Gewebsschrumpfung und -verdichtung gerechnet werden (Ehrlich 1995). Das Narbengewebe zeigt eine geringere Durchblutung sowie einen reduzierten Wassergehalt. Außerdem werden auch Hautanhangsgebilde (Haar-, Talg-, Schweißdrüsen) nicht in Narben gebildet. Ist die Heilung verzögert, z.B. weil die Wundränder auseinanderklaffen oder die Wundregion sehr groß ist, muss mit einer verstärkten Narbenbildung gerechnet werden. Die minderwertige Physiologie und Morphologie des Narbengewebes kann neben kosmetischen auch zu funktionellen Einschränkungen führen, wie z.B. geringerer Beweglichkeit der Region, Änderungen der Körperkontur oder Gewebsverhärtung (Desmouliere 1992; Sedlarik 1993; Grinell 1994; Gabbiani 1996).

Bedingt aus dem eingeschränkten Reparaturpotential der dargestellten Weichgewebe ergibt sich oftmals die Notwendigkeit zur Anwendung von Gewebsersatzmaterialien (vgl. 2.1) bei ausgedehnten Weichgewebsdefekten (vgl. 2.2.4). Die Gewebsreparatur erfolgt im Rahmen der Wundheilung.

2.2.2.2 Wundheilung

„Die Wundheilung ist die Zusammenfassung sämtlicher physikalisch-chemischer, biochemischer, biologischer und morphologischer Vorgänge, die ein gemeinsames Ziel haben: Wiederherstellung der Gewebeinheit durch Bildung neuer Strukturen, die mehr oder weniger der ursprünglichen Funktion gewachsen sind“ (Sedlarik 1993).

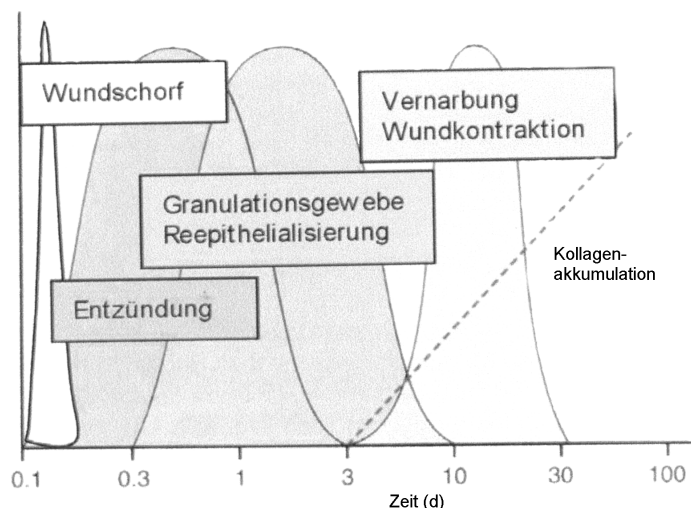


Abb. 9: **Phasen der Wundheilung**
(modifiziert nach Mueller, E.M. 2002)

Die Wundheilung lässt sich in die 4 Phasen einteilen (Abb. 9), die durch die Beteiligung und das komplexe Zusammenspiel verschiedener Zelltypen charakterisiert sind. Die Aktivierung der für die jeweilige Heilungsphase verantwortlichen Zellen geschieht über lösliche Mediatoren (Garner 1998; Falanga 2001).

Bei Wundsetzung kommt es zur Verletzung von Gefäßen. Nach Koagulation des Blutes entsteht der **Wundschorf** aus Blutplättchen und roten Blutkörperchen, die in einer Matrix aus Fibrinfibrillen, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin liegen. Der Wundschorf formt die provisorische Matrix, durch und über die nachfolgend die Zellen wandern. Darin enthaltene chemotaktische und proliferationsfördernde Zytokine und Wachstumsfaktoren sorgen für eine Initiation der Heilungsprozesse (Gailit 1996; Naughton 1997).

In der **Entzündungsphase** wandern Leukozyten zum Wundort. Die Neutrophilen machen die in der Wunde enthaltenen Bakterien unschädlich. Makrophagen phagozytieren absterbende Neutrophile, Zell- und Matrixtrümmer sowie verbleibende Mikroorganismen. Beide Zelltypen produzieren Zytokine, die die Aktivität von Fibroblasten und Keratinozyten stimulieren (Sedlarik 1993).

Bei der **Phase der Reepithelialisierung und Bildung des Granulationsgewebes** sind Keratinozyten und Fibroblasten am Wundverschluss beteiligt. Dazu werden diese durch Stimuli zur Proliferation und Migration in die Wunde angeregt und geben anschließend selber Signale ab, die den Heilungsprozess anregen, aufrechterhalten und koordinieren (Abb. 10).

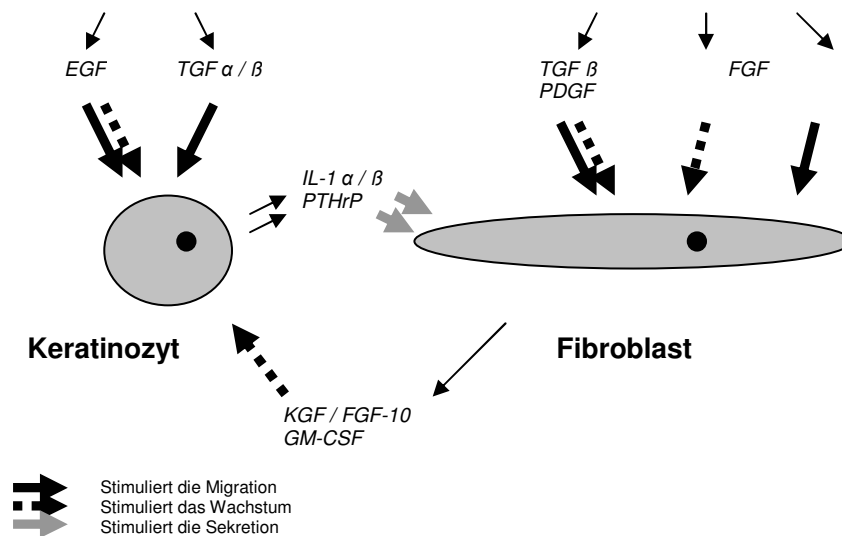


Abb. 10: **Beteiligung von Wachstumsfaktoren an der Wundheilung** (modifiziert nach Mueller, E.M. 2002)

Für die Bewegung im Wundbett sind eine aktive Interaktion mit der extrazellulären Matrix sowie eine Beweglichkeit der Zellen notwendig. Über Integrine adhären Keratinozyten (Integrine $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha v\beta 1$) und Fibroblasten (Integrin $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$) an die Matrix (Gailit 1996; Mueller, E.M. 2002). Die Zellbeweglichkeit wird durch den Verdau der Matrixproteine durch Proteasen gewährleistet, dazu gehören Matrixmetalloproteinasen (MMP vgl. 2.2.3.2) (Ries 1995; Kerkvliet 1999). Während der Epithelialisierung bedecken Keratinozyten die Wunde mit einer Zellschicht, die nachfolgend zur Epidermis stratifiziert wird.

Ebenso wandern Fibroblasten in die Wunde und bilden das Granulationsgewebe, welches sich aus den Fibroblasten selbst, der neu synthetisierten Matrix und vielen neu geformten Blutgefäßen zusammensetzt. Durch die Wachstumsfaktoren FGF (Fibroblast Growth Factor) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) wird die Proliferation von Endothelzellen stimuliert, die neuen Blutgefäße formen (Folkman 1988; Carmeliet 2000; Yancopoulos 2000). Während der 4. Heilungsphase der **Wundkontraktion und Vernarbung** werden durch Kontraktion des Gewebes die Wundränder näher zusammengebracht, was den Wundverschluss erleichtert. Im Rahmen der Vernarbung wird das Granulationsgewebe durch Kontraktion und Kollagenablagerung verfestigt (Ehrlich 1995).

Primär heilende Wunden (Primärheilung) mit aneinander gefügten Wundrändern, wie z.B. frische Operationswunden oder vernähte Verletzungswunden, heilen rasch unter minimaler Narbenbildung. Bei ihnen ist die Ausbildung von Granulationsgewebe gering.

Im Gegensatz dazu liegt bei massivem Gewebsverlust mit weit auseinanderklaffenden Wundrändern eine **Sekundärheilung** vor. Ausgehend von der Wundbasis wird das verloren gegangene Bindegewebe durch Granulationsgewebe ersetzt, welches anschließend kontrahiert und vernarbt, die Heilung ist insgesamt verzögert (Sedlarik 1993). Insgesamt kommt Fibroblasten eine zentrale Rolle bei der Reparatur von Weichgewebsdefekten zu.

2.2.3 Fibroblasten

2.2.3.1 Beteiligung an der Wundheilung

In der reifen, unverletzten Dermis liegt mit einem Wert von 0 bis 0,28 % ein geringer mitotischer Index der Fibroblasten vor (Spyrou 1998). Die Zellen sind in diesem Stadium von voll entwickelter Interzellulärsubstanz umgeben und haben einen inaktiven *Fibrozyten*-Phenotyp. Fibrozyten sind durch eine kleinere Gestalt sowie eine geringe Entwicklung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparats gekennzeichnet (Junqueira 1996).

Der inaktive Zustand der *Fibrozyten* ist reversibel und kann durch Mediatoren, z.B. bei frühen Phasen der Wundheilung ausgeschüttete Zytokine und Wachstumsfaktoren (vgl. 2.2.2.2) in den wachstums- und syntheseaktiven *Fibroblasten*-Phenotyp umgewandelt werden. Die Fibroblasten in einer heilenden Wunde stammen aus ortständigem Gewebe, in der Regel aus dem perivaskulären Gewebsverband (Sedlarik 1993).

Zwei Tage nach Wundsetzung ist mit 2,9 % der höchste mitotische Index gewebständiger Fibroblasten zu beobachten. Das Zytoplasma von Fibroblasten ist reich an granulärem ER und weist einen gut entwickelten Golgi-Apparat auf (Junqueira 1996). Nach ca. einer Woche intensiver Proliferation im Rahmen der Wundheilung ist der basale mitotische Index in etwa wieder erreicht. Zu diesem Zeitpunkt sind die Fibroblasten wieder von ihrem proliferativen Zustand in den ruhenden Fibrozyten-Zustand übergegangen, aus dem sie jedoch erneut wieder zu Fibroblasten aktiviert werden können (Spyrou 1998).

2.2.3.2 Matrixsynthese

Fibroblasten sind die Hauptproduzenten extrazellulärer Matrix bei der Wundheilung. Sie sind in der Lage, gleichzeitig alle Moleküle der Interzellulärsubstanz (vgl. 2.2.1.2.3) zu synthetisieren. Im frühen Granulationsgewebe heilender Wunden wird initial eine hohe Ausschüttung von Fibronektin, Hyaluronan und Tenascin beobachtet. Ungefähr 7 bis 10 Tage nach Wundsetzung sind dort große Mengen von Kollagen I und III, Fibronektin, Proteoglykanen und Tenascin vorzufinden. Nicht-kollagene Moleküle modulieren die Bildung supramolekularer fibrillärer Strukturen und formen eine molekulare Brücke zwischen Zelloberfläche und extrazellulärer Matrix (Mueller, P.K. 1995). Die Synthese der Prokollagene und weiterer Bestandteile der Grundsubstanz erfolgt intrazellulär. Nach Abgabe in den extrazellulären Raum erfolgt das weitere Prozessing des Prokollagens (Burgeson 1992; Junqueira 1996). Neu gebildetes Kollagen ist ungeordnet und liegt in Gelform vor, dieses wird bei der Fibrillogenese zunehmend verfestigt (Sedlarik 1993).

Der hohe Prolin- und Hydroxyprolingehalt des Kollagens ist für die räumliche Ausrichtung des Moleküls in eine helikale Struktur bedeutsam (Pachence 1996). Die intermolekulare Quervernetzung des Kollagens macht das Molekül widerstandsfähiger gegen enzymatischen Angriff und erniedrigt die Löslichkeit. Damit kann Kollagen im Gewebe angereichert werden (Pachence 1996).

Weder Hydroxyprolin noch Hydroxylysin, die typischen Aminosäuren des Kollagens, können direkt in das neu synthetisierte Protein eingebaut werden, sondern entstehen nach Ausbildung der Peptidbindungen durch Hydroxylierung von Prolin und Lysin (Burgeson 1992). Für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der dabei beteiligten Enzyme Prolyl-Hydroxylase und Lysyl-Hydroxylase ist eine adäquate Sauerstoffversorgung des Gewebes notwendig (Hunt 1972; Disemont 2001), aber auch Eisenionen und Ascorbinsäure sind wichtige Cofaktoren (Burgeson 1992; Sedlarik 1993).

Die Kontrolle der Kollagenproduktion erfolgt über

- a) Genregulation
- b) Posttranslationale Modifikation.

Über Genregulation werden der produzierte Kollagentyp und die synthetisierte Proteinmenge gesteuert. Im Rahmen der posttranslationalen Modifikation regulieren die Prolyl- bzw. Lysylhydroxylierung, die Weiterprozessierung des Prokollagens, die Glykosilierung sowie Quervernetzung des Proteins die Kollagenstruktur (Mueller, P.K. 1995).

Primär heilende Wunden weisen in der ersten Woche die höchste Kollagenausschüttung auf, aber auch nach Abschluss der Epithelialisierung läuft die Kollagenbildung über einen Zeitraum von 6 bis 12 Monaten auf niedrigerem Niveau weiter (Sedlarik 1993). Mit der Kollagensynthese geht parallel ein Turnover des neu gebildeten Kollagens einher, wobei die daran beteiligten Enzyme von den Fibroblasten selbst synthetisiert werden (Junqueira 1996; Kerkvliet 1999). Zwischen Bildung und Abbau muss ein fein abgestimmtes Gleichgewicht vorliegen (Raghow 1994). Ist das nicht der Fall, entstehen pathologische Zustände wie Keloide (erhöhte Kollagenbildung) oder chronische Wunden und Narben mit geringer Reißfestigkeit (erhöhter Kollagenabbau) (Ehrlich 1995; Luo 2001). Die Matrixdegradation erfolgt durch Matrixmetalloproteinasen (MMP; siehe Tab. 8) (Ries 1995; Langholz 1995).

MMP werden als inaktive Proenzymform ausgeschüttet und durch Proteinasen aktiviert. Neben dieser proteolytische Aktivierung werden MMP auch auf transkriptionalem Niveau sowie über Interaktion mit dem endogenen Inhibitor TIMP (Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinases) reguliert (Ries 1995). Im letzten Fall liegt die Kollagenase in einem stabilen stöchiometrischen Komplex mit dem korrespondierenden TIMP vor, der die autokatalytische Aktivierung der inaktiven Enzymform verhindert, indem er am Carboxyl-Terminus des Enzyms bindet (Seltzer 1994).

MATRIXMETALLOPROTEINASEN			
Enzym	Pseudonym	Kollagensubstrat	Zusätzliche Substrate (Auswahl)
MMP-1	Kollagenase-1, Fibroblastenkollagenase, Interstitielle Kollagenase	I, II, III; VII, VIII, X	Aggrekan, Gelatine, MMP-2, MMP-9, Cytokine
MMP-2	72 kDa Gelatinase, Gelatinase A	I, II, III, IV, V, VII, X, XI	Aggrekan, Elastin, Fibronectin, Gelatine, Laminin, MMP-1, MMP-9, Cytokine
MMP-3	Prokollagenase, Stromelysin-1	II, III, IV, IX, X, XI	Aggrekan, Elastin, Fibronectin, Gelatine, Laminin, MMP-7, MMP-9
MMP-7	Matrilysin, Matrin	IV, X	Aggrekan, Elastin, Fibronectin, Gelatine, Laminin, MMP-1, MMP-2, MMP-9, β 4-Integrin, Cytokine
MMP-9	92 kDa Gelatinase, Gelatinase B	IV, V, VII, X, XIV	Aggrekan, Elastin, Fibronectin, Gelatine, Cytokine
MMP-10	Stromelysin-2	III, IV, V	Aggrekan, Elastin, Fibronectin, Gelatine, MMP-1

Tab. 8: Wichtige Vertreter der MMP (2; 9)

MMP 2 und das korrespondierende TIMP 2 werden von Fibroblasten konstitutiv, auch in Zellkulturen, exprimiert, weitere MMP-Subtypen können induziert werden. Insbesondere MMP 2 führt konzentrationsabhängig zum Abbau von kollagenen Trägermaterialien (Kerkvliet 1999; Stephens 2001). Wachstumsfaktoren und Cytokine wie IL1, TNF- α , bFGF, EGF und PDGF erhöhen die MMP-Aktivität, indem sie an Rezeptoren auf der Zellmembran binden und die Genexpression verstärken (Birkedal-Hansen 1993).

Die Kollagendegradation findet sowohl intra- als auch extrazellulär statt. Nach Creemers (Creemers 1998) wird die Degradation in einer sauren Mikroumgebung beschleunigt, weil sie die Schwellung des Kollagenmoleküls hervorruft und damit den Zugang von Kollagenasen erleichtert.

Im Rahmen des **Remodellings** erfolgt eine Umformung und Reifung der Interzellulärsubstanz. Diese wird *in vivo* vom einem Zellverlust und der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix begleitet. Das Granulationsgewebe wird dabei durch Narbengewebe mit einem höheren Organisationsgrad ersetzt (Raghow 1994). Parallel dazu kann im Falle von weit auseinander stehenden Wundrändern auch eine Wundkontraktion beobachtet werden. Dabei wird, stimuliert durch Wachstumsfaktoren und mechanische Signale, ein Teil wundständiger Fibroblasten temporär in Myofibroblasten umgewandelt (Grinnell 2002). Diese sind durch einen hohen Gehalt an Mikrofilamenten, an alpha *smooth muscle* Aktin und an Myosin gekennzeichnet. Die für die Kontraktion verantwortlichen Kräfte werden durch das Gleiten cytoplasmatischer aktin- und myosinreicher Mikrofilamente der Myofibroblasten

hervorgerufen. Das führt zu einer Verlagerung und Neugruppierung von Kollagenfibrillen durch die von den Zellen erzeugte Zugkraft (Ehrlich 1995). Diese Kontraktion kann auch *in vitro* bei kollagenen Materialien wie Gelen und Schwämmen beobachtet werden und verursacht eine schnelle Volumenreduktion (Xhu 1997; Grinell 1999; Zerveola 2000). Es wird diskutiert, dass TGF- β 1 maßgeblich an der Myofibroblastenaktivierung beteiligt ist (Grinell 1994; Zerveola 2000). Mit zunehmender Kontraktion des Granulationsgewebes wird die DNS-Synthese herabgesetzt (Langholz 1995; Grinell 2000). Die Myofibroblasten verschwinden nachfolgend durch Apoptose (Darby 1990; Grinell 2000).

2.2.4 Weichgewebsdefekte

2.2.4.1 Erfahrungen aus der Behandlung oberflächlicher Weichgewebsdefekte

Lange Erfahrungen bei der Behandlung von Weichgewebsdefekten bestehen insbesondere bei der Therapie oberflächlicher (kutaner) Läsionen (Tab. 9). Dabei ist es das Ziel, die im Rahmen einer tiefen Verbrennung, chronischen Wunde oder nach einem Trauma zerstörte Dermis wieder herzustellen (Navsaria 1995; Marler 2000; Bello 2001).

Materialien zur Behandlung oberflächlicher Weichgewebsdefekte		
<i>Material</i>	<i>Stabilität nach Transplantation</i>	<i>Quelle</i>
<i>Dermisersatz</i>		
Alloderm™ (allogene, nicht sterilisierte azelluläre Dermis)*	hoch	Livsey 1995; Wainwright 1995
Integra™ (Kollagen-Chondroitin-6-sulfat-Copolymer, quervernetzt)	gering	Murphy, G.F. 1990; Yannas 1994
<i>Composite Graft</i>		
Graftskin™/ Apligraf™ (bovines Kollagen I besiedelt mit allogenen Fibroblasten und Keratinozyten)	gering	Eaglstein 1995; Sorensen 1998
Dermagraft™ (Polyglactinnetz mit allogenen Fibroblasten)	gering	Naughton 1997; Pollak 1997
Kollagen-Elastin-Schwamm mit autologen Fibroblasten	gering	Lamme 1998
Kollagengel mit autologen Fibroblasten	gering	Coloumb 1998

*nicht virusinaktiviert, in der Bundesrepublik als Arzneimittel nicht zugelassen

Tab. 9: **Materialien zur Behandlung oberflächlicher Weichgewebsdefekte**

Bei den so genannten *Composite Grafts* werden Dermisersatzmaterialien mit Hautzellen besiedelt und anschließend transplantiert (Sorensen 1998). In der Regel werden dafür von Fremdspendern stammende (allogene) Hautzellen herangezogen. Diese bieten den Vorteil des Vorhalts in Zellbanken und machen eine Gewebsentnahme beim Patienten unnötig (Navsaria 1995). Andererseits besteht bei diesen allogenen Zellen potentiell das Risiko der Virustransmission. Darüber hinaus kann eine Immunreaktion nicht sicher ausgeschlossen werden (Navsaria 1995; Eaglstein 1995; Rennekampf 1996; Mansbridge 1998).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Mehrheit der hier aufgeführten Materialien zur Behandlung kutaner Weichgewebsdefekte nur eine begrenzte Stabilität aufweist. Damit können sie nur kurze Zeit (wenige Wochen) in Defekt persistieren (Stern 1990; Hafemann 1999). Um eine permanente Defektfüllung sicherzustellen, muss in kurzer Zeit das Gewebersatzmaterial durch patienteneigenes, neu synthetisiertes Gewebe ersetzt werden. Aus diesem Grunde können insbesondere Patienten mit eingeschränkter Gewebsneubildung sowie großvolumigen Weichgewebsdefekten, z.B. Patienten mit Weichgewebssarkomen (vgl. 2.2.4.2), nicht von diesen Ansätzen profitieren.

2.2.4.2 Weichgewebssarkome

Der Begriff Weichgewebssarkome umfasst alle malignen, nichtepithelialen, extraskelettalen Tumore mit Ausnahme von Tumoren der retikuloendothelialen Systems, der Glia, des Stützgewebes der Eingeweide und spezifischer Organe.

Diese Tumore treten mit einer Inzidenz von 2 bis 4 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner auf und verursachen ausgedehnte und schwierig zu behandelnde Gewebsdefekte. Etwa 40 % der Sarkome werden an der unteren Extremität, 30 % am Körperstamm und jeweils 15 % an der oberen Extremität und im Kopf-Hals-Bereich diagnostiziert (Issels 2003). Hinsichtlich ihrer Entstehung kann man Weichgewebssarkome in mehrere Untergruppen einteilen (Tab. 10).

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Sarkome fibrösen oder histozytösen Ursprungs• Fibromatosen• Sarkome des Muskels• Sarkome des Fettgewebes• Sarkome des Endothels und der Lymphe• Sarkome der peripheren Nerven• Sarkome des Synovialgewebes• Sarkome des Knochens• Sarkome des Knorpels• gemischte Sarkome• Sarkome unbekannten Ursprungs |
|--|

Tab. 10: **Klassifizierung von Sarkomen nach ihrer Entstehung** (Moley 2000).

Sarkome werden im Rahmen eines chirurgischen Eingriffes entfernt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird in der Regel eine präoperative Bestrahlung angewandt, die das Auftreten von Tumorrezidiven verringern soll. Dieser positiven Wirkung für die Tumorbekämpfung steht jedoch oftmals eine negative Auswirkung auf die Defektheilung gegenüber. Die Bestrahlung schränkt bei der Hälfte der Patienten die Wundheilung stark ein (Ferguson 1999), so dass

nachfolgend Serombildung, Lymphansammlung sowie entzündliche Vorgänge den Heilungsverlauf erschweren (Hohenberger 1995; 1999).

Die nach Bestrahlung beeinträchtigte Wundheilung wird auf einen Radioschaden gewebständiger Fibroblasten zurückgeführt. Durch die ionisierenden Strahlen ist die Proliferation und Migration der Fibroblasten erniedrigt, so dass die Zellzahl in der Wunde reduziert ist (Gorodetsky 1991). Fibroblasten können damit nicht mehr in vollem Maße ihre wichtige Funktion bei der Wundheilung erfüllen (vgl. 2.2.3), was sich in einem reduzierten Kollagengehalt des Gewebes sowie einer abnormalen Kollagenstruktur mit geringerer Festigkeit widerspiegelt (Ferguson 1999; Schäffer 2001). Als Konsequenz daraus kann kein funktionales Bindegewebe gebildet werden.

Durch das Fehlen eines stabilen Bindegewebes ist die Gefahr von Wundrupturen erhöht (Hohenberger 2002). Darüber hinaus ist aufgrund der schlechten Defektfüllung das funktionelle und kosmetische Ergebnis oftmals nicht befriedigend (Ferguson 1999).

Der Radioschaden gewebständiger Fibroblasten besteht über lange Zeiträume. Damit ist auch bei Therapie der oftmals in einem ehemaligen Strahlenfeld liegenden Tumorrezidive mit Heilungskomplikationen zu rechnen (Hohenberger 1999). Bedingt durch diese lokalen Wundprobleme kann eine adäquate Nachbehandlung, wie z.B. Strahlen- oder Chemotherapie, nur verzögert, möglicherweise überhaupt nicht vorgenommen werden, was wiederum die Überlebenschancen der Patienten reduziert (Langstein 1999).

2.2.4.3 Behandlungsmöglichkeiten von Gewebsschäden nach Exzision von Weichgewebssarkomen

Bei Exzision von Weichgewebssarkomen werden ausgedehnte Gewebsdefekte geschaffen. Diese bedürfen dringend einer Behandlung, um die Gewebsstabilität wieder herzustellen und die Defektheilung zu verbessern (Hohenberger 1995; Moley 2000). Bei vielen Patienten werden autologe Muskellappen in den Defekt transplantiert (Ihara 1999). Diese Therapieoption ist jedoch limitiert, da bei Rezidiven oftmals nicht mehr genug bzw. ungeeignetes Gewebe für die Transplantation vorhanden ist. Des Weiteren wird an der Entnahmestelle des autologen Gewebes ein teilweise erheblicher neuer Defekt gesetzt (Langstein 1999). Aus der plastisch-kosmetischen Chirurgie bekannte synthetische oder semisynthetische Materialien zur Gewebsaugmentation vermögen aufgrund ihres geringen Volumens und schnellen Abbaus nicht, die ausgedehnten Defekte zu füllen (vgl. 2.2.4.1). Aus diesem Grunde wird im Tissue Engineering (vgl. 2.1.5) eine zukünftige Option zur Behandlung dieser Gewebsdefekte gesehen (Langstein 1999).

Die Methoden des Tissue Engineerings eröffnen die Möglichkeit, ausgehend von einer geringen Zellzahl mit Hilfe von *in vitro* Zellexpansion ein autologes Ersatzgewebe zur

Defektfüllung zu schaffen. Leider gibt es derzeit keine längerfristig Erfolg versprechenden Ansätze des Tissue Engineerings für diese klinisch bedeutsame Problemstellung. Erste Schritte zur Behandlung dieser Defekte beinhalteten bislang lediglich die Verwendung von Zellsuspensionen oder von niedrigkomplexen, schnell abgebauten Matrizen, die mit Zellen kombiniert wurden. Bei tierexperimentellen Versuchen wurden Präadipozyten-besiedelte PGLA-Matrizen (Patrick 2002) oder Fibrinpropfen (Borges 2002) transplantiert, jedoch waren aufgrund der schnellen Materialresorption die Ergebnisse nicht ermutigend. In ebenfalls auf Tiermodelle beschränkten Studien kamen auch Fibroblasten zum Einsatz. Die Injektion von reinen Fibroblastensuspensionen oder Zell-Alginat-Mischungen konnte aber auch hier keine längerfristige Volumenaugmentation und Verbesserung der Defektheilung bewirken (Krueger 1978; Gorodetsky 1991; Ferguson 1999; Marler 2000).

2.3 Anwendung der Zellkultur für das Tissue Engineering

2.3.1 Kulturparameter

Humane Zellen sind hinsichtlich ihrer Anforderungen an Substratversorgung sowie Konstanthaltung wichtiger physikalischer Parameter (Temperatur, pH-Wert) sehr anspruchsvoll. Aus diesem Grunde benötigen sie komplex zusammengesetzte **Medien**, die in der Regel mit Vitaminen, Aminosäuren, Zuckern, Lipiden sowie wachstumsfördernden Substanzen supplementiert sind.

Glutamin sowie Glukose stellen die Hauptkohlenstoff sowie –energiequellen für *in vitro* gezüchtete Säugerzellen dar (Miller 1989 a, b). Liegt eine **Glukose**konzentration von mehr als 5 mM im Medium vor, wird über die Glykolyse bis zu 90 % der Glukose in Laktat umgewandelt. Unterschreitet die Glukosekonzentration diesen Wert, wird ein Großteil der Glukose zur Nukleotidbiosynthese genutzt. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke im Medium begünstigen die Laktatbildung, da der Citratzyklus gedrosselt ist und für die oxidative Phosphorylierung nicht mehr genug Sauerstoff für den Energietransfer von den Reduktionsequivalenten zur Verfügung steht.

Die exzessive Akkumulation von **Laktat** wirkt sich negativ auf die Zellproliferation und Syntheseleistung aus. Durch die damit verbundene Reduktion des pH-Wertes, die oftmals nicht mehr durch Puffersysteme aufgefangen werden kann, werden suboptimale Bedingungen für enzymatische Reaktionen geschaffen. Darüber hinaus ist Laktat ab einer Konzentration von 20 mM toxisch für Säugerzellen, da es als Ion vorliegt und in Zellen eindringen kann (Glacken 1988; Miller 1989 b; Butler, M. 1991).

Das zweite Hauptsubstrat, das **Glutamin**, wird hauptsächlich in Oxalacetat metabolisiert, welches nachfolgend für Biosynthesen herangezogen wird. Üblicherweise weist Glutamin nur eine geringe Halbwertszeit (107 Stunden bei 37 °C) auf und muss deshalb regelmäßig durch Medienwechsel ersetzt werden (Arathoon 1981). Glutamat zerfällt spontan oder wird durch die Glutamatdehydrogenase desaminiert, wobei **Ammoniumionen** freigesetzt werden. Diese wirken bereits ab einer Konzentration von 2 bis 4 mM toxisch auf Säugerzellen (Bödeker 1985).

Durch den Zusatz von **Serum**, oftmals von fetalem Kälberserum (FKS), kann den Zellen eine Vielzahl wachstumsfördernder Substanzen zugeführt werden (Bödeker 1986; Freshney 1994). Aufgrund des Risikos der Übertragung von Mykoplasmen, Viren und TSE durch tierisches Serum besteht die Tendenz, Zellkulturen serumfrei unter Verwendung genau definierter, möglichst rekombinanter Ersatzfaktoren zu führen. Weiterhin wird jedoch vielen Zellkulturen wegen seines guten wachstumsfördernden Effektes Serum in einer Konzentration von bis zu 20 % (v/v) zugesetzt (Freshney 1994; Lidl 1994; Navsaria 1995).

Die Zellkulturen werden im Normalfall bei einer **Temperatur** von 37 °C geführt (Bloemkolk 1992). Statische Kulturen sowie kleinere Bioreaktorsysteme werden zu diesem Zwecke in Brutschränken betrieben, die üblicherweise mit einem Gemisch aus Luft und **CO₂** begast werden (Freshney 1994). Bei Oberflächenbegasung der Kulturen stammt der **Sauerstoff** aus dieser Gasphase des Brutschrankes.

Da Säugerzellen nur geringe Änderungen des **pH-Wertes** tolerieren, ist eine effiziente Regulierung des Medien-pH-Wertes notwendig (Danes 1963; Eagle 1973). Die optimalen pH-Werte für humane Zellen leiten sich im Allgemeinen von den physiologischen pH-Werten im humanem Serum ab, die im Bereich von pH 7,37 bis pH 7,43 liegen. In Zellkultursystemen wird der pH-Wert durch Puffersysteme reguliert. Häufig findet dazu das Puffersystem Natriumhydrogencarbonat/CO₂ Anwendung (Freshney 1994; Lidl 1994). Die Pufferkomponente CO₂ wird durch die Brutschrankbegasung mit Kohlendioxid eingestellt. Durch den CO₂-Partialdruck im Brutschrank wird der Anteil des gelösten CO₂ bestimmt.

Dissoziation des gelösten Kohlendioxids: $H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$

Dissoziation des Natriumhydrogencarbonats: $NaHCO_3 \leftrightarrow Na^+ + HCO_3^-$

Puffersystem: $H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$

Bei Verminderung des pH-Wertes wird das Puffersystem auf die linke Seite verschoben, bei Erhöhung auf die rechte Seite und bei Vergrößerung des CO₂-Partialdruckes wird die Konzentration gelösten Kohlendioxids und damit die Dissoziation zur Kohlensäure erhöht.

2.3.2 Anzüchtung dreidimensionaler Zellstrukturen

2.3.2.1 Problematik

Die Anzüchtung dreidimensionaler Zellstrukturen ist insbesondere aufgrund inadäquater Substratversorgung bei höherem Präparatevolumen limitiert (Freed 1994). Es liegt in der Regel ein transportkontrollierter Prozess vor, bei dem es nicht gelingt, ausreichend Substrate für die Zellen im Präparateinneren zur Verfügung zu stellen bzw. Stoffwechselprodukte effizient aus dem Träger abzuführen. Mit zunehmender Besiedelung eines Präparates wird oftmals eine Verschlechterung des Transports beobachtet. Dieses kann hervorgerufen werden durch

- a) die Zellmasse selbst, insbesondere bei Bildung von Aggregaten (Sardonini 1992; Galban 1999)
- b) die exzessive Ausschüttung viskoser extrazellulärer Matrix (Freed 1994; Galban 1999)
- c) die Reduktion der Porengröße bei Materialdegradation (Goeperich 1996; Chevally 2000).

Durch die damit verbundene Erhöhung des Widerstandes gegen den Stofftransport können die Substratansprüche der Zellen immer schlechter befriedigt werden, demgegenüber steht jedoch eine zunehmende Zellmasse mit höherem Bedarf. Als Konsequenz daraus sind die Wachstumsraten mit zunehmender Präparatedicke reduziert (Folkmann 1973; Freed 1993) sowie die Zellularität und die Vitalität im Materialinneren eingeschränkt (Folkmann 1973; Sikavitsas 2002). Bei ausschließlich diffusiv versorgten dreidimensionalen Zellaggregaten ist deshalb die maximale Dicke auf wenige Millimeter begrenzt (Folkmann 1973; Sardonini 1992). Neben der Transportlimitierung von Substraten und Metaboliten können jedoch auch Raumlimitierung sowie Kontaktinhibierung das Zellwachstum einschränken.

Für viele Zellen - wie hematopoetische Zellen (Sandstrom 1996; Sikavitsas 2000), Chondrozyten (Freed 1993), kardiovaskuläre Zellen (Carrier 2002) und Hepatozyten (Bader 1995; Flendrig 1997) - stellt Sauerstoff das limitierende Substrat dar. Der hohe Sauerstoffbedarf der Zellen von 0,053 bis 0,59 mmol/l*h (bei einer Zellzahl von E3 Zellen/l) (Glacken 1988 a) steht einer schlechten Sauerstoffstofflöslichkeit im Medium gegenüber, was die Probleme der Sauerstoffversorgung verdeutlicht. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass neben den Einflüssen durch limitierende Substrate das Zellwachstum auch einer zell- bzw. gewebsspezifischen, internen Kontrolle unterliegt. Von den Zellen selbst sezernierte Wachstums- bzw. chemotaktische Faktoren mit autokriner Wirkung nehmen einen wesentlichen Einfluss auf die Gewebsneubildung *in vitro* (Nollert 1991; Halberstadt 1994; Peng 1996). Um einen stimulierenden Effekt aufzuweisen, muss der autokrine Faktor jedoch mit einer bestimmten lokalen Konzentration im System vorliegen (Halberstadt 1994; Peng 1996).

Obwohl genaue Mechanismen noch nicht geklärt sind, belegen mehrere Untersuchungen, dass Zellen auch *in vitro* ein programmiertes, primär an den menschlichen Körper angepasstes Verhalten ausführen. Diese auch *in vitro* ausgeübten Regulationsmechanismen dienen im menschlichen Organismus der Gewebsreparatur, -differenzierung und -homeostase (Xhu 1997, Galban 1999; Steinbrech 1999; Yamanaka 2000; Galindo 2001; Falanga 2002). Bei bestimmten Zellkulturen, z.B. Chondrozyten und Fibroblasten zeigte sich diese zellspezifische interne Kontrolle sogar dominierend und übertraf in ihrer Wirkung transportassoziierte Einflüsse (Xhu 1997; Galban 1999).

2.3.2.2 Kultursysteme

KULTURSYSTEME	
Statische Kultursysteme	
Petrischalen	Freed 1994; Carrier 1999
Kulturflaschen	Halberstadt 1994; Vunjak-Novakovic 1999
Bioreaktorsysteme	
<i>Packed bed</i>	Kent 1993; Mueller, S.M. 1999
<i>Parallel plate</i> mit tangentialer Strömungsführung	Statopulous 1985; Halberstadt 1994; Peng 1996
Perfusionskammer mit Konstrukt durchströmung	Dunkelman 1995; Carrier 2002
Perfusionskammer mit Gegenstrom des basalen und apikalen Segments	Jockenhoevel 2002
Spinner	Freed 1995; Kim 1998; Sikavitsas 2002
Geschüttelte Flasche	Carrier 1999
Rollerflasche	Vunjak-Novakovic 1999
<i>Rotating wall vessel</i> Bioreaktor	Freed 1995; Sikavitsas 2002
xyz-Gyrator	Carrier 1999
Hohlfaserbioreaktor	Chen, S. 1996; Kamlot 1996
Pulsduplikatorsystem	Hoerstrup 2000

Tab. 11: Kultursysteme zur Anzuchtung dreidimensionaler Zellstrukturen

Zur Anzuchtung dreidimensionaler Strukturen werden verschiedene Kultursysteme genutzt (Tab. 11). Für die empfindlichen Zellen erfolgt der Sauerstoffeintrag in die Zellkultur blasenfrei über Oberflächenbegasung (bei kleineren Kulturvolumina), Anreicherung von Sauerstoff in externen Gefäßen oder Schleifen oder Membranbegasung des Reaktorsystems (Sardonini 1992; Flendrig 1997; Carrier 1999). Durch spezielles Design der Begasungsmembran, z.B. als Polymerkapillare oder Silikonschlauch, kann die für den Sauerstoffeintrag zur Verfügung stehende Oberfläche vergrößert werden (Arathoon 1986).

Da die kultivierten Zellen in der Regel nur adhärent wachsen, werden verschiedene Matrizen zur Zellimmobilisierung genutzt. Neben der Zellkulturplastikoberfläche herkömmlicher Zellkulturgefäße finden Microcarrier, Spheroide, Kapseln, Schwämme, Schäume, Gele, Hohlfasern sowie Gewebersatzmaterialien (Trägermaterialien vgl. 2.1.5.2) Anwendung (Tab. 12). Jedoch muss hier erwähnt werden, dass sich die Prozesskontrolle und Bilanzierung perfundierter, immobilisierter Zellsysteme zumeist schwierig gestalten (Glacken 1983; Arathoon 1986).

IMMOBILISIERTE ZELLSYSTEME	
Microcarrier	Freed 1993; Chen 1996; Papas 1999
Spheroide	Folkmann 1973; Dai 1996; Kunz-Schughart 2001; Reiniger-Mack 2002;
Enkapsulierung	Burdick 2002; Payne 2002
Schwämme	Mueller, S.M. 1999; Germian 2000
Schäume	Kent 1993; Maquet 2001
Gele	Koyano 1997; Balgude 2001; Nguyen 2002
Hohlfasern	Bader 1995; Flendrig 1997
Sowie alle weiteren Trägermaterialien (vgl. 2.1.5.2)	

Tab. 12: Immobilisierte Zellsysteme

Im Gegensatz zur **statischen Kultur**, in der der Stofftransport zu den Zellen rein diffusiv erfolgt, kommt bei Bioreaktorsystemen neben dem diffusiven auch der konvektive Transport zum Tragen. Der Stofftransport zum Präparat ist damit insgesamt verbessert. Bei tangentialer Überströmung des Präparates kann jedoch das Präparatinnere primär nicht vom konvektiven Transport profitieren, da er die zentrale Zone nicht erreicht (Galban 1999; Sikavitsas 2002). Aus diesem Grunde werden Reaktorsysteme genutzt, die eine Durchströmung des gezüchteten Gewebes gewährleisten (Dunkelman 1995; Carrier 2002). Hohlfaserreaktoren finden Anwendung bei der Kultivierung einer hohen Zellmasse, z.B. für die Bereitstellung von Hepatozyten für Leberunterstützungssysteme (Bader 1995; Flendrig 1997), jedoch muss bei ihnen mit teilweise hohen axialen Konzentrationsgradienten gerechnet werden, die eine adäquate Substratversorgung der Zellen oftmals nicht zulassen (Sardonini 1992). In neuartigen Reaktorsystemen, beispielsweise dem *rotating wall vessel* Bioreaktor (Freed 1995; Sikavitsas 2002) oder dem xyz-Gyrator (Carrier 1999), werden die Präparate frei im Medium schwebend kultiviert, was sich positiv auf die Zellproliferation und Homogenität der Trägerbesiedelung auswirken soll.

Spezielle, mehr an die Gegebenheiten im menschlichen Körper adaptierte, Reaktorbetriebsweisen können dazu beitragen, die Qualität des hergestellten Präparates zu verbessern. So wurden bei Anwendung eines pulsatilen Flusses verbesserte Eigenschaften kardiovaskulären Gewebersatzes beobachtet (Hoerstrup 2000; Jockenhoevel 2002). Bei gezüchtetem Knorpelersatz führt eine mechanische Belastung der Kulturen zu einer erhöhten Matrixsynthese und -festigkeit (Lee, C.R. 2003; Ibusuki 2003).

Neben Stofftransportprozessen müssen auch biologische Vorgänge beim Bioreaktordesign berücksichtigt werden. Bei einigen Zelltypen, z.B. hematopoetischen Zellen, steht daher im Vordergrund, dass eine natürliche Mikro- und Makroumgebung möglichst gut nachgeahmt wird (Peng 1996). Die in statischen Kulturen häufig auftretende Diffusionslimitierung des

Sauerstofftransports zieht einen eher anaerob ausgeprägten Zellmetabolismus nach sich. Begleitend dazu sind die Proliferation und Vitalität erniedrigt und damit die Zellularität, insbesondere in der Kernzone der Präparate, vermindert (Freed 1993; Carrier 1999; Burg 2000). Darüber hinaus sind statische Kulturen im Gegensatz zu perfundierten Kulturen oftmals durch eine schlechter differenzierte Ultrastruktur (Carrier 1999) sowie eine geringere Produktion extrazellulärer Matrix (Kim 1998; Vunjak-Novakovic 1999) gekennzeichnet.

2.3.2.3 Einflüsse der Strömung auf Zellen

Konträr zur statischen Kultur sind die Zellen in Bioreaktorsystemen einer Strömung ausgesetzt. Diese wirkt auf die Zellen direkt durch hydrodynamische Effekte und indirekt über ihren Einfluss auf den Stofftransport. Insbesondere die durch die Strömung hervorgerufenen Scherkräfte können Zelladhärenz und Vitalität beeinträchtigen (Kent 1993; van Kooten 1993). Die Auswirkung des Scherstress auf die Zelle hängt von seiner Stärke, Einwirkzeit und der Dynamik des Flusses ab (Lelkes 1991; Nerem 1992). Der tolerierte Scherstress ($\tau_{krit.}$) ist zellspezifisch, wird aber auch durch die Art der Wachstumsgrundlage bestimmt (Goldstein 2002; Mann 2002).

Mechanische Signale werden über die Plasmamembran und Integrine ins Zellinnere übertragen (Chen, K.D. 1999; Goldschmidt 2001; Butler, P.J. 2001), wo eine intrazelluläre Signaltransduktion ausgelöst und die Genexpression moduliert wird (Takahashi 1996; Lin 2000; Jalali 2001). Ein niedriger Scherstress kann einen positiven Einfluss auf den Zellmetabolismus nehmen. So zeigten Untersuchungen, dass z.B. die Protacyclinproduktion (Frangos 1988) und die Urokinaseexkretion von Zellen stimuliert werden (Stathopoulos 1985). Durch die höhere Fluidität der Membran ist die Zellpermeabilität und die Freisetzungsrates von Metaboliten erhöht (Stathopoulos 1985; Frangos 1988).

Auf zu hohen Scherstress reagieren Zellen innerhalb von kurzer Zeit. Binnen Sekunden werden Ionenkanäle aktiviert und die rezeptor-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion verändert (Stathopoulos 1985; Frangos 1988). Nach wenigen Stunden kann eine reduzierte Proliferation und Proteinsynthese beobachtet werden (Lelkes 1991; Kretzmer 1991; Lin 2000). Sind die Zellen länger einem überkritischen Scherstress ausgesetzt, lösen sie sich von der Wachstumsgrundlage. Dieses geht mit einer Zerstörung der Zellmembran einher, die Vitalität ist deshalb erheblich reduziert (Statopulous 1985; Kretzmer 1991). Nach zwei bis drei Tagen kann teilweise eine Adaptation der noch adhären Zellen an die Strömung festgestellt werden. Die Zellen richten sich dabei in Strömungsrichtung aus, auch eine Änderung der Zellmorphologie wird von verschiedenen Autoren beschrieben (Statopulous 1985; Nollert 1991; Kretzmer 1991).

2.3.2.4 Dreidimensionale Fibroblastenkulturen

Dreidimensionale Fibroblastenkulturen werden intensiv als *in vitro* Modell zur Untersuchung der bei der Wundheilung ablaufenden Prozesse eingesetzt (Bell 1981; Maas-Szabowski 2001), dienen aber auch der Aufklärung der Wundkontraktion (Lambert 1992; Grinnell 1994), Fibrosebildung sowie Degradation von Implantaten (Slivka 1992).

Dabei werden die Fibroblasten in der Regel mit einer niedrigkomplexen kollagenen Matrix in Form eines Kollagengels kombiniert, um unreifes, neu synthetisiertes Bindegewebe (Granulationsgewebe) nachzuahmen (Bell 1981; Moulin 1996).

Von diesen Untersuchungen ist bekannt, dass Fibroblasten auf eine unreife Matrix erhebliche Traktionskräfte ausüben, die oftmals zur Verformung bzw. Schrumpfung dieses Materials führen (Harris 1981; Besseau 2002). Dazu findet eine adhäsive, durch Integrine und Nicht-Integrinrezeptoren vermittelte Interaktion der Zellen mit dem Kollagen der Matrix statt (Grinnell 1994; Chevally 2000). Durch die Matrixkontraktion vermögen die Fibroblasten, sich 100 bis 1000fach schneller im unreifen Gewebe fortzubewegen als durch normale Zellmigration (Harris 1981). Bei Kontraktion fibroblastenbesiedelter Gele entstehen mechanische Kräfte, die zu einer Induktion von 60 bekannten Genen führen. Dazu gehören Gene für Zellzyklusregulation und Proliferation, für die intrazelluläre Signaltransduktion, die DNS-Synthese, für Rezeptoren und Zelloberflächenproteine, Cytokine und Wachstumsfaktoren, Proteine der extrazellulären Matrix, Proteaseinhibitoren (TIMP) sowie Cytoskelettkomponenten (Kessler 2001). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich mechanisch belastete und unbelastete Fibroblastenkulturen erheblich in ihrer Aktivität und in ihrem Phenotyp unterscheiden (Grinnell 2000; Kessler 2001).

Zur Stabilitätserhöhung wurden kollagene Matrizen mit Glykosaminoglykanen, Chitosan, Elastin und weiteren natürlichen Polymeren versetzt (Lamme 2000; Germain 2000). Diese komplexeren Materialien zeigten jedoch nach Besiedelung mit Fibroblasten ebenfalls eine schnelle Größenabnahme sowie Porenreduktion, die ein Einwandern der Zellen behinderten (Berthod 1996; Vassiere 2000; Chevally 2000).

Die Reaktion von Fibroblasten auf Cytokine und Wachstumsfaktoren hängt von ihrer räumlichen Anordnung in zweidimensionaler bzw. dreidimensionaler Kultur ab (Rhudy 1988; Clark 1995; Zerveola 2000). Auch die Wachstumsfaktorsekretion der Fibroblasten wird durch das Kulturmodell beeinflusst. So synthetisieren zum Beispiel dreidimensional kultivierte Fibroblasten erheblich mehr VEGF und HGF als Zellen auf herkömmlicher Zellkulturplastik (zweidimensionales Modell) (Pinney 2000). Eine veränderte Signaltransduktion durch Integrine konnte bei zwei- und dreidimensionalen Fibroblastenkulturen jedoch nicht festgestellt werden (Langholz 1997).

3. Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Weichgewebsersatz unter Nutzung der Methoden des Tissue Engineering hergestellt werden, der eine Defektfüllung ausgedehnter subkutaner Weichgewebsläsionen nach Exzision von Weichgewebssarkomen gestattet und darüber hinaus durch den Transfer aktiver Zellen bestrahlungsbedingte Heilungsprobleme ausgleicht. Damit sollen bei einer potentiellen klinischen Anwendung die Gewebstabilität verbessert und Wundheilungsstörungen reduziert werden (Hohenberger 2002).

Wegen ihrer hohen Teilungsfähigkeit sowie leichten Verfügbarkeit sind dermale Fibroblasten attraktive Zielzellen für die Schaffung dieses Weichgewebsersatzes. Sie tragen im Körper durch ihre Matrixsynthese erheblich zur Gewebsreparatur und -neubildung bei. Zur Züchtung eines Ersatzgewebes sind die Fibroblasten aus humanem Gewebe zu isolieren und effektiv zu vermehren. Da diese Zellen nur ein eingeschränktes dreidimensionales Wachstum aufweisen, muss ein geeignetes Trägermaterial Grundlage eines Weichgewebsersatzes sein. Neben der Biokompatibilität und Eignung für die Zellbesiedelung, sind auch die sich aus einer potentiellen Transplantation ableitenden Anforderungen bei der Auswahl des Trägermaterials zu berücksichtigen. Da beim Patienten aufgrund der Vorbestrahlung die Gewebsreparatur und -neubildung eingeschränkt ist, muss durch das gezüchtete Ersatzgewebe eine längerfristige Defektauffüllung sichergestellt werden.

In diesem Zusammenhang soll die Eignung eines biologischen Trägermaterials auf Grundlage einer humanen azellulären Dermis getestet werden. Diese ist in der Bundesrepublik durch das Arzneimittelgesetz (AMG) reguliert, welches die biologische Sicherheit des Transplantates zwingend vorschreibt. Da weltweit kein AMG-konformes Präparat verfügbar ist, muss zunächst eine biologisch sichere humane azelluläre Dermis entwickelt werden. Anschließend sind Techniken zur dreidimensionalen Besiedelung des Materials zu etablieren und optimieren, die es erlauben, in möglichst kurzer Zeit ein stabiles Ersatzgewebe mit teilungs- und syntheseaktiven Zellen bereitzustellen. Ein wirkungsvoller Gewebsersatz ist jedoch nur möglich, wenn es gelingt, diese Eigenschaften auch nach der Transplantation unter den *in vivo* vorliegenden Bedingungen aufrecht zu erhalten; so führen insbesondere hypoxische Bedingungen oftmals zum Absterben von Transplantaten. Aus diesem Grund sollen mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Modellen (Tiermodell) Aussagen über das Transplantatverhalten getroffen werden. Da das Tiermodell nicht den Haupthintergrund der Arbeit darstellt, können die tierexperimentell gewonnenen Daten lediglich als Ausgangsbefund angesehen werden. Die aus der Aufgabenstellung resultierenden Versuche sind in Abb. 11 zusammengefasst.

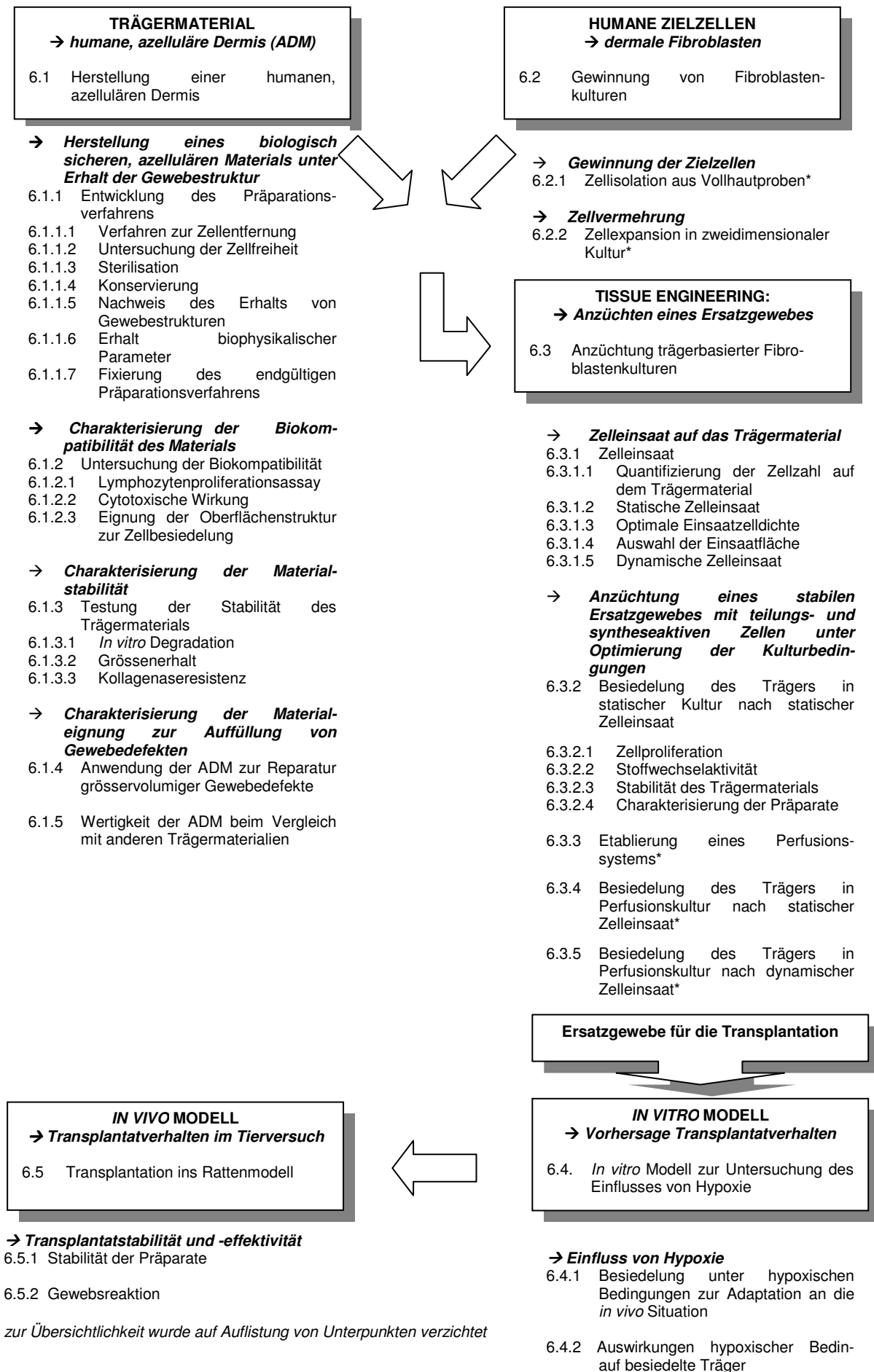


Abb. 11: Übersicht über die Abfolge und Inhalte der Versuche

4. Material

4.1 Geräte und Hilfsmaterialien

Bezeichnung	Spezifikation	Lieferant
Zentrifuge für Eppendorfgefäße	Biofuge 13	Heraeus GmbH
Brutschrank	BB 6220 CU (90% Luftfeuchtigkeit, 37 °C, 5% CO ₂)	Heraeus GmbH
Kleinbrutschrank	Cellstar	Nunc GmbH
Durchlichtmikroskop	CK 2	Olympus AG
Fotoeinrichtung für Mikroskop	SC 35 Type 12	Olympus AG
Analysenwaage	PG 503 Delta Range	Mettler-Toledo AG
pH-Meter mit Laboreinstab-Messkette	MP 220	Mettler-Toledo AG
Magnetrührer	IKA Color squid	IKA GmbH
Laborschüttler	Heidolph LQ 570	Heidolph GmbH
Zentrifuge	Labofuge 400e	Heraeus GmbH
Peristaltikpumpe	Masterflex Computerized	Cole-Parmer Instrument Company
Elektrische Pipettierhilfe	Pipettboy acu	Tecnomara AG Integra
Sterile Werkbank	Lamin Air HB 2448	Heraeus GmbH
Mikroplattenabsorptionsphotometer	Anthos ht 1	Anthos-Deutschland GmbH
Sauerstoffmikrosonde mit Monitor	Revoxode, oxygen catheter- microprobe	GMS GmbH
Sauerstoffdiffusionsmesskammer	Oxytec RE K 1-1	Oxytec GmbH
Wasserbad	Haake L, 37 °C	Haake GmbH
Schreiber	LKB REC 12, Vorschub 1 mm/min, 5 mV	Pharmacia & Upjohn GmbH
Nadeldrucker	Epson LQ 570	Epson GmbH
Mikrometerschraube	Messgenauigkeit 0,01 mm	VEB Feinmesszeugfabrik Suhl
Messschieber	Genauigkeit ± 0,02 mm	Novodirect GmbH
Reinstwasseranlage	Milli-Q UF Plus	Millipore GmbH
Tischautoklav	Tuttnauer 2540 EL	Systec GmbH
Heißluftsterilisator	UT 6200	Heraeus GmbH
Folieneinschweißgerät	HD 250 MS 8-1	HAWO Gerätebau GmbH
Kryolagerbehälter	RS 4800	Taylor-Wharton GmbH
Flüssigstickstoffvorratsbehälter	Harsco 100 l	Taylor-Wharton GmbH
Kühlschrank	Temperatur + 2 bis + 10 °C	Liebherr GmbH
Tiefkühlschrank	Temperatur < - 18 °C	Liebherr GmbH
Ultratiefkühlschrank	Temperatur < - 80 °C	Forma Scientific GmbH
Laborwaschautomat	INNOVA L4	BHT Hygienetechnik GmbH

Tab. 13: **Geräte**

Bezeichnung	Spezifikation	Lieferant
Gewebekulturplatten	6-, 24-, 96-Well	Sarstedt AG
Gewebekulturflaschen	Nunclon™ Surface (T80)	Nunc GmbH
Kultureinsätze für 6-Wellplatten	Falcon 25 mm Culture Insert, 1,0 µm Porengröße	Becton Dickinson GmbH
Reaktionsgefäße 1,5 ml		Merck Eurolab GmbH
Glasflaschen	100 ml, 200 ml, 500 ml	Schott GmbH
Handhomogenisator	Material: Glas, 15 cm ³	B. Braun Melsungen GmbH
Spezialkappen für Glasflaschen	Dreifachanschluß	Tecnomara GmbH
Petrischalen	Durchmesser 6 cm, 10 cm	Sarstedt AG
Kryoröhrchen	1,8 ml Vial Cryo Type™	Nunc GmbH
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Nunc GmbH
Kanülen	0,9 x 70 mm	Merck Eurolab GmbH
Einwegspritzen	10 ml	B. Braun Medical S.A.
Serummonovette		Sarstedt AG
Kanüle für Serummonovette		Sarstedt AG
Einwegpipetten aus Polystyrol	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Nunc GmbH
Gasfilter	PTFE, 0,2 µm	Novodirect GmbH
Spritzenfilter	Syringe filter 0,2 µm Nalgene®	Nunc GmbH
Zellsieb	40 µm, Falcon	Merck Eurolab GmbH
Zählkammer	Typ Neubauer	Brand GmbH
Scalpellklingen	Größe 22	Merck Eurolab GmbH
Luer-Stecksystem	Polypropylen	Novodirect GmbH
Filterhalter	Polypropylen, autoklavierbar, Durchmesser 47 mm	Novodirect GmbH
Schläuche	Masterflex 96420-14 Platinum Cured Silicone 3350	Novodirect GmbH
Kombifolie für Autoklaven	250 cm x 100 m	Strasser DLS GmbH
Spitzen für Eppendorfpipetten	100 µl, 1000 µl; steril	Sarstedt AG
Op-Kittel	Foliodress Perfekt	Paul Hartmann AG
Op-Haube	Medinette dino	Paul Hartmann AG
Abdecktücher	Foliodrape	Paul Hartmann AG
Mundschutz	Medimax senso	Paul Hartmann AG
Untersuchungshandschuh	Größe S, unsteril	Paul Hartmann AG
Scheren, Pinzetten, Klingenhalter für Scalpellklingen		Merck Eurolab GmbH
Beutel	Steriking Cover Bag	Loftex-Firchow GmbH
Testsimplen	Gebrauchsfertige, vorgefärbte Objektträger	Roche Diagnostics GmbH Mannheim
Klebeband	50 mm x 60 m	Merck Eurolab GmbH
Parafilm	10 m	Merck Eurolab GmbH

Tab. 14: Hilfsmaterialien

4.2 Chemikalien

Bezeichnung	Spezifikation	Charge	Lieferant
Trypanblau	0,5 % (w/v) in physiologischer Kochsalzlösung	444 U	Biochrom AG
Desderman®	Händedesinfektion	1039863	Schülke&Mayr GmbH
Terralin® Liquid	Alkoholische Flächendesinfektion, Sprühdesinfektion	1055749	Schülke&Mayr GmbH
Lysetol AF	Desinfektionsmittel zur Instrumentendesinfektion	1044130	Schülke&Mayr GmbH
Esmentan®	Waschlotion	1038733	Schülke&Mayr GmbH
Wofasteril	Desinfektionsmittel, Wirkstoff Peressigsäure	330602	Kesla Pharma GmbH
Perform	Beutel á 40 g zur Flächendesinfektion	1046572	Schülke&Mayr GmbH
MTT-Testkit	Cell Proliferation Kit I	90832320	Roche Diagnostics GmbH Mannheim
LDH-Testkit	Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	10026400	Roche Diagnostics GmbH Mannheim
BrDU-Testkit	Colorimetric Cell Proliferation ELISA	90832220 90910620	Roche Diagnostics GmbH Mannheim
Sircoll-Collagen Assay		G52	DMD GmbH
Protein Assay	BCA micro	B03L12/13	KMF Laborchemie GmbH
BCA Standard	2 mg/ml BSA mit 0,05% NaN ₃	B04L04	KMF Laborchemie GmbH
Dulbecco's MEM (1 x) (DMEM)	w 3,7 g/l NaHCO ₃ w 4,5 g/l D-Glukose w/o L-Glutamin w/o Na-Pyruvat	233 EE	Biochrom AG
DMEM/Ham's F-12 (1:1); (1 x)	w/o L-Glutamin	809 EE	Biochrom
RPMI 1640 (1 x)	w 2,0 g/l NaHCO ₃ w/o L-Glutamin	687 B	Biochrom AG
Serumfreies Keratinozytenmedium	Defined Keratinocyte-SFM w Glutamin	1026230	Gibco BRL Life Technologies
Fetales Kälberserum (FKS)	getestet auf Mycoplasmen	492 U	Biochrom AG
Neonatales Kälberserum (NKS)	getestet auf Mycoplasmen	351 X	Biochrom AG
Gentamycin	10 mg/ml	719 B	Biochrom AG
PBS-Dulbecco (1 x)	w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	505 EZ	Biochrom AG
HBSS (10 x)	10 x Hanks' Balanced Salts	3054911	Invitrogen Life Technologies GmbH
L-Glutamin	200 mM	655 EE	Biochrom AG
Natriumpyruvat	100 mM	802 E	Biochrom AG
EDTA	1 % (w/v)	321 E	Biochrom AG
Amphotericin B	Cell culture tested, activity NLT 420 µg/mg	081K4030	Sigma Aldrich GmbH
EGF	500 µg, recombinant	P020205	Biochrom AG
Hydrocortison	1 mg/ml	622 B	Biochrom AG

Tab. 15: Chemikalien

Bezeichnung	Spezifikation	Charge	Lieferant
Choleratoxin	95 % von <i>Vibrio cholerae</i>	91K4111	Sigma Aldrich GmbH
Insulin	bovin, Zn-Salz, 10 mg/ml	685 A	Biochrom AG
Phythämoglutinin	PHA L, lymphozytenstimulierend, reinst; 1,2 mg Protein/Flasche	217 E	Biochrom AG
Trypsin Inhibitor	Typ I-S from soybean	71K7017	Sigma Aldrich GmbH
Ficoll Trennlösung	Dichte 1,077 g/ml	729 B	Biochrom AG
DMSO	Steril	2282799	B. Braun Medical S.A.
Ascorbinsäure	L-Ascorbic acid, cell culture tested	121K0133	Sigma Aldrich GmbH
Kollagenase	Typ I (E.C.3.4.24.3.), Verdauungsaktivität 265 U/mg aus <i>Clostridium histolyticum</i>	51K1235	Sigma Aldrich GmbH
Trypsin	From bovine pancreas, Activity 1500 BAEE/mg solid	39474555	Sigma Aldrich GmbH
Albumin	Bovin, Fraktion 5	40K7604	Sigma Aldrich GmbH
Tris-HCl		59H5403	Sigma Aldrich GmbH
Kalziumchlorid	Dihydrat	TA209381	Merck KG
Natriumazid		K226566886 12	Merck KG
Ethanol 96 % Vol.	Sorte 410		Bundesmonopolverwaltung für Branntwein
Aqua dest.	Steril	L0015	Biochrom AG
Wasser zur Injektion	Steril		
Glycerol 100%ig	Steril	250399	Phoenix Pharmahandel AG & Co KG
Kollagen	Type 1 from rat tail	000632	Becton Dickenson GmbH
pH-Pufferlösungen	pH 7,00; 4,00; 10,00	9021697 9011694 00044110	Merck Eurolab GmbH
KCl-Puffer für pH-Elektroden	3 M	902349K	Merck Eurolab GmbH
Formalin	37 % p.a.	K226734036 04	Merck KG
Trocknungsmittel: Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator	Blaugel	K25	Merck Eurolab GmbH
NaCl	Natriumchlorid reinst, DAB- Qualität	K258302008 45	Merck KG
Triton X 100	p.a.	K227388036 14	Merck KG
NaOH	1 M	OC122500	Merck KG
Essigsäure	96 % p.a.	Z594862103	Merck KG
Schwefelsäure	95-98 % reinst	K264266139 17	Merck KG
Ketave TM	Wirkstoff Ketaminhydrochlorid	04513	Pharmacia & Upjohn GmbH
Rompun TM	Wirkstoff Xylazinhydrochlorid	DW 2058	Bayer AG
HCl	1 N Lösung	51K2324	Sigma Aldrich GmbH

Tab. 15: **Chemikalien** – Fortsetzung

Bezeichnung	Lieferant
Anti-Human Kollagen I Antikörper	Dako A.S.
Anti-Human Kollagen III Antikörper	Dako A.S.
Anti-Human Kollagen IV Antikörper	Dako A.S.
Anti-Human Laminin Antikörper	Dako A.S.
Anti-Human Fibronectin Antikörper	Dako A.S.
Anti-Human Pancytokeratin Antikörper	Dako A.S.
Anti-Human Vimentin Antikörper	Dako A.S.
Anti-Human CD34 Antikörper	Dako A.S.

Tab. 16: **Antikörper**

4.3 Formulierungen von Medien und Lösungen

Bei allen für die Zellkultur eingesetzten Formulierungen handelt es sich um sterile Lösungen.

4.3.1 Fibroblastenmedium

Formulierung für 100 ml Fibroblastenmedium:

- 86,5 ml Dulbecco's MEM (1 x)
- 10 ml FKS
- 2 ml L-Glutaminlösung (200 mM)
- 1 ml Natriumpyruvatlösung (100 mM)
- 0,5 ml Gentamycinlösung (10 mg/ml)

4.3.2 Keratinozyteneinsaatmedium

Formulierung für 100 ml Keratinozyteneinsaatmedium:

- 29 ml DMEM/F12 1:1
- 58 ml DMEM (1 x)
- 10 ml FKS
- 1 ml Natriumpyruvatlösung (100 mM)
- 2 ml L-Glutaminlösung (200 mM)
- 0,5 ml Gentamycinlösung (10 mg/ml)
- 100 µl Choleratoxinlösung (10^{-7} M in DMEM mit 10% FKS)
- 100 µl Insulinlösung (5 mg/ml in 0,05 N HCl)
- 200 µl Hydrocortisonlösung (0,2 mg/ml in DMEM)

4.3.3 Keratinozytenwachstumsmedium

Formulierung für 100 ml Keratinozytenwachstumsmedium:

- 100 ml Keratinozyteneinsaatmedium werden 100 µl EGF-Lösung (10 mg/ml in DMEM mit 10% FKS) zugesetzt

4.3.4 Lymphozytenmedium

Formulierung für 100 ml Lymphozytenmedium:

- 2 ml L-Glutaminlösung (200 mM)
- 88 ml RPMI 1640 (1 x)
- 10 ml autologes Serum
- zur Gewinnung von autologem Serum venöses Blut durch Punktion der in der Armbeuge gelegenen Venen in eine Serummonovette aspirieren
- Blut für 10 min bei 3000 U/min zentrifugieren und Serum abnehmen

4.3.5 Transportmedium für Hautproben

Formulierung für 100 ml Transportmedium:

- 99 ml Dulbecco's MEM (1 x)
- 1 ml Gentamycinlösung (10 mg/ml)

4.3.6 Waschpuffer für Hautproben

Formulierung für 100 ml Waschpuffer:

- 99 ml PBS
- 1 ml Gentamycinlösung (10 mg/ml)

4.3.7 Kollagenaselösung zur Zellisolierung

Formulierung für 10 ml Kollagenaselösung:

- 10 ml Fibroblastenmedium ohne Serumzusatz (siehe 4.3.1)
- 100 mg Kollagenase I (Verdauungsaktivität 265 U/mg)
- nach Auflösung der Kollagenase wird die Lösung durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert

4.3.8 Trypsin-Lösung zur Epidermiszellgewinnung

Formulierung für 50 ml einer 0,25%igen Trypsinlösung

- 43,5 ml PBS
- 5 ml Trypsin-Stammlösung 2,5 %ig (w/v) in A. dest., sterilfiltriert
- 1 ml Gentamycinlösung (10 mg/ml)
- 0,5 ml Glucoselösung 20 %ig (w/v) in A. dest., sterilfiltriert

4.3.9 Trypsin-EDTA-Lösung zum Passagieren von Zellen

Formulierung für 100 ml einer 0,125 %igen Trypsin-EDTA-Lösung:

- 91 ml PBS
- 5 ml Trypsin-Stammlösung 2,5 %ig (w/v) in A. dest., sterilfiltriert
- 4 ml EDTA (1 %ig)

4.3.10 Einfriermedium

Formulierung für 133 ml Einfriermedium:

- 109 ml Dulbecco's MEM (1 x)
- 13 ml FKS
- 10 ml DMSO
- 0,7 ml Gentamycinlösung (10 mg/ml)
- 0,5 ml Glucoselösung 20 %ig (w/v) in A. dest., sterilfiltriert

4.3.11 Kollagenaselösung zur Bestimmung der Kollagenaseresistenz

Formulierung für 10 ml:

- 9 ml Tris-HCl-Puffer (0,05 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 0,05 mg/ml Natriumazid, pH 7,4)
- 1 ml Kollagenasestammlösung (100 U/ml Kollagenase I in Tris-HCl-Puffer)

4.4 Trägermaterialien

Bezeichnung	Spezifikation	Lieferant
VacuSeal	Polyvinylschwamm	Coloplast GmbH
Prolene	Polypropylennetz	Ethicon AG
Vicryl, ungefärbt	Netz aus Polyglactin 910 (Copolymer aus Lactid und Glycolid)	Ethicon AG
Vicryl, gefärbt	Kissen aus Polyglactin 910 gefärbt mit D+C Violett	Ethicon AG
Alloderm®	Azelluläres nicht sterilisiertes gefriergetrocknetes Präparat aus Bestandteilen humaner Dermis	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch LifeCell Inc.
Humane azelluläre Dermis	Azelluläres sterilisiertes Transplantat aus Bestandteilen humaner Dermis	Selbst präpariert im DIZG

Tab. 17: **Trägermaterialien**

Die im Rahmen der Arbeit untersuchte humane, sterilisierte azelluläre Dermis wurde am Deutschen Institut für Zell- und Gewebeersatz (DIZG) eigens hergestellt. Das DIZG arbeitet auf der Basis nationaler wie auch internationaler Qualitätsstandards und ethischer Grundsätze und steht unter der Aufsicht der für die Arzneimittelzulassung Obersten Behörde, dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, sowie der zuständigen Landesgesundheitsbehörden. Die Entnahme, Präparation, Konservierung und Lagerung humaner Gewebe erfolgt auf der Basis des Arzneimittelgesetzes der Bundesrepublik Deutschland und der Quality Standards der EATB (European Association of Tissue Banks). Das DIZG besitzt eine behördliche Erlaubnis zur Herstellung von Arzneimitteln humanen Ursprungs.

5. Methoden

5.1 Gewinnung von biologischem Ausgangsmaterial

5.1.1 Spalthaut zur Präparation humaner azellulärer Dermis

Die Hautsammlung zur Präparation humaner azellulärer Dermis erfolgt unter Berücksichtigung des geltenden nationalen Transplantationsgesetzes und der Spenderauswahlkriterien des DIZG durch geschultes Fachpersonal. Die mit dem Dermatome entnommene Spalthaut wird in Beutel eingeschweißt und bis zur Präparation bei Temperaturen unter -18 °C aufbewahrt. Parallel dazu erfolgt in einem akkreditierten Prüflabor das infektionsserologische Screening des Spenderserums gemäß der geltenden Prüfvorschrift des DIZG. Die Freigabe der Haut zur Präparation erfolgt ausschließlich bei negativen Ergebnissen der Infektionsserologie.

5.1.2 Humane Vollhaut zur Isolierung von Zellen

Zur Zellgewinnung (Keratinocyten, Fibroblasten) wird humane Vollhaut herangezogen. Nach erfolgter Belehrung und Zustimmung des Patienten (*informed consent*) wird das bei der entsprechenden plastischen Operation (Mammareduktionsplastik, Abdominalplastik) anfallende Gewebe unter aseptischen Kautelen in Transportmedium überführt und sofort zur Präparation ins Labor verbracht. Das infektionsserologische Screening erfolgt nach Prüfvorschrift.

5.1.3 Rattenhaut zur Isolierung von Zellen

Zur Gewinnung von Rattenfibroblasten wird eine Vollhautprobe der Ratte herangezogen. Nach Euthanasie des Tieres wird die Entnahmeregion mit Alkohol desinfiziert. Ein ca. 30 cm² großes Gewebstück wird vom Rücken der Ratte entnommen und in Transportmedium verbracht, welches zusätzlich mit 5,6 µg/ml Amphotericin B supplementiert wurde.

5.2 Präparation humaner, azellulärer Dermis

5.2.1 Zellentfernung

Nachdem die Spalthaut in Wasser zur Injektion zur Entfernung von Blutbestandteilen gespült wurde, wird sie in die benötigten Abmaße geschnitten. Die papilläre Seite wird durch einen Einschnitt markiert. Anschließend wird die Haut in einer Enzymlösung bzw. einer hyperosmolaren Salzlösung unter Rühren bei 22 °C inkubiert, bis sich die Epidermis vollständig von der Dermis trennt.

Die Dermis wird dann zur Entfernung der Reagentien mit Wasser zur Injektion gespült und bei 22 °C für 24 Stunden einer Detergenzlösung ausgesetzt. Die Detergenzlösung wird mit Wasser sorgfältig aus der Dermis gewaschen, bis keine Restdetergenz im Spülwasser nachweisbar ist. Die Restdetergenzkonzentration wird in Anlehnung an die Ph.Eu. bestimmt (17).

5.2.2 Sterilisation

Die Sterilisation der Präparate erfolgt mit einem validierten chemischen Sterilisationsverfahren auf der Basis von Peressigsäure. Für dieses Verfahren wurde in Rahmen von Validierungsstudien der Nachweis der Inaktivierung von Bakterien, Sporen, Pilzen und Viren erbracht (Pruss 2001 a, b).

5.2.3 Konservierung

Zur Aufrechterhaltung der Präparateeigenschaften während der Lagerung werden folgende Gewebeskonservierungsmethoden (Weissflog 1984; Cinamon 1993; Richters 1996) getestet:

- a) *Kryokonservierung* durch Aufbewahrung der Transplantate in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff
- b) *Tieftemperaturkonservierung* durch Lagerung bei Temperaturen von -80 °C
- c) *Glyzerinkonservierung* durch Einbringen der Präparate in 98 %iges Glyzerin

Vor dem Einsatz für weitere Untersuchungen wird kryokonservierte (a) bzw. tieftemperaturkonservierte Dermis (b) durch Einbringen in PBS aufgetaut, glyzerinkonservierte Dermis (c) wird gemäß 5.7.1 rehydratisiert.

5.3 Prüfmethoden

5.3.1 Untersuchungen von Zellproliferation, -vitalität und –aktivität

5.3.1.1 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung von Zellzahl und Vitalität werden mit Trypanblau versetzte Zellen in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Dazu wird die Zellsuspension vor Eingabe in die Kammer 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Da Trypanblau von intakten Zellmembranen ausgeschlossen wird, werden lebende Zellen nicht angefärbt. Tote Zellen werden blau dargestellt. Die Vitalität wird als prozentualer Anteil lebender (ungefärbter Zellen) an der Gesamtzellzahl ermittelt.

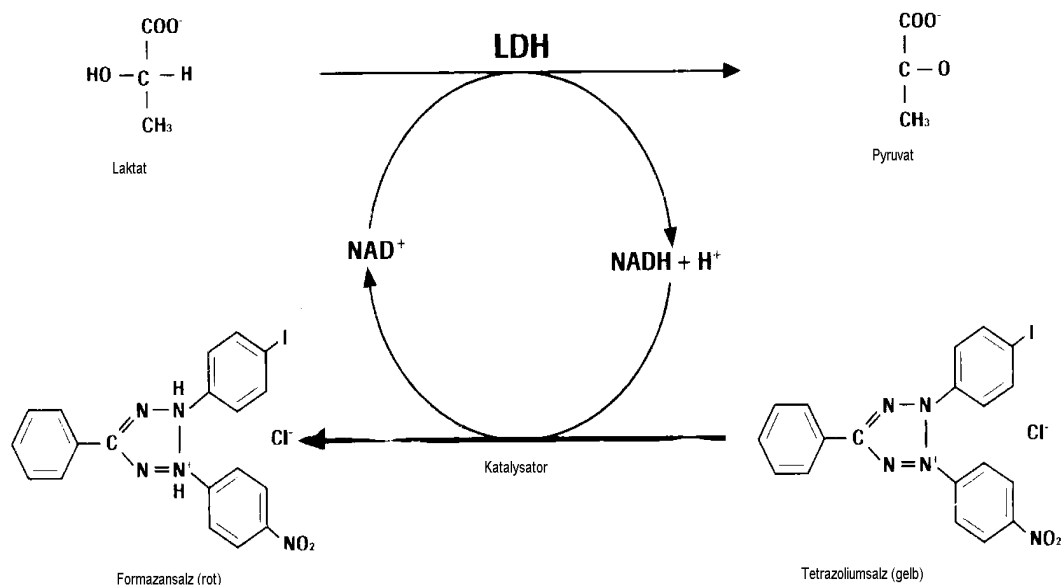
5.3.1.2 LDH-Assay

In Kulturüberständen wird die nach Schädigung der Plasmamembran freigesetzte, nun extrazelluläre Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität nach Abtrennung von Zellen oder Zelldebris durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 U/min bestimmt. Für den Blindwert wird Fibroblastenmedium genutzt.

Die intrazelluläre LDH-Aktivität wird als Maß für die Lebendzellzahl quantifiziert. Die LDH wird dazu durch 12stündige Zellyse mit Lysepuffer (1 % (v/v) Triton in PBS) aus den Zellen gelöst. Nach Zentrifugation der Suspensionen wird in den Überständen die LDH-Aktivität ermittelt. Für den Blindwert werden Lysepuffer (für ohne Trägermaterial kultivierte Fibroblasten), Lysepuffer nach Inkubation mit unbesiedelter azellulärer Dermis (für besiedelte azelluläre Dermis) bzw. Lysepuffer nach Inkubation mit zellfreiem Kollagengel (für besiedelte Kollagengele) eingesetzt. Der Assay wird nach den Anweisungen des Herstellers vorgenommen; die Absorption des beim Test gebildeten Tetrazoliumsalzes wird nach 15 min bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm vermessen (3).

Validierung des LDH-Assays

Der Zusammenhang zwischen Aktivität intrazellulärer LDH und Zellzahl wird durch die Validierung des LDH-Testes aufgezeigt. Dazu werden Fibroblastensuspensionen mit einer Zellzahl von 3E4, 6E4, 9E4, 12E4, 15E4 sowie 18E4 Zellen in Reaktionsgefäße pipettiert und bei 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird wie oben beschrieben mit 1 ml Lysepuffer lysiert und die mit der Lebendzellzahl korrespondierende intrazelluläre LDH-Aktivität mit dem Assay ermittelt.

Abb. 12: **Reaktionsprinzip des LDH-Assays** (modifiziert nach 3)

5.3.1.3 BrDU-Assay

Im BrDU-ELISA wird die Zellproliferation anhand des Einbaus des Pyrimidinanalogs BrDU (5-Bromo-2'-desoxyuridin) in neu synthetisierte DNS quantifiziert. Probe und Färbereagens werden im Verhältnis 1:10 (v/v) gemischt, die Zellen werden nachfolgend für 90 min mit dem BrDU inkubiert. Analog wird unbesiedelte azelluläre Dermis den verschiedenen Inkubationsschritten unterworfen (Blindwert). Die Quantifizierung des Reaktionsproduktes erfolgt bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm nach Abstoppen der Peroxidasereaktion mit 1 M Schwefelsäure (4).

5.3.1.4 MTT-Assay

Die metabolische Aktivität von Zellen wird mittels des MTT-Assays bestimmt. Durch mitochondriale Dehydrogenaseaktivität wird der Farbstoff MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in ein Formazansalz metabolisiert, dessen Konzentration nach Solubilisierung mit Solubilisierungslösung (10 % SDS in 0,01 M HCl) bei einer Messwellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm ermittelt wird. Die Farbstofflösung wird im Verhältnis 1:10 (v/v) zum Zellkulturmedium gegeben und die Zellen damit für 4 Stunden im Brutschrank kultiviert. Zur Lösung der Farbstoffkristalle wird der Ansatz mit dem gleichen Volumen Solubilisierungslösung über Nacht im Brutschrank inkubiert (5).

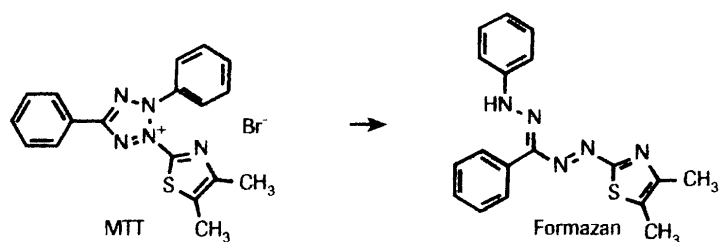


Abb. 13: Reaktionsprinzip des MTT-Assays (5)

5.3.1.5 Proteinbestimmung

In Lösung befindliche Proteine werden mit dem colorimetrischen MicroBC-Assay auf Grundlage der Bicinchoninsäuremethode quantifiziert, welcher nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt wird. Nach Reduktion von Kupferionen des Nachweisreagens durch die Peptidbindungen des Proteins werden durch Zugabe von Bicinchoninsäure Kupferchelatkomplexe gebildet. Die Absorption dieser Komplexe wird bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen. Unter Zuhilfenahme einer Standardkurve, die mit einem Proteinstandard (BSA) erstellt wird, erfolgt die Berechnung der Proteinkonzentration (6).

5.3.1.6 Kollagennachweis

Der Kollagennachweis erfolgt mit dem Sirius-Red Testkit auf Grundlage der festen Bindung der Sulfongruppen des Farbstoffs an die basischen Aminosäure-Gruppen des Kollagens. Nach Farbstoffelution wird die Extinktion als Maß für den Kollagengehalt bestimmt (7). Probe und Färbereagenz werden dazu im Verhältnis 1:10 (v/v) gemischt und bei Raumtemperatur 60 min unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation bei 9000 U/min für 10 min wird die überschüssige Färbelösung gründlich entfernt und der präzipitierte, an das Kollagen gebundene Farbstoff durch 30minütige Inkubation mit 0,5 ml einer 0,1 M NaOH-Lösung bei 37°C freigesetzt. Die Absorption wird in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 540 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Zur Berechnung der Kollagenkonzentration wird eine Eichkurve mit Kollagen I in den Konzentrationen von 0 µg bis 25 µg erstellt.

5.3.1.7 Laktatbestimmung

In Kulturüberstände abgegebenes Laktat wird am Institut für Klinische Chemie, Berlin-Steglitz vermessen; frisches Fibroblastenmedium wird für den Blindwert herangezogen.

5.3.1.8 Glukosebestimmung

Die Bestimmung von Glukose in Kulturüberständen erfolgt am Institut für Klinische Chemie.

5.3.1.9 Kollagenaseaktivität

Die Kollagenaseaktivität in Medienüberständen wird anhand des Verdaus definierter Kollagenmengen in einem Mikrotiterassay quantifiziert.

Vorbereitung der Kollagen-Mikrotiterplatten für den Assay

Wells von Rundbodenmikrotiterplatten werden mit 100 µl Kollagenlösung (Kollagen I, 0,2 µg/µl in 0,1 %iger Essigsäure) gefüllt und bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert; die letzte Reihe wird für die spätere Erstellung der Blindwerte freigelassen. Nach Trocknung des Films werden die Platten bei Raumtemperatur für 2 h in einem Exikator mit 50 ml einer 40 %igen Formaldehydlösung inkubiert. Ungebundenes Formaldehyd wird anschließend bei Raumtemperatur ausgegast (7). Bis zum Einsatz, maximal jedoch 7 Tage, werden die beschichteten Platten in einem Exikator mit Blaugel aufbewahrt.

Prokollagenase-Aktivierung

Prokollagenasen werden durch Inkubation mit Trypsin aktiviert (Freisetzung der aktiven Kollagenase). Jeweils 120 µl des Kulturüberstandes werden dazu in Reaktionsgefäßen für 10 min bei 37 °C mit 5 µl Trypsin (50 µg/ml) inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 µl Trypsininhibitor gestoppt (Mauch 1988).

Bestimmung der Kollagenaseaktivität

Jeweils 100 µl des Kulturüberstandes werden vor bzw. nach Prokollagenase-Aktivierung in die Kavitäten pipettiert. Ebenso werden Kavitäten mit 100 µl einer definierten Kollagenaselösung (Kollagenase-Stammlösung siehe 4.3.11) gefüllt. Die Platte wird auf einem Wippschüttler für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen aspiriert und die Konzentration gebundenen Kollagens mit dem Kollagen-Assay (5.3.1.6) bestimmt. Dazu werden auch leere Kavitäten (Blindwert) sowie kollagenbeschichtete, jedoch nicht enzym- bzw. kulturüberstand-inkubierte Kavitäten (100 % Kollagen) herangezogen.

Jede Kavität wird unter Schütteln für 60 min mit 200 µl Färbereagenz inkubiert. Nach Aspiration der Lösung wird der gebundene Farbstoff mit 100 µl 0,1 M NaOH für 30 min extrahiert und bei einer Messwellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm quantifiziert.

5.3.2 Untersuchung biophysikalischer Parameter

5.3.2.1 Sauerstoffdurchlässigkeit von Materialien

Gemäß DIN 53380-3 (Bestimmung der Gasdurchlässigkeit von Folien) (8) wird die Sauerstoffdurchlässigkeit (OPERM, oxygen permeability) mit Hilfe einer Diffusionsmesskammer mit integrierter Sauerstoffelektrode bestimmt. Die Diffusionsmesskammer wird dazu mit PBS gefüllt, auf 37 °C temperiert und solange mit Stickstoff begast, bis sich die Kammer mit Stickstoff gesättigt hat. Das zu vermessende Material wird anschließend über die Diffusionskammer gespannt und die Zunahme der Gelöstsauerstoffkonzentration mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet. Vor Beginn der Messungen wird eine Kalibrierung unter Begasung mit Stickstoff (0 % Luftsättigung) bzw. mit Luft (100 % Luftsättigung) vorgenommen.

5.3.2.2 Wasserdampfpermeabilität von Materialien

In Anlehnung an die DIN 53122-1 (Bestimmung der Wasserdampfpermeabilität von Folien) (9) wird die Wasserdampfpermeabilität (moisture yapour permeability – MVP) von Trägermaterialien mit der gravimetrischen Methode ermittelt. Dazu wird eine Petrischale mit Kieselgel (Blaugel, Korngröße 1 - 3 mm) gefüllt und vollständig mit der Probe abgedeckt. Die Probenränder werden mit Histologiewachs an die Petrischale fixiert, anschließend wird das Gewicht der Schale bestimmt. Die Schale wird in den Brutschrank überführt und bei 5 % CO₂, 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit > 90 % inkubiert. Über einen Zeitraum von insgesamt 6 Stunden wird das jeweils vorliegende Gewicht der Schale durch Wägung bestimmt und die korrespondierende Inkubationszeit notiert.

5.3.2.3 Proteinpermeabilität

Bestimmung mit Hilfe einer Diffusionskammer

Zur Bestimmung der Proteinpermeabilität wird humane azelluläre Dermis nach Exzision des Filters auf einen Filtereinsatz (Kultureinsatz für 6-Wellplatten) aufgezogen und andrückt. Durch Lufttrocknung wird ein fester Materialkontakt hergestellt; die Probenränder werden zusätzlich durch Klebeband fixiert. Der modifizierte Filtereinsatz wird in ein 6-Well überführt. Nach Rehydratisierung mit PBS wird die Anordnung auf Leckagen (Durchdringen von Flüssigkeit außerhalb der Kontaktfläche) überprüft.

Potentielle Proteinbindungsstellen werden durch 30minütige Inkubation des Wells mit 5 ml einer 10%igen NKS-Lösung (in PBS) bei Raumtemperatur abgeblockt, dann wird die Kavität

dreifach mit je 5 ml PBS gewaschen. Zur Untersuchung der Proteinpermeation bei Raumtemperatur wird die Kavität mit 3 ml, der Filtereinsatz mit 1,5 ml PBS gefüllt. Zum Versuchsstart werden 0,5 ml BSA-Lösung (Bovines Serumalbumin, 40 mg/ml in PBS) auf den Filtereinsatz gegeben. Nach 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten wird vorsichtig eine Probe von 100 µl aus der Kavität (Raum unter dem Filtereinsatz) gezogen. Der Proteingehalt wird nach 5.3.1.4 bestimmt.

Bestimmung nach Anlegen eines hydrostatischen Druckes

Die azelluläre Dermis wird in einen perfundierbaren Filterhalter eingespannt. Wie zuvor beschrieben erfolgt der Lecktest sowie das Abblocken potentieller Proteinbindungsstellen. Eine Wassersäule von 30 bzw. 60 cm wird genutzt, um die Permeabilität der Dermis für BSA zu untersuchen. Dazu wird in einem Abstand von 30 bzw. 60 Sekunden die gerade durch die Dermis getretene Flüssigkeit aufgefangen und anschließend auf ihren Proteingehalt untersucht.

5.3.2.4 Gelöstsauerstoffkonzentration

Die Gelöstsauerstoffkonzentration in aspiriertem Zellkulturmedium wird mit einer Sauerstoffmikrosonde (Revoxode, oxygen catheter-micro-probe) unverzüglich nach Probenahme gemessen. Entsprechend den Instruktionen des Herstellers werden zur Kalibrierung am Display der Gerätegrundeinheit die sondenspezifischen Kenndaten eingegeben.

5.3.2.5 pH-Wert

Der pH-Wert in aspiriertem Medium wird mit Hilfe eines pH-Meters bestimmt. Dieses wird vor jeder Messung mit den Puffern pH 4,0; 7,0 und 10,0 kalibriert.

5.3.3 Untersuchung der Materialstabilität

5.3.3.1 *In vitro* Degradation

Zur Feststellung von pH-Änderungen durch ausgelaugte Substanzen werden jeweils 0,5 cm² messende Materialproben in ein 24-Well überführt, mit 1 ml Fibroblastenmedium überschichtet und im Brutschrank inkubiert. Parallel dazu werden Kavitäten ohne Trägermaterialzusatz geführt. Im Verlauf von 3 Wochen wird im Abstand von 3 Tagen das Medium aus 4 Wells eines Ansatzes aspiriert, gepoolt und der pH-Wert mit einem pH-Meter

unverzüglich bestimmt. Der pH-Wert in Trägermaterial-exponierten Kavitäten wird mit dem in Fibroblastenmedium gemessenen Wert verglichen.

5.3.3.2 Größenerhalt

Der Größenerhalt von Präparaten wird anhand des Erhalts der Präparatedicken sowie –kantenlängen beurteilt. Die Kantenlängen werden zur Kalkulation der Präparatefläche herangezogen. Das Ausgangsmaterial wird mit einer sterilisierten Weißblechschablone auf identische Maße geschnitten. Im Kulturverlauf werden die Kantenlängen mit einem Messschieber vermessen. Die Dicke wird mittels einer Mikrometermessschraube an mindestens 5 verschiedenen Stellen der Probe ermittelt. Sterile Ausgangspräparate werden in Beuteln (Steriking Cover Bag) vermessen; die Dicke leerer Beutel wird von diesem Messwert subtrahiert.

Die Abnahme der Höhe von Kollagengelen in 24-Wellen wird mit einem Messschieber erfasst.

5.3.3.3 Kollagenaseresistenz

Die zu untersuchenden Proben werden in Anlehnung an die Methode von Lee (Lee, J.E. 2001) in 10 mg (Feuchtgewicht) Stücke geschnitten und bei 37 °C in 1 ml “Kollagenaselösung zur Bestimmung der Kollagenaseresistenz” (vgl. 4.3.11) inkubiert. Nach 4 Stunden wird unverzüglich das in den Überstand freigesetzte Protein mit dem BCA-Test (siehe 5.3.1.4) quantifiziert.

5.3.4 Gewebscharakterisierung

5.3.4.1 Bestimmung synthetisierten Kollagens

Zur Quantifizierung von neu gebildetem Kollagen wird das Gewebe einem Pepsinverdau unterworfen. Neu synthetisiertes nicht-quervernetztes Kollagen wird dabei durch das Enzym freigesetzt, quervernetztes Kollagen verbleibt im Gewebe.

Das Gewebe wird in 2 mm x 2 mm Stücke zerkleinert, zu 10 mg (FG) in Gefäße eingewogen und für 24 h bei 4 °C unter Schütteln in 5 ml Pepsinlösung (0,1 mg/ml in 0,5 M Essigsäure) inkubiert. Nach Zentrifugation bei 9000 U/min für 10 min wird im Überstand das Kollagen nach 5.3.1.6 bestimmt (7).

5.3.4.2 Histologische Untersuchung

Die für histologische Untersuchungen vorgesehenen Präparate werden in 4%igem gepufferten Formalin für mindestens 12 h im Kühlschrank fixiert, die weiteren Arbeitsschritte werden durch Mitarbeiter des Institutes für Pathologie des Klinikums Berlin-Buch vorgenommen.

Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (von 70 bis 100 %) und Austausch des Alkohols durch Aufhellung in Methylbenzoat und Benzol werden die Präparate in geschmolzenem Paraffin bei 58 - 60 °C eingebettet und anschließend mit dem Mikrotom geschnitten (Junqueira 1996).

5.3.4.3 Allgemeine histologische Färbemethoden

Zur Evaluierung der strukturellen Beschaffenheit der Dermispräparate sowie der Anwesenheit von Zellen werden allgemeine histologische Färbemethoden angewendet.

HE-Färbung

Die HE-Färbung unter Verwendung von *Mayers* saurem Hämalaun (Kernfärbung) sowie von Eosin (Darstellung von Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern) wird als allgemeine Übersichtsfärbung eingesetzt (Burck 1988; Junqueira 1996).

PAS-Färbung

Die PAS-Färbung mit Einsatz der Periodsäure-Schiff-Reaktion nach *Hotchkiss* dient zum Nachweis von neutralen Polysacchariden und sauren Glykosaminoglykanen. Diese färben sich rosa bis violett kann können anhand dessen identifiziert werden (Burck 1988).

Polychrome Färbung nach Domack

Die polychrome Färbung mit Kernechtrot, Anilinblau und Orange nach *Domack* stellt bindegewebige Anteile von Präparaten dar. Für die Färbung wird nach der Technik nach *Mallory* (Anilinblau-Orange-Oxalsäure-Gemisch) gearbeitet. Durch Domack-Färbung werden Zellkerne rot, kollagenes und retikuläres Bindegewebe dunkelblau, saure Mukosubstanzen blau und Chromatin rot bis gelbbraunlich angefärbt (Burck 1988).

5.3.4.4 Immunhistochemische Methoden

Immunhistochemische Methoden werden herangezogen, um die Verteilung spezieller Moleküle der Interzellulärsubstanz in den Dermispräparaten darzustellen. Zu diesem Zweck werden die Kollagentypen I, III und IV sowie die Glykoproteine Laminin und Fibronectin

nachgewiesen. Zellassoziierte Moleküle werden genutzt, um die Anwesenheit eines speziellen Zelltyps zu überprüfen. Dabei wird Pancytokeratin angewendet, um Keratinozyten darzustellen, Vimentin um Fibroblasten nachzuweisen und CD 34, um Endothelzellen zu detektieren. Das speziell darzustellende Molekül (Antigen) wird durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion gebunden und mit einer Enzym-Substratreaktion sichtbar gemacht. Das dabei gebildete Präzipitat macht die Lokalisation des Antigens erkennbar.

Für die immunhistochemische Untersuchung kommt die Avidin-Biotin-Enzym-Complex-Methode (ABC-Methode) zum Einsatz (vgl. Abb. 14). Diese nutzt die starke Affinität des Avidins (Hühnereiweiß-Glykoprotein) zu Biotin zur Bildung von enzymmarkierten (Strept-)Avidin-Biotin-Komplexen. Diese Komplexe werden über einen biotinylierten Sekundärantikörper gebunden. Als Enzym dient Peroxidase, die eine lösliche Vorstufe (Diaminobenzidin) oxidativ zu einem unlöslichen Farbstoff umwandelt, der mikroskopisch sichtbar ist (Junqueira 1996).

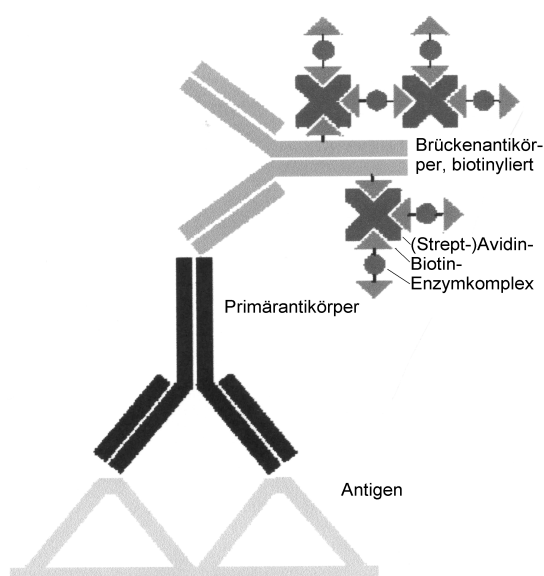


Abb. 14: Prinzip der ABC-Methode (10)

5.3.4.5 Rasterelektronenmikroskopie und Semidünnschnitte

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen dienen der Feinanalyse der Beschaffenheit der Präparateoberfläche. Die Untersuchungen werden freundlicherweise durch das Institut für Anatomie, AG Elektronenmikroskopie der Charité/ Campus Virchow durchgeführt. Die Präparate werden nach Befestigung auf Korkplatten in 2,5 %igem Glutaraldehyd (in Phosphatpuffer 0,06 M, pH 7,3) fixiert und vor Probenbearbeitung dreimal in Phosphatpuffer gewaschen.

Rasterelektronenmikroskopie

Nach Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, Infiltration mit HMDS für 2 mal 10 min, Trocknung und Goldbeschichtung (BAL-TEC MED 020) erfolgt die Untersuchung mit einem Rasterelektronenmikroskop, Typ DSM 982 Gemini (Fa. Zeiss) (Junqueira 1996).

Semidünnschnitte

Die Proben werden einer zweistündigen Nachfixierung in zweiprozentigem Osmiumtetroxid unterworfen, mit PBS gewaschen und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dann erfolgt die Einbettung in Kunststoff (Araldit), das Schneiden mit dem Ultramikrotom sowie die Anfärbung mit Toluidinblau.

5.4 Zellisolierung

5.4.1 Gewinnung von Keratinozyten

Zur Abreicherung von potentiell anhaftenden Keimen wird die Haut dreimal für jeweils 5 Minuten in Transportmedium und anschließend zweimal in Waschpuffer gespült. Nach Entfernung von anhängendem Fettgewebe und Dermisanteilen mittels einer Schere wird die Hautprobeprobe in "Trypsin-Lösung zur Epidermiszellgewinnung" (4.3.8) überführt und darin für 16 Stunden im Kühlschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird unter Zuhilfenahme von Pinzetten die Epidermis von der Dermis separiert. Die Epidermis wird mechanisch möglichst fein zerkleinert und in Keratinozyteneinsaatmedium aufgenommen. Das Röhrchen wird zur weiteren mechanischen Desintegration der Zellen 100mal vorsichtig in der Hand geschwenkt. Anschließend wird die Suspension durch ein Zellsieb filtriert und das Filtrat bei 1000 U/min für 7 Minuten zentrifugiert; das Pellet wird in Keratinozyteneinsaatmedium aufgenommen. Nach Bestimmung von Zellzahl und Vitalität (vgl. 5.3.1.1) werden von der Suspension Zellkulturen angelegt.

Zur Qualitätskontrolle werden sowohl vom Transportmedium, in das die Hautprobe nach Entnahme überführt wurde, als auch vom letzten Waschmedium sowie von der gewonnenen Zellsuspension Sterilkontrollen nach Ph.Eu. (18) durchgeführt.

5.4.2 Gewinnung von dermalen Fibroblasten

5.4.2.1 Gewinnung von humanen Fibroblasten

Nachdem die Hautprobe fünfmal für jeweils 5 Minuten in Transportmedium gewaschen wurde, wird anhaftendes Fettgewebe vollständig abpräpariert. Die Dermis wird mit einer Schere in ca. 1 mm³ große Stücke geschnitten und in die Kollagenaselösung (4.3.7) eingebracht.

Zur Isolierung der Fibroblasten wird der Ansatz für 16 Stunden bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Die Zellsuspension wird nun durch ein Zellsieb gegeben und das Filtrat bei 1000 U/min für 4 Minuten zentrifugiert. Nach Ermittlung von Zellzahl und Vitalität erfolgt die Zelleinsaat in Kulturgefäße. Wie auch bei 5.4.1 werden Sterilkontrollen durchgeführt.

5.4.2.2 Gewinnung von Fibroblasten der Ratte

Zur Vermeidung einer Pilzinfektion wird nachfolgend allen Lösungen Amphotericin in einer Endkonzentration von 5,6 µg/ml zugesetzt. Nachdem die Gewebeprobe wie unter 5.2.4.1 beschrieben gewaschen wurde, werden das Muskel- und das Fettgewebe entfernt. Zur Gewinnung von Fibroblasten werden Explantatkulturen angelegt. Dazu wird die Haut in ca. 0,5 cm² große Stücke geschnitten und mit der dermalen Seite nach untenweisend in Kulturflaschen transferriert.

5.4.3 Gewinnung von Lymphozyten aus venösem Blut

Venöses Blut wird nach Punktion der Armbeugenvenen in heparinisierte Spritzen aufgefangen; die Isolierung der Lymphozyten erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wird das Blut 1:2 mit PBS verdünnt und auf das halbe Volumen Ficoll geschichtet. Das Röhrchen wird für 20 Minuten bei 10 °C mit 2400 U/min zentrifugiert. Die lymphozytenhaltige Interphase wird vorsichtig aspiriert, zum Waschen in RPMI aufgenommen und für 10 Minuten bei 1200 U/min und 10 °C zentrifugiert. Der Waschschrift wird bei 1000 U/min wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wird das Pellet in Lymphozytenmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

5.5 Zellexpansion in zweidimensionaler Kultur

5.5.1 Allgemeine Kulturbedingungen für die Zellkultur

Soweit nicht anders angezeigt, werden alle Zellkulturen im Brutschrank bei 37 °C und 90 % Luftfeuchtigkeit unter Begasung mit Luft und 5 % CO₂ geführt (Normoxische Kultur).

5.5.2 Expansion von Keratinozyten

Die gewonnenen Keratinozyten werden in Keratinozyteneinsaatmedium mit einer Zelldichte von 2,5 E4 Zellen/cm² auf Feederlayer ausgesät. Die Feederlayer dienen der Unterstützung von Keratinozytenadhäsion und –proliferation und werden aus mitosegehemmten 3T3 Mausfibroblasten gebildet, welche aus einer Workingzellbank von mit 60 Gy bestrahlten Zellen entstammen.

Vierundzwanzig Stunden vor Keratinozyteneinsaat werden die Feederzellen mit einer Zellzahl von 1,3 E4 Zellen/cm² in die Kulturflaschen gegeben und mit Keratinozyteneinsaatmedium versorgt. Der erste Medienwechsel der Keratinozytenkultur erfolgt nach mikroskopisch sichtbarer Zelladhäsion (ca. 3 Tage nach Einsaat) unter vollständigem Austausch des Mediums gegen Keratinozytenwachstumsmedium; weitere Medienwechsel werden im Abstand von 3 Tagen vorgenommen.

Sind die Kulturgefäße nahezu konfluent bewachsen, werden die Keratinozyten aus den Flaschen trypsiniert. Dazu wird nach Spülen mit PBS die Zellschicht für 5 Minuten mit “Trypsin-EDTA Lösung zum Passagieren von Zellen” im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wird in Keratinozytenwachstumsmedium aufgenommen und analog zu 5.4.1 zentrifugiert. Die gewonnenen Zellen werden mit einer Einsaatzelldichte von 1,3 E4 Zellen/cm² für Subkulturen eingesetzt.

5.5.3 Expansion von Fibroblasten

5.5.3.1 Expansion von humanen Fibroblasten

Die Fibroblasten werden mit einer Zelldichte von 1,33 E4 Zellen/cm² in Kulturflaschen ausgesät. Der erste Medienwechsel erfolgt nach Zelladhärenz unter Austausch des gesamten Fibroblastenmediums und nachfolgend alle 3 Tage. Ist nahezu ein konfluenten Bewuchs erreicht, werden die Zellen wie unter 5.5.2 aufgezeigt trypsiniert und in Fibroblastenmedium aufgenommen. Subkulturen werden mit einer Splitratio von 1: 5 oder 1:10 angelegt.

5.5.3.2 Expansion von Fibroblasten der Ratte

Nachdem die Hautexplantate für ca. 30 Minuten in den Kulturflaschen angetrocknet sind, werden sie vorsichtig mit Fibroblastenmedium überschichtet. Der erste Medienwechsel erfolgt nach einer Woche unter vollständiger Ergänzung des Mediums durch frisches Fibroblastenmedium, nachfolgend alle 3 Tage. Sofern sich die Explantate im Kulturverlauf nicht selbständig vom Flaschenboden ablösen, werden sich nach signifikantem Auswachsen von Fibroblasten vorsichtig mit einer Pinzette aus der Kultur entfernt. Die Trypsinierung und Subkultivierung der Zellen erfolgt analog zu den humanen Fibroblasten.

5.5.4 Wachstumskinetik

Das Wachstumspotential der Zellen wird mit Hilfe von Wachstumskinetiken quantifiziert. Dazu werden die Zellen in 6-Wellplatten mit einer Einsaat Zelldichte von 4,2 E3 Fibroblasten/cm² ausgesät. Nach 1, 2, 3, und 4 Tagen werden jeweils 6 Kavitäten trypsinisiert und die Zellzahl durch Zählung bestimmt.

5.6 Biokompatibilität

5.6.1 Lymphozytenproliferationsassay

Zum Einsatz im Lymphozytenproliferationsassay werden Homogenisate der azellulären Dermis hergestellt. Dazu wird ein jeweils 50 mg (FG) schweres Gewebstück fein zerkleinert und in 5 ml HBSS bis zur vollständigen Homogenisierung im Handhomogenisator bearbeitet. Das Homogenisat wird über ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) filtriert.

Der Assay wird in 96-Wellplatten jeweils im 6fachen Ansatz pro Datenpunkt durchgeführt. Dabei wird die proliferationsstimulierende Wirkung von 5 verschiedenen Epiflex-Homogenisaten in jeweils 2 Konzentration (Konzentration 1: Endkonzentration in der Kavität 0,3 mg/ml; Konzentration 2: 0,03 mg/ml) auf die Lymphozyten von 5 verschiedenen Spendern untersucht und mit der Basisstimulation (1 E5 Lymphozyten pro Kavität ohne weitere Zusätze) sowie der durch Phythämagglutinin (Endkonzentration 10 µg/ml) hervorgerufenen Stimulation verglichen. Für jede Zellsuspension wird das jeweils korrespondierende Lymphozytenmedium mit 10% autologem Serum verwendet.

Ansätze:

- a) Medienblank: 180 µl Lymphozytenmedium, 20 µl HBSS
- b) Blindwert 1 der ADM: 180 µl Lymphozytenmedium, 20 µl Homogenisat, Konz. 1

- c) Blindwert 2 der ADM: 180 µl Lymphozytenmedium, 20 µl Homogenisat, Konz. 2
- d) Lymphozytenbasisstimulation: 180 µl Lymphozytensuspension, 20 µl HBSS
- e) PHA-Stimulation: 180 µl Lymphozytensuspension, 20 µl PHA
- f) ADM-Stimulation 1: 180 µl Lymphozytensuspension, 20 µl Homogenisat, Konz. 1
- g) ADM-Stimulation 2: 180 µl Lymphozytensuspension, 20 µl Homogenisat, Konz. 2

Nach 72stündiger Inkubation der Ansätze wird die DNS-Synthese anhand des BrDU-Einbaus bestimmt.

5.6.2 Untersuchung der cytotoxischen Wirkung von Materialien auf Zellen *in vitro*

Die cytotoxische Wirkung von Materialien wird mit Hilfe des MTT-Tests evaluiert. Fibroblasten werden dazu mit einer Einsaat Zelldichte von 3,5 E3 Zellen/cm² in 24-Wells ausgesät. Nach 24 Stunden wird pro Kavität ein 0,2 cm² großes Materialstück in das Medium gegeben. Parallel dazu werden nichtmaterialexponierte Wells geführt. Die Platten werden 4 Tage kultiviert; nach Entfernung der Materialproben wird der MTT-Test durchgeführt.

5.7 Anzüchtung trägerbasierter Kulturen

5.7.1 Vorbereitung des Materials

Die glyzerinkonservierte sterilisierte azelluläre Dermis wird in PBS überführt und darin zur Rehydratisierung für 60 Minuten unter zweimaligem Wechsel des Puffers inkubiert. Nach Zurechtschneiden auf die erforderliche Größe werden die Präparate flach auf den Boden von Kulturgefäßen ausgebreitet. Je nach Versuchsansatz wird die Dermis mit retikulärer bzw. papillärer Seite nach obenweisend platziert. Durch 8stündige Antrocknung der Präparate im Laminarstrom der Werkbank wird ihre Adhäsion an die Gefäße vermittelt. Vor Zelleinsaat wird die Dermis für 2 Stunden in Medium rehydratisiert.

5.7.2 Besiedelung mit humanen Keratinozyten zur Evaluierung des Erhalts der Oberflächenstruktur

Keratinozyten werden ohne Feederlayer mit einer Einsaat Zelldichte von 5000 Zellen/cm² auf die papilläre Seite der azellulären Dermis bzw. auf Zellkulturplastik gesät. Alle drei Tage erfolgt der Medienwechsel mit serumfreiem Keratinozytenmedium. Am Tag 3 sowie 5 wird der MTT-Test durchgeführt, um die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität zu bestimmen.

5.7.3 Zelladhäsionskinetik zur Untersuchung der geeigneten Einsaatfläche

Jeweils 1 cm² große Stücke azelluläre Dermis werden mit der papillären bzw. retikulären Seite nach obenweisend in 24-Wellings eingezogen. Nachfolgend werden Fibroblasten mit einer Einsaatzellichte von 1,57 E4 Zellen/cm² eingesät und die Platten in den Brutschrank überführt. Ebenso werden Vergleichskavitäten ohne azellulärer Dermis angelegt. Nach 30, 60, 90, 120, 150 sowie 180 Minuten werden jeweils 3 Kavitäten eines Ansatzes abgebrochen und vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wird in die Vergleichskavitäten 1 ml Triton X100, 1%ig (Lysepuffer für LDH-Bestimmung, siehe 5.3.1.2) gegeben; besiedelte Dermisstücke werden in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml Lysepuffer überführt. Die Inkubation zur Freisetzung der intrazellulären LDH sowie ihr Nachweis erfolgen wie unter 5.3.1.2 beschrieben.

5.7.4 Testung verschiedener Verfahren zur Zelleinsaat

An je 0,64 cm² großen Dermisstücken werden mit einer Einsaatzellichte von 1,57 E4 Zellen/cm² folgende Verfahren zur Zelleinsaat getestet:

- a) *Injektion*: 0,5 ml Zellsuspension an mehreren Stellen in die retikuläre Seite der Dermis injizieren, nach 24 h Dermisstück in neue Kavität überführen.
- b) *Rühren frei*: Dermisstücke in 20 ml Zellsuspension unter Rühren inkubieren, Rührgeschwindigkeit so wählen, dass sich die Stücke in Suspension befinden, nach 5 h Präparate in 24 Wells überführen.
- c) *Rühren fixiert*: Dermisstücke in Abstand von 1 cm auf eine Kanüle aufreihen, Kanülenspitze mit Stopper sichern und Kanülenende im Kopfraum eines Becherglases so fixieren, dass die Dermisstücke in die Zellsuspension eintauchen, weitere Schritte wie c)
- d) *Zentrifugation*: jeweils zwei Dermisstücke mit retikulärer Seite nach obenweisend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen geben, mit 5 ml Zellsuspension überschichten und für 10 min bei d1) 1000 U/min, d2) 2000 U/min bzw. d3) 3000 U/min zentrifugieren. Röhrchen vorsichtig in den Brutschrank überführen, nach 50 min Dermis in 24-Wellings transferieren.
- e) *Einsaugen*: Dermisstücke mit retikulärer Seite nach obenweisend auf den Filter einer Saugflasche platzieren. 50 ml Zellsuspension auftragen und Vakuumpumpe aktivieren. Nach einem Zeitraum von 30 min, in dem die Dermis mehrmals mit Medium befeuchtet wurde, Stücke in 24-Wellings überführen.
- f) *Statisch*: Dermis mit retikulärer Seite nach oben zeigend in 24-Wellings überführen und besiedeln.
- g) *Schüttler*: Dermis in Becherglas mit der Zellsuspension überführen und für g1) 5 h, g2) 6 h, g3) 8 h auf dem Wippschüttler inkubieren, dann Stücke in 24-Wellings überführen.

Die Inkubationsschritte erfolgen im Brutschrank; die weitere Kulturführung wie unter 5.8.2 erläutert.

5.7.5 Vergleichskulturen in Kollagengelen

Die Kollagenlösung (Kollagen I aus Rattenschwanz) wird mit 0,1 %iger Essigsäure auf eine Konzentration von 3 mg/ml eingestellt und anschließend in Verhältnis 80:10 (v/v) mit 10x Hanks-Puffer unter Rühren in Eisbad vermischt. Der pH-Wert wird mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Die Fibroblasten werden in FKS aufgenommen und im Verhältnis 10:90 (v/v) unter Rühren zur Kollagenlösung gegeben. Je 0,5 ml Lösung werden luftblasenfrei in ein 24-Well überführt und zum Gelieren für 1 bis 2 h in den Brutschrank überführt. Pro Kavität werden 3,14 E4 Zellen eingesät (entspricht einer Zelldichte von 1,57 E4 Zellen/cm² bezogen auf die Grundfläche der Kavität). Nach Verfestigung wird jedes Gel mit 1 ml Fibroblastenmedium überschichtet. Die Kulturführung erfolgt wie unter 5.8.2 beschrieben.

5.8 Besiedelung des Trägers in statischer Kultur

5.8.1 Zelleinsaat

Die Fibroblasteneinsaat erfolgt mit einer Zelldichte von 1,57 E4 Zellen/cm² auf die retikuläre Seite von 1 cm² großen Dermisstücken. Nach 48 Stunden wird jeweils ein besiedeltes Präparat in ein 24-Well überführt und mit 1 ml Fibroblastenmedium versorgt.

5.8.2 Kulturführung

Der Medienwechsel wird alle drei Tage mit Fibroblastenmedium vorgenommen.

5.9 Besiedelung des Trägers in Perfusionskultur

5.9.1 Ermittlung des geeigneten Volumenstroms für die Perfusion

Wie unter 5.8.1 besiedelte Präparate werden nach 48 h in die Perfusionskammern überführt und für jeweils 24 Stunden mit einem Volumenstrom von 30,45 ml/h, 48 ml/h bzw. 73,5 ml/h unter Rezirkulation des Fibroblastenmediums perfundiert. Parallel dazu werden statische Kulturen in 24-Well geföhrt. Die genauen Volumenströme werden mittels einer Pumpenkalibrierung ermittelt. Nach jeweils 24 Stunden werden die Präparate aus den

Kammern bzw. Wells entfernt. Durch Bestimmung der intra- und extrazellulären LDH-Aktivität (vgl. 5.3.1.2) wird die Zellzahl und Vitalität ermittelt.

5.9.2 Zelleinsaat

Die Zellen werden analog zu 5.8.1 auf 1 cm² große Dermisstücke gesät; nach 48 Stunden werden die Präparate in die Perfusionskammern überführt.

5.9.3 Kulturführung

Die Präparate werden mit einem Volumenstrom von 48 ml/h mit 70 ml Fibroblastenmedium rezirkulierend perfundiert. Nach 6 bzw. 10 Tagen werden jeweils 4 Perfusionskammern abgebrochen und die Präparate analysiert. Am 6. Tag wird in der Vorlageflasche der weiter geführten Kammern das gesamte Medium (55 ml) gegen frisches Medium ausgetauscht.

5.10 *In vitro* Hypoxiemodell

Zur Untersuchung des Einflusses sauerstoffarmer (hypoxischer) Kulturbedingungen auf das Wachstum, die Vitalität und Syntheseleistung der Zellen wird ein Hypoxiemodell angewendet. Vergleichend dazu werden Kulturen unter herkömmlicher Sauerstoffversorgung (Normoxie) betrachtet.

5.10.1 Besiedelung unter Hypoxie

Fibroblasten werden wie unter 5.8.1 beschrieben auf Dermisstücke eingesät und für 48 h unter normoxischen Bedingungen (Begasung mit Luft und 5 % CO₂; Temperatur 37 °C; >90 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Im Anschluss daran wird die Hälfte der Proben unter hypoxischen Bedingungen (Begasung mit Stickstoff und 5 % CO₂; Temperatur 37 °C; >90 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert, die übrigen Transplantate werden unter Normoxie weitergeführt.

5.10.2 Einfluss der Hypoxie auf besiedelte Präparate

Für zehn Tage in statischer Kultur unter normoxischen Kulturbedingungen mit Fibroblasten besiedelte azelluläre Dermis wird in einen Kleinstbrutschrank mit hypoxischen Kulturbedingungen überführt und dort über einen Zeitraum von 8 Tagen kultiviert. Die weitere Kulturführung erfolgt wie unter 5.8.2 beschrieben.

5.11 Transplantation ins Rattenmodell

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Berlin. Die Präparate werden nach Versuchsbewilligung durch die Ethikkommission in 10 bis 12 Wochen alte (adulte) männliche Lewisratten transplantiert. Die Narkoseeinleitung erfolgt mit einem CO₂/Carbogen-Gemisch; anschließend wird den Tieren 300 µl eines Betäubungsmittelgemisches aus Ketavet™ und Rompun™ (Mischung 5:1 (v/v)) intramuskulär verabreicht. Nach Rasur der Transplantationsareale am Rücken wird jeweils lateral an der rechten und linken Flanke ein Hautschnitt von 3 cm geschaffen. Mit einem Tupfer wird die Dermis von der Muskelfaszie getrennt und eine Tasche geschaffen, in die das 4 cm² große Dermistransplantat mit der retikulären Seite zur Rattendermis zeigend ausgebreitet wird. Pro Ratte werden jeweils an der linken bzw. rechten Flanke ein unbesiedeltes und ein für 10 Tage mit dermalen Fibroblasten der Lewisratte (autologe Zellen) besiedeltes Präparat transplantiert. Die Wunden werden mit Klammern verschlossen, mit Mull abgedeckt und mit einem elastischen Verband verbunden. Die Ratten werden nach der Transplantation einzeln gehalten.

Nach 6 Wochen werden die Tiere mit CO₂/Carbogen euthanasiert und das Transplantationsareal eröffnet. Größenerhalt sowie makroskopisches Erscheinungsbild der Präparate werden evaluiert sowie Gewebsexzisionen zur histologischen Untersuchung verbracht.

5.12 Statistik

Soweit nicht anders angezeigt, werden die Untersuchungen im Dreifachansatz pro Messpunkt durchgeführt; Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Zur Evaluierung, ob Messreihen signifikant voneinander abweichen oder derselben Grundgesamtheit angehören (Signifikanz), wird ein Signifikanztest herangezogen. Dazu wird der t-Test (Student's-t-Test) bei Messreihen, die einer Gaußschen Normalverteilung folgen, zur Bestimmung der Signifikanz zwischen zwei gepaarten Stichproben genutzt (Weiß 2000). Er wird im Rahmen der Arbeit angewandt, wenn es sich darum handelt, die von einem Spender gewonnenen Zellen hinsichtlich ihres Verhaltens unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen zu vergleichen. Wird bei diesen Untersuchungen zusätzlich azelluläre Dermis als Trägermaterial eingesetzt, entstammt diese jeweils von einem Spender. Darüber hinaus findet der t-Test Verwendung wenn es gilt, die Eigenschaften azellulärer Dermis unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen zu vergleichen. Die dazu herangezogenen Gewebe rühren dabei von einem identischen Spenderpool her.

6. Ergebnisse

6.1 Herstellung einer humanen sterilisierten azellulären Dermis als Trägermaterial für dreidimensionale Fibroblastenkulturen

6.1.1 Entwicklung des Präparationsverfahrens

Für die Herstellung eines zellbesiedelten Weichgewebssersatzes soll die Eignung eines biologischen Trägermaterials in Form einer humanen azellulären Dermis getestet werden. Dieses Präparat ist in der Bundesrepublik durch das Arzneimittelgesetz (AMG) reguliert, welches die biologische Sicherheit des Grafts als Grundvoraussetzung für den klinischen Einsatz zwingend vorschreibt. Wie bereits unter 2.1.2.1 ausgeführt, kann nur die Anwendung eines validierten Virusinaktivierungs- oder -abreicherungsverfahrens die biologische Sicherheit von allogenen Gewebspräparaten gewährleisten. Da bislang kein AMG-konformes Transplantat verfügbar ist, muss zunächst eine biologisch sichere humane azelluläre Dermis entwickelt werden. Dabei kann das hergestellte Präparat erst als azellulär angesehen werden, wenn der Nachweis der Zellfreiheit erbracht ist (6.1.1.2). Da darüber hinaus der Erhalt typischer Gewebsstrukturen (6.1.1.5) sowie wichtiger biophysikalischer Parameter (6.1.1.6) für die Interaktion des Transplantates mit Zellen und Geweben bedeutsam ist, müssen auch diese Anforderungen erfüllt sein.

6.1.1.1 Verfahren zur Zellentfernung

Zur Herstellung einer azellulären Dermis muss ein Verfahren zur Zellentfernung genutzt werden, welches alle epidermalen und dermalen Zellen aus dem Ausgangsgewebe Spalthaut entfernt. Ein enzymatisches Verfahren sowie ein Inkubationsverfahren mit einer hyperosmolaren Salzlösung wurden in Kombination mit einer nachfolgenden Detergenzbehandlung hinsichtlich ihrer Eignung zur Zellentfernung getestet (Abb. 15). Sowohl nach Enzyminkubation als auch nach Anwendung der hyperosmolaren Salzlösung ließ sich die Epidermis vollständig von der Dermis trennen.

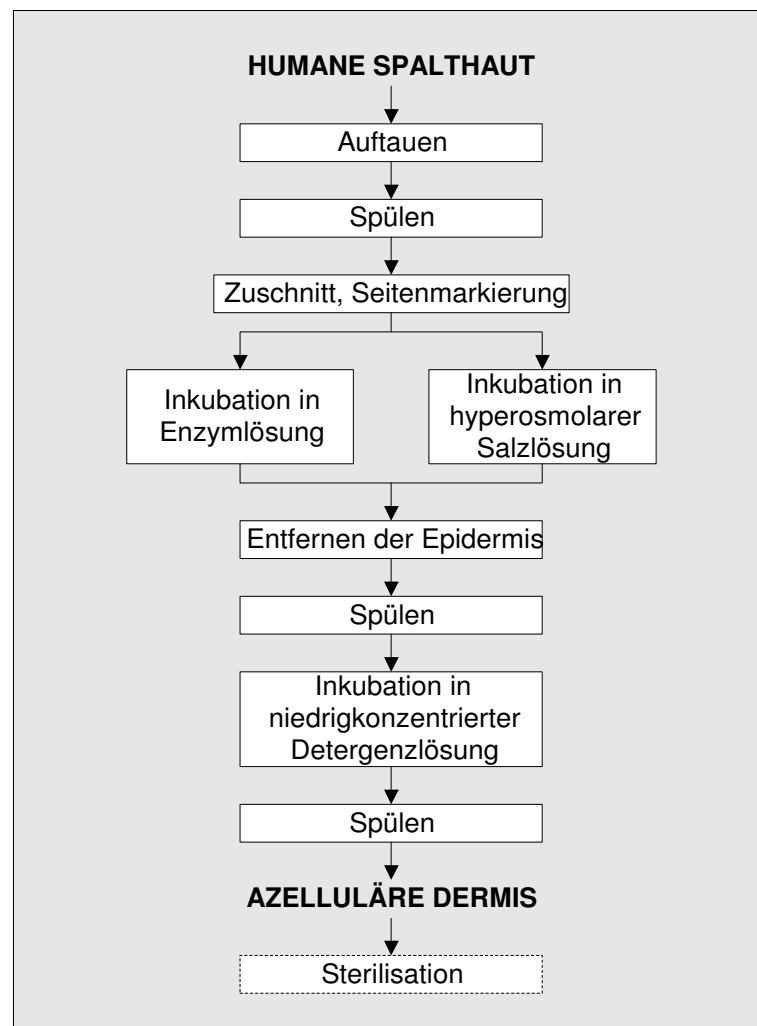


Abb. 15: Fließschema für die Verfahren zur Zellentfernung.

6.1.1.2 Nachweis der Zellfreiheit

Histologische Bilder zeigten nach Applikation des enzymatischen Verfahrens bzw. der hyperosmolaren Salzlösung eine vollständige Entfernung aller epidermalen Zellen sowie eine partielle Abreicherung von Fibroblasten und Endothelzellen in der Dermis.

Mit der anschließend durchgeführten Detergenzinkubation konnten alle Zellen und Zellfragmente aus der Dermis entfernt werden, wodurch ein vollkommen azelluläres Präparat hergestellt wurde (Bsp. Abb. 16, histologische Untersuchungen wurden für 10 Produktionsbatches durchgeführt). Zellossoziierte Marker waren in immunhistochemischen Untersuchungen nicht detektierbar. Sowohl Fibroblasten-assoziiertes Vimentin, von Keratinozyten exprimiertes Pancytokeratin als auch der Endothelmarker CD 34 ließen sich nicht nachweisen.

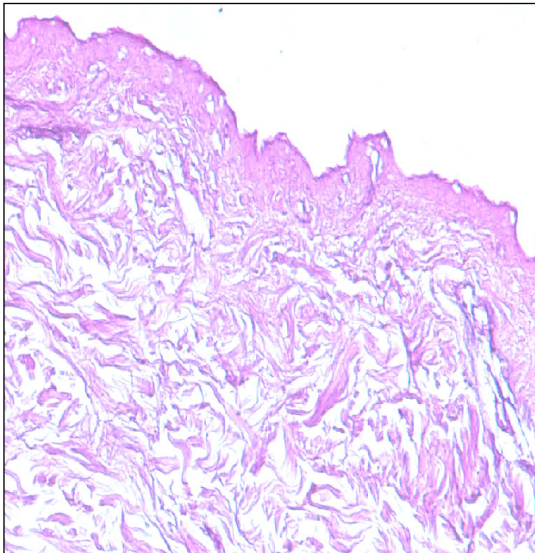


Abb. 16: **HE-Färbung der nach Zellentfernung gewonnenen Dermis:** Die Struktur der papillären und retikulären Dermis sowie der Basalmembran sind erhalten. Das Präparat ist zellfrei, 25fach.

6.1.1.3 Sterilisation

Die azelluläre Dermis wurde mit einem chemischen Sterilisationsverfahren auf der Basis von Peressigsäure sterilisiert, für das im Rahmen von Validierungsstudien der Nachweis der Inaktivierung von Bakterien, Pilzen, Sporen und Viren erbracht wurde (Pruss 1999 a, b). Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch konnten keine Unterschiede in der Gewebsstruktur unsterilisierter bzw. sterilisierter Präparate erkannt werden.

6.1.1.4 Konservierung

Zur Aufrechterhaltung der Eigenschaften der azellulären Dermis bei ihrer Lagerung wurden Konservierungsverfahren angewendet. Die Verfahren der Tieftemperaturkonservierung, Kryokonservierung bzw. Glycerinkonservierung konnten ohne makroskopisch feststellbare Einbußen der Präparatequalität zur Konservierung der Präparate eingesetzt werden.

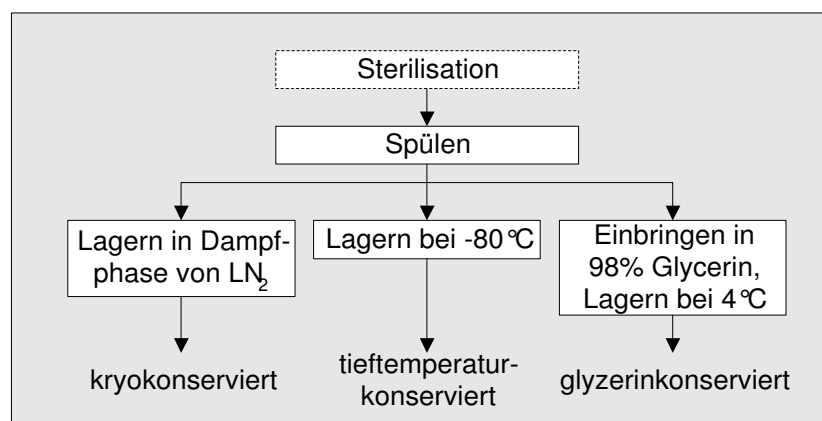


Abb. 17: **Fließschema für die getesteten Konservierungsverfahren.**

6.1.1.5 Nachweis des Erhalts von Gewebsstrukturen

In Übersichtsfärbungen (HE, PAS, Domack) zeigte sich bei allen azellulären Präparaten, dass die Basalmembranstruktur an der dermo-epidermalen Junction, welche für eine spätere Anheftung von Zellen von großer Bedeutung ist, intakt und in ihrer Kontinuität erhalten blieb. Die Kollagenstruktur der Dermis ließ keine signifikanten Veränderungen gegenüber der nativen Anordnung erkennen (vgl. Abb. 16). In der Dermis waren die Strukturen, die vormals durch Blutgefäße ausgefüllt wurden, inklusive der Basallamina erhalten. Im Gegensatz dazu wurden die Endothelzellen aus diesen Strukturen entfernt.

Die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen der hergestellten sterilisierten azellulären Dermis sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Tieftemperaturkonservierte und glyzerinkonservierte Präparate wiesen dabei im Vergleich zu kryokonservierter Dermis die beste Anfärbbarkeit für die untersuchten Marker auf.

Bei allen untersuchten Präparaten, auch bei dem unsterilisierten gefriergetrockneten Vergleichspräparat Alloderm® (vgl. Tab. 19), konnte Fibronektin nicht nachgewiesen werden.

	Laminin	Kollagen I	Kollagen III	Kollagen IV
a) Kryokonservierte Präparate				
<i>Basalmembran</i>	+++	-	-	++
<i>Papilläre Dermis</i>	-	+++	+++	-
<i>Retikuläre Dermis</i>	-	+++	+++	-
<i>Basallamina der Gefäßstrukturen</i>	++	-	-	++
b) Tieftemperaturkonservierte Präparate				
<i>Basalmembran</i>	+++	+	-	+++
<i>Papilläre Dermis</i>	+	+++	+++	-
<i>Retikuläre Dermis</i>	+	+++	+++	-
<i>Basallamina der Gefäßstrukturen</i>	+++	-	-	+++
c) Glyzerinkonservierte Präparate				
<i>Basalmembran</i>	+++	++	+	+++
<i>Papilläre Dermis</i>	-	+++	+++	-
<i>Retikuläre Dermis</i>	-	+++	+++	-
<i>Basallamina der Gefäßstrukturen</i>	+++	++	-	+++

- ungefärbt, + fokale Anfärbung, ++schwache, kontinuierliche Anfärbung, +++ starke, kontinuierliche Anfärbung

Tab. 18: Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen der hergestellten sterilisierten azellulären Dermis.

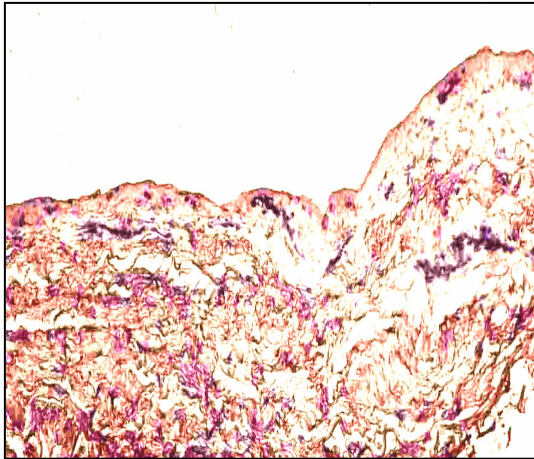


Abb. 18: **Immunhistochemische Darstellung von Kollagen IV bei glyzerinkonservierter ADM, 25fache Vergrößerung.**

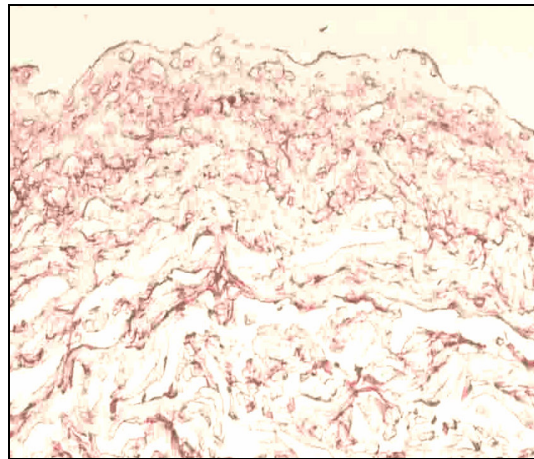


Abb. 19: **Immunhistochemische Darstellung von Laminin bei glyzerinkonservierter ADM, 25fache Vergrößerung.**

In rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (REM, Abb. 20) wurde die zellfreie apikale Seite der Basalmembran azellulärer Dermis mit ihrem papillären Muster dargestellt. Die Basalmembran zeigte bei allen Präparaten eine vollkommen intakte Struktur, unterliegende Kollagenfasern blieben in ihrer ursprünglichen Position. Die typische wellenartige Papillenstruktur kann in den Semidünnschnitten gut erkannt werden (Abb. 21).

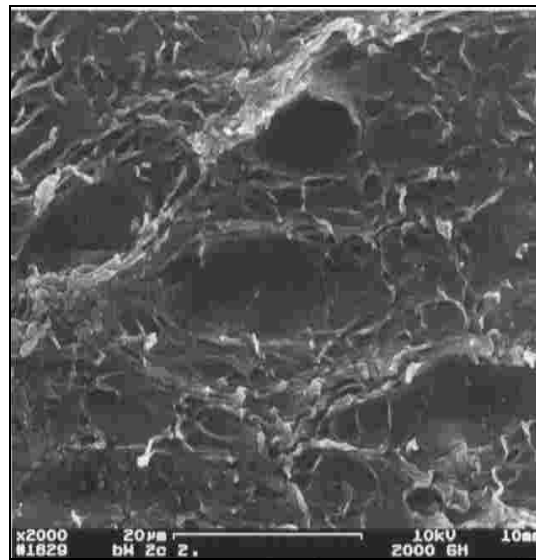
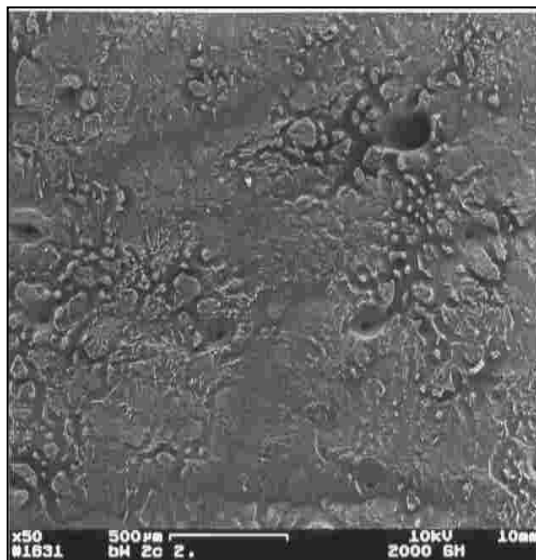


Abb. 20: **REM glyzerinkonservierter azellulärer Dermis: Blick auf die apikale Seite der Basalmembran.**

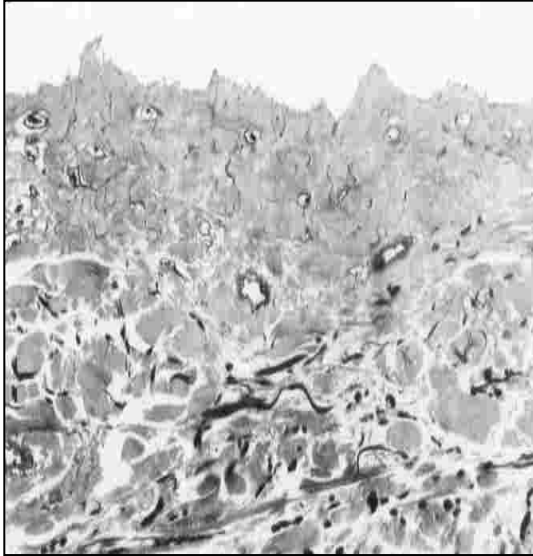


Abb. 21: **Semidünnschnitt** glyzerinkonservierter **ADM**: die Papillenstruktur der Dermis ist erhalten, 25fache Vergrößerung.

Als Vergleichspräparat für die selbst hergestellte, sterilisierte azelluläre Dermis wurde das unsterilisierte gefriergetrocknete Dermispräparat *Alloderm*® verwendet, das freundlicherweise kostenfrei von der Firma Lifecell Inc. zur Verfügung gestellt wurde.

	Laminin	Kollagen I	Kollagen III	Kollagen IV
Alloderm®				
<i>Basalmembran</i>	+++	++	+	+++
<i>Papilläre Dermis</i>	-	+++	+++	-
<i>Retikuläre Dermis</i>	-	+++	+++	-
<i>Basallamina der Gefäßstrukturen</i>	++	-	-	++

- ungefärbt, + fokale Anfärbung, ++schwache, kontinuierliche Anfärbung, +++ starke, kontinuierliche Anfärbung

Tab. 19: **Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen von Alloderm®**, einer azellulären unsterilisierten gefriergetrockneten Dermis.

Die Immunhistochemien des Alloderm® (Tab. 19) lassen eine qualitativ gleiche Zuordnung der Marker zu den verschiedenen Dermisstrukturen wie bei der selbst hergestellten azellulären Dermis erkennen. Beim Vergleich des Alloderm® mit den tieftemperatur- bzw. glyzerinkonservierten Präparaten (Tab. 18) ist die schwächere Anfärbung der Basallamina der Gefäße auffällig. Partiiell ist in Rasterelektronenmikroskopien eine Zerstörung der Basalmembran des Alloderm® mit Herausragen der unterliegenden Kollagenfasern ersichtlich (Abb. 22), in Semidünnschnitten (Abb. 23) erkennt man ein flacheres papilläres Muster.

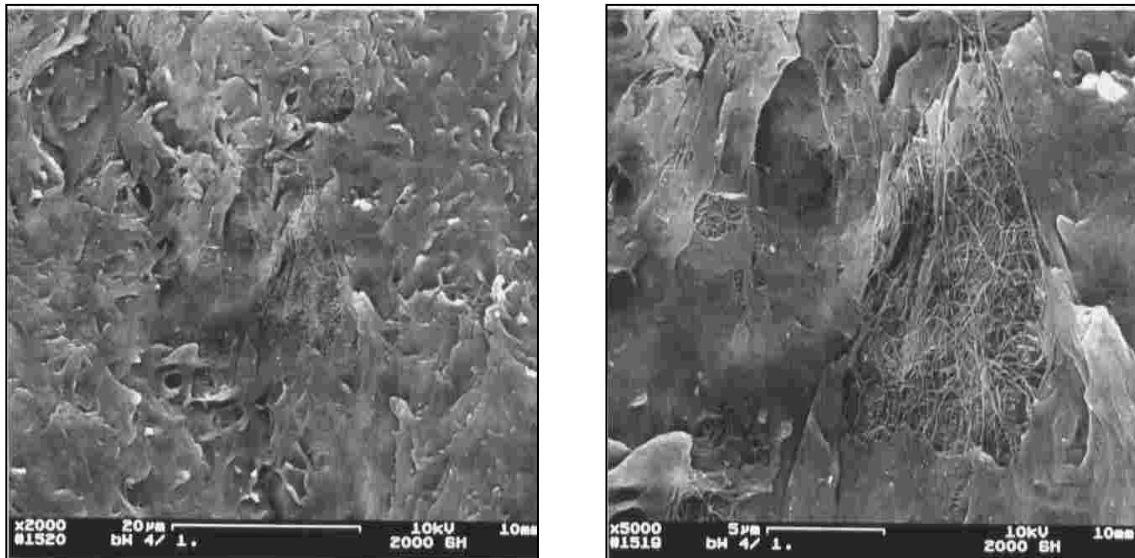


Abb. 22: **REM von Alloderm®**: Die Basalmembran weist beschädigte Bereiche mit herausquellenden Kollagenfasern auf.

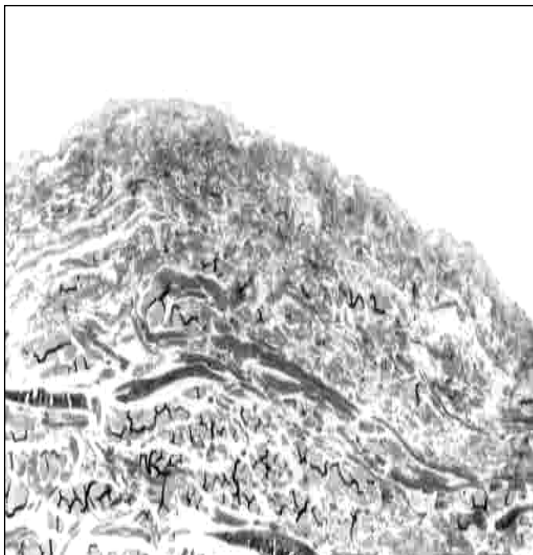


Abb. 23: **Semidünnschnitt von Alloderm®**: die Papillenstruktur zeigt ein flaches Erscheinungsbild, 25fache Vergrößerung.

Für weitere Untersuchungen wurde ausschließlich die selbst hergestellte sterilisierte azelluläre Dermis herangezogen.

6.1.1.6 Untersuchung biophysikalischer Parameter

Biophysikalische Parameter des Trägermaterials, insbesondere seine Durchlässigkeit für Wasserdampf und Sauerstoff, nehmen Einfluss auf die Materialinteraktion mit Zellen und Geweben (Hiles 1993; Lu 1998; Angelova 1999). Aus diesem Grunde wurde die Permeabilität der hergestellten azellulären Dermis für Wasserdampf (Moisture Vapour Permeability, MVP) und Sauerstoff (Oxygen Permeability, OPERM) nach den jeweiligen DIN-Normen bestimmt.

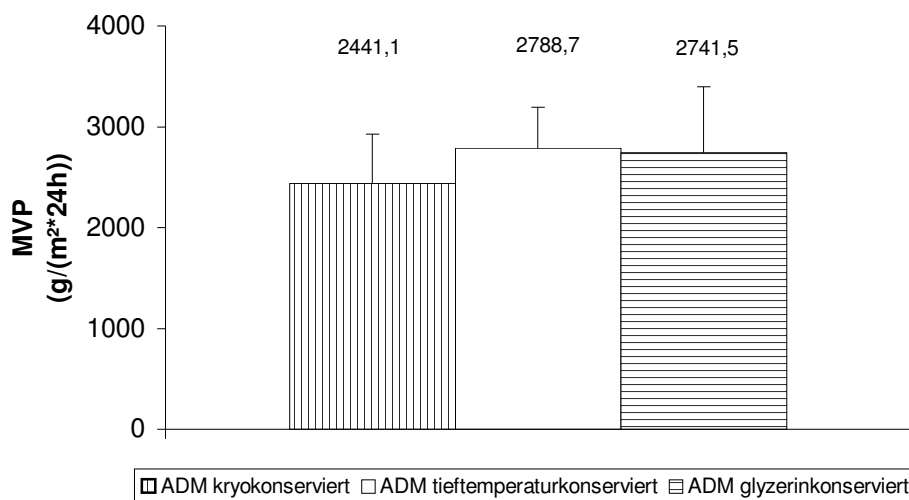


Abb. 24: **Wasserdampfdurchlässigkeit:** MVP verschiedener konservierter, vom selben Spenderpool stammender Präparate; ermittelt nach DIN 53122-1, n=14. Es handelt sich dabei um die selbst hergestellten sterilisierten Präparate.

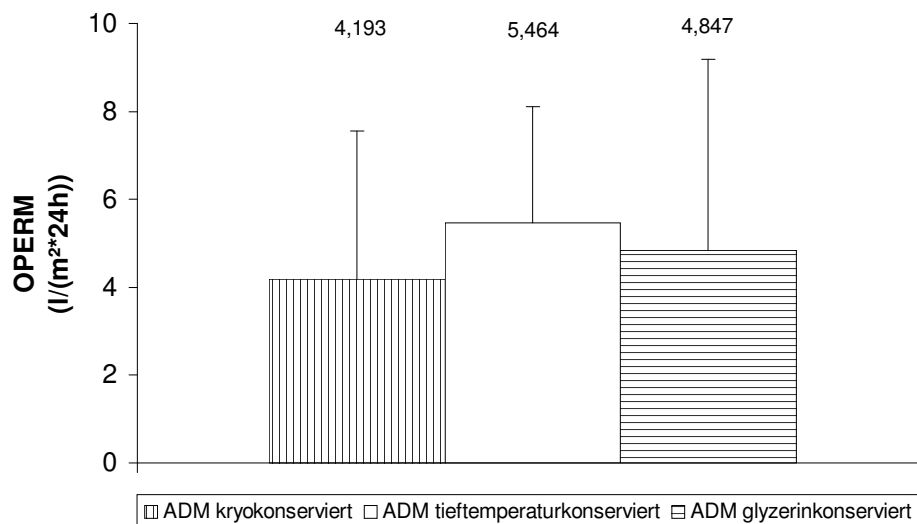


Abb. 25: **Sauerstoffpermeabilität:** OPERM vom selben Spenderpool stammender, sterilisierter Präparate; gemessen nach DIN 53380-3, n=7.

Bei allen Präparategruppen wurden sowohl eine hohe Wasserdampf- (Abb. 24) als auch eine hohe Sauerstoffdurchlässigkeit (Abb. 25) festgestellt, die nach Anwendung der verschiedenen Konservierungsmethoden nicht signifikant variierte ($p > 0,01$, t-Test).

6.1.1.7 Fixierung des endgültigen Präparationsverfahrens

Das Präparationsverfahren unter Anwendung einer hyperosmolarer Salzlösung und einer Detergenzlösung wurde als preiswertes und pharmazeutisch unbedenkliches Verfahren zur Herstellung einer azellulären Dermis fixiert und im Rahmen eines *Scale up* auf größere Präparate adaptiert. Das Fließschema des endgültig etablierten Herstellungsverfahrens (Abb. 26) veranschaulicht die Präparationsschritte sowie die Qualitätssicherung.

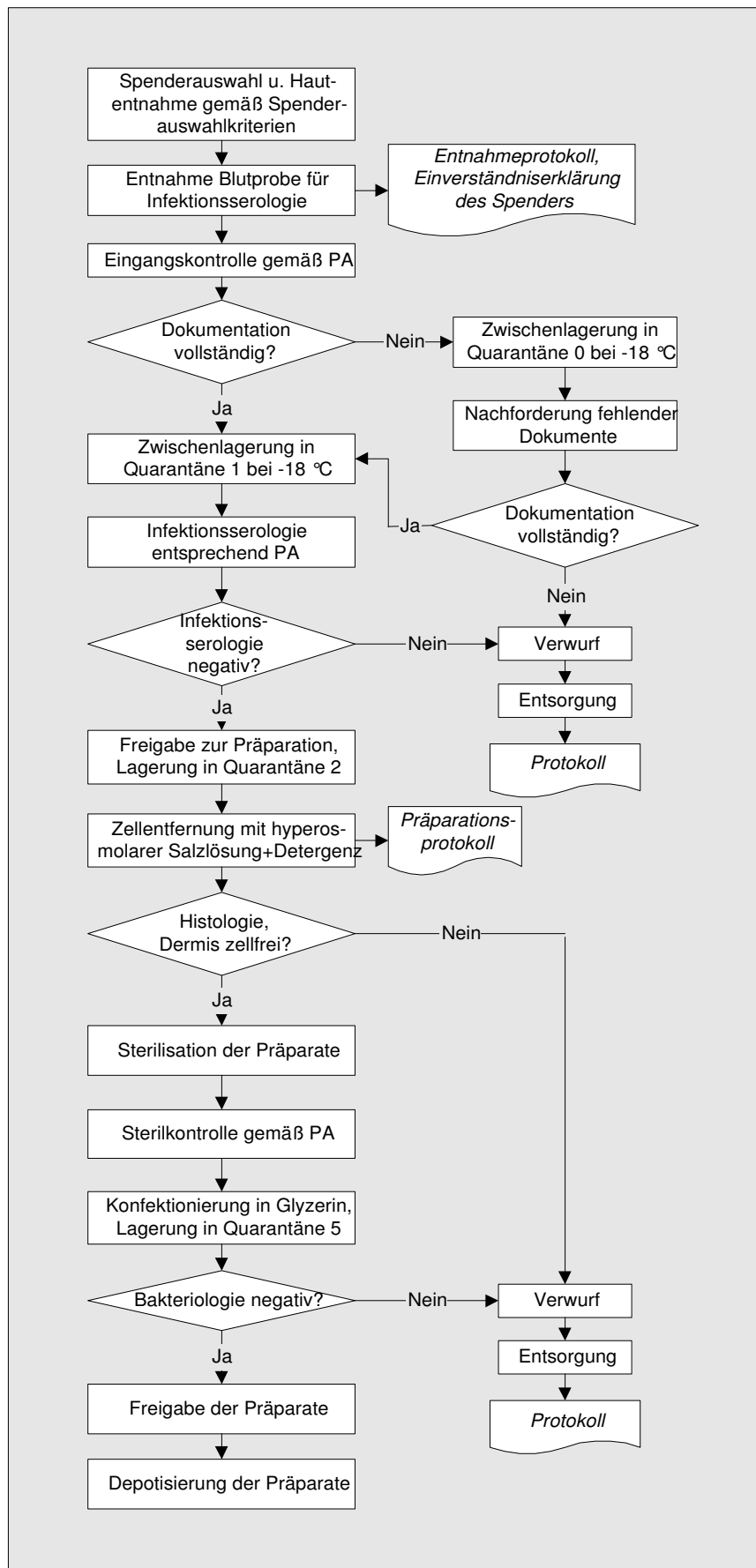


Abb. 26: Fließschema des endgültig etablierten Präparationsverfahrens.

In Konformität zum Arzneimittelgesetz wird zur Sicherstellung der biologischen Sicherheit das validierte Sterilisationsverfahren für alle Präparate angewandt. Das Verfahren der Glyzerinkonservierung wird als Konservierungsverfahren für alle weiteren Präparationen eingesetzt, da sich dadurch keine Beeinträchtigungen der Präparateigenschaften ergeben, gute Erfahrungen bei der Glyzerinkonservierung humaner allogener Haut vorliegen (Marshall 1995; Richters 1996) und eine einfache Lagerung der Präparate bei Kühlschranktemperaturen erfolgen kann.

6.1.2 Untersuchung der Biokompatibilität

Ein Material kann nur für ein biologisches System verträglich, also biokompatibel sein, wenn es darauf keinen immunologischen Einfluss (6.1.2.1) und keine cytotoxische Wirkung (6.1.2.2) ausübt. Zusätzlich muss die Matrix eine normale Interaktion mit Zellen erlauben (6.1.2.3).

6.1.2.1 Lymphozytenproliferationsassay

Inwieweit von der sterilisierten azellulären Dermis eine lymphozytenstimulierende Wirkung ausgeht, wurde im Lymphozytenproliferationsassay bestimmt. Damit können Aussagen über die Antigenizität des Materials getroffen werden (Bell 1981). Beim Lymphozytenproliferationsassay wurden periphere Blutlymphozyten von fünf verschiedenen Zellspendern jeweils mit Homogenisaten humaner azellulärer Dermis von fünf Gewebsspendern inkubiert. Die Lymphozytenproliferation wurde anhand des BrDU-Einbaus während der DNS-Synthese quantifiziert (Abb. 27).

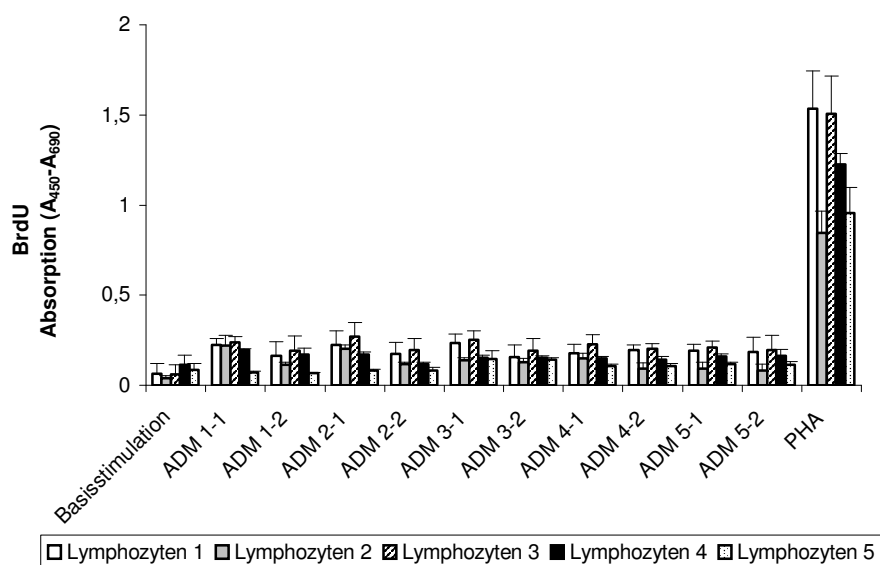


Abb. 27: **Lymphozytenproliferation:** Dermis-homogenisate von fünf Gewebsspendern wurden mit Lymphozyten von fünf Blutspendern im 6fach Ansatz getestet. Dermis wurde in der Konzentration von 0,3 mg Dermis/ml (-1) und 0,03 mg/ml (-2) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente Phythä-mogglutinin, als Negativkontrolle Lymphozyten ohne Substanzzusatz (Basisstimulation).

Im Gegensatz zu den Dermishomogenisaten bewirkte das Mitogen PHA (Phythämogglutinin) bei allen Lymphozytensuspensionen eine signifikante ($p < 0,01$, t-Test), bis zu 25fach gegenüber der Basisstimulation erhöhte, Lymphozytenproliferation.

6.1.2.2 Cytotoxische Wirkung von Trägermaterialien auf Zellen *in vitro*

Ob sterilisierte azelluläre Dermis auf dermale Fibroblasten eine cytotoxische Wirkung ausübt, wurde mit Hilfe des MTT-Assays untersucht (Wenzel 1998). Zur Beurteilung der Wertigkeit azellulärer Dermis wurden vergleichend auch synthetische Gewebersatzmaterialien für diese Versuche herangezogen. Dabei handelte es sich um Matrizen aus Polyvinylalkohol (VacuSeal), aus Polypropylen (Prolene) und Polyglactin in einer ungefärbten (Vicryl) sowie gefärbten Ausführung (Vicryl gefärbt). Nach 4tägiger Cokultur mit gefärbtem Vicryl war eine reduzierte mitochondriale Dehydrogenaseaktivität der Fibroblasten feststellbar, die in einer geringeren Farbstoffumwandlung resultierte (vgl. 5.3.1.4); dieses zeigte sich allerdings im t-Test als nicht signifikant im Vergleich zum Zellblank ($p > 0,01$). Bei allen anderen Trägermaterialien konnten ebenso keine signifikanten Beeinträchtigungen der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität festgestellt werden.

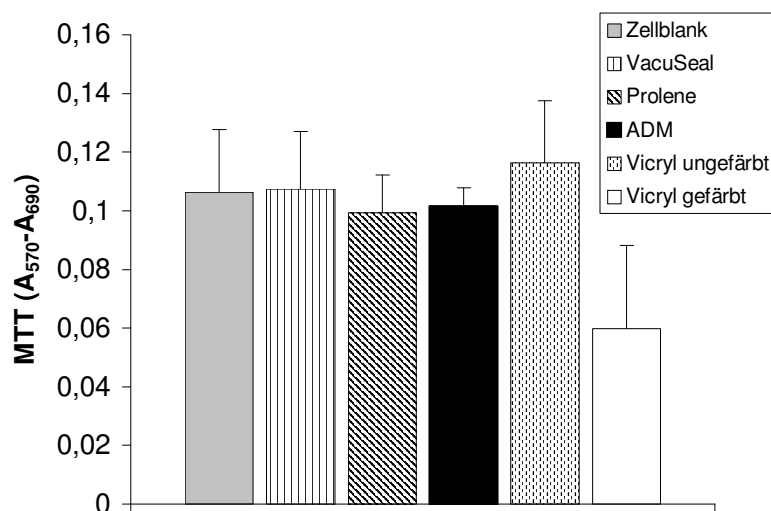


Abb. 28: **Wirkung potentieller Trägermaterialien auf Fibroblasten:** Nach vier-tägiger Cokultur der Fibroblasten mit den Matrizen wurde die mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität mit dem MTT-Test erfaßt, n=4.

6.1.2.3 Eignung der Oberflächenstruktur für die Zellbesiedelung

Die Eignung der Oberflächenstruktur azellulärer Dermis für die Zellbesiedelung wurde zunächst mit Keratinozytenkulturen abgeschätzt, da Keratinozyten den Haupt-Zelltyp der Haut darstellen und empfindlich auf Änderungen der Kulturbedingungen reagieren (Krejci 1991; Wright 1998).

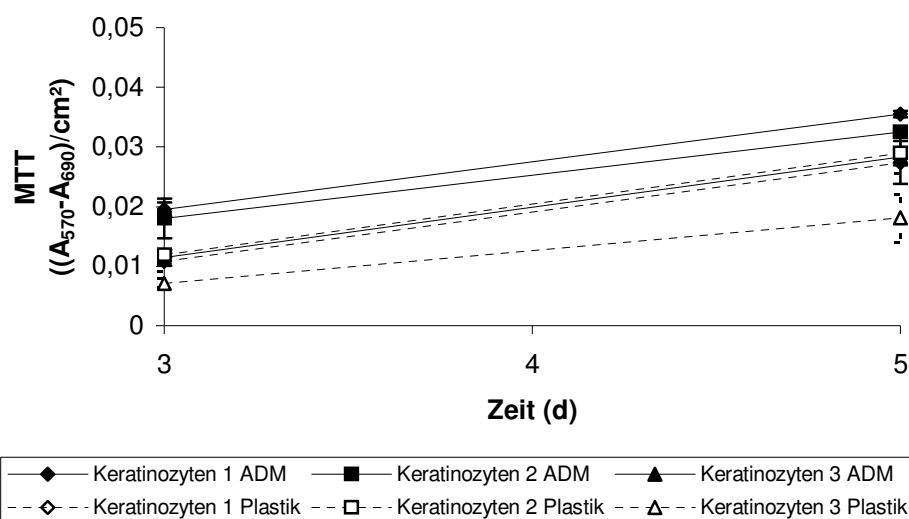


Abb. 29: **Besiedelung azellulärer Dermis mit Keratinozyten:** Mitochondriale Stoffwechselaktivität humaner Keratinozyten bei Besiedelung der papillären Seite azellulärer Dermis (ADM) bzw. Kultur auf Zellkulturplastik, n=3.

Azelluläre Dermis bot eine gute Wachstumsgrundlage für Keratinozyten. Die gemessene mitochondriale Dehydrogenaseaktivität (Abb. 29) war bei Keratinozytenadhäsion an azellulärer Dermis leicht, jedoch nicht signifikant ($p > 0,01$, t-Test) höher als bei Kultivierung auf Zellkulturplastik und nahm im Verlauf des Beobachtungszeitraumes ebenso zu.

6.1.3 Eignung azellulärer Dermis zur Reparatur größervolumiger Gewebsdefekte

Die Präparateabmessungen, insbesondere auch die Dicke (6.1.3.1), sind für eine Reparatur größervolumiger Gewebsdefekte entscheidend. Für die Versorgung bzw. Stimulation tiefer liegender Zellen ist darüber hinaus die Materialpermeabilität für biologisch aktive Substanzen (6.1.3.2) von großer Bedeutung.

6.1.3.1 Materialdicke

Die Dicke azellulärer Dermis wurde nach Auftauen bzw. Rehydratisieren sterilisierter kryokonservierter, tieftemperaturkonservierter bzw. glyzerinkonservierter Präparate mit einer Mikrometerschraube bestimmt, dabei ermittelte Werte sind in Abb. 30 dargestellt.

Signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen konservierten Präparaten waren dabei nicht evident.

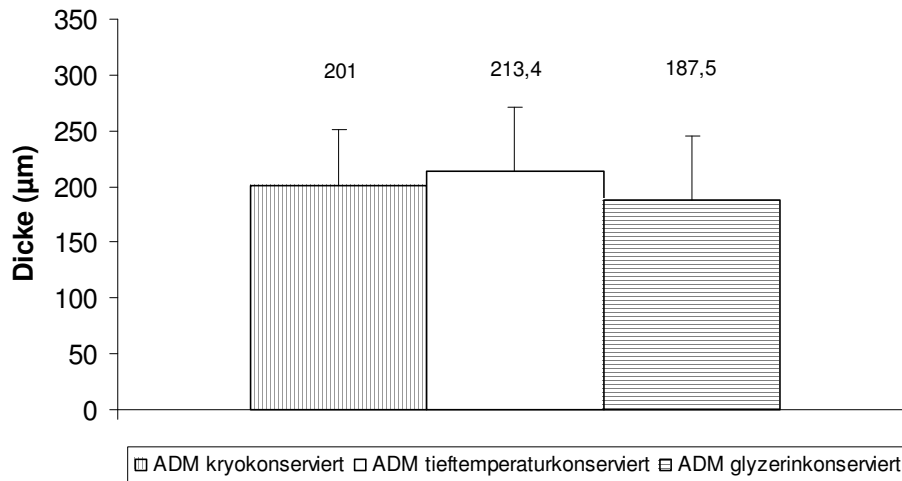


Abb. 30: **Materialdicke:** Die Dicke verschieden konservierter, jedoch vom selben Spenderpool herrührender Präparate wurde mit einer Mikrometermessschraube bestimmt, $n=15$.

6.1.3.2 Proteinpermeabilität

Um eine Stimulation dort befindlicher Zellen zu ermöglichen, muss auch in tieferen Schichten der azellulären Dermis das Eindringen biologisch aktiver Substanzen sichergestellt sein. Zu diesen Substanzen zählen Proteine, die z.B. als autokrin oder parakrin sekretierter Wachstumsfaktor einen erheblichen Einfluss auf die Zellproliferation und –aktivität nehmen können (Zerveola 2000; Falanga 2002). Der Stofftransport durch humane azelluläre Dermis wurde mit Hilfe einer Modellkomponente analysiert. Dazu wurde das Protein *Bovines Serumalbumin* (BSA, Fraktion V, 67 kDa) eingesetzt.

6.1.3.2.1 Diffusionsexperiment

Der diffusive Stofftransport durch humane azelluläre Dermis wurde in einer Diffusionsmesskammer untersucht, der Versuchsaufbau ist in Abb. 31 wiedergegeben.

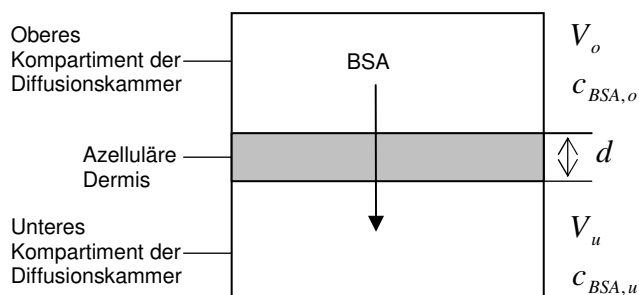


Abb. 31: **Aufbau der Diffusionskammer,** die zur Untersuchung der transdermalen Diffusion genutzt wurde. Die Symbole werden nachfolgend im Text erläutert.

Die Messungen wurden unter Verwendung zweier Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration der Modellkomponente durchgeführt. Im oberen Kompartiment wurde zu Beginn des Diffusionsexperimentes eine BSA-Lösung aufgetragen, im unteren Kompartiment lag zu diesem Zeitpunkt kein BSA sondern nur ein Puffer vor. Die Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Kompartimenten verursachten einen Diffusionsstrom durch die azelluläre Dermis, bis der Austauschvorgang abgeschlossen war und die Gleichgewichtskonzentration der Modellkomponente in der Messkammer vorlag.

Um den Stofftransport durch die azelluläre Dermis beschreiben zu können, wird zunächst für den Bilanzraum "Dermis" die Stoffstrombilanz der Komponente aufgestellt werden. Die allgemeine Stoffstrombilanz kann dabei wie folgt formuliert werden (Gleichung 6):

$$\underset{\text{(Zufluss)}}{\text{Stoffstrom}_{BSA,eint\ retend}} - \underset{\text{(Abfluss)}}{\text{Stoffstrom}_{BSA,austretend}} - \underset{\text{(Speicherterm)}}{\text{Stoffstrom}_{BSA,gespeichert}} - \underset{\text{(Reaktionsterm)}}{\text{Stoffstrom}_{BSA,umgewandelt}} = 0 \quad (6)$$

$\text{Stoffstrom}_{BSA,eint\ retend}$ in die Dermis eintretender Stoffstrom der Komponente

$\text{Stoffstrom}_{BSA,austretend}$ aus der Dermis austretender Stoffstrom der Komponente

$\text{Stoffstrom}_{BSA,gespeichert}$ in der Dermis gespeicherter Stoffstrom der Komponente

$\text{Stoffstrom}_{BSA,umgewandelt}$ in der Dermis umgewandelter Stoffstrom der Komponente

Für die Untersuchungen in der Diffusionskammer werden folgende Annahmen getroffen:

- die untersuchte Komponente wird nicht im Versuchssystem adsorbiert, damit ist der *Speicherterm* Null
- die untersuchte Komponente wird nicht metabolisiert (zellfreies System), damit entfällt der *Reaktionsterm*
- die Komponente ist im Kompartiment oberhalb der Dermis sowie im Kompartiment unterhalb der Dermis homogen verteilt
- der Stofftransport wird nur durch transdermale Diffusion determiniert
- aufgrund des geringen Konzentrationsbereiches ist der Diffusionskoeffizient im Diffusionsexperiment konzentrationsunabhängig

Damit kann die allgemeine Stoffstrombilanz (6) vereinfacht werden zu:

$$\text{Stoffstrom}_{eint\ retend} - \text{Stoffstrom}_{austretend} = 0 \quad (7)$$

$$\dot{n}_{BSA,o} - \dot{n}_{BSA,u} = 0 \quad (8)$$

$\dot{n}_{BSA,o}$ in die Dermis eintretender Stoffstrom der Komponente [mol/h]

$\dot{n}_{BSA,u}$ aus der Dermis austretender Stoffstrom der Komponente [mol/h]

Die Gesamtstoffmenge der Komponente verändert sich in der Diffusionskammer nicht, sondern - solange ein Diffusionsstrom vorliegt - lediglich die Konzentration der Komponente c_{BSA} mit der Ortskoordinate x . Der aus der Dermis austretende Stoffstrom entspricht dem Stoffstrom, der in das untere Kompartiment der Diffusionskammer übergeht.

Zur Beschreibung der transdermalen Diffusion findet das erste Ficksche Gesetz allgemein Anwendung (Forth 1996; Pirot 1997; Huschka 1998). Das Gesetz wird nun herangezogen, um einen Zusammenhang herzuleiten, der die Berechnung des effektiven Diffusionskoeffizienten aus der im unteren Kompartiment während des Diffusionsexperimentes ermittelten Konzentration der Komponente $c_{BSA,u}$ zulässt.

Bilanz für das untere Kompartiment der Diffusionskammer:

1. Ficksches Gesetz:
$$\dot{n}_{BSA,u} = \frac{\partial n_{BSA,u}}{\partial t} = -D_{eff,BSA} * A * \frac{\partial c_{BSA}}{\partial x} \quad (9)$$

$\frac{\partial n_{BSA,u}}{\partial t}$ diffundierter Molenstrom der Komponente im unteren Kompartiment [mol/h]

$D_{eff,BSA}$ effektiver Diffusionskoeffizient der Komponente [m²/h]

A für die Diffusion zur Verfügung stehende Querschnittsfläche der azellulären Dermis [m²]

$\frac{\partial c_{BSA}}{\partial x}$ Konzentrationsgradient der Komponente [mol/m⁴]

x Ortskoordinate [m]

Bezieht man Gleichung (9) auf das Volumen des unteren Kompartimentes, ergibt sich folgender Ausdruck:

$$\frac{\partial c_{BSA,u}}{\partial t} = -D_{eff,BSA} * \frac{A}{V_u} * \frac{\partial c_{BSA}}{\partial x} \quad (10)$$

$c_{BSA,u}$ Konzentration der Komponente im unteren Kompartiment [mol/m³]

V_u Volumen der unteren Kammer [m³]

Unter Annahme, dass der Transportprozess bereits angelaufen ist und die Konzentration der Komponente ($c_{BSA,o}$) damit einem linearen Profil folgt, kann die Konzentrationsänderung

∂c_{BSA} vereinfacht als Konzentrationsdifferenz ($c_{BSA,o} - c_{BSA,u}$) dargestellt werden. Die bei transdermalen Diffusion zurückgelegte Wegstrecke ∂x entspricht der Dermisdicke d .

$$\text{Daraus folgt: } \frac{dc_{BSA,u}}{dt} = -D_{eff,BSA} * \frac{A}{V_u} * \frac{c_{BSA,o} - c_{BSA,u}}{d} \quad (11)$$

Das Probenahmenvolumen ist beim Diffusionsexperiment im Vergleich zum Gesamtvolumen so gering, dass es vernachlässigt und von einem konstanten Volumen des unteren Kompartiments (V_u) ausgegangen wird.

Die zu einem bestimmten Zeitpunkt im oberen Kompartiment vorliegende Konzentration der Komponente ($c_{BSA,o}$) entspricht der Ausgangskonzentration ($c_{BSA,o(t=0)}$) abzüglich der Proteinmenge, die zu diesem Zeitpunkt in das untere Kompartiment diffundiert ist. Daraus folgen Ausdruck 12 und 13:

$$c_{BSA,o} = c_{BSA,o(t=0)} - \frac{n_{BSA,u}}{V_o} \quad (12) \quad c_{BSA,o} = c_{BSA,o(t=0)} - c_{BSA,u} * \frac{V_u}{V_o} \quad (13)$$

$c_{BSA,o}$ Konzentration der Komponente im oberen Kompartiment [mol/m³]

V_o Flüssigkeitsvolumen des oberen Kompartiments [m³]

Setzt man diesen Ausdruck in Gleichung ein 11, folgt:

$$\frac{dc_{BSA,u}}{dt} = -\frac{D_{eff,BSA} * A}{d * V_u} * (c_{BSA,o(t=0)} - c_{BSA,u} * (1 + \frac{V_u}{V_o})) \quad (14)$$

Nach Trennung der Variablen resultiert:

$$\int_0^{c_{BSA,u}} \frac{dc_{BSA,u}}{c_{BSA,o(t=0)} - c_{BSA,u} * (1 + \frac{V_u}{V_o})} = -\int_0^t \frac{D_{eff,BSA} * A}{d * V_u} * dt \quad (15)$$

Nach Integration folgt:

$$\frac{1}{(1 + \frac{V_u}{V_o})} * \{ \ln[\frac{c_{BSA,o(t=0)}}{(1 + \frac{V_u}{V_o})} - c_{BSA,u}] - \ln[\frac{c_{BSA,o(t=0)}}{(1 + \frac{V_u}{V_o})}] \} = -\frac{D_{eff,BSA} * A}{d * V_u} * t \quad (16)$$

Zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten ergibt sich damit folgender Ausdruck:

$$-\frac{d * V_u}{A * t * (1 + \frac{V_u}{V_o})} * \left\{ \ln \left[\frac{C_{BSA,o(t=0)}}{(1 + \frac{V_u}{V_o})} - c_{BSA,u} \right] - \ln \left[\frac{C_{BSA,o(t=0)}}{(1 + \frac{V_u}{V_o})} \right] \right\} = D_{eff,BSA} \quad (17)$$

Dieser Ausdruck lässt sich zusammenfassen zu:

$$-\frac{d * V_u}{A * t * (1 + \frac{V_u}{V_o})} * \left\{ \ln \left[1 - \frac{C_{BSA,u}}{C_{BSA,o(t=0)}} * (1 + \frac{V_u}{V_o}) \right] \right\} = D_{eff,BSA} \quad (18)$$

Die theoretische Gleichgewichtskonzentration ergibt sich als Quotient aus der Menge des zu Versuchsbeginn in der oberen Kammer applizierten BSA (zugefügt wurden 0,5 ml BSA-Lösung mit einer Konzentration von 40 mg/ml - d.h. 20 mg BSA - zu 1,5 ml bereits im oberen Kompartiment vorgelegtem Puffer) und dem Gesamtflüssigkeitsvolumen in der Kammer (5 ml). Das Gesamtflüssigkeitsvolumen der Kammer setzt sich aus dem Volumen des oberen Kompartimentes (2 ml) und des unteren Kompartimentes (3 ml) zusammen. Die theoretische Gleichgewichtskonzentration beläuft sich damit auf 4 mg/ml.

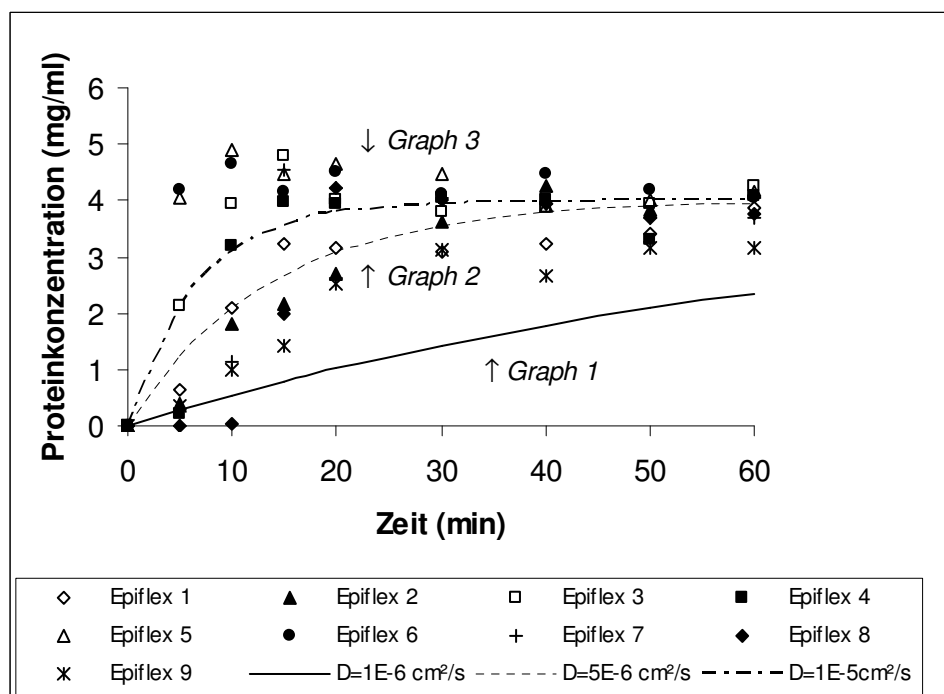


Abb. 32: **Diffusionsuntersuchungen:**

Die Diffusion von BSA durch die Dermis wurde anhand der Zunahme der Proteinkonzentration im unteren Kompartiment bei 28°C verfolgt, n=3. Durchgezogene Kurven: Simulation des Konzentrationsverlaufes bei Annahme eines effektiven Diffusionskoeffizienten von 1E-6 cm²/s (—); 5E-6 cm²/s (- - -) bzw. 1E-5 cm²/s (- · - ·).

Abb. 32 zeigt die beim Diffusionsexperiment im unteren Kompartiment gemessene BSA-Konzentration. Über einen Zeitraum von ca. 30 Minuten ist ein Ansteigen der Proteinkonzentration bis zu einer Konzentration von ca. 4 mg/ml zu beobachten. Zu diesem

Zeitpunkt war der Konzentrationsunterschied zwischen oberem und unterem Kompartiment ausgeglichen und der diffusive Stofftransport beendet. Die dann vorliegende Proteinkonzentration entspricht der theoretischen Gleichgewichtskonzentration, demzufolge wurde bei den Untersuchungen kein Albumin an die Diffusionskammer gebunden.

Exemplarisch wurde eine Simulation des Konzentrationsverlaufes für einen Diffusionskoeffizienten von $1\text{E-}6\text{ cm}^2/\text{s}$ (Graph 1), $5\text{E-}6\text{ cm}^2/\text{s}$ (Graph 2) sowie $1\text{E-}5\text{ cm}^2/\text{s}$ (Graph 3) vorgenommen, die daraus resultierenden Kurven sind in Diagramm 32 als durchgezogene Linien dargestellt. Die zeitliche Zunahme der Proteinkonzentration im unteren Kompartiment folgt einer Exponentialfunktion, deren Formel untenstehend wiedergegeben ist.

Simulation des Konzentrationsverlaufes ausgehend von Gleichung 18:

$$c = c_0 * (1 - \exp(-(1 + V_u/V_o) * D * A * t / (d * V_u)) / (1 + V_u/V_o))$$

$c_0 = c_{(t=0)} = 10\text{ mg/cm}^3$	BSA-Konzentration in der oberen Kammer zu Versuchsbeginn
$V_o = 2\text{ cm}^3$	Volumen der oberen Kammer
$V_u = 3\text{ cm}^3$	Volumen der unteren Kammer
$A = 4,9\text{ cm}^2$	für die Diffusion zur Verfügung stehende Querschnittsfläche der Dermis
$d = 0,02\text{ cm}$	Dicke der Dermis
D	effektiver Diffusionskoeffizient
t	Zeit
c	Proteinkonzentration im unteren Kammerkompartiment

Bei den simulierten Graphen wird ersichtlich, dass mit zunehmendem Diffusionskoeffizienten eine schnellere Konzentrationszunahme in der unteren Kammer erfolgt und sich die Gleichgewichtskonzentration früher einstellt. Vergleicht man diese errechneten Kurven mit den gemessenen Konzentrationsverläufen (Abb. 32), können bereits erste Aussagen über die Größenordnung der tatsächlich vorliegenden Diffusionskoeffizienten getroffen werden. Demnach sind vorrangig Diffusionskoeffizienten im Größenbereich von $5\text{E-}6\text{ cm}^2/\text{s}$ bis $1\text{E-}5\text{ cm}^2/\text{s}$ zu erwarten.

Für eine exakte Interpretation des Diffusionsvorganges sind genaue Zahlenwerte für den effektiven Diffusionskoeffizienten erforderlich. Mit Hilfe der kalkulierten Diffusionskoeffizienten ist auch ein Vergleich der transdermalen Diffusion von BSA mit der freien Diffusion des Proteins in einer wässrigen Lösung möglich, hier ist allerdings die Komplexität des Diffusionsverhaltens von Proteinlösungen zu beachten.

Wie aus der Beziehung von Stokes-Einstein (vgl. 2.2.1.2.4, Gleichung 2) ersichtlich wird, hängt der Diffusionskoeffizient einer Substanz i (D_i) neben dem hydrodynamischen

Teilchenradius der Substanz (r_i) und der Viskosität des Diffusionsmediums (η) auch von der Temperatur (T) ab. Der Diffusionskoeffizient ist umso größer, je kleiner der hydrodynamische Teilchenradius und die Viskosität der Lösung und je höher die Temperatur ist.

Stokes-Einstein-Gleichung:
$$D_i = \frac{k * T}{6 * \pi * \eta * r_i} \quad (2)$$

k Boltzmannkonstante [1,38E-23 J/K]

Die Viskosität einer Lösung sinkt mit zunehmender Temperatur, bei Proteinlösungen besteht ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen beiden Größen. Darüber hinaus ist die Viskosität auch von der Konzentration des gelösten Proteins abhängig. Mit zunehmender Proteinkonzentration kann eine nicht-linear ansteigende Viskosität beobachtet werden (Monkos 1996), als Konsequenz daraus sinkt der Diffusionskoeffizient. Wegen der Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten kann ein Vergleichswert für die freie Diffusion von BSA in einer wässrigen Lösung nur herangezogen werden, wenn er sich auf eine zum Diffusionsexperiment analoge Temperatur und Proteinkonzentration bezieht. Da keine Literaturwerte für die freie Diffusion von BSA unter diesen Bedingungen vorlagen, musste der Diffusionskoeffizient berechnet werden. Als Proteinkonzentration wurde dazu die Ausgangskonzentration von 10 mg/ml (20 mg BSA in 2 ml Puffer) im oberen Kompartiment der Diffusionskammer herangezogen.

Weil die Viskosität der Lösung nicht bekannt ist, muss diese zunächst errechnet. *Monkos* entwickelte dazu eine auf der Arrhenius-Gleichung basierende Formel, die die Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit der Viskosität wässriger BSA-Lösungen berücksichtigt (Gleichung 19) (Monkos 1996).

$$\eta_{BSA} = 1000 * \exp(-B + DT + \frac{\Delta E_s}{R * T}) \quad (19)$$

B	dimensionsloser Koeffizient
D	Koeffizient [K ⁻¹]
ΔE_s	Aktivierungsenergie [kJ/mol]
R	Allgemeine Gaskonstante [8,314E-3 KJ/(mol*K)]
T	Temperatur [K]
η	Viskosität [cp]; 1cp=E-3 Ns/m²

Die Koeffizienten B und D sind ebenso wie die Aktivierungsenergie ΔE_s konzentrationsabhängig und müssen numerisch aus experimentellen Daten ermittelt werden, jedoch wurde der Zusammenhang zwischen der Konzentration und den drei oben genannten

Parametern von *Monkos* für einen großen Konzentrationsbereich bereits aufgestellt. Die bei einer BSA-Konzentration von 10 mg/ml vorliegenden Werte wurden aus den Graphen von *Monkos* ermittelt. Die Parameter nehmen dabei folgende Werte an: $B = 26,08$; $D = 0,022 \text{ K}^{-1}$; $\Delta E_s = 34,44 \text{ kJ/mol}$. Mit Hilfe dieser Werte kann für eine Temperatur von 301,15 K (28 °C) eine Viskosität von 3,34 cp ($3,34 \cdot 10^{-3} \text{ Ns/m}^2$) errechnet werden. Die Viskosität der BSA-Lösung ist damit ca. 3,3fach höher als die Viskosität von Wasser, welche 1,009 cp beträgt (bei 20 °C; Näser 1990).

Mit dieser BSA-Viskosität wird nach Gleichung 2 der Diffusionskoeffizient ermittelt, dabei wird von einem hydrodynamischen Molekülradius von 3 nm ausgegangen (Song 1999). Der Diffusionskoeffizient für die freie Diffusion von BSA bei einer Temperatur von 28 °C und einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml wird demnach mit $2,2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ berechnet. Der berechnete Diffusionskoeffizient nimmt einen ca. 2,7fach kleineren Wert an als der in der Literatur zitierte Wert ($5,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ bei einer verdünnten BSA-Lösung ohne spezifizierte Konzentrationsangabe und einer Temperatur von 20 °C) (Young 1980).

Wie aus der Stokes-Einstein-Gleichung folgt, ist der Diffusionskoeffizient eines relativ großen Moleküls wie BSA gegenüber dem Diffusionskoeffizienten eines kleineren Moleküls (z.B. Glukose) reduziert. Der berechnete Diffusionskoeffizient für die freie Diffusion von BSA ist ca. 31mal kleiner als der Vergleichswert für Glukose ($6,78 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, wässrige Lösung bei 25 °C) (20).

Der von *Young* angegebene Vergleichswert für den Diffusionskoeffizienten bei freier Diffusion von BSA ($5,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) liegt relativ nahe am Wert von $1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, der bei der Simulation (Abb. 32) für die Erstellung des Graphen 1 herangezogen wurde. Demzufolge müsste bei freier Diffusion von BSA der Konzentrationsverlauf annähernd dieser Kurve folgen.

Aufgrund der Tatsache, dass bei der azellulären Dermis der Stofftransport durch eine hochkomplexe Struktur erfolgt, die die Diffusion der Komponente mehr oder weniger behindert, ist zu erwarten, dass der Diffusionskoeffizient bei Transport durch die azelluläre Dermis geringer ist als bei freier Diffusion in einer wässrigen Lösung, der Stofftransport also verschlechtert ist. Damit muss bei Diffusion von BSA durch die Dermis rein theoretisch ein noch langsamer ansteigender Konzentrationsverlauf erwartet werden, die Graphen also noch flacher ansteigen als Graph 1, der mit Näherung die freie Diffusion von BSA widerspiegelt (Abb. 32). Bei der Dermis steht nur ein Teil der Querschnittsfläche, nämlich die Materialporen für den Stofftransport zur Verfügung. Desweiteren bilden diese Poren ein Labrinth, welches die Transportwege durch "Umwege" verlängert. Diese Eigenschaften des Porensystems können durch einen Porositätsfaktors ε_p und einen Labyrinthfaktors τ berücksichtigt werden. Beide Faktoren führen dazu, dass der tatsächlich in einem porösen

Medium vorliegende *effektive Diffusionskoeffizient* gegenüber dem Diffusionskoeffizient in einem nichtporösen Medium erniedrigt ist.

$$D_{eff} = \frac{D^* \varepsilon_p}{\tau} \quad (20)$$

D_{eff}	effektiver Diffusionskoeffizient bei Diffusion durch ein poröses Medium [m ² /h]
D	Diffusionskoeffizient bei Diffusion durch ein nicht poröses Medium [m ² /h]
ε_p	Porositätsfaktor
τ	Labyrinthfaktor, meist im Bereich von 1,5 bis 10 (Froment 1979)

Leider sind beide Faktoren für viele Porensysteme nicht bekannt, aus diesem Grunde werden häufig effektive Diffusionskoeffizienten experimentell ermittelt. Dieser Weg wurde auch im Rahmen dieser Arbeit beschritten. Mit Hilfe der zuvor hergeleiteten Berechnungsgrundlage (Gleichung 18) konnten aus den in Abb. 32 dargestellten Konzentrationsverläufen die mittleren effektiven Diffusionskoeffizienten für die Diffusion von BSA durch humane azelluläre Dermis ermittelt werden (Abb. 33). Mittlere effektive Diffusionskoeffizienten ergeben sich aus dem Durchschnitt der effektiven Diffusionskoeffizienten, die nach Gleichung 18 für alle Versuchszeitpunkte jeweils einer Messreihe errechnet wurden.

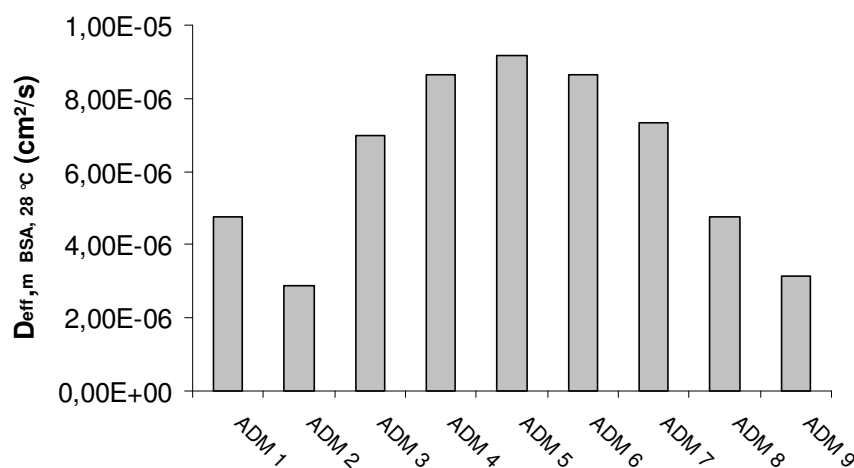


Abb. 33: **Mittlere effektive Diffusionskoeffizienten für BSA (bestimmt bei 28 °C):** Effektive Diffusionskoeffizienten für die Diffusion von BSA durch humane azelluläre Dermis, errechnet aus den experimentellen Daten.

Die ermittelten mittleren effektiven Diffusionskoeffizienten von 2,8E-6 bis ca. 9E-6 cm²/s sind entgegen den ursprünglichen theoretischen Annahmen um mehr als eine Zehnerpotenz höher als der Vergleichswert von *Young* für den Diffusionskoeffizienten bei freier Diffusion in wässriger Lösung (5,9E-7 cm²/s) (Young 1980). Dass bestätigt sich auch dadurch, dass in Abb. 32 anders als anfänglich postuliert die Konzentrationsverläufe für die transdermale Diffusion steiler ansteigen als Graph 1, der die freie Diffusion repräsentiert. Insgesamt

bedeutete das, dass die Diffusion in der Porenstruktur der Dermis besser ablaufen würde als in einer wässrigen Lösung. Physikalisch können keine Erklärungen dafür gefunden werden, Gründe sind jedoch im Versuchsaufbau bzw. in der Versuchsdurchführung zu suchen. Als Ursache für die hohen mittleren Diffusionskoeffizienten bei Diffusion von BSA durch azelluläre Dermis kommen konvektive Stoffströme in Frage, die bei diesem Versuchsaufbau zusätzlich zu den diffusiven Stoffströmen vorlagen und den Stofftransport verbesserten. Obwohl Probeauftrag und Probenahme sehr vorsichtig erfolgten, ist hier möglicherweise ein Strömungseffekt durch das Auftragen der Stammlösung bzw. durch das Absaugen der Proben für die Analyse entstanden, durch den zusätzlich BSA durch die Dermis gesogen wurde. Eine Leakage der Kammer, die außerhalb der Porenstruktur der Dermis einen Durchtritt von Flüssigkeit von oberen in das untere Kompartiment verursachte, ist auszuschließen, da alle Versuchsansätze vorab daraufhin überprüft wurden. Für die Erzeugung eines konvektiven Stoffstromes bei Probenahme spricht, dass nach dem ersten Messpunkt (5 Minuten), d.h. nach dem ersten Absaugen eines Aliquots, die Proteinkonzentration im unteren Kompartiment der Kammer für viele Ansätze stark zunimmt (siehe Abb. 32). Aus den BSA-Konzentrationen im Akzeptor nach 5minütiger Diffusion ergibt sich für die in einem gewissen Zuverlässigkeitsbereich liegenden Daten (für die Berechnung wurden die Konzentrationen der Ansätze 1, 2, 4, 7, 9 herangezogen) ein effektiver Diffusionskoeffizient von $9,59 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Dieser Wert weicht zwar nicht mehr so stark wie die mittleren effektiven Diffusionskoeffizienten vom Vergleichswert bei freier Diffusion (Young 1980) ab, ist jedoch immer noch - anders als postuliert - 1,6fach größer als dieser. Eine exakte Quantifizierung der Konvektionseinflüsse ist nicht möglich, da keine Erwartungswerte für den Unterschied zwischen den Diffusionskoeffizienten bei freier und transdermaler Diffusion vorliegen. Allerdings kann aufgrund der insgesamt unerwartet hohen Diffusionskoeffizienten angenommen werden, dass im Versuchsverlauf weitestgehend ein Konvektionseinfluss vorlag. Dieser wurde nicht nur beim Absaugen der Proben sondern auch beim Auftrag der Stammlösung zu Versuchsbeginn erzeugt. Das Probeziehen scheint jedoch einen größeren konvektiven Fluss erzeugt zu haben, so dass nach der ersten Probennahme die berechneten Diffusionskoeffizienten bei BSA-Transport durch die Dermis noch stärker vom Vergleichswert bei freier Diffusion abweichen.

6.1.3.2.2 Stofftransport bei Anlegen eines hydrostatischen Druckes

Um erste Aussagen darüber treffen zu können, ob der Stofftransport durch azelluläre Dermis prinzipiell gegenüber der Diffusion noch weiter erhöht werden kann, wurde der Transport von BSA bei Anlegen eines hydrostatischen Druckes untersucht. Neben dem diffusiven Stofftransport kommt in diesem Modell auch der Stofftransport durch eine Strömung zum Tragen (konvektiver Transport). Da die Transportuntersuchungen nicht den Haupthintergrund der Arbeit darstellten, wurde hier jedoch auf eine Berechnung der Transportparameter für dieses System verzichtet. Abb. 34 stellt die genutzte Perfusionskammer schematisch dar. Aufgrund eines hydrostatischen Druckes der durch eine Flüssigkeitssäule von 30 bzw. 60 cm erzeugt wurde, trat die BSA-Lösung durch die azelluläre Dermis.

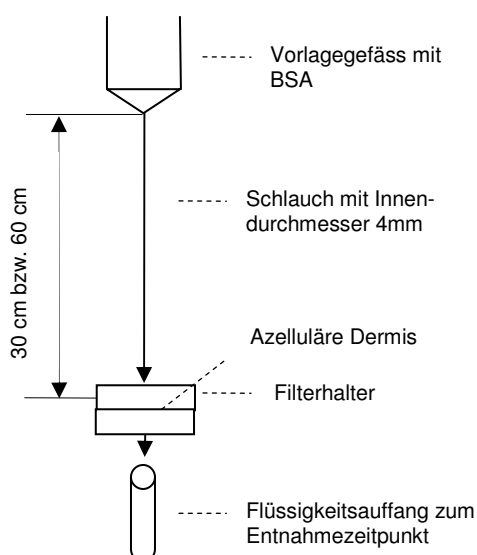


Abb. 34: **Perfusionskammer** zur Untersuchung des Transportes von BSA durch humane azelluläre Dermis bei Anlegen eines hydrostatischen Druckes

Zu Versuchsbeginn lag im unteren Kompartiment des Filterhalters (Zone unterhalb der Dermis) kein BSA, sondern lediglich Puffer vor. Um Totzeiten zu vermeiden, wurden die zum Filterhalter führenden Schläuche vor Versuchsbeginn vollständig mit BSA-Lösung gefüllt, und bei Versuchsbeginn mit der Perfusionskammer verbunden. Anschließend wurde die durch die Dermis tretende Lösung zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgefangen und hinsichtlich ihrer Proteinkonzentration analysiert. Die gemessenen Proteinkonzentrationen sind in Abb. 35 wiedergegeben.

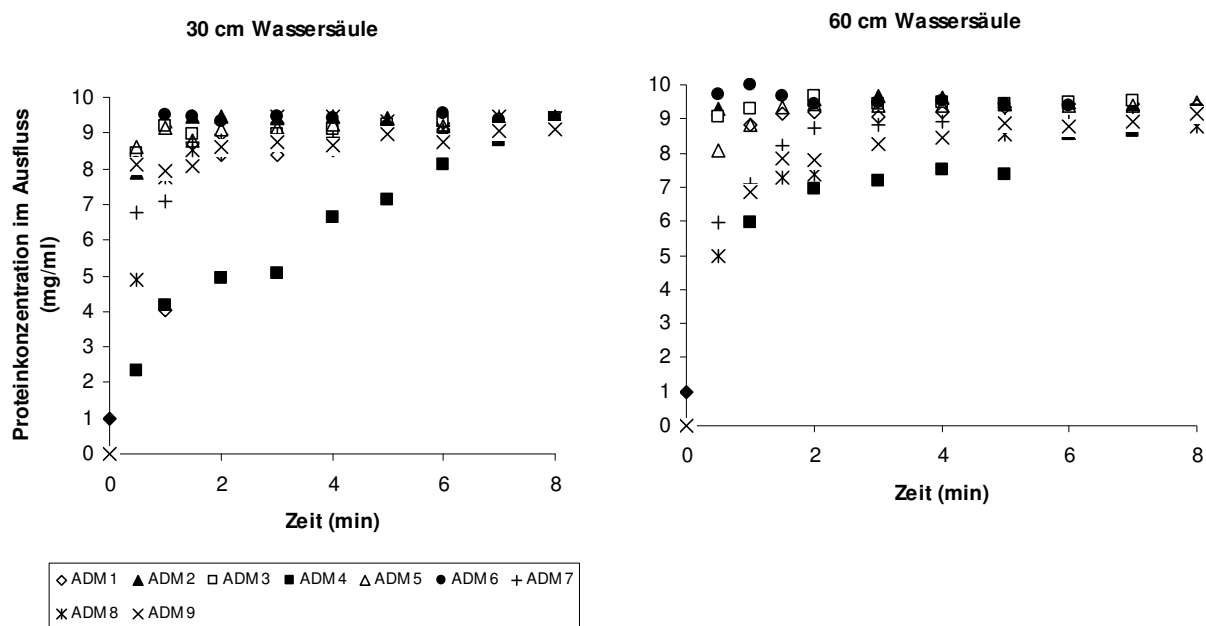


Abb. 35: **Transportuntersuchungen:** ADM wurde in eine Perfusionskammer eingefügt. Nach Anlegen eines hydrostatischen Druckes wurde der Transport von BSA durch die Dermis anhand der Zunahme der Proteinkonzentration im Ausfluss ermittelt verfolgt. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur (28 °C) durchgeführt, n=3.

Bei Anlegen eines hydrostatischen Druckes konnte ein schneller Flüssigkeitsdurchlauf durch die Dermis beobachtet werden. Die Konzentrationsgradienten (Abb. 35) sind deshalb sehr steil und im Auslauf lag nach kurzer Zeit eine konstante Proteinkonzentration vor, die annähernd der Konzentration der Vorlage entsprach.

Aufgrund der Geschwindigkeit des Stofftransportes bei Konvektion sind die exakten Konzentrationsgradienten nur schwer zu ermitteln. Anhand der Daten kann jedoch geschlussfolgert werden, dass die Konvektion maßgeblich zum Stofftransport beitragen kann. Dieser Umstand sollte bei zukünftigen Untersuchungen zur Besiedelung und Kulturführung azellulärer Dermis berücksichtigt werden.

6.1.4 Testung der Stabilität des Trägermaterials

Die Stabilität von Trägermaterialien ist bedeutsam für ihre Anwendung als Matrix für das Tissue Engineering, aber auch für einen potentiellen klinischen Einsatz. Dabei dürfen von der Matrix auch über einen längeren Zeitraum keine schädigen Inhaltsstoffe oder Degradationsprodukte freigesetzt werden (6.1.4.1). Ebenso sind der Größenerhalt (6.1.4.2) und die Resistenz gegen enzymatischen Angriff (6.1.4.3) wichtige Parameter für die Materialstabilität.

6.1.4.1 *In vitro* Degradation

Ob bei Langzeitinkubation der Trägermaterialien saure oder basische Inhaltsstoffe bzw. Abbauprodukte freigesetzt werden, wurde anhand des Medien-pH-Wertes im entsprechenden Testansatz beurteilt (Goepferich 1996). Die zellfreien Ansätze wurden unter Kulturbedingungen (37 °C, Begasung mit 5 % CO₂ und Luft, Luftfeuchtigkeit > 90 %) geführt. Bei Laugung von gefärbtem Vicryl war bereits nach 4 Tagen ein Absinken des pH-Wertes beobachtbar (Abb. 36), ab dem 10. Tag war der pH-Wert um 4 Einheiten gegenüber dem Medienleerwert reduziert. Eine gleichzeitige Infektion des Ansatzes konnte nicht festgestellt werden. Alle weiteren Materialien verursachten keine Veränderung des pH-Wertes.

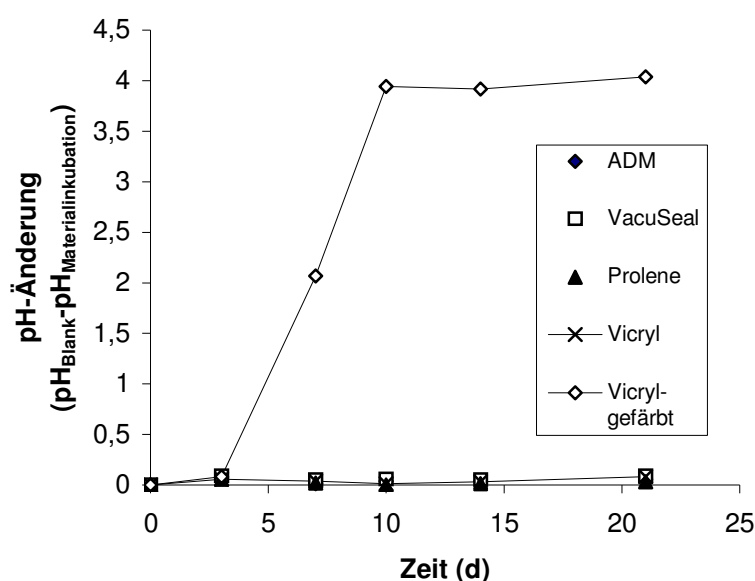


Abb. 36: **Langzeitlaugung von Trägermaterialien:** Der pH-Wert im Medium wurde bei Langzeitlaugung der Trägermaterialien unter Kulturbedingungen erfasst, (n=4).

6.1.4.2 Größenerhalt

Ebenfalls unter Kulturbedingungen wurde der Größenerhalt unbesiedelter azellulärer Dermis in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer gemessen. Für synthetische Gewebersatzmaterialien konnten diese Untersuchungen nicht vorgenommen werden, da nicht genug Material zur Verfügung stand. Während zehntägiger Inkubation konnte keine signifikante Größenänderung der Dermisstücke festgestellt werden. Nach 4 Wochen war die Präparatedicke allerdings signifikant auf 82 % des Ausgangswertes reduziert ($p < 0,01$, t-Test) (Abb. 37), parallel dazu wurden jedoch größere Präparateflächen gemessen, so dass sich das daraus resultierende Volumen nicht signifikant von dem der Ausgangspräparate unterschied. Die Volumenreduktion wurde signifikant nach 7wöchiger Inkubation. Die Präparate schienen nach 4 bzw. 7wöchiger Inkubation etwas weicher zu sein, so dass die Mikromettermessschraube tiefer in das Material eindrang, also eine geringere Dicke maß.

Begleitend dazu waren jedoch sowohl makroskopisch als auch histologisch keine strukturellen Veränderungen feststellbar.

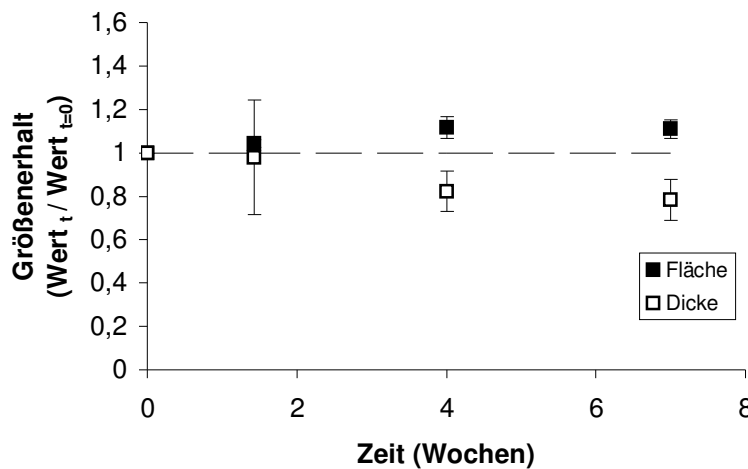


Abb. 37: **Größenerhalt zellfreier ADM:** Während der Langzeitinkubation von ADM wurden Präparatedicke sowie Fläche gemessen und auf die zu Versuchsbeginn ermittelten Werte bezogen, (n=10).

6.1.4.3 Kollagenaseresistenz

Eine potentielle klinische Anwendung des Trägermaterials kann durch einen schnellen Verdau durch Kollagenasen limitiert sein (Winter 1997; Hafemann 1999). Deshalb wurde die Kollagenaseresistenz azellulärer Dermis anhand der Proteinfreisetzung bei Enzymverdau bestimmt (Lee, J.E. 2001).

Bei unkultivierter Dermis konnte beim Kollagenaseverdau kein Protein aus dem Material freigesetzt werden. Auch nach siebenwöchiger Inkubation war die Kollagenaseresistenz nicht signifikant gegenüber unkultivierten Präparaten erniedrigt (Abb. 38).



Abb. 38: **Kollagenaseresistenz unbesiedelter ADM:** Die Präparate wurden nach 0, 4 bzw. 7wöchiger Inkubation einem vierstündigen Verdau mit 10 U/ml Kollagenase I unterworfen und das dabei aus der Dermis freigesetzte Protein quantifiziert (n=10).

6.1.5 Wertigkeit der azellulären Dermis beim Vergleich mit anderen Trägermaterialien

Die Eigenschaften der hergestellten sterilisierten azellulären Dermis wurden mit denen synthetischer Gewebersatzmaterialien (Tab. 20) verglichen; die Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefasst.

Präparat	ADM, sterilisiert	VacuSeal	Prolene	Vicryl	Vicryl, gefärbt
1. Material	azelluläre Dermis	Polyvinylalkohol	Polypropylen	Polyglactin 910	Polyglactin 910
2. Darreichungsform	Rechteck	Schwamm	Netz	Netz	Kissen
3. Flexibilität*	ja	ja	ja	ja	nein
4. Verarbeitbarkeit*	gut	gut	gut	gut	schlecht
5. Stabil bei Laugung*	ja	ja	ja	ja	nein
6. Resorbierbar	integriert**	nein ⁺	nein ⁺	ja ⁺	ja ⁺
7. Gasdurchlässigkeit	ja ⁺	nein ⁺	ja ⁺	ja ⁺	ja ⁺
8. Mikroskopierbar*	nur partiell	nein	ja	ja	nein
9. Cytotoxizität*	nein	nein	nein	nein	nicht signifikant
10. Einsaat möglich?	ja	ja	nein	nein	unverarbeitet ja
11. Eignung***	ja	nein	nein	nein	nein

Tab. 20: Prinzipielle Eignung von Trägermaterialien zur Herstellung eines zellbesiedelten Weichgewebersatzes

* getestet bei eigenen Untersuchungen

** bestimmt über einen Zeitraum von 6 Wochen entsprechend der unter Kapitel 6.5 dargestellten Daten

*** für die Herstellung eines zellbesiedelten Weichgewebersatzes zur längerfristigen Anwendung bei Gewebsschäden nach Exzision von Weichgewebssarkomen

⁺ entsprechend der Angaben in der Produktinformation

Beim gefärbten Vicryl wurde eine geringe Flexibilität und schlechte Verarbeitbarkeit beobachtet. Beim Schneiden gab dieses Material zahlreiche Fasern ab und zerfiel oftmals vollständig. Alle weiteren Matrizen ließen sich gut verarbeiten und formen. Aufgrund der Materialdicken ließen sich VacuSeal und das Vicrylkissen nicht, die azelluläre Dermis nur an Randzonen mikroskopieren. Ungünstig für eine dreidimensionale Besiedelung erscheint die Gasundurchlässigkeit des VacuSeal. Durch die sehr grobmaschige Form der Prolene- bzw. Vicrylnetze sowie den Zerfall adaptierter Vicrylkissen ist ein Aufbringen einer Zellsuspension auf diese Träger nicht möglich. Schlussfolgernd aus diesen Materialeigenschaften wurde die humane azelluläre Dermis als am besten geeignetes Trägermaterial ausgewählt und als einziges Material für weitere Versuche eingesetzt.

Obwohl die selbst hergestellte sterilisierte azelluläre Dermis hinsichtlich ihrer Zusammensetzung dem nicht sterilisierten Vergleichspräparat Alloderm® ähnelt (biologisches Trägermaterial in Form einer humanen azellulären Dermis), zeigte sich bei ersterer ein besserer Erhalt von dermalen Strukturelementen (vgl. 6.1.1.5). Im Gegensatz zu Alloderm® wird die selbst hergestellte azelluläre Dermis mit einem validierten Virusinaktivierungsverfahren sterilisiert. Sie weist damit in Konformität mit dem AMG eine hohe biologische Sicherheit auf und erfüllt so die vom AMG geforderte Grundvoraussetzung für einen klinischen Einsatz. Da der zu entwickelnde Weichgewebersatz längerfristig klinisch angewendet werden soll und die Anforderungen des AMG damit berücksichtigt werden müssen, wird für die nachfolgenden Versuche ausschließlich die hergestellte sterilisierte azelluläre Dermis herangezogen.

6.2 Gewinnung von Fibroblastenkulturen

Für die Herstellung eines zellbesiedelten Gewebersatzes ist es notwendig, die für die Bezüchtung genutzten Zellen aus humanem Gewebe zu isolieren (6.2.1) sowie effizient *in vitro* zu vermehren (6.2.2). Für das Tissue Engineering des Weichgewebersatzes wurden humane Fibroblasten herangezogen, die aus Vollhautproben gewonnen wurden.

6.2.1 Zellisolation aus Vollhautproben

6.2.1.1 Zellausbeute

Um für eine zukünftige klinische Anwendung Aussagen über die zur Isolierung einer definierten Fibroblastenmenge mindestens benötigte Biopsiegröße treffen zu können, wurde die Zellausbeuten bestimmt.

Humane dermale Fibroblasten wurden durch Kollagenaseverdau aus Vollhautproben isoliert. Nach 16stündiger Enzyminkubation konnte ein vollständiger Aufschluss des dermalen Gewebsteiles beobachtet werden. Unmittelbar nach Enzymverdau wurden Ausbeuten von 1 bis 3 Mio Zellen/g Haut erzielt, nach Etablierung der Zellkulturen in der ersten oder zweiten Kulturwoche konnten, ebenfalls bezogen auf die zur Präparation herangezogene Hautmenge, Ausbeuten ca. 4 bis ca. 8 Mio Zellen/g Haut bestimmt werden.

Signifikante Unterschiede in der Ausbeute bei Präparation von Mamma- bzw. Bauchhaut konnten nicht gefunden werden (Abb. 39).

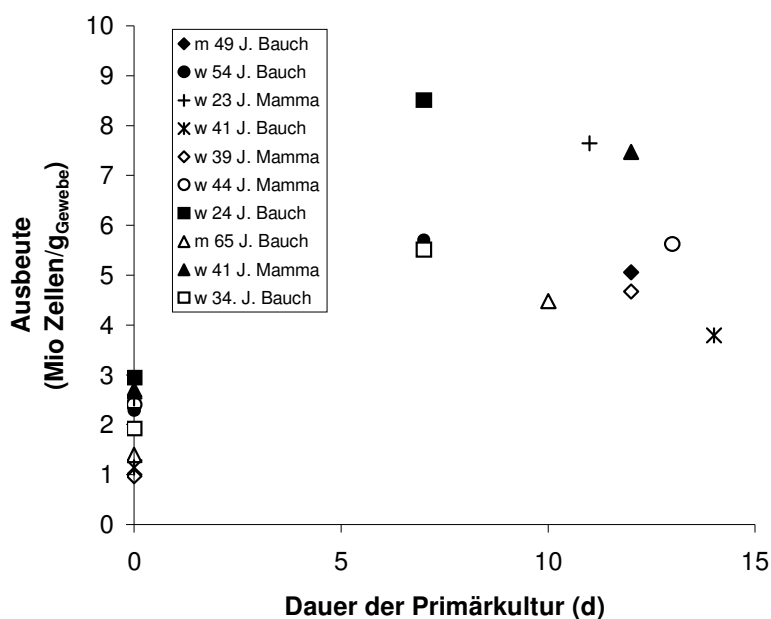


Abb. 39: **Ausbeuten:**

Die Ausbeuten wurden auf die Menge des zur Zellgewinnung genutzten Vollhautgewebes bezogen und nach Zellisolation bzw. nach Expansion in Primärkultur ermittelt. Kulturen wurden mit einer Zelldichte von $1,33 \times 10^4$ Zellen/cm² angelegt. Bei ca. 90 %-igem Bewuchs wurde nach Trypsinierung die Zellzahl bestimmt.

Die isolierten Zellen wiesen eine Vitalität von mehr als 90 % auf und hefteten sich gut an die Kulturgefäße an. Nachfolgend wurden ausschließlich Fibroblastenkulturen etabliert. Während der Primärkultivierung wurden die Fibroblasten bis zu ca. 90 % Konfluenz expandiert, ein schnelleres Wachstum der von jüngeren Spendern bzw. aus den verschiedenen Entnahmeregionen (Mamma, Bauch) stammenden Fibroblasten war dabei nicht evident.

6.2.1.2 Zellidentität

Im mikroskopischen Bild konnten die adhärenierten Fibroblasten im Stadium der Subkonfluenz als irregulär geformte Zellen mit zahlreichen cytoplasmatischen Fortsätzen (Abb. 40 a) erkannt werden, die mit zunehmender Besiedelung eine gestreckte, spindelartige Form annahmen. Bei Konfluenz zeigte sich ein gleichmäßiges Besiedelungsmuster mit parallel angeordneten, spindelförmigen Zellen (Abb. 40 b).



Abb. 40 a: **Subkonfluente Fibroblastenkultur:** Mikroskopisches Bild, Balken: 50 μm . Fibroblasten sind als unregelmäßig geformte Zellen zu erkennen.

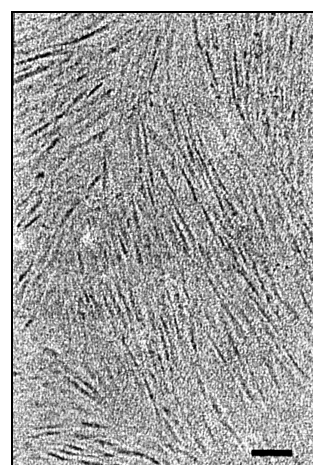


Abb. 40 b: **Konfluente Fibroblastenkultur:** Mikroskopisches Bild, Balken 50 μm . Die Zellen nehmen bei Konfluenz eine gestreckte, spindelartige Form an und sind parallel ausgerichtet.

Durch die Kulturführung mit einfach zusammengesetztem Fibroblastenmedium sowie den Verzicht auf zusätzliche Anheftungsfaktoren wurden Adhäsion und Wachstum von Fremdzellen (z.B. Keratinozyten, Endothelzellen) nicht unterstützt. Mittels Sterilkontrollen konnte eine Kontamination der Kulturen mit Bakterien, Pilzen und Mykoplasmen ausgeschlossen werden.

6.2.2 Zellexpansion in zweidimensionaler Kultur

6.2.2.1 Kulturmedium

Zur besseren Vergleichbarkeit von verschiedenen Ansätzen wurde bei allen Kulturen dieselbe Charge Fetalen Kälberserums (FKS) angewendet und auf den Zusatz von autologem Serum verzichtet. Das einfach zusammengesetzte Fibroblastenmedium aus DME-Medium unter Supplementation mit 10% FKS (Grinell 1994) förderte das Zellwachstum sehr gut.

6.2.2.2 Expansionspotential

Während der weiteren Expansion wurden die Zellen einmal wöchentlich durch Trypsinierung und nachfolgende Neueinsaat passagiert. Fibroblasten konnten bis zur 29. Passage erfolgreich geführt werden, jedoch nahm mit steigender Passagezahl die Zellproliferation ab. Dieses wird insbesondere ab der sechsten Passage an der Erhöhung der Generationszeit ersichtlich (Abb. 41).

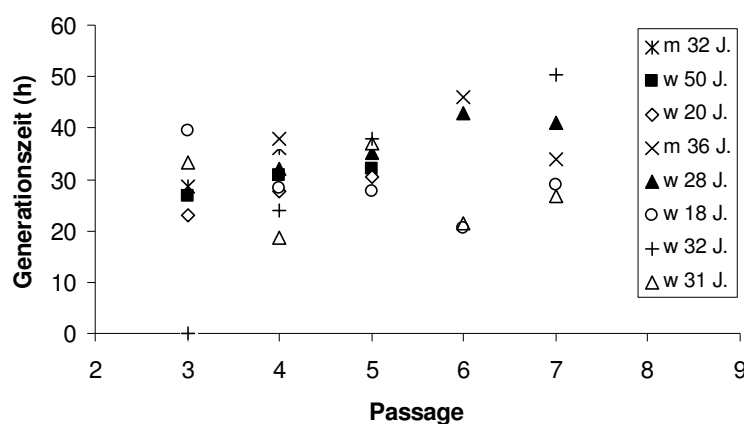


Abb. 41: **Generationszeit:**

Die Generationszeit verschiedener Passagen wurde in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt, n=6.

Eine mit zunehmender Passagezahl einhergehende Veränderung des Zellphenotyps bzw. Verminderung der Zellanheftung an die Kulturgefäße konnte nicht beobachtet werden.

Für eine potentielle klinische Bereitstellung von autologen Fibroblastenkulturen sind kurze Kulturzeiträume aufgrund eines möglichst klein gehaltenen Infektionsrisikos sowie einer schnellen Therapieoption erstrebenswert (Hohenberger 2002). Aus diesem Grund wurden nachfolgende Untersuchungen mit Fibroblasten niedriger Passagezahl (bis Passage 5) durchgeführt.

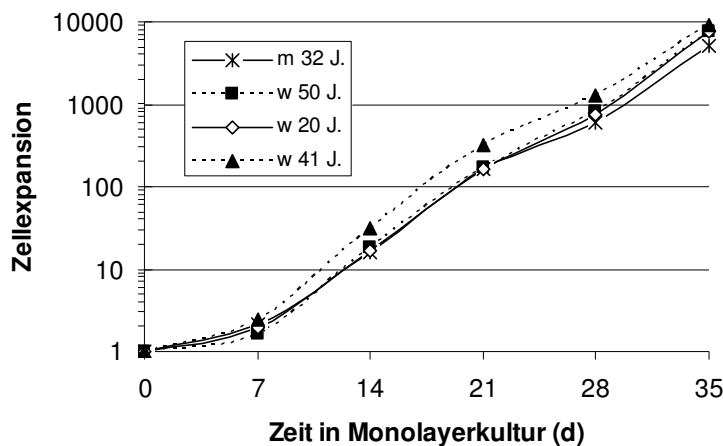


Abb. 42: **Zellexpansion in Monolayerkultur:** Fibroblasten wurden in Kulturflaschen vermehrt und bei ca. 90 % konfluentem Bewuchs durch Trypsinierung abgelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Neueinsaat.

Bis zur fünften Passage konnten die Fibroblasten mehr als 5000fach expandiert werden (Abb. 42).

6.3 Anzüchtung trägerbasierter Fibroblastenkulturen

Für das Tissue Engineering eines dreidimensionalen Weichgewebersatzes müssen die expandierten Fibroblasten mit einem Trägermaterial kombiniert werden. Die nachfolgend beschriebenen Versuche dienen der Optimierung der Zellbesiedelung der Matrix und der Charakterisierung der trägerbasierten Fibroblastenkulturen. Prinzipiell können die Art und Weise der Zelleinsaat auf das Trägermaterial (6.3.1), aber auch die nachfolgende Kulturführung, z.B. in statischer Kultur (6.3.2) bzw. in Perfusionskultur (6.3.3 bis 6.3.5), Einfluss auf die Materialbesiedelung nehmen.

6.3.1 Zelleinsaat

Für eine effiziente Zelleinsaat ist die Einsaatmethode (6.3.1.2., 6.3.1.5), aber auch die Einsaatzelldichte (6.3.1.3) und die für die Zelladhäsion zur Verfügung stehende Materialoberfläche (6.3.1.4) von großer Bedeutung. Zur Einschätzung der Einsaateffizienz muss eine Analysemethode herangezogen werden, die eine korrekte Quantifizierung der Zellzahl auf dem Trägermaterial zulässt (6.3.1.1).

6.3.1.1 Quantifizierung der Zellzahl auf dem Trägermaterial

Problematisch erweist sich die Quantifizierung der auf einem nicht transluzenten Trägermaterial gewachsenen Zellen, da die Trypsinierung der Zellen, die für eine nachfolgende Bestimmung der Zellzahl durch Auszählen notwendig ist, mikroskopisch nicht

hinsichtlich ihrer Effizienz beurteilt werden kann. Um das Risiko einer damit verbundenen Fehlbestimmung der Zellzahl zu vermeiden, wurde die intrazelluläre Laktatdehydrogenase-Aktivität zur Quantifizierung der Lebendzellzahl herangezogen. Das Enzym kann durch Tritonlyse vollständig aus Zellen freigesetzt werden (Middelkoop 1995; 3).

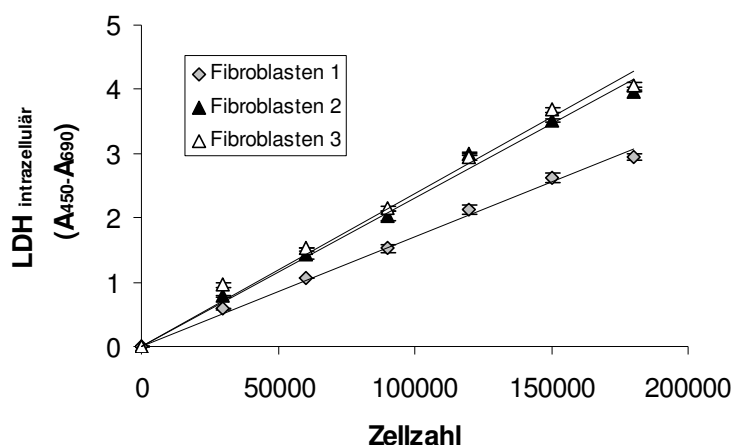


Abb. 43: **Intrazelluläre Laktatdehydrogenaseaktivität:** Die LDH wurde jeweils aus einer definierten Fibroblastenmenge durch Tritonlyse freigesetzt und mit dem LDH-Assay quantifiziert, n=3.

Es zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen Lebendzellzahl und intrazellulärer LDH-Aktivität (Abb. 43), die eine weitere Verwendung dieser Methode zur Bestimmung der Lebendzellzahl erlaubte.

6.3.1.2 Statische Zelleinsaat

Zur Zelleinsaat auf die Dermis wurde zunächst als einfach und schnell zu realisierendes Verfahren die "statische Zelleinsaat" genutzt. Die Zellsuspension wurde dafür einmalig auf die Oberfläche der Dermis pipettiert und durch kurzes Schwenken der Gefäße gut verteilt. Bereits nach wenigen Stunden waren bei mikroskopischer Kontrolle nur noch vereinzelt schwimmende Zellen zu erkennen. Anhand von histologischen Bildern sowie Wachstumsuntersuchungen konnte kein positiver Effekt einer mehrmaligen, zeitversetzten Einsaat auf dieselbe Besiedelungsfläche festgestellt werden, so dass weiterhin ein einmaliger Zellauftrag auf das Material angewandt wurde.

6.3.1.3 Einsaatzelldichte

Verschiedene Zelldichten wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur Zelleinsaat getestet, indem die nach Kultivierung aus dieser Einsaatzelldichte resultierende intrazelluläre LDH-Aktivität quantifiziert wurde (Abb. 44).

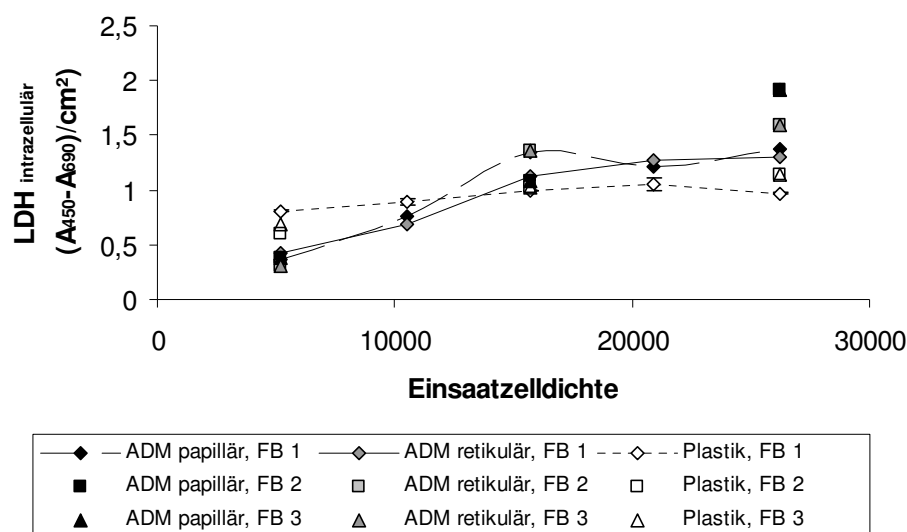


Abb. 44: **Optimierung der Einsaatzellichte:** Fibroblasten wurden mit verschiedenen Einsaatzellichten auf die papilläre bzw. retikuläre Seite azellulärer Dermis sowie auf Zellkulturplastik eingesät und für 7 Tage kultiviert. Nach Tritonlyse erfolgt die Messung der intrazellulären LDH, n=3.

Nach 7tägiger Kultivierung wurden bei allen Ansätzen höhere LDH-Aktivitäten als initial bei Einsaat gemessen, bei geringen Einsaatzellichten ist jedoch auf Zellkulturplastik ein besseres Wachstum zu verzeichnen als auf azellulärer Dermis. Erst bei einer Einsaatzellichte von $1,57 \text{ E4 Zellen/cm}^2$ sind die LDH-Aktivitäten bei Zellkultivierung auf Dermis größer als bei Zellkulturplastik, eine weitere Erhöhung der Einsaatzellichte zeigt keinen erheblichen Effekt. Nennenswerte Unterschiede der LDH-Aktivität nach Kultivierung der jeweils selben Fibroblastenzahl auf der papillären bzw. retikulären Seite der Dermis sind nicht ersichtlich. Schlussfolgernd daraus wurde nachfolgend für die Zelleinsaat auf azelluläre Dermis eine Zelldichte von $1,57 \text{ E4 Zellen/cm}^2$ verwendet.

6.3.1.4 Auswahl der Einsaatfläche

Als Oberfläche für die Zelladhäsion können prinzipiell beide Seiten der azellulären Dermis dienen, die papilläre Seite mit der Basalmembranstruktur sowie die retikuläre Seite mit einer lockeren Kollagenfasernanordnung. Um die Oberfläche zu identifizieren, die günstigere Adhäsionsbedingungen, wurde die Fibroblastenadhäsion auf beiden Seiten getestet.

Bereits nach 30 Minuten konnte eine gute Adhäsion der Fibroblasten an die verschiedenen Oberflächen (Zellkulturplastik, papilläre bzw. retikuläre Seite der Dermis) beobachtet werden, die nach zwei Stunden weitestgehend abgeschlossen war. Dabei zeigte sich, dass sich die nach Einsaat auf die papilläre bzw. retikuläre Seite erzielten Werte der intrazellulären LDH-Aktivität stark angleichen. Auch im Rahmen von histologischen Untersuchungen konnten keine seitenspezifischen Unterschiede in Zelladhärenz oder Wachstum festgestellt werden. Aus diesen Gründen sowie bedingt durch den Umstand, dass die lockere Faserstruktur der

retikulären Seite günstiger für das Einwachsen von Zellen in tiefere Strukturen erscheint, wurden im Folgenden die Fibroblasten auf die retikuläre Seite eingesät. Diese Annahme wurde durch spätere Versuchsergebnisse bestätigt.

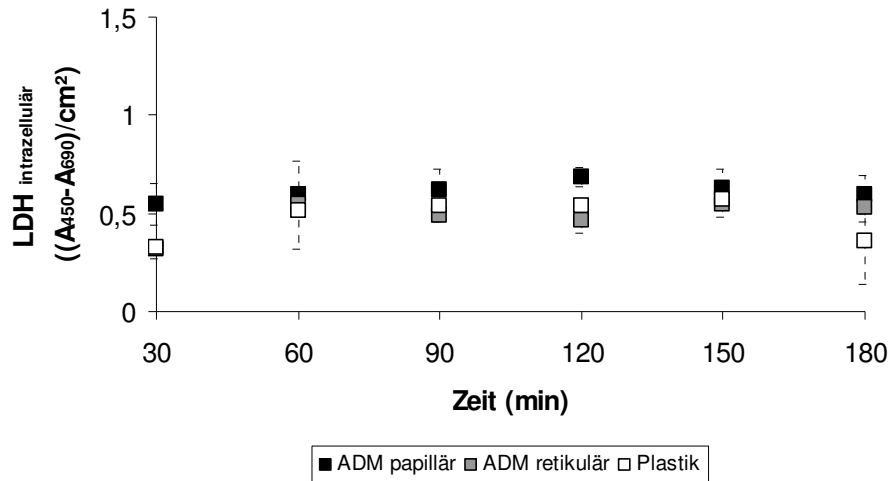


Abb. 45: **Adhäsionskinetik einer Fibroblastenkultur:** Mit einer Dichte von $1,57 \cdot 10^4$ Zellen/cm² wurden die Zellen auf die papilläre bzw. retikuläre Seite der Dermis sowie auf Zellkulturplastik eingesät. Die Adhäsion wurde anhand der intrazellulären LDH-Aktivität quantifiziert, n=3.

6.3.1.5 Dynamische Zelleinsaat

Um ein Eindringen der Zellen in die dermale Matrix zu befördern, wurden neben der „statischen Zelleinsaat“ weitere Einsaatmethoden untersucht. Da dieses Methodenspektrum eine Relativbewegung zwischen Trägermaterial und Zellsuspension nutzt, wird dafür nachfolgend der Begriff „dynamische Zelleinsaat“ verwendet.

Methode	Beschreibung	Wachstum	Zellen in Dermis?
a) <i>Injektion</i>	Zellinjektion in die Dermis	Schlecht	Nein
b) <i>Rühren</i>	Freie Flotation der Dermis in der Zellsuspension durch Rühren mit dem Magnetrührer	Mittel	Nein
c) <i>Rühren fixiert</i>	wie b), Dermis fixiert	Schlecht	Nein
d) <i>Zentrifugation</i>	Zentrifugation der Zellen auf die Dermis mit 1000 U/min, 10 min	Gut	<u>Ja</u>
e) <i>Einsaugen</i>	Einsaugen der Zellsuspension in die Dermis mit einer Vakuumpumpe	Schlecht	Nein
f) <i>Statisch</i>	Aufpipettieren der Zellen	Gut	Nein
g) <i>Schüttler</i>	Freie Flotation der Dermis in der Zellsuspension durch Schütteln mit einem Wippschüttler	Sehr gut	<u>Ja</u>

Tab. 21: **Anwendung verschiedener Methoden zur Zelleinsaat:** Nach Zelleinsaat wurden die Präparate für 10 Tage in statischer Kultur kultiviert und hinsichtlich des Wachstums und der Verteilung der Zellen in tieferen Dermissschichten analysiert.

Unmittelbar nach Zelleinsaat konnte bei der Methode *Injektion* eine Erhöhung der extrazellulären LDH-Aktivität festgestellt werden ($p > 0,01$, t -Test) (Abb. 46).

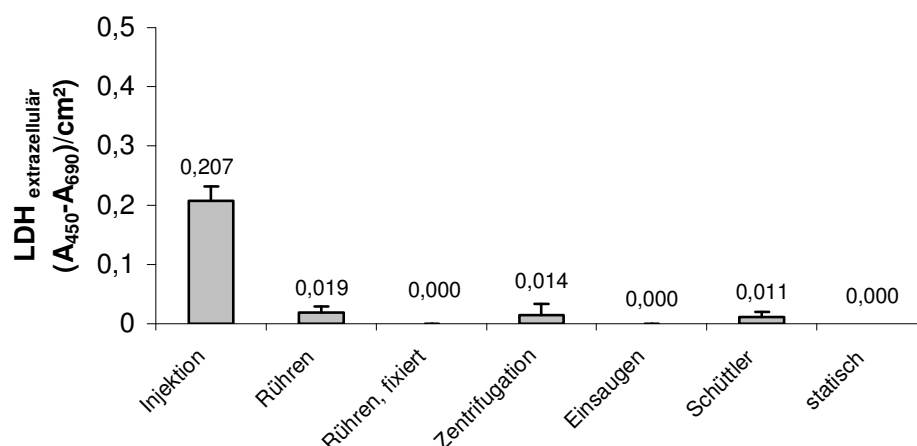


Abb. 46: **Extrazelluläre LDH-Aktivität nach Zelleinsaat:** Die extrazelluläre LDH-Aktivität wurde unmittelbar nach Durchführung der verschiedenen Einsaatmethoden in den Überständen gemessen, $n=3$.

Initial hatten sich die meisten Fibroblasten bei der Methode *Schüttler* an die Dermis angeheftet (Abb. 47). Hier und ebenso nach Zellauftrag durch Zentrifugation bzw. statische Zelleinsaat konnte ein gutes Fibroblastenwachstum beobachtet werden. Durch die etwas geringere Einsaat-effizienz bei den letzteren Methoden wurden jedoch insgesamt niedrige Zelldichten auf den besiedelten Trägermaterialien erzielt. Nach Zelleinsaat durch *Rühren* *fixiert*, *Einsaugen* bzw. *Injektion* waren so wenige bzw. keine Zellen an der Dermis adhärirt, dass keine signifikante Zellvermehrung, d.h. Erhöhung des intrazellulären LDH-Gehaltes, detektierbar war.

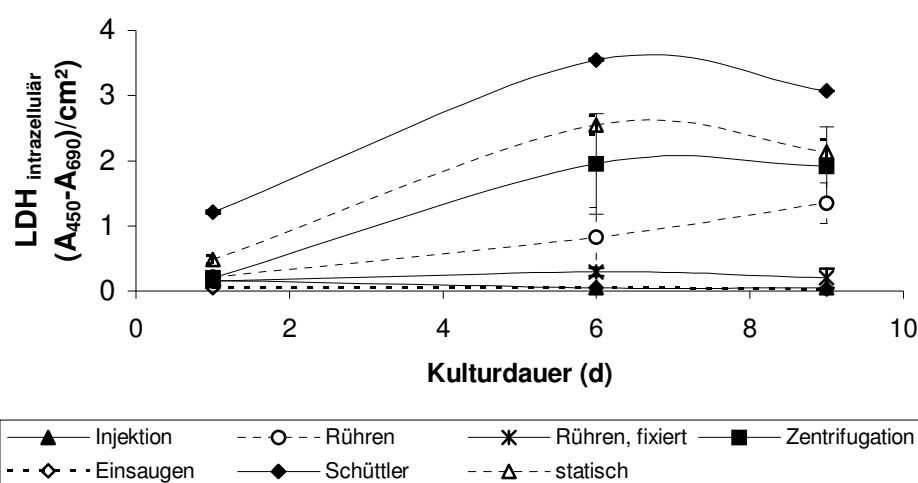


Abb. 47: **Intrazelluläre LDH-Aktivität nach dynamischer Zelleinsaat:** Die Präparate wurden für 10 Tage in statischer Kultur geführt und die intrazelluläre LDH-Aktivität nach Tritonlyse der Zellen bestimmt, $n=3$.

Eine weitere Ausdehnung der Inkubationszeit auf dem Wippschüttler von 4 auf 5 bzw. 6 Stunden bei der Methode *Schüttler* sowie eine Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit von 1000 auf 2000 bzw. 3000 U/min bei der Methode *Zentrifugation* brachte keine positiven

Effekte für die Besiedelung der Dermis, die Zellvitalität wurde dadurch jedoch nicht beeinträchtigt. Histologische Untersuchungen der Präparate nach 10tägiger Kultivierung ließen keine Veränderung der Dermismorphologie erkennen. Nach *statischer* Zelleinsaat (Abb. 48) bildete sich eine dichte, homogene Fibroblastenschicht auf der retikulären Dermisseite, das Innere der Dermis war zellfrei. Im Gegensatz dazu waren bei den Methoden *Schüttler* (Abb. 49) und *Zentrifugation* (Abb. 50) Fibroblasten auch in tieferen Dermissschichten nachweisbar, was eher der Fibroblastenanordnung in normaler humaner Haut entspricht (Abb. 51). Darüber hinaus waren nach Einsaat durch *Zentrifugation* die papilläre und retikuläre bzw. im Falle der Methode *Schüttler* die retikuläre Oberfläche homogen mit einer Fibroblastenschicht besiedelt. Ein Eindringen der Fibroblasten in tiefere Dermissschichten war ausgehend von der retikulären Seite zu beobachten.

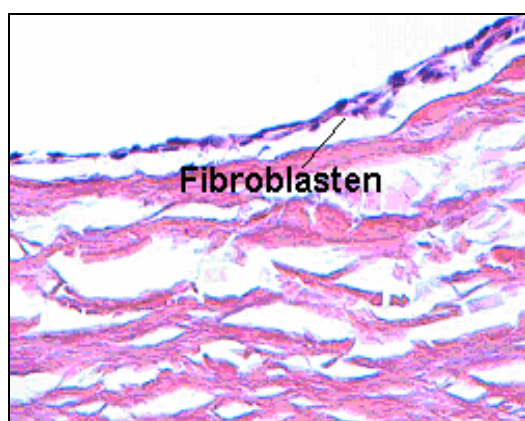


Abb. 48: **Dermis nach Fibroblasteneinsaat *statisch*:** histologisches Bild nach 10tägiger Kultivierung, HE-Färbung, 40fache Vergrößerung

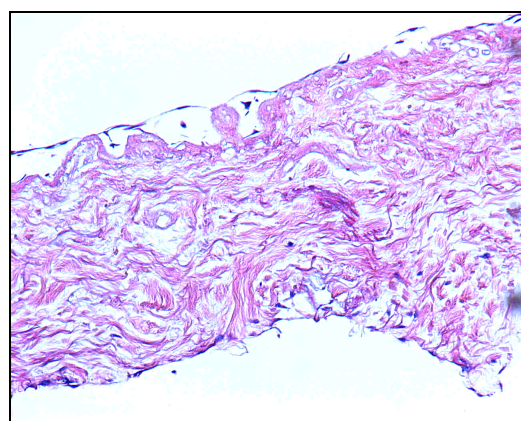


Abb. 49: **Dermis nach Einsaat *Zentrifugation*:** HE-Färbung nach 10tägiger Kultivierung, 25fach

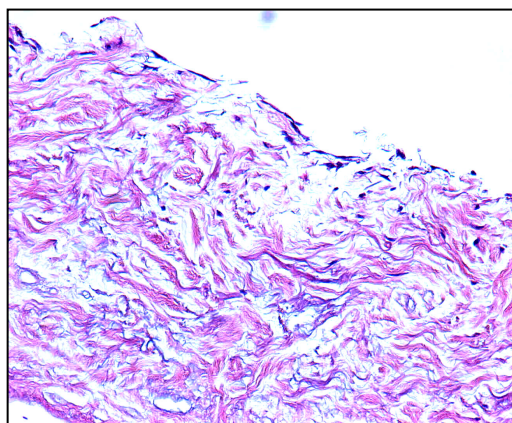


Abb. 50: **Dermis nach Fibroblasteneinsaat *Schütteln*:** HE-Färbung nach 10tägiger Kultivierung, 25fach.

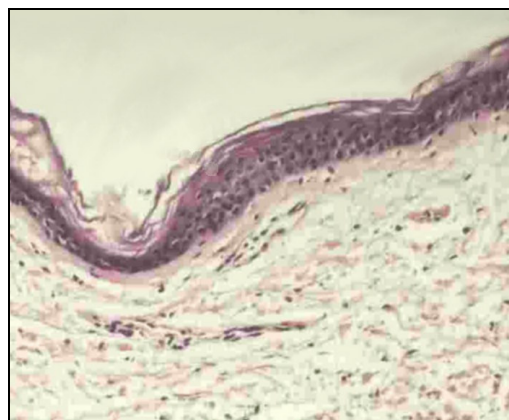


Abb. 51: **Humane Haut,** HE-Färbung, 25fach.

6.3.2 Besiedelung des Trägermaterials in statischer Kultur nach statischer Zelleinsaat

Bei den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurden Fibroblastenkulturen nach statischer Zelleinsaat auf verschiedene Matrizen in herkömmlichen Zellkulturgefäßen kultiviert (statische Kultur). Dabei wurden neben der azellulären Dermis auch Kollagengele (dreidimensionales Standardmodell, Prajapati 2000; Besseau 2002) und Zellkulturplastik (zweidimensionale Standardkultivierung, Schneider 1979; Schughart 2001) als Wachstumsgrundlage genutzt, um den Einfluss des Trägermaterials auf die Proliferation (6.3.2.1) und Stoffwechselaktivität (6.3.2.2) der Zellen zu evaluieren.

Aus Langzeitkulturen konnten Rückschlüsse über die Kontinuität von Wachstum und Syntheseleistung der Fibroblasten sowie über die Stabilität (6.3.2.3) und Eigenschaften (6.3.2.4) der besiedelten Präparate gezogen werden. Die dabei gewonnenen Daten wurden auf die intrazelluläre LDH-Aktivität bezogen, welche ein Maß für die Lebendzellzahl ist. Durch die Verwendung der spezifischen Größen konnte die Parameterquantität auf die Zellzahl normiert werden.

6.3.2.1 Zellproliferation

Nach 10tägiger Kultivierung wurden die höchsten intrazellulären LDH-Aktivitäten auf azellulärer Dermis erzielt (Abb. 52), eine Signifikanz gegenüber den Kulturen auf Zellkulturplastik konnte allerdings nicht aus den Werten gefolgert werden ($p > 0,01$, t-Test). In Kollagengelen waren bis zum 8. Kulturtag signifikant geringere intrazelluläre LDH-Aktivitäten als bei den übrigen Ansätzen messbar.

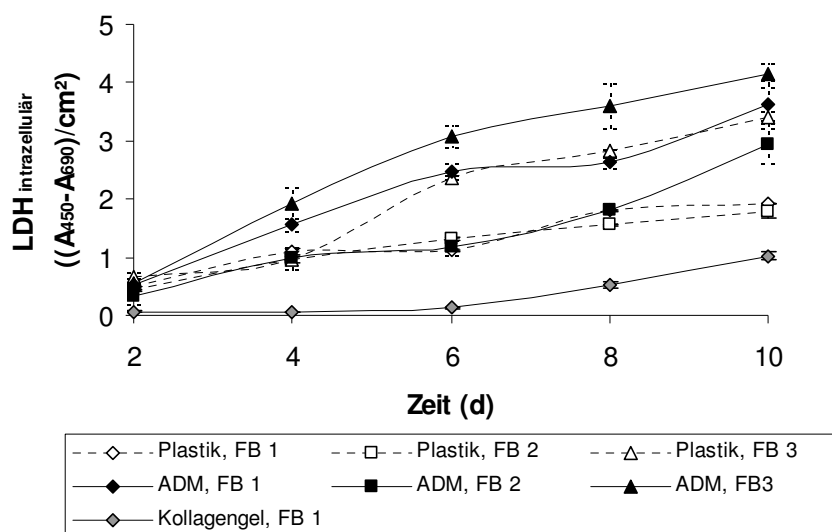


Abb. 52: **Wachstum von Fibroblasten auf verschiedenen Kulturoberflächen:** Fibroblasten wurden auf die retikuläre Seite azellulärer Dermis (ADM, n=3), auf Zellkulturplastik (Plastik, n=3) und in Kollagen-I-Gel (n=6) eingesät.

Ob sich eine länger andauernde Kultivierung positiv auf die Fibroblastenproliferation auswirkt, wurde in Langzeitkulturen getestet. Dabei war eine mit zunehmender Kulturdauer einhergehende Reduzierung der spezifischen DNS-Synthese nachweisbar, die ab der zweiten Kulturwoche annähernd gleiche Werte annimmt (Abb. 53).

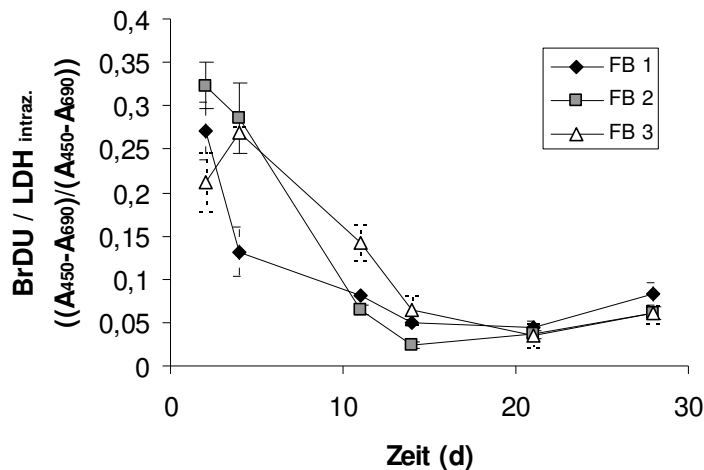


Abb. 53: **DNS-Synthese bei Langzeitkultivierung:** Fibroblasten wurden in statischer Kultur auf ADM kultiviert und die DNS-Synthese im BrDU-Assay bestimmt, (n=3).

6.3.2.2 Stoffwechselaktivität

Der Einfluss längerer Kulturzeiträume auf die mitochondriale Stoffwechselaktivität wurde mit Hilfe des MTT-Testes untersucht. Wie aus Abb. 54 ersichtlich wird, nahm auch die mitochondriale Stoffwechselaktivität mit zunehmender Kulturdauer ab und erreichte dann annähernd gleich bleibende Werte.

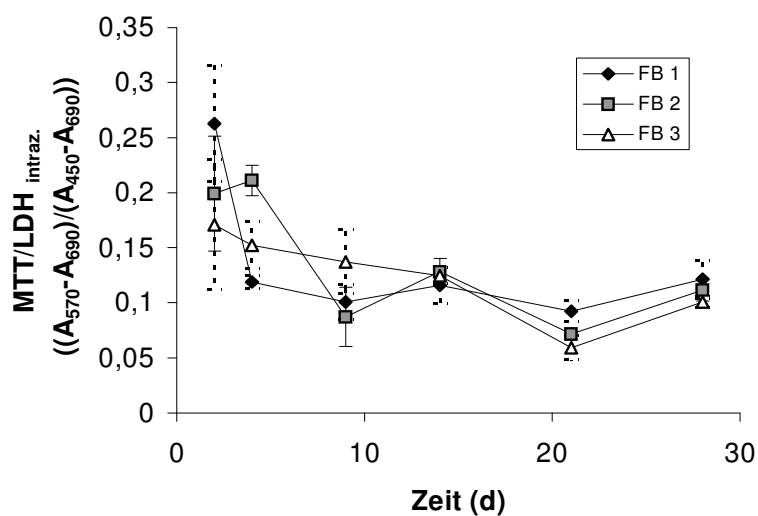


Abb. 54: **Mitochondriale Stoffwechselaktivität:** Aktivität bei Langzeitkultivierung auf ADM, n=3.

Kollagen wurde als wichtigstes von den Fibroblasten gebildetes Protein der extrazellulären Matrix (Ehrlich 1995; Herrick 1996) zur Charakterisierung der Syntheseleistung der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den Kulturüberständen quantifiziert.

Wie Abb. 55 zeigt, waren im Allgemeinen bei auf Dermis bzw. Zellkulturplastik gezüchteten Fibroblasten keine signifikanten Unterschiede in der Kollagenausschüttung ersichtlich, die Kollagenkonzentration in den Kulturüberständen nahm mit zunehmender Kulturdauer ab. Von zellfreier Dermis wurde kein Kollagen abgegeben. Kollagengele wurden nicht in die Untersuchung einbezogen werden, da eine Kollagenfreisetzung aufgrund des Strukturverlustes der Gele nicht ausgeschlossen werden konnte.

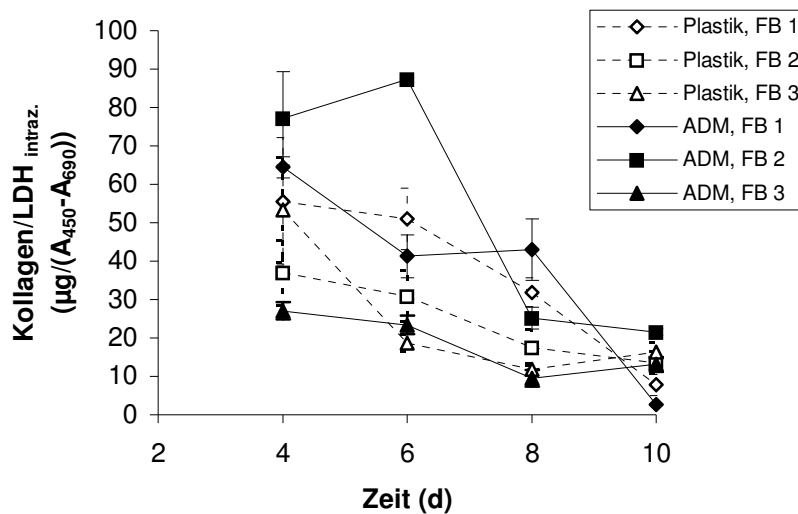


Abb. 55: **Kollagen im Kulturüberstand:** Fibroblasten wurden auf ADM bzw. auf Zellkulturplastik kultiviert. Die Kollagenmenge wird auf die bei der Ermittlung der intrazellulären LDH-Aktivität gewonnene Absorption bezogen, n=3.

Die Abnahme der Kollagenausschüttung in den Kulturüberstand bestätigte sich auch bei Langzeitkulturen. Ab der 2. Woche konnten konstante Kollagenmengen im Überstand detektiert werden (Abb. 56).

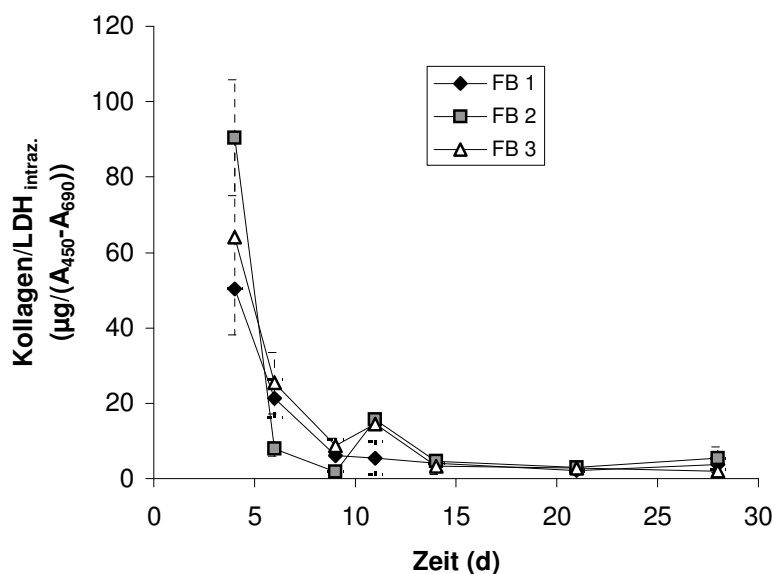


Abb. 56: **Kollagen im Kulturüberstand bei Langzeitkulturen:** Bei Besiedelung von ADM mit Fibroblasten wurde die Kollagenmenge im Kulturüberstand bestimmt, n=3.

Von Fibroblasten ausgeschüttete Kollagenasen können erheblich zur Remodellierung einer Matrix beitragen (Winter 1997; Hafemann 1999). Neben potentiellen Auswirkungen auf die Stabilität kollagenhaltiger Materialien bei ihrer Anwendung im Tissue Engineering kann bei anschließender Transplantation der besiedelten Präparate ein Einfluss der Enzyme auf das Transplantatlager nicht ausgeschlossen werden (Wysocki 1993).

Die Kollagenase kann sowohl als aktives Enzym als auch als inaktives Enzym (Proenzym) vorliegen. Das Proenzym kann zur aktiven Enzymform umgewandelt werden und dann seine kollagenolytische Aktivität entfalten (Seltzer 1994; Zerveola 2000).

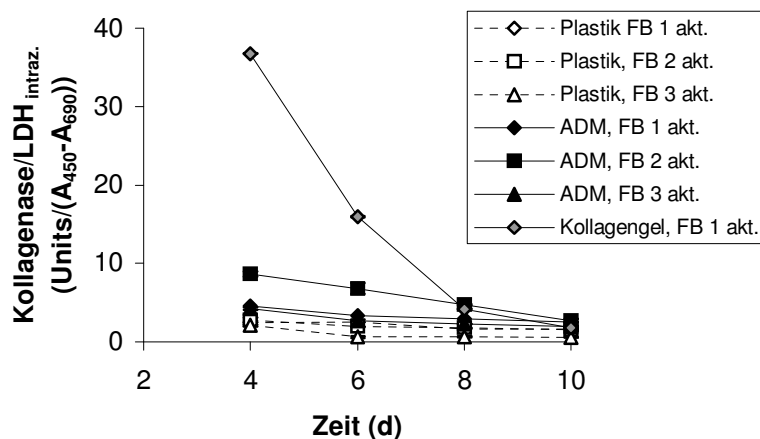


Abb. 57a: **Aktive Kollagenase im Kulturüberstand:** Die aktive Enzymform wird anhand der Kollagenspaltung im Kollagenaseassay quantifiziert, n=3.

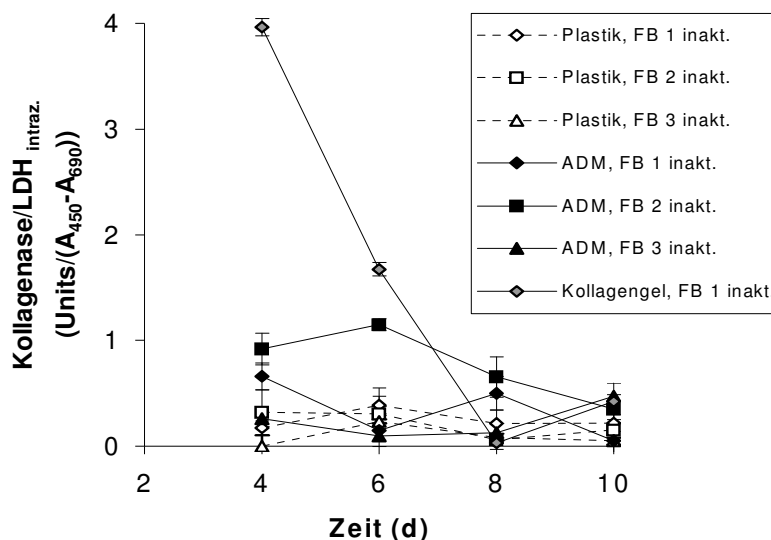


Abb. 57b: **Inaktive Kollagenase:** Die Aktivität des Proenzym wurde nach vorheriger Trypsinaktivierung ermittelt, n=3.

In Relation zur aktiven Kollagenaseform liegt nur ein geringer Anteil des Enzyms, maximal 10%, als inaktive Prokollagenase vor. Die Prokollagenasefreisetzung in den Überstand nimmt jedoch tendenziell einen ähnlichen, zeitabhängigen Verlauf. Für alle Ansätze ist eine mit Kulturdauer abnehmende Kollagenaseausschüttung feststellbar. In Überständen von Kollagengelen ließen sich im Vergleich zu auf Dermis bzw. Zellkulturplastik gezüchteten Fibroblastenkulturen bis zum 6. Tag signifikant höhere Mengen ($p < 0,01$, t-Test) für die aktive

(Abb. 57 a) und inaktive Enzymform nachweisen (Abb. 57 b). Zwischen Dermis- bzw. Zellkulturplastik-basierten Fibroblasten waren keine signifikanten Unterschiede in der Kollagenaseausschüttung ersichtlich.

Auch bei Langzeitkultivierung von Fibroblasten auf azellulärer Dermis zeigte sich, dass die aktive Enzymform dominiert (Abb. 58). Die im Überstand detektierbare Enzymmenge nimmt mit bis zur zweiten Woche fallenden und danach annähernd konstanten Werten für beide Enzymformen einen qualitativ ähnlichen Verlauf an, jedoch ist in der letzten Hälfte der Kulturzeit nur noch die aktive Enzymform nachweisbar.

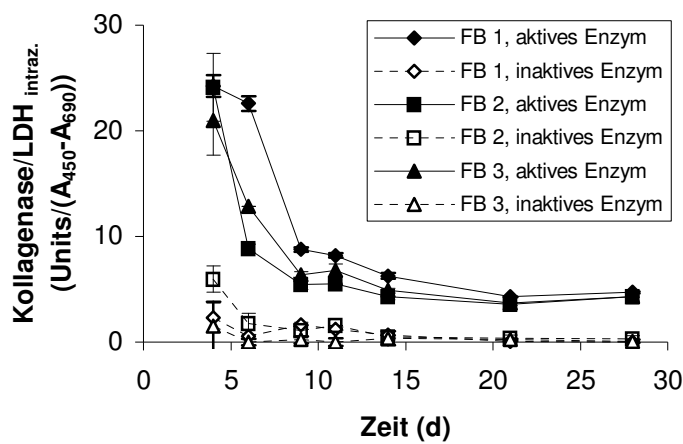


Abb. 58: **Kollagenaseaktivität von Langzeitkulturen:** In Kulturüberständen von besiedelter ADM wird die Menge des aktiven und des inaktiven Enzyms bestimmt, n=3.

6.3.2.3 Stabilität des Trägermaterials

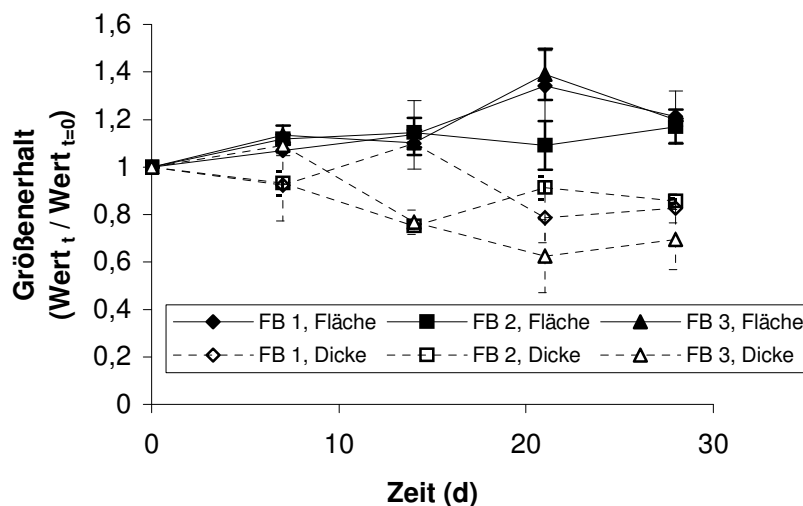


Abb. 59: **Größenerhalt besiedelter Dermis:** Fibroblasten wurden in statischer Kultur auf ADM kultiviert und die Präparatedicke und -fläche zu unterschiedlichen Zeitpunkten vermessen, n=3.

Inwieweit mit Fibroblasten besiedelte Dermis der Kontraktion unterworfen ist, wurde anhand der Präparateabmessungen analysiert (Abb. 59). Dabei war eine Verringerung der Präparatedicke nach zwei- bzw. dreiwöchiger Besiedelung erkennbar, die aber nur bei der

Fibroblastenkultur 3 signifikant war ($p < 0,01$, t-Test). Bei den Präparateflächen konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Ausgangswerten identifiziert werden.

Im Gegensatz dazu zeigten mit Fibroblasten besiedelte Kollagengele bereits nach den ersten vier Kulturtagen eine signifikante Kontraktion ($p < 0,01$, t-Test), die sich in der Dickenabnahme der Gele auf 65% der Ausgangsdicke bemerkbar machte (Abb. 60). Der Durchmesser der Gele blieb unverändert, die Stabilität nahm jedoch mit zunehmender Kulturzeit erheblich ab. Nach Exzision aus den Wells zerflossen die Gele oftmals.

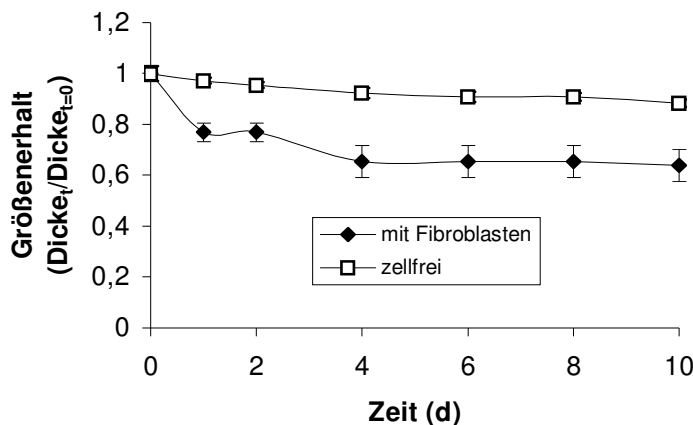


Abb. 60: **Größenerhalt von Kollagengelen:** Fibroblasten wurden in Kollagengele eingeschlossen, parallel dazu wurden zellfreie Gele geführt, $n=6$.

Die von Zellen ausgeschüttete Kollagenase kann durch Verdau des Kollagens die Stabilität kollagener Trägermaterialien herabsetzen (Winter 1997; Hafemann 1999). Inwieweit die Fibroblastenbesiedelung der Dermis zu einer Reduktion der Materialstabilität führte, wurde anhand der verbliebenen Kollagenaseresistenz der Dermis getestet.

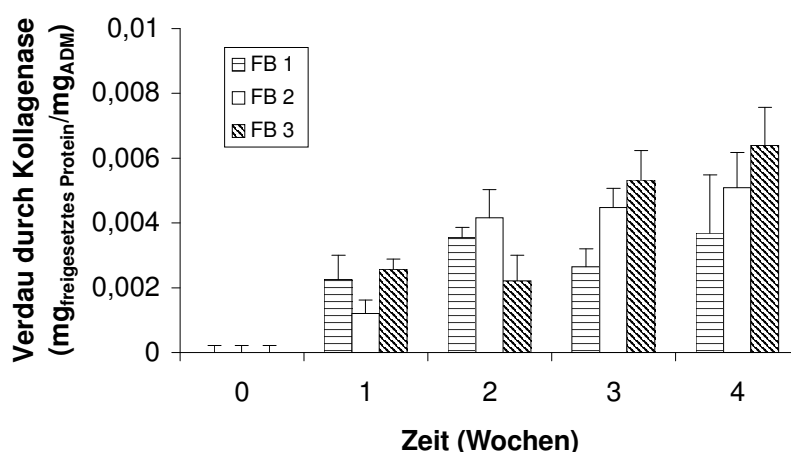


Abb. 61: **Kollagenaseresistenz besiedelter ADM:** Die Präparate wurden einem vierstündigen Verdau mit 10 U/ml Kollagenase I unterworfen, $n=3$.

Der Verdau besiedelter Dermis durch Kollagenase (Abb. 61) nahm mit zunehmender Kulturdauer zu, so dass höhere Proteinmengen freigesetzt wurden. Die Kollagenaseresistenz ist trotzdem als hoch einzustufen.

6.3.2.4 Charakterisierung der besiedelten Präparate

In histologischen Untersuchungen der Dermis konnten auch bei längerer Besiedelung keine Unterschiede in der dermalen Struktur festgestellt werden. Die dermale Matrix, die Basalmembran an der *dermo-epidermalen junction* sowie die Basallamina der früheren Gefäße blieben erhalten. Histologische Bilder zeigten nach statischer Einsaat und statischer Kulturführung eine kontinuierliche, mehrlagige Besiedelung der retikulären Oberfläche der Dermis mit spindelförmigen, parallel zueinander angeordneten Fibroblasten. Eine länger als zwei Wochen währende Kultivierung wirkte sich nicht positiv auf den Grad der Besiedelung aus, gleichwohl blieb die Anordnung der Fibroblastenschicht auch bei 4wöchiger Kultivierung erhalten. Ein Einwandern der Fibroblasten in tiefere Dermissschichten konnte nach statischer Zelleinsaat und statischer Kultivierung zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (vgl. auch 6.3.1.5 Abb. 47).

Inwieweit die Zellen neu synthetisierte extrazelluläre Matrix in das Präparat einbauten, wurde anhand der Kollagenmenge im Präparat evaluiert. Neu synthetisiertes Kollagen ist noch nicht quervernetzt und kann deshalb durch Pepsin aus der Dermis gelöst werden (Ehrlich 1995).

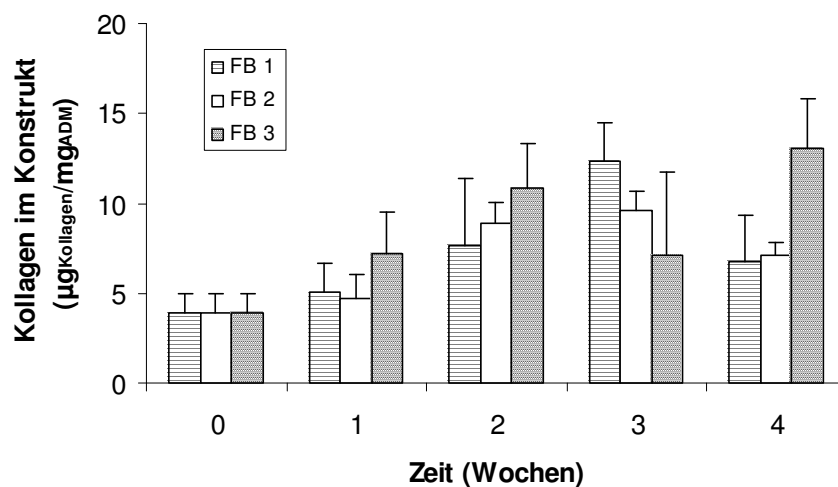


Abb. 62: **Kollagen-einbau in ADM:** Neu synthetisiertes Kollagen wird durch Pepsinverdau aus der Dermis freigesetzt und im Kollagenassay quantifiziert, n=3 bzw. n=6 für unbesiedelte ADM (0 Wochen).

Es konnte bei diesen Untersuchungen ein bis zur zweiten bzw. zur dritten Kulturwoche ansteigender Gehalt an nicht quervernetztem Kollagen in der Dermis detektiert werden (Abb. 62). Durch die sich zeitlich daran anschließende Quervernetzung des Kollagens und seine stärkere Ablagerung in der Dermis wird der Anteil nicht quervernetzten Kollagens reduziert. Damit kann beim Pepsinverdau weniger (nicht quervernetztes) Kollagen aus der Dermis freigesetzt werden, die gemessenen Kollagenkonzentrationen sinken demzufolge wieder in der 3. bzw. 4. Woche.

6.3.3 Etablierung eines Perfusionssystems

Prinzipiell können Zellkulturen neben den bereits im vorherigen Kapitel (6.3.2) betrachteten statischen Kulturen auch in einem Perfusionssystem geführt werden. Zu Evaluierung, ob sich eine Strömung positiv auf die Fibroblastenbesiedelung der azellulären Dermis auswirkt, wurde ein Perfusionssystem etabliert (6.3.3.1) und hinsichtlich der für die Fibroblasten geeigneten hydrodynamischen Bedingungen charakterisiert (6.3.3.2).

6.3.3.1 Technische Umsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Perfusionssystem angewendet, welches eine Durchströmung der Präparate gestattet. Da keine kommerzielle Lösung verfügbar war, wurde ein System eigens dafür zusammengestellt. Als Perfusionskammern wurden autoklavierbare Filterhalter aus Polypropylen genutzt und die zwei Tage lang statisch besiedelte azelluläre Dermis anstelle des Filters eingefügt. Der ursprüngliche Aufbau des Filterhalters musste dazu leicht verändert werden, da er einen Press-Fit des gesamten Materials vorsah und dadurch eine Schädigung der Zellen zu befürchten war (Abb. 63). Dazu wurde ein Filtereinsatz entfernt und jeweils ein 1 cm² messendes Stück Dermis, mit der besiedelten retikulären Seite zu Flüssigkeitseintritt weisend, auf den verbliebenen Filterhalter platziert.

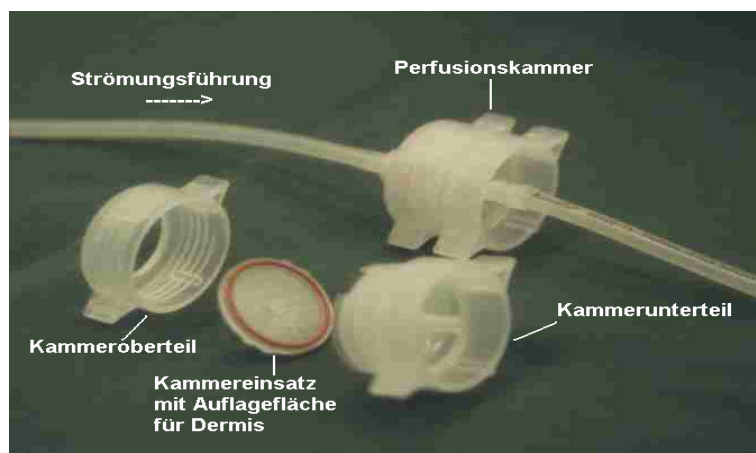


Abb. 63: **Modifikation des Filterhalters als Perfusionskammer.** Der Durchmesser des Kammereinsatzes beträgt 2,2 cm.

Zur Perfusion stand lediglich eine Peristaltikpumpe mit relativ großen geförderten Volumenströmen zur Verfügung. Die in den nachfolgenden Versuchen verwendeten Volumenströme mussten aufgrund dieser Gegebenheiten gewählt werden. Um parallele Untersuchungen an mehreren Perfusionskammern zu ermöglichen und gleichzeitig die Volumenströme der Pumpe zu reduzieren, wurden jeweils 4 Perfusionskammern parallel

perfundiert (Abb. 64). Der von der Pumpe geförderte Volumenstrom wurde durch eine Pumpenkalibrierung ermittelt. Zur Sicherstellung einer gleichen Durchströmung der Kammern wurden jeweils identische Längen und Durchmesser der Schläuche sowie eine identische räumliche Positionierung gewählt. Es zeigte sich, dass alle Kammern mit identischen Volumenströmen perfundiert wurden.

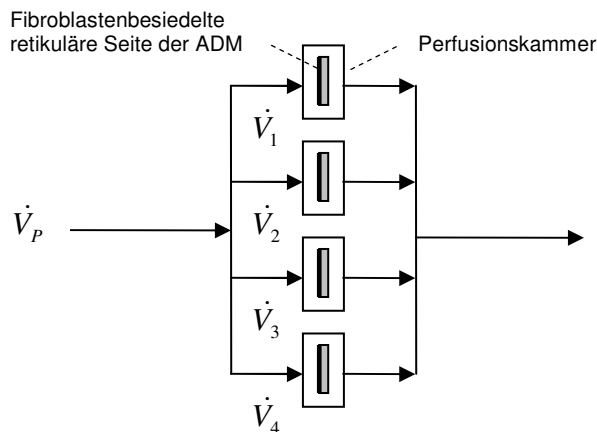


Abb. 64: **Strömungsführung in den vier parallel perfundierten Kammern.**

Der Zusammenhang der Volumenströme lässt sich folgendermaßen ausdrücken:

$$\dot{V}_P = \dot{V}_1 + \dot{V}_2 + \dot{V}_3 + \dot{V}_4 \quad (21)$$

$\dot{V}_P$ von der Pumpe geförderter Volumenstrom (ml/h)

$\dot{V}_1, \dot{V}_2, \dot{V}_3, \dot{V}_4$ in die jeweilige Perfusionskammer eintretender Volumenstrom (ml/h)

Bei Äquivalenz der Volumenströme gilt: $\dot{V}_1 = \dot{V}_2 = \dot{V}_3 = \dot{V}_4 = \frac{\dot{V}_P}{4} \quad (22)$

Perfusionskammern und Medienflaschen wurden im Brutschrank geführt. Durch Oberflächenbegasung erfolgte der Eintrag von Sauerstoff und CO₂ in die Vorlageflaschen.

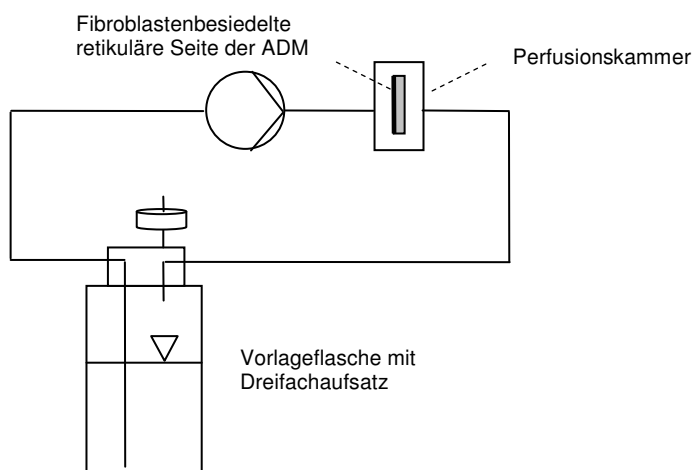


Abb. 65: **Schematischer Aufbau des Perfusionskreislaufes.** Zur Übersichtlichkeit wurde nur eine Perfusionskammer dargestellt.

6.3.3.2 Perfusionsoptimierung

Um geeignete hydrodynamische Bedingungen für nachfolgende Reaktorläufe auswählen zu können, wurden verschiedene Perfusionsbedingungen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf Zelladhärenz, Verteilung und Vitalität untersucht. Dabei wurden besiedelte Präparate jeweils für 24 Stunden (Lelkes 1991; Papadaki 1996) den drei kleinsten durch die Pumpe förderbaren Volumenströmen (121,8 ml/h, 192 ml/h, 294 ml/h) ausgesetzt. Zur Quantifizierung der unter den Perfusionsbedingungen vorliegenden hydrodynamischen Parameter mussten zunächst die Berechnungsgrundlagen für zellbesiedelte Dermis aufgestellt werden. Zur besseren Darstellung des Zusammenhanges werden diese nachfolgend erläutert.

6.3.3.2.1 Berechnungsformeln für perfundierte, zellbesiedelte Dermis

In diesem Zusammenhang stellt sich zunächst die Frage nach dem Verlauf der Strömung beim Eintritt in die Perfusionskammer. Prinzipiell sind zwei verschiedene Strömungswege denkbar: die Umströmung der Dermis (Abb. 66) sowie die Durchströmung des Materials (Abb. 67).

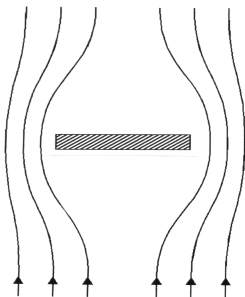


Abb.66: Strömungsverlauf bei Umströmung der ADM.

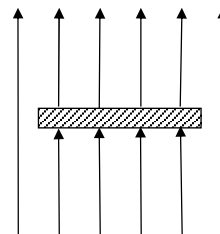


Abb. 67: Strömungsverlauf bei Durchströmung

Aufgrund der Gegebenheiten beim Stofftransport durch humane Haut (Bodde 1991; Forth 1996) kann davon ausgegangen werden, dass auch die Dermis für Flüssigkeiten permeabel ist. Das eigentliche Barriersystem der Haut (Stratum corneum) (Elias 2001) ist in der azellulären Dermis nicht erhalten. So zeigte sich bereits bei den Perfusionsuntersuchungen an zellfreien Präparaten (6.1.3.2.2), dass azelluläre Dermis eine gute Permeabilität für wässrige Lösungen aufweist. Wie bei den nachfolgenden Kalkulationen deutlich wird, liegen auch in der besiedelten Dermis vergleichsweise große Durchtrittskanäle vor, durch die eine Strömung erfolgen kann (vgl. Tab. 21). Deshalb wird bei den nachfolgenden Berechnungen davon ausgegangen, dass die Dermis von der Flüssigkeit durchströmt wird (Abb. 67).

Bei der besiedelten Dermis handelt es sich um ein poröses Medium, in dem die Zellen eingebettet sind. Die Porosität des Gewebes wird insbesondere durch die Kollagenfaseranordnung bestimmt (Carrier 2002). Für die Berechnungen wird angenommen, dass die Präparate aus gleichartigen und gleich angeordneten (kollagenen) Fasern bestehen und die Zellen in ihnen regelmäßig verteilt sind. Gemäß Carrier (Carrier 2002) werden die Berechnungsgrundlagen von Perry (Perry 1989) für durchströmte, zellbesiedelte Porensysteme angewendet.

Insbesondere die durch die Strömung hervorgerufene *Schubspannung* ist kritisch für den Erhalt von Zelladhärenz und –vitalität. Die Berechnung der auf die Zellen wirkenden Schubspannung erfolgt unter den Voraussetzungen, dass

- a) die Strömung gleichmäßig durch das gesamte Präparat hindurch tritt,
- b) die Wände des Perfusionsystems starr sind,
- c) die Strömung stationär verläuft,
- d) das Fluid inkompressibel ist,
- e) die Trägheitskräfte vernachlässigbar sind.

Die mittlere Schubspannung τ_m lässt sich als Quotient von auf die Faseroberfläche wirkender Reibungskraft F_z und Faseroberfläche S formulieren:

$$\tau_m = \frac{F_z}{S} \quad (23)$$

τ_m mittlere Schubspannung [N/m²]

F_z Reibungskraft [N]

S Faseroberfläche [m²]

Zusätzlich zu den Reibungskräften treten Druckkräfte auf. Die Druckkräfte wirken auf den Präparatequerschnitt und können wie folgt dargestellt werden:

$$F = \Delta p * A \quad (24) \quad \text{mit} \quad A = \frac{V}{L} \quad (25)$$

A Querschnittsfläche des Präparates [E-4 m²]

V Präparatvolumen [2E-8 m³]

L Gesamtlänge des perfundierten Präparates in der Strömungsrichtung [2E-4 m]

Δp Druckverlust über das perfundierte Präparat [Pa]

F Druckkraft [N]

Druckkraft und Reibungskraft stehen im Gleichgewicht, dafür kann folgende Kräftebilanz aufgestellt werden:

$F = F_z$, mit den Ausdrücken 23 und 24 für die Kräfte folgt:

$$\Delta p * A = \tau_m * S \quad (26)$$

Damit lässt sich folgende Formel für die mittlere Schubspannung aufstellen:

$$\tau_m = \frac{\Delta p}{L} * \frac{V}{S} \quad (27)$$

Da der Druckverlust bei Durchströmung des Präparates nicht bekannt ist, muss er in Gleichung 27 durch einen anderen Ausdruck ersetzt werden. Dabei kann bei vernachlässigbaren Trägheitskräften das Darcy'sche Strömungsgesetz für die Beschreibung eines konvektiven Flusses durch ein Porensystem herangezogen werden (Mähr 2001, Schäfer 2004).

$$\text{Strömungsgesetz nach Darcy} \quad w_o = \frac{\Delta p * k}{L * \eta} \quad (28)$$

k Permeabilität des Präparates [m²]

w_o Flüssigkeitsgeschwindigkeit an der Oberfläche des Präparates [m/s]

η Viskosität des Fluides [Ns/m²], für Zellkulturmedium 0,0007 Ns/m² bei 37 °C (Carrier 2002)

Im Gesetz von Darcy wird berücksichtigt, dass in einem Porensystem der Stofffluss nur durch die Poren erfolgen kann. Der auch als Durchlässigkeitsbeiwert bezeichnete Faktor k kennzeichnet die Permeabilität des Porensystems. Unter Anwendung des Gesetzes von Darcy kann der Druckverlust substituiert werden.

$$\frac{\Delta p}{L} = \frac{\eta * w_o}{k} \quad (29)$$

Nach Einsetzen von Gleichung 29 in Gleichung 27 sowie Darstellung des Ausdruckes S/V als Funktion der Konstrukthohlraumfraktion ε_p und des Faserdurchmesser d_p (Carrier 2002) folgt:

$$\tau_m = \frac{\eta^* w_O}{k} * \frac{d_p}{4 * (1 - \varepsilon_p)} \quad (30)$$

ε_p Konstrukthohlraumfraktion

d_p Durchmesser einer mit Zellen beschichteten Kollagenfaser [12,8 E-6 m]; (Perry 1989; Saidi 1995)

Die Permeabilität k des Präparates hängt von der Größe, Menge und Anordnung der Fasern ab. Im Falle der Dermis besteht das Porensystem aus einem Fasernetzwerk, die Permeabilität kann nach der analytischen Permeabilitätsfunktion von Kozeny-Carman für Fasernetzwerke berechnet werden (zitiert durch Vomhoff 1998):

$$k = \frac{r_f^2}{4} * \frac{\varepsilon_p^3}{K * (1 - \varepsilon_p)^2} \quad (31)$$

r_f Radius der Strömungskanäle [m]

K Kozeny-Konstante, $K=5,55$ für Fasernetzwerke (Vomhoff 1998)

Der mittlere Kollagenfaserdurchmesser in humaner Haut misst nach *Saidi* (Saidi 1995) 2,8 μm . Bei einer homogenen Besiedelung mit einer 5 μm dicken Zellschicht (Perry 1988) beträgt folglich der Durchmesser d_p einer besiedelten Faser 12,8 μm . Der Radius der Strömungskanäle in humaner Haut variiert zwischen 10 und 62,5 μm (Pins 2000); für die Berechnung wird ein gemittelter Wert von 36,25 μm zu Grunde gelegt.

Die Konstrukthohlraumfraktion ε_p hängt von der Volumenfraktion der Zellen ε_z und der Fasern ε_F in der Dermis ab. Die Volumenfraktion kollagener Fasern beläuft sich in humaner Dermis auf 0,21 (Saidi 1995). Damit kann die Konstrukthohlraumfraktion errechnet werden, wenn die Volumenfraktion der Zellen bekannt ist.

$$\varepsilon_p = 1 - \varepsilon_z - \varepsilon_F \quad (32)$$

ε_z Volumenfraktion der Zellen

ε_F Volumenfraktion der Fasern [0,21] (Saidi 1995)

Zur Berechnung der Volumenfraktion der Zellen wird die zu Perfusionsbeginn vorliegende Zellzahl im Präparat herangezogen. Die Volumenfraktion der Zellen entspricht dem Quotienten aus dem Volumen aller im Präparat befindlichen Zellen ($V_{Z,ges.}$) und dem Präparatevolumen. Das Gesamtzellvolumen kann aus der Zellzahl im Präparat und dem Volumen einer Zelle errechnet werden.

$$\varepsilon_Z = \frac{V_{Z,ges.}}{V} = \frac{N * V_Z}{V} \quad (33)$$

N	Zellzahl im Präparat
V_Z	Volumen einer Zelle [1,77 E-15 m ³] (Carrier 2002)
$V_{Z,ges.}$	Gesamtvolumen der Zellen im Präparat [m ³]

Zur Bestimmung der Zellzahl wird die intrazelluläre LDH-Aktivität des Präparates herangezogen. Anhand der zuvor bestimmten intrazellulären LDH-Aktivität pro Zelle (siehe 6.3.1.1) kann die Gesamtzellzahl im Präparat ermittelt werden.

$$N = \frac{A_{LDH \text{ int } raz., ges.}}{A_{LDH \text{ int } raz., Zelle}} \quad (34)$$

$A_{LDH \text{ int } raz., ges.}$	intrazelluläre LDH-Aktivität des Präparates [A ₄₅₀ -A ₆₉₀]
$A_{LDH \text{ int } raz., Zelle}$	intrazelluläre LDH-Aktivität einer Zelle [A ₄₅₀ -A ₆₉₀]

Als Kriterium für die Beschreibung der Art der Strömung (laminar oder turbulent) wird die Reynoldszahl herangezogen. Der Übergang von laminarer Strömung zu turbulenter Strömung tritt in Mikrosystemen bereits bei Reynoldszahlen von 200 bis 700 auf (Klemm 2003). Die Reynoldszahl gibt das Verhältnis von Trägheitskraft zu Reibungskraft an, bei sehr kleinen Reynoldszahlen kann von hohen Reibungskräften und geringen Trägheitskräften ausgegangen werden. Die Reynoldszahl (Re) kann berechnet werden nach:

$$Re = \frac{w_o * d_p * \rho}{\eta} \quad (35) \quad \text{mit} \quad w_o = \frac{\dot{V}}{A_K} \quad (36)$$

ρ	Dichte [kg/m ³], nach Carrier beträgt die Mediendichte bei 37 °C 1,03 E3 kg/m ³ (Carrier 2002)
$\dot{V}$	Volumenstrom des Mediums [m ³ /s]
A_K	Querschnittsfläche der Perfusionskammer [m ²]

Tabelle 21 fasst die zur Berechnung der hydrodynamischen Größen verwendeten Strukturparameter besiedelter humaner Dermis zusammen. Dabei bestätigt sich, dass trotz der Besiedelung des Präparates vergleichsweise große Durchtrittswege für die Durchströmung des Mediums vorliegen. Die Volumenfraktion der Poren (Konstrukt-hohlraumfraktion ε_p) nimmt fast 80% des Präparatevolumens ein und der Durchmesser der Strömungskanäle ist ein Vielfaches des Durchmessers einer besiedelten Kollagenfaser.

<i>Parameter</i>	<i>Symbol</i>	<i>Einheit</i>	<i>Wert</i>	<i>Quelle</i>
Durchmesser einer besiedelten Kollagenfaser	d_p	μm	12,8	Perry 1989; Saidi 1995
Volumen einer Zelle	V_z	mm^3	1,77E-6	Carrier 2002
Konstrukt-hohlraumfraktion	ε_p		0,7888	Berechnet*
Volumenfraktion kollagener Fasern	ε_F		0,21	Saidi 1995
Volumenfraktion der Zellen	ε_z		0,0011	Berechnet*
Radius der Strömungskanäle	r_f	μm	36,25	Mittlerer Wert Pins 2000

Tab. 21: **Verwendete Strukturparameter zur Berechnung hydrodynamischer Größen bei Perfusion besiedelter ADM.**

Mit Hilfe der oben aufgeführten Strukturparameter konnten gemäß den dargestellten Berechnungsgrundlagen die hydrodynamischen Parameter bei den verschiedenen Perfusionsbedingungen ermittelt werden. Diese sind in Tab. 22 dargestellt. Anzumerken ist, dass bei einem Volumenstrom von 30,45 ml/h eine diskontinuierliche, d.h. intervallweise Förderung festgestellt wurde. Eine Drossel stand leider nicht zur Verfügung, um damit verbundene Druckstöße zu reduzieren.

Bei keinem der genutzten Volumenströme konnte eine Dislokation des Präparates von der ursprünglichen Positionierung beobachtet werden. Anhand der von Dermis-basierten Fibroblasten im Rahmen des MTT-Testes gebildeten, zellassozierten Formazankristalle wurde das Verteilungsmuster der Zellen nach der Perfusion begutachtet. Das dabei beobachtete Muster hing erheblich vom genutzten Volumenstrom ab. Die inhomogene Färbung bei Perfusion mit einem Volumenstrom von 30,45 ml/h bzw. die fehlende Färbung bei Nutzung eines Volumenstromes von 73,5 ml/h ließen bereits darauf schließen, dass der Anteil adhärenter Zellen in den Präparaten reduziert war.

Bei allen Perfusionsbedingungen lag mit einer sehr geringen Reynoldszahl von $\leq 1E-3$ eine laminare Strömung vor. Die Trägheitskräfte sind, wie auch bei den Berechnungen angenommen, gegenüber den Reibungskräften zu vernachlässigen. Die mittlere

Schubspannung an der Zelloberfläche nimmt mit steigendem Volumenstrom zu und erreicht Werte von $0,36\text{E-}3 \text{ N/m}^2$ bei einem Volumenstrom von $30,45 \text{ ml/h}$ bis $0,87\text{E-}3 \text{ N/m}^2$ bei einem Volumenstrom von $73,5 \text{ ml/h}$.

<i>Parameter</i>	<i>Symbol</i>	<i>Einheit</i>	<i>Perfusions- bedingung 1</i>	<i>Perfusions- bedingung 2</i>	<i>Perfusions- bedingung 3</i>
Volumenstrom der Pumpe	$\dot{V}_P$	ml/h	121,8	192 ml/h	294 ml/h
Volumenstrom in der Kammer	$\dot{V}$	ml/h	30,45 ml/h	48 ml/h	73,5 ml/h
Flüssigkeitsgeschwindigkeit bei Eintritt in das Präparat	w_0	m/s	2,22E-5	3,51E-5	5,37E-5
Förderung			diskontinuierlich	kontinuierlich	kontinuierlich
Reynoldszahl	Re		0,42E-3	0,66E-3	1E-3
Mittlere Schubspannung an Zelloberfläche	τ_m	N/m ²	0,36E-3	0,57E-3	0,87E-3
Zellverteilung (Färbung durch Formazankristalle)			Inhomogene Färbung der ADM, Zentrum ungefärbt, Rand gefärbt	Homogene, starke Färbung der ADM	Keine signifikante Färbung der ADM

Tab. 22: **Perfusionsbedingungen in den Kammern.** Zur Kalkulation wurde die unmittelbar vor Perfusionsbeginn vorliegende Besiedelung zu Grunde gelegt.

6.3.3.2 Einfluss der Strömung auf die Zellen

Um Aussagen über den Anteil der nach Perfusion noch adhärenen Zellen (Abb. 68) zu ermöglichen, wurde die intrazelluläre LDH-Aktivität in perfundierten bzw. statisch kultivierten Präparaten ermittelt (Abb 68). Die Aktivitäten sind jeweils als relative Größen dargestellt, wobei der nach 24stündiger Perfusion bzw. 24stündiger statischer Kulturführung gemessene Wert auf den Ausgangswert bei Versuchsbeginn bezogen wird. Relative LDH-Aktivitäten, die den Wert von 1 unterschreiten, sind deshalb als Reduktion der Zahl adhärenen Zellen zu interpretieren.

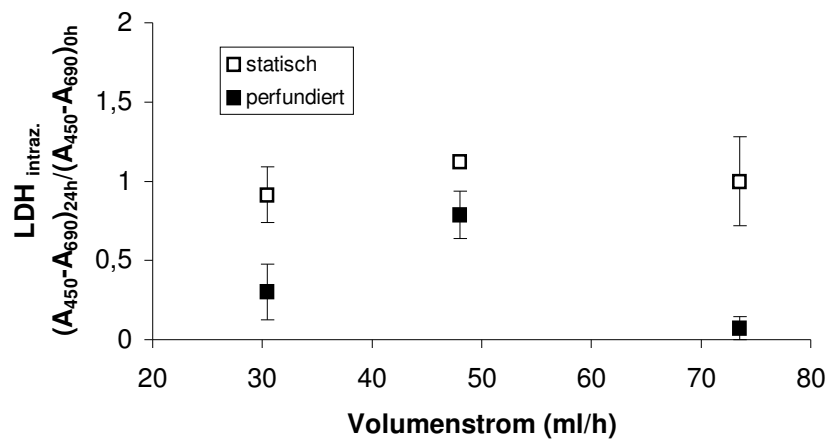


Abb. 68: **Intrazelluläre LDH-Aktivität nach Perfusion:** Die intrazelluläre LDH Aktivität der an die Dermis adhärennten Zellen wurde nach 24stündiger Perfusion ermittelt und mit der Aktivität statischer Kulturen verglichen (n=4).

Bei Perfusion mit einem Volumenstrom von 48 ml/h zeigten sich die höchsten LDH-Aktivitäten. Im Gegensatz dazu war der Anteil adhärenter Zellen bei Perfusion mit 30,45 ml/h bzw. 73,5 ml/h gegenüber den statischen Vergleichskulturen signifikant reduziert ($p < 0,01$, t-Test). Im Medium konnten keine erhöhten Aktivitäten für die LDH (extrazelluläre LDH-Aktivität) gemessen werden, wie das bei Zerstörung der Zellmembran zu erwarten wäre, allerdings trat auch ein starker Verdünnungseffekt durch das Medium auf. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass Volumenströme von 30,45 ml/h und 73,5 ml/h abträglich für die Zelladhäsion waren, die Ursachen dafür werden in der Diskussion erläutert (Kap. 7.3).

Als Konsequenz aus diesen Untersuchungen wurde für alle folgenden Perfusionsversuche ein Volumenstrom von 48 ml/h verwendet.

6.3.4 Besiedelung des Trägermaterials in Perfusionskultur nach statischer Zelleinsaat

In den nachfolgenden Versuchen wurde analysiert, inwieweit sich nach statischer Zelleinsaat die Perfusion förderlich auf Zellproliferation (6.3.4.1) und Stoffwechselaktivität (6.3.4.2) auswirkt. In diesem Zusammenhang wurden auch die Stabilität (6.3.4.3) und Qualität (6.3.4.4) der besiedelten Präparate betrachtet.

6.3.4.1 Zellproliferation

Die Dermis wurden zwei Tage nach Zelleinsaat in das Perfusionssystem überführt. Abb. 69 zeigt die intrazelluläre LDH-Aktivität perfundierter und statisch kultivierter Ansätze. Bei beiden ist eine Zunahme der Aktivität zu verzeichnen, jedoch fällt diese für die perfundierten Kulturen etwas geringer aus. Statistisch ist dieser Unterschied nicht signifikant ($p > 0,01$; t-Test).

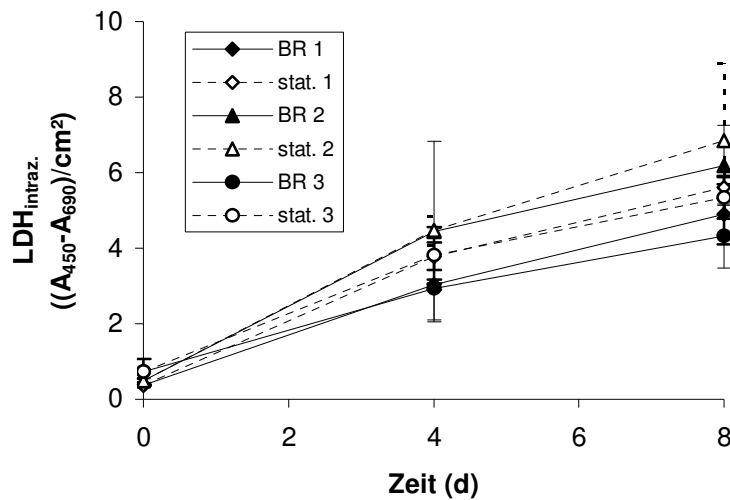


Abb. 69: **Intrazelluläre LDH-Aktivität** perfundierter und statisch kultivierter Dermis nach statischer Zelleinsaat: Nach Zelleinsaat und zweitägiger Kultivierung in statischer Kultur wurden die Träger mit einem Volumenstrom von 48 ml/h perfundiert („BR“) bzw. statisch weitergeführt („stat.“), n=3.

6.3.4.2 Stoffwechselaktivität

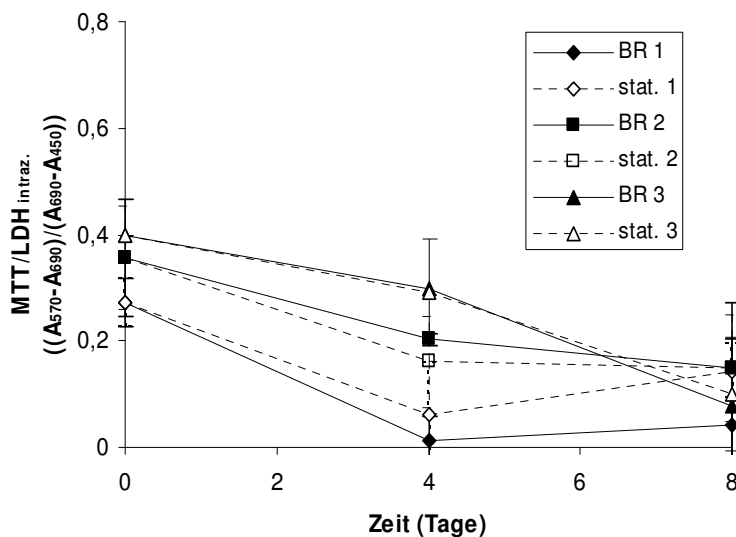


Abb. 70: **Mitochondriale Stoffwechselaktivität:** Die Aktivität wurde bei statischer („stat.“) bzw. Perfusionskultur („BR“) ermittelt und auf die intrazelluläre LDH-Aktivität bezogen, n=3.

Aus Abb. 70 wird ersichtlich, dass sich die spezifische mitochondriale Dehydrogenaseaktivität statisch kultivierter Dermis einerseits und perfundierter Dermis andererseits nicht signifikant voneinander unterscheiden und jeweils am Kulturende ein geringeres Niveau einnehmen. Aufgrund der Verdünnung durch das Medium konnte bei Perfusionskulturen keine signifikante Erhöhung der Kollagenkonzentration im Medium festgestellt werden. Hinsichtlich der Zusammensetzung der Kulturüberstände war bei statischer Kultivierung eine mit dem Kulturverlauf einhergehende Ansäuerung des Mediums zu beobachten. In den Perfusionskammern war das nicht der Fall (Abb. 71).

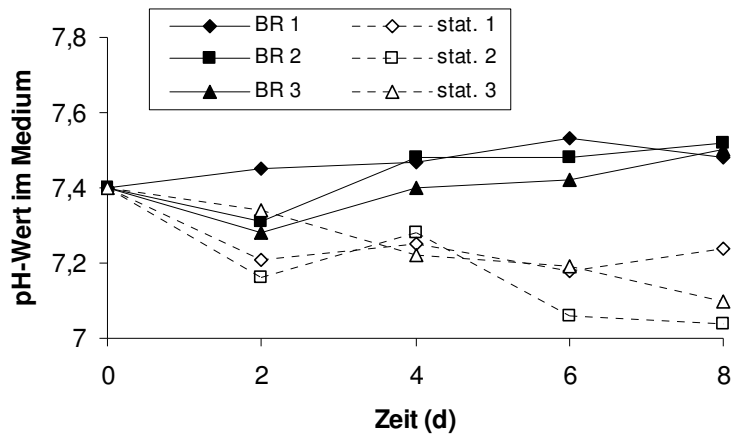


Abb. 71: **pH-Wert in Kulturüberständen:**

Die Perfusion erfolgte mit einem Volumenstrom von 48 ml/h, für jede Perfusionskammer standen 17,5 ml Medium zur Verfügung, das nach 4 Tagen zu 79% gegen frisches getauscht wurde. Bei statischen Kulturen wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt.

Diese Medienansäuerung in statischen Kulturen wurde vermutlich durch eine verstärkte Laktatausschüttung verursacht (Abb. 72).

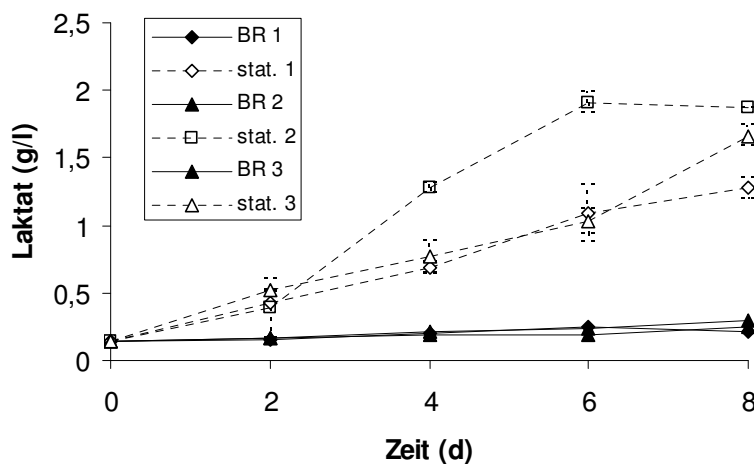


Abb. 72: **Laktatkonzentration in Kulturüberständen:**

Die Laktatkonzentration wurde bei statischer Kultivierung bzw. in den Perfusionskammern ermittelt, n=2.

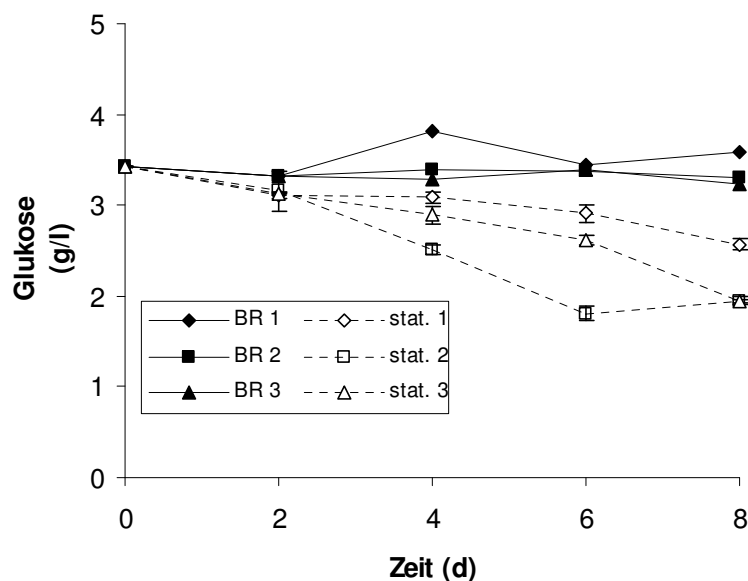


Abb. 73: **Glukosekonzentration in Kulturüberständen:**

Die Glukosekonzentration wurde jeweils bei statischer Kultivierung bzw. Perfusionkultur bestimmt, n=2.

Hinsichtlich der Glukosekonzentration wiesen die Kulturüberstände der Perfusionskammern geringere Schwankungen auf (Abb. 73). Im Gegensatz dazu sank in statischen Kulturen die Glukosekonzentration mit zunehmender Kulturdauer.

Abb. 74 stellt den Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes im Kulturmedium dar. Dabei ist ein mit Kulturverlauf abnehmender, final auf ca. 80% sinkender Partialdruck zu verzeichnen, der jedoch bei statisch kultivierten bzw. in Perfusionskammern geführten Kulturen nicht erheblich differiert.

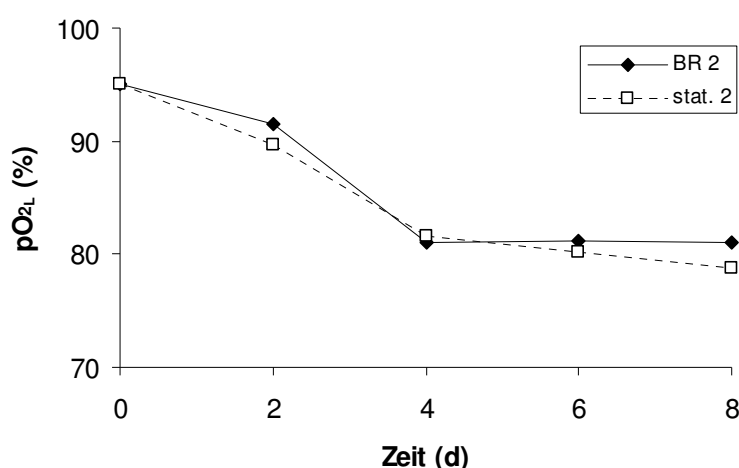


Abb. 74: **Sauerstoffpartialdruck im Medium:** Die ADM wurde zwei Tage nach Zelleinsaat in das Perfusionssystem überführt (Zeitpunkt 0) bzw. statisch kultiviert und der Sauerstoffpartialdruck im Medium bestimmt.

6.3.4.3 Stabilität des Trägermaterials

Zu keinem Zeitpunkt konnten Veränderungen des makroskopischen Erscheinungsbildes sowie der Flexibilität und Festigkeit der statisch kultivierten bzw. perfundierten Präparate festgestellt werden.

6.3.4.4 Charakterisierung der besiedelten Präparate

Histologische Bilder zeigen prinzipiell keine Unterschiede im Erhalt wichtiger dermaler Strukturelemente. Nach statischer Zelleinsaat konnte auch die nachfolgende perfundierte Kulturführung kein Eindringen der Zellen in die dermale Matrix vermitteln. Bei statisch kultivierten bzw. perfundierten Kulturen ließen sich gleichermaßen die Fibroblasten als oberflächlich auf der retikulären Seite der Dermis angesiedelte, parallel ausgerichtete Zellen darstellen (siehe auch 6.3.2.4).

6.3.5 Besiedelung des Trägermaterials in Perfusionskultur nach dynamischer Zelleinsaat

In Rahmen der folgenden Untersuchungen wurde betrachtet, ob nach vorheriger dynamischer Einsaat die Perfusionskultur einen positiven Effekt auf die Zellproliferation und Stoffwechselaktivität der Fibroblasten (6.3.5.1) bzw. die Zellverteilung im Trägermaterial (6.3.5.2) ausübt.

6.3.5.1 Zellproliferation und Stoffwechselaktivität

Nach dynamischer Zelleinsaat auf dem Schüttler wurden Fibroblastenkulturen für zwei Tage statisch kultiviert und anschließend im Perfusionssystem mit einem Volumenstrom von 48 ml/h perfundiert bzw. in Vergleichkulturen statisch weitergeführt. Dabei erzielte Ergebnisse spiegeln prinzipiell die bereits unter 6.3.4 ausgeführten Resultate wider.

Mit Perfusion unter den gewählten Strömungsbedingungen ließen sich auch hierbei keine gegenüber der statischen Kultivierung erhöhten Zellzahlen auf der azellulären Dermis erzielen. Die intrazelluläre LDH-Aktivität nahm - analog zu 6.3.4. - im Kulturverlauf zu. Auch die spezifische mitochondriale Stoffwechselaktivität zeigte den unter 6.3.4 aufgezeigten, zum Kulturende für beide Ansätze gleichartig abnehmenden Verlauf.

6.3.5.2 Charakterisierung der Präparate

Konträr zu den zuvor vorgenommenen Untersuchungen (vgl. 6.3.4) zeigten die histologischen Bilder nach dynamischer Zelleinsaat und anschließender Perfusion ein Eindringen der Fibroblasten in tiefe Dermissschichten. Das Einwandern der Zellen erfolgte ausgehend von der retikulären Seite der Dermis (Abb. 75).

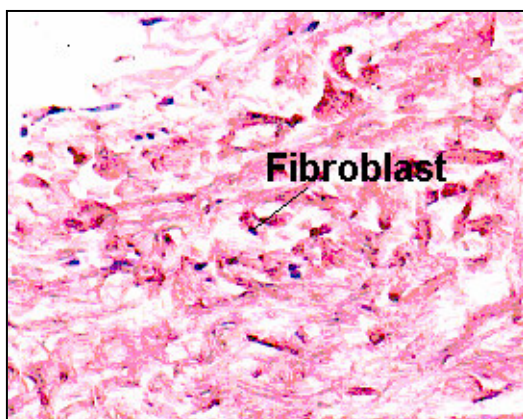


Abb. 75: **Histologisches Bild besiedelter Dermis nach dynamischer Zelleinsaat und Perfusion:** Die Dermis wurde zwei Tage nach dynamischer Zelleinsaat in die Perfusionskammer überführt und darin für 8 Tage kultiviert, HE-Färbung, 25fache Vergrößerung.

6.4 *In vitro* Modell zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf die Präparate

Nach subkutaner Transplantation besiedelter Präparate ist mit hypoxischen Bedingungen zu rechnen, da während der Defektheilung ein hoher Sauerstoffverbrauch der wundständigen Zellen besteht, der durch das erst unvollständig wieder etablierte Mikrogefäßsystem nicht gedeckt werden kann (Chvapil 1968; Jonsson 1991; Tokuda 2000).

Um eine Vorhersage über das Transplantatverhalten unter hypoxischen Bedingungen treffen zu können, wurde ein *in vitro* Modell angewendet. Hypoxische Bedingungen wurden durch Begasung der Kulturen mit 95 % Stickstoff und 5 % CO₂ geschaffen; zum Vergleich wurden ebenfalls normoxischen Kulturen (Begasung mit 95 % Luft und 5 % CO₂) betrachtet. Dabei wurde der Einfluss der Hypoxie auf subkonfluente Fibroblastenkulturen (6.4.1) sowie bereits vollständig besiedelte Präparate (6.4.2) untersucht.

6.4.1 Besiedelung unter hypoxischen Bedingungen zur Adaptation an die *in vivo* Situation

Um Aussagen darüber treffen zu können, inwieweit sich die Hypoxie förderlich auf die Proliferation (6.4.1.1) und Stoffwechselaktivität (6.4.1.2) der Zellen auswirkt, erfolgte eine Besiedelung azellulärer Dermis unter hypoxischen Bedingungen. Damit sollte auch geprüft werden, ob schon während der Anzüchtung der Präparate eine Adaptation der Zellen an hypoxische Bedingungen im Transplantationsareal erfolgen kann.

6.4.1.1 Zellproliferation

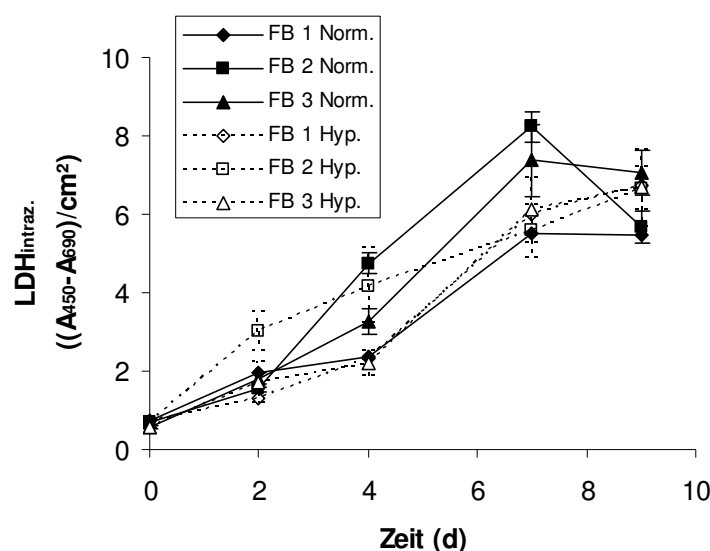


Abb. 76: **Intrazelluläre LDH-Aktivität unter Hypoxie:** Die Kultivierung erfolgte unter Begasung mit 95 % Luft und 5 % CO₂ („Norm.“, Normoxie) bzw. 95 % Stickstoff und 5 % CO₂ („Hyp.“, Hypoxie) ermittelt. Die Hypoxie wurde zwei Tage nach Einsaat initiiert, n=3.

Wie in Abb. 76 ersichtlich wird, nimmt die intrazelluläre LDH Aktivität bei normoxischer und hypoxischer Kultivierung mit der Kulturzeit zu. Signifikante Unterschiede in der LDH-Aktivität bestehen zwischen beiden Kulturansätzen nicht ($p > 0,01$, t -Test).

Zu Kulturbeginn sind hypoxische Kulturen jedoch signifikant in ihrer Vitalität eingeschränkt (Abb. 77). Mit zunehmender Kulturdauer steigt jedoch die Vitalität an, da durch die Medienwechsel die extrazelluläre LDH entfernt wird.

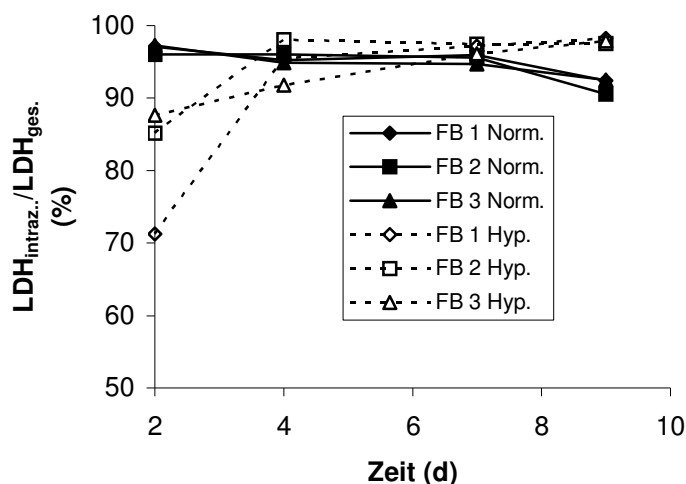


Abb. 77: **Vitalität unter Hypoxie:** Die Vitalität wurde als Verhältnis von intrazellulärer LDH Aktivität zur Gesamt-LDH Aktivität bestimmt. Letztere setzt sich aus der extrazellulären und der intrazellulären Aktivität zusammen, $n=3$.

6.4.1.2 Stoffwechselaktivität

Bei Hypoxie und Normoxie sind sowohl quantitativ als auch qualitativ gleichartige Verläufe der mitochondrialen Stoffwechselaktivität während der Kultivierung zu beobachten (Abb. 78), diese nimmt zum Kulturende ein geringeres Niveau ein.

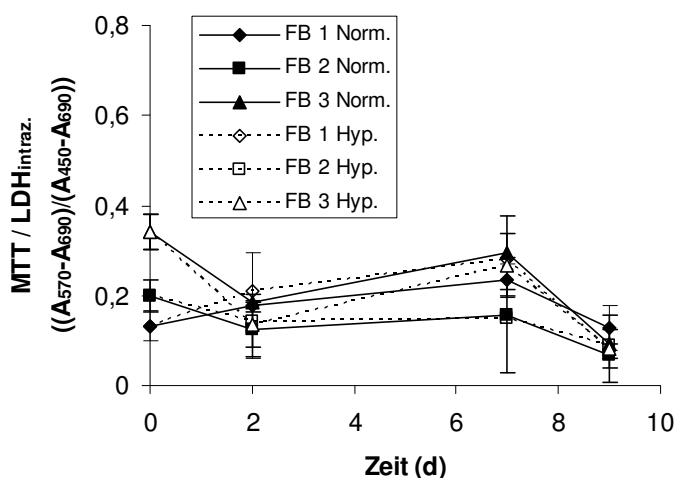


Abb. 78: **Mitochondriale Stoffwechselaktivität bei Hypoxie:** Die Stoffwechselaktivität wurde mit dem MTT-Test bestimmt, $n=3$.

Die Kollagensekretion in den Kulturüberstand war bei Hypoxie und Normoxie mit zunehmender Kulturdauer reduziert (Abb. 79). In hypoxischen Kulturen konnten jedoch insbesondere vom 4. bis zum 7. Kulturtag signifikant höhere Kollagenmengen detektiert werden.

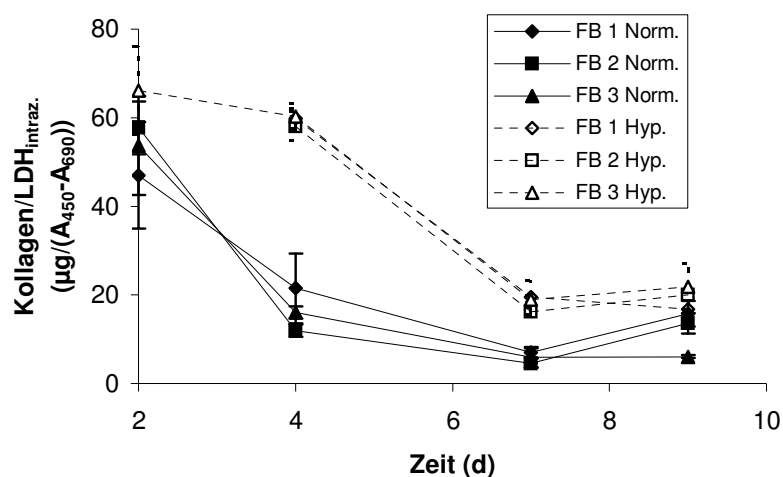


Abb. 79: **Kollagen** in Kulturüberständen bei Hypoxie und normoxischen Vergleichskulturen, n=3.

6.4.2 Auswirkung hypoxischer Bedingungen auf besiedelte Träger

Neben der Besiedelung unter hypoxischen Bedingungen wurde auch die Fähigkeit bereits 10 Tage vorab besiedelter Präparate untersucht, temporär unter Hypoxie zu persistieren. Hierzu wurden quantitative Untersuchungen der Vitalität (6.4.2.1) und Stoffwechselaktivität (6.4.2.2) durchgeführt.

6.4.2.1 Zellvitalität

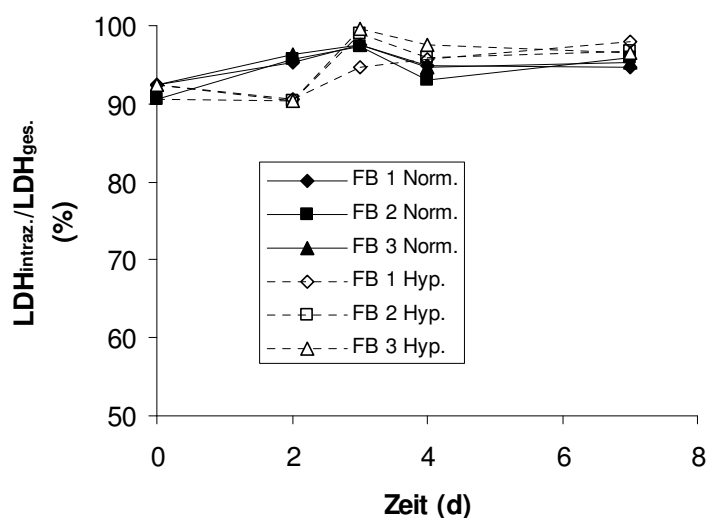


Abb. 80: **Vitalität besiedelter Präparate unter Hypoxie:** Die Vitalität wurde als Verhältnis von intrazellulärer LDH Aktivität zur Gesamt-LDH Aktivität bei hypoxischen und normoxischen Kulturen ermittelt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde auf Fehlerbalken verzichtet, n=3.

Wie Abb. 80 darstellt, verursacht die Hypoxie kein signifikantes Absinken der Vitalität. Im Gegensatz zu den unter 6.4.1.1 aufgezeigten Werten (Vitalität bei Besiedelung der azellulären Dermis unter Hypoxie), sind in bereits besiedelten Präparaten ausschließlich hohe, mehr als 90% betragende Vitalitäten festzustellen.

6.4.2.2 Stoffwechselaktivität

Abbildung 81 zeigt, dass hypoxische Bedingungen bei besiedelten Präparaten keine signifikante Veränderung der mitochondrialen Stoffwechselaktivität gegenüber normoxischen Präparaten nach sich zogen.

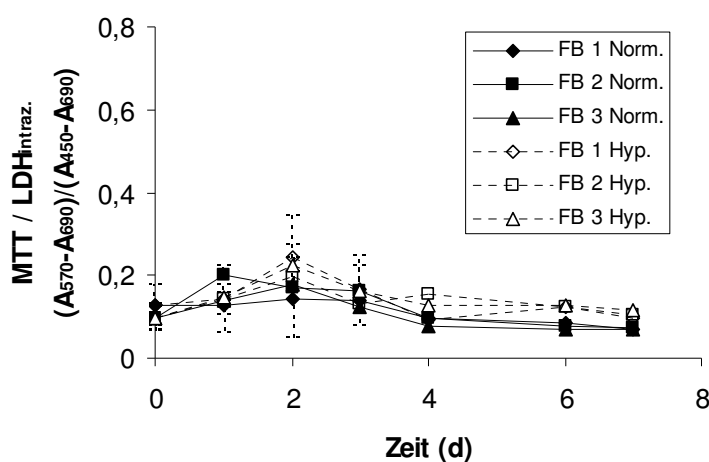


Abb. 81: **Mitochondriale Stoffwechselaktivität:** Besiedelte Präparate wurden hypoxischen und normoxischen Bedingungen unterworfen und die Aktivität mit dem MTT-Test ermittelt, n=3.

6.5 Transplantation ins Rattenmodell

Die Transplantatstabilität (6.5.1) und sowie die Gewebsreaktion (6.5.2) im Transplantatlager wurde im *in vivo* Modell betrachtet. Dazu wurde humane azelluläre Dermis - besiedelt mit autologen Rattenfibroblasten bzw. unbesiedelt - für einen Zeitraum von 6 Wochen in eine subkutane Tasche von adulten immunkompetenten Lewisratten transplantiert.

Da das Tiermodell nicht den Haupthintergrund der Arbeit darstellt, können die tierexperimentell gewonnenen Resultate lediglich als Anfangsbefund angesehen werden. Für eine Validierung des Transplantatverhaltens *in vivo* sollten zukünftig weitere tierexperimentelle Untersuchungen herangezogen werden (vgl. 8.3 - Ausblick).

6.5.1 Stabilität der Präparate

Zur Begutachtung der Präparatestabilität wurde das Transplantationsareal 6 Wochen nach der Transplantation weiträumig eröffnet. Makroskopisch war keine Veränderung des

Präparateerscheinungsbildes erkennbar. Bei mechanischer Manipulation mit der Pinzette wiesen die Transplantate eine unverminderte Festigkeit auf.

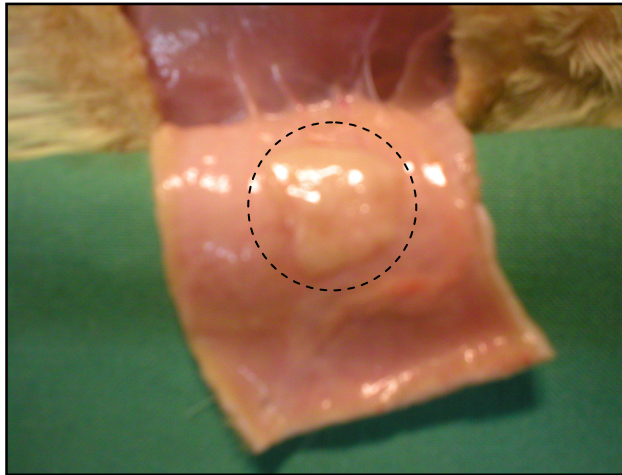


Abb. 82: **Makroskopisches Bild eines 2 x 2 cm großen Transplantates** aus humaner azellulärer Dermis nach 6wöchiger Transplantation ins Rattenmodell.

Die Mehrheit der Präparate zeigte nach 6 Wochen einen Flächenerhalt von 85 bis 95 % (Abb. 83), der als hoch einzuschätzen ist. Gründe für den geringeren Flächenerhalt bei Tier 4 sind nicht bekannt, jedoch waren aufgrund der Körperbewegung des Tieres die Präparate in der Gewebstasche verschoben und damit erschwert zu bemessen. Die initiale Besiedelung der Präparate resultierte im Allgemeinen in keiner höheren Transplantatschrumpfung.

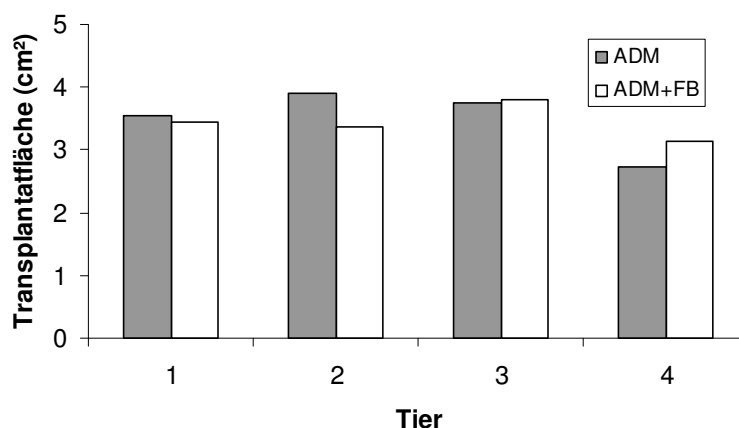


Abb. 83: **Fläche der Transplantate nach 6wöchiger Transplantation ins Rattenmodell.** Die humane azelluläre Dermis wurde vor der Transplantation mit Fibroblasten besiedelt („ADM+FB“) bzw. unbesiedelt implantiert („ADM“). Die Transplantatfläche wurde aus den gemessenen Präparateabmaßen berechnet.

6.5.2 Gewebsreaktion

Zur Abschätzung der Gewebsreaktion wurden die Präparate und das umliegende Gewebe aus dem Transplantationsareal exzidiert und histologisch ausgewertet. Sowohl bei unbesiedelter als auch bei besiedelter azellulärer Dermis waren 6 Wochen nach der Transplantation keinerlei Anzeichen für eine Abstoßung festzustellen (Abb. 84 a, b). Die Präparate selber und das umliegende Gewebe (Transplantatlager) zeigten mikroskopisch ein

unauffälliges Erscheinungsbild. Die Bindegewebsmatrix der transplantierten Dermis blieb in ihrer Struktur und Anordnung unverändert, eine Kalzifizierung war nicht feststellbar.

In den anfänglich unbesiedelten (Abb. 84 a) bzw. besiedelten Transplantaten (Abb. 84 b) kann das Vorhandensein von Bindegewebszellen sowie - vorrangig bei den zuvor besiedelten Präparaten (Abb. 84 b) - ein Einsprossen von Gefäßen beobachtet werden.

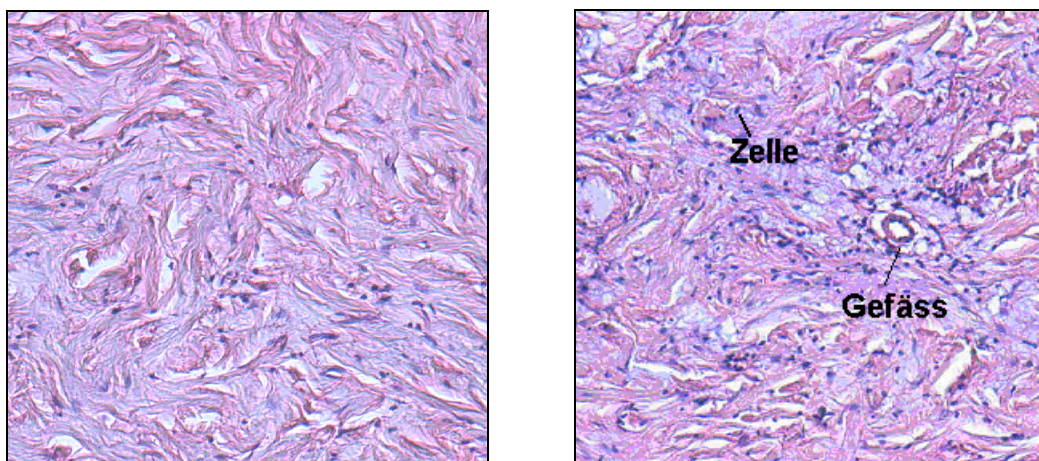


Abb. 84: **Transplantat nach 6wöchiger Transplantation ins Rattenmodell.** HE-Färbung, 25fach.

a) initial unbesiedelte ADM

b) initial mit autologen Fibroblasten besiedelte ADM

Histologische Schnitte wurden zur Quantifizierung des Zellgehalts und des Anteils gefäßähnlicher Strukturen in der transplantierten Dermis herangezogen. Dabei wurden die in einem Gesichtsfeld des Mikroskops liegenden Zellen zur Ermittlung der Zellzahl ausgezählt (Abb. 85). Als gefäßähnliche Strukturen wurden zirkulär angeordnete Zellverbände ermittelt, die das Lumen eines neuen Gefäßes bildeten (Abb. 86). Sowohl initial mit autologen Fibroblasten besiedelte als auch initial unbesiedelte Präparate enthielten unmittelbar vor der Transplantation keine Blutgefäße.

Sechs Wochen nach Transplantation war bei den initial besiedelten Präparaten eine signifikant höhere Zellularität und eine höhere Anzahl gefäßähnlicher Strukturen als bei den eingangs unbesiedelten Präparaten detektierbar ($p < 0,01$, t -Test). Neue Gefäßstrukturen füllten vorrangig das Bett alter, beim Herstellungsprozess der azellulären Dermis dezellularisierter (vgl. 6.1.1.5), Gefäßkanäle.

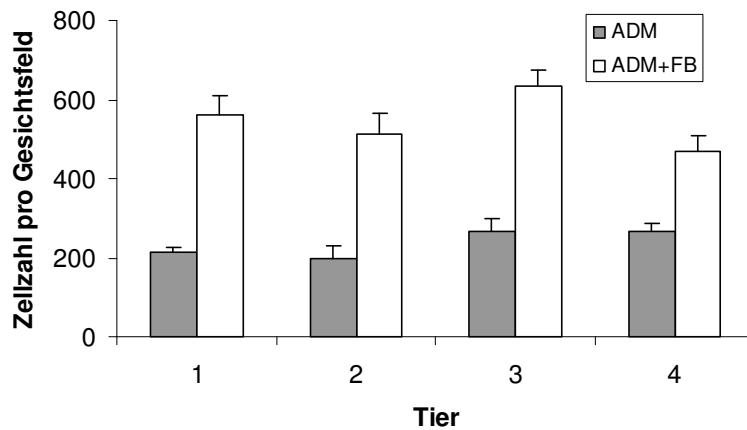


Abb. 85: **Zellzahl in den Präparaten nach 6wöchiger Transplantation** zuvor besiedelter („ADM+FB“) bzw. unbesiedelter („ADM“) Dermis. Die in einem Gesichtsfeld des Mikroskops befindlichen Zellen wurden bei 158facher Vergrößerung ausgezählt, pro Präparat wurden 5 Felder ausgewertet.

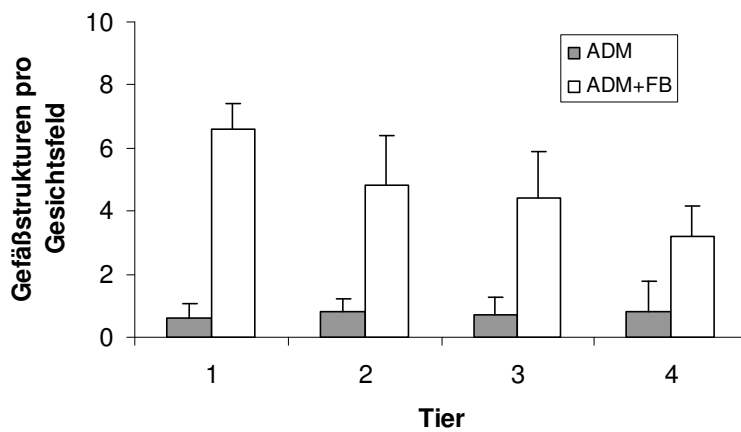


Abb. 86: **Anzahl der Gefäßstrukturen in den Transplantaten nach 6wöchiger Transplantation** besiedelter („ADM+FB“) bzw. unbesiedelter („ADM“) Dermis. Die in einem Gesichtsfeld vorliegenden Gefäßstrukturen wurden bei 158facher Vergrößerung ausgezählt. Pro Präparat wurden 5 Felder analysiert.

7. Diskussion

7.1 Herstellung einer humanen sterilisierten azellulären Dermis als Trägermaterial für dreidimensionale Fibroblastenkulturen

In der vorliegenden Arbeit war es das Ziel, einen mit autologen Fibroblasten besiedelten Weichgewebersatz zur Reparatur von Weichgewebsdefekten nach Exzision von Sarkomen zu entwickeln. Diese Defekte weisen eine niedrige Heilungstendenz auf und liegen oftmals in einer vorbestrahlten Region, so dass von einem stark eingeschränkten Reparaturpotential des Wundbetts auszugehen ist. Aus diesem Grunde muss durch den Weichgewebersatz über längere Zeiträume eine dreidimensionale Defektfüllung mit einem synthetisch aktiven Ersatzgewebe gewährleistet werden.

An das Trägermaterial sind deshalb hinsichtlich seiner Eigenschaften und Stabilität spezielle Anforderungen zu stellen (vgl. 2.1.5.2). Das Vorhandensein dieser Materialqualitäten wurde für die hergestellte humane azelluläre sterilisierte Dermis untersucht.

Mit einer humanen sterilisierten azellulären Dermis wurde unter Berücksichtigung der Anforderungen des Arzneimittelgesetzes (AMG) ein Trägermaterial für die Herstellung eines zellbasierten Weichgewebersatzes geschaffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine humane sterilisierte azelluläre Dermis als biologisches Trägermaterial entwickelt. In der Fachliteratur sind verschiedene Methoden zur Entfernung bzw. Inaktivierung von Zellen in humaner Haut beschrieben, wie die Applikation von Frier-Tau-Zyklen (Krejci 1991), Enzymen (Takami 1996), hygroskopischen (Chakrabaty 1999), wässrigen (Krejci 1991), hyperosmolaren oder detergenzhaltigen Lösungen (Livsey 1995). Ausgehend von diesen Methoden wurde zur möglichst schonenden Herstellung der azellulären Dermis ein enzymatisches bzw. auf einer hyperosmolaren Salzlösung beruhendes Verfahren mit einer nachfolgenden Detergeninkubation kombiniert und hinsichtlich der Eignung getestet (vgl. 6.1.1).

Sowohl die hyperosmolare Salzlösung als auch das enzymatische Verfahren bewirkten eine Trennung der hemidesmosomalen Verbindungen des Epithels zur Basalmembran an der *dermo-epidermalen Junction*. Damit ließen sich die epidermalen Anteile der Haut leicht entfernen. Verbliebene Zellen wurden durch die Detergenzbehandlung vollständig aus der Dermis herausgelöst.

Die nur kurzzeitig angewandten Inkubationsschritte zeigten sich sehr effizient für die Herstellung einer vollkommen azellulären Dermis. Sie sind gegenüber den Verfahren anderer Arbeitsgruppen zu bevorzugen, welche teilweise erheblichen Inkubationszeiten von mehr als vier Wochen benötigen (Krejci 1991; Medalie 1996) und oftmals nur eine

Inaktivierung und nicht Entfernung der Zellen bewirken (Demarchez 1992; Ben-Bassat 1992; Herson 2001).

Eine vollständige Abwesenheit von Zellen ist für eine niedrige Antigenizität der Präparate und damit für ihre gute Akzeptanz bei Transplantation äußerst wichtig. Zudem wird dadurch die Transplantatsicherheit erhöht, da viele Viren zellassoziiert sind (Marshall 1995; Pauli 2003). Darüber hinaus kann das Vorhandensein von Zellen auch die *in vitro*-Besiedelbarkeit des Materials beeinträchtigen. So beobachtete *Steinhoff* bei nur partiell zellfreien Matrizen eine unbefriedigende fleckenartige Zelleinsaat (*Steinhoff* 2000). Langwierige Inkubationsschritte bergen des Weiteren das Risiko einer mikrobiellen Kontamination sowie von Änderungen wichtiger Präparateeigenschaften in sich und sollten auch aus diesen Gründen vermieden werden.

Durch Anwendung eines validierten Virusinaktivierungsverfahrens sowie begleitende Maßnahmen konnte in Konformität mit dem Arzneimittelgesetz eine biologisch sichere azelluläre Dermis hergestellt werden. Damit ist eine wesentliche Voraussetzung für eine potentielle klinische Anwendung erfüllt.

Die azelluläre Dermis wurde mit einem chemischen Sterilisationsverfahren auf der Basis von Peressigsäure sterilisiert. Für dieses Verfahren ist der Nachweis über die Inaktivierung von Viren, Bakterien, Sporen und Pilzen erbracht (Pruss 1999; 2001). Damit wurde erstmals eine humane azelluläre, mit einem validierten Virusinaktivierungsverfahren sterilisierte Dermis hergestellt, die den hohen Anforderungen an biologisch sichere Gewebstransplantate entspricht. Die biologische Sicherheit ist eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendung eines zellfreien oder eines als Arzneimittelzubereitung zellbesiedelten Transplantates beim Menschen.

Die Effizienz des Sterilisationsverfahrens basiert auf dem schnellen Eindringen der Peressigsäure in Erreger, einer Verschiebung des pH-Wertes sowie der Freisetzung von Sauerstoff und freien Radikalen, die zur Oxidation, Zerstörung bzw. irreversiblen Hemmung von Enzymen, Beschädigung von Zellmembranen sowie virusstatistischen Effekten führen (Pruss 1999). Begleitend zur Sterilisation werden folgende Maßnahmen angewandt, um nach gegenwärtigem Erkenntnisstand ein Höchstmaß an Sicherheit zu gewährleisten:

- 1.) Spenderauswahl entsprechend allgemeiner und spezifischer Kriterien (Spenderauswahlkriterien nach EATB/ EAMST/ AATB) zum Ausschluss bestimmter Erkrankungen und Zustände, die eine erhöhte Prävalenz für übertragbare Krankheiten oder das Vorhandensein dieser Krankheiten in der Vergangenheit oder zum Zeitpunkt der Gewebsspende signalisieren.
- 2.) Körperliche Untersuchung des Spenders.

- 3.) Infektionsserologische Blutuntersuchung entsprechend der gültigen Richtlinien mit Nachweis von HIV 1 und 2-Antikörper, HBsAg, Anti-HCV-Antikörper, Anti-HBc-Antikörper, TPPA, Anti-CMV-Antikörper, HCV-NAT, HBV-NAT, HIV-NAT.

Durch Anwendung von Konservierungsverfahren können die Präparateigenschaften der azellulären Dermis bei Lagerung erhalten werden. Auf zusätzliche materialschädigende Fixierungsmethoden wurde verzichtet.

Als letzter Prozessschritt nach der Sterilisation wurde ein Konservierungsverfahren zur Haltbarmachung der Fertigpräparate eingesetzt (Weissflog 1984; May 1985; Richters 1996). Bei dem Verfahren der Tieftemperatur-, Kryo- bzw. Glycerinkonservierung (vgl. 6.1.1.4) konnte in allgemeinen histologischen Übersichtsfärbungen aufgrund der schonenden Entfernung bzw. Bindung freien Wassers keine Beeinträchtigungen wichtiger struktureller Elemente der Dermis wie der Basalmembranstruktur beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu zeigte ein unsterilisiertes gefriergetrocknetes Vergleichspräparat (Alloderm®) einen etwas schlechteren Erhaltungszustand. Bei Gefriertrocknung wird durch Lyophilisation das freie Wasser bis zu einem Restgehalt von weniger als 6% entzogen. Mit der damit einhergehenden Reduktion der Proteinhydratation können die Stabilität und Eigenschaften von Kollagenfasern beeinflusst und eine irreversible Änderung der Kollagenkonformation induziert werden (Smith 1982; Pereira 2001).

Für die Haltbarmachung der hergestellten sterilisierten Dermis wurde nachfolgend ausschließlich die Glycerinkonservierung verwendet. Dieser Wahl lag zugrunde, dass das Verfahren

- geringe logistische Aufwendungen verlangt (Präparatelagerung im Kühlschrank)
- weichmachende Eigenschaften aufweist
- eine erhöhte Stabilität und geringere Kalzifizierung von Gewebstransplantaten *in vivo* zur Folge hat, obwohl es keine Quervernetzung bewirkt (Khor 1997)
- sich bereits bei der Konservierung von allogenen Hautersatz bewährt hat (Marshall 1995).

Bei der azellulären Dermis handelt es sich um ein natürlicherweise bereits hoch quervernetztes, durch die Zellentfernung niedrig antigenes Material. Daher kann auf eine Fixierung durch chemische und physikalische Methoden (vgl. 2.1.3) verzichtet und langfristig oftmals zum Versagen biologischer Transplantate führende Effekte (vgl. Tab. 23) ausgeschlossen werden.

<i>In vitro</i> beobachtete Effekte	<i>In vivo</i> beobachtete Effekte
• Quervernetzung von Proteinen • Verlust der wellenförmigen Kollagenstruktur • Zellbeeinflussende Effekte • Lockerung von Kollagenbündeln • Verlust amorpher extrazellulärer Matrix • Verminderung der Materialflexibilität	• Verstärkte Ablagerung von Fibrin/Blutplättchen • Entzündung • Massives Flüssigkeitseindringen • Fragmentation oberflächlicher Kollagenbündel • Änderung der Gewebsarchitektur • Kalzifizierung • Verlust von Materialanteilen

Tab. 23: **Veränderung biologischer Materialien (Herzklappen) nach Fixierung** (Schoen 1999)

Für die Besiedelung mit Zellen und für die Transplantatintegration wichtige Interzellulärsubstanzen sind in der azellulären Dermis erhalten.

Mit Kollagen I, III und IV sowie dem Glykoprotein Laminin wurden immunhistochemisch wichtige Interzellulärsubstanzen der Dermis in den verschiedenen konservierten Präparaten nachgewiesen (vgl. 6.1.1.5). Die Zuordnung von Kollagen I und III zur papillären und retikulären Zone der Dermis sowie von Kollagen IV und Laminin zur Basalmembran und Basallamina der Gefäßstrukturen entspricht dem natürlichen Erscheinungsbild (Smith 1982; Junqueira 1996). Sowohl die kryokonservierten Dermispräparate als auch das Vergleichspräparat zeigten eine etwas schwächere Anfärbbarkeit für bestimmte dermale Strukturproteine als tieftemperatur- bzw. glyzerinkonservierte Dermis. Ursächlich hierfür könnten Änderungen der Proteinkonformation sein, die bei der Immunhistochemie die Interaktion mit den Antikörpern herabsetzten. Möglicherweise hat dazu die schnelle Änderung der osmotischen Verhältnisse beim Prozess des Kryokonservierens (Pikal-Cleland 2000) bzw. die starke Reduktion der Proteinhydratation bei der Gefriertrocknung (Smith 1982; Pereira 2001) beigetragen.

Bei keinem der Präparate war das Glykoprotein Fibronectin nachweisbar, von dem bekannt ist, dass es wenig extraktionsresistent ist (Demarchez 1992; Wainwright 1995). Das nachgewiesene Laminin hingegen vermittelt ebenso wie Fibronectin Zelladhäsion, Wachstum und Migration von Bindegewebszellen (Sage 1992; Raghov 1994; Junqueira 1996) und kann damit zu einer guten Zell-Material-Interaktion beitragen.

Der qualitative und quantitative Erhalt der Grob- und Feinstruktur der azellulären sterilisierten Dermis ist von großer Bedeutung für die Besiedelung der Matrix mit Zellen (Hynes 1992; Juliano 1993; Giancotti 1999; Zerveola 2000) sowie für die Akzeptanz des Präparates nach der Transplantation (Hiles 1993; Walter 1996; Putnam 1996). Zellen nutzen diese Strukturen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur Anheftung und Proliferation sowie als Leitschiene zur Migration in das Transplantat (Form 1986; Demarchez 1992; Kraut 1995;

Sieminski 2000). Darüber hinaus bestimmen die Interzellulärsubstanzen auch die mechanischen Eigenschaften der Dermis (Junqueira 1996). Sie tragen damit wesentlich zur Materialflexibilität und -elastizität bei und beeinflussen damit auch das funktionelle und kosmetische Transplantationsergebnis. Eine Veränderung der Anordnung kollagener oder vormaliger vaskulärer Strukturen (nun zellfreie Gefäßstrukturen in der azellulären Dermis) in einer dermalen Matrix resultiert laut *Wainwright* in einen unerwünschten, narbenartigen Umbau des Grafts (Wainwright 1995). Diese Narbenbildung kann eine geringere Beweglichkeit der Körperregion oder eine Gewebsverhärtung nach sich ziehen (Desmouliere 1992; Sedlarik 1993; Grinell 1994; Gabbiani 1996) und damit den Behandlungserfolg herabsetzen.

Die gute Permeabilität der Dermis für verschiedene Substanzen ist von hoher Bedeutung für den Stofftransport bei in vitro bzw. in vivo Applikation der Matrix.

Die Substanzdurchlässigkeit eines Gewebersatzmaterials ist nach Transplantation von besonderer Bedeutung für den Transport von biologisch aktiven Fluiden und Stoffwechselprodukten zwischen Transplantat und Transplantatlager (Hiles 1993; Lu 1998; Angelova 1999). Aber auch für das Tissue Engineering ist ein effizienter Stofftransport zu den Zellen im Trägermaterial erforderlich. Für viele durch das Tissue Engineering erzeugte Präparate ist insbesondere der Stofftransport limitierend für die Anzüchtung dreidimensionaler Zellstrukturen (Freed 1994; Galban 1999; Chevally 2000).

Inwieweit das Herstellungsverfahren Auswirkungen auf die Permeabilität der Dermis nimmt, wurde anhand der Wasserdampf- und Sauerstoffdurchlässigkeit untersucht (vgl. 6.1.1.6).

<i>Material</i>	<i>Wasserdampfdurchlässigkeit MVP (g/(m²*24h))</i>	<i>Sauerstoffdurchlässigkeit OPERM (l/(m²*24h))</i>
Sterilisierte ADM	2.441-2.789	4,193-5,464
Folienverbände	79-956 (Thomas 1990)	0,54-2 (Thomas 1990)
Integra™ Artificial Skin	240-2.400 (Thomas 1990)	Nicht getestet
Hydrokolloidverband	4.082 (Thomas 1990)	Nicht getestet
Humanes Amnion	2.033-3.138 (v. Versen-Höynck 2003)	0,43-2,02 (v. Versen-Höynck 2003)
Humane Haut	415,2* (Salisbury 1980)	0,76 (Stuecker 2002)**
Porcine Haut	1.927,2* (Salisbury 1980)	Nicht getestet

*nach Transplantation auf Verbrennungswunden, ** für feuchte, intakte Haut bei gesunden Probanden

Tab. 24: **Wasserdampf- und Sauerstoffdurchlässigkeit verschiedener Wundverbände bzw. humaner Haut**

Die hergestellte azelluläre Dermis zeigte mit 2.441 bis 2.789 g/(m²*24h) eine hohe Wasserdampfdurchlässigkeit sowie mit 4,193 bis 5,464 l/(m²*24h) ebenfalls eine hohe Sauerstoffdurchlässigkeit (vgl. Tab. 24). Die gegenüber humaner Haut erhöhte Durchlässigkeit der azellulären Dermis für Wasserdampf sowie Sauerstoff ist auf die

Abwesenheit des *Stratum corneum* zurückzuführen. Dieses stellt die Hauptpermeabilitätsbarriere der Haut dar (Elias 2001; Stücker 2002).

Der Proteintransport durch azelluläre Dermis (vgl. 6.1.3.2) wurde dem Modellprotein BSA (bovines Serumalbumin, MWG 67 kDa) analysiert. Dabei wurde in einer Diffusionsmesskammer zunächst der Stofftransport durch die Dermis bei Vorhandensein eines Konzentrationsgradienten untersucht; als Transportmechanismus wirkt hierbei die Diffusion infolge der Brown'schen Molekularbewegung der Teilchen. Aus den im unteren Kompartiment der Diffusionskammer gemessenen Konzentrationsverläufen konnten mittlere effektive Diffusionskoeffizienten für die transdermale Diffusion von $2,8\text{E-}6$ bis ca. $9\text{E-}6 \text{ cm}^2/\text{s}$ errechnet werden (Temperatur 28°C). Diese sind wider Erwarten größer als der Vergleichswert für die freie Diffusion von BSA in einer wässrigen Lösung ($5,9\text{E-}7 \text{ cm}^2/\text{s}$ bei 20°C , Young 1980). Der transdermale Transport kann nur durch die Poren des Porensystems „Dermis“ erfolgen, damit steht nicht die gesamte Materialquerschnittsfläche für die Diffusion zur Verfügung. Darüber hinaus bilden die Kollagenfasern ein Labyrinth, welches die Transportwege durch „Umwege“ lokal verlängert. Damit wird insgesamt der Transport durch die Dermis verschlechtert und demzufolge müssen die Diffusionskoeffizienten bei transdermaler Diffusion gegenüber der freien Diffusion erniedrigt sein. Wie bereits bei den Ergebnissen ausgeführt (6.1.3.2.1), traten in der für die Diffusionsuntersuchungen selbst konstruierten Kammer trotz vorsichtigem Arbeitens Strömungseffekte durch das Absaugen der Proben aus dem Kammerunterteil und auch – jedoch in einem geringeren Ausmaß – durch das Auftragen der Proteinstammlösung auf. Dadurch kann das Vorliegen konvektiver Stoffströme nicht ausgeschlossen werden, die den rein diffusiven Stofftransport überlagern und zu einer Überbestimmung von Diffusionskoeffizienten führen. Deshalb empfiehlt es sich für zukünftige Untersuchungen des diffusiven Stofftransportes eine Kammer zu nutzen, in der a) eine bessere Fixierung der Präparate, z.B. in einem O-Ringsystem, möglich ist, b) eine einfachere Probenahme erfolgen kann und c) das untere Kompartiment durchmischt wird.

Trotz allem kann von einer guten BSA-Durchlässigkeit der humanen azellulären Dermis ausgegangen werden. Das wird auch daran ersichtlich, dass sich im Diffusionsexperiment bereits nach ca. 30 min die Gleichgewichtskonzentration für das Protein einstellte, der Konzentrationsgradient also ausgeglichen und die Diffusion beendet war. Die gute Proteindurchlässigkeit deckt sich auch prinzipiell mit den Verhältnissen in humaner Haut, in der die Dermisstruktur einen diffusiven Transport erlaubt (Elias 2001).

Gemäß der Stokes-Einstein-Gleichung (Formel 2, 2.2.1.2.4) nimmt der Diffusionskoeffizient einer Substanz mit abnehmendem Teilchenradius der Substanz und abnehmender Viskosität der Lösung sowie mit steigender Temperatur zu. Eine Temperaturzunahme führt zu einer verstärkten Molekularbewegung der Teilchen und zu einer Viskositätsabnahme der Lösung.

Damit wird die Beweglichkeit der Teilchen erhöht und die Diffusion verbessert. Der diffusive Transport könnte demnach durch eine Temperaturerhöhung vergrößert werden. Insbesondere bei Proteinlösungen nimmt mit Konzentrationszunahme die Viskosität stark zu und führt zu einem gegenteiligen Effekt (Monkos 1996), der Diffusionskoeffizient sinkt aufgrund einer geringeren Teilchenbeweglichkeit. Aus der Stokes-Einstein-Gleichung folgt auch, dass bei Substanzen mit geringerem Teilchenradius als BSA ein gegenüber BSA erhöhter Diffusionskoeffizient resultiert, wenn die übrigen Parameter konstant gehalten werden. Damit können kleinere Moleküle noch besser als BSA durch die Dermis diffundieren. *Boucher* konnte in seinen Untersuchungen bestätigen, dass insbesondere die Molekülgröße die Diffusion von Proteinen durch Gewebe beeinflusst; mit zunehmender Größe war der Transport erschwert (Boucher 2001).

Neben der Diffusion von Serumproteinen ist die Passage von autokrinen und parakrinen Wachstumsfaktoren durch das besiedelte Präparat von großer Bedeutung für die Stimulation der dort befindlichen Zellen sowie die Interaktion dieser Zellen mit dem Transplantatlager (Zerveola 2000; Falanga 2002). Bei Wachstumsfaktoren handelt es sich um niedrigmolekulare Proteine, deren Größe die von BSA nicht übertrifft (vgl. Tab. 25). Folglich kann aus dem guten Transport von BSA durch die azelluläre Dermis auch eine gute Diffusion von Wachstumsfaktoren abgeleitet werden.

•	FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor	16 bis 18 kDa
•	EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	6,4 kDa
•	PDGF	Plättchenwachstumsfaktor	30 kDa
•	KGF	Keratinocytenwachstumsfaktor	22,5 kDa
•	VEGF	Vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor	46 bis 48 kDa
•	TNF α	Tumornekrosefaktor alpha	17 kDa

Tab. 25: **An der Wundheilung beteiligte Wachstumsfaktoren**; Proteingröße nach *Ibelgaufits* (Ibelgaufits 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Diffusionskoeffizienten für die Transportuntersuchungen in der Diffusionskammer auf Grundlage eines rein diffusiven Stofftransportes mit dem ersten Fickschen Gesetz berechnet. Obwohl maßgeblich von einem diffusiven Stofftransport durch die Haut ausgegangen und damit derzeit häufig das Ficksche Gesetz zu seiner Beschreibung genutzt wird (Forth 1996; Pirot 1997; Foldvari 1999), gestalten sich die tatsächlich ablaufenden Transportprozesse wegen des komplexen Aufbaus der Haut komplizierter. Im Realfall kann ein „Mitreißen“ der Substanz mit dem Lösungsmittel erfolgen (Advektion), die zu einer Beschleunigung des Transports führt, andererseits kann wie bereits erwähnt die unregelmäßige Poren- und Labyrinthstruktur der Haut den Transport behindern und damit verlangsamen (Huschka 1998; Ho 2003). Im Gegensatz dazu können Haarfollikel und Schweißdrüsen „Schnell-Transport-Wege“

darstellen, in dem sie Shunts in der Haut bilden (Ho 2003). Diese Mechanismen treten auch beim Substanztransport durch geologische Schichten und das Grundwasser auf, so dass bereits komplexe geologische Modelle für die Beschreibung des Substanztransports durch die Haut getestet werden (Ho 2003). Möglicherweise können diese Ansätze in Zukunft zu einer umfassenderen Modellierung des Stofftransportes durch Haut bzw. Dermis herangezogen werden.

In einer zweiten Versuchsserie der vorliegenden Arbeit wurde der BSA-Transport durch die Dermis nach Anlegen eines hydrostatischen Druckes betrachtet. Durch Änderung des hydraulischen Potentials mit der Strecke wird eine Strömung des gelösten Stoffes zusammen mit dem Lösungsmittel durch die Poren der Dermis verursacht. Neben dem diffusiven Stofftransport tritt hier ein Stofftransport durch eine Strömung (Konvektion) auf. Bei Strömungen durch Mikrokanäle liegt im Allgemeinen eine laminare Strömung mit geringen Reynoldszahlen vor (Ehrhard 2002). Da die Reynoldszahl das Verhältnis aus Trägheits- und Reibungskräften darstellt, kann bei kleinen Werten dieser dimensionslosen Kennzahl davon ausgegangen werden, dass die Reibungskräfte gegenüber den Trägheitskräften dominieren. Reibungskräfte entstehen an den Wänden des Mikrokanals und sind proportional zum dort vorliegenden Geschwindigkeitsgradienten. Mit Reduktion des Kanaldurchmessers nehmen der Geschwindigkeitsgradient an der Wand und damit die Reibungskraft stark zu. Vom Porenradius des Materials hängt ab, welcher Stofftransport (diffusiv oder konvektiv) überwiegt. Bei sehr kleinen Poren sind die Reibungskräfte so groß, dass die Flüssigkeit nur schwer in Bewegung gesetzt und damit die gelöste Substanz nicht mitgeführt werden kann, der Stofftransport erfolgt hier vorrangig diffusiv. Mit zunehmendem Porendurchmesser sinken die Reibungskräfte an den Porenwänden und die Trägheitskräfte steigen. Zusammen mit dem Fluid wird die gelöste Substanz transportiert, der konvektive Stoffstrom nimmt stark zu. Rzepka berechnete, dass in Filtern ab einem Porenradius von 15 μm der konvektive Stoffmengenfluss dominiert (Rzepka 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass bei Anlegen eines hydrostatischen Druckes die Proteinlösung schnell durch die azelluläre Dermis strömte. Die nach Kammerdurchtritt ermittelten Konzentrationsgradienten waren sehr steil und übertrafen die in den Diffusionskammern bestimmten Gradienten. In den Perfusionskammern wurde das Modellprotein mit der Strömung des Lösungsmittels mitgeführt, maßgeblich für den Stofftransport war hier der konvektive Transport. Die mittlere Porengröße der Dermis, welche von Pins auf 36,25 μm beziffert wird (Pins 2000), schließt also prinzipiell einen konvektiven Stofftransport nicht aus. Die deutlich schnellere Konzentrationszunahme im Akzeptor der Perfusionskammer zeigte des Weiteren, dass der Stofftransport in der Perfusionskammer gegenüber dem Transport in der Diffusionskammer erhöht war. Die Konvektion kann damit maßgeblich zur Verbesserung des Stofftransportes durch humane azelluläre Dermis

beitragen. Dieser Umstand sollte bei zukünftigen Untersuchungen zur Besiedelung und Kulturführung der Präparate berücksichtigt werden.

Durch mehrschichtige Applikation der Dermis kann eine Reparatur größervolumiger Gewebsdefekte erreicht werden.

Durch eine einlagige Anwendung azellulärer Dermis kann nur eine geringe Volumenfüllung vermittelt werden, da die Materialdicke mit ca. 200 µm relativ gering ist. Weil die natürliche Hautstruktur, abhängig von der Lokalisation, eine maximal drei Millimeter dicke Dermissschicht ausweist (Junqueira 1996), ist die Präparatedicke schon allein durch diese Gegebenheiten limitiert. Bei tieferer Entnahme des Ausgangsgewebes Haut resultierte eine unerwünschte, nachfolgend nur schwer zu entfernende Codistribution von Fettgewebe.

Eine mehrlagige (a) oder drapierte (b) Anwendung der zuvor mit Fibroblasten besiedelten Dermis ist jedoch zur Gewährleistung einer Volumenfüllung vorstellbar (Abb. 87). Aufgrund der hohen Materialflexibilität und –weichheit steht dieser Modifikation nichts im Wege.

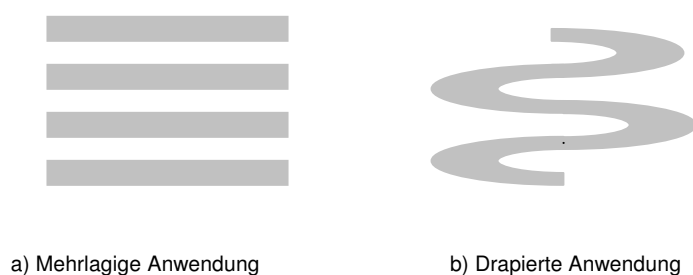


Abb. 87: **Anwendung der Dermis zur Füllung größervolumiger Defekte**

Die Vorteile dieser Applikationsmethode für die besiedelte Dermis sind darin zu sehen, dass eine initiale Besiedelung relativ dünner Präparate und ihre nachfolgende Kombination einen hohen Zell-Trägermaterial-Ratio erlaubt und damit bei Transplantation viele Zellen in den Gewebsdefekt überführt werden können. In diesem Falle muss jedoch sichergestellt werden, dass auch die Zellen in zentralen Regionen des nun mit besiedelter Dermis aufgefüllten Defektes ausreichend durch Diffusion versorgt werden, bis der Anschluss des Transplantates an das Gefäßsystem erfolgt ist. Weitere Aussagen über die letztendlich augmentierbaren Volumina können jedoch nur detaillierte *in vivo* Untersuchungen liefern.

Die hohe Biokompatibilität der azellulären Dermis schafft die Voraussetzungen für eine in vitro Besiedelung der Matrix mit Zellen sowie eine potentielle klinische Anwendung.

Ein Material kann längerfristig für ein biologisches System nur als biokompatibel, also verträglich, angesehen werden, wenn es keine Immunreaktion oder cytotoxische Wirkung verursacht (Pruitt 1984; Middelkoop 1995; Walter 1996).

Bei *in vitro* Tests konnte keine sich durch signifikante Stimulierung von peripheren Blutlymphozyten äußernde Antigenizität von Dermishomogenisaten nachgewiesen werden (vgl. 6.1.2.1). Im Gegensatz dazu reagierten die Blutlymphozyten auf das polyklonale Mitogen Phythämogglutinin mit einer Aktivierung und Proliferation. Die geringe Antigenizität der hergestellten azellulären Dermis ist durch eine effektive Entfernung zellulärer Elemente, die eine Immunantwort hervorrufen, zu erklären. Die Struktur der extrazellulären Matrix humaner Haut ist hoch konserviert und wirkt allein nicht immunogen (Pachence 1996).

Humane azelluläre Dermis wurde - wenn auch in keinem Falle virusinaktiviert - von anderen Arbeitsgruppen klinisch in der Regel als zellfreies, oberflächlich appliziertes Präparat zur Behandlung von tiefermalen Verbrennungen, bei Verlust von tieferliegenden Hautschichten, z.B. nach Traumen, oder bei chronischen Wunden sowie zur Behandlung von Gewebdefekten bei Narbenexzision eingesetzt. Dabei existieren keine Berichte über eine Aktivierung des Immunsystems nach Anwendung der Transplantate (Kraut 1995; Sheridan 1997; Munster 1997). Diese Voraussetzungen haben wichtige Implikationen. Im Gegensatz zu allogener Haut (Koller 2001) wird eine humane azelluläre Dermis aufgrund ihrer geringen Antigenizität nicht abgestoßen, sondern in das Transplantatlager integriert (Kraut 1995; Takami 1996; Gustafson 1999). Dies würde auch die Möglichkeit zur längerfristigen Behandlung von Volumendefekten eröffnen.

Cytotoxische Substanzen beeinträchtigen die Proliferation, den Metabolismus und die Vitalität von Zellen (Schönfeld 1993; Wenzel 1998). Daraus können zum einen Zell- bzw. Gewebsschäden resultieren (Wenzel 1998), zum anderen kann eine Zell-Material-Interaktion, die für einen Einbau von Implantaten in ein Transplantatlager erwünscht ist (Kraut 1995; Sieminski 2000; Welle 2001), erheblich herabgesetzt werden.

Die Cytotoxizität („Giftigkeit“) der hergestellten Dermis wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kokultur mit dermalen Fibroblasten untersucht (vgl. 6.1.2.2). Hier führte die azelluläre Dermis zu keiner Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität der Zellen, welche eine cytotoxische Wirkung eines Agens erkennen ließe (Wenzel 1998). Demzufolge wurden die im Rahmen des Herstellungsprozesses bei der Dezellularisierung und Sterilisation verwendeten Substanzen effizient aus den Präparaten gewaschen; die biologische Struktur selbst kann als bioinert angesehen werden.

Die hohe Materialstabilität der azellulären Dermis erlaubt die Herstellung zellbesiedelter Präparate mit stabilen Materialeigenschaften sowie eröffnet die Möglichkeit der längerfristigen Anwendung dieser Transplantate zur Auffüllung von Gewebdefekten.

Um über längere Zeiträume zum Auffüllen von Gewebdefekten anwendbar zu sein, muss ein Gewebersatz über eine hohe Stabilität verfügen. Dafür sind insbesondere der Erhalt

mechanischer Eigenschaften, der Materialstruktur sowie des Materialvolumens von hoher Bedeutung. Viele Implantate wie synthetische oder semisynthetische Gewebersatzmaterialien erfüllen über einen längeren Zeitraum diese Anforderungen nicht. Sie sind degradierbar, werden also im Transplantatlager (Yannas 1994; Sheridan 1994; Pachence 1996; Hoerstrup 2000) oder bereits bei Untersuchungen im *in vitro* Modell (Sittinger 1994; Carrier 1999) zersetzt. Neben der Herabsetzung der Materialstabilität treten oftmals Probleme durch Abbauprodukte und daraus resultierende Milieuänderungen auf (Tab. 26).

- Überleben von Zellen in der sich ändernden Umgebung eines erodierenden Polymers
- Verlust der mechanischen Stabilität
- Gewichts-/Volumenverlust
- Freisetzung toxischer Degradationsprodukte
- Änderung des Milieus, z.B. des pH-Wertes
- Änderung der Mikrostruktur des Trägermaterialkerns, z.B. Porengröße
- Feed-back Effekte von chemischen und physikalischen Änderungen auf die Degradation

Tab. 26: **Probleme bei degradierbaren Polymeren** (Goepferich 1996)

Die Materialstabilität azellulärer Dermis und synthetischer Vergleichsmaterialien wurde bei Langzeitinkubation im Medium bei einer Temperatur von 37 °C untersucht. Bei der Dermis konnte hierbei keine durch Substanzfreisetzung aus dem Präparat hervorgerufene pH-Änderung des Mediums festgestellt werden (vgl. 6.1.4.1). Eine drastische pH-Erniedrigung – wie dies beim Vergleichsmaterial „gefärbtes Vicryl“ zu beobachten war –, würde sich gleichermaßen *in vitro* und *in vivo* ungünstig auf Zellvitalität und –wachstum auswirken (Goepferich 1996). Verursacht sein kann diese pH-Absenkung durch einen vorzeitigen Zerfall des Vicryls in seine Komponenten (Poly)Glycolsäure und (Poly)Milchsäure (Athanasίου 1996). Zusätzlich zur Milieuänderung können sich diese freigesetzten Degradationsprodukte auch wegen ihrer Cytotoxizität negativ auf Zellen auswirken (Sittinger 1994).

Bei vierwöchiger Inkubation konnte keine signifikante Volumenreduktion der azellulären Dermis festgestellt werden; auch nach sieben Wochen zeigte sie einen 87%igen Volumenerhalt (vgl. 6.1.4.2). Dieser ist im Vergleich zu synthetischen und semisynthetischen Trägermaterialien, welche laut anderen Autoren bereits nach einmonatigem Einsatz im *in vitro* Modell eine Volumenreduktion von 50% und mehr aufwiesen (Koide 1993; Ishaug 1997; Carrier 1999), als hoch zu bewerten. Die hohe Volumenstabilität der hergestellten azellulären

Dermis macht sie für eine länger währende Auffüllung von ausgeprägten Gewebsdefekten äußerst attraktiv.

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes konnten keine Strukturveränderungen der azellulären Dermis identifiziert werden, die auf eine Beschädigung der Kollagenfasern schließen ließen. Jedoch erschien die Matrix nach 4 Wochen insgesamt weicher, so dass das verwendete Messinstrument zur Bestimmung der Präparateabmessungen (Mikrometermessschraube) tiefer in das Material eindrang. Minderbestimmungen der Dicke können deshalb leider nicht ausgeschlossen werden. Die „Weichheit“ der Präparate kann auf eine Wassereinlagerung in das Gewebe (Mazeration) zurückgeführt werden. Diese ruft eine Quellung des Materials hervor und tritt unter bestimmten Umständen, z.B. bei Schweißansammlungen auf der Haut, auch im menschlichen Organismus auf. Die hohe Kollagenaseresistenz der langzeitinkubierten Dermis deutet darauf hin, dass die Mazeration selbst zu keinem beschleunigten Abbau des Materials führt, auch aus der Fachliteratur sind keine entsprechenden Berichte bekannt. Allerdings dürfte die Mazeration für eine potentielle klinische Anwendung auch insofern nicht interessant sein, dass die Dermis für eine schnelle Therapieoption schon zu einem früheren Zeitpunkt transplantiert würde (z.B. nach 10tägiger Besiedelung), an dem keine Präparatequellung beobachtet wurde. Bei Anwendung der Präparate im Tiermodell (vgl. 7.5), deutete nichts darauf hin, dass sich nach der Transplantation Wasser in den Präparaten einlagerte.

Durch eine hohe natürliche Quervernetzung weist die hergestellte azelluläre Dermis eine hohe Kollagenaseresistenz auf.

Da kollagenhaltige Materialien in Kontakt mit Zellen und Geweben potentiell einem Kollagenaseangriff ausgesetzt sind und dadurch schnell abgebaut werden (Pachence 1996; Geiger 2002), wurde die Kollagenaseresistenz der azellulären Dermis getestet. Hierbei wurde eine definierte Konzentration bakterieller Kollagenase I verwendet (Lee, J.E. 2001). Diese weist hinsichtlich der im menschlichen Körper vorkommenden Kollagenasen eine hohe Ähnlichkeit der katalytischen Dömane auf. Das Enzym spaltet hochspezifisch Peptidbindungen in einer X-Gly-Pro-Sequenz innerhalb der tripel-helikalen Struktur des Kollagenmoleküls. Durch Quervernetzung aggregierte Tropokollagenmoleküle sind durch sterische Hinderung nicht zugänglich für den Enzymangriff (Olde-Damink 1995; Lee, W.K. 2001).

Im Vergleich zu semisynthetischen Kollagenmaterialien (Lee, J.E. 2001) zeigte die hergestellte azelluläre Dermis eine erhebliche, 3 bis 4 Zehnerpotenzen größere Kollagenaseresistenz. Das ist auf die hohe natürliche Quervernetzung der Kollagenstränge in der Dermis zurückführbar, die den Enzymzugriff blockierte. Da laut *Yannas in vitro* erhobene Daten für die Kollagenaseresistenz von Implantatmaterialien gut mit dem Degradationsverhalten nach subkutaner Applikation korrelieren (Yannas 1975), lässt sich

schlussfolgern, dass die azelluläre Dermis auch nach Transplantation in einen Gewebsdefekt eine hohe Stabilität gegen enzymatische Degradation aufweisen und damit die längerfristige Volumenfüllung erlauben könnte.

Die natürliche Oberflächenstruktur der hergestellten azellulären Dermis unterstützt die Besiedelung mit Zellen.

Neben der Toxizität und Antigenizität sind die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Materialoberfläche für eine gute Zellakzeptanz (Welle 2001), aber auch für die Zellmigration, -proliferation und -syntheseleistung bedeutsam (Ehrlich 1995; Grande 1997; Chevally 2000 a, b). Insbesondere bei synthetischem Gewebsersatz sind die Grenzflächen nicht immer dazu geeignet, eine optimale Interaktion mit Zellen zu gewährleisten (Angelova 1999).

Mit Keratinozyten wurde demonstriert, dass azelluläre Dermis auch bei Verwendung von niedrigen Einsatzzellichten und ohne Anheftungshilfe durch Feederlayer eine gute Wachstums Oberfläche liefert (vgl. 6.1.2.3). Entscheidend dafür ist der hohe Anteil von natürlich angeordneten Interzellulärsubstanzen in der Dermis, die an vielen zellulären Funktionen wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung beteiligt sind (Raghow 1994). Die Dermis unterstützt das Wachstum der beiden wichtigsten Hautzellen, der Fibroblasten (siehe 7.3) und der Keratinozyten, was Möglichkeiten zur Anwendung als Dermis- bzw. Hautersatz eröffnet (Abb. 88).

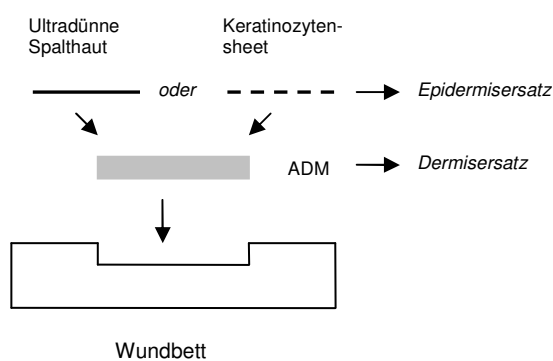


Abb. 88 a: **ADM als Dermisersatz**

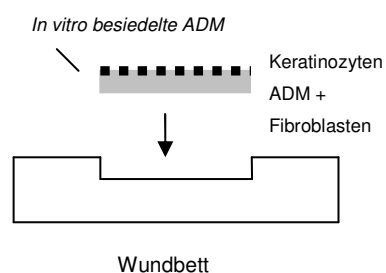


Abb. 88 b: **ADM als Hautersatz**

Die Materialeigenschaften der azellulären Dermis favorisieren sie für die Anwendung als Trägermaterial zur Herstellung Fibroblasten-besiedelter Präparate.

Zusammengefasst konnten bei der azellulären Dermis folgende Materialeigenschaften nachgewiesen werden, die sie als Matrix für die Herstellung eines Gewebersatzes zur längerwährenden Füllung von Weichgewebsdefekten favorisieren:

Flexibilität	→	hoch
Verarbeitbarkeit	→	gut
Langzeitstabilität <i>in vitro</i>	→	hoch
Sauerstoffdurchlässigkeit	→	hoch
Permeabilität für Proteine und Wasserdampf	→	hoch
Biokompatibilität	→	hoch
Oberflächeneignung für Zelladhäsion und –proliferation	→	gut

Tab. 27: Zusammenfassung der Materialeigenschaften der humanen azellulären Dermis

Für die guten Eigenschaften der azellulären Dermis ist wesentlich verantwortlich, dass es sich hierbei um ein biologisches Material mit einer komplexen Struktur handelt. Dieses ist äußerst vorteilhaft für das Tissue Engineering, weil

- die Zellen mit dieser Matrix bereits natürliche Anheftungsstrukturen vorfinden und eine zusätzliche Beschichtung damit nicht erforderlich ist.
- die Matrixzusammensetzung und Stabilität dem natürlichen Gewebsaufbau ähnelt und damit die Interaktion mit Zellen und einem Transplantatlager erleichtert.
- in der azellulären Dermis Leitstrukturen für eine gerichtete Gewebsneubildung vorhanden sind, z.B. zellfreie Gefäßstrukturen.
- die Dermis große Mengen extrazellulärer Matrix in einer natürlichen Anordnung liefert, die sowohl bei während der Kultivierung als auch bei *in vivo* nach Transplantation ablaufenden Prozessen eine große Rolle spielt.

Im Gegensatz dazu wiesen die parallel untersuchten synthetischen Matrizen nicht alle diese Eigenschaften auf. Darüber hinaus können vielfältige Probleme bei ihrer Resorption auftreten (vgl. Tab. 26); sie sind damit nicht als Grundlage für den in dieser Arbeit zu erstellenden Weichgewebersatz geeignet. Bei semisynthetischen Gewebersatzmaterialien, z.B. Kollagenmatrizen, schränkt insbesondere ihr schneller enzymatischer Abbau im Transplantatlager (Koide 1993; Pachence 1996; Geiger 2002) ihre Einsetzbarkeit zur länger andauernden Augmentation von Weichgewebsdefekten ein.

7.2 Gewinnung von Fibroblastenkulturen

Zur Herstellung eines zellbasierten Weichgewebersatzes lassen sich Fibroblasten effektiv aus Vollhautproben isolieren und expandieren.

Die ersten Schritte der Herstellung Fibroblasten-besiedelter Präparate stellten die Zellisolierung und initiale Expansion der Zellen in zweidimensionaler Kultur dar. Diese Expansion wurde solange durchgeführt bis eine ausreichende Zellzahl für die Einsaat auf die Matrix erreicht war. Dermale Fibroblasten ließen sich gut enzymatisch aus Hautbiopsaten isolieren und vermehren. Signifikante Unterschiede im Wachstum von verschiedenen alten Spendern (im Rahmen der Arbeit < 60 Jahre) herrührenden Zellen waren nicht feststellbar (vgl. 6.2). *Schneider* bemerkte bei mehr als 65 Jahre alten Spendern ein verschlechtertes Fibroblastenwachstum (*Schneider* 1979). Gegebenenfalls muss dieser Umstand für einen klinischen Einsatz der Präparate bei älteren Patienten berücksichtigt und längere Kulturzeiträume eingeplant werden. Die Zellproliferation konnte durch ein einfach zusammengesetztes Medium unter Zusatz von fetalem Kälberserum angeregt werden. Für eine klinische Anwendung kann es jedoch angezeigt sein, dieses Serum durch autologes Serum zu ersetzen, um das Risiko der Krankheitsübertragung zu reduzieren.

Mit zunehmender Kulturdauer wurde eine mit Erhöhung der Generationszeit einhergehende Wachstumsverlangsamung beobachtet. Das spiegelt den Umstand wider, dass primäre Zellen *in vitro* nur ein begrenztes Vermehrungspotential haben (*Schneider* 1979) bis sie in eine Phase der Seneszenz übergehen (*Hayflick* 1979). Die Seneszenz von Fibroblasten tritt jedoch erst bei ca. Passage 20 auf (*Kunz-Schughart* 2001), so dass sie für die notwendige Zellexpansion keine Relevanz haben sollte. Bis zur 5. Passage konnten die Zellen mehr als 5000fach expandiert werden. Geht man bei Etablierung der Primärkultur von einer Zellausbeute von 5 Millionen Zellen pro Gramm Haut aus (siehe 6.2) und nimmt zudem an, dass zur Zellgewinnung 10 mg Haut zur Verfügung stehen, lässt sich in der 5. Passage damit eine Menge von 250 Millionen Fibroblasten gewinnen. Bei einer einseitigen Einsaat auf die azelluläre Dermis mit einer Zelldichte von $1,57 \cdot 10^4$ Zellen/cm² (siehe 6.3) können fast 16.000 cm² Dermis besiedelt werden. Die Bereitstellung Fibroblasten-besiedelter Präparate ist damit also nicht durch die Zellexpansion limitiert.

7.3 Anzüchtung trägerbasierter Fibroblastenkulturen

Azelluläre Dermis bietet eine gute Grundlage für die Fibroblastenadhäsion.

Da Fibroblasten nicht in der Lage sind, allein einen dreidimensionalen artifiziellen Gewebsverband zu bilden, müssen für das Tissue Engineering eines Weichgewebsersatzes die expandierten Fibroblasten mit einem Trägermaterial – hier der hergestellten azellulären Dermis – kombiniert werden (vgl. 6.3).

Die Fibroblasten zeigten nach statischer Einsaat durch Aufpipettieren erst ab einer bestimmten Einsaat Zelldichte ($1,57 \cdot 10^4$ Zellen/cm²) auf der Dermis ein besseres Wachstum als auf herkömmlicher Zellkulturplastik. Mercier beobachtete nach Einsaat eine Konzentrierung von Fibroblasten in verschiedenen Arealen kollagener Matrix; im Gegensatz dazu wiesen synthetische Oberflächen eine uniformere Zellverteilung auf (Mercier 1996). Diese regional stärkere Zellakkumulation ist auf die Anisotropie der extrazellulären Matrix in biologischen Strukturen zurückzuführen. Damit ein für die Zellproliferation günstiges Mikromilieu mit einer spezifischen Zelldichte geschaffen werden kann, müssen also höhere Zellzahlen appliziert werden, um diesen Effekt auszugleichen. In diesem Mikromilieu können Fibroblasten über lösliche Faktoren sowie Zell-Zell-Kontakt interagieren (Putnam 1996). Die von Fibroblasten gebildeten Wachstumsfaktoren bewirken eine autokrine Stimulation (Zerveola 2000; Falanga 2002).

Die Proliferation von Fibroblasten auf der dermalen Matrix ist in Analogie zur Wundheilung zeitlich limitiert.

Die Kenntnis des Wachstumsverhaltens trägerbasierter Zellkulturen ist in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung. Hierzu zählen die Beschreibung des Züchtungsprozesses und die Optimierung der Kulturbedingungen, aber auch die Charakterisierung der Präparateigenschaften und die Festlegung des optimalen Transplantationszeitpunktes. Vor allem der für einen Transplantationserfolg entscheidende „Besiedelungsgrad“ der durch das Tissue Engineering erzeugten Präparate wird kontrovers diskutiert; leider fehlen oftmals vergleichende Untersuchungen. So werden von verschiedenen Arbeitsgruppen Träger unmittelbar nach der *in vitro* Adhäsion der Zielzellen zur Transplantation herangezogen (Murphy, G.F. 1990; Mooney 1994; Patrick 2002); andere Forscher kultivieren beimpfte Materialien über lange Zeiträume, in denen die Zellen proliferieren, differenzieren und teilweise erheblich extrazelluläre Matrix bilden (Eaglstain 1995; Naughton 1997; Mansbridge 1998). Es gibt Indizien dafür, dass bestimmte Kulturzeiträume für die Stabilität der Zellstruktur erforderlich sind (Freed 1994; Naughton 1997), dass sich jedoch andererseits „jüngere“ Präparate besser in einen Gewebsdefekt integrieren (Grande 1997).

Die Fibroblasten zeigten auf der azellulären Dermis eine gute Proliferation, jedoch war nach der 2. Kulturwoche keine signifikante Zunahme der Zellzahl zu verzeichnen; parallel dazu wurde ein Absinken der spezifischen DNS-Synthese auf einen konstanten Wert beobachtet. Dieses Wachstumsverhalten von Fibroblasten wird auch durch andere Autoren bestätigt (Hansborough 1994; Berthod 1996; Sugihara 2001). Eine Substratlimitierung bzw. korrespondierende Anhäufung von Stoffwechselprodukten können als Ursache für die zeitlich begrenzte Proliferation der Fibroblasten ausgeschlossen werden, da ein regelmäßiger Medienwechsel erfolgte und weder für die wichtigsten Substrate Glukose und Sauerstoff suboptimale bzw. für die potentiell schädliche Stoffwechselprodukte Laktat und Ammonium (Bödeker 1985; Butler, M. 1991) überkritische Konzentrationen detektiert werden konnten.

Da prinzipiell die Möglichkeit einer mehrschichtigen Besiedelung der Dermis festgestellt wurde, kam zumindest in der untersten Zellschicht ein Wachstumsstopp durch Kontaktinhibierung oder Raumlimitierung (Galban 1999) nicht zum Tragen. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass Zellen auch *in vitro* ein programmiertes Verhalten ausführen (Xhu 1997; Galban 1999). Vergleicht man die bei der Wundheilung ablaufenden Vorgänge, entdeckt man Parallelitäten zu dem auf der Dermis gefundenen Wachstumsverhalten: in der Wunde ist – nach einer initialen Phase der Zellmigration – der höchste mitotische Index ca. am dritten Tag festzustellen, dann sinkt er bis zum 7. Tag und erreicht einen konstanten, niedrigen Wert wie in normaler Dermis, wo die inaktiven Fibrozyten dominieren (Junqueira 1996). Die Zellzahl und Vitalität bleibt in diesem Zustand (Spyrou 1998) wie auch bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *in vitro* Kulturen auf der azellulären Dermis über einen langen Zeitraum erhalten. Diese Kontinuität erscheint förderlich für die Transplantatstabilität, d.h. für die Aufrechterhaltung der Zellularität. Hinsichtlich des Besiedelungsgrades des Trägermaterials ist es nicht günstig, ausgedehnte Kulturzeiträume zu verwenden. Der für eine Transplantation letztendlich optimale Zeitpunkt lässt sich jedoch nur aus vergleichenden *in vivo* Untersuchungen mit verschiedenen „alten“, besiedelten Präparaten (Grande 1997) ableiten.

Die Art und der Reifezustand der Wachstumsgrundlage beeinflussen die Proliferation von Fibroblasten.

Neben der Art der extrazellulären Matrix hat auch ihr Reifezustand, d.h. ihre dreidimensionale Anordnung, einen Einfluss auf die Zellproliferation (Clark 1995; Zerveola 2000; Pinney 2000). Mit diesem Hintergrund wurde die Fibroblastenproliferation auf folgenden Oberflächen verglichen:

- auf der reifen, aus stark quervernetzten Kollagenfasern bestehenden, azellulären Dermis

- auf einer synthetischen Wachstumsgrundlage (Zellkulturplastik)
- in Kollagengelen, welche eine unreife, nicht quervernetzte Matrix aus fibrillärem Kollagen darstellen (semisynthetischer Träger).

Nishikawa und *Hillmann* stellten fest, dass eine Matrix mit hoher Quervernetzung die Fibroblastenproliferation stimuliert (Nishikawa 1987; Hillmann 2002). Diese Aussage wird auch durch das im Rahmen dieser Arbeit beobachtete und im Vergleich zum Kollagengel deutlich bessere Fibroblastenwachstum auf der reifen azellulären Dermis bestätigt. Die Erklärung für diese Differenz ist wahrscheinlich in den im Rahmen der Wundheilung ablaufenden Prozessen zu finden. Dabei sind die Ansätze auf der azellulären Dermis bzw. auf dem Kollagengel mit verschiedenen Stadien und Abläufen der Wundheilung (primär bzw. sekundär heilende Wunde) vergleichbar (Abb. 89).

Mit Fibroblasten vermischtes Kollagengel, welches auch bei vielen Untersuchungen als Modell für Granulationsgewebe dient (Vaughan 2000; Grinnell 2002), spiegelt einen schon mit einer neu synthetisierten Matrix aufgefüllten Defekt wider, der nun umgebaut, d.h. in eine dreidimensionale Gewebsstruktur überführt werden muss. In diesem Kontext tritt die Fibroblastenproliferation zugunsten der Matrixremodellierung in den Hintergrund (Mueller, P.K. 1995; Ehrlich 1995). Im Gegensatz dazu kann die anfänglich zellfreie Dermis, die dann anschließend in Kontakt mit Fibroblasten kommt, in ein früheres Stadium der Wundheilung einordnet werden: dem Stadium, bei dem in einem reifen Gewebe eine Wunde gesetzt wird, die es nun gilt, durch Migration und Proliferation der Fibroblasten zu füllen. In der reifen Dermis liegt wenig unvernetztes Kollagen vor, so dass die Kollagenremodellierung eher in den Hintergrund tritt. Die Ergebnisse zeigen, dass es für die Zellproliferation förderlich ist, eine hoch organisierte Matrix als Trägerstruktur zu verwenden.

Das unterschiedlich stark ausgeprägte Zellwachstum auf der Dermis bzw. dem Kollagengel kann zusätzlich auch durch eine verschieden starke Stimulation durch Wachstumsfaktoren bedingt sein. Insbesondere die Glykosaminoglykane können in Weichgeweben Wachstumsfaktoren binden und damit einen Rückhalt und eine optimale Ausrichtung der Moleküle für Zellen ermöglichen (Junqueira 1996; Naughton 1997). Die Anwesenheit matrixgebundener Wachstumsfaktoren wird für die heilungsfördernde Wirkung von verschiedenen Gewebstransplantaten (Amnion, allogene Haut) mitverantwortlich gemacht (Hansbrough 1992). Mit den Interzellulärsubstanzen assoziierte Wachstumsfaktoren lagen möglicherweise auch in der humanen azellulären Dermis vor und regten das Zellwachstum an. Zusätzlich nimmt die räumliche Anordnung von Zellen auch Einfluss auf die Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren und damit auf die Fähigkeit von Zellen, auf Wachstumsfaktoren zu reagieren. Eine Interaktion von Zellen mit einer komplex aufgebauten, möglichst nativen extrazellulären Matrix ist sehr förderlich für die Stimulation durch Wachstumsfaktoren (Nakagawa 1989; Zerveola 2000).

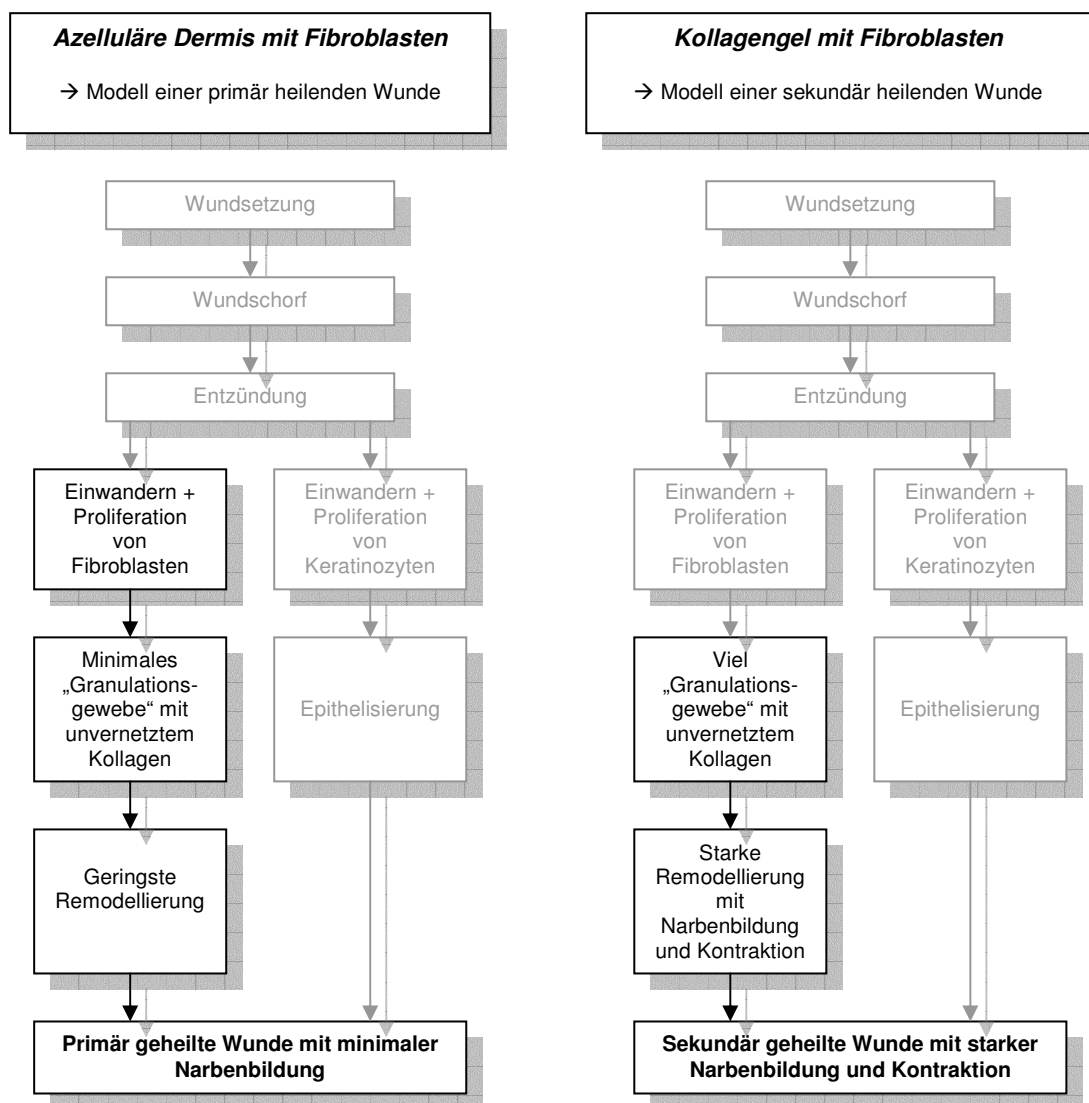


Abb. 89: Erklärung der Proliferation *in vitro* durch die bei der Wundheilung ablaufenden Prozesse, hervorgehoben sind die für den jeweiligen Ansatz relevanten Phasen der Wundheilung

Die metabolische Aktivität der Fibroblasten geht mit der Proliferation einher.

Mit der sinkenden Proliferation ging auch eine Reduktion der spezifischen mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität der Dermis-basierten Fibroblastenkulturen einher (6.3.2.2). Die mitochondriale Enzymaktivität nimmt laut *Naughton* einen Einfluss auf den Transplantationserfolg eines zellbesiedelten Materials, insbesondere auf die Adaptationsfähigkeit der Zellen an das neue Milieu (Naughton 1997). Demzufolge sollten zellbesiedelte Trägermaterialien mit einer hohen Aktivität für die Transplantation eingesetzt werden, lange Kulturzeiträume sind dafür ungeeignet.

Einen qualitativ ähnlichen Verlauf wie die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität nahm die Kollagensekretion in den Kulturüberstand; auch hier wurden mit zunehmender Kulturdauer sinkende Kollagenmengen in den Überstand abgegeben. Die Kollagenausschüttung ähnelt

prinzipiell den Gegebenheiten in heilenden Wunden, wo von den Fibroblasten in der ersten Woche am meisten Kollagen gebildet wird, die Kollagensynthese aber nachfolgend auf niedrigerem Niveau lange weiterläuft (Sedlarik 1993). Bedeutsam ist, dass die Kultivierung auf einer stark kollagenhaltigen, reifen Matrix (azelluläre Dermis) die Fähigkeit der Fibroblasten zur Kollagensynthese nicht beeinträchtigte. Dies zeigte sich darin, dass die Kollagensekretion Dermis-basierter Kulturen keine Unterschiede zur Kollagensekretion von Fibroblastenkulturen auf Zellkulturplastik aufwies.

Eine hohe Proteinsynthese, z.B. von Kollagen, ist für die Herstellung des besiedelten Präparates primär nicht erforderlich, da die azelluläre Dermis als Trägermaterial selbst schon eine entsprechende Komplexität aufweist. Nach Transplantation ist jedoch die Beteiligung der Fibroblasten an Reparaturprozessen, z.B. der Neubildung kollagener Matrix, erstrebenswert. Laut *Ferguson* tragen Fibroblasten nach Injektion in einen vorbestrahlten Gewebsdefekt über einen aktiven Mechanismus zur Wundheilung bei, da sie aufgrund besserer Proliferation, Migration, Kollagensynthese und –remodellierung die eingeschränkten Funktionen der radiogeschädigten Fibroblasten im Transplantatlager ausgleichen können (Ferguson 1999). *Sato* stellte fest, dass in Fibroblastenkulturen nach Akkumulation von Kollagensträngen im extrazellulären Raum eine dermisähnliche Struktur gebildet wurde (Sato 1998). Auch nach der Transplantation können Fibroblasten weiterhin Kollagen in einen Gewebsdefekt abgeben, welches mit der Zeit in eine reifere Gewebsstruktur überführt wird (Ferguson 1999; Lamme 2000). Mit zunehmendem Kollagengehalt im Defekt steigt die Wundreißfestigkeit des Gewebes, Heilungsstörungen nach der operativen Behandlung von Weichgewebssarkomen werden folglich reduziert (Marks 1991; Schäffer 2001).

Darüber hinaus nimmt die Sekretion von anderen Proteinen, insbesondere Wachstumsfaktoren, Einfluss auf die Proliferation und Aktivität der Zellen im Präparat selber (autokrin) sowie auf andere Zelltypen im Transplantatlager (parakrin). Fibroblasten sind in der Lage, angiogenetische Proteine wie VEGF, HGF und Angiopoetin-1 zu synthetisieren, die die Vaskularisierung eines Grafts beschleunigen (Naughton 1997; Black 1998; Pinney 2000). Des Weiteren werden können von ihnen auch nach der Transplantation Mitogene wie KGF, PDGF und TGF und FGF abgegeben werden, die gewebständige Zellen stimulieren (Hansbrough 1994; Naughton 1997; Pollak 1997).

Der Organisationszustand der Matrix beeinflusst die Kollagenasesekretion der Zellen; durch azelluläre Dermis wird keine erhebliche Kollagenasefreisetzung hervorgerufen.

Die Kollagenasesekretion in den Kulturüberstand spiegelt eine natürlicherweise im Rahmen der Wundheilung vorkommende Aktivität der Fibroblasten wider, zur Remodellierung und damit Reifung der neu synthetisierten kollagenen Matrix beizutragen (Junqueira 1996; Kerkvliet 1999). In Fibroblastenkulturen und Weichgewebsexplantaten wird normalerweise

MMP-2 und -9 gebildet (Creemers 1998; Kerkvliet 1999), MMP-1 kann insbesondere in kontrahierten (Langholz 1995; Xhu 1997) oder künstlich „verwundeten“ Kollagengelen (Abe 2001) induziert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit nahm die Kollagenasefreisetzung mit längerer Kulturdauer ab und erreichte für die Ansätze auf azellulärer Dermis ein sehr niedriges Niveau. Dieses ist für eine spätere Defektheilung nach Transplantation wichtig, da eine permanent hohe Kollagenaseexkretion einen chronischen Gewebs-Turnover und eine eingeschränkte Heilung hervorrufen kann (Wysocki 1993; Ehrlich 1995). Im Vergleich zur Dermis zeigten die Kollagengelkulturen eine wesentlich höhere Kollagenasefreisetzung (vgl. 6.3.2.2). Obwohl Kollagen an der Induktion der Kollagenase beteiligt ist (Xhu 1997), nehmen insbesondere die Mikrofilamentorganisation (Unemori 1986; Tomasek 1997) und mechanische Stimuli (Prajapati 2000; Muder a 2000; Abe 2001) Einfluss. Bei Kollagengelkulturen verursacht die Kontraktion einen hohen mechanischen Stimulus (Yannas 1994; Xhu 1997; Chevally 2000 b). Mechanische Signale werden über mechano-sensitive Elemente ins Zellinnere übertragen, wo sie eine intrazelluläre Signaltransduktion auslösen (Jalali 2001; Liu 2002). Als Mechanosensoren können Integrine (Jalai 2001; Goldschmidt 2001) und die Zellmembran (Hamill 2001; Butler, P.J. 2001) fungieren. Obwohl der genaue Ablauf der intrazellulären Signaltransduktion nicht vollständig geklärt ist, gibt es Hinweise darauf, dass dafür die Phosphorylierung zellulärer Proteine von hoher Bedeutung ist (Langholz 1997; Li 1997; Han 2002). Es werden verschiedene MAP– (Mitogen-aktiviertes Protein) Kinasekaskaden, wie die JNK (c-Jun N-terminale Kinase) bzw. die ERK (extrazellulär signal-regulierte Kinase), aktiviert (Lee, D.J. 2000; Lambert 2001; Hirano 2002; von Wichert 2003), die zur Veränderung der Genexpression führen. So kann in kontrahierten Kollagengelen eine erhöhte MMP-Expression beobachtet werden (Xhu 1997; Lambert 2001). Für die Aktivität der MMP ist des Weiteren der Anteil des korrespondierenden Inhibitors TIMP bedeutsam (Ries 1995). Die Untersuchungen von *Muder a* weisen darauf hin, dass mechanische Signale auch die TIMP-Ausschüttung beeinflussen können; er beobachtete eine Reduktion der TIMP Konzentration in mechanisch belasteten (kontrahierten) Kollagengelen (Muder a 2000). Ist der MMP/TIMP Quotient erhöht, d.h. liegt TIMP in einer geringeren Konzentration vor, steigt die kollagenolytische Aktivität (Zerveola 2000). Die im Vergleich zu Kollagengelkulturen geringere kollagenolytische Aktivität der Dermis-basierten Fibroblasten könnte demnach auf die geringe Kontraktion dieser Matrix und damit geringe mechanische Signale zur Erhöhung der MMP-Expression bzw. zur Herabsetzung der TIMP-Expression zurückgeführt werden.

Der Aufbau der Matrix bestimmt ihren Widerstand gegen die Kontraktion durch Fibroblasten; die azelluläre Dermis schränkt eine Kontraktion stark ein.

Obwohl die Kontraktion physiologisch in Wunden einen Sinn macht – indem sie die Wundränder zueinander bringt und damit den Wundverschluss erleichtert (Martin, P. 1997) – ist sie aufgrund der damit verbundenen Volumenreduktion bei Ersatzmaterialien zur Gewebsauffüllung äußerst unvorteilhaft. Von kontrahierten porösen Kollagenmatrizen ist des Weiteren bekannt, dass durch die Reduktion der Porengröße ein Eindringen von Zellen behindert wird (Vassiere 2000; Besseau 2002). Die Kontraktion tritt insbesondere auf, wenn die Matrix stark remodelliert wird, also unreif ist (Middelkoop 1995; Ehrlich 1995). Dabei interagieren die Zellen über die Integrine $\alpha1\beta1$ und $\alpha2\beta1$ aktiv mit der Kollagenmatrix (Schiro 1991; Langholz 1995) und üben auf diese Zugkräfte aus (Gabbiani 1996). Das bewirkt eine Reorganisation der Proteintertiärstruktur und führt zur Retraktion, Kondensation und Kompaktierung der Kollagenfibrillen (Grinell 2000; Besseau 2002). Parallel dazu werden Fibroblastenmorphologie und –metabolismus umprogrammiert, so wird die Kollagensynthese inhibiert (Xhu 1997; Chevally 2000 b). Das Ausmaß der Kontraktion hängt davon ab, wie das Material in der Lage ist, den von Zellen ausgeübten Zugkräften zu widerstehen (Grinell 2000; Parajapati 2000). Da bei ihnen eine stärkere Remodellierung der unreifen Kollagenstruktur sowie eine geringe Materialstabilität vorlagen, zeigten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fibroblasten-besiedelten Kollagengele eine höhere Kontraktion als die besiedelte Dermis. Die unerhebliche Kontraktion der besiedelten Dermis steht im Gegensatz zu den Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen mit geringer komplexen kollagenen Trägermaterialien (Middelkoop 1995; Vaissiere 2000; Besseau 2002). Aufgrund der geringen Kontraktion ist der Volumenerhalt bei Fibroblasten-besiedelten Dermispräparaten groß. Das schafft gute Voraussetzungen für die längerfristige Anwendung dieser Präparate zur Auffüllung von Weichgewebsdefekten.

Nach statischer Zelleinsaat etablieren sich Fibroblasten nur oberflächlich auf azellulärer Dermis.

Nach statischer Zelleinsaat durch Aufpipettieren der Zellsuspension auf das Material (vgl. 6.3.1.2) orientierten sich die Zellen auf der Dermisoberfläche parallel zu den Kollagenfasern. Die Zellen drangen in keinem Falle in die Matrix ein. Gründe für das nicht vorhandene Einwandern der Fibroblasten in tiefere Dermissschichten bei statischer Einsaat können sein, dass

- a) die Fibroblasten nicht zur Zellmigration in der Lage waren.
- b) die Matrixstruktur selbst die Zellmigration blockierte.
- c) die Kulturbedingungen nicht die Zellmigration erlaubt haben.

Als Voraussetzung für das Eindringen von Fibroblasten in einen künstlichen Hautersatz benennt Geiger das Vorhandensein von Poren mit 40 µm Durchmesser (Geiger 2002). In Untersuchungen der Materialgrob- und -feinstruktur der hergestellten azellulären Dermis konnten keine signifikanten Veränderungen der Matrixarchitektur festgestellt werden (vgl. 6.1.1). Da diese Architektur, wie in nachfolgenden Untersuchungen bewiesen, prinzipiell das Eindringen von Zellen erlaubt, kann eine durch die Matrixstruktur behinderte Zellmigration als wenig wahrscheinlich angesehen werden.

Gegen eine durch ungünstige Nährstoffversorgung bei statischer Kultur (Substratlimitation in tieferen Dermissschichten) nicht gewährleistete Zelletablierung in der Matrix (Fall c) spricht, dass bei Verwendung einer anderen Einsaat- aber identischen Kulturmethode Fibroblasten im Inneren der dermalen Matrix detektiert werden konnten. Demzufolge waren die Fibroblasten selbst nicht in der Lage, in diesem Kulturansatz in die Matrix einzuwandern, obwohl sie prinzipiell zur Zellmigration befähigt sind und dieses im Rahmen der Wundheilung auch sehr aktiv tun (Gailit 1996).

Gemäß Palecek hängt die Zellmigration auf einer Matrix von der Integrin-Ligand Affinität, der Integrin-Expression in den Zellen sowie der Konzentration der extrazellulären Matrix ab (Palecek 1997). Eine Erklärung für die ausbleibende tieferreichende Besiedlung mit Fibroblasten kann aufbauend auf diesem Zusammenhang gefunden werden. Die Dermis stellt für die Fibroblasten das natürliche, voll ausgereifte Substrat dar. Durch hohe Ligandexpression auf der azellulären Dermis, hohe Integrinexpression in den Zellen sowie hohe Affinität von Ligand und Integrinen werden die Zellen so fest an die Matrix gebunden, dass sie nicht mehr in der Lage zur Migration sind. Möglicherweise hat diesen Vorgang die schnelle Sedimentation und Adhäsion der Zellen auf der Dermis bei Anwendung der statischen Einsaat befördert. Diese hohe Interaktion zwischen Zellen und Dermis zeigt zwar die gute Eignung des Materials für diesen Zelltyp, ist jedoch für eine tieferreichende Besiedelung mit Fibroblasten nicht förderlich. Weder längere, bis zu vier Wochen andauernde statische Kultivierung (vgl. 6.3.2) noch die Nutzung von Perfusionskammern (vgl. 6.3.4) konnten bei vorheriger statischer Zelleinsaat diesen Effekt aufheben.

Durch eine dynamische Zelleinsaat kann eine tiefere Besiedelung der azellulären Dermis erreicht werden.

Neben der statischen Zelleinsaat wurden weitere Methoden zur Zelleinsaat getestet, um die starke Ligand-Matrix-Interaktion zu vermeiden (vgl. 6.3.1.5). Für diese Strategie sprachen auch Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die bei Vorhandensein einer Relativbewegung zwischen Matrix und Zellen den besten Zelleintrag feststellten (Murphy 1990; Freed 1995; Kim 1998; Burg 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten bei Zelleinsaat auf einem Horizontalschüttler die Fibroblasten ausgehend von der retikulären Seite der Dermis in die Matrix eindringen, sich dort etablieren und vermehren. Als Mechanismus für einen tieferschichtigen Zelleintrag bei Relativbewegung zwischen Matrix und Zellen kann eine schwächere, weil kurzzeitige Interaktion zwischen Ligand und Integrinen angesehen werden, die durch die Strömung immer wieder unterbrochen und durch die Zellen anschließend neu geknüpft wird. Daraus entsteht eine Rollbewegung der Zellen auf der Oberfläche, die eine gute Interaktion der Zellen mit der Matrix, eine für die Migration geeignete Zellpositionierung und die dafür erforderliche Beweglichkeit zulässt (Goldstein 2002). Eine schnelle und zu feste Ligand-Integrin-Bindung wird damit vermieden. Dieses „Rollen“ ist ein z.B. auch im Kapillarendothel ablaufender Vorgang, der die Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten ermöglicht und trotzdem eine Weiterbewegung der Blutkörperchen gestattet (Hynes 1992). Die tieferschichtige Besiedelung der Dermis ist zu bevorzugen, da eine dreidimensionale Anordnung der Fibroblasten eine höhere, eher der Gewebssituation *in vivo* entsprechende Regulation der Zellfunktion gestattet und eine intensive Interaktion mit der Matrix ermöglicht (Fukamidzu 1990; Prapjapati 2000).

Ein Bioreaktorsystem wurde zur Kultivierung der Präparate in Perfusionskultur etabliert.

Zu Evaluierung, ob sich eine Strömung positiv auf die Fibroblastenbesiedelung der azellulären Dermis auswirkt, wurde ein Perfusionssystem etabliert (6.3.3.1). Im Gegensatz zu den häufig für das Tissue Engineering angewandten Bioreaktoren mit tangentialer Strömungsführung (parallel zur Präparateoberfläche) (Halberstadt 1994; Freed 1994; Sitter 1994) erlaubte das im Rahmen dieser Arbeit genutzte System eine Durchströmung der Präparate; die Strömung ist hierbei senkrecht zur Präparateoberfläche ausgerichtet.

Die Vorteile dieses Systems sind darin zu sehen, dass radiale Gradienten minimiert und potentiell eine Substrat- und damit Wachstumslimitierung in Randzonen des Transplantates vermieden werden. Des Weiteren können durch die Durchströmung auch tieferliegende Materialsichten versorgt werden und vom verbesserten Stofftransport profitieren (Carrier 2002). Bei dieser Strömungsführung ist jedoch potentiell mit axialen Substratgradienten aufgrund der Metabolisierung des Substrates beim Durchtritt durch das Material zu rechnen (Sardonini 1992); aber auch Stofftransportlimitierungen können dazu beitragen.

Der Substanzdurchtritt durch das Trägermaterial hängt davon ab, inwieweit das Material selbst sowie die Zellmasse und potentiell von ihr gebildete extrazelluläre Matrix den Stofftransport erlauben (Sardonini 1992; Freed 1994; Galban 1999). Durch die geringe Dicke der zellbesiedelten Dermis sowie den im Vergleich zu anderen Kulturen (Hybridomen, Knochenmarkzellen oder Hepatozyten) geringen Zellgehalt pro Volumen,

dürften die durch exzessive Metabolisierung des Substrates verursachten axialen Gradienten zu vernachlässigen sein. Bei der Dermis kann des Weiteren prinzipiell davon ausgegangen werden, dass die Zwischenfaserräume per se groß genug sind, um den Stofftransport zu erlauben, da sie einen Hauptkanal für den Substanzdurchtritt in humaner Haut darstellen (Bodde 1991; Forth 1996). Von humaner Haut ist bekannt, dass die Anwesenheit vitaler Zellen den Stofftransport nicht signifikant herabsetzt, sondern lediglich das in der azellulären Dermis nicht mehr vorhandene *Stratum corneum* einen erheblichen Widerstand gegen den Stofftransport aufweist (Elias 2001). Berechnungen ergaben, dass mit einer Konstrukt-hohlraumfraktion von 0,7888 auch in der Fibroblasten-besiedelten Dermis vergleichsweise große Durchtrittskanäle für das Medium vorliegen (vgl. 6.3.3.2).

Daher kann angenommen werden, dass bei Fibroblastenbesiedelung der azellulären Dermis die Zellmasse selbst keinen erheblichen Stofftransportwiderstand verursacht. Im Falle des Kollagens, des wichtigsten von Fibroblasten produzierten Moleküls der extrazellulären Matrix, konnte während der Kultivierung kein exzessiver Einbau in die Dermis festgestellt werden (vgl. 6.3.2.4), so dass auch dadurch wahrscheinlich keine Transportlimitierung verursacht wird. Schlussfolgernd daraus erscheint im Perfusionssystem auch in tieferen Schichten der besiedelten Dermis eine gute Substratversorgung möglich. Damit kann hinsichtlich des Stofftransportes eine Perfusionskultivierung unter Durchströmung der Präparate prinzipiell zur Kultivierung dreidimensionaler Fibroblastenkulturen angewendet werden.

Bei den im Perfusionssystem genutzten hydrodynamischen Bedingungen konnten keine negativen flussinduzierten Effekte auf die Zellen festgestellt werden.

Neben den Gegebenheiten des Stofftransportes sind auch hydrodynamische Bedingungen im Bioreaktor zu berücksichtigen. Eine Strömung wirkt auf Zellen *in vitro* direkt durch hydrodynamische Effekte und indirekt über ihren Einfluss auf den Stofftransport. Insbesondere der vorherrschende Volumenstrom und die daraus resultierenden Scherkräfte sind kritische Parameter für die Aufrechterhaltung der Adhärenz sowie Vitalität von Zellkulturen (Kent 1993; van Kooten 1993). Die Mechanotransduktion und intrazelluläre Signaltransduktion laufen bei Einwirken einer Scherbelastung prinzipiell wie bei anderen mechanischen Stimuli, z.B. mechanische Signale durch Kontraktion von Kollagengelen, ab (Takahashi 1996; Chen, K.D. 1999; Hamill 2001). Damit kann eine längerfristig einwirkende Scherbelastung zelluläre Prozesse wie die Proliferation beeinflussen (Statopoulos 1985; Lelkes 1991; Kretzmer 1991).

Bei dem im Rahmen von Vorversuchen ausgewählten Volumenstrom von 48 ml/h konnten keine negativen flussinduzierten Effekte (Nollert 1991; van Kooten 1993; Goldstein 2002), wie Zelldeformation, Ablösung der Zellen bzw. Zerstörung der Basalmembran mit

Freisetzung intrazellulärer LDH beobachtet werden (vgl. 6.3.3.2). Ein durch Scherkräfte verursachter Wachstumsstopp (Kretzmer 1991; Lin 2000) war auch bei längerer Anwendung dieser Strömungsbedingungen nicht feststellbar – die Fibroblasten vermochten auf der Dermis zu proliferieren (6.3.4.1). Für eine Bewertung nach hydrodynamischen Aspekten lässt sich daraus schlussfolgern, dass der genutzte Volumenstrom von 48 ml/h gut für die Kultivierung besiedelter Dermis geeignet war. Mit einer Reynoldszahl von $0,66E-3$ lag bei diesem Volumenstrom eine laminare Strömung vor; die auf die Zelloberfläche wirkende mittlere Schubspannung wurde mit $0,57E-3 \text{ N/m}^2$ berechnet.

Im Gegensatz dazu konnte bei Anwendung niedrigerer (30,5 ml/h) bzw. höherer (73,5 ml/h) Volumenströme eine Zellablösung vom Trägermaterial beobachtet werden. Im ersten Fall könnten die durch eine diskontinuierliche Förderung der Pumpe hervorgerufenen Druckstöße ursächlich dafür sein, im zweiten Fall war die erhöhte Schubspannung von $0,87E-3 \text{ N/m}^2$ möglicherweise abträglich für die Zellen.

Vergleichswerte für die von humanen Fibroblasten auf einer dermalen Matrix tolerierten Scherbelastung ($\tau_{krit.}$) liegen leider nicht vor. Untersuchungen anderer Autoren belegen jedoch, dass die Scherkraftresistenz von Zellen neben der Dauer der einwirkenden Scherbelastung von der Wachstumsgrundlage abhängig ist. Die von den Zellen tolerierte Scherbelastung nimmt mit dem Gehalt an Interzellulärsubstanzen zu (Goldstein 2002; Mann 2002). In diesem Kontext ist zu erwarten, dass die biologische Struktur der azellulären Dermis sich prinzipiell förderlich auf die Scherkrafttoleranz der Fibroblasten auswirkt.

Im Perfusionssystem ist möglicherweise auch das Mikromilieu bedeutsam für das Fibroblastenwachstum.

Im Gegensatz zur statischen Kultur, in der der Stofftransport zu den Zellen rein diffusiv erfolgt, kommt bei Bioreaktorsystemen neben dem diffusiven auch der konvektive Transport zum Tragen. Der Stofftransport zum Präparat ist damit insgesamt verbessert. Aus diesem Grunde konnten verschiedene Autoren eine bessere Zellproliferation und –aktivität konvektiv versorgter Zellkulturen feststellen (Kim 1998; Carrier 1999; Vunjak-Novakovic 1999; Burg 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bei Kultivierung Fibroblasten-besiedelter Präparate im Perfusionssystem keine gegenüber statischen Kulturen erhöhte Proliferation oder Stoffwechselaktivität der Zellen festgestellt werden. Die gleichartigen Ergebnisse in beiden Kultursystemen lassen prinzipiell zwei Schlüsse zu:

a) dass die unterschiedliche Kulturführung nicht entscheidend für den Kulturerfolg ist oder b) dass die Kultivierung im Perfusionssystem – trotz geeigneter hydrodynamischer Bedingungen – unter suboptimalen Umständen erfolgte, also bei Optimierung prinzipiell

bessere Resultate erzielt werden könnten, so dass sich der Vorteil der perfundierten Kultivierung bestätigen ließe.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach dem limitierenden Substrat für Fibroblasten. Im Gegensatz zu anderen Zellkulturen (Sandstrom 1996; Flendrig 1997; Sikavitsas 2000, Carrier 2002) konnte für die Fibroblasten-besiedelten Präparate anhand der hohen Gelöstsauerstoffkonzentration im Kulturmedium gezeigt werden, dass Sauerstoff nicht das limitierende Substrat darstellte (vgl. 6.3.4.2). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass nicht nur im Medium zugeführte Substrate, sondern von den Zellen selbst sekretierte Wachstums- bzw. chemotaktische Faktoren einen wesentlichen Einfluss auf die Gewebsneubildung *in vitro* nehmen (Nollert 1991; Halberstadt 1994; Peng 1996). Um einen stimulierenden Effekt aufzuweisen, muss der autokrine Faktor jedoch mit einer bestimmten lokalen Konzentration im System vorliegen. Peng beobachtete bei geringer Durchströmung eines Bioreaktors, d.h. höherer Verweilzeit, ein besseres Zellwachstum, da die Ausschüttung der autokrinen Faktoren schneller war als der Abtransport durch den Medienfluss und damit eine Akkumulation über der Zellschicht bewirkt wurde (Peng 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erlaubten möglicherweise die relativ geringen Verweilzeiten im Perfusionssystem keine Akkumulation autokriner Faktoren in einer geeigneten Wirkkonzentration. Eine Optimierung der Kulturbedingungen perfundierter Präparate kann gegebenenfalls ein günstigeres Mikromilieu für die Fibroblasten schaffen (siehe 8.1), so dass sich insgesamt bessere Erfolge als in statischer Kultur erzielen ließen. In diesem Zusammenhang muss jedoch geklärt werden, inwieweit die Fibroblasten einer zell- bzw. gewebsspezifischen internen Kontrolle unterliegen, wie sie von verschiedenen Autoren vermutet wird (Xhu 1997; Galban 1999), und wie stark ein Einfluss über die oben genannten Faktoren möglich ist. Insgesamt bietet jedoch ein Bioreaktorsystem Vorteile für die Herstellung zellbesiedelter Präparate (Tab. 28) und sollte deshalb auch weiterhin angewendet werden.

- Verbesserung des Stofftransportes
- Möglichkeit des Scale up
- Reduktion des Aufwandes für Medienwechsel und des damit verbundenen Kontaminationsrisikos
- Gleichmäßige Substratzuführung, verbesserte Abfuhr von Stoffwechselprodukten
- Möglichkeit der on-line Prozesskontrolle, z.B. Messung von pH und pO₂
- Möglichkeit zur Regelung des Systems

Tab. 28: **Vorteile der Nutzung eines Bioreaktorsystems zur Herstellung zellbesiedelter Präparate**

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aufgrund der erhöhten Medienzuführung die Substratversorgung und Abfuhr von Stoffwechselprodukten in der Perfusionkammer im Vergleich zur statischen Kultur verbessert ist (vgl. 6.3.4.2).

Die Anreicherung von Laktat in den statischen Kulturen machte sich in einem Absinken des pH-Wertes bemerkbar. Diese Herabsetzung des pH-Wertes kann zu ungünstigen Bedingungen für enzymatische Reaktionen führen, ein suboptimaler Ablauf spezifischer Stoffwechselwege kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Laktat selbst ist bei niedrigen pH-Werten ab einer Konzentration von 20 mM toxisch (Glacken 1988; Butler, M. 1991), diese Konzentration wurde jedoch selbst bei statischer Kultivierung nicht erreicht.

7.4 *In vitro* Modell zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf die Präparate

Eine hypoxische Kulturführung wirkt sich nicht proliferationsstimulierend auf Fibroblasten aus.

Situationen mit reduzierter Sauerstoffversorgung (Hypoxie) sind bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen im Gewebe anzutreffen (Falanga 1994; Galindo 2001). Dabei kann ein niedriger Sauerstoffpartialdruck einen Stimulus für die Fibroblastenproliferation darstellen (Herrick 1996; Tokuda 2000). Um Aussagen darüber treffen zu können, inwieweit sich eine Kultivierung unter reduzierter Sauerstoffzufuhr förderlich auf die Proliferation auswirkt, wurden im Rahmen dieser Arbeit Fibroblastenkulturen über längere Zeiträume unter hypoxischen Bedingungen geführt (siehe 6.4). Eine durch Hypoxie induzierte Proliferationserhöhung konnte dabei nicht bestätigt werden, eine gedrosselte Sauerstoffzufuhr bei Kultivierung der Zellen ist demzufolge nicht zur Erhöhung des Wachstums geeignet.

Verschiedene Autoren begründen eine Hypoxie-induzierte Proliferationsförderung von Fibroblastenkulturen durch eine erhöhte Ausschüttung autokrin wirkender Wachstumsfaktoren, wie z.B. von TGF und PDGF (Falanga 1993; Herrick 1996; Steinbrech 1999). Darüber hinaus wird auch angiogenetisch wirkendes VEGF verstärkt gebildet (Falanga 1994; Steinbrech 1999). *In vivo* soll durch diese Faktoren die Reparatur eines hypoxischen Defektes beschleunigt, insbesondere auch das Gefäßeinwachsen stimuliert werden, so dass möglichst schnell wieder Bedingungen mit normaler Sauerstoffversorgung eintreten (Carmeliet 2000; Galindo 2001). Die Arbeitsgruppe um Das fand darüber hinaus in bestimmten neonatalen Adventitia-Fibroblastenpopulationen auch ohne verstärkte Ausschüttung von Mitogenen eine Hypoxie-induzierte Proliferation, die von der Aktivierung bestimmter Kinasen begleitet war. Dabei wirkte die Hypoxie allein als Proliferationsstimulus (Das 2001).

Dass bei hypoxischer Kultivierung von Fibroblasten auf azellulärer Dermis im Gegensatz zu Untersuchungen anderer Autoren auf synthetischen oder semisynthetischen, in jedem Falle niedrig komplexen Trägermaterialien (Falanga 1993; Herrik 1996) keine Proliferationssteigerung resultierte, könnte prinzipiell zur Ursache haben, dass auf der reifen Matrix die o.g. Proliferationsförderung nicht in der Qualität oder Quantität zum Tragen kommt. Sandner stellte so fest, dass die Stimulierung der VEGF-Ausschüttung durch Hypoxie in einer Gewebsstruktur wesentlich geringer war als bei parallel untersuchten Zellisolaten (Sandner 1997).

Fibroblasten können sich sowohl in subkonfluenten Kulturen als auch im bereits besiedelten Präparat gut an hypoxische Bedingungen adaptieren.

Sowohl bei subkonfluenten Fibroblastenkulturen als auch bei bereits besiedelten Präparaten war eine erstaunliche Adaptation der Fibroblasten an die Hypoxie festzustellen. Eine Zellanzüchtung unter reduzierter Sauerstoffzufuhr, um die Zellen an hypoxische Bedingungen im Gewebsdefekt zu gewöhnen, erscheint deshalb nicht vorteilhaft und ist daher als redundant zu betrachten.

Bedingt durch einen hohen Sauerstoffverbrauch wundständiger Zellen, der durch das erst unvollständig wieder etablierte Mikrogefäßsystem nicht gedeckt werden kann, ist in heilenden Wunden ein sehr geringer Sauerstoffpartialdruck von 0 bis 60 mm Hg anzufinden (Chvapil 1968; Jonsson 1991; Tokuda 2000). Darüber hinaus muss auch nach chirurgischen Eingriffen im Weichgewebe aufgrund der Beschädigung kapillärer Blutgefäße mit hypoxischen Bedingungen gerechnet werden (Hunt 1972; Schaser 1999). Beide Hypoxie-auslösenden Mechanismen kommen unmittelbar nach der chirurgischen Behandlung von Weichgewebssarkomen zum Tragen. Demzufolge muss auch bei einer zeitnah erfolgenden Transplantation eines zellbesiedelten Weichgewebssersatzes davon ausgegangen werden, dass die in den Defekt transferierten Fibroblasten hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind. In diesem Kontext ist die in den Versuchen manifestierte langwährende Hypoxietoleranz der Zellen von hoher Bedeutung für den Erfolg einer Transplantation eines Fibroblasten-basierten Weichgewebssersatzes. Die Hypoxietoleranz von Fibroblasten wird von Falanga auf den Umstand zurückgeführt, dass hypoxische Bedingungen bei der Wundheilung temporär die „Normalsituation“ für die Zellen darstellen, sie also gezwungen sind, dabei zu überleben (Falanga 1993). Neben der verstärkten Transkription angiogenetischer Faktoren wird unter Hypoxie die oxidative Phosphorylierung reduziert und anaerobe Stoffwechselwege aktiviert (Pasteur-Effekt). Da der anaerobe Metabolismus eine geringere ATP-Ausbeute pro Glukosemolekül zulässt, muss diese durch eine gesteigerte Aktivität glykolytischer Enzyme ausgeglichen werden (Stryer 1995). Das Umschalten des Metabolismus wird durch den Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 vermittelt

(Seagroves 2001). Des Weiteren kann auch ein Hypoxie-induzierbares, antiapoptotisch wirkendes Protein (IAP-2) das Überleben der Zellen verbessern (Dong 2001).

Eine hypoxische Kultivierung stimuliert nur kurzzeitig die Kollagensynthese der Fibroblasten.

Bei Hypoxie ausgesetzten Fibroblastenkulturen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine erhöhte Kollagenausschüttung nachgewiesen werden. Dieser Effekt ist jedoch, wie auch durch andere Autoren bestätigt (Steinbrech 1999; Yamanaka 2000), nur kurzzeitig beobachtbar. Das unter Hypoxie ausgeschüttete Kollagen ist unhydroxyliert, da Sauerstoff ein Co-Faktor der Peptidyl-Prolin-Hydroxylase ist (Chvapil 1968; Hunt 1972). Darüber hinaus ist Sauerstoff auch für die Quervernetzung des Kollagens erforderlich (Dissemont 2001). Damit liegt bei Hypoxie das Kollagen in einer instabilen Tripelhelix vor (Herrick 1996), welche in den Zellkulturüberstand ausgeschüttet wird. Erst nach Überführung in Normoxie wird diese Kollagenvorform von den Zellen hydroxyliert sowie für die Synthese von Fibrillen verwendet (Falanga 2002), welche sich dann im Präparat oder im Gewebe akkumulieren können (Johnsson 1991). Aus diesen Gründen kann die zeitweise erhöhte Kollagenausschüttung bei Andauern der Hypoxie nicht zum verstärkten Kollageneinbau in das Präparat beitragen.

Die unter Hypoxie temporär erhöhte Kollagenausschüttung ist nach *Falanga* auf eine autokrine Stimulation der alpha-1-pro-Kollagen mRNS-Synthese durch gleichzeitig verstärkt gebildetes TGF- β zurückführbar (Falanga 2002). Obwohl genaue Regulationsmechanismen noch nicht geklärt sind, vermutet *Steinbrech*, dass eine kurzzeitig erhöhte Kollagensynthese unter Hypoxie und eine gleichzeitige reduzierte MMP-3 Expression, eine Akkumulation von extrazellulärer Matrix in frühen Phasen der Wundheilung erlauben soll. Das dabei angehäuften Kollagen führt im Feedback-Mechanismus zu einer Herabsetzung der Kollagensynthese, so dass die Phase der aktiven Matrixsynthese abgeschlossen und der Prozess der Matrixremodellierung und -reifung eingeleitet werden kann (Steinbrech 1999).

7.5 Transplantation ins Rattenmodell

Dermis-basierte autologe Fibroblastenkulturen bieten prinzipiell einen guten Ansatz zur Reparatur von Weichgewebsdefekten nach Exzision von Sarkomen.

Die Behandlung von subkutanen Weichgewebsdefekten durch Injektion von Alginat-Fibroblasten-Suspensionen (Marler 2000) oder reinen Fibroblastensuspensionen (Gorodetsky 1991; Ferguson 1999) konnte in der Vergangenheit keine befriedigende und stabile Defektfüllung bewirken.

Da Matrizen breite Anwendung für das Tissue Engineering finden, lag es nahe, auch für die Schaffung eines Weichgewebsersatzes ein höherkomplexes Trägermaterial mit Fibroblasten

zu kombinieren. Für die Anzüchtung von Fibroblastenkulturen wurden bislang überwiegend synthetische oder semisynthetische Materialien wie Kollagenmembranen (Hillmann 2002), Kollagengele (Kessler 2001), Kollagen-Elastin-Matrizen (Lamme 2000), Laktat-Glykolat-Copolymere (Pinney 2000) sowie Kollagen-Glykosaminoglykan-Schwämme (Vassiere 2000) verwendet. All diese Materialien sind jedoch durch einen schnellen Abbau *in vivo* gekennzeichnet, so dass sie für eine Anwendung zur längerfristigen Defektreparatur nicht in Frage kommen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Trägermaterial in Form einer reifen, komplex strukturierten biologischen Matrix mit Fibroblasten kombiniert, um einen Weichgewebersatz für die bei Sarkomexzision entstehenden Defekte zu schaffen.

Die hohe Stabilität und gute Interaktion dieser Matrix mit den Zellen eröffnet die Möglichkeit, ein zellhaltiges Transplantat längerfristig zur Reparatur von subkutanen Weichgewebsdefekten einzusetzen. Damit sind potentiell auch ausgedehnte Weichgewebsdefekte mit limitierter Selbstheilungstendenz, wie Gewebsläsionen nach Exzision von vorbestrahlten Weichgewebssarkomen, für eine Behandlung mit *in vitro* vermehrten, autologen Fibroblasten zugänglich.

Neben der Verwendung von Fibroblasten bestehen auch Strategien, Adipozyten für einen Weichgewebersatz heranzuziehen (Patrick 2002; Borges 2002; Toriyama 2002). Fibroblasten erscheinen jedoch bei Vergleich der Ansätze (Tab. 29) aufgrund ihres guten Wachstums und ihrer aktiven Synthese von Molekülen der extrazellulären Matrix besser für diese Aufgabenstellung geeignet zu sein und wurden deshalb für die Arbeit verwendet.

Parameter	Fibroblasten	Adipozyten
Isolierung	Leicht, Vollhautbiopsate	Leicht, subkutanes Fett
Vermehrung in vitro	Einfach und effizient	Erschwert, schnelle Differenzierung (Toriyama 2002)
Syntheseleistung (Moleküle der extrazellulären Matrix)	Hoch	Gering
Stabilität und Funktionalität nach Transplantation	Gut	Gering (Patrick 2002; Toriyama 2002)
Ansprüche an Nährstoffversorgung	Gering	Hoch (Borges 2002)

Tab. 29: Vergleich der Eignung von Fibroblasten und Adipozyten zur Anwendung für die Weichgewebsreparatur

Mit autologen Fibroblasten besiedelte humane azelluläre Dermis zeigt nach subkutaner Transplantation ins Rattenmodell ein hohe Stabilität und keine unerwünschten Nebeneffekte.

Der Erfolg der Transplantation von autolog mit Lewisratten-Fibroblasten besiedelter, humaner azellulärer Dermis wurde an immunkompetenten adulten Lewisratten getestet (vgl. 6.5). Auch nach sechswöchiger subkutaner Implantation konnten bei keinem Tier Transplantat-assoziierte Effekte, wie entzündliche und Abstoßungsreaktionen oder Kalziumablagerungen (Kalzifizierung), beobachtet werden.

Bemerkenswert ist, dass dabei auch keine starke Verkleinerung des Materials feststellbar war. Darüber hinaus blieb die Struktur der dermalen Matrix über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten. Diese äußerst wichtige Materialstabilität der Dermis wird durch die hohe Kollagenase-, Degradations- und Kontraktionsresistenz des natürlich strukturierten, hoch quervernetzten dermalen Kollagens gewährleistet (vgl. Kapitel 7.1 und 7.3 - *in vitro* Untersuchungen zur Materialstabilität). Da bereits eine reife Bindegewebsstruktur in das Transplantatlager überführt wird, wird eine exzessive *in situ* Neubildung unterdrückt, die in der Regel von Narbenbildung begleitet ist (Madden 1971; Bell 1981; Demarchez 1992; Lamme 1996).

Die erzielten, sehr positiven Ergebnisse stehen in Gegensatz zum begrenzten Transplantationserfolg der bislang angewendeten Methoden (Gorodetsky 1991; Ferguson 1999; Marler 2000), bei denen die schnelle Materialresorption bzw. die geringe Komplexität die Anwendung zur Gewebsaugmentation einschränkte. Aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Resultaten lässt sich daher schlussfolgern, dass der gezüchtete Weichgewebsersatz ein beträchtliches, im Vergleich zu anderen Methoden höheres, Potential zur Auffüllung von subkutanen Weichgewebsdefekten nach Sarkomexzision aufweist.

Die initale Besiedelung der Dermis mit autologen Fibroblasten beschleunigte die Transplantatintegration in den Defekt.

Bei eingangs mit autologen Fibroblasten besiedelten Präparaten konnte nach Transplantation ins Rattenmodell eine höhere Zellularität und Gefäßbildung im Präparat beobachtet werden. Diese Effekte der Zellbesiedelung werden von verschiedenen Autoren auf die Sekretion von angiogenetisch und mitogen wirkenden Faktoren durch die im Transplantat gezüchteten Fibroblasten zurückgeführt, die auf das Transplantatlager einwirken. Damit wird das Einwachsen von Zellen und Gefäßen stimuliert (Ferguson 1999; Pinney 2000). Nach Transplantation kann aber auch die Kollagenmatrix selbst die Zellmigration und Proliferation fördern, in dem sie Anheftungs- und Leitstrukturen liefert (Demarchez 1992; Lamme 1996; Clubb 1999). Dieses würde sich auch bei einer potentiellen

klinischen Anwendung der Präparate positiv auf die Transplantatakzeptanz und –integration in das Transplantatlager auswirken.

Histologische Bilder zeigten, dass die natürliche Struktur und Porengröße der Dermis nach der Transplantation einen Zutritt von Zellen und eine homogene Besiedelung im gesamten Präparat ermöglichte, eine Kapselbildung trat nicht auf. Nach Angaben anderer Arbeitsgruppen konnte bei Materialien, die eine Fibroblasteneinwanderung nicht zuließen, letzteres festgestellt werden (Yannas 1989; Coleman 1993; Patrick 2002). Diese Kapselbildung durch oberflächlich dicht gepackte (Myo)Fibroblasten wäre äußerst unerwünscht, da sie oftmals zu einer Kontraktion der Präparate führt und den Stofftransport sowie die Zellmigration in das Transplantatinnere behindert (Coleman 1993; Clubb 1999).

Weitere tierexperimentelle Untersuchungen mit der Fibroblasten-besiedelten Dermis müssen zeigen, wie die Einheilung und qualitative Entwicklung des Weichgewebssersatzes über längere Nachbeobachtungszeiträume ablaufen und ob gute Transplantationsergebnisse auch in vorbestrahlten Defekten zu erreichen sind (vgl. 8.3 - Ausblick).

8. Ausblick

8.1 Optimierung der Besiedelung der azellulären Dermis

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich eine dynamische Zelleinsaat unter Relativbewegung zwischen Zellsuspension und azellulärer Dermis förderlich auf die tieferliegende Besiedelung des Präparates auswirkt. Bislang wurden dazu Methoden angewandt, bei denen im Batch-Ansatz eine Interaktion von Zellen und Materialoberfläche stattfand. Erste Untersuchungen (6.1.3.2) ließen darauf schließen, dass die Konvektion den Stofftransport durch das Material verbessern kann. Möglicherweise kann dieser Ansatz auch herangezogen werden, um die anfängliche Besiedelung der azellulären Dermis zu verbessern, d.h. initial eine höhere Zelldichte in tieferen Lagen zu erreichen. Dabei könnten prinzipiell hydrostatische Drücke (wie unter 6.1.3.2) oder ein Perfusionssystem (wie unter 6.3.3) genutzt werden, um durch eine Strömung die Zellen in die Dermis einzutragen.

Die bereits unter 7.3 beschriebenen Vorzüge eines Bioreaktorsystems sollten weiterhin bei der Anzucht der trägerbasierten dreidimensionalen Fibroblastenkulturen genutzt werden. Zum Einstellen günstiger lokaler Konzentrationen autokriner Wachstumsfaktoren im Bioreaktor empfiehlt sich ein Perfusionssystem, in dem kleinere Volumenströme und damit größere Verweilzeiten realisiert werden können. Um dahingehend eine Optimierung der Perfusionsbedingungen vornehmen zu können, sollten die Fibroblastenkulturen hinsichtlich der sekretierten autokrin wirkenden Wachstumsfaktoren charakterisiert und Schlüsselfaktoren sowie ihre optimale Wirkkonzentration identifiziert werden. Die Verweilzeit im Bioreaktorsystem sollte eine Anreicherung dieser Faktoren in der optimalen Konzentration erlauben. Möglicherweise kann auch durch gezielte Zugabe der Faktoren eine optimale Konzentration eingestellt werden; unter Umständen ist das jedoch mit hohen Kosten verbunden.

Für ein Scale-up der Fibroblastenbesiedelung azellulärer Dermis empfiehlt sich ein Bioreaktorsystem, welches eine reproduzierbare Anzucht größerflächiger Transplantate erlaubt. Darüber hinaus sollten die Kulturführung unter geringstem Kontaminationsrisiko und die Entnahme der fertig besiedelten Präparate aus dem Bioreaktorsystem ohne deren Beschädigung durchführbar sein.

8.2 Beschleunigung der Vaskularisierung

Da – im Falle von auch nativ vaskularisierten Geweben – nach Transplantation eines gezüchteten Gewebeersatzes insbesondere die Schnelligkeit der Vaskularisierung über die Akzeptanz und Funktionalität des Ersatzmaterials entscheidet, sind bei Behandlung großer Gewebedefekte Ansätze zur aktiven Steuerung der Transplantatvaskularisierung als sehr

interessant anzusehen. Zur Erreichung dieses Ziels können angiogenetisch wirkende Faktoren wie bFGF oder VEGF im Transplantat immobilisiert werden, die nach ihrer Freisetzung das Einwachsen von Blutgefäßen ins Transplantatlager stimulieren (Toriyama 2002; Sakakibara 2002; Perets 2003). Für eine effektive und sichere Wirkung der Faktoren ist jedoch eine zeitlich genau definierte Freisetzung erforderlich.

Eine andere Maßnahme kann die Prävascularisierung der Präparate darstellen. Dabei wird angestrebt, bereits *in vitro* ein Gefäßsystem in das Präparat einzufügen (Mikos 1993; Germain 2000). Nach Transplantation kann dadurch der Gefäßanschluss des Grafts beschleunigt werden (Black 1998; Nör 2001). Endothelzellen werden für die Zwecke mit den Zielzellen kokultiviert (Black 1998; Kaihara 2000; Chute 2002). Zur Herstellung von Mikrogefäßen werden bislang röhrenförmige Anordnungen genutzt (Neumann 2003) oder komplexe Matrizen mittels Mikrotechnologien mit einem vorgefertigten Bett für das Gefäßsystem versehen (Wintermantel 1996; Kaihara 2000). Möglicherweise können aber auch die bereits in der azellulären Dermis vorliegenden (zellfreien) Gefäßstrukturen als Leitschiene für die Anzüchtung eines Gefäßsystems herangezogen werden.

8.3 Validierung der Transplantate

Vor Anwendung des gezüchteten Weichgewebersatzes bei Gewebsdefekten nach Exzision von Sarkomen sind die Transplantate hinsichtlich ihrer Sicherheit (Nebenreaktionen) und Effektivität bei dieser speziellen Indikation zu validieren. Dazu muss ein Tiermodell herangezogen werden, welches, adaptiert an die Situation beim Patienten, die Transplantation in eine vorbestrahlte Muskelregion vorsieht (Ferguson 1999). Insbesondere die Volumenaugmentation und Stabilität der Defektheilung (z.B. Wundreißfestigkeit) aber auch ggf. Nebenreaktionen, wie Entzündungen und Abstoßungsreaktionen, sind dabei über einen mehrmonatigen Verlauf zu untersuchen (Krueger 1978; Marks 1991; Hohenberger 2002). In diesem Zusammenhang sollte auch getestet werden, wie durch mehrlagige oder drapierte Anwendung der Präparate eine noch höhere Volumenauffüllung zu erreichen ist.

8.4 Weitere Indikationen

Neben der Behandlung von Gewebeschäden nach Exzision von Weichgewebssarkomen gibt es weitere Indikationen, die eines Weichgewebersatzes bedürfen (Abb. 90). Da es sich hier ebenfalls um ausgedehnte Gewebsdefekte handelt, könnte eine Vorbesiedelung der Transplantate mit autologen Fibroblasten ebenso die Defektheilung verbessern und das Anwachsen der Transplantate beschleunigen.

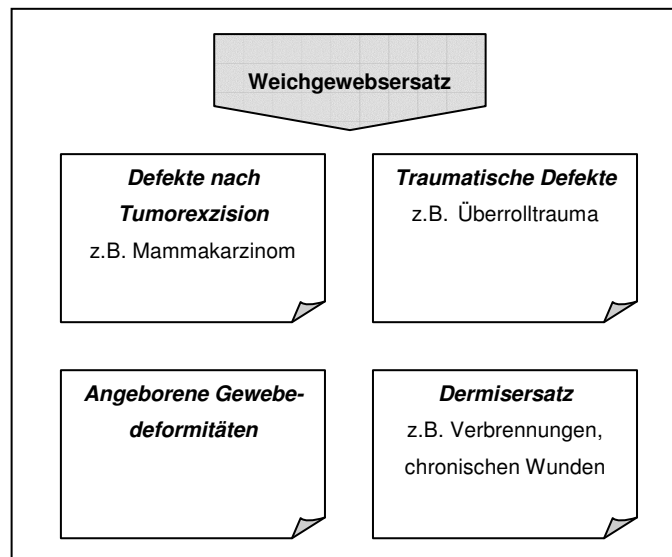


Abb. 90: **Anwendungsmöglichkeiten für einen Weichgewebersatz** auf der Basis humaner azellulärer Dermis und autologer Fibroblasten

8.5 Mögliche Praxis der Herstellung eines Weichgewebersatzes

Die mögliche Praxis der Herstellung eines Weichgewebersatzes auf der Grundlage autologer Fibroblasten und humaner azellulärer Dermis ist in Abb. 91 dargestellt.

Die Schritte der Isolierung der Fibroblasten, Zellexpansion und Anzüchtung eines Weichgewebersatzes könnten prinzipiell in einer klinikexternen Einrichtung erfolgen. Dazu müsste die Hautbiopsie sowie der fertige Weichgewebersatz unter genau definierten und standardisierten Bedingungen zwischen Klinik und Zellkulturlabor transportiert werden. Sämtliche Schritte, die die Isolierung der Zellen, die Zellexpansion sowie die Anzüchtung des Weichgewebersatzes beinhalten, d.h. alle Arbeiten am offenen Produkt, müssen unter GMP-Bedingungen innerhalb der Reinraumzone der Klasse A erfolgen. Für diese Arbeitsschritte ist eine Herstellungserlaubnis zur Herstellung autologer Zellkulturen nach § 13 AMG erforderlich.

Die Entnahme, Präparation, Sterilisation, Konservierung und Lagerung der humanen azellulären Dermis erfolgt ebenfalls auf der Grundlage des AMG. Für die humane azelluläre Dermis als Arzneimittel humanen Ursprungs muss dazu eine Arzneimittelregistrierung beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) vorliegen. Die Herstellung des Arzneimittels humanen Ursprungs bedarf darüber hinaus einer Erlaubnis durch die Landesgesundheitsbehörde. Dabei sind insbesondere entsprechende Herstellungsbedingungen (GMP-Bedingungen) nachzuweisen.

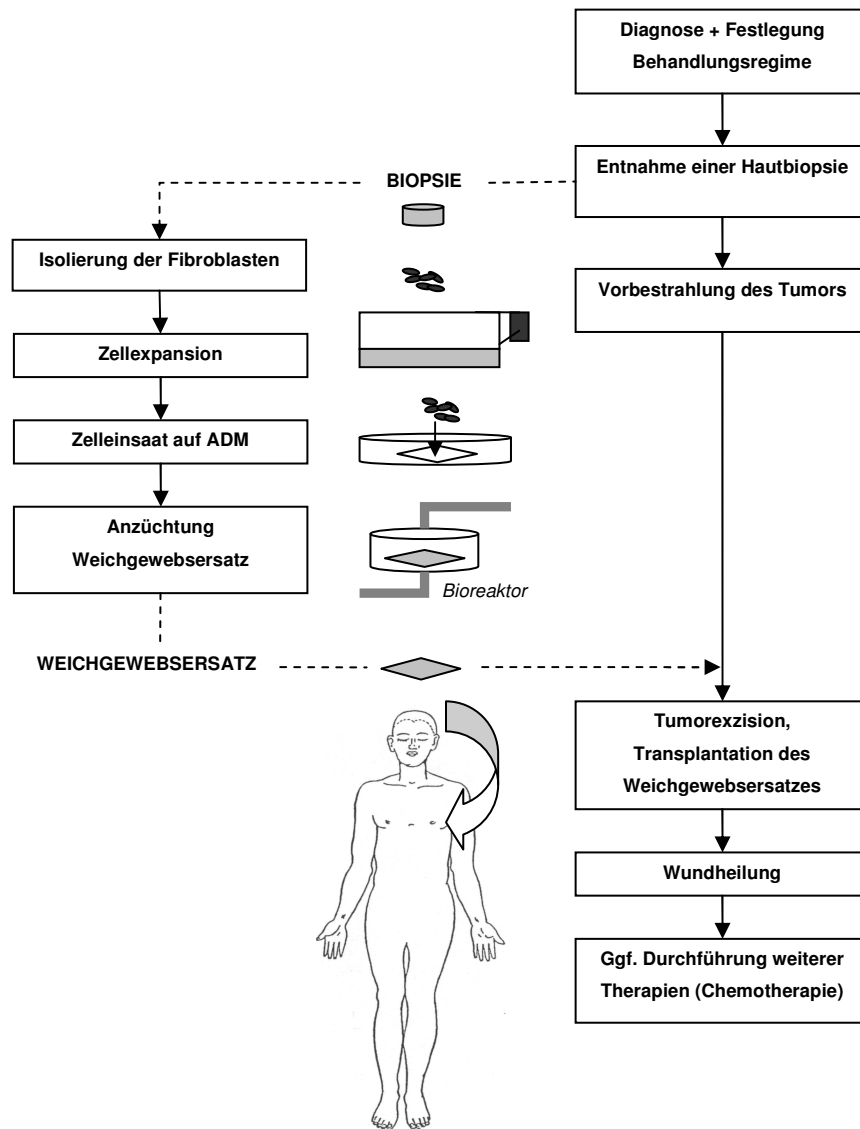


Abb. 91: **Mögliche Praxis der Herstellung eines Weichgewebersatzes** aus autologen Fibroblasten und humaner azellulärer Dermis zur Behandlung von Gewebedefekten nach Exzision von Weichgewebssarkomen.

9. Zusammenfassung

Bei der operativen Entfernung von Weichgewebssarkomen werden ausgedehnte Defekte geschaffen, die sowohl wegen ihrer Größe als auch aufgrund der häufig vorgenommenen präoperativen Bestrahlung eine niedrige Reparaturtendenz aufweisen und schwerwiegende Heilungsprobleme nach sich ziehen. Aufgrund der Wundprobleme kann eine adäquate Nachbehandlung, wie z.B. Strahlen- oder Chemotherapie, nur verzögert, möglicherweise überhaupt nicht vorgenommen werden, was die Überlebenschancen der Patienten reduziert.

Trotz des hohen klinischen Bedarfs ist die Behandlung dieser Gewebsschäden zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht zufrieden stellend gelöst, da die bislang zur Verfügung stehenden Methoden sowohl die langfristige Auffüllung des Defektes als auch die Wiederherstellung der Gewebsfunktionalität nur begrenzt ermöglichen. Mit dem Tissue Engineering bieten sich neue Möglichkeiten zur Behandlung von Weichgewebsschäden. Angesichts dieser Ausgangslage war es Ziel dieser Arbeit, unter Nutzung des Tissue Engineering einen Weichgewebssersatz herzustellen, der

- eine längerfristige Defektfüllung gestattet;
- durch Transfer aktiver autologer Zellen die bestrahlungsbedingten Heilungsprobleme ausgleicht;
- sowie die rechtlichen Anforderungen für den klinischen Einsatz in der Bundesrepublik Deutschland erfüllt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter Einsatz des Tissue Engineering ein komplexer zellbesiedelter Weichgewebssersatz hergestellt werden. Mit Hilfe von *in vitro* Modellen konnten Aussagen zu den guten Transplantateigenschaften getroffen und nach Transplantation *in vivo* (Rattenmodell) durch erste Befunde bereits verifiziert werden.

Die bislang nach Exzision von Weichgewebssarkomen angewandten Methoden zur Defektreparatur weisen allesamt wichtige Defizite auf. So stellen patienteneigene Muskellappen eine beschränkte Therapieoption dar, da sie nur begrenzt verfügbar sind und bei ihrer Entnahme ein zusätzlicher Defekt geschaffen wird. Der Einsatz von Gewebssatzmaterialien scheitert in der Regel an ihrer schnellen Resorption, die eine längerfristige Anwendung verhindert. Auch die Transplantation von Fibroblastensuspensionen oder besiedelten niedrigkomplexen Matrizen blieb bislang weitgehend erfolglos. Da sich das Tissue Engineering als Methodik zur *ex vivo* Anzucht autologer Zellstrukturen bewährt hat, ist es potenziell geeignet, bei der Herstellung eines alternativen Weichgewebssatzes Anwendung zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein solcher Weg beschritten. Als reparaturaktive Zellen des Bindegewebes wurden dazu humane

dermale Fibroblasten herangezogen. Aufgrund der Tatsache, dass sich im Tissue Engineering der Einsatz von Trägermaterialien seit Langem bewährt hat, lag es nahe, die Fibroblasten mit einem Trägermaterial zu kombinieren und somit ein dreidimensionales Weichgewebstransplantat herzustellen. Die in dieser Arbeit dokumentierte Herangehensweise lässt sich zusammenfassend in fünf Schritte gliedern:

1. Herstellung einer humanen sterilisierten azellulären Dermis als Trägermaterial für die Fibroblasten und Charakterisierung der Eigenschaften dieser Matrix
2. Gewinnung von Fibroblastenkulturen
3. Herstellung eines Weichgewebersatzes durch Besiedlung der azellulären Dermis mit Fibroblasten unter Nutzung der Methoden des Tissue Engineering
4. *In vitro* Untersuchungen zur Vorhersage der Transplantateigenschaften
5. Testung des Transplantatverhaltens *in vivo* (Tiermodell).

Bei der Auswahl des Trägermaterials mussten die Anforderungen an das spätere Transplantat berücksichtigt werden. Häufig für Fibroblastenkulturen genutzte synthetische oder semisynthetische Materialien waren dafür jedoch nicht geeignet, da sie in der Regel durch einen schnellen Abbau gekennzeichnet sind. Aus diesem Grund wurde erstmals eine biologische Matrix in Form einer humanen azellulären Dermis verwendet, um einen komplexen zellbesiedelten Weichgewebersatzes für Defekte nach Sarkomexzision zu schaffen. Die humane azelluläre Dermis wird in der Bundesrepublik durch das Arzneimittelgesetz (AMG) reguliert, welches die biologische Sicherheit des Transplantats zwingend vorschreibt. Da bislang keine Dermis verfügbar ist, die diesen Auflagen genügt, wurde eigens ein Präparat entwickelt. Durch Anwendung eines validierten Virusinaktivierungsverfahrens konnte eine humane azelluläre Dermis hergestellt werden, die in Konformität mit dem AMG den hohen Anforderungen an Gewebstransplantate als Arzneimittel humanen Ursprungs entspricht.

Durch die Charakterisierung der Eigenschaften der hergestellten azellulären Dermis wurde deren Eignung für die Zellbesiedlung und Transplantation getestet. Dabei konnten typische dermale Mikro- und Makrostrukturen nachgewiesen werden, welche für eine Zellinteraktion von großer Bedeutung sind. Diffusionsuntersuchungen zeigten, dass die azelluläre Dermis hoch durchlässig für Sauerstoff, Wasserdampf und Proteine (Serumalbumin) ist und damit den Substanztransport gewährleistet. Die geringe Antigenizität beim Lymphozytenproliferationsassay sowie die im Cytotoxizitätstest manifestierte gute Verträglichkeit für Zellen ließen auf eine hohe Biokompatibilität der Matrix schließen. Aus der hohen Kollagenaseresistenz und der geringen Materialschrumpfung bei Langzeitinkubation konnte eine hohe Materialstabilität gefolgert werden.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden humane Fibroblasten enzymatisch aus Hautproben gewonnen. Eine effiziente Zellvermehrung in zweidimensionaler Kultur erlaubte die Bereitstellung ausreichender Zellmengen für die Erzeugung des zellbesiedelten Weichgewebersatzes. Nachfolgend wurden im Rahmen des Tissue Engineering die Fibroblasten mit der azellulären Dermis kombiniert. Dazu erfolgte zunächst die Zelleinsaat auf das Material. Es zeigte sich, dass die azelluläre Dermis eine gute Grundlage für die Fibroblastenadhäsion bietet, aber das Einsaatverfahren entscheidend für die Zelleinwanderung in die Matrix ist. Am besten geeignet dafür war eine dynamische Zelleinsaat unter Nutzung eines Schüttlers. Anschließend wurden die Präparate in Kultursystemen geführt und ein Ersatzgewebe erzeugt. Neben statischen Ansätzen fand dafür auch ein Bioreaktorsystem Anwendung, in dem die Präparate mit Medium durchströmt wurden. Nach einer Perfusionsoptimierung wurde ein Volumenstrom von 48 ml/h ausgewählt, der die Adhärenz und Proliferation der Fibroblasten auf dem Trägermaterial gestattete. Dermis-basierte Fibroblastenkulturen zeichneten sich vor allem in der ersten Kulturwoche durch eine gute Proliferation und Stoffwechselaktivität aus. Als sehr günstig ist anzusehen, dass sie keine erhebliche Kollagenasefreisetzung und Kontraktion aufwiesen, damit wird ein hoher Struktur- und Volumenerhalt des Gewebersatzes sichergestellt. Diese hohe Stabilität eröffnet die Möglichkeit, ein zellhaltiges Transplantat längerfristig zur Reparatur von subkutanen Weichgewebsdefekten einzusetzen. Damit sind auch ausgedehnte Läsionen mit limitierter Selbstheilung für eine Behandlung mit *in vitro* vermehrten, autologen Fibroblasten zugänglich.

Um Vorhersagen über das Transplantatverhalten zu treffen, wurde zunächst ein *in vitro* Modell herangezogen. Dabei war festzustellen, dass sich Fibroblasten gut an hypoxische Bedingungen im Weichgewebsdefekt adaptieren können. Anschließend wurde mit immunkompetenten Lewisratten der Transplantationserfolg *in vivo* verifiziert. Nach sechswöchiger subkutaner Transplantation war eine hohe Akzeptanz der mit autologen Fibroblasten besiedelten humanen azellulären Dermis beobachtbar, die Fibroblastenbesiedelung stimulierte das Einwachsen von Gefäßen. Darüber hinaus zeigten die Transplantate im Gewebsdefekt eine hohe Struktur- und Volumenstabilität.

Die erzielten positiven Ergebnisse stehen in Gegensatz zum begrenzten Transplantationserfolg der bislang angewendeten, nicht auf autologen Muskellappen basierenden, Methoden. Aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Resultaten lässt sich daher schlussfolgern, dass der auf Grundlage einer humanen azellulären Dermis mit dermalen Fibroblasten gezüchtete Weichgewebersatz ein beträchtliches, im Vergleich zu anderen Methoden höheres Potential zur Auffüllung von Gewebsdefekten nach Exzision von

Weichgewebssarkomen aufweist. Darüber hinaus könnten auch weitere Indikationen, die einen Weichgewebsersatz erfordern, von diesen Transplantaten profitieren. Dazu zählen Defekte nach Exzision anderer Tumore, traumatische Weichgewebsdefekte, angeborene Gewebsdeformitäten sowie tiefermale Schäden. Bei allen diesen Weichgewebsdefekten ist jedoch das Defektausmaß zu berücksichtigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in tierexperimentellen Untersuchungen nur ein relativ begrenztes Gewebsvolumen gefüllt, in der klinischen Praxis ist jedoch häufig ein großvolumiger Ersatz notwendig. Demzufolge muss für die breite klinische Anwendung ein Scale up der Fibroblastenbesiedelung erfolgen, um einen an diese Bedürfnisse adaptierten Weichgewebsersatz herstellen zu können. Eine mehrlagige oder drapierte Anwendung der besiedelten Präparate ist zur Auffüllung größerer Defekte gut vorstellbar. Möglicherweise kann in Zukunft auch eine aktive Steuerung der Transplantatvaskularisierung durch Immobilisierung angiogenetischer Faktoren oder Prävaskularisierung der Präparate eingesetzt werden, um das Einwachsen des Weichgewebsersatzes zu beschleunigen.

Vor einer klinischen Anwendung ist in einem Tiermodell – adaptiert an die Situation im Transplantatlager nach Sarkomexzision – über einen mehrmonatigen Verlauf die Effektivität der Transplantate in einer vorbestrahlten Muskelregion zu testen. Insbesondere die Volumenaugmentation und Stabilität der Defektheilung sind dabei zu untersuchen. Die mögliche Herstellungsroutine eines zellbesiedelten Weichgewebsersatzes beinhaltet ebenso wie die vorliegende Arbeit die Isolierung von dermalen Fibroblasten aus einer Hautbiopsie, die Zellexpansion und anschließende Einsaat sowie Kultivierung der Zellen auf dem Trägermaterial. Alle diese Schritte müssen unter GMP (Good Manufacturing Practice)–Bedingungen erfolgen.

Mit Blick auf die eingangs geschilderte Problemstellung sind die Ergebnisse dieser Arbeit als Erfolg versprechend einzustufen. Der untersuchte Ansatz – erforderlichenfalls weiter modifiziert – erscheint nach dem erzielten Erkenntnisstand einen wichtigen Beitrag zu einer verbesserten Therapie von Patienten mit Gewebsdefekten nach Entfernung von Weichgewebssarkomen zu liefern. Eine Defektfüllung mit einem aktiven und stabilen Ersatzgewebe eröffnet die Möglichkeit, den sonst häufig auftretenden Wundheilungsstörungen entgegenzuwirken und die Gewebsstabilität mit einem guten funktionellen und kosmetischen Ergebnis wiederherzustellen. Aufgrund einer verbesserten Heilung kann eine adäquate Nachbehandlung, wie z.B. Strahlen- oder Chemotherapie, möglicherweise zu einem früheren Zeitpunkt vorgenommen werden, was sich positiv auf den Behandlungserfolg auswirken kann.

10. Literatur

- Abe, M.** Kan, C.; Zaw, K.K.; Ishikaw, O.: Induction of matrix metalloproteinase-1 in in vitro experimental wound model using a novel three-dimensional culture system. *Eur. J. Dermatol.* 2001; 11: 112-116
- Agostini, C.F.M.** Mann, G.F.; Allison, L.M.C.; Johnson, F.H.: Efficiency of medium utilization by human diploid fibroblasts in culture. *Develop. Biol. Standard.* 1980; 46: 51-58
- Altman, G.H.** Lu, H.H.; Horan, R.L.; Calabro, T.; Ryder, D.; Kaplan, D.L.; Stark, P.; Martin, I.; Richmond, J.C.; Vunjak-Novakovic, G.: Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering. *J. Biomech. Eng.* 2002; 124: 742-749
- Angelova, N.** Hunkeler, D.: Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Tibtech.* 1999; 17: 409-420
- Anselme, K.** Bacques, C.; Charriere, G.; Hartmann, D.J.; Herbage, D.; Garrone, R.: Tissue reaction to subcutaneous implantation of a collagen sponge. A histological, ultrastructural, and immunological study. *J. Biomed. Mater. Res.* 1990; 24: 689-703
- Arathoon, W.R.** Telling, R.C.: Uptake of amino acids and glucose by BHK 21 clone 13 suspension cells during cell growth. *Dev. Biol. Stand.* 1981; 50: 145-154
- Athanasiou, K.A.** Niederauer, G.G.; Agrawal, C.M.: Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996; 17: 93-102
- Bader, A.** Knop, E.; Frühauf, N.; Crome, O.; Böker, K.; Christians, U.; Oldhafer, K.; Ringe, B.; Pichlmayr, R.; Sewing, K.F.: Reconstruction of liver tissue in vitro: geometry of characteristic flat bed, hollow fiber, and sprouted bed bioreactors with reference to in vivo liver. *Artif. Org.* 1995; 19: 941-950
- Balgude, A.P.** Yu, X.; Szymanski, A.; Bellamkonda, R.V.: Agarose gel stiffness determinates rate of RGD neurite extension in 3D cultures. *Biomaterials* 2001; 22: 1077-1084
- Bell, E.** Ehrlich, P.H.; Buttle, D.J.; Nakatsuji, T.: Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 1981; 211: 1052-1054
- Bellamkonda, R.** Ranieri, J.P.; Bouche, N.; Aebischer, P.: Hydrogel-based three-dimensional matrix for neural cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995; 29: 663-671
- Ben-Bassat, H.** Eldad, A.; Chaouat, M.; Livoff, A.; Ron, N.; Neéman, Z.; Wexler, M.R.: Structural and functional evaluation of modifications in the composite skin graft: cryopreserved dermis and cultured keratinocytes. *Plast. Reconstr. Surg.* 1992; 89: 510-520
- Berthod, F.** Sahuc, F.; Hayek, D.; Damour, O.; Collombel, C.: Deposition of collagen fibril bundles by long-term culture of fibroblasts in a collagen sponge. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996; 32: 87-94
- Besseau, L.** Coulomb, B.; Lebreton-Decoster, C.; Giraud-Guille, M.M.: Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture. *Biomaterials* 2002; 23: 27-36
- Bettin, D.** Allogene Knochentransplantation bei TEP Revisionen. Vortrag beim 2. Symposium Zell- und Gewebetransplantation, Berlin, 7.3.2003

- Bhandari, R.N.** Riccalton, L.A.; Lewis, A.L.; Fry, J.R.; Hammond, A.H.; Tendler, S.J.; Shakesheff, K.M.: Liver tissue engineering: a role for co-culture systems in modifying hepatocyte function and viability. *Tissue Eng.* 2001; 7: 345-357
- Birkedahl-Hansen, H.** Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J. Periodont. Res.* 1993; 28: 500-510
- Black, A.F.** Berthod, F.; L'Heureux, N.; Germain, L.; Auger, F.A.: In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J.* 1998; 12: 1331-1340
- Bloemkolk, J.W.** Gray, R.G.: Effect of temperature of hybridoma cycle and mAb production. *Biotechnol. Bioeng.* 1992; 40: 427-431
- Bodde, H.E.** Van den Brink, I.; Koerten, H.K.; de Haan, F.H.N.: Visualization of in vitro percutaneous penetration of mercuric chloride transport through intracellular space versus cellular uptake through desmosomes. *J. Contr. Rel.* 1991; 15: 227-236
- Bödeker, B.G.D.** Steiner, U.; Berg, G.J.; Hewlett, G.; Schlumberger, H.D.: Produktion natürlicher Substanzen aus tierischen Zellkulturen in technischen Kultursystemen. *Tierische Zellkulturen, Bericht vom 2. BMBF-Statusseminar 1985*; 97-129
- Borges, J.** Tegtmeier, F.T.; Padron, N.T.; Mueller, M.C.; Stark, G.B.: Die Chorioallantoismembran (CAM) – ein neues Angiogenese-Modell im Tissue Engineering. *Chir. Forum* 2002; 31: 473-475
- Boucher, Y.** Pluen, A.; Ramanujan, S.; McKee, T.D.; Jain, R.K.: Interstitial diffusion of macromolecules in solid tumors: role of the interstitial matrix. *BED* 2001; 50: 97-98.
- Bowser, P.A.** White, R.J.: Isolation, barrier properties and lipid analysis of stratum compactum, a discrete region of stratum corneum. *Br. J. Dermatol.* 1985; 112: 1-14
- Boyce, S.T.** Christianson, D.J.; Hansbrough, J.F.: Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. *J. Biomed. Mater. Res.* 1988; 22: 939-957
- Brans, T.A.** Hoekstra, M.J.; Vloemans, A.F.P.M.; Kreis, R.W.: Long-term results of scalds in children with glycerol-preserved allografts. *Burns* 1994; 20: S10-S13
- Britberg, M.** Lindahl, A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson, O.; Peterson, L.: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondocyte transplantation. *New Engl. J. Med.* 1994; 331: 889-895
- Bujia, J.** Sittinger, M.; Hammer, C.; Burmester, G.: Züchtung menschlichen Knorpelgewebes mit Hilfe einer Perfusionskammer. *Laryn. Rhin. Otol.* 1994; 73: 577-580
- Burck, H.C.** *Histologische Technik.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 6. unveränderte Auflage 1988
- Burdick, J.A.** Anseth, K.S.: Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2002; 23: 4315-4323
- Burg, K.J.L.** Holder, W.D.; Culberson, C.R.; Beiler, R.J.; Greene, K.G.; Loebbeck, A.B.; Roland, W.D.; Eiselt, P.; Mooney, D.J.; Halberstadt, C.R.: Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 52: 642-649

- Burgeson, R.E.** Nimni, M.E.: Collagen types - Basic structure and tissue distribution. Clin. Orthop. Rel. Res. 1992; 283: 250-272
- Butler, M.** Hassel, T.; Doyle, C.; Gleave, S.; Jennings, P.: The effect of metabolic by products on animal cells in culture. Vortrag auf dem 10. ESACT Meeting 1991
- Butler, P.J.** Shear stress induces a time- and position-dependent increase in endothelial cell membrane fluidity. Am. J. Cell Physiol. 2001; 280: C962-C969
- Carmeliet, P.** Jain, R.K.: Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 2000; 407: 249-257
- Carrier, R.L.** Papadaki, M.; Rupnick, M.; Schoen, F.J.; Bursac, N.; Langer, R.; Freed, L.E.; Vunjak-Novakovic, G.: Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. Biotechnol. Bioeng. 1999; 64: 580-589
- Carrier, R.L.** Rupnick, M.; Langer, R.; Schoen, F.J.; Freed, L.E.; Vunjak-Novakovic, G.: Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle. Tissue Eng. 2002; 8: 175-188
- Chakrabarty, K.H.** Dawson, R.A.; Harris, P.; Layton, C.; Babu, M.; Gould, M.; Phillips, J.; Leigh, I.; Green, C.; Freedlander, E.; Mac Neil, S.: Development of autologous dermal-epidermal composites based on sterilized human allodermis for clinical use. Br. J. Dermatol. 1999; 141: 811-812
- Chen, F.** Yoo, J.J.; Atala, A.: Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. Urology 1999; 54: 407-410
- Chen, K.D.** Li, Y.S.; Kim, M.; Li, S.; Yuan, S.; Chien, S.; Shyy, J.Y.L.: Mechanotransduction in response to shear. J. Biol. Chem. 1999; 274: 18393-18400
- Chen, S.** Eguchi, S.; Watanabe, F.; Hewitt, W.; Kahaku, E.; Arnaout, W.; Rozga, J.; Demetriou, A.A.: Hepatic support strategies. Transpl. Proc. 1996; 28: 2036-2038
- Cheng, B.** Chen, Z.: Fabricating autologous tissue to engineer artificial nerve. Microsurg. 2002; 22: 133-137
- Chevallay, B.** Herbage, D.: Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. Med. Biol. Eng. Comput. 2000 a; 38: 211-218
- Chevally, B.** Abdul-Malak, N.; Herbage, D.: Mouse fibroblasts in long-term culture within collagen three-dimensional scaffolds: influence of crosslinking with diphenylphosphorylazide on matrix reorganization, growth, and biosynthetic and proteolytic activities. J. Biomed. Mater. Res. 2000 b; 49: 448-459
- Chun, J.** Tuan, T.L.; Han, B.; Vangsness, C.T.; Nimni, M.E.: Cultures of ligament fibroblasts in fibrin matrix gel. Connect. Tissue Res. 2003; 44: 81-87
- Chute, J.P.** Saini, A.A.; Chute, D.J.; Wells, M.R.; Clark, W.B.; Harlan, D.M.; Park, J.; Stull, M.K.; Civin, C.; Davis, T.A.: Ex vivo culture with human brain endothelial cells increases the SCID-repopulating capacity of adult human bone marrow. Blood 2002; 100: 4433-4439
- Chvapil, M.** Hurych, J.; Ehrlichová, E.: The influence of various oxygen tensions upon proline hydroxylation and the metabolism of collagenous and non-collagenous proteins in skin slices. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1968; 349: 211-217

- Cinamon, U.** Eldad, A.; Chaouat, M.; Wexler, M.R.; Israeli, A.; Zagher, U.; Ben-Bassat, H.: A simplified testing system to evaluate performance after transplantation of human skin preserved in glycerol or liquid nitrogen. *J. Burn Care Rehabil.* 1993; 14: 435-439
- Clark, R.A.F.** Nielsen, L.D.; Welch, M.P.; McPherson, J.M.: Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF- β . *J. Cell Sci.* 1995; 108: 1251-1261
- Clubb, F.J.** Clapper, D.L.; Deferrari, D.A.; Hu, S.P.; Seare, W.J.; Capek, P.P.; Armstrong, J.; McGee, M.G.; Billings, L.A.; Fuqua, J.M.; Parnis, S.M.: Surface texture and coating of biomaterial implants: effects on tissue integration and fibrosis. *ASAIO J.* 1999; 45: 281-287
- Coleman, D.J.** Sharpe, D.T.; Naylor, I.L.; Chander, C.L.; Cross, S.E.: The role of the contractile fibroblast in the capsules around tissue expanders and implants. *Br. J. Plast. Surg.* 1993; 46: 547-556
- Compton, C.C.** Current concepts in pediatric burn care: the biology of cultured epithelial autografts: an eight-year study in pediatric burn patients. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 1992; 2: 216-222
- Coombes, A.A.** Verderio, E.; Shaw, B.; Li, X.; Griffin, M.; Downes, S.: Biocomposites of non-crosslinked natural and synthetic polymers. *Biomaterials* 2002; 23: 2113-2118
- Coulomb, B.** Friteau, L.; Baruch, J.; Guilbaud, J.; Chretien-Marquet, B.; Glicenstein, J.; Lebreton-Decoster, C.; Bell, E.; Dubertret, L.: Advantage of the presence of living dermal fibroblasts within in vitro reconstructed skin for grafting in humans. *Plast. Reconstr. Surg.* 1998; 101: 1891-1903
- Creemers, L.B.** Jansen, I.D.C.; Hoebe, K.A.; Beertsen, W.; Everts, V.: Involvement of V-ATPases in the digestion of soft connective tissue collagen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1998; 251: 429-436
- Cuono, C.B.** Langdon, R.; Birchall, N.: Composite autologous-allogeneic skin replacement: Development and clinical application. *J. Invest. Dermatol.* 1987; 80: 626-635
- Czitrom, A.A.** Langer, F.; McKee, N.; Gross, A.E.: Bone and cartilage allotransplantation, a review of 14 years of research and clinical studies. *Clin. Orth. Rel. Res.* 1986; 208: 41-145
- Dai, W.** Saltzman, W.M.: Fibroblast aggregation by suspension with conjugates of poly(ethylene glycol) and RGD. *Biotechnol. Bioeng.* 1996; 50: 349-356
- Daly, C.H.** Biomechanical properties of dermis. *J. Invest. Dermatol.* 1982; 79: 17s-20s
- Danes, B.S.** Broadfoot, M.M.; Paul, J.: A comparative study of respiratory metabolism in cultured mammalian cell strains. *Exp. Cell. Res.* 1963; 30: 369-378
- Darby, I.** Skalli, O.; Gabbiani, G.: α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab. Invest.* 1990; 63: 21-29
- Das, M.** Bouche, D.M.; Moore, M.J.; Hopkins, D.C.; Nemenoff, R.A.; Stenmark, K.R.: Hypoxia-induced proliferation response of vascular adventitial fibroblasts is dependent on G protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 15631-15640
- DeLustro, F.** Condell, R.A.; Nguyen, M.A.; McPherson, J.M.: A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. *J. Biomed. Mater. Res.* 1986; 20: 109-120

- Demarchez, M.** Hartmann, D.J.; Regnier, M.; Asselineau, D.: The role of fibroblasts in dermal vascularization and remodelling of reconstructed human skin after transplantation onto the nude mouse. Transplantation. 1992; 54: 317-326
- Desmoulière, A.** Brandt-Rubbia, L.; Abdiu, A.; Walz, T.; Maciera-Coelho, A.; Gabbiani, G.: α -smooth muscle actin is expressed in a subpopulation of cultured and cloned fibroblasts and is modulated by γ -interferon. Exp. Cell. Res. 1992; 201: 64-73
- Diringer, H.** Unkonventionelle Viruskrankheiten. Bundesgesundheitsblatt 1990 a; 33: 187-192
- Diringer, H.** Durchbrechen von Speziesbarrieren mit unkonventionellen Viren. Bundesgesundheitsblatt 1990 b; 33: 435-440
- Dissemont, J.** Bedeutung von Sauerstoff in der Genese und Therapie chronischer Wunden. HARTMANN WundForum 2001; 2: 16-19
- Dong, Z.** Venkatachalam, M.A.; Wang, J.; Patel, Y.; Saikamur, P.; Semenza, G.L.; Force, T.; Nishiyama, J.: Up-regulation of apoptosis protein IAP-2 by hypoxia. J. Biol. Chem. 2001; 276: 18702-18709
- Doolin, E.J.** Strande, L.F.; Sheng, X.; Hewitt, C.W.: Engineering a composite neotrachea with surgical adhesives. J. Pediatr. Surg. 2002; 37: 1034-1037
- Dunkelman, N.S.** Zimmer, M.P.; LeBaron, R.G.; Pavelec, R.; Kwan, M.; Purchio, A.F.: Cartilage production by rabbit articular chondrocytes on polyglycolic acid scaffolds in a closed bioreactor system. Biotechnol. Bioeng. 1995; 46: 299-305
- Eagle, H.** The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. J. Cell. Physiol. 1973; 82: 1-8
- Eaglstain, W.H.** Iriondo, M.; Laszlo, K.: A composite skin substitute (Graftskin) for surgical wounds. Dermatol. Surg. 1995; 21: 839-843
- Eckes, B.** Mauch, C.; Hüppe, G.; Krieg, T.: Downregulation of collagen synthesis in fibroblasts within three-dimensional collagen lattices involves transcriptional and posttranscriptional mechanisms. FEBS Letters 1993; 318: 129-133
- Egbert, B.** McClelland, M.; Hanks, V.; Berg, R.A.; deLustro, F.: Evaluation of Artecoll polymethacrylate implant for soft-tissue augmentation: biocompatibility and chemical characterization. Plast. Reconstr. Surg. 1997; 100: 1466-1474
- Ehrlich, P.H.** Regulation der Wundheilung aus der Sicht des Bindegewebes. Der Chirurg 1995; 66: 165-173
- Elias, P.M.** Wood, L.C.; Feingold, K.R.: The skin and its barrier function: implication for wound healing. In: Cutaneous Wound healing. Martin Dunitz Verlag, 1. Auflage 2001: 5-14
- Elson, M.L.** Soft Tissue Augmentation, Dermatol Surg 1995, 21:491-500
- Ehrhard, P.** Meisel, I.: Strömungs- und Transportprozesse in Mikrokanälen. Nachrichten Forschungszentrum Karlsruhe 2002; 34: 137-142
- Falanga, V.** Kirsner, R.S.: Low oxygen stimulates proliferation of fibroblasts seeded as single cells. J. Cell.

- Physiol. 1993;154: 506-510
- Falanga, V.** Takagi, H.; Ceballos, P.I.; Pardes, J.B.: Low oxygen tension decreases receptor binding of peptide growth factors in dermal fibroblast cultures. Exp. Cell Res. 1994; 213: 80-84
- Falanga, V.** Shen, J.: Growth factors, signal transduction and cellular responses. In: Cuteaneous Wound healing. Martin Dunitz Verlag, 1. Auflage 2001: 81-93
- Falanga, V.** Zhou, L.; Yufit, T.: Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the activation of TGF- β 1. J. Cell. Physiol. 2002; 191: 42-50
- Fansa, H.** Schneider, W.; Wolf, G.; Keilhoff, G.: Host responses after acellular muscle basal lamina allografting used as a matrix for tissue engineered nerve grafts. Transplantation 2002; 74: 381-387
- Ferguson, P.C.** Boynton, E.L.; Wunder, J.S.; Hill, R.P.; O'Sullivan, B.; Sandhu, J.S.; Bell, R.S.: Intradermal injection of autologous dermal fibroblasts improves wound healing in irradiated skin. J. Surg. Res. 1999; 85:331-338
- Flendrig, L.M.** la Soe, J.W.; Jörning, G.G.A.; Steenbeek, A.; Karlsen, O.T.; Bovée, W.M.M.J.M.; Ladiges, N.C.J.J.; te Velde, A.A.; Chamuleau, R.A.F.M.: In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates. J. Hepatol. 1997; 26: 1379-1392
- Foldvari, M.** Baca-Estrada, M.E.; He, Z.; Hu, Z.; Attah-Poku, S.; King, M.: Dermal and transdermal delivery of protein pharmaceuticals: lipid-based delivery systems for interferon α . Biotechnol. Appl. Biochem. 1999; 30: 129-137
- Folkman, J.** Hochberg, M.: Self-regulation of growth in three dimensions. J. Exp. Med. 1973; 138: 745-753
- Folkman, J.** Haudenschild, C.: Angiogenesis in vitro. Nature 1988; 288: 551-556
- Form, D.** Pratt, B.; Madri, J.: Endothelial cell proliferation during angiogenesis. Lab. Invest. 1986; 55: 521-530
- Forth, W.** Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 1996, 7.Auflage; Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich
- Fossum, M.** Gustafson, C.J.; Nordenskjöld, A.; Kratz, G.: Isolation and in vitro cultivation of human urothelial cells from bladder washing of adult patients and children. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg. 2003; 37: 41-45
- Frangos, J.A.** McIntire, L.V.; Eskin, S.G.: Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism. Biotechnol. Bioeng. 1988; 32: 1053-1060
- Freed, L.E.** Vunjak-Novakovic, G.; Marquis, J.C.; Langer, R.: Kinetics of chondrocyte growth in cell-polymer implants. Biotechnol. Bioeng. 1994; 43:597-604
- Freed, L.E.** Vunjak-Novakovic, G.: Cultivation of cell-polymer tissue constructs in simulated microgravity. Biotechnol. Bioeng. 1995; 46: 306-313
- Freshney, R.I.** Culture of Animal Cells. John Wiley & Sons; N.Y., Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Third

Edition 1994

- Friedlaender, G.E.** Mankin; H.J.: Transplantation of osteochondral allografts. Ann. Rev. Med. 1984; 35: 311-24
- Froment, G.F.** Bischoff, K.B.: Chemical reactor analysis and design. John Wiley & Sons; N.Y., Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1979
- Fukamizu, H.** Grinnell, F.: Spatial organization of extracellular matrix and fibroblast activity: effects of serum, transforming growth factor β , and fibronectin. Exp. Cell. Res. 1990; 276-282
- Gabbiani, G.** Biologische Eigenschaften von Myofibroblasten. HARTMANN WundForum 1996; 1: 17-19
- Gailit, J.** Clark, A.F.: Studies in vitro in the role of α_v and β_1 integrins in the adhesion of human dermal fibroblasts to provisional matrix proteins fibronectin, vitronectin, and fibrinogen. J. Invest. Dermatol. 1996; 106: 102-108
- Galassi, G.** Burn, P.; Radice, M.; Cortivo, R.; Zanon, G.F.; Genovese, P.; Abatangelo, G.: In vitro reconstructed dermis implanted in human wounds: degradation studies of the HA-based supporting scaffold. Biomaterials 2000; 21: 2183-2191
- Galban, C.J.** Locke, B.R.: Analysis of cell growth kinetics and substrate diffusion in a polymer scaffold. Biotechnol. Bioeng. 1999; 65: 121-132
- Galindo, M.** Santiago, B.; Alcamí, J.; Rivero, M.; Martín-Serrano, M.; Pablos, J.L.: Hypoxia induces expression of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and IL-8 in human dermal fibroblasts. Clin. Exp. Immunol. 2001; 123: 36-41
- Garner, W.L.** Epidermal regulation of dermal fibroblast activity. Plast. Reconstr. Surg. 1998; 102: 135-139
- Geiger, M.** Friess, W.: Collagen sponge implants-application, characteristics and evaluation: part II. Pharm. Tech. Eur. 2002; 14: 58-66
- Germain, L.** Rémy-Zolghadri, M.; Auger, F.: Tissue engineering of the vascular system: from capillaries to larger blood vessels. Med. Biol. Eng. Comput. 2000; 38: 232-240
- Germann, G.** Raff, T.: Fremdhauttransplantation bei Schwerbrandverletzten. Chirurg 1995; 66: 260-270
- Giancotti, F.G.** Ruoslahti, E.: Integrin signaling. Science 1999; 285: 1028-1032
- Glacken, M.W.** Adema, E.; Sinskey, A.J.: Mathematical description of hybridoma culture kinetics: I. Initial metabolic rates. Biotechnol. Bioeng. 1988; 32: 491-506
- Glowacki, J.** Engineered cartilage, bone, joints, and menisci. Cells Tissues Organs. 2001; 169: 302-308
- Goldschmidt, M.E.** McLeod, K.J.; Taylor, W.R.: Integrin-mediated mechanotransduction in vascular smooth muscle cells. Circ. Res. 2001; 88: 674-680
- Goldstein, A.S.** DiMilla, P.A.: Effect of adsorbed fibronectin concentration on cell adhesion and deformation under shear on hydrophobic surfaces. J. Biomed. Mater. Res. 2002; 59: 665-675
- Gooch, K.J.** Kwon, J.H.; Blunk, T.; Langer, R.; Freed, L.E.; Vunjak-Novakovic, G.: Effects of mixing intensity on

- tissue-engineered cartilage. *Biotechnol. Bioeng.* 2001; 72: 402-407
- Göpferich, A.** Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996; 17: 103-114
- Gorodetsky, R.** McBride, W.H.; Withers, H.R.; Miller, G.G.: Effect of fibroblast implants on wound healing of irradiated skin: assay of wound strength and quantitative immunohistology of collagen. *Rad. Res.* 1991; 125: 181-186
- Grande, D.A.,** Halberstadt, C.; Naughton, G.; Schwartz, R.; Manji, R.: Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 34: 211-220
- Green, H.** Kehinde, O.; Thomas, J.: Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 5665-5668
- Grinnell, F.** Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J. Cell. Biol.* 1994; 124: 401-404
- Grinnell, F.** Ho, C.H.; Lin, Y.C.; Skuta, G.: Differences in the regulation of fibroblast contraction of floating versus stressed collagen matrixes. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 918-923
- Grinnell, F.** Fibroblast-collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. *Trends in Cell. Biol.* 2000; 10: 362-365
- Grinnell, F.** Ho, C.H.: Transforming growth factor β stimulates fibroblast-collagen matrix contraction by different mechanisms in mechanically loaded and unloaded matrices. *Exp. Cell. Res.* 2002; 273: 248-255
- Gustafson, C.J.** Eldh, J.; Kratz, G.: Culture of human urothelial cells on a cell-free dermis for autotransplantation. *Eur. Urol.* 1998; 33: 503-506
- Gustafson, C.J.** G. Kratz: Cultured autologous keratinocytes on a cell-free dermis in the treatment of full-thickness wounds. *Burns* 1999; 25: 331-335
- Hafemann, B.** Ensslen, S.; Erdmann, C.; Niedballa, R.; Zühlke, A.; Ghofrani, K.; Kirkpatrick, C.J.: Use of collagen/elastin-membrane for the tissue engineering of dermis. *Burns* 1999; 25: 373-384
- Halberstadt, C.R.** Hardin, R.; Bezverkov, K.; Snyder, D.; Allen, L.; Landeen, L.: The in vitro growth of a three-dimensional human dermal replacement using a single-pass perfusion system. *Biotechnol. Bioeng.* 1994; 34: 740-746
- Hamill, O.P.** Martinac, B.: Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol. Rev.* 2001; 81: 685-740
- Han, Y.P.** Nien, Y.D.; Garner, W.L.: Recombinant human platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta mediate contraction of human dermal fibroblast populated lattices is inhibited by Rho/GTPase inhibitor but does not require phosphatidylinositol-3' kinase. *Wound Repair Regen.* 2002; 10: 169-176
- Hansbrough, J.F.** Wound coverage with biologic dressings and cultured skin substitutes. R.G. Lands Company, Austin, 1992
- Hansbrough, J.F.** Morgan, J.; Greenleaf, G.; Underwood, J.: Development of a temporary living skin replacement composed of human neonatal fibroblasts cultured in Biobrane, a synthetic dressing material.

- Surgery 1994; 115: 633-44
- Harriger, M.D.** Supp, A.P.; Warden, G.D.; Boyce, S.T.: Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice. J. Biomed. Mater. Res. 1997; 35: 137-145
- Harris, A.K.** Stopak, D.; Wild, P.: Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. Nature 1981; 290: 249-251
- Hayflick, L.** The cell biology of aging. J. Invest. Dermatol. 1979; 73: 8-14
- Henze, U.** Zwadlo-Klarwasser, G.; Klosterhalfen, B.; Höcker, H.; Richter, H.; Mittermayer, C.: Kunststoffe für den medizinischen Einsatz als Implantatmaterialien. Deutsches Ärzteblatt 1999; 96: 687-691
- Herndon, D.N.** Thompson, P.B.; Desai, M.H.; van Osten, T.J.: Treatment of burns in children. Ped. Clin. North Am. 1985; 32: 1311-1332
- Herrick, S.E.** Ireland, G.W.; Simon, D.; McCollum, C.N.; Ferguson, M.W.J. Venus ulcer fibroblasts compared with normal fibroblasts show differences in collagen but not fibronectin production under both normal and hypoxic conditions. J. Invest. Dermatol. 1996; 106: 187-193
- Herson, M.R.** Mathor, M.B.; Altran, S.; Capelozzi, V.L.; Ferreira, M.C.: In vitro construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating into decellularized glycerol-preserved allodermis. Artif. Org. 2001; 25: 901-906
- Hickerson, W.L.** Compton, C.; Fletchall, S.; Smith, L.R.: Cultured epidermal autografts and allodermis combination for permanent burn wound coverage. Burns 1994; 20 Suppl. 1: 52-55
- Hiles, M.C.** Badylak, S.F.; Geddes, L.A.: Porosity of porcine small-intestinal submucosa for use as a vascular graft. J. Biomed. Mater. Res. 1993; 27: 139-144
- Hillmann, G.** Steinkamp-Zucht, A.; Geurtsen, W.; Gross, G.; Hoffmann, A.: Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. Biomaterials 2002; 23: 1461-1469
- Hirano, S.** Rees, R.S.; Gilmont, R.R.: MAP kinase pathways involving hsp27 regulate fibroblast-mediated wound contraction. J. Surg. Res. 2002; 102: 77-84
- Ho, C. K.** A geoscience approach to modeling chemical transport through skin. Sandia National Laboratories, unter www.sandia.gov/geobio/cliff.html vom 23.05.2003
- Hoerstrup, S.P.** Sodian, R.; Daebritz, S.; Wang, J.; Bacha, E.A.; Martin, D.P.; Moran, A.M.; Guleserian, K.J.; Sperling, J.S.; Kaushal, S.; Vacanti, J.P.; Schoen, F.J.; Mayer, J.E.: Functional living triflet heart valves grown in vitro. Circulation. 2000; 1002 suppl. III: III-44-III-49
- Hoerstrup, S.P.** Zünd, G.; Sodian, R.; Schnell, A.M.; Grünenfelder, J.; Turina, M.I.: Tissue engineering of small caliber vascular grafts. Eur. J. Cardio-Thor. Surg. 2001; 20: 164-169
- Hohenberger, P.** Chirurgische Therapie von Weichgewebssarkomen. Der Onkologe. 1995; 1: 101-109
- Hohenberger, P.** Allenberg, J.R.; Schlag, P.M.; Reichardt, P.: Results of surgery and multimodal therapy for patients with soft tissue sarcomas invading to vascular structures. Cancer 1999; 85: 396-408

- Hohenberger, P.** Persönliche Mitteilung; 2002
- Holmes, T.C.** Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Tibtech.* 2002; 20:16-21
- Hu, W.J.** Eaton, J.W.; Tang, L.: Molecular basis of biomaterial mediated foreign body reactions. *Blood* 2001; 98: 1231-1238
- Huang-Lee, L.L.H.** Cheung, D.T.; Nimni, M.E.: Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. *J. Biomed. Mater. Res.* 1990; 24: 1185-1201
- Humes, H.D.** Tissue engineering of a bioartificial kidney: a universal donor organ. *Transpl. Proc.* 1996; 28: 2032-2035
- Hunt, T.K.** Pai, M.P.: The effect of varying ambient oxygen tensions on wound metabolism and collagen synthesis. *Surg. Gyn. Obstet.* 1972; 135: 561-567
- Huschka, C.** Untersuchungen zur Wirkung von Biotin auf humane Keratinozyten und zur Modulation der Biotinpenetration in humane Haut. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1998
- Hutmacher, D.W.** Schantz, T.; Zein, I.; Ng, K.W.; Teoh, S.H.; Tan, K.C.: Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 55: 203-216
- Hynes, R.O.** Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11- 25
- Ibelgaufits, H.** Lexikon Cytokine. Medikon Verlag, München, 1992
- Ibusuki, S.** Fujii, Y.; Iwamoto, Y.; Matsuda, T.: Tissue-engineered cartilage using an injectable and in situ gelable thermoresponsive gelatine: fabrication and in vitro performance. *Tissue Eng.* 2003; 9: 371-384
- Ihara, K.** Shigetomi, M.; Kawai, S.; Doi, K.; Yamamoto, M.: Functioning muscle transplantation after wide excision of sarcomas in the extremity. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 1999; 358:140-148
- Ishaug, S.L.** Crane, G.M.; Miller, M.J.; Yasko, A.W.; Yaszemski, M.J.; Mikos, A.G.: Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 36: 17-28
- Issels** Sauer: Weichteilsarkome; www.krebsinfo.de/ki/empfehlungen/knochen/5-INTER.html, Version vom 11.06.2003
- Jalali, S.** Del Pozo, M.A.; Chen, K.D.; Miao, H.; Li, Y.S.; Schwartz, M.A.; Shyy, J.Y.L.; Chien, S.: Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic intercation with specific extracellular matrix ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 1042-1046
- Janeway, C.A.** Travers, P.: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1995
- Jockenhoevel, S.** Zund, G.; Hoerstrup, S.P.; Schnell, A.; Turina, M.: Cardivascular tissue engineering: a new laminar flow chamber for in vitro improvement of mechanical tissue properties. *ASAIO J.* 2002; 48: 8-11

- Jonsson, K.** Jensen, J.A.; Goodson, W.H.; Scheuenstuhl, H.; West, J.; Hopf, H.W.; Hunt, T.K.: tissue oxygenation, anemia and perfusion in relation to wound healing in surgical patients. *Ann. Surg.* 1991; 214: 605-613
- Juliano, R.L.** Haskill, S.: Signal-transduction from the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* 1993; 120: 577-585
- Junqueira, L.C.** Carniero, J.: Histologie, 4. Auflage, 1996, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Kaihara, S.** Borenstein, J.; Koka, R.; Lalan, S.; Ochoa, E.R.; Ravens, M.; Pien, H.; Cunningham, B.; Vacanti, J.P.: Silicon micromatching to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Eng.* 2000; 6: 105-117
- Kaiser, H.W.** Stark, G.B.; Kopp, J.; Balcerkiewicz, A.; Spilker, G.; Kreysel, H.W.: Cultured autologous keratinocytes in fibrin glue suspension, exclusively and combined with STS-allograft (preliminary clinical and histological report of a new technique). *Burns* 1994; 20: 23-29
- Kamarasinghe, G.** Transmissible diseases of particular importance in the immunocompromised and transplant recipients. *Advances in tissue banking* 2001; 5: 212-231
- Kamlot, A.** Rozga, J.; Watanabe, F.D.; Demetriou, A.A.: Artificial liver support systems. *Biotechnol. Bioeng.* 1996; 50: 382-391
- Kellar, R.S.** Landeen, L.K.; Shepherd, R.; Naughton, G.K.; Ratcliffe, A.; Williams, S.K.: Scaffold-based three-dimensional human fibroblast culture provide a structural matrix that supports angiogenesis in infarcted heart tissue. *Circul.* 2001; 104: 2063-2068
- Kent, B.L.** Mutharasan, R.: Cultivation of animal cells in a reticulated vitreous carbon foam. *J. Biotech.* 1993; 22: 311-328
- Kerkvliet, E.H.M.** Docherty, A.J.P.; Beertsen, W.; Everts, V.: Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase A (MMP-2) but not with collagenase. *Matrix Biol.* 1999; 18: 373-380
- Kessler, D.** Dethlefsen, S.; Haase, I.; Plomann, M.; Hirche, F.; Krieg, T.; Eckes, B.: Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotyp". *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 36575-36585
- Khor, E.** Methods for treatment of collagenous tissues for bioprotheses. *Biomaterials* 1997; 18: 95-105
- Klemm, E.** Rudek, M.; Markowz, G.; Schütte, R. Mikroverfahrenstechnik: 765 ff. in: Winnacker-Küchler, Chemische Technik. Wiley-VCH, Weinheim, 5. Auflage 2003
- Koide, M.** Osaki, K.; Konishi, J.; Oyamada, K.; Katakura, T.; Takahashi, A.: A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993; 27: 79-87
- Kojima, K.** Bonassar, L.J.; Roy, A.K.; Mizuno, H.; Cortiella, J.; Vacanti, C.A.: A composite tissue-engineered trachea using sheep nasal chondrocytes. *FASEB J.* 2003; 17: 823-838
- Koller, J.** Healing of skin and amnion grafts. *Advances in Tissue Banking* 2001; 5: 398-418
- Koyano, T.** Minoura, N.; Nagura, M.; Kobayashi, K.: Attachment and growth of cultured fibroblast cells on

- PVA/chitosan-blended hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 33: 486-490
- Krause, S.A.** Entwicklung und Charakterisierung von Mikroemulsionen zur dermalen Applikation von Arzneimitteln. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1999
- Kraut, J.D.** Eckhardt, A.J.; Patton, A.J.; Antoniadis, K.; Haith, L.R.; Shotwell, B.S.: Combined simultaneous application of cultured epithelial autografts and AlloDerm®. *Wounds* 1995; 7: 137-142
- Krejci, N.C.** Cuono, C.B.; Langdon, R.C.; McGuire, J.: In vitro reconstitution of skin: fibroblasts facilitate keratinocyte growth and differentiation on acellular reticular dermis. *J. Invest. Dermatol.* 1991; 97: 843-848
- Kretzmer, G.** Schuegerl, K.: Response of mammalian cells to shear stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991; 34: 613-616
- Krueger, W.O.** Jesse, R.J.; Goepfert, H.; Herson, J.; Romsdahl, M.M.; Walker, W.: Wound healing enhancement: fibroblast implantation to increase breaking strength in normal and irradiated skin. *Surg. Forum* 1978; 29: 585-587
- Kunz-Schughart, L.** Heyder, P.; Schroeder, J.; Knuechel, R.: A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation. *Exp. Cell Res.* 2001; 266: 74-86
- Lambert, C.A.** Soudant, E.P.; Nusgens, B.V.; Lapière, C.M.: Pretranslational regulation of extracellular matrix molecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces. *Lab. Invest.* 1992; 66: 444-451
- Lambert, C.A.** Colige, A.C.; Munaut, C.; Lapiere, C.M.; Nusgens, B.V.: Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension. *Matrix Biol.* 2001; 20: 397-408
- Lamme, E.N.** De Vries, H.J.C.; van Veen, H.; Gabbiani, G.; Westerhof, W.; Middelkoop, E.: Extracellular matrix characterization during healing of full-thickness wounds treated with a collagen/elastin dermal substitute shows improved skin regeneration in pigs. *J. Histochem. Cytochem.* 1996; 44: 1311-1322
- Lamme, E.N.** van Leeuwen, R.T.J.; van Jonker, J.; Middelkoop, E.: Living skin substitutes: survival and function of fibroblasts in a dermal substitute in experimental wounds. *J. Invest. Dermatol.* 1998; 111: 989-995
- Lamme, E.N.** van Leeuwen, R.T.J.; Brandsma, K.; van Marle, J.; Middelkoop, E.: Higher number of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J. Pathol.* 2000; 190: 595-603
- Langer, R.S.** Polymers for drug delivery and tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.* 1995; 23: 101-11
- Langholz, O.** Röckel, D.; Mauch, C.; Kozłowska, E.; Bank, I.; Krieg, T.; Eckes, B.: Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *J. Cell. Biol.* 1995; 131: 1903-1915
- Langholz, O.** Roeckel, D.; Petersohn, D.; Broermann, E.; Eckes, B.; Krieg, T.: Cell-matrix interactions induce tyrosine phosphorylation of MAP kinases ERK1 and ERK2 and PLC γ -1 in two-dimensional and

- three-dimensional cultures of human fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 1997; 235: 22-27
- Langstein, H.N.** Robb, G.L.: Reconstructive approaches in soft tissue sarcoma. *Sem. Surg. Oncol.* 1999; 17: 52-65
- Laurencin, C.T.** Attawia, M.A.; Elgendy, H.E.; Herbert, K.M.: Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized matrices. *Bone* 1996; 19: 93S-99S
- LeBaron, R.G.** Athanasiou, K.A.: Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials* 2000; 21: 2575-2587
- Lee, C.J.** Tissue engineered tracheal prosthesis with acceleratedly cultured homologous chondrocytes as an alternative of tracheal reconstruction. *J. Cardiovasc. Surg.* 2002; 43: 275-279
- Lee, C.R.** Grodzinsky, A.J.; Spector, M.: Biosynthetic response of passaged chondrocytes in a type II collagen scaffold to mechanical compression. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003; 64: 560-569
- Lee, D.J.** Rosenfeldt, H.; Grinnell, F.: Activation of ERK and p38 MAP kinases in human fibroblasts during collagen matrix contraction. *Exp. Cell Res.* 2000; 257: 190-197
- Lee, J.E.** Park, J.C.; Hwang, Y.S.; Kim, J.K.; Kim, J.G.; Suh, H.: Characterization of UV-irradiated dense/porous collagen membranes: morphology, enzymatic degradation, and mechanical properties. *Yons. Med. J.* 2001; 42: 172-179
- Lee, W.K.** Park, K.D.; Kim, Y.H.; Suh, H.; Park, J.C.; Lee, J.E.; Sun, K.; Baek, M.J.; Kim, H.M.; Kim, S.H.: Improved calcification resistance and biocompatibility of tissue patch grafted with sulfonated PEO or heparin after glutaraldehyde fixation. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 58: 27-35
- Leigh, I.M.** Purkis, P.E.: Culture grafted leg ulcers. *Clin. Exp. Dermatol.* 1986; 11: 650-652
- Lelkes, P.I.** Samet, M.M.: Endothelialization of the luminal sac in artificial cardiac prostheses: a challenge for both biologists and engineers. *J. Biomech. Eng.* 1991; 113: 132-142
- Leor, J.** Aboulafia-Etzion, S.; Dar, A.; Shapiro, L.; Barbash, I.M.; Battler, A.; Granot, Y.; Cohen, S.: Bioengineered cardiac grafts, a new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 2000; 102 suppl. III: III-56-III-61
- Li, S.** Kim, M.; Hu, Y.L.; Jalali, S.; Schlaepfers, D.D.; Hunter, T.; Chien, S.; Shyy, J.Y.L.: Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 30455-30462
- Lidl, T.** Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 3. Auflage, 1994
- Lin, K.** Hsu, P.P.; Chen, B.J.; Yuan, S.; Shyy, J.Y.L.; Li, Y.S.; Chien, S.: Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 9385-9389
- Liu, Y.** Chen, B.P.C.; Lu, M.; Zhu, Y.; Stemerman, M.B.; Chien, S.; Shyy, J.Y.L.: Shear stress activation of SREBP! In endothelial cells is mediated by integrins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 76-81
- Livesey, S.A.** Herndon, D.N.; Hollyoak, M.A.; Atkinson, Y.H.; Nag, A.: Transplantated acellular allograft dermal matrix. *Transplantation* 1995; 60: 1-9
- Lu, H.K.** Lee, S.Y.; Lin, F.P.: Elastic modulus, permeation time and swelling ratio of a new porcine dermal

- collagen membrane. *J. Periodont. Res.* 1998; 33: 243-248
- Lu, L.** Yaszemski, M.J.; Mikos, A.G.: Retinal pigment epithelium engineering using synthetic biodegradable polymers. *Biomaterials* 2001; 22: 3345-3355
- Luo, S.** Benathan, M.; Raffoul, W.; Panizzon, R.G.; Egloff, D.V.: Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions. *Plast. Reconstr. Surg.* 2001; 107: 87-96
- Maas, C.S.** Erikson, T.; McCalmont, T.; Mabry, D.; Cooke, D.; Schindler, R.: Evaluation of expanded polytetrafluoroethylene as a soft-tissue filling substance: an analysis of design-related implant behavior using the porcine skin model. *Plast. Reconstr. Surg.* 1997; 101: 1307-1314
- Maas-Szabowski, N.** Zabowski, A.; Stark, H.J.; Andrecht, S.; Kolbus, A.; Schorpp-Kistner, M.; Angel, P.; Fusenig, N.: Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 116: 816-820
- Madden, J.W.** Peacock, E.E.: Studies on the biology of collagen during wound healing: III. Dynamic metabolism of scar collagen and remodelling of dermal wounds. *Ann. Surg.* 1971; 174: 511-520
- Mann, B.K.** West, J.L.: Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration, and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 60: 86-93
- Mansbridge, J.** Liu, K.; Patch, R.; Symons, K.; Pinney, E.: Three-dimensional fibroblast culture implant for the treatment of diabetic foot ulcers: metabolic activity and therapeutic range. *Tissue Eng.* 1998; 4: 403-414
- Maquet, V.** Martin, D.; Scholtes, F.; Franzen, R.; Schoenen, J.; Moonen, G.; Jérôme, R.: Poly(lactide) foams modified by poly(ethyleneoxide)-block-poly(lactide) copolymers and a-FGF: in vitro and in vivo evaluation. *Biomaterials* 2001; 22: 1137-1146
- Marks, M.G.** Doillon, C.; Silver, F.H.: Effects of fibroblasts and basic fibroblast growth factor on facilitation of dermal wound healing by type I collagen matrices. *J. Biomed. Mater. Res.* 1991; 25: 683-696
- Marler, J.J.** Guha, A.; Rowley, J.; Koka, R.; Mooney, D.; Upton, J.; Vacanti, J.P.: Soft-tissue augmentation with injectable alginate and syngenic fibroblasts. *J. Plast. Reconstr. Surg.* 2000; 105: 2048-2058
- Marshall, L.** Gohosh, M.M.; Boyce, S.G.; MacNeil, S.; Freedlander, E.; Kudesia, G.: Effect of glycerol on intracellular virus survival: implications for the clinical use of glycerol-preserved cadaver skin. *Burns* 1995; 21: 356-361
- Martin, I.** Jakob, M.; Schäfer, D.; Heberer, M.; Vunjak-Novakovic, G.; Freed, L.E.: Expansion in the presence of specific growth factors enhances the potential of bovine and human chondrocytes to differentiate and engineer 3D cartilaginous tissues in vitro. *Cells Tiss. Org.* 2000; 21: 166-176
- Martin, P.** Wound healing-aiming for perfect skin regulation, *Science* 1997; 276: 75-81
- Mauch, C.** Adelman-Grill, B.; Hatamochi, A.; Krieg, T.: Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three-dimensional contact with collagen. *FEBS Letters* 1989; 250: 301-305

- May, S.R.** Recent developments in skin banking. In: May, Dogo (eds.), Care of the Burn Wound - Int. Congr. Geneva 1983; Karger, Basel 1985: 175-185
- Mähr, U.** Herstellung von Porenmembranen aus Polyacrylsäure-Dispersionen mit einstellbaren Stofftransporteigenschaften. Dissertation an der Technische Universität Berlin, 2001
- McAree, K.G.** Klein, R.L.; Boeckman, C.R.: The use of cultured epithelial autografts in the wound care of severely burned patients. J. Pediatric Surg. 1993; 28: 166-168
- Medalie, D.A.** Tompkins, R.G.; Morgan, J.R.: Evaluation of acellular human dermis as a dermal analog in a composite skin graft. ASAIO J. 1996; 42: M455-M462
- Mercier, I.** Lechaire, J.P.; Desmouliere, A.; Gaill, F.; Aumailley, M.: Interactions of human skin fibroblasts with monomeric or fibrillar collagen induce different organization of cytoskeleton. Exp. Cell Res. 1996; 225: 245-256
- Michali, D.** McPherson, M.: Immunologic study of artificial skin used in the treatment of thermal injuries. J. Burn Care Rehabil. 1990; 11: 21-26
- Middelkoop, E.** de Vries, J.C.; Ruuls, L.; Everts, V.; Wildevuur, C.H.R.; Westerhof, W.: Adherence, proliferation and collagen turnover by human fibroblasts seeded into different types of collagen sponges. Cell. Tissue Res. 1995; 280:447-453
- Mikos, A.G.** Sarakinos, G.; Lyman, M.D.; Ingber, D.E.; Vacanti, J.P.; Langer, R.: Prevascularization of porous biodegradable polymers. Biotechnol. Bioeng. 1993; 42: 716-723
- Miller, W.M.** Wilke, C.R.; Blanch, H.W.: Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. J. Cell. Physiol. 1989 a; 132: 524-530
- Miller, W.M.** Blanch, H.W.; Wilke, C.R.: A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. Biotechnol. Bioeng. 1989 b; 32: 947-965
- Minami, Y.** Sugihara, H.; Oono, S.: Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1993; 34: 2316-2324
- Moley, J.F.** Eberlein, T.J.: Soft-tissue sarcomas. Surg. Clin. North Am. 2000; 80: 687-708
- Monkos, K.** Viscosity of bovine serum albumin aqueous solutions as a function of temperature and concentration. Int. J. Biol. Macromol. 1996; 18: 61-68
- Mooney, D.J.** Kaufmann, P.M.; Sano, K.; McNamara, K.M.; Vacanti, J.P.; Langer, R.: Transplantation of hepatocytes using porous, biodegradable sponges. Transpl. Proc. 1994; 26: 3425-3426
- Mooney, D.J.** Langer, R.; Ingber, D.E.: Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix. J. Cell. Sci. 1995; 108: 2311-2320
- Moulin, V.** Castilloux, G.; Jean, A.; Garrel, D.R.; Auger, F.A.; Germain, L.: In vitro models to study wound healing fibroblasts. Burns 1996; 22: 359-362
- Mudera, V.C.** Pleass, R.; Eastwood, M.; Tarnuzzer, R.; Schultz, G.; Khaw, P.; McGrouther, D.A.; Brown, R.A.:

- Molecular responses of human dermal fibroblasts to dual cues: contact guidance and mechanical load. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 2000; 45:1-9
- Mueller, E.M.** Wundheilung am Beispiel der Haut - 2002. Unter www.pathology.unibe.ch, Version vom 01.06.2003
- Mueller, P.K.** Brinckmann, J.: Collagen and wound healing-a summary, in: The wound healing process: forensic pathological aspects (Oehmichen, Kirchner, eds). Schmidt-Römhild-Verlag, Lübeck 1995: 243ff.
- Mueller, S.M.** Mizuno, S.; Gerstenfeld, L.C.; Glowacki, J.: Medium perfusion enhances osteogenesis by murine osteosarcoma cells in three-dimensional collagen sponges. *J. Bone Miner. Res.* 1999; 14: 2118-2126
- Munster, A.A.** Cultured skin for massive burns - a prospective, controlled trial. *Ann. Surg.* 1997; 224: 372-377
- Murphy, G.F.** Orgill, D.P.; Yannas, I.V.: Partial dermal regeneration is induced by biodegradable collagen-glycosaminoglycan grafts. *Lab. Invest.* 1990; 63: 305-313
- Murphy, W.L.** Peters, M.C.; Kohn, D.H.; Mooney, D.J.: Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21: 2521-2527
- Myers, S.R.** Grady, J.; Soranzo, C.; Sanders, R.; Green, C.; Leigh, I.M.; Navsaria, H.A.: A hyaluronic acid membrane delivery system for cultured keratinocytes: clinical "take" rates in the porcine keratodermal model. *J. Burn Care Rehabil.* 1997; 18: 214-22
- Nakagawa, S.** Pawelek, P.; Grinnell, F.: Extracellular matrix organization modulates fibroblast growth factor responsiveness. *Exp. Cell Res.* 1989; 182: 572-582
- Naughton, G.** Mansbridge, J.; Gentzkow, G.: A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers. *Artif. Org.* 1997; 21: 1203-1210
- Navsaria, H.A.** Myers, S.R.; Leigh, I.M.; McKay, I.A.: Culturing skin *in vitro* for wound therapy. *Tibtech.* 1995; 13: 91-100
- Nerem, R.M.** Tissue engineering in the USA. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1992; 30: CE8-CE12
- Neumann, T.** Nicholson, B.S.; Sander, J.E.: Tissue engineering of perfused microvessels. *Microvasc. Res.* 2003; 66: 59-67
- Nguyen, K.T.** West, J.L.: Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002; 23: 4307-4314
- Nishikawa, A.** Taira, T.; Yoshizato, K.: In vitro maturation of collagen fibrils modulates spreading, DNA synthesis, and collagenolysis of epidermal cells and fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 1987; 171: 164-177
- Noah, E.M.** Chen, J.; Jiao, X.; Heschel, I.; Pallua, N.: Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen sponges prepared for tissue engineering. *Biomaterials* 2002; 23: 2855-2861
- Nollert, M.U.** Diamond, S.L.; McIntire, L.V.: Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 1991; 38: 588-602

- Nör, J.E.** Peters, M.C.; Christensen, J.B.; Sutorik, M.M.; Linn, S.; Khan, M.K.; Addinon, C.L.; Mooney, D.J.; Polverini, P.J.: Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab. Invest.* 2001; 81: 453-463
- O'Connor, N.E.** Mulliken, J.B.; Banks-Schlegel, S.: Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981; 1: 75-78
- Okumu, F.W.** Dao, L.N.; Fiedler, P.J.; Dybal, N.; Brooks, D.; Samir, S.; Cleland, J.L.: Sustained delivery of human growth hormone from a novel gel system: SABER™. *Biomaterials* 2002; 23: 4353-4358
- Olde Damink, L.H.H.** Dijkstra, P.J.; van Luyn, M.J.A.; van Wachem, P.B.; Nieuwenhuis, P.; Feijen, J.: Changes in the mechanical properties of dermal sheep collagen during in vitro degradation. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995; 29: 139-147
- Oudega, M.** Gautier, S.E.; Chapon, P.; Fragoso, M.; Bates, M.L.; Parel, J.M.; Bunge, M.B.: Axonal regeneration into Schwann cell grafts within bioresorbable poly(-hydroxyacid) guidance channels in the adult rat spinal cord. *Biomaterials* 2001; 22: 1125-1136
- Owen, T.J.** Lantz, G.C.; Hiles, M.C.; van Vleet, J.; Martin, B.R.; Geddes, L.A.: Calcification potential of small intestinal submucosa in a rat subcutaneous model. *J. Surg. Res.* 1997; 71: 179-186
- Pachence, J.M.** Collagen-based devices for soft-tissue repair. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996; 33: 35-40
- Palecek, S.P.** Loftus, J.C.; Ginsberg, M.H.; Lauffenburger, D.A.; Horwitz, A.F.: Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 1997; 385: 537-540
- Papadaki, M.** McIntire, L.V.; Eskin, S.G.: Effects of shear stress on the growth kinetics of human aortic smooth muscle cells in vitro. *Biotechnol. Bioeng.* 1996; 50: 555-561
- Papas, K.K.** Long, R.C.; Sambanis, A.; Constantinidis, I.: Development of a bioartificial pancreas: I. Long-term propagation and basal and induced secretion from entrapped β TC3 cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 1999; 66: 219-230
- Patrick, C.W.** Zheng, B.; Johnston, C.; Reece, G.P.: Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds. *Tissue Eng.* 2002; 8: 283-293
- Pauli, G.** Aktuelle Aspekte der Sicherheit biologischer Arzneimittel, Vortrag auf dem 2. Symposium Zell- und Gewebetransplantation, 7.3.2002, Berlin
- Payne, R.G.** Yaszemski, M.J.; Yasko, A.W.; Mikos, A.G.: Development of an injectable, in situ crosslinkable, degradable polymeric carrier for osteogenic cell populations. Part 1. Encapsulation of marrow stromal osteoblasts in surface crosslinked gelatine microparticles. *Biomaterials* 2002; 23: 4359-4371
- Peng, C.A.** Palsson, B.O.: Cell growth and differentiation on feeder layers is predicted to be influenced by bioreactor geometry. *Biotechnol. Bioeng.* 1996; 50: 479-492
- Pereira, B.P.** Some principles of biomechanics, structural and material properties. *Advances in Tissue Banking* 2001; 5: 507-533
- Perets, A.** Baruch, Y.; Weisbuch, F.; Shoshany, G.; Neufeld, G.; Cohen, S.: Enhancing the vascularization of

- three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003; 65A: 489-497
- Perry, S. D.** Wang, D.I.C.: Fiber bed reactor design for animal cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 1989; 34: 1-9
- Peterson, L.** Articular cartilage injuries treated with autologous chondrocyte transplantation in the human knee. *Acta Orthop. Belgica* 1996; 62: 196-200
- Pikal-Cleland, K.A.** Rodriguez-Hornedo, N.; Amidon, G.L.; Carpenter, J.F.: Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 384: 398-406
- Pinney, E.** Liu, K.; Sheeman, B.; Mansbridge, J.: Human three-dimensional fibroblast cultures express angiogenetic activity. *J. Cell. Physiol.* 2000; 183: 74-82
- Pins, G.D.** Toner, M.; Morgan, J.R.: Microfabrication of an analog of the basal lamina: biocompatible membranes with complex topographies. *FASEB J.* 2000; 14: 593-602
- Pirneay, J.P.** Vandenvelde, C.; Duinslaeger, L.; Reper, P.; Vanderkelen, A.: HIV transmission by transplantation of allograft skin: a review of literature. *Burns* 1997; 23: 1-5
- Pirot, F.** Kalia, Y.N.; Stinchcomb, A.L.; Keating, G.; Bunge, A.; Guy, R.H.: Characterization of the permeability barrier of human skin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 1562-1567
- Pollak, R.A.** Edington, H.; Jensen, J.L.; Kroeker, R.O.; Gentzkow, G.D.: A human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wounds* 1997; 9: 175-183
- Powers, M.J.** Domansky, K.; Kaazempur-Mofrad, M.R.; Kalezi, A.; Capitano, A.; Upadhyaya, A.; Kurzawski, P.; Wack, K.E.; Stolz, D.B.; Kamm, R.; Griffith, L.G.: A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol. Bioeng.* 2002; 78: 257-269
- Prajapati, R.T.** Chavally-Mis, B.; Herbage, D.; Eatswood, M.; Brown, R.A.: Mechanical loading regulates protease production by fibroblasts in three-dimensional collagen substrates. *Wound Rep. Reg.* 2000; 8: 226-237
- Pruitt, B.A.** Levine, N.S.: Characteristics and uses of biologic dressings and skin substitutes. *Arch. Surg.* 1984; 119: 312-322
- Pruss, A.** Kao, M.; Kiesewetter, H.; von Versen, R.; Pauli, G.: Virus safety of avital bone tissue transplants: evaluation of sterilization steps of spongiosa cuboids using a peracetic acid-methanol mixture. *Biologicals* 1999; 27: 195-201
- Pruss, A.** Baumann, B.; Seibold, M.; Kao, M.; Tintelnot, K.; von Versen, R.; Radtke, H.; Dörner, T.; Pauli, G.; Göbel, U.B.: Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-methanol. *Biologicals* 2001 a; 29: 59-66
- Pruss, A.** Hansen, A.; Kao, M.; Gürtler, L.; Pauli, G.; Benedix, F.; von Versen, R.: Comparison of the efficiency of virus inactivation methods in allogeneic avital bone tissue transplants. *Cell and Tissue Banking.* 2001 b; 2: 201-215
- Pruss, A.** Kao, M.; Gohs, U.; Koscielny, J.; von Versen, R.; Pauli, G.: Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. *Biologicals*

- 2002; 30: 125-133
- Pruss, A.** Virus Inactivation in Allogeneic Avital Bone Tissue Transplants by Peracetic Acid –Ethanol, Gamma Irradiation and Moist Heat. Vortrag beim 2. Symposium Zell- und Gewebetransplantation, Berlin, 7.3.2003
- Putnam, A.J.** Mooney, D.J.: Tissue engineering using synthetic extracellular matrices. *Nature Med.* 1996; 2: 824-826
- Radley, H.** Thermoplastic elastomers in medical application. *Med. Dev. Techn.* 2003; May: 38-40
- Raghow, R.** The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J.* 1994; 8: 823-831
- Rath, M.** Klassifizierung des Tissue Engineering einmal anders. *Transkript* 2003; 9: 28
- Reininger-Mack, A.** Thielecke, H.; Robitzki, A.A.: 3D-biohybrid systems: applications in drug screening. *Tibtech.* 2002; 20: 56-61
- Rennekamp, H.O.** Kiessig, V.; Hansbrough, J.F.: Current concepts in the development of cultured skin replacements. *J. Surg. Res.* 1996; 62: 288-295
- Rhudy, R.W.** McPherson, J.M.: Influence of the extracellular matrix on the proliferative response of human skin fibroblasts to serum and purified platelet-derived growth-factor. *J. Cell. Physiol.* 1988; 137: 185-1991
- Richters, C.D.** Hoekstra, M.J.; van Baare, J.; du Pont, J.S.; Kamperdijk, E.W.A.: Morphology of glycerol-preserved human cadaver skin. *Burns* 1996; 22: 113-116
- Ries, C.** Petrides, P.E.: Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1995; 376: 345-355
- Rivard, C.H.** Chaput, C.J.; DesRosiers, E.A.; Yahia, L.H.; Selmani, A.: Fibroblast seeding and culture in biodegradable porous substrates. *J. Appl. Biomat.* 1995; 6: 65-68
- Robinson, D.** Halperin, N.; Nevo, Z.: Regenerating hyaline cartilage in articular defects of old chickens using implants of embryonal chick chondrocytes embedded in a new natural delivery substance. *Calcif. Tiss. Int.* 1990; 46: 246-253
- Rotheburger, M.** Volker, W.; Vischer, J.P.; Berendes, E.; Glasmacher, B.; Scheld, H.H.; Deiwick, M.: Tissue engineering of heart valves: formation of a three-dimensional tissue using porcine heart valve cells. *ASAIO J.* 2002; 48: 586-591
- Rudert, M.** Wirth, C.J.; Schulze, M.; Reiss, G.: Synthesis of articular cartilage-like tissue in vitro. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 1998; 117: 141-146
- Rzepka, S.** Reagenzfreisetzung durch Kernspurfilter-Transportmechanismen und Anwendungsmöglichkeiten. Dissertation an der Philipps-Universität Marburg, 1999
- Sacks, M.S.** Gloeckner, C.D.: Quantification of the fiber architecture and biaxial mechanical behavior of porcine intestinal submucosa. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 46: 1-10

- Sage, H.** Collagens of basement membrane. *J. Invest. Dermatol.* 1986; 79: s51-s59
- Saidi, I.S.** Jacques, S.L.; Tittel, F.K.: Mie and Rayleigh modelling of visible-light scattering in neonatal skin. *Appl. Optics* 1995; 34: 7410-7418
- Salisbury, R.E.** Carnes, R.W.; Enterline, D.E.: Biological dressings and evaporative water loss from burn wound. *Ann. Plast. Surg.* 1980; 5: 270-272
- Sandner, P.** Wolf, K.; Bergmaier, U.; Gess, B.; Kurtz, A.: Induction of VEGF and VEGF receptor gene expression by hypoxia: divergent regulation in vivo and in vitro. *Kindeg Int.* 1997; 51: 448-453
- Sandstrom, C.E.** Bender, J.G.; Miller, W.M.; Papoutsakis, E.T.: Development of a novel perfusion chamber to retain nonadherent cells and its use for comparison of human "mobilized" peripheral blood mononuclear cell cultures with and without irradiated bone marrow stroma. *Biotechnol. Bioeng.* 1996; 50: 493-504
- Sardonini, C.A.** DiBiasio, D.: An investigation of the diffusion-limited growth of animal cells around single hollow fibers. *Biotechnol. Bioeng.* 1992; 40: 1233-1242
- Sato, M.** Ishikawa, O.; Miyachi, Y.: Distinct patterns of collagen expression are seen in normal and keloid fibroblasts grown in three-dimensional culture. *Br. J. Dermatol.* 1998; 138: 938-43
- Schaser, K.D.** Vollmar, B.; Menger, M.D.; Schewior, L.; Kroppenstedt, S.N.; Raschke, M.; Lübke, A.S.; Haas, N.P.; Mittlmeier, T.: In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury. *J. Orthop. Res.* 1999; 17: 678-685
- Schäfer, W.** Modellierung des Stofftransports in Grundwasser. Steinbeis-Transferzentrum 734 Grundwassermodellierung. Publikation unter www.schaefer-gwm.de/downloads/mod_sttp.pdf, Version 01.03.2004
- Schäffer, M.** Stülten, C.; Bongartz, M.; Budach, W.; Becker, H.D.: Pathophysiologische Bedeutung des Stickstoffmonoxides bei radiogenen Wundheilungsstörungen. *Chirurg. Forum* 2001; 30: 447-448
- Schiro, J.A.** Chan, B.M.C.; Roswit, W.T.; Kassner, P.D.; Pentland, A.P.; Hemler, M.E.; Eisen, A.Z.; Kupper, T.S.: Integrin $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. *Cell* 1991; 67: 403-410
- Schneider, E.L.** Aging and cultured skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1979; 73: 15-18
- Schoen, F.J.** Levy, R.J.: Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 47: 439-465
- Schönfeld, M.** Moll, I.; Maier, K.; Jung, E.G.: Keratinozyten aus der Zellkultur zur Therapie von Hautdefekten. *Hautarzt* 1993; 44: 281-289
- Schutte, E.** Regulatory barriers to tissue-engineered products. *Med. Dev. Technol.* 2002; 3: 27-29
- Seagroves, T.N.** Ryan, H.E.; Lu, H.; Wouters, B.G.; Knapp, M.; Thibault, P.; Laderoute, K.; Johnson, R.S.: Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the Pasteur effect in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 3436-3444

- Sedlarik, K.M.** Wundheilung. Gustav-Fischer-Verlag, Jena, Stuttgart, 2. Auflage, 1993
- Seltzer, J.L.** Lee, A.Y.; Akers, K.T.; Sudbeck, B.; Southon, E.A.; Wayner, E.A.; Eisen, A.Z.: Activation of 72-kDa type IV collagenase/gelatinase by normal fibroblasts in collagen lattices is mediated by integrin receptors but is not related to lattice contraction. *Exp. Cell Res.* 1994; 213: 365-374
- Sheridan, R.L.** Hegarty, M.; Tompkins, R.G.; Burke, J.F.: Artificial skin in massive burns-results to ten years. *Eur. J. Plast. Surg.* 1994; 17: 91-93
- Sheridan, R.L.** Choucair, R.J.: Acellular allogenic dermis does not hinder initial engraftment in burn wound resurfacing and reconstruction. *J. Burn Care Rehabil.* 1997; 18: 496-499
- Sheridan, R.L.** Tompkins, R.G.: Skin substitutes in burns. *Burns* 1999; 25: 97-103
- Shimizu, T.** Yamato, M.; Akutsu, T.; Shibata, T.; Isoi, Y.; Kikuchi, A.; Umezu, M.; Okano, T.: Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 60: 110-117
- Sieminski, A.L.** Gooch, K.J.: Biomaterial-microvasculature interactions. *Biomaterials* 2000; 21: 2232-2241
- Sikavitsas, V.I.** Bancroft, G.N.; Mikos, A.G.: Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 62: 136-148
- Singh, S.** Woerly, S.; McLaughlin, B.J.: Natural and artificial substrates for retinal pigment epithelial monolayer transplantation. *Biomaterials* 2001; 22: 3337-3343
- Sittinger, M.** *In vitro* Herstellung von vitalem Knorpelgewebe mit Hilfe resorbierbarer Polymere. Dissertation an der Universität Regensburg, 1994
- Slivka, S.R.** Bartel, R.L.: Rapid estimation of collagen in a dermal model. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 1992; 28A: 690-692
- Smith, L.T.** Holbrook, K.A.; Byers, P.H.: Structure of the dermal matrix during development and in the adult. *J. Invest. Dermatol.* 1982; 79: s93-s104
- Snyder, R.J.** Simonson, D.A.: Cadaveric allografts as adjunct therapy for nonhealing ulcers. *J. Foot Ankle Surg.* 1999; 38: 93-101
- Sodian, R.** Hoerstrup, S.; Sperling, J.S.; Daebritz, S.; Martin, D.P.; Moran, A.M.; Kim, B.S.; Schoen, F.J.; Vacanti, J.P.; Mayer, J.E.: Early in vitro experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation.* 2002; 102 suppl. III: III-22-III-29
- Song, J.H.** Kim, W.S.; Park, Y.H.; Yu, E.K.; Lee, D.W.: Retention characteristics of various proteins in flow field-flow fractionation: effects of pH, ionic strength, and denaturation. *Bull. Korean Chem. Soc.* 1999; 20: 1159-1164
- Sorensen, J.C.** Living skin equivalents and their application in wound healing. *Clin. Pod. Surg. Med.* 1998; 15: 129-137
- Spyrou, G.E.** Watt, D.A.L.; Naylor, I.L.: The origin and mode of fibroblast migration and proliferation in

- granulation tissue. *Br. J. Plast. Surg.* 1998; 51: 455-461
- Stathopoulos, N.A.** Hellums, J.D.: Shear stress effects on human embryonic kidney cells in vitro. *Biotechnol. Bioeng.* 1985; 27: 1021-1026
- Steinbrech, D.S.** Longaker, M.T.; Babak, B.J.; Saadeh, P.B.; Chin, G.S.; Gerrets, R.P.; Chau, D.C.; Rowe, N.M.; Gittes, G.K.: *J. Surg. Res.* 1999; 84: 127-133
- Steinhoff, G.** Stock, U.; Najibulla, K.; Mertsching, H.; Timke, A.; Meliss, R.R.; pethig, K.; Haverich, A.; Bader, A.: Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogeneic acellular matrix conduits-in vitro restoration of valve tissue. *Circulation.* 2000; 102 suppl. III; III-50-III-55
- Stephens, P.** Davies, K.J.; Occleston, N.; Pleass, R.D.; Kon, C.; Daniels, J.; Khaw, P.T.; Thomas, D.W.: Skin and oral fibroblasts exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity. *Br. J. Dermatol.* 2001; 144: 229-237
- Stern, R.** McPherson, M.; Longaker, M.T.: Histologic study of artificial skin used in the treatment of full-thickness thermal injury. *J. Burn Care Rehabil.* 1990; 11: 7-13
- Strehl, R.** Schumacher, K.; de Vries, U.; Minuth, W.W.: Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. *Tissue Eng.* 2002; 8: 37-42
- Stryer, L.** *Biochemie.* Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Oxford, 4. Auflage 1995: 806
- Stücker, M.** Struk, A.; Altmeyer, P.; Herde, M.; Baumgärtl, H.; Lübbers, D.W.: The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. *J. Physiol.* 2002; 538: 985-994
- Sugihara, H.** Toda, S.; Yonemitsu, N.; Watanabe, K.: Effects of fat cells on keratinocytes and fibroblasts in a reconstructed rat skin model using collagen gel matrix culture. *Br. J. Dermatol.* 2001; 144: 244-253
- Sung, H.W.** Hsu, C.S.; Wang, S.P.; Hsu, H.L.: Degradation potential of biological tissues fixed with various fixatives: an in vitro study. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997 a; 35: 147-155
- Sung, H.W.** Hsu, H.L.; Hsu, C.S.: Effects of various chemical sterilization methods on the crosslinking and enzymatic degradation characteristics of an epoxy-fixed biological tissue. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997 b; 37: 376-383
- Takahashi, M.** Berk, B.C.: Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) activation by shear stress in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 2623-2631
- Takami, Y.** Matsuda, M.; Hanumadass, M.; Walter, R.J.: Dispase/detergent treated dermal matrix as a dermal substitute. *Burns* 1996; 22: 182-190
- Thomas, S.** *Wound Management and Dressings.* Pharmaceutical Press, London, 1980
- Tokuda, Y.** Crane, S.; Yamaguchi, Y.; Zhou, L.; Falanga, V.: The levels and kinetics of oxygen tension detectable at the surface of human dermal fibroblast cultures. *J. Cell. Physiol.* 2000; 182: 414-420
- Tomasek, J.J.** Halliday, N.L.; Updike, D.L.; Ahern-Moore, J.S.; Vu, T.K.H.; Liu, R.W.; Howard, E.W.: Gelatinase A activation is regulated by the organization of the polymerized actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*

- 1997; 272: 7482-7487
- Tomford, W.W.** Mankin, H.J.; Friedlaender, G.E.; Doppelt, S.H.; Gebhardt, M.C.: Methods of banking bone and cartilage for allograft transplantation. *Orthop. Clin. North Am.* 1987; 18: 241-247
- Toriyama, K.** Kawaguchi, N.; Kitoh, J.; Tajima, R.; Inou, K.; Kitagawa, Y.; Torii, S.: Endogenous adipocyte precursor cells for regenerative soft-tissue engineering. *Tissue Eng.* 2002; 8: 157-165
- Torok, E.** Pollok, J.M.; Ma, P.X.; Vogel, C.; Dandri, M.; Petersen, J.; Burda, M.R.; Kaufmann, P.M.; Kluth, D.; Rogiers, X.: Hepatic tissue engineering on 3-dimensional biodegradable polymers within a pulsatile flow bioreactor. *Dig. Surg.* 2001; 18: 196-203
- Tseng, S.C.G.** Prabhasawat, P.; Lee, S.-H.: Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am. J. Ophthalmol.* 1997; 124: 765-774
- Unemori, E.N.** Werb, Z.: Reorganization of polymerized actin: a possible trigger for induction of procollagenase in fibroblasts cultured in and on collagen gels. *J. Cell. Biol.* 1986; 103: 1021-1031
- van Baare, J.** Buitenwerf, J.; Hoekstra, M.J.; du Pont, J.S.: Virucidal effect of glycerol used in donor skin preservation. *Burns* 1994; 20: S77-S80
- van der Rest, M.** Bruckner, P.: Collagens: diversity at the molecular and supramolecular levels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1993; 3: 430-436
- van Kooten, T.G.** Schakenraad, J.M.; van der Mei, H.C.; Busscher, H.J.: Influence of pulsatile flow on the behavior of fibroblasts adhered to glass. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 1993; 4: 601-614
- Vassiere, G.** Chevallay, B.; Herbage, D.; Damour, O.: Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2000; 38: 205-210
- Vaughan, M.B.** Howard, E.W.; Tomasek, J.J.: Transforming growth factor- β 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp. Cell Res.* 2000; 257: 180-189
- Vomhoff, H.** Dynamic compressibility of water-saturated fibre networks and influence of local stress variations in wet pressing. Dissertation an der KTH Stockholm, 1998
- von Heimburg, D.** Zachariah, S.; Kühling, H.; Heschel, I.; Pallua, N.: Untersuchungen humaner Präadipozyten angeheftet an Trägermaterialien in vitro und in vivo im Nacktmausmodell. Erste Ergebnisse eines autologen bioartifizialen Weichgewebefüllmaterials. *Chirurg. Forum* 2000; 29: 481-486
- von Versen, R.** Musculoskeletal tissue banking in Europe – regulations and quality assurance. *Ann. Chirur. Gynaec.* 1999; 88: 215-220
- von Versen-Höynck, F.** Humanes Amnion – Experimentelle Untersuchungen und Klinische Erfahrungen. Dissertation an der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität Berlin, 2003
- von Wichert, G.** Jiang, G.; Kostic, A.; De Vos, K.; Sap, J.; Sheetz, M.P.: RPTP- α acts as a transducer of mechanical force on α 5 β 3-integrin-cytoskeleton linkages. *J. Cell Biol.* 2003; 161: 143-153
- Vunjak-Novakovic, G.** Martin, I.; Obradovic, B.; Treppo, S.; Grodzinsky, A.J.; Langer, R.; Freed, L.E.: Bioreactor

- cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J. Orth. Res.* 1999; 17: 130-138
- Wachtel, T.L.** Ninnemann, J.; Fisher, J.C.; Frank, H.A.; Inancsi, W.: Viability of frozen allografts. *Am. J. Surg* 1979; 138: 783-787
- Wainwright, D.J.** Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns* 1995; 21: 243-248
- Walter, R.J.** Matsuda, T.; Reyes, H.M.; Walter, J.M.; Hanumadass, M.: Characterization of acellular dermal matrixes (ADMs) prepared by two different methods. *Burns* 1998; 24: 104-113
- Weiss, S.** Histological typing of soft tissue tumours. WHO. Springer-Verlag, Berlin, 1994
- Weissflog, A.** Wötzel, M.; Gmyrek, G.: Aufbau einer Hautbank auf der Grundlage der Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff. *Z. Med. Labor.-Diagn.* 1984; 25: 169-172
- WeiB, C.** Basiswissen Medizinische Statistik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Auflage 2000
- Welle, A.** Interdisziplinäre Entwicklung neuer Polymeroberflächen für Zellkulturen und Implantate. *Nachrichten – Forschungszentrum Karlsruhe.* 2001; 33: 295-304
- Wenzel, M.M.** Richter, H.A.: Cytocompatibility – Procedures, technologies and application of in-vitro cytotoxicity testing. Consortium CYTOTOX, Aachen, first edition 1998
- West, T.B.** Alster, T.S.: Autologous human collagen and dermal fibroblasts for soft tissue augmentation. *Dermatol. Surg.* 1998; 24: 510-512
- Whang, K.** Goldstick, T.K.; Healy, K.E.: A biodegradable polymer scaffold for delivery of osteotropic factors. *Biomaterials* 2000; 21: 2545-2551
- Wintermantel, E.** Mayer, J.; Blum, J.; Eckert, K.L.; Lüscher, P.; Mathey, M.: Tissue engineering scaffolds using superstructures. *Biomaterials* 1996; 17: 83-91
- Wright, K.A.** Nadire, K.B.; Busto, P.; Tubo, R.; McPherson, J.M.; Wentworth, B.M.: Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury. *Burns* 1998; 24: 7-17
- Wysocki, A.B.** Staiano-Coico, L.; Grinnell, F.: Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 101: 64-68
- Xhu, J.** Clark, A.F.: A three-dimensional collagen lattice induces protein kinase C- ζ activity: role in $\alpha 2$ integrin and collagenase mRNA expression. *J. Cell. Biol.* 1997; 136: 473-483
- Yamanaka, M.** Ishikawa, O.: Hypoxic conditions decrease the m-RNA expression of pro $\alpha 1$ (I) and (III) collagens and increase matrix metalloproteinases-1 of dermal fibroblasts in three-dimensional cultures. *J. Dermatol. Sci.* 2000; 24:99-104
- Yancopoulos, G.D.** Davis, S.; Gale, N.W.; Rudge, J.S.; Wiegand, S.J.; Holash, J.: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-248

- Yannas, I.V.** Burke, J.F.; Huang, C.; Gordon, P.L.: Correlation of in vivo collagen degradation rate with in vitro measurements. *J. Biomed. Mater. Res.* 1975; 9: 623-628
- Yannas, I.V.** Lee; E.; Orgill; D.P.; Skrabut, E.M.; Murphy, G.F.: Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 933-937
- Yannas, I.V.** Applications of ECM analogs in surgery. *J. Cell. Biochem.* 1994; 56: 188-191
- Young, M.E.** Carrood, P.A.; Bell, R.L.: Estimation of diffusion coefficients of proteins. *Biotech. Bioeng.* 1980; 22: 947-955
- Zacchi, V.** Soranzo, C.; Radice, M.; Brun, P.; Abatangelo, G.: In vitro engineering of human skin-like tissue. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 40: 187-194
- Zervolea, I.** Kletsas, D.; Stathakos, D.: Autocrine regulation of proliferation and extracellular matrix homeostasis in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2000; 276: 785-790
- 1** The fibrin network in tissue engineering. Tissel engineering – fibrin matrix technology. Publikation der Baxter AG, 2002
- 2** Extracellular matrix proteases & protein technical guide. Calbiochem®, Januar 2002, Volume 2
- 3** Cytotoxicity Detection Kit (LDH). Roche Diagnostics GmbH, Instruction Manual, August 1999, Version 5,
- 4** Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric). Roche Diagnostics GmbH, Instruction Manual, July 2002, Version 4
- 5** Cell Proliferation Kit I (MTT). Roche Diagnostics GmbH, Instruction Manual, Juli 2002, Version 3
- 6** MicroBC Assay. Uptima, Product Description, September 2000,
- 7** The Sircoll Collagen Assay. Biocolor Ltd., Instruction Manual, 1995, Version 3
- 8** DIN 53380-3, Bestimmung der Gasdurchlässigkeit von Folien. DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- 9** DIN 53122-1, Bestimmung der Wasserdampfpermeabilität von Folien. DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- 10** Pathologie online unter www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.htm vom 01.07.2003
- 11** Die bovine spongioforme Enzephalopathie (BSE) des Rindes und deren Übertragbarkeit auf den Menschen. Bundesgesundheitsbl. 2001; X: 1-11
- 12** Bericht der Arbeitsgruppe Blut: Gesamtstrategie Blutversorgung angesichts vCJK. August 2001
- 13** Gemeinsame Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Instituts und des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte vom 21.09.2001: Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Humanarzneimitteln sowie über die Sicherheit verkehrsfähiger Humanarzneimittel (Vollblut,

zelluläre Blutkomponenten und Gefrorenes Frischplasma sowie Arzneimittel aus humanen Geweben und homöopathische Arzneimittel humanen Ursprungs) – Abwehr von Arzneimittelrisiken, Stufe II

- 14** Bekanntmachung des BfArM vom 25.09.1995
- 15** Beilage zum Europäischen Arzneibuch - Nachtrag 2000, Eilresolution AP-CSP (99) 5
- 16** Vorblatt Entwurf einer Verordnung zum Verbot der Verwendung bestimmter Stoffe zur Vermeidung des Risikos der Übertragung transmissibler spongioformer Enzephalopathien durch Arzneimittel (Arzneimittel-TSE-Verordnung) vom 02.03.2001 veröffentlicht durch das Bundesministerium für Gesundheit
- 17** Europäisches Arzneibuch - Nachtrag 2001. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Monografie 2001/ 36
- 18** Europäisches Arzneibuch - Grundwerk 2002. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Monografie 4.00/2.06.01.00
- 19** Matrix Metalloproteinases - Cytokine Mini-Review. R&D Systems, Katalog 1999

11. Anhang

11.1 Berechnungsformeln

11.1.1 Sauerstoffpermeabilität (OPERM)

Die Sauerstoffpermeabilität humaner azellulärer Dermis wird in Anlehnung an DIN 53380-3 (Literaturquelle 8) mit Hilfe einer Diffusionsmesskammer ermittelt. Dabei entspricht die Sauerstoffpermeabilität dem Volumen Sauerstoff, der bezogen auf die Fläche in einem Zeitintervall von 24 Stunden durch eine Probe diffundiert:

Definition OPERM:
$$OPERM = \frac{Volumen_{O_2}}{Fläche * Zeit(24h)} \quad (37)$$

$$OPERM \text{ Sauerstoffpermeabilität (Oxygen Permeability)} \left[\frac{l_{O_2}}{m^2 * 24h} \right]$$

Die Diffusionsmesskammer wird so lange mit Stickstoff begast, bis sich Stickstoffsättigung einstellt. Anschließend wird die Kammer mit der azellulären Dermis abgedeckt und die zeitliche Zunahme der Sauerstoffkonzentration in der flüssigen Phase mit einem Schreiber aufgezeichnet. Die Akkumulation des Sauerstoffs in der flüssigen Phase folgt aus dem Tangentenanstieg der Schreiberkurve:

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = \frac{\Delta c_l}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{\Delta t} * c_l^* \quad (38)$$

$\frac{dc_{O_2}}{dt}$	Akkumulation des Sauerstoffs in der flüssigen Phase der Kammer [mol O ₂ /(l*h)]
c_l^*	Gleichgewichtskonzentration des Sauerstoffs in der flüssigen Phase [mol O ₂ /l]
c_l	aktuelle Konzentration des Sauerstoffs in der flüssigen Phase [mol O ₂ /l]
$\frac{\Delta E}{\Delta t}$	Tangentenanstieg der Schreiberkurve [Einheiten/Stunde]

Ist die flüssige Phase vollständig mit Sauerstoff gesättigt, liegt in ihr die Gleichgewichtskonzentration vor.

Es gilt dabei:
$$c_l = c_l^* \quad (39)$$

Die Gleichgewichtskonzentration (Sättigungskonzentration) des Sauerstoffs in der wässrigen Phase folgt aus dem Henryschen Gesetz:

$$c_l^* = \frac{p_{O_2}}{H_A} \quad (40)$$

p_{O_2} Sauerstoffpartialdruck in der Luft (Pa)

H_A Henrykoeffizient (J/mol)

Mit $H_A = H * R * T \quad (41) \quad \text{und} \quad p_{O_2} = y_{O_2} * p_0 \quad (42)$

Folgt:
$$c_l^* = \frac{y_{O_2} * p_0}{H * R * T} \quad (43)$$

y_{O_2} Molenbruch des Sauerstoffs in der Luft = 0,2093

p_0 Normalluftdruck = 101,3 E3 Pa = 101,3 E3 N * m⁻²

H Henrykonstante = 34,5

R Allgemeine Gaskonstante = 8,314 J/(mol * K) = 8,314 N * m/ (mol * K)

T Messtemperatur = 37 °C = 310,15 K

Die Gleichgewichtskonzentration beträgt dann bei 37 °C:

$$c_l^* = \frac{0,2093 * 101,3E3}{34,5 * 8,314 * 310,15} \frac{N * m^{-2}}{N * m * mol^{-1} * K^{-1} * K} = 0,238 \frac{mol}{m^3} = 0,238 \frac{mmol}{l}$$

Zur Berechnung der Sauerstoffpermeabilität (OPERM) wird der Ausdruck (37) auf die für die Sauerstoffdiffusion zur Verfügung stehende Materialfläche A bezogen. Diese entspricht der Fläche der Kammeröffnung. Zum Vergleich mit Literaturwerten wird die Sauerstoffpermeabilität auf ein Zeitintervall von 24 Stunden bezogen sowie das Volumen des in dieser Zeit durch das Material diffundierten Sauerstoffs angegeben. Durch Multiplikation mit dem Kammervolumen wird die Abhängigkeit der Messergebnisse vom Messvolumen eliminiert.

Für das Molvolumen eines Gases gilt: $1\text{mol} = 22,414\text{l}$ (44)

Mit $A = \frac{\pi}{4} * d_K^2$ (45) folgt daraus:

$$OPERM = 24 * 22,414 * V_K * \frac{\Delta E * c_l^*}{\Delta t * A} \quad (46)$$

A zur Diffusion zur Verfügung stehende Materialfläche [m²]

d Durchmesser der Kammeröffnung [m]

V_K Kammervolumen [l]

11.1.2 Wasserdampfdurchlässigkeit (MVP)

Bei Bestimmung der Wasserdampfdurchlässigkeit azellulärer Dermis mit der gravimetrischen Methode gemäß DIN 53122-1 (Literaturquelle 9) wird die durch das Material diffundierte Wasserdampfmenge an ein Trocknungsmittel gebunden. Die pro Zeitintervall diffundierte Menge kann dann anhand der Gewichtszunahme des Trocknungsmittels bestimmt werden. Zum Vergleich mit Literaturwerten wird die Wasserdampfpermeabilität auf ein Zeitintervall von 24 Stunden normiert.

$$MVP = 24 * \frac{\Delta m}{A * t} \quad (47)$$

MVP Wasserdampfdurchlässigkeit (Moisture Vapour Permeability) $\left[\frac{\text{g}}{\text{m}^2 * 24\text{h}} \right]$

Δm Durch das Material diffundierte Wasserdampfmenge, entspricht der Gewichtszunahme des Trocknungsmittels nach Eintritt von Wasserdampf [g]

A Probenfläche, die für Diffusion von Wasserdampf zur Verfügung stand [m²]

t Messdauer [h]

11.1.3 Generationszeit

Die Generationszeit wird in Wachstumskinetiken ermittelt, ein Kulturgefäß kann dabei als Batchansatz betrachtet werden. Bilanz für die Zellzahl im Batchansatz:

$$\frac{dX}{dt} = \mu * X \quad (48)$$

Nach Trennung der Variablen und Integration mit den Anfangsbedingungen $X = X_0$ und

$$t = t_0 \text{ folgt: } \ln \frac{X}{X_0} = \mu * (t - t_0) \quad (49)$$

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t - t_0} \quad (50)$$

μ spezifische Wachstumsrate [1/h]

X Gesamtzellzahl zum Ende des Batch [Zellen/ml]

X_0 Gesamtzellzahl zu Beginn des Batch [Zellen/ml]

$(t - t_0)$ Dauer des Batch [h]

Für die Generationszeit gilt: $g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (51)$

g Generationszeit [1/h]

Nach Einsetzen von (51) in (50) folgt für die Generationszeit:

$$g = \frac{\ln 2 * (t - t_0)}{\ln X - \ln X_0} \quad (52)$$

11.2 Abkürzungen

AATB	(<u>A</u> merican <u>A</u> ssociation of <u>T</u> issue <u>B</u> anks), Amerikanische Vereinigung der Gewebebanken
Abb.	Abbildung
ABC	<u>A</u> vidin- <u>B</u> iotin-Enzym- <u>C</u> omplex
ADM	Azelluläre Dermis
akt.	aktiv
AMG	<u>A</u> rzneimittelgesetz
BCA	(<u>b</u> icinchonin <u>a</u> cid), Bicinchoninsäure
BfArM	<u>B</u> undesinstitut für <u>A</u> rzneimittel und <u>M</u> edizinprodukte
BR	Bioreaktor
BrDU	5- <u>b</u> romo-2'- <u>d</u> esoxyuridine
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	(<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation)
CMV	<u>C</u> ytomegalie <u>v</u> irus
d.h.	das heißt
DIN	<u>D</u> eutsches <u>I</u> nstitut für <u>N</u> ormung
DIZG	<u>D</u> eutsches <u>I</u> nstitut für <u>Z</u> ell- und <u>G</u> ewebeersatz
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odifiziertes <u>E</u> agles <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNS	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
EAMST	<u>E</u> uropean <u>A</u> ssociation of <u>M</u> usculoskeletal <u>T</u> ransplantation (Europäische Vereinigung für Muskuloskeletale Transplantation)
EATB	(<u>E</u> uropean <u>A</u> ssociation of <u>T</u> issue <u>B</u> anks), Europäische Vereinigung der Gewebebanken
EBV	<u>E</u> ppstein- <u>B</u> arr- <u>V</u> irus
ECM	(<u>e</u> xtracellular <u>m</u> atrix), extrazelluläre Matrix
EDTA	<u>e</u> thylenediaminetetraacetic <u>a</u> cid
EGF	(<u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor), Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	enzyme-linked immunoabsorbent assay
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
ERK	(<u>e</u> xtracellular signal <u>r</u> egulated- <u>k</u> inase), extrazellulär signal-regulierte Kinase
EU	<u>E</u> uropäische <u>U</u> nion
FB	Fibroblast
FG	<u>F</u> euchtgewicht
(b) FGF	((<u>b</u> asic) <u>f</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor), (basischer) Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FKS	<u>F</u> etales <u>K</u> älberserum
GAG	<u>G</u> lykosaminoglykan
Ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	(<u>g</u> ranulocyte- <u>m</u> acrophage <u>c</u> olony- <u>s</u> timulating <u>f</u> actor), Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GMP	<u>G</u> ood <u>M</u> anufacturing <u>P</u> ractice
HAV	<u>H</u> epatitis- <u>A</u> - <u>V</u> irus

HBc	(Hepatitis B core), Hepatitis B Kern
HBsAg	(Hepatitis B surface antigen), Hepatitis B Oberflächenantigen
HBSS	<u>H</u> anks´ <u>B</u> alanced <u>S</u> alts <u>S</u> olution
HBV	<u>H</u> epatitis- <u>B</u> - <u>V</u> irus
HCV	<u>H</u> epatitis- <u>C</u> - <u>V</u> irus
HE	<u>H</u> ematoxylin- <u>E</u> osin
HGF	(<u>h</u> epatocyte <u>g</u> rowth <u>f</u> actor), Hepatozytenwachstumsfaktor
HIV	<u>H</u> umanes <u>I</u> mmundefizienz <u>V</u> irus
HMDS	<u>H</u> examethyl <u>d</u> isil <u>i</u> zan
Hyp.	Hypoxie
Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IL	<u>I</u> nterleukin
inakt.	inaktiv
intraz.	intrazellulär
i.S.v.	in <u>S</u> icht <u>v</u> on
J.	Jahre
JNK	c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminale <u>K</u> inase
KGF	(<u>k</u> eratinocyte <u>g</u> rowth <u>f</u> actor), Keratinozyten-Wachstumsfaktor
Konz.	Konzentration
LDH	<u>L</u> aktat <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase
LN₂	Flüssiger Stickstoff
m	männlich
MAP	(mitogen-activated protein), <u>M</u> itogen- <u>a</u> ktivierte <u>s</u> <u>P</u> rotein
MMP	(<u>m</u> atrix <u>m</u> etallo <u>p</u> roteinase), Matrixmetalloproteinase
MPG	<u>M</u> edizin <u>p</u> rodukt <u>e</u> gesetz
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
MVP	(<u>m</u> oisture <u>y</u> apour <u>p</u> ermeability), Wasserdampfdurchlässigkeit
NAT	<u>N</u> ukleinsäue <u>a</u> mplifikation <u>s</u> techniken
NKS	<u>N</u> eonatales <u>K</u> älbers <u>e</u> rum
Norm.	Normoxie
Nr.	Nummer
nvCJD	(<u>n</u> ew <u>v</u> ariant of <u>C</u> reutzfeldt- <u>J</u> acob- <u>D</u> isease), neue Variante der Creutzfeldt-Jacob-Krankheit
OPERM	(<u>o</u> xygen <u>p</u> ermeability), Sauerstoffdurchlässigkeit
p.a.	per analysi
PAS	(<u>p</u> eriodacic- <u>S</u> chiff <u>r</u> eaction), Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	(phosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline), Phosphatpuffer
PCK	Proteinkinase
PCR	(<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction), Polymerasekettenreaktion
PDGF	(<u>p</u> latelet <u>d</u> erived <u>g</u> rowth <u>f</u> actor), Plättchen-Wachstumsfaktor
PGA	Polyglykolat
PHA	Phythämagglutinin
Ph.Eu.	Europäische Pharmacopeia
PLA	Poly-L-Laktid
POD	Peroxidase
PTH-rP	(<u>p</u> arathyroid <u>h</u> ormone <u>r</u> elated <u>p</u> eptid), Parathyroidhormon verwandtes Peptid

REM	<u>R</u> asterelektronen <u>m</u> ikroskopie
SDS	(<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate), Natriumdodecylsulfat
stat.	statisch
Tab.	Tabelle
TGF	(<u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor), Transformierender Wachstumsfaktor
TIMP	<u>T</u> issue <u>I</u> nhibitor of <u>M</u> etallo- <u>P</u> roteinases
TM	(<u>T</u> rade <u>M</u> ark), Handelsmarke
TPG	<u>T</u> ranspl <u>an</u> tationsgesetz
TSE	<u>T</u> ransmissible <u>s</u> pongiforme <u>E</u> nzelo <u>p</u> athie
t-Test	Student's-t-Test
v.a.	vor allem
VEGF	(<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor), vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor
Vgl.	vergleiche
w	weiblich
WHO	(<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation), Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
ZKÜ	Zellkulturüberstand
3D	dreidimensional

Lebenslauf

Carina Syring, geboren am 04.06.1970 in Magdeburg

1977-1987	Polytechnische Oberschule Berlin
1987-1989	Gymnasium "Alexander-von-Humboldt" Berlin, Abschluß Abitur
09/1989-08/1990	Betriebspraktikum, Berliner Weingroßkellerei GmbH
1990 - 1991	Studium an der TH Köthen, Fachrichtung Biotechnologie
1991 – 1992	Studium an der Humboldt-Universität Berlin, Fachrichtung Biotechnologie Vordiplom Lebensmitteltechnologie: 21.8.1992, Nebenhörer in der Fachrichtung Biotechnologie der TU Berlin
1992-1997	Studium an der Technischen Universität Berlin, Fachrichtung Biotechnologie Vordiplom Biotechnologie 26.4.1993; Studienarbeit am Institut für Medizinische Immunologie der Charité zum Thema: "Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Antikörper- produktion im miniaturisierten Hohlfaserbioreaktor mit pH-Mikro- elektroden"; Diplomarbeit am Institut für Klinische Immunologie und Transfusions- medizin der Universität Leipzig zum Thema: "Entwicklung und Optimierung eines <i>in vitro</i> Modells für ein kapilläres Blutgefäß"; Hauptdiplom Biotechnologie 3.4.1997, Abschluß Diplom-Ingenieur
1994/1995	wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Berlin/AG Biotechnologie
02-07/1995	Fachpraktikum, ProBioGen GmbH, Berlin
1996-06/1997	wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Leipzig/ AG Medizinische Biotechnologie
07-12/1997	wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Experimentelle Chirurgie der Charité Berlin/ AG Leberunterstützungssysteme
seit 1998	Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz, Berlin ab 1999 Leitung der Abteilung Biotechnologie, 1999 Aufnahme der Arbeiten zur Promotion