

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

Funktioneller Gewebeersatz bei komplexen
Hautweichteildefekten mit einer hämodynamisch stimulierten
und *in vivo* axial vaskularisierten Bindegewebslappenplastik

von Johanna Outi Wietbrock
aus Friedrichshafen

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Angefertigt an der Klinik für Hand-, Plastische und Rekonstruktive Chirurgie
- Schwerbrandverletzententrum - der BG-Unfallklinik Ludwigshafen, Klinik für
Plastische Chirurgie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Mentor: Prof. Dr. Ulrich Kneser

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent / en: Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle
Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg
Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis	V
III.	Tabellenverzeichnis.....	VII
IV.	Abkürzungsverzeichnis	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung: Rekonstruktion von komplexen Hautweichteildefekten.....	1
1.2	Wundheilung.....	1
1.2.1	Wundpathophysiologie bei komplexen Hautweichteildefekten	1
1.2.2	Heilung von Defektwunden bei Ratte und Mensch	3
1.3	Therapiestrategien für allschichtige Hautweichteildefekte in der Rekonstruktiven Chirurgie	4
1.3.1	Geschichte der Mikrochirurgie	4
1.3.2	Lappenplastiken.....	5
1.4	<i>Tissue Engineering</i>	6
1.4.1	<i>Tissue Engineering</i> und Gefäßbildung.....	7
1.4.2	Strategien der <i>in vitro</i> Prävascularisation	9
1.4.3	Strategien der <i>in vivo</i> Vaskularisation.....	12
1.5	Das AV-Loop-Modell der Ratte	14
1.5.1	AV-Loop-assoziierte Angiogenese.....	15
1.5.2	Arten der Trägermatrix im AV-Loop-Modell	17
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Tiere und Haltung	19
2.2	Kammer und Matrizen	19
2.2.1	Isolationskammer.....	19

2.2.2	Matrizen	20
2.3	Operative Eingriffe	21
2.3.1	Anästhesie und perioperatives Management.....	22
2.3.2	AV-Loop-Operation.....	22
2.3.3	Reperfusion mit Indian-Ink und Explantation	25
2.3.4	Defektsetzung.....	27
2.3.5	Splint-Modell	27
2.3.6	Verband	28
2.3.7	Hebung und Transplantation der generierten Bindegewebslappenplastik	29
2.4	Elastizitätsbestimmung der Matrizen	32
2.5	Vorbereitung Reagenzien / Lösungen	35
2.5.1	Reagenzien für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung	35
2.5.2	Reagenzien für die Masson-Trichrom-Färbung	36
2.5.3	50% Indian-Ink in 5% Gelatine und 4% Mannitol	37
2.5.4	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 1-fach	37
2.5.5	4% Paraformaldehyd (PFA).....	37
2.5.6	19% EDTA (10% 4Na EDTA / 9% 2Na EDTA), pH 7,4.....	37
2.6	Histologische und immunhistochemische Methoden	38
2.6.1	Herstellung und Schneiden der Paraffinblöcke	38
2.6.2	Vorbereitung der Paraffinschnitte	40
2.6.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	41
2.6.4	Masson-Trichrom-van-Gieson-Färbung.....	42
2.6.5	Elastika-van-Gieson-Färbung	43
2.6.6	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen(PCNA)-Färbung.....	43
2.7	Datenverarbeitung	44
2.7.1	Auswertung der Fotodokumentation	44
2.7.2	Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop.....	45
2.7.3	Histomorphometrische Analyse der histologischen Schnitte	45
2.7.4	Statistische Auswertung	47

3	Verwendetes Material	49
4	Ergebnisse	55
4.1	Versuchsgruppen.....	55
4.1.1	Teilprojekt 1: Charakterisierung der Kollagenmatrizen im AV-Loop-Modell nach zwei verschiedenen Implantationsintervallen	55
4.1.2	Teilprojekt 2: Prüfung der Eignung der vaskularisierten Bindegewebslappenplastik zur Deckung lappenpflichtiger Defekte	57
4.2	Verwendung einer Kollagenmatrix zur <i>in vivo</i> Generierung einer vaskularisierten Bindegewebslappenplastik	59
4.2.1	Eignung von MatriDerm® als Trägermatrix im AV-Loop-Modell	60
4.2.2	Eignung von Integra™ DRT als Trägermatrix im AV-Loop-Modell.....	62
4.3	Vaskularisation der Matrix in Abhängigkeit des Implantationsintervalles	65
4.3.1	Angiogenesekinetik von MatriDerm®	65
4.3.2	Angiogenesekinetik von Integra™ DRT	67
4.3.3	Angiogenesekinetik der Matrizen im Vergleich	69
4.4	Elastizitätsmodul der Kollagenmatrizen	71
4.5	Zellmigration und -proliferation der Matrix in Abhängigkeit des Implantationsintervalles	72
4.5.1	Zellmigration und -proliferation in MatriDerm®	72
4.5.2	Zellmigration und -proliferation in Integra™ DRT.....	73
4.5.3	Korrelation der Gefäß- und Zelldichte.....	75
4.6	Generierung eines allschichtigen Hautweichteildefektes mit exponiertem Knochen.....	75
4.6.1	Defektheilung bei konservativer Behandlung.....	75
4.7	Rekonstruktion eines allschichtigen Hautweichteildefektes mit exponiertem Knochen.....	80
4.7.1	Rekonstruktion des Defektes mit MatriDerm® ohne Prävaskularisation....	80
4.7.2	Rekonstruktion des Defektes mit einer AV-Loop-basierten und <i>in vivo</i> vaskularisierten Bindegewebslappenplastik	83
5	Diskussion	89

5.1	Eigenschaft der verwendeten Kollagenmatrizen.....	89
5.2	MatriDerm® und Integra™ DRT im Vergleich.....	90
5.3	Elastizität und Angiogenesekinetik azellulärer Kollagenmatrizen	92
5.4	Die Isolationskammer als <i>in vivo</i> Bioreaktor	95
5.5	Züchtungsintervall zur <i>in vivo</i> Generierung einer axial intrinsisch vaskularisierten Bindegewebslappenplastik	97
5.6	Etablierung eines allschichtigen Hautweichteildefektes mit exponiertem Knochen.....	99
5.7	AV-Loop-basierte und <i>in vivo</i> gezüchtete Bindegewebslappenplastik zur Rekonstruktion von Hautweichteildefekten	101
6	Zusammenfassung.....	106
7	Summary	108
8	Literaturverzeichnis.....	110
9	Publikationen	129
10	Danksagung	130

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Isolationskammer und Positionierung der Kollagenmatrix	21
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der AV-Loop-Operation	24
Abbildung 2.3: Defekt mit Splint-Modell und Klettverband	29
Abbildung 2.4: Hebung und Anschluss des gezüchteten Bindegewebslappens	31
Abbildung 2.5: Spannungs-Dehnungs-Diagramm nach einachsigem Zugversuch ...	33
Abbildung 2.6: Schnittebenen der Präparate	39
Abbildung 2.7: Bestimmung der Zellmigration und -proliferation	47
Abbildung 4.1: Schema Behandlungsvarianten des Weichteildefektes	58
Abbildung 4.2: Zeitlicher Ablauf von Teilprojekt 2	59
Abbildung 4.3: MatriDerm®-Konstrukt nach vier Wochen	61
Abbildung 4.4: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der AV-Loop-Konstrukte	63
Abbildung 4.5: Ausschnitte Hämatoxylin-Eosin- und Masson-Trichrom-Färbung	64
Abbildung 4.6: Ausschnitte Elastika-van-Gieson-Färbung	65
Abbildung 4.7: Gefäßbildung in AV-Loop-Konstrukten	68
Abbildung 4.8: Verteilung der gebildeten Gefäße	69
Abbildung 4.9: Gefäßverteilung ausgehend von der AV-Loop-Achse	70
Abbildung 4.10: Spannungs-Dehnungs-Diagramm von MatriDerm® und Integra™ DRT	72
Abbildung 4.11: Zellmigration und -proliferation in AV-Loop-Konstrukten	74
Abbildung 4.12: Korrelation der Gefäß- und Zelldichte	75
Abbildung 4.13: Defektheilung bei konservativer Behandlung	77
Abbildung 4.14: Spontane Reduktion der Defektgröße	78
Abbildung 4.15 Spontane Defektheilung nach 7 Tagen	79
Abbildung 4.16: Spontane Defektheilung nach 14 Tagen	80
Abbildung 4.17: Defektheilung mit azellulärer, avaskulärer Wundauflage und Spalthaut	81
Abbildung 4.18: Defektdeckung mit MatriDerm® ohne Prävaskularisation	83
Abbildung 4.19: Defektheilung mit Bindegewebslappenplastik und Spalthaut	85

Abbildung 4.20: Defektdeckung mit prävaskularisiertem Gewebeersatz ohne Gefäßanschluss	87
Abbildung 4.21: Defektdeckung mit prävaskularisiertem Gewebeersatz mit Gefäßanschluss	88

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Protokoll Gewebeinfiltration mit Leica TP1020	40
Tabelle 2.2 Protokoll Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten	40
Tabelle 2.3 Protokoll Dehydrierung von histologischen Schnitten	41
Tabelle 2.4 Protokoll Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung	41
Tabelle 2.5 Protokoll Masson-Trichrom-van-Gieson-Färbung	42
Tabelle 2.6 Protokoll Elastika-van-Gieson-Färbung	43
Tabelle 4.1 Versuchsgruppen Teilprojekt 1	56
Tabelle 4.2 Versuchsgruppen Teilprojekt 2	57

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Definition
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A.	<i>Arteria</i>
AG	Aktiengesellschaft
ANG-1	Angiopoetin-1
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
AV	arterio-venös
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bzw.	beziehungsweise
CA	Kanada
ca.	ungefähr
CH	Schweiz
Co.	Compagnie
CrI	Charles River Laboratories
D	Deutschland
d	Tag
DMOG	<i>dimethyloxallyl glycin</i>
DNK	Dänemark
EC	Endothelzelle
E-Modul	Elastizitätsmodul
engl.	englisch
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin

HF	Hochfrequenz
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
i.v.	intravenös
IE	Internationale Einheiten
JPN	Japan
JW	Johanna Wietbrock
KA	Kalifornien
kg	Kilogramm
KG	Kommanditgesellschaft
konst	konstant
kPa	Kilopascal
l	Liter
MEMS	Mikro-Elektromechanische Systeme (engl. <i>microelectromechanical systems</i>)
mg	Milligramm
Mikro-CT	Mikro-Computertomographie
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloprotease
MT	Masson-Trichrom
n	Anzahl
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NJ	New Jersey
PAI-1	<i>plasminogen activator-1</i>
PBCB	<i>processed bovine cancellous bone</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating-cell-nuclear-antigen</i>
PDGF-B	<i>platelet derived growth factor-B</i>
PDMS	Polydimethylsiloxan

PFA	Paraformaldehyd
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
ROI	Region von Interesse (engl. <i>region of interest</i>)
SD	Sprague Dawley
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. <i>standard error of mean</i>)
sog.	sogenannt
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
urspr.	ursprünglich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V.	<i>Vena</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Problemstellung: Rekonstruktion von komplexen Hautweichteildefekten

Ein schweres Trauma, Infektionen, ausgedehnte Tumorexzisionen, Minderdurchblutung sowie thermische oder chemische Verletzungen können zu mehrschichtigen Hautweichteildefekten führen¹. Die Haut schützt den Organismus einerseits als mechanische und chemische Barriere, andererseits besitzt sie als immunkompetentes Abwehrorgan und Thermoregulator weitere lebenserhaltende Funktionen. Ein großflächiger Substanzverlust kann dabei zu einer Exposition tiefer liegender Strukturen wie Knochen, Sehnen, Gelenkknorpel oder auch Nerven, größeren Blutgefäßen oder Dura führen². Das freiliegende Gewebe der Wunde bietet einen idealen Nährboden für Mikroorganismen. Bei chronischen Wunden ist die Infektanfälligkeit zusätzlich durch die reduzierte Immunabwehr erhöht³. Diese Art von Defekten erfordert somit zum Erhalt der Funktion und zum Schutz vor Infektionen eine Deckung mit durchblutetem Gewebe⁴. Unter Zuhilfenahme mikrochirurgischer Technik können heutzutage Rekonstruktionen von Hautweichteildefekten vorgenommen, essentielle Körperfunktionen wiederhergestellt, und somit u.a. ganze Extremitäten erhalten werden^{5,6}. Im Rahmen des *Tissue Engineering* wird bereits seit vielen Jahren versucht, mit einer bedarfsgerechten Gewebegenerierung außerhalb des Körpers den oben genannten Erfordernissen gerecht zu werden^{7,8}. Es zeigte sich jedoch, dass insbesondere die Generierung eines Gefäßsystems innerhalb des Gewebekonstruktes den limitierenden Faktor beim Transfer von größeren Gewebevolumina darstellt⁹. Ein Gefäßsystem versorgt die darin enthaltenen Zellen zum einen mit Sauerstoff und Nährstoffen und bietet gleichzeitig eine kaliberstarke, vaskuläre Anschlussmöglichkeit. Die Umsetzung dieser Bedingungen ist unter *in vitro* Bedingungen nicht möglich⁸.

1.2 Wundheilung

1.2.1 Wundpathophysiologie bei komplexen Hautweichteildefekten

Man unterscheidet zwischen einer einfachen Wunde, bei der nur eine Gewebeschicht durchtrennt ist, und komplexen Wunden mit Beteiligung von tiefer liegenden Gewebestrukturen. Wenn eine direkte Adaption der frischen Wundränder

möglich ist, heilt diese bei einem gesunden Säugetierorganismus innerhalb weniger Tage mit nur geringer, oder gänzlich fehlender, Narbenbildung ab (*resitutio ad integrum*). Dies wird als primäre Wundheilung bezeichnet. Ist eine spannungsfreie Adaption der Wundränder nicht möglich, oder die Heilung durch Serom- und Hämatombildung oder eine Infektion beeinträchtigt, heilt die Wunde sekundär unter Bildung von Granulationsgewebe verzögert ab, oder geht in eine chronische Wunde über¹⁰.

Die sekundäre Wundheilung wird in drei Phasen eingeteilt. In den ersten Tagen findet die Entzündungsphase statt. Die vorherrschenden Zelltypen sind dabei neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Neutrophile Granulozyten sezernieren Enzyme zur Proteolyse und phagozytieren lysierte Bakterien sowie Zelldetritus. Gleichzeitig setzen sie Zytokine zur Aktivierung von Makrophagen, Fibroblasten und Keratinozyten frei¹¹. Während der Anteil neutrophiler Granulozyten nach der initialen Heilungsphase abnimmt, bleiben Makrophagen bis zur vollständigen Abheilung präsent und sind an der Steuerung der Gefäßneubildung und Matrixsynthese beteiligt¹². Hierfür sezernieren sie zum einen Matrixmetalloproteasen (MMPs) und Kollagenasen sowie außerdem Wachstumsfaktoren und Zytokine. Dadurch werden Endothelzellen für die Bildung von Kapillaren rekrutiert und Fibroblasten zur Matrixsynthese angeregt^{13,14}. Die Wundheilung geht im Anschluss in die proliferative Phase über. Frisches Granulationsgewebe - bestehend aus neu gebildeten Kapillaren und extrazellulärer Matrix - wird in der Wunde gebildet. Der Hauptanteil der Zellen besteht aus proliferierenden Fibroblasten, Endothelzellen sowie Epithelzellen. Die gebildete provisorische Matrix besteht hauptsächlich aus parallel angeordneten Kollagenfasern vom Typ III, Fibrin, Fibronectin und Proteoglykanen¹⁵. Ausgehend von den Wundrändern findet eine Epithelisation durch einwandernde Keratinozyten statt¹⁵. Die Migration und anschließende Proliferation der Keratinozyten wird durch MMPs sowie durch Wachstumsfaktoren und Integrin-Rezeptoren reguliert¹⁶. MMPs dienen zur Spaltung von Bestandteilen der Basalmembran - u.a. Kollagen Typ IV und Laminin - um die Keratinozytenmigration zu ermöglichen¹⁶. Während der Migrationsphase binden Keratinozyten über Integrin-Rezeptoren an die fibronectinreiche, extrazelluläre Matrix der Wunde¹⁶.

Die Wundkontraktion beginnt bereits im frühen Stadium der Wundheilung durch Differenzierung von eingewanderten Fibroblasten in Myofibroblasten¹⁷. Sie ist zwei Wochen nach Defektsetzung am höchsten ausgeprägt¹⁷. Das Ausmaß der Wundkontraktion ist abhängig von der Tiefe des Defektes¹⁶. Die Kontraktion kann eine Verkleinerung der Defektgröße um bis zu 40% bewirken¹⁶. Die letzte Phase wird als Remodellierung bezeichnet und ist durch eine permanente Umstrukturierung des gebildeten Wundgewebes geprägt. Das zuvor dominierende Kollagen Typ III wird hierbei durch Kollagen Typ I ersetzt, das durch seine Anordnung und Quervernetzung eine höhere Stabilität aufweist¹⁶.

1.2.2 Heilung von Defektwunden bei Ratte und Mensch

Allschichtige Hautweichteildefekte heilen bei der Ratte sekundär analog zum Menschen in den bereits erwähnten aufeinanderfolgenden Phasen. Die Wundpathophysiologie wird in tierexperimentellen Studien häufig an Ratten untersucht. Die Ratte ist das sinnesphysiologisch am niedrigsten entwickelte Tier, das über eine ausreichende Körperoberfläche zur Erzeugung von komplexen Weichteildefekten verfügt. Die meist beschriebene Lokalisation der Defektsetzung ist der Rückenbereich der Ratte¹⁸.

Bei Übertragung des Wundheilungsprozesses auf den Menschen müssen, bei Verwendung der Ratte als tierexperimentelles Wundmodell, die anatomischen Unterschiede der beiden Spezies beachtet werden¹⁹. Während beim Menschen der Wundverschluss vorwiegend durch Reepithelialisierung und Bildung von Granulationsgewebe erfolgt, trägt bei der Ratte die Wundkontraktion hauptsächlich dazu bei²⁰. Dies ist auf die vom Menschen abweichende Hautmorphologie der Ratte zurückzuführen²¹. Die Haut der Ratte ist im Gegensatz zum Menschen nicht fest mit der Subkutis verbunden. Diese morphologische Begebenheit ermöglicht eine höhere Wundkontraktion im Rahmen des Hautverschlusses während der Defektheilung¹⁸. Der *Musculus panniculus carnosus* ist eine weitere anatomische Besonderheit. Es handelt sich um einen Muskel, der unter der Haut lokalisiert ist und eine erhöhte Wundkontraktion bewirkt sowie die Bildung von Granulationsgewebe während der Wundheilung unterstützt¹⁹. Für die Simulation von Wundheilungsbedingungen des Menschen und anderen Tierspezies wurde für Nagetiere das Splint-Modell entwickelt. Hierbei wird durch das Aufnähen eines Silikonringes um den Wundrand der erhöhten

Kontraktion mechanisch entgegengewirkt, was in mehreren Studien bestätigt wurde^{22,23}.

1.3 Therapiestrategien für allschichtige Hautweichteildefekte in der Rekonstruktiven Chirurgie

1.3.1 Geschichte der Mikrochirurgie

Bei Verletzungen mit Gefäßbeteiligung war bis ins späte 19. Jahrhundert die chirurgische Behandlung auf das Ligieren der Gefäße beschränkt. Erst mit der Entwicklung der Gefäßchirurgie waren die Behandlung von Gefäßverletzungen und der Erhalt von durchblutetem Gewebe möglich. Eck *et al.* führten in einem Tierexperiment 1877 eine Seit-zu-Seit-Anastomose zwischen der Pfortader und der *V. cava inferior* durch²⁴. 1896 beschrieb John Murphy eine arterielle End-zu-End-Naht bei einem Patienten mit einer Schussverletzung im Bereich der Leiste²⁵. Die ersten Transplantationen von autologen Venen erfolgte Anfang des 20. Jahrhunderts durch Goyanes²⁶ und durch Lexer²⁷. Alexis Carrel lieferte experimentelle und klinische Vorarbeiten in Anastomosetechniken und dem Gefäßersatz. An Hunden gelang ihm erstmals eine erfolgreiche Verpflanzung eines autologen Venensegments in die Aorta, mit dem Ziel, Behandlungsmethoden für das intrathorakale Aneurysma zu etablieren²⁸. Für seine Arbeiten erhielt er 1912 den Nobelpreis für Medizin. 1913 folgte die Beschreibung verschiedener Methoden zur Legung eines Venenbypasses durch Jeger²⁹. Mit der Entdeckung des Heparins 1916³⁰, das einige Jahre später als antikoagulative Therapiemöglichkeit bekannt wurde, gewann die Mikrochirurgie in der Rekonstruktiven Chirurgie an Bedeutung. Durch die Entwicklung von Optiken mit Vergrößerungsmöglichkeit erhielt die Gefäßchirurgie einen weiteren erheblichen Aufschwung. Bereits 1921 wurden Operationsmikroskope von Carl Nylen eingeführt und erfolgreich in der Hals-Nasen-Ohren Chirurgie angewendet³¹. Jacobson und Suarez führten in experimentellen Arbeiten die Anastomosen an Gefäßen mit einem kleineren Durchmesser als 3 mm mit Hilfe eines doppelten binokularen Operationsmikroskops und feinem Mikroinstrumentarium durch³².

Die erste Organtransplantation beim Menschen gelang John P. Merrill und Joseph Murray durch die erfolgreiche Transplantation einer Niere³³. Chase und Schwarz berichteten von der erfolgreichen Anastomisierung der brachialen Gefäße bei Hunden, die einen Durchmesser von 1,2-1,7 mm aufwiesen³⁴. Die Transplantation

eines Bauchlappens an Hunden, basierend auf den oberflächlichen, epigastralen Gefäßen beschrieben Krizek *et al.* im Jahr 1965³⁵. Die erste freie Lappenplastik am Menschen war die Fibula-Lappenplastik im Jahr 1975³⁶. Ein weiterer Fortschritt gelang durch die Etablierung der Supramikrochirurgie, die die Naht von Gefäßen mit einem kleineren Durchmesser als 0,5 mm bezeichnet und erstmals in den 1980ern von Koshima *et al.* in Japan beschrieben wurde³⁷. Die Supramikrochirurgie ermöglicht in der Lymphorekonstruktiven Chirurgie den Anschluss von kleinen Lymphgefäßen an Venolen.

1.3.2 Lappenplastiken

Die Möglichkeit des freien Gewebetransfers stellt einen der Meilensteine in der Rekonstruktiven Medizin dar. Bereits früh kamen lokale „*random-pattern-flaps*“ zum Einsatz. Beispiel hierfür ist die Cross-Finger-Lappenplastik, die 1951 erstmals beschrieben wurde³⁸. Für die Vitalität dieser Lappenplastiken ist das Verhältnis Länge zu Breite ausschlaggebend^{39,40}. Dadurch ist die rekonstruktive Flexibilität stark eingeschränkt. Erweitert wird das Spektrum durch gestielte Lappenplastiken, die mehr Flexibilität bei der Defektdeckung ermöglichen, da diese unter Erhalt der bestehenden Versorgung mit Blutgefäßen gehoben werden. An den oberen Extremitäten wird beispielsweise die gestielte Radialis-Lappenplastik verwendet⁴¹. Die 1976 von Olivari erneut beschriebene Latissimus-dorsi-Lappenplastik⁴² kann sowohl gestielt als auch als freie Lappenplastik eingesetzt werden.

In den 1980ern ereignete sich die Entwicklung von Perforatorlappenplastiken, die entweder gestielt oder frei transferiert werden. Als Perforatoren werden Gefäße bezeichnet, die für eine suffiziente Blutversorgung der Lappenplastik sorgen. Die Gefäße ziehen dafür durch den Muskel oder durch die Septen von Muskelgruppen zur Lappenplastik. 1989 beschrieben Koshima und Soeda die erfolgreiche Defektdeckung mittels DIEP-Lappenplastik („*deep inferior epigastric artery perforator*“), die von Perforatorästen der tiefen Bauchgefäße versorgt wird⁴³. Häufig verwendet werden weiterhin die S-GAP-Lappenplastik („*superior gluteal artery perforator flap*“) aus der Gesäßregion⁴⁴ sowie die ALT-Lappenplastik („*pedicled anterolateral thigh flap*“) vom Oberschenkel⁴⁵. Durch die Entwicklung der perforatorbasierten Lappenplastiken konnte die Entnahmemorbidity in der Spenderregion reduziert werden⁴⁶. Sie bleibt jedoch dennoch ein Problem von autologen Lappenplastiken⁴⁶.

In der Veterinärmedizin wurde erstmals 1986 über einen freien, mikrochirurgischen Gewebetransfer in Hunden berichtet^{47,48}. Es folgte die Beschreibung verschiedener Lappenplastiken, die sich für den freien Transfer eignen. Beispiel noch heute angewandter Lappenplastiken sind der „*free trapezius musculocutaneous flap*“ in Hunden⁴⁹, der „*free latissimus dorsi muscle flap*“ in Katzen⁵⁰, der „*free medial saphenous fasciocutaneous and myocutaneous flap*“⁵¹ sowie der „*free rectus abdominis muscle flap*“ in Hunden^{52,53}.

Die Rekonstruktion von komplexen Defekten mittels freiem Gewebetransfer erfolgt seither auf hohem Niveau¹. Der Einsatz mikrochirurgischer Technik hat somit auch in der Veterinärmedizin Einzug erhalten⁵⁴. Die Behandlung allschichtiger Defekte durch gängige Methoden der Hautlappenplastiken ist dennoch limitiert⁵⁵. Die Problematik der begrenzten Verfügbarkeit an autogenem Gewebe für eine Defektdeckung spielt dabei, ebenso wie die Komplikationen durch Entnahmemorbiditäten, eine vergleichbare Rolle zur Humanmedizin.

1.4 Tissue Engineering

Der Begriff des *Tissue Engineering* wurde 1987 erstmals durch die National Science Foundation (USA) eingeführt⁵⁶. Es deckt ein großes, interdisziplinäres Feld ab, das sich aus einer Kombination von biotechnologischen Entwicklungsverfahren und Biowissenschaften zusammensetzt⁵⁷. Das Prinzip basiert auf der Herstellung von bioartifiziellen und funktionellen Geweben *ex* oder *in vivo*, die zur Wiederherstellung geschädigten Gewebes dienen, oder auch zum Ersatz von Geweben eingesetzt werden⁵⁷. Kenntnisse aus der Embryogenese, der Physiologie der Gewebeneubildung und -regeneration werden dabei auf einen neuen, translationalen Ansatz der Gewebefabrikation übertragen⁵⁷. Knorpelregenerierung durch *in vitro* kultivierte Chondrozyten war in den 1970ern einer der ersten Ansätze zur Fabrikation von Gewebe im *Tissue Engineering* durch W.T. Green⁵⁸. Die erfolgreiche Knorpelgenerierung in der Maus mittels synthetischer *scaffolds* (=Gerüstsubstanz) - besiedelt mit Chondrozyten - gelang erstmals Langer und Vacanti⁵⁹. Seither zielen die Bemühungen im *Tissue Engineering* auf die Herstellung verschiedener Gewebearten und auf ganze Organstrukturen ab. Verfahren zur Herstellung von Gewebe können grob in drei Kategorien unterteilt werden: a) Gabe von Zellen; b) Gabe

von Wachstumsfaktoren zur Induktion der Gewebekonstruktion; c) Nutzung von Biomaterialien als *scaffolds*, die mit Zellen besiedelt werden⁷.

1.4.1 *Tissue Engineering* und Gefäßbildung

Das Überleben von Zellen ist abhängig von der ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie dem Abtransport anfallender Stoffwechselprodukte. Zellen, die sich weiter als 100-200 µm von einer Kapillare entfernt befinden, werden nicht mehr ausreichend durch Diffusion ernährt⁶⁰. Aus diesem Grund ist im *Tissue Engineering* die Herstellung von Konstrukten mit suffizienter Versorgung limitiert in Bezug auf die Größe. Grundvoraussetzung für die Integrität nach einer Transplantation ist eine gleichmäßige Durchblutung im Konstrukt. Die Vaskularisation von größeren, komplexen Gewebekonstrukten mit einer Mikrovaskularisation stellt ein Kernziel im *Tissue Engineering* dar⁶¹. Die Idee der Prävasikularisation wurde 1993 von Mikos *et al.* aufgebracht, indem er mit seiner Arbeitsgruppe die *in vivo* Vaskularisation verschiedener, synthetischer *scaffolds* nach Implantation in stark vaskularisiertem Mesenterium in der Ratte zeigte⁶². Weitere Studien zeigten erhöhte Erfolge bezüglich der Vitalität von transferierten Kardiomyozyten durch Prävasikularisation⁶³ sowie von muskuloskelettalem Gewebe in der Maus⁶⁴.

Im *Tissue Engineering* werden Erkenntnisse des komplexen Mechanismus der Angiogenese auf translationale Weise für die Prävasikularisation von Gewebe angewandt. Für die fundierte Erklärung der Verfahren ist ein Grundverständnis einiger Prozesse nötig, die im Folgenden kurz erläutert werden.

Es werden verschiedene Arten der Gefäßbildung unterschieden. Die Vaskulogenese bezeichnet die *de novo* Bildung von Gefäßen durch die Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark, die im avaskulären Zielgewebe zu Endothelzellen ausdifferenzieren und ein primitives Gefäßnetz bilden⁶⁵. Die Vaskulogenese wurde längere Zeit nur mit der Gefäßbildung während der Embryonalentwicklung in Verbindung gebracht. Neuen Erkenntnissen zu Folge kommt die Vaskulogenese jedoch auch im adulten Organismus vor. Eine auf Vaskulogenese basierende Gefäßbildung konnte in der Pathophysiologie der Tumorgenese und der Wundheilung sowie bei der Revaskularisation von ischämischen Geweben nach Infarkten nachgewiesen werden^{66,67}. Die Entstehung von Gefäßen aus bereits bestehenden Blutbahnen wird als Angiogenese bezeichnet. Es wird dabei zwischen

dem Vorgang des sog. *sproutings* - dem Aussprossen eines neuen Astes aus dem bestehenden Gefäß - und der *intussusception* - der Aufteilung eines Gefäßes - unterschieden⁶⁵. Im adulten Organismus erfolgt die Gefäßbildung hauptsächlich durch Angiogenese. Bei dem *sprouting* und der *intussusception* spielen die Endothelzellen eine elementare Rolle. Endothelzellen bilden als Monolayer die Innenauskleidung der Gefäßwand. Sie spielen eine wesentliche Rolle für die Permeabilität, Hämostase und die Regulation des Tonus. Durch die Anlagerung von Perizyten und glatten Muskelzellen im Zuge der Arteriogenese werden die Gefäße stabilisiert⁶⁵. Die Endothelzellen liegen dabei einer Basalmembran auf, die aus extrazellulären Matrixproteinen besteht. Der Mantel aus Perizyten und Basalmembran hindert die Endothelzellen daran, ihre Position zu verlassen⁶⁸.

Die Neoangiogenese wird sowohl durch Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix, als auch durch freigesetzte, angio-induktive Wachstumsfaktoren wie *vascular endothel growth factor* (VEGF) oder *basic fibroblast growth factor* (bFGF) gesteuert⁶⁹. Die Gefäßstruktur und die Adaption des Gefäßnetzwerkes werden durch komplexe zelluläre Mechanismen, aber auch durch mechanische Kräfte, die auf die Gefäßwände einwirken, reguliert^{65,68}. In der initialen Phase der Angiogenese spielt insbesondere die Aktivierung des VEGF-Rezeptors (VEGFR2) eine elementare Rolle. Nach einem angio-induktiven Stimulus erfolgen zunächst eine Gefäßdilataion und die Formation von sog. „*tip cells*“, die Abkömmlinge der Endothelzellen sind. Dieser Vorgang erfordert eine Degradation der Basalmembran durch Proteolyse, die Ablösung der Perizyten sowie die Lockerung der interzellulären Verbindungen (VE-Cadherin, Claudine). Die erhöhte Permeabilität ermöglicht weiterhin die Extravasation von Plasmaproteinen (z.B. Fibrinogen und Fibronectin), wodurch ein provisorisches, angio-induktives Milieu für die migrierenden Endothelzellen gebildet wird⁶⁵. *Tip cells* werden durch Signale der extrazellulären Matrix (z.B. Semaphorine und Ephrine) gesteuert⁶⁵. Die Adhäsion der Zellen wird durch Integrine der extrazellulären Matrix vermittelt. Die *tip cells* werden begleitet von den sog. „*stalk cells*“, bei denen es sich ebenfalls um Mitglieder der Endothelzellen handelt. *Stalk cells* sind verantwortlich für das Längenwachstum und die Lumenbildung der Gefäße⁶⁵. Durch Fusion von benachbarten, luminalen *sprouts* wird die Perfusion innerhalb der neugebildeten Gefäße ermöglicht⁶⁵. Die endotheliale Freisetzung von

Wachstumsfaktoren wie *platelet-derived growth factor B* (PDGF-B), Angiopoetin-1 (ANG-1), *transforming growth factor-β* (TGF-β), ephrin-B2 und NOTCH fördert die Bildung der Basalmembran und die Rekrutierung von Perizyten^{68,70}. Primitive Gefäße, in denen keine Perfusion stattfindet, bauen sich wieder ab⁷¹. Der initialen Gefäßbildung folgt die Umgestaltung des entstandenen, primitiven Gefäßnetzes in ein organisiertes, arteriovenöses System. Arterielle und venöse Endothelzellen erhalten dabei eine spezifische molekulare Identität, die zur Differenzierung der Gefäße beiträgt⁷². Hämodynamische Faktoren wie der Blutfluss und die Pulsatilität tragen ebenfalls in hohem Maße dazu bei⁷³. Der Umbau und die Verzweigung der entstandenen Kapillaren wird hauptsächlich durch das Zusammenspiel von MMPs, die die Freisetzung von angio-induktiven Faktoren in der extrazellulären Matrix steuern⁷⁴, sowie Proteaseinhibitoren - *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) - und dem *plasminogen activator inhibitor - 1* (PAI-1) reguliert^{65,75}.

1.4.2 Strategien der *in vitro* Prävaskularisation

Die *in vitro* Prävaskularisation hat das Ziel, dreidimensionale Gefäßstrukturen innerhalb von Gewebekonstrukten zu bilden, die bei Implantation eine Verbindung zu dem umliegenden Gefäßsystem aufbauen können. Tremblay *et al.* gelang so die Integration eines prävaskularisierten Hautkonstruktes in das umliegende Gewebe bereits nach vier Tagen. Die Integration des Konstruktes ohne Prävaskularisation dauerte dagegen bis zu 14 Tage⁷⁶. Seither gestalten sich die *in vitro* Strategien der Prävaskularisation von Gewebe vielseitig, und können in *scaffold*- und zellbasierte unterteilt werden.

***Scaffold*-basierte Prävaskularisation**

Scaffolds aus verschiedenen Biomaterialien dienen als Leitschiene für das sich bildende Gewebe. Die verwendeten Matrizen sollten dafür eine ausreichende mechanische Stabilität und kontrollierte Biodegradation aufweisen⁵⁷. Neben artifiziellen Materialien werden auch „natürliche“ *scaffolds* verwendet. Die Herstellung nicht-synthetischer *scaffolds* erfolgt unter anderem durch eine physikalische (z.B. Einfrieren), enzymatische (z.B. Trypsin) oder chemische (z.B. Natriumdodecylsulfat) Dezellularisierung von nativen Körpergewebe unter Schonung der extrazellulären Matrix⁷⁷. Ein komplexes Beispiel dafür ist das dezellularisierte Herz aus Kadavern, das

als Gerüst für die Ansiedlung von Endothelzellen und Kardiomyozyten diene. Die Endothelzellen kleideten im Verlauf dieser *in vitro* Studie die ursprünglichen Koronargefäße als Monolayer aus. Nach erfolgreicher Rezellularisierung wies das Herz, zumindest in Kultur, kontraktile Eigenschaften auf⁷⁸.

Durch das Design und die Funktionalität der *scaffolds* kann die Prävascularisation stimuliert und gesteuert werden. Die Regulation erfolgt dabei meist durch die variable Freisetzung von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen⁹. Die Beschichtung der *scaffolds* mit bestimmten Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF fördert die Rekrutierung vaskulärer Zellen. Die Freisetzung von PDGF- β aus einer Kollagenmatrix erhöhte so die Bildung von Kapillaren in einem Wundheilungsmodell der Haut⁷⁹. Zur protrahierten Abgabe von Wachstumsfaktoren wurden verschiedene Biomaterialien konstruiert. *Scaffolds* mit einer definierten Abbaugeschwindigkeit, und damit einhergehender Freisetzung von gebundenen Wachstumsfaktoren⁶¹, sowie die Integration von abbaubaren Mikrosphären, die den Wachstumsfaktor enthalten⁸⁰, ermöglichen eine kontrollierte Abgabe. Eine Beschichtung mit bestimmten Proteinen kann darüber hinaus die Interaktion zwischen dem Biomaterial und den umgebenden Zellen regulieren und optimieren. Die Integration von Glykosaminoglykanen an der Materialoberfläche bewirkt so zum Beispiel eine Reduzierung der Fremdkörperreaktion nach Implantation des *scaffolds*⁸¹. Die Kombination mit Heparansulfat soll zur Steigerung des Gefäßwachstums führen⁸². Eine mit Heparansulfat beschichtete Biomatrix, die mit zwei Wachstumsfaktoren (VEGF und bFGF) geladen war, erzielte in einer Studie die Ausbildung eines differenzierten Gefäßnetzwerkes⁸³. In Anlehnung daran wurden Fibrinhydrogele als „*drug delivery*“ Systeme entwickelt, die durch eine systematische Freisetzung von VEGF und bFGF die Wundheilung unterstützen sollen⁸⁴.

Die Perfusion und Organisation der angesiedelten Zellen sollten auch durch die Herstellung von kanalisierten *scaffolds* unterstützt werden. Durch Fotolithografie wurden dafür Mikrokanäle, die architektonisch der Verzweigung eines Gefäßnetzes ähneln sollten, in Biomaterialien eingebracht⁸⁵. Diese Mikrokanäle sollen Endothelzellen als Grundgerüst zur Ausbildung von Gefäßstrukturen dienen. Eine Steigerung der Zellvitalität konnte durch das Einbetten von Glasfasern in ein Kollagengerüst, die nach Degradation Kanäle mit einem Durchmesser von 10-50 μm

im *scaffold* hinterließen, erreicht werden⁸⁶. Die computergestützte Herstellung von Biomaterialien soll mittlerweile nicht nur eine konkrete Anpassung der Beschaffenheit der *scaffolds* in ihren mechanischen Eigenschaften ermöglichen, sondern auch Anwendung für das Design mikrovaskulärer Strukturen darin finden⁸⁷. Techniken des 3D-Druckes sollen zukünftig so die Produktion ganzer Gewebekonstrukte unterstützen⁸⁸.

Mikro-Elektromechanische Systeme (MEMS)

Die Entwicklung Mikro-Elektromechanischer Systeme (MEMS) ermöglicht den Bau von dreidimensionalen Konstrukten mit vorgeformten - dem Gefäßnetz ähnelnden - Strukturen, die mit Endothelzellen besiedelt werden sollen. Hierbei fanden zunächst vor allem nicht abbaubare Materialien wie Polydimethylsiloxan (PDMS) Verwendung, wodurch eine *in vivo* Übertragung erschwert war⁹. Vorteilhaft von PDMS ist jedoch die Transparenz, wodurch eine Einsicht in die Matrix während der Kultivierung der Zellen möglich ist⁸⁹. Vernetzte Seidenproteine als strukturgebende Matrix scheinen für den *in vivo* Einsatz geeigneter zu sein, da sie sowohl mechanisch robust sind, als auch über eine kontrollierte Abbaugeschwindigkeit verfügen⁹⁰. Mit Hilfe von MEMS werden gegenwärtig Biomaterialien wie Polylactid-co-Glycolid (PLGA) oder Alginat-Gele mit Mikrokanälen versehen⁸⁹, um die Bildung eines Gefäßnetzes in Biomaterialien zu unterstützen.

***In vitro* Bioreaktoren**

Rotierende Bioreaktoren sorgen *in vitro* für eine gleichmäßige Diffusion des Nährmediums durch Poren der *scaffolds*⁹¹. Definierte Bedingungen sollen einen optimalen mechanischen, chemischen und biologischen Stimulus für die Förderung des Wachstums von Gewebe ermöglichen. Durch Bioreaktoren konnte so beispielsweise die Züchtung von Herzmuskelgewebe optimiert werden⁹². Bei der Prävaskularisation von Gewebeersatzmaterialien sollen Bioreaktoren den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen zum Zentrum der Konstrukte unterstützen. Sie sollen weiterhin die Versorgung von vitalen Gewebe mit einem Durchmesser größer als 1 mm gewährleisten⁹³. Fluss und Pulsatilität sind dynamische Parameter, die das *in vivo* Milieu imitieren sollen. Dadurch soll eine verbesserte strukturelle Zellorganisation und Biomechanik des Gewebes erreicht werden⁹⁴. Durch die Kultivierung boviner Gefäße

unter pulsatilen Konditionen mittels Perfusionsreaktorsystemen gelang die Generierung funktionaler Arterien, die auch nach Implantation einen arteriellen Charakter aufwiesen⁹⁵. *In vitro* Perfusionsbioreaktoren erreichen jedoch keine vollständige Vaskularisation komplexer Gewebestrukturen. Bis heute ist bei einer Implantation des so generierten Gewebes eine zusätzliche extrinsische Vaskularisation erforderlich⁹.

Zellbasierte Prävascularisation

Zellbasierte Techniken der Prävascularisation kommen in verschiedenen Varianten zum Einsatz. Die einfachste Form stellt die Besiedelung einer Biomatrix mit Endothelzellen oder gewebespezifischen Zellen dar⁹. Die Co-Kultivierung von Endothelzellen zusammen mit Fibroblasten, oder anderen Zelltypen wie Myoblasten, auf einer dreidimensionalen Matrix ist eine der Methoden für die *in vitro* Prävascularisation⁹⁶. Vorteil der Co-Kultur ist die Anlehnung an ein Milieu, das den Bedingungen *in situ* näher kommt. Mit Hilfe einer Tri-Kultur aus Endothelzellen, humanen Kardiomyozyten und embryonalen Fibroblasten in einem dreidimensionalen *scaffold* gelang es, ein vaskularisiertes Konstrukt mit charakteristischer Herzstruktur zu züchten. Es erhielt nach der Implantation mit der Zeit Anschluss an das umliegende Gefäßsystem *in vivo* und wies synchrone Kontraktionsmuster auf⁹⁷. Durch Transfektion können Zellen weiterhin zur Expression von bestimmten Wachstumsfaktoren angeregt werden. So konnte durch die Besiedelung eines *scaffold* mit transfizierten, mesenchymalen Stammzellen, die den Wachstumsfaktor VEGF verstärkt exprimierten, eine erhöhte Vaskularisation erreicht werden⁹⁸.

1.4.3 Strategien der *in vivo* Vaskularisation

Prälamination/ Präfabrikation

Durch Präfabrikation oder Prälamination hergestellte Lappenplastiken stellen eine Alternative zu herkömmlichen Lappenplastiken dar, und schlagen eine Brücke zwischen der Plastisch-Rekonstruktiven Chirurgie und dem *Tissue Engineering*. Das Prinzip der Präfabrikation wurde 1982 erstmals von Shen eingeführt und klinisch angewandt⁹⁹. Hierbei wird die gewünschte Gewebekomponente je nach Bedarf vorgeformt und ein Gefäßstiel oder eine Gefäßschleife axial eingebracht. Nach Neoangiogenese und Maturation wird das Gewebe in einem zweiten Eingriff an dem

Gefäßstiel abgesetzt und in die gewünschte Region transferiert^{57,100}. Eine durch Präfabrikation erzeugte Lappenplastik kann den Ansprüchen eines komplexen Defektes entsprechend generiert werden, und ist dabei unabhängig von der Anatomie des originären Gefäßnetzes. Die Prälamination beschreibt den Transfer von unterschiedlichem Gewebe in ein gut durchblutetes Areal mit Potential zur extrinsischen Vaskularisation des Transplantats. Pribaz differenzierte im Jahr 1994 diese Methode von der Methode der Präfabrikation¹⁰¹. Bei der Präfabrikation sowie der Prälamination ist ein anschließender Transfer im Sinne einer gestielten oder freien Lappenplastik, basierend auf der axialen Gefäßachse, vorgesehen⁵⁷. Präfabrizierte Lappenplastiken finden häufig bei Rekonstruktionen im Kopf- und Halsbereich Anwendung¹⁰². Die Prälamination eignet sich insbesondere zur Erzeugung von Konstrukten, die aus mehreren Gewebearten bestehen. Die so generierten Lappenplastiken werden häufig für die Rekonstruktion von zentralen Defekten in Gesicht und Nase verwendet, da hier verschiedene Gewebearten - wie Haut und Knorpel - rekonstruiert werden müssen¹⁰⁰. Für die Generierung von dreidimensionalen Strukturen, wie dem Ohr, findet die Prälamination ebenso Anwendung¹⁰³.

Zellbasierte Vaskularisation

Ein weiterer Ansatz der *in vivo* Prävasikularisation ist die Verwendung von sog. *cell sheets*. Dabei fungieren Biomaterialien als *sheets*, die mit Zellen besiedelt werden¹⁰⁴. Die zellbesiedelten *sheets* werden zur Vaskularisation unter die Haut implantiert. Durch wiederholte Operationen können die *sheets* übereinander gestapelt werden, und damit ein artifizielles, dreidimensionales Gewebekonstrukt erstellt werden, das zellreich und durchblutet ist⁶¹. Mit dieser Methode wurden unter anderem erfolgreich korneales und myokardiales Gewebe generiert⁹. Durch Schichtung mehrerer - mit Kardiomyozyten besiedelter - *cell sheets* in aufeinanderfolgenden Operationen, konnte myokardiales Gewebe mit einer Dicke von bis zu 1 mm generiert werden. Durch den Transfer der *cell sheets* über eine axiale Gefäßachse konnte im Anschluss eine Transplantation des artifiziiellen Gewebekonstruktes mittels mikrochirurgischer Technik durchgeführt werden¹⁰⁵.

In Vivo Bioreaktoren

Um eine Adaption des artifiziellen Gewebes an den Empfängerorganismus zu erreichen, wurde das Konzept des *in vitro* Bioreaktors auf *in vivo* Systeme übertragen. Mit Hilfe von mikrochirurgischer Technik können arteriovenöse Gefäßschleifen (AV-Loops) erzeugt werden, die als axiale Gefäßachse in ein *scaffold* eingebettet in eine Isolationskammer überführt werden. Im *Tissue Engineering* werden AV-Loops als Vermittler einer intrinsischen und axialen Vaskularisation von Geweben verwendet. Die Isolationskammer stellt dabei einen *in vivo* Bioreaktor dar, der subkutan implantiert wird. Abhängig von dem verwendeten Biomaterial innerhalb der Kammer und der implantierten Zellen, können gezielt verschiedene Arten von Gewebe wie Knochen-¹⁰⁶, Leber-¹⁰⁷ oder Muskelgewebe¹⁰⁸ generiert werden. Experimentell wurde das AV-Loop Modell mehrfach in Nagetieren^{109,110} und im Großtiermodell¹¹¹ erfolgreich zur *in vivo* Fabrikation von bioartifiziell, vaskularisiertem Gewebe eingesetzt. Mit Hilfe einer Titankammer, die unter einem Muskel implantiert wurde, konnte durch Zugabe von Stammzellen und spezifischen Wachstumsfaktoren durchblutetes Knochengewebe im menschlichen Körper erzeugt werden, das mikrochirurgisch erfolgreich als Unterkieferersatz transplantiert wurde¹¹². Die klinische Anwendung beschränkt sich bis heute jedoch auf Einzelfallbeschreibungen.

1.5 Das AV-Loop-Modell der Ratte

Das Prinzip des AV-Loop-Modells in der Ratte basiert auf frühen Arbeiten von Erol und Spira¹¹³. Durch Verwendung einer arteriovenösen Gefäßschleife mit einem interponierten Venenstück gelang den Autoren die Vaskularisation eines Vollhauttransplantats¹¹³. Das Prinzip der Induktion einer axialen Vaskularisation erhielt dadurch Einzug in die experimentelle Rekonstruktive Chirurgie^{114,115}.

Tanaka *et al.* züchteten mittels AV-Loop und einem synthetischen Hautersatzmaterial eine autologe Lappenplastik mit axialer Vaskularisation¹¹⁶. Das Konzept des AV-Loop-Modells wurde im Jahr 2000 durch Morrison und Kollegen entscheidend durch das Einbringen der Gefäßschleife in eine Isolationskammer modifiziert¹¹⁷. Lokmic *et al.* untersuchten die Kinetik der spontanen Neovaskularisation und das Oxygenierungsprofil des Gewebes, das sich um den AV-Loop bei Positionierung in der Kammer bildet¹¹⁸. Mit Hilfe des Modells konnte die Formation von

vaskularisiertem Knochengewebe innerhalb der Kammer unter Anwendung einer porösen Matrix sowie Osteoblasten erreicht werden¹¹⁹. Bitto *et al.* kombinierten die axiale Gefäßachse mit einer Implantation eines motorischen Nervs in die Isolationskammer. Die motorische Innervation diente dabei in Verbindung mit myo-induktiven Substanzen der myogenen Differenzierung von implantierten mesenchymalen Stammzellen¹⁰⁸. Mit der Etablierung eines *in vivo* gezüchteten und axial vaskularisierten Knochens am Schaf wurde das erste *Upscaling* des AV-Loop-Modells in das Großtier vollzogen¹²⁰. Neben dem *Tissue Engineering* wird das AV-Loop-Modell aufgrund seiner Einzigartigkeit auch zur *in vivo* Untersuchung der komplexen Mechanismen einer benignen, adulten Angiogenese an sich herangezogen¹²¹.

1.5.1 AV-Loop-assoziierte Angiogenese

Die Darstellung der Gefäßlumen zu deren Quantifizierung erfolgt entweder durch eine Farbstoff-Perfusion oder durch immunhistochemische Methoden¹¹⁴. Für die Auswertung der zweidimensionalen, histologischen Schnittbilder wurde ein automatisierter Algorithmus etabliert, wodurch eine zeitsparende und örtlich exakte Analyse des neu entstandenen Gefäßsystems möglich ist¹²². Dreidimensionale Analyseverfahren umfassen die Elektronenmikroskopie an *corrosion casts*¹¹⁴ sowie die automatisierte Auswertung von Mikro-CT-Rekonstruktionen nach Kontrastmittel-Perfusion¹²³.

Die Mechanismen der AV-Loop-assoziierten Angiogenese sind weitgehend ungeklärt¹²⁴. Nach Überführung der Gefäßschleife in eine Isolationskammer kommt es in Abhängigkeit von der verwendeten Matrix bereits nach ca. sieben Tagen zur sichtbaren Neoangiogenese, welche zunächst als multiple, luminale Gefäßausprossung beginnt und im weiteren Verlauf die Kammer gleichmäßig mit einem funktionsfähigen Mikrozirkulationssystem durchzieht¹⁰⁶. Nach 14 Tagen hat sich bei Verwendung einer azellulären Fibrinmatrix ein stabiles Gefäßnetzwerk ausgebildet¹²⁵. Durch die Gabe von Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF und bFGF), gelöst in Fibrin, konnte das Ausmaß der Gefäßbildung gesteigert werden¹²⁶. Cassell *et al.* zeigten in einer Vergleichsstudie verschiedener Matrizen eine Abhängigkeit der Angiogenese von der Beschaffenheit der verwendeten Trägermatrix¹⁰⁹. Konzentrationsvarianten der Komponenten einer Fibrinmatrix bewirkten eine

unterschiedliche Degradationsgeschwindigkeit der Matrix, wodurch das Ausmaß der Gefäßbildung ebenfalls beeinflusst wurde¹²⁷. Während die Gefäßzunahme bei einer stabilen Matrix, die keiner Biodegradation unterlaufen war, noch nach acht Wochen nachgewiesen werden konnte, kam der Prozess der Angiogenese in biodegradiblen Matrizen bereits nach zwei Wochen zum Erliegen^{118,128}.

Von manchen Autoren wurde beschrieben, dass vom Venen-Interponat keine Gefäßbildung ausgeht¹¹⁸. Polykandriotis *et al.* dagegen beschrieben den venösen Graft als Effektor der AV-Loop-assoziierten Gefäßbildung¹²⁸. Diese These wird durch dreidimensionale Bildgebungsverfahren unterstützt, die eine luminale Aussprossung vom Venen-Interponat aus belegen¹²³. Als treibende Kraft für die stattfindende Angiogenese wird neben dem Hypoxiegradienten^{129,130} die veränderte Hämodynamik verantwortlich gemacht, die auf die venöse Gefäßwand wirkt. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen von Oliver Watson an Zebrafischen haben die Bedeutung der Flussstimulation für die Angiogenese in hypoxischen Arealen unterstrichen¹³¹. Der reduzierte periphere Widerstand im arteriovenösen Shunt resultiert in einer erhöhten Flussrate im venösen Graft verglichen mit dem originären Fluss¹²¹. Die hämodynamische Stimulation scheint mit einer endothelspezifischen Induktion des *gap junction*-bildenden Strukturproteins Connexin(Cx) 43 in der Wand des venösen Grafts einher zu gehen¹²¹. Die Relevanz von Cx43 für die Angiogenese konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden^{132,133}. Eine hämodynamisch stimulierte Induktion wurde - im Gegensatz zu den weiteren endothelial exprimierten Connexinen (Cx37, Cx40 und Cx45) - für Cx43 ebenfalls in anderen Tiermodellen beschrieben^{134,135}.

In einem arterioarteriellen (AA) Loop-Modell in der Ratte wurde der originäre Versuchsansatz dahingehend verändert, dass der Anschluss des distalen Endes des venösen Grafts anstatt an die *V. femoralis* an die *A. femoralis* erfolgte¹²⁴. Dadurch gelang die Reduktion der auf die Wand des venösen Grafts wirkende Flussrate bei gleichzeitigem Erhalt aller weiteren Variablen (Pulsatilität, Blutdruck, Graftdurchmesser und Oxygenierung) im Vergleich zum AV-Loop-Modell. Dies führte zu einem vollständigen Sistieren der Gefäßbildung im AA-Loop-Modell, wodurch die gesteigerte Wandschubspannung (*shear rate*) als Vermittler der AV-Loop-assoziierten Angiogenese gezeigt wird¹²⁴.

1.5.2 Arten der Trägermatrix im AV-Loop-Modell

Ursprünglich wurden AV-Loops zur Vaskularisation von Hautlappen benutzt. Dazu wurden, nach anfänglicher Anwendung von autogenem Gewebe¹¹³, bereits zu Beginn dieses Jahrzehnts artifizielle Ersatzgewebe eingesetzt^{116,136}. Bei der Evaluierung von Angiogenese-Prozessen diente hauptsächlich Fibrin als extrazelluläre Trägermatrix^{124,128}. Die Kinetik der Angiogenese konnte durch die Zusammensetzung der Fibrinmatrix variiert werden¹³⁷. Durch gelöste Wachstumsfaktoren wurde Fibrin auch als *“drug delivery“* System genutzt¹³⁸. Im Rahmen des *Tissue Engineering* fand Fibrin auch als Trägermatrix Verwendung für zellbasierte Verfahren zur Gewebezüchtung mittels dem AV-Loop-Modell. Bei der Generierung von Muskelgewebe, für die eine Besiedlung der Fibrinmatrix mit Myoblasten erfolgte, konnte jedoch keine suffiziente Langzeitstabilität erreicht werden¹³⁹. Fibrin neigte auch in höherer Konzentrierung zu einer relativ raschen, narbigen Kontraktion¹³⁷, sodass es zur Generierung von transplantablem Gewebe nicht geeignet scheint. In einer frühen Arbeit, in der Fibrin mit PLGA und Matrigel verglichen wurde, zeigte sich Fibrin hinsichtlich der Langzeitstabilität und Vaskularisation ebenfalls unterlegen¹⁰⁹. Mit autogenem, muskuloskelettalem Gewebe¹⁴⁰, sowie synthetischem Material basierend auf Kollagen¹⁴¹, wurden erste Versuche zur Generierung vaskularisierter Weichteilgewebe unternommen. Für die Fabrikation von Knochengewebe kamen mechanisch stabilere Biomaterialien als Trägermatrix zum Einsatz. Kneser *et al.* gelang 2006 die erste erfolgreiche Vaskularisation einer soliden porösen Matrix aus boviner Spongiosa (PBCB)¹⁴². Mit der Intention ein durchblutetes artifizielles Knochengewebe zu erzeugen, wurden weitere poröse Matrizen wie TricOS® und Bioglas®45S5 hinsichtlich ihrer Angiogenesekinetik und dem osteogenen Potential untersucht^{111,120,143}. Aktuelle Langzeitstudien mit dem Knochenersatzmaterial NanoBone® im AV-Loop-Modell des Schafes zeigen erste Erfolge durch die Kombination einer ex- und intrinsischen Vaskularisation bei der Generierung von durchblutetem, artifiziellem Knochengewebe in klinisch relevanter Größenordnungen¹⁴⁴.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Globales Ziel der Arbeit ist die *in vivo* Generierung einer vaskularisierten Bindegewebslappenplastik unter Nutzung einer rein hämodynamisch stimulierten, intrinsischen Vaskularisation, mit der eine Deckung von komplexen, allschichtigen Hautweichteildefekten möglich ist.

Es wurden nachfolgende Projektziele angegeben:

- 1) Ermittlung der optimalen Matrix zur Generierung einer stabilen und ausreichend vaskularisierten Bindegewebslappenplastik

Hierfür wurden zwei azelluläre, für die klinische Anwendung zugelassene Kollagenmatrizen (MatriDerm® und Integra™ DRT) auf ihre Vaskularisationskinetik im AV-Loop-Modell der Ratte, ihre mechanischen Eigenschaften und ihre Fähigkeit der Zellrekrutierung verglichen.

- 2) Ermittlung des geeigneten Züchtungsintervalles einer mittels AV-Loop und Kollagenmatrix generierten Bindegewebslappenplastik

Hierfür erfolgte die histomorphometrische Charakterisierung der AV-Loop-Konstrukte nach einem subkutanen Implantationsintervall von 14 und 28 Tagen.

- 3) Etablierung eines allschichtigen Defektmodelles am Schulterblatt, welches die Deckung mit einer freien Lappenplastik durch mikrochirurgische Technik ermöglicht
- 4) Validierung der AV-Loop-basierten freien Bindegewebslappenplastik hinsichtlich der Fähigkeit, eine komplexe Wunde mit exponiertem Knochen zu rekonstruieren

Hierfür wurde die im Rahmen des Projektes gezüchtete und optimierte Lappenplastik bei der Einheilung über der kritischen Defektzone mit einer avaskulären Matrix zur Deckung sowie einer konservativen Wundbehandlung verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Haltung

Die tierexperimentellen Versuche wurden mit durchschnittlich 289 g schweren, weiblichen Spraque Dawley Ratten (CrI:SD; Charles River Laboratories, Sulzfeld, D) durchgeführt, die unter standardisierten Bedingungen in einem 12 Stunden Licht-/Dunkelrhythmus, bei freiem Zugang zu Futter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D) und Wasser, in Gruppen von zwei bis fünf Tieren gehalten wurden. Neuzugänge wurden für mindestens eine Woche zur Akklimatisierung und Eingewöhnung in der Haltung belassen, bevor sie für die Versuche herangezogen wurden. Das Tierversuchsvorhaben wurde am 07.03.2013 durch das Landesuntersuchungsamt Koblenz genehmigt (Aktenzeichen: 23 177 -07/G 13-7-008). Die Durchführung der Versuche erfolgte in der Versuchstierhaltung der BG-Unfallklinik Ludwigshafen. Für die Studie wurden insgesamt 51 Tiere operiert. Die einzelnen Gruppen sind in Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 dargestellt.

2.2 Kammer und Matrizen

2.2.1 Isolationskammer

Für die subkutane Einbettung des AV-Loops wurde eine Isolationskammer aus biokompartiblem Teflon (Institut für Materialwissenschaften, Abteilung Glas und Keramik, Universität Erlangen-Nürnberg, D) verwendet, die eine zylindrische Form aufwies (Abbildung 2.1). Der Innendurchmesser der Kammer betrug 10 mm und die Höhe 6 mm. Der Boden der Kammer hatte einen Durchmesser von 15 mm und ragte um 2 mm über den Rand der Kammer hinaus. Die Bodenplatte war an den Seiten jeweils mit einem Loch versehen, durch das die Kammer mit jeweils einem Einzelknopfheft an der unterliegenden Faszie der Innenseite des Oberschenkels befestigt wurde. In der Kammer waren im Zentrum vier Stifte aus Kunststoff in Anordnung eines Vierecks am Boden befestigt, die den AV-Loop in Position hielten und eine Dislokation verhinderten. Eine 5 mm breite Öffnung stellte den Ein- und Ausgang für das zu- und abführende Gefäß dar. Bis auf diese Öffnung war die Kammer rundum geschlossen, sodass eine Gefäßeinsprossung von außen nicht möglich war.

Die Isolationskammer wurde mit einem an der Oberseite abgerundeten Deckel (Durchmesser: 14 mm, Höhe: 2 mm) aus demselben Material verschlossen.

2.2.2 Matrizen

Der AV-Loop wurde in eine mit Matrix gefüllte Kammer überführt. In dieser Studie wurden azelluläre, kollagenbasierende Fabrikate als Matrix verwendet.

Zum einen wurde die Kollagen-Elastin-Matrix MatriDerm® (MedSkin Solutions, Dr. Suwelack AG, Billerbeck, D) verwendet. Laut Herstellerangaben (persönliche Auskunft; MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG, Stand Dezember 2014) beträgt die Porengröße von MatriDerm® 20-140 µm, die Wasseraufnahmekapazität mindestens 20 g/g und weist eine Porosität >90% auf. Die Matrix wurde für die Studie in Kreise mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Dicke von 2 mm zugeschnitten. Mit einer Kanüle wurden im trockenen Zustand der Matrix vier Löcher für die Kunststoffstifte in der Kammer vorgestochen. Anschließend wurde die Matrix mit 0,9%iger isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D) angefeuchtet. Eine Schicht wurde auf den Boden der Kammer gelegt. Darauf wurde der AV-Loop platziert und abschließend nochmals eine Schicht der Matrix darüber gelegt, sodass die Kammer ausgefüllt und die Gefäßschleife vollständig in der Matrix eingebettet war.

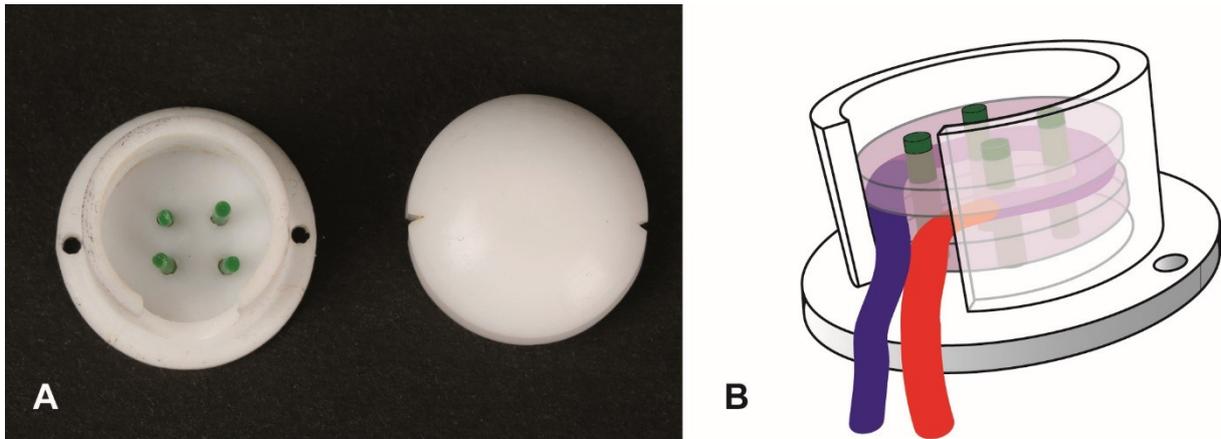


Abbildung 2.1: Isolationskammer und Positionierung der Kollagenmatrix

(A) Darstellung der Isolationskammer (links) und Deckel (rechts) aus Teflon und (B) der Schichtung des AV-Loops zwischen die untere und obere Matrixschicht (rosa)

Als zweite Matrix wurde ein Integra™ *Dermal Regeneration Template* (DRT) *Single Layer* (Integra LifeSciences, NJ, USA) verwendet. Es handelt sich dabei um eine Matrix mit einer Porosität von 98% und einer Porengröße von 30-120 μm , die aus quervernetzten Kollagenfasern aus Rindersehnen und Glykosaminoglykanen (Chondroitin-6-Sulfat) in einem Verhältnis 92/8 (bovines Kollagen/ Chondroitin-6-Sulfat) und einer definierten Abbaurate von 30 Tagen *in vivo* besteht (Herstellerangaben; URL: http://www.ilstraining.com/idrt/idrt/brs_it_03.html, Stand März 2015). Es wurden kreisförmige Layer mit einem Durchmesser von 10 mm mit jeweils vier Löchern angefertigt. Da die Schichtdicke nur 1 mm betrug, wurden auf den Boden der Kammer und auf die Gefäßschleife jeweils zwei Schichten gelegt, um einen vergleichbaren Füllungsgrad der Kammer zu erreichen.

2.3 Operative Eingriffe

Alle für die Studie durchgeführten operativen Eingriffe erfolgten durch den gleichen Operateur (JW, Tierärztin). Alle Operationen außer der Defektsetzung (siehe 2.3.4) wurden mit Hilfe eines Operationsmikroskopes (Vergrößerung x 16; OPMI® Technoskop pico, Carl Zeiss, Jena, D) durchgeführt.

2.3.1 Anästhesie und perioperatives Management

Die Ratten wurden gewogen und anschließend zur Einleitung der Narkose in eine Induktionsbox für Ratten (UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL) gesetzt, die mit 5% Isofluran (Albrecht GmbH, Aulendorf, D) in reinem Sauerstoff mit einem Volumenfluss von 2 l/min geflutet wurde. Nach Ausfall des Umdrehreflexes und Vorfall der Nickhaut wurden die Ratten auf den Operationstisch gelegt. Die Erhaltung der Inhalationsnarkose erfolgte über eine Nasenmaske (UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL) bei Spontanatmung mit 1,5-2% Isofluran in reinem Sauerstoff mit einem Volumenfluss von 0,3 l/min. Das Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde durch den Ausfall des Zwischenzehenreflexes überprüft. Zur Überwachung der Vitalfunktionen während der Narkose erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Kontrolle der Schleimhautfarbe, der Atemfrequenz und der Körpertemperatur durch den Operateur. Um ein Auskühlen der Ratten zu verhindern, wurden die Tiere während der Operation auf einer regulierbaren Heizplatte (UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL) gelagert, und diese abhängig von der jeweils ermittelten Körpertemperatur eingestellt.

Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D) verhinderte die Austrocknung der Augen während der Operation. Allen Tieren wurde perioperativ Buprenorphin (0.05mg/kg; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D) subkutan zur Analgesie verabreicht. Benzylpenicillin-Streptomycin (0,5 mg/kg; Veracin®-compositum, Albrecht, Eulendorf, D) wurde als Infektionsprophylaxe intramuskulär appliziert. Postoperativ erhielten die Ratten 2x täglich Buprenorphin (0,05 mg/kg) subkutan über zwei Tage.

2.3.2 AV-Loop-Operation

Die AV-Loop-Operation erfolgte unter Inhalationsnarkose (siehe 2.3.1). Die Hinterbeine wurden mit einer Schermaschine (B.Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, D) geschoren. Durch einen in die seitliche Schwanzvene gelegten Venenverweilkatheter (Introcan Safety Winged 24G, Braun Melsungen AG, Melsungen, D) erfolgte zu Beginn der Operation die intravenöse Gabe von 4 ml Heparinlösung (10.000 I.E./l). Nach erfolgter Prämedikation (siehe 2.3.1) wurden beide Beine in gestreckter Haltung fixiert, mit einem Hautdesinfektionsmittel (Kodan Tinktur forte, ungefärbt, Schülke & Mayr

GmbH, Norderstedt, D) desinfiziert und die Ratte mit einem sterilen Loch-Abdecktuch (Foliodrape, Paul Hartmann AG, Heidenheim, D) mit einer Aussparung im Operationsfeld abgedeckt. Ein im Kopf- und Brustbereich der Ratte zusätzlich ausgeschnittenes Loch im Abdecktuch diente zur Überwachung von Atmung und Schleimhautfarbe. Der ca. 4 cm lange Hautschnitt an der medialen Seite des rechten Beines begann auf Höhe des Knies und endete in der Leistengegend. Das direkt unter der Haut gelegene Gefäßbündel mit der *V.* und *A. saphena* wurde aus der umliegenden Faszie freipräpariert. Dabei wurden kleine Gefäßabgänge mit einer bipolaren Pinzette koaguliert und durchtrennt, um eine ausreichende Mobilisierung der Gefäßstiele zu gewährleisten. Vor dem distalen Absetzen der Gefäße erfolgte an den vorgesehenen Schnittstellen eine Adventitektomie. In einem 90° Winkel zur Gefäßachse wurde jeweils proximal eine Mikrogefäßklemme (B-1V; S&T AG, Neuhausen, CH) auf das Gefäß gesetzt. Bei der Lokalisation der Schnittstellen musste darauf geachtet werden, dass diese sich nicht in unmittelbarer Nähe eines Gefäßabganges befanden, um spätere Wirbelbildungen des Blutflusses im Anastomosenbereich zu verhindern. Nach Koagulation mittels bipolarer Pinzette distal der geplanten Schnittstelle erfolgte die Absetzung der Gefäße mit einem geraden Schnitt senkrecht zur Gefäßachse. Anschließend wurden die Gefäßstümpfe mit einem Gefäßdilator geweitet, und mit einer heparinisierten Lösung (10.000 I.E./l) gespült. Um einem Gefäßspasmus durch die Manipulation der Gefäße entgegenzuwirken, wurde jeweils ein Tropfen 10% Paveronhydrochlorid-Lösung (Linden Arzneimittel Vertrieb GmbH, Heuchelheim, D) auf die Gefäßenden gegeben.

Analog zur rechten Seite erfolgte die Präparation der kontralateralen *V. saphena*, aus der ein ca. 2 cm langes Stück als venöses Interponat für den AV-Loop entnommen wurde (Abbildung 2.2). Die Vene wurde hierfür proximal und distal nach der Adventitektomie im Bereich der Schnittstellen mittels bipolarer Pinzette koaguliert und anschließend mit einem senkrechten Schnitt zur Gefäßachse abgesetzt. Es folgte die Aufweitung der Enden des Venenstückes mit dem Gefäßdilator und die Spülung mit heparinierter Lösung (10.000 I.E./l).

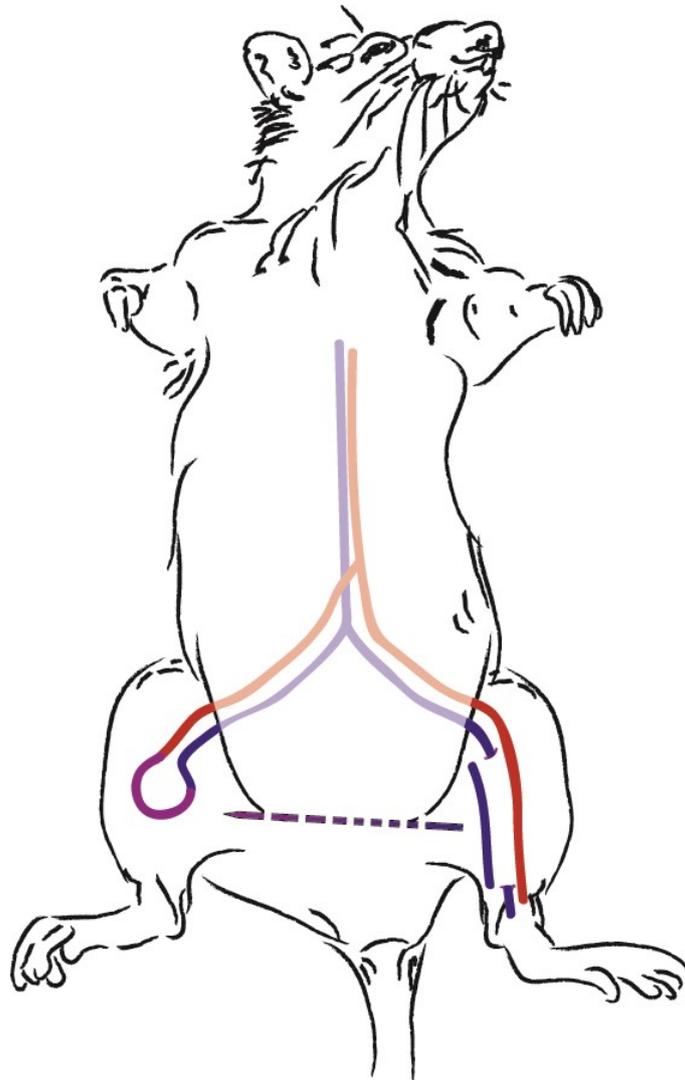


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der AV-Loop-Operation

Das gewonnene venöse Interponat wurde zwischen die Gefäßstümpfe der rechten *A.* und *V. saphena* eingenäht (Abbildung 2.2). Dabei wurde das proximale Ende des Interponats mit dem Gefäßstumpf der Vene und das distale Ende mit dem Gefäßstumpf der Arterie verbunden. Die mikrochirurgische Gefäßnaht erfolgte jeweils in End-zu-End-Technik durch 8-10 Einzelknopfhefte mit einem 11-0 Polyamid-Faden (Ethicon, Somerville, NJ, USA). Vor dem Öffnen der Mikrogefäßklemmen wurde jeweils ein Tropfen 10% Paveronhydrochlorid-Lösung (Linden Arzneimittel Vertrieb GmbH, Heuchelheim, D) auf die Gefäße zur Relaxation gegeben. Anschließend

wurden die Mikrogefäßklemmen geöffnet und die Durchgängigkeit und die Dichtigkeit der Anastomosen geprüft.

Für die Implantation der Isolationskammer wurde zunächst die für das Tier vorgesehene Matrix (MatriDerm® oder Integra™ DRT; Vorbereitung siehe 2.2.2) hergerichtet, und die erste Schicht auf den Boden der Kammer gelegt. Anschließend wurde die Kammer auf die Innenseite des Oberschenkels platziert und mit zwei Einzelknopfheften mit einem 6-0 Polypropylen Faden (Ethicon, Somerville, NJ, USA) an der Muskelfaszie fixiert. Die Gefäßschleife wurde vorsichtig angehoben und in die Kammer gelegt. Die Gefäßschleife wurde in der Kammer so platziert, dass sie um die vier Stifte zum Liegen kam. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Spannung auf die Anastomosen wirkte. Abschließend erfolgten die Deckung der Gefäßschleife mit einer zweiten Schicht der entsprechenden Matrix und der Verschluss der Kammer mit dem Deckel. Die Haut wurde über der Kammer mit einer Unterhautnaht (3-0 Vicryl Plus; Ethicon, Somerville, NJ, USA) und fortlaufender Hautnaht (4-0 Vicryl Plus; Ethicon, Somerville, NJ, USA) verschlossen, und die Wunde mit Aluminiumspray (cp-pharma, Burgdorf, D) versiegelt.

Am Ende der Operation wurde nochmals 4 ml Heparinlösung (10.000 I.E./l) zur Thromboseprophylaxe über den Venenverweilkatheter verabreicht, welcher anschließend entfernt wurde. Eine makroskopische Wundkontrolle und Beurteilung des Allgemeinbefindens der Ratte erfolgten täglich bis zum Zeitpunkt der Konstruktentnahme.

2.3.3 Reperfusion mit Indian-Ink und Explantation

Die Reperfusion und anschließende Explantation der AV-Loop-Konstrukte erfolgte je nach Versuchsgruppe nach einer Implantationsdauer von 14 (Teilprojekt 1, Gruppe A, C; Teilprojekt 2, Gruppe B, C) oder 28 Tagen (Teilprojekt 1, Gruppe B, D). Zur Darstellung und Auswertung der neugebildeten Gefäße innerhalb des AV-Loop-Konstruktes erfolgte eine Exsanguination und anschließende Reperfusion mit dem schwarzen Farbstoff Indian-Ink (= schwarze Kalligraphie-Tinte). Dieser wurde zuvor mit Gelatine versetzt (siehe 2.5.3), die ein Austreten des Farbstoffes aus den Gefäßlumen verhinderte.

Einleitung und Erhaltung der Inhalationsnarkose erfolgte wie in 2.3.1 beschrieben mittels Isofluran in reinem Sauerstoff. Die Ratte wurde am ventralen

Abdomen und an der Innenseite des rechten Oberschenkels im Bereich der Isolationskammer rasiert. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums erfolgte ein ca. 5 cm langer Hautschnitt von distal nach proximal über der subkutan tastbaren Isolationskammer. Die Isolationskammer war von einer straffen Bindegewebskapsel umschlossen, die auf dem Deckel der Kammer mit einer Sektionsschere inzidiert wurde. Im Anschluss wurde die Isolationskammer aus dem umliegenden Gewebe freigelegt und der außerhalb der Kammer liegende Gefäßstiel des Loops dargestellt.

Die Durchgängigkeit der in die Kammer eingebrachten Gefäßschleife erfolgte durch Prüfung des Blutflusses distal der Gefäßschleife durch einen „Ausstreichtest“. Hierfür wurde die abführende *V. saphena* kurz nach dem Austritt aus der Kammer mit einer Mikropinzette abgeklemmt, und somit der Blutfluss unterbrochen. Von da ausgehend wurde die Vene mit einer zweiten Pinzette distalwärts ausgestrichen. Anschließend wurde die Vene distal abgeklemmt und die proximale Abklemmung aufgehoben. Ein Nachfließen von Blut aus dem Kammerinneren wurde als Kriterium für die Durchgängigkeit des AV-Loops herangezogen.

Für die Exsanguination der Ratte wurde das ventrale Abdomen in der *Linea alba* eröffnet und der Magen-Darm-Trakt nach links verlagert. Die *Aorta abdominalis* und die *Vena cava caudalis* wurden freipräpariert und dargestellt. Kaudal des Abganges der *A. renalis sinistra* wurde mit einem 6-0 Polypropylen Faden (Prolene, Ethicon, Somerville, NJ, USA) eine Ligatur um die *Aorta abdominalis* vorgelegt. Kranial der Aufteilung der *V. cava caudalis* in die *V. iliaca externa* und *V. iliaca interna* wurde eine weitere Ligatur vorgelegt, die sowohl die *V. cava caudalis* als auch die *Aorta abdominalis* umfasste. Im Anschluss wurde die *Aorta abdominalis* mit einer Pinzette fixiert, ein Venenkatheter vor der kranialen Ligatur kraniokaudal eingeführt und die Ligatur zur Fixierung des Katheters festgezogen. In die *V. cava caudalis* wurde ein Loch für den Abfluss geschnitten. Im Anschluss wurde die Ratte mit 100 ml, auf Körpertemperatur vorgewärmter, Heparinlösung (100.000 I.E./l) entblutet. Danach erfolgte die Reperfusion mit 30 ml Indian-Ink-Gelatine-Lösung. Nach Beenden der Reperfusion wurde der Venenkatheter entfernt und die vorgelegte kaudale Ligatur zugezogen, um ein Ausfließen des Farbstoffes zu verhindern. Zur Aushärtung der Indian-Ink-Gelatine-Lösung wurde die Ratte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank

belassen. Am nächsten Tag wurde das AV-Loop-Konstrukt an seinem Gefäßstiel abgesetzt und anschließend für 24 Stunden in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

2.3.4 Defektsetzung

Die Ratte wurde analog zur Beschreibung in 2.3.1 vorbereitet und in Narkose gelegt. Lateral im Bereich des rechten Schulterblattes wurde die Ratte rasiert und der Bereich mit alkoholhaltigem Hautdesinfektionsspray (Kodan Tinktur forte, ungefärbt, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D) desinfiziert. Im Anschluss wurde die Ratte in Linksseitenlage gebracht und das rechte Vorderbein nach kaudal gestreckt und fixiert, sodass auf dem Schulterblatt eine maximale Hautspannung resultierte. Nach Lagerung erfolgte die Abdeckung mit einem sterilen Lochtuch. Zur genauen Lokalisierung des Defektes wurden die *Spina scapulae*, das *Tuberculum supraglenoidale*, der *Margo superior* der Skapula sowie das Schultergelenk manuell aufgesucht, und mittig auf dem Schulterblatt über der *Spina scapulae* mit einer Präparierschere ein kreisförmiger Hautdefekt mit einem Durchmesser von ca. 11 mm ausgeschnitten. Nach Durchtrennen und Entfernen der Hautmuskeln erfolgte das scharfe Abtragen des *M. trapezius pars cervicalis et thoracica* und der *Mm. infra- et supraspinati*, sodass die *Spina scapulae*, die *Fossa supraspinata* und die *Fossa infraspinata* exponiert waren. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Muskelansätze am *Margo superior*, *Spina scapulae* und *Tuberculum supraglenoidale* von distal und proximal der Skapula belassen wurden, um eine *Scapula alata* zu verhindern. Dies hätte eine Einschränkung des Bewegungsablaufes der Ratte zur Folge gehabt. Mit einem Skalpell wurde der freiliegende Knochen abgeschabt und von verbleibenden Weichteilresten befreit. Das Weichteilgewebe am Defektrand wurde mit einer bipolaren Pinzette verödet.

2.3.5 Splint-Modell

Um den Wundrand wurde ein Silikonring (Silicone Sheet JTR-S-0,5; GRACE Bio-Labs) aufgenäht. Dieser diente - wie in der Fachliteratur bereits beschrieben²² - dazu, der erhöhten Wundkontraktion entgegen zu wirken. Der verwendete Silikon-Splint hatte einen Außendurchmesser von 26 mm, einen Innendurchmesser von 18 mm und eine Stegbreite von 4 mm. Der Splint wurde mit acht Einzelknopfheften (4-0 Vicryl plus; Ethicon, Somerville, NJ, USA) in einem Abstand von 3 mm entlang des

Wundrandes fixiert (Abbildung 2.3). Hierbei wurde von außen durch den Splint, die Haut und durch den Muskel eingestochen, in umgekehrter Reihenfolge wieder ausgestochen und anschließend geknotet.

2.3.6 Verband

Die Wunde wurde je nach Versuchsgruppe mit einer Fettgaze (BACTIGRAS; Smith&Nephew GmbH, Hamburg, D) (Teilprojekt 2; Gruppe B, C) oder zusätzlich mit einer sterilen Kompresse (Teilprojekt 2; Gruppe A) abgedeckt. Als Fixierverband diente in Anlehnung an beschriebene Methoden¹⁴⁵ ein Klettverschluss, der für die vorliegenden Versuche entsprechend modifiziert wurde (Abbildung 2.3). Der runde Klett wurde mit einem Durchmesser von 40 mm ausgeschnitten. Aus dem Unterteil, das anschließend auf die Haut um den Splint aufgenäht wurde, wurde ein Loch mit einem Durchmesser von 28 mm herausgeschnitten, sodass die Wunde und der Splint frei lagen. Das Klettoberteil (= Deckel) wurde als Abdeckung auf das angenähte Klettverschlussgegenteil gelegt und festgedrückt. Für die folgende Fotodokumentation und Wundbehandlung konnte so der Klettverschlussdeckel abgehoben, und nach erfolgter Behandlung wieder verschlossen werden.

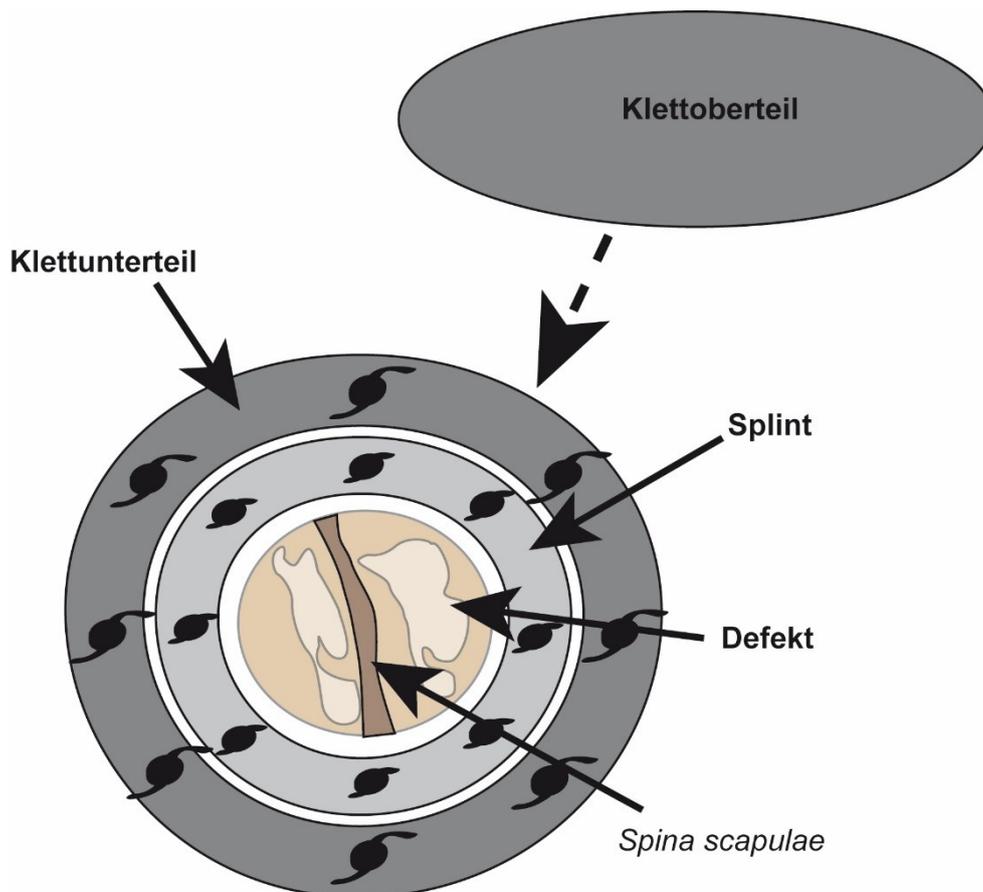


Abbildung 2.3: Defekt mit Splint-Modell und Klettverband

Schematische Darstellung des allschichtigen Weichteildefektes mit Exposition der *Spina scapulae* lateral auf dem Schulterblatt. Um den Wundrand wurde ein Silikonring (= Splint) aufgenäht. Als Fixierverband erfolgte die Aufnahme des Klettunterteils um den Splint, auf das das Klettoberteil flexibel angeheftet wurde.

2.3.7 Hebung und Transplantation der generierten Bindegewebslappenplastik

Die Hebung und der Transfer der Lappenplastik, die mittels AV-Loop in der Isolationskammer gezüchtet wurde, erfolgte nach einem Implantationsintervall von 14 Tagen in Inhalationsnarkose mit Isofluran und Sauerstoff sowie unter perioperativer Analgesie mit Buprenorphin (siehe 2.3.1). Anschließend wurde analog zur AV-Loop-Operation (2.3.2) ein Venenverweilkatheter (Introcan Safety Winged 24G Sicherheitsvenenverweilkanüle, Braun Melsungen AG) in der lateralen Schwanzvene platziert und 4 ml Heparinlösung (10.000 IE/l) appliziert. Die Ratte wurde im Bereich der rechten Schulter, links der Lendenwirbelsäule auf dem Rücken und ventral am Hals rasiert. Bei ungenügender Haarentfernung wurden die restlichen Haare in diesen Bereichen mit Enthaarungscreme (Dirk Rossmann GmbH, Burgwedel, D) entfernt.

Im ersten Schritt wurde der Defekt auf dem rechten Schulterblatt gesetzt. Hierfür wurde die Ratte in Linksseitenlage positioniert und nach alkoholischer Hautdesinfektion (Kodan Tinktur forte, ungefärbt, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D) mit einem sterilen Tuch abgedeckt. Über dem OP Bereich wurde ein Loch ausgeschnitten. Die Defektsetzung erfolgte wie unter 2.3.4 beschrieben.

Nun wurde die Wunde mit einem sterilen Tupfer abgedeckt und die Ratte in Rückenlage umgelagert. Nach erneuter steriler Vorbereitung des OP-Bereiches ventral am Hals wurde zur Präparation der *Vena jugularis externa dextra* und der *Arteria carotis communis dextra*, die als Anschlussgefäße für den Bindegewebslappen dienten, ventral rechts parallel zur Luftröhre ein ca. 3 cm langer Hautschnitt gemacht. Die Gefäße wurden stumpf aus dem umliegenden Fettgewebe freigelegt und dargestellt. Bis zur Transplantation wurde auch diese Wunde mit einem sterilen Tupfer abgedeckt.

Im Anschluss erfolgte die Hebung des gezüchteten Bindegewebslappens an seinem arteriovenösen Gefäßstiel (Abbildung 2.4). Medial am Oberschenkel wurde über der subkutan liegenden Isolationskammer ein ausreichend langer Hautschnitt von ca. 5 cm gesetzt. Die eng anliegende Kapsel um die Kammer wurde eröffnet und der Schnitt nach cranial und caudal erweitert. Der Gefäßstiel, bestehend aus der *Vena* und *Arteria saphena*, wurde möglichst weit proximal, nahe der Leistengegend dargestellt und isoliert, um so einen ausreichend langen Stiel zu erhalten. An der Absetzstelle wurde die Adventitia weitestgehend entfernt, um die spätere Anastomose zu erleichtern. Nach Absetzen des Gefäßstiels und Heben des noch in der Kammer liegenden Lappens wurden die Enden mit einem Gefäßdilator dilatiert, und mit heparinierter Kochsalzlösung (10.000 IE/l) gespült. Bis zur Transplantation wurde der Lappen mitsamt der Kammer in 0,9% NaCl (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D) verwahrt. Der Hautverschluss erfolgte mit einer fortlaufenden Subkutannaht mit 3-0 Vicryl Plus (Ethicon, Somerville, NJ, USA) und anschließender Hautnaht mit 4-0 Vicryl Plus (Ethicon, Somerville, NJ, USA).

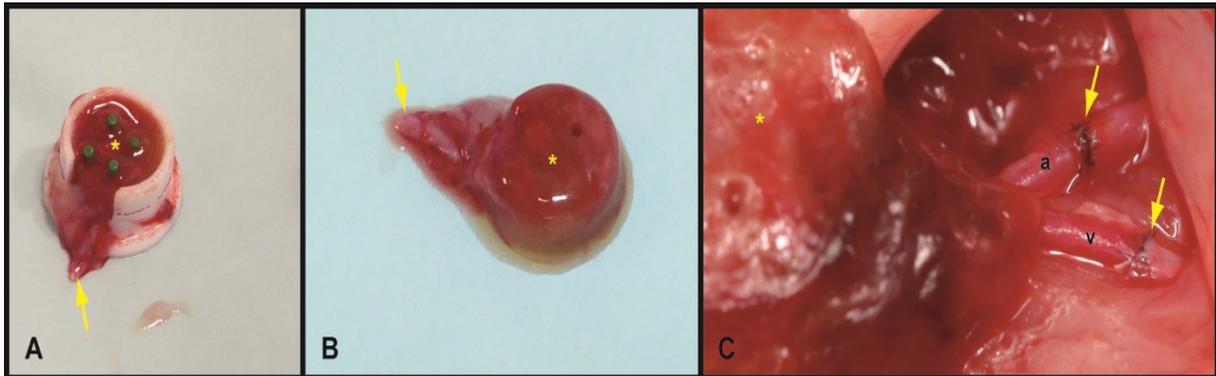


Abbildung 2.4: Hebung und Anschluss des gezüchteten Bindegewebslappens

(A, B) Entnommenes AV-Loop-Konstrukt (=Bindegewebslappen) (*) an seinem Gefäßstiel (gelber Pfeil) und mikrochirurgischer Anschluss (C) mittels End-zu-End-Anastomose (Pfeile) des arteriellen Stielgefäßes (a) an die umgelagerte *A. carotis communis* und des venösen Stielgefäßes (v) an die *V. jugularis externa*.

Für den Anschluss des Lappens wurde die Ratte erneut in Linksseitenlage gelagert und der OP-Bereich steril hergerichtet. *Vena jugularis externa dextra* und *Arteria carotis communis dextra* wurden mit Gefäßklemmen (B-1V; S&T AG, Neuhausen, CH) kaudal abgeklemmt und möglichst weit kranial abgesetzt. Nach Dilatation und Spülung wurden die Gefäßenden durch Tunnelung unter dem *M. sternocephalicus* und *M. brachiocephalicus* durchgeführt, sodass diese über den kranialen Rand der Skapula im lateral auf der Skapula gesetzten Defekt zum Liegen kamen. Um ein Zurückrutschen der Gefäße zu vermeiden, wurde jeweils eine doppelte Approximatklemme (ABB-1V; S&T AG, Neuhausen, CH) im Abstand von 3 mm zum Gefäßende auf die Gefäße gesetzt. Dabei ist auf einen sicheren Halt der Klemmen zu achten, da bei Abrutschen der Klemme von der *Arteria carotis communis* das Gefäß zurückrutscht, und bis zur Bergung ein hoher Blutverlust auftreten kann. Nun wurde der Lappen aus der Kammer entnommen und mit seinem Gefäßstil so platziert, dass eine spannungsfreie Anastomose möglich war. Die mikrochirurgische Anastomisierung erfolgte End-zu-End durch Einzelknopfhefte mit 11-0 Polyamid Faden (Ethicon, Somerville, NJ, USA) (Abbildung 2.4). Sodann folgte die Öffnung der Approximatklemme (erst venös, dann arteriell) sowie eine Prüfung auf Durchgängigkeit. Zur Reduktion des Gefäßspasmus wurde jeweils ein Tropfen Paveron (PAVERON N; Linden Arzneimittel-Vertrieb-GmbH, Heuchelheim, D) auf die Anastomosen appliziert.

Abschließend wurde vom Rücken mit einem Weckmesser ein für die Größe des Defekts passendes Spalthauttransplantat entnommen und über dem Bindegewebslappen in fortlaufender Nahttechnik mit 6-0 Polypropylen (PROLENE; Ethicon, Somerville, NJ, USA) am Wundrand fixiert. Der Hautschnitt ventral am Hals wurde mit einer fortlaufenden Subkutannaht mit 3-0 Vicryl Plus (Ethicon, Somerville, NJ, USA) und Hautnaht mit 4-0 Vicryl Plus (Ethicon, Somerville, NJ, USA) verschlossen.

Abschließend wurde ein Splint mit Klettverschlussfixierung wie oben beschrieben aufgebracht (siehe auch Abbildung 2.3). Als Wundaufgabe diente sterile Fettgaze (BACTIGRAS; Smith&Nephew GmbH, Hamburg, D). Nach intravenöser Applikation von 4 ml heparinierter Kochsalzlösung (10.000 IE/l) wurde der Venenverweilkatheter entfernt. Am Ende der Operation wurde erneut Buprenorphin (0,5 mg/kg) subkutan appliziert.

Postoperativ erfolgte eine Analgesie mit Buprenorphin 2 x täglich s.c. für 3 Tage. Am ersten Tag nach der Operation wurde zur Thromboseprophylaxe nochmals 4 ml heparinisierte Kochsalzlösung (10.000 IE/l) subkutan appliziert.

2.4 Elastizitätsbestimmung der Matrizen

Zur Bestimmung der Elastizität der Kollagenmatrizen wurde der Elastizitätsmodul E nach Thomas Young (engl. *Young's Modulus*) aus dem linear-elastischen Teil des Zugversuchs ermittelt. Die Elastizitätsmessung wurde im experimentellen Labor des Instituts für Kardiovaskuläre Physiologie der Medizinischen Fakultät Mannheim (Labor Gloe, T.) durchgeführt.

Im Bereich des linear-elastischen Materialverhaltens (im Folgenden der Einfachheit halber „elastisch“ genannt) nimmt das Material bei vollständiger Entlastung wieder seinen geometrischen Ursprungszustand ein. Die Gerade zu Beginn der Spannungs-Dehnungs-Kurve (siehe exemplarisch Abbildung 2.5 A) repräsentiert genau diesen Bereich im Spannungs-Dehnungs-Diagramm. Der Elastizitätsmodul ist nun der Proportionalitätsfaktor, welcher den linearen Zusammenhang zwischen der Spannung σ und Dehnung ε beschreibt¹⁴⁶:

$$\sigma \left[\frac{N}{m^2} \right] = E \left[\frac{N}{m^2} \right] \times \varepsilon [-] \rightarrow E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = konst$$

Die Ermittlung des Elastizitätsmoduls E erfolgte über einachsige Zugversuche im linear-elastischen Bereich ($\frac{\sigma}{\varepsilon} = \text{konstant}$). Mittels dem Dual Wire Myograph 410 A (DMT, Aarhus, DNK) wurden die Kollagenmatrizen (jeweils $n=2$) definierten, einachsigen Spannungszuständen ausgesetzt, und die jeweils aufgebrachte Kraft gemessen. Die Matrizen wurden hierzu mit zwei Platindrähten unter dem Mikroskop in den Myographen eingespannt (siehe Abbildung 2.5 B).

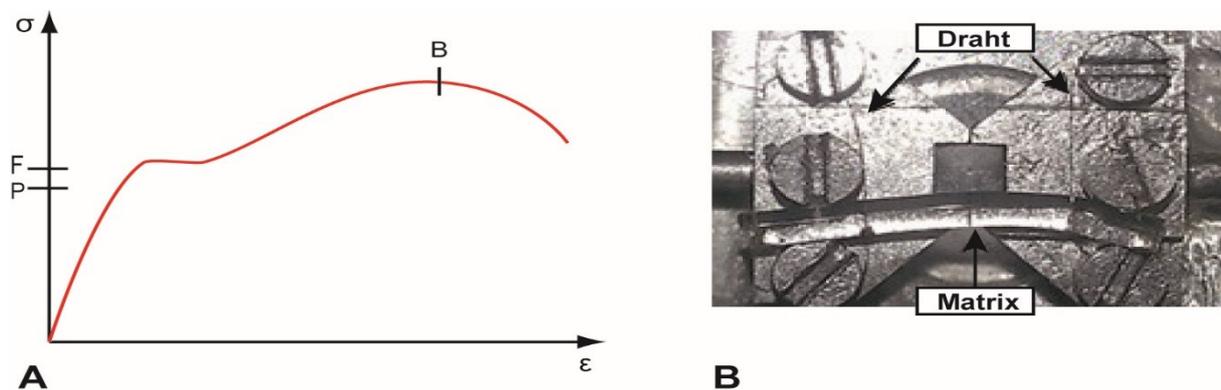


Abbildung 2.5: Spannungs-Dehnungs-Diagramm nach einachsigem Zugversuch

(A) Schematische Darstellung des Kurvenverlaufs eines elastischen Körpers; das Material weist bei $\sigma \leq P$ ein linear-elastisches und bei $\sigma \geq F$ ein plastisches Verhalten auf. (Zeichnung in Anlehnung an Gross *et al.*¹⁴⁶) **(B)** zeigt exemplarisch die Positionierung der Matrix im Dual Wire Myograph 410 A (Foto zur Verfügung gestellt von Gloe, T., Kardiovaskuläre Physiologie der Medizinischen Fakultät Mannheim)

σ = Spannung; ε = Dehnung; P = Proportionalitätsgrenze; F = Streckgrenze;
 B = Bruchgrenze

Durch manuelle Einstellung am Dual Wire Myograph 410 A wurde jede Matrix anschließend in diskreten Schritten von 0,2 mm gedehnt, und die für den resultierenden Spannungszustand ursächliche Kraft gemessen. Unter Berücksichtigung des Ausgangsquerschnitts A_0 sowie der Ausgangslänge l_0 der Proben konnte aus diesen Daten der Elastizitätsmodul der Matrizen ermittelt werden.

Dazu wurde der Proportionalitätsfaktor $a \left[\frac{N}{m} \right]$ zwischen aufgebrachter Kraft F [N] und resultierendem Weg s [m] mittels linearer Interpolation der Messwerte einer jeden Matrix bestimmt (Hooke'sches Gesetz):

$$F = a \times s \rightarrow a = \frac{F}{s}$$

Die Korrelation Kraft-Weg wurde durch Berücksichtigung des Ausgangsquerschnitts A_0 in die Spannungsdarstellung überführt:

$$\frac{F}{A_0} = \frac{a \times s}{A_0} = \sigma$$

Eingesetzt in die Definition des Elastizitätsmoduls ergibt sich mit der Dehnung $\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$ und $s = \Delta l$ folgende Formel:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{\frac{a \times \Delta l}{A_0}}{\frac{\Delta l}{l_0}} = \frac{a \times l_0}{A_0}$$

Aus den Elastizitätsmoduln der beiden Proben (n) jeder Gruppe wurde schließlich der mittlere Elastizitätsmodul des Matrixmaterials bestimmt.

Zusätzlich gilt, dass bei der Elongation der Matrix um Δl in Zugrichtung (x) deren Querschnitt A_0 um ΔA abnimmt (Änderung in y- und z-Richtung) und somit nicht konstant ist. Diese von der Längenänderung Δl abhängige Änderung des Querschnitts wird durch die Poissonsche Zahl ν ausgedrückt, $\nu = -E \times \frac{\varepsilon_y}{\sigma_x}$. Durch die homogene Matrixstruktur gilt dieser Zusammenhang identisch in z-Richtung¹⁴⁶. Da in dem vorliegenden Versuch keine Messergebnisse zur Abnahme des Durchmessers der Matrizen bei Dehnung vorlagen, wurde die Querkontraktion zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls jedoch nicht herangezogen.

2.5 Vorbereitung Reagenzien / Lösungen

2.5.1 Reagenzien für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Lösung	Zusammensetzung	
Meyer's-Hämatoxylin-Lösung	<i>Aqua dest.</i>	1000 ml
	Kaliumaluminiumsulfat	50 g
	Hämatoxylin	1 g
	Natriumjodat (NaIO ₃)	0,2 g
	Essigsäure, konzentriert	20 ml
Eosin-Y-Lösung 1%ig	<i>Aqua dest.</i>	100 ml
	Eosin Y	1 g
Ammonium-Wasser 0,2%ig	<i>Aqua dest.</i>	100 ml
	Ammoniumhydroxid (NH ₄ OH)	0,2 ml
Säure-Alkohol-Lösung 1%ig	70% EtOH	50 ml
	Salzsäure (HCL), konzentriert	1 ml

2.5.2 Reagenzien für die Masson-Trichrom-Färbung

Lösung	Zusammensetzung	
Bouin's-Lösung	Pikrinsäure (gesättigt)	75 ml
	Formaldehyde (37-40%)	25 ml
	Essigsäure, konzentriert	5 ml
Weigert's-Eisen-Hämatoxylin-Lösung		
Stammlösung A:	Hämatoxylin	1 g
	95% Ethanol	100 ml
Stammlösung B:	29% Eisen(III)-chlorid	4 ml
	<i>Aqua dest.</i>	95 ml
	Salzsäure (HCL), konzentriert	1ml
<i>Biebrich Scarlet</i> -Säurefuchsin-Lösung	<i>Biebrich scarlet</i> , 1% wässrig	90 ml
	Säurefuchsin, 1% wässrig	10 ml
	Essigsäure, konzentriert	1 ml
Phosphormolybdän-, Wolframatophosphorsäure- Lösung	Phosphormolybdänsäure, 5%	25 ml
	Wolframatophosphorsäure, 5%	25 ml
Anilinblau-Lösung	Anilinblau	2,5 g
	Essigsäure, konzentriert	2 ml
	<i>Aqua dest.</i>	100 ml
Essigsäure-Lösung 1%ig	Essigsäure, konzentriert	1 ml
	<i>Aqua dest.</i>	99 ml

2.5.3 50% Indian-Ink in 5% Gelatine und 4% Mannitol

Reagenz	Zusammensetzung
0,9% NaCl	15 ml
Gelatine	1,5 g
Mannit	1,2 g
Black-Indian-Ink	15 ml

2.5.4 Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 1-fach

Reagenz	Zusammensetzung
NaCl	8 g
KCL	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
<i>Aqua dest.</i>	1000 ml

2.5.5 4% Paraformaldehyd (PFA)

Reagenz	Zusammensetzung
<i>Aqua dest.</i>	100 ml
PFA	4 g
NaOH (1M)	0,5 ml

2.5.6 19% EDTA (10% 4Na EDTA / 9% 2Na EDTA), pH 7,4

Reagenz	Zusammensetzung
<i>Aqua dest.</i>	490 ml
4Na EDTA	50 g
2Na EDTA	45 g
NaOH (5N)	10 ml

2.6 Histologische und immunhistochemische Methoden

2.6.1 Herstellung und Schneiden der Paraffinblöcke

Die Präparate wurden aus der Teflonisoliationskammer herausgelöst und hinter den vorderen zwei Stiften der Kammer (Teilprojekt 1, Gruppe A-D) mit einer scharfen Rasierklinge angeschnitten. Die Präparate, die das Schulterblatt enthielten (Teilprojekt 2, Gruppe A-C), wurden vor der Einbettung in Paraffin für 14 Tage in 19% EDTA-Lösung (2.5.6) inkubiert. Das 19 %ige EDTA-Medium wurde dabei jeden dritten Tag erneuert. Dieser Vorgang diente der Entkalkung des Knochenanteils der Präparate. Der Anschnitt der Präparate aus Teilprojekt 2 erfolgte in der Mitte des Defektes senkrecht zur *Spina scapulae* (Abbildung 2.6). Anschließend wurden die Präparate dehydriert und mit flüssigem Paraffin infiltriert (Tabelle 2.1).

Zur Herstellung von schneidbaren Blöcken wurden die Präparate jeweils mit der Anschnittfläche auf den Boden der mit flüssigen Paraffin gefüllten Einbettwanne gelegt, und diese mit dem Deckel der für die Infiltration benutzten Kassette abgedeckt (Rotilabo®-Einbettkassetten, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D). Bei der Platzierung in der Einbettwanne wurde für die spätere Auswertung auf eine einheitliche Ausrichtung der Präparate geachtet. Zum gleichmäßigen Auskühlen wurden die Kassetten direkt auf einer Kühlplatte (-20°C) bis zur vollständigen Aushärtung gelagert.

Es wurden neun (Teilprojekt 1) bzw. acht (Teilprojekt 2) verschiedene Ebenen in einem Abstand von je 150 µm mit dem Mikrotom (Leica RM2255, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, D) angeschnitten. Die so entstandenen Schichten lagen damit 0, 150, 300, 450, 600, 750 und 900 µm von der Anschnittfläche entfernt (Abbildung 2.6). Pro Ebene wurden fünfzehn Schnitte angefertigt, die jeweils eine Dicke von fünf Mikrometer hatten.

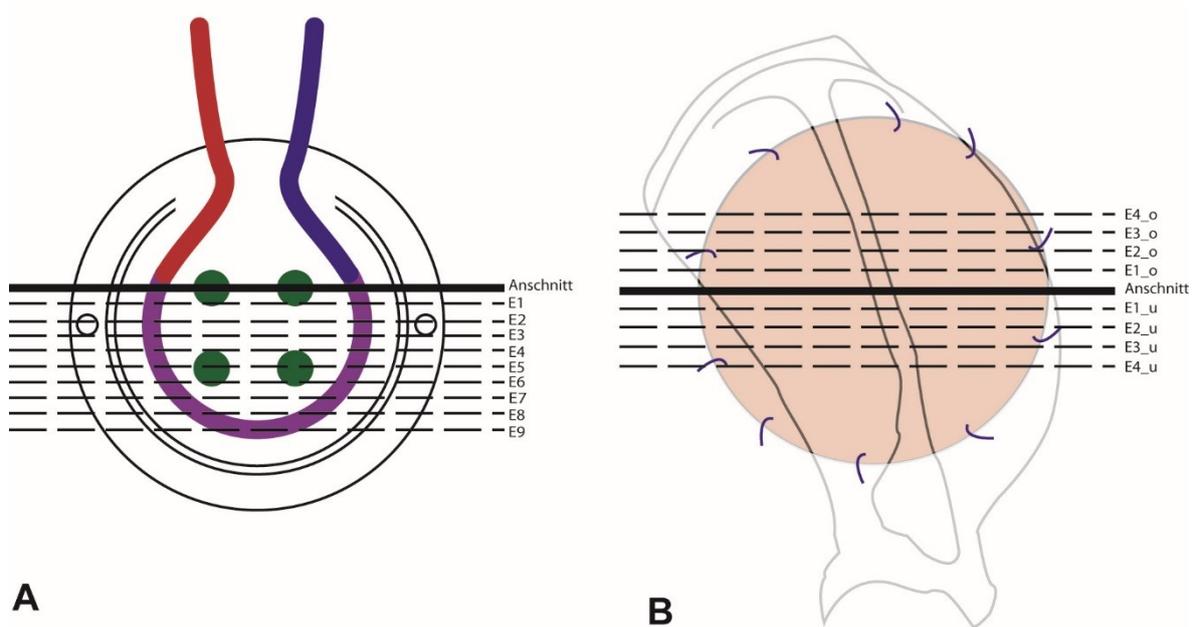


Abbildung 2.6: Schnittebenen der Präparate

(A) Schnittebenen der in Paraffin eingebetteten Präparate ausgehend vom Anschnitt in Teilprojekt 1

(B) Schnittebenen der in Paraffin eingebetteten Präparate (nach vorangegangener Entkalkung mit 19% EDTA) in Teilprojekt 2

Die Schnitte wurden im Wasserbad (Leica HI1210, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, D) bei 40° C gestreckt, auf beschichtete Objektträger (Superfrost Ultra Plus®; Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D) aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Tabelle 2.1 Protokoll Gewebeeinfiltration mit Leica TP1020

Reagenz	Dauer (min)
30 % EtOH	90
50 % EtOH	90
70 % EtOH	120
95 % EtOH	90
99,9 % EtOH	90
99,9 % EtOH	90
99,9 % EtOH	90
99,9 % EtOH	90
99,9 % Xylol	90
99,9 % Xylol	90
Paraffin bei 60°C	120
Paraffin bei 60°C	120

2.6.2 Vorbereitung der Paraffinschnitte

Zunächst wurden die Objektträger horizontal im Ofen bei 60°C für eine Stunde gelagert, damit das Gewebe sich streckt und gut auf dem Objektträger haftet. Die Objektträger wurden nach Abkühlen auf Raumtemperatur entparaffiniert und rehydriert. Das entsprechende Protokoll ist in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2 Protokoll Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten

Reagenz	Dauer (min)
Xylol	10
Xylol	10
99,9% EtOH	5
99,9% EtOH	5
95% EtOH	2
70% EtOH	2
<i>Aqua dest.</i>	1

Im Anschluss erfolgte die jeweilige histologische Färbung. Nach Färbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, und nach anschließender Waschung in Xylol (Tabelle 2.3) mit einem synthetischen Einschlussmittel (Roti®Histokitt II; Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D) eingedeckt.

Tabelle 2.3 Protokoll Dehydrierung von histologischen Schnitten

Reagenz	Dauer (min)
95% EtOH	5
99,9% EtOH	5
99,9% EtOH	5
Xylol	5
Xylol	5

2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung wurde nach gängigem Standardprotokoll durchgeführt, das in Tabelle 2.4 aufgeführt ist.

Tabelle 2.4 Protokoll Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung

Reagenz	Zeit
Meyer's-Hämatoxylin-Lösung	8 min
Fließendes Leitungswasser	5 min
1%ige Säure-Alkohol-Lösung	30 sec
Fließendes Leitungswasser	1 min
0,2% Ammonium-Wasser	1 min
Fließendes Leitungswasser	5 min
1% Eosin-Lösung	5 min
Fließendes Leitungswasser	2 min

2.6.4 Masson-Trichrom-van-Gieson-Färbung

Die Masson-Trichrom(MT)-Färbung wurde nach gängigem Standardprotokoll durchgeführt, das in Tabelle 2.5 aufgeführt ist.

Tabelle 2.5 Protokoll Masson-Trichrom-van-Gieson-Färbung

Reagenz	Zeit
Bouin's-Lösung bei 56°C im Ofen	60 min
Fließendes Leitungswasser	5 -10 min
Weigert's-Eisen-Hämatoxylin-Arbeitslösung	10 min
Fließendes Leitungswasser	10 min
<i>Aqua dest.</i>	6x eintauchen
<i>Biebrich Scarlet-Säurefuchsin-Lösung</i>	10 min
<i>Aqua dest.</i>	6x eintauchen
Phosphormolybdän-, Wolframatomphosphorsäure-Lösung	15-20 min
Anilinblau-Lösung	5-7 min
<i>Aqua dest.</i>	Kurz eintauchen
1% Essigsäure-Lösung	3 min
<i>Aqua dest.</i>	6x eintauchen

Für die Hämatoxylin-Arbeitslösung wurden die Stammlösungen A und B in gleichen Teilen gemischt. In der Masson-Trichrom-Färbung stellten sich die Zellkerne schwarz, die Kollagenfasern blau sowie Muskelfasern, Zytoplasma und Keratin rot dar. Als Kontrolle dienten Paraffinschnitte vom Darm der Ratte.

2.6.5 Elastika-van-Gieson-Färbung

Die Elastika-van-Gieson-Färbung wurde nach gängigem Standardprotokoll durchgeführt, das in Tabelle 2.6 aufgeführt ist.

Tabelle 2.6 Protokoll Elastika-van-Gieson-Färbung

Reagenz	Zeit
Resorcin-Fuchsin (Elastin-Farblösung nach Weigert)	15 min
Fließendes Leitungswasser	1 min
Weigert's-Hämatoxylin-Arbeitslösung*	5 min
Fließendes Leitungswasser	10 min
1%ige Säure-Alkohol-Lösung**	10 sec
<i>Aqua dest.</i>	10 sec
Pikrofuchsin-Lösung nach van Gieson	2 min
<i>Aqua dest.</i>	10 sec

* Zusammensetzung siehe 2.5.2 ** Zusammensetzung siehe 2.5.1

Die Hämatoxylin-Arbeitslösung wurde analog zur Masson-Trichrom-Färbung aus den Stammlösungen A und B (siehe 2.5.2) hergestellt. In der Elastika-van-Gieson-Färbung stellen sich Zellkerne braun-schwarz, Bindegewebe rot, Muskulatur gelb und elastische Fasern blau-schwarz dar. Als Kontrolle dienten Paraffinschnitte der Aorta der Ratte.

2.6.6 Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen(PCNA)-Färbung

Proliferierende Zellen wurden immunhistochemisch durch das Anfärben des *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) (PCNA Lifetech Kit; Invitrogen, Frederick, USA) visualisiert. Dazu wurden die Paraffinschnitte, wie in 2.6.2 beschrieben, für die Färbung vorbereitet. Im Anschluss an die Rehydrierung erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase durch 3% Wasserstoffperoxid für 10 min, und die dreimalige Spülung für 2 min in 1-facher PBS-Lösung. Für die Demaskierung wurden die Schnitte mit einem Citratpuffer in einer Mikrowelle bei 750 Watt für 1 min gekocht, für 10 min bis zum Erreichen der Raumtemperatur gekühlt sowie mit 1-facher PBS-Lösung gewaschen. Auf jeden Schnitt wurden 2 Tropfen Blockierlösung (Reagenz 1, PCNA

Lifetech Kit) gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde das Reagenz abgegossen und 2 Tropfen des biotinilierten primären Antikörpers Maus-anti-PCNA (Reagenz 2, PCNA Lifetech Kit) für 60 min auf das Gewebe gegeben. Es folgte die dreimalige Spülung mit 1-fachem PBS für jeweils 2 min. Nach 10 min Inkubation mit einer Streptavidin-Peroxidase (Reagenz 3, PCNA Lifetech Kit) zur Visualisierung des Antikörpers wurden die Schnitte abermals dreimal für jeweils 2 min mit 1-fachem PBS gespült. Sodann wurde Diaminobenzidin (Reagenzien 4A, 4B und 4C nach Packungsbeilage angesetzt, PCNA Lifetech Kit) für 10 min auf die Schnitte gegeben. Danach sind die Präparate für 2 min mit PBS zum Blocken gespült worden. Es folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Reagenz 5, PCNA Lifetech Kit) für 1 min und abschließendem Bläuen mit Leitungswasser für 5 min.

2.7 Datenverarbeitung

2.7.1 Auswertung der Fotodokumentation

Im Teilprojekt 2 erfolgte postoperativ eine digitale Fotodokumentation der Defektwunde an den Tagen 2, 5, 7, 9, 12 und 14. Bei konservativer Wundbehandlung (Gruppe A) wurde daraus die Reduktion der Wundfläche ermittelt. Die Auswertung der Fotodokumentation erfolgte mit Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems GmbH, München, D). Die Pixelanzahl der Innenfläche des Splints P_{sp} sowie der Wundfläche P_w wurde bestimmt, und der Anteil der Wundfläche an der Splintinnenfläche in Prozent wie folgt berechnet:

$$\text{Anteil Wundfläche } a \text{ [\%]} = \frac{P_w}{P_{sp}} \times 100$$

Der Innendurchmesser r des Splints betrug einheitlich 18 mm und entsprach somit einer Fläche von $A_{sp} = 254 \text{ mm}^2$:

$$A \text{ [mm}^2\text{]} = \pi \times r^2$$

Da die Splintfläche $A_{sp} \text{ [mm}^2\text{]}$ als konstant angesehen werden kann, wurde sie zur Normalisierung der Wundfläche herangezogen. Die Berechnung der jeweiligen Wundfläche $A_n \text{ [mm}^2\text{]}$ erfolgte anhand des ermittelten Anteils der Wundfläche a an der Splintinnenfläche A_{sp} auf dem jeweiligen Foto.

$$A_n(\text{mm}^2) = (a \times A_{sp})/100$$

Im nächsten Schritt wurde die Reduktion der Wundfläche an Tag n in Bezug zu Tag 0 ($n = 0$) ermittelt:

$$\text{Wundreduktion [\%]} = 100 - \left(\frac{A_n}{A_0} \times 100 \right)$$

Darüber hinaus wurde die Reduktionsrate z zwischen den aufeinander folgenden Dokumentationen wie folgt ermittelt:

$$\text{Reduktionsrate } z_n [\%] = 100 - \left(\frac{A_n}{A_{n-1}} \times 100 \right)$$

2.7.2 Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop

Die Durchsicht der gefärbten Präparate erfolgte mit einem Lichtmikroskop (AxioImager M2; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D), das mit einem 5-, 10-, 20-, 40- und 100-fach Objektiv sowie 10-fach Okularen ausgestattet war. Die Aufnahmen wurden über eine direkt an das Mikroskop angeschlossene Digitalkamera (AxioCam MRc; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D) auf ein Computersystem übertragen und dort mit der Bildbearbeitungssoftware Axio Vision 4 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D) verarbeitet und digital gespeichert.

Für Übersichtsaufnahmen wurden Einzelbilder mit Hilfe eines automatisierten Tisches am Mikroskop angefertigt, die von der Bildbearbeitungssoftware in ein Bild zusammen geführt wurden. Übersichtsaufnahmen von HE, MT und Elastika-van-Gieson-gefärbten Schnitten wurden in 100-facher Vergrößerung angefertigt. Die Übersichtsaufnahmen der PCNA-Färbung für die quantitative Zellkernanalyse wurden in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Detailaufnahmen von Teilausschnitten erfolgten in Teilprojekt 1 (Gruppe A-D) mit 200-facher Vergrößerung und in Teilprojekt 2 (Gruppe B. C) in 100-facher Vergrößerung.

2.7.3 Histomorphometrische Analyse der histologischen Schnitte

Initial erfolgte die deskriptive, histomorphometrische Charakterisierung der AV-Loop-Konstrukte. Dafür wurden mittels HE, MT und Elastika-van-Gieson gefärbte Schnitte visuell durchgemustert und Gewebestrukturen sowie Zelltypen identifiziert.

Die Quantifizierung der Gefäßanzahl und -fläche innerhalb der AV-Loop-Konstrukte erfolgte mittels computergestützter, histomorphometrischer Analyse der 2-dimensionalen Paraffinschnittpräparate durch einen automatisierten Algorithmus, der

- basierend auf positiven und negativen Experten - mit Farbstoff gefüllte Gefäße detektiert. Nach automatischem Abzug der angeschnittenen Hauptgefäße des AV-Loops wurden diese mit Hilfe des Programms in einem Koordinatensystem angeordnet. Eine detaillierte Beschreibung des Programms findet sich in der Fachliteratur¹²². Mit Hilfe des Algorithmus wurden Radian um den AV-Loop gelegt, die ihren Ausgangspunkt in der Mittelachse der AV-Loop-bildenden Gefäße hatten. Daraus wurden kreisringförmige Areale gebildet, wobei stets galt $r_{au\beta en} - r_{innen} = 200\mu m$. Die Fläche des jeweiligen Areals errechnete sich mit der Kreisringflächenformel zu $A_n[\mu m^2] = \pi \times (r_{au\beta en,n}^2 - r_{innen,n}^2)$. Anhand dieser Werte und der Anzahl an Gefäßen in den jeweiligen Arealen wurde die Gefäßdichte in Abhängigkeit zum Abstand zur AV-Loop-Achse ermittelt.

Zur Quantifizierung der Zellbesiedelung und der Proliferation innerhalb des AV-Loop-Konstruktes wurden Paraffinschnitte, die immunhistochemisch mittels PCNA-Färbung visualisiert wurden, herangezogen (siehe 2.6.6). Die Auswertung des Proliferationsprofils und des Zellanteils in den Matrizen (Teilprojekt 1) erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>, zugegriffen im Oktober 2014). Hierfür wurden jeweils acht Vierecke (Kantenlänge = 300 μm) mit einer Fläche von $9 \times 10^4 \mu m^2$ um die beiden Hauptgefäße gelegt (Abbildung 2.7) Anschließend wurde in jedem Quadrat die Gesamtzahl der Zellkerne und die Zahl der durch PCNA-gefärbten Zellkerne manuell ausgezählt. Die ausgezählten Quadrate 1-4 wurden dem Zentrum des AV-Loop-Konstruktes zugeordnet. Die Quadrate 5-8 standen repräsentativ für die Peripherie (Abbildung 2.7). Daraus ergaben sich pro AV-Loop-Konstrukt jeweils acht ausgezählte Quadrate für das Zentrum und für die Peripherie. Aus der Summe der ermittelten Quadrate pro Versuchsgruppe wurden die arithmetischen Mittelwerte bestimmt.

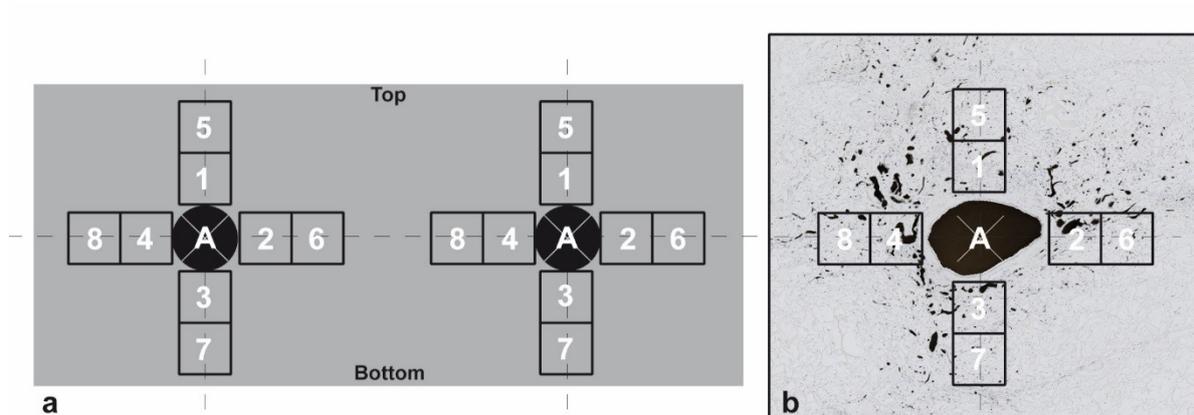


Abbildung 2.7: Bestimmung der Zellmigration und -proliferation

(a) zeigt schematisch die Anordnung der ausgezählten Quadrate (1-8) um die beiden Anschnitte der AV-Loop-Achse (A); in (b) sind exemplarisch die mit ImageJ ausgezählten ROI (=Quadrate 1-8) um einen Anschnitt (A) gezeigt

Für die Evaluation einer Korrelation zwischen der Zell- und der Gefäßdichte wurden die ausgezählten Quadrate des Zentrums den ermittelten Gefäßdichten der Areale mit 1-400 μm Abstand zur Hauptgefäßachse des AV-Loops zugeordnet. Die Quadrate der Peripherie wurden entsprechend den Arealen im Abstand von 400-800 μm zur Gefäßachse zugeteilt.

2.7.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Datenverarbeitung wurde mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die graphische Darstellung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 6. Mit dem Graphikprogramm Adobe Illustrator CS4 (Adobe Systems GmbH, München, D) wurden die im Methoden- und Ergebnisteil dargestellten Skizzen und Abbildungen erstellt.

Abbildungen und Tabellen zeigen arithmetische Mittelwerte absoluter und normalisierter Werte \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistische Signifikanz (Teilprojekt 1) wurde bei dem Vergleich der Gruppen mittels Varianzanalyse durch einfaktoriellen (=one-way) ANOVA mit Post-Hoc-Test nach Sidak überprüft. Bei einer Abweichung der Normalverteilung wurden die Werte aufgrund der Varianzhomogenität logarithmisch (dekadischer Logarithmus)

transformiert, und die so erhaltenen Werte für die Berechnungen herangezogen. Als statistisch signifikant galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ($p < 0,05$). Die Ermittlung von bivariaten Zusammenhängen erfolgte mittels einer Korrelationsanalyse, bei der der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) ermittelt wurde. Werte mit $r=1$ standen dabei für eine absolut positive Abhängigkeit; $r=-1$ für eine absolut negative Abhängigkeit und $r=0$ für keinen bestehenden Zusammenhang der beiden verglichenen Merkmale. Um die statistische Signifikanz der ermittelten Korrelationskoeffizienten zu bestimmen, wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Bei einem gerichteten linearen Zusammenhang erfolgte eine einfache Regressionsanalyse.

3 Verwendetes Material

Chirurgisches Instrumentarium	Hersteller
Adventitiaschere SAS-18 R-8	S&T AG, Neuhausen, CH
Approximatorklemme ABB-1V	S&T AG, Neuhausen, CH
Chirurgische Pinzette	Aesculap AG, Tuttlingen, D
Gefäßdilator D-5A.1	S&T AG, Neuhausen, CH
Gefäßklemmen B-1 V	S&T AG, Neuhausen, CH
Metzenbaum Präparierschere mit Goldgriff	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D
Mikronadelhalter B-15-8.3	S&T AG, Neuhausen, CH
Mikropinzette JFL 3.1	S&T AG, Neuhausen, CH
Spülaufsatz 0,3mm	Waldemar Link GmbH & Co. KG, Hamburg, D
Wundspreizer Finsen 3x4Z.scharf 70mm	Aesculap AG, Tuttlingen, D

Nahtmaterial	Hersteller
11-0 Polyamid ETHILON (EH7438G)	Ethicon, Somerville, NJ, USA
3-0 Vicryl Plus (VCP452H)	Ethicon, Somerville, NJ, USA
4-0 Vicryl Plus (VCP494H)	Ethicon, Somerville, NJ, USA
6-0 Polypropylen PROLENE (8695H)	Ethicon, Somerville, NJ, USA

Medikamente/ Arzneimittel	Hersteller
Aluminium-Spray	Cp-pharma, Burgdorf, D
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D
Buprenoret® 0,3mg/ml Injektionslösung	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D
Heparin 25.000 I.E./5ml	Rotexmedica GmbH, Trittau, D
INTEGRA® <i>Dermal Regeneration Template (DRT) Single Layer</i>	Integra LifeSciences, N.J., USA

IsoFlo® 100% w/w Inhalationsgas, flüssig	Albrecht GmbH, Aulendorf, D
kodan Tinktur forte, gefärbt	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D
MatriDerm®	MedSkin Solutions, Dr. Suwelack AG, Billerbeck, D
NaCl 0,9 % Infusionslösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
Narcoren®	Merial GmbH, Hallbergmoos, D
PAVERON N	LINDEN Arzneimittel-Vertrieb-GmbH, Heuchelheim, D
Veracin-Compositum®	Albrecht GmbH, Aulendorf, D

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Abdecktuch 45 x 75cm Raucodrape®	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co.KG, Rengsdorf, D
Abedd Espe Classic, 2-5cm	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D
Antifekt N1 L	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D
BACTIGRAS®	Smith&Nephew GmbH, Hamburg, D
Deckgläser 24 x 50mm	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Discofix C-3 blau	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Enthaarungscreme	Dirk Rossmann GmbH, Burgwedel, D
Einbettform (<i>Mega Base Molds 2</i>) 32x23x14 mm	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, D
<i>Feather Disposable Scalpel No. 15</i>	Feather safety Razor Co.,LTD, Osaka, JPN
Heidelberger Verlängerung 140 cm	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
<i>Hypodermic Needle-Pro 26G x 1/2"</i>	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Injekt® 10ml/ Luer Solo	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Injekt® 2ml/ Luer Solo	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Intrafix® Primeline	Braun Melsungen AG, Melsungen, D

<i>Introcan Safety Winged 24G</i> Sicherheitsvenenverweilkanüle	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Leica DB80 LS, low profile microtome blades	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, D
Loch-Tuch 75 x 90mm sk Foliodrape®	Paul Hartmann AG, Heidenheim, D
<i>LS-2 Connector</i>	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Mini- Spike® Filter	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Mullkompressen steril 10 x 10cm	Fuhrmann GmbH, Much, D
Omnifix® 40 Solo	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Original Perfusor® Spritze 20 ml/Luer Lock Duo	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Peha Wattestäbchen, steril	Paul Hartmann AG, Heidenheim, D
Ratte/Maus-Haltung, 10mm	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D
Rotilabo®-Einbettkassetten	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Sicherheitskanüle G21 0,8x38	Braun Melsungen AG, Melsungen, D
<i>Silicone sheet JTR-S-0,5</i>	GRACE Bio-Labs, Bend, Oregon, USA
Superfrost Ultra Plus®	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Teflonisationskammer	Universitätsinstitut für Materialwissenschaften, Erlangen, D
Zentrifugenröhrchen 50ml	TPP® Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH

Geräte	Hersteller
Aesculap ISIS Akku-Haarschneider GT420	B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, D
CM2 Flussmesser	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL
<i>Control Unit-02</i>	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL
<i>Dual Wire Myograph 410 A</i>	DMT, Aarhus, DNK
<i>Gas-Exhaust Box</i>	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL
Heizplatte	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL

Kern Präzisionswaage PCB 6000-0	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D
Leica EG 1150C-Kühlplatte	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, D
Leica HI 1210	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, D
Leica RM 2255	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, D
Leica TP 1020	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, D
<i>Minicutter</i> (HF Gerät, bipolar)	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D
Narkosebox Ratte	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL
Nasenmaske Ratte	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL
OPMI® Technoskop pico	Carl Zeiss, Jena, D
Verdampfer	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL
Zeiss Axio Imager M2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Zeiss AxioCam MRc	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D

Chemikalien	Hersteller
Ammoniumhydroxid-Lösung	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Anilinblau-Diamoniumsalz	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Black-Indian-Ink	Windsor & Newton TM; London, GB
Antigen-Demaskierungs-Lösung (Citratpuffer)	Vector Laboratories, Burlingame, CA
Eisen(III)-chlorid reinst., wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Elastin-Farblösung nach Weigert	Merck KG, Darmstadt, D
Eosin Y (C.I. 45380)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Essigsäure 100% reinst	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ethanol, vergällt	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz-Dihydrat reinst (2Na EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D

Ethylendiamintetraessigsäure-Tetranatriumsalz-Dihydrat reinst (4Na EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Formaldehyd-Lösung 37%	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Gelantine	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Hämatoxylin (C.I. 75290)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
ImmEdge™ Pen	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA
Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat (Alaun)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Merck KG, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KG, Darmstadt, D
Mannit	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KG, Darmstadt, D
Natriumjodat	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Natronlauge 50%	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Paraffin (Roti®-Plast)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd (PFA) reinst, DAC	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
PCNA Staining Kit	Life Technologies™, Frederick, USA
Phosphomolybdänsäurehydrat	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Pikrinsäure-Lösung	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Pikrofuchsin-Lösung nach van Gieson	Merck KG, Darmstadt, D
Ponceau BS (<i>Biebrich scarlet WS</i>)	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Roti®-Histokitt II	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Salzsäure, rauchend 37%	Merck KG, Darmstadt, D
Säurefuchsin (C.I. 42685)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D

Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Wolframatophosphorsäurehydrat	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsgruppen

4.1.1 Teilprojekt 1: Charakterisierung der Kollagenmatrizen im AV-Loop-Modell nach zwei verschiedenen Implantationsintervallen

In dem Projektteil wurden die Matrizen MatriDerm® (Gruppe A und B) und Integra™ DRT (Gruppe C und D) hinsichtlich ihrer Eignung zur Gewinnung einer durchbluteten Bindegewebslappenplastik evaluiert. Die Matrizen dienten als Träger- und Gerüstsubstanz des AV-Loop-Konstruktes. Sie wurden zu unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten hinsichtlich ihrer Angiogenesekinetik, Stabilität und Vernarbungstendenz untersucht. Die Entnahmezeitpunkte nach 14 und 28 Tagen dienten der Ermittlung des besten Zeitpunktes für die spätere Transplantation der *in vivo* generierten Lappenplastik.

Alle Tiere überstanden die Operationen gut und zeigten im postoperativen Verlauf keine Einschränkungen des Allgemeinbefindens. Sie nahmen stetig an Gewicht zu. Die implantierte Isolationskammer wurde gut toleriert und die Tiere waren am Tag der Operation lahmheitsfrei. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden keine Anzeichen einer Infektion festgestellt. Drei Tiere hatten im Beobachtungszeitraum die Isolationskammer, inklusive Inhalt, über Nacht entfernt und aufgefressen. Aufgrund dessen wurden diese drei Tiere euthanasiert und aus der Auswertung ausgeschlossen. Zur Angleichung der Anzahl in den Versuchsgruppen wurden zwei Tiere nachoperiert.

Zum Zeitpunkt der Explantation konnte bei der allgemeinen Untersuchung der Tiere keine Auffälligkeiten oder Einschränkungen des Allgemeinbefindens festgestellt werden. Die Hautnähte waren bei allen Tieren komplikationsfrei abgeheilt. Die Kammer war von einer fibrösen Kapsel überzogen. Nach Eröffnen der Kapsel über der Kammer trat eine seröse Flüssigkeit aus. Die Darstellung des Gefäßstiels verlief in allen Fällen komplikationslos. Der Inhalt der Kammer erschien weißlich bis gelblich. Bei drei Tieren war der Inhalt rötlich gefärbt. Dies war wahrscheinlich durch eine leichte Einblutung aus den Gefäßnähten bei der Platzierung der Gefäßschleife in die Kammer während der Operation bedingt. Bei einem Tier war bei der Entnahme der Deckel der Kammer leicht angehoben. In der histologischen Auswertung zeigte sich bei diesem

Tier kein Unterschied im Vergleich zur übrigen Versuchsgruppe. Sechs Tiere wurden wegen einer Thrombosierung der Gefäßschleife aus der Auswertung ausgeschlossen. Es zeigte sich dabei eine Häufung der Thrombus Bildung in Gruppe D (4/7 operierten Tieren). Von einer Fallangleichung der Gruppe D durch weitere Operationen wurde abgesehen. Dies begründete sich zum einen in den zuvor definierten Abbruchkriterien und zum anderen in der erniedrigten Gefäßbildung in Integra™ DRT im Vergleich zu MatriDerm®. Der Unterschied stellte sich bereits nach 14 Tagen deutlich dar und zeichnete sich auch nach 28 Tagen ab (Daten dargestellt unter 4.3). Beim Vergleich mittels Varianzanalyse (siehe 2.7.4) wurden alle Gruppen (A-D) eingeschlossen. Aufgrund der geringen Fallzahl (n=2) in Gruppe D konnte bei Analysen mit dieser Gruppe erwartungsgemäß kein statistisches Signifikanzniveau ermittelt werden (siehe 4.3, 4.5).

Tabelle 4.1 Versuchsgruppen Teilprojekt 1

Matrix	Gruppe	Implantationszeitspanne (d)	OPs	Ausschlusskriterium		Auswertung
MatriDerm®	A	14	n= 7	Thrombus	n=1	n= 6
	B	28	n= 9	Thrombus	n=1	n= 6
				Kammer entfernt	n=2	
INTEGRA™ DRT	C	14	n= 7			n= 7
	D	28	n= 7	Thrombus	n=4	n= 2
Kammer entfernt				n=1		

4.1.2 Teilprojekt 2: Prüfung der Eignung der vaskularisierten Bindegewebslappenplastik zur Deckung lappenpflichtiger Defekte

Für den zweiten Teil des Projektes wurden drei Gruppen untersucht, bei denen sich die Methode der Behandlung eines allschichtigen Defektes seitlich auf dem Schulterblatt unterschied. Tabelle 4.2 zeigt die Einteilung der verschiedenen Gruppen im Detail. Da in den Gruppen B und C ausschließlich eine deskriptive Analyse vorgesehen war, wurde aufgrund des 3R-Prinzips (siehe Tierschutzgesetz, Tierschutz-Versuchstierverordnung) eine kleine Fallzahl veranschlagt.

Tabelle 4.2 Versuchsgruppen Teilprojekt 2

Gruppe	Züchtungsintervall (d)	Wundbehandlung	Gefäßanschluss	Beobachtungsintervall (d)	Anzahl
A	-	konservativ	-	14	n= 10
				7	n= 5
B	14	Lappenplastik	Ja	14	n= 3
C (Sham)	-	MatriDerm® - sheet	nein	14	n= 3

Die Herstellung des AV-Loops sowie die Implantation der Isolationskammer (Gruppe B) verliefen bei allen Tieren ohne Komplikationen. Während des Zeitraumes bis zur Transplantation nach 14 Tagen verhielten sich alle Tiere unauffällig und es konnten keine Anzeichen von Infektion, Nahtdehiszenz oder sonstiger Beeinträchtigung der Tiere festgestellt werden. Die Hebung des gezüchteten Lappens und das Absetzen an seinem venösen und arteriellen Gefäßstiel gelang bei allen Tieren ohne Besonderheiten. Die Prüfung der Durchgängigkeit der AV-Loops war bei allen Tieren positiv.

Sowohl das Setzen des Defektes auf dem Schulterblatt als auch das Aufnähen des Splints und des Klettverbandes verliefen bei allen Tieren ohne Komplikationen (Gruppe A-C). Bei zwei Tieren musste der Splint im Versuchsverlauf erneuert werden, da die Tiere den Klettverschluss entfernt und den Splint beschädigt hatten. Der aufgenähte Klettverschluss musste im postoperativen Verlauf bei mehreren Tieren erneut aufgenäht werden. Die Wunden wurden dabei nicht verändert oder beeinträchtigt.

In Gruppe B wurde der gezüchtete Bindegewebslappen auf den erzeugten Defekt erfolgreich transplantiert. Als Grundlage zur Herstellung des vaskularisierten Lappens wurde MatriDerm® als Matrix verwendet. Die Präparation der rechten *A. carotis communis* und *V. jugularis externa* sowie die mikrochirurgische Gefäßnaht zum Anschluss der ausreichend langen Gefäßstiele verliefen dabei in allen Fällen komplikationslos. Bei der Entnahme konnten bei keinem der Tiere Infektionszeichen festgestellt werden. In der Kontrollgruppe A erfolgte die Wundversorgung konservativ. In der Kontrollgruppe C wurde nur MatriDerm® ohne Prävaskularisation zur Defektdeckung eingesetzt (Abbildung 4.1).

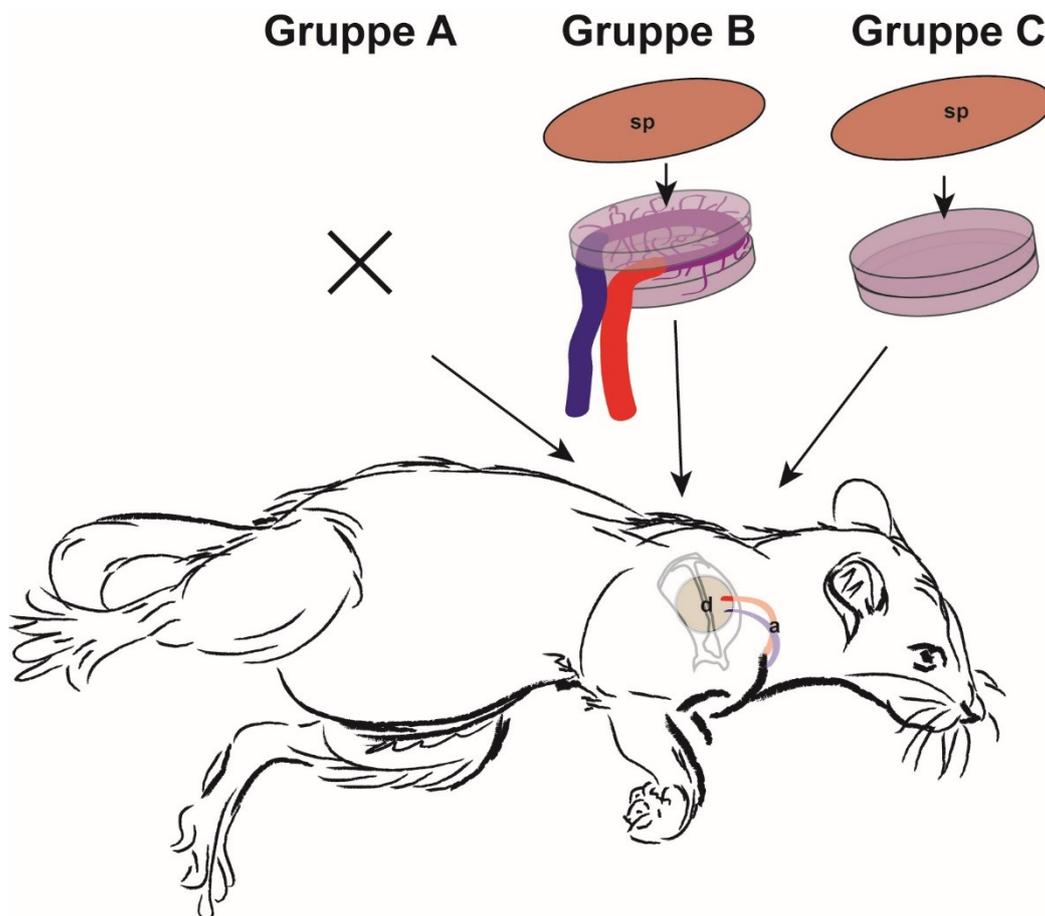


Abbildung 4.1: Schema Behandlungsvarianten des Weichteildefektes

d = Defekt mit freiliegenden Knochenstrukturen (Gruppe A-C);

a = umgelagerte Anschlussgefäße (Gruppe B); sp = Spalthauttransplantat

Die Entnahme der Spalthaut (Gruppe B, C) verlief bei allen Tieren komplikationsfrei. Die Entnahmestellen wiesen geringgradige kapillare Blutungen aus der tiefen Dermis auf. Sie heilten unter Krustenbildung nach 14 Tagen vollständig ab. Bei einem Tier verfärbte sich das Spalthauttransplantat im Verlauf des Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen rötlich bis schwarz. Bei allen Tieren trat aus den Öffnungen der gestichelten Spalthaut während des Beobachtungsintervalls seröse Flüssigkeit aus, die zur Bildung von Krusten auf dem Spalthauttransplantat führte.

Die Fotodokumentation des Heilungsprozesses an den Tagen 0, 2, 5, 7, 10, 12 und 14 verlief ohne Komplikationen. Bei der Entnahme gelangen die Präparation der Bauchgefäße und die anschließende Reperfusion mit Indian-Ink erfolgreich. Die Explantationen zur nachfolgenden histologischen Untersuchung fanden 7 oder 14 Tage nach Setzen des Weichteildefekts statt (siehe Abbildung 4.2).

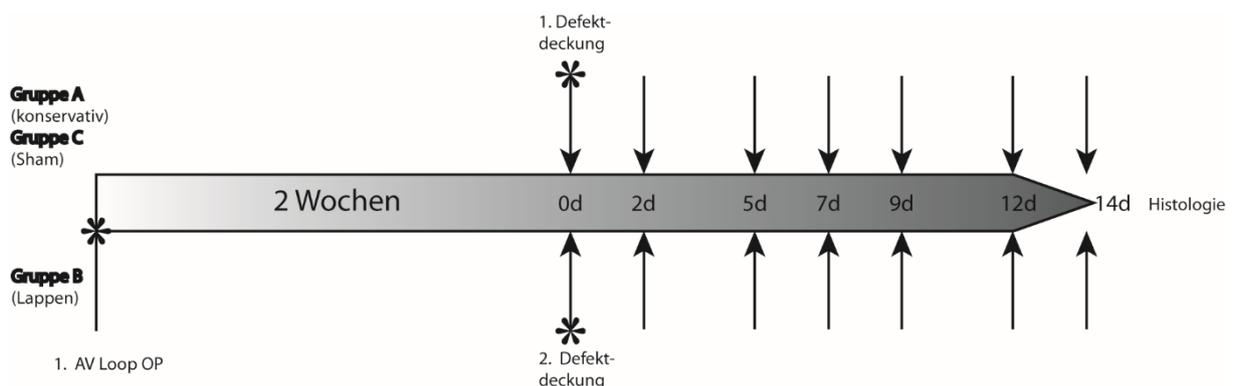


Abbildung 4.2: Zeitlicher Ablauf von Teilprojekt 2

4.2 Verwendung einer Kollagenmatrix zur *in vivo* Generierung einer vaskularisierten Bindegewebslappenplastik

Nach Betrachtung der makroskopischen Beschaffenheit der entnommenen AV-Loop-Konstrukte erfolgte die morphologische Beurteilung und deskriptive Beschreibung durch die Analyse der Hämatoxylin-Eosin(HE)- und Masson-Trichrom(MT)-Färbung. Zusätzlich wurde die Elastika-van-Gieson-Färbung zur Beurteilung herangezogen. Es wurden mehrere Ebenen betrachtet, und diese im Hinblick auf die Migration von inflammatorischen Zellen und von Fibroblasten in die Matrix beurteilt. Weiterhin wurden das Kollagenprofil und der Umbauprozess der

Matrix histologisch verifiziert. Die mit Indian-Ink-Farbstoff gefüllten Gefäße stellten sich in den histologischen Schnitten schwarz dar.

4.2.1 Eignung von MatriDerm® als Trägermatrix im AV-Loop-Modell

Makroskopisch wiesen die entnommenen Konstrukte nach zwei Wochen eine weiße bis rötliche Färbung der Matrix auf. Die Konsistenz war weich-elastisch. Die Beschaffenheit der Matrix war unverändert im Vergleich zum Implantationszeitpunkt und füllte die Kammer ganz aus.

Bei allen Konstrukten fand sich histologisch nach zwei Wochen eine noch erkennbare Abgrenzung der Matrixschichten mit gleichmäßiger Struktur. Die ursprüngliche Struktur der Matrix war weitestgehend erhalten. Im Zentrum waren das Einwachsen von Granulations- und Bindegewebe sowie Anzeichen von Degradation der Matrix sichtbar (Abbildung 4.4 A). Der AV-Loop war von einem zellreichen Fibrinkoagulat umgeben, das auch Kollagenfasern enthielt. In den vorderen Ebenen, nahe am Eingang der Kammer, war die Gefäßneubildung des arteriellen Stielgefäßes im Vergleich zur direkten Umgebung des venösen Stielgefäßes weniger ausgeprägt. In den hinteren Ebenen, in denen das venöse Interponat angeschnitten war, zeigte sich dagegen eine homogene Verteilung der neugebildeten Gefäße um die Hauptachse. Gefäße unterschiedlichen Kalibers waren gleichmäßig in die Matrix eingewachsen und füllten das Zentrum der Konstrukte aus. Die äußersten Seitenränder der Konstrukte waren bis auf wenige Fibroblasten und Makrophagen zellarm und nach 14 Tagen noch nicht vaskularisiert, was in Abbildung 4.4 A sichtbar wird. Die Kollagenfasern zeichneten sich gegen das rot angefärbte, exsudierte Fibrin und das einwachsende Bindegewebe ab. Entlang der quervernetzten Kollagenfasern der Matrix, die sich in der MT-Färbung blau darstellten, befanden sich Fibroblasten umgeben von Fibrin und Granulationsgewebe, was in Abbildung 4.5 repräsentativ dargestellt wird. In der Elastika-van-Gieson-Färbung imponierten im ganzen Konstrukt schwarz angefärbte elastische Fasern. Die Verteilung entsprach dabei der ursprünglichen Morphologie von MatriDerm® (siehe Abbildung 4.6 A, C). Das angeschnittene, axiale Hauptgefäß des Loops, als auch die neugebildeten Gefäße größeren Kalibers wiesen eine *Lamina elastica* auf (siehe Abbildung 4.6). In der Umgebung der Gefäße traten als inflammatorische Begleiterscheinung neben Fibroblasten eingewanderte Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten,

Makrophagen und Lymphozyten auf, wie in Abbildung 4.5 erkennbar ist. In die Matrix eingewanderte Erythrozyten waren ebenfalls sichtbar.

Bei der Entnahme nach vier Wochen wiesen die AV-Loop-Konstrukte deutliche makroskopische Veränderungen auf. Das Gewebe war weich-elastisch und hatte an Volumen abgenommen. Es bestand ein Abstand der Seitenränder des Gewebes zur Innenwand der Kammer von ca. 1-3 mm, und das Gewebe füllte die Kammer auch in der Höhe nicht mehr vollständig aus (siehe auch Abbildung 4.3).

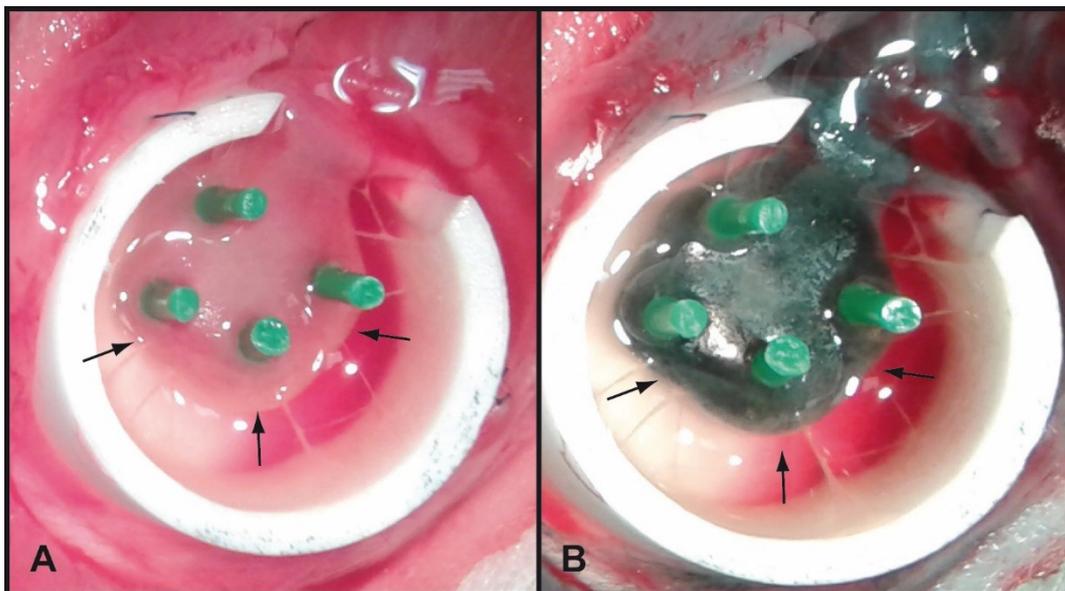


Abbildung 4.3: MatriDerm®-Konstrukt nach vier Wochen

Repräsentative Darstellung des makroskopischen Befunds des Kammerinhalts nach 28 Tagen bei Verwendung von MatriDerm® als Trägermatrix vor (A) und nach (B) der Reperfusion mit Indian-Ink

Pfeile zeigen den Rand des bindegewebigen Konstruktes um den AV-Loop

Histologisch hatte nach einer Zeitspanne von vier Wochen eine vollständige Denaturierung der MatriDerm®-Matrix stattgefunden. Die ursprüngliche Schichtung der beiden Matrixblätter war nicht mehr erkennbar und das ganze Konstrukt gleichmäßig mit kollagenhaltigem Bindegewebe durchwachsen. Sowohl in der Peripherie als auch im Zentrum hatte eine Besiedlung mit Zellen stattgefunden. Als vorherrschender Zelltyp konnten Fibroblasten und -zyten identifiziert werden. In geringerer Anzahl waren Makrophagen, und zum Teil auch Erythrozyten erkennbar. Das gesamte Gewebe war gleichmäßig mit Gefäßen durchwachsen. Im Vergleich zeigten sich nach

vier Wochen Gefäße von größerem Kaliber als nach zwei Wochen, bei denen zum Teil arterielle Gefäßtypen anhand der Wandstruktur mit einer gefalteten *Lamina elastica interna et externa* sowie das Vorhandensein einer *Lamina muscularis* ausgemacht werden konnten (Abbildung 4.5). Die elastischen Fasern waren gleichmäßig im gesamten Konstrukt erhalten geblieben.

4.2.2 Eignung von Integra™ DRT als Trägermatrix im AV-Loop-Modell

Die makroskopische Beschaffenheit von Integra™ DRT als Matrix war nach zwei Wochen Implantationszeitspanne unverändert. Sie füllte die Kammer gleichmäßig aus und hatte eine gelbliche-weiße Farbe. Die Konsistenz der Konstrukte war weich-elastisch. Beim histologischen Screening waren die Anteile der einzelnen Integra™ DRT Schichten noch abgrenzbar. Die Kollagenfasern der Matrix waren in der MT-Färbung noch eindeutig identifizierbar und die inneren beiden (von insgesamt vier Layer) Schichten vereinzelt mit Zellen besiedelt. In den äußeren Schichten befanden sich keine Zellen (Abbildung 4.4 B). Der AV-Loop war in unmittelbarer Nähe von neugebildetem Granulationsgewebe, bestehend aus Fibrin und Fibroblasten, sowie von inflammatorischen Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten und von kleinen Gefäßen umgeben (Abbildung 4.5). Das Granulationsgewebe war nur wenig in die Matrix eingewachsen. Letztere schien durch das neugebildete Gewebe leicht angehoben und war deutlich abgrenzbar. Neugebildete Gefäße befanden sich nahezu ausschließlich im gebildeten Granulationsgewebe, während in den Zwischenräumen der Matrix nur vereinzelt in unmittelbarer Umgebung des Loops Gefäße auffindbar waren.

Integra™ DRT hatte als *scaffold* nach vier Wochen seine makroskopische Morphologie beibehalten. Es hatte keine sichtbare Volumenreduktion stattgefunden, und das Konstrukt füllte die Kammer nach wie vor vollständig aus. Das Gewebe war weiß-gelblich und von weich-elastischer Konsistenz. Histologisch zeichnete sich die Schichtung der vier verwendeten Matrixblätter weiterhin erkennbar ab (Abbildung 4.4 D). Die ursprüngliche Morphologie von Integra™ DRT konnte sowohl in der HE-Färbung als auch in der MT-Färbung an den Kollagenfasern identifiziert werden. Das angeschnittene Hauptgefäß war von Granulationsgewebe umgeben, das teilweise in die Zwischenräume der innen gelegenen Schichten der Kollagenmatrix einwuchs. In diesen Bereichen fand sich eine geringe Degradation der Matrix. Das

Granulationsgewebe wies kollagenhaltige Fasern und eine hohe Zelldichte auf. Die Verteilung der Gefäße konzentrierte sich auf das Granulationsgewebe in der zentralen Umgebung des Loops, wo der Umbau der Matrix erkennbar war. In diesen Arealen konnten als vorherrschende Zelltypen Fibroblasten und einige Makrophagen identifiziert werden. Der obere und untere Integra™ DRT-Layer war je nur vereinzelt mit Zellen besiedelt und wies keine Gefäße auf. In der Elastika-van-Gieson-Färbung imponierten elastische Fasern analog zur ursprünglichen Morphologie von Integra™ DRT und die Ausbildung einer *Lamina elastica* in den größeren, neu entstandenen Gefäßen war zu erkennen (Abbildung 4.6 B, D).

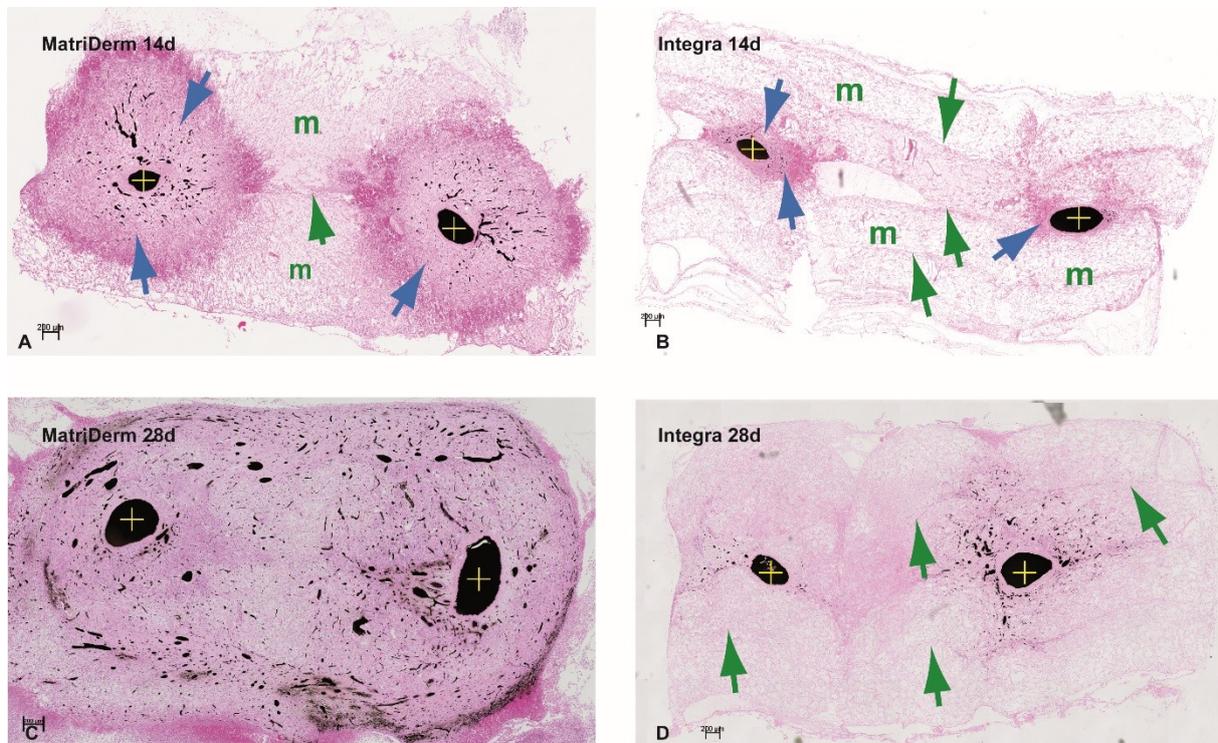


Abbildung 4.4: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der AV-Loop-Konstrukte

Repräsentative Darstellung der Übersichtsfärbungen. Die Schichtung der Matrizen (grüner Pfeil) ist im MatriDerm®-Konstrukt nach 14 Tagen (A) und im Integra™-Konstrukt nach 14 und nach 28 Tagen (B, D) erkennbar. Die ursprüngliche Struktur der jeweiligen Matrix (m) ist bei allen Gruppen, mit Ausnahme von MatriDerm® nach 28 Tagen (C), noch erhalten. Die Umbauprozesse (blauer Pfeil) schreiten von der direkten Umgebung des AV-Loops aus im Zeitverlauf weiter voran, wobei in MatriDerm® (A, C) auch die peripheren Anteile erreicht werden.

Querschnitte des angeschnittenen AV-Loops (+) und neugebildete Gefäße stellen sich schwarz dar

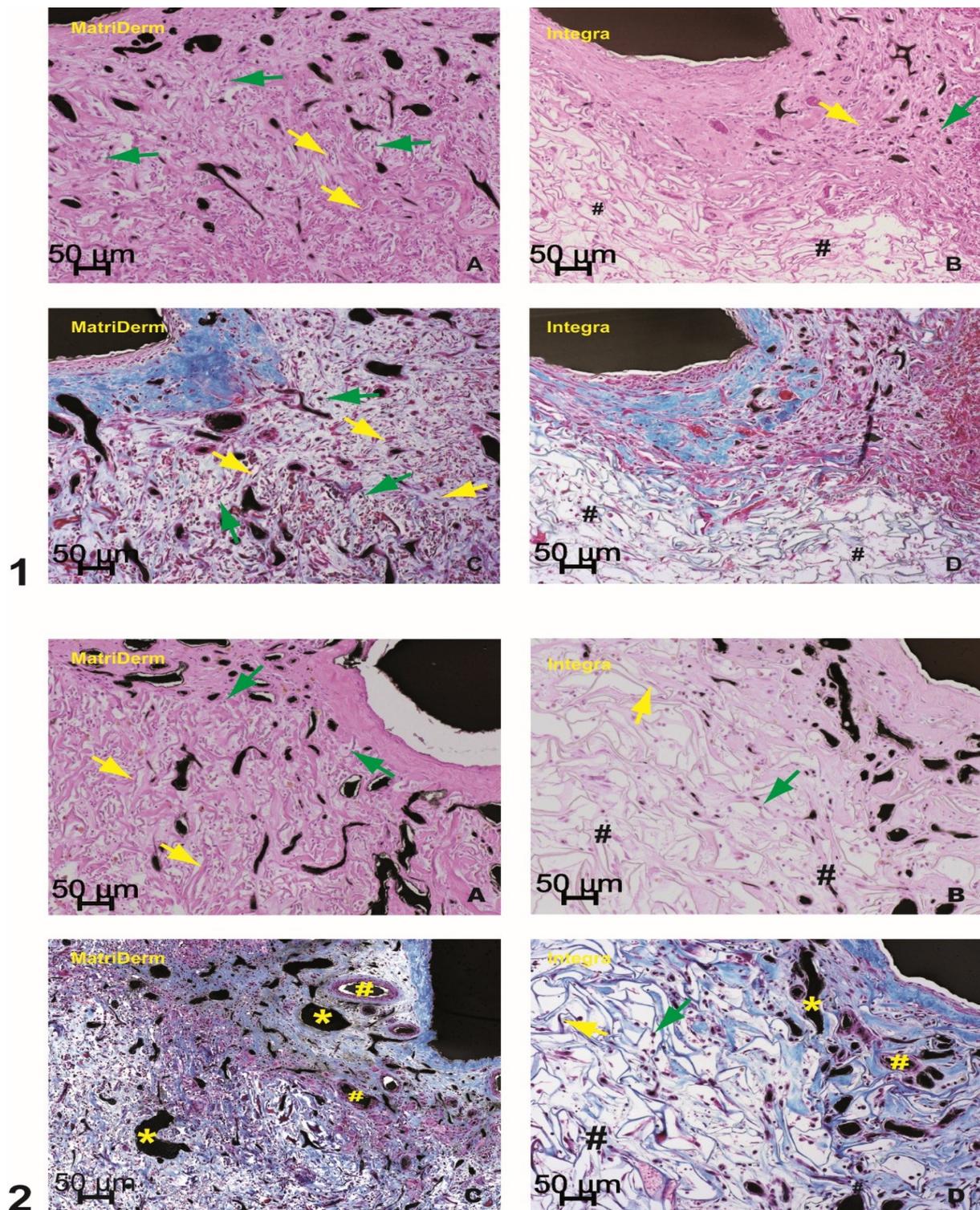


Abbildung 4.5: Ausschnitte Hämatoxylin-Eosin- und Masson-Trichrom-Färbung

Repräsentative Darstellung von Ausschnitten der AV-Loop-Konstrukte (Anschnitt des Loops jeweils links (1) oder rechts (2) oben sichtbar) nach 14 (1) und 28 (2) Tagen

= urspr. Matrixstruktur, gelbe Pfeile = Fibroblasten, grüne Pfeile = Granulozyten, schwarz = Gefäße des arteriellen (#, gelb) und venösen (*) Typs

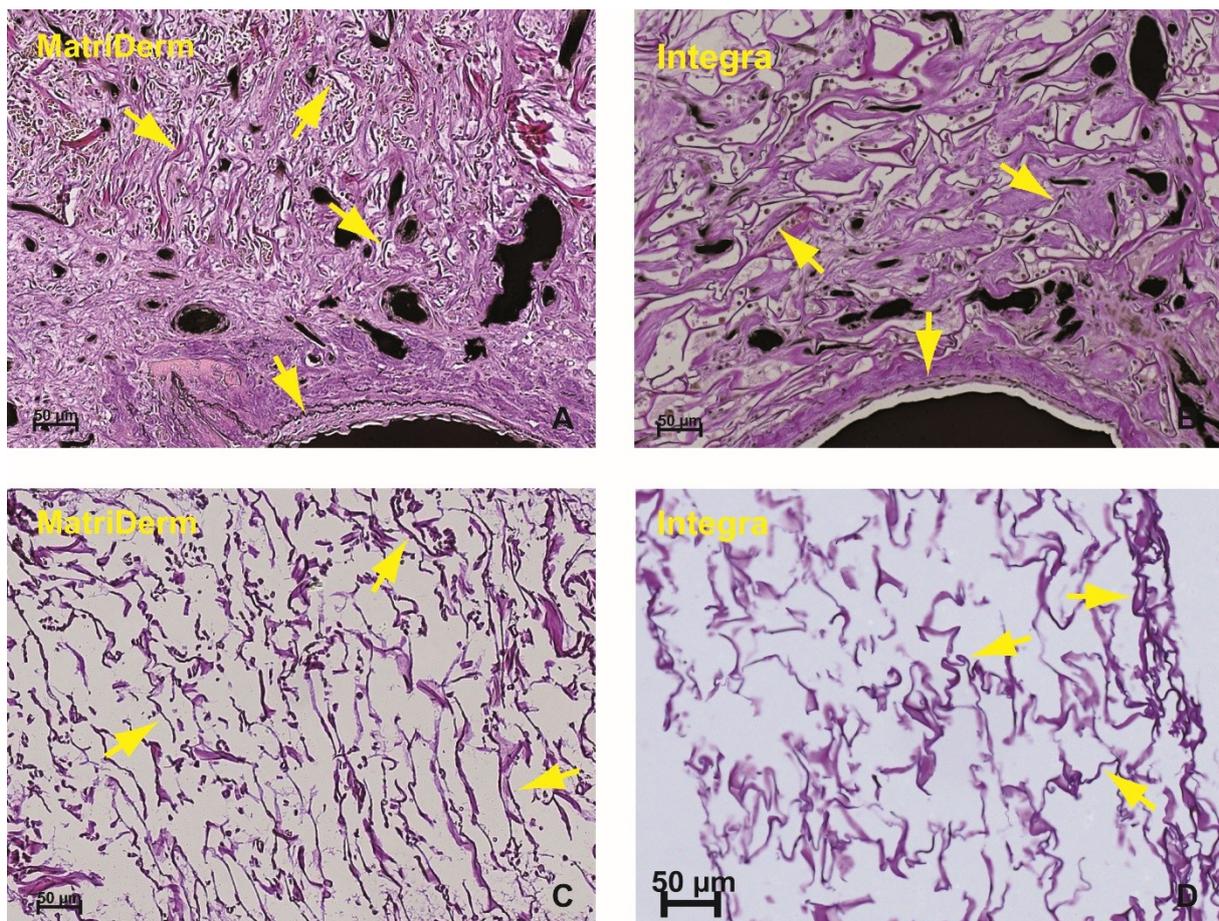


Abbildung 4.6: Ausschnitte Elastika-van-Gieson-Färbung

Repräsentative Darstellung von Ausschnitten der AV-Loop-Konstrukte nach 28 Tagen (A, B) und der unbehandelten Matrizen (C, D). In allen Proben lag eine vergleichbare Verteilung der elastischen Fasern (Pfeile) vor. In den AV-Loop-Konstrukten war die *Lamina elastica* der Gefäße sichtbar (A + B Anschnitt des AV-Loops unten im Bild)

4.3 Vaskularisation der Matrix in Abhängigkeit des Implantationsintervalles

Die Kinetik der Angiogenese wurde nach zwei und vier Wochen mit Hilfe eines automatisierten Algorithmus quantitativ evaluiert (siehe 2.7.3). Es wurden anhand der zweidimensionalen Paraffinschnitte sowohl die Anzahl der neugebildeten Gefäße innerhalb des AV-Loop-Konstruktes, als auch die gebildete Gefäßfläche ermittelt.

4.3.1 Angiogenesekinetik von MatriDerm®

Nach einem Implantationsintervall von 14 Tagen war eine deutliche Bildung von Gefäßen ausgehend vom AV-Loop detektierbar. Die mittlere Gesamtzahl der Gefäße

pro Schnitt betrug $1312 \pm 325,1$ und die mittlere Gefäßfläche $1,67 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 4.7).

Der Abstand der gebildeten Gefäße zu der Hauptachse des AV-Loops (im Folgenden als Hauptachse bezeichnet) wurde zusätzlich ermittelt. Dadurch konnte das Verteilungsmuster innerhalb des gesamten Konstruktes abgebildet werden, das in Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9 dargestellt ist.

Nach 14 Tagen betrug in einem Radius von 200 μm um die Hauptachse die Gefäßdichte $4,24 \times 10^{-5} \pm 2,43 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2$. Zwischen 201 μm und 400 μm hatte die Dichte auf $3,7 \times 10^{-4} \pm 1,01 \times 10^{-4} / \mu\text{m}^2$ zugenommen. Die höchste Gefäßdichte ($5 \times 10^{-4} \pm 1,01 \times 10^{-4} / \mu\text{m}^2$) bestand 401-600 μm von der Hauptachse entfernt. Weiter peripher nahm die Gefäßanzahl stetig ab (600-800 μm : $4,01 \times 10^{-4} \pm 1,22 \times 10^{-4} / \mu\text{m}^2$; 801-1000 μm : $2,54 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4} / \mu\text{m}^2$; 1001-1200 μm : $8,67 \times 10^{-5} \pm 2,57 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2$; 1201-1400 μm : $3,05 \times 10^{-5} \pm 1,07 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2$; 1401-1600 μm : $1,04 \times 10^{-5} \pm 3,9 \times 10^{-6} / \mu\text{m}^2$). 1601-1800 μm entfernt zur Hauptachse war lediglich noch eine Gefäßdichte von $1,17 \times 10^{-6} \pm 8,09 \times 10^{-7} / \mu\text{m}^2$ detektierbar.

Die mittlere Gefäßanzahl war nach 28 Tagen gegenüber 14 Tagen signifikant ($p=0,0039$) angestiegen auf $4053 \pm 583,7$ (Abbildung 4.7 A). Dieser 3,1-fache Anstieg fiel geringer aus als die Zunahme der mittleren Gesamtgefäßfläche ($6,68 \times 10^5 \pm 1,06 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; Abbildung 4.7 B). Im Vergleich zu 14 Tagen hatte diese ebenfalls deutlich zugenommen (4-fach; $p=0,0041$). Die Gefäßdichte im Umkreis von 200 μm zur Hauptachse blieb im Vergleich zu 14 Tagen unverändert (siehe Abbildung 4.8). In den sich anschließenden Arealen fand sich dagegen jeweils eine höhere Gefäßdichte, wie aus Abbildung 4.8 hervorgeht. Die maximale Gefäßdichte trat nach 28 Tagen wie auch bereits nach 14 Tagen 401-600 μm von der Hauptachse entfernt ($6,61 \times 10^{-4} \pm 7,21 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2$) auf. Eine Verdopplung der Gefäßdichte wurde 801-1000 μm^2 ($4,97 \times 10^{-4} \pm 5,73 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2$) von der Hauptachse entfernt ermittelt. Der Anstieg der Gefäßdichte im Vergleich zu 14 Tagen war in den peripheren Arealen deutlich stärker ausgeprägt als im Zentrum (1001-1200 μm : 5,4-fach, $4,65 \times 10^{-4} \pm 6,79 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2$; 1201-1400 μm : 10-fach, $3,14 \times 10^{-4} \pm 7,71 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2$; 1401-1600 μm : 22-fach, $2,26 \times 10^{-4} \pm 6,85 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2$). Im äußersten Randbereich der AV-Loop-Konstrukte, der einen Abstand von 1601-1800 μm zur Hauptachse hatte, nahm die Gefäßdichte nach 28 Tagen ($4,94 \times 10^{-5} \pm 1,58 \times 10^{-5} / \mu\text{m}^2$) im Vergleich zu 14 Tagen

sogar um den Faktor 42 zu. In Abbildung 4.9 wird eine erhöhte Vaskularisation der peripheren Areale nach 28 Tagen deutlich.

4.3.2 Angiogenesekinetik von Integra™ DRT

In den Integra™ DRT-Konstrukten betrug die mittlere Gefäßzahl nach 14 Tagen $530 \pm 116,9$ mit einer Gefäßfläche von $5,87 \times 10^4 \pm 1,61 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (siehe auch Abbildung 4.7). Die höchste Dichte an gebildeten Gefäßen fand sich zwischen 201-400 μm Entfernung zur Hauptachse ($3,35 \times 10^{-4} \pm 3,89 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$). 401-600 μm von der Hauptachse entfernt befand sich eine davon nur geringgradig abweichende Gefäßdichte ($2,72 \times 10^{-4} \pm 5,44 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$). Im angrenzenden Areal (601-800 μm : $1,13 \times 10^{-4} \pm 4,16 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$) fiel die Gefäßdichte im Vergleich zur nahen Umgebung zur Hauptachse bereits um die Hälfte niedriger aus. In den weiter peripher gelegenen Bereichen nahm die Gefäßdichte stetig ab (801-1000 μm : $5,29 \times 10^{-5} \pm 2,26 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$; 1001-1200 μm : $2,53 \times 10^{-5} \pm 1,13 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$; 1201-1400 μm : $1,02 \times 10^{-5} \pm 5,63 \times 10^{-6}/\mu\text{m}^2$; 1401-1600 μm : $3,03 \times 10^{-6} \pm 2,13 \times 10^{-6}/\mu\text{m}^2$; 1601-1800 μm : $1,34 \times 10^{-7} \pm 1,34 \times 10^{-7}/\mu\text{m}^2$), was in Abbildung 4.8 dargestellt wird.

Nach 28 Tagen hatte sich bei Integra™ DRT-Konstrukten die Gesamtgefäßanzahl ($1637 \pm 510,5$) gegenüber 14 Tagen signifikant ($p=0,0428$; Abbildung 4.7 A) um das 3,1-fache erhöht. Die Gefäßfläche ($3,27 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) war ebenfalls deutlich ($p=0,0070$; Abbildung 4.7 B) gestiegen. Die Zunahme betrug ein 5,6-faches der mittleren Gefäßfläche nach 14 Tagen.

Die höchste Gefäßdichte verschob sich nach 28 Tagen weiter von der Hauptachse weg (Abstand 401-600 μm : $4,12 \times 10^{-4} \pm 4,35 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$). Ein Anstieg der Gefäßdichte um mehr als das Doppelte im Vergleich zu 14 Tagen wurde in den angrenzenden Arealen ermittelt (601-800 μm : 2,7-fach, $3,08 \times 10^{-4} \pm 1,57 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$; 801-1000 μm : 4,8-fach, $2,53 \times 10^{-4} \pm 4,95 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$; 1001-1200 μm : 7,4-fach $1,87 \times 10^{-4} \pm 5,15 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$). Eine deutlich höhere Gefäßdichte im Gegensatz zu 14 Tagen fand sich auch in den peripher liegenden Bereichen (1201-1400 μm : 11,5-fach, $1,17 \times 10^{-4} \pm 4,57 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$; 1401-1600 μm : 24,8-fach, $7,53 \times 10^{-5} \pm 4,67 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$; 1601-1800 μm : 96,4-fach, $1,29 \times 10^{-5} \pm 1,1 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$). Dennoch befand sich, trotz der starken Zunahme der Gefäßdichte nach 28 Tagen, in den peripheren Randbereichen aufgrund der bereits geringen Gefäßdichten nach

14 Tagen eine geringe Vaskularisation (Entfernung >1000 μm : Gefäßdichte $<2 \times 10^{-4}/\mu\text{m}^2$), die in Abbildung 4.9 idealisiert dargestellt wird.

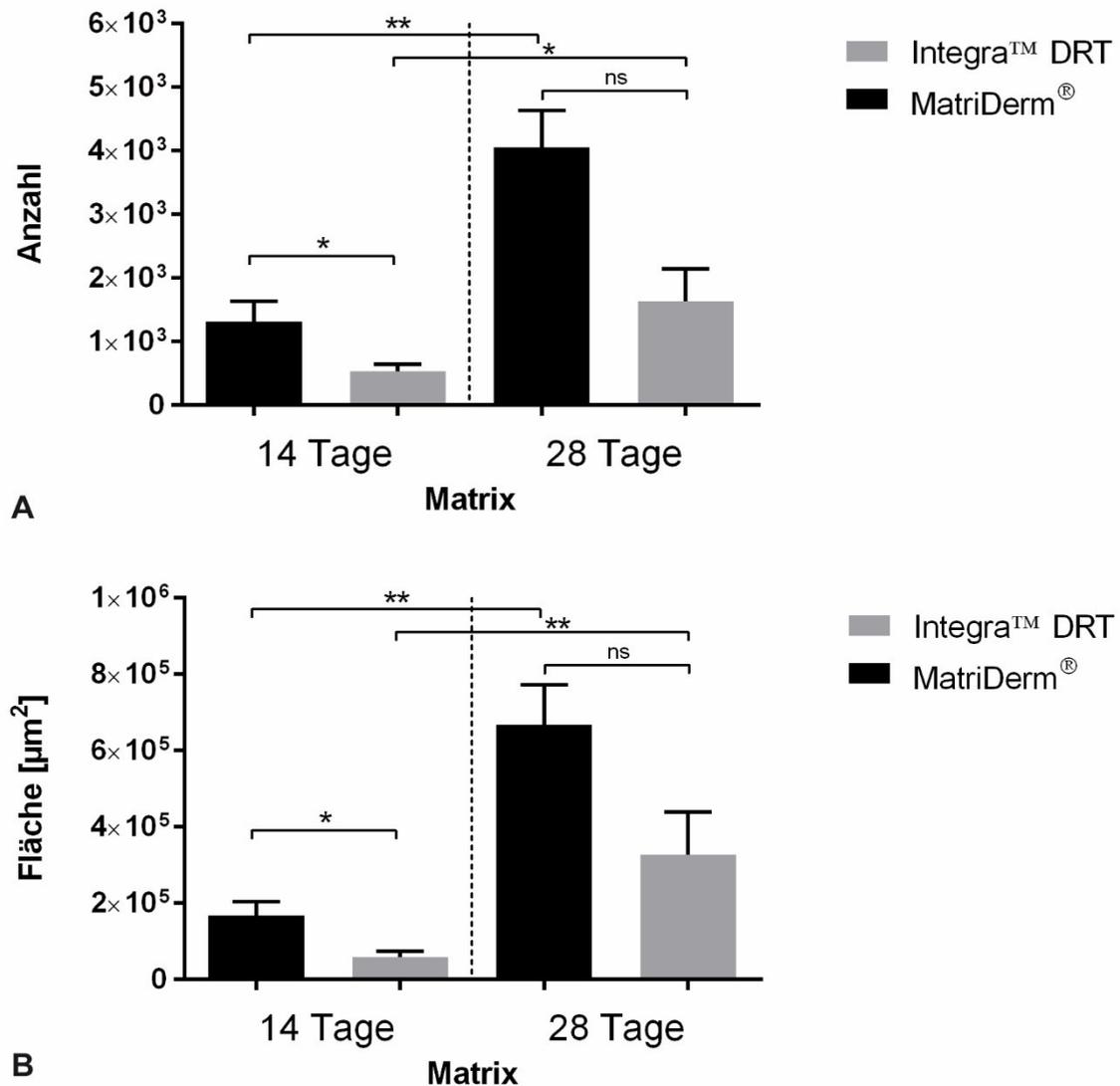


Abbildung 4.7: Gefäßbildung in AV-Loop-Konstrukten

Quantitative Analyse der Angiogenese mit Angaben der Gefäßanzahl (A) und der Gefäßfläche (B) unter Verwendung von Integra™ DRT und MatriDerm® nach 14 (links) und 28 (rechts) Tagen

** = $p < 0,005$ * = $p < 0,05$ ns = $p > 0,05$; für die Berechnung des statistischen Signifikanzniveaus wurden die Werte jeweils dekadisch logarithmiert

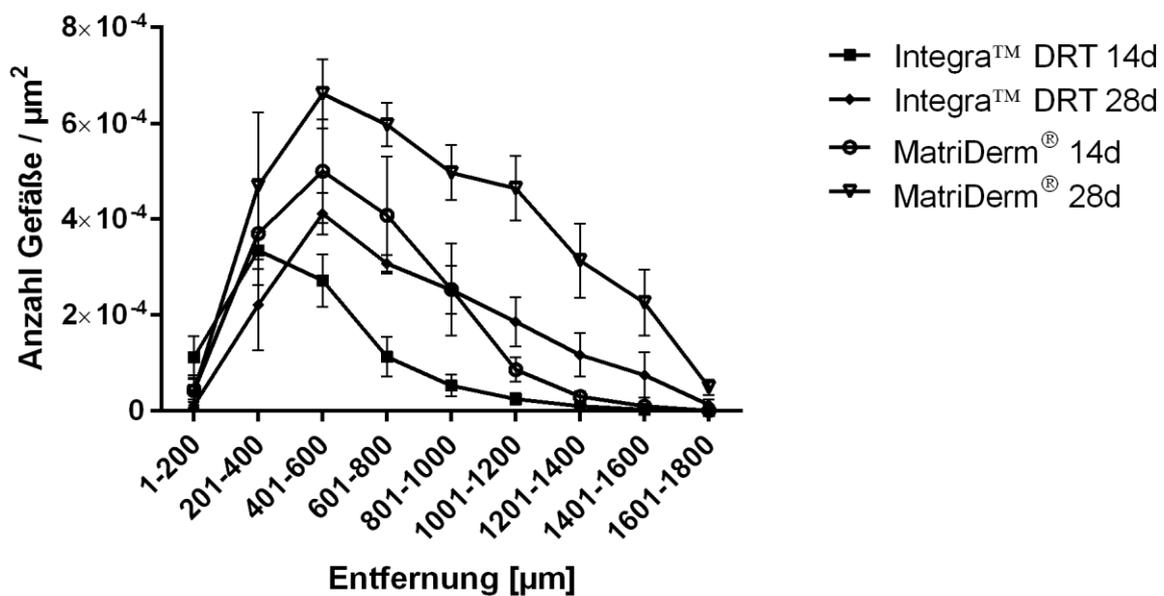


Abbildung 4.8: Verteilung der gebildeten Gefäße

Gefäßdichte innerhalb der AV-Loop-Konstrukte in Relation zum Abstand der Gefäßhauptachse nach 14 und 28 Tagen

4.3.3 Angiogenesekinetik der Matrizen im Vergleich

Nach zwei Wochen hatten sich in den MatriDerm®-Konstrukten wesentlich ($p=0,0296$) mehr Gefäße (2,5-fach) gebildet als in der Integra™ DRT-Gruppe (Abbildung 4.7). Die Gesamtgefäßfläche, die sich innerhalb der 14 Tage gebildet hatte, lag in MatriDerm® ebenfalls deutlich (2,9-fach; $p=0,0204$) über der gebildeten Gefäßfläche in Integra™ DRT.

Die maximale Gefäßdichte war in MatriDerm® um das 1,7-fache ($p=0,0403$) gegenüber Integra™ DRT erhöht. Während in der Integra™ DRT-Gruppe die maximale Gefäßdichte im Zentrum lokalisiert war, befand sie sich in der MatriDerm®-Gruppe bereits weiter peripher. Die an diese Bereiche anschließenden Areale der Peripherie wiesen in MatriDerm® ebenfalls eine stärkere Vaskularisation im Vergleich zu der Integra™ DRT-Gruppe auf (siehe Abbildung 4.8).

Nach 28 Tagen hatte die maximale Gefäßdichte in der MatriDerm®-Gruppe zugenommen, wobei keine örtliche Verschiebung stattgefunden hatte. In der Integra™ DRT-Gruppe dagegen befand sich die maximale Gefäßdichte nach 28 Tagen im Vergleich zu 14 Tagen weiter peripher lokalisiert. Obwohl die gefäßreichsten Areale

somit nach 28 Tagen keine räumliche Differenz mehr aufwiesen, unterschied sich die jeweils höchste Dichte an Gefäßen weiterhin deutlich ($p=0,0327$) zwischen MatriDerm[®] und Integra[™] DRT aufgrund der starken Gefäßzunahme in MatriDerm[®]. So wies die Peripherie der MatriDerm[®]-Konstrukte eine gleichmäßige Vaskularisation auf (siehe Abbildung 4.9, MatriDerm[®] 28 Tage), während sich die peripheren Areale in den Integra[™] DRT-Konstrukten weitestgehend avaskulär zeigten (siehe Abbildung 4.9, Integra 28 Tage). Dies äußerte sich in der quantitativen Analyse in einer deutlich erniedrigten Gefäßdichte der Integra[™] DRT-Konstrukte gegenüber den MatriDerm[®]-Konstrukten (Abbildung 4.8).

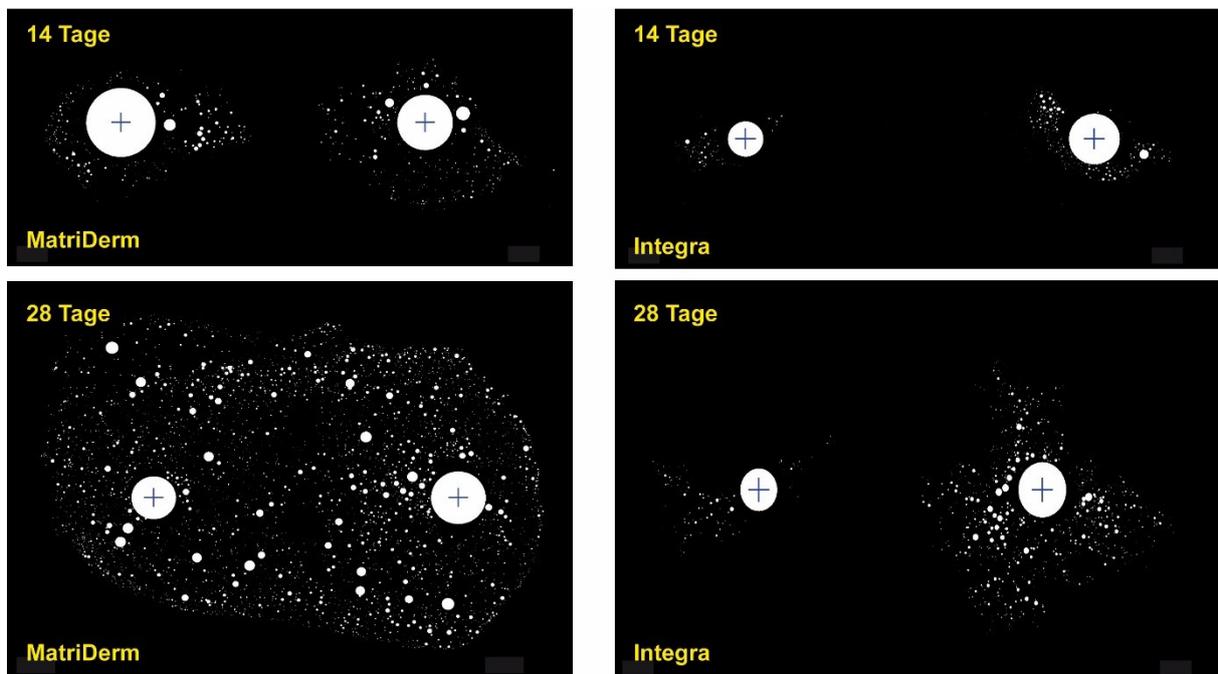


Abbildung 4.9: Gefäßverteilung ausgehend von der AV-Loop-Achse

Repräsentative Darstellung (als sog. *ideal map*) der neugebildeten Gefäße (weiß) nach räumlicher Analyse mit automatisiertem 2D-Algorithmus (2 große Weißflächen jeweils Anschnitte des AV-Loops)

Die Gesamtgefäßzahl hatte in MatriDerm[®] und in Integra[™] DRT zwischen dem 14. Tag und dem 28. Tag gleichsam zugenommen (3-fach), wobei MatriDerm[®] eine höhere Gesamtgefäßzahl aufwies als Integra[™] DRT (Unterschied an Tag 28 >2400 Gefäße; $p=0,1977$). Die Gesamtgefäßfläche in der MatriDerm[®]-Gruppe betrug im Vergleich zu der Integra[™] DRT-Gruppe das Doppelte (Unterschied an Tag 28 > $3,4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0,5844$).

4.4 Elastizitätsmodul der Kollagenmatrizen

Zur Beurteilung der mechanischen Eigenschaften der kollagenhaltigen Matrizen wurden Elastizitätsmessungen durchgeführt (siehe 2.4). Bei der Matrix Integra™ DRT zeichnete sich bei einer Dehnung zwischen 3-15% ein linearer Verlauf der Spannungs-Dehnungskurve ab (=linear-elastisches Verhalten), anhand dessen der Elastizitätsmodul bestimmt wurde. MatriDerm® dagegen zeigte über die gesamte Strecke der durchgeführten Dehnung (bis 30%) ein linear-elastisches Verhalten. Die daraus resultierende lineare Steigung der Regressionsgeraden über den gesamten Kurvenverlauf wurde zur Ermittlung des Elastizitätsmoduls der Matrix herangezogen.

MatriDerm® hatte ein mittlerer Elastizitätsmodul von 51,3 kPa. Für Integra™ DRT war im Vergleich dazu eine geringere Kraftaufwendung für eine identische Dehnung der Matrix notwendig. Daraus resultierte ein niedriger Wert des mittleren Elastizitätsmoduls ($E=28,5$ kPa) für Integra™ DRT. Der Vergleich der jeweiligen Regressionsgeraden (mittels einfacher Regressionsanalyse; siehe auch 2.7.4) ergab eine deutliche ($p=0,014$) Abweichung des Steigungsverlaufs der Matrizen. Dies äußerte sich im Spannungs-Dehnungsdiagramm in einem flachen Kurvenverlauf des elastischen Bereiches von Integra™ DRT. Im Gegensatz dazu stieg die Spannungs-Dehnungskurve von MatriDerm® im linear-elastischen Bereich deutlich steiler an (siehe Abbildung 4.10). Die Elastizitätsmessung mit dem Stichprobenumfang $n=2$ pro Matrix deutet darauf hin, dass der Elastizitätsmodul von Integra™ DRT tendenziell niedriger ist als derjenige von MatriDerm®. Ähnlich wie im einachsigen Zugversuch erwies sich MatriDerm® auch im haptischen Vergleich mit Integra™ DRT während den Operationen als deutlich fest-elastischere Matrix. Hierbei nahm MatriDerm® nach starker Dehnung bei anschließend vollständiger Entlastung wieder die ursprüngliche Länge an. Bei Integra™ DRT dagegen blieb bei geringem Zug nach vollständiger Entlastung eine plastische Verformung der Matrix ohne Rückerlangung der ursprünglichen Länge erhalten, und ein Reißen der Matrix trat bereits bei geringer Dehnung wesentlich früher ein als bei MatriDerm®.

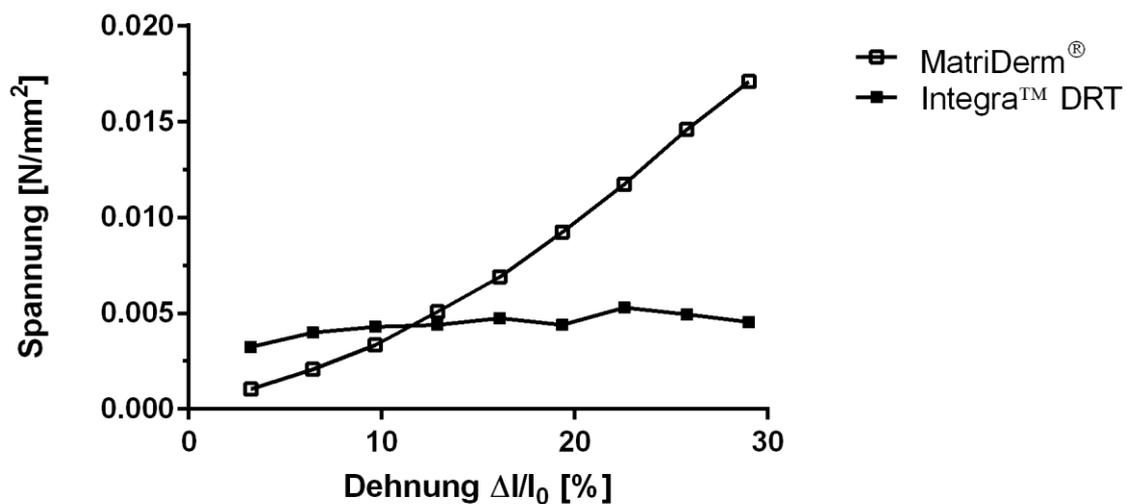


Abbildung 4.10: Spannungs-Dehnungs-Diagramm von MatriDerm® und Integra™ DRT
 Exemplarische Darstellung (n=1/Matrix) der Spannungs-Dehnungs-Kurve nach einachsigen Zugversuch mit Dual Wire Myograph 410 A
 Δl = Längenänderung und l_0 = Ausgangslänge der Matrix

4.5 Zellmigration und -proliferation der Matrix in Abhängigkeit des Implantationsintervalles

Eine Trägermatrix zur Generierung eines Gewebeersatzes muss sowohl die Vaskularisation ermöglichen als auch den migrierenden Zellen als Grundgerüst zur Anhaftung dienen. Das Potential der Kollagenmatrizen, eine strukturierte Gewebeformation bis zur Umwandlung in eine stabile, vaskularisierte Bindegewebslappenplastik zu unterstützen, wurde durch Erfassung der Zellrekrutierung und der Proliferationsrate der Zellen untersucht. Die folgenden numerischen Angaben der Zellzahlen beziehen sich jeweils auf eine Fläche von $9 \times 10^4 \mu m^2$.

4.5.1 Zellmigration und -proliferation in MatriDerm®

In den MatriDerm®-Konstrukten hatte nach 14 Tagen eine Besiedlung der Matrix mit $106,98 \pm 10,4$ Zellen im Zentrum stattgefunden, von denen 6,87% ($7,35 \pm 0,93$ Zellen) proliferierten. In der Peripherie proliferierten 8,69% ($6,19 \pm 1,03$ Zellen) der insgesamt $71,23 \pm 7,95$ Zellen (Abbildung 4.11 A).

Nach 28 Tagen befand sich im Zentrum eine 1,6-fach höhere Gesamtzellzahl ($174,31 \pm 15,68$ Zellen; $p=0,0001$) als nach 14 Tagen. Gleichzeitig war der Anteil an proliferierenden Zellen im Vergleich zu 14 Tagen angestiegen auf 19,73% ($34,4 \pm 4,47$ Zellen; $p<0,0001$). Ein 2,6-facher Anstieg ($p<0,0001$) der Gesamtzellzahl ($184,96 \pm 14,25$) nach 28 Tagen im Vergleich zu 14 Tagen fand sich in der Peripherie der Matrix (Abbildung 4.11 B). Die Proliferationsrate betrug 21,28% in der Peripherie, und war somit gegenüber 14 Tagen deutlich erhöht ($39,35 \pm 5,41$ Zellen; $p<0,0001$).

4.5.2 Zellmigration und -proliferation in Integra™ DRT

Die migrierten Zellen im Zentrum von Integra™ DRT nach 14 Tagen ($85,34 \pm 7,15$ Zellen) wiesen eine Proliferationsrate von 9,23% ($7,88 \pm 1,19$ Zellen) auf. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich in den peripheren Arealen um mehr als die Hälfte weniger Zellen ($41,04 \pm 6,8$) als im Zentrum (siehe Abbildung 4.11 A). Der Anteil an proliferierenden Zellen betrug in der Peripherie 10,7% ($4,39 \pm 0,93$ Zellen).

Nach 28 Tagen hatte sich die Gesamtzellzahl im Zentrum ($140,81 \pm 20,59$ Zellen) um ein 1,7-faches ($p=0,0466$), sowie in der Peripherie ($125,13 \pm 25,91$ Zellen) um ein 3-faches ($p=0,0004$) erhöht. Die Proliferationsrate der Zellen im Zentrum war auf 12,61% im Vergleich zu 14 Tagen angestiegen ($17,75 \pm 5,28$ Zellen; $p=0,2385$). In der Peripherie betrug der Anteil proliferativer Zellen 11,99% ($15 \pm 4,14$ Zellen; $p=0,2917$) der Gesamtzellzahl und unterschied sich somit nur gering zur Proliferationsrate nach 14 Tagen.

Aus Abbildung 4.11 wird deutlich, dass in MatriDerm® im Vergleich zu Integra™ DRT nach 28 Tagen eine verstärkte Zellrekrutierung stattgefunden hatte (Zentrum: 1,2-fach, $p=0,4387$; Peripherie: 1,5-fach, $p=0,0232$), die zu einer erhöhten Zellbesiedlung der peripheren Areale geführt hatte. Bei genauem Vergleich wiesen die MatriDerm®-Konstrukte nach 28 Tagen eine deutlich erhöhte Proliferation auf als die Integra™ DRT-Konstrukte (Zentrum: 1,9-fach, $p=0,0101$; Peripherie: 2,6-fach; $p=0,0005$).

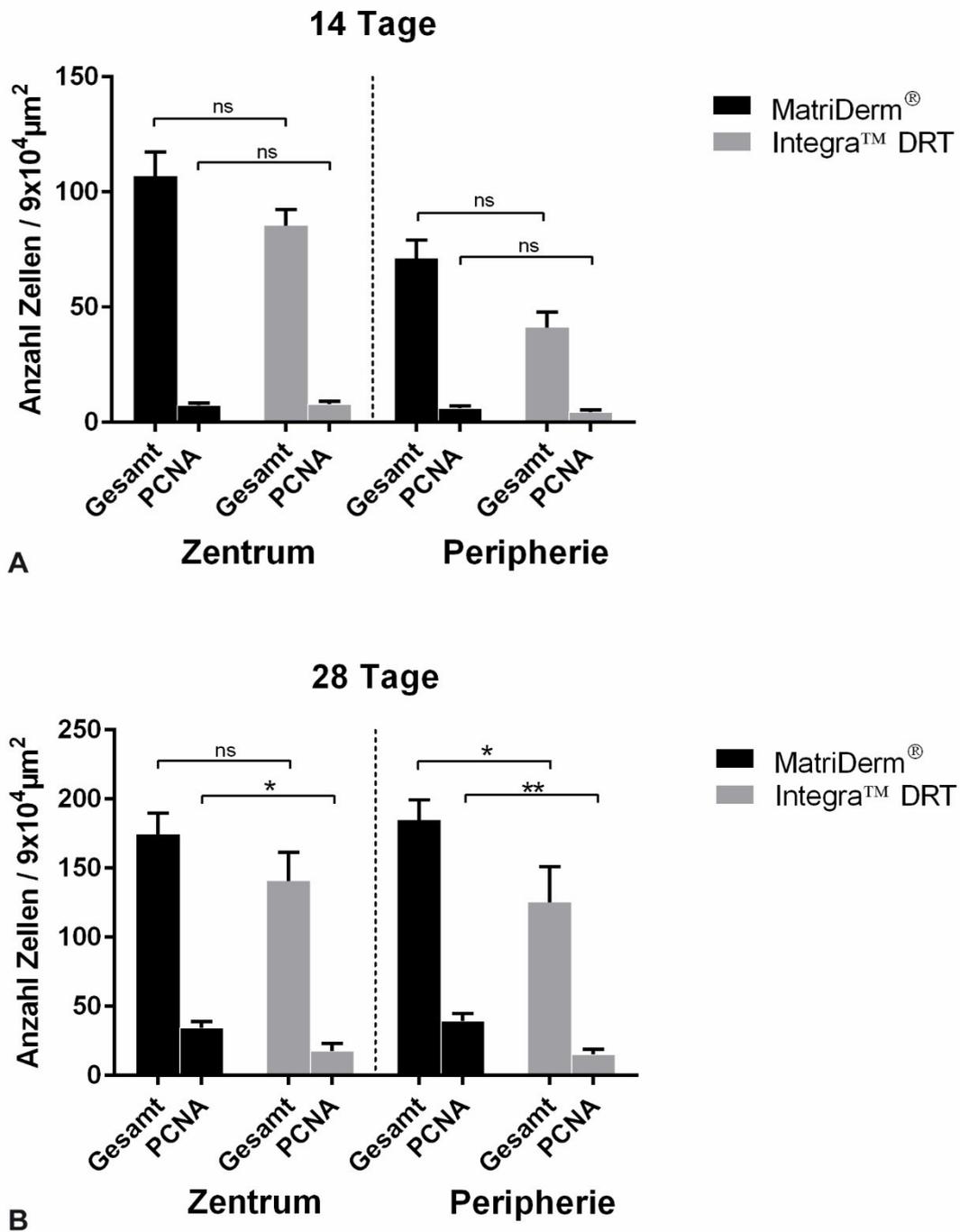


Abbildung 4.11: Zellmigration und -proliferation in AV-Loop-Konstrukten

Quantitative Analyse der Zellzahl (Gesamt) und Anteil der proliferierenden Zellen (PCNA) nach 14 (A) und nach 28 Tagen (B)

** = $p < 0,005$ * = $p < 0,05$ ns = $p > 0,05$

4.5.3 Korrelation der Gefäß- und Zelldichte

Die Korrelationsanalyse, mit Bestimmung des Korrelationskoeffizienten (r) nach Pearson, wurde für die Definition eines Zusammenhangs zwischen der ermittelten Zelldichte und der jeweiligen Gefäßdichte in den entsprechenden Bereichen herangezogen. Im Zentrum fand sich kein linearer Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der vorhandenen Zellzahl ($r=-0,2051$; $p=0,3724$). Im Gegensatz dazu zeichnete sich in der Peripherie ein positiver, linearer Zusammenhang ($r=0,6206$; $p=0,0027$) zwischen der Gefäßdichte und der Zelldichte ab (Abbildung 4.12). Ein Anstieg der Zelldichte ging hier im Mittel auch mit einer erhöhten Gefäßbildung einher.

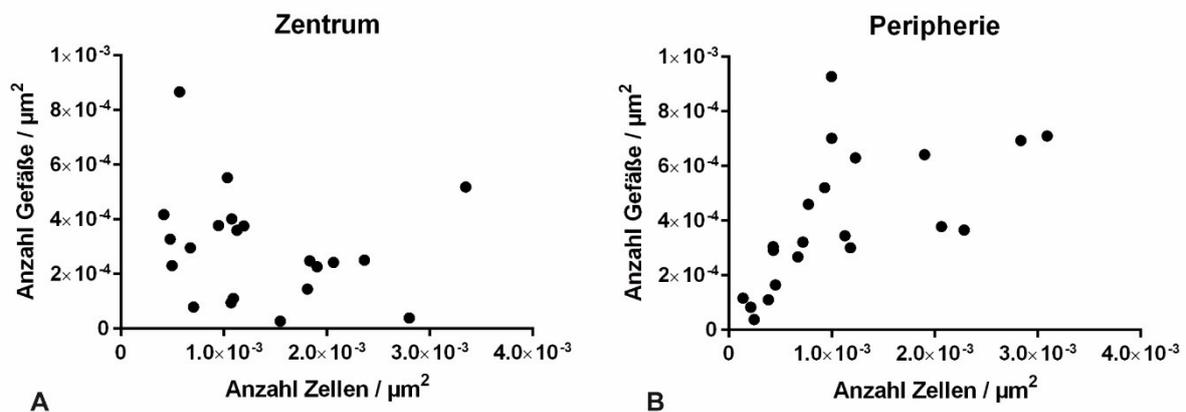


Abbildung 4.12: Korrelation der Gefäß- und Zelldichte

Korrelationsanalyse mit Ermittlung des Korrelationskoeffizienten (r) nach Pearson im Zentrum (A) und in der Peripherie (B) der AV-Loop-Konstrukte

4.6 Generierung eines allschichtigen Hautweichteildefektes mit exponiertem Knochen

4.6.1 Defektheilung bei konservativer Behandlung

Zur Beurteilung der Verlässlichkeit und Qualität der *in vivo* axial vaskularisierten Bindegewebslappenplastik in Hinblick auf die Behandlung von komplexen Hautweichteildefekten, wurde das unter 2.3.4 bis 2.3.6 beschriebene Defektmodell etabliert. Hierfür erfolgte zunächst eine Evaluation der Wundflächenreduktion über 14 Tage unter konservativer Behandlung. Neben der makroskopischen Beschreibung der Defektheilung mittels standardisierter Fotodokumentation wurde am 7. und 14. Tag

nach Defektsetzung eine deskriptive, histomorphometrische Analyse durchgeführt (siehe Abbildung 4.2).

Analyse der Fotodokumentation

Die Fotodokumentation zeigte, dass nach zwei Tagen der Knochen vom Schulterblatt exponiert war. Die Wundränder waren trocken. Frisches Granulationsgewebe im Defekt fehlte. Am fünften Tag imponierte der Wundrand weitgehend unverändert. Am Rand des Defektes befand sich ein rötliches, feuchtes Koagulat, das nicht mit den Wundrändern verbunden war und sich bei Reinigung der Wunde leicht entfernen ließ. Die Knochenoberfläche des Schulterblattes war weiterhin exponiert. Ausgehend von den Wundrändern war die Wundfläche nach sieben Tagen mit frischem Granulationsgewebe teilweise bedeckt. Dieses zeichnete sich durch eine lockere Beschaffenheit aus. *Spina scapulae* und Oberflächen der *Fossa infraspinata* und *Fossa supraspinata* lagen weiterhin größtenteils frei (Abbildung 4.13). Im Vergleich dazu fand auch am neunten Tag keine weitere makroskopisch beurteilbare Veränderung des Defektes statt. Nach zwölf Tagen war eine Reduktion der Wundfläche anhand des zunehmenden Abstandes zwischen dem Wundrand und des Innendurchmessers des Splints erkennbar. Die Wunde war nun mit rötlichem Granulationsgewebe ausgefüllt, das Anschluss an die Wundränder hatte und über eine merkliche, mechanische Festigkeit verfügte. Die Knochenoberfläche lag zum Teil frei. Am 14. Tag füllte größtenteils festes Granulationsgewebe den Defekt aus, und eine weitere Verkleinerung des Wunddurchmessers war sichtbar. Im Zentrum des Defektes zeigten sich *Spina scapulae* sowie Teile der *Fossa infraspinata* und *Fossa supraspinata* exponiert.

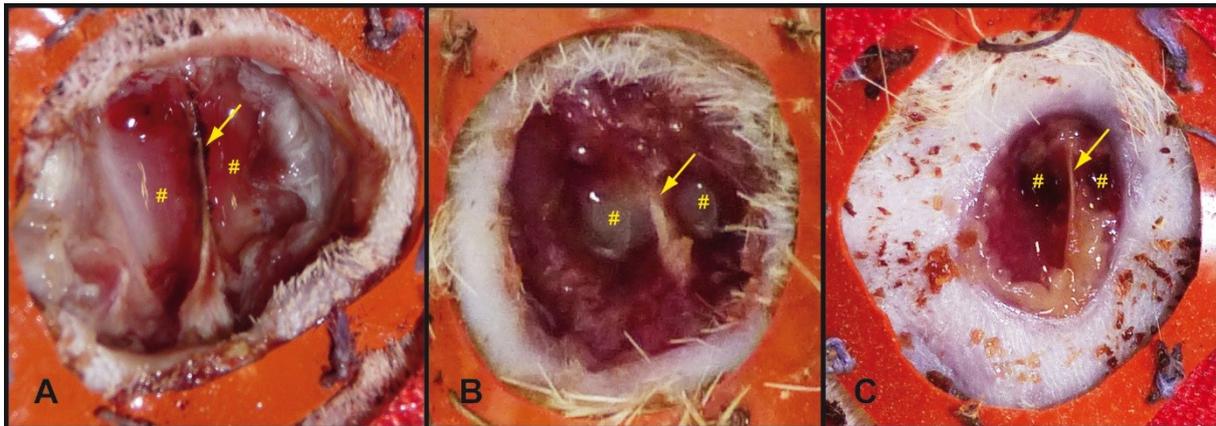


Abbildung 4.13: Defektheilung bei konservativer Behandlung

Exemplarische Darstellung des fotodokumentarischen Zeitverlaufs der spontanen Defektheilung nach 2 (A), 7 (B) und 14 Tagen (C)

= exponierte Knochenstrukturen des Schulterblatts inklusive der *Spina scapulae* (Pfeil); Splint-Innendurchmesser $r = 18 \text{ mm}$ (orange)

Spontane Reduktion der Defektgröße

Als numerischer Faktor zur Beurteilung der Heilungstendenz wurde die Fläche des Defektes fotodokumentarisch ermittelt (siehe 2.7.1). Die Wundkontraktion zeigte mit voranschreitender Zeit einen exponentiellen Verlauf, der in Abbildung 4.14 dargestellt wird. In den ersten sieben Tagen reduzierte sich die Wundfläche im Mittel um $21,86 \pm 1,81\%$. Nach neun Tagen hatte sich die Wundfläche um weitere $18,16 \pm 2,79\%$ reduziert, sodass die Defektgröße im Vergleich zur Anfangsgröße um $33,48 \pm 2,3\%$ verringert war. Zwischen dem neunten und zwölften Tag der Defektheilung reduzierte sich die Wundfläche um $31,69 \pm 3,44\%$. Eine Reduktion um mehr als die Hälfte ($54,56 \pm 2,6\%$) der ursprünglichen Wundfläche (Tag 0) bestand nach zwölf Tagen. Die höchste Reduktionsrate trat zwischen dem zwölften und 14. Tag ($43,48 \pm 5,17\%$) auf, wobei sich die Wundfläche um $74,92 \pm 6,84\%$ im Vergleich zur Anfangsfläche reduziert hatte.

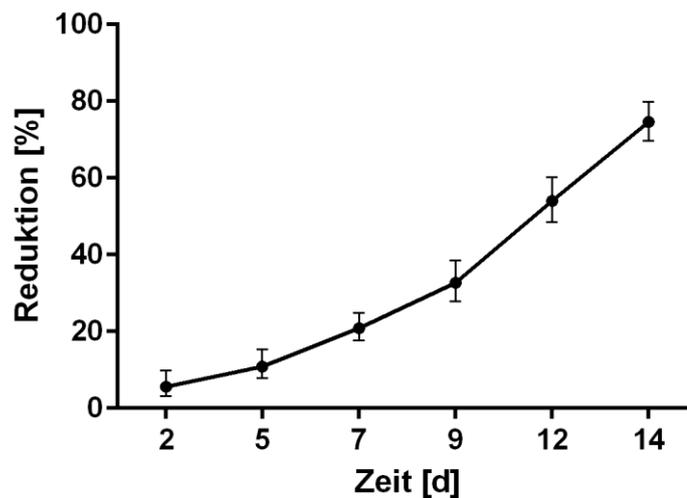


Abbildung 4.14: Spontane Reduktion der Defektgröße

Zeitverlauf (Tag 2-14) der Reduktion der Wundfläche im Vergleich zur Anfangsfläche (Tag 0) im Splint-Modell bei konservativer Behandlung; an den Tagen 2, 5 und 7 wurde der dargestellte Mittelwert aus n=15 und an den Tagen 9, 12 und 14 aus n=10 gebildet

Histomorphologie

In der histologischen Untersuchung zeigte sich nach sieben Tagen, ausgehend von den Wundrändern, das Auftreten von Granulationsgewebe. Die *Spina scapulae* lag vollständig frei und die Knochenoberfläche der *Fossa supraspinata* und der *Fossa infraspinata* waren nur am äußeren Rand mit Granulationsgewebe bedeckt. Das junge Granulationsgewebe bestand aus zahlreichen Fibroblasten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Es enthielt eine fibrinreiche Matrix mit kleinen Kapillaren (Abbildung 4.15).

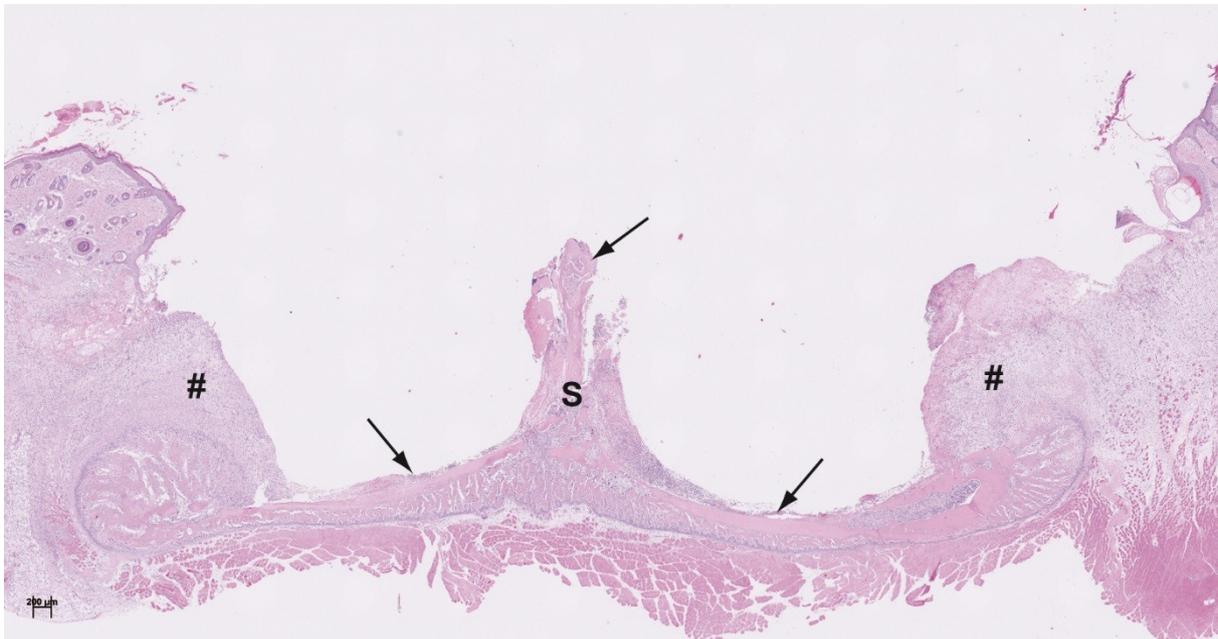


Abbildung 4.15 Spontane Defektheilung nach 7 Tagen

Repräsentative Darstellung der Defektdeckung bei konservativer Wundbehandlung nach 7 Tagen (HE). Die Knochenstrukturen (S) sind exponiert (schwarze Pfeile). Ausgehend von den Hautwundrändern (links und rechts im Bild zu erkennen) wächst junges Granulationsgewebe (#) ein.

Nach 14 Tagen bedeckte die Knochenoberflächen größtenteils Granulationsgewebe, das von den Seiten einwuchs. Die *Spina scapulae* war weiterhin exponiert. Das junge Granulationsgewebe wies ein typisches histologisches Bild geprägt von Fibrin, Fibroblasten und inflammatorischen Zellen auf. Die dem Knochen direkt aufliegende Schicht bestand aus reifem Granulationsgewebe, das kollagene Fasern, spindelförmige Fibrozyten und ausgereifte Gefäße enthielt (Abbildung 4.16). Die Wundränder ragten am Tag 14 im Vergleich zu Tag 7 weiter über die initial vollständig exponierte Knochenoberflächen hinaus. Dies korrelierte mit der im Rahmen der Fotodokumentation ermittelten Reduktion der Wundfläche. Eine Überbrückung der Wundoberfläche durch eine Epithelialisierung hatte nicht stattgefunden.

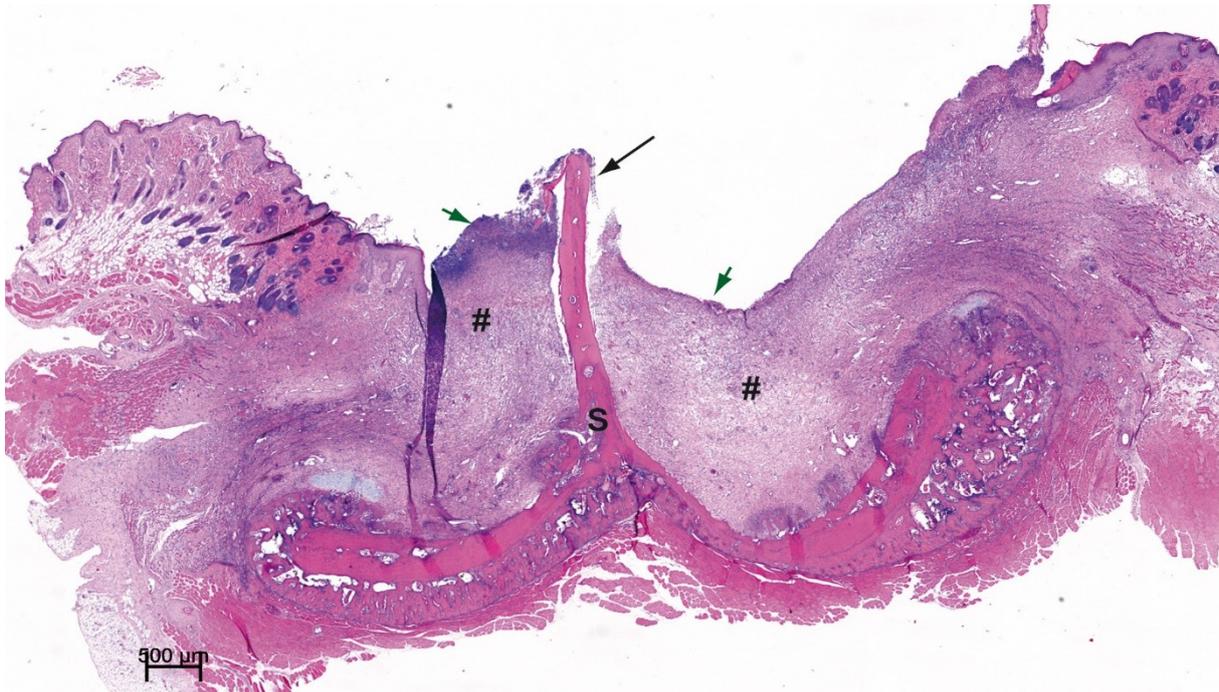


Abbildung 4.16: Spontane Defektheilung nach 14 Tagen

Repräsentative Darstellung der Defektdeckung bei konservativer Wundbehandlung nach 14 Tagen (HE). Die Knochenstrukturen (S) sind weitestgehend mit Granulationsgewebe (#) bedeckt und sind anteilig noch freiliegend (schwarzer Pfeil). Das Granulationsgewebe zwischen den Hautwundrändern (links und rechts im Bild zu erkennen) liegt frei (grüne Pfeile). Bei der senkrechten Falte links der *Spina scapulae* (S) handelt es sich um ein histologisches Schneid-Artefakt.

4.7 Rekonstruktion eines allschichtigen Hautweichteildefektes mit exponiertem Knochen

4.7.1 Rekonstruktion des Defektes mit MatriDerm® ohne Prävaskularisation

In der Versuchsgruppe C des zweiten Teilprojektes wurde MatriDerm® ohne Prävaskularisation als Wundaufgabe verwendet. Es wurden zwei Layer MatriDerm® übereinander auf die Wunde appliziert und mit einem Spalthauttransplantat bedeckt. Zur Beurteilung der Defektheilung wurden analog zu 4.6.1 eine standardisierte Fotodokumentation sowie eine histologische Untersuchung nach 14 Tagen durchgeführt.

Analyse der Fotodokumentation

Makroskopisch wiesen alle Tiere der Gruppe einen vergleichbaren Heilungsverlauf auf. Das Spalthauttransplantat war am zweiten Tag feucht und blass.

Es lagen keine Entzündungszeichen vor. Am fünften Tag lag die Spalthaut der unterliegenden Matrix MatriDerm® flach an. An den Nahträndern hatten sich Krusten gebildet, die sich leicht ablösen ließen. Nach sieben Tagen war das Spalthauttransplantat an den Wundrändern angewachsen und erschien zunächst vital. Im Zentrum fanden sich hingegen rötlich-braune Verfärbungen. Die mit Hilfe einer Kanüle initial eingebrachten Drainagelöcher der Haut hatten sich geschlossen, und eine leichte Schwellung der Wunde trat auf. Nach erneutem Löffern der Spalthaut trat seröse Wundflüssigkeit aus und die Wundschwellung ging zurück. Durch die Löcher schimmerte das unterliegende MatriDerm® feucht und grau-weiß gefärbt durch. Die Naht war nach neun Tagen nicht mehr erkennbar. An den Rändern bestand eine vollständige Integration der Spalthaut in die Wundränder. Eine Abgrenzung von der Haut war weiter zentral deutlich erkennbar. Am zwölften Tag erschien dieses Areal glasig und transparent, sodass die unterliegende Matrix durchschimmerte. Das morphologische Erscheinungsbild wies auf ein Absterben des Spalthauttransplantates ausgehend vom Zentrum hin. Am Tag der Entnahme (Tag 14) zeigte sich - ausgehend von der Naht zur Wundfläche gerichtet - ein ca. 1 mm breiter, vitaler Hautstreifen, gefolgt von einem weißen Areal, das makroskopisch einer Nekrosezone entsprach.

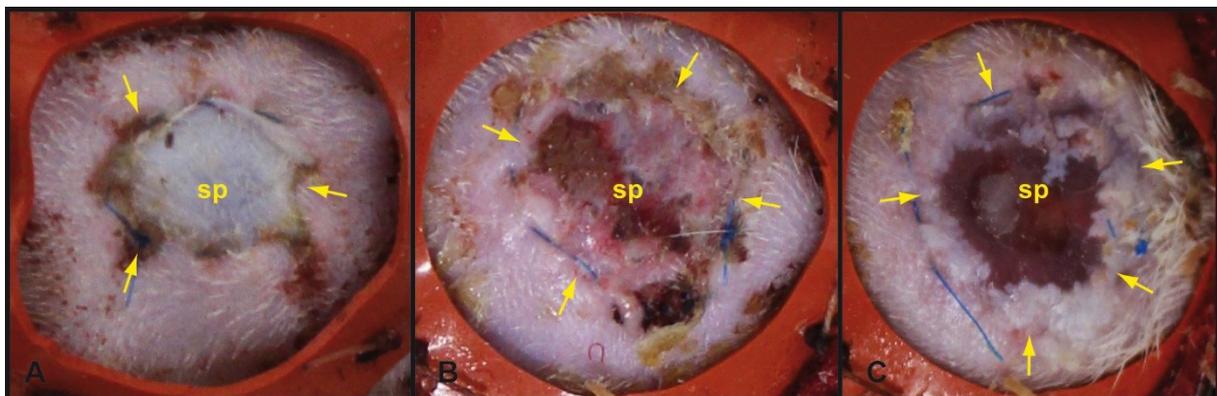


Abbildung 4.17: Defektheilung mit azellulärer, avaskulärer Wundauflage und Spalthaut
Exemplarische Darstellung des fotodokumentarischen Zeitverlaufs der Defektheilung
 nach 2 (A), 7 (B) und 14 Tagen (C)

sp = Spalthauttransplantat mit unterliegender Wundauflage (MatriDerm®), Pfeile = fortlaufende Naht zwischen Wundrand und Spalthaut, Splint-Innendurchmesser $r = 18 \text{ mm}$ (orange)

Histomorphologie

Nach 14 Tagen Beobachtungszeitraum wurde jeweils das Schulterblatt mit dem Defekt entnommen und histologisch aufgearbeitet. In der HE-Übersichtsfärbung war die primäre Wundauflage (MatriDerm®) eindeutig von den Wundrändern abgrenzbar. Die MatriDerm®-Layer lagen eng an der Knochenoberfläche des Schulterblatts. An der Grenze zwischen der Kollagenmatrix und dem umgebenden Gewebe befand sich eine dichte Schicht aus parallel angeordneten Kollagenfasern, die die Matrix gegen die Umgebung abgrenzte. Des Weiteren war dieser Bereich stark mit Zellen infiltriert. Dies deutete eine bindegewebige Abkapselung der Kollagenmatrix zur Wunde hin an. In die Kollagenmatrix hatte nur eine geringe Zellmigration stattgefunden. Es zeigten sich keine Anzeichen für einen aktiven Umbau der Kollagenstruktur von MatriDerm® (Abbildung 4.18). Die Gefäße außerhalb der Matrix stellten sich durch die Farbstoffperfusion mittels Indian-Ink schwarz dar. In den MatriDerm®-Layer waren dagegen keine angefärbten Gefäße detektierbar. Eine Vaskularisation durch extrinsische Gefäßeinsprossung hatte demnach nicht stattgefunden. Das Spalthauttransplantat hatte an den Nahrändern Kontakt zu der umliegenden Haut. Im Zentrum war die Struktur des Transplantates nicht erhalten. Eine Verbindung zur der unterliegenden MatriDerm®-Schicht war nicht erkennbar und somit nicht aufgebaut worden. Durch die mangelnde Verbindung hob sich das Spalthauttransplantat mit den Hauträndern von den tieferliegenden Strukturen ab. Dies führte bei der Herstellung der Paraffinschnitte mittels Mikrotom zu einer örtlichen Verlagerung der obersten Schicht des Defektes (Abbildung 4.18).

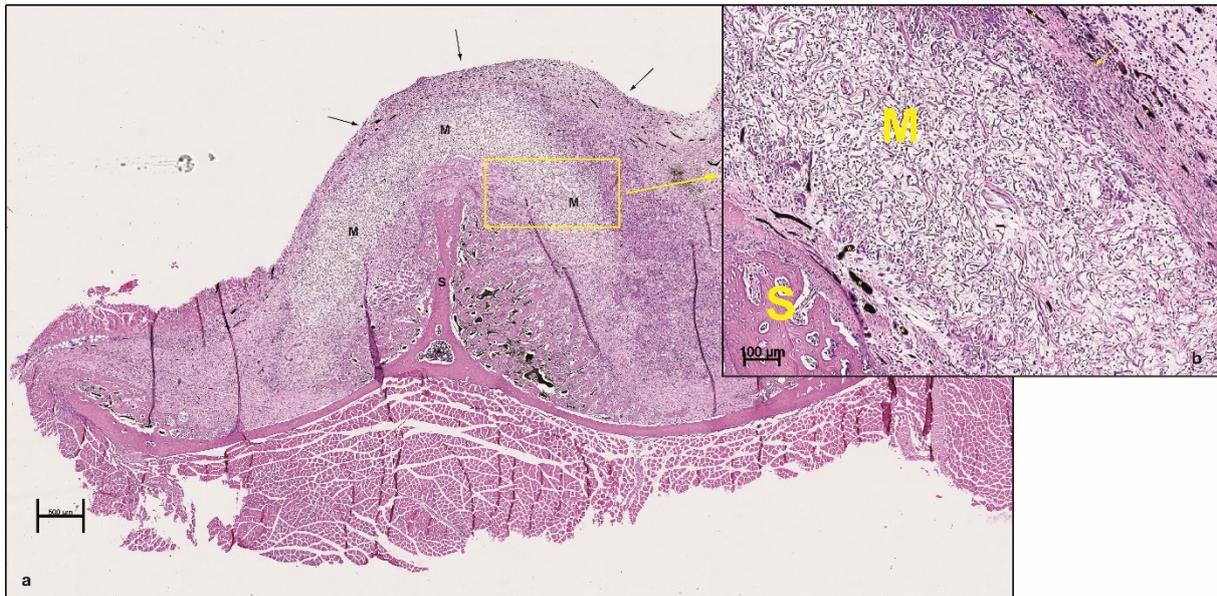


Abbildung 4.18: Defektdeckung mit MatriDerm® ohne Prävascularisation

Repräsentative Darstellung der Defektdeckung bei Wundbehandlung mit azellulärer Wundauflage nach 14 Tagen (a,b; HE). Die Knochenstrukturen (S) sind weitestgehend von MatriDerm® (M) bedeckt, das von dem umliegenden Gewebe durch eine Kapsel aus Bindegewebe (Pfeile) abgegrenzt wird. Durch ein histologisches Schneid-Artefakt ist das Spalthauttransplantat abgelöst und im Bild nicht sichtbar. In der Detailaufnahme (b) wird die klare Trennung der gefäßlosen Wundauflage (M) vom gefäßreichen (Gefäße = schwarz) umliegenden Gewebe erkennbar.

4.7.2 Rekonstruktion des Defektes mit einer AV-Loop-basierten und *in vivo* vaskularisierten Bindegewebslappenplastik

Die Deckung des allschichtigen Defektes auf dem Schulterblatt erfolgte hier mit der axial vaskularisierten Bindegewebslappenplastik, die unter Verwendung von MatriDerm® als Kammermatrix nach 14 Tagen Züchtung an ihrem Gefäßstiel abgesetzt, und nach Einbringen in den Defekt an die Halsempfängergefäße angeschlossen wurde (siehe 2.3.7). Auch hier wurde ein gesticheltes Spalthauttransplantat als oberste Deckschicht verwendet. Es wurden drei Tiere operiert und der Heilungsverlauf analog zu 4.6.1 und 4.7.1 mittels standardisierter Fotodokumentation evaluiert. Nach 14 Tagen erfolgte die histologische Untersuchung zur abschließenden Beurteilung der Integration der transplantierten Lappenplastik.

Analyse der Fotodokumentation

Das Spalthauttransplantat lag nach zwei Tagen dem transplantierten Lappen glatt an und war bei zwei Tieren feucht und vital. Bei einem Tier (1B) hatte sich die Spalthaut rötlich bis schwarz verfärbt und war von einer Kruste aus geronnenem Blut bedeckt. Ein vorzeitiges Absterben der Spalthaut konnte aufgrund der makroskopischen Verfärbung zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Nach fünf Tagen hatte sich das Spalthauttransplantat makroskopisch nicht wesentlich verändert. Einzelne Areale schienen, beurteilt nach der Färbung, noch vital zu sein. Bei den anderen beiden Tieren (2B, 3B) erschienen die Spalthauttransplantate weiterhin vital. Sie zeigten im Bereich der Naht Anzeichen der Integration in die umliegende Haut. Am Rand und aus den eingestochenen Löchern trat auf Druck eine seröse Wundflüssigkeit aus. Am siebten Tag der Heilungsperiode waren die beiden rosafarbenen Spalthäute (2B, 3B) mit einer Kruste aus seröser Wundflüssigkeit bedeckt, die sich leicht ablösen lies. Die Nähte waren bei beiden Tieren verheilt, und die Spalthauttransplantate gut angewachsen. Am neunten Tag fanden sich kleine Areale mit einer rosa Färbung, die eine leichte Transparenz aufwiesen. Eine makroskopisch deutlich zu erkennende Kontraktion der Wundränder zeigte sich nach 12 Tagen bei allen drei Tieren. Sowohl die beiden rosafarbenen (2B, 3B), als auch das stellenweise schwarz verfärbte (1B) Spalthauttransplantat waren krustig. In den folgenden zwei Tagen nahm die Wundfläche durch Annäherung der äußeren Wundränder weiter ab. Bei allen Tieren hob sich das zentral krustige Spalthauttransplantat von den Wundrändern ab und war nicht vollständig in die Wunde eingewachsen. Anzeichen für eine Vitalität der zentralen Bereiche der Spalthauttransplantate (1B-3B) waren makroskopisch nicht erkennbar (Abbildung 4.19).

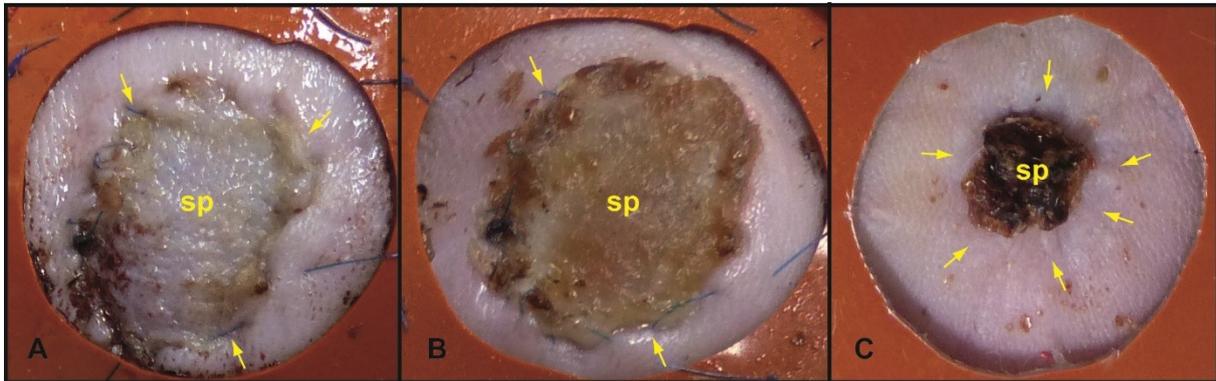


Abbildung 4.19: Defektheilung mit Bindegewebslappenplastik und Spalthaut

Exemplarische Darstellung des fotodokumentarischen Zeitverlaufs der Defektheilung nach 2 (A), 7 (B) und 14 Tagen (C)

sp = Spalthauttransplantat mit unterliegendem Bindegewebslappen, Pfeile = fortlaufende Naht zwischen Wundrand und Spalthaut, Splint-Innendurchmesser $r = 18 \text{ mm}$ (orange)

Histomorphologie

Histologisch imponierte bei einem Tier der Gruppe (2B) eine Thrombosierung der axialen Gefäßachse der transplantierten Bindegewebslappenplastik. Die Lappenplastik war deutlich vom umliegenden Gewebe abgrenzbar und in ihrem morphologischen Erscheinungsbild unverändert (Abbildung 4.20 a). In der MT-Färbung war die Struktur der quervernetzten Kollagenfasern von MatriDerm® noch eindeutig zu erkennen. Eine Degradation der Trägermatrix war nicht erfolgt. Durch eine Kapsel aus parallel angeordneten Kollagenfasern konnte die Abgrenzung zum Wundgewebe ausgemacht werden. Eine Integration in das umliegende Gewebe hatte somit nicht stattgefunden. Im Randbereich der Lappenplastik fanden sich inflammatorische Zellen, die sich überwiegend aus Lymphozyten und Makrophagen zusammensetzten. Entlang der Kollagenfasern innerhalb der Trägermatrix fanden sich einzelne Zellen. Außer der angeschnittenen axialen Gefäßachse des AV-Loops, die durch einen Thrombus verlegt war, waren innerhalb der Bindegewebslappenplastik keine weiteren Gefäße detektierbar (Abbildung 4.20 b). Im äußersten Randbereich waren teilweise kleine Gefäße aus der Umgebung in die Trägermatrix des Lappens eingewachsen, die wie die Gefäße im Wundgewebe durch Farbstoffperfusion schwarz ausgefüllt waren.

Das histomorphometrische Erscheinungsbild der beiden übrigen, nicht thrombosierten Lappenplastiken (1B, 3B) unterschied sich hingegen deutlich. Die ursprüngliche Struktur von MatriDerm® war nicht identifizierbar. Somit konnte die transferierte Bindegewebslappenplastik nicht mehr eindeutig vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden (siehe Abbildung 4.21 a). Die Trägermatrix war vollständig degradiert und in gleichmäßig vaskularisiertes Bindegewebe umgewandelt worden, welches vollständig in den Defekt integriert schien. Sowohl in der transferierten Bindegewebslappenplastik als auch im umliegenden Wundgewebe fanden sich mit schwarzen Farbstoff (Indian-Ink) ausgefüllte Gefäße (Abbildung 4.21 b, c). Das präfabrizierte intrinsische Gefäßnetzwerk des transplantierten Gewebes hatte somit Anschluss an das Gesamtgefäßnetz. Das transplantierte Gewebe war an das umliegende Gewebe adaptiert. Die Wundoberfläche war teilweise mit Haut bedeckt, die sich ausgehend von den initialen Wundrändern über die Bindegewebslappenplastik gelegt hatte. Das Spalthauttransplantat war nekrotisch und hatte keinen Anschluss an den unterliegenden Bindegewebslappen erhalten.

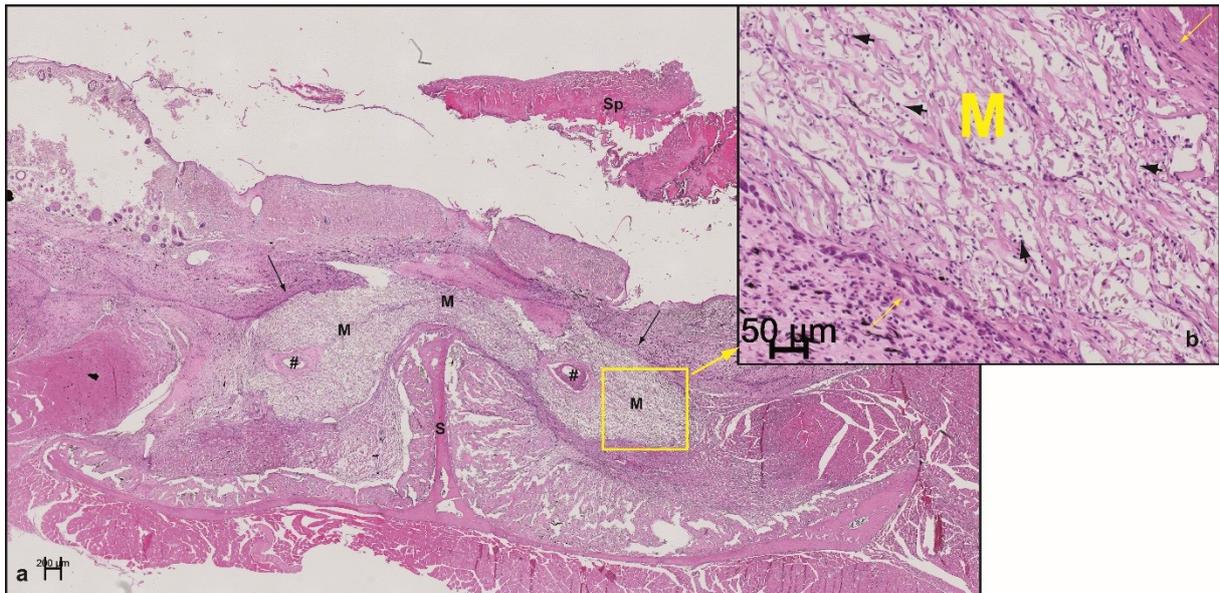


Abbildung 4.20: Defektdeckung mit prävascularisiertem Gewebeersatz ohne Gefäßanschluss

Histologisches Schnittbild (a,b; HE) der frei transferierten Bindegewebslappenplastik ohne intrinsische Durchblutung nach 14 Tagen (erkennbar an der nichtvorhandenen Füllung von Gefäßstrukturen mit Black-Indian-Ink) aufgrund eines Verschlusses der Hauptgefäßachse durch einen Thrombus (#). Der Lappen (M) bedeckt die Knochenstrukturen (S) des Schulterblatts, ist jedoch nicht in das umliegende Wundgewebe integriert worden und durch eine Bindegewebschicht abgegrenzt (lange Pfeile). Das nekrotische Spalthauttransplantat (Sp) (oben im Bild a) ist abgehoben und hat keine Verbindung zur Lappenplastik. In der Detailaufnahme sind einzelne Zellen (kurze Pfeile) in der Matrix des Lappens (M) sichtbar.

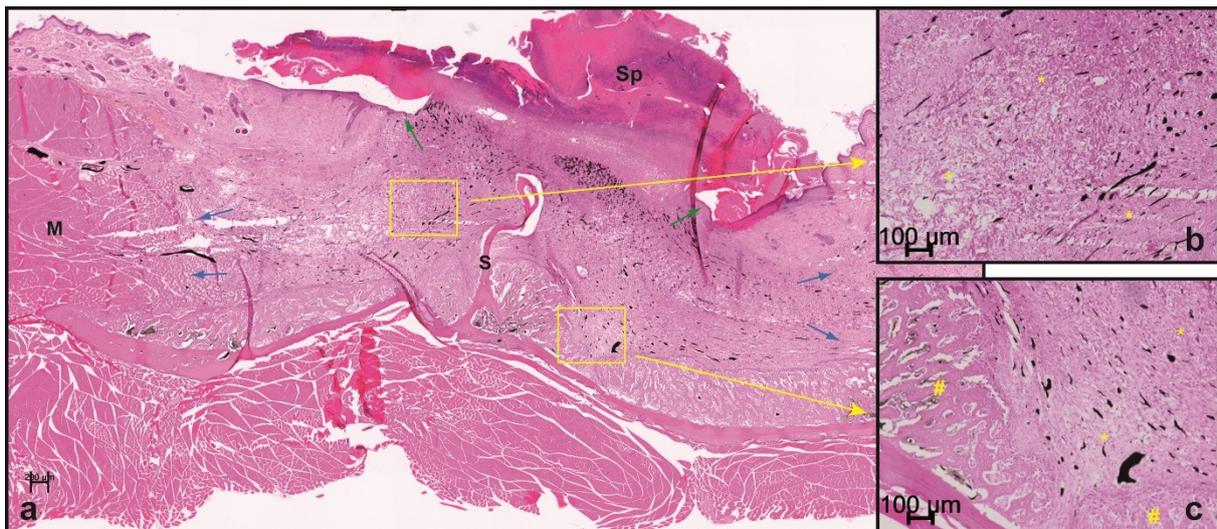


Abbildung 4.21: Defektdeckung mit prävascularisiertem Gewebeersatz mit Gefäßanschluss

Histologisches Schnittbild (a,b,c; HE) der frei transferierten Bindegewebslappenplastik mit intrinsischer Durchblutung nach 14 Tagen. Der gut durchblutete Gewebeersatz bedeckt das Schulterblatt (S) und ist in das Wundgewebe (blaue Pfeile) integriert worden. Das Spalthauttransplantat (Sp) liegt dem Lappen funktionslos auf, die Hautwundränder sind erkennbar (grüne Pfeile). Detailaufnahmen (b,c) zeigen den gleichmäßig durchwachsenen und perfundierten Gewebeersatz (*) mit Gefäßen (schwarz), der den Knochen (#) bedeckt.

5 Diskussion

5.1 Eigenschaft der verwendeten Kollagenmatrizen

Obgleich einer Kollagenmatrix keine angio-induktive Eigenschaft zugeschrieben wird^{147,148}, fördert sie die Adhäsion und Anordnung von einwandernden Zellen¹⁴⁹. Bei den hier untersuchten Kollagenmatrizen zeigten sich keine Anzeichen von Fremdkörperreaktion, wie sie bei einer Verwendung von PLGA im AV-Loop-Modell festgestellt wurden¹⁵⁰. Inflammatorische Zellen waren jeweils mäßig vorhanden und sind Teil der Morphogenese einer Gewebeformation¹⁵. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels AV-Loop die Bildung eines gleichmäßigen, die Kollagenmatrix durchziehenden Gefäßnetzwerkes - ausgehend von der axialen Gefäßschleife - gezeigt werden. Die Gefäßbildung erreichte hierbei abhängig vom Züchtungsintervall die Peripherie der Matrix.

Nach vollständigem Matrixabbau kommt es zum Sistieren der Gefäßbildung, was bei einer Fibrinmatrix bereits nach zwei Wochen der Fall ist¹²⁸. Interessanterweise fand sich in der vorliegenden Studie im Kontrast dazu auch nach vier Wochen in beiden Matrizen eine Zunahme der Gefäßanzahl (3-fach), was auf eine prolongierte *sprouting*-Eigenschaft gegenüber Fibrin hinweist. Dies ist möglicherweise auf die langsame Resorptionsgeschwindigkeit der Matrix zurückzuführen. Die mittlere Gefäßfläche wies eine stärkere Zunahme (4 bis 5-fach) auf als die Gefäßanzahl zwischen zwei und vier Wochen. Ursächlich hierfür ist vermutlich eine Modellierung der primitiven Gefäße in ein organisiertes Netzwerk, bestehend aus einer hierarchischen Anordnung aus Arterien, Kapillaren und Venen⁶⁸. Hierfür spricht auch die nach vier Wochen sichtbare Arterialisierung. Die fortgeschrittene Gefäßbildung könnte durch die Langzeitstabilität der Kollagenmatrix bedingt sein und wird durch frühere Langzeitstudien zur Gefäßbildung in stabiler Matrix¹²³ bestätigt. Die vorhandene Stabilität lässt sich auf die Quervernetzung von kollagenen Fasern zurückführen, wodurch eine erhöhte mechanische Stabilität besteht und die Resorptionsgeschwindigkeit verringert wird⁸¹. Beschichtungen von Kollagenfasern mit Elastin - wie bei MatriDerm® - oder Glykosaminoglykanen - wie bei Integra™ DRT - können die Stabilität weiter erhöhen. Der Überzug soll eine bessere Resistenz gegenüber Kollagenasen bewirken¹⁵¹. Elastin und Chondroin-6-sulfat sollen weiterhin unterschiedliche Wirkungen auf die

Vaskularisation aufweisen. Chondroitin-6-sulfat zeigte in Chorioallantoismembranen anti-angiogene Eigenschaften¹⁵². Elastin dagegen unterstützte im gleichen Modell die Angiogenese, indem es die Zellmigration und die Tubulogenese fördert¹⁵³.

5.2 MatriDerm® und Integra™ DRT im Vergleich

MatriDerm® und Integra™ DRT zeichneten sich durch eine unterschiedliche Vaskularisationskinetik aus. Im Vergleich zu Integra™ DRT war bei MatriDerm® nach zwei und vier Wochen eine höhere Gefäßanzahl sichtbar. Auch die ermittelte Gefäßfläche lag deutlich über den Werten von Integra™ DRT. Die Gefäßdichte nahm in Integra™ DRT, im Gegensatz zu MatriDerm®, im Abstand von mehr als 600 µm von der Hauptachse (AV-Loop) deutlich ab. Das unterschiedliche Verteilungsmuster der Gefäße blieb auch nach vier Wochen bestehen. Dies äußerte sich in einer höheren Gefäßdichte der Peripherie von MatriDerm® im Vergleich zu Integra™ DRT.

Die azelluläre Matrix weist direkt nach der Implantation keinen Hypoxiegradienten auf. Man geht davon aus, dass über die Gefäßwand in die Matrix einwandernde Zellen einen solchen Gradienten erzeugen, dem die Gefäßeinsprossung folgt¹⁵⁴. Dies verdeutlichten bereits Ergebnisse früherer Studien am AV-Loop-Modell. Nach sieben Tagen zeigte sich ein Hypoxie-Maximum innerhalb der proliferativen Zone, der sich vom Zentrum mit der Zeit in die Peripherie verlagerte. Mit der Abnahme proliferierender Zellen nahm auch der Hypoxiegradient ab, sowie die Gefäßanzahl nicht weiter zu¹¹⁸. Hauptverantwortlich für die Angiogenese im AV-Loop scheint allerdings die veränderte Flussstimulation auf den venösen Graft zu sein. So konnte gezeigt werden, dass wenn das Venenstück in die arterielle Strombahn eingebracht wird und ein sog. arterioarterieller (AA) Loop entsteht, die Gefäßbildung ausgehend vom venösen Graft vollständig aufgehoben wird¹²⁴. Hier unterscheidet sich die Anordnung vom AV-Loop nur in einem reduzierten, bzw. normalisierten Blutfluss durch den Loop. Die Hypoxie scheint also nicht der initiale Hauptstimulus der AV-Loop-assoziierten Angiogenese zu sein. Trotzdem deuten aktuelle Arbeiten von Zebrafisch-Embryonen darauf hin, dass der Blutfluss ein elementarer Trigger bei Angiogenese-Prozessen unter Hypoxie darstellt¹³¹. Zudem zeigten aktuelle Arbeiten eine erhöhte Gefäßdichte im AV-Loop-Modell der Ratte durch die systemische Applikation von DMOG (*dimethyloxallyl glycin*), einem Stabilisator von HIF (*hypoxia inductible*

factor)¹⁵⁵. Dies weist ebenfalls auf eine Hypoxie-Vermittlung der Angiogenese in der Kammer hin. In MatriDerm[®], das nach zwei und vier Wochen eine höhere Gesamtzellzahl aufwies, besteht vermutlich ein stärkerer Hypoxiegradient aufgrund metabolischer Aktivitäten der Zellen¹⁵⁶. Dies könnte eine Verstärkung des Angiogenese-Stimulus erklären.

Mit Zunahme von Gefäßdicke und -durchmesser wird die Zellmigration über die Gefäßwand in die Matrix gesteigert. Der Korrelationskoeffizient (r) nach Pearson ergab in der vorliegenden Studie einen tendenziell positiven linearen Zusammenhang zwischen der Kinetik der Zellmigration und der Vaskularisation, jedoch nur in der Peripherie. Die fehlende Korrelation im Zentrum könnte auf die Nähe zum AV-Loop zurück zu führen sein. In diesem Bereich ist eine nutritive Versorgung der Zellen durch Diffusion über eine Strecke von bis zu 200 μm ⁶⁰ aus dem Hauptgefäß möglich. Daher ist der Bedarf an neuen Gefäßen zur Oxygenierung der Peripherie größer. Dies wird durch die stärkere Zunahme der Gefäßdicke (10 bis 42-fach) bei gleichzeitiger Zunahme der Gesamtzellzahl deutlich, während im Zentrum die Zunahme der Gefäßdicke im Vergleich zur Zunahme der Gesamtzellzahl geringer ausgeprägt war.

In der Fachliteratur gab es bis heute keine quantitativen Aussagen über die *in vivo* Vaskularisation von MatriDerm[®]. Die Arbeiten zu MatriDerm[®] als artifiziellen Hautersatz beschäftigten sich überwiegend mit dem Einfluss der Matrix auf Wundkontraktion und Narbenbildung^{157,158}. Erste Untersuchungen mit Integra[™] DRT im AV-Loop-Modell beschränkten sich auf deskriptive histomorphometrische Charakterisierungen¹⁴¹. In einer experimentellen Studie an der Ratte schien Integra[™] DRT als Trägermatrix zur *in vivo* Präfabrikation vaskularisierter Hautlappen geeignet zu sein¹⁵⁹. Möglicherweise haben die Kammer-Isolationsbedingungen im vorliegenden Modell die komprimierte Vaskularisation bedingt. Ein positiver Effekt auf die *in vivo* Präfabrikation einer Hautlappenplastik durch eine zusätzliche Zellmigration aus dem umliegenden Gewebe ist denkbar.

Auffällig war in der vorliegenden Studie eine erhöhte Thromboserate ($n=4/7$) in den Integra[™] DRT-Konstrukten nach vier Wochen. Bei der frühen Entnahme nach 14 Tagen traten dagegen keine Thrombosen auf. Im Vergleich dazu betrug die Durchgängigkeitsrate in der MatriDerm[®]-Gruppe nach vier Wochen 89%. Auf die Bildung von Thrombosen wirken im Wesentlichen Alterationen des Endothels,

Veränderungen der Blutviskosität und die Strömungsgeschwindigkeit ein (Virchow-Trias). Während der Versuchsdurchführung zeigte sich, dass Integra™ DRT enger um die eingebrachte Gefäßschleife anliegt als MatriDerm®, das seine Form beibehält. Eine Kompression durch die Trägermatrix könnte so hypothetisch zu einer Reduzierung des Blutflusses führen und als Thrombogen wirken. Aufgrund der deutlich stärker ausgeprägten Gefäßbildung in MatriDerm® sowie definierter Abbruchkriterien wurde bewusst von zusätzlichen Operationen zur Fallzahlangleichung der Integra™ DRT-Gruppe abgesehen, wodurch eine statistische Signifikanz der verminderten Gefäßanzahl und -fläche nach vier Wochen vermutlich darstellbar gewesen wäre.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Studie erstmals die *in vivo* Vaskularisation von Integra™ DRT und MatriDerm® durch Einbringung einer angio-induktiven, axialen Gefäßachse verifiziert und quantifiziert. Beide Matrizen zeichneten sich dabei durch eine ausreichende Stabilität aus, die in einer stetig fortschreitenden Gefäßbildung bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt nach vier Wochen resultierte. Die vorliegenden Daten weisen, ausgedrückt durch die stärkere Zunahme der Gefäßfläche als der Gefäßanzahl darauf hin, dass die Bildung eines ausgereiften Gefäßsystems durch ein *remodeling* der primitiven Gefäße entsteht. Das unterschiedliche Ausmaß der Angiogenese-Induktion weist auf einen matrixabhängigen Faktor hin. Zudem konnte erstmalig *in vivo* der Zusammenhang zwischen Zellrekrutierung und Vaskularisationskinetik von originär azellulären Matrizen im AV-Loop-Modell verifiziert werden.

5.3 Elastizität und Angiogenesekinetik azellulärer Kollagenmatrizen

In bisherigen Studien zum AV-Loop erfolgten überwiegend eine histomorphometrische Analyse der Neoangiogenese sowie die Evaluation spezifischer Gewebekonstruktion. Mechanische Eigenschaften der verwendeten Biomaterialien als Trägermatrix wurden dagegen meist nicht genauer untersucht. Die regulatorischen Interaktionen zwischen Endothelzellen und extrazellulärer Matrix auf die kapillare Morphogenese sind bislang nur unzureichend geklärt¹⁶⁰. Anhand des Elastizitätsmoduls nach Young wurde in der vorliegenden Studie die Verformbarkeit der Kollagenmatrizen ermittelt. Die Elastizität von MatriDerm® lag deutlich über der von Integra™ DRT. Aufgrund eines standardisierten Herstellungsprozess der beiden

Matrizen ist von einer geringen Variabilität der Proben auszugehen, weshalb die ermittelte Signifikanz des Steigungsverlaufs der Spannungs-Dehnungs-Kurven der Matrizen eher als repräsentativ anzusehen ist. MatriDerm® wies somit eine deutlich fest-elastischere Struktur auf als Integra™ DRT. Die ermittelte biomechanische Eigenschaft korrelierte mit den haptischen Erfahrungen zur jeweiligen Matrix während der Versuchsdurchführung.

Bei Integra™ DRT zeigte sich eine kurze, steile Steigung bis zum Erreichen des linearen Verlaufs der Spannungs-Dehnungskurve. In diesem Bereich findet eine Ausrichtung der Matrix in Folge der einachsigen Zugrichtung statt. Ein vergleichbares Verhalten von biologischen Materialien zeigt sich z.B. auch bei Gefäßwänden oder am Herzen, die mit steigender Auslenkung eine höhere Steifigkeit erlangen¹⁶¹. Ein solches Verhalten lässt sich im Spannungs-Dehnungsverlauf von MatriDerm® nicht erkennen, was auf eine abweichende Anordnung der Komponenten hindeutet. Es zeigte sich über die gesamte Dehnungsstrecke der vorgenommenen Dehnung ein linear-elastischer Verlauf. Bei Integra™ DRT trat nach ca. 15% Dehnung der Übergang in den Bereich der plastischen Verformung ein (Proportionalitätsgrenze). Da die plastische Verformung anderen Gesetzmäßigkeiten unterliegt¹⁴⁶, wurde nur der Bereich mit linearer Steigung zur Ermittlung des Elastizitätsmoduls herangezogen.

Bei arteriellen Gefäßen imponiert nach anfänglich proportionalem Verhalten ein steiler Anstieg der Spannungs-Dehnungskurve, da es die elastischen und kollagenen Fasern als Strukturelemente der Gefäßwand ermöglichen, dehnende Kräfte zu kompensieren und so eine Überdehnung verhindern¹⁶¹. Der vorliegenden Differenz des elastischen Verhaltens der Matrizen kann diese Begebenheit ebenfalls zugrunde liegen, da sie aus eben diesen Strukturelementen verschieden zusammengesetzt sind. Die Elastin-Komponente von MatriDerm® könnte theoretisch Einfluss auf das elastische Verhalten nehmen. Elastin wird neben einer Unterstützung der Geweberegeneration auch ein positiver Einfluss auf die Angiogenese zugesprochen¹⁶². Interessanterweise konnten elastische Fasern in beiden Kollagenmatrizen initial visualisiert werden. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise weitere biomechanische Faktoren für die differente Elastizität verantwortlich sind.

Die Porengröße der Matrix nimmt ebenfalls Einfluss auf die Gefäßdichte^{163,164}. Die Porenbeschaffenheit der verwendeten Matrizen wies laut Herstellerangaben keine maßgeblichen Differenzen auf. Nach Angaben in älteren *in vivo* Arbeiten über Biomaterialien mit vergleichbaren Porengrößen zu den vorliegenden Kollagenmatrizen, scheint außerdem sowohl eine Zellmigration¹⁵¹ als auch eine Vaskularisation⁶² ungehindert möglich zu sein. Daher scheint der Einfluss des Porendurchmessers und der Porosität auf die Gefäßbildung in der vorliegenden Studie vernachlässigbar zu sein.

Der Elastizitätsunterschied und die unterschiedlich ausgeprägte Gefäßbildung deuten auf einen Zusammenhang zwischen der biomechanischen Beschaffenheit der extrazellulären Matrix und der Angiogenese hin. Eine erhöhte Gefäßbildung lag hierbei in der festeren Matrix vor. Dies wird durch frühere Untersuchungen unterstrichen, in denen das Ausmaß der Gefäßbildung durch die Festigkeit der Matrix beeinflusst wurde^{165,166}. Dem Festigkeitsgrad der Matrix wurde eine Modulation der VEGF-Wirkung zugeschrieben¹⁶⁰. In diesem Kontext konnte eine Abhängigkeit der Regulation der Expression des VEGF-Rezeptors-2 durch die Festigkeit der extrazellulären Matrix gezeigt werden⁶⁹. Möglicherweise ist dies auch eine der Ursachen für die stärker ausgeprägte Angiogenese in der festeren MatriDerm[®]-Matrix der vorliegenden Versuche.

Erstaunlicherweise zeigte sich *in vitro* eine gegensätzliche Abhängigkeit zwischen Matrixfestigkeit und Angiogenese. Eine zunehmende Festigkeit der extrazellulären Matrix schien einen negativen Einfluss auf die Gefäßbildung zu haben¹⁶⁷. Reduziertes kapillares Wachstum sowie eine reduzierte Gefäßnetzbildung durch Erhöhung der Matrixdichte wurden in mehreren *in vitro* Studien beschrieben^{168,169}. Während *in vitro* eine weiche Matrix demnach die Gefäßbildung zu fördern scheint, konnte *in vivo* auch in frühen Arbeiten ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren in weicher Matrix nur eine verminderte Neoangiogenese nachgewiesen werden¹⁷⁰. Diese Beobachtungen spiegeln sich in den vorliegenden Ergebnissen des angio-induktiven Verhaltens der Kollagenmatrizen wieder. Die *in vivo* verstärkte Angiogenese in festerer Matrix ist möglicherweise durch mechanische Stimulation von Endothelzellen bedingt. Eine mechanische Stimulation basiert unter anderem auf Festigkeitsgradienten, die *in vivo* durch Rekrutierung proteolytisch aktiver

Zellen innerhalb der Matrix entstehen und bei initial festerer Matrix stärker ausgeprägt sind¹⁷¹. Die These wurde durch Studien von Mammoto *et al.* untermauert, in denen *in vivo* Umbauprozesse in einer festeren Matrix zu einer stärkeren Gefäßbildung führten⁶⁹. Ein größerer Festigkeitsgradient in MatriDerm® als in Integra™ DRT ist durch deutlich stärkere Umbauprozesse der Matrix zu erwarten und stellt eine mögliche Erklärung für die vorliegenden Daten dar. Des Weiteren scheinen Matrizen mit höherer Elastizität über eine erhöhte Fähigkeit der Zellrekrutierung zu verfügen¹⁷². Die Migrationsrichtung der Zellen scheint dabei vor allem durch einen Gradienten der Matrixelastizität in Richtung der steiferen Areale gesteuert zu werden¹⁷³. Hierdurch könnte sich die erhöhte Zellrekrutierung in MatriDerm® erklären.

Die feste Beschaffenheit von MatriDerm® könnte auf die Kollagenkonzentration zurück zu führen sein, durch die eine größere Adhäsionsfläche für Zellen besteht¹⁷⁴. Diese spiegelt sich in der hohen Zelldichte in MatriDerm® im Vergleich zu Integra™ DRT wieder. Die proliferativen und morphologischen Zelleigenschaften scheinen weiterhin durch Adhäsionsmöglichkeiten an die extrazelluläre Matrix reguliert zu werden¹⁷⁵. Für die Bildung tubulärer Strukturen durch Endothelzellen wurde dahingehend bereits ein Zusammenhang beschrieben¹⁷⁶.

Zusammenfassend zeichnet sich ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Vaskularisation sowie der Zellrekrutierung und der Elastizität der Matrix ab. Die vorliegenden Daten untermauern die Annahme, dass die mechanischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix Einfluss auf die Gefäßbildung *in vivo* haben. Eine festere Beschaffenheit der Matrix scheint dabei die Adhäsion und Proliferation von Zellen zu unterstützen. Gleichzeitig lässt sich *in vivo* auf eine effizientere Stimulation der Zellmigration und Angiogenese in fest-elastischen Matrizen schließen.

5.4 Die Isolationskammer als *in vivo* Bioreaktor

In der vorliegenden Studie wurde eine geschlossene Isolationskammer aus Teflon für die Herstellung der AV-Loop-Konstrukte verwendet. Die Art der Kammer wurde speziell für das Modell entwickelt, und fand in Studien mehrerer Arbeitsgruppen Verwendung^{121,139}. Durch die Abgrenzung zum umliegenden Gewebe erfolgte die Vaskularisation ausschließlich intrinsisch ausgehend von der eingebrachten arteriovenösen Gefäßschleife.

Die Notwendigkeit der Isolation während der Präfabrikation von vaskularisiertem Gewebeersatz wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Guthrie *et al.* postulierten, dass die extrinsische Vaskularisation verhindert werden sollte, da der dadurch reduzierte ischämische Stimulus die Reifung eines eigenständigen Gefäßnetzwerkes innerhalb eines Gewebekonstruktes negativ beeinflussen könnte¹⁷⁷. Das Einbringen einer Gefäßschleife unter die Haut ohne Isolation ging mit einer erhöhten Nekrose der Hautlappenplastik im Vergleich zur Verwendung eines azellulären Integra™ DRT-Layer zur Isolation einher¹⁵⁹. Mutaf *et al.* beschrieben dagegen, dass die Isolation keinen Einfluss auf die Gesamt-Vitalität präfabrizierter Hautlappenplastiken hatte, obwohl durch die Abgrenzung mit einem Silikonblatt während der Präfabrikation eine vermehrte Gefäßsprossung aus der axialen Gefäßschleife erreicht wurde¹⁷⁸.

Als negativ bei der *in vivo* Gewebezüchtung ist die zum Teil ausgeprägte Serombildung zu betrachten, die sowohl bei der Verwendung von Silikonblättern¹⁷⁸, als auch bei Teflonisolationenkammern¹²¹ auftreten kann. Es zeigte sich in der vorliegenden Studie bei der Entnahme eine vergleichbare, fibröse Kapselbildung um die Kammer. Das isolierte Innenleben der Kammer mit der Bindegewebslappenplastik blieb dagegen unbeeinflusst. Die Generierung von Gewebe innerhalb einer geschlossenen Kammer stellt somit eine Möglichkeit dar, das Konzept der *in vitro* Bioreaktoren auf ein intrakorporales Modell der Gewebeherstellung zu übertragen¹⁷⁹. Obwohl die Züchtung innerhalb dieses *in vivo* Bioreaktors den physiologischen Bedingungen des Organismus unterliegt, findet die Generierung unter definierten Bedingungen statt. Die Isolation vom umliegenden Gewebe ermöglicht zudem die Verwendung von verschiedenen *release*-Systemen, die eine gesteuerte Freisetzung von Substanzen ermöglichen, dies ohne, oder mit nur sehr niedriger systemischer Wirkung. Durch die Besiedelung mit gewebespezifischen Zellen kann die Formation von Gewebearten gezielt gesteuert werden^{140,180}. Hinsichtlich einer klinischen Anwendung eröffnet dies die Möglichkeit einer gezielten therapeutischen Manipulation der Vaskularisation und Gewebeformation innerhalb der Kammer während der Fabrikationsperiode. Bei Hebung des AV-Loop-Konstruktes an seinem axialen Gefäßstiel wird durch die Verwendung der geschlossenen Kammer weiterhin die Setzung eines chirurgischen Traumas an den Rändern des Lappens vermieden⁵⁶.

Bei porösen Kammern findet im Gegensatz dazu sowohl eine intrinsische als auch eine extrinsische Vaskularisation statt. Bereits zwei Wochen nach Implantation erhielten 87% der Gefäße in der Kammer Anschluss an das extrinsische Gefäßsystem, nach weiteren zwei Wochen waren es nahezu 100%¹²⁷. Bei MatriDerm® wurde in der vorliegenden Studie in einer geschlossenen Kammer ebenfalls eine homogene Gefäß- und Zellverteilung erreicht, allerdings ist es gleichzeitig zum Volumenverlust des Gewebes gekommen. Durch zusätzliche extrinsische Vaskularisation sowie Zellmigration könnten größere Gewebevolumina erlangt¹⁸¹, und möglicherweise auch der Gewebedegradierung entgegen gewirkt werden.

5.5 Züchtungsintervall zur *in vivo* Generierung einer axial intrinsisch vaskularisierten Bindegewebslappenplastik

Für die *in vivo* Vaskularisation von artifiziellen Gewebekonstrukten werden, abhängig von der Fabrikationsart, unterschiedliche Zeitintervalle benötigt. Bei der Präfabrikation von Knorpelgewebe - eingebettet in Muskelgewebe - mittels axialer Gefäßschleife konnte in Kaninchen eine gleichmäßige Vaskularisation nach sechs Wochen erreicht werden¹⁰³. Studien im AV-Loop-Modell der Ratte ohne Trägermatrix erreichten die Generierung von stabilem, vaskularisiertem Gewebe nach zwölf Wochen¹¹⁷. Dies zeigt auch im Hinblick auf die vorliegende Arbeit, dass der Einsatz einer stabilen Matrix das Züchtungsintervall deutlich verkürzen kann. Im AV-Loop-Modell des Schafes wurde eine suffiziente Perfusion und Stabilität von artifiziellen Knochengewebe ebenfalls erst nach von zwölf Wochen erreicht¹²⁰. Die Herstellung eines artifiziellen Weichteilgewebes gestaltete sich deutlich weniger zeitintensiv, was aus publizierten Züchtungsintervallen von 20 Tagen zur Vaskularisation präfabrizierter Lappen hervorgeht¹⁸². Aus den publizierten Daten kann kein eindeutiger Rückschluss auf das ideale Züchtungsintervall von intrinsisch vaskularisiertem Gewebe gezogen werden. Es spiegelt die Heterogenität der erforderlichen Zeit, in Abhängigkeit von verwendeter Matrix und Tiermodell, wieder. Die zwei gewählten Beobachtungsintervalle von zwei und vier Wochen sollten, in Anlehnung an frühere Arbeiten, die Haupt- und späte Phase der Angiogenese abbilden¹²⁸ und weiterhin die Beurteilung der Langzeitstabilität der Matrix ermöglichen.

Während Integra™ DRT nach vier Wochen hinsichtlich der Form makroskopisch keine Veränderung aufwies, waren die Konstrukte mit MatriDerm®

dagegen formverändert und hatte an Volumen verloren. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen zur *in vivo* Degradierung der Kollagenmatrizen einer anderen Arbeitsgruppe¹⁸³. Die Resorptionsgeschwindigkeit scheint mit der Zellrekrutierungsfähigkeit der Matrix zu korrelieren. Die erhöhte Zahl und räumliche Verteilung proliferativer Zellen in MatriDerm® nach vier Wochen unterstreicht den Prozess der Maturation.

Die Umbauprozesse äußerten sich in MatriDerm® bereits nach zwei Wochen in Form von Fibrinkoagulat und Granulationsgewebe, das entlang der Matrixstruktur vom Zentrum des Konstruktes in die Peripherie zog. Gleichzeitig fanden sich Anzeichen für die Degradation der originären Matrix, insbesondere im zell- und gefäßreichen Areal. Im Vergleich dazu beschränkte sich die Gewebeformation in Integra™ DRT auf die direkte Umgebung des AV-Loops im Zentrum der Kammer. Diese Tatsache widerspricht den Ergebnissen einer früheren Studie mit Integra™ DRT als Trägermatrix, in der allerdings lediglich eine deskriptive Analyse vorgenommen wurde¹⁴¹. Eine Integration des Granulationsgewebes in die Integra™ DRT-Matrix konnte ebenso wie das Auftreten von eingewachsenen Gefäßen in der vorliegenden Studie erst nach vier Wochen festgestellt werden.

Für den freien vaskularisierten Gewebetransfer ergeben sich aus den vorliegenden Ergebnissen abweichende Voraussetzungen für die jeweilige Matrix. Die Übertragung von Ergebnissen bereits erwähnter Studien¹³⁷ lässt wegen der fortgeschrittenen Matrixresorption nach vier Wochen keine starke Gefäßbildung in MatriDerm® mehr erwarten. In der nicht-degradierten Integra™ DRT-Matrix dagegen ist eine fortschreitende Gefäßbildung auch nach vier Wochen wahrscheinlich¹²³. Ein der Vaskularisation und Zellmigration von MatriDerm® vergleichbarer Zustand kann bei Integra™ DRT zu einem späteren Entnahmezeitpunkt (>vier Wochen) nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl Integra™ DRT sich als ausreichend stabil erwies, wäre aufgrund der Angiogenese- und Zellmigrationskinetik eine längere Implantationsperiode als vier Wochen zur ausreichenden Zellbesiedlung und Vaskularisation des Gewebekonstruktes erforderlich, um die Vitalität unmittelbar nach dem freien Transfer zu gewährleisten. Eine geringe Gefäßeinsprossung in Integra™ DRT beschrieben

Druecke *et al.* bei einer ausschließlich extrinsischen Vaskularisation ebenfalls erst nach einem Zeitraum von mehr als vier Wochen¹⁸⁴.

In Hinblick auf die Züchtung von spezifischem Gewebe durch Implantation differenzierter Zellen, bietet Integra™ DRT gegenüber MatriDerm® Vorteile. Die Langzeitstabilität von Integra™ DRT bietet dem entsprechenden Gewebe ausreichend Zeit zur Differenzierung. Bei einer vorzeitigen Resorption der Trägermatrix dagegen ist keine Bildung von gewebetypischen Strukturen nach nur vier Wochen zu erwarten¹³⁹. So gelang zum Beispiel in der Maus der Nachweis von funktionalem, endokrinem Pankreasgewebe in einer prävascularisierten Kammer erst nach sechs Wochen¹⁸⁵. Die erhöhte Thromboserate der Integra™ DRT-Konstrukte, die nach vier Wochen beobachtet wurde, macht eine Eignung zur Generierung eines axial durchbluteten Gewebes nach einem längeren Zeitraum jedoch fragwürdig.

MatriDerm® erwies sich dagegen nach zweiwöchigem Implantationsintervall als geeignet zur Generierung eines axial vaskularisierten Gewebeersatzes, während nach vier Wochen eine ausreichende Stabilität des Konstruktes nicht mehr gegeben war. Die gute Vaskularisation, Stabilität und beginnende Matrixumformation wurde als Entscheidungsgrundlage für die Transplantation nach zwei Wochen herangezogen. Die Auf- und Abbaurate von Gewebe orientiert sich an der jeweiligen Bedarfssituation des Gesamtorganismus. Während unter isolierten Bedingungen der Abbau ab einem bestimmten Zeitpunkt überwog, konnte der Schrumpfung nach dem Transferieren des AV-Loop-Konstruktes mit Anschluss an das umliegende Gefäßsystem auf den Defekt im weiteren Verlauf entgegen gewirkt werden und ein gleichmäßiger Umbau des MatriDerm®-scaffolds in körpereigenes Gewebe ermöglicht werden.

5.6 Etablierung eines allschichtigen Hautweichteildefektes mit exponiertem Knochen

Für die generelle Validierung von gezüchteten, vaskularisierten Lappenplastiken zur Rekonstruktion allschichtiger Hautweichteildefekte sind keine Defekte mit Exposition kritischer Strukturen wie Knochen in der Ratte beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde daher ein Defektmodell entwickelt, das diese Erfordernisse erfüllt und gleichzeitig eine Rekonstruktion durch freien Gewebetransfer in mikrochirurgischer Technik ermöglicht. Anatomisch bedingt war das Ausmaß der Kammer, und somit der generierten Bindegewebslappenplastik, eingeschränkt. Dies

grenzte die Defektfläche auf einen Durchmesser von einem Zentimeter ein. Als geeignete anatomische Region wurde das Schulterblatt gewählt. Die entstandene Wundfläche war vergleichbar mit bereits beschriebenen - hauptsächlich in Rücken- und Bauchregion lokalisierten - runden Defekten, bei denen es sich allerdings um reine Hautdefekte ohne Knochenexposition handelte¹⁸.

Der vorliegende Defekt-Heilungsprozess wies die typischen drei Wundheilungsphasen auf, was sich durch Granulationsgewebbildung äußerte. Die spontane Reduktionsgeschwindigkeit der Wundfläche nahm exponentiell zu und erreichte zwischen dem 12. und 14. Tag ihr Maximum. Die Wundfläche hatte sich nach zwölf Tagen um mehr als die Hälfte reduziert. Bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt (14. Tag) schritt die Wundflächenreduktion weiter voran und bewirkte eine Defektverkleinerung um insgesamt ca. 75%. Trotz Reduktion der Wundfläche war es zu diesem Zeitpunkt nur zu einer instabilen Deckung gekommen. Als Folge waren kritische Gewebestrukturen (*Spina scapulae*) trotz Bildung und Reifung des Granulationsgewebes weiterhin exponiert.

Eine Wundkontraktion erfolgt bei sekundärer Wundheilung laut Literatur ab dem zehnten Tag¹¹, was dem Anstieg der Reduktionsrate zwischen dem neunten und zwölften Tag in der vorliegenden Studie entsprach. Für diesen Vorgang wird eine multifaktorielle Abhängigkeit beschrieben. Das Kontraktionsausmaß variiert hier abhängig von der Größe und Form der Wunde. In älteren Studien imponierte zum Teil eine schnellere Wundrandkontraktion bei Defekten größeren Ausmaßes. Die Geschwindigkeit des Wundverschlusses durch Kontraktion erfolgte dabei proportional zum Ausgangsdurchmesser des Defektes¹⁸⁶. Die vorliegenden Daten zur Wundflächenreduktion entsprechen im Beobachtungszeitfenster den bisher beschriebenen Ergebnissen in Wundmodellen der Ratte²². Sie korrelieren im Verhältnis ihrer zeitlichen Abfolge mit anderen Versuchstierarten sowie dem Menschen^{16,20,186}. Nach Angaben in der Fachliteratur ist dabei ein Peak der Wundkontraktion nach zwei Wochen zu erwarten¹⁶. Dies gibt Grund zur Annahme, dass nach dem Beobachtungsintervall die Kontraktionsrate abnimmt.

Die Wundsanieung wird weiter durch ischämische Bedingungen sowie die Vitalität der freiliegenden Strukturen beeinflusst¹⁸⁷. Falls der Verschluss - wie beim vorliegenden Defektmodell - durch Epithelialisierung nicht erfolgt, kommt es zur

überschießenden Bildung von Granulationsgewebe¹⁸⁸. Dies führt zu einem unvollständigen Reparatursprozess, bei dem keine funktionelle und anatomische Regeneration des Gewebes erfolgt. Zudem besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko bei instabiler Vaskularisation¹⁸⁸. Ohne chirurgische Intervention ist unter den beschriebenen Bedingungen nicht mit einer komplikationslosen Heilung des Defektes zu rechnen⁵⁷.

Es wurde somit ein allschichtiges Hautweichteildefektmodell auf dem Schulterblatt der Ratte etabliert, bei dem bei konservativer Behandlung nach zwei Wochen keine Rekonstruktion erreicht wurde, und ein instabiler Zustand bestand. Gleichzeitig ist durch die Nähe zu den Halsgefäßen und durch die Lage des Defektes zum einen die mikrochirurgische Anschlussmöglichkeit des transferierten Gewebes gegeben, und zum anderen eine Manipulation des Defektes durch das Tier nicht möglich.

5.7 AV-Loop-basierte und *in vivo* gezüchtete Bindegewebslappenplastik zur Rekonstruktion von Hautweichteildefekten

Verfahren des *Tissue Engineering* zur Generierung bioartifizieller, vaskularisierter Gewebe stellen derzeit weitestgehend experimentelle Ansätze dar. Mit Hilfe *in vitro* co-kultivierter Zellen, die auf Biomaterialien aufgetragen wurden, zeigten sich nach anschließender Einbringung einer Gefäßachse erste Erfolge bei der Rekonstruktion allschichtiger Defekte der Bauchwand¹⁸⁹. Bislang existieren jedoch keine Studien, die eine axial vaskularisierte Lappenplastik nach Generierung tatsächlich frei auf einen kritischen Defekt mit exponiertem Knochen im Tier transplantiert und auf seine Zuverlässigkeit zur Sanierung der Wunde untersucht haben. Das AV-Loop-Modell erlaubt die intrinsische Vaskularisation von *in vivo* gezüchteten Gewebe und bietet gleichzeitig eine kaliberstarke Anschlussmöglichkeit für eine Oxygenierung unmittelbar nach dem Transfer. Nur so kann es klinisch mit herkömmlichen Lappenplastiken konkurrieren. Das aufgeführte Defektmodell ermöglicht nun erstmals den freien Transfer mit mikrochirurgischer Anschlussmöglichkeit, um die Qualität AV-Loop-basierter artifizieller Lappenplastiken zu beurteilen.

Obwohl die Bemühungen der Züchtung von suffizient perfusionierten Gewebekonstrukten vielversprechend sind, ist nicht bekannt, ob ein mittels AV-Loop axial vaskularisierter Gewebeersatz ohne zu Hilfenahme von Wachstumsfaktoren und/oder *in vitro* Zell-Co-Kulturen zur Deckung allschichtiger Hautweichteildefekte geeignet ist. Um eine Antwort auf diese Frage zu erhalten, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe des AV-Loop-Modells einen solchen bioartifiziellen Bindegewebslappen zu generieren und hinsichtlich der Fähigkeit zur Rekonstruktion von komplexen Wunden mit Knochenexposition zu evaluieren. Dabei wurde gezielt auf potentiell kanzerogene Wachstumsfaktoren^{190,191} sowie auf die aufwendige Kombination mit *in vitro* Methoden verzichtet.

In der vorliegenden Studie wurde nach erfolgreicher Vaskularisation die generierte Bindegewebslappenplastik mit dem axialen Gefäßstiel an die ortsständigen Gefäße angeschlossen, und so eine Deckung des Defektes mit exponiertem Knochenanteil durch durchblutetes Gewebe erreicht. Zwei von drei frei transferierten Bindegewebslappenplastiken wiesen nach zwei Wochen eine axiale Durchblutung über den AV-Loop sowie eine vollständige Integration in den Defekt auf. Die initial avaskuläre Matrix (MatriDerm®), als auch die vaskularisierte Bindegewebslappenplastik ohne axiale Blutversorgung, erzielten keine funktionelle Defektdeckung, was sowohl für die Qualität der vaskularisierten Lappenplastik als auch für die Verlässlichkeit des Defektmodells spricht. Exemplarisch deutet der transferierte Bindegewebslappen mit Verschluss der axialen Gefäßachse durch einen Thrombus, wodurch die axiale, intrinsische Versorgung verhindert war, auf die Notwendigkeit einer unmittelbaren Durchblutung hin. Die Kompensation einer fehlenden, initialen Durchblutung durch extrinsische Vaskularisation schien aufgrund der Konstruktgröße nicht ausreichend, um eine vergleichbare Integration des transferierten Gewebes zu erreichen. Es zeigte sich bei Defektdeckung mittels azellulärer, avaskulärer Matrix, analog zum Bindegewebslappen ohne axiale Durchblutung, des Weiteren eine bindegewebige Kapselbildung, die zu einer Abgrenzung des Wundgewebes führte. Die dabei ausbleibende Gefäßeinsprossung kann durch das Fehlen metabolisch aktiver Zellen bedingt sein. Die Endothelzellmigration während der Angiogenese basiert auf den komplexen Mechanismen der Chemotaxis, Haptotaxis und der Mechanotaxis¹⁹². Die Migration

erfolgt entlang von Gradienten chemotaktisch wirksamer Substanzen¹⁹³, und wird weiterhin durch Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibrin und Kollagen Typ I moduliert¹⁹⁴. Integrinen kommt bei den adhäsiven Interaktionen zwischen extrazellulärer Matrix und Endothelzellen¹⁴⁸ sowie Fibroblasten¹⁹⁵ eine regulative Rolle zu. Durch Proteolyse der extrazellulären Matrix wird eine Freisetzung der erwähnten Komponenten herbeigeführt¹⁵. Die Stimulation zur Zellmigration könnte in der azellulären Matrix sowie dem nicht vaskularisierten Bindegewebslappen, der durch temporäre Minderperfusion wenige Zellen aufwies, vermindert gewesen sein. Die axiale Durchblutung der Bindegewebslappenplastik diente nach dem freien Transfer einer suffizienten Oxygenierung des entstandenen Gewebes und stimulierte die Zellmigration und Gefäßeinsprossung aus dem Wundrand. Dies wurde histologisch durch eine hohe Zelldichte und einen fortgeschrittenen Umbauprozess der axial vaskularisierten Bindegewebslappenplastik verifiziert.

Erste Versuche zur Rekonstruktion allschichtiger Defekte im Kaninchenohr mittels generiertem Gewebeersatz ohne *in vitro* Zell-Co-Kulturen beruhten auf einem axialen Gefäßbündel¹⁸¹. Eine ausreichende Vaskularisation sowie Stabilität des Gewebeersatzes konnte jedoch nur durch bFGF-Gabe sowie durch wiederholte Operationen während der Züchtung erreicht werden. Außerdem musste hier keinerlei kritische Struktur bedeckt werden, so dass die Übertragung auf ein klinisches Szenario sehr eingeschränkt ist. Die Überlegenheit des AV-Loops zur Vaskularisation, wie in der vorliegenden Studie verwendet, zu einem blind endenden, ligierten arteriovenösen Gefäßbündel wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Unter Isolationsbedingungen einer Kammer zeigte sich ein vergleichbares Potential von AV-Loop und Gefäßbündel bei der Vaskularisation von Gewebekonstrukten¹³⁶. In anderen Studien dagegen konnten durch den AV-Loop im Vergleich zum Gefäßbündel höhere Gefäßzahlen erreicht werden¹⁹⁶. Eine weitere Vergleichsstudie zeigte eine stärkere Angiogenese-Induktion durch AV-Loops als durch Gefäßbündel bei der Generierung artifizierender Knochengewebe im Kaninchen¹⁹⁷. AV-Loops wurden klinisch zur Vaskularisation bei freiem Gewebetransfer bereits vereinzelt eingesetzt¹⁹⁸.

Thromboseraten der arteriovenösen Gefäßschleifen, die auf die Manipulation der Gefäße zurück zu führen sind, wurden bereits als negativer Faktor des Verfahrens beschrieben¹⁹⁶. Im vorliegenden Modell könnte die zweimalige mikrochirurgische

Behandlung der Gefäße mit wiederholter Gefäßnaht und unterschiedlichen Flusseigenschaften zu Beginn und Ende der AV-Loop-Züchtung¹²¹ zu einer Erhöhung des Stielthrombose-Risikos führen. Thrombosen des venösen Stielgefäßes gelten als eine der Hauptursachen für den Totalverlust transplantierte Lappenplastiken¹⁹⁶. Die Umlagerung der Halsgefäße unter der seitlichen Halsmuskulatur hindurch war mit einer erheblichen Manipulation verbunden, wodurch das Risiko einer Thrombose deutlich erhöht sein könnte. Weiterhin steht der Torsionsgrad bei Adaption der Gefäße in direktem Zusammenhang mit der Neigung zur Thrombusbildung bei freien Lappenplastiken¹⁹⁹. Eine Drehung der Anschlussgefäße um ihr eigene Achse konnte in der vorliegenden Studie trotz Markierung nicht zuverlässig verhindert werden, wodurch eine Thrombose der zuführenden Stielgefäße erklärbar wäre. Dies ist allerdings auf die Größe der Gefäße in der Ratte zurück zu führen. Es ist davon auszugehen, dass die Problematik bei größeren Tierspezies und auch beim Menschen allein wegen des Gefäßkalibers daher sehr viel geringer sein sollte. Thrombose-induzierende Eigenschaften der generierten Bindegewebslappenplastik könnten nur bei höherer Fallzahl und direktem Vergleich mit einer autologen Lappenplastik im selben Wundmodell validiert werden.

Zur vollständigen Rekonstruktion der Epidermis wurde in der vorliegenden Arbeit ein Spalthauttransplantat verwendet. Die Spalthautentnahme erfolgte in Anlehnung an beschriebene Methoden bei der Ratte²⁰⁰. Anhand der vorliegenden Ergebnisse scheint das Spalthauttransplantat zur Deckung der Bindegewebslappenplastik jedoch nicht geeignet. Gleiches zeigte sich, wie zu erwarten war, bei der Verwendung von MatriDerm® ohne Prävaskularisation. Die Nekroseneigung der Spalthauttransplantate steht im Kontrast zur erfolgreichen Kombination mit MatriDerm® bei Rekonstruktionen von Hautverbrennungen am Menschen²⁰¹. In der Ratte erschien eine extrinsische *in vivo* Vaskularisation von MatriDerm® über zwei Wochen ausreichend, um die Vitalität eines Epidermis-Transplantates zu gewährleisten²⁰². Hier wurde im Gegensatz zum vorliegenden Modell eine transkutane Kammer verwendet, die eine Verschiebung des Hauttransplantats gegen MatriDerm® verhinderte. Durch die fehlende Verbindung der Haut mit der Subkutis bei der Ratte¹⁸ ist das Spalthauttransplantat im vorliegenden Versuchsaufbau gegen die durchblutete Bindegewebslappenplastik verschiebbar.

Eine Perfusion des Spalthauttransplantats konnte somit im vorliegenden Fall nicht gewährleistet werden.

Ein denkbarer, alternativer Ansatz zur Spalthaut ist eine Mikroinjektion von kultivierten Keratinozyten und Fibroblasten in die obere MatriDerm®-Schicht des vaskularisierten Gewebeersatz zur Unterstützung der Epithelialisierung, was bei der Rekonstruktion reiner Vollhautdefekte der Ratte erste Erfolge zeigte²⁰³. Kultivierte, autologe Keratinozyten, gelöst in Fibrinsuspension, wurden mit einer azellulären Matrix kombiniert und ebenso erfolgreich im Schwein eingesetzt, was zu einer beschleunigten Epithelialisierung von Vollhautwunden bei gleichzeitiger Reduzierung der Wundkontraktion führte²⁰⁴. Für Rekonstruktionen allschichtiger Hautweichteildefekte wäre diese Methode, in Verbindung mit einer axial vaskularisierten Bindegewebslappenplastik als Unterlage, ein weiterer interessanter Ansatz für eine Anschlussstudie.

Das *upscaling* auf ein Großtiermodell sollte für folgende Studien zur Validierung AV-Loop-gezüchteter Bindegewebslappenplastiken erwogen werden. Anatomisch und physiologisch kommt dafür das Schwein als experimentelles Modell dem Menschen am nächsten^{205,206}. Das Hausschwein bietet im Gegensatz zur Ratte zudem die Möglichkeit, Defekte von klinischer Relevanz zu simulieren. Für eine ausreichende Beurteilung, ob vergleichbare Resultate zu herkömmlichen, autologen Lappenplastiken bei einer Rekonstruktion komplexer Wunden durch eine auf diese Weise gezüchtete Bindegewebslappenplastik erlangt werden, sind weiterhin Langzeitstudien erforderlich. Dies ist ein notwendiger Schritt, um die langfristige klinische Komplementierung des Verfahrens zu ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Im *Tissue Engineering* ist die Herstellung von artifiziellem Gewebe mit suffizienter Versorgung bei einem freien Transfer in Bezug auf die Größe limitiert. Grundvoraussetzung für die Integrität nach einer Transplantation ist eine gleichmäßige Durchblutung im Konstrukt. Mit Hilfe einer arteriovenösen Gefäßschleife (AV-Loop), die eingebettet in eine Matrix in eine Isolationskammer überführt wird, ist eine *in vivo* Generierung von einer axial intrinsisch vaskularisierten Bindegewebslappenplastik möglich. Die Gefäßbildung sowie die biomechanische Stabilität des generierten Gewebes werden dabei von der Beschaffenheit der Trägermatrix und dem Züchtungsintervall beeinflusst. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung der optimalen Matrix und des idealen Züchtungsintervalls zur Generierung einer AV-Loop-basierten, freien Bindegewebslappenplastik sowie deren Validierung hinsichtlich der Fähigkeit eine komplexe Wunde mit exponiertem Knochen zu rekonstruieren.

Die Charakterisierung von zwei Kollagenmatrizen (MatriDerm[®] und Integra[™] DRT) im AV-Loop-Modell der Ratte zeigte nach einem subkutanen Implantationsintervall von zwei und vier Wochen eine erhöhte Vaskularisation und Zelldichte von MatriDerm[®] im Vergleich zu Integra[™] DRT. Dies ging mit einem starken Umbauprozess von MatriDerm[®] einher, das, im Gegensatz zu Integra[™] DRT, nach vier Wochen auch in den peripheren Arealen eine gleichmäßige Vaskularisation und Zellbesiedlung aufwies. Weiterhin ergab die Analyse der Elastizität einen Zusammenhang zwischen fest-elastischer Matrix und erhöhter Gefäßbildung sowie Zellmigration *in vivo*. Das Auftreten von quantitativ unterschiedlichen Dynamiken der Gefäßbildung und Maturation in den Kollagenmatrizen deutet die Komplexität des Zusammenspiels zwischen der Angiogenese und der extrazellulären Matrix an.

Die AV-Loop-basierte Bindegewebslappenplastik konnte im Anschluss erstmals erfolgreich auf einen standardisierten Defekt mit exponiertem Knochen auf dem Schulterblatt der Ratte frei transplantiert werden. Sie führte im Gegensatz zu avaskulären Verfahren hier zu einer suffizienten Deckung mit rascher Sanierung der Wunde. Bei dem Verfahren konnte gänzlich auf die Verwendung angio-induktiver und damit potentiell kanzerogener Substanzen verzichtet werden. Auch eine aufwändige *in vitro* Zellkultivierung musste nicht erfolgen, da die natürliche Migration von Zellen

über die Gefäßoberfläche zu einer Zellbesiedlung, und später zum funktionellen, bindegewebigen Umbau des Gewebes führte. Weiter konnte gezeigt werden, dass sich MatriDerm® aufgrund seiner Vaskularisations- und Zellrekrutierungskinetik besonders gut für AV-Loop-basierte Lappenplastiken eignet. Die relativ einfache und verlässliche Methode bietet somit optimale Bedingungen für eine mittelfristige klinische Anwendung, um so passgenaue Lappenplastiken entfernt von der Verletzungszone zu generieren, und die Hebmorbidität und begrenzte Verfügbarkeit von herkömmlichen Lappenplastiken zu umgehen. Die Entwicklung weiterer Ansätze, bei denen die beschriebene Methode der Gewebezüchtung zum freien Transfer mit etablierten Techniken zusammengeführt wird, könnte in Zukunft maßgeblich zur Optimierung der Züchtung von durchblutetem Gewebeersatz beitragen und neue innovative Therapieoptionen aufzeigen.

7 Summary

In tissue engineering, fabrication of more complex three dimensional constructs without prevascularization remains limited due to the lack of diffusion of oxygen and nutrition into the central areas. The basic requirement for mass transfer is a viable vascular network, allowing sufficient oxygen supply within the artificial tissue which enables *in vivo* integration. By means of arteriovenous (AV) loops embedded in a carrier matrix (scaffold) and placed in an isolation chamber, the *in vivo* generation of a connective tissue flap with axial intrinsic vascularization can be achieved. With this approach, the vessel formation as well as the biomechanical stability of the newly grown tissue flap could be influenced by the nature of the used carrier matrix and the breeding duration. Aim of the present study was to determine the optimal matrix and the ideal prefabrication duration for a free connective tissue flap based on the AV loop. Its suitability for reconstruction of complex wounds with exposed bone was also validated.

Comparison of two collagen-based matrices (MatriDerm[®] and Integra[™] DRT) in the AV loop model revealed that MatriDerm[®] results in a higher vessel formation and cell migration than Integra[™] DRT after two and four weeks of subcutaneous implantation. This has been associated with an increased maturation of MatriDerm[®], which caused the peripheral areas of the constructs to well vascularize and colonize with cells after four weeks, in contrast to Integra[™] DRT constructs, whose periphery remains avascular with poor cell migration after the same period of time. Furthermore, a correlation between a stiff, elastic matrix and increased *in vivo* vascularization, as well as increased cell migration, could be demonstrated. The appearance of quantitatively different dynamics of angiogenesis and maturation processes with the two collagen matrices implies the complexity of the functional interaction between angiogenesis and the extracellular matrix.

The fabricated axially vascularized connective tissue flap was successfully transferred to a standardized defect with exposed bone on the rat's bladebone for the first time. Thereby, in contrast to avascular treatments, sufficient coverage with a quick reconstruction of the wound was achieved after two weeks. The application of growth factors was not required for this process, which is highly beneficial as they are strongly

discussed to be carcinogenic. Furthermore, it was possible to dispense with complex *in vitro* cell cultures, as the natural cell migration across the vessel surface has resulted in an adequate remodeling of the tissue. The particular suitability of MatriDerm® for generating a vascularized connective tissue flap due to its vascularization capabilities and cell recruitment kinetics was shown.

The results reveal a simple and reliable approach for the fabrication of artificial, vascularized tissue flaps remote from the injury, tailored to the required size and shape. Thus, the extraction morbidity and limited availability of common autologous flaps could be avoided. The development of further approaches by combining the described method with other existing principles in the field of tissue engineering could decisively contribute to the optimized fabrication of mass transfer enabled, vascularized tissue and lead to implementing new, innovative therapeutic strategies.

8 Literaturverzeichnis

1. Kurach, L., Smith, M.E.H. & Fowler, J.D. Microvascular free tissue transfer of the trapezius flap in 20 dogs and a wallaby. *Veterinary Surgery* **42**, 170-175 (2013).
2. Meyer, A., *et al.* Results of combined vascular reconstruction and free flap transfer for limb salvage in patients with critical limb ischemia. *Journal of vascular surgery* (2015).
3. Bryant, R.A. & Nix, D.P. *Acute & Chronic Wounds: Current Management Concepts*, (Elsevier Mosby, 2012).
4. Wong, C.H. & Wei, F.C. Microsurgical free flap in head and neck reconstruction. *Head & neck* **32**, 1236-1245 (2010).
5. Hong, J.P., Shin, H.W., Kim, J.J., Wei, F.C. & Chung, Y.K. The use of anterolateral thigh perforator flaps in chronic osteomyelitis of the lower extremity. *Plastic and reconstructive surgery* **115**, 142-147 (2005).
6. Engel, H., Lin, C.H. & Wei, F.C. Role of microsurgery in lower extremity reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery* **127 Suppl 1**, 228S-238S (2011).
7. Langer, R. & Vacanti, J.P. Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)* **260**, 920-926 (1993).
8. Horch, R.E., *et al.* Tissue engineering and regenerative medicine -where do we stand? *Journal of cellular and molecular medicine* **16**, 1157-1165 (2012).
9. Lovett, M., Lee, K., Edwards, A. & Kaplan, D.L. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **15**, 353-370 (2009).
10. Henne-Bruns, D. 5.1 Wundheilung. in *Duale Reihe Chirurgie* (eds. Henne-Bruns, D., Kremer, B. & Dürig, M.) (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008).
11. Clark, R.A. Wound repair. in *The molecular and cellular biology of wound repair* 3-50 (Springer, 1988).

12. Witte, M.B. & Barbul, A. General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America* **77**, 509-528 (1997).
13. Clark, R.A., et al. Role of macrophages in wound healing. *Surgical forum* **27**, 16-18 (1976).
14. Casey, W.J., Peacock, E.E. & Chvapil, M. Induction of collagen synthesis in rats by transplantation of allogenic macrophages. *Surgical forum* **27**, 53-55 (1976).
15. Singer, A.J. & Clark, R.A.F. Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine* **341**, 738-746 (1999).
16. Li, J., Chen, J. & Kirsner, R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology* **25**, 9-18 (2007).
17. Clark, R.A.F. Basics of cutaneous wound repair. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology* **19**, 693-706 (1993).
18. Dorsett-Martin, W.A. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **12**, 591-599 (2004).
19. Gottrup, F., Agren, M.S. & Karlsmark, T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **8**, 83-96 (2000).
20. Galiano, R.D., Michaels, V.J., Dobryansky, M., Levine, J.P. & Gurtner, G.C. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair and Regeneration* **12**, 485-492 (2004).
21. Davidson, J.M. Animal models for wound repair. *Archives of dermatological research* **290 Suppl**, S1-11 (1998).
22. Bae, S.H., Bae, Y.C., Nam, S.B. & Choi, S.J. A skin fixation method for decreasing the influence of wound contraction on wound healing in a rat model. *Archives of plastic surgery* **39**, 457-462 (2012).
23. Korula, P., Varma, S.K. & Sunderrao, S. Inhibition of wound contraction by point-to-point adherent splintage. *Plastic and reconstructive surgery* **95**, 725-730 (1995).

24. Eck, N. On the question of ligature of the portal vein. *Voen Med Zh* **130**(1877).
25. Murphy, J. Resection of arteries and veins injured in continuity - end-to-end suture: experimental and clinical research. *Med Rec.* **51**, 73-88 (1897).
26. Goyanes, J. Sustitucion plastica de las arterias por las venas o arterioplastia venosa, aplicada, como Nuevo metodo, al tratamiento de los aneurismas. *El Siglo Med* **2752**, 561-564 (1906).
27. Lexer, E. Die ideale Operation des arteriellen u. arteriell-venösen Aneurysma. *Verhandlungen der deutschen Gesellschaft für Chirurgie* (1907).
28. Carrel, A. Permanent intubation of the thoracic aorta. *The Journal of experimental medicine* **16**, 17-24 (1912).
29. Jeger, E. Die Chirurgie der Blutgefäße und des Herzens. Berlin: A. Hirschwald, 1913. Nachdruck. (Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1983).
30. McLean, J. The Thromboplastin action of cephalin. *The American journal of physiology* **41**, 250-257 (1916).
31. Nylen, C.O. The microscope in aural surgery, its first use and later development. *Acta oto-laryngologica. Supplementum* **116**, 226-240 (1954).
32. Jacobson, I.I.J.H. & Suarez, E.L. Microvascular surgery. *Chest* **41**, 220-224 (1962).
33. Merrill, J.P., Murray, J.E., Harrison, J.H. & Guild, W.R. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *Journal of the American Medical Association* **160**, 277-282 (1956).
34. Chase, M.D. & Schwartz, S.I. Consistent patency of 1.5 millimeter arterial anastomoses. *Surgical forum* **13**, 220-222 (1962).
35. Krizek, T.J., Tani, T., Desprez, J.D. & Kiehn, C.L. Experimental transplantation of composite grafts by microsurgical vascular anastomoses. *Plastic and reconstructive surgery* **36**, 538-546 (1965).

36. Taylor, G.I., Miller, G.D. & Ham, F.J. The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plastic and reconstructive surgery* **55**, 533-544 (1975).
37. Oesterwitz, H., Ghods, M. & Geomelas, M. *Praktische Mikrochirurgie: Anwendungen in der Plastischen und Rekonstruktiven Chirurgie und der Urologie*, (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
38. Cronin, T.D. The cross finger flap: a new method of repair. *The American surgeon* **17**, 419-425 (1951).
39. Milton, S.H. Pedicled skin-flaps: the fallacy of the length: width ratio. *The British journal of surgery* **57**, 502-508 (1970).
40. Milton, S.H. Experimental studies on island flaps. 1. The surviving length. *Plastic and reconstructive surgery* **48**, 574-578 (1971).
41. Mühlbauer, W., Herndl, E. & Stock, W. The forearm flap. *Plastic and reconstructive surgery* **70**, 336-342 (1982).
42. Olivari, N. The latissimus flap. *British journal of plastic surgery* **29**, 126-128 (1976).
43. Koshima, I. & Soeda, S. Inferior epigastric artery skin flaps without rectus abdominis muscle. *British journal of plastic surgery* **42**, 645-648 (1989).
44. Verpaele, A.M., *et al.* The superior gluteal artery perforator flap: an additional tool in the treatment of sacral pressure sores. *British journal of plastic surgery* **52**, 385-391 (1999).
45. Song, Y.G., Chen, G.Z. & Song, Y.L. The free thigh flap: a new free flap concept based on the septocutaneous artery. *British journal of plastic surgery* **37**, 149-159 (1984).
46. Allen, R.J. & Heitmann, C. Perforator flaps--the history of evolution. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe* **34**, 216-218 (2002).

47. Miller, C.W., Chang, P. & Bowen, V. Identification and transfer of free cutaneous flaps by microvascular anastomosis in the dog. *Veterinary Surgery* **15**, 199-204 (1986).
48. Fowler, J.D., Degner, D.A., Walshaw, R. & Walker, D. Microvascular free tissue transfer: results in 57 consecutive cases. *Veterinary Surgery* **27**, 406-412 (1998).
49. Philibert, D., Fowler, J.D. & Clapson, J.B. Free microvascular transplantation of the trapezius musculocutaneous flap in dogs. *Veterinary Surgery* **21**, 435-440 (1992).
50. Nicoll, S.A., Fowler, J.D., Remedios, A.M., Clapson, J.B. & George, D. Development of a free latissimus dorsi muscle flap in cats. *Veterinary Surgery* **25**, 40-48 (1996).
51. Degner, D.A. & Walshaw, R. Medial saphenous fasciocutaneous and myocutaneous free flap transfer in eight dogs. *Veterinary Surgery* **26**, 20-25 (1997).
52. Calfee, E.F., *et al.* Microvascular free tissue transfer of the rectus abdominis muscle in dogs. *Veterinary Surgery* **31**, 32-43 (2002).
53. Miller, J.M., Lanz, O.I. & Degner, D.A. Rectus abdominis free muscle flap for reconstruction in nine dogs. *Veterinary Surgery* **36**, 259-265 (2007).
54. Lewin, G.A. & Smith, J.H. Repair of a canine forelimb skin deficit by microvascular transfer of a caudal superficial epigastric flap. *Journal of Small Animal Practice* **51**, 119-122 (2010).
55. de Battisti, A., Polton, G., de Vries, M. & Friend, E. Chest wall reconstruction with latissimus dorsi and an autologous thoracolumbar fascia graft in a dog. *Journal of Small Animal Practice* **56**, 218-222 (2015).
56. Cassell, O.C., Hofer, S.O., Morrison, W.A. & Knight, K.R. Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *British journal of plastic surgery* **55**, 603-610 (2002).
57. Kneser, U., Schaefer, D.J., Polykandriotis, E. & Horch, R.E. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *Journal of cellular and molecular medicine* **10**, 7-19 (2006).

58. Green, W.T., Jr. Articular cartilage repair. Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clinical orthopaedics and related research*, 237-250 (1977).
59. Vacanti, C.A., Langer, R., Schloo, B. & Vacanti, J.P. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plastic and reconstructive surgery* **88**, 753-759 (1991).
60. Rouwkema, J., Rivron, N.C. & van Blitterswijk, C.A. Vascularization in tissue engineering. *Trends in biotechnology* **26**, 434-441 (2008).
61. Novosel, E.C., Kleinhans, C. & Kluger, P.J. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews* **63**, 300-311 (2011).
62. Mikos, A.G., *et al.* Prevascularization of porous biodegradable polymers. *Biotechnology and bioengineering* **42**, 716-723 (1993).
63. Sakakibara, Y., *et al.* Prevascularization with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor enhances the benefits of cardiomyocyte transplantation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **124**, 50-56 (2002).
64. Levenberg, S. & Langer, R. Advances in tissue engineering. *Current topics in developmental biology* **61**, 113-134 (2004).
65. Carmeliet, P. & Jain, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298-307 (2011).
66. Ribatti, D., Vacca, A., Nico, B., Roncali, L. & Dammacco, F. Postnatal vasculogenesis. *Mechanisms of development* **100**, 157-163 (2001).
67. Asahara, T., *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation research* **85**, 221-228 (1999).
68. Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**, 873-887 (2011).
69. Mammoto, A., *et al.* A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis. *Nature* **457**, 1103-1108 (2009).

70. Gaengel, K., Genove, G., Armulik, A. & Betsholtz, C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **29**, 630-638 (2009).
71. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* **6**, 389-395 (2000).
72. Swift, M.R. & Weinstein, B.M. Arterial-venous specification during development. *Circulation research* **104**, 576-588 (2009).
73. Jones, E.A., le Noble, F. & Eichmann, A. What determines blood vessel structure? Genetic prespecification vs. hemodynamics. *Physiology (Bethesda, Md.)* **21**, 388-395 (2006).
74. Arroyo, A.G. & Iruela-Arispe, M.L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular research* **86**, 226-235 (2010).
75. Blasi, F. & Carmeliet, P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 932-943 (2002).
76. Tremblay, P.L., Hudon, V., Berthod, F., Germain, L. & Auger, F.A. Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **5**, 1002-1010 (2005).
77. Song, J.J. & Ott, H.C. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends in molecular medicine* **17**, 424-432 (2011).
78. Ott, H.C., *et al.* Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine* **14**, 213-221 (2008).
79. Royce, P.M., Kato, T., Ohsaki, K. & Miura, A. The enhancement of cellular infiltration and vascularisation of a collagenous dermal implant in the rat by platelet-derived growth factor BB. *Journal of dermatological science* **10**, 42-52 (1995).
80. Liu, H., *et al.* Effects of the controlled-released basic fibroblast growth factor from chitosan-gelatin microspheres on human fibroblasts cultured on a chitosan-gelatin scaffold. *Biomacromolecules* **8**, 1446-1455 (2007).

81. Pieper, J.S., *et al.* Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats. *Biomaterials* **21**, 1689-1699 (2000).
82. Pieper, J.S., *et al.* Loading of collagen-heparan sulfate matrices with bFGF promotes angiogenesis and tissue generation in rats. *Journal of biomedical materials research* **62**, 185-194 (2002).
83. Nillesen, S.T., *et al.* Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials* **28**, 1123-1131 (2007).
84. Hall, H. Modified fibrin hydrogel matrices: both, 3D-scaffolds and local and controlled release systems to stimulate angiogenesis. *Current pharmaceutical design* **13**, 3597-3607 (2007).
85. Kaihara, S., *et al.* Silicon micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue engineering* **6**, 105-117 (2000).
86. Nazhat, S.N., *et al.* Controlled Microchannelling in Dense Collagen Scaffolds by Soluble Phosphate Glass Fibers. *Biomacromolecules* **8**, 543-551 (2007).
87. Mondy, W.L., *et al.* Computer-aided design of microvasculature systems for use in vascular scaffold production. *Biofabrication* **1**, 035002 (2009).
88. Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G. & Markwald, R.R. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends in biotechnology* **21**, 157-161 (2003).
89. Kaully, T., Kaufman-Francis, K., Lesman, A. & Levenberg, S. Vascularization--the conduit to viable engineered tissues. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **15**, 159-169 (2009).
90. Altman, G.H., *et al.* Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **24**, 401-416 (2003).
91. Dutt, K., *et al.* Three-dimensional model of angiogenesis: coculture of human retinal cells with bovine aortic endothelial cells in the NASA bioreactor. *Tissue engineering* **9**, 893-908 (2003).
92. Carrier, R.L., *et al.* Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle. *Tissue engineering* **8**, 175-188 (2002).

93. Chouinard, J.A., Gagnon, S., Couture, M.G., Levesque, A. & Vermette, P. Design and validation of a pulsatile perfusion bioreactor for 3D high cell density cultures. *Biotechnology and bioengineering* **104**, 1215-1223 (2009).
94. Sodian, R., *et al.* Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering. *Tissue engineering* **8**, 863-870 (2002).
95. Niklason, L.E., *et al.* Functional arteries grown in vitro. *Science (New York, N.Y.)* **284**, 489-493 (1999).
96. Lesman, A., *et al.* Engineering vessel-like networks within multicellular fibrin-based constructs. *Biomaterials* **32**, 7856-7869 (2011).
97. Lesman, A., Gepstein, L. & Levenberg, S. Cell tri-culture for cardiac vascularization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1181**, 131-137 (2014).
98. Geiger, F., *et al.* VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone* **41**, 516-522 (2007).
99. Yao, S.T. Microvascular transplantation of prefabricated free thigh flap. *Plastic and reconstructive surgery* **69**, 568 (1982).
100. Parrett, B. & Pribaz, J. Prefabricated and prelaminated flaps. in *Color Atlas of Burn Reconstructive Surgery* (eds. Hyakusoku, H., Orgill, D.P., Teot, L., Pribaz, J.J. & Ogawa, R.) 300-309 (Springer Berlin Heidelberg, 2010).
101. Pribaz, J.J. & Fine, N.A. Prelamination: Defining the prefabricated flap—a case report and review. *Microsurgery* **15**, 618-623 (1994).
102. Vranckx, J.J., Den Hondt, M. & Delaere, P. Prefabrication and prelamination strategies for the reconstruction of complex defects of trachea and larynx. *Journal of reconstructive microsurgery* **30**, 145-152 (2014).
103. von Bomhard, A., *et al.* Prefabrication of 3D cartilage constructs: Towards a tissue engineered auricle - a model tested in rabbits. *PloS one* **8**, e71667 (2013).

104. Yang, J., *et al.* Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials* **28**, 5033-5043 (2007).
105. Shimizu, T., *et al.* Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 708-710 (2006).
106. Buehrer, G., *et al.* Combination of BMP2 and MSCs significantly increases bone formation in the rat arterio-venous loop model. *Tissue engineering. Part A* **21**, 96-105 (2015).
107. Kneser, U., *et al.* Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices. *Journal of biomedical materials research* **47**, 494-503 (1999).
108. Bitto, F.F., *et al.* Myogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a newly developed neurotised AV-loop model. *BioMed research international* **2013**, 935046 (2013).
109. Cassell, O.C., *et al.* The influence of extracellular matrix on the generation of vascularized, engineered, transplantable tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences* **944**, 429-442 (2001).
110. Tanaka, Y., *et al.* Effects of flow patterns and hemodynamic force on vascular endothelium in the temporary arteriovenous shunt loop in rabbits. *Journal of reconstructive microsurgery* **29**, 331-340 (2013).
111. Beier, J.P., *et al.* De novo generation of an axially vascularized processed bovine cancellous-bone substitute in the sheep arteriovenous-loop model. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* **46**, 148-155 (2011).
112. Warnke, P.H., *et al.* Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* **364**, 766-770 (2004).
113. Erol, O.O. & Spira, M. New capillary bed formation with a surgically constructed arteriovenous fistula. *Surgical forum* **30**, 530-531 (1979).
114. Polykandriotis, E., Arkudas, A., Horch, R.E., Sturzl, M. & Kneser, U. Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a

- new perspective for biomedical science. *Journal of cellular and molecular medicine* **11**, 6-20 (2007).
115. Khouri, R.K., Upton, J. & Shaw, W.W. Prefabrication of composite free flaps through staged microvascular transfer: an experimental and clinical study. *Plastic and reconstructive surgery* **87**, 108-115 (1991).
116. Tanaka, Y., Tsutsumi, A., Crowe, D.M., Tajima, S. & Morrison, W.A. Generation of an autologous tissue (matrix) flap by combining an arteriovenous shunt loop with artificial skin in rats: preliminary report. *British journal of plastic surgery* **53**, 51-57 (2000).
117. Mian, R., *et al.* Formation of new tissue from an arteriovenous loop in the absence of added extracellular matrix. *Tissue engineering* **6**, 595-603 (2000).
118. Lokmic, Z., Stillaert, F., Morrison, W.A., Thompson, E.W. & Mitchell, G.M. An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 511-522 (2007).
119. Arkudas, A., *et al.* Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue engineering* **13**, 1549-1560 (2007).
120. Boos, A.M., *et al.* Engineering axially vascularized bone in the sheep arteriovenous-loop model. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **7**, 654-664 (2013).
121. Schmidt, V.J., *et al.* High flow conditions increase connexin43 expression in a rat arteriovenous and angiointuctive loop model. *PloS one* **8**, e78782 (2013).
122. Weis, C., *et al.* Automatic quantification of angiogenesis in 2D sections: a precise and timesaving approach. *Journal of microscopy* (2015).
123. Arkudas, A., *et al.* Automatic quantitative micro-computed tomography evaluation of angiogenesis in an axially vascularized tissue-engineered bone construct. *Tissue engineering. Part C, Methods* **16**, 1503-1514 (2010).
124. Schmidt, V.J., *et al.* Flow increase is decisive to initiate angiogenesis in veins exposed to altered hemodynamics. *PloS one* **10**, e0117407 (2015).

125. Polykandriotis, E., *et al.* Regression and persistence: remodelling in a tissue engineered axial vascular assembly. *Journal of cellular and molecular medicine* **13**, 4166-4175 (2009).
126. Polykandriotis, E., *et al.* Factors influencing successful outcome in the arteriovenous loop model: a retrospective study of 612 loop operations. *Journal of reconstructive microsurgery* **27**, 11-18 (2011).
127. Arkudas, A., *et al.* Combination of extrinsic and intrinsic pathways significantly accelerates axial vascularization of bioartificial tissues. *Plastic and reconstructive surgery* **129**, 55e-65e (2012).
128. Polykandriotis, E., *et al.* The venous graft as an effector of early angiogenesis in a fibrin matrix. *Microvascular research* **75**, 25-33 (2008).
129. Asano, Y., Ichioka, S., Shibata, M., Ando, J. & Nakatsuka, T. Sprouting from arteriovenous shunt vessels with increased blood flow. *Medical & biological engineering & computing* **43**, 126-130 (2005).
130. Hofer, S.O., *et al.* The use of pimonidazole to characterise hypoxia in the internal environment of an in vivo tissue engineering chamber. *British journal of plastic surgery* **58**, 1104-1114 (2005).
131. Watson, O., *et al.* Blood flow suppresses vascular Notch signalling via dll4 and is required for angiogenesis in response to hypoxic signalling. *Cardiovascular research* **100**, 252-261 (2013).
132. Laws, M.J., *et al.* Gap junction communication between uterine stromal cells plays a critical role in pregnancy-associated neovascularization and embryo survival. *Development (Cambridge, England)* **135**, 2659-2668 (2008).
133. Wang, H.H., *et al.* Activation of endothelial cells to pathological status by down-regulation of connexin43. *Cardiovascular research* **79**, 509-518 (2008).
134. Inai, T., *et al.* Shear stress-induced upregulation of connexin 43 expression in endothelial cells on upstream surfaces of rat cardiac valves. *Histochemistry and cell biology* **122**, 477-483 (2004).
135. Gabriels, J.E. & Paul, D.L. Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed. *Circulation research* **83**, 636-643 (1998).

136. Tanaka, Y., *et al.* Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation? *Plastic and reconstructive surgery* **112**, 1636-1644 (2003).
137. Arkudas, A., *et al.* Composition of fibrin glues significantly influences axial vascularization and degradation in isolation chamber model. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* **23**, 419-427 (2012).
138. Arkudas, A., *et al.* Evaluation of blood vessel ingrowth in fibrin gel subject to type and concentration of growth factors. *Journal of cellular and molecular medicine* **13**, 2864-2874 (2009).
139. Bach, A.D., *et al.* A new approach to tissue engineering of vascularized skeletal muscle. *Journal of cellular and molecular medicine* **10**, 716-726 (2006).
140. Messina, A., *et al.* Generation of a vascularized organoid using skeletal muscle as the inductive source. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 1570-1572 (2005).
141. Manasseri, B., *et al.* Microsurgical arteriovenous loops and biological templates: a novel in vivo chamber for tissue engineering. *Microsurgery* **27**, 623-629 (2007).
142. Kneser, U., *et al.* Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop. *Tissue engineering* **12**, 1721-1731 (2006).
143. Arkudas, A., *et al.* Evaluation of angiogenesis of bioactive glass in the arteriovenous loop model. *Tissue engineering. Part C, Methods* **19**, 479-486 (2013).
144. Weigand, A., *et al.* Acceleration of vascularized bone tissue-engineered constructs in a large animal model combining intrinsic and extrinsic vascularization. *Tissue engineering. Part A* **21**, 1680-1694 (2015).
145. Haack, S. *Stimulation der Wundheilung durch wiederholte lokale Applikation von Insulin-like growth factor-I (IGF-I) unter dem Aspekt unterschiedlicher Applikationsformen.* Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2008).

146. Gross, D., Hauger, W., Schröder, J. & Wall, W.A. *Technische Mechanik 2: Elastostatik*, (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
147. Potter, M.J., Linge, C., Cussons, P., Dye, J.F. & Sanders, R. An investigation to optimize angiogenesis within potential dermal replacements. *Plastic and reconstructive surgery* **117**, 1876-1885 (2006).
148. Feng, X., Tonnesen, M.G., Mousa, S.A. & Clark, R.A. Fibrin and collagen differentially but synergistically regulate sprout angiogenesis of human dermal microvascular endothelial cells in 3-dimensional matrix. *International journal of cell biology* **2013**, 231279 (2013).
149. Beier, J.P., *et al.* Collagen matrices from sponge to nano: new perspectives for tissue engineering of skeletal muscle. *BMC biotechnology* **9**, 34 (2009).
150. Cao, Y., *et al.* The influence of architecture on degradation and tissue ingrowth into three-dimensional poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds in vitro and in vivo. *Biomaterials* **27**, 2854-2864 (2006).
151. van der Veen, V.C., van der Wal, M.B.A., van Leeuwen, M.C.E., Ulrich, M.M.W. & Middelkoop, E. Biological background of dermal substitutes. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **36**, 305-321 (2010).
152. Hahnenberger, R. & Jakobson, A.M. Antiangiogenic effect of sulphated and nonsulphated glycosaminoglycans and polysaccharides in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Glycoconjugate journal* **8**, 350-353 (1991).
153. Robinet, A., *et al.* Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *Journal of cell science* **118**, 343-356 (2005).
154. Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T. & Carmeliet, P. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Developmental cell* **16**, 167-179 (2009).
155. Yuan, Q., *et al.* PHDs inhibitor DMOG promotes the vascularization process in the AV loop by HIF-1a up-regulation and the preliminary discussion on its kinetics in rat. *BMC biotechnology* **14**, 112 (2014).
156. Guo, S. & Dipietro, L.A. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research* **89**, 219-229 (2010).

157. Min, J.H., Yun, I.S., Lew, D.H., Roh, T.S. & Lee, W.J. The use of matrigel and autologous skin graft in the treatment of full thickness skin defects. *Archives of plastic surgery* **41**, 330-336 (2014).
158. Philandrianos, C., *et al.* Comparison of five dermal substitutes in full-thickness skin wound healing in a porcine model. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **38**, 820-829 (2012).
159. Yan, H., *et al.* Integra acellular collagen as a vascular carrier for skin flap prefabrication in rats. *Annals of plastic surgery* **67**, 299-302 (2011).
160. Wu, Y., Al-Ameen, M.A. & Ghosh, G. Integrated effects of matrix mechanics and vascular endothelial growth factor (VEGF) on capillary sprouting. *Annals of biomedical engineering* **42**, 1024-1036 (2014).
161. Heberer, G., *et al.* *Aorta und große Arterien: Pathophysiologie, Klinik, Röntgenologie und Chirurgie*, (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
162. Daamen, W.F., *et al.* A biomaterial composed of collagen and solubilized elastin enhances angiogenesis and elastic fiber formation without calcification. *Tissue engineering. Part A* **14**, 349-360 (2008).
163. Sieminski, A.L. & Gooch, K.J. Biomaterial–microvasculature interactions. *Biomaterials* **21**, 2233-2241 (2000).
164. Klenke, F.M., *et al.* Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *Journal of biomedical materials research. Part A* **85**, 777-786 (2008).
165. Critser, P.J., Kreger, S.T., Voytik-Harbin, S.L. & Yoder, M.C. Collagen matrix physical properties modulate endothelial colony forming cell-derived vessels in vivo. *Microvascular research* **80**, 23-30 (2010).
166. Cronin, K.J., *et al.* The role of biological extracellular matrix scaffolds in vascularized three-dimensional tissue growth in vivo. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **82**, 122-128 (2007).
167. Sieminski, A.L., Hebbel, R.P. & Gooch, K.J. The relative magnitudes of endothelial force generation and matrix stiffness modulate capillary morphogenesis in vitro. *Experimental cell research* **297**, 574-584 (2004).

168. Ghajar, C.M., *et al.* The effect of matrix density on the regulation of 3-D capillary morphogenesis. *Biophysical journal* **94**, 1930-1941 (2008).
169. Yamamura, N., Sudo, R., Ikeda, M. & Tanishita, K. Effects of the mechanical properties of collagen gel on the in vitro formation of microvessel networks by endothelial cells. *Tissue engineering* **13**, 1443-1453 (2007).
170. Passaniti, A., *et al.* A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **67**, 519-528 (1992).
171. Ingber, D.E. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circulation research* **91**, 877-887 (2002).
172. Gray, D.S., Tien, J. & Chen, C.S. Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned Young's modulus. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **66A**, 605-614 (2003).
173. Wong, J.Y., Velasco, A., Rajagopalan, P. & Pham, Q. Directed movement of vascular smooth muscle cells on gradient-compliant hydrogels. *Langmuir* **19**, 1908-1913 (2003).
174. Francis, M.E., Uriel, S. & Brey, E.M. Endothelial cell-matrix interactions in neovascularization. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **14**, 19-32 (2008).
175. Gaudet, C., *et al.* Influence of type I collagen surface density on fibroblast spreading, motility, and contractility. *Biophysical journal* **85**, 3329-3335 (2003).
176. Ingber, D.E. & Folkman, J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *The Journal of cell biology* **109**, 317-330 (1989).
177. Guthrie, R.H., Jr., Cucin, R.L., Orlando, J.C. & Kovachev, D. Silicone elastomer sheeting in the development of pedicle flaps. *Archives of otolaryngology (Chicago, Ill. : 1960)* **101**, 89-90 (1975).
178. Mutaf, M., Tasaki, Y. & Fujii, T. Is bed isolation necessary during flap prefabrication? An experimental study in rats. *Annals of plastic surgery* **33**, 392-400 (1994).

179. Polykandriotis, E., *et al.* Bioreaktoren in der Regenerativen Medizin–Vom technischen Apparat zur rekonstruktiven Alternative? *Handchirurgie· Mikrochirurgie· Plastische Chirurgie* **44**, 198-203 (2012).
180. Arkudas, A., *et al.* Fibrin gel-immobilized VEGF and bFGF efficiently stimulate angiogenesis in the AV loop model. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **13**, 480-487 (2007).
181. Tanaka, Y., *et al.* Prefabricated engineered skin flap using an arteriovenous vascular bundle as a vascular carrier in rabbits. *Plastic and reconstructive surgery* **117**, 1860-1875 (2006).
182. Nguyen, T.H., *et al.* Comparison of effective use of implanted vascular pedicles for skin flap prefabrication: an experimental study. *Annals of plastic surgery* **63**, 209-216 (2009).
183. Bottcher-Haberzeth, S., *et al.* Matriderm(R) 1 mm versus Integra(R) Single Layer 1.3 mm for one-step closure of full thickness skin defects: a comparative experimental study in rats. *Pediatric surgery international* **28**, 171-177 (2012).
184. Druecke, D., *et al.* Modulation of scar tissue formation using different dermal regeneration templates in the treatment of experimental full-thickness wounds. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **12**, 518-527 (2004).
185. Forster, N.A., *et al.* A prevascularized tissue engineering chamber supports growth and function of islets and progenitor cells in diabetic mice. *Islets* **3**, 271-283 (2011).
186. McGrath, M.H. & Simon, R.H. Wound Geometry and the Kinetics of Wound Contraction. *Plastic and reconstructive surgery* **72**, 66-72 (1983).
187. Knighton, D.R., Silver, I.A. & Hunt, T.K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* **90**, 262-270 (1981).
188. Reimers, K., Aust, M. & Sorg, H. Biologische Grundlagen der Wundheilung. in *Praxis der Plastischen Chirurgie* 3-11 (Springer Berlin Heidelberg, 2011).

189. Shandalov, Y., *et al.* An engineered muscle flap for reconstruction of large soft tissue defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 6010-6015 (2014).
190. Polnaszek, N., *et al.* Fibroblast growth factor 2 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer research* **63**, 5754-5760 (2003).
191. Wang, C.A., Harrell, J.C., Iwanaga, R., Jedlicka, P. & Ford, H.L. Vascular endothelial growth factor C promotes breast cancer progression via a novel antioxidant mechanism that involves regulation of superoxide dismutase 3. *Breast cancer research : BCR* **16**, 462 (2014).
192. Li, S., Huang, N.F. & Hsu, S. Mechanotransduction in endothelial cell migration. *Journal of cellular biochemistry* **96**, 1110-1126 (2005).
193. Lamalice, L., Le Boeuf, F. & Huot, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation research* **100**, 782-794 (2007).
194. Dejana, E., *et al.* Interaction between fibrinogen and cultured endothelial cells. Induction of migration and specific binding. *The Journal of clinical investigation* **75**, 11-18 (1985).
195. King, S.J., *et al.* beta1 integrins regulate fibroblast chemotaxis through control of N-WASP stability. *The EMBO journal* **30**, 1705-1718 (2011).
196. Valauri, F.A., Hirase, Y. & Buncke, H.J. Prefabricated neovascularized free muscle flaps: pedicle variations. *Journal of reconstructive microsurgery* **4**, 203-207 (1988).
197. Dong, Q.S., *et al.* Prefabrication of axial vascularized tissue engineering coral bone by an arteriovenous loop: a better model. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **32**, 1536-1541 (2012).
198. Horch, R.E., Beier, J.P., Kneser, U. & Arkudas, A. Successful human long-term application of in situ bone tissue engineering. *Journal of cellular and molecular medicine* **18**, 1478-1485 (2014).
199. Guven, E., Aydin, H.U., Kuvat, S.V., Berkoz, O. & Topalan, M. Effects of microarterial anastomosis torsion on survival of oblique groin flap in rats. *Journal of plastic surgery and hand surgery* **46**, 379-382 (2012).

200. Rahmanian-Schwarz, A., Knoeller, T., Held, M., Amr, A. & Schaller, H.E. A new, rapid, standardized method for harvesting split skin grafts in rodents. *Plastic and reconstructive surgery* **127**, 1494-1497 (2011).
201. Ryssel, H., Germann, G., Kloeters, O., Gazyakan, E. & Radu, C.A. Dermal substitution with Matriderm® in burns on the dorsum of the hand. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **36**, 1248-1253 (2010).
202. Schneider, J., *et al.* Matriderm® versus Integra®: A comparative experimental study. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **35**, 51-57 (2009).
203. Killat, J., *et al.* Cultivation of keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional bovine collagen-elastin matrix (Matriderm(R)) and application for full thickness wound coverage in vivo. *International journal of molecular sciences* **14**, 14460-14474 (2013).
204. Bannasch, H., *et al.* Wundheilung am Schwein nach Transplantation einer Keratinozyten-Fibrin-Kleber-Suspension und azellulärer Dermis. in *Chirurgisches Forum 2002*, Vol. 31 485-487 (Springer Berlin Heidelberg, 2002).
205. Meyer, W. Bemerkungen zur Eignung der Schweinehaut als biologisches Modell für die Haut des Menschen. *Hautarzt* **47**, 178-182 (1996).
206. Sullivan, T.P., Eaglstein, W.H., Davis, S.C. & Mertz, P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair and Regeneration* **9**, 66-76 (2001).

9 Publikationen

Veröffentlichungen in begutachteten Journals

Schmidt VJ, Hilgert JG, Covi JM, Weis C, **Wietbrock JO**, de Wit C, Horch RE, Kneser U. High flow conditions increase connexin43 expression in a rat arteriovenous and angioinductive loop model. *PLoS One* **8**: e78782 (2013).

Schmidt VJ, Hilgert JG, Covi JM, Leibig N, **Wietbrock JO**, Arkudas A, Polykandriotis E, de Wit C, Horch RE, Kneser U. Flow increase is decisive to initiate angiogenesis in veins exposed to altered hemodynamics. *PLoS One* **10**: e0117407 (2015).

Kongressbeiträge

Wietbrock JO, Huber L, Leibig N, Schulte M, Kneser U, Schmidt VJ. Funktioneller Gewebeersatz mittels eines hämodynamisch stimulierten und *in vivo* vaskularisierten Bindegewebslappens (186) 18. *Chirurgische Forschungstage in Hannover* (10.10.2014)

Schmidt VJ, Leibig N, **Wietbrock JO**; Bigdeli AK, Kneser U. The hemodynamically stimulated and *in vivo* vascularized soft tissue free flap enables closure of large defects in rats (ID: 1068) 132. *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in München* (30.04.2015)

10 Danksagung

Mein erster Dank geht an Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka für ihr Interesse an meiner Arbeit, für die hilfreiche Unterstützung und für die Übernahme der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Kneser möchte ich herzlich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der BGU Ludwigshafen danken. Das in mich gesetzte Vertrauen sowie die zielgerichtete wissenschaftliche Begleitung haben mir sehr geholfen bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Mein besonders lieber Dank geht an Herrn Dr. Volker Schmidt, der mir mit seinem fundierten Fachwissen und konstruktiver Kritik nicht nur viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit gegeben hat, sondern mich auch durch seinen Optimismus und motivierende Begeisterung für das Forschungsthema nachhaltig geprägt hat. Seine stete Hilfs- und Gesprächsbereitschaft und kontinuierliche Förderung hat wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Neben der exzellenten Betreuung möchte ich Ihm für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts danken.

Herrn Dr. Matthias Schulte bin ich für seine fachliche Unterstützung bei der Versuchsdurchführung, den vielen Anregungen und seine überdurchschnittliche Hilfsbereitschaft sehr dankbar. Ohne Ihn wäre ich so manches Mal verzweifelt.

Herrn Dr. Torsten Gloe vom Institut für Kardiovaskuläre Physiologie der Medizinischen Fakultät Mannheim möchte ich für seine wertvolle fachliche Beratung, seine wissenschaftlichen Anregungen und die gute Zusammenarbeit danken.

Herrn PD Dr. Sven Reese aus der Tierärztlichen Fakultät München danke ich für die umfangreiche Hilfestellung und Beratung bei der statistischen Auswertung.

Ganz besonders danke ich jedoch meiner Familie für die stete Unterstützung während der gesamten Studien- und Promotionszeit, sowie für ihren besonders wichtigen emotionalen Beistand, ohne die mir die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin danke ich natürlich Thomas, dem Menschen, der mir jeden Tag zur Seite steht, mir Mut macht und jederzeit Rückhalt bietet.