

AUS DER KLINIK FÜR KINDERCHIRURGIE
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
DIREKTOR: PROF. DR. MED. L. WÜNSCH

In-vivo-Regeneration von Dünndarm

Testung biogener und synthetischer Materialien zur
Regeneration von Dünndarmgewebe im Tiermodell

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von
Johannes Paul Beer
aus Kassel

Lübeck 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dott. Dr. med. (U.C.MI.) Wunsch
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Eberhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2016

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.12.2016

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	Regenerative Medizin und <i>tissue engineering</i>	1
1.2	Grundlagen der Anatomie, Histologie und Physiologie des Dünndarms.....	2
1.3	Regeneration und Defektheilung von Dünndarmgewebe.....	5
1.4	Klinischer Hintergrund: Darmversagen und Kurzdarmsyndrom im Kindesalter	6
1.5	Stand der Forschung: Zellträgermaterialien für <i>small intestinal tissue engineering</i>	9
1.6	Zielsetzung und Hypothesen.....	17
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1	Versuchsablauf und Genehmigung der Tierversuche.....	19
2.2	Versuchstiere.....	20
2.3	Material.....	20
2.3.1	Kollagene Matrizes.....	21
2.3.1.1	Surgisis® 4-Layer Tissue Graft.....	21
2.3.1.2	Chondro-Gide®.....	23
2.3.1.3	TUTOPATCH®.....	24
2.3.2	Synthetische Matrizes.....	25
2.3.2.1	ETHISORB® Dura Patch.....	25
2.3.3	Weitere Materialien.....	26
2.4	Methoden.....	27
2.4.1	Titanisierung des Surgisis® 4-Layer Tissue Graft.....	27
2.4.2	Vorbereitung der Matrizes.....	27
2.4.3	Präoperatives Management und Schmerztherapie.....	28
2.4.4	Chirurgische Techniken.....	29
2.4.5	Tierhaltung und Euthanasie.....	31
2.4.6	Entnahme und Aufarbeitung der Präparate.....	32
2.4.6.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	33
2.4.7	Makroskopische Analyse und statistische Methoden.....	34
2.4.8	Mikroskopische Analyse und histomorphologische Auswertung.....	35

3.	ERGEBNISSE.....	39
3.1	Biomechanische Stabilität	39
3.1.1	Surgisis® 4-Layer Tissue Graft.....	39
3.1.2	Chondro-Gide®	40
3.1.3	TUTOPATCH®	41
3.1.4	ETHISORB® Dura Patch.....	42
3.1.5	In-vivo-Schrumpfung der einzelnen Materialien.....	43
3.1.6	Unterschiede zwischen biogenen und synthetischen Materialien	44
3.2	Dünndarmregeneration.....	48
3.2.1	Gemeinsame Prinzipien der Regeneration von Dünndarmmukosa	48
3.2.2	Surgisis® 4-Layer Tissue Graft.....	54
3.2.3	Chondro-Gide®	58
3.2.4	TUTOPATCH®	62
3.2.5	ETHISORB® Dura Patch.....	66
4.	DISKUSSION	71
4.1	Biomechanische Stabilität	71
4.2	Dünndarmregeneration.....	77
4.3	Fazit und Ausblick.....	84
5.	ZUSAMMENFASSUNG	87
6.	LITERATURVERZEICHNIS	89
7.	ANHANG	95
7.1	Auflistungen verwendeter Materialien.....	95
7.2	Evaluation der histomorphologischen Zielparameter.....	97
8.	DANKSAGUNG	99
9.	LEBENS LAUF.....	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen:

EZM; EZMs	Extrazellulärmatrix; Extrazellulärmatrizes
LILT	<i>longitudinale intestinale lengthening and tapering</i>
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PDS	Poly-p-dioxanon
PGA	<i>polyglycolic acid</i> [dt. Polyglykolsäure]
PLGA	<i>polylactic-co-glycolic acid</i> [dt. Polylactid-co-Glycolid]
PLLA	<i>poly-L-lactic acid</i> [dt. Poly-L-Lactid]
PP	<i>polypropylene</i> [dt. Polypropylen]
PTFE	<i>polytetrafluoroethylene</i> [dt. Polytetrafluorethylen]
STEP	Serielle transversale Enteroplastie
SIS	<i>small intestinal submucosa</i> [dt. Dünndarmsubmukosa]
TE	<i>tissue engineering</i> [dt. Gewebekonstruktion]

Statistische Kennwerte:

α	Signifikanzniveau
H_0	Nullhypothese
H_A	Alternativhypothese
IQR	Interquartilsabstand
max	Maximum
min	Minimum
n	Anzahl
p	Signifikanz
$Q_{0,25}$	25. Perzentil
$Q_{0,75}$	75. Perzentil
t_x	Zeitpunkt
\tilde{x}	Median

1. EINLEITUNG

1.1 Regenerative Medizin und *tissue engineering*

Die regenerative Medizin ist ein biomedizinischer Forschungsbereich, zu dem u. a. die Stammzellforschung und das *tissue engineering* (*TE*, dt. Gewebekonstruktion) zählen. *TE* umfasst ein interdisziplinäres Forschungsfeld, das technische Prinzipien mit Biowissenschaft kombiniert, um ein biologisches Äquivalent zu entwickeln, das Gewebefunktionen wieder herstellt, erhält oder verbessert (Langer und Vacanti, 1993). Seit ungefähr 30 Jahren befasst sich die Wissenschaft mit der Erforschung lebender Zellen, biokompatibler Materialien und Wachstumsfaktoren, um diese zu kombinieren und in den Körper zu implantieren, um die Wundheilung zu unterstützen oder die Funktion fehlender Organe zu ersetzen. Gerade letzteres ist im Hinblick auf einen Mangel an Spenderorganen oder hoher Abstoßungsraten bei der Transplantation gewisser Organe von Interesse. Die Termini „regenerative Medizin“ und „*tissue engineering*“ werden häufig synonym verwendet, sind aber bis heute nicht eindeutig definiert. Orlando et al. differenzieren zwischen der regenerativen Medizin, bei der Stammzellen zur Anwendung kommen, sowie dem *TE*, das vornehmlich die Produktion von Körperteilen *ex vivo* beschreibt (Orlando et al., 2011). Stock und Vacanti wiederum verstehen unter *TE*, die Implantation *in vitro* kombinierter Zell-Matrix-Rekonstruktionen in den Körper, und unter *guided tissue regeneration*, die Implantation azellulärer Matrices, die *in vivo* neu besiedelt werden (Stock und Vacanti, 2001).

Die ersten auf Gewebe basierenden Therapien waren Hauttransplantatetechniken. Mit der Möglichkeit Zellen zu konservieren und zu kultivieren, um sie auf biologisch abbaubaren Materialien anzuhaften, wurde um 1980 das erste durch *TE* hergestellte Hauttransplantat entwickelt und angewendet (Green et al., 1979; O'Connor et al., 1981). Während der 90er Jahre wurden Hauttransplantatetechniken und anschließend Produkte zur Knorpelregeneration verbessert und kommerzialisiert (MacNeil, 2007; Khan und Hardingham, 2012).

Obwohl signifikante Fortschritte in der Regeneration der Harnblase (Oberpenning et al., 1999; Cosentino et al., 2012), der Kornea (Tsai et al., 2000) und der Bronchien (Macchiarini et al., 2008) erzielt wurden, sind durch *TE* hergestellte Blutgefäße (Shin'oka et al., 2001), Herzen (Karikkineth und Zimmermann, 2013), Lebern (Allen und Bhatia, 2002), Bauchspeicheldrüsen sowie Gewebe im Bereich des Gastrointestinaltrakts (Choi et al., 1998; Grikscheit et al., 2002, 2003; Maemura et al., 2003) nach jahrelangen Forschungsbemühungen noch weit davon entfernt, klinische Lösungsansätze anzubieten.

Um dieses Ziel erreichen zu können, müssen noch umfassende Probleme gelöst werden. Die Versorgung der Zellen mit einem funktionierendem Gefäßsystem, die Kontrolle komplexer Anordnungen unterschiedlicher Zelltypen im dreidimensionalem Gewebe und die Beschaf-

fung großer Mengen an Zellmaterial, um solche Gewebe generieren zu können, müssen gewährleistet werden. *TE* und regenerative Medizin sind interdisziplinäre und komplexe Forschungsfelder, das ein tiefes Verständnis für den Effekt vielzähliger Faktoren bei der Entwicklung von Geweben und Organen erfordern (Berthiaume et al., 2011).

1.2 Grundlagen der Anatomie, Histologie und Physiologie des Dünndarms

Zum besseren Verständnis für die Regeneration von Dünndarmgewebe ist es erforderlich, dessen Anatomie, Histologie und Physiologie zu beschreiben. Hervorgehoben werden hier die speziellen Eigenschaften des Jejunums.

Der Dünndarm ist ein Organ des Verdauungssystems, indem sich die wichtigsten Verdauungs- und Resorptionsprozesse vollziehen. Beim Erwachsenen hat er eine Länge von ca. 4,7 bis 9,7 m post mortem gemessen (Hounnou et al., 2002). Bei Reifgeborenen ist er ca. 2 m lang (Struijs et al., 2009). Er gliedert sich in das Duodenum, das Jejunum und das Ileum. Das ca. 25 cm lange Duodenum beginnt am Pylorussphinkter des Magens. Es reicht bis zum Treitz-Band (Ligamentum suspensorium duodeni) und setzt sich an der Flexura duodenojejunalis in das Jejunum fort (Schiebler, 2005). Das Jejunum ist der längste Dünndarmabschnitt und geht makro- sowie mikroskopisch ohne scharfe Begrenzung in das Ileum über (Kummer und Welsch, 2014).

Die unterschiedlichen Abschnitte des Rumpfdarms (Speiseröhre, Magen, Dünndarm, Dickdarm) haben einen einheitlichen Wandaufbau. Von innen nach außen (Lüllmann-Rauch, 2012a, vgl. Abb. 1):

Mukosa

Die Schleimhaut wird unterteilt in eine Lamina epithelialis (Oberflächenepithel), eine Lamina propria (lockeres retikuläres Bindegewebe), die vaskularisiert ist und immunologisch aktives Gewebe enthält und eine Lamina muscularis mucosae (glatte Muskulatur), die innen quer und außen längs gerichtet ist.

Submukosa

Diese Bindegewebsschicht besteht hauptsächlich aus scherengitterartig angeordneten Kollagenfasern und ist reich an Blut- und Lymphgefäßen. Außerdem enthält sie den Meissner-Plexus (Nervengewebe), der die Motilität der inneren Darmschichten steuert.

Muskularis

Die Muskelschicht, besteht aus 2 Schichten glatter Muskulatur, einer inneren, stärker ausgeprägten Ring- und einer äußeren Längsmuskelschicht. Zwischen diesen beiden Muskelschichten befindet sich ein weiterer Nervenplexus (Auerbach-Plexus), der die Peristaltik des Darms steuert.

Serosa

Die glatte Auskleidung der Bauchhöhle, die sich nur auf Darmabschnitten findet, die intraperitoneal liegen, besteht aus einer Subserosa (bindegewebige Verschiebeschicht), die unmittelbar an die Muskularis grenzt und einer Serosa (viszerales Epithel des Peritoneums, das durch sogenanntes Mesothel gebildet wird, welches über Zonulae occludentes fest verbunden und sekretorisch aktiv ist).

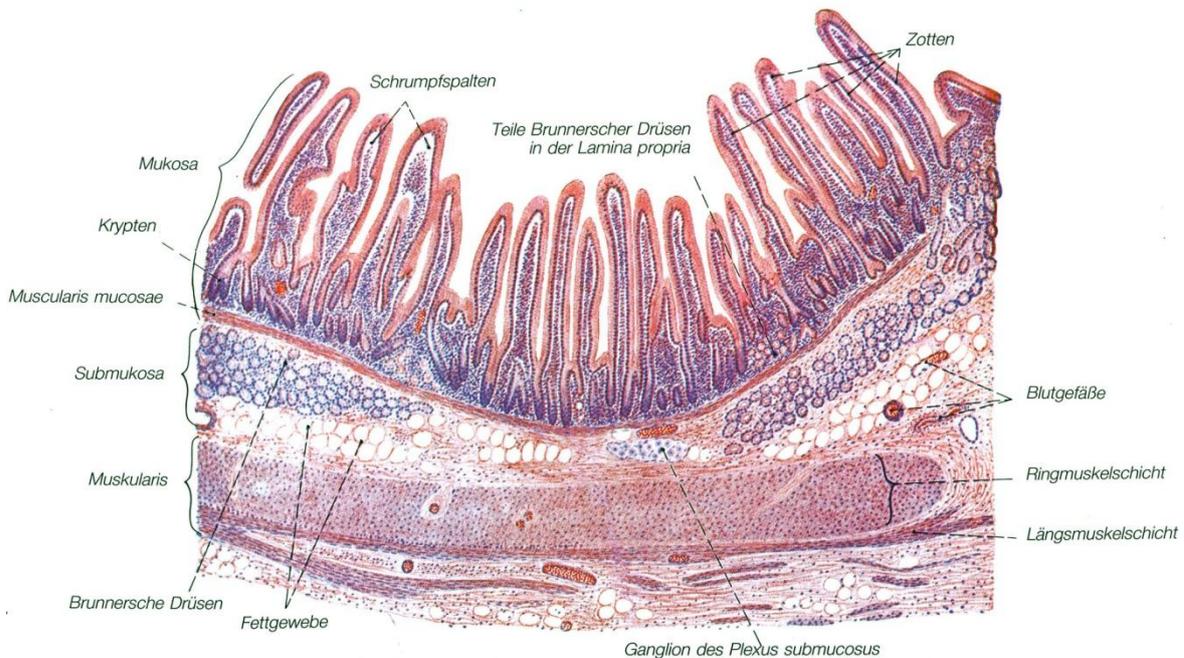


Abb. 1 Schematische Darstellung des histologischen Wandaufbaus des Magen-Darm-Traktes am Beispiel des Dünndarms in Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Quelle: Welsch, Atlas Histologie, 7.Auflage 2005 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München

Eine makro- und mikroskopisch starke Oberflächenvergrößerung ermöglicht dem Jejunum eine hohe Resorptionsleistung. Diese Oberflächenvergrößerung wird durch Falten aus Mukosa und Submukosa (Plicae circulares), Zotten und Mikrovilli erreicht. Es hat eine Gesamtoberfläche von ca. 200 m² beim Erwachsenen (Lüllmann-Rauch, 2012a).

Die Mukosa bildet Zotten und Krypten aus. Die Zotten sind dicht stehende, lange, finger- oder blattförmige Ausstülpungen, die in das Darmlumen vorspringen. Sie sind von einschichtigem Oberflächenepithel bedeckt und werden durch die Lamina propria ausgehöhlt, die kleinste Blutgefäße, glatte Muskelzellen, Makrophagen, Plasmazellen, Eosinophile, Lymphozyten und Mastzellen enthält. Krypten sind tubuläre Einstülpungen, die hauptsächlich von einschichtigem prismatischem Epithel ausgekleidet werden. Das Epithel von Krypten und Zotten geht kontinuierlich ineinander über (Kummer und Welsch, 2014).

Das Oberflächenepithel der Zotten besteht aus resorbierenden Enterozyten, Becherzellen und endokrinen Zellen. Die Enterozyten besitzen einen tiefliegenden ovalen Zellkern und feinste Ausläufer, sog. Mikrovilli. Diese haben eine Länge von ca. 1 µm und sind lichtmikroskopisch

lediglich als flaumige Linie, dem sogenannten Bürstensaum, auf der apikalen Oberfläche erkennbar (Kummer und Welsch, 2014). In der Plasmamembran des Bürstensaums befinden sich unterschiedliche Verdauungsenzyme, die der Verdauung von Kohlenhydraten, Proteinen und Nukleotiden dienen. Hier findet die Resorption aufgespaltener Nahrungsbestandteile statt (Gekle, 2010). Becherzellen sind schleimbildende Zellen, die sich einzeln zwischen den Enterozyten befinden. Sie beinhalten einen basal gelegenen, dichten Zellkern und im apikalen Teil große Schleimgranula, die mittels Exozytose freigesetzt werden.

In den Krypten finden sich die Paneth-Körnerzellen. Sie produzieren Lysozym, ein bakterizides Enzym, und sind zur Phagozytose befähigt. Ihre Aufgabe besteht darin, die mikrobielle Darmflora zu regulieren. Außerdem finden sich hier endokrine Zellen, die zahlreiche Peptidhormone (Cholezystokinin, Sekretin, Somatostatin, u. a.) synthetisieren und diese mittels Exozytose freisetzen. Die Hormone haben in erster Linie parakrine Funktion (Tortora und Derrickson, 2006). Zählt man alle endokrinen Zellen des Dünndarms zusammen, so ist er das größte endokrine Organ des Körpers. In der Tiefe der Krypten befinden sich Stammzellen, aus denen sich das Oberflächenepithel der Zotten innerhalb von 5 bis 6 Tagen regeneriert. Die Apoptose findet hauptsächlich an den Zottenspitzen statt, wo die absterbenden Zellen in das Darmlumen abgestoßen und mit dem Fäzes ausgeschieden werden (Lipkin, 1985; Kummer und Welsch, 2014).

Die Muskularis mit ihrer Ring- und Längsmuskelschicht hat die Aufgabe den Speisebrei zu transportieren. Man unterscheidet 2 Bewegungsarten: Segmentierung und Peristaltik. Die Segmentierung dient der Vermischung des Speisebreis mit den Verdauungssäften aus Pankreas und Leber und bringt die Nahrungspartikel zur Resorption in Kontakt mit der Mukosa. Die Peristaltik dient im Anschluss daran dem Abtransport des Chymus. Insgesamt verbleibt der Speisebrei ca. 3 bis 5 Stunden im Dünndarm (Tortora und Derrickson, 2006).

„Die Resorption [der unterschiedlichen Nahrungsbestandteile] vollzieht sich mittels Diffusion, erleichterter Diffusion, Osmose und aktivem Transport“ (Tortora und Derrickson 2006). Das Jejunum unterscheidet sich funktionell vom Ileum. Während die Hauptdigestion und Resorption von Fetten, Proteinen und Kohlenhydraten sowie Eisen, Folsäure und der meisten Vitamine im Duodenum und Jejunum stattfinden, stellt das Ileum dafür nur eine Reservekapazität dar, ist aber in seinem letzten Teil auf die Absorption von Vitamin B12 und Gallensäuren spezialisiert. Auch der Dickdarm trägt zur Energieversorgung bei. Innerhalb seiner Flora werden bis dahin unverdaute Kohlenhydrate zu kurzkettigen Fettsäuren abgebaut und resorbiert (Gekle, 2010).

1.3 Regeneration und Defektheilung von Dünndarmgewebe

Aus pathobiologischer Sicht versteht man unter Regeneration den Ersatz von Gewebe, das durch Abnutzung oder Schädigung zerstört wurde. Der Zellersatz ist die adaptative Antwort des Gewebes auf einen Zellverlust und beruht auf dem Zusammenwirken von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontaktmechanismen und Faktoren, die Wachstum, Zelltod, Proliferation und Differenzierung einer Zelle regulieren. Interaktionen untereinander oder mit einer kollagenen Matrix werden über adhäsive Glykoproteine (Fibronectin, Laminin oder Integrine) gesteuert. Zu den Proliferationsfaktoren zählen je nach Organ und Gewebe Hormone, Vitamine, Proteine von Protoonkogenen und Wachstumsfaktoren (Riede et al., 2004).

Bei der Regeneration unterscheidet man zwischen physiologischer und reparativer Regeneration. Die physiologische Regeneration tritt bei Geweben auf, die sich einmalig (z. B. Milchzähne), zyklisch (z. B. Endometrium) oder permanent (z. B. Schleimhäute) erneuern. Die reparative Regeneration tritt nach einem Gewebedefekt auf und kann als vollständige Regeneration durch Ersatz des geschädigten Gewebes mit dem selben Zelltyp erfolgen, sodass die normale Histoarchitektur des Gewebes wiederhergestellt wird, oder als unvollständige Regeneration, bei der eine narbige Ersatzstruktur aus Bindegewebe entsteht, die den Defekt ausfüllt, jedoch nicht die Funktion des ursprünglichen Gewebes erfüllt (Riede et al., 2004).

Die Schleimhaut des Dünndarms ist ein sich physiologisch, permanent regenerierendes Gewebe. Aus Stammzellen in der Tiefe der Mukosa entwickeln sich kontinuierlich Enterozyten, die, nachdem sie ihre spezifische Funktion ausgeübt haben, einem apoptotischen Zelltod unterliegen und abgestoßen werden. Das Oberflächenepithel der Dünndarmmukosa erneuert sich komplett alle 5 bis 6 Tage (Kummer und Welsch, 2014).

Eine Schädigung der Schleimhaut im Gastrointestinaltrakt wird je nach der Tiefe des Defekts als Erosion oder Ulkus bezeichnet. Ein Ulkus reicht tiefer als die Lamina muskularis mucosae; eine Erosion betrifft lediglich die Lamina epithelialis. Ursache eines Schleimhautdefekts ist ein Missverhältnis zwischen schleimhautprotektiven und -aggressiven Faktoren (Alexandrakis, 2006).

Die Defektheilung eines Ulkus verläuft in etwa nach den Regeln der sekundären Wundheilung, die sich bei Gewebedefekten vollzieht, bei der die Wundränder weit voneinander entfernt liegen. Nach einer Gewebeschädigung wird der Grund des akuten Ulkus während der exsudativen Phase mit koagulierendem Blut und Fibrin aufgefüllt. Dieser Wundschorf stabilisiert die Wunde. Aufgrund der Traumatisierung des angrenzenden Gewebes wird eine alterative Entzündungsreaktion ausgelöst. Die resorptive Phase ist dadurch gekennzeichnet, dass neutrophile Granulozyten, die der Erregerabwehr dienen und Makrophagen, die das Exsudat abbauen, in den Defekt einwandern. Die Bildung von Granulationsgewebe leitet die proliferative Phase und das Ende der Entzündung ein. Kapillaren proliferieren (Angioneogenese) und

zirkulierende Stammzellen wandern ein, die sich zu Fibroblasten differenzieren und mit der Kollagensynthese beginnen (Riede et al., 2004; Jochum und Baretton, 2012).

„In der frühen Heilungsphase zeigt der Ulkusgrund eine typische Vierschichtung. Unter Detritus und fibrinoider Nekrosezone liegen kapillarreiches Granulationsgewebe und Narbengewebe. Im weiteren Verlauf kommt es zur Reinigung des Ulkusgrundes mit Verschwinden des Schorfs. [Während der Regenerationsphase] wächst vom Ulkusrand her ein einreihiges Regeneratepithel über den Ulkusgrund. Dieses bildet in der Folge eine Schleimhaut mit villöser Architektur und basalen Drüsen aus, die erst nach Monaten oder Jahren die Dicke der ursprünglichen Schleimhaut erreicht. Häufig tritt eine Umdifferenzierung in ein intestinales Epithel auf (intestinale Metaplasie)“ (Jochum und Baretton, 2012).

1.4 Klinischer Hintergrund: Darmversagen und Kurzdarmsyndrom im Kindesalter

„Der Begriff Darmversagen bezeichnet die Unfähigkeit, wegen einer eingeschränkten resorptiven Kapazität des Darms (...) die Protein-, Energie-, Flüssigkeits- und Mikronährstoffbilanz aufrechtzuerhalten. Der Begriff Kurzdarmsyndrom bezeichnet ein Darmversagen nach ausgedehnter Resektion mit der Unfähigkeit wegen einer eingeschränkten resorptiven Kapazität des Darms (...), die Protein-, Energie-, Flüssigkeits- und Mikronährstoffbilanz mit einer konventionellen Diät aufrechtzuerhalten“ (Lamprecht et al., 2014). Das Kurzdarmsyndrom ist eine der häufigsten Ursachen für das chronische Darmversagen. In der einschlägigen Literatur variieren die epidemiologischen Angaben für diese Erkrankungen im Kindesalter stark. Die Inzidenz wird auf 24,5 – 87 / 100.000 Lebendgeburten beziffert. Die Anzahl an Neuerkrankungen unter Frühgeborenen ist wesentlich höher als unter Reifgeborenen (Wales et al., 2004; Salvia et al., 2008). Aus Großbritannien wird eine Punktprävalenz von 13,7 / 1 Million Kinder berichtet (Beath et al., 2011).

Die Hauptursache für ein Kurzdarmsyndrom sind ausgedehnte Dünndarmresektionen, die durch kongenitale und perinatale Erkrankungen, z. B. multiple Dünndarmatresien, Bauchwanddefekte (v. a. Gastroschisis), Malrotation, Volvulus sowie mit ca. 30 % im Wesentlichen die nekrotisierende Enterokolitis, entstehen. In den seltenen Fällen können längere Dünndarmabschnitte auch von Geburt an fehlen, ohne dass chirurgische Interventionen zum Organverlust geführt haben. Etwa 20 % aller Kurzdarmsyndrome bei Kindern entwickeln sich außerhalb der Neonatalzeit. Führende Ursachen sind hier ein Volvulus, ein Trauma oder ein langstreckiger Darmbefall bei Morbus Crohn (Wales und Christison-Lagay, 2010).

Der Körper passt sich in gewissem Maße an die neue Situation an. Morphologische Veränderungen umfassen eine Dilatation der Dünndarmschlingen, erhöhte epitheliale Zellproliferation, Zellhyperplasie und damit eine Vergrößerung der Darmzotten sowie eine Vertiefung der Krypten. Dadurch vergrößert sich die resorbierende Darmoberfläche. Eine erhöhte Expressi-

on an Transportproteinen verbessert zudem die Resorptionsleistung und das Kolon kann sich über Gärungsprozesse adaptieren sowie vermehrt Nährstoffe absorbieren. (Royall et al., 1992; O'Brien et al., 2001; Jeppesen und Mortensen, 2002; Bines et al., 2002). Eine spontane Darmverlängerung ist nicht zu beobachten. „Der Darm verlängert sich nur im Rahmen des altersbedingten Wachstums“ (Nützenadel, 2007).

Hauptsymptome des Kurzdarmsyndroms sind die Malabsorption und die Diarrhö. Der Verlust eines großen Anteils an resorbierender Darmsurface hat das Unvermögen zur Resorption aller Nahrungsbestandteile zur Folge. Dehydratation, Elektrolytstörungen und Malnutrition führen langfristig zur Störung der somatischen, motorischen und psychosozialen Entwicklung des Kindes begleitet von muskulärer Hypotonie, Misslaunigkeit, Ödemen und Aszitis. Kinder mit Kurzdarmsyndrom entwickeln häufig eine metabolische Azidose, die mit Unruhe, Schwindel, Schläfrigkeit und Leistungsverlust einhergeht. Der Mangel an Proteinen führt zu Hypalbuminämie sowie einem Defizit an Immunglobulinen, mit der Folge erhöhter Infektanfälligkeit. (Nützenadel, 2007; Lacher et al., 2013).

Durch die mangelnde Resorption von Kohlenhydraten bildet sich ein osmotischer Gradient nach intraluminal aus, der zum Einstrom von Wasser in den Darm führt und eine massive osmotische Diarrhoe bedingt. Eine gestörte Gallensäurerückresorption führt zu Steatorrhoe und einem sauren aggressiven Stuhl. Wegen Übersiedlung des dilatierten Dünndarms mit pathogenen Darmbakterien und deren Translokation in den Blutkreislauf treten häufig Bakteriämien und Sepsitiden auf. Bedingt durch funktionelle und anatomische Stenosen zeigen Patienten mit Kurzdarmsyndrom häufig ein aufgeblähtes Abdomen (Nützenadel, 2007; Lacher et al., 2013).

Die Behandlung des Kurzdarmsyndroms umfasst konservative und chirurgische Therapiemöglichkeiten. Postoperativ ist zumeist eine parenterale Ernährung notwendig. Wegen der Bedeutung intraluminaler Nährstoffe für die Mukosaadaptation sollte die parenterale Ernährung möglichst früh durch eine adaptierte orale Ernährung ergänzt werden (Dodge et al., 2012). Zur oralen Nahrungszufuhr werden bevorzugt Muttermilch oder, falls nicht vorhanden, Formula-Diäten gegeben. Ebenfalls wird eine Zufuhr von Elektrolyten, Spurenelementen und Vitaminen gewährleistet (Olieman et al., 2010). Konservative Therapieprinzipien beinhalten des Weiteren die Verlangsamung der Peristaltik mittels Loperamid, die medikamentöse Beeinflussung der Adaptation der Mukosa durch Glukagon-like Peptid 2 (Jeppesen et al., 2011), die Reduktion von Gallensäuren durch Ursodesoxycholsäure und der Einsatz von Protonenpumpeninhibitoren zur Verminderung der Magensäure (Lacher et al., 2013).

Die konservative Therapie des Kurzdarmsyndroms ist im Wesentlichen limitiert durch die mit dem Darmversagen-assoziierte Hepatopathie, die in 40 bis 60 % der pädiatrischen Patienten unter langfristiger parenteraler Ernährung auftritt. Das klinische Spektrum umfasst eine hepatische Steatose, Cholestase, Cholelithiasis sowie eine hepatische Fibrose (Kelly,

2006). Außerdem birgt ein zentraler Venenkatheter die Gefahr von Infektionen, Katheter-assoziierten Septitiden und Thrombosen mit der Folge fehlender zentralvenöser Zugänge zur weiteren Ernährung (Steiger und Srp, 1983; Bueno et al., 1999). Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit Kurzdarmsyndrom, die eine dauerhafte parenterale Ernährung erhalten, beträgt ca. 50 bis 60 % (Nucci et al., 2008; Fishbein, 2009).

Eine Indikation zur chirurgischen Intervention wird z. B. bei Ikterus ohne portale Hypertension, Dünndarmatresien, proximalen Fisteln, extensiver Dünndarmdilatation und wiederkehrender bakterieller Translokation bei adäquater Restlänge gestellt (Sudan et al., 2005; Modi et al., 2007). Neben der Optimierung der Darmfunktion mit der Wiederherstellung der Darmkontinuität, sowie der Beseitigung narbiger Darmstenosen oder Fisteln, gibt es 2 etablierte Verfahren zur Darmverlängerung, um einerseits die Resorptionsfläche zu erhalten, und andererseits die Probleme durch die Dilatation zu kompensieren. Bei der Operation nach Bianchi (*longitudinale intestinale lengthening and tapering, LILT*) wird das dilatierte Dünndarmsegment längs halbiert, die 2 geformten parallelen Lumina abgesetzt und hintereinander geschaltet (Bianchi, 1980). Bei der seriellen transversalen Enteroplastie nach Kim (STEP) wird das dilatierte Dünndarmlumen an vielen Stellen mittels Klammernahtgerät transversal teilweise verschlossen (Kim et al., 2003). Chirurgische Darmverlängerungen mittels *LILT*- oder *STEP*-Technik verbessern die Entwöhnung von der parenteralen Ernährung, reduzieren die damit verbundenen Komplikationen und vermeiden in der Mehrzahl der Fälle die Dünndarmtransplantation (Sudan et al., 2007).

Die isolierte Dünndarmtransplantation oder die kombinierte Leber- und Dünndarmtransplantation ist die Ultima Ratio bei drohendem Leberversagen, gehäuften Thrombosen oder Sepsitiden. Die Prognose der Patienten mit Kurzdarmsyndrom konnte durch die Optimierung operativer Techniken und den Fortschritten bei der Immunsuppression deutlich verbessert werden (Fishbein, 2009). Dennoch sind lebensbedrohliche Komplikationen (opportunistische Infektionen, chronische Abstoßung, Gedeihstörungen, etc.) bei dieser Behandlung hoch und die 5-Jahres-Überlebensrate nach einer Dünndarmtransplantation beträgt lediglich 56 bis 61 % (Sudan, 2010).

Bis heute bleibt die Behandlung von Kindern mit Kurzdarmsyndrom eine große Herausforderung. Trotz großer Fortschritte bei konservativen und chirurgischen Therapiemöglichkeiten ist die Mortalität dieser Erkrankung mit geschätzten 20 bis 40 % sehr hoch (Wales und Christison-Lagay, 2010). Weiterhin ist mit einem Anstieg der Fallzahlen zu rechnen, da es aufgrund zunehmender Frühgeburtlichkeit und verbesserter Behandlungsstrategien zu einer zunehmenden Inzidenz der nekrotisierenden Enterokolitis kommen wird (Holman et al., 2006); dies ist die häufigste Ursache für das Kurzdarmsyndrom.

Deshalb ist es notwendig neue und innovative Therapieansätze, wie im Bereich der regenerativen Medizin und des *small intestinal tissue engineering*, zu entwickeln.

1.5 Stand der Forschung: Zellträgermaterialien für *small intestinal tissue engineering*

TE eines funktionstüchtigen Dünndarms ist ein komplexer Prozess mit dem Ziel, dessen strukturelle Komponenten, eine spezialisierte Darmmukosa mit Epithelzellen und interstitiellen Zellen, glatte Muskulatur und den intrinsischen enteralen Nervenplexus, zu regenerieren. Der Zweck des künstlich geschaffenen Konstrukts ist es, die anatomischen und physiologischen Funktionen des nativen Dünndarms zu imitieren und damit Patienten mit Kurzdarmsyndrom in Zukunft eine kurative Behandlungsoption anzubieten (Bitar und Raghavan, 2012).

Joseph Philip Vacanti gilt als Pionier auf dem Gebiet des *TE*. Sein Ansatz ist es, Stammzellen zu kultivieren, *in vitro* auf ein formgebendes Trägermaterial aufzubringen und diese Zell-Matrix-Konstrukte in einen Empfängerorganismus zu implantieren. Im Verlauf führen die künstlichen Transplantate die physiologischen Funktionen des ersetzten Organs aus (Kim und Mooney, 1998; Harvard Stem Cell Institute, 2015). Auf Grundlage dieser Methode veröffentlichten Vacanti et al. 1988 Versuchsergebnisse, bei denen Zellen aus dem Darm fetaler Ratten entnommen und innerhalb eines Kulturmediums erfolgreich auf polymere Matrizes angelagert werden konnten. Nach *In-vivo*-Regeneration zeigten sich Neovaskularisation, Zellwachstum, inflammatorische Infiltrate und Reabsorption der Matrix. Es bildete sich eine zystische Struktur aus, auf deren luminaler Oberfläche sich ein gut differenziertes einschichtiges Regeneratepithel etablierte, in dessen Lumen sich Schleim und Zelldebris befand (Vacanti et al., 1988). Diese Versuche demonstrierten erstmals, dass es möglich ist Dünndarmgewebe zu regenerieren.

Die Wissenschaft auf dem Gebiet des *small intestinal tissue engineering* beschäftigt sich mit vielfältigen und komplexen Problemstellungen, u. a. mit der Suche nach geeigneten Quellen für Zellmaterial, mit der Analyse brauchbarer Biomaterialien als Trägermaterial für die Zellen, mit möglichen Herstellungsprozessen von Zell-Matrix-Konstrukten und mit der Handhabung von Immun- und Fremdkörperreaktionen.

Beim *TE* hat die Auswahl des geeigneten Biomaterials als formgebendes, dreidimensionales Gerüst für Zellen eine entscheidende Bedeutung, da es die native Mikroumgebung des zu regenerierenden Gewebes simuliert und im Wesentlichen dessen biologische und mechanische Eigenschaften beeinflusst. Poröse, biokompatible Trägermaterialien erlauben es den Zellen sich anzulagern und regulieren die Zell-Zell-Interaktion. Ihre Aufgabe ist es, die Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen gegebenenfalls mit Hilfe exogener biochemischer Stimuli, z. B. Wachstumsfaktoren und Adhäsionsproteine, zu ermöglichen. Blutgefäße wachsen ein und die Matrix wird in ein funktionierendes Gewebe umstrukturiert. Die Zellen beginnen damit eine eigene Extrazellulärmatrix (EZM) zu synthetisieren, während

das Biomaterial idealerweise in nicht-toxische Produkte degradiert und abgebaut wird. Bis das regenerierte Gewebe über ausreichend eigene Stabilität verfügt, müssen diese Materialien genügend Festigkeit gegenüber den lokal vorherrschenden biochemischen und biophysikalischen Kräften garantieren und den Gefahren einer Infektion oder Abstoßung entgehen. Unterschiedliche Biomaterialien stehen zu Verfügung. Grundsätzlich kann man zwischen Materialien aus natürlichem Ursprung und synthetischen, polymeren Matrices unterscheiden.

Zur Herstellung natürlicher Materialien werden humane oder tierische Gewebe verwendet, die dezellularisiert und aufgearbeitet werden, sodass eine individuelle, gewebespezifische EZM resultiert. Eine EZM wird von den ortsansässigen Zellen der jeweiligen Gewebe maßgeschneidert angefertigt und befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht mit der umgebenden Mikroumwelt. Die strukturellen und funktionellen Moleküle der EZM ermöglichen die Kommunikation benachbarter Zellen untereinander sowie mit ihrer Umgebung. Nerven sowie Blut- und Lymphgefäße können in die EZM einwachsen und die Nährstoffversorgung der Zellen sicherstellen. Kollagen ist der Hauptbestandteil der EZM und dient als strukturelles Gerüst für die Zellen. Kollagen Typ I ist ein Strukturprotein mit einem Durchmesser von 2 bis 20 μm , das sich durch Zugfestigkeit und mechanische Belastbarkeit auszeichnet. Kollagen Typ III ist Hauptbestandteil retikulärer Fasern mit einem geringeren Durchmesser ($< 1 \mu\text{m}$), das feinmechanische Aufgaben in Form flächiger Netze erfüllt und das als eine Art Stützkorsett mit begrenzter Dehnbarkeit Epithelzellverbände, Kapillaren, Fettzellen, Muskelfasern und periphere Nerven umgibt. Glykoproteine fungieren als Adhäsionsproteine und gewährleisten, dass alle Zellen einen dauerhaften oder vorübergehenden Kontakt mit der Matrix eingehen, und sich in ihr teilen und bewegen können. Glykosamino- und Proteoglykane absorbieren Wasser in großen Mengen und tragen damit zur mechanischen Eigenschaft des Bindegewebes bei. Außerdem binden sie Wachstumsfaktoren, die wichtig für die Zellinteraktion sind. Wachstumsfaktoren wiederum stimulieren die Zellmigration und -teilung und tragen somit zur Synthese neuen Gewebes bei (Lüllmann-Rauch, 2012b).

Untersuchungen zeigen, dass die mechanischen Eigenschaften von EZMs von der Gewebespezifität und -herkunft, der Hydratation, der 3-dimensionalen Beschaffenheit und der terminalen Sterilisation der Matrix abhängen. Tottey et al. fanden heraus, dass die Zugfestigkeit und der Gehalt an Wachstumsfaktoren in EZMs, die aus jüngeren Schweinen gewonnen werden, größer sind, als bei älteren (Tottey et al., 2011).

EZMs können vermutlich die native Mikroumwelt besser simulieren als synthetische Materialien, da sie von Natur aus über die notwendigen Zellinteraktionsmechanismen verfügen (Badylak, 2007; Andrée et al., 2013). Ein Nachteil bei der Verwendung natürlicher Matrices im Vergleich zu synthetischen Materialien ist, dass sie nicht in großen Mengen produziert werden können. Außerdem können ihre Eigenschaften, z. B. die mechanische Beständigkeit,

bei der Herstellung nicht standardisiert und an die jeweiligen Bedürfnisse des spezifischen, zu regenerierenden Gewebes angepasst werden (Kim and Mooney, 1998). Diverse EZMs aus verschiedenen Geweben wurden als biologische Trägermaterialien für das *TE* mit Erfolg verwendet und bereits für klinische Zwecke kommerzialisiert.

Eine der am besten untersuchten EZMs in der regenerativen Medizin und dem *TE* ist die *small intestinal submucosa* (*SIS*, dt. Dünndarmsubmukosa). *SIS* wird vorwiegend aus dem Jejunum von Schweinen hergestellt. Nach der Organentnahme und Portionierung wird das Darmrohr invertiert und die Mukosa mechanisch abgetragen. Anschließend wird das Darmsegment erneut invertiert und die Serosa und Muskularis außen vollständig entfernt. Es verbleibt die ca. 80 bis 200 μm dicke Submukosa (Badylak et al., 1989; Demirbilek et al., 2003). Als EZM beinhaltet sie bioaktive Faktoren, wie Glykoproteine, Glykosaminoglykane und Wachstumsfaktoren sowie Adhäsionsproteine für den Zell-Matrix-Kontakt (Pu, 2005; Yang et al., 2010). *SIS* hat immunsuppressive und antibakterielle Eigenschaften und die Fähigkeit Zellmigration und -adhäsion zu vermitteln (Badylak et al., 2001; Sarikaya et al., 2002; Palmer et al., 2002; Ansaloni et al., 2007). Der Nutzen von *SIS* wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen in vivo erprobt und zahlreiche Studien konnten zeigen, dass dieses Biomaterial befähigt ist, die Geweberegeneration zu induzieren.

Chen und Badylak verwendeten die *SIS* erstmals im Bereich des Gastrointestinaltrakts, um dessen Eigenschaften als Trägermaterial zur Dünndarmregeneration in einem Xenograftmodell zu untersuchen. Sie glaubten, dass die Verwendung einer EZM, die aus demselben Organ hergestellt wird, das zu regenerieren beabsichtigt wird, gute Resultate erzielen müsste. Dazu wurde ein ca. 7 mal 3 cm großer Dünndarmdefekt bei 23 Hunden verursacht, der mit ein- oder achtschichtiger *SIS* gedeckt wurde. Außerdem wurden 4 Hunde einer Dünndarmteilresektion unterzogen, und in deren Darmpassage ein tubuläres, 6 cm langes *SIS*-Segment eingefügt. Mehrschichtige *SIS* erwiesen sich dabei als chirurgisch besser handhabbar. 3 Monate nach Implantation war es schwierig das Patch-tragende Dünndarmsegment in situ ausfindig zu machen, da Größe, Struktur und Konsistenz identisch zu nativem Gewebe war. Die tubulären *SIS*-Segmente erwiesen sich in dieser Versuchsanordnung als ungeeignet, da alle 4 Hunde ernsthafte postoperative Komplikationen aufgrund von Stenosen und Anastomoseninsuffizienzen erlitten (Chen und Badylak, 2001).

Wang et al. etablierten 2003 eine andere Versuchsanordnung, um den Einsatz von tubulären *SIS*-Segmenten als Dünndarminterponate zu untersuchen, mit dem Unterschied, diese aus der Darmpassage auszuschalten und dadurch vor dem schädlichen Kontakt mit Nahrungsresten zu schützen. 4 Lagen der *SIS*-Matrix wurden um eine Plastikröhre gewickelt und zu einem Tubus mit 20 mm Länge und ca. 6 mm Durchmesser geformt. 20 erwachsene Lewis-Ratten dienten als Tiermodell. Unter Allgemeinanästhesie wurde eine gut durchblutete

Jejunalschlinge isoliert und die unterbrochene Darmpassage durch eine Anastomose des oralen und aboralen Endes wiederhergestellt. Die isolierte Jejunalschlinge wurde transversal durchtrennt und der *SIS*-Tubus in deren Mitte beidseitig anastomosiert. Schlussendlich wurden beide Enden des Konstrukts als Enterostoma ausgeleitet (Wang et al., 2003).

Lee et al. orientierten sich an der Versuchsanordnung von Wang et al., um die biomechanischen Eigenschaften von einschichtigen mit vierschichtigen *SIS* zu vergleichen (Lee et al., 2008). Demirbilek et al. nutzten 20 Kaninchen als Tiermodell, indem sie ein antimesenteriales Jejunalsegment über 6 cm inzidierten und eine 6 mal 2 cm große ellipsoide *SIS* einfügten (Demirbilek et al., 2003).

Bei all diesen Experimenten wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten die *SIS*-Matrizes mit dem regenerierten Gewebe entnommen und histologische Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Gesamtschau aller Studien homogen und demonstrieren, dass die *SIS*-Matrix die Darmmukosaregeneration ermöglicht:

In der frühen postoperativen Phase, 2 Wochen nach Implantation, ist die Matrix von zahlreichen inflammatorischen Zellen kolonialisert. Die Entzündungsreaktion ist im weiteren Verlauf rückläufig (Wang et al., 2003). Auch fibroblastische und mononukleare Zellen sowie prominente vaskuläre Proliferation (Neovaskularisationen) zeigen sich auf der Matrix (Demirbilek et al., 2003; Wang et al., 2003, 2005). Zu diesem Zeitpunkt wird in keiner Studie von epithelialer Regeneration berichtet. Ein einschichtiges Regeneratepithel beginnt erst nach ca. 4 Wochen die luminale Patchoberfläche der *SIS* zu bedecken. Dieses Regeneratepithel hat seinen Ursprung im Anastomosensbereich. Die Matrix war hierbei komplett mit gut geformten Blutgefäßen durchsetzt (Chen und Badylak, 2001; Demirbilek et al., 2003; Wang et al., 2003, 2005; Lee et al., 2008).

Demirbilek et al. berichten, dass bereits nach 6 Wochen eine komplette Mukosaregeneration inklusive säulenförmiger Epitheleinstülpungen, Zotten, Becherzellen und gut organisierten Gefäßneubildungen auf der *SIS*-Matrix zu erkennen sind (Demirbilek et al., 2003). Wang et al. berichten hingegen, dass nach 8 Wochen erst 70 % der luminalen Patchoberfläche mit Regeneratepithel bedeckt ist (Wang et al., 2003). Auch Lee et al. registrieren zu diesem Zeitpunkt eine noch nicht vollständige Oberflächenbedeckung, bei der die zentrale Patchregion ausgespart bleibt (Lee et al., 2008) und Chen und Badylak beschreiben nach 8 Wochen eine morphologisch unreife Mukosa- und Submukosa-Architektur (Chen und Badylak, 2001).

Nach 12 Wochen hat sich in allen Untersuchungen eine vollständige Neomukosa, mit dem histologischen Phänotyp nativer Darmmukosa, auf der *SIS*-Oberfläche etabliert. Es zeigt sich eine typische Morphologie aus Krypten und Zotten. Enterozyten, Becherzellen, Paneth-Körnerzellen und endokrine Zellen konnten mit speziellen Färbeprotokollen identifiziert werden. Zwischen Woche 12 und Woche 24 entwickeln sich die etablierten Strukturen

weiter. Die Mukosadicke, die Zottenhöhe und die Kryptentiefe nehmen signifikant zu. Nach 24 bzw. 26 Wochen ist eine gut entwickelte Dreischichtung der Oberfläche aus Mukosa, Muskelgewebe und Serosa zu erkennen, die mit dem nativem Darmgewebe histomorphologisch nahezu identisch ist (Chen und Badylak, 2001; Wang et al., 2003, 2005).

Chen und Badylak, Wang et al. und Lee et al. konnten bereits nach 4 Wochen auch die Regeneration von glatten Muskelzellen histologisch nachweisen. Diese waren auf beide Randbereiche der Matrix in der Nähe der Anastomose beschränkt. Neuronale Reinnervation konnte nicht festgestellt werden (Chen und Badylak, 2001; Wang et al., 2005; Lee et al., 2008).

Diese Studien zeigen, dass die *SIS*-Matrix innerhalb von ca. 3 Monaten die Regeneration von Dünndarmmukosa ermöglichen kann, auch ohne die Anwendung von Zellkulturen. Allerdings weisen sämtliche Untersuchungen auch darauf hin, dass die *SIS* über schlechte biomechanische Eigenschaften verfügt. In allen Studien wird von einer relevanten In-vivo-Schrumpfung der *SIS* berichtet. Das Ausmaß der Schrumpfung wird jedoch sehr unterschiedlich beschrieben. Während Demirbilek et al. nach 2 Wochen lediglich eine Schrumpfung von 3 % registrieren, beziffern Chen und Badylak die Schrumpfung auf ca. 35 %. Nach 4 Wochen stellen Wang et al. und Demirbilek et al. eine ähnliche Schrumpfung von etwa 20 bis 25 % fest. Ihre Ergebnisse divergieren im weiteren Verlauf. Während Demirbilek et al. nach 6 Wochen bereits eine Kontraktion von ca. 50 % der Ausgangslänge feststellen, bemerken Wang et al. nach 8 Wochen erst eine Schrumpfung von 20 bis 30 % und nach 12 bzw. 24 Wochen von ca. 30 bis 40 %. Chen und Badylak wiederum berichten nach 16 Wochen von einer Schrumpfung von ca. 50 % und nach einem halben Jahr von ca. 80 %.

Diese Unterschiede in den Ergebnissen sind möglicherweise darin begründet, dass die *SIS* nicht einheitlich produziert werden und daher in gewissem Maße als individuelles, biologisches Produkt betrachtet werden muss. So wird berichtet, dass die mechanischen Eigenschaften von EZMs sowie die Immunreaktion des Empfängerorganismus von der Gewebespezifität und -herkunft, der Weiterverarbeitungsmethode, der Hydratation, der 3-dimensionalen Beschaffenheit und der terminalen Sterilisation abhängt. Tottey et al. fanden z. B. heraus, dass die Zugfestigkeit und der Gehalt an Wachstumsfaktoren bei 3 Wochen alten Schweinen größer ist als bei 12, 26, 52 Wochen alten Schweinen (Tottey et al., 2011).

Wang et al. haben für die Experimente eine *SIS* verwendet, die aus dem Darm von Ratten hergestellt wurde, während in anderen Studien *SIS* von Schweinen verwendet wurde. Außerdem wurde in den Versuchen eine unterschiedliche Anzahl an *SIS*-Lagen verwendet. Lee et al. untersuchten deshalb, ob sich die biomechanischen Eigenschaften von ein- und vierschichtigen *SIS* unterscheiden und stellten dabei signifikante Unterschiede im Ausmaß der longitudinalen Schrumpfung fest. Der einschichtige Patch ist nach 2 Wochen um ca. 55 %, nach 4 Wochen um etwa 80 % und nach 8 Wochen um gut 95 % geschrumpft; der vierschichtige Patch

hingegen nach den gleichen zeitlichen Endpunkten um ca. 30 %, 60 % und 70 %. Damit erweist sich zwar eine mehrschichtige SIS als stabiler, allerdings ist auch eine longitudinale Schrumpfung auf ca. 30 % der initialen Länge nach 8 Wochen erheblich (Lee et al., 2008; vgl. Tab. 1).

Tab. 1 Schrumpfung der *small intestinal submucosa* (SIS) in unterschiedlichen Publikationen

Studie	Chen und Badylak	Wang et al.	Demirbilek et al.	Lee et al.	
Tiermodell	Hunde	Ratte	Kaninchen	Ratte	
SIS-Herkunft	Schwein	Ratten	Schwein	Schwein	
Anzahl Lagen	1 und 8	4	k. A.	1	4
Regenerationsdauer (in Wochen)	Schrumpfung (in % +/- SD)				
2	ca. 35	18,5 (+/- 3,2)	3,00 (+/- 11,6)	56 (+/- 10)	32 (+/- 5)
4	-	22,1 (+/- 5,9)	23,33 (+/- 5,0)	81 (+/- 6)	60 (+/- 4)
6	-	-	48,33 (+/- 6,7)	-	-
8	-	25,6 (+/- 7,4)	-	94 (+/- 2)	71 (+/- 6)
12	-	35,5 (+/- 6,6)	-	-	-
16	ca. 50	-	-	-	-
24	-	38,4 (+/- 8,5)	-	-	-
52	ca. 80	-	-	-	-

Synthetische Materialien zeichnen sich dadurch aus, dass sie in großen Mengen gleichartig gefertigt werden und dabei ihre Makro- (Größe und Form) und Mikrostruktur (Porengröße, Porenstruktur, Fasergröße) kontrolliert und verändert werden können. Dadurch ist es möglich die biomechanischen Eigenschaften der Materialien, wie z. B. die Degradationsdauer und damit ihre strukturelle Stabilität zu optimieren und die Immunreaktion des Organismus auf das Fremdmaterial zu beeinflussen. Sie verfügen jedoch, im Gegensatz zu biogenen Materialien aus natürlichem Ursprung, nicht über die Adhäsions- und Wachstumsfaktoren, die die Geweberegeneration zusätzlich fördern können. Natürlich vorkommende Polyester, die zu nicht-toxischen Metaboliten abgebaut werden, finden breite klinische Anwendung, z. B. als Nahtmaterial oder in der Hernienchirurgie als Netze, und wurden auch in verschiedenen Untersuchungen als resorbierbare Matrizes im Bereich des TE erfolgreich getestet (Kim und Mooney, 1998; Chen et al., 2006).

Thompson et al. verglichen erstmals 3 unterschiedliche synthetische Materialien für die Regeneration von Dünndarmmukosa, in dem sie bei Kaninchen einen 2 mal 5 cm großen Ileumdefekt mit Matrizes aus Dacron, Polyglykolsäure (*polyglycolic acid*, PGA) oder Polytetrafluorethylen (*polytetrafluoroethylene*, PTFE) deckten. Hierbei war zwischen den verschiedenen Materialien kein signifikanter Unterschied festzustellen: Der 10 cm² große Defekt

war nach 2 Wochen um 50 % und nach 8 Wochen auf ca. 85 % seiner initialen Größe geschrumpft. Nach 2 Wochen zeigte sich eine marginale Regeneration der Neomukosa, mit nach zentral abnehmender Zottengröße und Übergang in ein einschichtiges kubisches Epithel. Nach 8 Wochen war die gesamte luminale Matrixoberfläche mit Neomukosa bedeckt, die morphologisch der nativen Darmmukosa gleicht (Thompson et al., 1986).

Mitte der neunziger Jahre wurden technisch aufwendige Verfahren entwickelt, um organähnliche Mikrostrukturen unter geeigneten Kulturbedingungen aus Stammzellen herzustellen. Choi und Vacanti verwendeten z. B. epitheliale Organoideinheiten, die im Kern aus mesenchymalen Stromazellen bestehen, die von einer Schicht aus intestinalem Epithel umgeben werden. Spezielle *PGA*-Matrizes wurden in vitro mit diesen intestinalen Organoideinheiten besät und als Blatt oder Tubus in das Omentum majus von adulten Lewis-Ratten implantiert. Histologische Analysen zeigen, dass sich eine Neomukosa auf der Matrixoberfläche etabliert, die aus Epithelzellen, Becherzellen und Paneth-Körnerzellen besteht und Krypten sowie Zotten ausbildet. Die Krypten und Zotten vergrößern sich morphologisch im zeitlichen Verlauf. Unterhalb der Neomukosa finden sich Neovaskularisationen, degradierte Polymerfasern, Fibroblasten, extrazelluläre Matrix, glatte Muskelzellen sowie inflammatorische Riesenzellen als Ausdruck einer Fremdkörperreaktion (Choi und Vacanti, 1997).

Chen et al. haben 8 verschiedene mikroporöse, biologisch abbaubare Polyester aus *PGA*, Poly-L-Lactid (*poly-L-lactic acid, PLLA*) bzw. Kombinationen aus diesen zu unterschiedlichen Anteilen (*polylactic-co-glycolic acid, PLGA*) für die Regeneration von Dünndarmmukosa untersucht. Diese Polymere bestehen aus sich regelmäßig wiederholenden Einheiten, die mit einer Hydroxylgruppe auf der einen und einer Carboxylgruppe auf der anderen Seite enden, und keine Seitenketten tragen. Eine derartige Struktur ermöglicht einen moderaten Kristallisationsgrad, einen hohen Schmelzpunkt und eine geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln. In vivo werden sie in ca. 2 bis 4 Wochen durch Hydrolyse aufgespalten. Diese Materialien wurden entsprechend der Versuchsanordnung von Choi und Vacanti in vitro mit intestinalen Epithelorganoideinheiten besät und als Zell-Matrix-Konstrukte in Form eines 10 mm langen Tubus in das Omentum majus von Lewis-Ratten implantiert und dort für 4 Wochen zur Regeneration belassen (Chen et al., 2006).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Regeneration von Dünndarmmukosa auf den synthetischen Materialien umso ausgeprägter ist, je höher der *PGA*-Anteil innerhalb der Matrix ist. Bei Matrizes aus 100 % *PLLA* lässt sich lediglich eine Oberflächenbedeckung mit Neomukosa von 10 bis 16 % feststellen, während Matrizes, deren Anteil 75 zu 25 % bzw. 50 zu 50 % von *PLA* zu *PGA* ist, eine Oberflächenbedeckung von 13 bzw. 21 % aufweisen. Netze aus *PGA* mit einer größeren Faserdicke (13 - 15 µm) und Porengröße (250 µm), die zuvor mit *PLLA*

(2 bzw. 5%ig) behandelt wurden, zeigen eine signifikant größere Oberflächenbedeckung von 31 bzw. 36 % nach 4 Wochen. Jedoch konnte auf Materialien, die ausschließlich aus *PGA*-Nanofasern mit einer Faserdicke von 0,84 µm und geringer Porengröße (10 µm) bestehen, nur eine maximale Oberflächenbedeckung von 4,7 % erreicht werden.

Die Matrices, die ausschließlich aus *PGA*-Nanofasern bestehen, lassen histologisch keine Mukosaregeneration erkennen. In allen anderen Präparaten hat sich eine Neomukosa auf den Fremdmaterialien etabliert. Diese besteht aus zahlreichen Krypten und verhältnismäßig wenigen Zotten. Zotten sind am häufigsten auf *PGA*-Matrices mit 5%iger *PLLA*-Behandlung zu finden und sind auf diesen morphologisch am weitesten entwickelt. Außerdem konnte Narbengewebe nachgewiesen werden, das aus polymeren Rückständen, inflammatorischen Zellen und Fibroblasten besteht.

Synthetische Matrices weisen in den Experimenten gute mechanische Eigenschaften auf. Matrices mit einem hohen *PGA*-Anteil zeigen die geringste Schrumpfung nach 4 Wochen (3 bis 12 % der Ausgangslänge). Reine *PLLA*-Matrices schrumpfen um 10 bis 26 %, während die Verbundstoffe (*PLGA*) um ca. 42 % schrumpfen.

Boomer et al. verglichen in einer experimentellen Versuchsanordnung 7 synthetische Matrices hinsichtlich ihrer mechanischen und biokompatiblen Eigenschaften für das *small intestinal tissue engineering*, indem sie diese der intraperitonealen Umgebung *in vivo* und der intraluminalen Umwelt *in vitro* aussetzten. Auch sie kommen zu dem Resultat das *PGA*-Fasern mit 5%iger *PLLA*-Behandlung unter den evaluierten Materialien über die beste Degradationsrate und Bruchkraft verfügen, dahingehend dass sie dem Regenerat die notwendige Stabilität verleihen bis es über eigene mechanische Stabilität verfügt. *PLGA*-Nanofasern zeigen das geringste Potenzial für Fremdkörperreaktionen (Boomer et al., 2013).

Die Studienlage verdeutlicht, dass es sowohl auf synthetischen als auch biogenen Materialien, mit oder ohne vorheriger Stammzellinkubation, möglich ist Dünndarmgewebe zu regenerieren. Untersuchungen mit *SIS-EZM* zeigen, dass sich nach frühestens 4 Wochen ein Regeneratepithel auf der Matrixoberfläche ausbildet und spätestens nach 12 Wochen eine vollständige Neomukosa, mit dem histologischen Phänotyp nativer Darmmukosa, auf dessen gesamter Oberfläche etabliert hat. Bei Experimenten mit synthetischen Materialien zeigen Polyester aus *PGA*, das zuvor mit *PLLA* 5%ig behandelt wurde, bei einer größeren Faserdicke und Porengröße das beste regenerative Potenzial für Dünndarmgewebe. Hier lässt sich bereits nach 2 Wochen eine marginale Regeneration der Neomukosa nachweisen. Nach 4 Wochen ist, im Vergleich zu anderen synthetischen Materialien, eine signifikant größere Oberflächenbedeckung von 31 bzw. 36 % festzustellen und nach 8 Wochen ist die gesamte luminale Matrixoberfläche mit Neomukosa bedeckt, die morphologisch der nativen Darmmukosa gleicht.

Aufgrund verschiedener Versuchsanordnungen mit unterschiedlichen Versuchstieren, unterschiedlichen Materialzusammensetzungen, unterschiedlicher Regenerationsdauer und geringen Fallzahlen ist es schwierig die Versuchsergebnisse direkt miteinander zu vergleichen. Daher ist es bei der jetzigen Datenlage nicht möglich, abschließend zu beurteilen, ob *SIS* als natürliche EZM oder *PGA* als synthetische Matrix über ein besseres regeneratives Potenzial für die Dünndarmregeneration verfügt.

Selbiges gilt für die biomechanischen Eigenschaften. In allen Untersuchungen, sowohl zu natürlichen als auch synthetischen Materialien, konnte eine signifikante Schrumpfung der Zellmatrix *in vivo* festgestellt werden. Diese Eigenschaft ist als äußerst kritisch zu beurteilen, da es beim *small intestinal tissue engineering* das vorrangige Ziel ist den Verlust resorptiver Darmoberfläche, die zum Krankheitsbild des Kurzdarmsyndroms führt, zu ersetzen. Die Matrix muss über Stabilität und Festigkeit verfügen, da eine möglichst geringe Schrumpfung erwünscht ist. Polylactid-co-Glycolid mit einem hohen Anteil an *PGA* und einem niedrigen Anteil an *PLLA* zeigt bei der bisherigen Datenlage sowohl unter den synthetischen Materialien als auch im Vergleich zur *SIS* die niedrigste Tendenz zur Schrumpfung.

1.6 Zielsetzung und Hypothesen

Um Fortschritte auf dem Gebiet des *small intestinal tissue engineering* erzielen zu können, ist es notwendig geeignete Biomaterialien hinsichtlich ihrer biomechanischen und regenerativen Eigenschaften zu untersuchen. Bisher wurden in verschiedenen Versuchsanordnungen in erster Linie unterschiedliche synthetische Materialien und die kollagene *SIS*-EZM getestet. Die Untersuchungen konnten zeigen, dass es möglich ist auf diesen Biomaterialien Dünndarmgewebe zu regenerieren. Weitere Kollagenmatrizes sind kommerziell verfügbar und befinden sich bereits erfolgreich in klinischer Anwendung zur Reparatur anderer Gewebe, wurden jedoch noch nicht für die Regeneration von Dünndarmgewebe getestet.

Aktuelle Studien zeigen auf, dass synthetische polymere Matrizes aus *PLGA* mit einem hohen Anteil an *PGA* und einem niedrigen Anteil an *PLLA* über sehr gute biomechanische Eigenschaften verfügen, da sie *in vivo* einer geringen Schrumpfung unterliegen. Kollagene EZMs weisen hingegen ein großes Potenzial für die Regeneration von Dünndarmgewebe auf (vgl. 1.5). Bisher wurden jedoch keine vergleichenden Studien durchgeführt, die synthetische und biogene Materialien unter einheitlichen Versuchsbedingungen getestet haben.

Um diesem Forschungsdesiderat nachzugehen, werden in der vorliegenden Arbeit 4 verschiedene Materialien mithilfe einer tierexperimentellen Versuchsanordnung hinsichtlich beider immanent wichtigen Eigenschaften für das *small intestinal tissue engineering* – der mechanischen Stabilität und dem regenerativen Potenzial – *in vivo* getestet. Als Tiermodell dient die Wistar-Ratte. Zum Einsatz kommen dabei der ETHISORB® Dura Patch, eine synthe-

tische *PLGA*-Matrix mit einem Anteil von 90 % *PGA* und 10 % *PLLA* und eine kollagene *SIS*-Matrix, der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft. Beide Materialien wurden bereits für die Dünndarmregeneration mit Erfolg angewendet. Außerdem werden 2 weitere Kollagenmatrizes verwendet, der Chondro-Gide® und der TUTOPATCH®. Diese wurden noch nicht für das *small intestinal tissue engineering* erprobt, so dass überprüft wird, ob auch diese kollagenen EZMs die Dünndarmregeneration ermöglichen. Aufgrund der aufwendigen technischen Anforderungen an die Isolierung und Kultivierung von intestinalen Stammzellen, beschränkt sich diese Arbeit auf die Untersuchung von Materialien ohne die Anwendung von Zellen bzw. Organoideinheiten.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in 2 separate Analysen. Die erste, makroskopische Auswertung der Präparate befasst sich mit den biomechanischen Eigenschaften der verwendeten Materialien. Zunächst wird untersucht, ob die verwendeten Materialien *in vivo* schrumpfen. Folglich gilt als Nullhypothese ($H_{0,1}$), dass die Materialien nicht schrumpfen und als Alternativhypothese ($H_{A,1}$), dass die ausgewählten Matrizes im zeitlichen Verlauf einer *In-vivo*-Schrumpfung unterliegen.

In der Literatur wird für synthetische Materialien eine weniger starke Schrumpfung als für biogene Kollagenmatrizes aufgezeigt (vgl. 1.5). Deshalb wird als zweite Alternativhypothese ($H_{A,2}$) angenommen, dass die auf Kollagen basierenden Matrizes *in vivo* stärker schrumpfen, als der synthetische ETHISORB® Dura Patch. Die zweite Nullhypothese ($H_{0,2}$) geht dem entsprechend davon aus, dass kein Zusammenhang zwischen der Schrumpfung und den verwendeten Zellträgermaterialien existiert.

Die zweite, mikroskopische Auswertung dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Fähigkeit der genannten Materialien für die Regeneration von Dünndarmgewebe, ihrem sogenannten regenerativen Potenzial. Von unterschiedlichen Autoren wird postuliert, dass EZMs die natürliche Mikroumgebung des Regenerats besser imitieren können als synthetische Materialien, weil sie *per se* über die notwendigen Zellinteraktionsmechanismen verfügen und synthetische Matrizes gehäuft immunologische Reaktionen hervorrufen, die die Geweberegeneration beeinträchtigen (vgl. 1.5).

Für die dritte Nullhypothese ($H_{0,3}$) wird daher festgelegt, dass kein Unterschied zwischen den verwendeten Materialien hinsichtlich ihres regenerativen Potenzials erkennbar ist. Als Alternativhypothese ($H_{A,3}$) gilt, dass die auf Kollagen basierenden Zellträger, der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft, der Chondro-Gide® und der TUTOPATCH® über ein größeres Potenzial zur Dünndarmregeneration verfügen, als der synthetischen ETHISORB® Dura Patch.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsablauf und Genehmigung der Tierversuche

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens wurde ein experimenteller Tierversuch gewählt. Ziel war es verschiedene Materialien hinsichtlich ihrer biomechanischen und regenerativen Eigenschaften für Dünndarmgewebe *in vivo* zu untersuchen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde eine bereits etablierte Versuchsanordnung von Wang et al. verwendet (Wang et al., 2003).

Hierzu erfolgten im Labor bei Wistar-Ratten unter Allgemeinanästhesie eine mediane Laparotomie und die Ausschaltung einer Darmschlinge des Jejunums aus der Darmpassage. Die Darmkontinuität wurde durch eine Anastomose des oralen und aboralen Anteils wieder hergestellt. Die isolierte Darmschlinge wurde in der Mitte durchtrennt und eine tubularisierte Matrix eingefügt. Es erfolgte an beiden Enden eine Anastomose der Matrix mit einem gut durchbluteten Darmanteil, und die Ausleitung der Darmschlinge beidseits als Enterostoma in die Bauchhaut (sog. *blind loop*).

Die Durchführung der Tierversuche wurde gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein am 7. Mai 2010 genehmigt. Das Versuchsvorhaben wird dort unter dem Aktenzeichen V312-72241.122-24 (52-4/10) geführt.

Ziel des Experiments war es nach 2 zeitlichen Endpunkten – 30 und 60 Tage nach Implantation der Matrices – jeweils 4 Regenerate pro Versuchsreihe aus dem Situs zu entnehmen und zu analysieren. Während der Durchführung der Versuche kam es gehäuft zum Tode der Versuchstiere vor dem Eintritt des definierten Endpunkts. Die häufigsten Ursachen dafür waren ein Ileus oder intraabdominelle Infektionen. Folglich mussten insgesamt 55 Versuche durchgeführt werden. (vgl. Tab. 2).

Tab. 2 Anzahl der Versuche in den einzelnen Versuchsreihen

Kürzel	Matrix	Anzahl der Versuche nach Endpunkt			Anzahl der Versuche pro Versuchsreihe
		30 Tage	60 Tage	letal	
SIS	Surgisis® 4-Layer Tissue Graft	4	4	1	9
CH	Chondro-Gide®	4	4	4	12
TU	TUTOPATCH®	4	4	6	14
ET	ETHISORB® Dura Patch	4	4	6	14
Tod des Versuchstiers vor der Implantation der Matrix					1
Vorversuche					5
Gesamt:					55

Zur Etablierung der Versuchsanordnung vor Ort, wurden die operative Technik und die Reproduzierbarkeit des Experiments durch 5 Vorversuche ermittelt. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Materialien auf ihre biomechanische Tauglichkeit als Darmregenerat getestet.

Während der Regenerationsdauer wurden die Ratten durch die Tierpfleger der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gepflegt. Nach den festgelegten Endpunkten von 30 und 60 Tagen wurden die Tiere getötet und die Jejunalschlinge mit dem Darmregenerat entnommen. Anschließend wurden die Präparate vermessen. Zur weiteren Analyse wurden die Proben histotechnisch aufgearbeitet. Abschließend wurden die Präparate makroskopisch vermessen, fotografiert und histologisch beschrieben.

2.2 Versuchstiere

Für die Experimente wurden ausschließlich 8 bis 10 Wochen alte, 250 bis 350 g schwere, weibliche Wistar-Ratten verwendet. Dabei handelt es sich um eine ausgezüchtete Albino-Variante der Wanderratte (lat. *Rattus norvegicus albinus*), die am *Wistar Institute for Anatomy and Biology* der *University of Pennsylvania* (Philadelphia, USA) zu Beginn des 20. Jahrhunderts als standardisiertes Labortier gezüchtet wurde.

Der verwendete Auszuchtstamm Crl:WI wurde von *Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH* (Sulzfeld) erworben. Er wird als Modellorganismus in der medizinischen und biologischen Forschung häufig verwendet und findet vielfach Anwendung in chirurgischen Tiermodellen. Daher ist diese Tierart im Sinne der Vergleichbarkeit mit anderen Publikationen bestens geeignet.

2.3 Material

Die für die Experimente verwendeten Matrizes, Instrumente, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software sind im Nachfolgenden aufgeführt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es 4 unterschiedliche Matrizes auf ihre mechanischen und regenerativen Eigenschaften als künstliches Darmsegment zu untersuchen. Zur Anwendung kamen 3 kollagene Matrizes aus biogenem Ursprung und ein vollsynthetisch produzierter Verbundstoff (vgl. Tab. 3). Diese haben sich bereits als geeignete Regenerationsgerüste in der Medizin etabliert und befinden sich bereits in klinischer Anwendung. Darüber hinaus haben sich diese Materialien in den Vorversuchen als mechanisch kompatibel erwiesen.

Tab. 3 Verwendete Matrices

Name	Hersteller
Kollagene Matrices aus biogenem Ursprung	
Surgisis® 4-Layer Tissue Graft	Cook® Medical Inc.
Chondro-Gide®	Geistlich Pharma AG
TUTOPATCH®	TUTOGEN Medical GmbH
Synthetische Matrix	
ETHISORB® Dura Patch	Ethicon GmbH & Co KG (Johnson & Johnson Medical GmbH)

Im Folgenden werden die Bestandteile, die Beschaffenheit, die Eigenschaften, der Herstellungsprozess und die klinische Verwendung dieser Materialien näher ausgeführt. Alle Angaben beziehen sich auf Herstellerinformationen in Form von Gebrauchsanweisungen, Informationsbroschüren, Beratungsgesprächen und Vorträgen.

2.3.1 Kollagene Matrices

Biogene Matrices werden aus tierischen Organen gewonnen, anschließend aufgearbeitet und als xenogene Transplantate für unterschiedliche klinische Indikationen verwendet. Ihre Hauptbestandteile sind Kollagene, die Proteine des Bindegewebes. Darüber hinaus verfügen sie, je nach Herstellungsprozess, über eine Vielzahl weiterer struktureller oder funktioneller Faktoren: Glykoproteine fungieren als Adhäsionsproteine. Glykosamino- und Proteoglykane absorbieren Wasser in großen Mengen und beeinflussen damit die mechanischen Eigenschaften des Bindegewebes. Wachstumsfaktoren stimulieren die Zellmigration und -teilung und tragen somit zur Synthese neuen Gewebes bei (vgl. 1.5).

In dieser Arbeit wurden 3 unterschiedliche, kollagene Materialien aus biogenem Ursprung verwendet: Chondro-Gide®, Surgisis® 4-Layer Tissue Graft und TUTOPATCH®.

2.3.1.1 Surgisis® 4-Layer Tissue Graft

Der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft ist ein biologisches Implantat des Biotechnologieunternehmens Cook® Medical Inc. Hierbei handelt es sich um eine azelluläre, auf Kollagen basierende Matrix, die durch die firmeneigene *small intestinal submukosa (SIS)*-Technologie hergestellt wird. Die Submukosa ist eine lockere Bindegewebsschicht im Gastrointestinaltrakt, die sich zwischen Mukosa und Muskularis befindet und dem Dünndarm von Schweinen entnommen wird. Diese Bindegewebsschicht aus scherengitterartig angeordneten Kollagenfasern ist reich an Blut- und Lymphgefäßen und enthält den Meissner-Nervenplexus (vgl. 1.2).

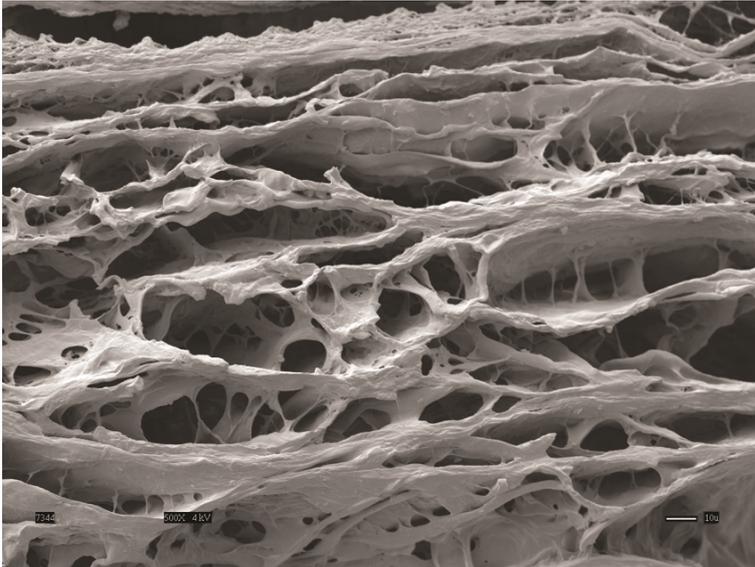


Abb. 2 Mikrostruktur des Surgisis® 4-Layer Tissue Graft. Rasterelektronenmikroskopie. Quelle: Cook® Medical Inc.

Bei dem Aufbereitungsverfahren werden alle Zellen entfernt, jedoch wird die natürliche fibröse und poröse Eigenschaft des Bindegewebes beibehalten. Dadurch entsteht eine dünne, robuste Schicht aus extrazellulären Matrixkomponenten (vgl. Abb. 2). Die konservierten Bestandteile der Matrix nach der Aufbereitung sind Strukturproteine (Kollagen Typ I, III, IV und VI, Elastin), Glykoproteine (Fibronectin, Laminin),

Glykosamino- und Proteoglykane (Hyaluronsäure, Heparansulfat, Heparin, Dermatansulfat) und Wachstumsfaktoren (FGF-2, CTGF, TGF- β).

Um eine mehrschichtige und damit stabilere Matrix zu formen, werden mehrere Lagen dieser speziellen SIS-Membran übereinander gelegt und miteinander verklebt. Bei den Experimenten dieser Arbeit wurde ein vierlagiger Patch verwendet.

Als natürliche, Extrazellulärmatrix (EZM) eignet sich der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft als strukturelles und funktionelles Biomaterial um den Heilungsprozess von Geweben im menschlichen Körper zu unterstützen. Während dieses Prozesses wird der Patch durch körpereigenes Gewebe ersetzt, das dieselben physiologischen und morphologischen Eigenschaften wie natives Gewebe haben soll. Dabei kommt es initial zu einer lokalen Entzündungsreaktion.

Das Produkt wird einem genauen Desinfektions-, Dezellularisierungs-, viralem Inaktivierungs- und Sterilisationsprozess mit standardisierten Methoden unterzogen. Die Auswahl der verwendeten Tiere, aus denen das Material gewonnen wird, unterliegt strikten Kontrollen. In-vitro-Testergebnisse haben demonstriert, dass weder die Gerinnungskaskade aktiviert, noch eine akute Abstoßungsreaktion auf den SIS-Patch ausgelöst wird; jedoch können diese, sowie allergische Reaktionen, Adhäsionen, u. a. nicht ausgeschlossen werden.

2.3.1.2 Chondro-Gide®

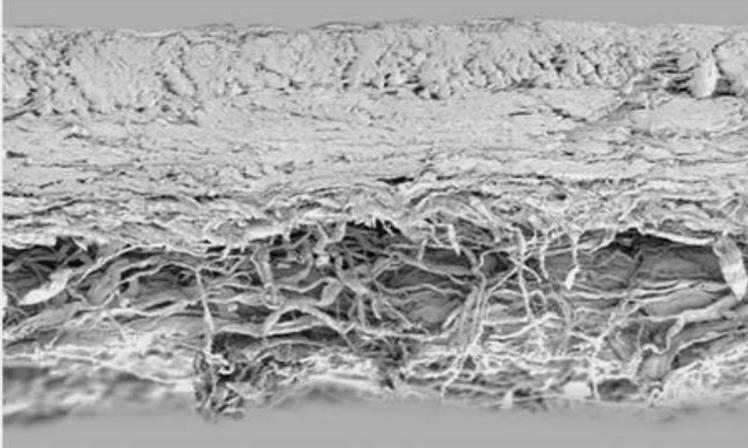


Abb. 3 Bilayer Struktur von Chondro-Gide®. Rasterelektronenmikroskopie.

Quelle: „Chondro-Gide®, AMIC® Knie, Autologe Matrix Induzierte Chondrogenese“, Geistlich Pharma AG

Chondro-Gide® ist ein Produkt der Geistlich Pharma AG. Es ist eine zweischichtige Matrix (vgl. Abb. 3) und hat eine faserige Mikrostruktur aus den natürlichen Strukturproteinen Kollagen (Typ I und III) und einem geringen Anteil Elastin, ohne weitere Quervernetzung oder chemische Zusätze. Die kohärenten Kollagenfasern sind hydrophil, schwellen bei Benetzung an und bilden eine

einheitliche Gewebestruktur. Die strukturelle Integrität wird im feuchten Zustand gewahrt. Bei Anfeuchtung erfolgt eine Größenzunahme um ca. 10 bis 15 %. Chondro-Gide® wird durch einen standardisierten und kontrollierten Prozess aus tierärztlich zertifizierten Schweinen gewonnen und anschließend aufgereinigt, um das Risiko immunologischer Reaktionen zu vermindern. Welches Organ dazu verwendet wird, unterliegt der Geheimhaltung.

Der Herstellungsprozess ist wirksam, um pathogene Bakterien, Viren, Pilze, Sporen und Parasiten sicher und zuverlässig zu eliminieren. Die Matrix wird im Doppelblister durch γ -Strahlung sterilisiert. Der Patch findet in der Orthopädie bei der Abdeckung von Gelenkknorpeldefekten zur Knorpelregeneration Anwendung, entweder mittels autologer Chondrozyten-Transplantation oder mit Hilfe knochenmarkstimulierender Techniken.

Chondro-Gide® hat eine zweischichtige Struktur. Die poröse Schicht, die dem Defekt zugewandt wird, erlaubt das Einwachsen der Zellen und den Neuaufbau von Gewebe. Die kompakte Schicht, die zum Gelenkspalt zeigt, erfüllt dabei eine Barrierefunktion und verhindert, dass die transplantierten Chondrozyten oder die mit Stammzellen angereicherten Blutkoagel, aus dem Defekt ausgespült werden.

Das organische Material zeichnet sich durch Biokompatibilität und geringe Antigenität aus. Dennoch können allergische Reaktionen nicht ausgeschlossen werden. In Tierstudien wurde gezeigt, dass diese kollagene Matrix in Knochenkavitäten innerhalb von 24 Wochen resorbiert wird. Kollagenasen, Gelatinasen und Proteinasen spalten es zu Oligopeptiden und letztlich in einzelne Aminosäuren auf. In belasteten und bewegten Zonen kann die Resorptionszeit kürzer sein.

2.3.1.3 TUTOPATCH®

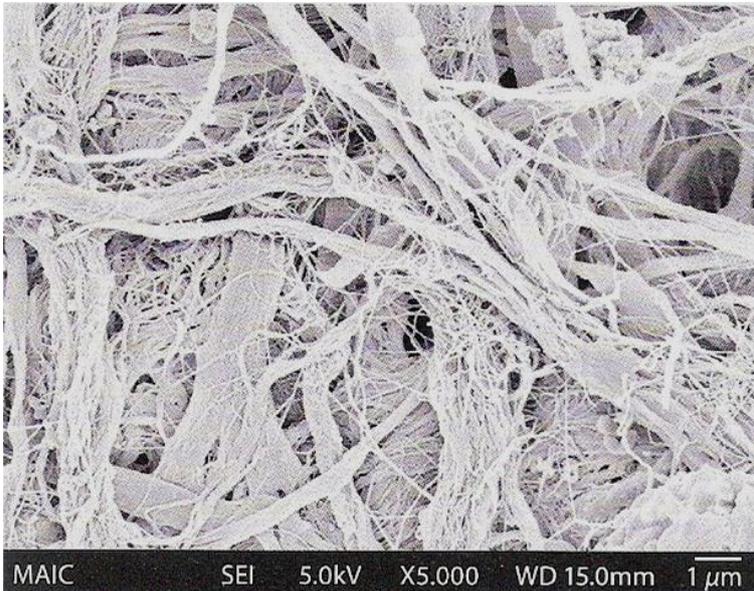


Abb. 4 Dreidimensionale Struktur xenogener TUTOGEN-Produkte am Beispiel des TUTOMESH®

Quelle: „TUTOMESH®, Weichgewebe-Ersatz mit xenogener Kollagenmembran“, TUTOGEN Medical GmbH

TUTOPATCH® ist ein Produkt der TUTOGEN Medical GmbH. Es handelt sich um eine avitale, zellfreie Kollagenmembran aus bovinem Perikard (vgl. Abb. 4). Zu ca. 98 % besteht es aus nativem Kollagen Typ I. Den restlichen Anteil machen andere Kollagene aus, u. a. Elastin. Der TUTOPATCH® hat eine zweischichtige Struktur mit einer glatten und einer rauen Oberfläche. Die glatte Seite dient der Reduktion von Adhäsionen mit umliegenden Strukturen. Die raue Seite entsteht, wenn bei der Aufbereitung die Fettschicht am Perikard entfernt wird. Sie zeichnet sich durch eine größere Oberfläche aus und unterstützt dadurch die Zellmigration und Vaskularisation aus dem umliegenden Gewebe. Der Patch ist für Flüssigkeiten undurchlässig.

Das aus Rindern gewonnene Gewebe wird einem firmeneigenen, mehrstufigen Verfahren ausgesetzt, welches eine gründliche Aufreinigung und eine schonende Dehydratisierung des Gewebes mit Lösungsmitteln beinhaltet. Dieser sogenannte TUTOPLAST®-Prozess ist ein Konservierungs- und Sterilisationsverfahren für Binde- und Stützgewebe, das die antigene Eigenschaft der Gewebe entfernt, indem es Zellen zerstört und Zellreste, Fett sowie nicht-kollagene Proteine, wie auch Wachstumsfaktoren, eliminiert. Alle Arten von Krankheitserregern werden inaktiviert. Eine chemische Quervernetzung wird dabei nicht durchgeführt und die dreidimensionale Kollagenstruktur des Materials bleibt unverändert. Abschließend wird das bovine Perikard mittels niedrig dosierter γ -Strahlung sterilisiert.

Das aus Rindern gewonnene Gewebe wird einem firmeneigenen, mehrstufigen Verfahren ausgesetzt, welches eine gründliche Aufreinigung und eine schonende Dehydratisierung des Gewebes mit Lösungsmitteln beinhaltet. Dieser sogenannte TUTOPLAST®-Prozess ist ein Konservierungs- und Sterilisationsverfahren für Binde- und Stützgewebe, das die antigene Eigenschaft der Gewebe entfernt, indem es Zellen zerstört und Zellreste, Fett sowie nicht-kollagene Proteine, wie auch Wachstumsfaktoren, eliminiert. Alle Arten von Krankheitserregern werden inaktiviert. Eine chemische Quervernetzung wird dabei nicht durchgeführt und die dreidimensionale Kollagenstruktur des Materials bleibt unverändert. Abschließend wird das bovine Perikard mittels niedrig dosierter γ -Strahlung sterilisiert.

Der TUTOPATCH® hat umfangreiche Anwendung in der klinischen Praxis. Er kommt als Ersatz oder Verstärkung von Bindegewebestrukturen sowie als Barrieremembran, z. B. als Duraplastik, primäre Abdeckung einer Gastroschisis oder Omphalozele, Zwerchfeldefektverschluss, Perikardersatz, Abdeckung von Gefäßprothesen und gastrointestinalen Anastomosen, Verstärkung primärer Band- und Sehnennähte, subkutane Defektfüllung zum Einsatz.

Initial sorgt der TUTOPATCH® für einen Verschluss des Gewebedefektes und dient als Leitschiene, in die Fibroblasten einsprossen können. Neues Kollagen wird aufgebaut und der

TUTOPATCH® durch körpereigenes, ortstypisches, stabiles Bindegewebe ersetzt. Außerdem ermöglicht es das Einwachsen von Gefäßen. Dieser Umbauprozess ist abhängig von der Größe des Transplantats, den Regenerationseigenschaften des Implantatbetts sowie von begleitenden Erkrankungen. Ohne Störung kann der Umbauprozess mehrere Wochen bis mehrere Monate dauern.

2.3.2 Synthetische Matrices

Synthetische Materialien zeichnen sich dadurch aus, dass sie in großen Mengen gleichartig gefertigt werden und dabei ihre Makro- (Größe und Form) und Mikrostruktur (Porengröße, Porenstruktur, Fasergröße) kontrolliert und verändert werden können. Dadurch ist es möglich die biomechanischen Eigenschaften der Materialien, wie z. B. die Degradationsdauer und damit ihre strukturelle Stabilität zu verbessern. Sie verfügen jedoch, im Gegensatz zu kollagenen Matrices, nicht über die Adhäsions- und Wachstumsfaktoren, die die Geweberegeneration zusätzlich fördern können.

2.3.2.1 ETHISORB® Dura Patch



Abb. 5 ETHISORB®-Vlies mit dreidimensionalem VICRYL®-Filamentgeflecht (V) und punktueller Verklebung durch eine PDS-Schmelze (PDS). Rasterelektronenmikroskopie, 70x.
Quelle: „ETHISORB® - ein neues resorbierbares Implantat für die Chirurgie“, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH

Als einzige synthetisch hergestellte Matrix wurde in dieser Versuchsanordnung der ETHISORB® Dura Patch verwendet.

ETHISORB® Dura Patch ist ein, von der Ethicon GmbH & Co KG entwickelter, vollsynthetisch hergestellter, resorbierbarer Verbundstoff in Form eines Vlies aus VICRYL® (Polyglactin 910) und Poly-p-dioxanon (PDS). VICRYL® ist der Handelsname eines Nahtmaterials; ein Copolymer, das zu 90 % aus Polyglykolsäure und zu 10 % aus Poly-L-Lactid (zusammen

Poly-lactid-co-Glycolid, PLGA) besteht. Der Hauptbestandteil, Polyglykolsäure, ist ein aus Hydroxyessigsäuredimeren polymerisierter Ester, der mittels Hydrolyse innerhalb von ca. 30

Tagen abgebaut wird. Poly-p-dioxanon ist ebenfalls ein, biologisch abbaubares, synthetisches Polymer aus p-Dioxanon, eine aus Ether und Ester bestehende chemische Ringkonfiguration. Es wird innerhalb von 6 Monaten durch Hydrolyse komplett reabsorbiert.

Die beiden Ausgangsmaterialien dieser Verbundstruktur werden durch einen thermoplastischen Prozess, ohne Zusatz von Fremd- oder Hilfsstoffen, miteinander verbunden. Dabei entsteht ein filamentöses Composite-Material mit einer dreidimensionalen Faseranordnung (vgl. Abb. 5): Die unregelmäßig verlaufenden VICRYL®-Fasern sind etwa 12 µm dünn und durch eine lokale PDS-Schmelze miteinander verklebt. Anschließend wird der Composite einseitig mit einem violett gefärbten PDS-Film (D&C Violett Nr.2, Color Index-Nr. 60725) beschichtet.

Dieses Material findet in der Medizin als vollständig resorbierbares Implantat für die temporäre Überbrückung von Defekten der Dura mater Anwendung. Die poröse Struktur erlaubt das Einwachsen von körpereigenem Gewebe. Die Beschichtung mit einem PDS-Film gewährleistet Flüssigkeitsdichtigkeit und minimiert die Ausbildung von Adhäsionen an dieser Seite des Patches. Bei Anwendung an der Dura erfolgt eine Resorption innerhalb von ca. 90 Tagen. Die PDS-Anteile lassen sich bis zu 180 Tagen nach Implantation nachweisen. Der Patch wird durch eine Dura-ähnliche Ersatzstruktur aus dichtem, kollagenem und gerichtetem Bindegewebe ersetzt. Nach Abschluss der Resorption findet sich am Implantationsort eine bindegewebige Ersatzstruktur.

Des Weiteren findet diese synthetische Matrix Anwendung zur Rekonstruktion der Bauchwand, der Brustwand, des Beckenbodens, als artifizielle Nierenkapsel und zur Rekonstruktion von parodontalen Knochendefekten. Zudem wird er als Nahtwiderlager in fragilen Geweben und Organparenchymen, insbesondere in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie sowie der Leber- und Nierenchirurgie genutzt.

Wie bei jedem Fremdkörper kann nach Implantation eine vorübergehende Gewebsreaktion hervorrufen werden. ETHISORB® Dura Patch wird mit Ethylenoxid sterilisiert.

2.3.3 Weitere Materialien

Im Anhang befinden sich tabellarische Übersichten über alle Geräte, Medikamente, Instrumente, Verbrauchsmaterialien, Färbungsreagenzien, Mikroskope, Kameras und Computerprogramme, die für die Durchführung der Versuche, die histotechnische Aufarbeitung der Proben sowie die makroskopische und mikroskopische Analyse und statistische Auswertung der Daten angewendet wurden (vgl. 7.1).

2.4 Methoden

Im Folgenden werden die angewendeten Methoden zur Durchführung der Versuche, Erhebung der Daten und Auswertung der Ergebnisse, die in dieser Arbeit verwendet wurden, dargestellt.

2.4.1 Titanisierung des Surgisis® 4-Layer Tissue Graft

Der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft wurde vor Implantation einem speziellen nanotechnologischen Veredelungsverfahren unterzogen, das von dem Medizintechnikunternehmen *pfm medical titanium GmbH* entwickelt und durchgeführt wurde. Dabei wurde eine wenige Nanometer dünne Titanoberfläche auf dieser Matrix aufgebracht.

Zunächst wird die Bindungsneigung des Trägermaterials durch die Oberflächenaktivierung mit Niederdruckplasma, hierbei handelt es sich um ein ionisiertes Gas, verbessert. Im nächsten Schritt wird in einem patentierten Prozess eine ca. 30 bis 50 nm dünne, biokompatible Titanoxidoberfläche aufgetragen, die kovalent an dem behandelten Material haftet, wodurch aus dem homogenen Surgisis® 4-Layer Tissue Graft ein zweischichtiger Composite wird.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe „*Tissue Engineering*“ der Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie der Universität zu Lübeck zeigen, dass diese Behandlung von Biomaterialien, insbesondere bovinem Perikard, die Epithelialisierung, Zelladhäsion und -vitalität *in vitro* positiv beeinflussen (Guldner et al., 2009).

Bei diesem Titanisierungsverfahren bleiben, laut Herstellerangaben, die Materialeigenschaften des Produktes unverändert. Die von der *pfm medical titanium GmbH* verwendete Technologie ermöglicht eine Plasmaanwendung bei niedriger thermischer Belastung, um temperatursensitive Oberflächen zu aktivieren und zu schützen. Außerdem seien natürliches Einwachsen, geringe Schrumpfung, Migration, hervorragende Biokompatibilität und geringere Abstoßungsreaktionen des Trägermaterials gewährleistet (pfm medical ag, 2015).

2.4.2 Vorbereitung der Matrices

Ausreichende Sterilität wurde vor der Implantation der Zellträgermaterialien sichergestellt. Chondro-Gide®, TUTOPATCH® und ETHISORB® Dura Patch wurden vom jeweiligen Hersteller steril verpackt geliefert. Beim Surgisis® 4-Layer Tissue Graft erfolgte nach der Titanisierung (vgl. 2.4.1) eine schonende, chemische Sterilisation in einem Gassterilisator, wie sie für gewöhnlich bei thermolabilen Materialien zur Anwendung kommt.

Die Matrices wurden wie folgt präoperativ vorbereitet: Unter sterilen Bedingungen wurden die Materialien mit einer Schere auf eine Größe eines 15 mal 20 mm großen Rechtecks

zugeschnitten, anschließend mit 0,9%iger NaCl-Lösung angefeuchtet und mittels einer fortlaufenden Poly-p-dioxanon-Naht (PDS 6.0) entlang der langen Rechteckseite zu einem Hohlzylinder geformt. Dabei war darauf zu achten, dass bei den mehrschichtigen Composites die richtige Orientierung der Oberflächen stattfand, d.h. dass die Seite, auf der die Geweberegeneration stattfinden sollte, nach innen gerichtet war.

Beim Surgisis® 4-Layer Tissue Graft zeigte sich nach Titanbehandlung eine zweischichtige Struktur. Hierbei wurde die titanbeschichtete Seite, die sich positiv auf die regenerativen Eigenschaften des Materials auswirkt, nach innen orientiert.

Beim Chondro-Gide® zeigte die kompakte Schicht, die als Barriere dient, nach außen und die poröse nach luminal.

Der TUTOPATCH® hat eine zweischichtige Struktur mit einer glatten und einer rauen Oberfläche. Die raue Seite zeichnet sich durch eine größere Oberfläche aus und unterstützt dadurch die Zellmigration und Vaskularisation aus dem umliegenden Gewebe und musste deshalb nach intraluminal gerichtet werden.

Der synthetische ETHISORB® Dura Patch besteht aus einer porösen und einer kompakten Struktur. Die kompakte Schicht erlaubt das Einwachsen von körpereigenem Gewebe und wurde deshalb nach luminal gewendet.

Das Resultat war je ein Tubus von 20 mm Länge, ca. 15 mm Umfang, ca. 4,8 mm Durchmesser und ca. 300 mm² Oberfläche. Diese Maße stimmen mit den Maßen des Darms einer jungen Wistar-Ratte überein, sodass Patch und Rattendarm gut kompatibel waren.

2.4.3 Präoperatives Management und Schmerztherapie

Die operativen Maßnahmen erfolgten in Allgemeinanästhesie unter Isofluran-Gasnarkose. Die Narkose wurde an einem für veterinärmedizinische Eingriffe geeigneten Anästhesiearbeitsplatz durchgeführt:

Zur Narkoseeinleitung wurden die Versuchstiere in eine Narkosebox aus Plexiglas für Nagetiere gesetzt. Über einen Zuleitungsschlauch wurde ein Gasgemisch aus 5%igem Isofluran-Anästhetikum aus einem Narkosemittelverdampfer (DRÄGER Vapor 19.3) und Sauerstoff über ein Durchflusssensor (MEDAP Flowmeter) zugeführt. Nachdem die Ratte erkennbar narkotisiert war, wurde sie aus der Narkosebox geholt und in Rückenlage auf dem Versuchstisch positioniert. Über eine spezielle Narkosemaske mit Gaszuleitungsadapter für kleine Nager wurde die Narkose aufrecht gehalten und der Anteil des Isofluran sukzessive auf 2,5 bis 3 % reduziert. Insgesamt wurde den Versuchstieren das volatile Anästhetikum für eine Versuchsdauer von ca. 45 bis 90 Minuten verabreicht.

Die Lagerung erfolgte auf einer Wärmedecke, um einer Auskühlung der Tiere vorzubeugen.

Die Operation erfolgte unter sterilen Bedingungen: Der Operationsbereich wurde mit einem Einwegrasierer vom Fell befreit, mit Cutasept® desinfiziert und die Umgebung mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt.

Vor Beendigung der Operation erfolgte die einmalige Gabe von Metamizol 1 mg intraperitoneal. Postoperativ erhielten die Ratten 500 mg Novalgin auf 250 ml Trinkwasser ad libitum. Das entspricht, bei einer geschätzten Trinkmenge von 40 bis 50 ml, einer Dosis von ca. 80 bis 100 mg pro Tag.

2.4.4 Chirurgische Techniken

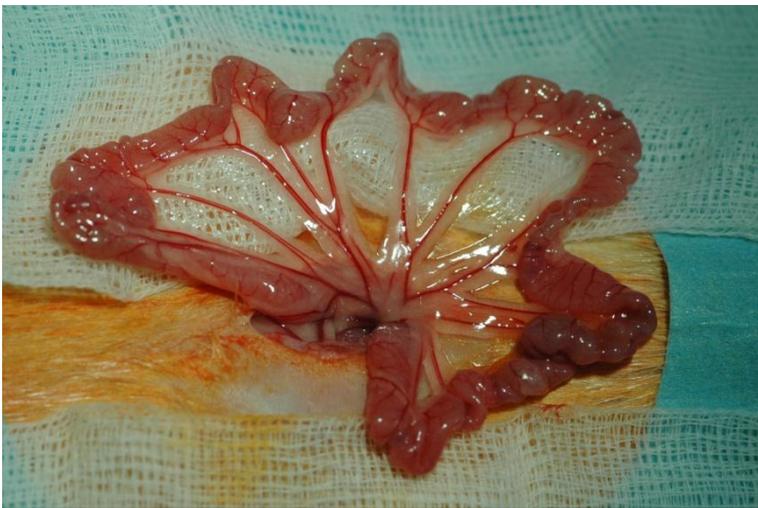


Abb. 6 Aufsuchen einer Jejunalschlinge mit ausreichender Blutversorgung

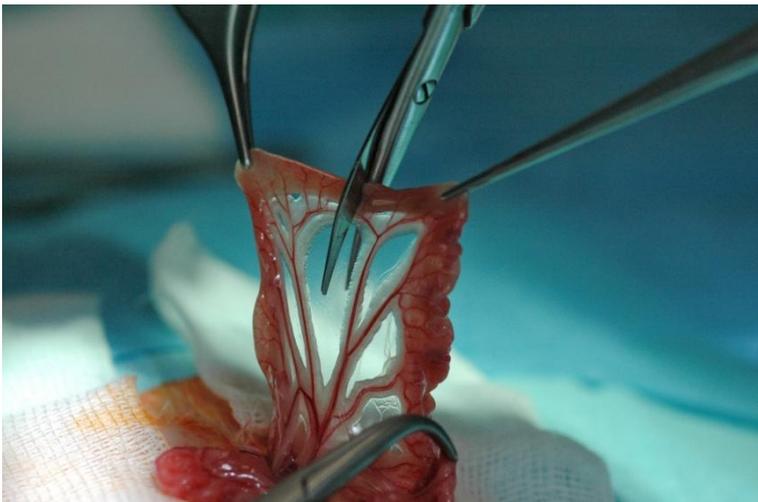


Abb. 7 Durchtrennung der Jejunalschlinge mit einer Schere

dass der Darmabschnitt, der isoliert werden sollte, eine ausreichende Blutversorgung mittels zweier Gefäßarkaden erhielt (vgl. Abb. 6).

Alle Operationen wurden von einem erfahrenen Facharzt für Kinderchirurgie geleitet. Die Assistenz wurde von dem Doktoranden übernommen. Die chirurgische Technik zur Durchführung der Experimente orientiert sich an einer Versuchsanordnung, die 2003 von Wang et al. etabliert wurde (Wang et al., 2003):

Nach Einleitung der Anästhesie, Lagerung und Desinfektion, erfolgte eine mediane Laparotomie: Die Haut wurde über eine Länge von 2,5 bis 3 cm inzidiert und die Bauchhöhle durch Inzision der Linea alba eröffnet. Nach anatomischer Orientierung, wurde eine ca. 6 cm lange Jejunalschlinge ca. 10 cm distal des Treitz-Bandes aufgesucht. Dabei wurde gewährleistet,

Nachdem der ausgewählte Darmabschnitt oral und aboral abgeklemmt wurde, erfolgte die Durchtrennung der Darmschlinge beidseits mit einer Schere (vgl. Abb. 7). Das Resultat waren 3 voneinander getrennt vorliegende Darmabschnitte: ein oraler, ein mittiger und ein aboraler Anteil.



Abb. 8 Isolierte Darmschlinge mit Patchinterponat

Im nächsten Schritt wurden der orale und der aborale Darmabschnitt durch eine End- zu- End- Anastomose mittels 8 bis 10 Einzelknopfnähten mit PDS 7.0 miteinander verbunden und die Darmpassage wieder hergestellt. Die nun isolierte Darmschlinge wurde, wie in Abb. 8 und Abb. 9 dargestellt, in der Mitte beider Gefäßarkaden halbiert und die 20 mm lange tubularisierte Matrix interponiert.

Dazu erfolgten wiederum jeweils 8 bis 10 Einzelknopfnähte mit PDS 7.0. Das Resultat war ein Tubus der aus 3 Anteilen bestand: Die beiden Enden, bestehend aus je einem ca. 3 cm langen Darmsegment, das jeweils von einer Vene und einer Arterie aus der Arteria bzw. Vena mesenterica superior versorgt wurde. Dazwischen befand sich das Zellträgermaterial, das nun beidseits an natives Darmgewebe grenzte.

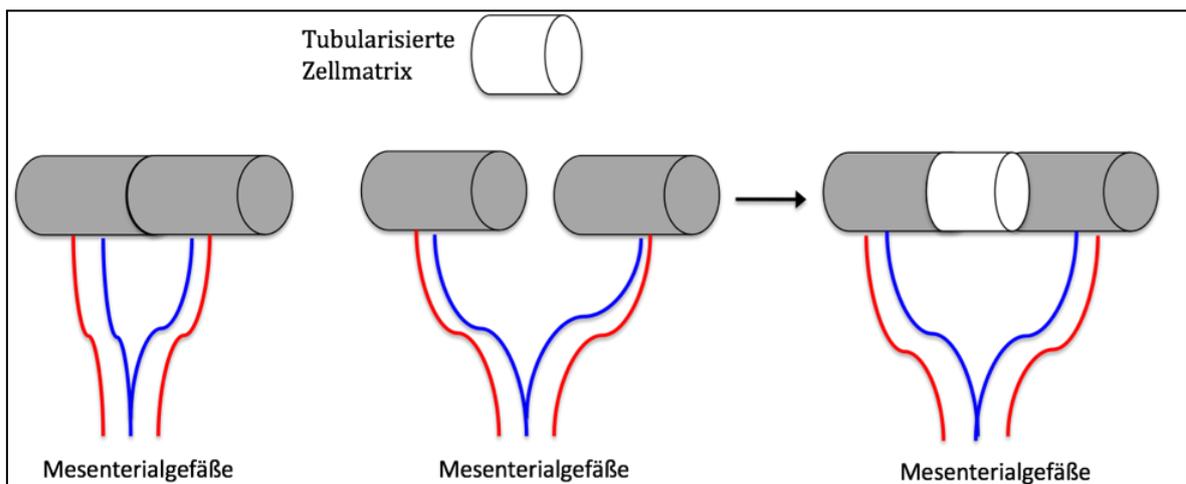


Abb. 9 Schematische Darstellung der chirurgischen Technik



Abb. 10 Ausleitung der isolierten Darmschlinge beidseits als Enterostoma.

Anschließend wurde die isolierte Darmschlinge mittels zweier Enterostomata ausgeleitet, um den Abfluss von abgestoßenen Zellen und Schleim zu garantieren und damit einer Dilatation und der Gefahr einer Ruptur des ausgeschalteten Darmabschnitts vorzubeugen:

Es erfolgten 2 ca. 0,5 cm große Inzisionen der Bauchwand im linken und rechten Mittel-

bauch. Um 2 künstliche Darmausgänge zu schaffen, wurden die beiden Enden der Jejunalschlinge in die Bauchwand mit 4 Einzelknopfnähten eingenäht (VICRYL® 6.0, vgl. Abb. 10).

Zum Abschluss wurde die Bauchfaszie mittels fortlaufender Naht (VICRYL® 4.0) verschlossen und der Hautverschluss mit Einzelknopfnähten (VICRYL® 4.0) durchgeführt.

2.4.5 Tierhaltung und Euthanasie

Die Tierhaltung fand unter standardisierten Laborbedingungen statt. Die Pflege der Tiere wurde durch ausgebildete Tierpfleger der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gewährleistet.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolon-Boxen, die mit Weichholzchips eingestreut waren. Postoperativ wurden die Tiere zunächst für 3 Tage in Einzelkäfigen (Makrolonbox Typ III mit erhöhtem Deckel) gehalten. Für die ersten 24 Stunden erfolgte eine Nahrungskarenz bei freier Trinkmenge, dann der Kostaufbau. Nach klinischer Stabilisation erfolgte die Haltung von 2 bis 4 Tieren pro Käfig (Makrolonbox Typ IV). Die Käfige wurden einmal wöchentlich gereinigt. Total pathogenfreies Futter und Wasser wurden ad libitum angeboten.

Die Temperatur im Rattenraum betrug 21 bis 22 °C, die Luftfeuchtigkeit lag zwischen 40 und 70 %. Die Tiere wurden in einem 12 h / 12 h - Hell/Dunkel - Zyklus gehalten. Die Tiere aller Versuchsreihen wurden im selben Raum untergebracht.

Je nach Versuchsgruppe wurden die Ratten für 30 oder 60 Tage gehalten. Die Tötung der Tiere zur Entnahme der Proben nach Ablauf des Versuchsprotokolls erfolgte durch eine letale Isofluran-Narkose.

2.4.6 Entnahme und Aufarbeitung der Präparate

Im Anschluss an die Tötung der Ratten wurden die Proben zur weiteren Aufarbeitung und Auswertung folgendermaßen entnommen und aufgearbeitet:



Abb. 11 Aufsuchen der isolierten Darmschlinge mit dem Patch in situ



Abb. 12 Vermessung der Präparate am Beispiel des TUTOPATCH®

Die Versuchstiere wurden erneut in Rückenlage auf dem Versuchstisch positioniert und die Bauchdecke entlang der Naht eröffnet.

Die isolierte Darmschlinge mit dem Regenerat wurde aufgesucht (vgl. Abb. 11) und aus dem umliegenden Gewebe und der Bauchwand freipräpariert und die Probe aus dem Situs entnommen. Das Präparat bestand nun aus dem Regenerat, das beidseits an natives Darmgewebe grenzte.

Nachdem das Präparat vermessen wurde (vgl. Abb. 12), wurde das Regenerat durch einen Längsschnitt eröffnet. Das Resultat war ein flaches Präparat. Anschließend wurde die Probe in eine Einbettkassette gelegt und in Formalin 4%ig zur Immersionsfixierung eingelegt.

Die Präparate wurden standardisiert, folgendermaßen gekennzeichnet: z. B. TU84

1. Kürzel für die jeweilige Matrix: SIS für Surgisis® 4-Layer Tissue Graft, CH für ChondroGide®, TU für TUTOPATCH®, ET für ETHISORB® Dura Patch
2. Erste Ziffer für den jeweiligen Endpunkt: 4 für 4 Wochen, entsprechend 30 Tagen; 8 für 8 Wochen, entsprechend 60 Tagen
3. Zweite Ziffer für die fortlaufende Nummerierung der Präparate in den einzelnen Versuchsreihen

Die weitere Aufarbeitung der Proben fand am Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck statt. Zur Herstellung histologischer Präparate wurden die Proben zunächst mittels aufsteigender Ethanolreihe dehydriert, mit Xylol aufgehellt und mit Paraffinwachs infiltriert. Dies erfolgte maschinell in einem Vakuuminfiltrationsprozessor (Tissue-Tek® VIP®). Anschließend erfolgten die Orientierung der Probe, mit der Schichtung der einzelnen Darmwandabschnitte parallel zur Schneiderichtung, in einer Metallausgießschale und die Einbettung mit Paraffin zu einem Wachsblock. Nach Auskühlung des Paraffinblocks bei -20 °C wurden die Proben durch ein Rotationsmikrotom (Leica RM2245) auf eine Schnittdicke von ca. 1 µm geschnitten. Zur Ausdehnung wurden die Schnitte in ein 50 °C warmes Wasserbad gelegt und anschließend auf einem Objektträger aufgetragen. Zur besseren Haftung des Paraffinschnitts mit dem Objektträger, wurde dieser in einem Brutschrank gelagert. Zur Entparaffinierung und Färbung wurden die Präparate in einem Färbegerät weiterverarbeitet.

2.4.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

UK SH <small>Campus Lübeck Institut für Pathologie</small>	REZEPTURHANDBUCH		Seite 1 von 2
	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) (Färbeautomat Leica ST 4040)		Version: 5

1. Färbung

Arbeitschritt	Reagenz	Zeit/min	Bemerkungen
1.	Xylol	1	
2.	Xylol	1	
3.	Xylol	1	
4.	Xylol	1	
5.	Alkohol 100%	1	
6.	Alkohol 100%	1	
7.	Alkohol 100%	1	
8.	Alkohol 96%	1	
9.	Leitungswasser	1	
10.	Hämatoxylin	1	
11.	Hämatoxylin	1	
12.	Leitungswasser	1	
13.	High Def	1	
14.	High Def	1	
15.	Leitungswasser	1	
16.	Bluing Reagent	1	
17.	Leitungswasser	1	
18.	½ Eosin Y/ ½ Multichrome	1	
19.	Alkohol 100%	1	
20.	Alkohol 100%	1	
21.	Alkohol 100%	1	
22.	Xylol	1	
23.	Xylol	1	
24.	Xylol	1	
25.	Xylol	1	
26.	Xylol	1	
27.	leer	1	

2. Reagenzien (s. Reagenzienverzeichnis):

- 2.1. Xylol, F, X_n
- 2.2. Alkohole, F
- 2.3. Hämatoxylin Vintage, Stat lab, T
- 2.4. High Def, Stat lab, X_n
- 2.5. Eosin Y, Stat lab, T, **Multichrome**
- 2.6. Bluing Reagent, Stat lab

Fragebogen am: 24.10.11
Verteiler: ID, OB, OM-Handbuch, Bereich: Labor für allg. histopath. Diagnostik, hämatopathologische, IJK Diagnostik
Auto-HE.doc

Für die mikroskopische Begutachtung wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gewählt. Nach der Vorbereitung der Präparate wurde die standardisierte, maschinelle Färbung der Schnitte nach einem festen Protokoll (vgl. Abb. 13) in einem linearen Färbegerät (Leica ST 4040) durchgeführt. Ziel der Anwendung des Naturfarbstoffs Hämatoxylin ist die Kernfärbung. „Der wirksame Farbstoff ist allerdings nicht das farblose Hämatoxylin selbst, sondern sein Oxidationsprodukt Hämatein“ (Lang, 2013). Das hier verwendete Produkt (Vintage Hematoxylin) ist eine Mischung aus Hämatoxylin und Hämatein, die mit dreiwertigen Aluminiumionen und Essigsäure versetzt werden, um die Selektivität zu den Nukleinsäuren zu erhöhen. Das Gemisch „führt in erster Linie zur kontrastreichen Darstellung der Zellkerne in blauem oder violetterm Farbton (...)“ (Lang, 2013).

Abb. 13 Färbeprotokoll für die maschinelle Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Das hier verwendete Eosin-Y (Vintage Eosin) ist ein roter, saurer Farbstoff aus der Gruppe der Xanthenfarbstoffe und chemisch

Tetrabrom-Fluorescein. „Eosin färbt Cytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern kräftig rot. Auch Kernstrukturen nehmen den Farbstoff an, wodurch nach vorangegangener Kernfärbung mit [der Hämatoxylin-Mischung] das typische rötlich-violette Mischbild entsteht. (...) Cytoplasma erscheint rötlich-rosa und kollagene Fasern zeigen eine eher altrosa Nuance“ (Lang, 2013).

Abschließend erfolgte die maschinelle Abdeckung der gefärbten Präparate mit Deckgläsern durch eine Eindeckmaschine (Automatic Glass Coverslipper ACS 720).

2.4.7 Makroskopische Analyse und statistische Methoden

Die makroskopische Analyse untersucht die biomechanische Stabilität der ausgewählten Materialien. Dazu soll das Ausmaß ihrer Schrumpfung *in vivo* ermittelt werden. Jeder Matrix wurde eine eigene Versuchsreihe zugeordnet. In jeder Versuchsreihe wurden zu 2 zeitlichen Endpunkten, $t_1 = 30$ Tage und $t_2 = 60$ Tage, jeweils 4 Präparate ($n = 4$) aus dem Situs entnommen. Jedes Präparat bestand aus einer isolierten Jejunalschlinge, in dessen Mitte sich das Dünndarmregenerat befand, das beidseits von nativer Dünndarmmukosa begrenzt wurde. Die Länge des Regenerats wurde gemessen, indem der Abstand zwischen beiden Anastomosen mit einem Millimetermaß bestimmt wurde. Insgesamt wurden 32 Präparate analysiert.

Die Datenanalyse erfolgte mittels der Software SPSS 13.0. Die Deskription der Versuchsreihen umfasste jeweils den Median (\tilde{x}), das obere und untere Quartil ($Q_{0,25}$ und $Q_{0,75}$), den Interquartilsabstand ($IQR = Q_{0,75} - Q_{0,25}$) als Streuungsmaß sowie die Minima (min) und Maxima (max) der Patchlängen zu den jeweiligen zeitlichen Endpunkten. Weiterhin wurden die Daten anhand von Boxplots visualisiert.

Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs ($n = 8$) kann keine Normalverteilung der Messwerte angenommen werden. Die Hypothesen wurden daher anhand nichtparametrischer, verteilungsfreier Verfahren getestet (Bortz et al., 2008a). Konkret handelt es sich um Friedmans verallgemeinerten Vorzeichenstest, den Vorzeichenrangtest nach Wilcoxon und den U-Test nach Mann und Whitney. Bei kleinen Stichproben ($N_1, N_2 \leq 10$) ist es erforderlich, die exakten Versionen dieser Testverfahren einzusetzen. Mit diesen Tests ist es möglich, Unterschiede in der zentralen Tendenz der Versuchsreihen festzustellen. Dazu werden die kardinal skalierten Messwerte in eine Rangreihenfolge transformiert und dadurch allein die Ordinal-Information der Daten berücksichtigt. Der Unterschied der Summen der Rangplätze in den einzelnen Gruppen kennzeichnet Differenzen im Hinblick auf die untersuchte Variable. Dadurch ist es möglich einen p-Wert zu ermitteln auf Grundlage dessen die Nullhypothese angenommen oder verworfen wird (Bortz et al., 2008b).

Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha \leq 0,05$ festgelegt.

Die erste Alternativhypothese ($H_{A,1}$) wurde wie folgt definiert: Die einzelnen Materialien unterliegen in vivo einer Schrumpfung. Als Schrumpfung ist die Abnahme der Länge eines Regenerats in einer Versuchsreihe mit zunehmender In-vivo-Regenerationsdauer definiert, d.h. dass ein Unterschied zwischen der medianen Patchlänge zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ Tage, $t_1 = 30$ Tage und nach $t_2 = 60$ Tage besteht ($H_{A,1}$). Der Friedman-Test prüft auf signifikante Unterschiede zwischen mehr als 2 abhängigen Stichproben, in diesem Fall auf die Patchlänge der verwendeten Zellträgermaterialien zu den 3 definierten Endpunkten. Mit dem Friedman-Test wird nur festgestellt, ob in einer Stichprobe überhaupt signifikante Unterschiede vorliegen. Mit dem Wicoxon-Test, der auf Unterschiede zwischen nur 2 abhängigen Stichproben testet, wird deshalb separat geprüft, ob die medianen Patchlängen jeweils zum Zeitpunkt t_1 bzw. t_2 geringer sind als zum Zeitpunkt t_0 , d.h. ob eine signifikante Schrumpfung der einzelnen Materialien vorliegt (einseitige Fragestellung).

Die zweite Alternativhypothese ($H_{A,2}$), die besagt, dass Kollagenmatrizes in vivo stärker schrumpfen als der synthetische ETHISORB® Dura Patch, wird mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests geprüft. Dieser Test untersucht den Unterschied zwischen 2 unabhängigen Stichproben, also in dieser Arbeit zwischen den medianen Patchlängen in den einzelnen Versuchsreihen zu den definierten Endpunkten t_1 bzw. t_2 . Zunächst wurde getestet, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den kollagenen Matrizes vorliegt (zweiseitige Fragestellung). Im zweiten Schritt wurde separat geprüft, ob der synthetische ETHISORB® Dura Patch signifikant weniger stark schrumpft als der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft, der Chondro-Gide® und der TUTOPATCH® (einseitige Fragestellung). Außerdem werden der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft, der Chondro-Gide® und der TUTOPATCH® einer gemeinsamen Stichprobe zu geordnet, weil diese 3 Materialien kollagenen Ursprungs sind, und ebenfalls mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests dem synthetischen Zellträgermaterial gegenübergestellt (einseitige Fragestellung).

2.4.8 Mikroskopische Analyse und histomorphologische Auswertung

Die mikroskopische Analyse der vorliegenden Arbeit untersucht das regenerative Potenzial der ausgewählten Materialien für Dünndarmgewebe. Nach Abschluss der makroskopischen Analyse wurden die Proben in Formalin fixiert und nach histotechnischer Aufbereitung mikroskopisch begutachtet (Olympus BH-2). Bei der primären Begutachtung der Präparate einer Versuchsreihe wurde eine Selektion an geeigneten Präparaten vorgenommen, um Präparate mit geeigneter Schnittebene zu identifizieren, bei der beide Anastomosenbereiche und die Matrix mit dem Mukosaregenerat vollständig abgebildet waren.

Ein erfahrener Pathologe unterstützte die deskriptive Auswertung der Präparate. Die Befunddokumentation wurde mit einem Fotomikroskop (Axiocam für Axiophot) mit entsprechender bildverarbeitender Software (AxioVision) digital vorgenommen.

Die Begutachtung der Präparate zeigte, dass unabhängig vom spezifischen Zellträgermaterial die Regeneration von Dünndarmmukosa gemeinsamen Prinzipien folgt. Die grundlegenden Abläufe bei der Etablierung von Dünndarmgewebe *in vivo* auf einer Matrix werden im ersten Schritt detailliert beschrieben (vgl. 3.2.1).

Das vorrangige Ziel ist es die Gesamtmorphologie der regenerierten Dünndarmmukosa qualitativ über eine Versuchsreihe hinweg zu erfassen. Dazu wurden ausgewählte Präparate zu den Zeitpunkten $t_1 = 30$ Tage und $t_2 = 60$ Tage systematisch analysiert. Im ersten Schritt wurden die angewendeten Zellträgermaterialien mikroskopisch beschrieben. Die Darstellung ihrer Faserstrukturen im zweidimensionalen Abbild sowie deren morphologische Veränderungen zwischen den gewählten Endpunkten wurden differenziert herausgearbeitet. Außerdem wurden die Präparate auf etwaige immunologische Reaktionen seitens des Empfängerorganismus untersucht, indem immunologische Zellen identifiziert wurden.

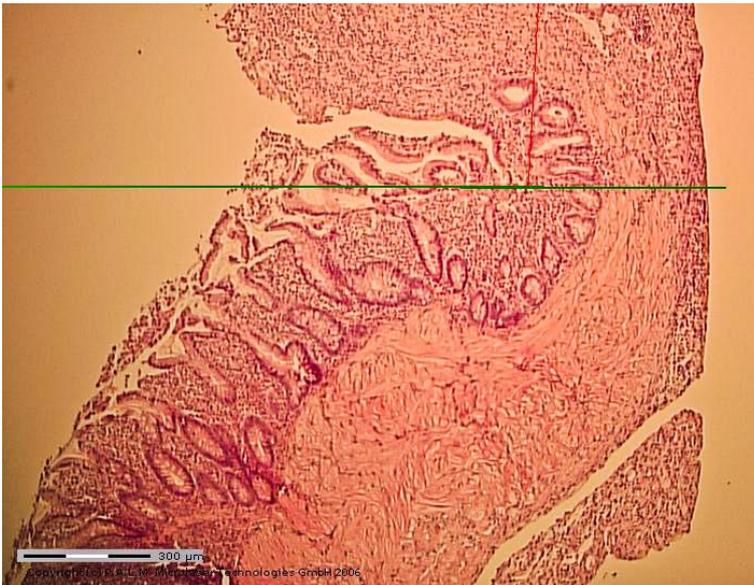


Abb. 14 Markierung des Übergangs (grüne Linie) von nativer Mukosa zu Neomukosa am Beispiel des Präparats SIS43.

Im zweiten Schritt wurde die Mukosamorphologie analysiert. Als mikroskopischer Übergang von nativer zu regenerierter Darmmukosa, wurde das Ende der querverlaufenden Ringmuskelschicht definiert (vgl. Abb. 14). Die histomorphologischen Charakteristika der Dünndarmmukosa sind das einschichtige Zylinderepithel mit Mikrovilli, die Krypten und Zotten ausbilden, die Lamina propria sowie die Muscularis mucosae (vgl. 1.2).

Für die dritte Nullhypothese ($H_{0,3}$) wurde festgelegt, dass kein Unterschied zwischen den verwendeten Materialien hinsichtlich ihres regenerativen Potenzials erkennbar ist. Als Alternativhypothese ($H_{A,3}$) gilt, dass die auf Kollagen basierenden Zellträgermaterialien, der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft, der Chondro-Gide® und der TUTOPATCH® über ein größeres Potenzial zur Dünndarmregeneration verfügen, als der synthetischen ETHISORB® Dura Patch.

Um diese Hypothesen zu testen, wurden Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsreihen hinsichtlich des regenerativen Potenzials der Materialien für Dünndarmmukosa demonstriert. Dies erfolgte durch eine qualitative Deskription und differenzierte Gegenüberstellung der Histomorphologie der Neomukosa in den Versuchsreihen. Individuelle Besonderheiten in den Präparaten wurden hervorgehoben. Zur Unterstützung der mikroskopischen Analyse wurden folgende morphologische Zielparameter definiert, evaluiert und miteinander verglichen:

Epithelialisierung der Patchoberfläche:

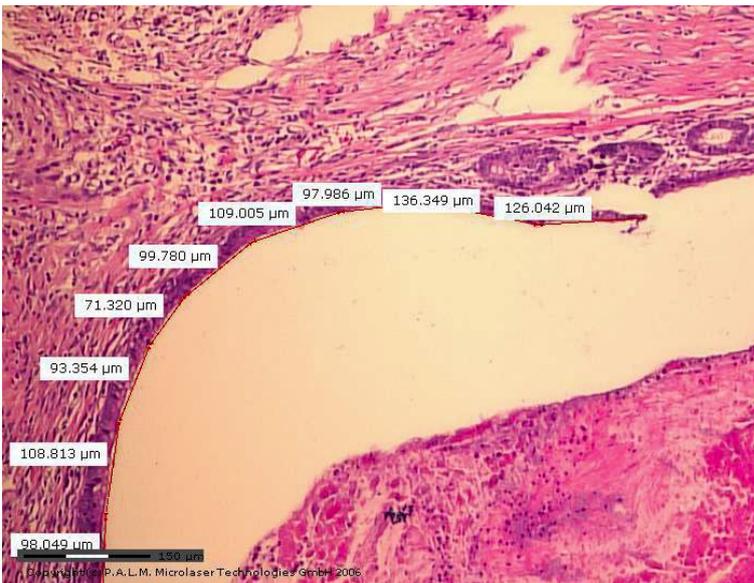


Abb. 15 Messung der Länge des einschichtigen Epithels auf der Patchoberfläche am Beispiel des Präparats ET81.

Bei der Regeneration von Darmmukosa breitet sich ausgehend von der nativen Mukosa in den Anastomosenbereichen ein einschichtiges Oberflächenepithel auf der luminalen Seite der Zellträgermaterialien aus. Im zweidimensionalen Abbild bei der Lichtmikroskopie wird die Länge dieser Epithelschicht, gemessen (vgl. Abb. 15).

Länge und maximale Tiefe der Neomukosa:

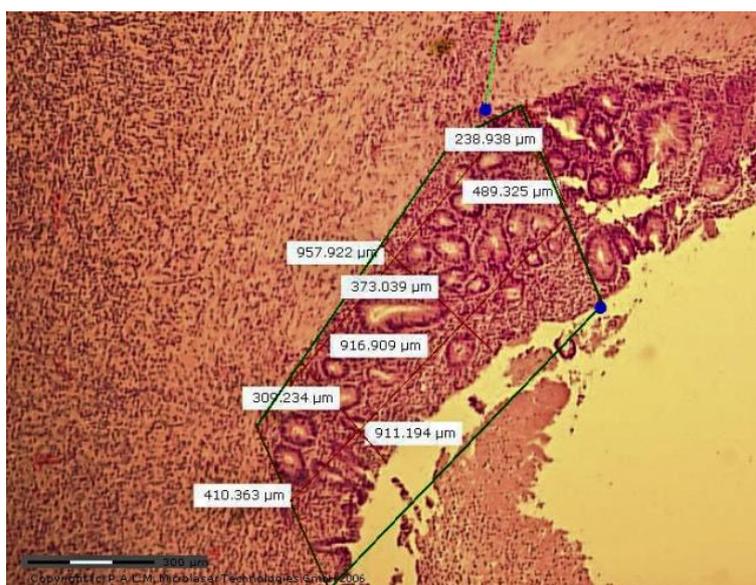


Abb. 16 Messung der Länge und der maximalen Tiefe der Neomukosa auf der Matrix am Beispiel des Präparats TU42.

Ein morphologisches Charakteristikum nativer Dünndarmmukosa sind Krypten mit regelrechter Architektur. Sie stellen sich in der zweidimensionalen Lichtmikroskopie als tubuläre Epithelkonfigurationen in der Lamina propria dar. Ihre Regeneration auf dem Patch in horizontaler und vertikaler Ebene wurde vermessen. Dadurch ist es möglich die Breite und Länge der Neomukosa zu bestimmen (vgl. Abb.

16).

Außerdem wurde die Anzahl der Krypten pro Anastomose ausgezählt, sowie die Anzahl von deutlich ausgebildeten Zotten im Gesamtpräparat bestimmt.

Die Vermessung und Befunddokumentation der Daten wurde an einem inversen Mikroskop (Axiovert 200M) mit Kamerasystem und mikroskopischer Vermessungssoftware (P.A.L.M. Robo Software 3.2) durchgeführt.

Eine Signifikanzanalyse der Ergebnisse dieser Zielparameter wurde nicht vorgenommen, weil die Anzahl an Präparaten und verwertbarer Schnittbilder zu gering war. Sie dienten allein der präziseren Beschreibung der ausgewählten Präparate und der besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchsreihen.

Eine tabellarische Übersicht der erhobenen Daten befindet sich im Anhang (vgl. 7.2).

3. ERGEBNISSE

3.1 Biomechanische Stabilität

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analyse hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften der Materialien dargestellt. Von Interesse ist, ob die verschiedenen Materialien *in vivo* schrumpfen und ob ein Unterschied zwischen den Versuchsreihen erkennbar ist. Für jede verwendete kollagene oder synthetische Matrix wurde eine Versuchsreihe angelegt. Insgesamt gibt es 4 Versuchsreihen mit je 8 Einzelexperimenten. Zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ Tage wurden pro Versuchsreihe 8 Patches mit einer Länge von 20 mm in je einen Rattendarm interponiert (vgl. 2.4.4). Nach einer Regenerationsdauer von $t_1 = 30$ Tagen und $t_2 = 60$ Tagen wurden jeweils 4 Präparate entnommen und deren Länge gemessen.

3.1.1 Surgisis® 4-Layer Tissue Graft

In der Versuchsreihe mit dem Surgisis® 4-Layer Tissue Graft zeigt sich eine Besonderheit gegenüber den anderen Materialien. Nach der Eröffnung des Abdomens und Darstellung der ausgeschalteten Jejunalschlinge mit der Matrix, konnten die Regenerate makroskopisch nicht vom nativen Darmgewebe abgegrenzt und daher deren Länge weder nach 30 noch nach 60 Tagen bestimmt werden.

In den Präparaten SIS42, SIS43 und SIS44, die zum Zeitpunkt $t_1 = 30$ Tage entnommen wurden, zeigten sich nach longitudinaler Eröffnung des Lumens im vermuteten Patch-tragenden Bereich, Rückstände der Matrix. Diese waren intraluminal gelegen und weiterhin in tubularisierter Form vorhanden.

In dem Präparat SIS41 und den Präparaten, die nach $t_2 = 60$ Tagen entnommen wurden (SIS81, SIS82, SIS83, SIS84) waren keine Rückstände von Fremdmaterial nachweisbar.

3.1.2 Chondro-Gide®

In allen 4 Präparaten, die nach 30 Tagen entnommen wurden, konnte der Patch aufgefunden und vermessen werden. Die Präparate waren zwischen 3 und 16 mm lang. Dies entspricht 15 bis 80 % der Ausgangslänge. Der Median (\bar{x}_{t_1}) der Patchlängen beträgt zu diesem Zeitpunkt 5,5 mm. Bei der mittleren Hälfte der Präparate ($Q_{0,75} - Q_{0,25}$) liegt die Patchlänge in einem Bereich von 3,5 bis 13,5 mm. Das heißt der Chondro-Gide®-Patch ist nach 30 Tagen um 32,5 bis 82,5 % ($\bar{x}_{t_1} = 72,5 \%$) geschrumpft.

Zum Zeitpunkt t_2 konnten beim Chondro-Gide®-Patch 3 von 4 Präparate vermessen werden. Bei der Entnahme des Präparates CH82 konnte kein Regenerat identifiziert und daher die Zellmatrix auch nicht vermessen werden.

Für die anderen 3 Präparate wird eine Restlänge von 7 bis 15 mm (35 bis 75 % der Ausgangslänge) gemessen. Der Median (\bar{x}_{t_2}) beträgt 7 mm. Nach 60 Tagen Regenerationszeit ist der Patch demnach zwischen 25 und 65 % ($\bar{x}_{t_2} = 65\%$) geschrumpft (vgl. Tab. 4).

Tab. 4 Makroskopische Auswertung der Versuchsreihe mit dem Chondro-Gide® -Patch

Präparat	Zeitpunkt t_0 (nach 0 Tagen)		Zeitpunkt t_1 (nach 30 Tagen)		Zeitpunkt t_2 (nach 60 Tage)	
	Länge	Prozent der Ausgangslänge	Länge	Prozent der Ausgangslänge	Länge	Prozent der Ausgangslänge
	(in mm)	(in %)	(in mm)	(in %)	(in mm)	(in %)
CH41	20	100	6	30		
CH42	20	100	3	15		
CH43	20	100	5	25		
CH44	20	100	16	80		
CH81	20	100			15	75
CH82	20	100			-	-
CH83	20	100			7	35
CH84	20	100			7	35
Median (\bar{x})	20,00	100,00	5,50	27,50	7,00	35,00
Minimum (min)	20,00	100,00	3,00	15,00	7,00	35,00
Maximum (max)	20,00	100,00	16,00	80,00	15,00	75,00
75. Perzentil ($Q_{0,75}$)	20,00	100,00	13,50	67,50	15,00	75,00
25. Perzentil ($Q_{0,25}$)	20,00	100,00	3,50	17,50	7,00	35,00
Interquartilsabstand (IQR)	0,00	0,00	10,00	50,00	8,00	35,00
Anzahl Präparate (n)		8		4		3

3.1.3 TUTOPATCH®

Nach 30 Tagen In-vivo-Regenerationsdauer konnten aus 3 von 4 Versuchstieren Präparate entnommen und vermessen werden. Im Präparat TU44 konnte kein Regenerat identifiziert werden.

In den anderen 3 Präparaten zeigt sich eine Restlänge der tubularisierten Matrix von 13 bis 15 mm. Die mediane Länge (\bar{x}_{t_1}) beträgt nach 30 Tagen 15 mm. Das entspricht 75 % der Ausgangslänge. Demnach ist der Patch auf 25 bis 35 % ($\bar{x}_{t_1} = 25 \%$) seiner Ausgangslänge geschrumpft.

Nach einer Regenerationszeit von 60 Tagen konnten alle 4 Präparate vermessen werden. Im Median (\bar{x}_{t_2}) beträgt die Länge der Matrizes 5 mm (25 % der Ausgangslänge) bei einem Minimum (min) von 3 mm und einem Maximum (max) von 10 mm der Restlänge. Im mittleren Quantil ($Q_{0,75} - Q_{0,25}$) zeigt sich eine Schrumpfung auf 3,25 bis 9 mm. Dies entspricht einem Verlust von 55 bis 83,75 % ($\bar{x}_{t_2} = 75 \%$) der Ausgangslänge zum Zeitpunkt t_2 (vgl. Tab. 5).

Tab. 5 Makroskopische Auswertung der Versuchsreihe mit dem TUTOPATCH®

Präparat	Zeitpunkt t_0 (nach 0 Tagen)		Zeitpunkt t_1 (nach 30 Tagen)		Zeitpunkt t_2 (nach 60 Tage)	
	Länge	Prozent der Ausgangslänge	Länge	Prozent der Ausgangslänge	Länge	Prozent der Ausgangslänge
	(in mm)	(in %)	(in mm)	(in %)	(in mm)	(in %)
TU41	20	100	15	75		
TU42	20	100	15	75		
TU43	20	100	13	65		
TU44	20	100	-	-		
TU81	20	100			10	50
TU82	20	100			4	20
TU83	20	100			3	15
TU84	20	100			6	30
Median (\bar{x})	20,00	100,00	15,00	75,00	5,00	25,00
Minimum (min)	20,00	100,00	13,00	65,00	3,00	15,00
Maximum (max)	20,00	100,00	15,00	75,00	10,00	50,00
75. Perzentil ($Q_{0,75}$)	20,00	100,00	15,00	75,00	9,00	45,00
25. Perzentil ($Q_{0,25}$)	20,00	100,00	13,00	65,00	3,25	16,25
Interquartilsabstand (IQR)	0,00	0,00	2,00	10,00	5,75	28,75
Anzahl Präparate (n)		8		3		4

3.1.4 ETHISORB® Dura Patch

In allen 4 Präparaten, die nach 30 Tagen entnommen wurden, konnte die Patchlänge evaluiert werden. Die Länge beträgt zwischen 15 und 19 mm. Dies entspricht 75 bis 95 % der Ausgangslänge. Im Median (\bar{x}_{t_2}) ist der synthetische Patch auf 17,5 mm geschrumpft. Nach 30 Tagen entspricht dieses Ergebnis einer Schrumpfung im mittleren Quantil ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$) von 1,25 bis 4,5 mm und im Median (\bar{x}_{t_1}) von 2,5 mm (12,5 %).

Nach 60 Tagen konnten in dieser Versuchsreihe die Längen von 3 der 4 entnommenen Präparate evaluiert werden. Bei der Entnahme des Präparates ET82 war kein Patchmaterial identifizierbar und konnte daher nicht vermessen und ausgewertet werden.

Die Restlänge beträgt zwischen 10 bis 14 mm mit einem Median von 10 mm ($\bar{x}_{t_2} = 50\%$ der Ausgangslänge). Damit ergibt sich für den mittleren quantilen Längenverlust 30 bis 50 % nach 60 Tagen (vgl. Tab. 6).

Tab. 6 Makroskopische Auswertung der Versuchsreihe mit dem ETHISORB® Dura Patch

Präparat	Zeitpunkt t_0 (nach 0 Tagen)		Zeitpunkt t_1 (nach 30 Tagen)		Zeitpunkt t_2 (nach 60 Tage)	
	Länge	Prozent der Ausgangslänge	Länge	Prozent der Ausgangslänge	Länge	Prozent der Ausgangslänge
	(in mm)	(in %)	(in mm)	(in %)	(in mm)	(in %)
ET41	20	100	19	95		
ET42	20	100	17	85		
ET43	20	100	18	90		
ET44	20	100	15	75		
ET81	20	100			14	70
ET82	20	100			-	-
ET83	20	100			10	50
ET84	20	100			10	50
Median (\bar{x})	20,00	100,00	17,50	87,50	10,00	50,00
Minimum (min)	20,00	100,00	15,00	75,00	10,00	50,00
Maximum (max)	20,00	100,00	19,00	95,00	14,00	70,00
75. Perzentil ($Q_{0,75}$)	20,00	100,00	18,75	93,75	14,00	70,00
25. Perzentil ($Q_{0,25}$)	20,00	100,00	15,50	77,50	10,00	50,00
Interquartilsabstand (IQR)	0,00	0,00	3,50	16,25	4,00	20,00
Anzahl Präparate (n)		8		4		3

3.1.5 In-vivo-Schrumpfung der einzelnen Materialien

Die deskriptive Auswertung der einzelnen Versuchsreihen zeigt für alle verwendeten Materialien mit Ausnahme des Surgisis® 4-Layer Tissue Graft eine Schrumpfung der Regenerate mit zunehmender Regenerationsdauer. In keiner Versuchsreihe wird eine Zunahme der Patchlänge registriert. Anhand nichtparametrischer Testverfahren für verbundene Stichproben wurde geprüft, ob die In-vivo-Schrumpfung bei den einzelnen Materialien signifikant ist.

Mit dem Friedman-Test ist ein signifikanter Unterschied zwischen den medianen Patchlängen nach 0, 30 und 60 Tagen in den Versuchsreihen mit dem TUTOPATCH® und ETHISORB® Dura Patch und damit eine signifikante Schrumpfung dieser beiden Materialien nachweisbar ($p = 0,028$ in beiden Versuchsreihen). In der Versuchsreihe mit dem Chondro-Gide® ist kein signifikanter Unterschied im Friedman-Test festzustellen ($p = 0,194$; vgl. Tab. 7).

Tab. 7 Signifikanzprüfung der Unterschiede in der medianen Patchlänge in den einzelnen Versuchsreihen mit dem Friedmann-Test

Versuchsreihe	Mediane Patchlänge (in mm)			p
	t ₀	t ₁	t ₂	
Chondro-Gide®	20,00	5,50	7,00	0,194
TUTOPATCH®	20,00	15,00	5,00	0,028
ETHISORB® Dura Patch	20,00	17,50	10,00	0,028

Mit dem Wilcoxon-Test wurde separat geprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Patchlängen zum Zeitpunkt t₀ und t₁ bzw. t₀ und t₂ in den Versuchsreihen vorliegt. Es zeigt sich in keiner Versuchsreihe ein signifikanter Unterschied (vgl. Tab. 8). Ein deutlicher Trend, der für eine Schrumpfung spricht, ist sowohl beim Chondro-Gide® als auch beim ETHISORB® Dura Patch zwischen Tag 0 und Tag 30 ($p = 0,063$) und beim TUTOPATCH® zwischen Tag 0 und Tag 60 erkennbar ($p = 0,063$).

Tab. 8 Signifikanzprüfung der Unterschiede in der medianen Patchlänge zu beiden Endpunkten in den einzelnen Versuchsreihen mit dem Wilcoxon-Test

Versuchsreihe	Mediane Patchlänge (in mm)			p	Mediane Patchlänge (in mm)			p
	t ₀	t ₁			t ₀	t ₂		
	Chondro-Gide®	20,00	5,50		0,063	20,00	7,00	
TUTOPATCH®	20,00	15,00	0,125	20,00	5,00	0,063		
ETHISORB® Dura Patch	20,00	17,50	0,063	20,00	10,00	0,125		

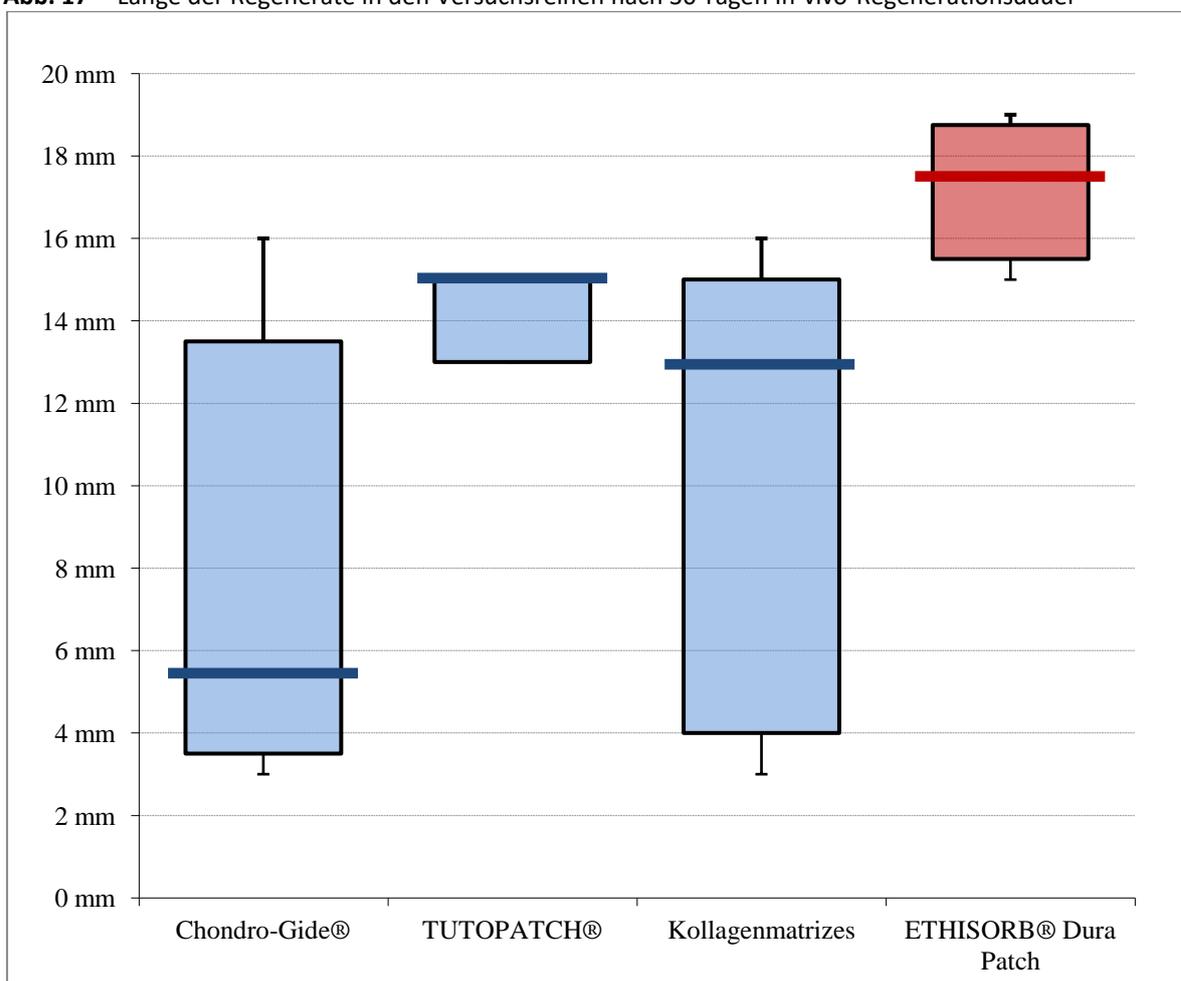
Folglich wird für die Versuchsreihe mit dem TUTOPATCH® und dem ETHISORB® Dura Patch die erste Nullhypothese (H_{0,1}) verworfen, die besagt, dass die Materialien nicht schrumpfen, da beide Materialien eine signifikante In-vivo-Schrumpfung aufweisen. Für die Versuchsreihe mit dem Chondro-Gide® wird H_{0,1} beibehalten.

3.1.6 Unterschiede zwischen biogenen und synthetischen Materialien

Folgende Boxplots zeigen eine Gegenüberstellung der Patchlängen in den verschiedenen Versuchsreihen zu den Endpunkten an Tag 30 und Tag 60. Diese weisen den Median (\tilde{x}_t), das 25. Perzentil ($Q_{0,25}$) und das 75. Perzentil ($Q_{0,75}$) aus. Die Spannweitenlinien beschreiben die Minima (min) und Maxima (max) in einer Versuchsreihe. Kollagene Matrizes werden blau dargestellt und die synthetische Matrix ist rot gekennzeichnet. Der Boxplot für „Kollagenmatrizes“ fasst die Daten aus den Versuchsreihen mit dem Chondro-Gide®-Patch und dem TUTOPATCH® zusammen. Beide bestehen zu einem vergleichbaren Anteil aus Kollagen Typ I und Typ III (vgl. 2.3.1.2 und 2.3.1.3).

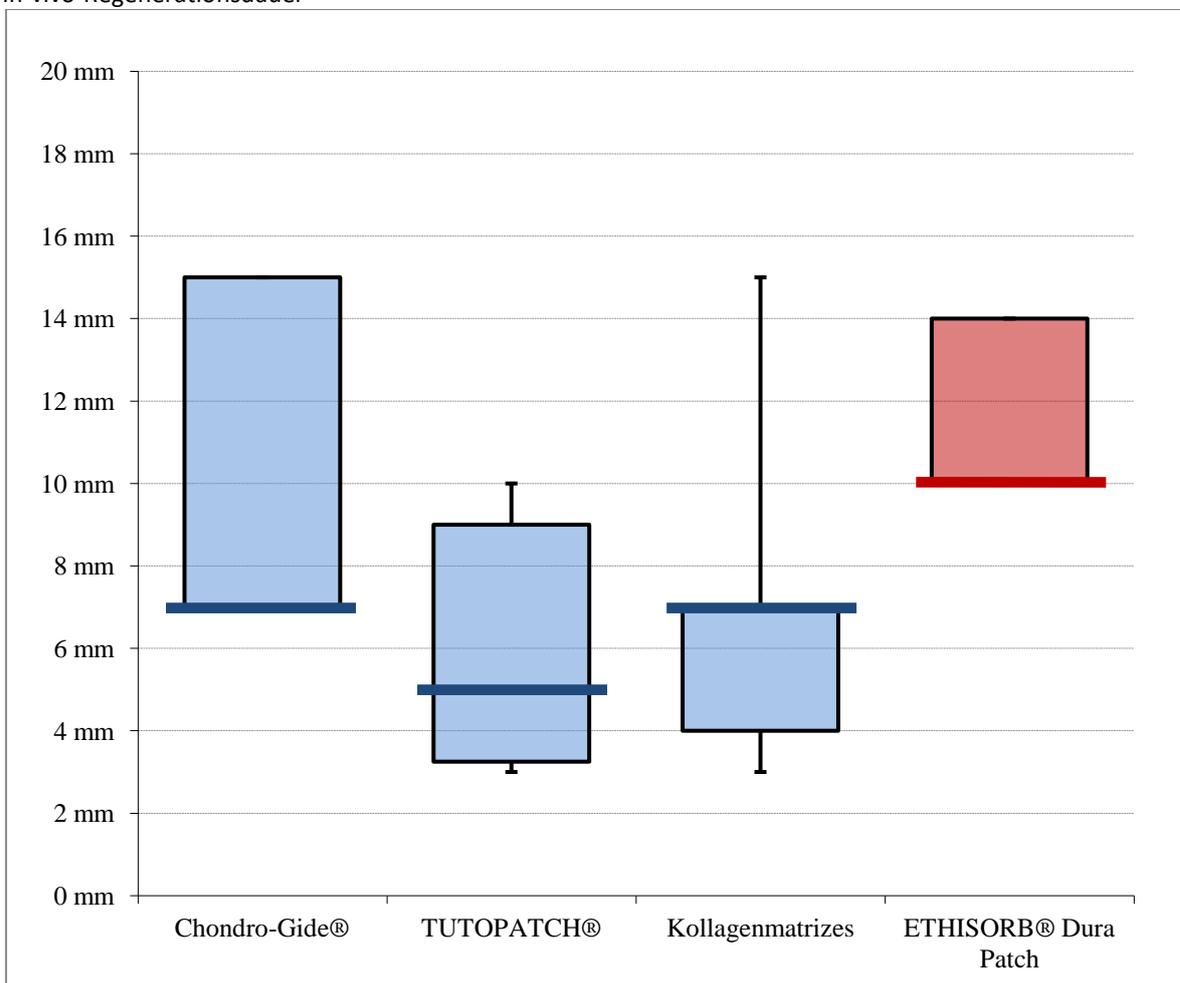
Anhand der Boxplots ist ersichtlich, dass bei allen Präparaten eine Schrumpfung der Matrix, deren Ausgangslänge 20 mm betrug, festzustellen ist. Mit Hilfe des Friedman-Tests konnte für den TUTOPATCH® und den ETHISORB® Dura Patch eine signifikante Schrumpfung nachgewiesen werden. Für den Chondro-Gide®-Patch ist eine Tendenz zur Schrumpfung zwischen Tag 0 und Tag 30 ersichtlich. In keinem Fall ist eine Verlängerung des Matrixsegments zu beobachten.

Abb. 17 Länge der Regenerate in den Versuchsreihen nach 30 Tagen In-vivo-Regenerationsdauer



Es zeigt sich, dass der Chondro-Gide®-Patch nach 30 Tagen im Median am stärksten schrumpft. Es besteht nur noch ca. ein Viertel ($\tilde{x}_{t_1} = 27,5 \%$) der primären Länge. Dagegen bestehen beim TUTOPATCH® im Median noch 3 Viertel ($\tilde{x}_{t_1} = 75 \%$) der Ausgangslänge. Zusammengenommen schrumpfen die Kollagenmatrizes im Median zum Zeitpunkt t_1 um 35 %, d. h. es besteht noch ca. 2 Drittel der Ausgangslänge ($\tilde{x}_{t_1} = 13 \text{ mm}$). Die geringste Verkürzung nach 30 Tagen Regenerationsdauer ist beim synthetischen ETHISORB® Dura Patch zu erkennen. Im Median kann noch 17,5 mm (87,5 %) der Patchlänge nachgewiesen werden (vgl. Abb. 17).

Abb. 18 Erhaltene Patchlänge in den einzelnen Versuchsreihen nach 60 Tagen In-vivo-Regenerationsdauer



Auch 60 Tage nach Implantation ist beim ETHISORB® Dura Patch im Median die geringste Schrumpfung zu verzeichnen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsreihen sind zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht mehr so deutlich: Der ETHISORB® Dura Patch hat im Median noch eine Restlänge von 10 mm ($\tilde{x}_{t_1} = 50 \%$). Im Vergleich dazu beträgt die erhaltene Patchlänge bei den Kollagenmatrizes zum selben Zeitpunkt noch 7 mm. Das entspricht einer Schrumpfung um ca. 2 Drittel ($\tilde{x}_{t_1} = 65 \%$).

Beim TUTOPATCH® ist zum selben Zeitpunkt der größte Längenverlust festzustellen. Im Median bestehen lediglich noch 5 mm. Das entspricht einem Viertel der Ausgangslänge. In der Versuchsreihe mit dem Chondro-Gide®-Patch zeigt sich ein unerwartetes Ergebnis: Nach einer Dauer von 60 Tagen ist die mediane Restlänge größer ($\bar{x}_{t1} = 7 \text{ mm}$) als nach 30 Tagen Regenerationsdauer ($\bar{x}_{t2} = 5,5 \text{ mm}$; vgl. Abb. 18).

Die deskriptiven Untersuchungen machen deutlich, dass der synthetische ETHISORB® Dura Patch zu beiden zeitlichen Endpunkten im Median eine geringere Schrumpfung aufweist als die kollagenen Matrizes. Mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests, ein nichtparametrischer Test für unverbundene Stichproben, wurde geprüft, ob diese Unterschiede signifikant sind und damit die zweite Nullhypothese getestet, die davon ausgeht, dass kein Zusammenhang zwischen der Schrumpfung und den verwendeten Zellträgermaterialien existiert.

Zwischen den Versuchsreihen mit dem Chondro-Gide®-Patch und dem TUTOPATCH®, die beide aus biogenem Ursprung sind und zum Großteil aus Kollagen bestehen, kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Längen der Matrizes sowohl nach 30 als auch nach 60 Tagen Regenerationsdauer festgestellt werden ($p_{t1} = 0,343$, $p_{t2} = 0,2$; vgl. Tab. 9). Infolgedessen werden die Resultate der beiden Kollagenmatrizes zusammengefasst und mit dem synthetischen ETHISORB® Dura Patch verglichen (vgl. Abb. 17 und 18).

Die Gegenüberstellung der Boxplots spricht für eine deutlich geringere Schrumpfung des synthetischen Materials. Während an Tag 30 die kollagenen Matrizes im Median um 35 % ihrer Ausgangslänge geschrumpft sind, ist der ETHISORB® Dura Patch lediglich um 12,5 % geschrumpft. Anhand des Mann-Whitney-U-Tests zeigt sich eine signifikant geringere Schrumpfung ($p_{t1} = 0,012$) der medianen Patchlänge des synthetischen Zellträgermaterials nach 30 Tagen Regenerationsdauer im Vergleich zu den Kollagenmatrizes. An Tag 60 zeigen die kollagenen Matrizes im Median eine Restlänge von 7 mm und der ETHISORB® Dura Patch von 10 mm. Zu diesem Endpunkt ist keine signifikante Schrumpfung im selben Test nachweisbar, jedoch ist ein Trend erkennbar, der für eine geringe Schrumpfung des synthetischen Materials spricht ($p_{t2} = 0,092$; vgl. Tab. 9).

Auch der Vergleich der einzelnen Versuchsreihen spricht für eine geringere Schrumpfung des synthetischen Materials: Der ETHISORB® Dura Patch hat eine signifikant geringere Schrumpfung als der Chondro-Gide® zum Zeitpunkt t_1 ($p = 0,029$). Zum Zeitpunkt t_2 ist kein Unterschied zwischen diesen Versuchsreihen ersichtlich ($p = 0,3$). Zwischen den Versuchsreihen mit dem ETHISORB® Dura Patch und dem TUTOPATCH® ist zu beiden zeitlichen Endpunkten ein Trend erkennbar, der für eine geringere Schrumpfung des ETHISORB® Dura Patch spricht ($p = 0,086$; vgl. Tab. 9).

Tab. 9 Signifikanzprüfung der Unterschiede in der medianen Patchlänge zwischen den verschiedenen Versuchsreihen nach 30 und 60 Tagen mit dem Mann-Whitney-U-Test

Versuchsreihen	Mediane Patchlänge (in mm) nach $t_1 = 30$ Tagen		Mediane Patchlänge (in mm) nach $t_2 = 60$ Tagen	
		p		p
Chondro-Gide® TUTOPATCH®	5,50 15,00	0,343	7,00 5,00	0,2
ETHISORB® Dura Patch Chondro-Gide®	17,50 5,50	0,029	10,00 7,00	0,3
ETHISORB® Dura Patch TUTOPATCH®	17,50 15,00	0,086	10,00 5,00	0,086
Synthetisch Matrix Kollagenmatrix	17,50 13,00	0,012	10,00 7,00	0,092

Als Resultat dieser Analyse wird die zweite Nullhypothese für Materialien aus biogenem Ursprung beibehalten, weil zwischen den Versuchsreihen mit der Chondro-Gide®-Matrix und dem TUTOPATCH® kein signifikanter Unterschied festgestellt wird. Kollagene Matrices zeigen ein vergleichbares Ausmaß der Schrumpfung.

Im Gegensatz dazu wird für den Vergleich zwischen kollagenen und synthetischen Materialien die zweite Alternativhypothese angenommen: Der synthetische ETHISORB® Dura Patch weist eine geringere Schrumpfung als die Kollagenmatrices auf.

3.2 Dünndarmregeneration

Die Auswertung der mikroskopischen Ergebnisse ist rein deskriptiv. Im Folgenden wird die Histologie der gewonnenen Proben beschrieben und an Hand von Abbildungen veranschaulicht, die sich am Ende des jeweiligen Kapitels befinden. Die zu Grunde liegenden Daten sind im Anhang zu finden (vgl. 7.2). Bevor auf die Unterschiede im Hinblick auf die Regeneration von Dünndarmmukosa auf den verschiedenen Materialien eingegangen wird, werden deren Gemeinsamkeiten herausgearbeitet, da sich gezeigt hat, dass die Regeneration von Darmgewebe, unabhängig von dem verwendeten Trägermaterial, nach einem gemeinsamen Prinzip verläuft.

3.2.1 Gemeinsame Prinzipien der Regeneration von Dünndarmmukosa

In der mikroskopischen Übersichtsaufnahme lassen sich zunächst 3 Anteile im Präparat voneinander abgrenzen: Die Zellmatrix stellt sich als homogener Komplex in der Bildmitte dar und grenzt mit beiden Enden an native Dünndarmmukosa (vgl. Abb. 19). Diese ist anhand des typischen histologischen Aufbaus (Mukosa, Submukosa und Muskularis) deutlich zu erkennen (vgl. 1.2).

Während die Mukosa sich in unterschiedlichem Ausmaß auf dem Patch neu entwickelt hat, zeigt die Muskularis mit ihrer zirkulären und longitudinalen Ausrichtung kein Regenerat in den ausgewerteten Präparaten. Das Ende der Muskelschicht wurde deshalb als Übergang von nativer Darmmukosa zu Patchgewebe definiert (vgl. Abb. 20). Die Mukosa stellt sich ab diesem Punkt morphologisch unreifer dar (vgl. Abb. 21).

Der azelluläre Matrixkomplex selbst präsentiert sich mikroskopisch je nach verwendetem Material unterschiedlich. Allen gemeinsam ist, dass sich nach den Regeln der Wundheilung im Anschluss an eine Entzündungsreaktion, als Folge einer mechanischen Schädigung des Gewebes, zunächst ein Granulationsgewebe auf der Zellmatrix etabliert (vgl. 1.3). Neutrophile Granulozyten und Makrophagen sind Ausdruck der resorptiven Phase. Die Bildung von Granulationsgewebe durch Proliferation von Kapillaren und Fibroblasten, die Kollagen synthetisieren, leitet die Reparatur ein.

Kollagene Matrizes stellen sich lichtmikroskopisch anders dar, als der synthetische ETHISORB® Dura Patch. Das Kollagen ist anhand homogen gefärbter, eosinophiler Fasern zwischen den Zellkernen zu erkennen (vgl. Abb. 22). Der ETHISORB® Dura Patch zeigt hingegen eine gröbere Struktur mit gräulich gefärbten Filamenten (vgl. Abb. 23) und ist polarisationsoptisch doppelbrechend. Außerdem ist eine Organisation des Fremdmaterials im zeitlichen Verlauf zu beobachten. In manchen Präparaten sind auch floride Entzündungsreaktionen erkennbar, die sich als lokalisierte, granulozytäre Infiltrationen darstellen (vgl. Abb. 24).

Eine wichtige Frage ist, ob es bereits zu Gefäßneubildungen in den Patches gekommen ist; diese tragen wesentlich zur Oxygenierung und Nährstoffversorgung der Neomukosa bei. In allen Präparaten sind Gefäßanschnitte unterschiedlichen Kalibers identifizierbar. Vornehmlich finden sich Kapillaren, die an dem einschichtigen Endothel mit prominenten Zellkernen und Erythrozyten im Lumen zu erkennen sind (vgl. Abb. 25). Seltener zeigen sich auch Arterien mit einer Muskelschicht.

Die Architektur der Neomukosa stellt sich primitiver dar als die nativer Mukosa, differenziert sich jedoch im Verlauf aus. Nach Etablierung von Granulationsgewebe, bildet sich eine geschlossene Epithelschicht, auf der Patchoberfläche; sogenanntes Regeneratepithel (vgl. Abb. 26). Diese nimmt ihren Ursprung an der Anastomose und breitet sich von dort ausgehend auf der luminalen Fläche des Patches aus. Die Zellen der Epithelschicht zeigen entweder Zylinderepithel mit tiefsitzendem ovalem Zellkern oder kubisches Epithel mit rundem Zellkern (vgl. Abb. 27). Bei starker Vergrößerung zeigen sich Mikrovilli auf dem Epithel (vgl. Abb. 28). Diese sind ein wichtiges Kennzeichen für die apikobasale Orientierung der Zellen. Als Zeichen hoher Zellaktivität und Zellteilungsraten sind die Zellkerne des Epithels größer, aufgelockert und weisen helleres Chromatin auf, als das Epithel der nativen Mukosa. Zwischen den Epithelzellen der Lamina epithelialis finden sich bereits Becherzellen, deren Sekret in der PAS-Färbung als große, eosinophil gefärbte Granula zu erkennen ist (vgl. Abb. 29). Diese kommen im Regeneratepithel der Neomukosa deutlich seltener vor und können daher als morphologisches Reifezeichen gewertet werden.

Die typischen histologischen Merkmale der Lamina epithelialis der Mukosa im Dünndarm, sind Krypten und Zotten. Während der Regeneration von Darmmukosa bilden sich zunächst Krypten im Anastomosenbereich aus (vgl. Abb. 30) oder vereinzelt bzw. in kleinen Gruppen an der Patchoberfläche unterhalb des Regeneratepithels (vgl. Abb. 31). Im zeitlichen Verlauf nehmen sie an Zahl und Größe zu (vgl. Abb. 32). Im Vergleich zur nativen Darmmukosa wirken sie auch nach 60 Tagen Regenerationszeit noch unförmig. Sie wachsen unstrukturierter, verzweigen sich stärker, sind nicht streng orthogonal zur Oberfläche ausgerichtet und von weitaus mehr Bindegewebe umgeben (vgl. Abb. 33). Die Lamina epithelialis ist dünner als im nativen Darmgewebe. Bei der zweidimensionalen mikroskopischen Darstellung nativer Rattendarmmukosa des Jejunums, zeigen sich mehrere Schichten von schmalen runden Kryptenanschnitten unterhalb der Zotten, die gemeinsam die Breite der Lamina epithelialis bestimmen (vgl. Abb. 34). Im Bereich der regenerierten Mukosa zeigen sich hingegen selten mehrere Kryptenschichten. Die gesamte Neomukosaarchitektur erscheint aufgrund dieser Unterschiede primitiver.

Zotten sind 30 Tage als auch 60 Tage nach Implantation der Matrix seltener zu finden als Krypten. Auch ihre Morphologie ist unreif. Sie präsentieren sich zumeist als vereinzelte Ausstülpungen der Lamina epithelialis, nachdem sich in ihrer unmittelbaren Umgebung Krypten

ausgebildet haben. Im Gegensatz zu den schlanken und langen Zotten des nativen Jejunums, sind diese deutlich kürzer (vgl. Abb. 35 und Abb. 36).

Generell kann man sagen, dass die Mukosa sich im zeitlichen Verlauf morphologisch verändert und reift. Die Länge des einschichtigen Epithels und damit auch die Oberflächenbedeckung des Patches nehmen zu und Krypten wie auch Zotten vermehren sich. Außerdem wächst die Neomukosa in horizontaler und vertikaler Ebene. Als Ausdruck geringerer Zellteilung und zunehmender morphologischer Reife zeigt sich eine vermehrte Ausbildung von Becherzellen und das Oberflächenepithel enthält weniger Chromatin.

Im Folgenden werden die Unterschiede zwischen den einzelnen Fremdmaterialien deskriptiv herausgearbeitet.

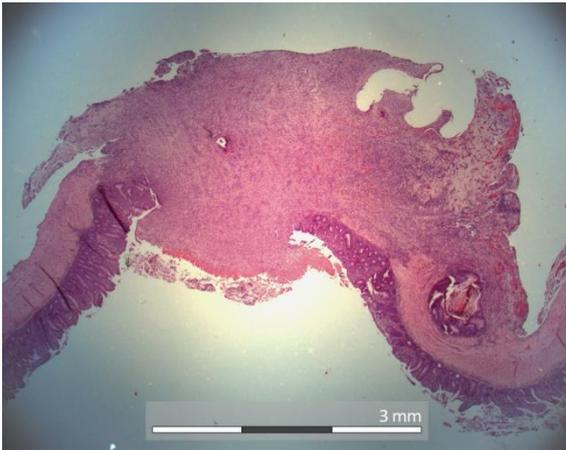


Abb. 19 Übersichtsaufnahme eines Präparats. Die Zellmatrix grenzt beidseits an native Darmmukosa. Regenerationsdauer: 30 Tage, TUTOPATCH®, Präparat: TU42

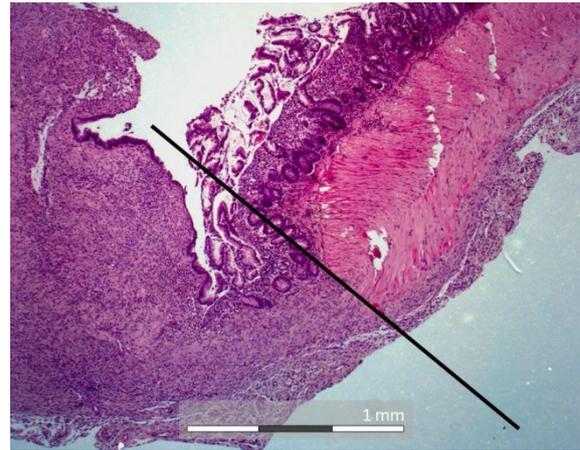


Abb. 20 Übergang von nativer Darmmukosa zu Neomukosa auf der Matrix, erkennbar am Abbruch der Muskularis. Regenerationsdauer: 30 Tage, Surgisis® 4-Layer Tissue Graft, Präparat: SIS43

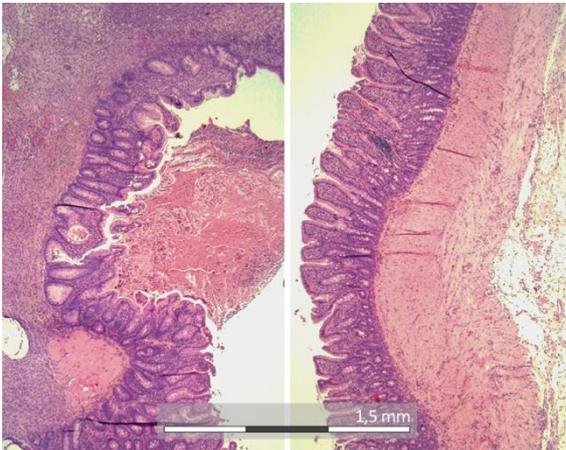


Abb. 21 Vergleich unreifer Neo - Mukosa (links) mit reifer nativer Mukosa (rechts). Regenerationsdauer: 60 Tage, Chondro-Gide®, Präparat: CH84

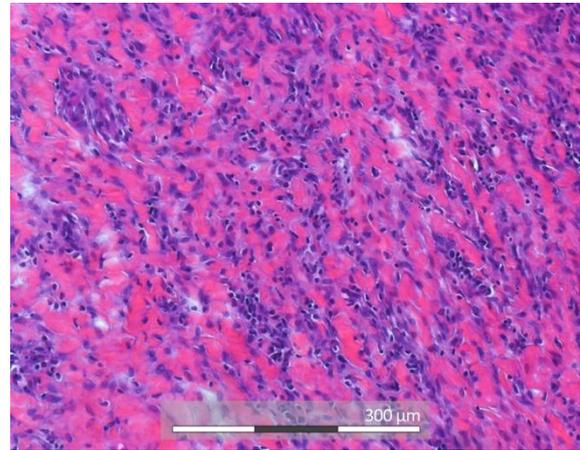


Abb. 22 Infiltration der Matrix mit Fibroblasten. Das Matrixkollagen als eosinophile Fasern liegt zwischen den blau gefärbten Zellkernen. Regenerationsdauer: 60 Tage, Surgisis® 4-Layer Tissue Graft, Präparat: SIS81

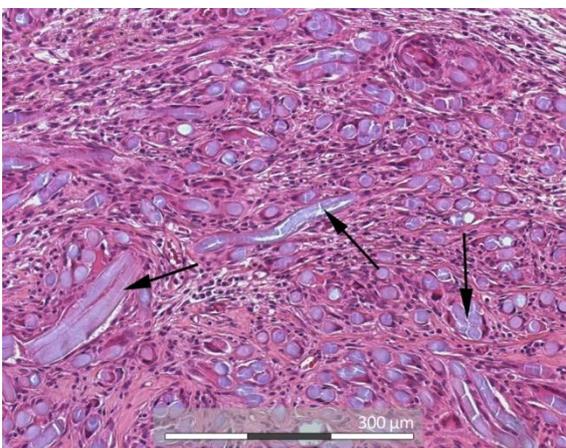


Abb. 23 Dicke, graue Faseranschnitte als Korrelat des synthetischen ETHISORB® Dura Patches. Regenerationsdauer: 30 Tage, ETHISORB® Dura Patch, Präparat: ET44

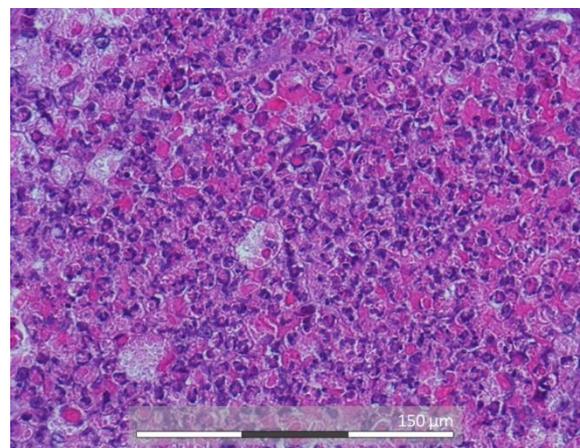


Abb. 24 Lokalisiertes Anhäufungen neutrophiler Granulozyten als Zeichen florider Entzündungsreaktionen. Regenerationsdauer: 30 Tage, Chondro-Gide®, Präparat: CH44

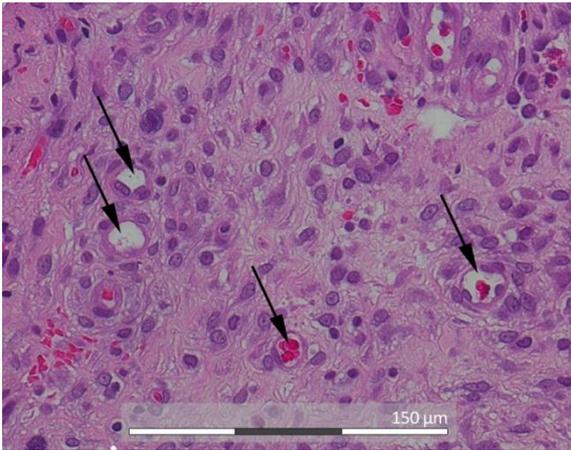


Abb. 25 Mehrere Gefäßanschnitte als Zeichen der Angiogenese auf dem Patch.
Regenerationszeit: 30 Tage, Chondro-Gide®,
Präparat: CH42

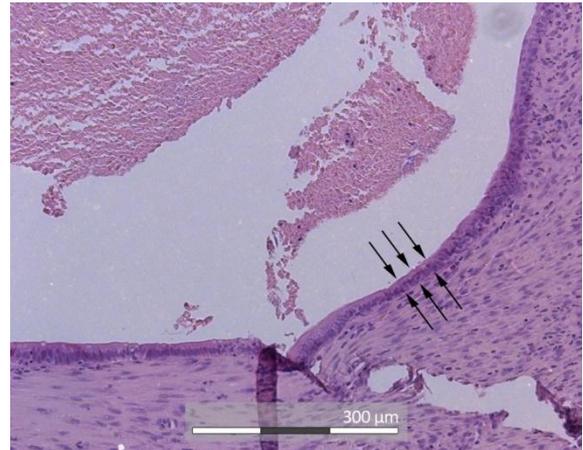


Abb. 26 Einschichtiges Regeneratepithel auf der luminalen Patchoberfläche.
Regenerationszeit: 30 Tage, Chondro-Gide®,
Präparat: CH43

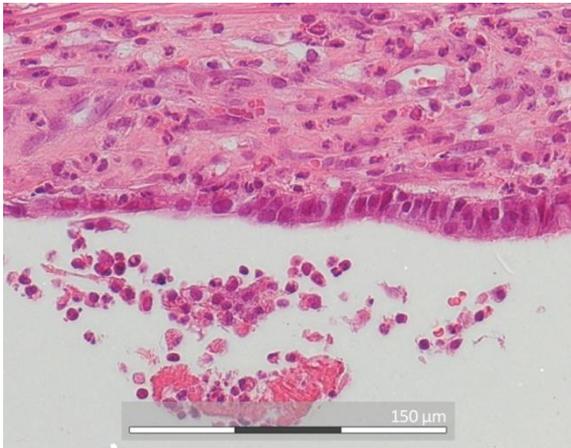


Abb. 27 Zylinderepithel und kubisches Epithel im Regeneratepithel.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Surgisis® 4-Layer
Tissue Graft, Präparat: SIS44



Abb. 28 Mikrovilli auf dem Regeneratepithels.
Regenerationsdauer: 30 Tage, TUTOPATCH®,
Präparat: TU43

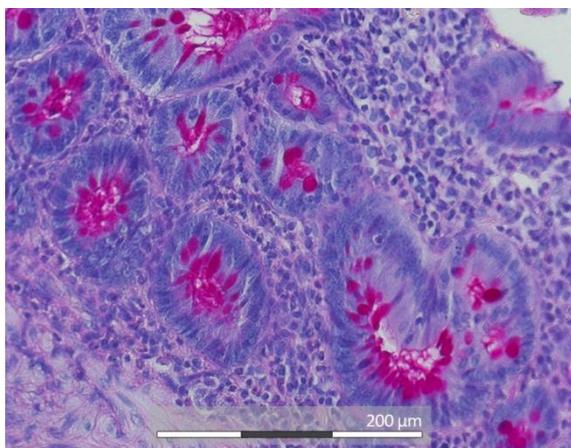


Abb. 29 Becherzellen in Kryptenregeneraten.
PAS-Färbung.
Regenerationsdauer: 30 Tage, TUTOPATCH®,
Präparat: TU42

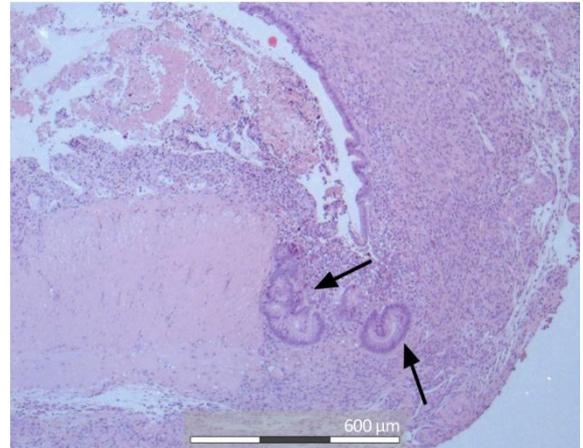


Abb. 30 Einzelne Kryptenregenerate im Anastomosenbereich.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Surgisis® 4-Layer
Tissue, Präparat: SIS42

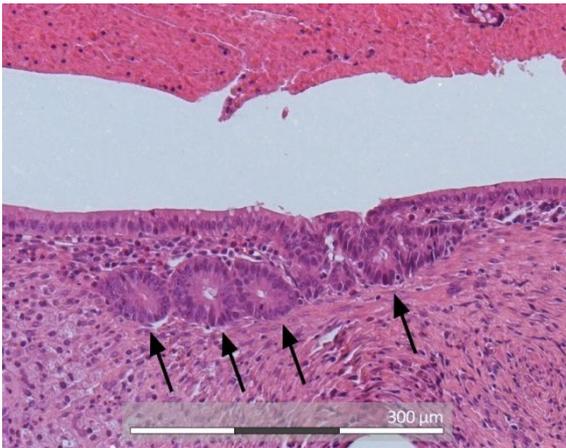


Abb. 31 Kryptenregenerate distal der Anastomose unterhalb der luminalen Patchoberfläche.
Regenerationsdauer: 30 Tage, ETHISORB® Dura Patch, Präparat: ET44

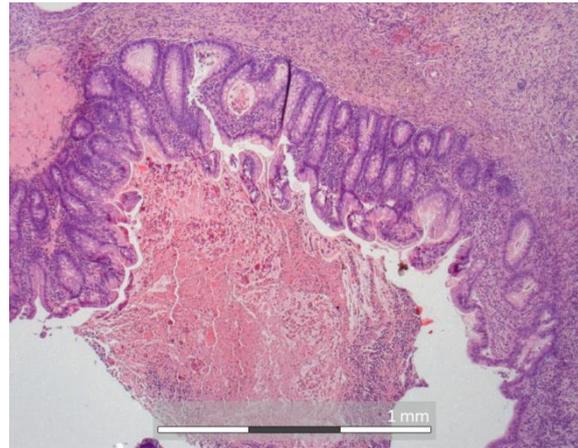


Abb. 32 Anzahl und Größe der Kryptenregenerate haben nach 60 Tagen zugenommen.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Chondro-Gide, Präparat: CH84

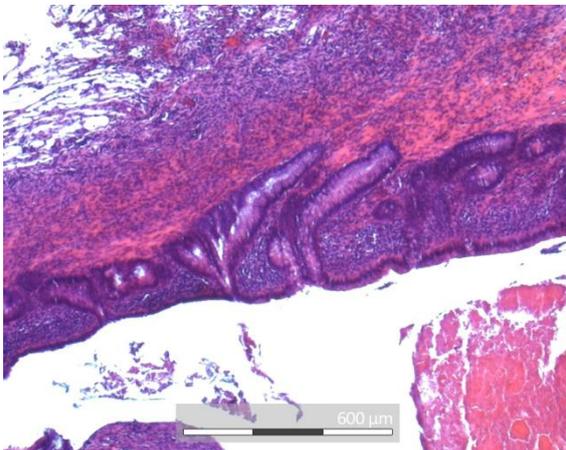


Abb. 33 Unförmige und unstrukturiert gewachsene Kryptenregenerate.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Surgisis® 4-Layer Tissue, Präparat: SIS84

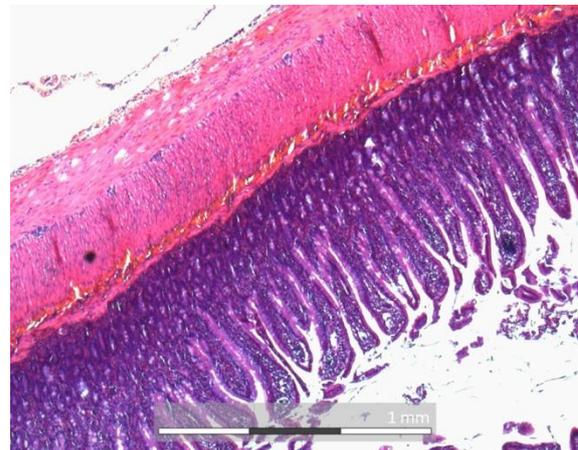


Abb. 34 Native Darmmukosa. Mehrreihige Kryptenanschnitte und lange, schlanke Zotten.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Surgisis® 4-Layer Tissue Graft, Präparat: SIS84



Abb. 35 Zottenregenerate. Erste Ausstülpungen aus der Lamina epithelialis an der luminalen Patchoberfläche.
Regenerationsdauer: 30 Tage, TUTOPATCH®, Präparat: TU43

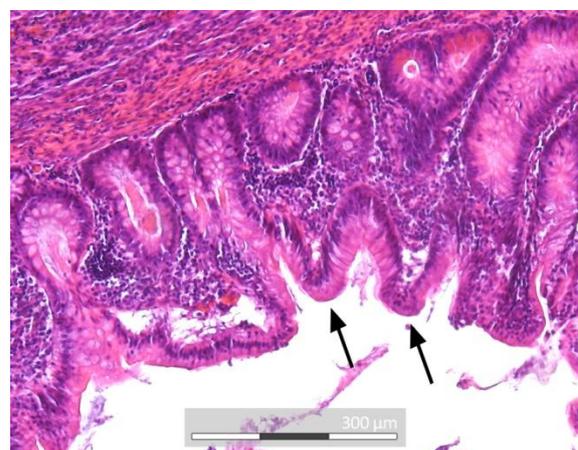


Abb. 36 Anzahl und Größe der Zottenregeneraten haben nach 60 Tagen Regenerationsdauer zugenommen.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Surgisis® 4-Layer Tissue Graft, Präparat: SIS83

3.2.2 Surgisis® 4-Layer Tissue Graft

Matrix

Der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft ist eine kollagene Matrix, die aus der Submukosa von Schweinen gewonnen wird und aus Strukturproteinen, Glykoproteinen, Glykosamino- und Proteoglykanen sowie Wachstumsfaktoren besteht.

Das Kollagen der biogenen Matrix stellt sich als homogene, eosinophile Fasern dar, die ohne Orientierung zwischen den Zellkernen liegen (vgl. Abb. 37) und ist histologische in der H.E.-Färbung nicht von nativem Kollagen abzugrenzen. Es ist aber davon auszugehen, dass die Fibroblasten, die die Matrix infiltriert haben, neues Kollagen synthetisieren und altes ergänzen. Im Gegensatz zum makroskopischen Befund, bei dem die SIS-Matrix nach der Entnahme aus dem Situs nicht mehr identifizierbar war, lassen sich mikroskopisch eindeutig kollagene Patchfasern nachweisen.

Sowohl nach 30 als auch nach 60 Tagen Regenerationsdauer zeigt sich eine schütterere Infiltration mit neutrophilen Granulozyten, jedoch keine Abszedierungen. Histozytäre Riesenzellen, die eine Fremdkörperreaktion des Empfängerorganismus auf die xenogene Submukosa zum Ausdruck bringen, sind ebenfalls selten zu finden.

30 Tage nach Patchimplantation finden sich vereinzelt Gefäßneubildungen (vgl. Abb. 38). Nach 60 Tagen Regenerationsdauer sind zahlreiche Neovaskularisationen zu beobachten (vgl. Abb. 39).

Mukosaregeneration

Die Mukosaregeneration auf der Matrix ist nach 30 Tagen Regenerationszeit äußerst primitiv. Das Epithelregenerat, das sich als erste Struktur auf der Patchoberfläche zeigt, ist verhältnismäßig kurz. Im zweidimensionalen Abbild bedeckt es lediglich 2,6 bis 5,7 mm ($\tilde{x}_{t1} = 3,4$ mm).

Wenige Krypten haben sich 30 Tage nach Implantation ausgebildet ($\tilde{x}_{t1} = 3,5$; Range: 3 - 7 Krypten je Anastomose). Lediglich das Präparat SIS42 zeigt im Bereich einer Anastomose zahlreiche Krypten, die weit in die Tiefe des Patches reichen (vgl. Abb. 40). In allen anderen Präparaten ist die Regeneration von Mukosa deutlich weniger entwickelt. Es zeigen sich vereinzelte Kryptenregenerate in den Anastomosenbereichen, die an der Patchoberfläche liegen (Neomukosatiefe: 0,2 - 0,5 mm) und bis kurz hinter der Anastomose auftreten (Neomukosalänge: 0,3 - 1 mm; vgl. Abb. 41 und Abb. 42). Zottenregenerate finden sich zu diesem Zeitpunkt sehr wenige ($\tilde{x}_{t1} = 0$; vgl. Abb. 43).

Bezogen auf die Anzahl von Krypten, deren Ausbreitung auf dem Patch, der Anzahl der Zotten und der Länge des Regeneratepithels, zeigt der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft nach 30 Tagen die primitivste Mukosaregeneration unter allen untersuchten Matrizes. Nach 60-tägiger

Regenerationszeit präsentiert sich diese Matrix jedoch qualitativ und quantitativ konträr. In allen Präparaten zeigt sich eine sehr gute relative Oberflächenepithelialisierung ($\tilde{x}_{t2} = 95\%$; Range: 90 – 100 %) auf der Patchoberfläche, bei einer mittelmäßigen absoluten Epithelialisierung ($\tilde{x}_{t2} = 6,3$ mm; Range: 5,8 – 8,7 mm). Die Mukosa-Architektur ist hoch entwickelt (vgl. Abb. 44). Innerhalb dieser Neomukosa findet sich die höchste Kryptenanzahl unter allen Matrizes ($\tilde{x}_{t2} = 22,5$; Range: 16 – 68 Krypten je Anastomose) und sie hat sich weitreichend auf der Patchoberfläche etabliert ($\tilde{x}_{t2} = 2,7$ mm; Range: 1,9 - 4,4 mm). Im Präparat SIS 83 zeigt sich eine Matrix, deren luminale Oberfläche nahezu komplett über mehrere Schichten von Kryptenanschnitten bedeckt ist. Lediglich ein schmaler zentraler Anteil zeigt noch kein Regenerat (vgl. Abb. 45). Auch die Präparate SIS 81 und SIS 84 zeigen zahlreiche, große Krypten auf der gesamten Patchlänge, die in ihrer Morphologie aber noch sehr unförmig wirken (vgl. Abb. 46).

In allen Präparaten finden sich auch schlanke und vergleichsweise viele Zotten (vgl. Abb. 47). Im Vergleich zu nativer Dünndarmmukosa sind sie jedoch deutlich kürzer (vgl. Abb. 48).

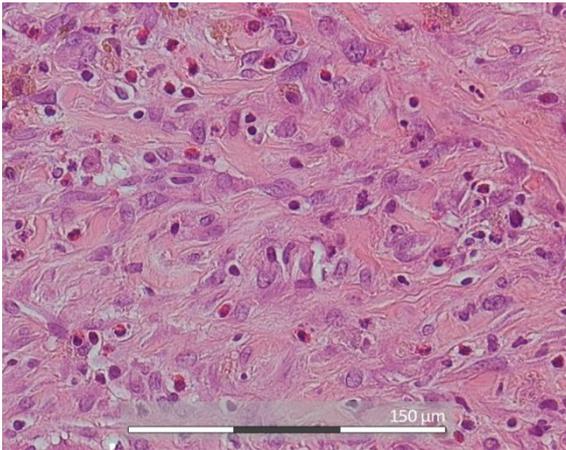


Abb. 37 Das Kollagen des Surgisis® 4-Layer Tissue Graft als homogene, eosinophile Fasern zwischen den Zellen.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: SIS44

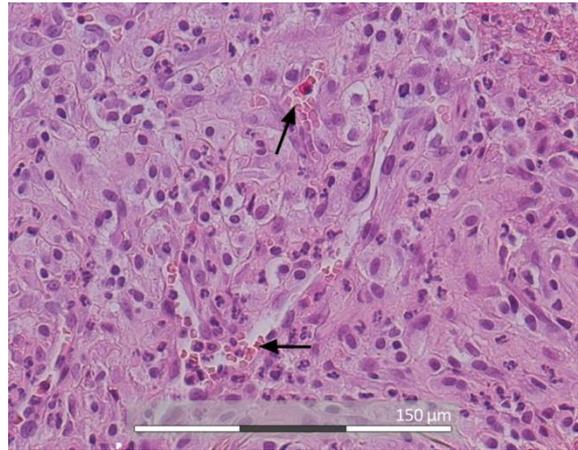


Abb. 38 Einzelne Gefäßneubildungen 30 Tage nach Implantation.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: SIS43

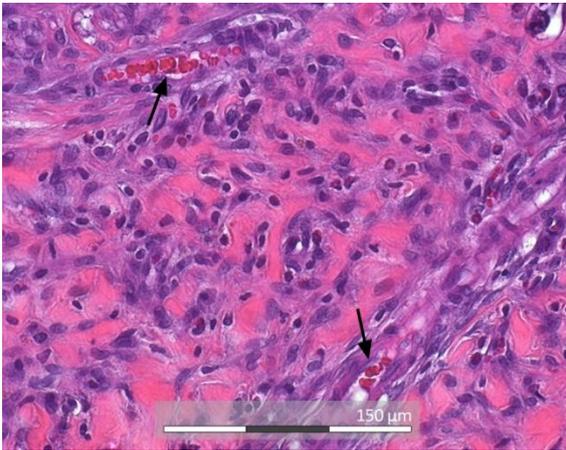


Abb. 39 Zahlreiche Neovaskularisationen nach 60 Tagen Regenerationsdauer.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: SIS81

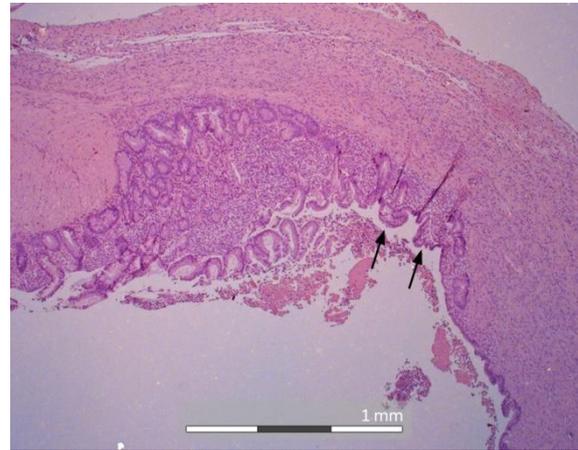


Abb. 40 Zahlreiche, tiefgelegene Krypten und Zotten bereits 30 Tage nach Implantation.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: SIS42

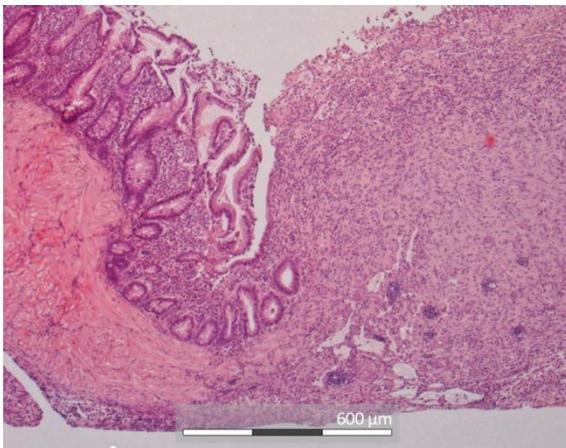


Abb. 41 Wenige Kriptenregenerate.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: SIS43



Abb. 42 Wenige Kriptenregenerate.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: SIS44

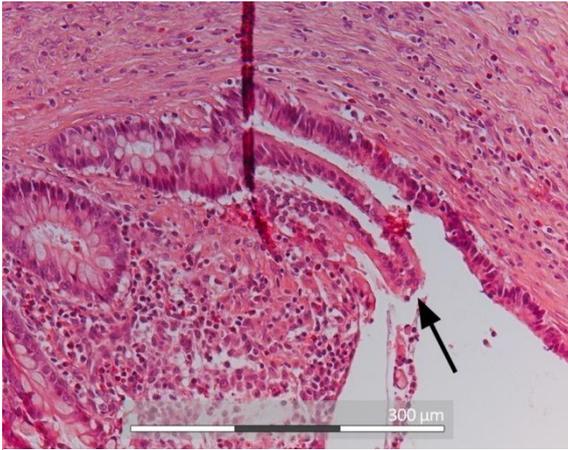


Abb. 43 Vereinzelt Zottenregenerat.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: SIS44

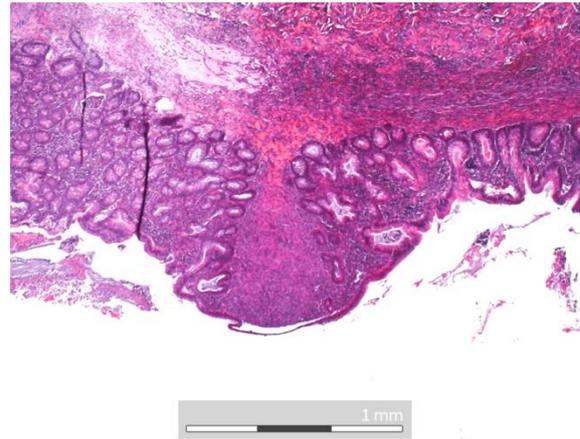


Abb. 44 Hoch entwickelte Mukosa - Architektur mit weit fortgeschrittener Kryptenregeneration und vollständiger Epithelialisierung der Patchoberfläche.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: SIS83

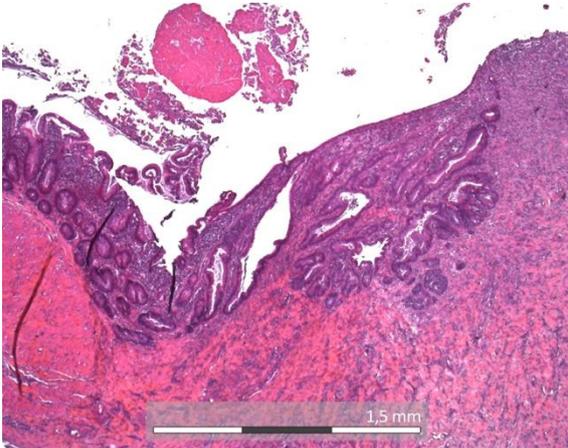


Abb. 45 Weitreichende Mukosaregeneration mit unförmigen Kryptenregeneraten.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: SIS83

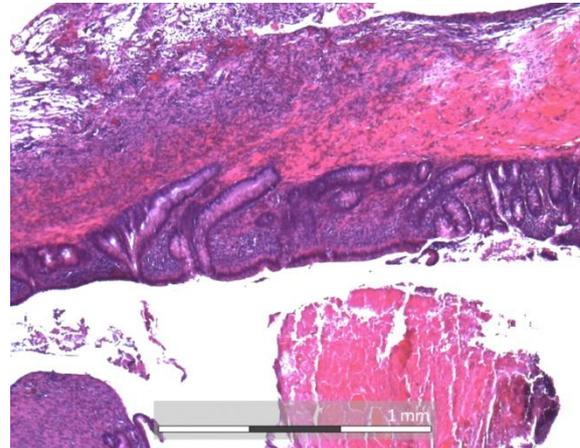


Abb. 46 Plumpe Kryptenregenerate.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: SIS84

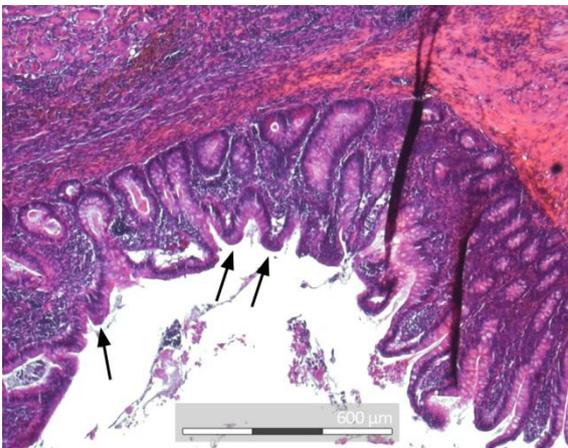


Abb. 47 Einige Zottenregenerate.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: SIS84

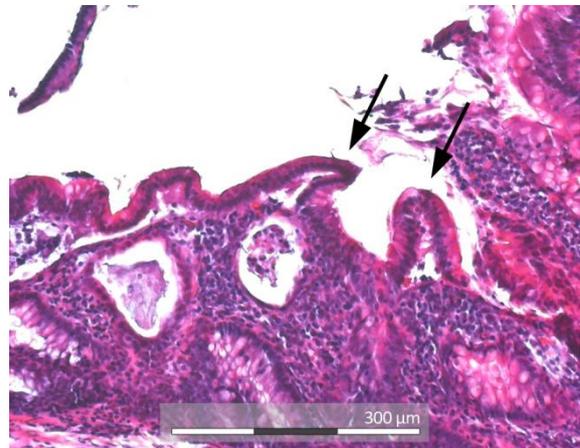


Abb. 48 Schlanke Zottenregenerate.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: SIS83

3.2.3 Chondro-Gide®

Matrix

Die Chondro-Gide®-Matrix besteht aus einer faserigen Mikrostruktur, gebildet aus den natürlichen Strukturproteinen Kollagen Typ I und III ohne weitere Zusätze. Das Kollagen präsentiert sich wie beim Surgisis® 4-Layer Tissue Graft mikroskopisch als homogene und eosinophile Fasern (vgl. Abb. 49). Das Matrixkollagen lässt sich hier von neu synthetisiertem Kollagen lichtmikroskopisch nicht differenzieren.

In einzelnen Präparaten, sowohl nach 30 als auch nach 60 Tagen, zeigt sich eine mittelgradige bis hohe Entzündungsaktivität (vgl. Abb. 50). Lokalisiert kommt es zu unterschiedlich dichter Infiltration mit neutrophilen Granulozyten bis hin zu Mikroabszessen (vgl. Abb. 51). In den Präparaten mit erhöhter Entzündungsaktivität sind die Mukosaregeneration und die Angiogenese reduziert. Eine Fremdkörperreaktion auf das Patchmaterial ist nicht zu beobachten.

Nach einer Regenerationsdauer von sowohl 30 als auch 60 Tagen zeigen sich Neovaskularisationen (vgl. Abb. 52).

Mukosaregeneration

Das einschichtige Regeneratepithel auf der luminalen Matrixoberfläche des Chondro-Gide® zeigt nach 30-tägiger Regenerationszeit eine Länge von 4,1 bis 5,1 mm ($\bar{x}_{t1} = 4,7$ mm). Nach 60 Tagen hat sich das Regeneratepithel beim Chondro-Gide® fast verdoppelt ($\bar{x}_{t2} = 8,7$ mm).

30 Tage nach Implantation sind Kryptenregenerate auf dem Chondro-Gide®-Patch zu beobachten. Diese stellen sich vornehmlich als unförmige Konfigurationen in ein- oder zweireihiger Anordnung an der Patchoberfläche im Anastomosenbereich oder im Median bis zu 1,6 mm distal von ihr dar (vgl. Abb. 53 und Abb. 54). Das Präparat CH43 zeigt eine Besonderheit. Im Bereich einer Anastomose finden sich 30 Tage nach Implantation verhältnismäßig viele Krypten, die mit ihren Ausführungskanälchen bis weit in die Tiefe des Patches eindringen, sich stark verzweigen und dadurch hyperplastisch erscheinen (vgl. Abb. 55). Dieser Bereich muss zurückhaltend ausgewertet werden.

Nach 60 Tagen hat sich die Kryptenanzahl im Median mehr als verdoppelt ($\bar{x}_{t2} = 18,5$) und die Krypten haben sich in horizontaler sowie vertikaler Richtung weiter auf dem Patch ausgebreitet: Die Krypten sind minimal 1,5 bis maximal 6 mm distal der Anastomose anzutreffen ($\bar{x}_{t1} = 1,6$ mm; $\bar{x}_{t2} = 3,2$ mm) und penetrieren in die Patchtiefe von minimal 0,4 bis maximal 0,8 mm ($\bar{x}_{t1} = 0,27$ mm; $\bar{x}_{t2} = 0,46$ mm).

Morphologisch präsentieren sich die Krypten nach 60 Tagen unterschiedlich. Teilweise liegen sie einzeln an der Patchoberfläche, wie z. B. im Präparat CH83 (vgl. Abb. 56). Hier finden sich auch atypische Zotten, die sehr lang sind und aus einem Divertikel in das Lumen ragen

(vgl. Abb. 57). Sowohl nach 30 als auch 60 Tagen Regenerationsdauer finden sich beim Chondro-Gide® Zotten (vgl. $\tilde{x}_{t1} = 1$; $\tilde{x}_{t2} = 2$).

Im Präparat CH81 ist auffällig, dass die Mukosa nahezu die gesamte Patchoberfläche mit unreifen Krypten bedeckt. Die gesamte Länge der luminalen Patchoberfläche ist jedoch im Vergleich zu allen anderen Präparaten deutlich kürzer (vgl. Abb. 58). Das Präparat CH84 zeigt hingegen eine Architektur der Neomukosa, die der Morphologie nativer Darmmukosa bereits stark ähnelt (vgl. Abb. 59). Auch hier sind mehrere reife Zotten zu erkennen (vgl. Abb. 60).

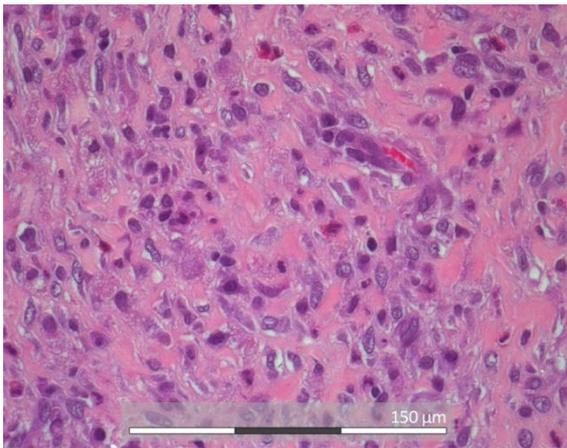


Abb. 49 Das Kollagen der Chondro-Gide® - Matrix als homogene, eosinophile Fasern zwischen den Zellkernen.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: CH42

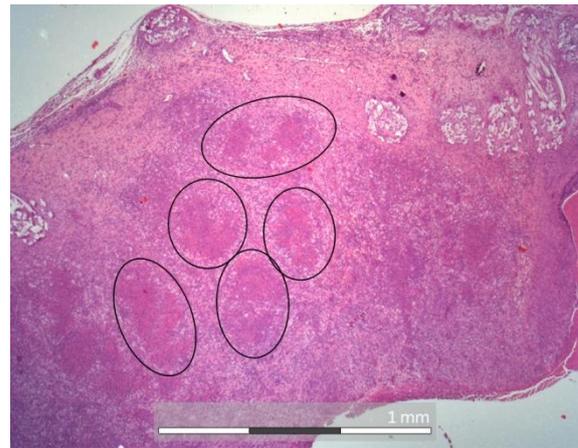


Abb. 50 Mikroabszesse auf dem Patch.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: CH44

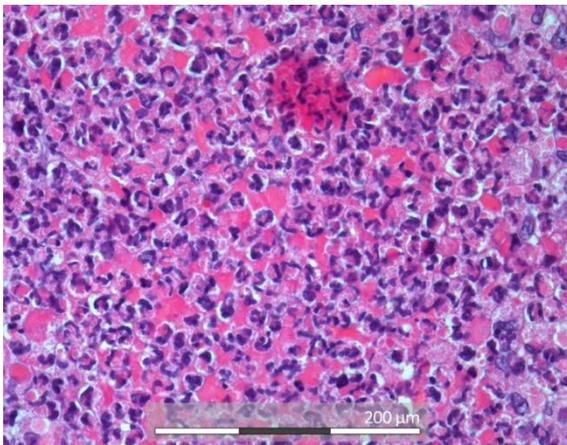


Abb. 51 Neutrophile Granulozyten auf der Chondro-Gide® - Matrix.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: CH44

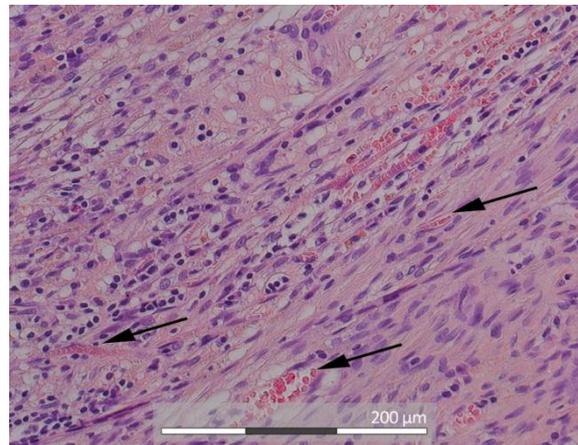


Abb. 52 Gefäßneubildungen.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: CH83

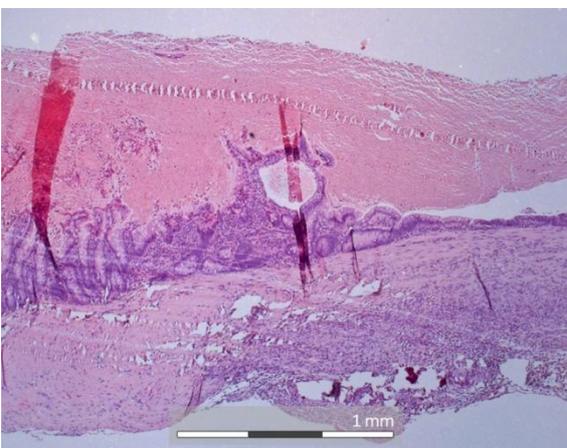


Abb. 53 Kryptenregenerate im Anastomosenbereich.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: CH43

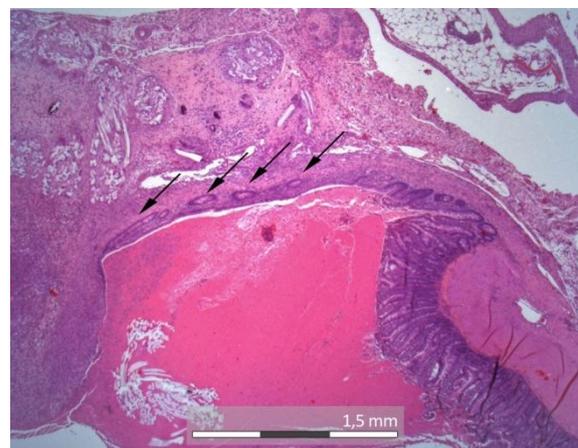


Abb. 54 Einreihige Kryptenregenerate an der luminalen Patchoberfläche distal der Anastomose.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: CH44



Abb. 55 Hyperplastische Kryptenregenerate.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: CH43

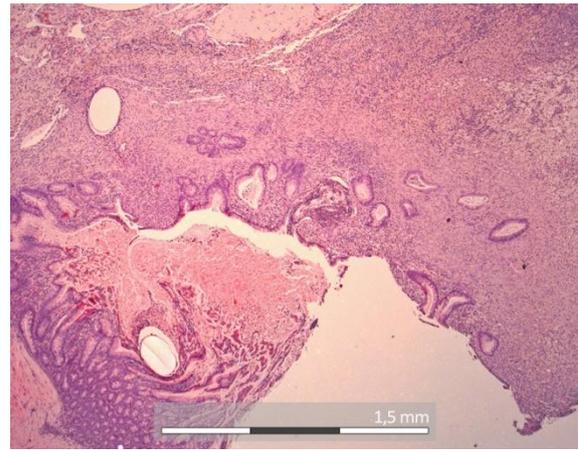


Abb. 56 Vereinzelte Kryptenregenerate unterhalb
der luminalen Patchoberfläche.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: CH83

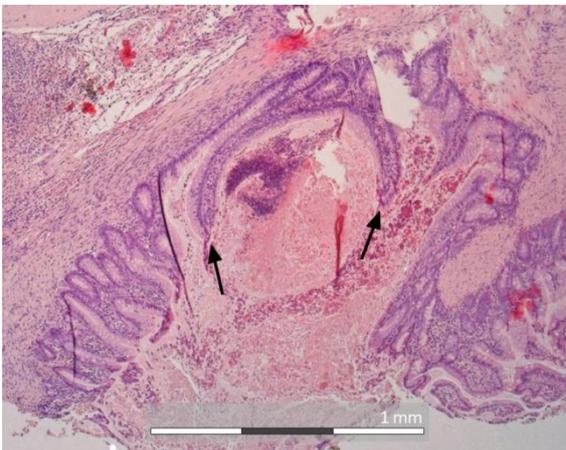


Abb. 57 Divertikel und atypische
Zottenregenerate.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: CH83

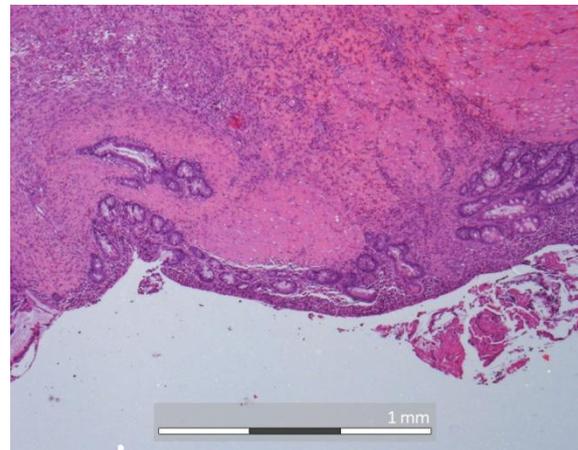


Abb. 58 Kryptenregenerate mit nahezu
vollständiger Oberflächenepithelialisierung.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: CH81

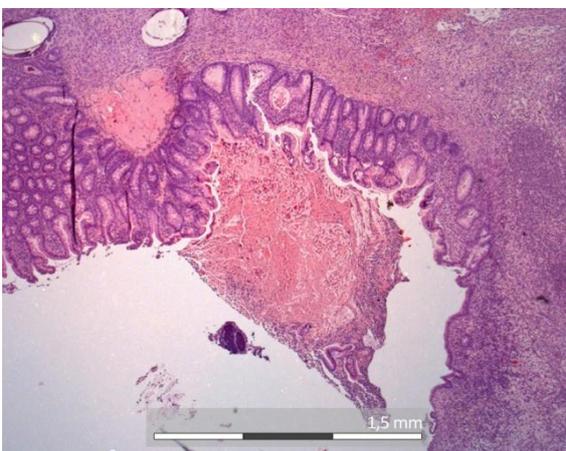


Abb. 59 Vergleichsweise gute
Kryptenregeneration.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: CH84



Abb. 60 Zottenregenerate.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: CH84

3.2.4 TUTOPATCH®

Matrix

Der TUTOPATCH® ist ebenfalls eine kollagene Matrix. Sie wird aus bovinem Perikard gewonnen. Ihre Struktur stellt sich wie bei den anderen kollagenen Matrices in der Lichtmikroskopie als homogene, eosinophile Fasern zwischen den Zellen dar. Die Faserstruktur erscheint im Vergleich zum Surgisis® 4-Layer Tissue Graft und zur Chondro-Gide®-Matrix dicker (vgl. Abb. 61).

In den Präparaten 30 Tage nach Implantation sind einige wenige neutrophile Granulozyten zu beobachten. In den Präparaten 60 Tage nach Implantation hingegen, zeigt sich eine hohe Entzündungsaktivität. Insbesondere im Präparat TU83 sind massive Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten zu beobachten, die sich um eine eosinophile, amorphe Masse (möglicherweise eingeschmolzenes Patchmaterial) organisieren und Mikroabszesse ausbilden (vgl. Abb. 62 und Abb. 63).

Beim TUTOPATCH® zeigen sich zwar 30 und 60 Tage nach Implantation Neovaskularisationen. Die Kapillardichte ist jedoch gering (vgl. Abb. 64).

Mukosaregeneration

Nach einer Regenerationsdauer von 30 Tagen zeigt sich im Präparat TU42 bereits eine gute Regeneration von Krypten ($n = 29$), die dicht beieinander stehen (Neomukosallänge: 0,9 mm) und bereits tief in den Patch hineinreichen (Neomukosatiefe: 0,39 mm; vgl. Abb. 65). Das vermittelt den Eindruck eines kontinuierlichen oder fließenden Übergangs aus der nativen Schleimhaut in den Patch. 30 Tage nach Implantation ist dies das beste Resultat unter allen Präparaten. Weitere Anastomosen zeigen beim TUTOPATCH® eine weniger reife Morphologie zu diesem Zeitpunkt (vgl. Abb. 66). Das Präparat TU43 zeigt lediglich einige unförmige Krypten an der Patchoberfläche, die zwar noch bis 2,4 mm distal der Anastomose reichen, aber nicht in die Tiefe vorgedrungen sind (vgl. Abb. 67). Im Median findet man 9 Krypten (Range: 5 – 27) pro Anastomose und keine Zotte im Gesamtpräparat.

Die morphologische Entwicklung in der Zeit von Tag 30 bis Tag 60 ist gering. Das Regeneratepithel an der Patchoberfläche hat sich im zeitlichen Verlauf nicht verlängert (Range: t_1 : 2,6 - 7,6 mm; t_2 : 2,8 – 7,7 mm). Nach 60 Tagen wurde die geringste Oberflächenepithelialisierung unter allen Matrices erreicht.

Auch die Neomukosa stellt sich morphologisch weiterhin heterogen dar: Das Präparat TU81 zeigt lediglich eine große Gruppe von Krypten, die tief im Patch liegt sowie Kryptenregenerate im Anastomosenbereich (vgl. Abb. 68). Das Präparat TU84 zeigt eine vergleichsweise schmale Schicht an Neomukosa, mit bis zu 11 Krypten je Anastomose. Hier scheint die Matrix an Substanz verloren zu haben, da der Patch in diesem Präparat ver-

gleichsweise schmal ist (vgl. Abb. 69). Das Präparat TU83 andererseits zeigt eine vergleichsweise gute Mukosaregeneration an beiden Anastomosen mit zahlreichen Krypten (vgl. Abb. 70). 60 Tage nach Implantation ist beim TUTOPATCH® im Median die geringste Anzahl an Krypten ($\tilde{x}_{t2} = 15$) und Zotten ($\tilde{x}_{t2} = 2$; vgl. Abb. 71) unter den kollagenen Matrices gefunden wurden. Das Regeneratepithel ($\tilde{x}_{t2} = 4,7$ mm) sowie die Neomukosalänge ($\tilde{x}_{t2} = 2,3$ mm) ist am kürzesten unter allen verwendeten Materialien.

Nach 60 Tagen Regenerationszeit sind lediglich im Präparat TU83 deutliche Mukosaausstülpungen oder Epithelproliferationen an der Patchoberfläche als Zeichen von Zottenregeneration zu sehen (vgl. Abb. 72).

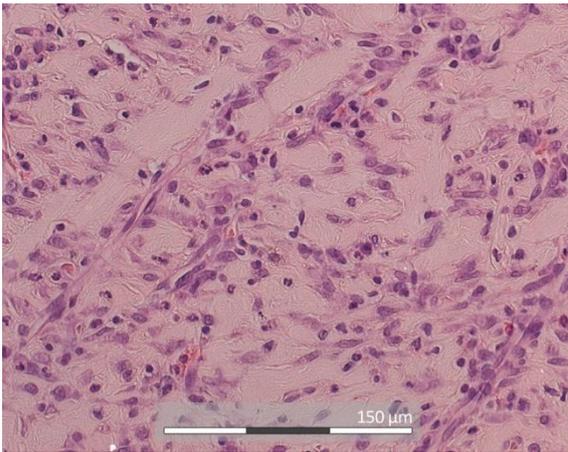


Abb. 61 Das Kollagen des TUTOPATCH® als homogene, eosinophile Fasern zwischen den Zellen.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: TU43

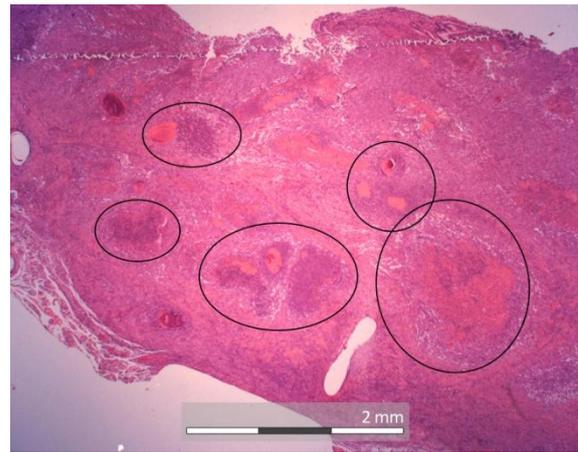


Abb. 62 Lokalisierte Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten als Zeichen hoher Entzündungsaktivität.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: TU85

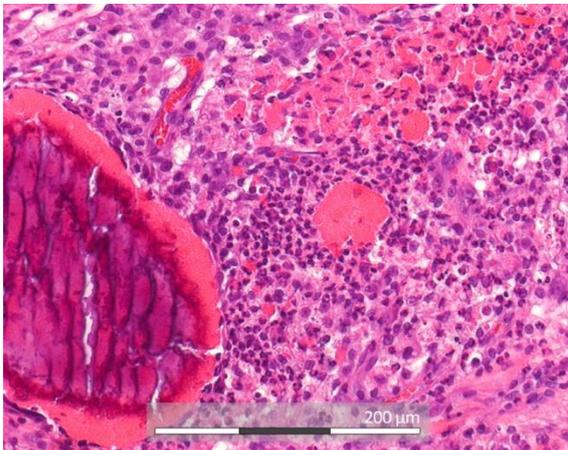


Abb. 63 Neutrophile Granulozyten, die sich um ein eosinophile, amorphe Masse organisieren.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: TU85

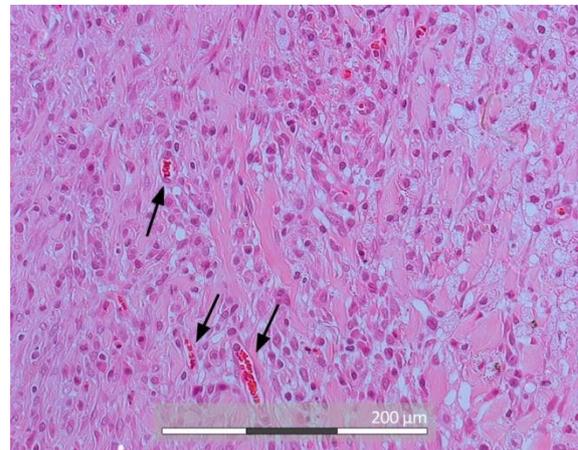


Abb. 64 Gefäßneubildungen 60 Tage nach Implantation.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: TU81

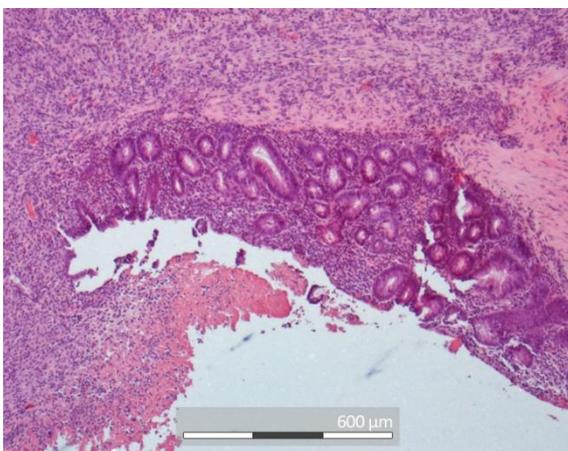


Abb. 65 Gut entwickelte Neomukosaarchitektur bereits 30 Tage nach Implantation.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: TU42

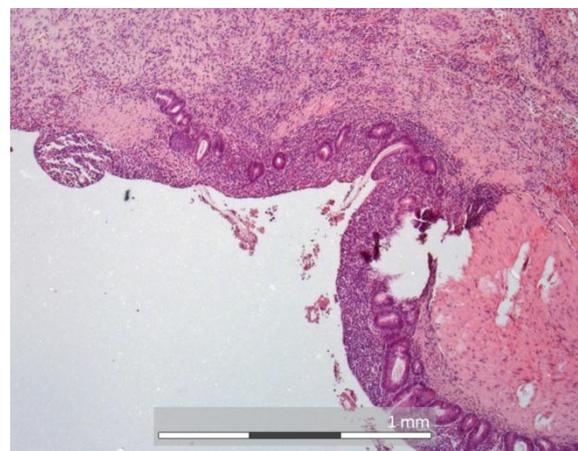


Abb. 66 Primitive Neomukosaarchitektur 30 Tage nach Implantation.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: TU43

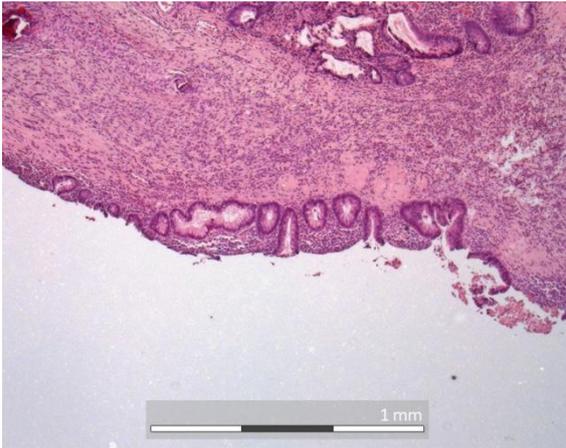


Abb. 67 Einzelne unförmige Krypten an der Oberfläche des TUTOPATCH® 30 Tage nach Implantation.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: TU43

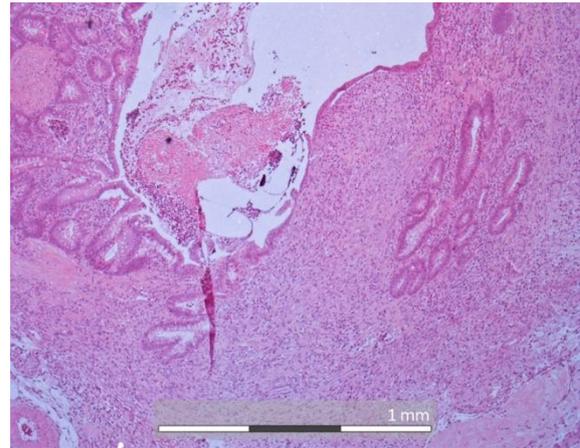


Abb. 68 Mäßige Kryptenregeneration 60 Tage nach Implantation.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: TU81

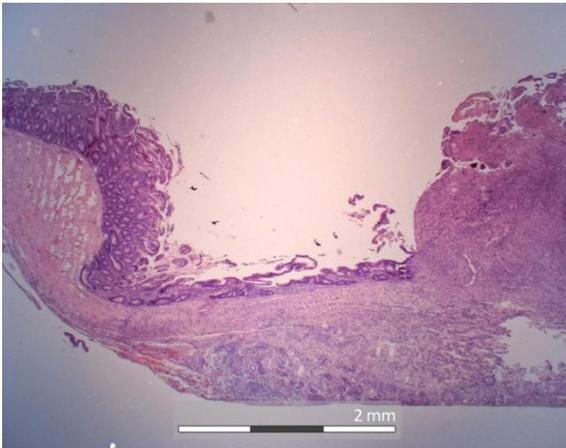


Abb. 69 Schmale Neomukosa.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: TU84

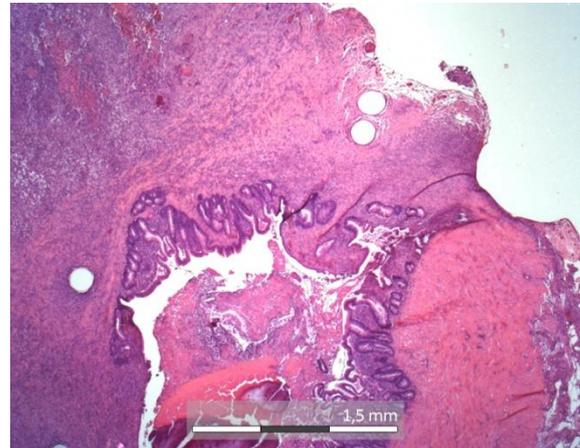


Abb. 70 Reife Neomukosaarchitektur mit zahlreichen Kryptenanschnitten.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: TU83

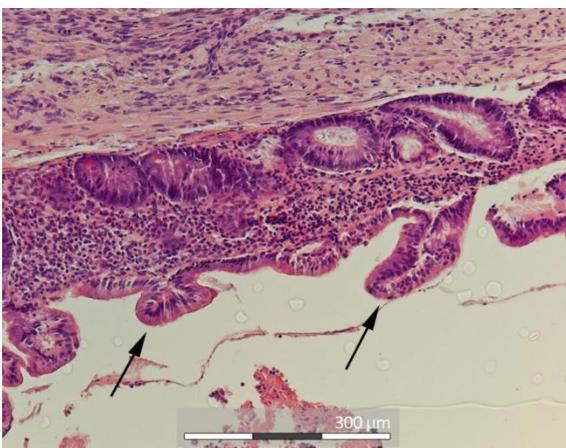


Abb. 71 Zottenregenerate. Erste Ausstülpungen aus der Lamina epithelialis an der luminalen Matrixoberfläche.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: TU84

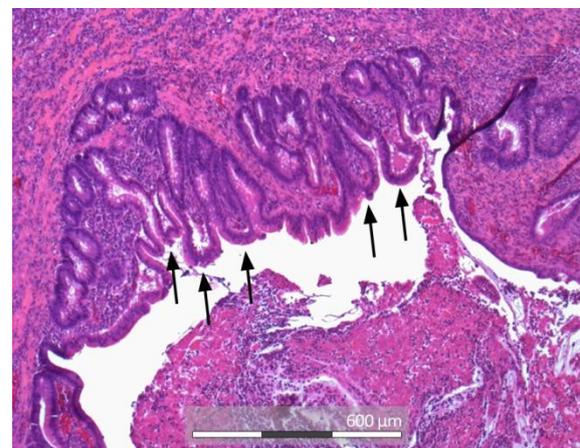


Abb. 72 60 Tage nach zeigen sich in diesem Präparat einige schlanke Zottenregenerationen.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: TU83

3.2.5 ETHISORB® Dura Patch

Matrix

Der ETHISORB® Dura Patch ist ein rein synthetisches dreidimensionales Vlies aus VICRYL®-Garn und PDS-Schmelze und zeigt in der lichtmikroskopischen Übersicht eine unregelmäßige Anordnung der VICRYL®-Filamente. Die einzelnen Filamente sind in der Aufsicht als blasse, gräuliche, homogene Fasern zu erkennen, die sich je nach Schnittebene als Linien oder Kreise darstellen und lichtmikroskopisch doppelt brechen. Im Vergleich zu den umliegenden Zellkernen erscheinen sie sehr groß, starr und stabil (vgl. Abb. 73).

Nach 30 Tagen Regenerationszeit zeigt sich eine homogene Infiltration des Fremdmaterials mit Granulationsgewebe. Es sind Fibroblasten zu erkennen, die Kollagen produzieren, das als homogene, eosinophile Fasern zwischen Zellen und Patchfasern zu erkennen ist (vgl. Abb. 74). Außerdem sind zahlreich histiozytäre Riesenzellen zu sehen, die Ausdruck einer ausgeprägten Fremdkörperreaktion des Organismus gegen die Matrix sind und das Fremdmaterial phagozytieren (vgl. Abb. 75).

Der ETHISORB® Dura Patch unterliegt einem deutlichen Umbauprozess zwischen 30 und 60 Tagen. Die klare Faseranordnung, wie sie sich nach 30 Tagen darstellt, ist aufgehoben. Einzelne homogene Filamente, sind nicht mehr zu sehen. Stattdessen finden sich massenhaft schaumzellige Makrophagen, die an ihrem grobgranulärem, blassem Zytoplasma zu erkennen sind (vgl. Abb. 76). Sie sind Ausdruck fortgeschrittener Fremdkörperresorption. Der Kollagenanteil dagegen hat deutlich zugenommen.

Besonders auffällig sind bei diesem Material hochgradiger Entzündungsreaktionen. In allen Präparaten zeigen sich lokalisierte Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten und nekrotischem Material (vgl. Abb. 77 und Abb. 78). In der Übersicht ist zu erkennen, dass die Patchstruktur stellenweise aufgelockert und zerstört ist (vgl. Abb. 79). Dies spricht für vermehrt abszedierende Prozesse im Patch. Darüber hinaus finden sich Inseln mit azellulärer, homogener, gräulicher Masse (möglicherweise Nahrungsmittelreste oder Patchrückstände), die ebenso von neutrophilen Granulozyten umgeben sind (vgl. Abb. 80).

An Tag 30 und Tag 60 nach Implantation zeigen sich vereinzelt kleine Gefäßanschnitte mit gut ausgebildeten Gefäßwänden, teilweise mit Erythrozyteninhalt (vgl. Abb. 81 und Abb. 82). Diese haben nach 60 Tagen Regenerationszeit an Zahl und Größe zugenommen. Die Kapillardichte ist insgesamt mäßig.

Mukosaregeneration

Die Epithelialisierung der Patchoberfläche nach 30 und 60 Tagen ist im Vergleich zu den kollagenen Matrices im Median weiter fortgeschritten ($\tilde{x}_{t1} = 10$ mm; $\tilde{x}_{t2} = 11,8$ mm).

Das Auftreten von Krypten ist vergleichsweise gering. Nach 30 Tagen zeigen sich die ersten Kryptengruppierungen im Anastomosenbereich (vgl. Abb. 83). Bis 5,1 mm distal treten im Median auch vereinzelt weitere Krypten auf (vgl. Abb. 84). Zwischen diesen liegen allerdings sehr große Abstände und sie reichen nicht weit in die Tiefe des Patches hinein ($\tilde{x}_{t1} = 0,17$ mm). Zotten findet man nach 30 Tagen Regenerationszeit keine.

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich allenfalls eine mäßige morphologische Reifung der benannten Strukturen. 60 Tagen nach Implantation hat die Länge des Oberflächenepithels nicht wesentlich zugenommen (Range: 9 – 15 mm). Die Kryptenzahl hat sich im Median ca. verdoppelt ($\tilde{x}_{t1} = 5,5$ pro Anastomose; $\tilde{x}_{t2} = 13$ pro Anastomose), ist im Vergleich zu den kollagenen Matrices jedoch geringer. Wie bereits nach 30 Tagen zeigen sich sowohl Gruppierungen von Krypten im Anastomosenbereich (vgl. Abb. 85 und Abb. 86), wie auch vereinzelt Krypten distal an der Oberfläche. Proximale sowie distale Krypten haben zahlenmäßig zugenommen, sind jedoch vergleichsweise gering in die Patchtiefe vorgedrungen (vgl. Abb. 87).

Nach 60 Tagen zeigen sich epitheliale Ausstülpungen auf der Patchoberfläche, die als Zottenregenerate zu deuten sind. Diese Zotten sind jedoch sehr klein und wirken deshalb morphologisch noch sehr unreif (vgl. Abb. 88; vgl. Abb. 89).

Im Präparat ET81 zeigt sich eine morphologische Besonderheit. Hier hat sich im Bereich einer Anastomose ein Divertikel ausgebildet (vgl. Abb. 90).

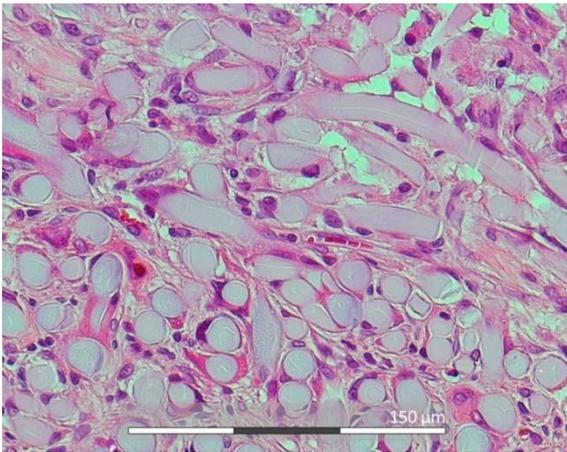


Abb. 73 VICRYL® - Garn des ETHISORB® Dura Patch.
 Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: ET44

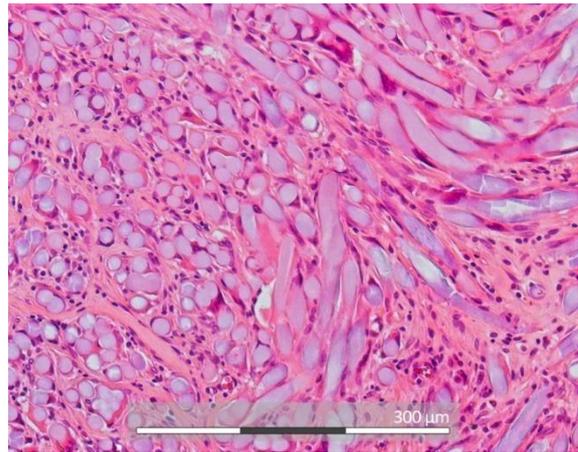


Abb. 74 Neu synthetisiertes Kollagen zwischen den Zellkernen und den VICRYL® - Filamenten.
 Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: ET44

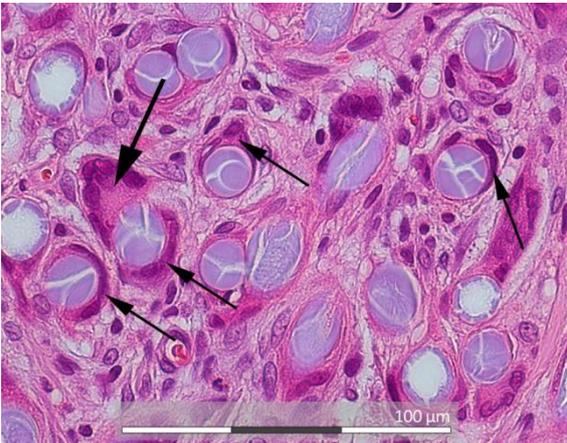


Abb. 75 Histiocytäre Riesenzellen, die die VICRYL®-Filamente umschließen und phagozytieren.
 Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: ET44

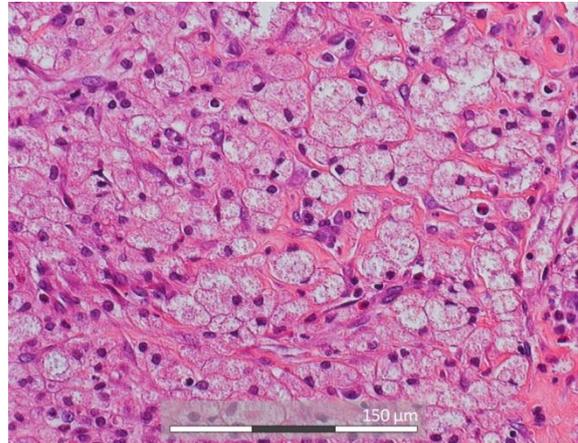


Abb. 76 Zahlreiche Schaumzellen, die das Fremdmaterial phagozytiert haben.
 Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET81

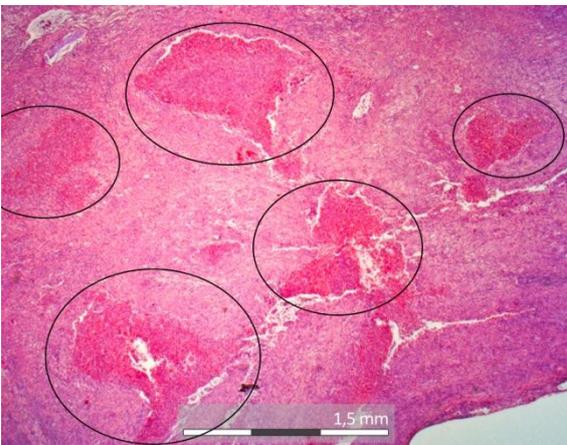


Abb. 77 Lokalisierte, große Entzündungsherde auf dem ETHISORB® Dura Patch.
 Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET81

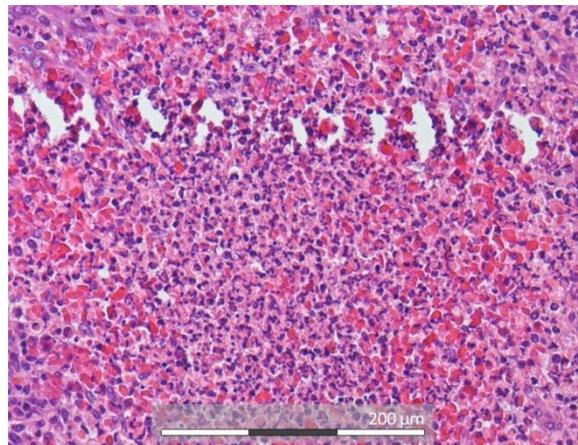


Abb. 78 Lokalisierte Anhäufungen neutrophiler Granulozyten.
 Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET81

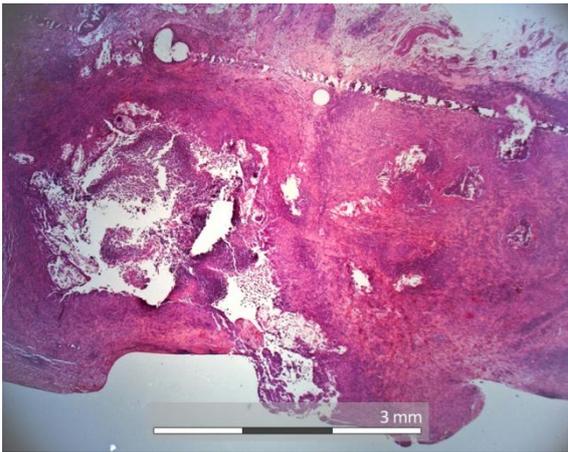


Abb. 79 Destruierter ETHISORB® Dura Patch.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET84

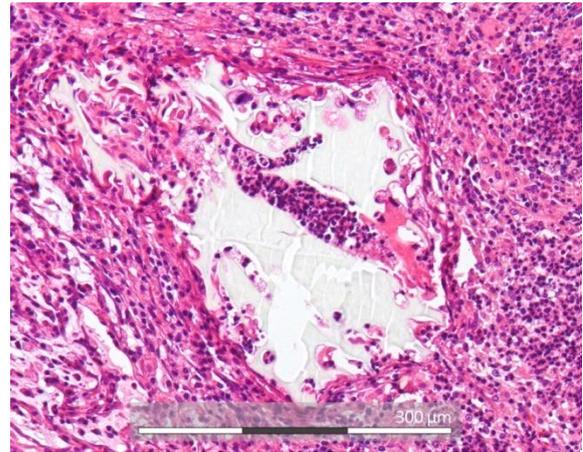


Abb. 80 Azelluläres Material, das von neutrophilen Granulozyten umgeben wird.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET83

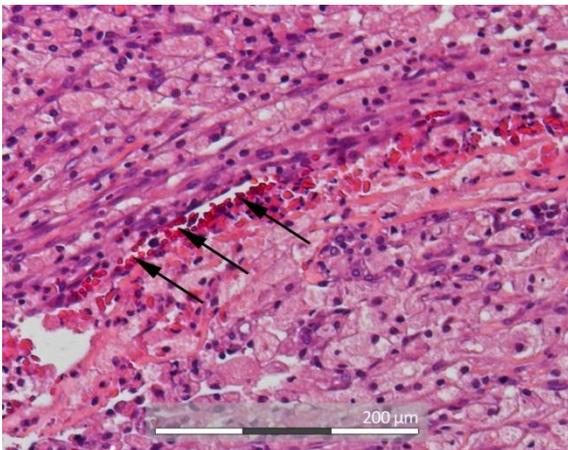


Abb. 81 Angiogenese auf dem ETHISORB® Dura Patch.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET81

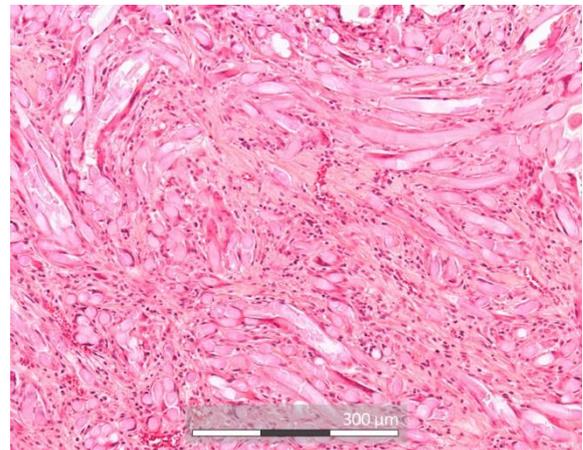


Abb. 82 Zahlreiche Neovaskularisationen.
Regenerationsdauer: 30 Tage; ET44

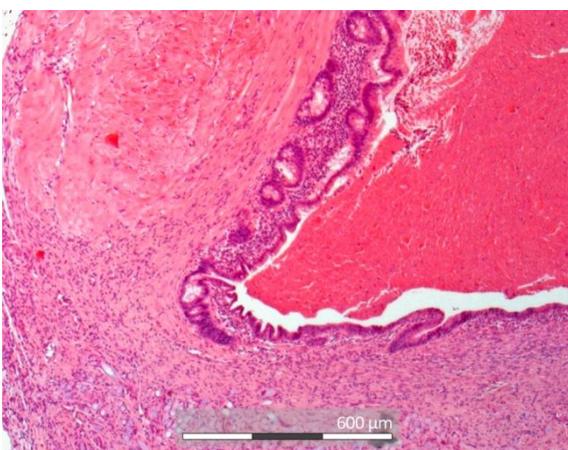


Abb. 83 Kryptenregenerate im Anastomosenbereich.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: ET44

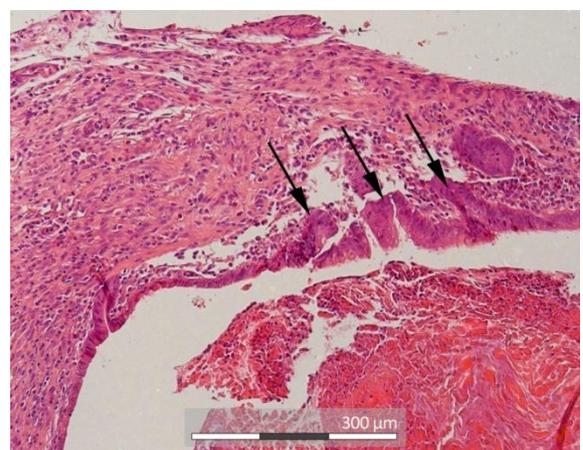


Abb. 84 Vereinzelte Kryptenregenerate distal der Anastomose unterhalb der Patchoberfläche.
Regenerationsdauer: 30 Tage, Präparat: ET44

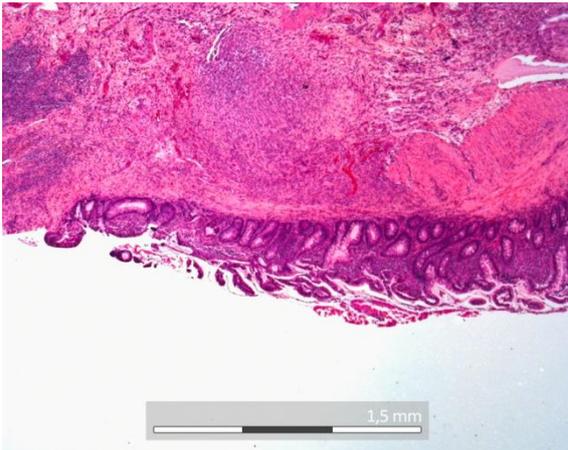


Abb. 85 Kryptenregenerate im Anastomosenbereich.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET84

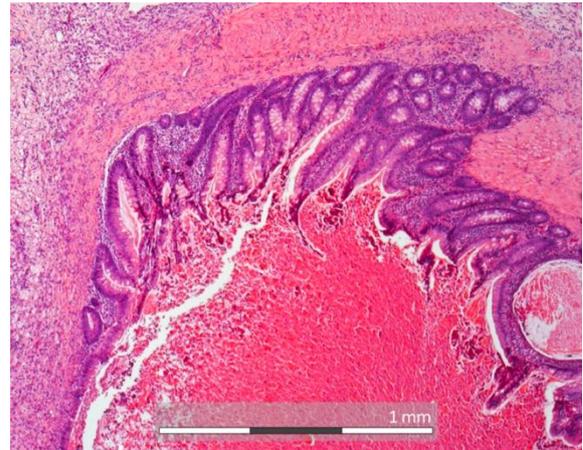


Abb. 86 Kryptenregenerate im Anastomosenbereich 60 Tage nach Implantation.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET81

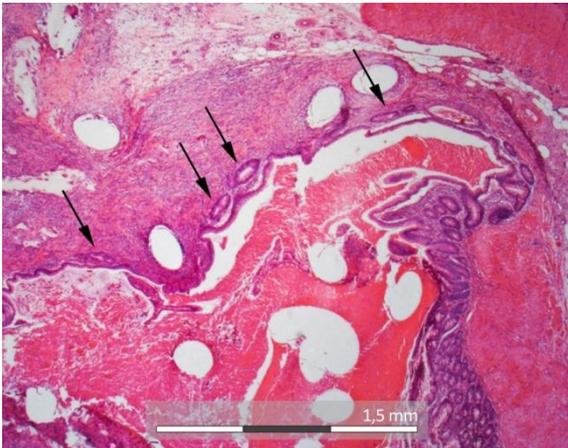


Abb. 87 Kryptenregenerate, die flach an der luminalen Matrixoberfläche gelegen sind.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET83

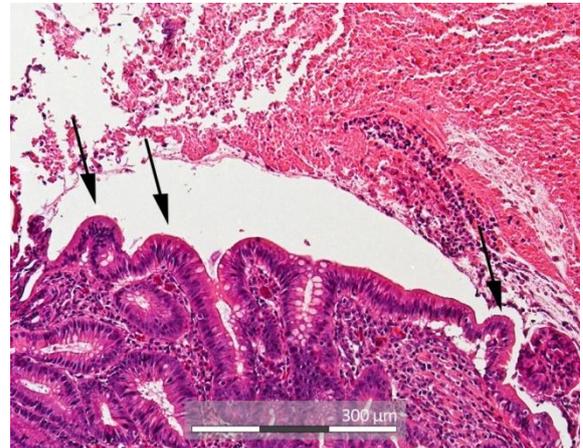


Abb. 88 Unreife Zottenregenerate.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET83

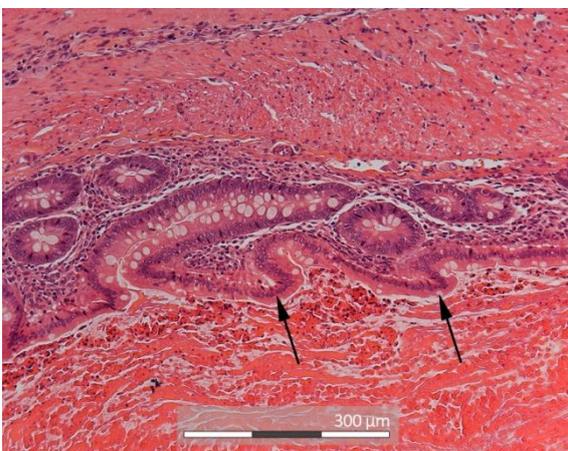


Abb. 89 Kurze Zottenregenerate.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET81



Abb. 90 Divertikel.
Regenerationsdauer: 60 Tage, Präparat: ET81

4. DISKUSSION

4.1 Biomechanische Stabilität

Das *small intestinal tissue engineering* hat zum Ziel, defizitäres oder fehlendes Dünndarmgewebe durch ein rekonstruiertes, funktionstüchtiges Gewebe zu ersetzen, um damit Patienten, die an einem Kurzdarmsyndrom erkrankt sind, in Zukunft eine kurative Therapie zu ermöglichen. Eine Schrumpfung dieses konstruierten Organersatzes ist als äußerst kritisch zu bewerten, weil bei diesen Patienten eine ausreichend große Resorptionsfläche wieder hergestellt werden muss. Daher ist es von immanenter Bedeutung geeignete Biomaterialien für die Dünndarmregeneration hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber den lokal vorherrschenden Umwelteinflüssen zu untersuchen.

In aktuellen Studien hinsichtlich der biomechanischen Stabilität geeigneter Zellträgermaterialien wurden diverse synthetische Materialien und die *small intestinal submucosa* (SIS), eine Kollagenmatrix, die aus der Submukosa des Dünndarms von Schweinen hergestellt wird, getestet. Bisherige Erkenntnisse sprechen dafür, dass synthetische Polyester mit einem hohen Anteil an Polyglykolsäure (engl. *polyglycolic acid*, PGA) und einem niedrigen Anteil an Poly-L-Lactid (engl. *poly-L-lactic acid*, PLLA) eine geringere Schrumpfung aufweisen, als kollagene SIS-Extrazellulärmatrizes (EZM). Jedoch wurden bisher noch keine vergleichenden Studien durchgeführt, die synthetische und biogene Materialien unter einheitlichen Versuchsbedingungen getestet haben (vgl. 1.5).

Deshalb ist es ein Ziel dieser Forschungsarbeit eine synthetische Polyester-Matrix (ETHISORB® Dura Patch), eine 4-lagige SIS-Matrix (Surgisis® 4-Layer Tissue Graft) und 2 weitere Kollagenmatrizes (Chondro-Gide®, TUTOPATCH®), die anderen Organen bzw. Tieren abstammen und bisher noch nicht für die Dünndarmregeneration angewendet wurden, unter einheitlichen Bedingungen, hinsichtlich ihrer biomechanischen Eigenschaften *in vivo* zu untersuchen (vgl. 1.6). Folgende Resultate erzielte die makroskopische Analyse der Präparate:

Die durchgeführten Experimente erzielten keine Ergebnisse in der Versuchsreihe mit dem Surgisis® 4-Layer Tissue Graft. Es war weder nach 30 noch nach 60 Tagen möglich die Länge des Regenerats der SIS-Matrix zu ermitteln, da nach der Entnahme aller Präparate in dieser Versuchsreihe die Matrizes mit dem regenerierten Gewebe makroskopisch nicht eindeutig von der nativen Darmmukosa abzugrenzen waren. In 3 von 4 Präparaten, die nach 30 Tagen entnommen wurden, zeigten sich im Lumen des vermuteten Patch-tragenden Bereichs jedoch deutliche Rückstände der SIS-Matrix (vgl. 3.1.1). Außerdem konnten in der mikroskopischen Begutachtung der Präparate eindeutig Kollagenstrukturen nachgewiesen werden, die dem Fremdmaterial zuzuordnen sind (vgl. 3.2.2).

Zur Erklärung dieser Befunde kommt in erster Linie ein methodischer Fehler in Frage, da mikroskopisch eindeutig Patchgewebe nachweisbar ist und der Patch-tragende Bereich demnach übersehen wurde. Möglicherweise wurde nur die äußerste Schicht der vierlagigen, tubularisierten SIS-Matrix von Zellen besiedelt, während die inneren Schichten als eine stabilisierende Schiene für das Konstrukt dienten. Diese haben sich im Verlauf abgelöst und konnten später intraluminal aufgefunden werden. Da in allen 4 Proben nach 60 Tagen keine intraluminalen Rückstände identifizierbar waren, ist es denkbar, dass diese entweder über die Enterostomata ausgeschieden oder im Laufe der Zeit aufgespalten und resorbiert wurden.

Ähnliche Schwierigkeiten bei der Identifikation des Patch-tragenden Dünndarmsegments beschreiben bereits Chen und Badylak, weil dessen Größe, Struktur und Konsistenz identisch zu nativem Gewebe waren (Chen und Badylak, 2001). Die Tatsache, dass eine makroskopische Abgrenzung zwischen nativem und regeneriertem Darmgewebe deutlich erschwert ist, spricht dafür, dass die SIS sehr gut mit dem nativen Darm kompatibel ist. Frühere Untersuchungen, in denen eine vergleichbare Versuchsanordnung gewählt wurde, berichten allerdings von einer bedeutsamen In-vivo-Schrumpfung dieser kollagenen EZM (Chen und Badylak, 2001; Lee et al., 2008; Wang et al., 2005).

Die TUTOPATCH®-Kollagenmatrix und der synthetische ETHISORB® Dura Patch zeigen das erwartete Schrumpfungsverhalten. In der deskriptiven Auswertung verzeichnet der TUTOPATCH® im Median nach 30 Tagen In-vivo-Regenerationsdauer eine erhaltene prozentuale Restlänge von 75 %, nach 60 Tagen nur noch von 25 %. Der ETHISORB® Dura Patch ist zu beiden zeitlichen Endpunkten deutlich weniger geschrumpft. Nach 30 Tagen sind noch 87,5 % der Matrixlänge erhalten, nach 60 Tagen noch 50 % (vgl. 3.1.3 und 3.1.4).

In der Versuchsreihe mit der kollagenen Chondro-Gide®-Matrix sind paradoxe Ergebnisse zu verzeichnen. Nach einer kürzeren Regenerationsdauer von 30 Tagen ist die erhaltene Restlänge des Patches im Median kürzer ($\tilde{x}_{t1} = 27,5 \%$) als nach 60 Tagen Regenerationsdauer ($\tilde{x}_{t2} = 35 \%$). Der Chondro-Gide® ist demnach statistisch innerhalb von 30 Tagen stärker geschrumpft als innerhalb von 60 Tagen (vgl. 3.1.2). Eine Ursache für diese scheinbar widersprüchliche Beobachtung könnte in dem geringen Stichprobenumfang in den einzelnen Versuchsreihen und der damit verbundenen Ausreißer-Problematik zu finden sein. Eine andere Erklärung wäre, dass der Chondro-Gide® initial stark schrumpft und im weiteren Verlauf wieder expandiert. Solch ein biomechanisches Verhalten für kollagene Biomaterialien wurde bisher noch nicht beschrieben. Letztendlich können diese als paradox erscheinenden Ergebnisse nur durch weitere Experimente verifiziert werden.

Die deskriptiven Untersuchungen der Versuchsreihen mit dem Chondro-Gide® und dem TUTOPATCH® demonstrieren erstmals, dass diese bisher noch nicht untersuchten Kollagenmatrizes ebenfalls in vivo schrumpfen, so wie es bereits für die SIS-Matrix beschrieben wur-

de. Bei ausnahmslos allen ausgewerteten Präparaten zeigt sich eine Schrumpfung der Matrix. In keinem Fall ist eine Verlängerung des Dünndarmersatzes festzustellen.

Mit nichtparametrischen Testverfahren wurden die Unterschiede in der Länge der Regenerate bzw. Matrizes zu den 3 festgelegten Endpunkten und dadurch ihre Schrumpfung auf Signifikanz geprüft (vgl. 2.4.7). Anhand des Friedman-Tests ist in den Versuchsreihen mit dem TUTOPATCH® und dem ETHISORB® Dura Patch ein signifikanter Unterschied zwischen den Patchlängen zu den Zeitpunkten t_0 , t_1 und t_2 nachweisbar ($p = 0,028$ in beiden Versuchsreihen).

In der Versuchsreihe mit dem Chondro-Gide® zeigt sich keine signifikante Schrumpfung im Friedman-Test ($p = 0,194$), obwohl in dieser Versuchsreihe die stärkste mediane Schrumpfung nach 30 Tagen unter allen Materialien beobachtet wird. Dieses Resultat ist durch die starke Streuung der Einzelwerte in dieser Versuchsreihe ($IQR_{t1} = 10$ mm; $IQR_{t2} = 8$ mm) bei gleichzeitig geringem Stichprobenumfang erklärbar. Exakte Tests, wie sie hier angewendet wurden, sind bei starker Streuung eingeschränkt aussagekräftig, weil sie kardinal skalierte Messwerte in eine ordinal skalierte Rangreihenfolge transformieren und lediglich potenzielle Unterschiede in der zentralen Tendenz aufzeigen (vgl. 2.4.7). Daher wurde zusätzlich der Wilcoxon-Test als Post-Hoc-Test durchgeführt, weil dieser separat auf signifikante Unterschiede in der Patchlänge zum Zeitpunkt t_0 und t_1 bzw. t_0 und t_2 testet. Dabei zeigt sich ein deutlicher Trend zwischen Tag 0 und Tag 30, der ebenfalls für eine Schrumpfung in der Versuchsreihe mit dem Chondro-Gide® spricht ($p = 0,063$).

Signifikante Unterschiede sind jedoch in keiner Versuchsreihe mit dem Wilcoxon-Test nachweisbar. Jedoch weisen neben dem Chondro-Gide® auch der ETHISORB® Dura Patch zwischen Tag 0 und Tag 30 und der TUTOPATCH® zwischen Tag 0 und Tag 60 deutliche Trends auf, die für eine Schrumpfung dieser Materialien sprechen ($p = 0,063$ in allen Versuchsreihen).

Neben der Frage, ob in den einzelnen Versuchsreihen eine In-vivo-Schrumpfung nachweisbar ist, besteht ein wesentliches Interesse dieser Arbeit darin, Unterschiede zwischen den verwendeten Materialien herauszuarbeiten. Zwischen den Versuchsreihen mit den kollagenen Matrizes Chondro-Gide® und TUTOPATCH® ist im Mann-Whitney-U-Tests weder nach 30 ($p = 0,343$) noch nach 60 Tagen ($p = 0,2$) Regenerationsdauer ein signifikanter Unterschied festzustellen. Infolgedessen wird angenommen, dass die beiden Kollagenmatrizes in gleichem Maße schrumpfen.

Die sehr ähnliche biochemische Zusammensetzung von Chondro-Gide® und TUTOPATCH® ist eine mögliche Erklärung für das vergleichbare biomechanische Verhalten dieser EZMs. Beide Kollagenmatrizes werden mittels spezieller, firmeneigener Dezellularisierungsprozesse aus tierischen Geweben hergestellt. Der TUTOPATCH® besteht zu 98 % aus Kollagen Typ I und

wird aus bovinem Perikard gewonnen. Die genaue Zusammensetzung und Gewebespezifität des Chondro-Gide® wird vom Hersteller geheim gehalten. Es ist jedoch bekannt, dass er aus porcinem Gewebe gewonnen wird und die natürlichen Strukturproteine (Kollagen Typ I und Typ III) des Bindegewebes beinhaltet. Beide Matrices haben eine zweischichtige Struktur, wobei eine Schicht undurchlässig für Flüssigkeiten ist. Bei beiden Herstellungsprozessen werden keine zusätzlichen Veränderungen an der natürlichen, dreidimensionalen Kollagenstruktur vorgenommen (vgl. 2.3.1.2 und 2.3.1.3).

Auch die SIS-EZM beinhaltet hauptsächlich die natürlichen Strukturproteine des Bindegewebes, zeichnet sich aber insbesondere dadurch aus, dass bei ihrer Herstellung Wachstumsfaktoren konserviert werden (vgl. 2.3.1.1). Das biomechanische Verhalten der SIS wurde bereits in vergleichbaren Tierexperimenten, bei denen ebenfalls die Ratte als Tiermodell diente, untersucht. Wang et al. etablierten 2003 eine Versuchsanordnung, um die biomechanischen Eigenschaften 4-lagiger-SIS-Matrices zu testen. Auf dieser Versuchsanordnung basieren die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente (vgl. 2.1). Auch Lee et al. bezogen sich darauf und untersuchte ebenfalls 4-lagige-SIS-EZMs (vgl. 1.5). Die Ergebnisse bzgl. der In-vivo-Schrumpfung der SIS bei diesen Untersuchungen sind heterogen.

Wang et al. und Demirbilek et al. beschreiben nach 4 Wochen Regenerationszeit eine vergleichbare Schrumpfung der SIS von 22,1 % bzw. 23,33 %. Zwischen 4 und 8 Wochen beobachten Wang et al. lediglich eine geringfügige Schrumpfung auf 25,6 %. Dagegen berichten Lee et al. nach 4-wöchiger Regenerationszeit bereits eine Schrumpfung von 60 % und nach 8 Wochen von 71 % (vgl. 1.5).

Die eigens ermittelte mediane Schrumpfung in der Versuchsreihe mit TUTOPATCH® zeigt nach 30 Tagen eine vergleichbare Schrumpfung wie sie Wang et al. und Demirbilek et al. für die SIS wiedergeben ($\tilde{x}_{t1} = 25 \%$). In der Versuchsreihe mit dem Chondro-Gide®-Patch wird hingegen nach 30 Tagen bereits eine deutlich stärkere Schrumpfung gemessen ($\tilde{x}_{t1} = 62,5 \%$), so wie sie Lee et al. festgestellt haben. Nach 60 Tagen Regenerationsdauer besteht in beiden Versuchsreihen eine Schrumpfung von 65 bzw. 75 % und damit in der Größenordnung wie sie Lee et al. bestimmt haben.

Wie für die kollagenen Matrices kann mit Hilfe des Friedman-Tests ebenso eine signifikante Schrumpfung des ETHISORB® Dura Patch nachgewiesen werden ($p = 0,028$). Der ETHISORB® Dura Patch ist eine voll-synthetische Matrix, die zu 90 % aus Polyglykolsäure (PGA) und zu 10 % aus Poly-L-Lactid (PLLA) besteht (zusammen Polylactid-co-Glycolid, PLGA, vgl. 2.3.2). Dieses Material wurde für die Versuche der vorliegenden Arbeit ausgewählt, da bisherige Untersuchungen aufzeigen, dass synthetische Matrices aus Polyestern mit einem hohen Anteil an PGA die geringste Schrumpfung aufweisen (Boomer et al., 2013; Chen et al., 2006). Chen et al. haben unterschiedliche mikroporöse, biologisch abbaubare Polyester aus PGA, Poly-L-Lactid (*poly-L-lactic acid*, PLLA) bzw. Kombinationen aus diesen zu unterschiedlichen

Anteilen (Polylactid-co-Glycolid, *PLGA*) für die Regeneration von Dünndarmmukosa untersucht. Die Matrices wurden zuvor mit intestinalen Stammzellen besät und als Zell-Matrix-Konstrukte in Form eines Tubus in das Omentum majus von Lewis-Ratten implantiert. Sie ermitteln für reine *PGA*-Matrices nach 4 Wochen Regenerationszeit eine Schrumpfung von 12 %, für *PGA*-Matrices mit einem geringfügigen Anteil an *PLLA* (2 bzw. 5 %) eine Schrumpfung von 3 bis 4 % und für *PGA*-Matrices mit einem erhöhten *PLLA*-Anteil (50 bzw. 75 %) eine Schrumpfung von 42 %.

Die mediane Schrumpfung in der Versuchsreihe mit dem ETHISORB® Dura Patch beträgt nach ca. 4 Wochen Regenerationszeit 12,5 %. Chen et al. registrieren eine etwas geringere Schrumpfung (3 – 4 %) für vergleichbare *PGA*-Matrices mit einem geringfügigen Anteil an *PLLA*. Die Ergebnisse dieser Arbeit bringen erstmals Resultate zu synthetischen Materialien über eine längere Regenerationsdauer hervor. Im Median ist der ETHISORB® Dura Patch nach 60 Tagen um 50 % seiner Ausgangslänge geschrumpft.

Aktuelle Studien, die sich mit der In-vivo-Schrumpfung von Zellträgermaterialien beschäftigen, zeigen auf, dass synthetische Materialien weniger schrumpfen, als kollagene EZMs: Während für die *SIS* nach 4 Wochen Regenerationszeit eine Schrumpfung im Bereich von 22,1 bis 81 % angegeben wird, liegt im gleichen Zeitraum die Schrumpfung von synthetischen Materialien zwischen 3 und 46 %. Auch die deskriptiven Untersuchungen der eigenen Versuchsreihen zeigen, dass synthetische Materialien über bessere biomechanische Stabilität verfügen: Während die kollagenen Matrices nach 30 Tagen minimal um 20 und maximal 75 % schrumpfen ($\bar{x}_{t1} = 35 \%$), verzeichnet der ETHISORB® Dura Patch zum gleichen Zeitpunkt eine Schrumpfung zwischen 5 und 25 % ($\bar{x}_{t1} = 10 \%$). Auch nach 60 Tagen ist ein Unterschied erkennbar: Kollagene Matrices schrumpfen zwischen 25 und 85 % ($\bar{x}_{t2} = 75 \%$), während der synthetische Patch zwischen 30 und 50 % ($\bar{x}_{t2} = 50 \%$) schrumpft (vgl. 1.5).

Anhand des Mann-Whitney-U-Tests wurde geprüft, ob die geringere Schrumpfung des synthetischen Materials signifikant ist. Nach 30 Tagen Regenerationszeit zeigt sich eine signifikant geringere Schrumpfung des ETHISORB® Dura Patch im Vergleich zu den Kollagenmatrices ($p = 0,012$). Nach 60 Tagen ist keine signifikant geringere Schrumpfung nachweisbar, jedoch ist ein Trend erkennbar, der für eine geringere Schrumpfung spricht ($p = 0,092$).

Der direkte Vergleich zwischen dem ETHISORB® Dura Patch und dem Chondro-Gide®-Patch zeigt ebenfalls eine signifikant geringere Schrumpfung des synthetischen Zellträgers nach 30 Tagen ($p = 0,029$). Nach 60 Tagen ist kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsreihen nachweisbar ($p = 0,3$). Im Vergleich zum TUTOPATCH® ist sowohl nach 30 als auch nach 60 Tagen ein Trend erkennbar, der für eine geringe Schrumpfung des ETHISORB® Dura Patch spricht ($p = 0,086$ an beiden Endpunkten).

Anhand der durchgeführten Experimente im Rahmen dieser Arbeit, ist es möglich, sowohl für den TUTOPATCH® als auch für den ETHISORB® Dura Patch, eine signifikante Schrumpfung nachzuweisen. Beim Chondro-Gide® ist nach 30 Tagen ein Trend erkennbar, der für eine Schrumpfung spricht. Dadurch kann erstmals gezeigt werden, dass auch andere kollagene Matrizes einer Schrumpfung unterliegen, wie dies bereits in verschiedenen Publikationen zur SIS dargelegt wurde. Hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften der SIS können die durchgeführten Versuche keine neuen Erkenntnisse herbeiführen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bzgl. der Schrumpfung von Chondro-Gide® und TUTOPATCH® zeigen keinen signifikanten Unterschied, sodass ein vergleichbares Schrumpfungsverhalten für Kollagenmatrizes angenommen wird, obwohl sich der Herstellungsprozess beider Matrizes unterscheidet. Darüber hinaus können bisherige Publikationen darin bestätigt werden, dass auch synthetische Matrizes schrumpfen. Erstmals liegen mit Hilfe der durchgeführten Experimente auch Daten hinsichtlich der Schrumpfung von synthetischen Materialien nach 60 Tagen Regenerationszeit vor. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen kollagenen und synthetischen Materialien: Nach 30 Tagen Regenerationszeit ist eine signifikant geringere Schrumpfung für die synthetische Matrix zu verzeichnen. Nach 60 Tagen sind zudem deutliche Trends erkennbar, die ebenfalls für eine geringere Schrumpfung des synthetischen Zellträgers sprechen.

Der Stichprobenumfang in den einzelnen Versuchsreihen ist sehr gering. Anhand nichtparametrischer und exakter Testverfahren ist es trotzdem möglich signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsreihen zu demonstrieren. Jedoch ist es notwendig nachfolgende Untersuchungen mit größeren Versuchsreihen durchzuführen, um die Resultate der vorliegenden Arbeit zu verifizieren. Das Tiermodell stellt derzeit die einzige Möglichkeit dar, Materialeigenschaften unter realistischen In-vivo-Bedingungen zu testen. Ein allgemeines Problem wissenschaftlicher Arbeiten mit einem tierexperimentellen Versuchsansatz ist jedoch die eingeschränkte Wiederholbarkeit der Experimente aus berechtigten, ethischen Gründen.

Der Vergleich der Ergebnisse zwischen verschiedenen Publikationen ist problematisch. Das *small intestinal tissue engineering* ist ein junges Forschungsfeld. Daher existieren bisher nur wenige Publikationen, die sich mit vergleichbaren Fragestellungen beschäftigt haben. Die Auswahl an unterschiedlichen Biomaterialien ist groß. Unterschiedliche Versuchsanordnungen wurden gewählt, die sich u. a. in der Auswahl des Tiermodells oder der chirurgischen Technik unterscheiden. Eine etablierte Methode ist z. B. die Matrix vor Implantation in den Empfängerorganismus mit intestinalen Epithelorganoideinheiten zu besäen. Möglicherweise verfügen solche Zell-Matrix-Konstrukte über bessere biomechanische Eigenschaften, da die Zellen dem Konstrukt zusätzliche Stabilität verleihen. Ebenso haben die Erfahrung des versuchsdurchführenden Chirurgen sowie die ansteigende Lernkurve bei zunehmender Versuchsanzahl, einen relevanten Einfluss auf die Resultate. Dies zeigte sich bei den eigenen

Experimenten auch daran, dass zu Beginn der Versuchsdurchführung die Letalität der Versuchstiere größer und im weiteren Verlauf abnehmend war.

Im Gegensatz zu synthetischen Materialien, deren Herstellungsprozess standardisierbar ist, sind EZMs individuelle, biologische Produkte, die sich nur zu einem gewissen Grad gleichen können. Untersuchungen weisen darauf hin, dass die mechanischen Eigenschaften der EZMs von der Gewebespezifität und -herkunft, der Hydratation, der 3-dimensionalen Beschaffenheit sowie der terminalen Sterilisation der Matrix abhängen. Tottey et al. fanden z. B. heraus, dass die Zugfestigkeit und der Gehalt an Wachstumsfaktoren bei jüngeren Schweinen größer ist als bei älteren (Tottey et al., 2011). In den eigenen Versuchen zeigt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Schrumpfung zwischen den angewendeten kollagenen Matrices. Weitere Kollagenmatrices sollten getestet werden, um herauszufinden, ob spezielle Matrixeigenschaften einen relevanten Einfluss auf die biomechanische Stabilität haben.

Wegen der erschwerten Vergleichbarkeit verschiedener Publikationen aufgrund der Anwendung unterschiedlicher Materialien und Methoden, wurde eine geringe Stichprobenanzahl in den eigenen Versuchsreihen in Kauf genommen, um dem Forschungsdesiderat nachgehen zu können, möglichst viele Materialien unter einheitlichen Versuchsbedingungen zu testen. Eine wesentliche Stärke der vorliegenden Arbeit ist auch darin zu sehen, dass erstmals sowohl kollagene als auch synthetische Matrices direkt miteinander verglichen werden.

4.2 Dünndarmregeneration

Die Anforderungen an das ideale Zellträgermaterial für die Regeneration von Dünndarmgewebe sind umfangreich. Wie bereits erläutert müssen sie ausreichend biomechanische Stabilität gewährleisten. Eine weitere wesentliche Aufgabe der Matrix besteht darin, die Zelladhäsion, -migration, -proliferation und -differenzierung sowie Neovaskularisation und Umbauprozesse durch ortsansässige Zellen zu ermöglichen, damit ein histologisch vollständiger Organersatz auf dem Biomaterial etabliert werden kann. Das Zellträgermaterial sollte keine Immunreaktionen beim Empfänger hervorrufen und im Verlauf vollständig durch dessen Organismus resorbiert werden, sodass allein das Regenerat zurückbleibt, das die physiologischen Funktionen des nativen Gewebes ausübt.

Daher bestand, neben der Analyse der biomechanischen Eigenschaften von unterschiedlichen Materialien, ein weiteres Interesse dieser Arbeit darin, auch ihre Fähigkeit für die Dünndarmregeneration zu untersuchen, dem sogenannten regenerativen Potenzial. Von unterschiedlichen Autoren wird postuliert, dass EZMs die natürliche Mikroumgebung des Regenerats besser imitieren können als synthetische Materialien, weil sie per se über die notwendigen Zellinteraktionsmechanismen verfügen (Badylak, 2007). Andrée et al. sind sogar der Ansicht, dass eine organspezifische EZM, die demselben Organ abstammt, das regeneriert werden soll,

von Natur aus über die besten Eigenschaften zur Regeneration verfügt (Andrée et al., 2013). Außerdem werden bei synthetischen Matrices gehäuft immunologische Reaktionen beobachtet, die ihr regenerative Potenzial möglicherweise beeinträchtigen (Boomer et al., 2013; Chen et al., 2006; Choi und Vacanti, 1997).

Die mikroskopische Analyse der vorliegenden Arbeit untersucht das regenerative Potenzial der verwendeten Materialien. Der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft dient als organspezifische, xenogene Referenzmatrix. Er wird aus der Submukosa des Dünndarms von Schweinen hergestellt. Zwei weitere organunspezifische Kollagenmatrices, der Chondro-Gide® und der TUTOPATCH®, sowie der synthetische ETHISORB® Dura Patch dienen als Kontrollen. Alle Regenerate wurden nach 30 bzw. 60 Tagen aus dem Situs entnommen, histotechnisch aufgearbeitet und nach histomorphologischen Kriterien begutachtet (vgl. 2.4.6).

Zunächst ist festzustellen, dass in allen Versuchsreihen Mukosaregeneration nachgewiesen werden kann und die Regeneration einer Neomukosa auf Biomaterialien gemeinsamen Prinzipien folgt: Während sich die Mukosa in unterschiedlichem Ausmaß auf dem Patch erneuert, zeigt die Muskularis lichtmikroskopisch in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung keine Regeneration. Zunächst wird die Matrix durch Granulationsgewebe infiltriert und Kapillaren wachsen hinein. Eine geschlossene Epithelschicht breitet sich ausgehend von der Anastomose auf der luminalen Patchoberfläche aus. Dort finden sich neben Epithelzellen mit Mikrovilli auch Becherzellen. Im weiteren Verlauf bilden sich die gewebespezifischen Krypten sowie vereinzelte Zotten aus. Ihre Morphologie ist zunächst plump und unreif; sie entwickeln sich jedoch qualitativ und quantitativ im Verlauf, wodurch die Lamina epithelialis der Mukosa zunehmend an Breite gewinnt. Bei der Etablierung einer Neomukosa auf den ausgewählten Biomaterialien ist eine deutliche Analogie zur sekundären Wundheilung im Sinne der Defektheilung eines Ulkus zu erkennen (vgl. 3.2.1).

Beim Surgisis® 4-Layer Tissue Graft stellen sich die charakteristischen Strukturen nach 30 Tagen Regenerationszeit im Vergleich zu allen anderen Matrices quantitativ und morphologisch sehr unreif dar. Sowohl die Epithelialisierung der Patchoberfläche ($\bar{x}_{t1} = 3,4$ mm) als auch die Länge der Neomukosa ($\bar{x}_{t1} = 0,5$ mm) sind im Median am kürzesten. Die absolute Anzahl an Kryptenregeneraten je Anastomose ist die geringste ($\bar{x}_{t1} = 3,5$) und lediglich eine Zotte konnte in 3 Präparaten aufgefunden werden. Bemerkenswert ist die morphologische Entwicklung zwischen Tag 30 und 60. Nach 60 Tagen Regenerationsdauer hat sich eine Mukosa auf dem Patch etabliert, die morphologisch gegenüber allen anderen Matrices das beste Resultat erzielt hat. Die luminal Patchoberfläche ist im Median zu 95 % von Regeneratepithel bedeckt und es haben sich zahlreiche, mehrreihige Krypten ausgebildet, die sehr eng beieinanderstehen, von wenig Bindegewebe umgeben werden und in den Patch tiefreichend eindringen (vgl. Abb. 44). Dadurch erreicht die Neomukosa eine ca. doppelt so große Breite ($\bar{x}_{t1} = 0,8$ mm) wie bei allen anderen Materialien. Im Median finden sich nach 60 Tagen die

meisten Krypten. Ebenso zeigen sich vergleichsweise viele, schlanke Zotten (vgl. Abb. 47 und Abb. 48). Darüber hinaus zeigte sich auf der Schweinedarmsubmukosa wenig entzündliche Aktivität.

Auch vorherige Untersuchungen beschreiben frühestens nach 4 Wochen das Auftreten eines Regeneratepithels auf der *SIS*. Lee et al. und Wang et al. berichten nach 8 Wochen von einer noch nicht vollständigen, ca. 70%igen Oberflächenbedeckung, bei der die zentrale Patchregion noch ausgespart bleibt (Wang et al., 2005; Lee et al., 2008). Die eigenen Resultate sind damit vergleichbar. Dagegen beschreiben Demirbilek et al. bereits nach 6 Wochen eine vollständige Mukosaregeneration inklusive säulenförmiger Epitheleinstülpungen, Zotten, Becherzellen und gut organisierten Gefäßneubildungen auf der *SIS*-Matrix (Demirbilek et al., 2003). Eine mögliche Erklärung für diese deutlichen Unterschiede ist in den verschiedenen, chirurgischen Methoden zu finden. Während bei Lee et al., Wang et al. und in den Versuchen zu dieser Arbeit ein tubuläres *SIS*-Segment in den Darm interponiert wurde, haben Demirbilek et al. das Darmsegment lediglich längs inzidiert und eine ellipsoide *SIS* eingefügt. Bei diesen Versuchen ist die Anastomose, von wo aus die Regeneration beginnt, zwischen nativem Darm und Matrix größer. Nach 12 Wochen Regenerationszeit wird in allen Untersuchungen der vorhandenen Literatur von einer vollständigen Neomukosa auf der *SIS*-Oberfläche berichtet, die dem histologischen Phänotyp nativer Darmmukosa gleicht.

Wie bei der *SIS* wird ebenso beim Chondro-Gide® und beim TUTOPATCH® Mukosaregeneration auf der Matrix mikroskopisch nachgewiesen. Nach 30 Tagen Regenerationszeit ist die absolute oberflächliche Epithelialisierung unter den kollagenen Matrices vergleichbar

(Surgisis® 4-Layer Tissue Graft: $\tilde{x}_{t1} = 3,4$ mm; Chondro-Gide®: $\tilde{x}_{t1} = 4,7$ mm; TUTOPATCH®: $\tilde{x}_{t1} = 5,1$ mm). Zu diesem Zeitpunkt erscheint die Histomorphologie von Chondro-Gide® und TUTOPATCH® ähnlich. Beide weisen, im Vergleich zum Surgisis® 4-Layer Tissue Graft ($\tilde{x}_{t1} = 3,5$), im Median eine etwa doppelt so hohe Anzahl an Krypten pro Anastomose auf ($\tilde{x}_{t1} = 8$; bzw. $\tilde{x}_{t1} = 9$). In der Versuchsreihe mit dem Chondro-Gide® sind an Tag 30 die zahlreichsten Zotten zu finden und Krypten treten vereinzelt am weitesten distal der Anastomose auf (Neomukosalänge: $\tilde{x}_{t1} = 1,6$ mm, vgl. Abb. 54), während beim TUTOPATCH® die Krypten enger zusammenstehen (vgl. Abb. 65). Nach 30 Tagen Regenerationszeit zeigen beide EZMs ein morphologisch reiferes Bild als die *SIS*.

Im zeitlichen Verlauf entwickelt sich die Mukosaarchitektur beim Chondro-Gide® besser als beim TUTOPATCH®. Die Länge des Regeneratepithels sowie die Anzahl an Krypten und Zotten haben sich beim Chondro-Gide® 60 Tage nach Implantation ungefähr verdoppelt. Die Gesamtmorphologie in den Präparaten des Chondro-Gide® ist unterschiedlich. In einem Präparat präsentiert sich bereits eine Morphologie mit nahezu vollständiger Oberflächenepithelialisierung und gut ausgebildeter Neomukosa (vgl. Abb. 58 und Abb. 59).

In anderen Präparaten zeigen sich aber ebenso abnorme Strukturen, wie ein Divertikel (vgl. Abb. 57) oder hyperplastische Kryptenregenerate (vgl. Abb. 55). Der TUTOPATCH® weist im Median zu diesem Zeitpunkt die geringste Epithelialisierung der Patchoberfläche und die geringste Anzahl an Krypten und Zotten unter den kollagenen Matrices auf. Darüber hinaus sind in beiden Versuchsreihen vermehrt entzündliche Prozesse in Form lokalisierter Mikroabszesse auf der Matrix festzustellen (vgl. Abb. 50). Vor allem der TUTOPATCH® zeigt eine hohe Entzündungsaktivität 60 Tage nach Implantation (vgl. Abb. 62).

Auch auf dem synthetischen ETHISORB® Dura Patch konnte mikroskopisch Mukosaregeneration festgestellt werden. Er überzeugt sowohl 30 als auch 60 Tage nach Implantation durch eine sehr gute absolute Epithelialisierung der luminalen Patchoberfläche ($\tilde{x}_{t1} = 10,9$ mm; $\tilde{x}_{t2} = 11,8$ mm). Nach 30 Tagen sind wenige Krypten je Anastomose zu beobachten ($\tilde{x}_{t1} = 6$). Diese sind weit distal der Anastomosen zu finden, allerdings treten sie dort nur vereinzelt auf, anstatt in Gruppen (vgl. Abb. 84). Außerdem dringen sie nicht in die Tiefe des Patches vor, weshalb sich lediglich eine schmale, unreife Neomukosa präsentiert (vgl. Abb. 83). Eine ähnliche Neomukosaarchitektur ist nach 60 Tagen Regenerationszeit zu finden. Zwar haben sich vermehrt Krypten an der luminalen Patchoberfläche ausgebildet, so dass die Krypten enger beieinanderstehen sowie zahlreiche, kleine Epithelausstülpungen, die als Zottenregenerate gedeutet werden können, jedoch hat die Breite der Neomukosa kaum zugenommen (vgl. Abb. 85). Auch die Weiterentwicklung in vertikaler Richtung hat stagniert: Weder das Regeneratepithel, noch die Neomukosa haben wesentlich an Länge zugenommen.

Thompson et al. zeigte erstmals, dass es möglich ist Dünndarmmukosa auf synthetischen PGA-Matrices zu regenerieren. Nach 2 Wochen Regenerationszeit beschreibt er ebenso eine sehr dünne Schicht Neomukosa auf der luminalen Patchseite, jedoch treten Zotten bereits regelmäßiger auf, die zentral an Größe abnehmen und in ein einschichtiges Regeneratepithel münden. Unreife Zotten sind im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche beim ETHISORB® Dura Patch erst nach 8 Wochen registriert worden (vgl. Abb. 88). Außerdem wird von Thompson et al. berichtet, dass nach 8 Wochen bereits die gesamte lumenale Matrixoberfläche von Neomukosa bedeckt wird, und dass glattes Muskelgewebe auf dem Patch zu beobachten ist. Auch diese Feststellung widerspricht deutlich den Resultaten der vorliegenden Arbeit, da bei den durchgeführten Versuchen zu diesem Zeitpunkt nur ca. 50 % der Patchoberfläche mit Regeneratepithel bedeckt ist. Thompson et al. beschreiben demnach ein deutlich besseres regeneratives Potenzial für PGA-Matrices. Eine Erklärung hierfür kann einerseits in der andersartigen Versuchsanordnung zu finden sein: Ein 10 cm² großer Ileumdefekt wurde mit einer PGA-Matrix gedeckt. Des Weiteren beschreiben sie eine deutlich stärkere Schrumpfung für die PGA-Matrix (Thompson et al., 1986). Eine Schrumpfung führt jedoch zur Reduktion der Gesamtoberfläche und damit zu einer Zunahme der relativen Oberflächenbedeckung.

Choi und Vacanti sowie Chen et al. verwendeten bei ihren Versuchen unterschiedliche synthetische Matrizes, die zuvor in vitro mit intestinalen Epithelorganoideinheiten besät wurden. Ein wesentlicher Unterschied in der Versuchsanordnung bestand außerdem darin, dass diese Matrizes nicht als Interponat in die Dünndarmpassage integriert, sondern als Zell-Matrix-Konstrukte ohne Kontakt zur Darmpassage in das Omentum majus von Lewis-Ratten implantiert wurden. Auch mit dieser Methode ist es möglich eine Neomukosa auf synthetischen Materialien zu etablieren. Dabei zeigten Chen et al., dass Materialien aus *PGA* mit einer größeren Faserdicke von 13-15 μm und Porengröße von 250 μm Durchmesser, die zuvor mit *PLLA* (2 bzw. 5%ig) behandelt wurden, die signifikant größere Oberflächenbedeckung mit Neomukosa aufweisen: nach 4-wöchiger Regenerationszeit im Mittel 31 bzw. 36 %. In den meisten Präparaten, in denen es nicht zur Obliteration des Lumens kam, war sogar eine nahezu vollständige Mukosaregeneration zu beobachten (Chen et al., 2006; Choi und Vacanti, 1997). Bei den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen, konnte nach 30 Tagen Regenerationszeit nur ein Präparat ausgewertet werden. Hier zeigt sich lediglich eine Oberflächenbedeckung mit Neomukosa und Regeneratepithel von ca. 10 %. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede ist, dass die Matrizes bei den anderen Arbeiten vor Implantation mit intestinalen Epithelorganoideinheiten behandelt wurden. Möglicherweise steigert diese Methode das regenerative Potenzial der Materialien.

Synthetische Matrizes sind Fremdmaterialien, die durch den Empfängerorganismus abgebaut werden und immunologische Reaktionen hervorrufen können. In den histologischen Präparaten des ETHISORB® Dura Patches sind die VICRYL®-Filamente noch nach 60 Tagen nachweisbar und erscheinen sehr groß, starr und stabil (vgl. Abb. 73). Zwischen Tag 30 und Tag 60 unterliegen die Patchfasern einem deutlichen Umbauprozess. Die klare Faseranordnung, wie sie sich nach 30 Tagen darstellt, ist aufgehoben. Einzelne homogene Filamente, sind nicht mehr zu sehen (vgl. Abb. 76). Auch Choi und Vacanti sowie Chen et al. beschreiben nach 4 Wochen Residuen polymerer Fasern, wohingegen Thompson et al. berichten, dass die *PGA*-Matrix bereits nach 4 Wochen nahezu vollständig abgebaut wurde.

Außerdem registrieren Choi und Vacanti das Auftreten inflammatorischer Riesenzellen, welche Ausdruck für Fremdkörperreaktionen sind. In den für diese Arbeit angefertigten Präparaten mit dem ETHISORB® Dura Patch zeigen sich an Tag 30 ebenfalls histiozytäre Riesenzellen, die damit beginnen das Fremdmaterial zu phagozytieren (vgl. Abb. 75) und an Tag 60 finden sich massenhaft schaumzellige Makrophagen, die ein Ausdruck für fortgeschrittene Fremdkörperresorption sind (vgl. Abb. 76). Ebenso beschreiben alle Autoren Anzeichen für Entzündungsreaktionen. Auch in den Präparaten dieser Arbeit ist das Auftreten hochgradiger entzündlicher Aktivität bei der synthetischen Matrix besonders auffällig. Es zeigen sich lokale Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten und nekrotischem Material. Dies spricht für vermehrt abszedierende Prozesse im Patch (vgl. Abb. 77 bis Abb. 79).

In der Zusammenschau der Gesamtmorphologie zeigt der synthetische ETHISORB® Dura Patch in den vorliegenden Präparaten das geringste regenerative Potenzial für Dünndarmmukosa. Er zeigt zwar in allen Versuchsreihen die beste Oberflächenbedeckung mit Regeneratepithel, was dafür spricht, dass die Epithelzellen gut auf der Matrixoberfläche anhaften. Alle anderen charakteristischen Strukturen sind jedoch unreif. Die Breite der Neomukosa, die zu Beginn wegen des Mangels an Zotten vor allem durch die Krypten bestimmt wird, ist zu beiden zeitlichen Endpunkten im Vergleich mit den kollagenen EZMs am geringsten. Daher lässt sich vermuten, dass die synthetische 3-dimensionale Faserstruktur die Zellmigration in die Tiefe des Patches erschwert.

Krypten findet man im Median ebenfalls zahlreicher in den Versuchsreihen mit den Kollagenmatrizes. Sie treten dort auch vielfach in Gruppen auf, seltener vereinzelt wie beim ETHISORB® Dura Patch. Das vermehrte Auftreten dieser charakteristischen, morphologischen Strukturen ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass das Potenzial für die Regeneration von Dünndarmmukosa bei den EZMs größer ist. Darüber hinaus ist eine starke Fremdkörperreaktionen gegen die *PGA*-Fasern sowie das häufigere Auftreten abszedierender Prozesse auf der synthetischen Matrix festzustellen. Diese reaktiven Prozesse verändern möglicherweise das biochemische Milieu innerhalb der Matrix und hemmen dadurch die Geweberegeneration.

Einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Kollagenmatrizes Chondro-Gide® und TUTOPATCH® auf Grundlage der mikroskopischen Analyse herauszuarbeiten, ist schwierig, da sich beide in der Gesamtschau der Präparate heterogen präsentieren. Beim Surgisis® 4-Layer Tissue Graft ist das auffälligste Merkmal die beträchtliche morphologische Entwicklung zwischen dem 30. und 60. Tag. Während sich an Tag 30 seine Histomorphologie im Vergleich zum Chondro-Gide® und TUTOPATCH® unreifer darstellt, zeigt sich an Tag 60 eine deutlich höher entwickelte Mukosaarchitektur als bei den anderen kollagenen EZMs. Eine Theorie, die erklären könnte warum die gewebespezifische EZM zu Beginn der Regenerationsphase ein schlechteres Resultat erzielt als gewebunspezifische EZMs und im weiteren Verlauf sein regeneratives Potenzial deutlich steigert, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht herleitbar. Möglicherweise ist dieses Phänomen auf die kleine Stichprobengröße des Experiments zurückzuführen.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass der organspezifische Surgisis® 4-Layer Tissue Graft über das größte Potenzial zur Dünndarmregeneration verfügt. Die Theorie von Andrée et al., die besagt, dass die Charakteristika einer EZM, die demselben Gewebe oder Organ abgeleitet werden, den erforderlichen Eigenschaften für die Reparation desselben Gewebes oder Organs am besten entsprechen, wird dadurch bestätigt (Andrée et al., 2013). Die organspezifische Matrix verfügt möglicherweise über die bessere 3-dimensionale Struktur und die spezifischen Adhäsionsproteine für den Zell-Matrix-Kontakt und damit die Fähigkeit, die

Zellmigration und -adhäsion für das Mukosaepithel besser zu vermitteln (Badylak et al., 2001, Pu, 2005; Yang et al., 2010). Der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft unterscheidet sich vom Chondro-Gide® und TUTOPATCH® neben seiner Organspezifität auch darin, dass in ihm Wachstumsfaktoren (FGF-2, CTGF, TGF- β) beim Herstellungsprozess konserviert bleiben (vgl. 2.3.1.1). Möglicherweise sind Wachstumsfaktoren ein Schlüssel, um das regenerative Potenzial von Biomaterialien zusätzlich zu steigern. Außerdem sprechen mehrere Autoren der SIS immunsuppressive und antibakterielle Eigenschaften zu (Sarıkaya et al., 2002; Palmer et al., 2002; Ansaloni et al., 2007). Auch in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen zeigt sich auf der Schweinedarmsubmukosa wenig entzündliche Aktivität.

Eine weitere Besonderheit des Surgisis® 4-Layer Tissue Graft zeigt sich bei der makroskopischen Analyse der Präparate. Nach longitudinaler Eröffnung des Lumens, im vermuteten Patch-tragenden Bereich, wurden Rückstände der Matrix vorgefunden. Diese waren intraluminal gelegen und in tubularisierter Form vorhanden (vgl. 3.1.1). Derartige Patch-rückstände wurden bei den anderen Zellträgermaterialien nicht beobachtet. Vermutlich wurde nur die äußerste Schicht der vierlagigen SIS-Matrix von Zellen besiedelt. Die inneren Schichten dienten dabei als eine stabilisierende Schiene für das Konstrukt. Auch der Verbund von mehreren Schichten der SIS könnte bei der Regeneration von Dünndarmmukosa einen Vorteil bringen.

Bei den Experimenten dieser Arbeit wurde auf der luminalen Seite des Surgisis® 4-Layer Tissue Graft vor Implantation eine Nanometer dünne Titanschicht aufgetragen, weil Untersuchungen zeigen, dass sich diese positiv auf die Epithelialisierung, Zelladhäsion und -vitalität von Biomaterialien auswirkt (Guldner et al., 2009). Der Vergleich zu bisherigen Publikationen im Bereich des *small intestinal tissue engineering* bei denen die SIS ohne Titanisierung verwendet wurde, zeigt zum jetzigen Zeitpunkt keinen deutlichen Vorteil für die Anwendung dieses biomedizinischen Veredelungsverfahrens.

Die lichtmikroskopische Analyse histologischer Präparate mit nur einer Färbemethode, ohne die Zuhilfenahme weiterer histotechnischer Möglichkeiten, unterliegt Einschränkungen. Die statistisch-deskriptive Auswertung der definierten Zielparameter diente der besseren Vergleichbarkeit der Präparate untereinander (vgl. 2.4.8). Bei der primären Begutachtung wurde eine Vorauswahl an geeigneten Präparaten vorgenommen. Dabei stand wesentlich im Vordergrund, Präparate mit geeigneter Schnittebene zu identifizieren, bei der beide Anastomosenbereiche und die Patchregion deutlich abgebildet waren. Mit dieser Vorauswahl wurde eine Stichprobenverzerrung (engl. *selection bias*) in Kauf genommen. Außerdem ist unklar, inwieweit vereinzelte Schnittebenen repräsentativ für das Gesamtpräparat sind. Die Fallzahlen des Experiments sind zudem gering. Pro Versuchsreihe war es lediglich möglich 3 bis 6 aussagekräftige Präparate zu identifizieren. Aus diesen Gründen wurde auf eine Signifikanzanalyse im Rahmen der histologischen Auswertung verzichtet.

Bei der Beurteilung der Regeneration und der Zellarchitektur der Matrizes darf der Aspekt der Schrumpfung nicht vernachlässigt werden. Häufig wird in der Literatur die Oberflächenbedeckung mit Neomukosa in relativen Zahlen angegeben. Jedoch führt die Schrumpfung einer Matrix zur Reduktion ihrer Gesamtoberfläche und damit bei gleichbleibender absoluter Oberflächenbedeckung zur Zunahme der relativen Oberflächenbedeckung: Umso stärker die Schrumpfung, desto größer ist die prozentuale Bedeckung der Matrixoberfläche mit Neomukosa. Folglich ist es wichtig, dass die Unterschiede mit absoluten Zahlenwerten begründet werden. Diese Vorgabe muss auch in etwaigen folgenden histologischen Untersuchungen berücksichtigt werden!

Des Weiteren ist die Morphologie der Neomukosa lediglich ein Surrogatparameter für das regenerative Potenzial. Letztendlich ist entscheidend, inwieweit das durch *tissue engineering* (TE) hergestellte Organ die zahlreichen und komplexen physiologischen Funktionen des Dünndarms erfüllt und der Patient mit Kurzdarmsyndrom von diesem Organersatz profitiert.

Eine detaillierte histologische Beschreibung von Dünndarmregeneraten, die sich auf unterschiedlichen Biomaterialien ausbilden, dient einem besseren Verständnis für die Bedeutung und Zusammensetzung der Komponenten der Mikroumgebung auf die Regenerationsprozesse. Dadurch ist es unter Umständen in Zukunft möglich das regenerative Potenzial von Zellträgermaterialien zusätzlich zu steigern, z. B. durch Zusätze an Wachstumsfaktoren oder Veränderungen der Matrixstruktur durch biomedizinische Verfahren.

4.3 Fazit und Ausblick

In dieser Forschungsarbeit wurden eine synthetische PLGA-Matrix (ETHISORB® Dura Patch), eine 4-lagige SIS-Matrix (Surgisis® 4-Layer Tissue Graft) und 2 bisher noch nicht untersuchte kollagene EZMs (Chondro-Gide® und TUTOPATCH®) erstmals unter einheitlichen Versuchsbedingungen getestet.

Die makroskopische Analyse untersuchte die biomechanischen Eigenschaften dieser Materialien. Die erste Alternativhypothese ($H_{A,1}$) bestätigt sich für den kollagenen TUTOPATCH® und den synthetischen ETHISORB® Dura Patch. Beide Materialien weisen eine signifikante Schrumpfung mit zunehmender In-vivo-Regenerationsdauer auf. Für die kollagene Chondro-Gide®-Matrix ist eine deutliche Tendenz erkennbar, die für eine Schrumpfung zwischen Tag 0 und Tag 30 spricht. Erstmals wird dadurch auch eine Schrumpfung für bisher noch nicht untersuchte Kollagenmatrizes nachgewiesen. Für das Schrumpfungsverhalten des Surgisis® 4-Layer Tissue Graft können die durchgeführten Experimente keine neuen Resultate erzielen.

Die Kollagenmatrizes zeigen eine vergleichbare Schrumpfung. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Patchlänge des Chondro-Gide® und des TUTOPATCH® nach 30 und

60 Tagen festgestellt werden. Die zweite Nullhypothese ($H_{0,2}$) wird daher für kollagene Matrizes beibehalten. Der synthetische ETHISORB® Dura Patch schrumpft nach 30 Tagen Regenerationsdauer signifikant weniger als die kollagenen Matrizes. Nach 60 Tagen sind weiterhin deutliche Trends erkennbar, die für eine bessere biomechanische Stabilität des synthetischen Zellträgers sprechen. Die zweite Alternativhypothese ($H_{A,2}$), die von einer geringeren Schrumpfung synthetischer Materialien ausgeht, wird angenommen.

Die mikroskopische Analyse untersuchte das regenerative Potenzial der verwendeten Zellträgermaterialien, also ihre Fähigkeit zur Dünndarmregeneration. Auf dem organspezifischen Surgisis® 4-Layer Tissue Graft präsentiert sich nach 60 Tagen Regenerationszeit die beste Neomukosamorphologie unter allen ausgewerteten Präparaten. Die regenerierte Mukosa auf den organunspezifischen Kollagenmatrizes Chondro-Gide® und TUTOPATCH® stellt sich heterogen dar. Ein deutlicher Unterschied zwischen diesen Materialien kann daher nicht aufgezeigt werden. Der synthetische ETHISORB® Dura Patch zeigt das geringste regenerative Potenzial. Die charakteristischen Merkmale für Dünndarmmukosa sind auf diesem synthetischen Zellträger deutlich weniger ausgeprägt im Vergleich zu den kollagenen Matrizes. Darüber hinaus sind in zahlreichen Präparaten dieser Versuchsreihe deutlicher Fremdkörperreaktionen und abszedierende Prozesse zu beobachten.

Die Resultate der mikroskopischen Analyse bekräftigen die in der Literatur angeführte Theorie, dass EZMs über ein größeres regeneratives Potenzial verfügen als synthetische Materialien, weil sie die natürliche Mikroumgebung des Regenerats besser imitieren können. Deshalb wird die dritte Arbeitshypothese ($H_{A,3}$) angenommen: Die organspezifische Matrix, der Surgisis® 4-Layer Tissue Graft verfügt über das beste erneuerbare Potenzial für Dünndarmmukosa unter den ausgewerteten Zellträgermaterialien. Auf den organunspezifischen kollagenen Matrizes, Chondro-Gide® und TUTOPATCH® zeigt sich eine qualitativ besserer Histomorphologie der Neomukosa als beim synthetischen ETHISORB® Dura Patch. Dieser synthetische Zellträger weist in den durchgeführten Experimenten das geringste Potenzial für die Regeneration von Dünndarmmukosa auf.

Eine wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit, die erstmals synthetische und kollagene Zellträgermaterialien direkt miteinander vergleicht, ist, dass synthetische Materialien sich als biomechanische stabiler erweisen, die Kollagenmatrizes jedoch über ein besseres regeneratives Potenzial verfügen. Diese Diskrepanz verdeutlicht die Notwendigkeit neue Zellträgermaterialien zu entwickeln, die den Anforderungen für die Dünndarmregeneration besser entsprechen. Ein halbsynthetischer Zellträger, der auf seiner luminalen Seite aus extrazellulären Matrixkomponenten und auf seiner Außenseite aus stabilisierenden synthetischen Fasern besteht, könnte beispielsweise Fortschritte erzielen, weil dieser beide immanent wichtigen Eigenschaften für das *small intestinal tissue engineering* in einem Material vereinen würde.

Unerlässlich ist es in künftigen Forschungsvorhaben den Fokus auf die Anwendung von Zell-Matrix-Konstrukten zu legen. In einigen Versuchen wurden bereits Zellen bzw. Organoide mit Erfolg für die Dünndarmregeneration angewendet. Eine experimentelle Methode, bei der intestinale Epithelorganoideinheiten auf die Zellträgermaterialien vor der Implantation in den Empfängerorganismus aufgebracht werden, ist vielversprechend. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, ohne die Anwendung von Zellen oder Organoideinheiten, lassen im Vergleich zu ähnlichen Untersuchungen mit Zell-Matrix-Konstrukten vermuten, dass die Biokompatibilität von Zellträgermaterialien durch die Besiedlung mit Zellen verbessert und die Geweberegeneration optimiert wird. Insbesondere bei großen Defekten ist davon auszugehen, dass die Defektdeckung mit Neomukosa schneller erfolgt. Das Gewebe muss nicht mehr über beliebig lange Strecken vom Rand her einwachsen, sondern kann sich an Ort und Stelle aus den Organoiden ausbilden. Vergleichende Studien, die der Anwendung von Zell-Matrix-Konstrukten einen signifikanten Vorteil bei der Dünndarmregeneration belegen können, stehen allerdings noch aus. Darüber hinaus stellt sich die Frage, welchen Effekt diese Methode auf die biomechanische Stabilität der Zellträgermaterialien hätte.

Weitere biotechnische Verfahren zur Steigerung des regenerativen Potenzials oder der biomechanischen Eigenschaften von Materialien sollten detailliert erforscht werden, da sich z. B. Zusätze von Wachstumsfaktoren förderlich für die Regeneration erweisen. Auch weitere biomedizinische Verfahren zur Veränderung der 3-dimensionalen Matrixstruktur, wie z. B. die Veredelung der Matrixoberfläche mit Titan, stehen zur Verfügung und sollten für die Anwendung im Bereich des *small intestinal tissue engineering* getestet werden.

Umfangreiche Forschungs- und Entwicklungsarbeit muss weiterhin geleistet werden, damit ein durch *TE* hergestellter Dünndarmersatz in Zukunft Patienten mit einem Kurzdarmsyndrom als kurative Therapiemöglichkeit angeboten werden kann. Der kausale Einfluss unterschiedlicher Matrixeigenschaften und Herstellungsprozesse der Materialien auf das Schrumpfungsverhalten sind unzureichend untersucht. Hilfreich hierfür wäre vor allem die Mitarbeit pharmazeutischer Unternehmen, die ihre Prozesse und Matrixzusammensetzungen offenlegen könnten. Außerdem ist die Bedeutung der Kombination unterschiedlicher Matrixkomponenten, wie die Strukturproteine, die Mixtur aus Wachstumsfaktoren und die Varianten an Glykosaminoglykanen, Hormonen und anderen Signalmolekülen, für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionsmechanismen noch und nicht ausreichend gut verstanden.

Des Weiteren gilt es zu überprüfen, ob dieser konstruierte Organersatz in der Lage ist, die mannigfaltigen und komplexen physiologischen Funktionen von Dünndarmgewebe zu erfüllen. Eine große Herausforderung wird außerdem darin bestehen, *small intestinal tissue engineering* in größeren Tiermodellen zur Anwendung zu bringen, die den Dimensionen der menschlichen Anatomie besser entsprechen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Kurzdarmsyndrom ist eine potenziell lebensbedrohende Erkrankung, bei der nach ausgedehnter Resektion längerer Darmabschnitte dem Körper nicht ausreichend Nährstoffe zur Verfügung gestellt werden können. Die derzeitigen Therapiemöglichkeiten sind limitiert. *Small Intestinal Tissue Engineering* ist ein innovatives Forschungsfeld, das zum Ziel hat Dünndarmgewebe mit Hilfe biotechnischer Verfahren zu entwickeln. Eine etablierte experimentelle Methode ist es Zellträgermaterialien in einen Empfängerorganismus zu implantieren, wo das Implantat sich zu einem vollwertigen Organersatz entwickelt. Als Zellträgermaterialien stehen sowohl synthetische Polymere als auch biogene, auf Kollagen basierende, Extrazellulärmatrizes zur Verfügung.

Das wesentliche Ziel dieses Forschungsvorhabens ist es, synthetische und kollagene Matrizes unter einheitlichen Versuchsbedingungen zu testen. In einer tierexperimentellen Versuchsanordnung wurde ein organspezifischer, kollagener Zellträger (Surgisis® 4-Layer Tissue Graft), 2 weitere kommerziell verfügbare, organunspezifische kollagene Matrizes (Chondro-Gide®, TUTOPATCH®) sowie ein synthetischer Patch (ETHISORB® Dura Patch) in vivo zwischen 2 Dünndarmsegmente bei Ratten interponiert und nach 30 und 60 Tagen entnommen. Die Länge der Regenerate wurde makroskopisch vermessen und die Präparate histologisch hinsichtlich ihrer Neomukosamorphologie analysiert.

In der Versuchsreihe mit dem TUTOPATCH® und ETHISORB® Dura Patch kann eine signifikante Schrumpfung nachgewiesen werden. Beim Chondro-Gide® zeigt sich ein deutlicher Trend, der ebenfalls für eine Schrumpfung spricht. In der Versuchsreihe mit dem Surgisis® 4-Layer Tissue Graft war es nicht möglich Patchlängen zu den genannten Endpunkten zu erheben. Auf Grundlage der Ergebnisse wird angenommen, dass kollagene Matrizes ein vergleichbares Schrumpfungsverhalten in vivo aufweisen, da zwischen den Kollagenmatrizes kein signifikanter Unterschied festgestellt werden kann. Gegenüber diesen weist der synthetische ETHISORB® Dura Patch eine signifikant geringere Schrumpfung auf.

In der histologischen Analyse zeigt der organspezifische Surgisis® 4-Layer Tissue Graft das größte Potenzial für die Regeneration von Dünndarmgewebe. Die Mukosaarchitektur auf den organunspezifischen Kollagenmatrizes präsentiert sich heterogen. Auf dem synthetische ETHISORB® Dura Patch werden gehäuft entzündliche Prozesse sowie Fremdkörperreaktionen festgestellt. Diese sind eine mögliche Ursache dafür, dass sich auf dieser polymeren Matrix eine deutlich schlechtere Neomukosa präsentiert.

Es bestätigt sich die aus bisherigen Untersuchungen abgeleitete Hypothese, dass synthetische Matrizes bessere biomechanische Eigenschaften hinsichtlich einer In-vivo-Schrumpfung aufweisen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Extrazellulärmatrizes unabhängig von ihrer Gewebespezifität, Herkunft oder ihrem Herstellungsprozess gleichwertige me-

chanische Eigenschaften inne haben. Erstmals wird auch eine Schrumpfung für bisher noch nicht untersuchte Kollagenmatrizes nachgewiesen.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit bekräftigen außerdem die Theorie, dass Extrazellulärmatrizes aus Kollagen über ein größeres regeneratives Potenzial verfügen als synthetische Materialien und dass eine organspezifische Matrix, die aus Dünndarmsubmukosa hergestellt wird, die besten Erfolge für die Regeneration von Dünndarmmukosa erzielt.

Sowohl die biomechanische Stabilität als auch das regenerative Potenzial sind gleichwertige, immanent wichtige Materialeigenschaften für das *small intestinal tissue engineering*. Daher ist es erforderlich, weiterhin Forschungs- und Entwicklungsarbeit in die Untersuchung der dreidimensionalen Beschaffenheit von Biomaterialien sowie deren Auswirkungen auf die Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen zu investieren. Darüber hinaus muss die Anwendung von Wachstumsfaktoren, Stammzellen und neuer biotechnischer Verfahren zur Verbesserung der Matriceigenschaften erprobt sowie neue Zellträgermaterialien entwickelt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Alexandrakis E: Magenulkuskrankheit. In: Thomas C (Hrsg.): Histopathologie. 14. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2006. S. 137.
- Allen JW, Bhatia SN: Engineering liver therapies for the future. *Tissue Eng* 2002. 8: 725–737.
- Andrée B, Bär A, Haverich A, Hilfiker A: Small intestinal submucosa segments as matrix for tissue engineering: review. *Tissue Eng Part B Rev* 2013. 19: 279–291.
- Ansaloni L, Cambrini P, Catena F, Di Saverio S, Gagliardi S, Gazzotti F, Hodde JP, Metzger DW, D'Alessandro L, Pinna AD: Immune response to small intestinal submucosa (surgisis) implant in humans: preliminary observations. *J Invest Surg* 2007. 20: 237–241.
- Badylak SF: The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* 2007. 28: 3587–3593.
- Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA: Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res* 1989. 47: 74–80.
- Badylak S, Kokini K, Tullius B, Whitson B: Strength over time of a resorbable bioscaffold for body wall repair in a dog model. *J Surg Res* 2001. 99: 282–287.
- Beath SV, Gowen H, Puntis JWL: Trends in paediatric home parenteral nutrition and implications for service development. *Clin Nutr* 2011. 30: 499–502.
- Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML: Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2011. 2: 403–430.
- Bianchi A: Intestinal loop lengthening - A technique for increasing small intestinal length. *J Pediatr Surg* 1980. 15: 145–151.
- Bines JE, Taylor RG, Justice F, Paris MCJ, Sourial M, Nagy E, Emselle S, Catto-Smith AG, Fuller PJ: Influence of diet complexity on intestinal adaptation following massive small bowel resection in a preclinical model. *J Gastroenterol Hepatol* 2002. 17: 1170–1179.
- Bitar KN, Raghavan S: Intestinal tissue engineering: current concepts and future vision of regenerative medicine in the gut. *Neurogastroenterol Motil* 2012. 24: 7–19.
- Boomer L, Liu Y, Mahler N, Johnson J, Zak K, Nelson T, Lannutti J, Besner GE: Scaffolding for challenging environments: Materials selection for tissue engineered intestine. *J Biomed Mater Res A* 2014. 102: 3795–3802.
- Bortz J, Lienert GA, Boehnke K: Verteilungsfreie und parametrische Tests. In: Bortz J, Lienert GA, Boehnke K (Hrsg.): Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2008. a. S. 79–86.

- Bortz J, Lienert GA, Boehnke K: Analyse von Rangdaten. In: Bortz J, Lienert GA, Boehnke K (Hrsg.): Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2008. b. S. 197–294.
- Bueno J, Ohwada S, Kocoshis S, Mazariegos GV, Dvorchik I, Sigurdsson L, Di Lorenzo C, Abu-Elmagd K, Reyes J: Factors impacting the survival of children with intestinal failure referred for intestinal transplantation. *J Pediatr Surg* 1999. 34: 27–32.
- Chen DC, Avansino JR, Agopian VG, Hoagland VD, Woolman JD, Pan S, Ratner BD, Stelzner M: Comparison of polyester scaffolds for bioengineered intestinal mucosa. *Cells Tissues Organs* 2006. 184: 154–165.
- Chen MK, Badylak SF: Small bowel tissue engineering using small intestinal submucosa as a scaffold. *J Surg Res* 2001. 99: 352–358.
- Choi RS, Riegler M, Pothoulakis C, Kim BS, Mooney D, Vacanti M, Vacanti JP: Studies of brush border enzymes, basement membrane components, and electrophysiology of tissue-engineered neointestine. *J Pediatr Surg* 1998. 33: 991–997.
- Choi RS, Vacanti JP: Preliminary studies of tissue-engineered intestine using isolated epithelial organoid units on tubular synthetic biodegradable scaffolds. *Transplant Proc* 1997. 29: 848–851.
- Cosentino M, Gaya JM, Breda A, Palou J, Villavicencio H: Alloplastic bladder substitution: are we making progress? *Int Urol Nephrol* 2012. 44: 1295–1303.
- Demirbilek S, Kanmaz T, Ozardali I, Edali MN, Yücesan S: Using porcine small intestinal submucosa in intestinal regeneration. *Pediatr Surg Int* 2003. 19: 588–592.
- Dodge ME, Bertolo RF, Brunton JA: Enteral feeding induces early intestinal adaptation in a parenterally fed neonatal piglet model of short bowel syndrome. *J Parenter Enteral Nutr* 2012. 36: 205–212.
- Fishbein TM: Intestinal transplantation. *N Engl J Med* 2009. 361: 998–1008.
- Gekle M: Funktion des Magen-Darm-Trakts, Energiehaushalt und Ernährung. In: Klinker R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (Hrsg.): Physiologie. 6. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010. S. 416–499.
- Gonzalez R, Fugate K, McClusky D 3rd, Ritter EM, Lederman A, Dillehay D, Smith CD, Ramshaw BJ: Relationship between tissue ingrowth and mesh contraction. *World J Surg* 2005. 29: 1038–1043.
- Green H, Kehinde O, Thomas J: Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979. 76: 5665–5668.
- Grikscheit TC, Ogilvie JB, Ochoa ER, Alsberg E, Mooney D, Vacanti JP: Tissue-engineered colon exhibits function in vivo. *Surgery* 2002. 132: 200–204.

- Grikscheit T, Ochoa ER, Srinivasan A, Gaissert H, Vacanti JP: Tissue-engineered esophagus: experimental substitution by onlay patch or interposition. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003. 126: 537–544.
- Guldner NW, Jasmund I, Zimmermann H, Heinlein M, Girndt B, Meier V, Flüss F, Rohde D, Gebert A, Sievers H-H: Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium with titanium coating: a new technology for cardiovascular tissue engineering. *Circulation* 2009. 119: 1653–1660.
- Harvard Stem Cell Institute: Joseph Vacanti, MD.
2015.<http://www.hsci.harvard.edu/people/joseph-vacanti-md> (Tag des Zugriffs 03.01.2016)
- Holman RC, Stoll BJ, Curns AT, Yorita KL, Steiner CA, Schonberger LB: Necrotising enterocolitis hospitalisations among neonates in the United States. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006. 20: 498–506.
- Hounnou G, Destrieux C, Desmé J, Bertrand P, Velut S: Anatomical study of the length of the human intestine. *Surg Radiol Anat* 2002. 24: 290–294.
- Jeppesen PB, Gilroy R, Pertkiewicz M, Allard JP, Messing B, O’Keefe SJ: Randomised placebo-controlled trial of teduglutide in reducing parenteral nutrition and/or intravenous fluid requirements in patients with short bowel syndrome. *Gut* 2011. 60: 902–914.
- Jeppesen PB, Mortensen PB: Enhancing bowel adaptation in short bowel syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 2002. 4: 338–347.
- Jochum W, Baretton G: Schleimhautdefekte: Erosion und Ulkus. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg.): *Pathologie*. 5. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag; 2012. S. 559–561.
- Karikkineth BC, Zimmermann W-H: Myocardial tissue engineering and heart muscle repair. *Curr Pharm Biotechnol* 2013. 14: 4–11.
- Kelly DA: Intestinal failure-associated liver disease: what do we know today? *Gastroenterology* 2006. 130: S70–77.
- Khan WS, Hardingham TE: Cartilage tissue engineering approaches applicable in orthopaedic surgery: the past, the present, and the future. *J Stem Cells* 2012. 7: 97–104.
- Kim BS, Mooney DJ: Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998. 16: 224–230.
- Kim HB, Fauza D, Garza J, Oh J-T, Nurko S, Jaksic T: Serial transverse enteroplasty (STEP): a novel bowel lengthening procedure. *J Pediatr Surg* 2003. 38: 425–429.
- Klinge U, Klosterhalfen B, Müller M, Ottinger AP, Schumpelick V: Shrinking of polypropylene mesh in vivo: an experimental study in dogs. *Eur J Surg* 1998. 164: 965–969.

- Kummer W, Welsch U: Rumpfdarm. In: Welsch U (Hrsg.): Lehrbuch Histologie. 4. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag; 2014. S. 361–390.
- Lacher M, von Schweinitz D, Ure Benno, Ure B: Kurzdarmsyndrom. In: von Schweinitz D, Ure Benno, Ure B (Hrsg.): Kinderchirurgie. 2. Aufl. Berlin: Springer Medizin Verlag; 2013.
- Lamprecht G, Pape U-F, Witte M, Pascher A, DGEM Steering Committee: S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin e. V. in Zusammenarbeit mit der AKE, der GESKES und der DGVS. *Aktuel Ernährungsmed* 2014. 39: 57–71.
- Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 1993. 260: 920–926.
- Lang G: Hämatoxylin-Eosin-Färbung. In: Lang G (Hrsg.): Histotechnik. Wien: Springer Medizin Verlag; 2013. S. 197–204.
- Lee M, Chang PCY, Dunn JCY: Evaluation of small intestinal submucosa as scaffolds for intestinal tissue engineering. *J Surg Res* 2008. 147: 168–171.
- Lipkin M: Growth and development of gastrointestinal cells. *Annu Rev Physiol* 1985. 47: 175–197.
- Lüllmann-Rauch R: Speiseröhre und Magen-Darm-Kanal. In: Lüllmann-Rauch R (Hrsg.): Taschenlehrbuch Histologie. 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. a. S. 386–412.
- Lüllmann-Rauch R: Bindegewebe im eigentlichen Sinn. In: Lüllmann-Rauch R (Hrsg.): Taschenlehrbuch Histologie. 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. b. S. 121–140.
- Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA: Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008. 372: 2023–2030.
- MacNeil S: Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* 2007. 445: 874–880.
- Maemura T, Shin M, Sato M, Mochizuki H, Vacanti JP: A tissue-engineered stomach as a replacement of the native stomach. *Transplantation* 2003. 76: 61–65.
- Modi BP, Javid PJ, Jaksic T, Piper H, Langer M, Duggan C, Kamin D, Kim HB: First report of the international serial transverse enteroplasty. Data registry: indications, efficacy, and complications. *J Am Coll Surg* 2007. 204: 365–371.
- Nucci A, Burns RC, Armah T, Lowery K, Yaworski JA, Strohm S, Bond G, Mazariegos G, Squires R: Interdisciplinary management of pediatric intestinal failure: a 10-year review of rehabilitation and transplantation. *J Gastrointest Surg* 2008. 12: 429–436.
- Nützenadel W: Kurzdarmsyndrom. In: Lentze MJ, Schaub J, Schulte FJ, Spranger J (Hrsg.): Pädiatrie. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2007. S. 930–931.
- Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ, Atala A: De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1999. 17: 149–155.

- O'Brien DP, Nelson LA, Huang FS, Warner BW: Intestinal adaptation: structure, function, and regulation. *Semin Pediatr Surg* 2001. 10: 56–64.
- O'Connor N, Mulliken J, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H: Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981. 1: 75–78.
- Olieman JF, Penning C, Ijsselstijn H, Escher JC, Joosten KF, Hulst JM, Tibboel D: Enteral nutrition in children with short-bowel syndrome: current evidence and recommendations for the clinician. *J Am Diet Assoc* 2010. 110: 420–426.
- Orlando G, Wood KJ, Stratta RJ, Yoo JJ, Atala A, Soker S: Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future. *Transplantation* 2011. 91: 1310–1317.
- Palmer EM, Beilfuss BA, Nagai T, Semnani RT, Badylak SF, van Seventer GA: Human helper T cell activation and differentiation is suppressed by porcine small intestinal submucosa. *Tissue Eng* 2002. 8: 893–900.
- pfm medical ag: Oberflächenbehandlung mit Niederdruckplasma. 2015. <http://www.pfmmedical.com/de/produktion/technologien/niederdruckplasma/index.html> (Tag des Zugriffs 15.03.2014)
- Pu LLQ: Small intestinal submucosa (Surgisis) as a bioactive prosthetic material for repair of abdominal wall fascial defect. *Plast Reconstr Surg* 2005. 115: 2127–2131.
- Riede U-N, Walch A, Wiestler OD: Regeneration. In: Riede U-N, Werner M, Schäfer H-E (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2004. S. 330–337.
- Royall D, Wolever TM, Jeejeebhoy KN: Evidence for colonic conservation of malabsorbed carbohydrate in short bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 1992. 87: 751–756.
- Salvia G, Guarino A, Terrin G, Cascioli C, Paludetto R, Indrio F, Lega L, Fanaro S, Stronati M, Corvaglia L, Tagliabue P, De Curtis M, Working Group on Neonatal Gastroenterology of the Italian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition: Neonatal onset intestinal failure: an Italian Multicenter Study. *J. Pediatr.* 2008. 153: 674–676, 676.e1–2.
- Sarikaya A, Record R, Wu C-C, Tullius B, Badylak S, Ladisch M: Antimicrobial activity associated with extracellular matrices. *Tissue Eng* 2002. 8: 63–71.
- Schiebler TH: Organe des Verdauungssystems. In: Schiebeler TH (Hrsg.): *Anatomie*. 9. Aufl. Berlin: Springer Medizin Verlag; 2005. S. 562–592.
- Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 2001. 344: 532–533.
- Steiger E, Srp F: Morbidity and mortality related to home parenteral nutrition in patients with gut failure. *Am J Surg* 1983. 145: 102–105.

- Stock UA, Vacanti JP: Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 2001. 52: 443–451.
- Struijs MC, Diamond IR, de Silva N, Wales PW: Establishing norms for intestinal length in children. *J Pediatr Surg* 2009. 44: 933–938.
- Sudan D: Long-term outcomes and quality of life after intestine transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2010. 15: 357–360.
- Sudan D, DiBaise J, Torres C, Thompson J, Raynor S, Gilroy R, Horslen S, Grant W, Botha J, Langnas A: A multidisciplinary approach to the treatment of intestinal failure. *J Gastrointest Surg* 2005. 9: 165–177.
- Sudan D, Thompson J, Botha J, Grant W, Antonson D, Raynor S, Langnas A: Comparison of intestinal lengthening procedures for patients with short bowel syndrome. *Ann Surg* 2007. 246: 593–604.
- Thompson JS, Kampfe PW, Newland JR, Vanderhoof JA: Growth of intestinal neomucosa on prosthetic materials. *J Surg Res* 1986. 41: 484–492.
- Tortora GJ, Derrickson BH: Dünndarm. In: Tortora GJ, Derrickson BH (Hrsg.): *Anatomie und Physiologie*. 1. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag; 2006. S. 1070–1080.
- Tottey S, Johnson SA, Crapo PM, Reing JE, Zhang L, Jiang H, Medberry CJ, Reines B, Badylak SF: The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties. *Biomaterials* 2011. 32: 128–136.
- Tsai RJ, Li LM, Chen JK: Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000. 343: 86–93.
- Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R: Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg* 1988. 23: 3–9.
- Wales PW, Christison-Lagay ER: Short bowel syndrome: epidemiology and etiology. *Semin Pediatr Surg* 2010. 19: 3–9.
- Wales PW, de Silva N, Kim J, Lecce L, To T, Moore A: Neonatal short bowel syndrome: population-based estimates of incidence and mortality rates. *J Pediatr Surg* 2004. 39: 690–695.
- Wang ZQ, Watanabe Y, Noda T, Yoshida A, Oyama T, Toki A: Morphologic evaluation of regenerated small bowel by small intestinal submucosa. *J Pediatr Surg* 2005. 40: 1898–1902.
- Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A: Experimental assessment of small intestinal submucosa as a small bowel graft in a rat model. *J Pediatr Surg* 2003. 38: 1596–1601.
- Yang B, Zhou L, Sun Z, Yang R, Chen Y, Dai Y: In vitro evaluation of the bioactive factors preserved in porcine small intestinal submucosa through cellular biological approaches. *J Biomed Mater Res A* 2010. 93: 1100–1109.

7. ANHANG

7.1 Auflistungen verwendeter Materialien

Tab. 10 Auflistung aller verwendeten Geräte und Medikamente, die für die Narkosedurchführung und intraoperative Schmerztherapie benötigt wurden

Gerät	Fabrikat	Hersteller
Narkosemittelverdampfer (umgewidmeter Halothan- oder Enfluran-Vapor)	DRÄGER Vapor 19.3	Dräger Medical Deutschland GmbH
Durchflusssensor	MEDAP Flowmeter (doppelt)	MAQUET GmbH & Co. KG
Narkosebox aus Plexiglas für Nagetiere (L/B/H: 300/150/160 mm)		
Narkosemaske für Mäuse und kleine Nager (Acrylglas, Latex, incl. Gaszuleitungs-Adapter)		
Zuleitungsschläuche		
Wärmedecke		
Medikamente		
Isofluran p.i.		
Sauerstoff p.i.		
Metamizol i.p. 1g		

Tab. 11 Auflistung des mikrochirurgischen OP-Instrumentariums und aller Verbrauchsmaterialien, die für die Durchführung des operativen Eingriffs verwendet wurden

Mikrochirurgisches OP-Instrumentarium	Chirurgische Verbrauchsmaterialien
2 OP-Scheren (stumpf, spitz)	1 Einwegrasierer
2 Pinzetten (anatomisch, chirurgisch)	Cutasept (Propan-2-ol)
2 Klemmen	1 steril verpacktes OP-Abdecktuch
1 Nadelhalter	1 steril verpacktes Lochtuch
1 Skalpell 15	Nahtmaterial VICRYL® 4.0 und 6.0
2 gebogene Overholts, fein	Nahtmaterial PDS 6.0 und 7.0

Tab. 12 Auflistung aller Geräte, Färbungsreagenzien und Verbrauchsmaterialien, die für die histotechnische Aufarbeitung benötigt wurden

Geräte	Fabrikat	Hersteller
Vakuuminfiltrationsprozessor	Tissue-Tek® VIP®	Sakura®
Rotationsmikrotom	Leica RM2245	Leica Mikrosysteme
Lineares Färbegerät	Leica ST 4040	Leica Mikrosysteme
Eindeckmaschine	Automatic Glass Coverslipper ACS 720	Medite, Inc.
Wasserbad		
Brutschrank		
Verbrauchsmaterialien	Handelsname	Hersteller
Formalin mit 5 % Alkohol		StatLab Medical Products Inc.
Ethanol (verschiedene Konzentrationen)	Reagent Alcohol	StatLab Medical Products Inc.
Xylol	Xylene, Laboratory Grade	StatLab Medical Products Inc.
Paraffinwachs	MEDITE PURE™ Paraffin	Medite Inc.
Leitungswasser		
Hämatoxylin	Vintage Hematoxylin	StatLab Medical Products Inc.
Bläureagenz	Scott's Bluing Reagent	StatLab Medical Products Inc.
Eosin-Y	Vintage Eosin	StatLab Medical Products Inc.
Einbettkassetten		
Metallausgießschalen		
Objektträger		
Deckgläser		

Tab. 13 Übersicht aller verwendeten Mikroskope und Kameras für die mikroskopische Analyse der Präparate und Befunddokumentation sowie die angewandte Software für die Datenauswertung

Mikroskop	Hersteller	
Olympus BH-2	Olympus Optical CO. GmbH	
Axiovert 200M	Carl Zeiss Microscopy GmbH	
Axiophot	Carl Zeiss Microscopy GmbH	
Kamera	Hersteller	
Axiocam (für Axiophot)	Carl Zeiss Microscopy GmbH	
Software	Version	Hersteller
AxioVision	4.6.1.0	Carl Zeiss Microscopy GmbH
P.A.L.M. RoboSoftware	3.2	Carl Zeiss Microscopy GmbH
IBM SPSS Statistics	13.0	IBM®

7.2 Evaluation der histomorphologischen Zielparameter

Tab. 14 Epithelialisierung der Patchoberfläche nach $t_2 = 30$ Tage und $t_2 = 60$ Tage

Nach $t_2 = 30$ Tage			Nach $t_2 = 60$ Tage		
	Absolute Epithelialisierung (in mm)	Relative Epithelialisierung (in %)		Absolute Epithelialisierung (in mm)	Relative Epithelialisierung (in %)
Chondro - Gide® (n = 3)			Chondro - Gide® (n = 3)		
CH41	4,1	35,3	CH81	3,2	96,3
CH43	5,1	42,0	CH83	8,7	64,5
CH44	5,0	19,8	CH84	10,1	58,9
Median	5,0	35,3	Median	8,7	64,5
Surgisis® 4 - Layer Tissue Graft (n = 3)			Surgisis® 4 - Layer Tissue Graft (n = 3)		
SIS42	5,7	58,6	SIS81	6,3	90,1
SIS43	2,6	29,6	SIS83	5,9	100,0
SIS44	3,4	38,1	SIS84	8,3	95,3
Median	3,4	38,1	Median	6,3	95,3
TUTOPATCH® (n = 2)			TUTOPATCH® (n = 3)		
TU42	2,6	45,7	TU81	2,8	31,8
TU43	7,6	56,5	TU83	7,7	98,0
			TU84	4,7	74,7
Median	5,1	53,3	Median	4,7	74,7
ETHISORB® Dura Patch (n = 1)			ETHISORB® Dura Patch (n = 2)		
ET44	10,9	10,9	ET81	14,7	38,4
			ET83	9,0	82,5
Median	10,9	10,9	Median	11,8	60,4

Tab. 15 Länge und max. Tiefe der Neomukosa nach $t_1 = 30$ Tage

	Länge der Neo – Mukosa (in mm)		Max. Tiefe der Neo – Mukosa (in mm)	
	1. Anastomose	2. Anastomose	1. Anastomose	2. Anastomose
Chondro-Gide® (n = 7)				
CH41	3,6	0,5	0,23	0,27
CH42	1,6	-	0,46	-
CH43	1,6	0,2	0,35	0,11
CH44	2,4	1,8	0,23	1,83
Median	1,6		0,27	
Surgisis® 4-Layer Tissue Graft (n = 6)				
SIS42	1,0	2,1	0,31	0,82
SIS43	0,4	0,3	0,30	0,19
SIS44	0,5	0,3	0,28	0,46
Median	0,5		0,31	
TUTOPATCH® (n = 4)				
TU42	0,9	0,3	0,39	0,46
TU43	0,9	2,4	0,22	0,35
Median	0,9		0,37	
ETHISORB® Dura Patch (n = 2)				
ET44	5,1	5,2	0,18	0,16
Median	5,1		0,17	

Tab. 16 Länge und max. Tiefe der Neomukosa nach $t_2 = 60$ Tage

	Länge der Neo – Mukosa (mm)		Max. Tiefe der Neo – Mukosa (mm)	
	1. Anastomose	2. Anastomose	1. Anastomose	2. Anastomose
Chondro-Gide® (n = 6)				
CH81	1,5	1,5	0,43	0,49
CH83	3,8	4,0	0,40	0,80
CH84	6,0	2,6	0,29	0,50
Median	3,2		0,46	
Surgisis® 4-Layer Tissue Graft (n = 6)				
SIS81	3,2	2,1	0,63	1,10
SIS83	1,8	1,9	0,84	1,22
SIS84	4,4	3,6	0,62	0,80
Median	2,7		0,82	
TUTOPATCH® (n = 6)				
TU81	0,3	2,2	0,23	0,81
TU83	3,3	3,3	0,63	0,55
TU84	2,3	1,8	0,19	0,23
Median	2,3		0,39	
ETHISORB® Dura Patch (n = 5)				
ET81	2,2	8,8	1,06	0,24
ET83	4,4	3,2	0,30	0,19
ET84	2,0	-	0,46	-
Median	3,2		0,30	

Tab. 17 Anzahl an Krypten je Anastomose und Zottenanzahl im Gesamtpräparat

	Krypten – Anzahl		Zotten – Anzahl		
	1. Anastomose	2. Anastomose			
Chondro-Gide®		(n = 7)		(n = 4)	
CH41	11	6	0		
CH42	6	-	0		
CH43	8	1	3		
CH44	7	22	2		
Median	8		1		
Surgisis® 4-Layer Tissue Graft		(n = 6)		(n = 3)	
SIS42	7	35	0		
SIS43	3	4	0		
SIS44	3	3	1		
Median	3,5		0		
TUTOPATCH®		(n = 4)		(n = 2)	
TU42	27	5	0		
TU43	9	9	2		
Median	9		1		
ETHISORB® Dura Patch		(n = 2)		(n = 1)	
ET44	6	5	0		
Median	5,5		0		

8. DANKSAGUNG

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Deshalb möchte ich mich bei folgenden Personen für Ihre tatkräftige Unterstützung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Wünsch und Herrn Dr. Tafazzoli-Lari möchte ich mich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung der Arbeitsplätze bedanken. Ich danke Herrn Dr. Tafazzoli-Lari darüber hinaus für seine hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm intensiv und professionell über mehrere Jahre begleitet.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Gau für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche danken. Herr Dr. Gebhard mit seiner histologischen Expertise und Frau von den Driesch mit ihrer statistischen Fachkenntnis haben ebenso maßgeblich zum Erfolg dieses Forschungsvorhabens beigetragen.

Darüber hinaus bedanke ich mich für die sprachlichen Korrekturen durch Frau Wicht und Frau Maiwald. Sie haben dazu beigetragen, dass der komplexe Inhalt dieser Dissertation gut verständlich ist.

Ein ganz besonderer Dank gilt jedoch vor allem meinen Eltern, meine Schwester, meiner Lebenspartnerin sowie zahlreichen Freunden die mir auf ihre ganz besondere Weise, Kraft und Motivation auf meinem Lebensweg schenken, und mich immer wieder aufs Neue unterstützen.

9. LEBENS LAUF

Johannes Beer

Geburtsdatum 15. Juni 1985
Geburtsort Kassel



BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 07/2014 **Deutsches Rotes Kreuz - Klinikum Köpenick, Berlin**
Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
Weiterbildung zum Facharzt für Anästhesiologie

HOCHSCHULSTUDIUM: Humanmedizin

06/2013 **2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung**
04/2010 – 06/2013 **Universität zu Lübeck**
10/2006 – 03/2010 **Philipps-Universität Marburg**

ZEITRAUM DER DISSERTATION

06/2011 – 12/2016 **Experimentelle Doktorarbeit**
bei Prof. Dr. med. L. Wünsch und Dr. med. K. Tafazzoli-Lari an der
Klinik für Kinderchirurgie, Universität zu Lübeck