

**Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer



**Tissue Engineering einer autologen Neofaszie in Kombination mit
synthetischen Netzen im dynamischen Bioreaktor:
Morphometrie und explorative Gen-Expressionsanalyse**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christian Andreas Schulz

aus Würzburg

Würzburg, im Mai 2014



**Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer



**Tissue Engineering einer autologen Neofaszie in Kombination mit
synthetischen Netzen im dynamischen Bioreaktor:
Morphometrie und explorative Gen-Expressionsanalyse**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christian Andreas Schulz

aus Würzburg

Würzburg, im Mai 2014

Referent: Prof. Dr. med. Dr. Ulrich Dietz

Korreferentinnen: Prof. Dr. H. Walles, Prof. Dr. K. Wermke

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.08.2019

Der Promovend ist Arzt.

**Ich widme diese Arbeit meinem ehemaligen, zu früh verstorbenen,
Mitbewohner und engem Freund Matthias Strobl, der sich sicherlich
darüber gefreut hätte zu sehen, dass ich sowohl das Studium
abschließen konnte, als auch eine Doktorarbeit zu Wege bringe**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	Seite 1
1.1	Fragestellung	Seite 2
2.	Material und Methode	Seite 3
2.1	Schematischer Aufbau	Seite 3
2.2	Gewinnung der Fibroblasten	Seite 4
2.2.1	Gewinnung von Fibroblasten aus Faszie/Herniengewebe	Seite 4
2.2.2	Gewinnung von Fibroblasten aus Hautbiopsaten	Seite 5
2.2.3	Passagieren, Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen	Seite 6
2.3	Bioreaktorkultur	Seite 7
2.3.1	Kultur im 6-Kammer-Bioreaktor	Seite 8
2.3.2	Neofaszien Weiterverarbeitung	Seite 9
2.4	Histologie	Seite 9
2.4.1	Hämalaun-Eosin-Färbung	Seite 10
2.4.2	Elastika-Pikrosiriusrot-Färbung	Seite 10
2.5.	Quantitative Real-Time (qRT) PCR	Seite 11
2.5.1	RNA Isolierung	Seite 11
2.5.2	cDNA-Synthese	Seite 12
2.5.3	Quantitative Real-Time (qRT) PCR	Seite 13
2.6	Gene-Array	Seite 14
2.6.1	RNA Isolierung	Seite 14
2.6.2	Gene-Array	Seite 15

3	Ergebnisse	Seite 18
3.1	Zellkultur und Typisierung der Spender	Seite 18
3.2	Bioreaktor	Seite 19
3.3	Histologie	Seite 20
3.3.1	Fibroblasten in der Neofaszie	Seite 20
3.3.2	Dicke der Neofaszien (HE-Färbung und Siriusrot)	Seite 21
3.3.3	Kollagenstruktur, -dichte und -ratio I/III (Siriusrot)	Seite 26
3.4	qRT-PCR	Seite 31
3.5	Gene Array	Seite 35
4	Beantwortung der Studienfragen	Seite 42
5	Diskussion	Seite 46
5.1	Bedeutung des Kollagenmetabolismus in der Hernienchirurgie	Seite 46
5.2	Was wir aus Netzexplantaten wissen	Seite 47
5.3	Marker der Kollagenaktivität	Seite 48
5.4	Stellenwert des Tissue Engineerings	Seite 49
5.5	Die Neofaszie aus Spender-Fibroblasten	Seite 51
5.6	qRT-PCR	Seite 53
5.7	Gene-Arrays	Seite 54
6	Offene Fragen, Ausblick und Perspektiven	Seite 55
7	Zusammenfassung	Seite 58
8	Anhang	Seite 61
8.1	Material	Seite 61

1 Einleitung

Als Narbenhernie wird eine operativ erworbene Schwachstelle der Bauchwand bezeichnet. Durch diese Schwachstelle können die mit Peritoneum überzogenen Baucheingeweide nach außen treten. Die Inzidenz von Narbenhernien nach abdominalchirurgischen Eingriffen wird in der Literatur unterschiedlich angegeben, sie liegt irgendwo zwischen 2% und 15% (wird aber teilweise auch mit 5-20% angegeben). [1] Die Inzidenz nach großen Laparotomien ist höher als nach laparoskopischen Eingriffen. [2] Das Risiko von einem Narbenhernienrezidiv betroffen zu sein ist von mehreren Faktoren Abhängig. So wurden Rauchen, das Alter (>45 Jahre), männliches Geschlecht, Adipositas (BMI > 25) unter anderem als Risikofaktoren erkannt. [1] Aufgrund des zunehmenden Altersdurchschnittes der Bevölkerung werden Narbenhernien in den nächsten Jahren weiterhin an Bedeutung im chirurgischen Alltag gewinnen. Weil abhängig von Größe, Lage und Zeitpunkt des Auftretens der Schwächen des Narbengewebes, nach operativen Eingriffen, die Komplikationen, unter anderem mit Platzbauch und Darminkarzeration, abdominalchirurgische Notfälle darstellen können; und die Patienten in ihrem Alltag beeinträchtigen, ist die Forschung an den zugrundeliegenden Problemen und an Verbesserungen der Operationsverfahren unerlässlich. Mittlerweile sind synthetische Netze als Behandlungsoption von Bauchwanddefekten nichtmehr wegzudenken. [2] [3] Aber die Verwendung von synthetischen Materialien schafft neue Probleme (Infektionen, Schmerzen, Verhärtungen der Bauchwand mit Funktionsverlust...). Die Therapie von akuten und chronischen Infektionen nach Implantation von synthetischen Netzen kann von Antibiotikagabe bis hin zu Laparatomie mit Netzexplantation und Therapie von Fistelungen reichen. [4] In Würzburg wurde ein Klassifikationssystem entwickelt, mit dem das Risiko des Auftretens von Narbenhernien bzw. deren Rezidiven abgeschätzt werden kann, und dadurch das operative Vorgehen dem Risiko entsprechend geplant werden kann. Diese Klassifikation bezieht neben Rezidiven, der Lage der Hernie sowie deren Größe als erstes auch patientenseitig vorhandene Risikofaktoren (Rauchen, männliches Geschlecht, Alter >45 Jahre und ein BMI >25 kg/cm²...) mit in die Risikokalkulation mit ein. [5] Nachdem in den letzten Jahren die Bedeutung des Tissue Engineerings für die Erforschung des Wuchsverhaltens von Fibroblasten an

synthetischen Strukturen (unter anderem Netzimplantaten) stetig zugenommen hat, und Aufgrund der zunehmenden netzbedingten Komplikationen, soll mit dieser Arbeit ein Modell vorgestellt werden, mit dem in Zukunft in vitro die Forschung an neuen Materialien ebenso möglich ist, wie auch die Forschung an Auswirkungen von verschiedenen Risikofaktoren auf die Narbenbildung, bzw. die Kollagenqualität. Durch eine Weiterentwicklung könnte es auch als Grundlage der Erforschung von gesunden bzw. pathologischen Vorgängen der Narbenbildung dienen, an der viele verschiedene Zellen des Immunsystems beteiligt sind. [6] Weiterhin soll dieses Modell (falls dies in Zukunft zum Goldstandard werden sollte) die Möglichkeit bieten in patienteneigenes Kollagengewebe eingebettete Netzimplantate zu züchten, welche dann in hernienchirurgischen Eingriffen verwendet werden können.

1.1 Fragestellung

- a) Können im Bioreaktor hergestellte Neofaszien aus humanen Fibroblasten mit synthetischen Netzen kokultiviert werden?
- b) Reproduziert die Kollagenmorphologie der im 6-fachen dynamischen Bioreaktor gezüchteten Neofaszien je nach Netz-Typ die aus Explantaten bekannten klinischen Muster?
- c) Gibt es Unterschiede in der Dicke und Densität der Neofaszien bei den unterschiedlichen Netzen?
- d) Besteht eine Korrelation bei der Expression von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III zwischen dem Nativgewebe des Spenders und der erzeugten Neofaszie?
- e) Inwieweit wird die Theorie der guten und schlechten Heiler (bezogen auf die Kollagenration I/III) durch die Ergebnisse dieser Arbeit gestützt?
- f) Welche Korrelation besteht zwischen der qRT-PCR und dem Gene-Array?
- g) Welche Kollagen-bezogenen Gene sind in den Gene-Arrays am auffälligsten?

2 Material und Methode

Im Folgenden werde ich auf die Methoden der Gewinnung von Probenmaterial, der Aufarbeitung, der Zellkultur und Fasziencultivierung im Bioreaktor eingehen, des Weiteren werden die Methoden zur Analyse und Gewinnung unserer Ergebnisse (Histologie, qRT-PCR, Gene-Array) vorgestellt. Die verwendeten Materialien, Geräte und Lösungen sind im Anhang ab Seite 61 zu finden.

2.1 Schematischer Aufbau

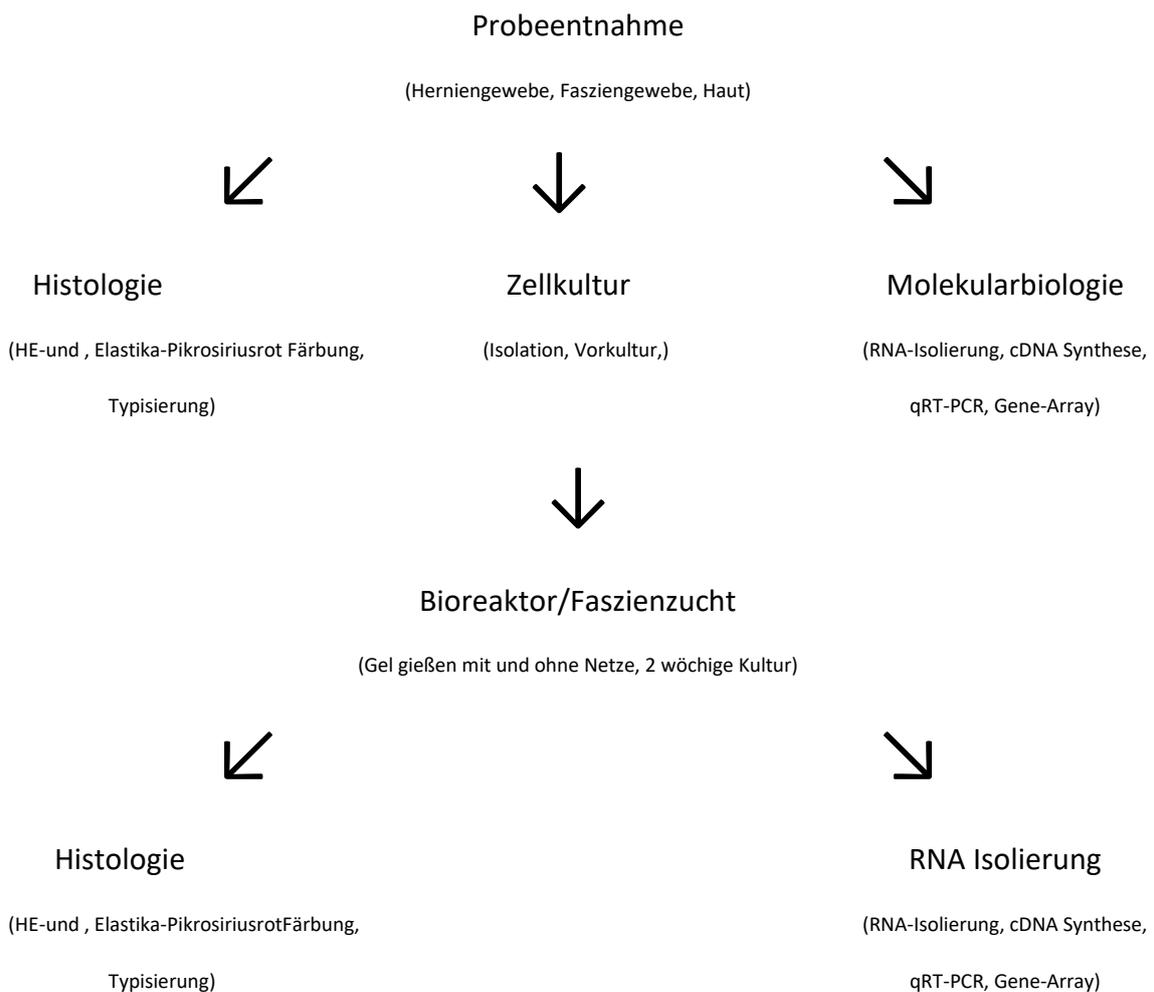


Abb. 1 – Workflow

2.2 Gewinnung der Fibroblasten

2.2.1 Gewinnung von Fibroblasten aus Faszie/Herniengewebe

Tag 1:

Gewinnung der Probe(n) im Rahmen einer Operation. Für die histologische Untersuchung wird ein ca. 1 cm² großes, und für die Kultur und RNA/DNA Analyse ein ca. 4 cm² großes Stück Faszie/Herniengewebe benötigt. Beide Stücke werden steril in 50 ml Zentrifugen Röhren überführt, das für die Kultur in DMEM und Gentamycin und das für die Histologie in Formaldehyd.

Im Labor wird die Probe in der Sterilbank in eine Plastikpetrischale mit Deckel gelegt, vom 4 cm² großen Stück ein ca. 5 auf 5 mm großer Teil abgeschnitten und dieser nativ in einem Kryoröhrchen bei -80 Grad Celsius eingefroren zur späteren RNA/DNA Analyse. Der Rest wird sorgfältig von Fett befreit und in ca. 5mm breite Quadrate geschnitten. Diese werden in eine Laborglasflasche, welche mit 40 ml Verdauung (DMEM; 10% FCS; 1% Penicillin, Streptomycin, 32 mg Kollagenase Type 1) gefüllt ist und ein Magnetührstäbchen enthält, gegeben. Für 16-20 Std. wird das Gewebe nun im 37 Grad warmen Wasserbad unter langsamem Rühren verdaut.

Tag 2:

Der Inhalt der Glasflasche wird durch ein Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und dann 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird mithilfe einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 3-10 ml Nährlösung (DMEM; 10 % FCS; 1% Pen/Strep) resuspendiert, und von 200 µl Zellsuspension mit ebenso viel Tryptanblau in einer Zählkammer die Zellen gezählt. Nach der Zählung wird entschieden in wie vielen T 75 Flaschen ausgesät wird, dementsprechend Nährmedium zugegeben und sorgfältig mithilfe einer 10 ml Glaspipette vermengt, pro Flasche werden 10 ml der neuen Suspension ausgebracht und diese im Brutschrank bei 37 Grad kultiviert. Jeden 2. Tag finden eine Kontrolle und ein Wechsel des Nährmediums statt.

2.2.2 Gewinnung von Fibroblasten aus Hautbiopsaten:

Tag 1:

Gewinnung der Probe(n) im Rahmen einer Operation. Für die histologische Untersuchung wird ein ca. 1cm², für die Kultur und RNA/DNA Analyse ein ca. 3-4cm² großes Stück entnommen und wie das Hernien/Fasziengewebe steril in 50ml Zentrifugen Röhrchen überführt (für die Histologie in Formaldehyd, für den Transport in DMEM und Gentamycin). Im Labor wird die Probe unter der Sterilbank in eine Plastik Petrischale mit Deckel gelegt, ein 5mm breites quadratisches Stück wird nativ in einem Kryoröhrchen bei -80 Grad für die RNA/DNA Analyse eingefroren. Die restliche Haut wird 3-4 Mal mit PBS⁺ gewaschen (Flüssigkeit jeweils mit Pasteurpipette und Sauger absaugen), und dann mit einem Skalpell vom Unterhautfettgewebe befreit, dieses wird verworfen. Danach wird die Probe wieder 3-4 Mal mit PBS⁺ gewaschen, danach wird das Gewebe mit einem Skalpell in ca. 2-3 mm starke Streifen geschnitten und 3-4 Mal mit PBS⁻ gewaschen. Anschließend werden die Streifen in eine frische Petrischale gelegt, es wird 10 ml Dispaselösung zugegeben (2U/ml). Für 16-18 Std. wird die Schale bei 4°C gelagert.

Tag 2:

2 Petrischalen werden mit PBS⁺ gefüllt (eine für die Epidermis eine für die Dermis). Die Dispaselösung wird abgesaugt, danach werde wieder 10 ml PBS⁺ zugegeben und unter Zuhilfenahme von 2 sterilen Pinzetten die Dermis von der Epidermis abgelöst und in die jeweiligen Schalen überführt. (wichtig ist: das Gewebe darf nichtmehr trocken liegen. Die Flüssigkeit wird abgesaugt (ein kleiner Rest wird belassen um die Stücke feucht zu halten).Anschließend werden die Dermisstückchen mit einem Skalpell in ca. 1-2 mm breite Quadrate geschnitten, diese werden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen verbracht. Im Anschluss wird 10 ml Kollagenaselösung (500 U/ml) zugegeben und das Röhrchen für 45 min in den 37°C warmen Brutschrank gestellt. Nach Entnahme wird die Suspension 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt; 10 ml Nährlösung zugegeben und nochmals bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Nachdem abermals vorsichtig der Überstand abgesaugt wurde, werden 2ml

Nährlösung zugegeben und das ganze mit einer sterilen 5 ml Einmalpipette „resuspendiert“ und in eine T 75 Kulturflasche überführt. Diese wird bei 37°C im Brutschrank belassen. Am nächsten Tag werden nochmals 2ml Nährlösung zugegeben und das ganze weiterkultiviert.

2.2.3 Passagieren, Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen

Passagieren

Wenn die Bewuchsdichte der T75 Kulturflasche mehr als 90% beträgt, müssen die Zellen abgelöst werden und in ein neues Gefäß überbracht werden. Dabei saugt man zuerst die Nährlösung ab, wäscht mit 10 ml PBS⁻, gibt dann 10 ml PBS⁻/EDTA zu und stellt die Flasche für 5-10 min in den Brutschrank, gibt 5ml Trypsin/EDTA Ablösepuffer zu und inkubiert bei 37°C für 3- (allerhöchstens) 5 min. Nach der benötigten Einwirkzeit (Zellen haben sich gelöst und schwimmen abgekugelt in der Lösung) und gibt 1ml FCS zu um die Enzymreaktion zu stoppen. Daraufhin wird der Inhalt mithilfe einer sterilen 10 ml Glaspipette in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, und die Flasche nochmal mit 10 ml PBS⁻ ausgewaschen (diese Suspension gibt man ebenfalls in das Röhrchen). Nun wird die Suspension bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert, danach wird der Überstand abgesaugt und wie weiter oben schon beschrieben mit Trypanblau und einer Zählkammer die Zellzahl bestimmt, nun bestehen mehrere Möglichkeiten:

1. In neue T 75 Zellkulturflaschen aussähen und weiterkultivieren;
2. Einfrieren und für die spätere Verwendung aufheben;
3. In Gel gießen und im Bioreaktor kultivieren.

Einfrieren

Nach dem Zählen nochmals bei 1200 rpm 5 min zentrifugieren, den Überstand absaugen und pro 1 Millionen Zellen 1 ml Nährlösung zugeben. Danach wird das ganze

gut resuspendiert, und jeweils 1 ml in ein Kryoröhrchen gegeben. In jedes Kryoröhrchen gibt man nun noch den gleichen Anteil FCS der schon im Nährmedium enthalten ist, und 0,1ml DMSO, das ganze wird in einem Kammerbehälter mit Wasser in der Zwischenwand („Mr. Frosti“) bei -80°C eingefroren.

Auftauen

Das Kryoröhrchen wird aus dem Froster geholt und im Wasserbad bei 37°C solange aufgetaut bis nur noch ein kleines Klümpchen Eis übrig ist, der Inhalt wird sofort mit 10 ml Nährlösung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Nährmedium suspendiert, in eine T 75 Flasche gegeben und bei 37°C im Brutschrank kultivieren.

2.3 Bioreaktorkultur

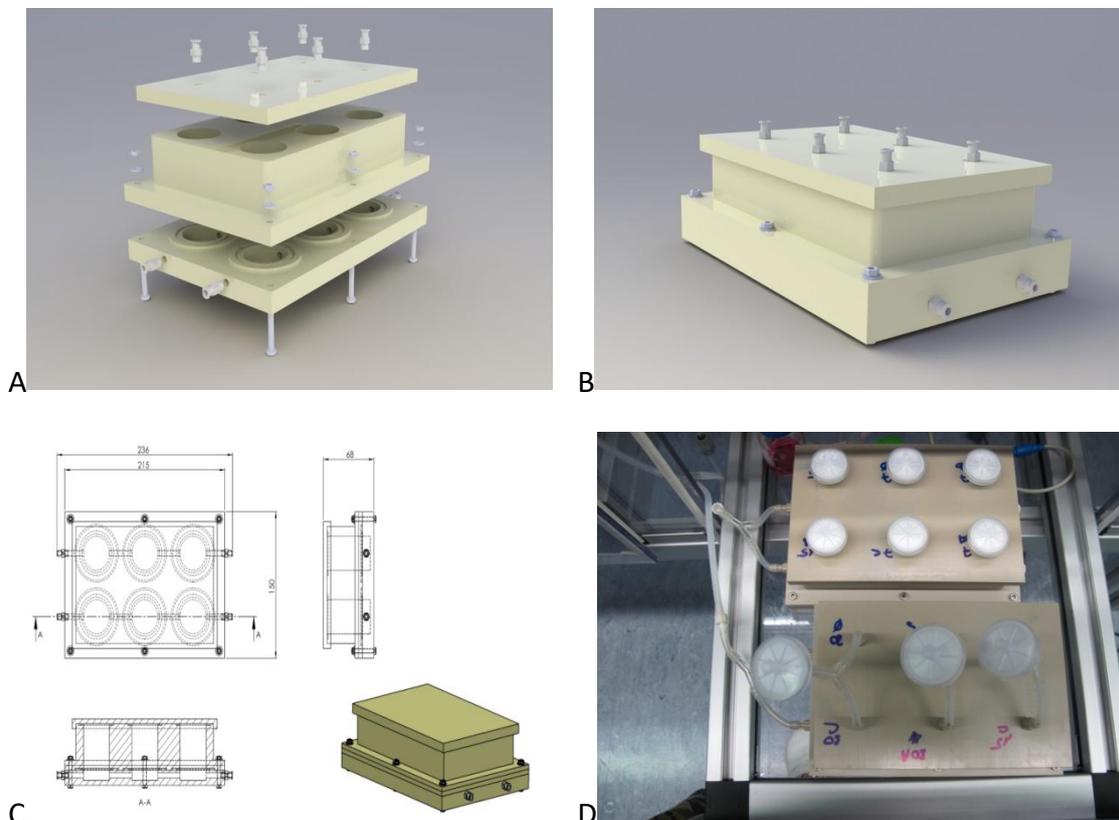


Abb. 2 – A, B und C Konzeptzeichnungen des Bioreaktors; D Foto des laufenden Bioreaktors mit Sterilfiltern.

2.3.1 Kultur im 6-Kammer-Bioreaktor

Der verwendete Bioreaktor besteht aus einem Deckel, einem Zwischenstück, welches die Gelkammern enthält und einer Basis. Zwischen Basis und Deckel befindet sich eine Silikonmembran. Durch Druckluft wird diese Membran um 0,5cm angehoben um den Zellen in den Gelkammern Atemtätigkeit zu simulieren. Die Einstellung des Druckluftkreislaufs ist:

Laufzeit: 1220 min

Ruhezeit: 1min

Ventil offen: 2 sec

Ventil geschlossen: 2 sec

Druck von 0,5bar

Die Bestückung des Reaktors beginnt mit dem zählen der vorkultivierten Zellen, 750.000 Zellen werden in einem Zentrifugenröhrchen in 1,7 ml Gelneutralisationslösung suspendiert dazu wird 3,3 ml Kollagen Typ 1 Gel (6mg/ml) zugegeben. Wichtig ist hierbei die blasenfreie Suspension! Das Gel wird dann in den Bioreaktor gegossen, nach der ersten Hälfte des Gels, welches gleichmäßig auf dem Grund der Kammer (Silikonmembran) aufgebracht wird, wird das sterilisierte und zugeschnittene, OP Netz eingelegt und die andere Hälfte Gel darüber gegossen. Dann wird der Reaktor verschlossen zum aushärten des Gels in den Brutschrank gestellt. Nach dem aushärten wird 5 ml Nährmedium darüber gegeben, der Reaktor verschlossen und in den Brutschrank gestellt; die Druckluftschläuche angeschlossen, die gewünschte Luftdruckwechselfrequenz und Druckdauer eingestellt und 2 Wochen kultiviert, jeden 2. Tag Medienwechsel (ggf. auch kürzer) und Kontrolle auf Kontamination. An den Deckeln werden Sterilfilter angebracht, um Kontamination durch Raumluft zu vermeiden.

Es wurden 3 verschiedene Netztypen verwendet:



Abb. 3 – A, Parietex* Netz: Zweikomponentennetz, gestrickt aus hydrophilem Polyestermonofilament (PET) mit resorbierbaren Mikrohaken aus Polylactidsäure (PLA); B, Das ULTRAPRO* Netz ist ein teilresorbierbares, leichtgewichtiges und monofiles Netz, das zu etwa gleichen Teilen zusammengesetzt ist aus: PROLENE* – nicht resorbierbares Polypropylen und MONOCRYL* – resorbierbares Poliglecapon; C Mikroelektronisch gesponnenes PLGA-Netz (Polylactid-co-Glycolid-Netz), Konzeptnetz der Arbeitsgruppe Groll

2.3.2 Neofaszien Weiterverarbeitung

Nach 2 Wochen werden die fertigen Gelpellets entnommen und für 3 Std. in Formaldehyd einlegt. Danach werden die Pellets halbiert und zwischen, jeweils einer Lage, Papier in flaches Einbettungsgefäß und über Nacht in die Paraffineinbettungsmaschine gegeben (mehrere Töpfe mit ansteigendem Alkoholgehalt in der Lösung und am Schluss Paraffintopf, mit automatischem weiterwandern durch die Töpfe). Am nächsten Tag werden die Pellet aus dem heißem Paraffin geholt und aus dem Gefäß entnommen, noch einmal halbiert und in einer Metallschale voll heißem Paraffin auf einer Heizplatte auf die gerade Schnittfläche gestellt, anschließend von der Platte gezogen und festgehalten bis das Paraffin am Grund hart genug ist dass die Probe fest steht. Der Paraffinblock wird nun bei in den Kühlraum gebracht, und dort bei 4-6°C vollständig aushärten gelassen, anschließend aus der Metallschale entfernt und weiterverarbeitet (schneiden, färben...).

2.4 Histologie

Tiefgefrorenes Gewebe wurde bei -18°C mithilfe des Kryotoms auf 4µm Stärke zugeschnitten, anschließend wurden die Schnitte auf Objektträgern bei -80°C gelagert. Vor dem Färben wurden die Schnitte 15 min bei Raumtemperatur aufgetaut und

danach mit gekühlter Fixierlösung (4°C) 8 Minuten lang fixiert. Im Anschluss wurden sie 15 min in lauwarmem Leitungswasser aufgeweckt und kurz mit VE-Wasser gespült.

Die in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden über eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert (Xylol1 5min, Xylol2 5min, 100 % EtOH 1 5min, 100% EtOH 2 5min, 90% EtOH 1 3min, 80% EtOH 1 3min, 70% EtOH 2 3min).

2.4.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Um zu überprüfen ob Zellen in einem Schnitt durch ein Gewebe lokalisiert sind wird die Hämalaun-Eosin-Färbung eingesetzt, wobei Hämalaun aufgrund seiner positiven Ladungen (basisch) an saure Zellbestandteile bindet (DNA, RNA, sulfatisierte Glykosaminoglykane), diese blau färbt und Eosin aufgrund seiner negativen Ladung an zytoplasmatische Proteine und Speicher und Sekretgranula bindet und diese rot anfärbt.

Für diese Färbung legt man den Objektträger 8min in Hämalaun ein, spült ihn anschließend mit VE-Wasser, bis sich keine Farbe mehr auswaschen lässt und taucht ihn 2x kurz in Differenzierungsalkohol. Anschließend spült man wiederum mit VE-Wasser (1min) und danach für 5 min mit Leitungswasser (bläuen durch pH-Umschlag). Danach färbt man 1min mit Eosin-Lösung und spült anschließend mit VE-Wasser bis sich keine Farbe mehr auswaschen lässt. Danach taucht man den Objektträger 2x kurz in 70%-iges Ethanol gibt ihn danach jeweils 2min in 96- und 98%-iges Ethanol und anschließend 2x für 5min in Isopropanol um den Schnitt zu entwässern. Anschließend wird der gefärbte Schnitt mit Aquatex® eingedeckt und fixiert. In der He-Färbung wurde hauptsächlich die Dicke der Neofaszie beurteilt.

2.4.2 Elastika-Pikrosiriusrot-Färbung

Diese Färbung ermöglicht es, elastische Fasern von kollagenen Fasern zu unterscheiden. Resorcin-Fuchsin färbt elastische Fasern tiefbraun bis blauschwarz an. Pikrosiriusrot färbt Muskulatur und Zytoplasma gelb und Kollagen rot an.

Zunächst legt man den Objektträger (mit Gewebeschnitt) 1h in der Pikrosiriusrot-Lösung ein und spült anschließend durch 2x eintauchen in verdünnter Essigsäure. Danach legt man den Objektträger 2 min in 80%-iges Ethanol, um ihn auf die Fuchsin-Lösung vorzubereiten, und gibt ihn dann für 30 min in ein Bad aus Resorcin-Fuchsin-Lösung. Anschließend spült man ca. 1min mit VE-Wasser und differenziert in 96%-igem Ethanol (bis der Hintergrund entfärbt ist), danach jeweils 2min in 96%-iges und 98%-iges Ethanol und anschließend 2x 5min in Isopropanol geben, zum Entwässern. Das Ganze mit Aquatex® eindecken und fixieren. In dieser Färbung wurde die Kollagenstruktur beurteilt, und unter Zuhilfenahme eines Polarisationsmikroskops zwischen Kollagen1 und Kollagen3 differenziert; Anhand der Kollagen1/3 Ratio wurden die Gewebe auch in unterschiedliche Kategorien (gute Heilungsprognose, schlechte Heilungsprognose) eingeteilt.

2.5. Quantitative Real-Time (qRT) PCR

2.5.1 RNA Isolierung

Um RNA aus Geweben zu isolieren werden diese zunächst abgewogen um die RNA-Säule nicht zu verstopfen, da eine Säule nur eine begrenzte Menge an RNA auffangen kann. Bei kollagenreichem Bindegewebe ist die benötigte Menge ca. 100mg, bei den Pellets mit Netz ca. das Doppelte bis 3-Fache der Menge, um genügend Zellen zu erhalten. Für die RNA Isolation aus Zellen in Kultur fällt der Zerkleinerungsschritt weg, hier nimmt man zwischen 1 und 10 Millionen Zellen. Nach dem Zerkleinern des Gewebes wird dieses, zusammen mit 700µl Qiazollösung, in ein 2ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Und das ganze ca. 5 min bei Raumtemperatur im TissueRuptor (eine kleine Metallkugel wird in das Röhrchen gegeben und dann das Röhrchen bei 20-50 Hz geschüttelt) lysiert. Nach dem Lysieren wird die Flüssigkeit von evtl. noch vorhandenen festen Bestandteilen ab pipettiert und in den Qiashreder (Zentrifugenröhrchen mit Einsatz, durch den beim zentrifugieren die Lösung homogenisiert wird) überführt, ab diesem Schritt ist das Verfahren für Zell und Gewebisolation das gleiche. Nach dem homogenisieren lässt man die Lösung für 5 min

bei Zimmertemperatur stehen, danach gibt man 140µl Chloroform dazu und schüttelt das Röhrchen für ca. 15 Sekunden. Im Anschluss lässt man die Lösung wieder für ca. 3 min stehen um sie danach für 15 min bei 12000xg und 4°C zu Zentrifugieren. Nach dem Zentrifugieren haben sich 3 Phasen im Röhrchen ausgebildet, oben eine klare Phase, (enthält die RNA, dann eine weiße Mischphase und unten eine rötlich-trübe organische Phase mit dem Rest der Zell-oder Gewebsbestandteilen. Man pipettiert nun die wässrige Phase ab, den Rest verwirft man. Zu dieser wässrigen Phase gibt man nun die 1 ½ fache Menge 100% igen Ethanol und pipettiert diese Lösung nach dem Vermischen (durch vorsichtiges auf und ab pipettieren) in 700µl Schritten auf eine Rneasy-Säule (diese befindet sich auf einem leeren 2ml Zentrifugenröhrchen), nun wird bei 8000xg für 15-60 Sekunden zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, da die RNA in der Säule gebunden wird. Diesen Schritt wiederholt man solange bis die ganze Lösung durchzentrifugiert wurde(ab jetzt wird nur noch bei 8000xg und 15-60 Sekunden zentrifugiert). Danach werden 700µl RWT-Buffer auf das Säulchen gegeben und dieses wieder zentrifugiert, der Durchfluss wird wieder verworfen. Danach wird wieder zentrifugiert mit 500µl RPE-Buffer, den Durchfluss abermals werfen. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt. Danach wird einmal „leer“, d.h. ohne eine Zugabe von einer Lösung zentrifugiert, um alle Rückstände der Waschlösungen zu entfernen. Als letzter Schritt wird mit 30-50µl RNase-freiem-Wasser zentrifugiert (in ein frisches Zentrifugenröhrchen), in diesem Durchfluss befindet sich die isolierte RNA.

Um die Menge zu überprüfen wird in einem Photospektrometer die Absorption bei 260nm und 280nm bestimmt. Um die Qualität der RNA zu überprüfen wird in einem nächsten Schritt über einen Bioanalyzer ein virtuelles Gel Bild errechnet und die Menge von 18s/28s (ribosomaler RNA) in der Lösung bestimmt.

2.5.2 cDNA-Synthese

Zuerst wird der Arbeitsplatz mit RNase Exitus Plus gereinigt, während die Reagenzien von -20°C auf Eis auftauen. Die aufgetaute RNA wird mit RNase-freiem Wasser so verdünnt, dass in 15µl Gemisch 800 µg RNA enthalten sind (möglichst Einheitlich für alle Proben). IScript Reaction Mix und reverse Transkriptase werden zentrifugiert und

gevortext, um sicherzustellen dass alles gut durchmischt ist. Zu diesen 15µl werden nun 4µl „iScript Reaction Mix“ und 1µl reverse Transkriptase pipettiert, sodass sich ein Endvolumen von 20µl je Probe ergibt, noch einmal kurz gevortext. Dieser Gesamtansatz wird nun in den Thermocycler gegeben und mit dem gespeicherten Protokoll (5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C, 5 min bei 85°C , danach beliebig lange bei 4°C) behandelt, um die RNA in DNA umzuschreiben. Die DNA kann nun bei Bedarf weiter verdünnt werden, oder bis zum späteren Start der qRT-PCR bei -20°C aufbewahrt werden.

2.5.3 Quantitative Real-Time (qRT) PCR

Alle Chemikalien auf Eis auftauen, immer auf Eis arbeiten. Supermix ist Lichtempfindlich, daher mit Alufolie oder anderweitig vor Lichtexposition schützen. Alle Lösungen vor Benutzung zentrifugieren und vortexen. Als nächstes wird der Mastermix angesetzt, hierfür werden je 2µl Forward- und Reverse-Primer mit 10 µl BioRad Mix (pro Probe) zusammengegeben. Für den Mastermix sollten immer ein paar Proben mehr einkalkuliert werden, sonst reicht er nicht (Pipettierungenauigkeiten). In die Kammern der 96-Well-Platte werden nun nach Pipettierschema je 1 µl DNA (normalerweise noch einmal auf 1:5-1:10 verdünnt, da sich aber in dieser Konzentration von Proben aus dem Nativgewebe keine MMP-1 und MMP-8Aktivität nachweisen ließ ohne Verdünnung) an den Rand pipettiert und diese mit 5 µl Wasser auf den Boden der Well-Platten gespült. Hierzu werden jetzt 14µl Mastermix pipettiert, wobei auf Luftblasenfreie Applikation zu achten ist. Von jeder Proben-Primer-Paarung werden 2 Duplikate erstellt. Es werden für jeden Primer auch 2 Felder mit negativ-Kontrollen (Wasser anstatt DNA) erstellt, sowie auch für jede Probe noch eine Paarung mit einem Primer für ein Housekeepinggen in unserem Fall GAPDH. Gerät über die Software öffnen und nach dem Einstellen der Platte und nochmaliger Kontrolle der Parameter wird der Lauf gestartet. Im Programm muss vorher festgelegt werden an welchen Punkten Fotos gemacht werden, wie die Plattenbelegung ist und welches Protokoll verwendet werden soll. In diesem Fall wird ein Protokoll verwendet, welches zuerst 30 min bei 95°C inkubiert, danach 40 mal jeweils 5 Minuten auf 95°C gefolgt von 5 Minuten auf 59,5°C und am Ende jedes 59,5°C Zyklus ein Foto macht. Danach noch

einmal 5 min auf 65°C und ein Foto, und zum Abschluss 5 min bei 95°C. Als Ergebnis erhalten wir für jede Probe und jede getestete DNA eine sigmoidale Kurve. Am Übergang in den linearen Abschnitt des Graphen können wir den ΔC_t Wert der getesteten DNA ablesen. Je niedriger dieser Wert, desto höher die Konzentration dieser DNA, da weniger Zyklen durchlaufen werden mussten um eine signifikante Änderung der Licht Absorption zu erzielen. Durchgeführt wurden qRT-PCRs auf folgende Gene, Col1a1, Col1a2, Col3a1, MMP-1, MMP-8, ELN.

2.6 Gene-Array

2.6.1 RNA Isolierung

Um RNA aus Geweben zu isolieren werden diese zunächst abgewogen um die RNA-Säule nicht zu verstopfen, da eine Säule nur eine begrenzte Menge an RNA auffangen kann. Bei kollagenreichem Bindegewebe ist die benötigte Menge ca. 100mg, bei den Pellets mit Netz ca. das Doppelte bis 3-Fache der Menge, um genügend Zellen zu erhalten. Für die RNA Isolation aus Zellen in Kultur fällt der Zerkleinerungsschritt weg, hier nimmt man zwischen 1 und 10 Millionen Zellen. Nach dem Zerkleinern des Gewebes wird dieses, zusammen mit 700 μ l Qiazollösung, in ein 2ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Und das ganze ca. 5 min bei Raumtemperatur im TissueRuptor (eine kleine Metallkugel wird in das Röhrchen gegeben und dann das Röhrchen bei 20-50 Hz geschüttelt) lysiert. Nach dem lysieren wird die Flüssigkeit von evtl. noch vorhandenen festen Bestandteilen ab pipettiert und in den Qiashredder (Zentrifugenröhrchen mit Einsatz, durch den beim zentrifugieren die Lösung homogenisiert wird) überführt, ab diesem Schritt ist das Verfahren für Zell und Gewebsisolation das gleiche. Nach dem homogenisieren lässt man die Lösung für 5 min bei Zimmertemperatur stehen, danach gibt man 140 μ l Chloroform dazu und schüttelt das Röhrchen für ca. 15 Sekunden. Im Anschluss lässt man die Lösung wieder für ca. 3 min stehen um sie danach für 15 min bei 12000xg und 4°C zu Zentrifugieren. Nach dem Zentrifugieren haben sich 3 Phasen im Röhrchen ausgebildet, oben eine klare Phase, (enthält die RNA, dann eine weiße Mischphase und unten eine rötlich-trübe organische Phase mit dem Rest der Zell-oder Gewebsbestandteilen. Man pipettiert nun die

wässrige Phase ab, den Rest verwirft man. Zu dieser wässrigen Phase gibt man nun die 1 ½ fache Menge 100% igen Ethanol und pipettiert diese Lösung nach dem Vermischen (durch vorsichtiges auf und ab pipettieren) in 700µl Schritten auf eine RNeasy-Säule (diese befindet sich auf einem leeren 2ml Zentrifugenröhrchen), nun wird bei 8000xg für 15-60 Sekunden zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, da die RNA in der Säule gebunden wird. Diesen Schritt wiederholt man solange bis die ganze Lösung durchzentrifugiert wurde (ab jetzt wird nur noch bei 8000xg und 15-60 Sekunden zentrifugiert). Danach werden 700µl RWT-Buffer auf das Säulchen gegeben und dieses wieder zentrifugiert, der Durchfluss wird wieder verworfen. Danach wird wieder zentrifugiert mit 500µl RPE-Buffer, den Durchfluss abermals werfen. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt. Danach wird einmal „leer“, d.h. ohne eine Zugabe von einer Lösung zentrifugiert, um alle Rückstände der Waschlösungen zu entfernen. Als letzter Schritt wird mit 30-50µl RNase-freiem-Wasser zentrifugiert (in ein frisches Zentrifugenröhrchen), in diesem Durchfluss befindet sich die isolierte RNA.

Um die Menge zu überprüfen wird in einem Photospektrometer die Absorption bei 260nm und 280nm bestimmt. Um die Qualität der RNA zu überprüfen wird in einem nächsten Schritt über einen Bioanalyzer ein virtuelles Gel Bild errechnet und die Menge von 18s/28s (ribosomaler RNA) in der Lösung bestimmt.

2.6.2 Gene-Array

Die gewonnene RNA wurde auf Trockeneis zum IZKF transportiert. Die Microarray Analyse der RNA wurde von der IZKF Microarray-Abteilung (Uniklinikum Würzburg) unter Aufsicht von Dr. C.-J. Scholz durchgeführt. Microarray Analysen werden durchgeführt um die Expression einer hohen Anzahl von Genen simultan untersuchen zu können. Hierfür wird die RNA zuerst in cDNA mit T7 Polymerasebindungsstellen umgeschrieben. Anschließend wird daraus die cRNA mit Biotin versehenen Nucleotiden transkribiert, und amplifiziert. Diese aRNA wird anschließend mit dem Microarraychip hybridisiert und die Signalstärken auf dem Chip ausgelesen und ausgewertet.

Die cRNA wurde mithilfe des IVT-ExpressKit (Affymetrix) synthetisiert, markiert und mit dem PrimeViewchip (Affymetrix) hybridisiert. Hierfür wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen:

Zuerst wurden 100ng RNA von einer T7-Reversen-Transkriptase in cDNA transkribiert. Als Kontrolle für den Erfolg der Transkription wurden Poly-A-RNA Kontrollen dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Die Einzelstrangsynthesemixtur (2,5µl Erststrangsyntheseenzym und Puffermix) wurden 2,5µl RNA/Poly-A-RNA Kontrollmix zugegeben und 2 Stunden bei 42°C inkubiert um die cDNA zu gewinnen. Um den Zweitstrang zu synthetisieren wurden 10µl Zweitstrangsynthesemix (1µl Zweitstrangsyntheseenzymmixtur und 2,5µl Zweitstrangpuffermixtur, verdünnt mit nukleasefreiem Wasser) dem 5µl cDNA Reaktionsmix zugesetzt und eine Stunde bei 16°C gefolgt von 10 Minuten bei 65°C im Thermocycler inkubiert. Für die in-vitro-Transkription der biotinmarkierten, amplifizierten RNA (aRNA) wurden 15µl IVT-Biotinmarker, 10µl Markierungspuffer und 3µl Enzymmix hergestellt. Dieser Enzymmix wurde mit 15µl doppelsträngiger cDNA vermischt und für 16 Stunden bei 40°C inkubiert. Die aRNA wurde mithilfe von Bindungssträngen (im IVT-Kit enthalten) aufgereinigt. Die aufgereinigte aRNA wurde anschließend mithilfe von 25µl RNA-Fragmentationsmix (bestehend aus 10µl aRNA und 5µl 5x ArrayFragmentationspuffer verdünnt mit nukleasefreiem Wasser) fragmentiert, indem es für 35 Minuten bei 94°C inkubiert wurde. Die gewonnene fragmentierte aRNA wurde sofort auf Eis gekühlt. Der Microarraychip (PrimeView) wurde mit 130µl pre-Hybridisierungsmix 15 Minuten bei 45°C vorbehandelt, anschließend wurde die Hybridisierung mit 130µl Hybridisierungsmix (aRNA enthalten, 10 Minuten bei 96°C und 2 Minuten bei 45°C inkubiert) und dem PrimeViewchip für 16 Stunden bei 60 RPM und 45°C im Thermocycler durchgeführt. Danach wurden ungebundene aRNA-Fragmente unter Verwendung der Affymetrix Fluidicstation 450 und des FS450_0002 Scan Protokolls und die gebundene RNA markiert. Die markierten Chips wurden im GeneChipScanner 3000 7G (Affymetrix) gescannt. Die Datenauswertung erfolgte mit den Biokonduktor Paketen Affy und AffyDegradation (Aufgrund schlechter RIN Werte der RNA der Nativgewebe) in der R v3.0.1 Umgebung. Die Datennormalisierung und Sondenset Aufsummierung wurde mithilfe des RMA Befehls in Standardkonfiguration durchgeführt. [7]

Alle hier vorgestellten Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt außer jenen Schritten bei denen es erwähnt ist (Brutschrank, Wasserbad, Zentrifuge...). Auf Sterilität der verwendeten Werkzeuge, Lösungen und Gefäße wurde geachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur und Typisierung der Spender

Zu Beginn dieses Projektes war der ursprüngliche Plan, Biopsate sowohl von Hernienpatienten, als auch von gesunden Spendern zu entnehmen. Dies sollte unter anderem der Verifizierung und genaueren Analyse vermuteter und bekannter Risikofaktoren anhand von PCR und Gene-Array dienen. Im Verlauf des ersten Jahres stellte sich allerdings recht schnell heraus, dass die Anzahl der Fibroblasten, die aus gesunder Faszie gewonnen wurden, um ein vielfaches niedriger war, als die Anzahl aus Herniengewebe und Hautbiopsaten. Dies führte dazu, dass es in ca. 50-60% der Fälle, in denen Biopsien aus gesundem Faszienewebe entnommen wurde, nicht genügend Fibroblasten gewonnen werden konnten, um diese in statischer Kultur züchten (expandieren) zu können. So wurde im weiteren Verlauf der Biopsatgewinnung darauf verzichtet von gesunden Spendern Proben zu entnehmen, da die Größe der benötigten zu entnehmenden gesunden Faszie, um sicher genügend Fibroblasten für die Kultur zu gewinnen, ein vertretbares Maß übersteigen würde (es ist nicht vertretbar bei gesunden Patienten Biopsate von 5 auf 2 cm Größe zu entnehmen, da hiermit wiederum die Gefahr der Entwicklung einer Narbenhernie zu groß gewesen wäre). Durch Verwendung einer an der Aachener Universitätsklinik verwendeter Kollagenratio, bei der das Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III, im Siriusrotgefärbten Biopsat unter Polarisationsmikroskopie bestimmt wird, konnte dennoch eine Einteilung der Herniengewebe in vermutet gute und schlechte Heiler vorgenommen werden (Ratio Kollagen I/III >5 = guter Heiler). Wie weiter oben schon angedeutet, unterschieden sich die gewonnenen Gewebe sowohl hinsichtlich der gewonnenen Menge an Fibroblasten, als auch hinsichtlich ihrer Kulturaktivität. So zeigten vor allem Zellen die von Patienten mit mehreren Risikofaktoren, bzw. nach stattgefundenem Narbenhernienrezidiv, mit einem langsameren Wachstum in der Kultur aus (längere Expansionsdauer), was wiederum bedeutete, dass schneller wachsende Zellen in höherer Passagezahl in den Reaktor gebracht wurden, wenn wir sie mit den langsamer wachsenden Zellen kokultivieren wollten (Zellen wurden bis höchstens Passagezahl 5 verwendet). Als Ergebnis ist festzuhalten, die Kollagenratio

basierte Typisierung in „gute und schlechte Heiler“ gibt einen Anhaltspunkt, ob mit einer längeren Expansionsdauer zu rechnen ist, da verlängerte Expansionsdauern bisher nur bei „schlechten Heilern“ beobachtet wurden, alternativ könnte versucht werden Proben bei denen mit längerer Expansion zu rechnen ist dementsprechend dichter auszusähen (2000 Zellen/ T-75 Flasche anstatt 1000) um die Dauer zu reduzieren, gerade auch im Hinblick auf die eventuelle Verwendung, von mit Spenderfibroblasten vorkultivierten Neofaszien mit/ohne Netz, als Transplantat für zukünftige Hernienoperationen. Die Typisierung erlaubt auch noch eine weitere Form der Analyse der Neofaszien so können diese nicht nur anhand der verwendeten Netze eingruppiert und gegenübergestellt werden sondern es kann noch eine weitere, Netzunabhängige Analyse anhand zugrundeliegender „Fibroblastenqualität“ vorgenommen werden.

3.2 Bioreaktor

Der Bioreaktor bereitete, wie erwartet, kaum Probleme. Anfänglich trockneten einzelne Neofaszien während der Kultur aus, was sich aber durch Zugabe von etwas mehr DMEM-Kulturmedium und bei Bedarf verkürzten Wechselintervallen (24-36h bei Bedarf) in den Griff bekommen ließ. In keinem Reaktordurchlauf waren wir mit dem Problem der Kontamination der Neofaszie konfrontiert, was wir auch aufgrund der verwendeten Materialien und den 5cm tiefen Kammern (Sicherheitsabstand zwischen Kultur und Deckel), sowie den Sterilfiltern am Deckel (Filtrierung der Luft die in die Kammern eintritt) nicht erwarteten. In Bezug auf die unterschiedlichen, verwendeten Netze zeigte sich bei den Kulturen mit dem Konzeptnetz der Arbeitsgruppe Groll sowie bei den Kulturen ohne Netz keine Formstabilität der Neofaszie in Bezug auf den Durchmesser der Faszien (schrumpften auf ca. 2/3 der Ausgangsfläche zusammen).

3.3 Histologie

3.3.1 Fibroblasten in der Neofaszie

Zu Beginn der Histologischen Auswertung stand die Frage, ob sich die Fibroblasten, im Verlauf der 2-wöchigen Kultur, über den gesamten Bereich der Neofaszie verbreitet hatten, oder ob die mit eingebrachten Netze, während der dynamisch-mechanisch stimulierten Kultur, eine negative Auswirkung auf die Fibroblastenverteilung hatten. Hierzu wurden Schnitte in HE-Färbung, mit 400-facher Vergrößerung untersucht. Es zeigte sich dass die verwendeten Netze keinen negativen Effekt auf die Verteilung der Fibroblasten hatten. (Fibroblasten konnten über den gesamten Bereich der Neofaszie nachgewiesen werden, auch in unmittelbarer Umgebung der Netzstrukturen).

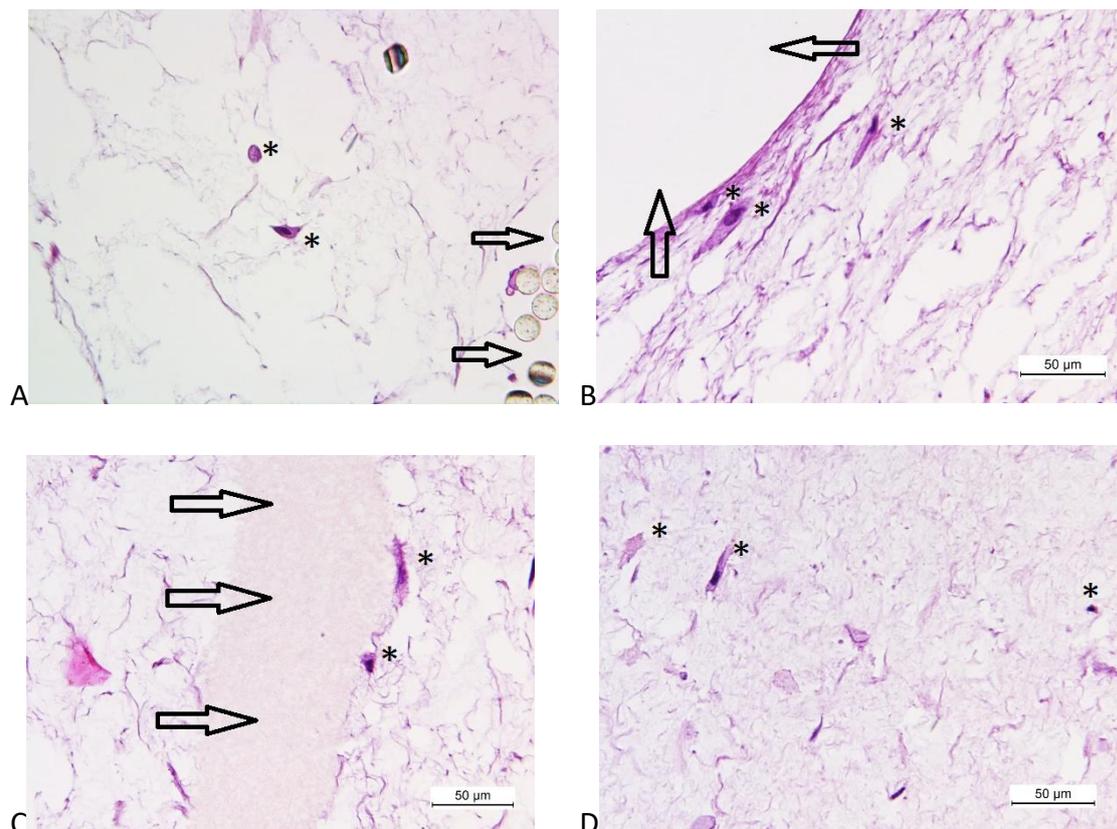


Abb. 4 – Beispiele für Fibroblasten in der Neofaszie in HE-Färbung mit 400-facher Vergrößerung. A) 7A, B) 7B, C) 7C und D) 7 ohne Netz; Sterne: Fibroblasten; Pfeile: Netzstrukturen bzw. artifizielle Lücken an denen Netzstrukturen waren

3.3.2 Dicke der Neofaszien (HE-Färbung und Siriusrot)

Für die Analyse der Dicke der erhaltenen Neofaszien wurden 31 unterschiedliche Neofaszien von 12 verschiedenen und typisierten Spendern untersucht (5 als „gute Heiler“ und 7 als „schlechte Heiler“ typisierte Spender), bis auf einige Ausnahmen, lagen diese jeweils in HE und Siriusrotfärbung vor.

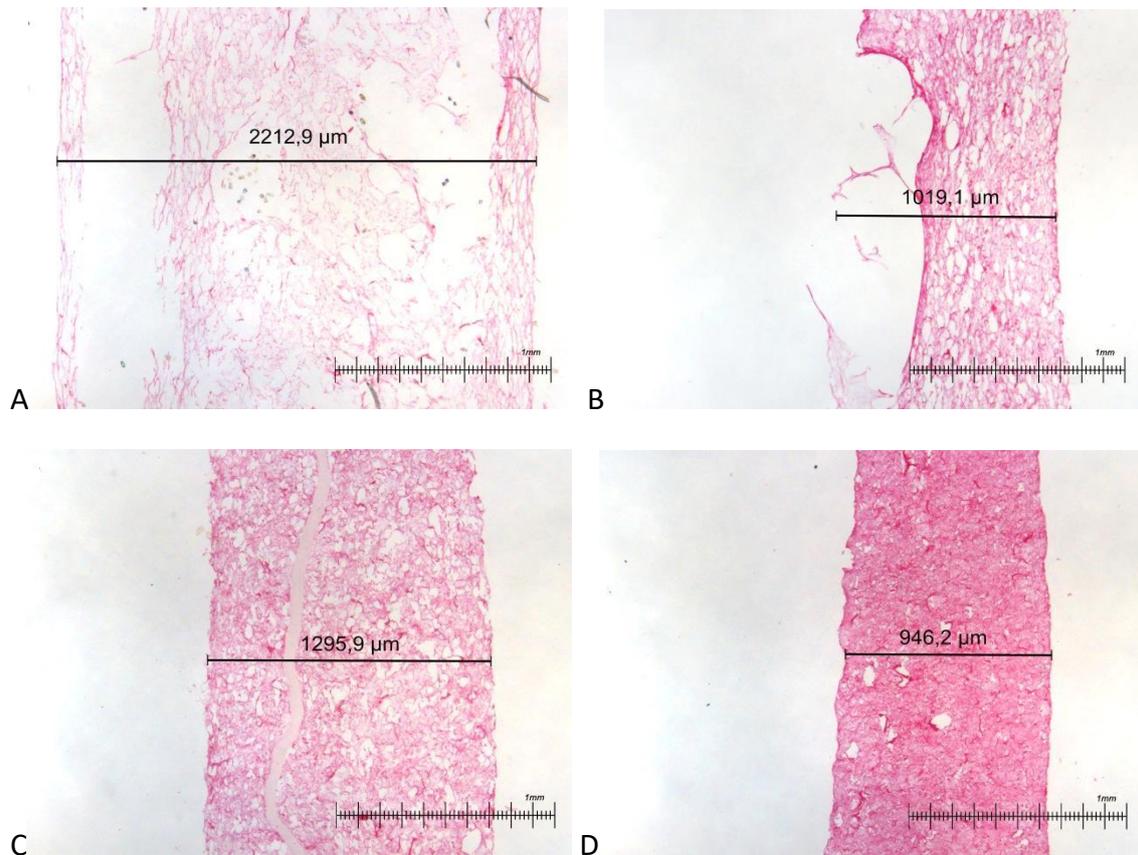


Abb. 5– Beispiele für die Bestimmung der Faszienstärke. A) Netz A (Probe 7A), B) Netz B (Probe 7B), C) Netz C (Probe 7C) und D) Kein Netz (ebenfalls Probe 7) alle in Siriusrot-Färbung, Vergrößerung 50x, Mikrofotographie ohne Polarisation

Die Untersuchungskriterien waren nach Netzen getrennt:

die durchschnittliche Neofaszienstärke

Die Varianz bzw. daraus resultierend die Standardabweichung

Diese Untersuchungskriterien wurden (auch nach Netzen getrennt) auf kleinere Einzelgruppen („gute und schlechte Heiler“) angewandt, abschließend wurde der netzübergreifende Durchschnitt mit jeweiliger Varianz sowohl für alle Proben, als auch für die jeweiligen Heilerkategorien untersucht. 18 Neofaszien waren Kulturen der als „gute Heiler“ eingruppierten Spender, 13 der als „schlechte Heiler“ eingruppierten. Die höhere Menge trotz geringerer absoluter Zahl an Neofaszien von als „gute Heiler“ typisierten erklärt sich daraus, dass Kulturen mit Netz C und Kulturen ohne Netz hauptsächlich von „guten Heilern“ gezüchtet wurden, da dort die Zellausbeute nach Expansion höher war und der Hauptfokus auf Vergleiche zwischen Netz A und B lag, da diese beiden klinisch schon im Einsatz sind, so dass auch vergleichende Betrachtungen zu Netzexplantaten hinsichtlich Kollagenstruktur angestellt werden konnten (siehe 3.3.3).

Tabelle 1 – Dicke der Neofaszie

	Sirius in μm	HE in μm	\emptyset Faszie	\emptyset nach "Heiler" (mean \pm SD)	\emptyset Netztyp Gesamt (mean \pm SD)
Polyester					1695,45 \pm 193,01
#2A	1517,8	1735,5	1626,65		
#7A	1862,6	1506,4	1684,5		
#17A	1502,2	1445,1	1473,65		
#24A	1856,8		1856,8		
#43A	1582,6	1664,1	1623,35		
				1659,575 \pm 160,48	
#10A	1407,6	1420,3	1413,95		
#12A	1912,9	1808,2	1860,55		
#15A	1845,8	1837,6	1841,7		
#26A	2036,4	2110,8	2073,6		
#30A	1858,5	1769,5	1814		
				1800,76 \pm 217,09	
Ultrapro					1302,77 \pm 405,01
#7B	1385,6	1416,5	1401,05		
#9B		907,1	907,1		
#13B	1710,1		1710,1		
#24B	2143		2143		
#43B	856,8	877,7	867,25		
				1405,7 \pm 457,55	
#10B	782	789,8	785,9		
#15B	1360	1593,7	1476,85		
#26B	962,9	898,5	930,7		
#30B	1667	1338,9	1502,95		
				1174,1 \pm 335,91	
Konzept					1796,51 \pm 159,814
#7C	1813,7	1690	1751,85		
#13C	2168,5		2168,5		
				1960,175 \pm 214,35	
#12C	1802,7	1819,3	1811		
#15C	1734	1759,8	1746,9		
#26C	1774,8	1642,4	1708,6		
#30C	1685,5	1498,9	1592,2		
				1714,675 \pm 98,33	
Hydrogel					1250,86 \pm 375,89
#7	883,1	1044,1	963,6		
#13	829,3		829,3		
				896,45 \pm 93,964	
#10	1106,7	854,1	980,4		
#12	1847,2	1970,1	1908,65		
#15	1703,1	1645,9	1674,5		
#26	1103,9	1072,9	1088,4		
#30	1377,3	1245	1311,15		
				1392,62 \pm 357,776	

Gelb: schlechte Heiler; Grün: gute Heiler

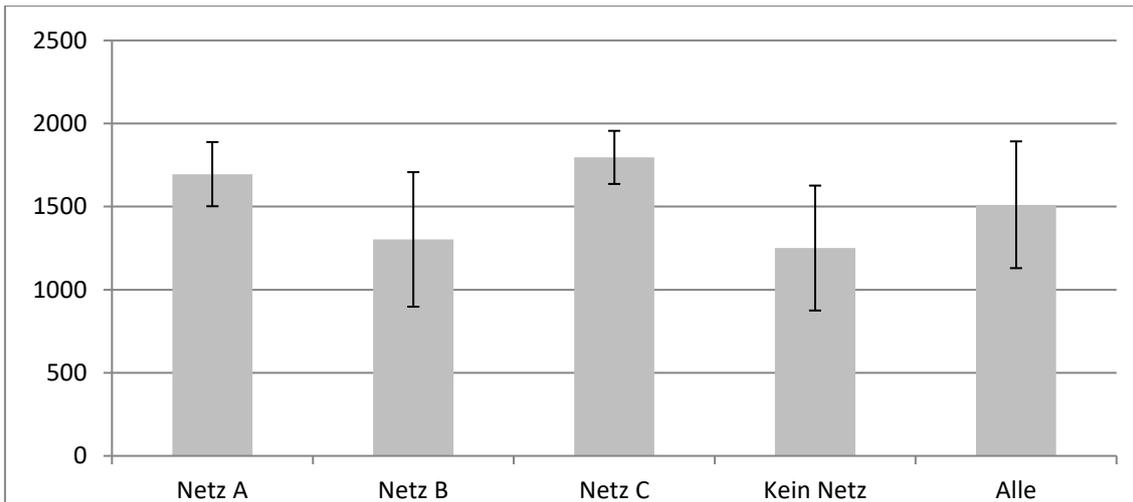


Abb.6 – Durchschnittliche Dicke der Neofaszien in μm , mit Standardabweichung (nicht nach Heilerkategorien unterschieden).

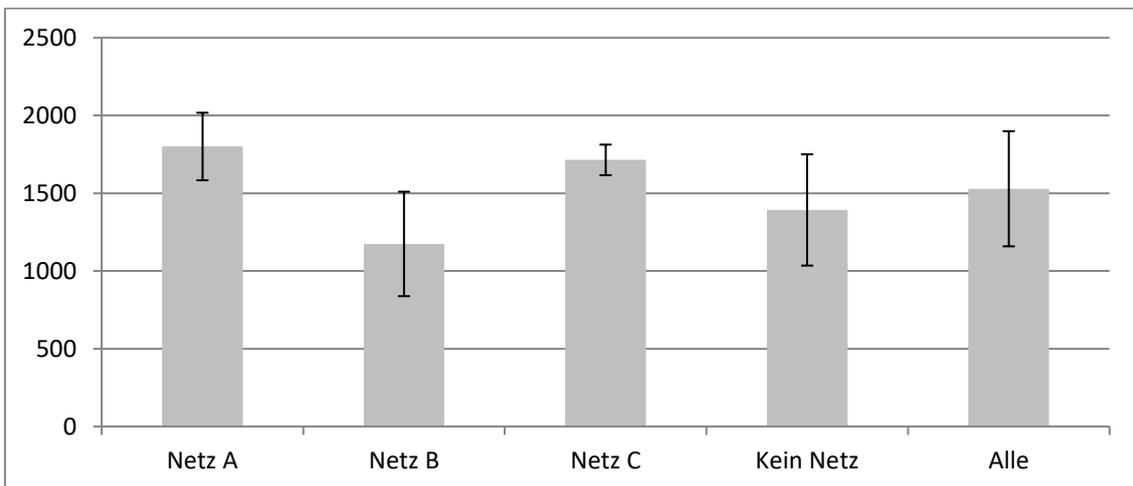


Abb. 7 – Durchschnittliche Dicke der Neofaszien von Guten Heilern in μm , mit Standardabweichung.

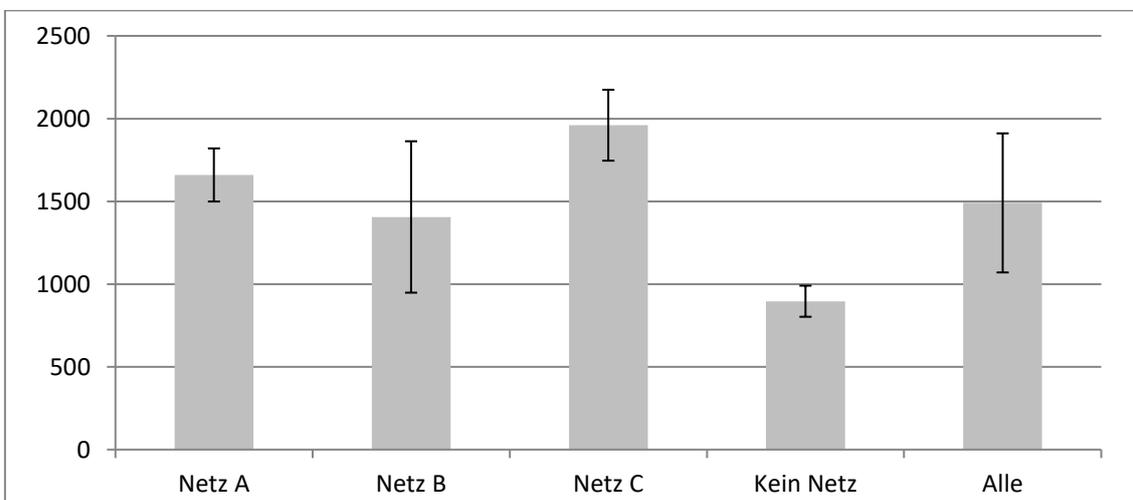


Abb.8 – Durchschnittliche Dicke der Neofaszien von Schlechten Heilern in μm , mit Standardabweichung.

Der auffälligste Unterschied besteht bei den Neofaszien die ohne Netz kultiviert wurden. Dort fällt auf, dass die Faszienstärke von „schlechten Heilern“ um einiges niedriger ist als die von „guten Heilern“, da aber noch zu wenige Proben kultiviert wurden um dies zu validieren, werden noch weitere Kulturen benötigt um endgültige Aussagen hierzu treffen zu können. Ansonsten wird deutlich dass Netze A und C einheitlichere Faszien produzieren als Netz B, dass von allen Netzen in allen Kategorien die größte Streuung der Ergebnisse aufweist. Während bei den „schlechten Heilern“ alle Netztypen zu einer Zunahme der Faszienstärke, im Vergleich zu Kulturen ohne Netz führen, produziert Netz B bei „guten Heilern“ dünnere Faszien. Für weitergehende Aussagen muss aber noch die Kollagendichte (Densität) bestimmt werden (siehe 3.3.3).

3.3.3 Kollagenstruktur, -dichte und -Ratio I/III (Siriusrot)

Zur Betrachtung von Kollagenstruktur, -dichte und -Ratio I/III werden Siriusrotgefärbte Schnitte benötigt, Aussagen über die Struktur werden sowohl mit einfacher Lichtmikroskopie als auch mithilfe der Polarisationsmikroskopie getroffen, um Aussagen zu Dichte und Ratio treffen zu können müssen die Schnitte in Polarisationsmikroskopie betrachtet werden. In der Sirius Färbung ist erkennbar dass sich über die kompletten Neofaszien Stränge von gerichteten Kollagenfibrillen ziehen. Bei Netz A (Polyester) zeichnen sich diese durch einen eher als polydirektional zu bezeichnenden Faserverlauf aus, Stellen der Neofaszie mit verstärkter Faserausbildung, liegen, sowohl räumlich, als auch vom Faserverlauf, scheinbar nicht im klaren Zusammenhang mit den Netzstrukturen. In den beiden Bildern sind die Kollagenstränge rosarot angefärbt, die Lücken in der Faszie sind die Bereiche die vom Netz durchzogen sind, teilweise artifiziell verzogen und vergrößert.

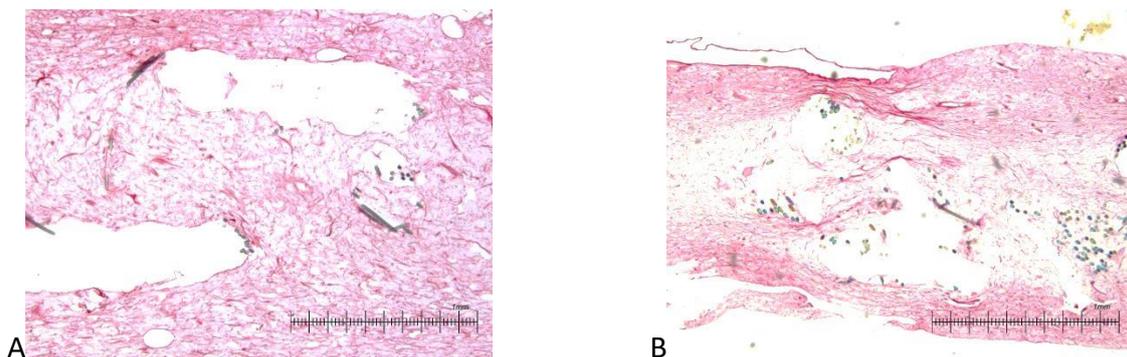


Abb.9 – Kollagenstruktur links 15A (Siriusrot), rechts 2A (Siriusrot)

Auch bei Netz B (Polypropylen) ist über die komplette Neofaszie erkennbar dass sich Kollagen den mechanischen Anforderungen entsprechend zu größeren Fibrillen bündelt. Netz B zeichnet sich außerdem durch eine stärkere Verdichtung der Kollagenstränge um die Netzstruktur herum aus. Dieses konzentrische Wachstumsmuster ist nach 2-wöchiger Kultur schon zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Netzeinkorporation würde diese Kollagenstruktur immer stärker ausgeprägt sein, bis sie wie von klinischen Netzexplantaten bekannt ist, zur dominanten Kollagenstruktur wird. In den nachfolgenden Bildern, sind in der ersten Reihe exemplarisch zwei siriusgefärbte Neofaszien nach 2-wöchiger Kultur mit Netz B zu sehen. In der zweiten Reihe links ein in vivo Netzexplantat in Polarisationsaufnahme, bei dem diese konzentrische Kollagenfaseranordnung das dominante Merkmal ist;

während auf der rechten Seite ein Polarisationsbild, in 40-facher Vergrößerung, einer Neofaszie mit Netz B zu sehen ist, bei dem erkennbar wird, dass auch nach der 2-wöchigen Kultur diese konzentrisch verstärkt ausgeprägte Kollagenstruktur schon vorhanden ist.

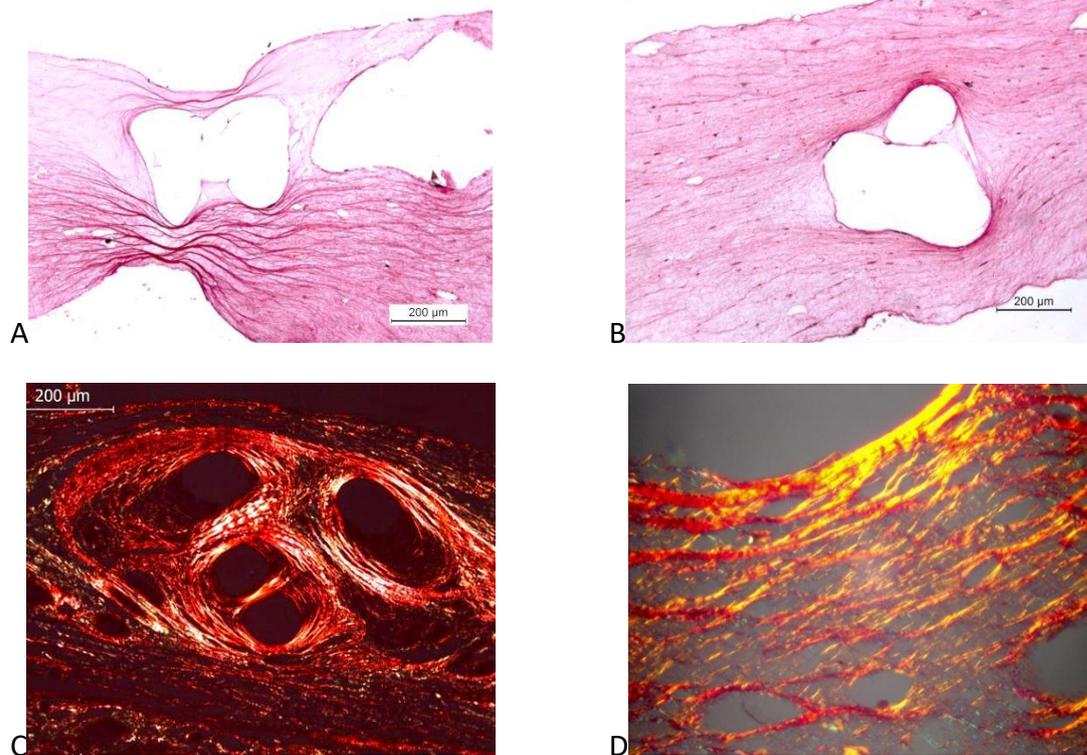


Abb. 10 –Kollagenstruktur obere Reihe Siriusrot, untere Reihe Siriusrot in Polarisationsmikroskopie. A, 43B; B, 26B; C Bild eines in Würzburg explantierten Netzes; D, 30B.

Netz C zeichnet sich ähnlich wie Netz A durch polydirektionalen Faserverlauf aus, wobei die Faszie an sich etwas homogener wirkt und größere Fibrillen hauptsächlich an den Rändern und direkt am Netz quer zur mechanischen Druckrichtung des Reaktors verlaufen. Die schon angedeutete Forminstabilität des Konzeptnetzes wird in diesen Schnitten erkennbar, durch den wellenartigen Charakter der Netzstruktur. Dies ist Resultat der Abnahme des Durchmessers der Neofaszie während der Kultur.

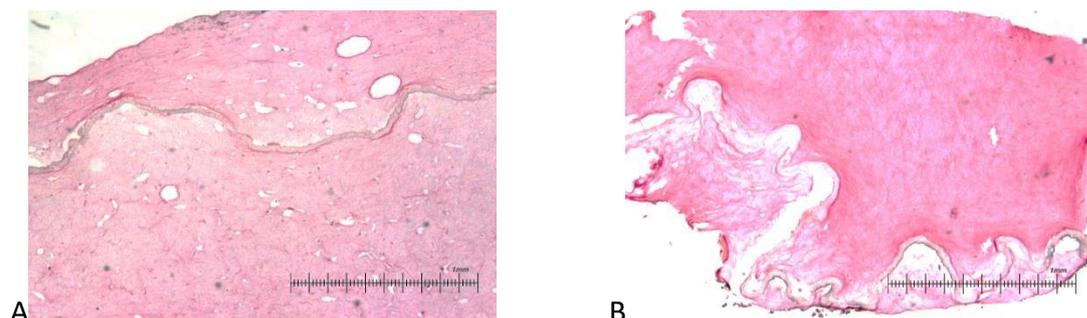


Abb. 11 – Kollagenstruktur links 13C (Siriusrot); rechts 26C (Siriusrot)

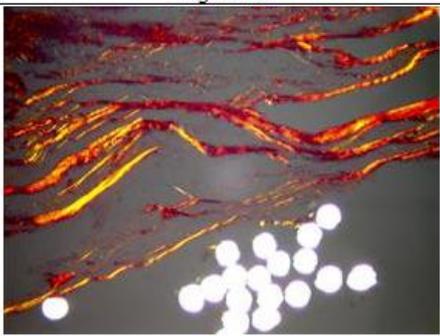
In der weitergehenden Auswertung der Neofaszien hinsichtlich ihres Kollagens interessiert das Verhältnis (Ratio) von Kollagen I zu Kollagen III, da sich dadurch Aussagen über die Zugfestigkeit des Gewebes machen lassen, da Kollagen III elastischer als Kollagen I ist und damit eine hohe Ratio mit größerer Stabilität gleichgesetzt werden kann. Die Ratio lässt sich ermitteln, da Kollagen I in der Polarisationsmikroskopie Rot bzw. in manchen Aufnahmen auch orange erscheint, während Kollagen III ein Farbspektrum von Gelb bis Türkis aufweist.

Interessant ist auch die Kollagendensität, als Maß für die Kollagendichte (Kompaktheit) des Gewebes, dargestellt in der Polarisationsmikroskopie mit maximaler Farbsättigung um auch alle „Rottöne“ zu erfassen.

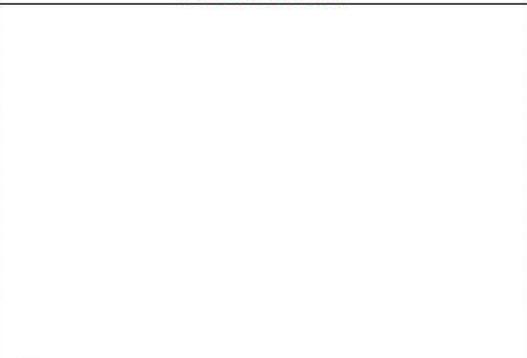
LAS Bericht Bildanalyse

Projekt		Ergebnis	
Präparation		Beobachtung	
Probe		Bearbeiter	
Schlüsselwörter		Kalibrierung:	1 pixel = 1,14 Microns
Analysedatum:	12.11.2013	Gescannter Bereich:	0

Originalbild



Bearbeitetes Bild



2APOL.tif

Abb.12 – Beispielhaft dargestellt der beginn des Berichts mit der Leica Applicationsuite 4.3 für Probe 2A

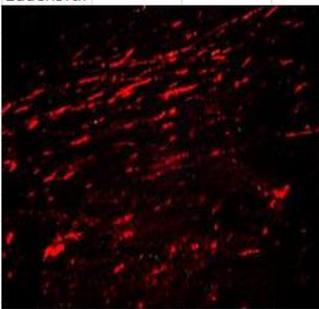
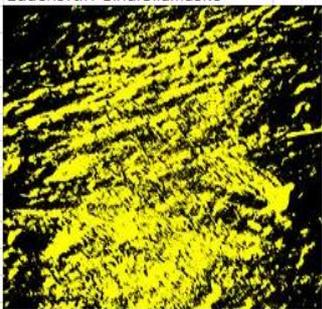
Titel	Daten	2adens.tif	2adens.tif: Binärbildmaske
Bildname	2adens.tif		
Pixelgröße	2560 x 1920 x 24 bpp		
Kalibrierte Größe	2560,00 x 1920,00 px		
Kalibrierung	1 pixel = 1 Pixels		
Kalibrierwert	1		
Erstelldatum	31.10.2013 18:18:37		
Dateigröße	14.400 kb		

Abb 13 – zu sehen ist links die hohe Sättigung des Bildes in der Polarisationsmikroskopie, und rechts gelb eingefärbt, alles was als rot (Kollagen) erkannt wird für die Messung der Densität

Tabelle 2 –Ergebnisse der Polarisationsmikroskopie und Ratio Kollagen I/III

Neofaszie Polarisierung	Fläche Rot (Koll I) in μm^2	Fläche Grün (Koll III) in μm^2	% Rot (Koll I)	% Grün (Koll III)	Ratio I/III Fläche	Ratio I/III %
7Nativ	2713274	473617	55,2	9,64	5,728835747	5,7261410788
7A	1017993,75	76259,75	15,82	1,18	13,3490307797	13,406779661
7B	2980064,82	132737,51	46,31	2,06	22,4508115302	22,4805825243
7C	903409,71	61242,92	14,03	0,95	14,75125141	14,7684210526
7 ohne Netz	2248740,63	109618,57	34,94	1,7	20,5142306637	20,5529411765
9B	1864984,63	171598,53	28,98	2,66	10,8683019021	10,8947368421
10Nativ	3975697	116519	80,89	2,37	34,1205897751	34,1308016878
10A	6987,4	415,9	9,6	0,6	16,8006732388	16
10B	2210,6	284,5	3,1	0,4	7,7701230228	7,75
10 ohne Netz	21540,2	154,2	29,7	0,2	139,6900129702	148,5
12Nativ	40754,3	5022,2	56,2	6,9	8,1148301541	8,1449275362
12A	534954,62	264870,21	8,31	4,11	2,019685868	2,0218978102
12C	2091644,45	130267,21	32,5	2,02	16,0565690322	16,0891089109
12 ohne Netz	2503720,49	392163,12	38,91	6,09	6,3843853802	6,3891625616
13B	1618474,72	453646,92	25,15	7,05	3,5676969217	3,5673758865
13C	2727434,81	289079,64	42,38	4,49	9,4348907104	9,438752784
13 ohne Netz	3358477,03	903616,55	52,19	14,04	3,7167059745	3,7172364672
15Nativ	669621,77	37550,59	10,4	0,58	17,8325232706	17,9310344828
15A	3065237,02	758498,76	47,63	11,78	4,0411892302	4,0432937182
15B	1871035,35	113651,95	29,07	1,76	16,4628530351	16,5170454545
15C	2563088,77	96424,02	39,83	1,49	26,5814344807	26,7315436242
15 ohne Netz	1637809,01	67107,75	25,45	1,04	24,4056611941	24,4711538462
17A	785110,41	17848,44	12,2	0,27	43,9876207669	45,1851851852
24A	2447428,64	47231,48	38,03	0,73	51,8177418959	52,095890411
24A2	1144145,12	53420,97	17,78	0,83	21,4175279857	21,421686747
24B	2745903,78	162709,65	42,67	2,52	16,8760966544	16,9325396825
24B2	1090052,57	37630,45	16,94	0,58	28,9673009491	29,2068965517
26Nativ	30445,4	5667,3	42	7,8	5,372117234	5,3846153846
26A	3716,4	614,9	5,9	0,8	6,0439095788	7,375
26B	1803174,86	519571,23	28,02	8,07	3,4705055936	3,4721189591
26C	3118381,77	469328,79	48,46	7,29	6,6443436594	6,6474622771
26 ohne Netz	4217158,28	629784,15	65,53	9,78	6,6961962761	6,700408998
30A	2494894,45	60617,16	38,77	0,94	41,1582207085	41,2446808511
30B	2424911,89	299976,69	37,68	4,66	8,0836677343	8,0858369099
30C	885748,47	7383,39	13,76	0,11	119,9650120067	125,0909090909
30 ohne Netz	5423931,37	36843,67	84,29	0,57	147,2147419082	147,8771929825
43Nativ	28376	8480,2	39,2	11,7	3,3461474965	3,3504273504
43A	5435,7	1717,9	7,5	2,4	3,1641539088	3,125
43B	9251,1	2856,2	12,8	3,9	3,2389538548	3,2820512821
55Nativ	14293,8	6176,4	19,7	8,5	2,3142607344	2,3176470588

Gelb = schlechter Heiler, grün = guter Heiler

Tabelle 3 – Ergebnisse der Bestimmung der Kollagensdichte

Neofaszie Densität	Fläche Kollagen in μm^2	% Kollagen	Fläche Faszie in μm^2	% Faszie	% Kollagen in Faszie
7Nativ	53046	73,2	68843,85	95	77,0526315789
7A	25869	35,6	44471,44	61	58,3606557377
7B	930393	18,92	3688132,9	75	25,2266666667
7C	3597218	73,18	4915577	100	73,18
7 ohne Netz	4049116	82,37	4915577	100	82,37
9B	3131403	63,7	4669798	95	67,0526315789
10Nativ	61337,7	84,6	61627,7	85	99,5294117647
10A	18302,4	25,3	28936,6	40	63,25
10B	59988,1	82,8	65441,56	90	92
10 ohne Netz	38114,4	52,6	62316,32	86	61,1627906977
12Nativ	64659,5	89,2	68863,81	95	93,8947368421
12A	1601426	32,58	4424019	90	36,2
12C	4701807	95,65	4915577	100	95,65
12 ohne Netz	4009602	81,57	4915577	100	81,57
12 ohne Netz 2	2370834	48,23	4915577	100	48,23
13B	1684985	34,28	4114338	93	36,8602150538
13C	3601973	73,28	4915577	100	73,28
13 ohne Netz	4563961	92,85	4915577	100	92,85
15Nativ	1828018	37,19	4915577	100	37,19
15A	2051261	41,73	4915577	100	41,73
15B	1158301	23,56	4915577	100	23,56
15C	1514086	30,8	4669798	95	32,4210526316
15 ohne Netz	4471271	90,96	4915577	100	90,96
17A	706800	14,37	4669798	95	15,1263157895
24A	1491041	30,33	4424019	90	33,7
24B	3144172	63,96	4669798	95	67,3263157895
26Nativ	44995,1	62,1	61587,5	85	73,0588235294
26A	52582,7	72,6	65165,17	90	80,6666666667
26B	2101986	42,76	2457788	50	85,52
26C	3919035	79,73	4915577	100	79,73
26 ohne Netz	4040655	82,2	4768109	97	84,7422680412
30A	1912951	38,91	4915577	100	38,91
30B	1980863	40,3	4669798	95	42,4210526316
30C	2199705	44,75	4915577	100	44,75
30 ohne Netz	4888036	99,44	4915577	100	99,44
43Nativ	60449,9	83,4	67408,16	93	89,6774193548
43A	18837,8	26	56424	80	32,5
43B	42953	59,3	72433,39	100	59,3
55Nativ	4787,5	6,6	17986,742	25	26,4

Gelb = schlechter Heiler, grün = guter Heiler

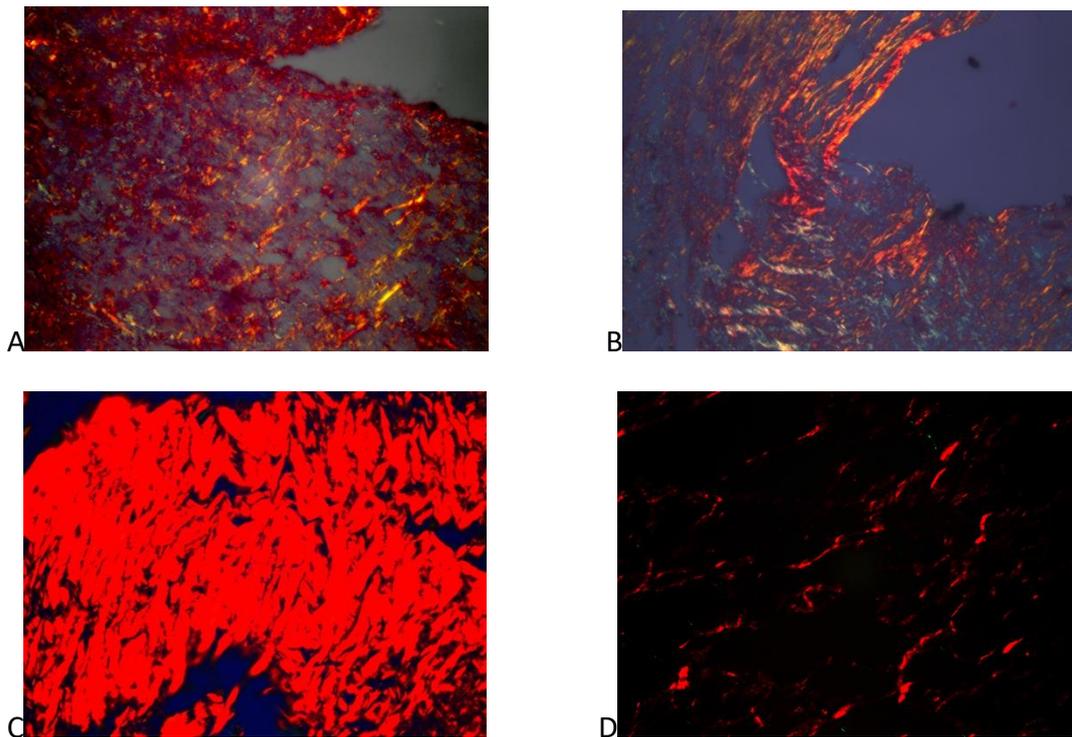


Abb 14 – Beispiele für A) hohe I/III Ratio (A), B) niedrige I/III Ratio(B); C) hohe Densität (C); D), niedrige Densität (D).

3.4 qRT-PCR

Für die quantitative real time-PCR, wurde RNA, bzw. die daraus transkribierte cDNA, von folgenden Proben verwendet:

Proben 7, 10, 12, 15, 26, 43, 55, wobei von allen Proben, bis auf 12, auch RNA der Neofaszien mit den Netzen A und B verwendet wurde. Bei Probe 12 waren es Neofaszien der Netze A und C. Zur RNA Isolierung wäre noch zu erwähnen, dass um genügend RNA zu erhalten Aufgrund der niedrigen Zellzahl in den Geweben, für die Isolierung aus Nativgewebe die 3-fache Menge Material verwendet wurde (100 anstatt 30mg), und für die Isolierung aus Neofaszien sogar 300mg Material zur Verfügung stehen musste,(da Netz und Gel auch „totes Gewicht“ darstellten).Die gleichen RNA-Proben wurden auch für die in Kapitel 3.5 beschriebenen Gene Arrays verwendet.

Bei der qRT-PCR handelt es sich um eine PCR Methode bei dem über ein dem Mastermix zugesetztes lumineszentes Reagens und Fotos nach jedem Replikationszyklus, um die Absorption zu messen, nicht nur Gene nachgewiesen

werden können, sondern auch durch den Replikationszyklus in dem die sigmoidale Absorptionskurve in den Bereich der linearen Steigung übergeht (ct-value), Aussagen über die Mengenverhältnisse von RNA im Ausgangsgewebe und damit der Aktivität von Genen, getroffen werden können. Als Housekeepinggen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Das Housekeepinggen wird benötigt um die Genaktivität der einzelnen Proben untereinander vergleichen zu können. Dabei wird der Δ ct-value bestimmt (der ct-value von GAPDH der jeweiligen Probe vom ct-value des Gens, z.B. Col1A1 abgezogen). Der Δ ct-value der einzelnen Gene einer Probe stellt somit den von der Grundaktivität der Zellen einer Probe „bereinigten“ Wert da, und kann somit zum Vergleich mit den Δ ct-values der anderen Proben herangezogen werden. Zur weiteren Analyse wird nun eine Probe als Vergleichsstandard (Calibrator) verwendet, und der $\Delta\Delta$ ct-value für die einzelnen Gene bestimmt, indem vom jeweiligen Δ ct-value einer Probe der Δ ct-value dieses Gens des Calibrators abgezogen wird. Nach der Livak-Formel ($2^{(-\Delta\Delta ct)}$) kann nun der Faktor bestimmt werden, um den in der jeweiligen Probe dieses Gen stärker oder schwächer exprimiert ist als im Calibrator. Für die Auswertungen wurde zum einen Probe 26 nativ als Calibrator benutzt und alle anderen Genexpressionen damit verglichen. Weiterhin wurden noch Vergleiche innerhalb der einzelnen Proben vorgenommen, in dem die Expressionsstärken der Neofaszien mit der Expressionsstärke des dazugehörigen Nativgewebes als Calibrator verglichen wurden.

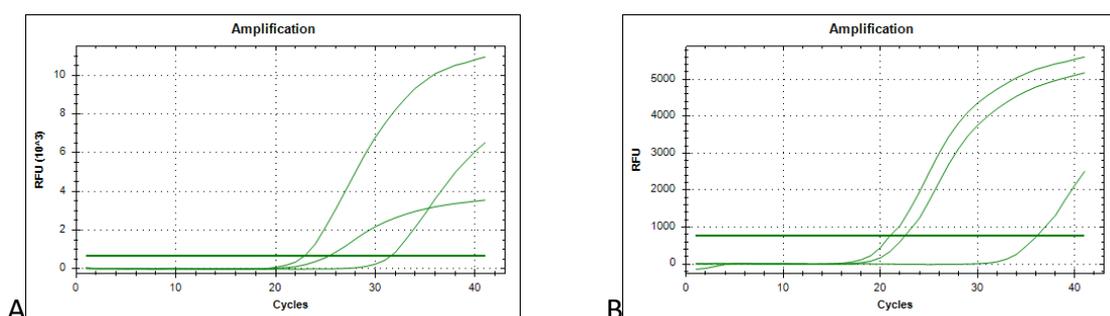


Abb. 15 – A unterschiedliche ct-values für Col1A1 von stärker nach schwächer 7A, 10, 7; B, Beispiel für stärkere Expressierung durch Kultur ct-values für MMP-1 von 7B, 7A, 7. Wenn die ascendierende Kurve frühzeitig die Schwellenlinie kreuzt ist von einer stärkeren Expressierung auszugehen...

Tabelle 4:Ergebnisse der qRT-PCR mit Darstellung der Zyklenzahl (ct-value)

Probennr.	Ct ref. (Gapdh)	Ct Col1A1	Ct Col1A2	Ct Col3A1	Ct MMP1	Ct MMP8	Ct ELN
7	31,57	25,17	24,97	25,82	35,7	40,26	31,46
7A	23,5	22,77	22,68	25,76	22,16	38,4	29,12
7B	22,82	23,11	23,27	25,75	20,71	38,69	33,02
10	29,42	31,57	31,5	34,55	42	36,47	33,94
10A	22,74	23,97	24,52	24,72	23,61	34,88	34,35
10B	24,58	22,49	23,11	25,29	25,53	36,4	31,79
12	29,95	29,99	30,27	31,4	38,59	38,49	36,32
12A	24,09	25,25	24,17	25,43	23,6	34,43	32,87
12C	23,39	23,33	22,77	23,45	20,95	35,13	30,08
15	30,62	26,34	28,23	28,79	42	38,245	37,24
15A	25,35	26,42	26,82	28,65	28,27	38,48	34,59
15B	23,28	26,48	25,83	28,37	28,37	37,19	32,51
26	33,06	32,24	32,33	34,45	35,935	37,45	38,24
26A	22,52	21,77	21,52	23,95	22,31	31,69	29,44
26B	23,14	21,21	21,84	23,91	21,98	31,85	29,45
43	30,42	34,25	32,78	35,43	37,93	36,37	37,79
43A	24,92	22,07	22,55	23,65	22,62	30,69	29,09
43B	22,21	24,59	23,13	24,42	22,4	29,86	31,62

Zyklenzahl (ct-value) entspricht dem Zyklus bei dem die Extinktion sowohl einen Schwellenwert überschreitet, als auch die sigmoidale Absorptionskurve der qRT-PCR in den geraden, konstant steigenden, Teil der Kurve übergeht.

Tabelle 5 – Δ Ct(ct-Gen)-(ct-GAPDH)

Probennr.	Δ Ct Col1A1	Δ Ct Col1A2	Δ Ct Col3A1	Δ Ct MMP1	Δ Ct MMP8	Δ Ct ELN
7	-6,4	-6,6	-5,75	4,13	8,69	-0,11
7A	-0,73	-0,82	2,26	-1,34	14,9	5,62
7B	0,29	0,45	2,93	-2,11	15,87	10,2
10	2,15	2,08	5,13	12,58	7,05	4,52
10A	1,23	1,78	1,98	0,87	12,14	11,61
10B	-2,09	-1,47	0,71	0,95	11,82	7,21
12	0,04	0,32	1,45	8,64	8,54	6,37
12A	1,16	0,08	1,34	-0,49	10,34	8,78
12C	-0,06	-0,62	0,06	-2,44	11,74	6,69
15	-4,28	-2,39	-1,83	11,38	7,625	6,62
15A	1,07	1,47	3,3	2,92	13,13	9,24
15B	3,2	2,55	5,09	5,09	13,91	9,23
26	-0,82	-0,73	1,39	2,875	4,39	5,18
26A	-0,75	-1	1,43	-0,21	9,17	6,92
26B	-1,93	-1,3	0,77	-1,16	8,71	6,31
43	3,83	2,36	5,01	7,51	5,95	7,37
43A	-2,85	-2,37	-1,27	-2,3	5,77	4,17
43B	2,38	0,92	2,21	0,19	7,65	9,41

negative Werte bedeuten eine niedrigere Zykluszahl im Vergleich zum Referenzgen und somit eine stärkere Expression. Positive Werte bedeuten eine schwächere Expression

Tabelle 6: 2^{Δ(-ΔΔCt)} 26 als Calibrator

Probennr.	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} Col1A1	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} Col1A2	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} Col3A1	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} MMP-1	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} MMP-8	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} ELN
7	47,84	58,49	141,04	0,42	0,05	39,12
7A	0,94	1,06	0,55	18,57	0,0007	0,74
7B	0,46	0,44	0,34	31,67	0,0004	0,03
10	0,13	0,14	0,07	0,001	0,16	1,58
10A	0,24	0,18	0,66	4,01	0,005	0,012
10B	2,41	1,67	1,60	3,8	0,006	0,24
12	0,55	0,48	0,96	0,02	0,06	0,44
12A	0,25	0,57	1,04	10,3	0,02	0,08
12C	0,59	0,93	2,51	39,81	0,006	0,35
15	11,00	3,16	9,32	0,003	0,12	0,37
15A	0,27	0,22	0,27	0,97	0,002	0,06
15B	0,062	0,10	0,08	0,22	0,001	0,06
26	1	1	1	1	1	1
26A	0,95	1,21	0,97	8,49	0,036	0,3
26B	2,16	1,48	1,54	16,39	0,05	0,46
43	0,04	0,12	0,08	0,04	0,34	0,22
43A	4,08	3,12	6,32	36,13	0,38	2,01
43B	0,11	0,32	0,57	6,43	0,1	0,05

Verhältnis der Expressionsstärke in Bezug auf die Stärke der Probe 26 (z.B. Col3A1 der Probe 43 ist nur 0,08 mal so stark ausgeprägt)

Tabelle 7: 2^{Δ(-ΔΔCt)} Proben für sich Nativ als Calibrator

Probennr.	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} Col1A1	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} Col1A2	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} Col3A1	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} MMP-1	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} MMP-8	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} ELN
#7	1	1	1	1	1	1
#7A	0,02	0,02	0,004	44,32	0,01	0,02
#7B	0,01	0,008	0,002	75,58	0,007	0,0008
#10	1	1	1	1	1	1
#10A	1,89	1,23	8,88	3350,13	0,03	0,007
#10B	18,9	11,71	21,41	3169,41	0,04	0,15
#12	1	1	1	1	1	1
#12A	0,46	1,18	1,08	560,28	0,29	0,19
#12C	1,07	1,92	2,62	2164,77	0,11	0,80
#15	1	1	1	1	1	1
#15A	0,02	0,07	0,029	352,14	0,02	0,16
#15B	0,006	0,03	0,008	78,25	0,01	0,16
#26	1	1	1	1	1	1
#26A	0,95	1,21	0,97	8,49	0,04	0,3
#26B	2,16	1,48	1,54	16,39	0,05	0,46
#43	1	1	1	1	1	1
#43A	102,53	26,54	77,71	897,64	1,13	9,19
#43B	2,73	2,71	6,96	159,79	0,31	0,24

Wie in Tabelle 6 nur die Neofaszien auf ihr Nativgewebe kalibriert (Stärkere Expression in den Neofaszien Fett hervorgehoben).

3.5 Gene Array

Die Daten des Gene Array zeigen in der Heatmap fast über den gesamten Bereich des Genoms eine Veränderung der Expression von Nativgewebe zur Kultur. Die Unterschiede zwischen den Netzen stellen sich dagegen als nicht so gravierend heraus (verdeutlicht anhand einer Heatmap und einer Korrespondenzanalyse).

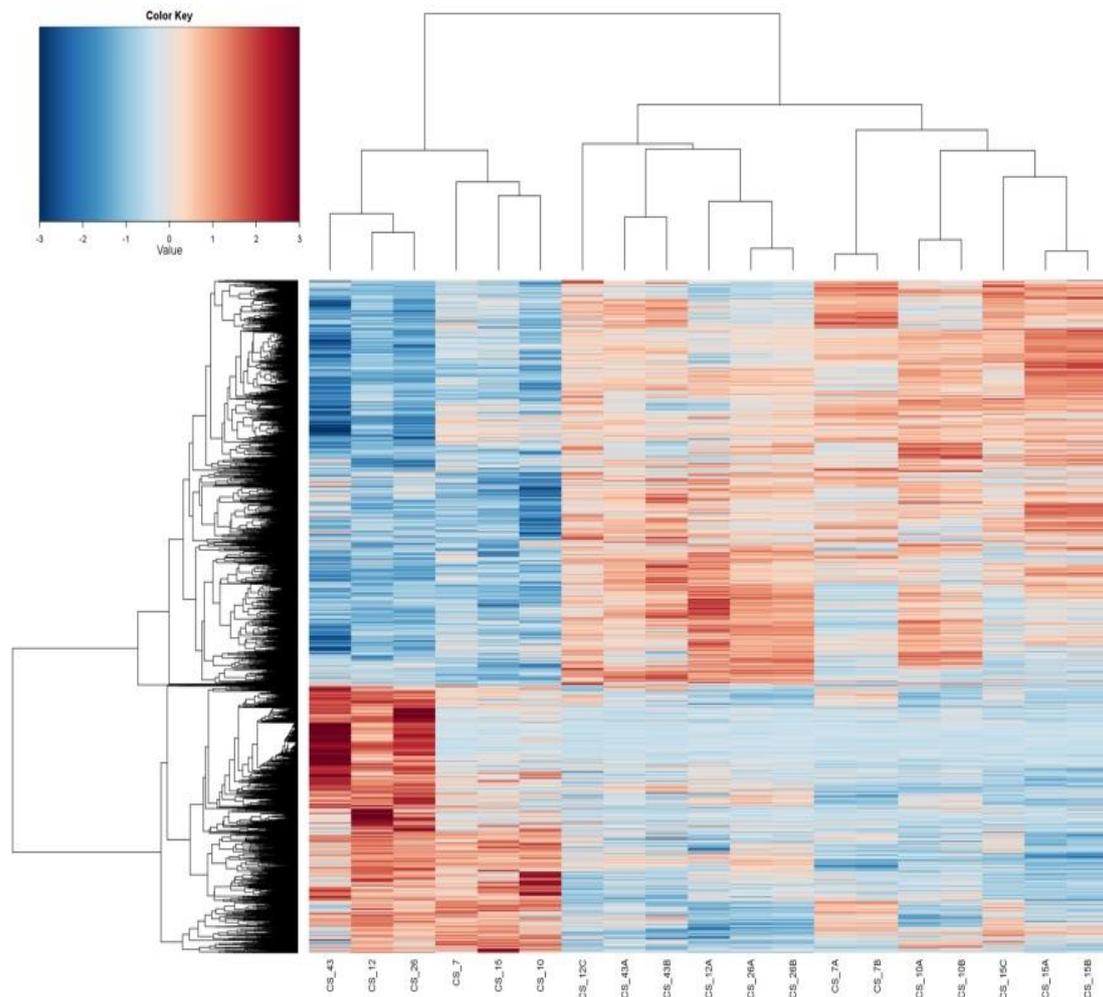


Abb. 16 – :Heatmap des Gene Arrays (komplettes Genom) inklusive Clusterdarstellung

In der Heatmap bedeutet rot stark exprimiert, blau schwach exprimiert. Wie zu erkennen ist bestehen starke Unterschiede zwischen den Nativgeweben (links) und den Neofaszien (7. Spalte bis ganz rechts). Nochmals dargestellt anhand der Clusterpfade am oberen Rand der Heatmap, in der ersichtlich wird das es 2 große Aktivitätscluster gibt, Nativ und Kultur. Bemerkenswert ist auch dass es zwischen den Expressionsstärken eine größere Ähnlichkeit von Neofaszie 12C zu den Faszien 43A und B gibt als zu 12A. ansonsten zeigen Neofaszien der einzelnen Proben die höchste

Affinität zueinander, unabhängig vom verwendeten Netztyp. Auffällig ist auch dass die Einteilung in „gute und schlechte Heiler“ keine Aussage über die Genaktivität des Nativgewebes erlaubt, denn beide als „schlechte Heiler“ eingestuften Proben (7 und 43) weisen ihrerseits eine stärkere Affinität der Expression zu jeweils 2 als „gute Heiler“ klassifizierten (12 und 26 bzw. 15 und 10) auf als zueinander.

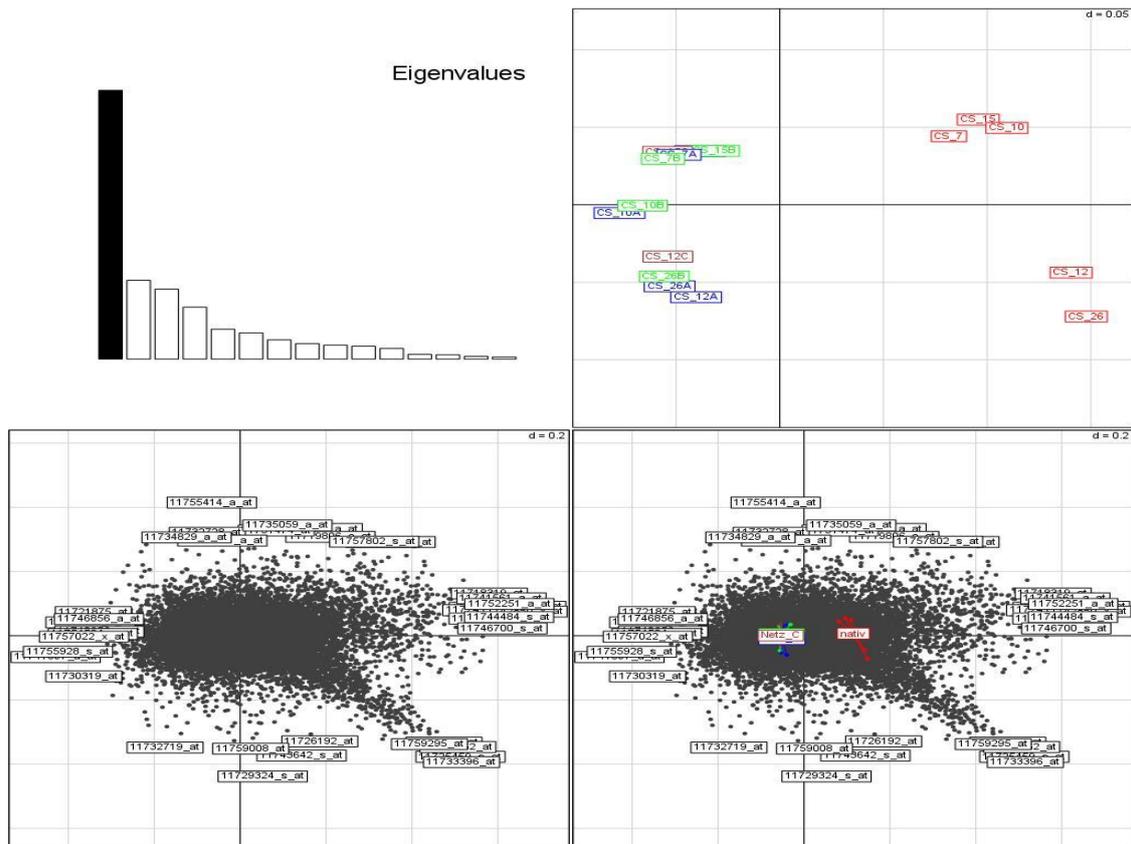


Abb. 17 – Korrespondenzanalyse der Faszien (das komplette Genom als Grundlage)

In der Korrespondenzanalyse wird der geringe Einfluss der unterschiedlichen Netztypen auf die Gesamtaktivität der untersuchten Genome noch einmal verdeutlicht, erkennbar ist eine Zweiteilung in Nativgewebe und Neofaszien.

Interessant ist auch ein Vergleich der Ergebnisse von Gene-Array mit denen der qRT-PCR, darum wurde noch einmal eine Heatmap, und eine Korrespondenzanalyse erstellt, die vor allem die in der qRT-PCR untersuchten Gene enthält.

der Probe 43. Erkennbar wird aber auch dass Kulturen mit Netz C (12 und 15) eine stärkere Abweichung der Expressionsstärke zu ihren Kokulturen mit den Netzen A und B aufweisen und Neofaszien von anderen Spendern hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens ähnlicher sind.

Als Vergleich der Ergebnisse von qRT-PCR und Gene-Array zu ermöglichen wurde eine Rangkorrelation der Rohdaten (des Gene-Arrays) mit den Δ ct-values (qRT-PCR) der Untersuchten Gene, durchgeführt. (wobei höhere Werte im Gene Array mit stärkerer Expression gleichzusetzen sind, während größere und positive Δ ct-values für eine schwächere Expression stehen). Hier die Tabelle der verwendeten Rohdaten des Gene Arrays.

Tabelle 8: Rohdaten derjenigen Sonde des Gene-arrays die für die Rangkorrelation nach Spearman verwendet wurde.

Probennr.	COL1A1	Col1A2	Col3A1	MMP-1	MMP-8	ELN
7	12,85	11,57	13,08	5,3	2,8	6,94
7A	9,97	10,68	9,8	13,79	2,7	5,99
7B	9,86	10,8	9,67	13,8	2,66	5,43
10	11,81	10	11,89	4,2	3,54	6,08
10A	10,79	10,24	11,6	13,77	2,98	5,11
10B	11,87	11,26	12,26	12,6	2,85	5,47
12	9,56	9,51	11,1	3,73	2,8	5,72
12A	9,34	10,65	11,6	14,41	2,9	5,63
12C	10,87	11,22	11,49	13,87	2,48	5,31
15	12,54	11,78	12,7	4,28	2,82	6,79
15A	9,31	10,31	10,43	13,53	2,78	5,43
15B	8,74	9,51	9,17	12,9	2,69	5,22
26	10,15	9,38	10,99	3,69	2,85	5,24
26A	10,77	10,42	11,33	14,25	2,92	5,54
26B	10,93	10,7	11,44	14,05	2,85	5,48
43	4,45	5,82	6,02	4,33	3,33	5,57
43A	10,43	10,8	11,4	14,29	2,85	5,79
43B	6,48	10,26	10,32	14,07	3,14	5,03

Für den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman wird folgende Formel verwendet:

$$k = 1 - \frac{6 \times \sum_{i=1}^n d_i^2}{n \times (n^2 - 1)}$$

in unserem Fall ist $n = 18$, d ist die Differenz der beiden Ränge des gleichen Gens für die gleiche Probe in beiden Verfahren. Z.B. für Col1A1 ist die d für Probe 7 = 0 ($1-1=0$). Das Ergebnis der Spearman Korrelation befindet sich zwischen 0 und 1, wobei ein Korrelationskoeffizient von 1 bedeuten würde Beide Reihen sind identisch von der Reihenfolge, je kleiner der Koeffizient desto unwahrscheinlicher wird ein Zusammenhang der beiden Verfahren. Um den p-value zu bestimmen wurde die Tabelle verwendet, die im Anhang auf Seite 61 angegeben ist.

Tabelle 9: Rangkorrelation von Gene-Array und qRT-PCR

Gen ↓	Rang →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	Koeffizient	p-value
Stärkste Expression																				Niedrigste Expression	
Col1A1	PCR	7	15	43A	10B	26B	26	26A	7A	12C	12	7B	15A	12A	10A	10	43B	15B	43	0,704	<0,01
	G-A	7	15	10B	10	26B	12C	10A	26A	43A	26	7A	7B	12	12A	15A	15B	43B	43		
Col1A2	PCR	7	15	43A	10B	26B	26A	7A	26	12C	12A	12	7B	43B	15A	10A	10	43	15B	0,750	<0,01
	G-A	15	7	10B	12C	7B	43A	26B	7A	12A	26A	15A	43B	10A	10	15B	12	26	43		
Col3A1	PCR	7	15	43A	12C	10B	26B	12A	26	26A	12	10A	43B	7A	7B	15A	43	15B	10	0,660	<0,01
	G-A	7	15	10B	10	10A	12A	12C	26B	43A	26A	12	26	15A	43B	7A	7B	15B	43		
MMP-1	PCR	12C	43A	7B	7A	26B	12A	26A	43B	10A	10B	26	15A	7	15B	43	12	15	10	0,771	<0,01
	G-A	12A	43A	26A	43B	26B	12C	7A	10A	15A	7B	15B	10B	7	43	15	10	12	26		
MMP-8	PCR	26	43A	43	10	15	43B	12	7	26B	26A	12A	12C	10B	10A	15A	15B	7A	7B	0,615	<0,05
	G-A	10	43	43B	10A	26A	12A	26	43A	26B	10B	15	12	7	15A	7A	15B	7B	12C		
ELN	PCR	7	43A	10	26	7A	26B	12	15	12C	26A	10B	43	12A	15B	15A	43B	7B	10A	0,695	<0,01
	G-A	7	15	10	7A	43A	12	12A	43	26A	26B	10B	15A	7B	12C	26	15B	10A	43B		

G-A: Gene-Array.

Daraus wird ersichtlich, dass zwischen beiden Verfahren mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von < 0,01 eine Korrelation angenommen werden kann. Außer bei MMP-8 hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeit mit < 0,05 zwar etwas höher aber auch noch sehr gut.

Um einen weiteren ersten Eindruck von der Korrelation der Ergebnisse zu erhalten wurden in einer Tabelle die Werte einer zufällig ausgewählten Gene-Array Sonde mit den ct-values der einzelnen Gene verglichen.

Tabelle 10: Vergleich von ct-values der qRT-PCR und Gene-Array Rohdaten von zufälliger Sonde

Nativ oder Netz	Col1A1 Array	Col1A1 PCR	Col1A2 Array	Col1A2 PCR	Col3A1 Array	Col3A1 PCR	MMP-1 Array	MMP-1 PCR	MMP-8 Array	MMP-8 PCR	ELN Array	ELN
7	12,83	25,17	14,31	24,97	13,08	25,82	5,29	35,7	2,95	40,26	6,94	31,46
10	11,52	31,57	13,72	31,5	11,89	34,55	4,19	42	3,35	36,47	6,08	33,94
12	10,33	29,99	12,52	30,27	11,05	31,4	3,73	38,59	2,85	38,49	5,72	36,32
15	12,69	26,34	14,29	28,23	12,69	28,79	4,27	42	3,16	37,24	6,79	37,24
26	10,72	32,24	12,83	32,33	10,99	34,45	3,69	37,45	3,28	38,24	5,24	38,24
43	5,49	34,25	10,49	32,78	6,01	35,43	4,33	36,37	3,05	37,79	5,57	37,79
7A	10,26	22,77	13,21	22,68	9,8	25,76	13,78	22,16	3,08	38,4	5,99	29,12
10A	10,69	23,97	13,58	24,52	11,6	24,72	13,77	23,61	3,94	34,88	5,11	34,35
12A	10,81	25,25	13,73	24,17	11,59	25,43	14,41	23,6	3,47	34,43	5,63	32,87
15A	10,56	26,42	12,95	26,82	10,43	28,65	13,52	28,27	3,32	38,48	5,43	34,59
26A	11,57	21,77	13,42	21,52	11,33	23,95	14,24	22,31	3,71	31,69	5,54	29,44
43A	11,47	22,07	13,55	22,55	11,39	23,65	14,29	22,62	6,7	30,69	5,79	29,09
7B	10,27	23,11	13,18	23,27	9,66	25,75	13,8	20,71	3,22	38,69	5,43	33,02
10B	12,24	22,49	13,84	23,11	12,25	25,29	12,59	25,53	2,87	36,4	5,47	31,79
15B	9,61	26,48	12,69	25,83	9,17	28,37	12,9	28,37	3,16	37,19	5,22	32,51
26B	11,64	21,21	13,49	21,84	11,44	23,91	14,05	21,98	3,17	31,85	5,48	29,45
43B	9,27	24,59	12,48	23,13	10,32	24,42	14,06	22,4	7,04	29,86	5,03	31,62
12C	11,59	23,33	13,57	22,77	11,49	23,45	13,86	20,95	2,92	35,13	5,31	30,08

Hellblau hinterlegt: schwache Expression, Rot hinterlegt: starke Expression. Orange: Nativgewebe, Sonnengelb: Neofaszie Netz A, Dunkelblau: Neofaszien Netz B, Hellgelb: Neofaszie Netz C

Zu sehen ist eine Starke Korrelation der Expressionswerte aus beiden Verfahren.

4 Beantwortung der Studienfragen

a) Können im Bioreaktor hergestellte Neofaszien aus humanen Fibroblasten mit synthetischen Netzen kokultiviert werden?

Nachdem anfänglich bei Kulturmedienwechselintervallen von 48 Stunden einige Kulturen austrockneten, wurde im Verlauf auf ein dynamischeres Modell umgestellt; und je nach Bedarf das Wechselintervall auf bis zu 24 Stunden reduziert. Dadurch wurde es möglich, dem, am wahrscheinlichsten, der dynamischen Kultur, ohne geschlossenen Medienkreislauf, geschuldeten, unterschiedlich stark ausgeprägten Kulturmediumsverlust entgegen zu wirken. Seitdem war es möglich innerhalb einer Kulturdauer von 14 Tagen zuverlässig Neofaszien, sowohl mit als auch ohne synthetischem Netz, kultivieren zu können. Dabei konnten in der HE-Färbung bei 400-facher Vergrößerung über die gesamte Neofaszie nachgewiesen werden.

b) Reproduziert die Kollagenmorphologie der im 6-fachen dynamischen Bioreaktor gezüchteten Neofaszien je nach Netz-Typ die aus Explantaten bekannten klinischen Muster?

Bei den Ergebnissen zur Kollagenmorphologie kann bis jetzt nur von ansatzweise ausgeprägter Reproduktion gesprochen werden. In der Siriusrotfärbung war die für Netz A bekannte Polydirektionale Anordnung der Kollagenfibrillen erkennbar. Auch die sich bei Netz B ausbildende konzentrisch um die Netzfasern verstärkte Ausbildung der Kollagenfibrillen ist in Ansätzen bereits erkennbar. Für Netz C liegen noch keine Ergebnisse zu Netzexplantaten vor, da es sich hierbei um ein Konzeptnetz handelt das sowohl klinisch als auch in Tierversuchen noch nicht getestet wurde. Weiterhin wurde eine verstärkte Ausbildung von Kollagenfibrillen quer zur Druckrichtung des Reaktors beobachtet.

c) Gibt es Unterschiede in der Dicke und Densität der Neofaszien bei den unterschiedlichen Netzen?

Die Netze A und C produzieren mit geringerer Abweichung vom Mittelwert dickere Faszien als Netz B oder Neofaszien ohne Netz. Wobei Netz A bei schlechten Heilern

dünnere Faszien als bei guten Heilern produziert, während es sich bei den Netzen B und C andersherum verhält. Bei den Werten für die Kollagendensität fiel auf, dass zumeist die Ausgangswerte reproduziert wurden. Mit einer leichten Tendenz zu niedrigeren Werten bei Netz A. Da wir bis jetzt unsere Daten nur auf Basis von insgesamt 41 verschiedenen Neofaszien erhoben haben, können wir hier ebenfalls nur von einer Tendenz sprechen, welche es in der Zukunft durch größere Mengen an Neofaszien zu bestätigen gilt. Diese Werte sind auch aufgrund des, nach zweiwöchiger Kultur noch nicht komplett abgebauten, Rattenkollagen I welches für die Gele verwendet wurde verfälscht; durch eine verlängerte Kulturdauer könnte dieses Problem behoben werden.

d) Besteht eine Korrelation bei der Expression von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III zwischen dem Nativgewebe des Spenders und der erzeugten Neofaszie?

Es lies sich lediglich die Tendenz erkennen, dass je höher die Grundaktivität im Nativgewebe war, bezüglich der allgemeinen Kollagenexpression, die Neofaszien mit höherer Wahrscheinlichkeit eine niedrigere Expression zeigten. Dies könnte an der fehlenden Stimulation durch andere Zelltypen (Makrophagen, Lymphozyten...) wie sie in vivo vorhanden ist liegen; ebenso kommt als Erklärung hierfür in Betracht, dass das im Gel vorhandene Rattenkollagen I die Kollagenneusynthese negativ beeinflusst, da sich die Fibroblasten bereits in einer „stabilen“ Extrazellulärmatrix befinden, und nur noch verstärkt Kollagen synthetisieren um auf die wechselnden Umgebungsdruckverhältnisse bzw. die Netzstrukturen zu reagieren. Eine sich in den Ergebnissen der PCR nachvollziehbare Reproduktion der Ausgangsratio war nicht zu erkennen. Es konnte auch kein gleichbleibender Netzabhängiger Effekt (durchgehend höhere oder niedrigere Ratio) auf die Ratio der Neofaszien aufgezeigt werden. Der wohl entscheidendste Einfluss auf die Kollagenproduktion war bei Probe 43 zu erkennen. Diese wies im Nativgewebe mit Abstand die schwächste Expression auf, und die Kultur zeigte bei beiden verwendeten Netzen (A und B) eine Zunahme in der Kollagensynthese. Um ein vielfaches stärker bei Netz A zu sehen (Zunahme um den Faktor 100). Alle Neofaszien exprimierten verstärkt MMP-1, während die Kultur auf die Expression von MMP-8 bzw. Elastin keinen fördernden Effekt zu haben scheint. Die starke Zunahme der Expression von MMP-1 ist am ehesten auf den schon zu

Kulturbeginn hohen Anteil von Rattenkollagen I in der Gelmatrix zurückzuführen, welches von den Fibroblasten zuerst abgebaut werden muss bevor sie mit der Sekretion von eigenem Kollagen beginnen können.

e) Inwieweit wird die Theorie der guten und schlechten Heiler (bezogen auf die Kollagenratio I/III) durch die Ergebnisse dieser Arbeit gestützt?

Bei der Bestimmung der Kollagen I/III Ratio fiel auf, dass je höher die Ausgangsratio war, desto höher war die Chance, dass diese Ratio von den Neofaszien nicht, oder nur knapp erreicht werden konnte. Dabei zeigte Netz C zumeist noch die besten Ergebnisse. Für die Netze A und B lies sich keine klare Tendenz feststellen welches Netz nun die höheren Ergebnisse lieferte (mal das eine und mal das andere). Während die Neofaszien von Probe 43 annähernd die gleichen Ratios wie die Nativratio besaßen (diese war mit Ratio I/III von 3 auch sehr niedrig), konnte bei Probe 7 eine Steigerung der Ratio durch die Kultur festgestellt werden (von Nativ 5 auf 13 (Netz A) bzw. 22 (Netz B)). Diese Ergebnisse sind nur bedingt Aussagekräftig sind, da das Gel das als ECM (Extrazelluläre Matrix) für die Netze und die Fibroblasten, zur Neofaszienkultur, diente, Rattenkollagen I enthielt und dadurch die Ergebnisse bei langsamer „wachsenden“ Fibroblasten verfälscht haben könnte. Daraus lässt sich keine Bestätigung für die Theorie der guten und schlechten Heiler herleiten, da sich beide als schlecht eingruppierten Heiler unterschiedlich verhielten. Die Bestätigung kann allenfalls durch die verstärkte Anzucht von Neofaszien in der Zukunft und dem damit einhergehenden größeren Datensatz erreicht werden.

f) Welche Korrelation besteht zwischen der qRT-PCR und dem Gene-Array?

Da mit einem Gene-Array in kürzerer Zeit sowohl Vergleichsuntersuchungen über das gesamte Genom, als auch zu unterschiedlichen Pathways angestellt werden können war es interessant zu sehen ob eine Korrelation der Ergebnisse aus beiden Verfahren erkennbar ist. Hierzu wurde eine Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt, die für alle in der qRT-PCR untersuchten Gene eine p-value von 0,01 ergab; außer für MMP-8, hier lag der p-value bei 0,05. Daraus konnte auf eine Korrelation der beiden Verfahren geschlossen werden, so dass für zukünftige Untersuchungen erst einmal nur Gene-

Arrays durchgeführt werden; und nur bei auffälligen Werten in dieser Untersuchung gezielt einzelne Gene durch die qRT-PCR noch einmal mit einem zweiten Verfahren dargestellt werden.

g) Welche Kollagen-bezogenen Gene sind in den Gene-Arrays am auffälligsten?

Am auffälligsten war bei den Gene-Arrays die Tatsache, dass die Unterschiede zwischen, aufgrund der Kollagenratio, in gute und schlechte Heiler unterschiedenen nicht so gravierend war wie vielleicht zu vermuten gewesen wäre. Und sich in der Hauptsache eine Zweigliederung sowohl in der Korrespondenzanalyse, als auch in der Clusterdarstellung zwischen Nativproben und Neofaszien zeigte. Der von uns nicht nachzuweisende Zusammenhang dieser Klassifizierung mit dem tatsächlich vorliegenden Expressionsverhalten zeigte sich v.a. darin, dass sowohl die Nativgewebe der als schlechten Heiler klassifizierten Proben, als auch deren Neofaszien stärkere Ähnlichkeit im Expressionsverhalten mit als guten Heilern klassifizierten zeigten als untereinander. Auffällig war auch das in fast allen Proben (Ausnahmen 43, 10 und 15C) MMP-13 kaum exprimiert wurde (höchstwahrscheinlich Aufgrund geringem Kollagen III im Nativ- bzw. durch die Verwendung von Ratenkollagen I niedrigerem vorliegen in den Neofaszien), hier wäre interessant, ob die MMP-13 Expression in diesen Neofaszien nach 4 wöchiger Kultur zunimmt. Was weiterhin auffiel war die Tatsache, dass die größten Übereinstimmungen in der Genexpression zwischen Neofaszien derselben Nativprobe vorhanden waren, einzig die beiden mit dem Netz C kultivierten Proben wiesen größere Gemeinsamkeiten mit Neofaszien von anderen Spendern auf als mit ihren Kokulturen der Netze A und B. Ein weiterer Faktor der zu dieser starken Zweigliederung der Ergebnisse beigetragen haben dürfte, könnte die Tatsache sein, dass die RNA der Nativgewebe stärker degradiert war als die der Neofaszien, was dem Transport vom OP ins Institut für Tissue Engineering und Regenerativer Medizin, vor dem Einfrieren auf -80 °C, geschuldet sein dürfte. Hier sollte für die Zukunft an einer besseren Konservierung der RNA des Nativgewebes gearbeitet werden (RNA-Later bzw. Flüssiger Stickstoff direkt im OP).

5 Diskussion

5.1 Bedeutung des Kollagenmetabolismus in der Hernienchirurgie

Hernienoperationen zählen im Bereich der Viszeralchirurgie zu den häufigeren Operationen. Zusätzlich zu primären inguinalen, umbilikalen und abdominellen Hernien, treten in ca. einem fünftel der Fälle, nach offenen Bauchraumoperationen, Narbenhernien auf. [2] Die Zahl der Rezidivhernien bei Abdominellen Hernien konnte durch Verbesserung der Operationsverfahren (Goldstandart laparoskopische tensionsfreie Hernien Reparatur mit synthetischen Netzen in Sublaytechnik) auf unter 5% reduziert werden [2] Die Pathomechanismen der Hernien Bildung sind noch weitestgehend unbekannt. Die Bauchwand muss Drücke von bis zu 252 mmHg aushalten. [2] Gibt ein Bereich der Faszie nach entwickelt sich dort eine im Verlauf meist in Ihrer Größe zunehmende Hernie. In vielen Herniengeweben liegt eine Verschiebung des Verhältnisses von Kollagen I und Kollagen III vor, dort wird im Verhältnis mehr Kollagen III produziert und weniger des strafferen ausgereiften Kollagens I. Dies führt zu „weicheren“, elastischeren und gegenüber mechanischem Druck weniger belastbaren Faszien. Lange Zeit wurde für kollagenes Bindegewebe eine niedrige Umbaurate angenommen. Aber mittlerweile ist bekannt, das in kollagenem Bindegewebe Umbauraten von durchschnittlich 3-5% in der Lunge und in dentalem Bindegewebe von bis zu 10% pro Tag angenommen werden können [8]. Der einzelne Fibroblast produziert hierbei bis zu 3,5 Millionen Moleküle Prokollagen pro Tag, von denen jedoch zwischen 10% und 90% (abhängig von Gewebe und Alter) bereits intrazellulär von Lysozymen wieder abgebaut werden [9]. Einen nicht unerheblichen Teil zum ausgewogenen Kollagenmetabolismus trägt das Maß an gebildeten und sezernierten MMPs bei, diese werden in der Mehrheit auch von den Fibroblasten gebildet und sezerniert. [9]. Neuere Studien zeigen dass die Hernienbildung, in stärkerem Maße als bisher angenommen, auf eine gesteigerte MMP Sekretion (MMP-1, MMP-2, MMP-13) und weniger, allein, auf ein Missverhältnis von Kollagen I zu Kollagen III zurückzuführen ist; während der Einfluss von MMP-9 auf pathologische Narbenbildung, bisher noch nicht, gezeigt werden konnte. [10]. Weiterhin wird

Mittlerweile verstärkt der Einfluss von Makrophagen und Lymphozyten, hier v.a. Ihre Entzündungsmediatoren, untersucht. [11] Es konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten selbst als Immunregulatorische Zellen von Bedeutung sind [12], und die vorübergehende Ausdifferenzierung in Myofibroblasten einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Wundheilung haben. [9] Weiterhin spielen das Operationsverfahren, die Art des Netzes und auch die Operationstechnik nicht unerhebliche Rollen bei der Ausbildung des Narbengewebes und dem Auftreten von Komplikationen (Rezidiv, Infektion, Schmerz und Fisteln). [2] Auch müssen bei Risikofaktoren wie Adipositas per magna verfeinerte Operationstechniken zum Einsatz kommen um der hohen Rezidivrate entgegen zu wirken. [13]

5.2 Was wir aus Netzexplantaten wissen

Aus Netzexplantaten ist bekannt, dass sich um die Netzstrukturen eine chronische Entzündungsreaktion zeigt. Diese ist bei Polyesternetzen (Netz A) schwächer ausgeprägt als z.B. bei Polypropylnetzen, oder wie hier auch verwendeten Kompositnetzen (Polypropylen und Polyglacton bzw. Polygecapron). [14] Weiterhin ist aus Tierversuchen bekannt, dass sich auch 90Tage nach Netzimplantation eine erhöhte Expression von MMP-1 und MMP-13 in den, die Netzstrukturen umschließenden Bereichen des Fasziengewebes, als Ausdruck der Fremdkörperreaktion nachweisen lässt. [14] Diese gesteigerte Expression und auch Sekretion wird im lebenden Organismus durch Immunmodulatoren (TGF- β , PDGF, LTB₄ und IL-1) erreicht. Diese stimulieren Monozyten zur Differenzierung in Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen, welche ihrerseits wiederum Immunmodulatoren sezernieren (TNF- α , IL-6, PDGF, G-CSF und GM-CSF) und selbst auch an der Produktion und Freisetzung von MMP's beteiligt sind. [15] Neben Makrophagen sind noch viele andere Immunzellen an dem chronisch entzündlichen Geschehen beteiligt (CD3+ Lymphozyten, CD4+ und CD8+ T-Zellen, CD20+ B-Zellen...). [6] Gewisse Level von MMPs sind für eine normale Wundheilung vonnöten, in Narbengewebe um implantierte Netze herum kann diese gesteigerte Sekretion, durch die Fremdkörperreaktion, zu einer unzureichenden Wundheilung führen. [6] Die Stärke der Fremdkörperreaktion hängt in entscheidendem Maße vom verwendeten Material, der

Porengröße und Anteil der verwendeten Materialien am Gesamtnetz ab. [16] So führten PE Netze zu einer rein chronischen, reif-epitheloidzelligen Fremdkörperreaktion mit mehrkernigen Riesenzellen und einer geringen Bindegewebsinduktion, während Polypropylenetze auch noch nach Jahren Anteile einer floriden Entzündung, mit stimulierter Bindegewebsneubildung aufwiesen. Dafür zeigten PE Netze nach längerer Implantationsdauer beginnende Materialermüdungserscheinungen (Brüchigkeit des Netzes). [16] Diese chronisch-persistierenden Entzündungsherde wiesen Ähnlichkeiten zum Erscheinungsbild der Asbestose, Schistosomiasis sowie auch zu immunhistochemisch erhobenen Befunden an Mammasilikonimplantaten auf. Die gesteigerte Proliferation und die gesteigerte Apoptoserate an diesen chronisch-floriden Herden könnte die eine Erklärung für die steigende Anzahl von Fallbeschreibungen von Malignomen (Fibrosarkomen, Histiozytomen und Sarkomen), nach Kunststoffimplantaten, sein. [16] Nachdem eine zu starke Narbenbildung um Netzimplantate auch zu einer Abnahme der Elastizität und daraus resultierend zu Komplikationen (Schmerzen, „Funktionsverlust“...) führen können ist eine stetige Verbesserung der verwendeten Materialien mit möglichst geringen chronisch-inflammatorischen Prozessen anzustreben.

5.3 Marker der Kollagenaktivität

Als Marker der Kollagenaktivität, kommen v.a. die für Kollagene kodierenden Gene in Betracht (Col1A1, Col1A2, Col3A1,...). Weiterhin die MMPs (1, 2, 8, 9, 13) die hauptsächlich für den Abbau verschiedener Kollagene in der Extrazellulären Matrix stehen. Diese MMPs werden ihrerseits wiederum TIMPs (tissue inhibitors of Matrix peptidase) in Ihrer Aktivität gehemmt. [15] [17] Weiterhin spielen die Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten und die Expression für diese Typischen Markern (α -SMA, Desmin...) eine Rolle bei der Entstehung von Fibrozyten (weisen Eigenschaften sowohl von Fibroblasten als auch Lymphoider Zellen auf), welche die Kollagenproduktion und Sekretion wiederum verstärken. [18] Diese Marker können Ihrerseits jedoch nur bedingte Aussagen auf die Tatsächliche Kollagensekretion geben, da intrazellulär bereits bis zu 90% des neu synthetisierten Kollagens entweder im Golgiapparat, dem endoplasmatischen Reticulum oder in Lysosomen abgebaut wird.

[8] Weiterhin können Fibroblasten auf bis zu 50% ihrer Oberfläche Kollagen aus der extrazellulären Matrix phagozytieren und in Lysosomen Abbauen. [8] Da das System der Kollagensynthese, Sekretion, sowie des Abbaus Extra- und Intrazellulär ein hochkomplexes System darstellt, und dieses, für eine gesunde Gewebefunktion, durch ein Gleichgewicht zwischen Ab- und Aufbau gekennzeichnet ist, lassen sich kaum einzelne Marker identifizieren die sichere Aussagen zur Kollagenaktivität zulassen. Vielmehr handelt es sich um ein System des Cosignallings welches bis jetzt noch nicht endgültig entschlüsselt ist. Weiterhin besteht die Vermutung, dass innerhalb des Fibroblasten unterschiedliche Pathways existieren, welche die schon intrazellulär wieder abgebaute Menge an Kollagen bestimmen. Ein Zusammenhang mit gesteigerter MMP-2 Aktivität und dem Auftreten von direkten inguinalen Hernien wird angenommen, sowie dass eine Überexpression von MMP-1 und MMP-13 bei Narbenhernien und deren Rezidiven involviert ist. MMP-9 spielt eine große Rolle in der physiologischen Wundheilung, in pathologischen Prozessen (Hernien) scheint sie aber keine Relevanz zu besitzen. [10] Da Fibroblasten ihrerseits zum einen stark von immunmodulierenden Zellen beeinflusst werden, zum anderen selbst auch immunmodulatorisch wirken können, wird die Aussage zu eindeutigen Markern, die direkte Rückschlüsse auf die Kollagensekretion geben, noch einmal schwieriger. [9] [11] [12] [18] [19] [20] [21] [22] [23] Als indirekte Marker für die Kollagenaktivität der Gewebe können diese Gene dennoch betrachtet werden, da eine gesteigerte Expression zumindest auf erhöhte Zellaktivität in diesem Bereich hinweist.

5.4 Stellenwert des Tissue Engineerings

Tissue Engineerings und regenerative Medizin haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen, so werden immer mehr Modelle entwickelt, die in vitro die physiologischen, bzw. pathophysiologischen Prozesse nachvollziehbar machen. Weiterhin lassen sich über regenerative Verfahren Gewebe (bzw. Verwendbarer Ersatzstrukturen) zu züchten die zur Implantation eingesetzt werden können. [24] Über unterschiedliche Verfahren können Aussagen zum Wuchsverhalten von Fibroblasten in vitro getroffen werden [25] [26], bzw. die Auswirkungen unterschiedlicher Wachstumsfaktoren. [27] Weiterhin können durch Verfahren des Tissue Engineerings

Vergleiche der Fibroblastenmigration in vitro mit denen in vivo angestellt werden. [28] Unterschiede in der Umgestaltung der Extrazellulären Matrix können genauso betrachtet werden [29], wie das unterschiedliche Verhalten der Fibroblasten bei Verwendung Fibroblasten aus verschiedenen Populationen (aus verschiedenen Geweben). [30] Durch veränderte Kulturbedingungen z.B. dem kontinuierlichen Durchfluss von frischem Nährmedium, oder der kontinuierlichen Rotation der Kultur im dreidimensionalen Raum kann erreicht werden, dass sich ein gleichmäßiger Bewuchs der Substrate mit den zu kultivierenden Zellen bis in die Mitte der Trägerstrukturen ausbildet, da das Nährmedium alle Ebenen erreicht. [31] [32] In den letzten Jahren wurde verstärkte Forschung im Bereich der verwendeten Materialien, ihrer Fähigkeit den unterschiedlichen Zellen (Fibroblasten, Chondrozyten Herzmuskelzellen...) als Leitstruktur bei der Ausbildung funktionaler Gewebe, bzw. besserer Implantate zu dienen, als auch eine Vaskularisation dieser gezüchteten Gewebe zu ermöglichen. Auch konnten die Bereiche in denen regenerativ hergestellte Gewebsimplantate Verwendung finden könnten erweitert (Blutgefäße, Herzklappen, Bänder, Sehnen, Knorpel und Haut...). [33] Unterschieden werden können synthetisch hergestellte Trägerstrukturen (Netze, Gele, Metalloberflächen...) sowie azellularisierte Gewebe als Trägerstrukturen für das Tissue Engineering (Brustgewebe als Trägerstruktur...). [34] Das Züchten von Fibroblastenkulturen mit unterschiedlichen Netzen gibt Aufschluss über die Interaktionen der Fibroblasten mit den verschiedenen Materialien, und kann darum zur Verbesserung der für die Hernienchirurgie verwendeten Netzimplantate beitragen. [35] So wurden in den letzten Jahren Versuche unternommen, durch die Verwendung von elektronisch gesponnenen PLGA Geweben neue Wege in der Materialforschung zu gehen, sowie durch Anheftung verschiedener Peptide das Einwuchsverhalten dieser Netze zu verbessern [36] [37] Es konnte gezeigt werden, dass die Adsorption von MMP-2 und MMP-9 auf Netzstrukturen einen fördernden Einfluss auf die Anlagerung von neutrophilen Granulozyten hatte [38] Der Versuch vaginale Fibroblasten auf Netzen zu kultivieren zeigte dass es Unterschiede im Anwuchs Verhalten Abhängig vom verwendeten Netztyp gab. [39] Nachgewiesen hatte die dynamisch mechanische Kultur, wie sie dieser Arbeit auch zu Grunde liegt, einen positiven Effekt auf das Wuchsverhalten sowie die Kollagenproduktion von Fibroblasten in 3D-Gel Kultur. [40] Erste Versuche

der Kultur von Fibroblasten auf Netzgewebe für die Hernienchirurgie zeigten, dass die durch die in vitro Kultur vorab auf das Netz gezüchteten Fibroblasten, in vivo, als Reiz für eine beschleunigte Fibroblastenmigration auf bzw. um das Gewebe fungierten. [41] Eine Zielsetzung des Tissue Engineerings und der regenerativen Medizin ist auch, in immer mehr, durch geeignete Modelle dargestellten, Bereichen der Forschung an physiologischen und pathologischen Veränderungen an Geweben nach Zugabe von Medikamenten oder Materialien, Tierversuche überflüssig zu machen. So konnten in den letzten Jahren schon Modelle für die Haut, und auch für die Lunge etabliert werden, die vielversprechend dies in nicht ferner Zukunft für diese Bereiche realisieren lassen könnten. [42] [43] [44] [45] Es wäre wünschenswert, wenn es in den nächsten Jahren gelänge dieses Modell durch Verbesserung als Modell für die Bauchwand zu etablieren, welches auch in der Lage ist diese Art von Forschung in vitro zu ermöglichen.

5.5 Die Neofaszie aus Spender-Fibroblasten

Schnitte Der Nativgewebe und der Neofaszien wurden sowohl HE gefärbt, als auch Pikrosiriusrot. Die Methode der Pikrosiriusrotfärbung und die Betrachtung der Schnitte, sowohl in normaler Lichtmikroskopie, sowie auch unter dem Polarisationsmikroskop, stellt eine zuverlässige Möglichkeit dar, Kollagen nicht nur zu identifizieren, sondern auch zu unterscheiden. [46] In den HE Schnitten waren Fibroblasten über den ganzen Bereich der Neofaszie zu erkennen. In Pikrosiriusrot-Färbung zeigten sich über den gesamten Bereich der Neofaszien Kollagenfasern die sich auch bei Betrachtung unter Polarisationsmikroskopie zu größeren Fibrillen bündelten. Dabei waren in verschiedenen Neofaszien unterschiedliche Ausrichtungen der größeren Stränge erkennbar. Während diese in den Neofaszien mit Netz C, hauptsächlich, an den Außenseiten und in der Nähe des Netzes, quer zur Druckrichtung des Bioreaktors verliefen, waren sie bei Neofaszien mit Netz B, meist konzentrisch um die Netzfaser angeordnet. Bei Neofaszien mit Netz A war der Verlauf der größeren Fibrillen polydirektional aber auch zumeist verstärkt entgegen der Druckrichtung ausgeprägt. Die Neofaszien die ohne Netz kultiviert wurden wiesen hier die größten Unterschiede zueinander auf, mal war ein hauptsächlich gegen die

Druckrichtung stärker ausgeprägter Faserverlauf zu erkennen, andere wiesen einen diffusen Verteilungstyp auf. In Bezug auf die Dicke der kultivierten Neofaszien lies sich feststellen, dass Neofaszien der Netze A und C im Durchschnitt dicker waren und auch kleinere Standardabweichungen aufwiesen als Neofaszien des Netzes B (Neofaszien des Netzes B waren auch als einzige in der Gruppe der guten Heiler dünner als in der der schlechten Heiler) oder ohne Netz (Kulturen ohne Netz von schlechten Heilern produzierten die dünnsten Neofaszien mit der geringsten Standardabweichung). Bei Betrachtung der Kollagenratio I/III war zu beobachten: je höher die Ausgangsratio, desto wahrscheinlicher wird diese von Neofaszien der Netze A und B nicht erreicht, oder sogar bei weitem unterschritten. Exemplarisch an Probe 10 besprochen, Nativratio: 34; Netz-A-ratio: 15; Netz-B-ratio: 7,7. Bei schlechter Ausgangsratio wird dieser Wert durch die Neofaszien der Netze A und B reproduziert, bzw. sogar gesteigert, exemplarisch Proben 7 und 43: 7 Nativratio: 5,7, 7 Netz-A-ratio: 13,34, 7 Netz-B-ratio: 22,4, 43 Nativratio: 3,3, 43 Netz-A-ratio: 3,1, 43 Netz-B-ratio: 3,23. Zu beobachten ist bei Faszien des Netzes C in fast allen Fällen ein ansteigen der Ratio. Für die Neofaszien ohne Netz lassen sich keinerlei Tendenzen erkennen, Mal nimmt die Ratio ab, mal wird sie gesteigert. Betrachten wird die Kollagendensität, dargestellt in der Polarisationsmikroskopie mit maximaler Farbsättigung um auch alle „Rottöne“ zu erfassen, als Maß für die „Kompaktheit“ und damit wiederum Stabilität der Faszie fällt auf:

1. Die Neofaszien zeichnen sich zumeist durch eine niedrigere Densität aus, Netz C und Faszien ohne Netz erreichen relativ zuverlässig annähernd die Ausgangswerte.
2. Eine Tendenz ob Netz A oder B dem anderen in Bezug auf die Densität überlegen ist lassen sich nicht treffen, da mal das eine, mal das andere Netz die höheren Werte produziert.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der Kollagenstruktur, -ratio und – Densität sagen, dass sich die unterschiedlichen Neofaszien abhängig vom verwendeten Netz stark in ihrer Kollagenstruktur unterscheiden (polydirektional vs. Konzentrisch). Während Netz A und B unterschiedlich, auch abhängig von der Ursprungsratio, kaum, bzw. je höher diese ist, negativen, Einfluss auf die Ratio nehmen ist bei Netz C eine

Tendenz zu verbesserter Ratio zu erkennen. Bei der Densität scheinen die Ergebnisse auch in diese Richtung zu weisen während Netz C und seltsamerweise auch Kulturen ohne Netz zu hoher Densität neigen, fällt dieser Wert für Netz A und B meist ab, wobei noch keine Vorhersagen getroffen werden können, bei welchem Netz dies stärker ausgeprägt ist. Da wir aber im Gel Rattenkollagen I verwendeten, ist leider nicht auszuschließen, dass nach der nur 14 tägigen Kulturdauer immer noch zu viel Rattenkollagen vorhanden ist, welches die Ergebnisse verfälscht (zu hohe Ratio, zu starke Densität).

5.6 qRT-PCR

In den Nativgeweben wird, MMP-1 und MMP-8 kaum exprimiert. Elastin wird in allen Proben kaum exprimiert, und durch die Kultur auch nicht wirklich gesteigert. Kollagen I und III sind in den Nativgeweben (mit Ausnahme von Probe 7 und 15) auch nicht übermäßig stark exprimiert, werden durch die Kultur auch nur vereinzelt stärker exprimiert. Im Vergleich zum Nativgewebe fällt bei allen Proben eine starke Aktivitätssteigerung von MMP-1 auf, MMP-8 wird nach der Kultur zumeist schwächer als im Nativgewebe exprimiert. Die Netze A und B zeigen für die Neofaszien des gleichen Spenders ähnliche Tendenzen (unveränderte oder um ähnliche Faktoren verstärkte beziehungsweise abgeschwächte Expression). Nur bei den Proben 10 und 43 kommt es zu einer wirklich erwähnenswerten Aktivitätszunahme aller untersuchten Kollagene. Bei Probe 43 zeigt sich auch der größte Unterschied in der Kollagen-1 und 3 Aktivität zwischen den Netzen (Col1A1 37,5-fach stärkere Aktivität in Netz A als in Netz B), so scheint diese Probe als einzige verstärkt auf Netz A anzusprechen, während in allen anderen Proben die Unterschiede kleiner sind und meist Netz B zu einer verstärkten Expression führt (diese ist wiederum bei Probe 10 am stärksten ausgeprägt). Nachdem sich im Vorfeld der Endgültigen qRT-PCR, in mehreren Untersuchten Proben, Nativ bzw. Faszie, kein MMP-13 nachweisen lies wurde für die hier zugrundeliegenden Daten darauf verzichtet die Neofaszien bzw. die Nativgewebe auch hierauf zu testen. So können die einzigen Aussagen zu dieser MMP nur über den Gene-Array getroffen werden.

5.7 Gene-Arrays

Die Methode des Gene-Arrays besteht darin über Gensonden das gesamte Genom darzustellen, danach können durch Verwendung geeigneter Software Korrespondenzanalysen, Heatmaps mit Clusterdarstellungen schnell Vergleiche zu unterschiedlichen Proben angestellt werden. [47]. Mit dem Gene-Array ist es auch möglich unterschiedliche Pathways zu darzustellen und deren veränderte Expression zu untersuchen. [48] Dabei wird auf verschiedene Software Programme (z.B. RMA, AvDiff oder MAS5.0) zurückgegriffen um die Vergleichbarkeit durch Fehlerminimierung zu erhöhen. [7] In unserer Untersuchung wurden zur Interpretation der Gene Arrays ebenfalls Heatmaps, Clusterdarstellungen und Korrespondenzanalysen angefertigt. In der Heatmap bedeutet rot stark exprimiert, blau schwach exprimiert. Wie zu erkennen ist bestehen starke Unterschiede zwischen den Nativgeweben (links) und den Neofaszien (7. Spalte bis ganz rechts). Nochmals dargestellt anhand der Clusterpfade am oberen Rand der Heatmap, in der ersichtlich wird das es 2 große Aktivitätscluster gibt: Nativ und Kultur. Bemerkenswert ist auch dass es zwischen den Expressionsstärken eine größere Ähnlichkeit von Neofaszie 12C zu den Faszien 43A und B gibt als zu 12A. ansonsten zeigen Neofaszien der einzelnen Proben die höchste Affinität zueinander, unabhängig vom verwendeten Netztyp. Auffällig ist auch dass die Einteilung in „gute und schlechte Heiler“ keine Aussage über die Genaktivität des Nativgewebes erlaubt, denn beide als „schlechte Heiler“ eingestuft Proben (7 und 43) weisen ihrerseits eine stärkere Affinität der Expression zu jeweils 2 als „gute Heiler“ klassifizierten (12 und 26 bzw. 15 und 10) auf, als zueinander. Da auch interessant ist inwieweit die Daten des Gene-Arrays mit denen aus der qRT-PCR vergleichbar sind, wurde eine Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt. Aus dieser ging hervor, dass zwischen beiden Verfahren mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $< 0,01$ eine Korrelation angenommen werden kann. Außer bei MMP-8 hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeit mit $< 0,05$ etwas höher. Somit können für weitere Analysen die Daten des Gene-Array nach Auffälligkeiten in der Expression untersucht werden.

6 Offene Fragen, Ausblick und Perspektiven

Probleme die sich stellten waren unter anderem die oftmals zu geringe Zellausbeute von gesunden Probanden, bei denen nach Einwilligung, im Rahmen eines nicht mit Hernienchirurgie in Verbindung stehenden abdominalchirurgischen Eingriffes, Biopsate entnommen wurden, dadurch ließen sich leider von diesen Spendern, im Rahmen der Vorkultur, nicht genügend Zellen expandieren um Neofaszien züchten zu können. Da es nicht vertretbar ist dem durch größere Gewebeentnahmen (Entnahme gesunder Faszie, Erhöhung des Risikos der Ausbildung einer Narbenhernie...) entgegen zu wirken, wurde der Gedanke der Gewinnung von Faszienewebe von gesunden Spendern, als Vergleichsgruppe, leider, wieder verworfen. Weiterhin ist zu beachten, dass es sich sowohl bei Faszienbiopsaten, als auch bei Hernienbiopsien um sehr kollagenreiches Gewebe handelt, weshalb für die RNA Isolierung die dreifache Menge an Gewebe benötigt wurde als normalerweise für das miRNeasy-Mini-Kit vorgesehen ist (100µgr anstatt 30µgr). Bei der RNA Isolierung aus Neofaszien wurde davon noch einmal die 3 Fache Menge benötigt, da das Gewicht des Netzes noch mitberücksichtigt werden musste. Da die Gefahr besteht, dass die Ergebnisse für Kollagendensität und I/III Ratio durch das im Gel vorhandene Rattenkollagen I verfälscht werden, wäre es wünschenswert ein Gel als Trägerstruktur zu entwickeln, welches ohne Rattenkollagen auskommt. Dadurch könnte dieser Fehler ausgeschlossen werden, ohne auf eine immunhistochemische Doppelfärbung zurückgreifen zu müssen, die zwischen humanem und Rattenkollagen differenziert, da dieses Verfahren der Fehlerminimierung auch nur ungenau die wahren Verhältnisse wiedergeben kann (unterschiedliches Verhältnis in unterschiedlichen Höhen der Neofaszie und damit nur näherungsweise korrektem Verhältnis auf Schnitten durch das Gewebe). Eine weitere Möglichkeit dieser Verfälschung der Ergebnisse zu begegnen, könnte die Verlängerung der Neofaszienkulturzeit darstellen, da höchstwahrscheinlich mit längerer Kulturdauer der Anteil an, noch nicht durch humanes Kollagen ersetzten, Rattenkollagen in der gezüchteten Neofaszie abnehmen wird. Die Verlängerung der Kulturdauer hätte außerdem noch einen weiteren positiven Effekt. Da die Anordnung des Kollagens innerhalb der Neofaszie nach zwei wöchiger Kultur nur im Ansatz die gleichen

Charakteristika aufweist, die von explantierten Netzen bekannt sind, sollte sich dieses Anordnungsmuster durch längere Kulturdauer verstärkt ausprägen, und dadurch eine bessere Vergleichbarkeit, mit der aus in vivo bekannten, durch die Kollagenausrichtung vermittelten, Inkorporation der Netze zu ermöglichen. In Bezug auf die unterschiedlichen, verwendeten Netze zeigte sich bei den Kulturen mit dem Konzeptnetz der Arbeitsgruppe Groll sowie bei den Kulturen ohne Netz keine Formstabilität der Neofaszie in Bezug auf die Fläche. So schrumpften diese Kulturen im Verlauf der 2-wöchigen Kultur um bis zu 35% im Durchmesser. Um diesem Problem für die Zukunft aus dem Weg zu gehen wäre eine Überlegung, die Reaktoren mit einem eingefrästem Gewinde in den Kammern zu versehen und mithilfe eines Schraubinges die Gele am Rand zu fixieren. Parietex- und Ultrapronetz zeigten sich formstabil während der Kultur. Da sich in den untersuchten Netzexplantaten Zeichen einer chronischen Entzündung zeigten, sollte in Zukunft auch an eine Kokultur der Fibroblasten mit Makrophagen gedacht werden (Fibroblasten einerseits als Immunmodulierende Zellen, andererseits als Ziel von Immunmodulatoren, u.a. der Makrophagen), da so ein Eindruck vom Co-signaling gewonnen werden kann, bzw. dieser genauer untersucht werden kann. Sollte sich dieses Verfahren nicht verwirklichen lassen, könnte alternativ durch Zugabe von TNF- α , IL-6, PDGF, G-CSF, GM-CSF, Vitamin C oder Lysyloxidase zum Kulturmedium geprüft werden ob sich dadurch eine Veränderung der Aktivität der Fibroblasten erreichen lässt und dies die Eigenschaften Neofaszien verändern würde. Durch die weitere Optimierung des Verfahrens (längere Kulturdauer, rattenkollagenfreie Gele, Kokultur mit Makrophagen bzw. Zugabe von Immunmodulatoren...) sollte dieses Modell, in Zukunft, immer genauer die physiologischen bzw. pathophysiologischen Prozesse der Wundheilung bzw. Hernienbildung und der Netzingorporation darstellen und dadurch irgendwann als in vitro Modell zur Testung neuer Netztypen genutzt werden können. Wenn dieses Verfahren in Zukunft soweit ausgereift ist, würden Tierversuche in diesem Bereich der Forschung überflüssig. Weiterhin bietet sich, durch die durchgeführten Gene-Arrays, die Möglichkeit tiefergehende Analysen zur Genexpression durchzuführen. In diesen können weiterhin Untersuchungen auf Micro-RNA Ebene durchgeführt werden; dadurch könnte es möglich werden, über die Identifizierung alternativer Pathways, weitere Faktoren zu entdecken die einen Einfluss auf die Qualität und Menge des von

den Zellen produzierten Kollagens haben. Eventuell lassen sich dadurch doch noch Unterschiede in der Genexpression finden, welche die Theorie der guten und schlechten Heiler stützen, die bis jetzt noch nicht durch Ergebnisse gestützt werden kann. Weiterhin sollte die Qualität der RNA des Nativgewebes verbessert werden, (RNA-Later bzw. flüssiger Stickstoff für den Teil der Biopsie der zur RNA Isolierung herangezogen wird direkt im OP) um eine größere Vergleichbarkeit der molekularbiologischen Ergebnisse zu ermöglichen.

7 Zusammenfassung

Einleitung: Die Inzidenz von Narbenhernien (operativ erworbene Schwachstellen der Bauchwand) ist abhängig von der Art der vorhergegangenen Operation, nach Laparaskopien ist sie um einiges niedriger als nach Laparotomien, wird aber mit 2-20% in der Literatur angegeben. Aufgrund der möglichen Komplikationen (Platzbauch, Darminkarzeration, Schmerzen, Funktionseinschränkung, ...) stellen Narbenhernien oftmals große Belastungen für die Patienten dar. Die operative Sanierung, in Abhängigkeit von Größe und Lage, wird zumeist durch einbringen eines Netzgewebes erreicht. Dieser Fremdkörper kann seinerseits wieder Komplikationen hervorrufen (Infektionen, Funktionsverlust, Schmerzen, Fisteln), die bis zur Explantation des Netzgewebes führen können. Das Risiko für das Auftreten von Narbenhernien bzw. deren Rezidiven hängt von vielen Faktoren ab, als Risikofaktoren wurden unter anderem Rauchen, männliches Geschlecht, Alter >45 Jahre und ein BMI >25 kg/cm² ausgemacht. Ein Teilbereich des Tissue Engineerings ist die Entwicklung von Modellen, anhand derer in vitro Prozesse des menschlichen Körpers nachvollzogen werden können. Mit dieser Arbeit soll ein Modell etabliert werden Anhand dessen die Untersuchung der Kollagenproduktion und der Netzinkorporation bzw. die Auswirkungen verschiedener Risikofaktoren auf diese Prozesse in vitro ermöglicht werden soll. Weiterhin wurden Studienfragen formuliert, die sich sowohl mit der Durchführbarkeit dieser Methode abzielten, als auch gezielt nach der Stützung der These der „guten und schlechten Heiler“ durch diese Arbeit abzielten. Sowie nach der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit bekannten Kollagenmustern die aus Netzexplantaten bekannt sind. **Material und Methode:** Für die vorliegende Arbeit wurden Biopsien von Faszien bzw. Narbenhernien im Rahmen einer Operation gewonnen, aus diesen wurden die Fibroblasten isoliert und anschliessend entweder eingefroren bzw. expandiert, um sie in einer Rattenkollagenmatrix mit und ohne synthetischem Netz im dynamisch mechanischen Bioreaktor zu kultivieren. Die Biopsien wurden Anhand der Kollagen I/III Ratio in „gute und schlechte Heiler“ eingruppiert. Anschließend wurden die so gezüchteten Neofaszien HE und Pikrosiriusrot gefärbt um zum einen einen Eindruck von der Verteilung der Fibroblasten innerhalb der Neofaszie zu gewinnen, als auch Aussagen zum Kollagenmuster, der Kollagen I/III Ratio und zur Kollagendensität treffen zu können.

Die Dicke der kultivierten Neofaszien wurde sowohl in Sirius als auch in HE Färbung untersucht. Weiterhin wurden RT-PCR und Gene Arrays von Nativgeweben und von Neofaszien mit unterschiedlichen Netztypen durchgeführt. **Ergebnisse:** Bei gesunden Probanden konnten oftmals nicht genügend Zellen aus den Faszienbiopsaten gewonnen werden, deshalb wurde im Verlauf der Arbeit auf die Gewinnung von gesundem Faziengewebe als Vergleichsgruppe verzichtet. Fibroblasten von als „schlechten Heilern“ klassifizierten Patienten zeigten meist ein langsames Wachstum in der Expansionsphase. Der Bioreaktor bereitete kaum Probleme (ein paar Faszien trockneten anfänglich aus, dieses Problem lies sich durch bei Bedarf verkürzten Medienwechselintervallen in den Griff bekommen. Probleme mit Kontaminationen traten nicht auf. Bei den Histologischen Untersuchungen der Neofaszien waren Fibroblasten über den gesamten Bereich der Neofaszie zu sehen, auch in unmittelbarer Umgebung der Netzstrukturen. Die Kollagenmuster stimmten in Ansätzen mit den aus klinischen Netzexplantaten bekannten Mustern überein (Polydirektional bei Polyesternetz, Konzentrisch um die Netzstrukturen bei Polypropylen). Weiterhin war eine verstärkte Kollagenbildung quer zur Druckrichtung des Bioreaktors zu erkennen. Bei der Betrachtung der Dicke der Neofaszien zeigte sich (unter Vorbehalt, aufgrund der geringen Probenanzahl) eine Tendenz zu meist dünneren Faszien bei „schlechten Heilern“ während die Neofaszien von „guten Heilern“ meist eine kleinere Streuung um den Mittelwert zeigten (einheitlicher waren). Die Kollagendensität und auch die Kollagen I/III Ratio lieferten Ergebnisse Anhand derer Gesagt werden kann, dass je höher die Ausgangswerte im Nativgewebe waren, diese mit höherer Wahrscheinlichkeit von den Neofaszien nicht erreicht werden konnten. qRT-PCR und Gene Array zeigten in der Rangkorrelation nach Spearman große Übereinstimmungen.

Beantwortung der Studienfragen: Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist Neofaszien mit synthetischen Netzen zu züchten, die über den gesamten Bereich mit Fibroblasten besiedelt waren. Die Ergebnisse der Kollagenmorphologie zeigten in Ansätzen die aus Netzexplantaten bekannten Muster. Bei Kollagen I/III Ratio und Densität war lediglich erkennbar, dass je höher die Ausgangswerte waren, diese mit zunehmender Wahrscheinlichkeit nicht reproduziert werden konnten. Es ließ sich keine Verbindung zwischen der Kollagen I/III Ratio der Histologischen Gewebeproben und den Molekularbiologischen Ergebnissen feststellen. Weiterhin konnte die Theorie

der „guten und schlechten Heiler“ molekularbiologisch nicht gestützt werden, da die Proben der als „schlechte Heiler“ Klassifizierten Biopsien stärkere Gemeinsamkeiten mit als „gute Heiler“ Klassifizierten Biopsien aufwiesen als untereinander. Es konnte gezeigt werden dass die Kultur auf die MMP-8 und Elastinproduktion keinen Einfluss zu haben scheint. **Diskussion:** Im Verlauf der Diskussion wurde darauf hingewiesen, dass die Kollagensynthese, und Sekretion ein komplexes und höchst aktives System darstellt, welches im Rahmen der Wundheilung durch Co-Signalling, und der Interaktion zwischen Fibroblasten und Immunzellen (Makrophagen...) nochmals verändert wird, auch dadurch bedingt, dass Fibroblasten im Verlauf der Wundheilung selbst als immunmodulierende Zellen in Erscheinung treten können. So können weiterhin die Kollagen kodierenden Gene (Col1A1, Col1A2, Col3A1) als Marker für die Kollagenaktivität herangezogen werden, da aber zwischen Synthese und Sekretion des Kollagens ein nicht zu vernachlässigender Teil bereits intrazellulär wieder abgebaut wird kann nur durch Betrachtung dieser Gene die Theorie der „guten und schlechten Heiler“ nicht gestützt werden. Durch die hohe Korrelation der Ergebnisse aus gene-Array und qRT-PCR könnte für die Zukunft vorläufig auf die Durchführung von qRT-PCR verzichtet werden, um eventuell unterschiedliche Pathways mit dem Gene-Array zu identifizieren. **Offene Fragen Ausblick und Perspektiven:** Da das System der Wundheilung und Kollagensynthese und –Sekretion sehr komplex ist sollte für die Zukunft durch eine Kokultur mit Makrophagen bzw. durch die Zugabe von TNF- α , IL-6, PDGF, G-CSF, GM-CSF, Vitamin C oder Lysyloxidase zum Kulturmedium, geprüft werden ob sich eine Aktivitätsveränderung der Fibroblasten und damit eine andere Neofaszienstruktur erreichen lässt. Weiterhin sollte um einer Verfälschung der Ergebnisse durch das für die Gele verwendete Rattenkollagen vorzubeugen, entweder die Kulturdauer verlängert werden (mit dem Gedanken dass dann das gesamte Rattenkollagen durch humanes ersetzt wurde) bzw. ein Kollagenfreies Gel als Trägerstruktur entwickelt und verwendet werden. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Gene-Arrays aus Spenderbiopsie und Neofaszie zu erreichen sollten die zur RNA-Gewinnung verwendeten Anteile der Biopsie noch innerhalb des OP in RNA-later bzw. in flüssigen Stickstoff gegeben werden, um einer verstärkten Degradation vorzubeugen.

8 Anhang

8.1 Material

Tabelle 11: Werte für den p-value der Korrespondenzanalyse nach Spearman

Anzahl der Proben	$p=0,05$	$p=0,01$
5	1	
6	0,886	1
7	0,786	0,929
8	0,738	0,881
9	0,683	0,833
10	0,648	0,794
12	0,591	0,777
14	0,544	0,715
16	0,506	0,665
18	0,475	0,625
20	0,45	0,591
22	0,428	0,562
24	0,409	0,537
26	0,392	0,515
28	0,377	0,496
30	0,364	0,478

Laborgerät/Material	Hersteller
Absaugsystem Vacusafe	IntegraBiosciences
Abzug	Prutscher
Analysenwaage	Kern
Autoklav	
Technoclav	Biomedis
Tischautoklav	Systec
Varioklav	H+P
Brutschrank	Thermo Fischer Scientific
Doppelgelsystem PerfectBlue	Peqlab Biotechnologie
Einbettautomat	Sakura
Eismaschine AF-80	Scotsman/HIBU
Gefrierschrank	
-20°C	Liebherr
-80°C	Kendro
Glaspipetten Reinigungsautomat	Hözel
Handzähler	neoLab
Heißluftsterilisator	MemmertHeraeus

<p>Einhängethermostat für Wasserbad Kühlplatte Kurzzeitmesser Magnetischer Heizrührer Multimode Mikroplattenleser Mikropipetten Mikroskop (Axiovert 40 C) Multistep Pipette Multistep Pipette NanoDrop-Platte pH-Meter Pipettenstopfmaschine Pipettierhilfe Präzisionswaage Schlittenmikrotom Septophag Spülmaschinen Sterilwerkbank Thermocycler Trockenschrank Vortexer Wärmeplatte Wärmeschrank Wasserbad Wasserbad für Paraffinschnitte Zentrifuge Multifuge Centrifuge 5417R Centrifuge 5424 BioRad CFX Manager Affymetrix Gene Chip Scanner</p>	<p>Lauda Leica Roth VWR Tecan Eppendorf Zeiss Brand Eppendorf Tecan Mettler Toledo BellCo Glass Dunn Brand Kern Hesse Miele Thermo Fisher Scientific SensoQuest MettmertHeraeus Roth Medax Meditate Lauda Thermo Fisher Scientific Eppendorf Eppendorf BioRad Affymetrix</p>
<p>Verbrauchsmaterial</p>	
<p>Combitips Deckgläser Einbettfilterpapier Labonord Einbettungskassetten mit Deckel Einmalpipetten, Polysterol Filterpapier, gefaltet Filterpipettenspitzen Handschuhe Latex Nitril Kryoröhrchen Mikrotiterplatte 96 Well transparent</p>	<p>Eppendorf Menzel-Gläser Labonord Klinipath Greiner Bio-One AlbetLabScience Greiner Bio-One Cardinal Health Nitril Kimberly-Clark Nunc TPP</p>
<p>Mikrotom, Einmalklingen</p>	

Objektträger Parafilm Pasteurpipetten, Glas PCR-Stripes (Polypropylen) Petrischalen, unbeschichtet PET-Inserts Pipettenspitzen, steril QIAshredder Reagiergefäße (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml) Septophag-Ersatzbeutel Sterilfilter Sterilisierverpackung Skalpellklingen Vernichtungsbeutel PP Zellkulturflaschen (T25, T75, T150) Zellsieb, Nylon (100µm) Zenrifugenröhrchen 15ml Zentrifugenröhrchen 50ml	Menzel-Gläser Pechiney Brand Brand Greiner Bio-One Millipore Eppendorf QIAGEN Eppendorf Porod SartolonStediumBiotech Melag Bayha PP Hartenstein TPP BD Bioscience Greiner Bio-One BD Biosciences
Labormaterialien	
Edelstahlgießformen Einfrierbehälter Glaswaren Magnetührstäbchen Medibox Entsorgungsbehälter Neubauer-Zählkammer Pinzetten Skalpellkilngenthalter	Labonord VWR Schott Hartenstein BBraun Hartenstein Assistent Bayha

Substanz	Hersteller/Vertrieb	Bestellnummer
HEPES, biotechnology performance certified NaCl	Roth Hartenstein	H4034-100G A3597
Collagenase Typ I -S	Sigma	C1639-50MG
EDTA-Na ₂ Salz _x 2H ₂ O	Sigma	E5134
Natriumacetat	Roth	6773.2
Glycerin	Hartenstein	CG40
DMEM powder (high glucose, with L-glutamine)	PAA	G0001,3010
Versene 1x	Gibco	15040-033
Bio whittaker FBS	LONZA	DE 14-80 1F
Natriumhydroxid, Plätzchen	Roth	6771.3
Chondroitin Sulfate	Sigma	C4384-1G
Gentamicin 10mg/ml	PAA	P11-004
PenStrep (je 5U/ml)	Gibco	15070

5% Trypsin-EDTA (10x)	Gibco	15400-054
Ethylendiamin-Tetraessigsäure	Sigma	431788
Ethanol absolut	Roth	9065.2
Kaliumchlorid	Hartenstein	CK10
Kaliumhydrogenphosphat	VWR	1.04873.1000
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	VWR	1.06580.1000
Natriumhydrogencarbonat, >99,5% Cellpure	Roth	HNO 1.2
Calciumchlorid, wasserfrei	VWR	10043-52-4
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, >99% Cellpure	Roth	HNO 3.3
Dispase	BD	354235
Essigsäure 100%	Roth	3738.2
Ethanol 100%	Roth	9065.4
Trizma® hydrochloride	Sigma	T5941-1KG
Trizma® Base	Sigma	T6066-500G
Aceton		5025.5//CA10//
Albumin fraction V (BSA)	Roth	1.12018.0025
Trypan blue	Sigma	T8154-100ml
Direct Red 80	Sigma	365548-5G
Picric Acid solution	Sigma	P6744-1GA
Xylenes	Sigma	16446-2,5L
Hematoxylin solution according to Mayer	Sigma	101102358
Phosphat buffered saline	Oxoid	BR0014G
Antibody diluent	Dako	S2022
Wasserstoffperoxyd 30%	Merck	1072100250
Microscopy Aquatex	Merck	108562
Etidiumbromid	AppliChem	CE80

Verwendete Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur:

DMEM – Grundmedium	
66,9g 18,5g →pH 7,2 einstellen →ad. 5000ml Aqua dest. →sterilfiltrieren	DMEM-Pulver NaHCO ₃

Kultivierungsmedium	
90% 10% Entspricht 99% Dazu 1%	DMEM Grundmedium FCS PenStrep

Verdaumedium	
DMEM Kulturmedium +32µg	Collagenase (200U/ml)

Transportmedium	
99% 1%	DMEM-Grundmedium Gentamicin

PBS ⁺	
140mM 2mM 1,5mM 8,5mM 0,5mM 0,9mM →pH 7,2 einstellen →ad. 5000 ml Aqua dest. →sterilfiltrieren	NaCl KCl Kh ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O MgCl ₂ x6H ₂ O CaCl ₂

PBS ⁻	
140mM 2mM 1,5mM 8,5mM → pH 7,2 einstellen →ad. 5000ml Aqua dest. →sterilfiltrieren	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O

Trypsin-EDTA-Lösung	
100ml 10ml	Versene (1x) Trypsin-EDTA (10x)

DMEM-Grund medium, 2-fach konzentriert	
66,9g 18,5g → pH 7,2 einstellen →ad. 2500ml Aqua dest. →sterilfiltrieren	DMEM Pulver NaHCO ₃

HEPES-Lösung 3M	
35,745g 18ml 10 Stück → pH 7,8 einstellen →ad. 50 ml Aqua dest. →sterilfiltrieren	HEPES Aqua dest. NaOH-Plätzchen

Chondroitin 4-sulfat-Lösung (c = 05mg/ml)	
25mg 5ml →sterilfiltrieren	Chondroitin 4-sulfat PBS ⁺

Chondroitin 6-sulfat-Lösung (c = 05mg/ml)	
25mg 5ml →sterilfiltrieren	Chondroitin 6-sulfat PBS ⁺

Gelneutralisationslösung	
93% 3% 0,5% 0,5% 3% →sterilfiltrieren	DMEM, 2-fachkonzentriert HEPES, 3M Chondroitin 4-sulfat-Lösung Chondroitin 6-sulfat-Lösung FCS

Dispase-Lösung	
100ml 2 U/ml →sterilfiltrieren	PBS ⁻ Dispase

Verwendete Lösungen für die Histologie:

Eosin-Lösung	
1% (w/v) 200ml →filtrieren →4 tropfen	Eosin B VE-Wasser Konzentrierte Essigsäure

Differenzierungsalkohol	
13,7ml	1M Salzsäure
200ml	50%-iges Ethanol

Lösung 1 (für Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert)	
0,5g	Fuchsin basisch
1,0g	Resorcin
in 50ml VE-Wasser unter erwärmen lösen	

Lösung 2 (für Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert)	
2,0g	Eisen(III)chlorid
In 10ml VE-Wasser lösen	
Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert	
→Lösung 1 bis zum Kochen erhitzen	
Lösung2 zugeben und bei verringerter Hitze 5 min weiterkochen, ab und zu schwenken	
→erkalten lassen und filtrieren	
→Filter aufbewahren, Durchfluss verwerfen	
Filter in Erlenmeyerkolben überführen und mit 100ml 96%-igem Ethanol übergießen	
→erneut zum kochen bringen	
→erkalten lassen und 0,7ml konzentrierte Salzsäure zugeben	
→filtrieren	

Lösung 1 (für Pikrosiriusrot-Lösung)	
1% (w/v)	DirectRed 80
In 10ml VE-Wasser lösen	

Lösung 2 (für Pikrosiriusrot-Lösung)	
3,0g	Pikrinsäure
In 200 ml VE-Wasser lösen	
Pikrosiriusrot-Lösung	
10ml	Lösung 1
90ml	Lösung 2

Verdünnte Essigsäure	
22ml	VE-Wasser
10ml	Konzentrierte Essigsäure

Kits und Primer für die molekularbiologischen Arbeiten

Verwendete Kits	
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
iScript cDNA Synthese Kit	BioRad, München, Deutschland
iQ SYBR green supermix	BioRad, München, Deutschland
GeneChip 3` IVT express Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
Reverse Transkriptase	BioRad, München, Deutschland
Taq Polymerase	Eurogentec, Köln, Deutschland

Verwendete Primer (in 5`.... 3` Richtung angegeben)	
CACACGTCTCGGTCATGGTA	Col1A1 sense
AAGAGGAAGGCCAAGTCGAG	Col1A1 antisense
AGCAGGTCCTTGAAACCTT	Col1A2 sense
GAAAAGGAGTTGGACTTGGC	Col1A2 antisense
AGGACTGACCAAGATGGGAA	Col3A1 sense
AGGGGAGCTGGCTACTTCTCTC	Col3A1 antisense
GAGCTCAACTCCGGGTAGA	MMP-1 sense
CCCAAAGCGTGTGACAGTA	MMP-1 antisense
GAATGGCCAAATTCATGAGC	MMP-8 sense
ATTTGATGGACCCAATGGAA	MMP-8 antisense
GGCTTAAGAGGTTTGCCTCC	ELN sense
GCTCCTGCTGTCCATCCTC	ELN antisense

8.2 Literatur

- [1] Winkler MS, Gerharz E, Dietz UA 2008 Narbenhernienchirurgie Übersicht und aktuelle Trends; Urologe 47:740-747
- [2] Park AE, Roth JS, Kavic SM, 2006 Abdominal wall hernia; Curr Probl Surg; 43(5):326-75.
- [3] Dietz UA, Wichelmann C, Wunder C, Kauczok J, Spor L, Strauß A, Wildenauer R, Jurowich C, Germer CT (2012); Early repair of open abdomen with a tailored two-component mesh and conditioning vacuum packing: a safe alternative to the planned giant ventral hernia; Hernia (4):451-60. doi: 10.1007/s10029-012-0919-0. Epub
- [4] Dietz UA, Spor L, Germer CT (2011); Therapie der Netz(-Implantat)-Infektion; Chirurg 82:208-217; doi 10.1007/s00104-010-2013-4
- [5] Dietz UA, Winkler MS, Härtel RW, Fleischhacker A, Wiegering A, Isbert C, Jurowich Ch, Heuschmann P, Germer CT (2014), Importance of recurrence rating, morphology, hernial gap size, and risk factors in ventral and incisional hernia classification; Hernia. 18(1):19-30. doi: 10.1007/s10029-012-0999-x. Epub 2012.
- [6] Klinge U, Dietz UA, Fet N, Klosterhalfen B (2014); Characterisation of the cellular infiltrate in the foreign body granuloma of textile meshes with its impact on collagen deposition; Hernia. [Epub ahead of print
- [7] Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP (2003); Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics; 4(2):249-64.
- [8] Laurent GJ (1987); Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass; Am J Physiol.; 252(1 Pt 1):C1-9.
- [9] McAnulty RJ (2007); Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease; nt J Biochem Cell Biol.; 39(4):666-71. Epub 2006

- [10] Antoniou SA, Antoniou GA, Granderath FA, Simopoulos C (2009); The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of abdominal wall hernias; *Eur J Clin Invest*; 39(11):953-9. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02199.x. Epub 2009
- [11] Wynn TA (2008); Cellular and molecular mechanisms of fibrosis; *J Pathol.*; 214(2):199-210.
- [12] Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, Hilkens CM, Collin MP (2007); Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells; *J Immunol.*; 179(3):1595-604.
- [13] Chang EI, Foster RD, Hansen SL, Jazayeri L, Patti MG (2007); Autologous tissue reconstruction of ventral hernias in morbidly obese patients; *Arch Surg.*; 142(8):746-9; discussion 749-51.
- [14] Junge K, Rosch R, Bialasinski L, Klinge U, Klosterhalfen B, Schumpelick V (2003); Persistent extracellular matrix remodelling at the interface to polymers used for hernia repair; *Eur Surg Res.*; 35(6):497-504.
- [15] Junge K, Binnebösel M, von Trotha KT, Rosch R, Klinge U, Neumann UP, Lynen Jansen P (2012); Mesh biocompatibility: effects of cellular inflammation and tissue remodelling; *Langenbecks Arch Surg.*; 397(2):255-70. doi: 10.1007/s00423-011-0780-0. Epub 2011
- [16] Klosterhalfen B, Klinge U, Hermanns B, Schumpelick V (2000); Pathologie traditioneller chirurgischer Netze zur Hernienreparation nach Langzeitimplantation im Menschen; *Chirurg*; 71:43-51
- [17] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010); Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment; *Cell.*; 141(1):52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
- [18] Kisseleva T, Brenner DA (2008); Mechanisms of fibrogenesis; *Exp Biol Med* (Maywood); 233(2):109-22. doi: 10.3181/0707-MR-190.

- [19] Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008); Growth factors and cytokines in wound healing; *Wound Repair Regen.*; 16(5):585-601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x.
- [20] Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkötter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T (2000); Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis; *Matrix Biol.*; 19(4):325-32.
- [21] Gabbiani G (2003); The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases; *J Pathol.*; 200(4):500-3.
- [22] Hinz B, Gabbiani G (2003); Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling; *Thromb Haemost.*; 90(6):993-1002.
- [23] Schultz GS, Wysocki A (2009); Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing; *Wound Repair Regen.*; 17(2):153-62. doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x.
- [24] Hartmann-Fritsch F, Biedermann T, Braziulis E, Luginbühl J, Pontiggia L, Böttcher-Haberzeth S, van Kuppevelt TH, Faraj KA, Schiestl C, Meuli M, Reichmann E (2012); Collagen hydrogels strengthened by biodegradable meshes are a basis for dermo-epidermal skin grafts intended to reconstitute human skin in a one-step surgical intervention; *J Tissue Eng Regen Med.*; 10. doi: 10.1002/term.1665. [Epub ahead of print]
- [25] Grinnell F, Ho CH, Tamariz E, Lee DJ, Skuta G (2003); Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices; *Mol Biol Cell.*; 14(2):384-95.
- [26] Grinnell F (2003); Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices; *Trends Cell Biol.*; 13(5):264-9.
- [27] Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang JH, Shin US, Kim HW (2010); Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration; *J Tissue Eng.*; 2010:218142. doi: 10.4061/2010/218142.

- [28] Wolf K, Alexander S, Schacht V, Coussens LM, von Andrian UH, van Rheenen J, Deryugina E, Friedl P (2009); Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo; *Semin Cell Dev Biol.*; 20(8):931-41. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.08.005.
- [29] Rhee S (2009); Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling; *Exp Mol Med.*; 41(12):858-65. doi: 10.3858/emm.2009.41.12.096.
- [30] Nolte SV, Xu W, Rennekampff HO, Rodemann HP (2008); Diversity of fibroblasts--a review on implications for skin tissue engineering; *Cells Tissues Organs.*; 187(3):165-76. Epub 2007
- [31] Pei M, Solchaga LA, Seidel J, Zeng L, Vunjak-Novakovic G, Caplan AI, Freed LE (2002); Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds; *FASEB J.*; 16(12):1691-4.
- [32] Kitagawa T, Yamaoka T, Iwase R, Murakami A (2006); Three-dimensional cell seeding and growth in radial-flow perfusion bioreactor for in vitro tissue reconstruction; *Biotechnol Bioeng.*; 93(5):947-54.
- [33] Freed LE, Guilak F, Guo XE, Gray ML, Tranquillo R, Holmes JW, Radisic M, Sefton MV, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G (2006); Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling; *Tissue Eng.*; 12(12):3285-305.
- [34] Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW (2009); Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function; *Acta Biomater.*; 5(1):1-13. doi: 10.1016/j.actbio.2008.09.013. Epub 2008
- [35] Weyhe D, Belyaev O, Buettner G, Mros K, Mueller C, Meurer K, Papapostolou G, Uhl W (2008); In vitro comparison of three different mesh constructions; *ANZ J Surg.*; 78(1-2):55-60. doi: 10.1111/j.1445-2197.2007.04362.x.
- [36] Grafahrend D, Heffels KH, Beer MV, Gasteier P, Möller M, Boehm G, Dalton PD, Groll J (2011); Degradable polyester scaffolds with controlled surface chemistry combining minimal protein adsorption with specific bioactivation; *Nat Mater.*; 10(1):67-73. doi: 10.1038/nmat2904.

- [37] Mattanavee W, Suwantong O, Puthong S, Bunaprasert T, Hoven VP, Supaphol P (2009); Immobilization of biomolecules on the surface of electrospun polycaprolactone fibrous scaffolds for tissue engineering; *ACS Appl Mater Interfaces.*; 1(5):1076-85. doi: 10.1021/am900048t.
- [38] Renò F, Traina V, Cannas M (2008); Adsorption of matrix metalloproteinases onto biomedical polymers: a new aspect in biological acceptance; *J Biomater Sci Polym Ed.*; 19(1):19-29. doi: 10.1163/156856208783227631.
- [39] Skala CE, Petry IB, Gebhard S, Hengstler JG, Albrich SB, Maltaris T, Naumann G, Koelbl H (2009); Isolation of fibroblasts for coating of meshes for reconstructive surgery: differences between mesh types; *Regen Med.*; 4(2):197-204. doi: 10.2217/17460751.4.2.197.
- [40] Pusch K (2009); Entwicklung eines Bioreaktors zum Aufbau eines in vitro Fasziomodells; Masterthesis angefertigt am Fraunhoferinstitut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik
- [41] Pu F, Rhodes NP, Bayon Y, Chen R, Brans G, Benne R, Hunt JA (2010); The use of flow perfusion culture and subcutaneous implantation with fibroblast-seeded PLLA-collagen 3D scaffolds for abdominal wall repair; *Biomaterials* 31(15):4330-40. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.02.010.
- [42] Mertsching H, Weimer M, Kersen S, Brunner H (2008); Human skin equivalent as an alternative to animal testing; *GMS Krankenhhyg Interdiszip.*; 3(1):Doc11.
- [43] Hermanns MI, Fuchs S, Bock M, Wenzel K, Mayer E, Kehe K, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (2009); Primary human coculture model of alveolo-capillary unit to study mechanisms of injury to peripheral lung; *Cell Tissue Res*; 336(1):91-105. doi: 10.1007/s00441-008-0750-1. Epub 2009
- [44] Pusch J, Votteler M, Göhler S, Engl J, Hampel M, Walles H, Schenke-Layland K (2011); The physiological performance of a three-dimensional model that mimics the microenvironment of the small intestine; *Biomaterials*; 32(30):7469-78. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.035.

- [45] Schanz J, Pusch J, Hansmann J, Walles H (2010); Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research; *J Biotechnol.*; 148(1):56-63. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.03.015.
- [46] Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR (1979); Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections; *Histochem J.*; 11(4):447-55.
- [47] Buga AM, Scholz CJ, Kumar S, Herndon JG, Alexandru D, Cojocaru GR, Dandekar T, Popa-Wagner A (2012); Identification of new therapeutic targets by genome-wide analysis of gene expression in the ipsilateral cortex of aged rats after stroke; *PLoS One.*; 7(12):e50985. doi: 10.1371/journal.pone.0050985. Epub 2012
- [48] van den Hove DL, Jakob SB, Schraut KG, Kenis G, Schmitt AG, Kneitz S, Scholz CJ, Wiescholleck V, Ortega G, Prickaerts J, Steinbusch H, Lesch KP (2011); Differential effects of prenatal stress in 5-Htt deficient mice: towards molecular mechanisms of gene × environment interactions; *PLoS One.*; 6(8):e22715. doi: 10.1371/journal.pone.0022715. Epub 2011

Danksagung:

Ich danke Herrn Professor Dr. Dr. Ulrich Dietz für die Überlassung dieses interessanten Themas an der Schnittstelle zwischen Chirurgie und Tissue Engineering. Die letzten zweieinhalb Jahre stand er mir prompt und allzeit hilfsbereit bei Fragen und sich stellenden Problemen zur Seite. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können, Danke Uli. Großer Dank gebührt auch allen Beschäftigten der mit an der Arbeit beteiligten Institute, allen voran Carolin Tripp, Nadine Gutermuth und Sylvia Murawicki ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Heike Walles dafür dass ich die Räumlichkeiten des Institutes für Tissue Engineering und Regenerative Medizin jederzeit nutzen konnte, und für das Angebot das Koreferat zu übernehmen. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Claus-Jürgen Scholz und seiner Assistentin Margarethe Göbel für die Durchführung und Auswertung der Gene-Arrays danken. Ich möchte meinen ehemaligen Mitbewohnern und engsten Freunden (allen voran Jockl, Nico, Carlo, Jan, Schnee, Sylv, Sylwii und Lena natürlich auch noch andere) danken, dass Ihr es die letzten Jahre sowohl mit mir ausgehalten habt, als es auch geschafft habt mich davon abzuhalten alles hinzuschmeißen. Weiterer Dank geht an die Rosa-Luxemburg-Stiftung ohne deren finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Studienstipendiums es mir nicht möglich gewesen wäre das Studium so „entspannt“ durchzuziehen. Der größte Dank gilt meiner Familie die immer für mich da war und mich, egal was ich für Scheiße gebaut habe, unterstützt und aufgefangen hat. Ohne Euch hätte ich das alles nicht bewerkstelligen können.

Lebenslauf:

Christian A. Schulz

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 23.08.1981

Geburtsort: Würzburg

Schulbildung:

1992-2001 Deutschhaus Gymnasium Würzburg

06/2001 Abitur am Deutschhaus Gymnasium Würzburg

Beruflicher Werdegang:

04/2000-04/2003 Aushilfskraft Jet-Station Rudolf Rausch,
Rottendorferstr. 5, 97072 Würzburg

07/2001-05/2002 Zivildienst im Altenpflege und Wohnheim Dr. Dahl,
Friedenstr. 41, 97072 Würzburg

08/2002-04/2003 Freiwilliges Soziales Jahr im Altenpflege und Wohnheim
Dr. Dahl, Friedenstr. 41, 97072 Würzburg

04/2003-08/2003 Auszubildender an BFS für Krankenpflege des
Universitätsklinikums Würzburg, Straubmühlweg 8, 97078
Würzburg

08/2003-06/2005 Ausbildung zum Gärtner für Garten und Landschaftsbau
Bei Galabau Hagn, Weingartenstr. 30,
97252 Frickenhausen

06/2005-09/2005 Geselle bei Galabau Hagn, Weingartenstr. 30
97252 Frickenhausen

09/2005-10/2005 Erntehelfer (Weinlese) Weingut Juliusspital, Klinikstr.1
97070 Würzburg

10/2005-04/2006 Aushilfe bei Götz Brot KG, Industriestrasse 2,
97297 Waldbüttelbrunn

04/2006-10/2006 Geselle Galabau Hagn, Weingartenstr. 30
97252 Frickenhausen

Studium:

10/2006-06/2013 Studium der Humanmedizin Julius Maximilians
Universität Würzburg

06/2013 Abschluss des Studiums

Famulaturen und Praktisches Jahr:

08/2009-09/2009 Famulatur auf der beschützten Intensivstation A2 für
für Männer, der psychiatrischen Klinik der Universität
Würzburg, Fuchsleinstr. 15, 97080 Würzburg

03/2010-04/2010 Famulatur in der Ambulanz der Universitätsaugenklinik,
Josef-Schneider-Str. 11, 97080 Würzburg

03/2011 Famulatur in der Anästhesiologie und Intensivmedizin
der Missionsärztlichen Klinik, Salvatorstr. 7,
97067 Würzburg

04/2011 Famulatur in der Urologie der Missionsärztlichen Klinik,
Salvatorstr.7, 97067 Würzburg

02/2012-06/2012 Tertian Anästhesie (Wahlfach), Uniklinik Würzburg,
Oberdürrbacherstr. 6, 97080 Würzburg

06/2012-10/2012 Tertian Chirurgie, Uniklinik Würzburg,
Oberdürrbacherstr. 6, 97080 Würzburg

10/2012-01/2013 Tertian Innere Medizin, Uniklinik Würzburg,
Oberdürrbacherstr.6, 97080 Würzburg