

**Aus der Klinik und Poliklinik für
Allgemein- und Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer**

**Blasenaugmentation mit Hilfe eines biokompatiblen Materials
im Rattenmodell**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
FRIEDERIKE WINDE
aus Würzburg

WÜRZBURG, November 2018

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Meyer
Korreferent: apl. Prof. Dr. med. Dr. (UFPR) M. Sc. Ulrich Dietz
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2018

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Einführung	2
2.1 Anatomie der Harnblase	2
2.2 Blasenektropie	3
2.2.1 Embryologie	3
2.2.2 Klinisches Erscheinungsbild.....	5
2.2.3 Inzidenz und assoziierte Fehlbildungen	5
2.2.4 Therapie	7
2.3 Aktuelle Studienergebnisse von Lyoplant®	10
3. Fragestellung	11
4. Material und Methoden	13
4.1 Lyoplant® (B.Braun, Deutschland).....	13
4.1.1 Aussehen und Materialeigenschaften	13
4.1.2 Immunologische Eigenschaften von Lyoplant®	14
4.2 Das Kleintiermodell.....	15
4.2.1 Allgemeiner Ablauf der Studie.....	15
4.2.2 Die Versuchstiere	16
4.2.3 Das Verfahren der operativen Implantation	16
4.2.4 Postoperative Nachkontrollen und Datenerhebung	17
4.2.5 Das Verfahren der operativen Explantation	17
4.3 Histologische Untersuchung	18
4.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	18
4.3.2 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung.....	19
4.3.3 Immunhistochemie-Färbung	20
5. Ergebnisse	23
5.1 Makroskopische Auswertung	23
5.1.1 Wachstum der Tiere.....	23
5.1.2 Implantatzustand bei Explantation	24
5.2 Mikroskopische Auswertung	30
5.2.1 Histologische Beurteilung.....	30

5.2.2 Immunhistologische Beurteilung	40
6. Diskussion	44
7. Zusammenfassung.....	52
8. Tabellenverzeichnis	54
9. Abbildungsverzeichnis	55
10. Literaturverzeichnis	57
11. Anhang	

Verzeichnis der Abkürzungen

CD	cluster of differentiation
DAB	Diaminobenzidin
EEK	Ekstrophie-Eispadie-Komplex
EM	Elektronenmikroskop
GIT	Gastrointestinaltrakt
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgG/M/E	Immunglobulin G/M/E
IL	Interleukin
Lyoplant [®]	Lyoplant [®] (B.Braun, Deutschland)
M.	Musculus
OP	Operation
OT	Objektträger
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PPP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
SIS	small intestinal submucosa
TH1-Zellen	T-Helferzelle 1
TH2-Zellen	T-Helferzelle 2
Tris-NaCl	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

Jedes Jahr werden in Deutschland ca. 49.000 Kinder mit einer großen Fehlbildung geboren. Mehr als 14% davon sind kongenitale interne urogenitale Anomalien, wie zum Beispiel Blasenektrophien [1]. Der Ekstrophie-Epispadie-Komplex entsteht durch eine embryonale Schädigung der Kloakalmembran. Daraus resultiert ein fehlender Verschluss der vorderen Harnblasen- und Bauchwand, sowie eine rinnenförmig offen liegende Harnröhre [2-5]. Die Therapie dieser Anomalie ist in der Kinderchirurgie eine herausfordernde Aufgabe. Es sind mehrere operative Maßnahmen bekannt, die jedoch alle zahlreiche Komplikationen aufweisen. Viele Therapieoptionen beinhalten eine Pouch-Bildung bzw. eine Blasenvergrößerung aus Darmanteilen. Die damit einhergehenden Komplikationen, wie metabolische Azidose, Schädigungen der oberen Harnwege und erhöhtes Kolonkarzinomrisiko, beeinträchtigen die Lebensqualität der Patienten erheblich [6, 7]. Durch die Weiterentwicklung der Medizin im Zeitalter des Tissue Engineerings, wird folglich nach geeigneten Materialien gesucht, die als Blasenersatz oder zur Blasenvergrößerung dienen, ohne den Darm für Harnableitungsverfahren nutzen zu müssen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem biokompatiblen Kollagen-Netz Lyoplast[®], das im Rahmen eines Kleintiermodells in die Harnblase von Ratten implantiert wird, um die Funktionstüchtigkeit als Blasenersatz bzw. Blasenaugmentat zu testen. Bislang wurde das Kollagen-Netz nur in der Neurochirurgie verwendet, doch gibt es bereits Experimente zur Erprobung der Tauglichkeit von Lyoplast[®] in der Therapie von kongenitalen Bauchwanddefekten [8-10].

2. Einführung

2.1 Anatomie der Harnblase

Die Harnblase (lat. Vesica urinaria) ist ein glattmuskuläres Hohlorgan im Bereich des kleinen Beckens. Sie ist ein extraperitoneales Organ, das heißt, dass sie außerhalb der Beckenhöhle liegt, welche eine kaudale Fortsetzung der Bauchhöhle darstellt. Sie ist direkt hinter der Symphyse lokalisiert und grenzt beim Mann an das Rektum, bei der Frau an den Uterus. Dadurch werden die sogenannten Excavationes rectovesicalis bzw. vesicouterina gebildet. Ersteres stellt den tiefsten Punkt der Bauchhöhle beim Mann dar [11].

Die Harnblase gliedert sich in den Harnblasenkörper mit einem Scheitel, dem Apex, und einem Grund, dem Fundus. Der Apex ist über das Ligamentum umbilicale medianum, dem obliterierten Urachus, mit dem Nabel verbunden [11]. In den subperitoneal gelegenen Blasenfundus münden die beiden Ureteren von hinten ein. Die beiden Ostia ureterum und das vorn-unten lokalisierte Ostium urethrae internum bilden das Trigonum vesicae [12].

Der histologische Aufbau der Harnblasenwand besteht aus drei Schichten. Von innen nach außen sind das Tunica mucosa mit dem Urothel und der Lamina propria. Die mittlere Schicht ist die Tunica muscularis mit dem dreilagigen Geflecht glatter Muskelzellen, die den Musculus detrusor vesicae bilden und nach außen hin grenzt die Tunica serosa die Harnblase ab [11, 12].

Die Harnblase hat verschiedene Funktionen. Zum einen dient sie als Reservoir des Harns. Sie kann bis zu 500ml Harn speichern. Der Verschluss, sowie die Füllung der Harnblase, werden über den Sympathikus reguliert [13]. Da kein anatomischer Sphinkter am Blasenausgang existiert, wird der Verschluss und folglich die Kontinenz der Harnblase über die innere, unwillkürlich gesteuerte Ringmuskelschicht der Urethra, sowie über den äußeren, willkürlich gesteuerten Musculus sphincter urethrae externus gewährleistet [11].

Desweiteren ist die Entleerung des Speichers unter willkürlicher Kontrolle eine Funktion der Harnblase. Zu diesem Zweck kontrahiert der Musculus detrusor vesicae. Diese Aktivität wird parasympathisch vermittelt [13].

2.2 Blasenektrophie

2.2.1 Embryologie

Die Embryologie von Harn- und Genitalorganen korreliert stark miteinander. Das Urogenitalsystem entsteht aus einer Leiste des Keimblatts Mesoderm [14]. Die Anlagen der Ureteren münden beidseits in die Kloakenmembran [3, 14]. Diese wird durch das Septum urorectale in eine ventrale Membrana sinus urogenitalis, spätere Harnblase, Urethra, Introitus vaginae und akzessorische Geschlechtsdrüsen, und eine dorsale Membrana analis, späteres Rektum, aufgeteilt (s. Abb. 1a). In der Regel wird diese Aufteilung durch die Proliferation von mesodermalen Zellen des Septum urorectale verstärkt [3, 14, 15].

Bei Kindern mit Blasenektrophien führt eine mesodermale Entwicklungsstörung dazu, dass ab der 3. Schwangerschaftswoche keine mesodermalen Zellen mehr in die Kloakenmembran einwandern. Als Folge daraus unterbleibt das Verschmelzen der Genitalhöcker (s. Abb. 1b) und es bildet sich eine zunehmende Instabilität, die zur Ruptur der kranialen Kloakenmembran führt [3-5]. Die bisherige Kloakenmembran bildet den infraumbilikal ventralen Anteil der Bauchwand. Dieser bildet später die muskuläre Bauchwand und durch die Störung der kompletten Ringbildung, den vorderen Teil des Beckenrings. Die Ausbildung einer ventralen Harnblasenwand unterbleibt, sodass die Blasenplatte offenliegt (s. Abb.1c) [2-5]. Ein Sonderfall der Blasenektrophie, die kloakale Blasenektrophie, tritt auf wenn die Kloakenmembran rupturiert bevor der Sinus urogenitalis durch das urorectale Septum vom späteren Enddarm getrennt werden konnte (s. Abb. 2) [2-4].

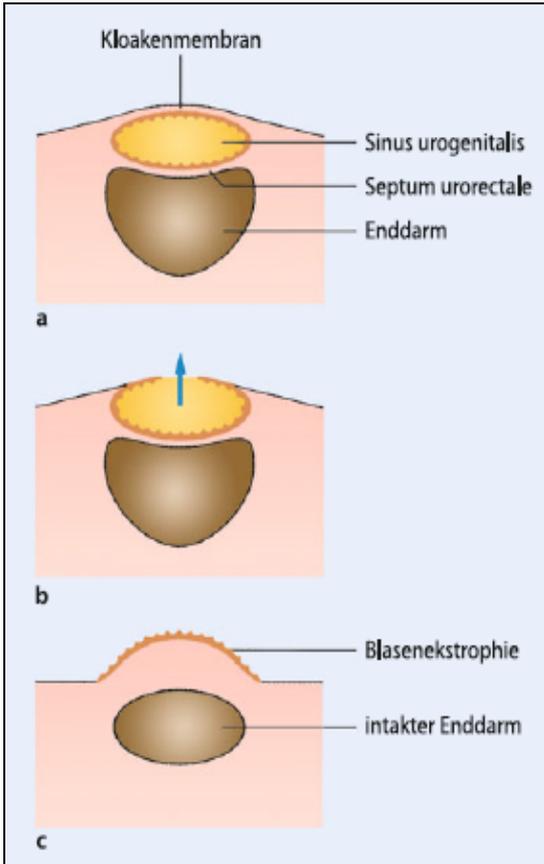


Abb. 1: Entstehung einer Blasenektrophie

- a) Aufteilung der Kloakenmembran in Sinus urogenitalis und Enddarm; fehlendes Einwandern von mesodermalen Zellen
- b) Ruptur kranialer Kloakenmembran
- c) offen liegende Blasenplatte

aus: [16] Conrad, S. und J.W. Thüroff, *Urologie*, A. 14.30, Editor. 2014, Springer: Berlin Heidelberg

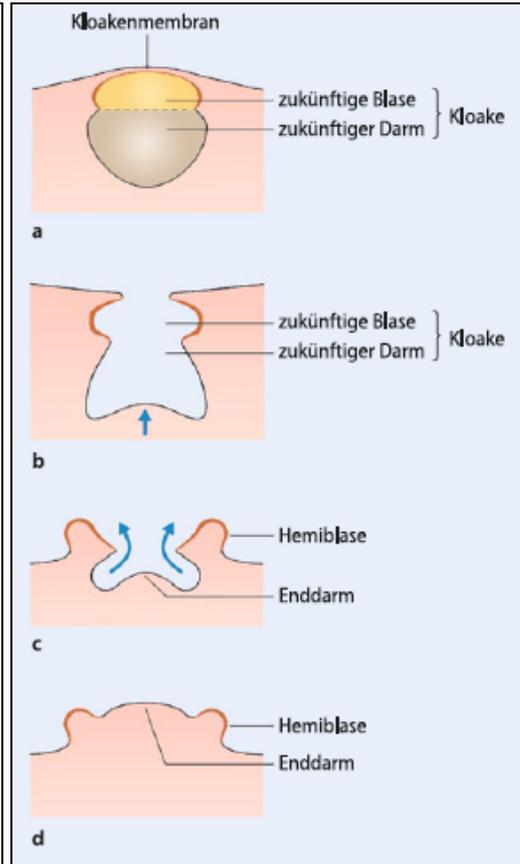


Abb. 2: Entstehung einer kloakalen Blasenektrophie

- a) Kloakenmembran ist noch nicht durch das Septum urogenitale in Sinus urogenitalis und Enddarm geteilt
- b) Ruptur der Kloakenmembran durch fehlendes Einwachsen mesodermaler Zellen
- c) fehlende hintere Blasenwand,
- d) sodass der Enddarm zwischen der zweigeteilten Blasenwand freiliegt

[17] Conrad, S. und J.W. Thüroff, *Urologie*, A. 14.34, Editor. 2014, Springer: Berlin Heidelberg

2.2.2 Klinisches Erscheinungsbild

Die klassische Blasenektrophie ist mittels Blickdiagnose erkennbar. Die Betroffenen werden mit einem offenem Unterbauch und einer evaginierten Blasenplatte geboren. Eine infraumbilicale Rektusdiastase mit gespaltenen Musculi recti, eine fehlende anteriore Harnblasenwand, eine fehlende vordere Bauchwand, eine Epispadie (s.u.), Genitalmissbildungen und eine Symphysendehiszenz stellen das Krankheitsbild dar [3-5, 18, 19].

Die Patienten leiden an Harninkontinenz und rezidivierenden Harnwegsinfektionen. Aufgrund der weit auseinander stehenden Schambeinäste, mit Folge von Fehlstellungen der Hüftpfanne und des Femurs, zeigen die Patienten Störungen des Gangbildes, wie den watschelnden Entengang [2].

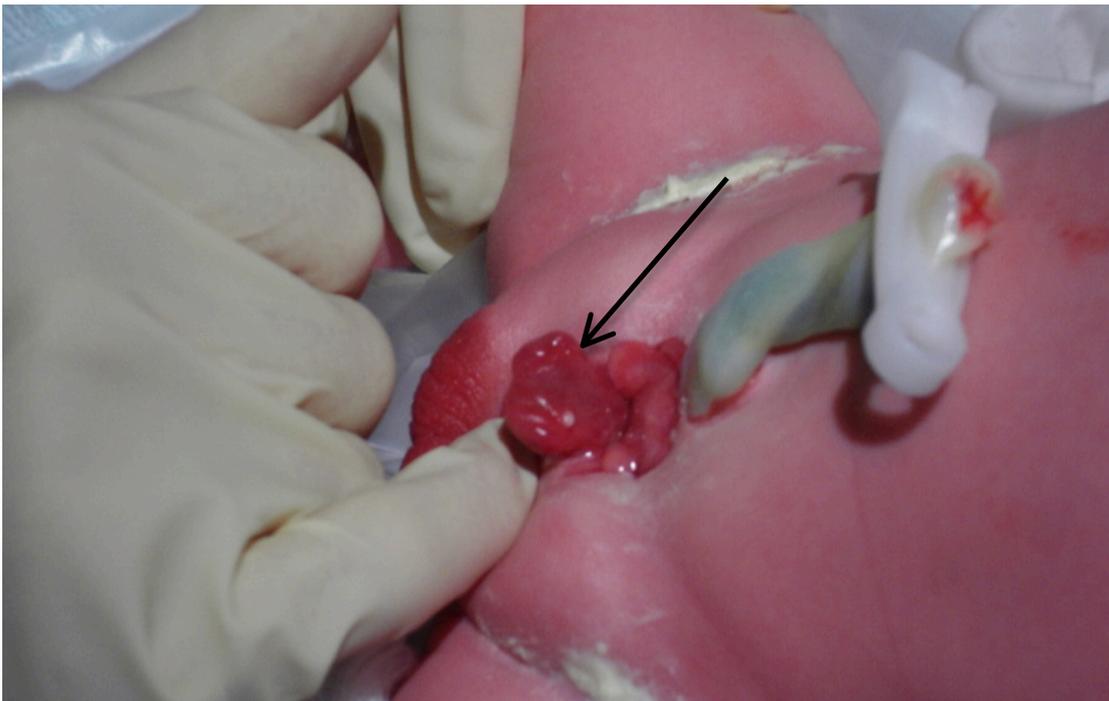


Abb.3: Neugeborenes mit Blasenektrophie
(Schwarzer Pfeil zeigt auf die offen liegende Harnblase)

2.2.3 Inzidenz und assoziierte Fehlbildungen

Blasenektrophien treten mit einer Häufigkeit von 1:40.000-50.000 Neugeburten auf. Jungen sind doppelt so häufig betroffen wie Mädchen [3-5].

Die genaue Pathogenese der Erkrankung ist noch nicht ausreichend geklärt. Es wird angenommen, dass eine multifaktorielle Genese mit genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren die Fehlbildung auslösen [4, 20].

Mittels fetaler transabdomineller Sonografie und postnatalen Untersuchungen wie Sonografie von Nierenlager und oberen Harnwegen, Ausscheidungsurogramm, sowie seitengetrennter Nierenclearance kann der Schweregrad der Erkrankung und die Assoziation zu anderen urologischen Fehlbildungen untersucht werden [3, 5, 18]. Der Ekstrophie-Epispadie-Komplex (EEK) wird nach dem Schweregrad in die isolierte Epispadie, die klassische Blasenekstrophie und die kloakale Blasenekstrophie eingeteilt [4, 19].

Epispadie ist eine Fehlbildung der Harnröhre und des Penis. Dabei ist die vordere Bauchwand komplett geschlossen. Durch Spaltbildung der Urethra und Malposition hinter beide Schwellkörper liegt die Harnröhre komplett oder teilweise rinnenförmig offen auf der Dorsalseite des Penis [21].

Je distaler der Meatus urethrae, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Kontinenz des Harntraktes erhalten bleibt [3, 5]. Der Penis ist in der Regel kurz, breit und nach dorsal gekrümmt. Bei Mädchen ist die Klitoris gespalten. Häufig ist der Symphysenspalt dehiszent [18, 21].

Die Inzidenz der isolierten Epispadie ist bei männlichen Patienten bei 1:100.000, bei weiblichen Patienten bei 1:400.000 [3-5, 21]. Die kloakale Ekstrophie ist die schwerste Form des Ekstrophie-Epispadie-Komplexes [19]. Dabei kommt es durch sehr frühzeitige Spaltbildung der Kloakenmembran (s.o.) zu einer Spaltung der Harnblase in zwei Hemiblasen mit medialem Darmabschnitt, sodass Darm und Harntrakt nicht von einander getrennt sind (s. Abb. 2). Die Inzidenz dieser Form des EEKs beträgt 1:400.000 [3-5]. Patienten mit einer Form des EEK weisen häufig noch andere Fehlbildungen auf, wie zum Beispiel Hernia inguinalis, Retentio testis, Kryptorchismus (40% der Fälle) gelegentlich Omphalozenen, Analatresie, rektale Stenosen, sowie die o.g. Genitalmissbildungen und Spaltbecken [22, 23]. Teilweise betreffen Fehlbildungen die Ureteren, mit Folge eines Reflux von Urin in die Nieren, sodass diese ebenfalls Schaden nehmen können [3-5, 18].

Patienten mit kloakaler Ekstrophie weisen mehr assoziierte Fehlbildungen auf als Patienten mit isolierter Epispadie oder klassischer Blasenekstrophie.

(s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Assoziierte Fehlbildungen bei Patienten mit kloakaler Ekstrophie [4]

Betroffenes Organsystem	Häufigkeit bei Patienten mit kloakaler Ekstrophie
Untere Extremitäten	23%
Wirbelfehlbildungen	20%
Herz	9%
GIT	7%
Andere	22%

Da Patienten mit einer Form des EEKs häufig Latexallergien haben, muss bei Operationen (s.u.) beachtet werden, dass sie in einer latexfreien Umgebung durchgeführt werden [18].

2.2.4 Therapie

Die Therapie von Blasenekstrophien ist vielfältig. Auch wenn sie mittlerweile funktionelle und kosmetische Ansprüche erfüllen kann, geht sie mit einigen Komplikationen einher und ist folglich unbefriedigend [19, 24, 25]. Die Ziele der Therapie sind Schonung des oberen Harntraktes, vor allem der Nieren, Harnkontinenz und eine normale Sexualität bzw. bei Frauen eine normale Schwangerschaft [4].

Momentaner Goldstandard ist der frühzeitige Harnblasenverschluss mit initialer oder späterer Blasen Halsrekonstruktion. Dabei wird die Harnblase durch Adaptation der bestehenden Blasenplatte verschlossen und die vordere Bauchwand wird ebenfalls rekonstruiert. Danach erfolgt die Reduktion der Symphysendehiszenz, ggf. mit einer ileosakralen Osteotomie. Diese Schritte können entweder in einer einzeitigen oder in einer mehrzeitigen Operation erfolgen [4, 5, 18, 19]. Der Zeitpunkt der ersten Operation ist noch Standpunkt

gegenwärtiger Diskussionen, da die Meinungen von 72h postnatal bis zu späteren Monaten tendieren [4, 26].

Bei weiblichen Patienten können genitale Defekte schon während der ersten Operation behoben werden. Bei männlichen Patienten wird die Epispadie erst später, zum Beispiel im Alter von 6-12 Monaten operiert. Um die Durchblutung des Penis und damit einhergehend das Wachstum der Penishaut zu verbessern, werden die Patienten vor der operativen Korrektur der Epispadie lokal mit Testosteron behandelt [18]. Um die Kontinenz der Betroffenen zu verbessern bzw. zu erlangen, wird entweder während der initialen Operation, oder bis zu Jahre später in einer zweiten OP eine Blasenhalstruktion durchgeführt [4]. Diese Art der Therapie führt häufig zu einer nicht zufriedenstellenden Kontinenz bzw. die Patienten werden hyperkontinent [5]. Wenn die Patienten bis zum Alter von 5-9 Jahren nicht kontinent werden, oder der Versuch der frühzeitigen Harnblasenschließung nicht gelungen ist, folgen Maßnahmen wie Revision von Blasenhalstruktion, Blasenaugmentation oder Neblasenimplantation [19].

Blasenaugmentationen mit Sigma, Ileum, Sigma-Ileum-Kombinationen oder Magenanteilen sind vor allem für Patienten mit einer geringen Blasenkapazität indiziert [27]. Verschiedene xenogene Materialien, wie zum Beispiel small intestinal submucosa (SIS), wurden getestet, zeigten jedoch ungenügende Ergebnisse, sodass von der Benutzung von SIS als Blasenaugmentat abgeraten wird [28]. Ebenso wurde Pelvicol[®], ein azelluläres Kollagen-Netz aus Schweinehaut, als Blasenaugmentat getestet und durch die Ausbildung von akuten Entzündungsreaktionen, Mikrokalzifikationen und Abszessbildung als ungeeignet befunden [29].

Neblasen können aus unterschiedlichen Materialien, wie zum Beispiel Colon, Ileum oder Magenanteilen gebildet werden. Bei der Implantation von Neblasen und auch häufig bei Blasenaugmentationen werden kontinente Harnableitungen über ein katheterisierbares Nabelstoma (Mitrofanoff-Stoma) erforderlich [4, 30]. Das Stoma kann mittels Appendix, Ileum oder Colonanteilen konstruiert werden. In allen drei Fällen wird ein katheterisierbarer Tunnel zum Bauchnabel geleitet, sodass die Patienten sich mindestens einmal pro Tag selbst

katheterisieren müssen. Bei dieser Methode leiden Patienten häufig an Obstruktionen oder abdominellen bzw. pelvinen Abszessen, vor allem wenn Colonanteile zur Harnableitung benutzt werden [25]. Außerdem können Stoma-Probleme, wie Stenosen, Prolaps, Ischämien oder Inkontinenz vorkommen [31]. Bei diesem Versuch des kontinenten Blasenverschlusses sind oftmals viele Operationen nötig und es kann häufig keine komplette Kontinenz erreicht werden.

In manchen Zentren umgeht man den oben genannten Versuch der Blasenaufbauplastik, indem direkt eine primäre Harnableitung gebildet wird.

Dazu gibt es verschiedene Möglichkeiten [3-5]. Zum einen können uretero-sigmoidale Pouches konstruiert werden. Dieser sogenannte Mainz-Pouch II leitet den Urin in den Enddarm ab, folglich wird ein Urin-Stuhl-Gemisch ausgeschieden. Diese Methode geht mit Komplikationen, wie Infekten, metabolischer Azidose und dem erhöhten Risiko eines Kolonkarzinoms einher. Bei Kindern kann dieser Pouch in bis zu 90% der Fälle zu progressiven Schädigungen der oberen Harnwege führen [6, 7].

Es kann auch ein sogenannter Mainz-Pouch I gestaltet werden. Dabei handelt es sich um einen Ileozökalpouch mit kontinentem Nabelstoma. Diese Therapiemethode kann zur Bildung von Blasensteinen führen [6]. Eine weitere Möglichkeit ist ein Conduit aus Kolon oder Ileum. Bei dieser Form der Harnableitung besteht keine Kontinenz. Die Patienten erhalten eine Ureterokutaneostomie, sodass sie den Urin in einen Beutel am rechten Unterbauch ausscheiden [4]. Diese Therapiemethode führt häufig zu Komplikationen wie Harnleiterstrikturen, Stomastenosen und durch vesikoureteralen Reflux zu Schädigungen der oberen Harnwege [6].

Um Neugeborenen mit EEK eine bestmögliche Therapie gewährleisten zu können, sollten Betroffene in spezialisierten Zentren geboren werden, bzw. postnatal direkt in ein Zentrum, welches Erfahrung mit EEK-Patienten hat, verlegt werden [4, 18, 25, 32-34].

2.3 Aktuelle Studienergebnisse von Lyoplast[®]

Das biokompatible Kollagennetz Lyoplast[®] ist bisher Gegenstand von nur wenigen experimentellen Untersuchungen.

In einer Studie von Wunsch et al. [35] wurde Lyoplast[®] zusammen mit verschiedenen anderen Biomaterialien in vitro mit Urothelzellen besiedelt. Anschließend wurden die Konstrukte elektronenmikroskopisch und tensiometrisch bewertet. Lyoplast[®] wies unter dem EM eine flache Oberflächenstruktur, ähnlich wie physiologisches Urothel, auf, aber untereinander entstanden nur wenige Zellkontakte. In den tensiometrischen Messungen fiel die Reißfestigkeit von Lyoplast[®] verglichen mit anderen Biomaterialien, ebenfalls schwächer aus. Folglich geht Wunsch et al. davon aus, dass es in in-vitro-Untersuchungen noch kein ideales Biomaterial für urogenitale Rekonstruktionen gibt. Der tensiometrisch ermittelte Wert von Lyoplast[®] grenzte jedoch stark an den Wert für die unbehandelte Harnblasenwand [35].

Meyer et al. testete Lyoplast[®] in verschiedenen Studien zur Therapie von kongenitalen Bauchwanddefekten als erfolgsversprechendes Material [8-10].

Dazu wurde jeweils im Kleintiermodell ein abdomineller Vollwanddefekt erzeugt und mit den verschiedenen Materialien Polytetrafluorethylen (PTFE, GORE-Tex[®], Dual-Mesh, W.L. Gore and Associates USA), Polypropylen (PPP, Vicryl-Mesh[®], Ethicon, Deutschland) und Lyoplast[®] gedeckt.

Die Tiere wurden täglich für sechs Wochen auf postoperative Komplikationen und Körpergewicht überprüft. Anschließend wurde die Bauchwand erneut eröffnet und der Grad der Adhäsionen zum umliegenden Gewebe bestimmt. Es wurde Gewebe für histologische, tensiometrische und immunhistologische Untersuchungen entnommen [8-10]. In den durchgeführten Studien wiesen die Tiere eine physiologische Wachstums- und Gewichtskurve auf. Keines der Tiere aus der Lyoplast[®]-Gruppe entwickelte postoperative Komplikationen.

Es zeigte sich, dass alle implantierten Materialien einer höheren tensiometrischen Kraft widerstehen konnten als in der Kontrollgruppe mit unbehandelter Bauchdecke. Die Implantate der Tiere aus der PTFE- und PPP-Gruppe waren durch Fibrosereaktionen reißfester als die Lyoplast[®]-Implante,

welche eine ähnliche Reißfestigkeit wie die unbehandelte Bauchdecke aufwiesen [10].

Des Weiteren entwickelten die Tiere aus der Lyoplant[®]-Gruppe weniger Adhäsionen zum umliegenden Gewebe. In den histologischen und immunhistologischen Untersuchungen zeigten sich nur schwache Entzündungsreaktionen, gemessen an der Zahl der eingewanderten Fibroblasten und CD4,CD8a sowie CD68-getriggerten Zellen, verglichen mit den PTFE- und PPP-Gruppen. Interessanterweise erzeugte das Lyoplant[®]-Implantat einen Remodelling-Prozess, der durch aktive Neovaskularisation induziert wurde. Somit scheint Lyoplant[®] in den durchgeführten Studien eine wesentlich schwächere Entzündungs- und Immunreaktion vom Körper zu erzeugen und unterstützt somit die Transplantatakzeptanz [8-10].

Meyer et al. unterstützt die Hypothese, dass Lyoplant[®] durch eine überwiegende immunologische TH2-Antwort die Anwesenheit von anti-inflammatorischen Zytokinen unterstützt und dadurch Abwehrreaktionen vom Körper gegen das Lyoplant[®]-Implantat unterdrückt [8, 10].

Die o.g. Studienergebnisse wurden in einem Großtiermodell mit Schweinen nochmals bestätigt. Durch Laparoskopien im Abstand von 3,6,9 und 12 Monaten wurde nachgewiesen, dass sich trotz kontinuierlicher Remodelling-Prozesse die Implantatdicke von Lyoplant[®] nicht veränderte, da es funktionell durch körpereigenes Gewebe ersetzt wurde [10].

3. Fragestellung

Biomaterialien haben sich in vielen Bereichen der Medizin zur Defektdeckung von Organen etabliert. Das in dieser Arbeit untersuchte Material Lyoplant[®], findet bislang in der Neurochirurgie Einsatz und wurde in mehreren experimentellen Studien zu kongenitalen Bauchwanddefekten als geeignet getestet [36]. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob das Kollagen-Netz Lyoplant[®] auch als Blasenaugmentat geeignet ist.

Damit das Biomaterial als Harnblasengerüst verwendet werden kann, muss es einigen Anforderungen gerecht werden, die innerhalb dieser Studie untersucht werden (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Anforderung an Biomaterialien als Harnblasenaugmentat [9, 37, 38]

Anforderung	Begründung
Biokompatibilität	Um keine Fremdkörperreaktion des Körpers zu erzeugen
Resorbierbarkeit	Sodass der Körper nicht auf Dauer einem Fremdmaterial ausgesetzt bleibt
Mechanische Stabilität	Um die Konsistenz auch bei erhöhtem Blasendruck zu gewährleisten
Unterstützung von regenerativen Prozessen und Zelldifferenzierung	Um möglichst belastbar und reparabel zu sein
Antikarzinogen und antiallergisch	Um möglichen Komplikationen vorzubeugen

In dieser Studie wird im Rahmen eines Kleintiermodells untersucht, (1) wie die Tiere sich bezogen auf das Körpergewicht entwickeln, ob (2) das Implantat Adhäsionen zu umliegenden Organen bildet, ob (3) das Implantat nach sechs Wochen noch makroskopisch sichtbar ist, sowie (4) die histologische und immunhistologische Beurteilung des Kollagen-Netzes mit Bezug zum umliegenden Gewebe. Hierbei wird vor allem (5) die Entstehung von Neovaskularisation und (6) die Entwicklung eines Remodelling-Prozesses bewertet.

4. Material und Methoden

4.1 Lyoplast[®] (B.Braun, Deutschland)

4.1.1 Aussehen und Materialeigenschaften

Das verwendete Implantat Lyoplast[®] ist ein bovines Kollagenmaterial der Firma B. Braun Melsungen AG.

Es wird aus Rinderperikard hergestellt [36]. Virologische Untersuchungen haben ergeben, dass das Material nicht mit Viren oder Prionen infiziert ist. Folglich ist eine Übertragung von Erkrankungen, wie zum Beispiel die bovine spongiforme Enzephalopathie, auf die Versuchstiere ausgeschlossen [9, 10].

Des Weiteren wird bei der Herstellung von Lyoplast[®] darauf geachtet, dass alle nicht-kollagenen Substanzen, wie zum Beispiel Fette, Enzyme und Proteine entfernt werden, sodass es ein avaskuläres und azelluläres Material ist [8, 9, 36]. Durch den Vorgang der Lyophilisierung wird die mikroporöse Struktur des Kollagen-Materials beibehalten. Die lose Faserstruktur "ermöglicht somit eine schnelle Infiltration der körpereigenen Zellen" [36]. Zusätzlich kann das zu implantierende Material "rehydriert werden, um es glatter und geschmeidiger zu machen" [36].

Das biokompatible Material wird nach Implantation in das Zielobjekt durch langsamen enzymatischen Abbau und Wiederauffüllung mit Kollagen in körpereigenes Bindegewebe umgesetzt. Dieser Vorgang wird Remodelling genannt und beginnt mit einer Neovaskularisation des vorher avaskulären Materials [8, 36]. Das Kollagenmaterial weist eine exzellente Biokompatibilität auf. Derzeit wird Lyoplast[®] in der Neurochirurgie als Duraersatz zur Behebung von Duradefekten eingesetzt [36].



Abb. 4: Lyoplast®

aus: [36] AG, B.B.M. *Lyoplast*. 2015; Available from:

https://www.bbraun.de/content/dam/catalog/bbraun/bbraunProductCatalog/CW_DE/de-de/b0/lyoplast.jpeg.bb-.23889569/lyoplast.jpeg

4.1.2 Immunologische Eigenschaften von Lyoplast®

Durch die Implantation von xenogenem Material wie Lyoplast® wird die Immunabwehr der Versuchstiere aktiviert.

Dazu werden u.a. T-Lymphozyten gebildet, die auf ihrer Oberfläche verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Funktionen, wie zum Beispiel CD4 und CD8 haben. Die CD8-T-Lymphozyten eliminieren erregerinfizierte körpereigene Zellen und werden als zytotoxische Zellen bezeichnet. CD4-T-Lymphozyten werden auch T-Helferzellen genannt, weil sie durch die Produktion von Zytokinen andere Immunzellen aktivieren [39, 40].

Typ-1-T-Helferzellen stimulieren die zelluläre Immunantwort, indem sie Zytokine wie Interferon- γ , Interleukin-2 und Tumornekrosefaktor- α ausschütten, die die

Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen auslösen. Diese phagozytieren Fremdmaterial und lösen eine Entzündungsreaktion aus [40, 41]. B-Lymphozyten werden durch Typ1-T-Helferzellen aktiviert und stimulieren die Antikörper-Produktion. Über die Ausschüttung von Zytokinen wird der Typ2-T-Helferzellen-Pathway gehemmt.

Die TH-2-Lymphozyten repräsentieren die humorale Immunantwort. Sie lösen die Ausschüttung der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL13 aus. Dadurch wird die Interaktion mit B-Lymphozyten gefördert, die Antikörper produzieren und ausschütten [40]. Vor allem IL-4 und IL-13 bewirken den Antikörperwechsel von IgG und IgM zu IgE, sowie eine Hemmung des TH1-Pathways, sodass keine Makrophagen mehr aktiviert werden. Diese Aktionen werden durch die anderen oben genannten Interleukine des TH2-Pathways verstärkt [40]. Somit wirkt der Typ2-T-Helferzellen-Pathway antiinflammatorisch.

Die Implantation von Lyoplant[®] erzeugt eine immunologische Reaktion des TH2-Pathways, sodass eine Entzündungsreaktion supprimiert wird. Dadurch wird eine Transplantatakzeptanz des xenogenen Materials gefördert [8].

4.2 Das Kleintiermodell

4.2.1 Allgemeiner Ablauf der Studie

Nach Genehmigung des Tierschutzantrags (s. Anhang) für 16 junge Wistar-WU-Ratten (Harlann-Winkelmann, Borchon, Deutschland), wurden die Versuchstiere narkotisiert und das zu untersuchende Kollagen-Netz Lyoplant[®] in die Harnblase der Tiere implantiert.

Um einen möglichen Einfluss durch die Anästhesie oder durch die Eröffnung der Bauchwand auszuschließen, wurde parallel in einer Kontrollgruppe (n=1) eine sham-Operation durchgeführt. In dieser wurde das Tier lediglich in Narkose versetzt und die Bauchwand inklusive Faszie eröffnet. Post-OP wurden die Versuchstiere für einen Zeitraum von sechs Wochen täglich gewogen und auf Hernienbildung, Zeichen einer Infektion und Wundheilungsstörungen kontrolliert.

Am Ende der sechsten Woche wurden die Tiere erneut narkotisiert und die Bauchwand eröffnet. Die Harnblase der Tiere wurde makroskopisch beurteilt und anschließend explantiert. Um die richtige Verdünnung der unterschiedlichen Antikörper auszutesten, ohne die Harnblase zu verwerten, wurde in der gleichen Operation die Milz von fünf Versuchstieren als Referenzgewebe entnommen.

Alle Versuchstiere wurden in Narkose mit einer intrakardialen Injektion von T61 getötet. Es folgten histologische und immunhistologische Untersuchungen der Harnblasen, um den Remodelingprozess des Kollagenmesh in das umliegende Gewebe genauer zu beurteilen.

4.2.2 Die Versuchstiere

Im Rahmen eines Kleintiermodells wurde der Tierschutzantrag für 16 junge Ratten des Inzuchtstamms Wistar-WU-Ratten (Harlann-Winkelmann, Borchon, Deutschland) genehmigt. Zum Zeitpunkt der Implantation wogen die Ratten 75-100 g. In dem gesamten Zeitraum der experimentellen Studie wurden die Tiere leitliniengerecht in klimatisierten Scanbur-Schränken unter keimarmen Bedingungen gehalten, mit dauerhaftem Zugang zu Wasser.

4.2.3 Das Verfahren der operativen Implantation

Die Tiere wurden im mikrochirurgischen OP im ZOM (Zentrum der Operativen Medizin) im Universitätsklinikum Würzburg unter sterilen Bedingungen operiert. Nach Einleitung einer Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Florene (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethylidifluoromethylether), Abbot GmbH, Deutschland), wurde die Bauchwand der Tiere rasiert, desinfiziert und steril abgedeckt, um das Risiko der Wundinfektion zu vermindern. Es folgte die mediane Unterbauchlaparotomie mit Mobilisation der Bauchdecken, des Darms und Freilegung der Harnblase.

Nach Resektion eines 0,8x0,8cm großen Quadrats aus der Harnblasenwand, wurde der entstandene Defekt durch ein ebenfalls 0,8x0,8cm großes Kollagenmesh Lyoplast[®] komplettiert.

Das Netz wurde mittels sechs nicht-resorbierbarer Prolene-Einzelknopfnähte (8/0) in die Harnblasenwand eingenäht. Um eine sichere Abdichtung der Harnblase zu erhalten wurde der Defekt zusätzlich mit Fibrinogen (TachoSil[®], Fa. Nycomed, Österreich) beschichtet.

Die Bauchwandfaszien wurden mit nicht-resorbierbaren Polypropylen-Fäden (4/0) genäht, der Hautverschluss in fortlaufender Technik mit nicht-resorbierbaren Polypropylen-Fäden (7/0).

4.2.4 Postoperative Nachkontrollen und Datenerhebung

Zur postoperativen Analgesie erhielten die Versuchstiere Tramal[®] (Wirkstoff Tramadol). Die Tiere wurden nach der Operation für 2h unter einer Wärmelampe nachbeobachtet.

In den anschließenden sechs Wochen wurden die Wunden der Tiere täglich visitiert und auf postoperative Komplikationen kontrolliert. Dabei wurde vor allem auf die Bildung von Narbenhernien, Infektionen und Wundheilungsstörungen geachtet. Das Körpergewicht der Tiere wurde ermittelt und in ein Gewichtsprotokoll, das spezifisch für jedes Tier angelegt wurde, aufgezeichnet. Dadurch hätten mögliche Schwankungen, die mit Erkrankungen wie zum Beispiel einem Ileus zusammenhängen können, möglichst zeitnah festgestellt werden können.

4.2.5 Das Verfahren der operativen Explantation

Zur operativen Explantation erhielten die Tiere erneut eine Isofluran-Inhalationsnarkose und eine Unterbauchlaparotomie. Die Harnblase mit implantiertem Material wurde makroskopisch betrachtet und der Grad der Adhäsionen zu den umliegenden Organen bestimmt (s. Tabelle 3).

Es folgte die Explantation der Harnblase und sofortige Fixierung in Formaldehyd. Aus den oben genannten Gründen wurde die Milz als Referenzgewebe von fünf Versuchstieren entnommen und ebenfalls in Formaldehyd eingelegt. Die Versuchstiere wurden unter Aufrechterhaltung der Narkose mittels einer intrakardialen Injektion von T61 getötet.

Tabelle 3: Einteilung der Adhäsionsgrade

Gradnummer	Beschreibung des Adhäsionsgrades
Adhäsion Grad 0	keine Adhäsion
Adhäsion Grad 1	mit dem Finger lösbare Adhäsion
Adhäsion Grad 2	schwer mit dem Finger lösbare Adhäsion
Adhäsion Grad 3	nur mit dem Skalpell lösbare Adhäsion

4.3 Histologische Untersuchung

Nach der Entnahme von Milz und Harnblase, inklusive Implantat, wurden die Organe in 10% Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 24 Stunden wurden die Paraffinblöcke mittels eines Mikrotoms in 2µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger aufgezogen. Nach erneuter Inkubationszeit von mindestens 24 Stunden wurden die Paraffinschnitte mit Hämatoxylin-Eosin, nach Masson-Goldner-Trichom und immunhistochemisch gefärbt.

4.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist eine Standardfärbung im Labor. Sie färbt die azidophilen Zellanteile, wie zum Beispiel die Zellkerne blau und die basophilen Anteile, wie zum Beispiel Zytoplasma, Erythrozyten und Kollagen rot [42]. Zunächst müssen die Paraffinschnitte entparaffiniert werden. Dazu werden die Objektträger (OT) für jeweils zehn Minuten nacheinander in zwei verschiedene Xylol-Lösungen gelegt. Danach werden sie in eine absteigende Alkoholreihe für

jeweils 3 Minuten gehalten und anschließend in destilliertem Wasser geschwenkt bis sich keine Schlieren mehr bilden.

Zur Färbung der basischen Zellanteile werden die OT für 15 Minuten in die wässrige Hämalaun Lösung nach Mayer gehalten. Nach anschließendem Spülen für 10 Minuten mit Leitungswasser und destilliertem Wasser, werden die OT in die saure Eosin-Lösung 1% gestellt. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol-Lösung werden die Schnitte entwässert und mit Entellan eingedeckt.

4.3.2 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Die Masson-Trichrom-Goldner-Färbung ist eine histologische Übersichtsfärbung, durch die bestimmte Zell- und Gewebebestandteile farblich voneinander getrennt werden. Die Zellkerne erscheinen blau-schwarz. Zytoplasma, sowie Muskelfasern werden ziegelrot gefärbt. Kollagen, Mucus und basophile Granula nehmen eine grüne Farbe an und Erythrozyten eine orangegelbe Farbe [42, 43].

Als erstes werden die OT mit den Paraffinschnitten entparaffiniert, indem sie für jeweils 20 Minuten in zwei verschiedene Xylol-Lösungen gehalten werden und dann für jeweils 3 Minuten in eine absteigende Alkoholreihe gelegt werden. Danach werden die OT mit destilliertem Wasser gespült. Nacheinander werden jeweils 6 Tropfen der Lösung „Weigerts Eisenhämatoylin A“ und der Lösung „Weigerts Eisenhämatoylin B“ aufgetragen und dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die OT werden abgetropft, dann werden 10 Tropfen Pikrinsäure-Alkohol Lösung auf jeden OT gegeben.

Nach 4 minütiger Wartezeit und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser, wird die erste Goldner-Lösung aufgetragen. Dabei handelt es sich um Ponceausäure Fuchsin nach Masson. Davon werden jeweils 10 Tropfen auf jeden OT gegeben und erneut 4 Minuten gewartet, sodass die Farbe gut in das Gewebe einziehen kann. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wird die zweite Goldner-Färbung aufgetragen, diesmal 10 Tropfen Molybdatophosphorsäure. Diese muss für 10 Minuten einwirken.

Die OT werden abgetropft und mit 10 Tropfen der dritten und letzten Goldner-Farbe benetzt. Das ist die Lösung „hellgrün“ nach Goldner, die für 5 Minuten einwirkt. Danach werden die OT mit destilliertem Wasser gespült und in eine aufsteigende Alkoholreihe für jeweils 3 Minuten gehalten. Nach jeweils 20 minütigem Entwässern mit zwei verschiedenen Xylol-Lösungen, folgt das Eindecken mit Entellan.

4.3.3 Immunhistochemie-Färbung

Mittels der Immunhistochemie-Färbung werden spezifische Antigene in den Gewebeschnitten nachgewiesen. Antigene sind hochspezifische Moleküle, die durch die Bindung von Antikörpern Immunreaktionen im Körper auslösen [44]. In diesem Versuch wird die indirekte Zwei-Schritt-Methode angewendet, bei der ein Primärantikörper an ein Epitop von dem Antigen bindet und ein Enzym-konjugierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper bindet. Als Enzym wird in diesem Fall Peroxidase verwendet. Mithilfe des Enzyms kann die immunologische Reaktion sichtbar gemacht werden.

Zunächst müssen die Gewebsschnitte auf den OT entparaffiniert werden. Dazu werden sie für 20 Minuten in eine Küvette mit Xylol gelegt und danach kurz in einer zweiten Küvette mit Xylol geschwenkt. Zur Rehydrierung werden die OT in eine absteigende Alkoholreihe mit zweimal je 100% Ethanol, 97% Ethanol und anschließend destilliertem Wasser für jeweils ca. 3-4 Minuten gegeben.

Um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren, werden die OT für 10 Minuten in ein Gemisch aus 3%iger Wasserstoffperoxid und PBS-Lösung gegeben. Dadurch wird das Risiko von falsch-positiven Reaktionen verringert.

Anschließend werden die OT dreimal für je 5 Minuten mit Tris NaCl gespült.

Der Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,6 besteht aus Trishydroxymethylaminomethan, gelöst in destilliertem Wasser und Hydrochlorid. Er dient der endgültigen Ablösung von Bestandteilen wie Paraffin oder Wasserstoffperoxid von den OT.

Durch die Fixierung mit Formalin, direkt nach der Organentnahme wurden die Schnitte maskiert. Dadurch können die Antigene nicht mehr von den spezifischen Antikörpern erkannt und gebunden werden. Die Demaskierung

erfolgt in diesem Versuch mit einem Dampfschnellkochtopf und Citratpuffer. Letzteres bindet störende Calcium-Ionen in den Gewebeschnitten. Der Vorgang der Demaskierung im Dampfschnellkochtopf dauert ca. 30 Minuten. Danach werden die Schnitte für 5 Minuten mit einem Tris-NaCl-Puffer gespült. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, werden die OT für 25 Minuten mit 30%igem Goat-Serum benetzt.

Es werden pro Gewebsschnitt ca. 200µl der verdünnten Primärantikörper-Lösung auf die Schnitte gegeben (s. Tabelle 2). Zur Verdünnung wird eine DAKO Antikörper Lösung benutzt. Je höher die Verdünnung, desto weniger unspezifische Hintergrundfärbung wird erzeugt.

In diesem Versuch wurden folgende Primärantikörper eingesetzt:

- CD4 FA Genetex (Maus-anti-Ratte CD4 Antiserum)
- CD8a FA Exbio (Maus-anti-Ratte CD8a Antiserum)
- CD68 FA Genetex (Maus-anti-Ratte CD68 Antiserum)
- Kollagen I FA Cedarlane (Kaninchen-anti-Ratte Kollagen I)
- Kollagen III FA Cedarlane (Kaninchen-anti-Ratte Kollagen III)
- Kollagen IV FA Cedarlane (Kaninchen-anti-Ratte Kollagen IV)

Zum Einwirken der Primärantikörper inkubieren die Schnitte über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C. Die Feuchtigkeit dient als Schutz, damit die Schnitte nicht austrocknen.

Am nächsten Tag werden die OT dreimal für je 5 Minuten mit Tris-NaCl-Puffer gewaschen. Danach wird pro Schnitt 200µl der verdünnten Sekundärantikörperlösung auf die OT gegeben. Diesmal werden die Antikörper mit dem Tris-NaCl-Puffer verdünnt.

Als Sekundärantikörper werden zum einen Peroxidase-conjugated Rabbit anti-Mouse IgG für die Primärantikörper CD4, CD8a und CD68 genommen, und zum anderen Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG für die Primärantikörper Kollagen I, III, IV. Die OT inkubieren bei Raumtemperatur für 60 Minuten in einer trockenen, abgedunkelten Kammer. Die Schnitte werden erneut dreimal für je 5 Minuten mit Tris-NaCl-Puffer gewaschen und mit je 2 Tropfen DAB-Lösung benetzt. Diaminobenzidin ist ein farbloses Chromogen, das durch das Enzym

Peroxidase in einen Farbkomplex umgewandelt wird und folglich der Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion dient. In diesem Fall wird die Reaktion braun dargestellt.

Nach erneutem Waschen mit Tris-NaCl-Puffer für 5 Minuten und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser, erfolgt die Kernfärbung mit Hämalaun-Lösung nach Mayer für 1 Minute. Danach werden die OT für 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt.

Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser werden die Schnitte zum Entwässern in eine aufsteigende Alkoholreihe gegeben, bestehend aus je zweimal 96% und 100% Alkohol. In der jeweils zweiten Küvette bleiben die Schnitte für ca. 2 Minuten stehen. Dann werden sie in einer Küvette mit Xylol geschwenkt und in einer zweiten Küvette mit Xylol für ca. 10 Minuten stehen gelassen. Es folgt das Eindecken mit Entellan und die mikroskopische Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion.

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Studie verwendeten Primärantikörper

Maus-anti-Ratte	Seriennummer	Firma	Verdünnung
CD4	GTX76103-250	Genetex	1:100
CD8a	EXB-11-678-C100	Exbio	1:200
CD68	Genetex	Genetex	1:300

Kaninchen-anti-Ratte	Seriennummer	Firma	Verdünnung
Kollagen I	CED-CL50141AP-1	Cedarlane	1:500
Kollagen III	CED-CL50341AP-1	Cedarlane	1:500
Kollagen IV	CED-CL50441AP-1	Cedarlane	1:500

5. Ergebnisse

5.1 Makroskopische Auswertung

5.1.1 Wachstum der Tiere

Die Tiere entwickelten während der sechs Wochen postoperativer Nachbeobachtung eine physiologische Körpergewichtskurve ohne Auffälligkeiten (s. Abb.5).

Das Operationsgewicht zu Beginn der Studie schwankte zwischen 147 – 176 g und im Durchschnitt wogen die Tiere am Tag der Implantation ca. 162 g. Am Tag der Explantation wogen die Tiere 379 – 530 g und durchschnittlich ca. 450 g. Die Diskrepanz der Körpergewichte von den gleichaltrigen Ratten entsteht durch individuelles Fress- und Trinkverhalten und liegt im Rahmen des normalen Schwankungsbereichs.

Ein Versuchstier (Tier II 2) wurde am zweiten Tag post-OP auf Grund einer Nahtinsuffizienz mit Entwicklung einer Vier-Quadranten-Peritonitis von der Studie ausgeschlossen. Bei den anderen 15 Versuchstieren zeigten sich während des gesamten Beobachtungszeitraums keine Auffälligkeiten oder Komplikationen, wie zum Beispiel Infektionszeichen, Narbenhernien oder Wundheilungsstörungen.

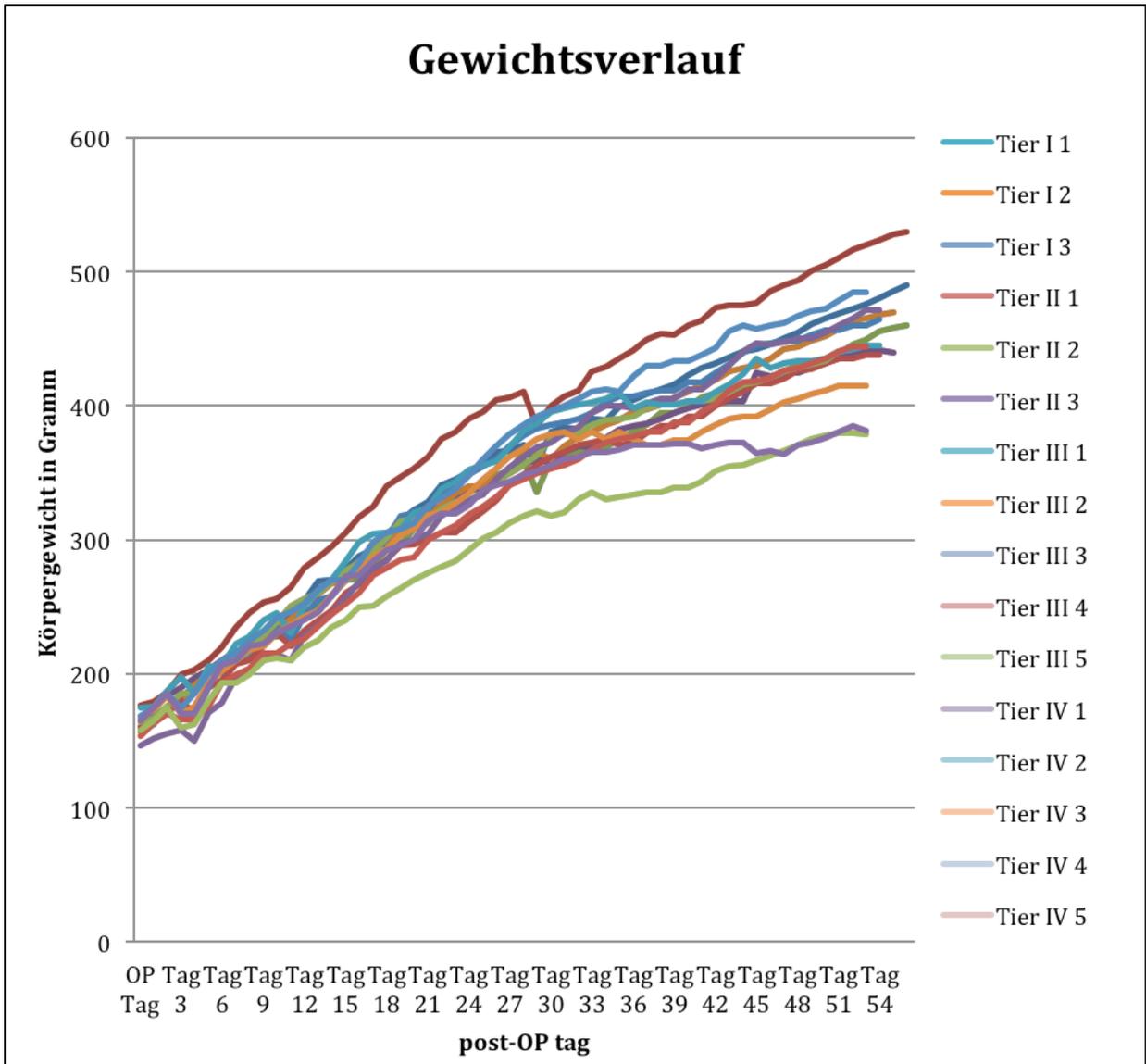


Abb. 5: Gewichtsverlauf der Versuchstiere in dieser Studie

5.1.2 Implantatzustand bei Explantation

Bei der makroskopischen Betrachtung der operierten Harnblasen zum Zeitpunkt der Explantation, erschienen die Narben aller 15 Versuchstiere reizlos und ohne Zeichen einer Entzündung (s. Abb. 7).



Abb. 6: Narkotisiertes Versuchstier zur Explantation der Harnblase

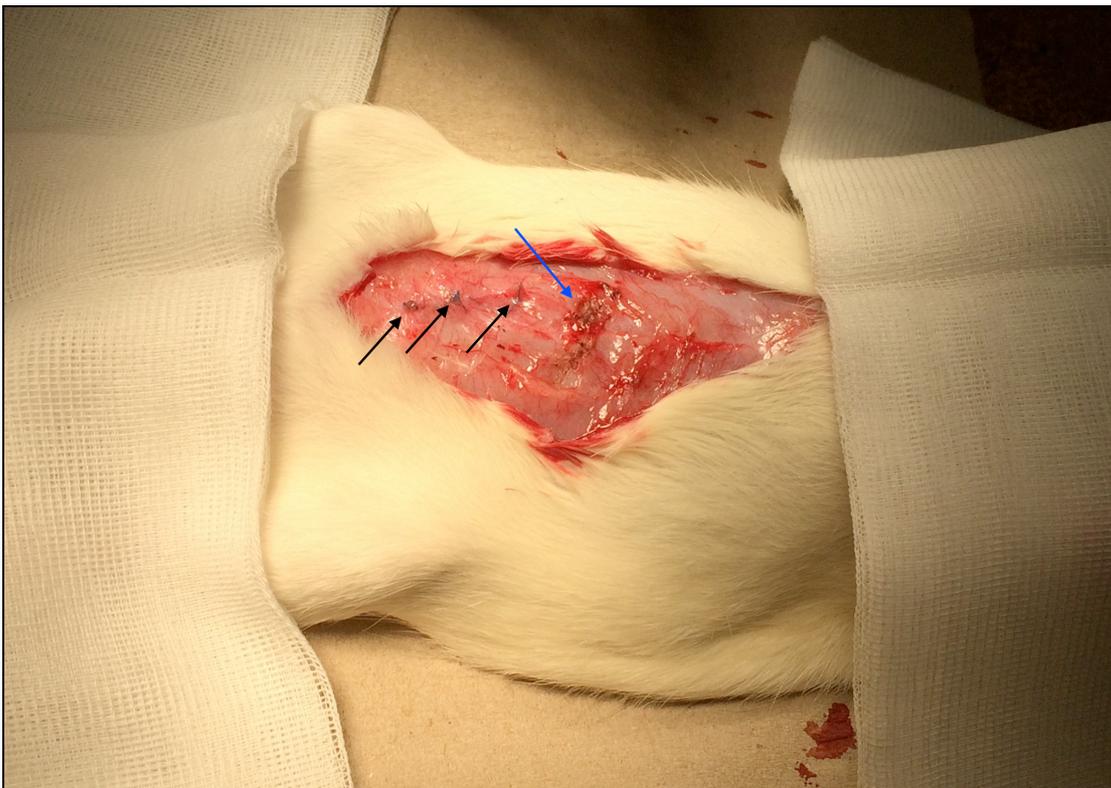


Abb. 7: Reizlose Operationsnarbe (schwarze Pfeile zeigen auf das Nahtmaterial von der Implantation, blauer Pfeil zeigt auf eine koagulierte Stelle zur Blutstillung)

Es waren keine makroskopischen Auffälligkeiten an Harnblasen und umliegenden Organen sichtbar, wie zum Beispiel Narbenhernien (s. Abb. 8).

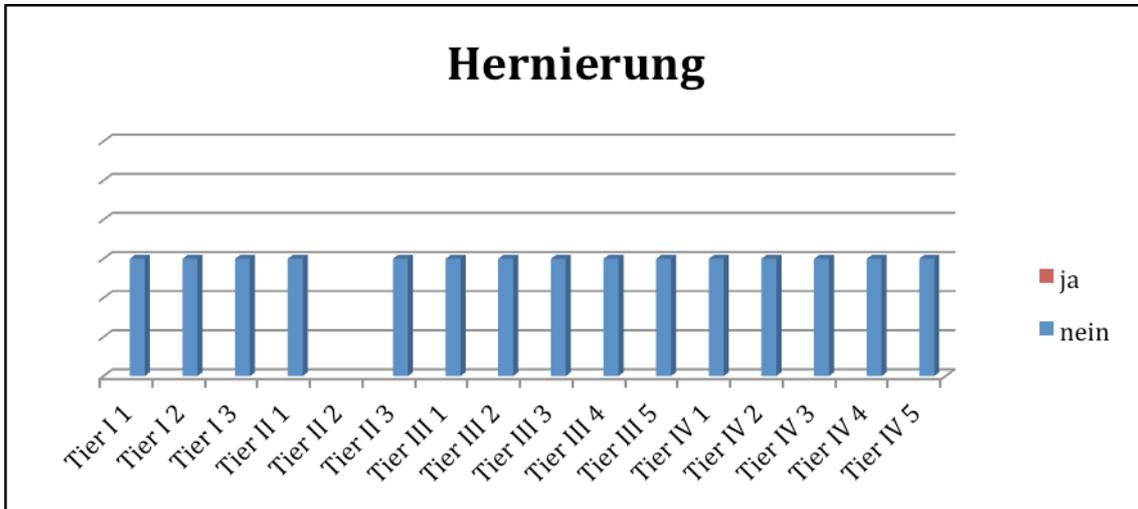


Abb. 8: Narbenhernien der Versuchstiere

Die Bewertung der Adhäsionen in Grad 0-3 (s.o.) ergab einige interindividuelle Unterschiede bei den Tieren, die graphisch in Tabelle 5 und Abb. 9 dargestellt wurden.

Bei ca. einem Drittel der Versuchstiere waren keine Zeichen von Verwachsungen (Adhäsion Grad 0) zu sehen. Bei den restlichen zwei Dritteln (9/15) wurden minimale Verwachsungen (Adhäsionen Grad 1) festgestellt und in einem Versuchstier waren stärkere Adhäsionen zwischen Harnblase und Darm ausgeprägt (Adhäsionen Grad 2) (s. Abb.13).

Tabelle 5: Ergebnisse der Adhäsionsbestimmung

Adhäsion Grad 0	33,3% (5/15 Versuchstieren)
Adhäsion Grad 1	60% (9/15 Versuchstieren)
Adhäsion Grad 2	6,7% (1/15 Versuchstieren)
Adhäsion Grad 3	0% (0/15 Versuchstieren)

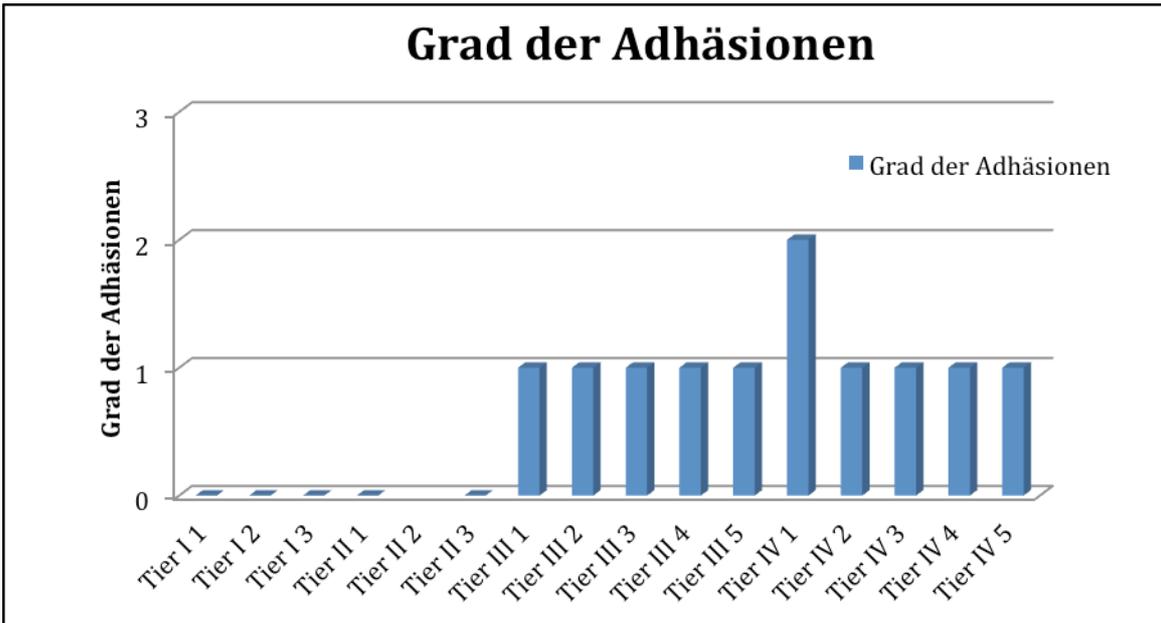


Abb. 9: Adhäsionsgrade der Versuchstiere

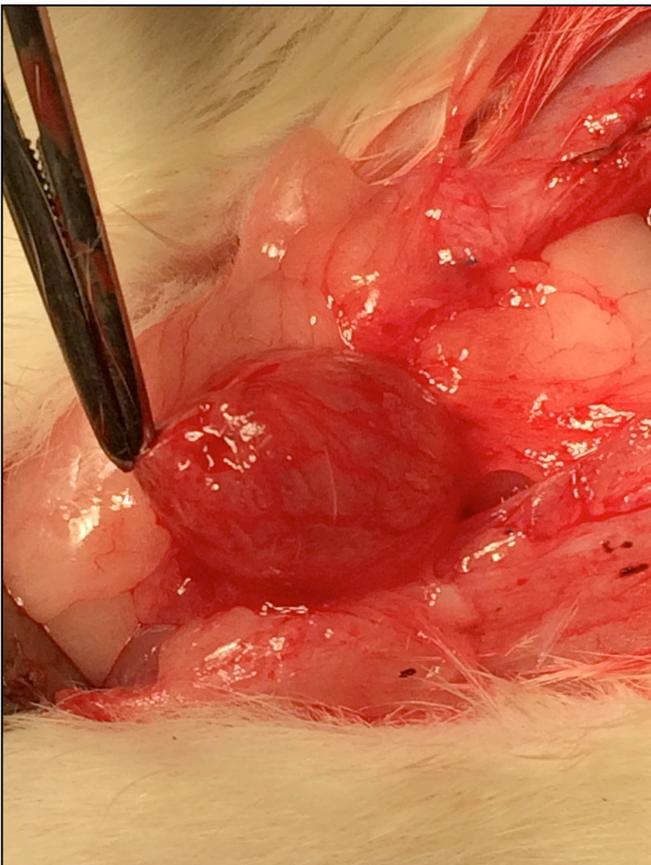


Abb. 10: Explantierte Harnblase mit Adhäsion Grad 0, Lyoplast® ist makroskopisch nicht sichtbar

Bei der Bewertung der Implantatsichtbarkeit fiel auf, dass bei 33,3% (5/15) Lyoplast[®] noch gut sichtbar war, bei 20% (3/15) waren nur noch geringe Anteile des Kollagen-Netzes zu sehen und bei 46,7% (7/15) waren nur noch die nicht-resorbierbaren Prolene-Nähte, aber kein Anteil vom Implantat zu sehen (s. Abb. 11).

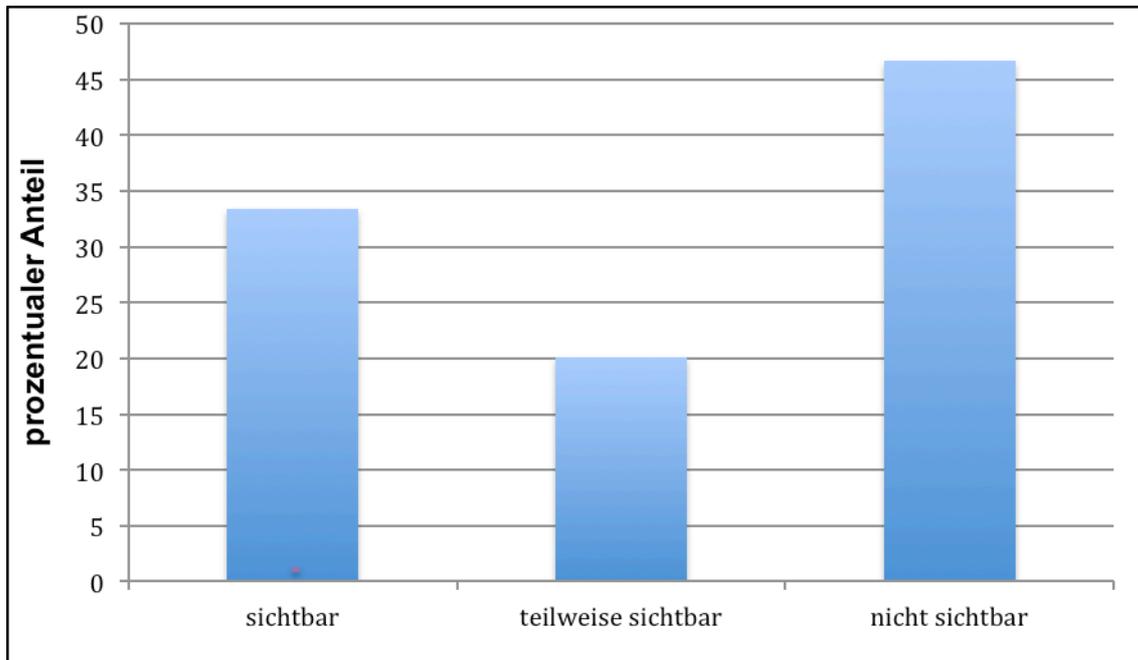


Abb. 11: Vergleich der makroskopischen Sichtbarkeit der Implantate

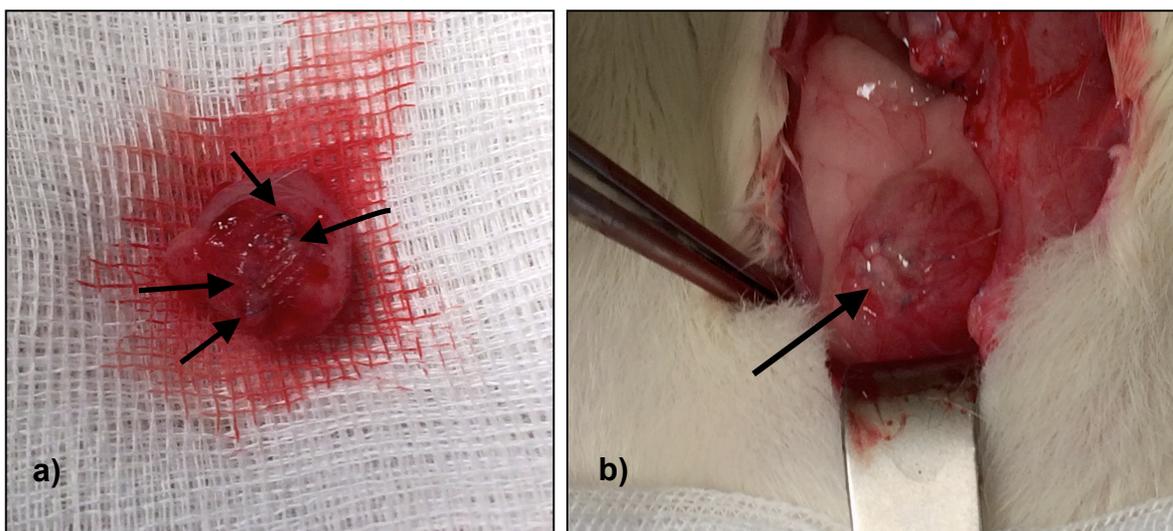


Abb. 12: Makroskopische Sichtbarkeit der Kollagen-Netz-Implantate (schwarze Pfeile zeigen auf das Nahtmaterial)

a) makroskopisch kein sichtbares Kollagen-Netz

b) makroskopisch sichtbares Kollagen-Netz

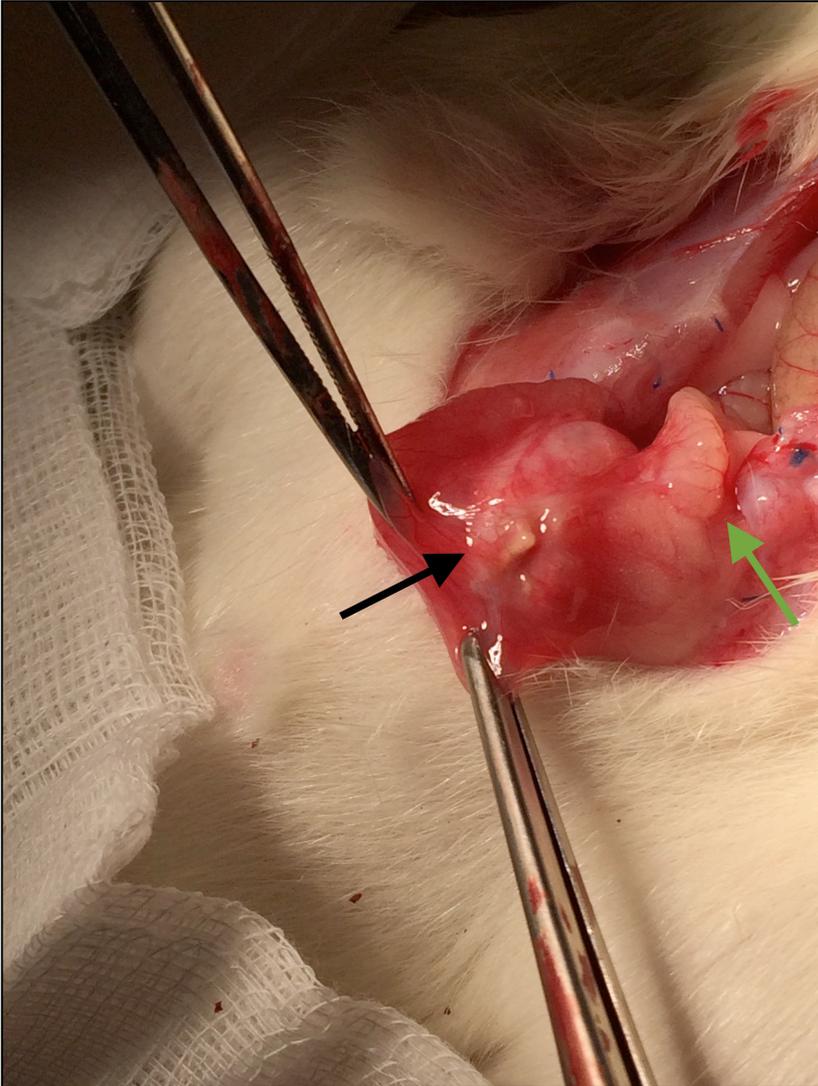


Abb. 13: Explantierte Harnblase mit Adhäsion zum Darm (grüner Pfeil) und makroskopisch sichtbarem Kollagen-Netz (schwarzer Pfeil)

Bei den drei Versuchstieren, die makroskopisch nur noch Anteile von dem Kollagen-Netz zeigten, waren viele Gefäßzeichnungen, im Sinne einer Neovaskularisation zu sehen (s. Abb. 14).

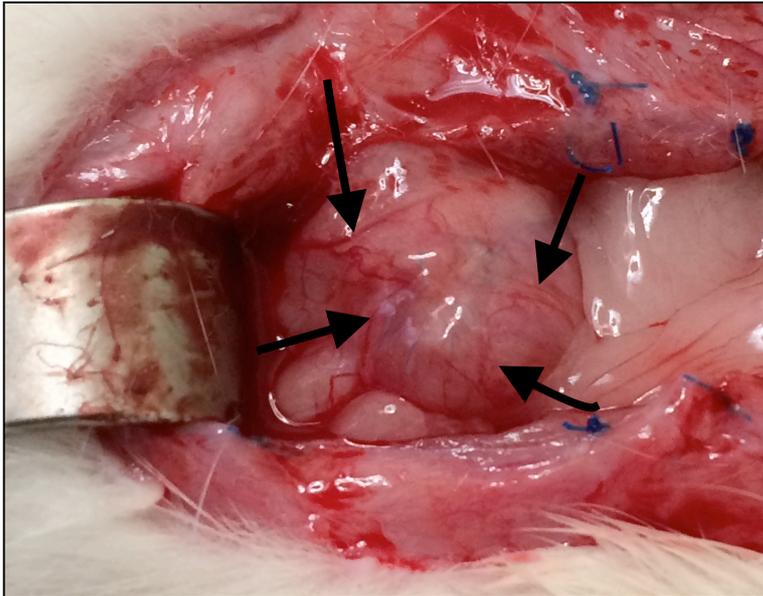


Abb. 14: Harnblase im Situs mit Gefäßzeichnungen (schwarze Pfeile) in das nur noch z.T. sichtbare Implantat-Netz

5.2 Mikroskopische Auswertung

Das Gewebe wurde in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom geschnitten. Nach Auftragen der Gewebeprobe auf Objektträger, konnten die histologischen und immunhistologischen Färbungen durchgeführt werden (s.o.). Anschließend wurden die Schnitte von zwei unabhängigen Untersuchern an einem Olympus BX-50-Mikroskop ausgewertet.

5.2.1 Histologische Beurteilung

Entlang des Harnblasenlumens zeigte sich in der HE-Färbung eine Dunkelfärbung durch größere Zellansammlungen bzw. in Masson-Trichrom-Goldner-Färbung eine rote Zellschicht, im Sinne einer Epithelialisierung (s. Abb.15 und Abb.16).

Da die Paraffinschnitte ca. 2µm dünn geschnitten wurden und sich Narbengewebe schwierig schneiden lässt, brachen z.T. Gewebsabschnitte ab. Somit waren auf einigen Bildern zerrissene Wandstrukturen abgebildet (s. Abb. 15).

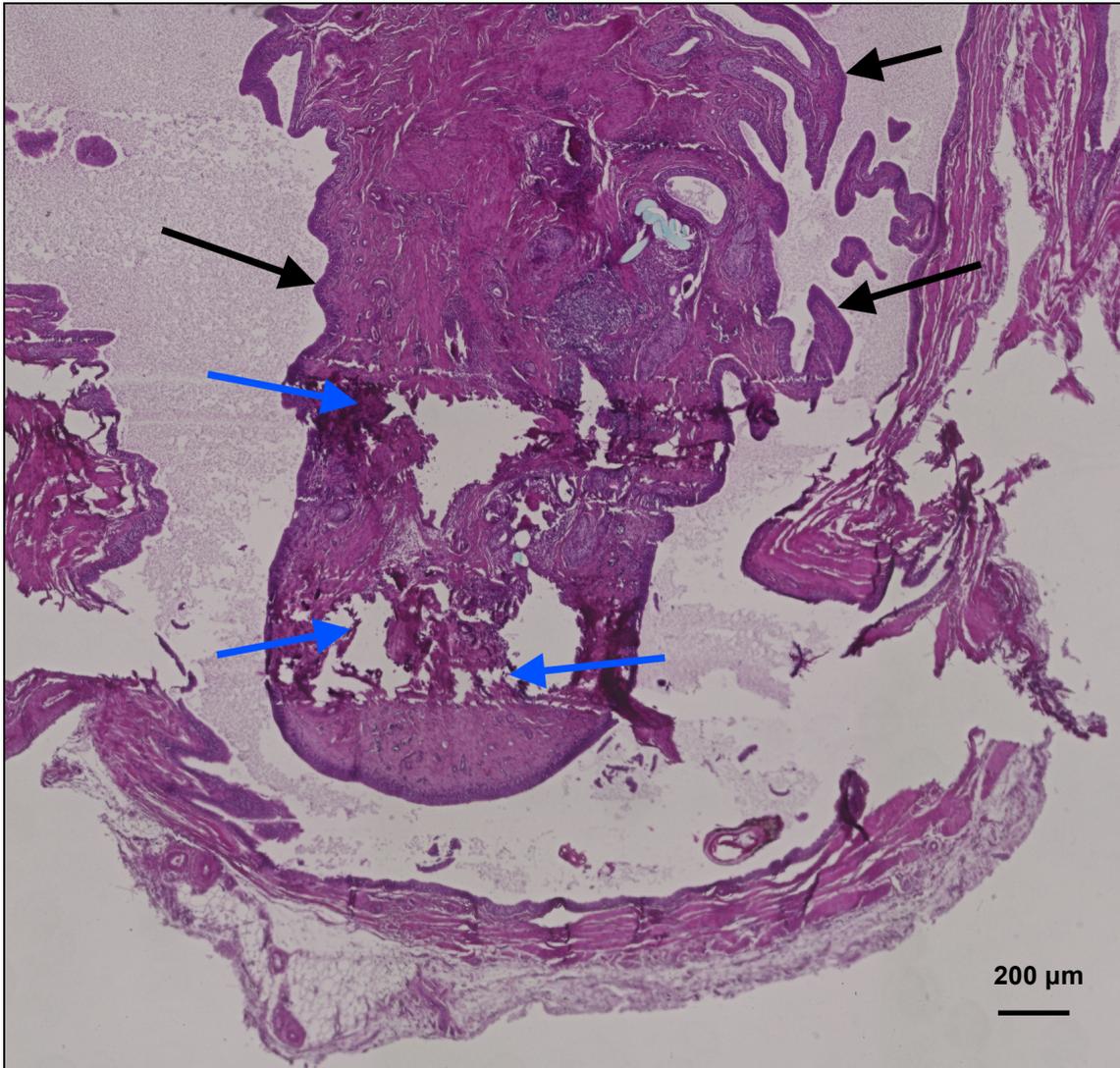


Abb. 15: Ausschnitt aus einem Präparatbild in HE-Färbung (Vergrößerung x50) mit Epithelialisierung (schwarzen Pfeile) und zerrissenen Wandstrukturen (blaue Pfeile)

In den nicht-operierten Wandabschnitten schloss sich an das Epithel eine breite Schicht aus Muskulatur, dem M. detrusor vesicae, und dann die Serosa an (s. Abb.16).

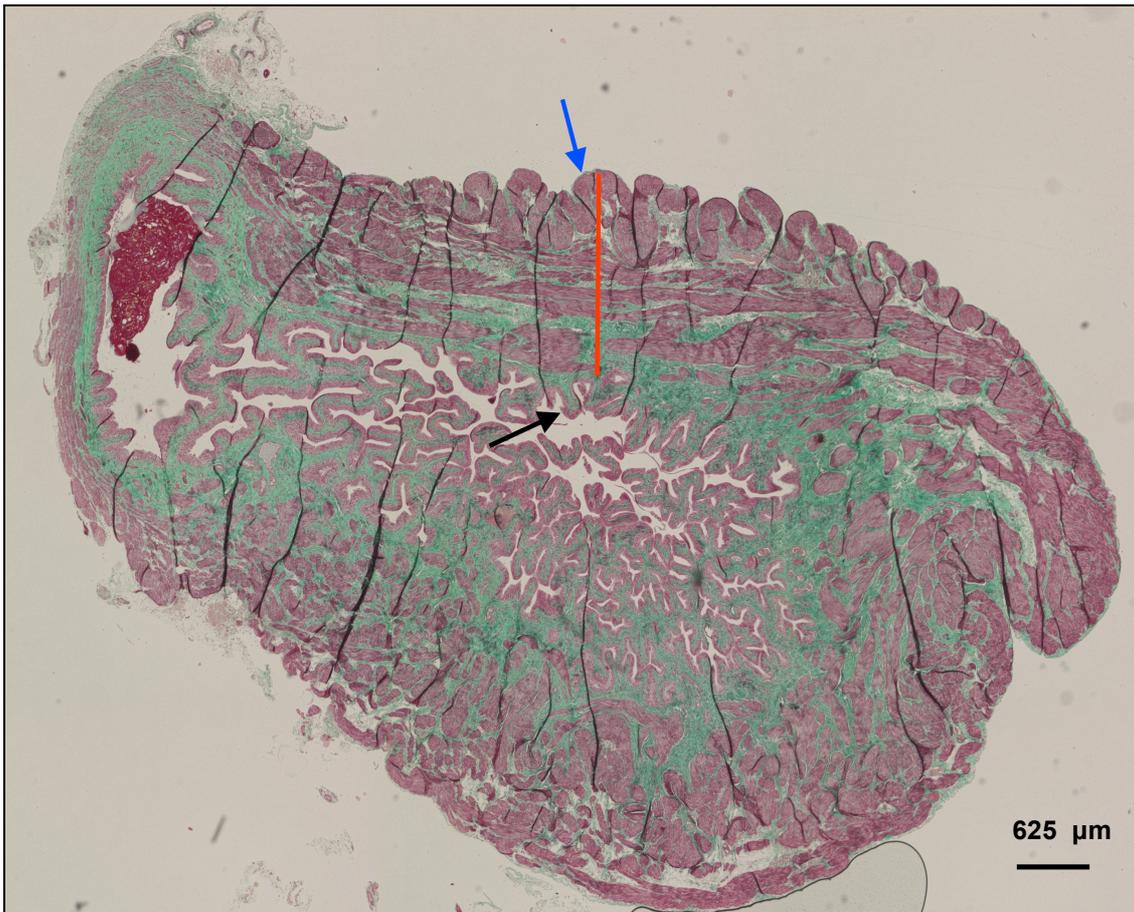


Abb. 16: Kontrollschnitt der Harnblase ohne Implantat in Masson-Trichrom-Goldner-Färbung (Vergrößerung x16) (Schwarzer Pfeil zeigt auf die rote Auskleidung des Lumens mit Epithel, rote Linie markiert den Bereich der Muskulatur, blauer Pfeil zeigt auf die grüne Schicht Tunica serosa)

In den Wandbereichen, in denen das Implantat eingesetzt wurde, ging die Muskulatur der unbehandelten Harnblasenwand in eine breite Schicht aus Bindegewebe über (s. Abb.17). Das Bindegewebe ersetzte somit die Muskulatur in diesen Wandabschnitten.

In der Übergangszone beider Gewebearten waren viele kleinere Gefäße zu erkennen, die sich neu gebildet haben. Dieser Prozess der Neovaskularisation ist in Abbildungen 17, 18 und 19 dargestellt.

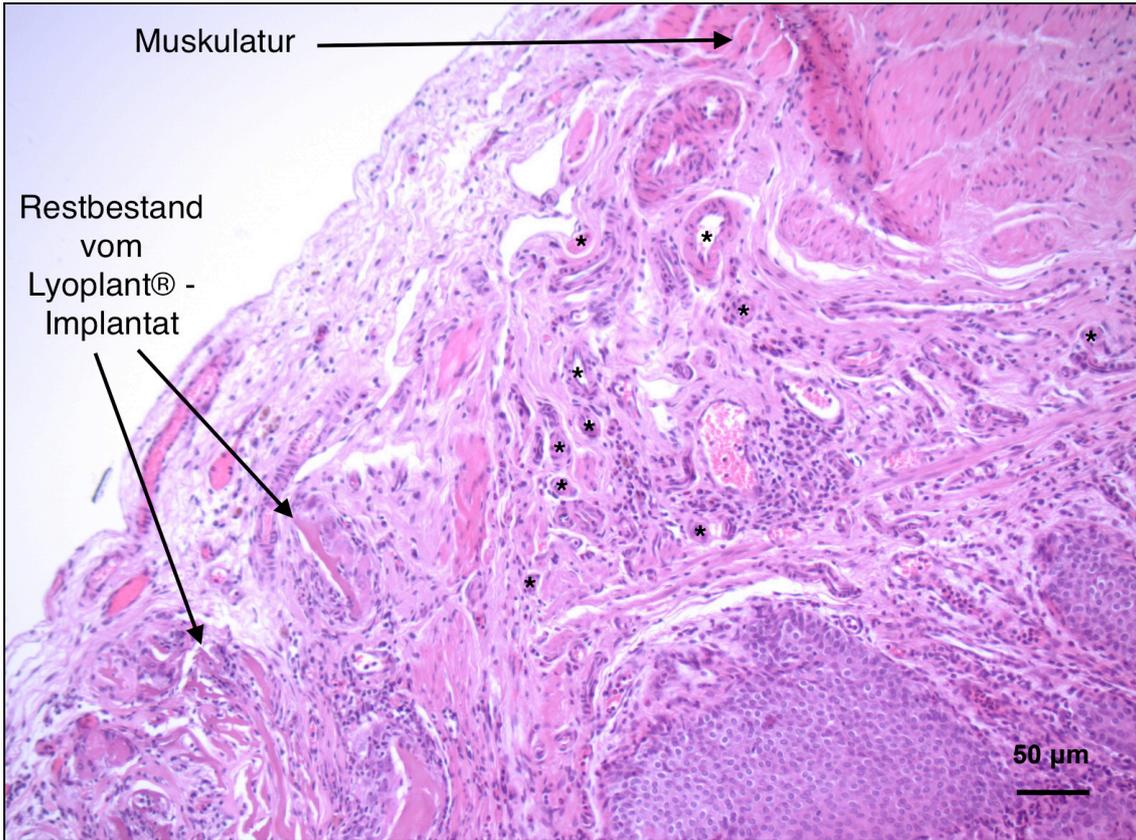


Abb. 17: Übergangsbereich von unbehandelter Harnblasenwand mit Muskulatur zu einem Wandbereichen mit Lyoplast®-Implantat. Mit Sternchen (*) ist eine Auswahl an Gefäßen zwischen den beiden Wandbereichen markiert, im Sinne einer Neovaskularisation (Vergrößerung x200)



Abb. 18: Neovaskularisation in einem Präparats-Ausschnitt, schwarze Pfeile zeigen auf neu gebildete Gefäße (Goldner-Färbung, Vergrößerung x100)

Bei starker Vergrößerung des Übergangsbereichs von Abbildung 17 war zu erkennen, dass nicht viele Entzündungszellen, wie zum Beispiel Makrophagen in Form von Histiozyten und neutrophilen Granulozyten, über die Gefäße in das OP-Gebiet eingewandert sind (s. Abb. 19).

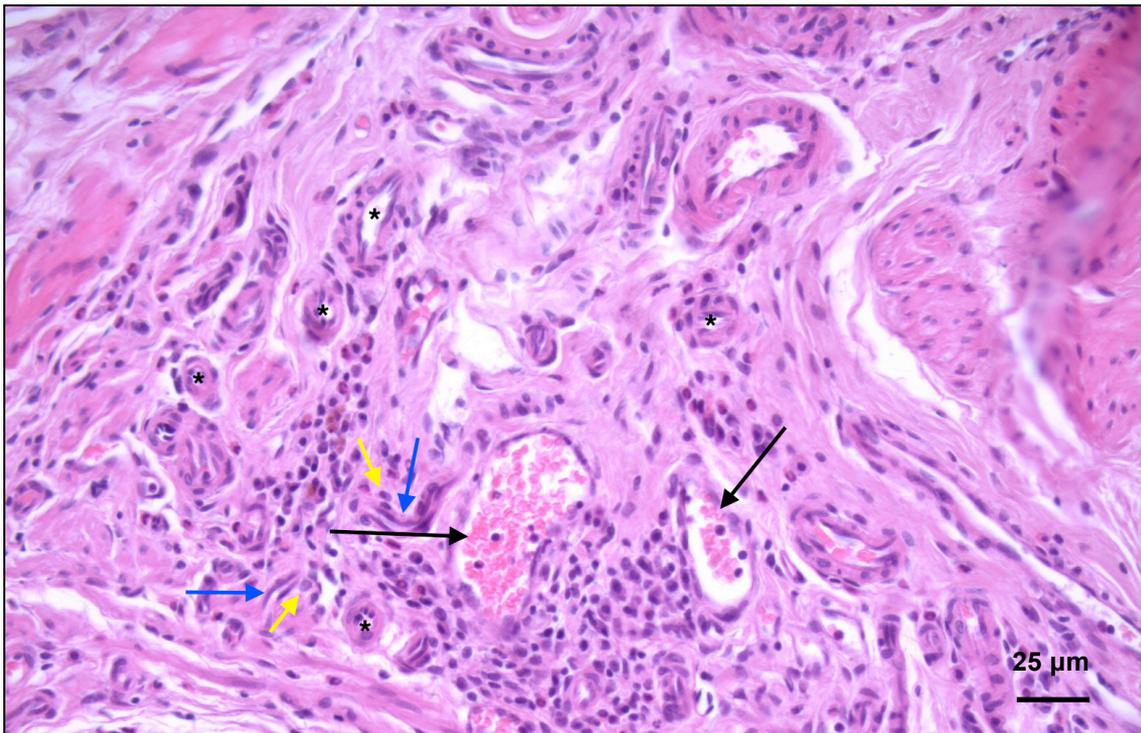


Abb. 19: Vergrößerung (x400) der HE-Färbung von dem Bereich der Neovaskularisation in Abbildung 17 (Sternchen: neu gebildete kleine Gefäße, schwarze Pfeile: Gefäße mit Entzündungszellen, gelbe Pfeile: Fibroblasten, blaue Pfeile: Fibrozyten)

Zwischen den Gefäßen waren große, runde Zellkerne auffindbar, die als Fibroblasten identifiziert wurden und direkt neben einigen ovalen langgestreckten Zellkernen lagen, die Fibrozyten repräsentierten. Diese Zellen stellten die Hauptbestandteile des Bindegewebes dar.

Die leichten Entzündungsreaktionen, die durch Einbringen von Fremdmaterial begründet wurden, erzeugten Kalzifikationen, die den Schwierigkeitsgrad des Schneidens von den Präparaten erhöhten und folglich zum Zerreißen von Gewebematerial führten.

Da sich in dieser Studie die Kalzifikationen vor allem um das nichtresorbierbare Nahtmaterial bildeten, kam es hauptsächlich an diesen Stellen zu zerrissenen Wandstrukturen (s. Abb.20).

Da Lyoplant[®] zum Zeitpunkt der Explantation weitestgehend in Bindegewebe umgewandelt war, imponierte das Implantat auf den Schnitten nicht mehr als

Fremdmaterial. Es waren nur noch vereinzelte Reste des Implantats zu sehen (s. Abb. 17).

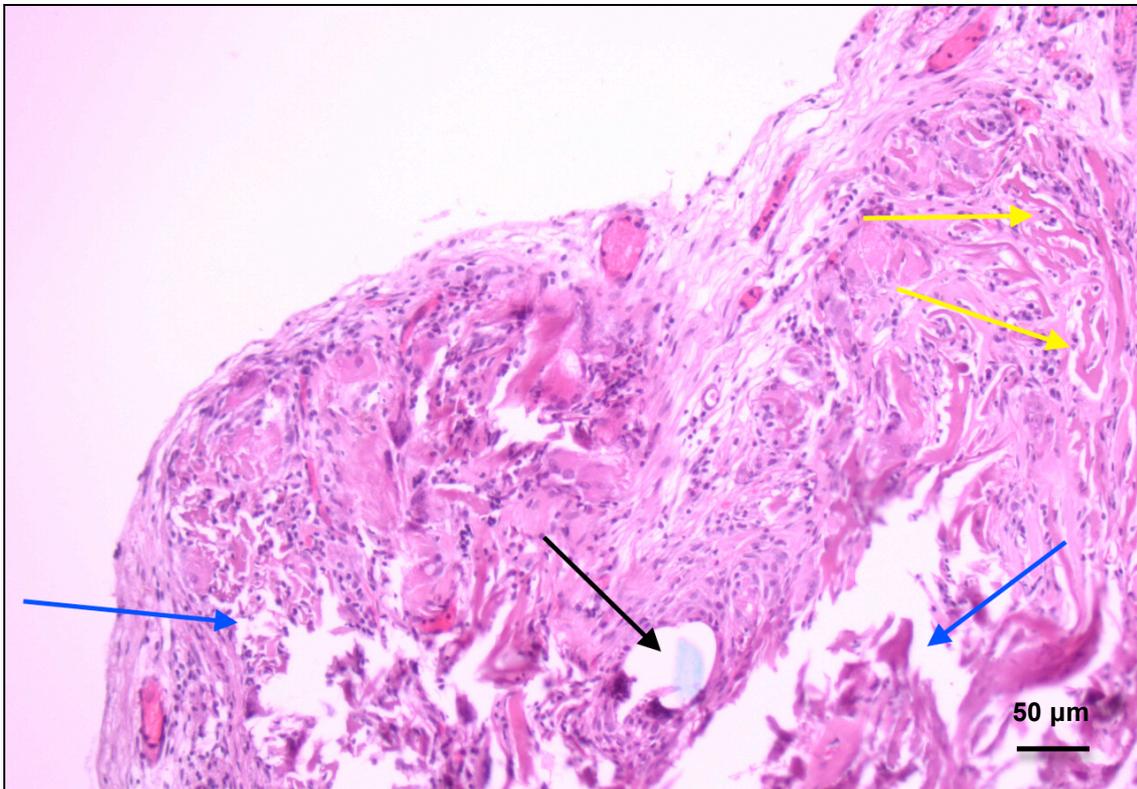


Abb. 20: Fremdgewebsreaktion um Nahtmaterial (Vergrößerung x200) (schwarzer Pfeil: Nahtmaterial, blauer Pfeil: zerrissene Wandstrukturen, gelbe Pfeile: Lyoplast[®]-Implantat)

Da mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial gearbeitet wurde, waren die Nähte in den histologischen Schnitten noch deutlich sichtbar und lösten eine Ansammlung von Makrophagen aus (s. Abb. 21).

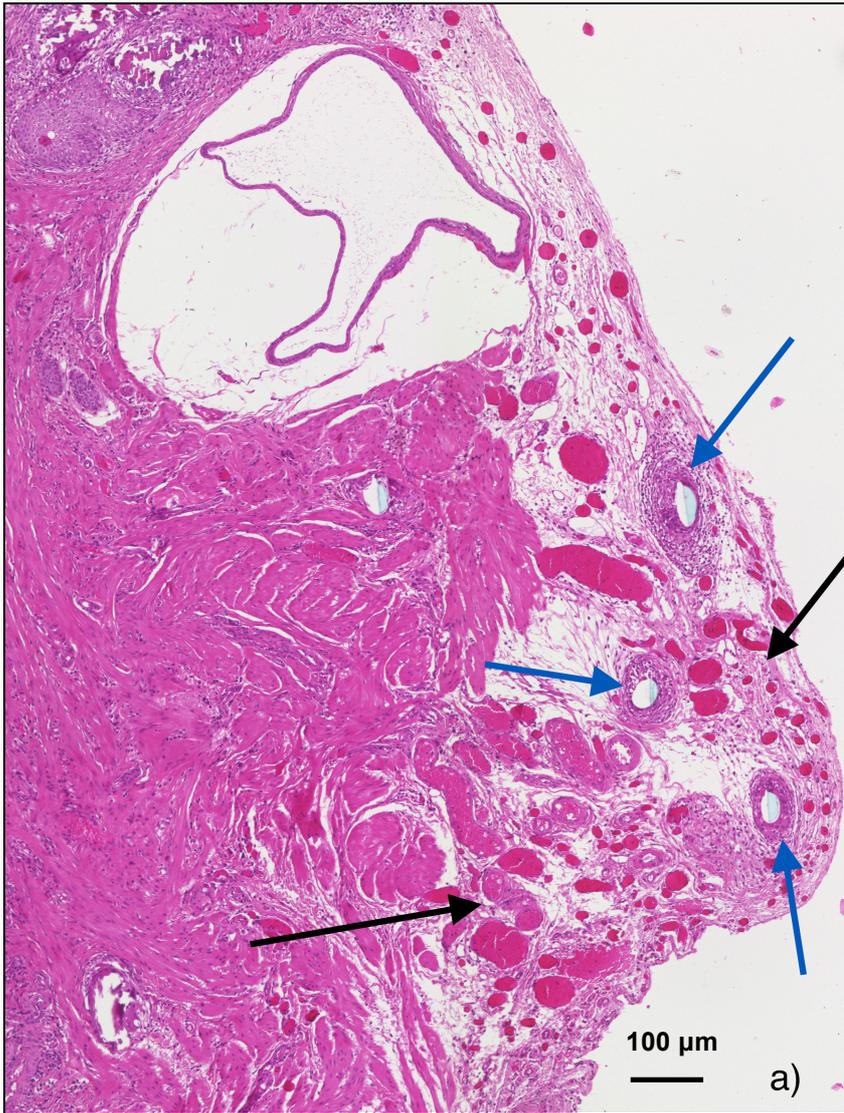
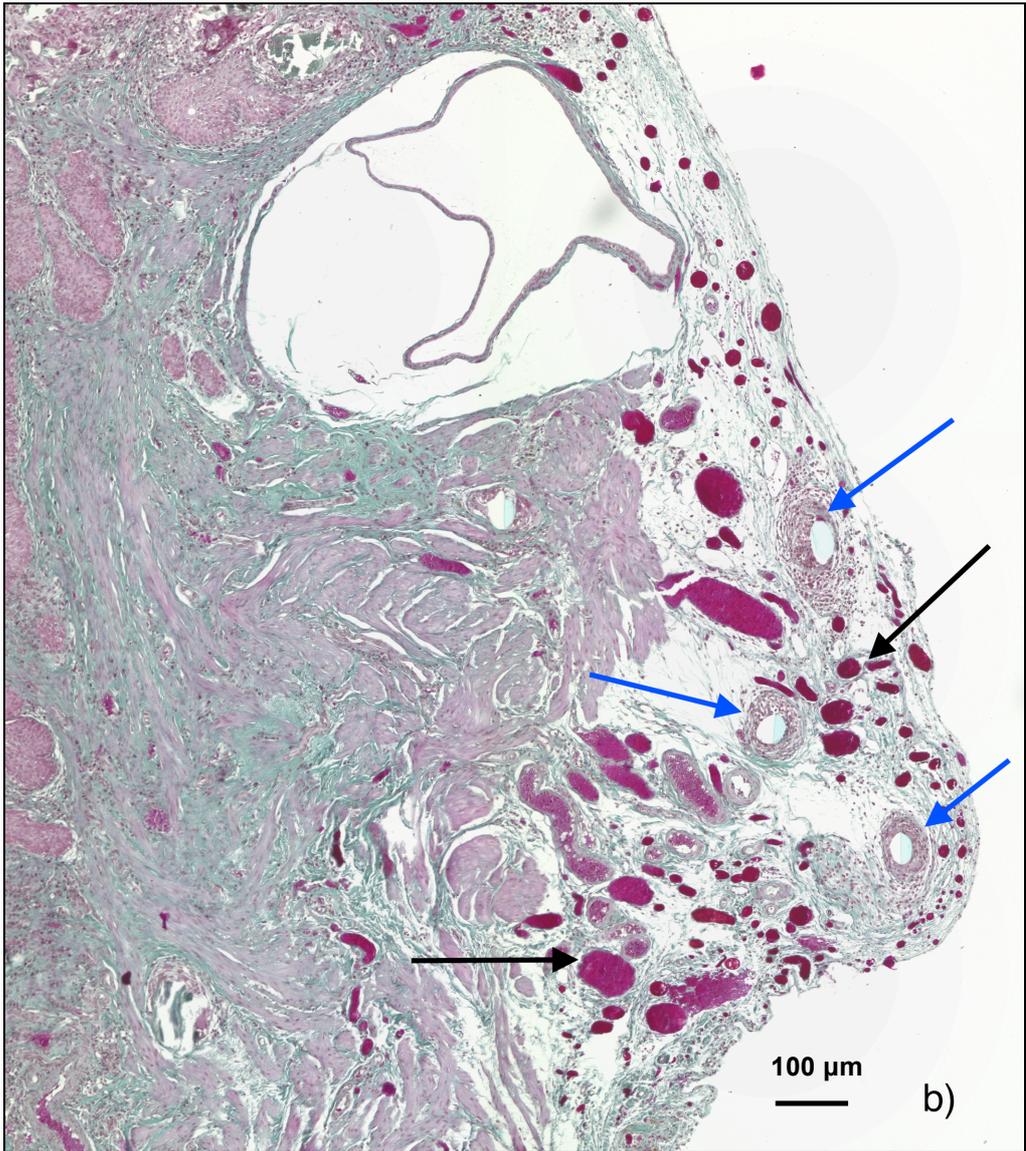


Abb. 21: Neovaskularisation (schwarze Pfeile) und Ansammlungen von Makrophagen (blaue Pfeile) um Nahtmaterial im Vergleich
a) HE-Färbung (Vergrößerung x100)



und b) Masson-Trichrom-Goldner-Färbung (Vergrößerung x100)

In Abbildung 22 sind die histologischen Auswertungen der einzelnen Schnitten im Detail aufgezeichnet. Dabei bezieht sich die Zellinfiltration auf das Ausmaß der Entzündungsreaktion, die Vaskularisation beschreibt die Formation von neuen Gefäßen und der Remodelling-Vorgang wird durch die Epithelialisierung und die aufgebaute Kollagenmenge beurteilt.

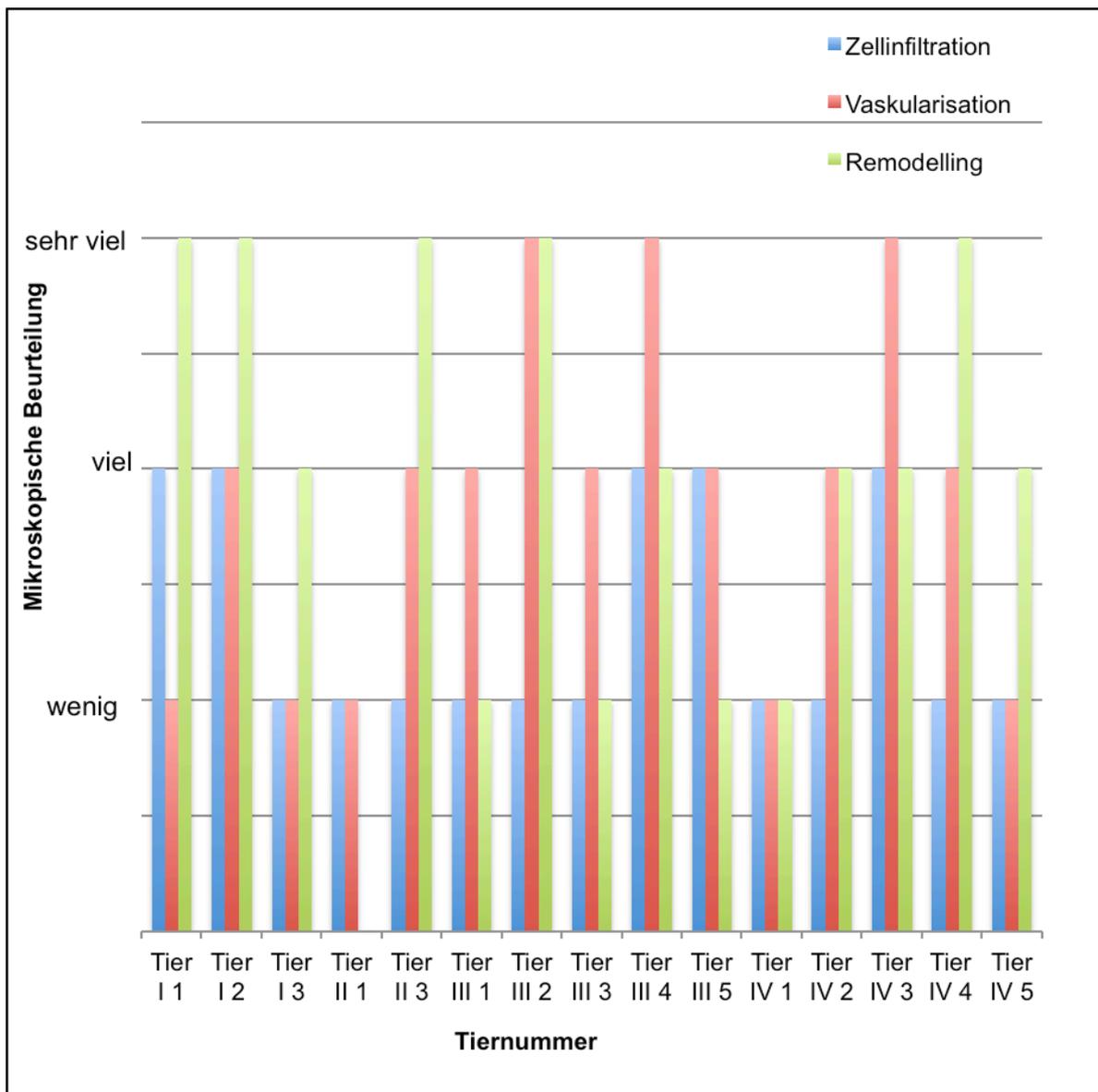


Abb.22: Übersicht der histologischen Auswertung von den Paraffinschnitten

5.2.2 Immunhistologische Beurteilung

Die immunhistologisch gefärbten Präparate zeigten nur mäßige Infiltrationen von CD4- und CD8a-positiven Zellen, die hauptsächlich um Blutgefäße, im Bereich der Neovaskularisation lokalisiert waren (s. Abb. 23).

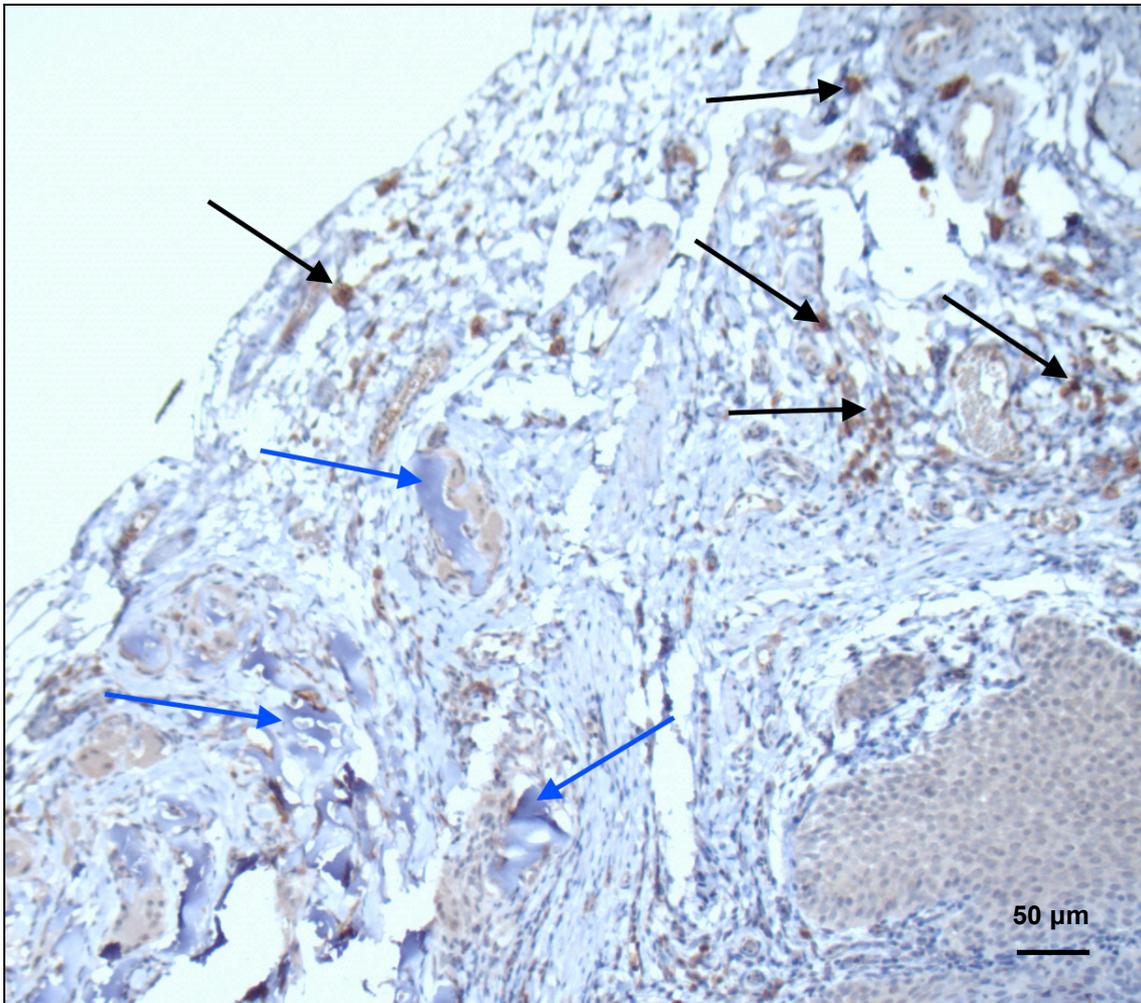


Abb. 23: Leichte CD4-positive Reaktion im Bereich der Neovaskularisation (schwarze Pfeile zeigen auf CD4positive T-Helferzellen, blaue Pfeile zeigen auf Lyoplast[®]-Implantate) (Vergrößerung x200)

Viele CD68-positive Zellen, die Oberflächenmarker von Makrophagen, konzentrierten sich primär um das Nahtmaterial (s. Abb. 24 und 25).

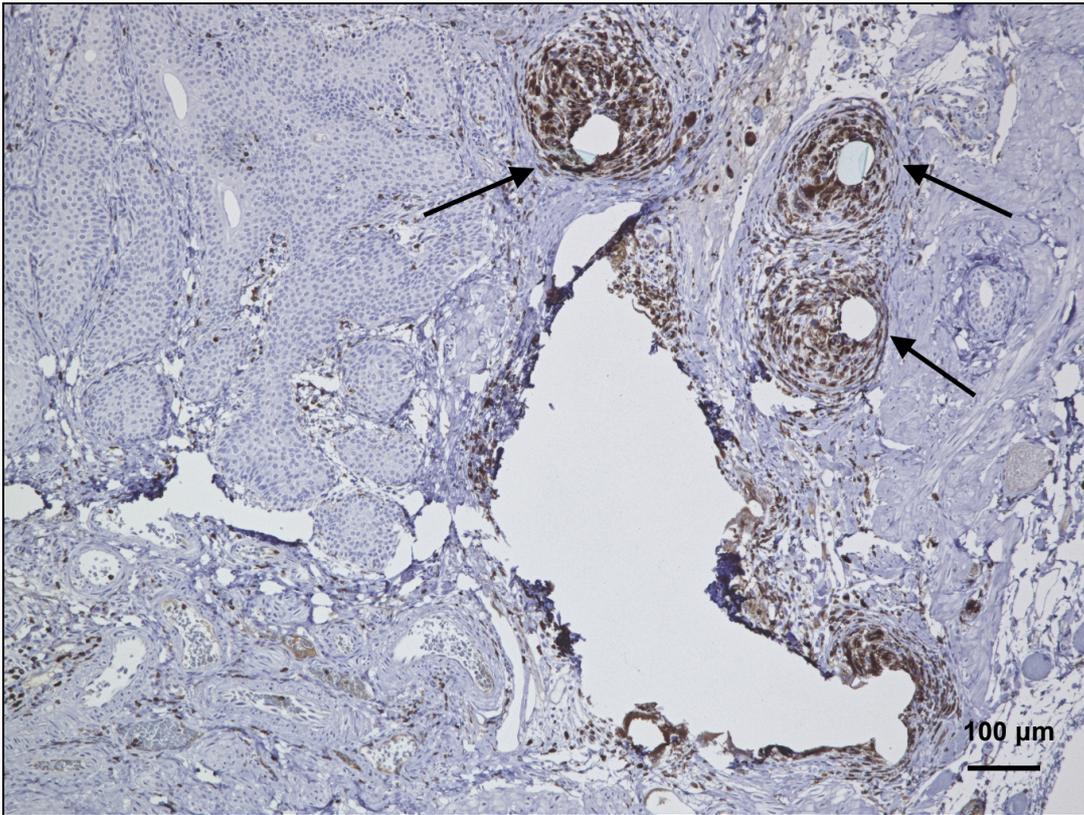


Abb. 24: Verstärkte Reaktion von CD68-positiven Zellen um das Nahtmaterial (schwarze Pfeile) (Vergrößerung x100)

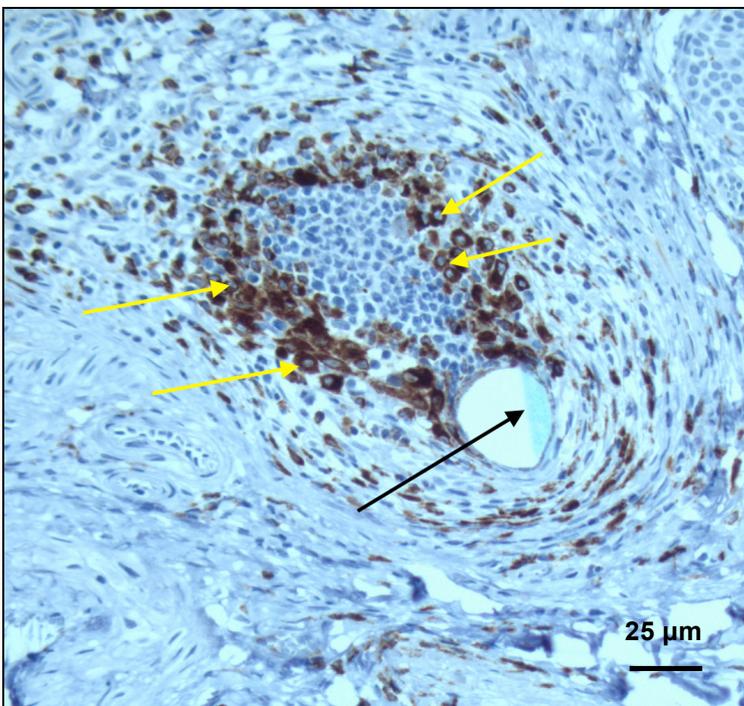


Abb. 25: Makrophagenansammlung (gelbe Pfeile) um Nahtmaterial (schwarzer Pfeil) (Vergrößerung x400)

Die Reaktion der Zellen von Kollagen III und IV gefärbten Antikörpern war sehr gering bis zu nicht nachweisbar und beschränkte sich weitestgehend auf das Endothel der Gefäße (s. Abb. 26).

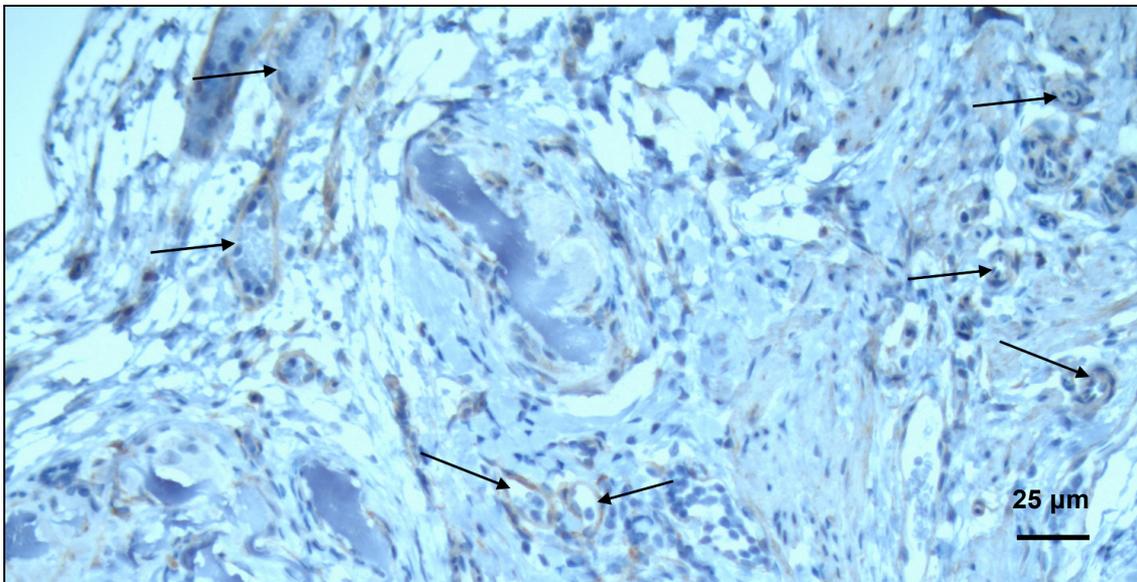


Abb. 26: Kollagen IV-positive Endothelzellen der Gefäße (schwarze Pfeile)
(Vergrößerung x400)

Die stärkste immunhistologische Reaktion zeigte sich gegenüber Kollagen I, mit vielen diffus verteilten Zellen (s. Abb. 27).

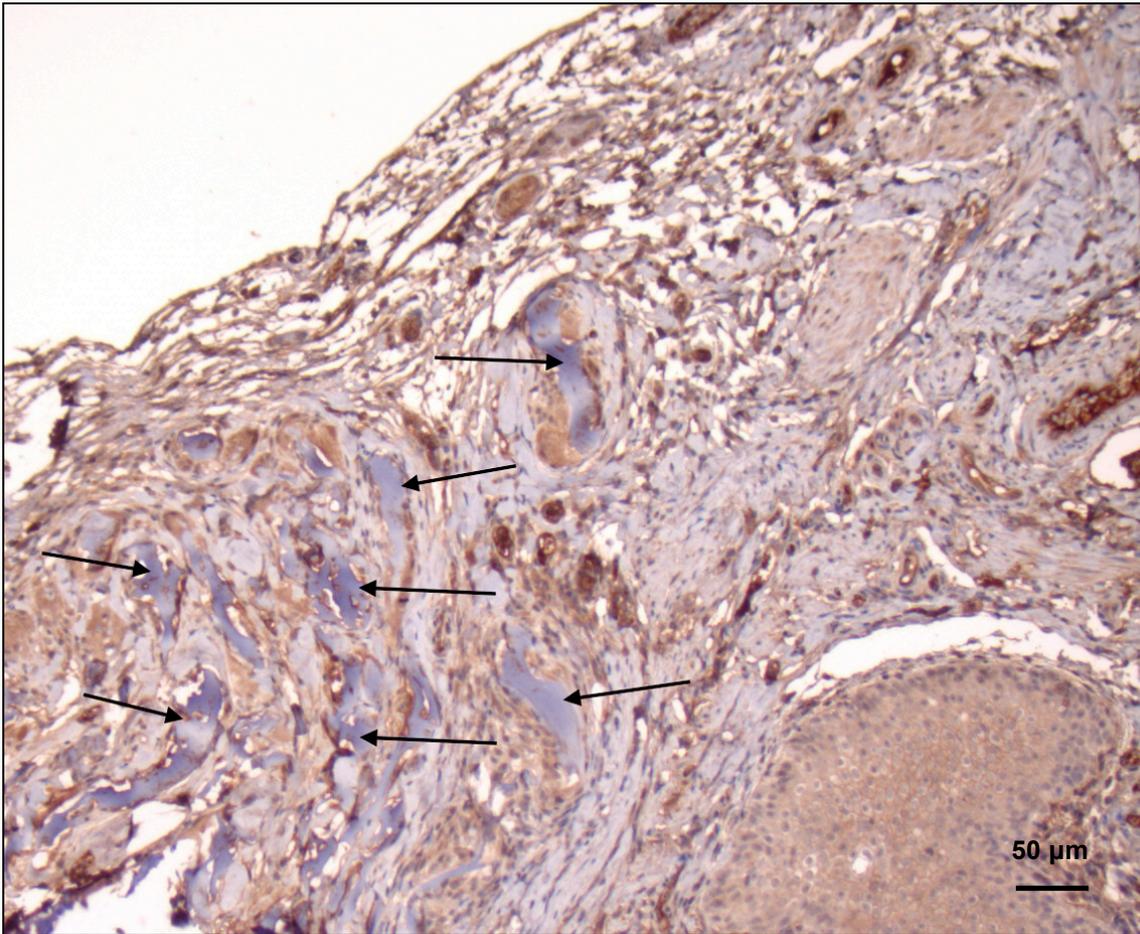


Abb. 27: Starke diffuse Reaktion von Antikörper gegen Kollagen I-positive Zellen (Vergrößerung x200) (schwarze Pfeile zeigen auf Reste vom Lyoplast[®]-Implantat)

6. Diskussion

Die Therapie von kongenitalen Urogenitaldefekten, wie zum Beispiel des Ekstrophie-Epispadie-Komplexes, stellt eine große Herausforderung für die behandelnden Ärzte dar [24, 45].

Der aktuelle Therapiestandard ist ein frühzeitiger Blasen- und Bauchwandverschluss postpartal, mit nachfolgender Epispadiekorrektur im Alter von 6-12 Monaten und einer Blasenhsrekonstruktion mit 5-6 Lebensjahren, um eine adäquate Kontinenz zu gewähren [18]. Es sind häufig multiple Rekonstruktionsoperationen erforderlich und wenn der erste Versuch einer Blasenhsrekonstruktion nicht gelingt, bzw. die Harnblase eine geringe Kapazität oder Compliance aufweist, ist eine Entercystoplastie mit ggf. kontinenter Harnableitung notwendig [19]. Durch die Benutzung von Darmsegmenten zur Vergrößerung der Harnblase bzw. zur Harnableitung können zahlreiche Komplikationen entstehen, zum Beispiel Narbenhernien, Blasensteine, Stomaprolaps, Stomastenosen, Vitamin B12-Mangel, maligne Entartungen [31, 46]. Studien haben ergeben, dass ein Misserfolg des ersten Harnblasenverschlusses, die Harnblasenkapazität auf 60% vermindert und durch einen zweiten Misserfolg bereits auf 40%, sodass nach zwei erfolglosen Blasenhsrekonstruktionen, die Wahrscheinlichkeit auf Harnkontinenz nur ca. 20% beträgt [47].

Wirtschaftlich entstehen hohe Kosten durch einen ersten operativen Misserfolg, da die Patienten erneut operiert werden müssen, die Komplikationsrate erhöht ist und die Krankenhausliegezeit deutlich verlängert wird. In einer Studie von Hesh et al. werden die Kosten von erfolgreichen Erstoperationen mit den Kosten von nicht erfolgreichen Erstoperation bei Patienten mit Blasenexstrophien verglichen. Das Ergebnis war ein Anstieg von \$ 9000 allein durch die stationäre Krankenhausbehandlung und eine erhöhte Ausgabe von ca. \$ 11000 für OP-Kosten und damit einhergehende Dienstleistungen [48].

Um diese Komplikationen zu umgehen und einen Harnblasenersatz ohne Nutzung von autologem Material zu ermöglichen, wird in Zeiten des Tissue

Engineerings nach Möglichkeiten gesucht, die Harnblase mit xenogenem Material zu ersetzen bzw. zu vergrößern.

Lam Van Ba et al. hat in einer retrospektiven Studie biologische und synthetische Biomaterialien als Blasenersatz verglichen. Diese zeigt, dass bislang noch kein ideales Biomaterial, das allen Anforderungen gerecht wird, existiert [49].

Ayyildiz et al. testeten eine azelluläre Kollagenmatrix aus Schweinehaut (Pelvicol[®], C.R. Bard, Karlsruhe) als Blasenaugmentat in Kaninchen. Das Material wurde bisher bei vaginalem Prolaps, Stressinkontinenz und Induration penis plastica (Peyronie-Krankheit) eingesetzt. Es ist ein nicht-allergisches, azelluläres Biomaterial und resistent gegenüber Kollagenasen. Innerhalb der Studie wurde es dann jedoch als für eine Blasenaugmentation untauglich befunden, da sich Mikrokalzifikationen, ein Blasenabszess und folglich eine Urinleakage bildeten. Außerdem kam es zu einer minimalen Materialkontraktion, die wiederum zu einer verminderten Blasenkapazität führen kann [29, 50].

In einer Tierstudie mit Kaninchen erzielte das Material SIS (small intestine submucosa) gute Ergebnisse als Blasenimplantat. SIS ist ein azelluläres Kollagenmesh aus Schweinedarm, das die Neubildung von Gefäßen und den Remodelling-Prozess unterstützt. Es regenerierte funktionelles Blasengewebe und verursachte im Langzeitergebnis von 24 Wochen keine Komplikationen [51]. In einer klinischen Studie von Schaefer et al. wurde SIS in die Harnblase von sechs Patienten implantiert [28, 52]. Die histologischen Untersuchungsergebnisse der klinischen Studie ergaben, dass SIS sich innerhalb von durchschnittlich 24,4 Monaten komplett in das umliegende Gewebe umwandelte. Jedoch entwickelten zwei Patienten Harnblasensteine und ein Patient erlitt eine Harnblasenruptur. Somit sollte SIS in der Klinik nicht als Harnblasenaugmentat eingesetzt werden [28].

Ziel dieser Studie ist es, Lyoplast[®] als Implantat in einem Kleintiermodell als geeignetes xenogenes Biomaterial zur Harnblasenaugmentation zu testen.

In dem Kleintiermodell mit Ratten kam es während der sechs Wochen Beobachtungszeit zu keinen Komplikationen bzw. Auffälligkeiten, wie Narbenhernien, Infektionszeichen oder Wundheilungsstörungen. Die Tiere wiesen eine physiologische Gewichtskurve auf und waren klinisch unauffällig. Lediglich ein Tier musste auf Grund einer Nahtinsuffizienz mit resultierender Vier-Quadranten-Peritonitis von der Versuchsreihe ausgeschlossen werden. Es ist davon auszugehen, dass diese Komplikation aus einem technischen Fehler bei der Implantation des Materials resultierte, da bei keinem der anderen Versuchstiere eine Nahtinsuffizienz aufgetreten war.

Lyoplant[®] hat durch seine Eigenschaft als azelluläre Biomatrix den Vorteil, dass es nicht einem konstanten enzymatischen Abbauprozess unterliegt, sondern im Zuge eines Remodelling-Prozesses in umliegendes Gewebe umorganisiert wird. Das neu gebildete Narbengewebe besteht aus Epithel und Bindegewebe. Die Implantatmatrix dient als Gerüst und strukturelle Unterstützung für die Gewebezellen und dem Zellwachstum während der Wundheilung [38, 53]. Durch die mikroporöse Struktur und der losen Kollagenfaserstruktur wird ein schnelles Einwachsen der Zellen ermöglicht [36]. Folglich war das Implantat in unserer Studie nur noch in einem Drittel der Versuchstiere gut sichtbar, in zwei Drittel der Tiere war es fast komplett bzw. komplett resorbiert und durch Bindegewebe ersetzt, sodass nur noch die nicht-resorbierbaren Prolene-Nähte sichtbar waren. Dadurch ist der Körper nicht lange einem Fremdmaterial ausgesetzt. Das Risiko für mögliche Komplikationen wie Infektionen und notwendige Folgeoperationen kann erheblich reduziert werden.

Verschiedene Biomaterialien, unter anderem auch Lyoplant[®], wurden in einer Studie von Wünsch et al. *in vitro* mit Urothelzellen besiedelt und hinsichtlich ihrer Interaktion mit dem Urothel, sowie ihrer mechanischen Stabilität untersucht [35]. Die Studie ergab, dass synthetische Biomaterialien eine glattere Oberfläche als die azellulären Matrices aufwiesen. Obwohl alle Materialien eine andere tensiometrische Kraft im Vergleich zu nativer Blasenwand aufwiesen, zeigte die tensiometrische Messung von Lyoplant[®] ähnliche Werte wie die einer unbehandelten Harnblasenwand [35].

Meyer et al. haben mit einem Tensiometer als objektiven Indikator ebenfalls nachgewiesen, dass Lyoplast[®] in Studien über kongenitale Bauchwanddefekte eine ähnliche mechanische Stabilität wie die native Bauchwand aufweist [8-10]. Die Tatsache, dass Lyoplast[®] in den Studien von Meyer et al. weniger Adhäsionen verursachte als die beiden Vergleichsmaterialien Polypropylen (PPP) und Polytetrafluorethylen (PTFE), die jedoch in den tensiometrischen Untersuchungen höhere Werte als Lyoplast[®] erreichten, unterstützt die Hypothese, dass die beiden synthetischen Materialien eine enorme Fremdgewebsreaktion auslösten. Diese verursachte eine starke Entzündungsreaktion mit nachfolgender Fibrosierung, wodurch hohe tensiometrische Werte erzielt wurden, die die Elastizität der PPP- und PTFE-Implantate herabsetzt [8-10].

Narbgewebe kontrahiert und reduziert damit die Größe von Implantaten [54]. Die Schrumpfung von Implantaten ist bei synthetischen Materialien stärker zu erwarten als bei biogenen Materialien [10]. Somit weist Lyoplast[®] eine ausreichend hohe Materialstabilität auf, um den hohen intraabdominellen Druck und die Kraft der Nachbarstrukturen stand zu halten. Das damit einhergehend erhöhte Risiko der Entstehung von Adhäsionen zu umliegenden Organen wird in dieser Studie als gering eingestuft, da ein Drittel der Versuchstiere keine Verwachsungen bei der Explantation aufwies und sich bei den anderen zwei Drittel lediglich geringgradige Adhäsionen zeigten. Ein Versuchstier zeigte Verwachsungen der Harnblase mit dem Darm, die jedoch durch einen Operationsfehler bei der Implantation erklärt werden können. Die ausreichende Stabilität der Harnblase ist vor allem für das Krankheitsbild der Blasenektrophie wichtig, da bei Betroffenen durch eine weitere Schwachstelle der vorderen Bauchwand häufiger Komplikationen wie Blasenprolaps und Wunddehiszenz beschrieben wurden [55].

Auf Grund der Größenverhältnisse des Implantats in einer Rattenharnblase im Vergleich zur menschlichen Harnblase ist die verminderte Elastizität durch die Bildung von Narbgewebe bei Menschen weniger bedeutsam. Das gleiche trifft auf die Kalzifikationen in der Harnblase zu. In dieser Studie kam es zu kristallinen Ausfällungen, vor allem um das Nahtmaterial herum, die das weitere

Präparieren des Gewebes erschwert haben und zur Bildung von Blasensteinen führen könnten. Da das Implantat auf die Gesamtgröße der Harnblase bezogen bei Ratten größer ist als bei Menschen, würde die Kristallisation im Tiermodell zu größeren Schwierigkeiten führen als bei Menschen.

Eine Studie von Zhao et al. in der azellulären Blasenmatrizen mit dem Seidenstrukturprotein Fibroin besiedelt wurden (BAMG-SF) und in Harnblasen von Ratten implantiert wurden, zeigte, dass durch das Protein die Tendenz zur Kristallisierung reduziert wird [56].

Eine weitere positive Eigenschaft von Lyoplant[®] ist die Biokompatibilität, sodass das Material nicht vom Körper bzw. dem umliegenden Gewebe immunologisch abgestoßen wird [36].

In der Studie von Wünsch et al. hat Lyoplant[®] in vitro kaum Zellkontakte ausgebildet, sodass es als nicht geeignet interpretiert wurde [35]. Diese Ergebnisse wurden jedoch in dieser Studie widerlegt, da histologische Untersuchungen eine komplette Epithelialisierung nachwiesen, sodass Zellkontakte in vivo gebildet wurden.

Auch makroskopisch hat sich das implantierte Material gut in die native Harnblase eingefügt, da es bei der Explantation bei zwei Drittel der Versuchstiere nicht mehr oder nur noch teilweise sichtbar war. Dieser Remodelling-Prozess wird durch Neovaskularisation induziert, [10] die zu dem die Geweberegeneration durch stetige Versorgung mit Sauerstoff unterstützt. Die Gefäßneubildung ist sowohl makroskopisch, wie auch mikroskopisch zu erkennen. Die frühzeitige Neubildung von Gefäßen ist wichtig, damit es nicht zu einer hypoxiebedingten Schrumpfung des Kollagennetzes kommt [57].

Limitierende Faktoren der Studie von Wünsch et al. sind die fehlenden in vivo-Experimente, die belegen würden, dass Lyoplant[®] nach Implantation in einen Körper biokompatibel ist und Zellkontakte ausbildet.

Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass Fibroblasten über die Gefäße in das OP-Gebiet gelangen. Diese produzieren Kollagen und reifen zu ortsständigen, synthese-inaktiven Fibrozyten heran. Durch die Bildung von Zellverbänden untereinander wird ein stabiles Kollagengeflecht gebildet [58].

Somit unterstützt Lyoplast[®] die Zelldifferenzierung und die durch die Neovaskularisation geförderten regenerativen Prozesse.

Durch die Eigenschaft der Avaskularität und Azellularität ist das Biomaterial Lyoplast[®] immunologisch günstig, da es keine Abwehrreaktion des Körpers induziert [8, 59, 60]. Keines der Versuchstiere zeigte anaphylaktische Reaktionen, sodass davon auszugehen ist, dass das Implantat keine Allergien induziert.

Die immunhistologischen Untersuchungen dieser Studie zeigten, dass insgesamt nur eine schwache Entzündungsreaktion gegen das xenogene Implantat ausgelöst wurde. Diese umfasst vor allem Makrophagen (Oberflächenmarker CD68), die sich gegen das verwendete Prolene-Nahtmaterial richteten. Es wurden nicht-resorbierbare Nähte verwendet, die in den histologischen Untersuchungen eine starke Fremdkörperreaktion hervorgerufen haben. Da sich die Ansammlung von Makrophagen weitestgehend auf die Nähte beschränkte, löste das Implantat selbst keine entzündlichen Vorgänge aus. Die immunhistologische Färbung von CD4 und CD8a positiven Zellen, die eine T-lymphozytäre Reaktion repräsentieren würde, [39, 40] war nur schwach ausgeprägt. Dadurch wird die Hypothese unterstützt, dass das Lyoplast[®]-Implantat keine starke Fremdreaktion hervorgerufen hat. Kollagen I ist eines der am meisten vorkommenden Kollagen-Typen. Es ist hauptsächlich Bestandteil in der Dermis, in Sehnen und in Bändern [58]. Da dieser kollagene Typ in so vielen verschiedenen Gewebetypen verbreitet ist, kommt er auch in den Harnblasen der Versuchstiere vor und ruft folglich eine stärkere, diffuse Antikörper-Reaktion hervor. Kollagen III produzierende Zellen bilden retikuläre Fasern, die typisch für Basalmembranen sind. Kollagen IV ist ebenfalls Bestandteil von Basalmembranen [58]. Endothelzellen kleiden alle Blutgefäße aus und sind in Basalmembranen verankert [61]. Daher waren in der immunhistologischen Färbung Kollagen III und IV positive Zellen in den Zonen der Neovaskularisation zu sehen und markierten die Blutgefäße.

Allein die makroskopische Erscheinung von nur wenigen Verwachsungen zwischen Fremdmaterial und umliegenden Organen deutet daraufhin, dass das

Kollagenimplantat gut vom Körper toleriert wurde. Da in den histologischen Untersuchungen nur noch kleine Reste von Lyoplast[®] sichtbar waren, ist zu vermuten, dass sich das Kollagenetz beinahe vollständig in Bindegewebe umgewandelt hat und somit nicht mehr als Fremdmaterial dem Körper ausgesetzt war. In einem gewissen Rahmen ist eine leichte Entzündungsreaktion nach Materialimplantation physiologisch, da es zu Fremdkörperreaktionen kommt [8].

Die Studie von Meyer et al. deckte auf, dass synthetische Materialien die als Bauchwandimplantat verwendet wurden, wesentlich stärkere immunologische Abwehrreaktionen vom Körper auslösten [8-10]. Folglich benötigen Patienten nach Implantation von synthetischen Biomaterialien in der Regel eine immunsuppressive Therapie [38]. Lyoplast[®] hat den Vorteil, dass es durch „seine geringe Neigung Immunreaktionen auszulösen“ [36] eher eine Transplantatakzeptanz fördert und eine zusätzliche Immunsuppression nicht notwendig macht. Diese immunologisch günstige Reaktion wird über den T_H2-Pathway der T-Lymphozyten ausgelöst, welcher unter anderem den T_H1-Pathway unterdrückt (s.o.) [8-10].

Kritiker von xenogenen Biomaterialien merken an, dass es bei der Benutzung dieser Materialien häufig zu einer Übertragung von durch Prionen oder Viren ausgelösten Erkrankungen kommt [62]. Die Gefahr der Krankheitsübertragung beim Benutzen von Lyoplast[®]-Implantaten wurde mittels virologischer Untersuchungen ausgeschlossen [10].

Diese Studie unterstützt die Hypothese, dass Lyoplast[®] im klinischen Gebrauch der Kinderchirurgie als Blasenaugmentat geeignet ist. Vor der Anwendung im klinischen Alltag sollten erneut Tiermodelle erprobt werden, in denen unterschiedliche Implantatgrößen ausgetestet werden. Des Weiteren ist die Anwendung dieser Studie in einem Großtiermodell zu testen, um festzustellen, ob ein größerer intraabdomineller Druck im Unterbauch Probleme beim Implantat verursacht. Eine weitere Limitierung der Studie stellt die geringe Anzahl von Versuchstieren und die Verwendung von einem Untersuchungszeitraum von nur sechs Wochen dar. Dadurch ist aus dieser

Studie nicht abzuleiten, ob das Material antikanzerogen wirkt, da keine Spätfolgen untersucht werden konnten. In einer folgenden Studie könnte das Material Lyoplast[®] mit anderen Materialien, wie zum Beispiel Pelvicol[®], SIS oder synthetische Biomaterialien zur Blasenaugmentation verglichen werden. Wie in vielen Studien angemerkt wird, spielt der Wachstumsfaktor VEGF eine große Rolle in der Neovaskularisation und demnach in der Gefäßversorgung der Implantate [63-65]. Um die positiven Ergebnisse dieser Studie bzgl. der Neovaskularisation zu bestätigen, könnten Untersuchungen durchgeführt werden, in denen immunhistologisch VEGF nachgewiesen wird und mit der Menge von VEGF in anderen Materialien, die zur Blasenaugmentation benutzt werden, verglichen wird.

In folgenden Studien, die Lyoplast[®] als Blasenaugmentat testen, sollten Untersuchungen zur Harnblasenfunktion und Harnblasenkapazität erfolgen, um die jeweiligen Zustände vor und nach Materialimplantation zu vergleichen.

Schlussfolgernd erscheint das Biomaterial Lyoplast[®] zur Blasenaugmentation in der Kinderchirurgie geeignet. Durch die Verwendung von diesem Kollagenmesh zur Therapie des Ekstrophie-Epispadie-Komplexes (EEK) könnte die Anzahl an Operationen und vor allem die Komplikationsrate erheblich gesenkt werden. Die Ausgaben für OP-Kosten und stationäre Krankenhausaufenthalte würden stark reduziert werden. Die betroffenen Kinder würden frühzeitiger ihre Harnkontinenz erlangen und eine ästhetische Korrektur des mitbetroffenen äußeren Genitals wäre früher möglich. Die Lebensqualität der Betroffenen würde erheblich gesteigert werden.

7. Zusammenfassung

Blasenekstrophien sind urologische Fehlbildungen, die schwer zu therapieren sind. Derzeit wird diese Anomalie mit Operationen wie Blasen Halsrekonstruktionen oder kontinenten Harnableitungen behandelt, die in der Regel aus autologen Darmsegmenten konstruiert werden. Diese Therapie bringt zahlreiche Komplikationen mit sich.

In dieser Studie wird untersucht, ob das biokompatible Kollagennetz Lyoplast[®] (Braun, Deutschland) ein geeignetes Biomaterial zur Harnblasenaugmentation ist. Die Eignung des Materials wurde mittels der Kriterien Biokompatibilität, Resorbierbarkeit, mechanischer Stabilität, Unterstützung von regenerativen Prozessen und Zelldifferenzierung, antikanzerogene und antiallergische Eigenschaften bestimmt.

In einem Kleintiermodell, wurden 16 jungen Wistar Ratten ein 0,8 x 0,8cm großes Lyoplast[®]-Netz in die Harnblase implantiert. Die Versuchstiere wurden sechs Wochen lang gewogen und nachbeobachtet. Danach wurden die Harnblasen explantiert und mikroskopisch mit HE-, Masson-Trichrom-Goldner und immunhistologischen Färbungen (Antikörper CD4, CD8a, CD68, Kollagen I, III und IV) dargestellt.

Mit Ausnahme von einem Versuchstier, das auf Grund einer Nahtinsuffizienz eine 4-Quadranten-Peritonitis entwickelte, wurden keine Komplikationen oder Auffälligkeiten beobachtet.

Bei der Explantation war keine Hernie sichtbar und die Adhäsionen zu den umliegenden Organen wurden als geringgradig eingestuft. Bei lediglich fünf Tieren war das Lyoplast[®]-Implantat in der Harnblase noch sichtbar. Die anderen Tiere zeigten nur noch Spuren bzw. nur noch das Nahtmaterial und auffallende Gefäßeinsprossungen in das Implantat.

Die mikroskopische Betrachtung bestätigte die Neovaskularisation, ein Vorgang, der Remodeling induziert, bei dem das implantierte Kollagen-Netz resorbiert und in körpereigenes Gewebe umgewandelt wird. Histologisch zeigten sich eine Epithelialisierung und die Bildung von Bindegewebe in den restlichen Wandschichten. Das Implantat förderte die Zelldifferenzierung und

regenerative Prozesse. Die Präparate wiesen nur wenige Makrophagen und neutrophile Granulozyten und sehr günstige immunologische Eigenschaften auf, da die untersuchten Antikörper nur geringfügig reagierten. Am stärksten reagierten die Antikörper CD68, ein Marker der Makrophagen, gegen das nichtresorbierbare Nahtmaterial und Antikörper Kollagen I diffus. Die immunologische Reaktion wirkt über den T_H2-Pathway und fördert eine Transplantatakzeptanz.

Zusammenfassend erfüllt das biokompatible Kollagen-Netz Lyoplast[®] (B.Braun, Deutschland) alle erforderlichen Kriterien, die beim urothelialen Tissue Engineering an Biomaterialien gestellt werden. Es ist ein gut verträgliches Material und zur Blasenaugmentation in Kleintiermodellen geeignet.

In wie fern es im klinischen Alltag zur Behandlung von Patienten mit Blasenektrophien eingesetzt werden kann, muss in weiteren Studien mit Großtiermodellen und klinischen Studien getestet werden.

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Assoziierte Fehlbildungen bei Patienten mit kloakaler Ekstrophie [4]	7
Tabelle 2: Anforderungen an Biomaterialien als Harnblasenaugmentat [9, 37, 38]	12
Tabelle 3: Einteilung der Adhäsionsgrade	18
Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Studie verwendeten Primärantikörper	22
Tabelle 5: Ergebnisse der Adhäsionsbestimmung	26

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung einer Blasenektrophie [16]	4
Abbildung 2: Entstehung einer kloakalen Blasenektrophie [17]	4
Abbildung 3: Neugeborenes mit Blasenektrophie	5
Abbildung 4: Lyoplast [®] [36]	14
Abbildung 5: Gewichtsverlauf der Versuchstiere in dieser Studie	24
Abbildung 6: Narkotisiertes Versuchstier zur Explantation der Harnblase	25
Abbildung 7: Reizlose Operationsnarbe	25
Abbildung 8: Narbenhernien der Versuchstiere	26
Abbildung 9: Adhäsionsgrade der Versuchstiere	27
Abbildung 10: Explantierte Harnblase mit Adhäsion Grad 0	27
Abbildung 11: Vergleich der makroskopischen Sichtbarkeit der Implantate	28
Abbildung 12: Makroskopische Sichtbarkeit der Kollagen-Netz-Implantate	
a) makroskopisch kein sichtbares Kollagen-Netz	28
b) makroskopisch sichtbares Kollagen-Netz	29
Abbildung 13: Explantierte Harnblase mit Adhäsion zum Darm und	
makroskopisch sichtbarem Kollagen-Netz	29
Abbildung 14: Harnblase im Situs mit Gefäßzeichnungen in das nur noch z.T.	
sichtbare Implantat-Netz	30
Abbildung 15: Ausschnitt aus einem Präparatbild in HE-Färbung mit	
Epithelialisierung und zerrissenen Wandstrukturen (x4)	31
Abbildung 16: Kontrollschnitt der Harnblase ohne Implantat in Masson-	
Trichrom-Goldner-Färbung (x4)	32
Abbildung 17: Übergangsbereich von unbehandelter Harnblasenwand mit	
Muskulatur zu einem Wandbereich mit Lyoplast [®] -Implantat (x10)	33
Abbildung 18: Neovaskularisation in einem Präparats-Ausschnitt (x10)	34
Abbildung 19: Vergrößerung der HE-Färbung von dem Bereich der	
Neovaskularisation in Abbildung 12 (x20)	35
Abbildung 20: Fremdgewebsreaktion um Nahtmaterial (x10)	36
Abbildung 21: Neovaskularisation und Ansammlungen von Makrophagen um	
Nahtmaterial (x10)	
a) in HE-Färbung	37

b) in Masson-Trichrom-Goldner-Färbung	38
Abbildung 22: Übersicht der histologischen Auswertung von den Paraffinschnitten	39
Abbildung 23: Leichte CD4-positive Reaktion im Bereich der Neovaskularisation (x10)	40
Abbildung 24: Verstärkte Reaktion von CD68-positiven Zellen um das Nahtmaterial (x10)	41
Abbildung 25: Makrophagenansammlung um Nahtmaterial (x20)	41
Abbildung 26: Kollagen IV-positive Endothelzellen der Gefäße (x20)	42
Abbildung 27: Starke diffuse Reaktion von Antikörpern gegen Kollagen I-positive Zellen (x10)	43

10. Literaturverzeichnis

1. Queisser-Luft, A. and J. Spranger, *Fehlbildungen bei Neugeborenen*. Deutsches Ärzteblatt, 2006. **103**(38): p. 2464-2471.
2. Sökeland, J. and H. Rübber, *Blasenekstrophie*, in *Taschenlehrbuch Urologie*, J. Sökeland and H. Rübber, Editors. 2008, Thieme: Stuttgart. p. S.175/176.
3. Conrad, S. and J.W. Thüroff, *Blasen- und Harnröhrenfehlbildungen*, in *Urologie*, R. Hautmann and J. Gschwend, Editors. 2004, Springer: Berlin Heidelberg. p. S. 393-396.
4. *Selbsthilfegruppe Blasenekstrophie/ Epispadie e.V.* [cited 2015; Available from: http://www.blasenekstrophie.de/index.php?navi_main=Selbsthilfegruppe.
5. Riedmiller, H. and A. Löser, *Urologie*, in *Pädiatrie*, Speer Ch and M. Gahr, Editors. 2012, Springer: Berlin Heidelberg. p. S. 709-712.
6. Hautmann, R., *Operative urologische Therapie*, in *Urologie*, R. Hautmann and J. Gschwend, Editors. 2014, Springer: Berlin Heidelberg. p. S.104-110.
7. Smeulders, N. and C.R. Woodhouse, *Neoplasia in adult exstrophy patients*. BJU Int, 2001. **87**(7): p. 623-8.
8. Meyer, T., et al., *Immune response to xenogeneic matrix grafts used in pediatric surgery*. Eur J Pediatr Surg, 2007. **17**(6): p. 420-5.
9. Meyer, T., et al., *A new biocompatible material (Lyoplant) for the therapy of congenital abdominal wall defects: first experimental results in rats*. Pediatr Surg Int, 2006. **22**(4): p. 369-74.
10. Meyer, T., et al., [*PAUL procedure. A new biocompatible concept for the therapy of congenital abdominal wall defects*]. Chirurg, 2010. **81**(3): p. 236-42.
11. Drenckhahn, D. and J. Waschke, *Harn- und Genitalsystem*, in *Benninghoff/Drenckhahn Taschenbuch Anatomie*, D. Drenckhahn and J. Waschke, Editors. 2008, Elsevier - Urban und Fischer: München. p. S. 287-309.

12. Schünke, M., et al., *Prometheus - Lernatlas der Anatomie/ Innere Organe*. 2009, Stuttgart: Thieme.
13. Sökeland, J. and H. Rübben, *Harnblase und Harnröhre*, in *Taschenlehrbuch Urologie*, J. Sökeland and H. Rübben, Editors. 2008, Thieme: Stuttgart. p. S. 19-26.
14. Sökeland, J. and H. Rübben, *Entwicklung des Urogenitalsystems*, in *Taschenlehrbuch Urologie*, J. Sökeland and H. Rübben, Editors. 2008, Thieme: Stuttgart. p. S.2-6.
15. Frohneberg, D. and W. D, *Embryologie - Entwicklung des Urogenitalsystems*, in *Urologie*, R. Hautmann and J. Gschwend, Editors. 2014, Springer: Berlin Heidelberg. p. S. 2-11.
16. Conrad, S. and J.W. Thüroff, *Urologie*, A. 14.30, Editor. 2014, Springer: Berlin Heidelberg.
17. Conrad, S. and J.W. Thüroff, *Urologie*, A. 14.34, Editor. 2014, Springer: Berlin Heidelberg.
18. Frimberger, D. and G.J. P, *Bladder Exstrophy and Epispadias*, in *Pediatric Surgery*, P. Puri and M. Höllwarth, Editors. 2014, Springer: Berlin Heidelberg. p. S. 589-606.
19. Inouye, B.M., et al., *Modern management of the exstrophy-epispadias complex*. *Surg Res Pract*, 2014. **2014**: p. 587064.
20. K V, S., A. Mammen, and K. Varma, *Pathogenesis of bladder exstrophy: A new hypothesis*. *J Pediatr Urol*, 2015((15)00272-7): p. S.1477-5131.
21. Sökeland, J. and H. Rübben, *Epispadie*, in *Taschenlehrbuch Urologie*, J. Sökeland and H. Rübben, Editors. 2008, Thieme: Stuttgart. p. S. 178/179.
22. Husmann, D.A., et al., *Inguinal pathology and its association with classical bladder exstrophy*. *J Pediatr Surg*, 1990. **25**(3): p. 332-4.
23. Stec, A.A., et al., *Colorectal anomalies in patients with classic bladder exstrophy*. *J Pediatr Surg*, 2011. **46**(9): p. 1790-3.
24. Kouame, B.D., et al., *Aesthetic, urological, orthopaedic and functional outcomes in complex bladder exstrophy-epispadias's management*. *Afr J Paediatr Surg*, 2015. **12**(1): p. 56-60.

25. Stewart, D., et al., *Pediatric surgical complications of major genitourinary reconstruction in the exstrophy-epispadias complex*. J Pediatr Surg, 2015. **50**(1): p. 167-70.
26. Rubenwolf, P.C., et al., *Persistent histological changes in the exstrophic bladder after primary closure-a cause for concern?* J Urol, 2013. **189**(2): p. 671-7.
27. Woodhouse, C.R., A.C. North, and J.P. Gearhart, *Standing the test of time: long-term outcome of reconstruction of the exstrophy bladder*. World J Urol, 2006. **24**(3): p. 244-9.
28. Schaefer, M., et al., *Bladder augmentation with small intestinal submucosa leads to unsatisfactory long-term results*. J Pediatr Urol, 2013. **9**(6 Pt A): p. 878-83.
29. Ayyildiz, A., et al., *Using porcine acellular collagen matrix (Pelvicol) in bladder augmentation: experimental study*. Int Braz J Urol, 2006. **32**(1): p. 88-92; discussion 92-3.
30. Gearhart, J.P., D.S. Peppas, and R.D. Jeffs, *The application of continent urinary stomas to bladder augmentation or replacement in the failed exstrophy reconstruction*. Br J Urol, 1995. **75**(1): p. 87-90.
31. Surer, I., et al., *Continent urinary diversion and the exstrophy-epispadias complex*. J Urol, 2003. **169**(3): p. 1102-5.
32. Varma, K.K., A. Mammen, and S.K. Kolar Venkatesh, *Mobilization of pelvic musculature and its effect on continence in classical bladder exstrophy: a single-center experience of 38 exstrophy repairs*. J Pediatr Urol, 2015. **11**(2): p. 87 e1-5.
33. Nelson, C.P., et al., *Bladder exstrophy in the newborn: a snapshot of contemporary practice patterns*. Urology, 2005. **66**(2): p. 411-5.
34. Massanyi, E.Z., J.P. Gearhart, and S. Kost-Byerly, *Perioperative management of classic bladder exstrophy*. Res Rep Urol, 2013. **5**: p. 67-75.
35. Wunsch, L., E.M. Ehlers, and M. Russlies, *Matrix testing for urothelial tissue engineering*. Eur J Pediatr Surg, 2005. **15**(3): p. 164-9.

36. AG, B.B.M. *Lyoplant*. 2015; Available from: <http://www.bbraun.de/cps/rde/xchg/bbraun-de/hs.xsl/products.html?prid=PRID00000805>.
37. Kollhoff, D.M., E.Y. Cheng, and A.K. Sharma, *Urologic applications of engineered tissue*. Regen Med, 2011. **6**(6): p. 757-65.
38. El-Taji, O.M., A.Q. Khattak, and S.A. Hussain, *Bladder reconstruction: The past, present and future*. Oncol Lett, 2015. **10**(1): p. 3-10.
39. Gulbins, E. and K.S. Lang, *Immunsystem*, in *Physiologie des Menschen*, R. Schmidt and F. Lang, Editors. 2007, Springer: Berlin Heidelberg. p. 551-562.
40. Kaufmann, S.H.E., *T-Zellen*, in *Basiswissen Immunologie*, S.H.E. Kaufmann, Editor. 2014, Springer: Berlin Heidelberg. p. 64-83.
41. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
42. Riedelsheimer, B. and S. Büchl-Zimmermann, *Färbungen*, in *Romeis - Mikroskopische Technik*, M. Mulisch and U. Welsch, Editors. 2015, Springer: Berlin Heidelberg. p. 171-282.
43. Goldner, J., *A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes*. Am J Pathol, 1938. **14**(2): p. 237-43.
44. Kaufmann, S.H.E., *Immunologische Grundbegriffe*, in *Basiswissen Immunologie*, S.H.E. Kaufmann, Editor. 2014, Springer: Berlin Heidelberg. p. 1-5.
45. Bertin, K.D., et al., *Complex bladder-exstrophy-epispadias management: causes of failure of initial bladder closure*. Afr J Paediatr Surg, 2014. **11**(4): p. 334-40.
46. Gerharz, E.W. and W.S. McDougal, *Metabolic and functional consequences of urinary diversion through intestinal segments*. World J Urol, 2004. **22**(3): p. 155-6.
47. Gearhart, J.P., et al., *The multiple reoperative bladder exstrophy closure: what affects the potential of the bladder?* Urology, 1996. **47**(2): p. 240-3.
48. Hesh, C.A., et al., *The cost of failure: The economic impact of failed primary closure in classic bladder exstrophy*. J Pediatr Surg, 2015.

49. Lam Van Ba, O., et al., *Bladder tissue engineering: a literature review*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **82-83**: p. 31-7.
50. Portis, A.J., et al., *Laparoscopic augmentation cystoplasty with different biodegradable grafts in an animal model*. J Urol, 2000. **164**(4): p. 1405-11.
51. Wang, Y. and L. Liao, *Histologic and functional outcomes of small intestine submucosa-regenerated bladder tissue*. BMC Urol, 2014. **14**: p. 69.
52. Murphy, F. and M.T. Corbally, *The novel use of small intestinal submucosal matrix for chest wall reconstruction following Ewing's tumour resection*. Pediatr Surg Int, 2007. **23**(4): p. 353-6.
53. Chan, B.P. and K.W. Leong, *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*. Eur Spine J, 2008. **17 Suppl 4**: p. 467-79.
54. Oberpenning, F., et al., *De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(2): p. 149-55.
55. Schaeffer, A.J., et al., *Complete primary repair of bladder exstrophy: a single institution referral experience*. J Urol, 2011. **186**(3): p. 1041-6.
56. Zhao, Y., et al., *Time-dependent bladder tissue regeneration using bilayer bladder acellular matrix graft-silk fibroin scaffolds in a rat bladder augmentation model*. Acta Biomater, 2015. **23**: p. 91-102.
57. Kanematsu, A., S. Yamamoto, and O. Ogawa, *Changing concepts of bladder regeneration*. Int J Urol, 2007. **14**(8): p. 673-8.
58. Lüllmann-Rauch, R., *Binde- und Stützgewebe in Taschenlehrbuch Histologie*. 2009, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York p. 114-165.
59. Bolland, F., et al., *Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering*. Biomaterials, 2007. **28**(6): p. 1061-70.
60. Yang, B., et al., *Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(5): p. 1201-11.

61. Lüllmann-Rauch, R., *Kreislauforgane*, in *Taschenlehrbuch Histologie*. 2009, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. p. 241-263.
62. Patience, C., et al., *No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys*. *Lancet*, 1998. **352**(9129): p. 699-701.
63. Song, L., et al., *Bladder acellular matrix and its application in bladder augmentation*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014. **20**(2): p. 163-72.
64. Roelofs, L.A., et al., *Bladder Regeneration using a Smart Acellular Collagen Scaffold with Growth Factors VEGF, FGF-2 and HB-EGF*. *Tissue Eng Part A*, 2015.
65. Nillesen, S.T., et al., *Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF*. *Biomaterials*, 2007. **28**(6): p. 1123-31.

Tierschutzantrag

**Über den
Tierschutzbeauftragten der
Universität Würzburg**

**An die
Regierung von Unterfranken
Postfach 63 49**

97013 Würzburg

**Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8
Abs. 1 des Tierschutzgesetzes**

**Name, genaue Postanschrift und Telefonnummer des
Antragstellers:**

Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Meyer

Leiter der Abteilung für Kinderchirurgie

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie

Oberdürrbacherstrasse 6

97080 Würzburg

Tel.: 0931-201-31071

Email: Meyer_T@chirurgie.uni-wuerzburg.de

Alle Paragraphenangaben beziehen sich auf das
Tierschutzgesetz entsprechend der Bekanntmachung der
Neufassung vom 25. Mai 1998 (BGBl I S.1105)

Der Unterzeichnete beantragt die Genehmigung zur
Durchführung von Tierversuchen nach § 8 Abs. 1 des
Tierschutzgesetzes für folgendes Versuchsvorhaben:

1. Angaben zum Versuchsvorhaben

*Blasenaugmentation mit Hilfe eines biokompatiblen
Kollagenmesh aus „Small Intestinal Submucosa“ (SIS)
im Rattenmodell.*

**1.1 Bezeichnung des Versuchsvorhabens (einschließlich
der internen Kurzbezeichnung)**

siehe oben

**1.2 Zweck und Unerlässlichkeit des Versuchsvorhabens (§
7 Abs.2)**

**1.2.1 Angabe des Zwecks des Versuchsvorhabens und
wissenschaftlich begründete Darlegung, dass dieser
einem der in § 7 Abs.2 Satz 1 genannten Zwecke
zuzuordnen ist**

Der Zweck des Versuchsvorhabens ist die Optimierung der chirurgischen Therapie von Kindern und Jugendlichen, die an einer Mikro- oder Schrumpfblase leiden. Hierbei ist der Schutz des oberen Harntraktes mit ungehindertem Abfluss und der Vermeidung von aufsteigenden Infektionen bei restharnfreier Entleerung der Blase das primäre Behandlungsziel. Auch bei voller Ausschöpfung aller konservativen Therapiemöglichkeiten kommt es bei einer vorhandenen Mikro- oder Schrumpfblase in einer großen Anzahl der Fälle zu einer irreversiblen Nierenschädigung bis hin zum chronischen Nierenversagen und Notwendigkeit der Nierentransplantation (Schalow et al. 2002).

Die chirurgische Therapie einer Mikro- oder Schrumpfblase stellt heute immer noch eine der bedeutendsten Probleme der (kinder-)urologischen Chirurgie dar (Caione et al. 2006).

Um die Nierenfunktion zu schützen, muss in der Regel eine Blasenaugmentation (Blasenneubildung bzw. Neo-blasenbildung) mit Darm erfolgen.

Dieses bisherige Standardverfahren mit der Augmentation von Darm als unphysiologischem Material ziehen eine Reihe von Problemen und Komplikationen nach sich, wie z. B. rezidivierenden Harnwegsinfekte oder eine Blasensteinbildung. Da die Blasenaugmentation häufig im Kindesalter durchgeführt werden muss, ist auch die potentielle Gefahr der malignen Entartung der Neoblase ein erhebliches Risiko für die jungen Patienten (Mitchell 2003; Kispal et al. 2011; Obermayr et al. 2011).

Aus diesem Grunde wurde eine Reihe von Ersatzmaterialien für die Durchführung einer Blasenaugmentation vorgeschlagen, die sich jedoch bis heute nicht bewähren konnten (Cheng et al. 2000). Synthetische Materialien wie Polypropylen führen zu starken Abstoßungsreaktionen des Körpers und besitzen nur eine sehr eingeschränkte Dehnbarkeit (Ashkar et al. 1967). Nichtsynthetische, biologisch abbaubare Gewebe, wie Plazenta, Dura mater (Hirnhaut) oder Amnionsack zeigt ebenfalls eine starke Tendenz der Schrumpfung oder können zu einer sog. metaplastischen Ossifizierung(unerwünschte Bildung von Knochenstrukturen) führen (Fishman et al. 1987; Kropp 1998).

Aus diesem Grund ist die Entwicklung eines Ersatzmaterials, das die genannten Eigenschaften **nicht** beinhaltet, dringend erforderlich.

In einer Reihe von Versuchen konnte bis heute ein möglicher Nutzen der Verwendung von industriell hergestellter zellfreier Submucosa aus Schweinedünndarm (*engl.: small intestine submucosa, SIS*) als Blasenaugmentat nachgewiesen werden (Kropp et al. 1995; Kropp 1998; Cheng et al. 2000).

Des Weiteren ist SIS als biokompatibles Material bereits für einer ganzen Reihe von Indikationen (z. B. Hernien-chirurgie, Peyronie-Krankheit) als chirurgisches Implantat zugelassen und beschrieben (Hayn et al. 2009; Hiles et al. 2009).

Im Rahmen eines individuellen Heilversuches wurden an der kinderchirurgischen Abteilung der Cnopf'schen Kinderklinik an insgesamt 5 Kindern eine Blasenaugmentation mit SIS durchgeführt, bei denen eine Blasenaugmentation mit Dünndarm

(bisheriger Standard) aus verschiedenen Gründen nicht möglich war (z. B. Fehlbildung des Darms, relativer Kurzdarm) bzw. von den Patienten resp. den Eltern abgelehnt wurde (M. Schäfer et al. 2011, Publikation in Vorbereitung).

Dabei zeigte sich im postoperativen Verlauf von nunmehr fast zwei Jahren ein außergewöhnlich positiver Verlauf mit persistentem Anstieg der Blasenkapazität und histologisch dokumentiertem vollständigem Umbau des Augmentates zu weitgehend normal konfigurierter und geschichteter Blasenwand.

Letztlich unklar bleibt jedoch die Frage, wie dick das zu implantierende Material für eine normale Blasenfunktion (1-lagiges SIS vs. 4-lagiges SIS; Dicke der Blasenwand, Dauer des Umbaus des Implantates zu geschichteter physiologischer Blasenwand) sein muss.

1.2.2 Wissenschaftlich begründete Darlegung der Unerlässlichkeit des Versuchsvorhabens unter Berücksichtigung des jeweiligen Standes der wissenschaftlichen Erkenntnisse (§ 7 Abs. 2 Satz 2 erster Halbsatz)

Da es sich bei der Studie um den Nachweis der Erzeugung von funktionstüchtiger, normal geschichteter Blasenwand handelt, ist ein Versuchsaufbau in reiner Zellkultur o. ä. nicht möglich, da kein Verfahren existiert, dass eine normale Blasenwand außerhalb des lebenden Organismus nachbilden kann.

Es existieren zwar bereits einige Studien, die sich mit dem Nachweis der grundsätzlichen Eignung von SIS als Blasenaugmentat beschäftigen. Bei insgesamt sehr positiven Ergebnissen besteht jedoch eine große Heterogenität der verwendeten Versuchsmodelle. In einer Studie wurde 1-lagiges SIS verwendet (Ayyildiz et al. 2008), während in mehreren anderen Studien 4-lagiges SIS verwendet wurde (Kropp et al. 1996; Caione et al. 2006). Es ist jedoch bislang nicht klar, welches dieser beiden Materialstärken eine bessere Qualität und somit ein besseres Outcome für den Patienten bietet.

Anhand eines Kleintiermodells soll im Rahmen dieses Antrags untersucht werden, inwiefern sich die Verwendung von 1-lagigem vs. 4-lagigem SIS in der Ausbildung einer weitgehend normalen Blasenwand unterscheidet (Dicke der Blasenwand, Dauer des

Umbaues des Implantates zu geschichteter Blasenwand).

1.2.3 Wissenschaftlich begründete Darlegung, dass der Versuchszweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren als den Tierversuch erreicht werden kann (§7 Abs. 2 Satz 2, zweiter Halbsatz)

Für die Analyse der zellulären Ab- und Umbaumechanismen, die bei der Verwendung biokompatibler Materialien die bei der Blasenaugmentation mit einem biokompatiblen Material auftreten, stellt der Tierversuch eine unverzichtbare Grundlage dar. Die Interaktionen zwischen implantiertem Material und Organismus setzen sich in vivo aus zahlreichen und bisher noch nicht vollständig verstandenen, komplexen Reaktionsschritten verschiedenster Zelltypen zusammen, die bisher so nur im Organismus beobachtet und untersucht werden können (Meyer et al. 2007). In vitro lassen sich zur Zeit jedoch nur einzelne spezifische Zellinteraktionen bzw. molekulare Vorgänge analysieren (Broll et al., 2002).

1.3 Ausschöpfung zugänglicher Informationsmöglichkeiten (§ 8 Abs. 3 Nr. 1 Buchstabe b)

1.3.1 Welche Informationsmöglichkeiten wurden genutzt?

Um Mehrfachversuche zu vermeiden, erfolgt fortlaufend ein computergestütztes Literaturstudium, das der Erfassung bestehender sowie neu hinzukommender Informationen zu diesem Thema dient. Des Weiteren werden regelmäßig entsprechende Fachkongresse und Fortbildungsveranstaltungen besucht, um aktuelle klinische und experimentelle Entwicklungen auf dem Gebiet der Blasenaugmentation zu verfolgen.

1.3.2 Ist das angestrebte Versuchsergebnis hinreichend bekannt?

nein

Wenn ja, wissenschaftlich begründete Darlegung, dass die Überprüfung des hinreichend bekannten angestrebten Versuchsergebnisses durch einen Doppel- oder einen Wiederholungsversuch unerlässlich ist.

1.4 Art und Anzahl der vorgesehenen Tiere (§ 8 Abs. 2 Satz 3 i.V.m. § 8 a Abs. 2 Nr.2 und § 9 Abs. 2)

1.4.1 Vorgesehene Tierarten und Begründung für die Wahl der Tierart (§ 9 Abs. 2 Nr. 1)

Verwendet wird der Inzuchtrattenstamm Wistar Furth (WF), da die Mitarbeiter der experimentellen Chirurgie und experimentelle Transplantations-Immunologie über eine langjährige Erfahrungen in der Tierhaltung sowie in mikrochirurgischen Techniken an der Ratte verfügen (Timmermann et al., 1998; Meyer et al., 2002; Meyer et al. 2006)

1.4.2 Vorgesehene Anzahl und Begründung für die Anzahl der Tiere einschließlich Angaben zur biometrischen Planung (§ 9 Abs.2 Nr. 2) Arbeitsprogramm:

Vorversuche zur Erarbeitung der OP-Methode (n=5 Tiere)

Hauptversuche

1. Untersuchungen zur Implantation eines jeweils 1 x 1 cm großen Kollagen-Netzen (**Gruppe A:** 1-lagiger SIS-Patch vs. **Gruppe B:** 4-lagiger SIS-Patch) als Blasenersatz bei WF-Ratten (**n=30 Tiere**).

2. Histologische Auswertung der Ab- bzw. Umbauvorgänge des operierten Neoblase nach 2 Wochen, 6 Wochen und 3 Monaten.

3. Messung der Blasenkapazität im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (**n=5**).

Zu Teilziel 1: Untersuchungen zur Implantation eines jeweils 1 x 1 cm großen 1-lagigen vs. 4-lagigen SIS-Patches in die Blasenwand bei WF-Ratten. Diese Untersuchungen sollen zeigen, inwieweit sich ein biokompatibles Material in Abhängigkeit der Materialdicke zur Therapie der Blasenaugmentation eignet.

Zu Teilziel 2: Histologische Auswertung der Ab- bzw. Umbauvorgänge der Blasenwand nach 2 Wochen, 6 Wochen und 3 Monaten. Hierzu werden die o.g. implantierten Materialien aus der Blase nach definierten Zeitpunkten explantiert. Nach Aufarbeitung erfolgt die histologische und immunhistologische Beurteilung der zellulären Ab- bzw. Umbauvorgänge der einzelnen o.g. Materialien.

Zu Teilziel 3: Bestimmung der Blasenkapazität als Parameter der Blasenfunktion. Hierzu wird die

Neoblase nach definierten Zeitpunkten explantiert und die Blasenkapazität volumetrisch bestimmt. Die so gewonnenen Ergebnisse werden mit den Ergebnissen einer unbehandelten Blase verglichen.

Tierexperimentelle Tabelle:

1. Vorversuche (n=5 Tiere)

2. Bestimmung der Blasenkapazität, Histologische und Immunhistochemische Auswertung (n=30 Tiere):

	2 Wochen	6 Wochen	3 Monate
1-lagiger Layer	5	5	5
4-lagiger Layer	5	5	5

3. Kontrolltiere (n=5)

Insgesamt werden mit diesem Antrag somit **40 Tiere** beantragt. An den Tieren wird ausschließlich die Implantation eines 1 x 1 cm großen Netzes in die Blasenwand als belastender Eingriff durchgeführt.

1.4.3 Handelt es sich um eigens für Tierversuche gezüchtete Tiere (§ 9 Abs. 2 Nr. 7)?

ja

Name und Anschrift des Züchters:

Charles River Wiga GmbH, D-97633 Sulzfeld

1.4.3.1 Wenn nein, ist unter Verwendung der Anlage 3 ein besonderer Antrag auf Zulassung einer Ausnahme nach § 9 Abs. 2 Nr. 7 Satz 2 mit Begründung, warum nicht eigens für Tierversuche gezüchtete Tiere verwendet werden können, zu stellen

entfällt

1.4.3.2 Ggf. Begründung, warum eine Entnahme aus der Natur für erforderlich gehalten wird (§ 9 Abs. 2 Nr. 1 Satz 2)

entfällt

1.5 Angabe von Ort, beabsichtigtem Beginn (Datum) und voraussichtlicher Dauer des Versuchsvorhabens (§ 8 Abs. 2 Satz 3 i.V.m. § 8 a Abs. 2 Nr. 4)

Die Operationen werden im mikrochirurgischen OP, ZOM, der Experimentellen Chirurgie (Leiterin: Frau Prof. Dr. A.-M. Waaga-Gasser) der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, Oberdürrbacherstrasse 6, 97080 Würzburg, durchgeführt. Mit den Experimenten wird unmittelbar nach Erteilung der Genehmigung begonnen. Die Versuchsdauer ist auf zwei Jahre angesetzt.

1.6 Beschreibung der Art, Durchführung und Dauer der Eingriffe und Behandlungen, einschließlich der Angaben in der Tabelle (§ 8 Abs. 2 Satz 3 i.V.m. § 8 a Abs. 2 Nr. 3)

1.6.1 Welche Eingriffe oder Behandlungen sollen durchgeführt werden (genaue Ablaufbeschreibung und detaillierte Angaben über die angewandten Methoden)?

Die Operationen werden sämtlich unter Isofluran-Inhalationsnarkose durchgeführt. Nach initialer Rasur der Bauchwand, erfolgt nach Desinfektion und sterilem Abdecken eine Unterbauchlaparotomie. Mobilisation des Darmpaketes und Darstellen der Blase. Resektion eines 1 x 1 cm großen Blasenstreifens. Implantation eines jeweils 1 x 1 cm großen Kollagen-Netzes in die Blase mittels sechs definierten Vicryl-Einzelknopfnähten der Stärke 8,0. Kontrolle auf Bluttrockenheit. Abdichtung mittels Fibrinkleber. Mehrschichtiger Verschluss der Bauchdecke mittels fortlaufender Naht (Vicryl 5,0 und Prolene 8,0). Postoperativ werden die Tiere für 1-2 Stunden unter einer Wärmelampe nachbeobachtet. Erfahrungsgemäß nehmen die operierten Tieren nach dem Eingriff im weiteren Verlauf an Gewicht und Größe zu. Nach der unter 1.4.2 genannten Zeit wird das Tier zur Entnahme des Implantates erneut narkotisiert und mit einer intrakardialen T-61-Injektion getötet.

1.6.2 Welche Eingriffe oder Behandlungen werden unter Betäubung durchgeführt und welche Betäubungsverfahren werden dabei angewandt?

Alle Operationen und Entnahmen erfolgen in Isofluran-Inhalationsnarkose.

1.6.3 Werden schmerzhaft Eingriffe ohne Betäubung durchgeführt?

nein

1.6.4 Werden an einem nicht betäubten Tier mehrere erheblich schmerzhaft Eingriffe oder Behandlungen durchgeführt?

nein

1.6.5 Welchen Belastungen (Intensität und Dauer von Schmerzen oder Leiden) werden die Tiere voraussichtlich ausgesetzt oder welche Schäden werden ihnen voraussichtlich zugefügt?

Eine Belastung der Tiere nach der Implantation wird in einem Wundschmerz bestehen, wie er auch bei klinischen Abdominal-Eingriffen bekannt ist. Dieser wird durch einmalige Gabe von Tramal® (Wirkstoff: Tramadol) nach OP gemildert. Die Tiere erwachen sehr schnell aus der Narkose und erhalten die Möglichkeit, sich unter einer Wärmelampe für 1 bis 2 Stunden von der Operation zu erholen. Anschließend werden sie in Scanbur-Schränken unter keimarmen Bedingungen gehalten. Weiter erlauben diese Schränke, daß jeglicher Umgebungstreß von ihnen ferngehalten wird. Nach dem operativen Eingriff erholen sich die Tiere rasch, nehmen erfahrungsgemäß an Gewicht zu und zeigen ein unauffälliges Erscheinungsbild und Verhalten. Die Tiere werden täglich auf Verhalten und Aussehen (z. B. Fellbeschaffenheit) beurteilt und gewogen. Diese Daten werden in ein für jedes Tier angelegtes Datenblatt ("Krankenblatt") eingetragen. Sollte eines der Tiere postoperativ die klinischen Zeichen eines Infektes, Darmverschlusses (Ileus) oder eine Blasenproblematik im Sinne einer Blasenentzündung, Blasenhochstandes oder Leckage zeigen, wird der Versuch abgebrochen, um die Tiere nicht zu stark zu belasten.

1.6.6 Vorgesehene Maßnahmen zur Schmerzlinderung nach Abklingen der Betäubung

Der postoperative Wundschmerz wird mit dem Analgetikum Tramal® (Wirkstoff: Tramadol) prophylaktisch nach der Operation behandelt. Weitere Maßnahmen zur Schmerzbehandlung werden nicht durchgeführt.

Die Angaben nach den Nummern 1.6.1 bis 1.6.6 sind zusätzlich in der dem Genehmigungsantrag beigefügten Tabelle zu vermerken!

(Unterschiedliche Tierarten sind entsprechend zu berücksichtigen.)

1.7 Ethische Vertretbarkeit des Versuchs (§ 7 Abs. 3)

1.7.1 Wissenschaftlich begründete Darlegung, dass die zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden der Versuchstiere im Hinblick auf den Versuchszweck ethisch vertretbar sind (§ 7 Abs. 3 Satz 1)

In diesem Versuchsvorhaben sollen die zellulären Zusammenhänge die bei den Ab- bzw. Umbauvorgänge biokompatibler, resorbierbarer und nicht resorbierbarer Materialien auftreten, analysiert werden. Diese sind grundlegende Voraussetzungen für die unerläßliche weitere Verbesserung der operativen Versorgung von fibrotisch umgebauten Blasen (=Schrumpfblase).

Im Rahmen unserer experimentellen Vorversuche konnten wir zeigen, dass biokompatible Materialien bereits erfolgreich zur Therapie kongenitaler Bauchdeckendefekte eingesetzt werden können (Meyer et. al 2006, 2007 und 2010). Ebenso konnten wir im Rahmen eines individuellen Heilversuches an insgesamt 5 Kindern eine Blasenaugmentation mit SIS durchgeführt, bei denen eine Blasenaugmentation mit Dünndarm (bisheriger Standard) aus verschiedenen Gründen nicht möglich war (z. B. Fehlbildung des Darms, relativer Kurzdarm) bzw. von den Patienten resp. den Eltern abgelehnt wurde (M. Schäfer et al. 2011, Publikation in Vorbereitung).

Logische Schlussfolgerung dieser Versuchsreihen ist daher auch die **Optimierung der Anwendung** biokompatibler Materialien zur Therapie der fibrotisch umgebauten Blase (Schrumpfblase; Bildung einer Neoblase durch Blasenaugmentation). In diesem Zusammenhang erscheint das Versuchsvorhaben ethisch vertretbar.

1.7.2 Bei länger anhaltenden oder sich wiederholenden erheblichen Schmerzen oder Leiden, wissenschaftlich begründete Darlegung, dass das angestrebte Versuchsergebnis vermutlich für wesentliche Bedürfnisse von Mensch und Tier einschließlich der Lösung wissenschaftlicher Probleme von hervorragender Bedeutung ist (§ 7 Abs. 3 Satz 2)

entfällt

2. Nachweis ¹⁾ der Erfüllung der Voraussetzungen des § 8 Abs. 3 Nr. 3 und 4

siehe Stellungnahme des Tierschutzbeauftragten

2.1 Nachweis, dass die zur Durchführung des Versuchsvorhabens erforderlichen Anlagen, Geräte und sonstigen sachlichen Mittel vorhanden sind.

Siehe Stellungnahme des Tierschutzbeauftragten

2.2 Nachweis, dass die organisatorischen Voraussetzungen, insbesondere für die Aufgabenerfüllung des Tierschutzbeauftragten, gegeben sind.

Siehe Stellungnahme des Tierschutzbeauftragten

2.3 Nachweis, dass eine den Anforderungen des § 2 entsprechende Unterbringung und Pflege einschließlich der Betreuung der Tiere sowie ihre medizinische Versorgung sichergestellt ist.

Die für die Versuchsdurchführung notwendige Ausstattung und Geräte (u. a. Narkoseanlage, mikrochirurgisches Besteck, Operationsmikroskop) sind im mikrochirurgischen OP, ZOM, der Experimentellen Chirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik vorhanden.

Die Tiere werden vor und nach Operation in den Tierhaltungsräumen der Experimentellen Chirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik untergebracht. Frau Prappacher-Lösch ist, als versierte Versuchstierpflegerin, mit den Aufgaben der Tierhaltung und -pflege bestens vertraut. Die tägliche postoperative Kontrolle der operierten Tiere ist ebenfalls sichergestellt.

3. Verfahren am Versuchsende

Alle Tiere werden getötet; entweder, wenn sie nach der Operation eines der unter 1.6.5 genannten Abbruchkriterium erfüllen, oder bei unauffälligem Verlauf nach spätestens 3 Monaten. Die Tiere werden zur Entnahme der Präparate in Narkose gelegt und anschließend in Narkose durch Injektion von T 61 getötet.

3.1 Beabsichtigter Verbleib der Tiere:

Tötung nach Beobachtungszeit von 2, 6 und 12 Wochen

4. **Darlegung, dass die Einhaltung der Anforderungen an die Durchführung der Tierversuche nach § 9 Abs. 1 und 2 und die Erfüllung der Aufzeichnungspflicht nach § 9 a Abs. 1 erwartet werden kann.**

Die Versuche werden vom Versuchsleiter und seinem Stellvertreter überwacht (siehe 7.1 und 7.2). Alle Versuche werden mit den erforderlichen Angaben, wie u.a. das Allgemeinbefinden der Tiere in der postoperativen Phase und der Zeitpunkt der Tötung, in einem Datenblatt protokolliert.

5. **Hat der Tierschutzbeauftragte eine Stellungnahme nach § 8 b Abs. 3 Nr. 3 abgegeben?**

ja

6. **Anonymisierung des Antrages zur Vorlage bei der Kommission zur Unterstützung der zuständigen Behörden bei der Entscheidung über die Genehmigung von Tierversuchen nach § 15 Tierschutzgesetz.**

Wird auf eine Anonymisierung des Antrags verzichtet?

ja

7. **Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter (§ 8 Abs. 3 Nr. 2)**

- 7.1 **Leiter des Versuchsvorhabens**

- 7.1.1 Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Meyer

Leiter der Abteilung für Kinderchirurgie
Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-,
Gefäß- und Kinderchirurgie
Oberdürrbacherstrasse 6
97080 Würzburg

- 7.1.2 **Berufsbezeichnung**

Leiter der Abteilung für Kinderchirurgie

7.1.3 Nachweis der fachlichen Eignung

Seit 1999 an der Chirurgischen Universitätsklinik in Würzburg tätig; mehrjährige Erfahrungen im Umgang mit Versuchstieren und Tierexperimenten. Der Nachweis der fachlichen Eignung liegt der Regierung von Unterfranken bereits vor.

7.2 Stellvertretender Leiter des Versuchsvorhabens

7.2.1 Dr. med. Frank-Mattias Schäfer

Abteilung für Kinderchirurgie
Cnopf'sche Kinderklinik Nürnberg
St.-Johannis-Mühlgasse 19
90419 Nürnberg

7.2.2 Berufsbezeichnung

Assistenzarzt der Abteilung für Kinderchirurgie und -urologie and der Cnopf'schen Kinderklinik Nürnberg

7.2.3 Nachweis der fachlichen Eignung

Mehrjährige Erfahrungen im Umgang mit Versuchstieren und Tierexperimenten. Der Nachweis der fachlichen Eignung wird der Regierung von Unterfranken noch vorgelegt.

8. Personen, die im Rahmen der Versuchsdurchführung Eingriffe oder Behandlungen an Tieren durchführen.

8.1 Namen der Personen und deren Tätigkeit (ausgenommen Betäubung)

A) **Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Meyer**, Leiter der Abt. für Kinderchirurgie, Chirurgische Universitätsklinik (Klinik I), Durchführung der operativen Eingriffe und der Narkose.

B) **Dr. med. Frank-Mattias Schäfer**, Assistenzarzt der Abteilung für Kinderchirurgie und -urologie, Cnopf'sche Kinderklinik Nürnberg). Durchführung der operativen Eingriffe und der Narkose.

C) **N. N.**, medizinischer Doktorand/in, Durchführung von Gewebeentnahmen an narkotisierten Tieren.

8.1.1 Nachweis der erforderlichen Qualifikation (§ 9 Abs. 1 Satz 2 und 3); ggf. Hinweis auf eine erteilte Ausnahmegenehmigung.

A) Seit 1999 an der Chirurgischen Universitätsklinik in Würzburg tätig; mehrjährige Erfahrungen im Umgang mit Versuchstieren und Tierexperimenten. **Der Nachweis der fachlichen Eignung liegt der Regierung von Unterfranken bereits vor.**

B) Seit 2007 an der Abteilung für Kinderchirurgie und -urologie an der Cnopf'schen Kinderklinik in Nürnberg tätig. **Der Nachweis der fachlichen Eignung wird der Regierung von Unterfranken noch vorgelegt.**

C) Der/die Kandidat/in wird vom Projektleiter und/oder stellvertretenden Projektleiter angelernt und unter Aufsicht arbeiten; er/sie wird an der Fortbildungsveranstaltung "Versuchstierkundliches Seminar" im Institut für Virologie zum entsprechenden Zeitpunkt teilnehmen. **Die Ausnahmegenehmigung wird zum entsprechenden Zeitpunkt beantragt.**

8.2 Gegebenenfalls Namen der Personen, die die Betäubung durchführen oder die Durchführung der Betäubung beaufsichtigen.

Die Narkose wird durch den Antragsteller durchgeführt bzw. überwacht. Alle tierexperimentell tätigen Mitarbeiter der Experimentellen Chirurgie und der Experimentellen Transplantations-Immunologie werden regelmäßig in tierexperimenteller Anästhesie geschult.

8.2.1 Nachweis der erforderlichen Qualifikation (§ 9 Abs. 2 Nr. 4 Satz 2)

siehe oben

8.3 Berechtigung der Personen zur Benutzung der Einrichtung, in der die Tierversuche durchgeführt werden (§ 8 Abs. 6)

8.3.1 Sind die genannten Personen bei der Einrichtung beschäftigt?

ja

8.3.2 Wenn nein, sind sie mit Zustimmung des verantwortlichen Leiters der Einrichtung zur Benutzung der Einrichtung befugt?

entfällt

9. Personen, die für die Pflege, Betreuung und medizinische Versorgung der Versuchstiere verantwortlich sind.

9.1 Name und Qualifikation der für die Pflege und Betreuung der Tiere verantwortlichen Person.

Frau Prappacher-Lösch, Versuchstierpflegerin,
Experimentelle Transplantations-Immunologie der
Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg

9.2 Name und Qualifikation der für die medizinische Versorgung verantwortlichen Person.

Prof. Dr. Th. Meyer, Klinik und Poliklinik für
Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie,
Oberdürrbacher-strasse 6, 97080 Würzburg

9.3 Name und Anschrift des Tierarztes, dem nach Abschluss des Versuchs die überlebenden Tiere der in § 9 Abs. 2 Nr. 8 genannten Arten vorgestellt werden.

entfällt

Würzburg, den 31.10.2011

Univ. Prof. Dr. Th. Meyer ^{UK}
Leiter der Kinderchirurgie
Zentrum Operative Medizin
Chirurgische Klinik u. Poliklinik I
D-97080 Würzburg, Oberdürrbacher Str. 6

Unterschrift des Antragstellers

Unterschrift des
Leiters
des Versuchsvorhabens

Unterschrift des
stellvertretenden Leiters
des Versuchsvorhabens

Beilagen:

1. Tabelle zu den Punkten 1.6.1 bis 1.6.6 für Angaben über die erwarteten Belastungen für die Tiere ("Belastungstabelle")

8.2.2 Schlaf											
8.2.3 Wasser											
8.2.4 Futter											
8.2.5 Bewegung											
8.3 Überreizung (Stress)											
8.4 andere (3)											
9. andere Eingriffe/Behandlungen (3)											

(1) Bei Verwendung mehrerer Tierarten bitte jeweilige Tierart in den Spalten angeben

(2) Nichtzutreffendes streichen

(3) bitte nennen

Literatur:

- Ashkar, L. and E. Heller (1967). "The silastic bladder patch." J Urol 98(6): 679-683.
- Ayyildiz, A., K. T. Akgul, et al. (2008). "Use of porcine small intestinal submucosa in bladder augmentation in rabbit: long-term histological outcome." ANZ J Surg 78(1-2): 82-86.
- Broll R., Bethge T. et al. (2002). "Einfluss resterilisierter Kunststoffnetze aus Polypropylen auf das Wachstum humaner Fibroblasten". Zentralb Chir 127: 589-593
- Caione, P., N. Capozza, et al. (2006). "In vivo bladder regeneration using small intestinal submucosa: experimental study." Pediatr Surg Int 22(7): 593-599.
- Cheng, E. Y. and B. P. Kropp (2000). "Urologic tissue engineering with small-intestinal submucosa: potential clinical applications." World J Urol 18(1): 26-30.
- Fishman, I. J., F. N. Flores, et al. (1987). "Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction." J Urol 138(5): 1291-1294.
- Hayn, M. H., M. F. Bellinger, et al. (2009). "Small intestine submucosa as a corporal body graft in the repair of severe chordee." Urology 73(2): 277-279.
- Hiles, M., R. D. Record Ritchie, et al. (2009). "Are biologic grafts effective for hernia repair?: a systematic review of the literature." Surg Innov 16(1): 26-37.
- Kispal, Z., D. Balogh, et al. (2011). "Complications after bladder augmentation or substitution in children: a prospective study of 86 patients." BJU Int 108(2): 282-289.

- Kropp, B. P. (1998). "Small-intestinal submucosa for bladder augmentation: a review of preclinical studies." *World J Urol* 16(4): 262-267.
- Kropp, B. P., S. Badylak, et al. (1995). "Regenerative bladder augmentation: a review of the initial preclinical studies with porcine small intestinal submucosa." *Adv Exp Med Biol* 385: 229-235.
- Kropp, B. P., M. K. Rippy, et al. (1996). "Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations." *J Urol* 155(6): 2098-2104.
- Meyer T., Breuer S., et al. (2002). "Xenogene Inseltransplantation zur Therapie des Diabetes mellitus: Langzeitfunktion ohne Immunsuppression im Rattenmodell". *Chirurgisches Forum 2002 für experimentelle und klinische Forschung*. Springer Berlin Heidelberg New York 31:293-295
- Meyer T., Schwarz K., Ulrichs K. and Höcht B. (2006). "A new biocompatible material (Lyoplant®) for the therapy of congenital abdominal wall defects: First experimental results in rats". *Pediatric Surgery International* 22:369-374
- Meyer T., Seifert A. et al. (2010). " Das PAUL-Procedure: Ein biokompatibles Konzept zur Therapie kongenitaler Bauchwanddefekte. *Chirurg* 81:236-242
- Mitchell, M. E. (2003). "Bladder augmentation in children: where have we been and where are we going?" *BJU Int* 92 Suppl 1: 29-34.
- Obermayr, F., P. Szavay, et al. (2011). "Outcome of augmentation cystoplasty and bladder substitution in a

pediatric age group." Eur J Pediatr Surg 21(2): 116-119.

- Schalow, E. L. and A. J. Kirsch (2002). "Advances in bladder augmentation." Curr Urol Rep 3(2): 125-130.

Genehmigung zur Verwendung von Abbildungen des Springer-Verlags

3.7.2018

RightsLink Printable License

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 03, 2018

This Agreement between Friederike Winde ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4381340655347
License date	Jul 03, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Springer eBook
Licensed Content Title	Fehlbildungen des Urogenitaltraktes und Kinderurologie
Licensed Content Author	S. Conrad, R. Stein, J.W. Thüroff
Licensed Content Date	Jan 1, 2014
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	yes
Title	Blasenaugmentation mit Hilfe eines biokompatiblen Materials im Rattenmodell
Instructor name	Prof. Dr. med. Thomas Meyer
Institution name	Kinderchirurgie der Universität Würzburg
Expected presentation date	Oct 2018
Portions	Abb. 14.30a-c, Abb. 14.34a-d
Specific Languages	german
Requestor Location	Friederike Winde Franziskanergasse 1A Würzburg, Bavaria 97070 Germany Attn: Friederike Winde
Billing Type	Invoice
Billing Address	Friederike Winde Franziskanergasse 1A Würzburg, Germany 97070 Attn: Friederike Winde
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions
Springer Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where '**reuse in a dissertation/thesis**' has been selected the following terms apply: Print rights for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g.

Nature/Springer/Palgrave) [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc) [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)]

Other Conditions:

Version 1.0

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Danksagung

Ein großer Dank geht an alle, die mich unterstützt und motiviert haben, diese Arbeit fertigzustellen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Thomas Meyer und an meine Betreuerin Dr. Kathrin Backhaus, die sich immer Zeit genommen haben, um Fragen zu beantworten und mir entscheidende Hilfestellungen zur Fertigstellung dieser Arbeit gaben.

Die Betreuung war sehr angenehm und entspannt und hat zudem mein Interesse an dem Fach Kinderchirurgie geweckt.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Ulrich Lang für seine zahlreichen Ratschläge und Unterstützungen bedanken, ohne die ich meine Doktorarbeit nicht hätte fertigstellen können.

Vielen Dank auch an das Team vom chirurgischen Forschungslabor Würzburg, das mir sehr geholfen hat, vor allem Dr. Irina Chodnevskaja.

Ich danke auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit mit Rat und Tat beiseite standen.