



**Autolog zellbesiedelte Matrix zum Verschluss gastraler Inzisionen:  
Eine Machbarkeitsstudie im Schweinemodell.**

---

**Autologous seeded matrix for gastrotomy closure:  
A proof of concept in a porcine model.**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin  
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

**Tobias Schlesinger**

aus

**Offenburg**

Würzburg, November 2021

**Eingereicht am:** .....

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Brehm**

**1. Betreuer: Priv.-Doz. Dr. sc. hum. Marco Metzger**

**2. Betreuerin: Prof. Dr. rer. biol hum. Heike Walles**

**3. Betreuerin: Priv.-Doz. Dr. med. Katica Krajinovic**

**4. Betreuer: Prof. Dr. med. Christoph-Thomas Germer**

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:** .....

**Der Promovend ist Arzt.**

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Vollwanddefekte gastrointestinaler Hohlorgane .....	1
1.2 Anatomie und Physiologie des Magens.....	4
1.3 Wundheilung im Gastrointestinaltrakt .....	6
1.4 Etablierte Methoden zum Verschluss der eröffneten .....	7
Magenwand.....	7
1.5 Tissue Engineering.....	9
1.6 Fragestellung und Strategie.....	10
2 Material und Göttinger Minischweine .....	11
2.1 Material .....	11
2.2 Göttinger Minischweine .....	18
2.3 Small intestinal submucosa (SIS) .....	20
3 Methoden.....	20
3.1 Methoden der Zellkultur .....	20
3.1.1 Entnahme von Hautbiopsien.....	20
3.1.2 Isolation primärer Fibroblasten aus Schweinehaut.....	21
3.1.3 Allgemeine Arbeitstechnik in der Zellkultur .....	22
3.1.4 Passagieren und Zellzahlbestimmung .....	23
3.1.5 Kryokonservierung .....	24
3.1.6 Zytospins .....	25
3.1.7 Mycoplasmen-PCR.....	25
3.1.8 Herstellung der Implantate .....	26
3.2 Methoden der Großtierstudie .....	27
3.2.1 Primäre Operationen.....	27
3.2.2 Erhebung klinischer Parameter .....	30
3.2.3 Explorative Laparoskopie .....	31
3.2.4 Gastroskopie .....	32
3.2.5 Finalisierung .....	33
3.3 Histologie.....	34
3.3.1 Allgemeine Methoden: FFPE-Präparate.....	34
Fixierung.....	34

Einbetten .....	35
Blocken .....	36
Schneiden.....	36
Entparaffinieren .....	37
Eindecken.....	37
3.3.2 Übersichtsfärbungen .....	37
Hämatoxylin-Eosin.....	37
Trichromfärbung nach Masson-Goldner.....	39
Pentachrom nach Movat.....	40
3.3.3 Immunhistochemische Färbungen.....	41
4 Ergebnisse .....	45
4.1 Zellisolation und -charakterisierung .....	45
4.2 Patch-Züchtung.....	47
4.3 Implantation .....	48
4.4 Klinischer Verlauf .....	49
4.5 Laparoskopie .....	51
4.6 Gastroskopie.....	52
4.7 Finalisierung.....	53
4.8 Histologie.....	54
5 Diskussion.....	56
5.1 Entwicklung der Implantate.....	56
5.2 Erprobung am Großtiermodell.....	58
5.3 Histologie.....	61
6 Fazit .....	61
7 Zusammenfassung.....	62
8 Summary .....	63
9 Literaturverzeichnis .....	65
10 Anhang.....	75
10.1 Abkürzungen.....	75
10.2 Einheiten.....	76
10.3 Abbildungen .....	77
10.4 Tabellen.....	78
10.5 Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit.....	79

10.6 Eidesstattliche Erklärung.....	80
10.7 Affidavit .....	80
10.8 Lebenslauf.....	81
10.9 Danksagung.....	82

# 1 Einleitung

## 1.1 Vollwanddefekte gastrointestinaler Hohlgorgane

Der menschliche Körper ist auf einen strukturell sowie funktionell intakten Verdauungstrakt angewiesen. Der Verdauungs- oder Gastrointestinaltrakt umfasst die röhrenförmigen Hohlgorgane Ösophagus, Magen und Darm. Sie erfüllen allgemein bekannte Aufgaben wie den Transport, die Zerkleinerung sowie die Aufnahme der Nahrung. Zugleich bilden sie die Barriere zwischen dem empfindlichen inneren Milieu des Körpers und dem Nahrungsbrei, also der „Außenwelt“. Verletzungen gastrointestinaler Hohlgorgane sind daher potentiell lebensbedrohlich.<sup>1,2</sup> Die klinischen Verläufe und entsprechenden Therapiemaßnahmen sind heterogen und hängen von der Ätiologie, der Größe und Lokalisation sowie dem allgemeinen Zustand des Patienten ab. Typische Ursachen für strukturelle Defekte im Gastrointestinaltrakt sind Entzündungen und Tumore, aber auch verschluckte Fremdkörper.<sup>3,4</sup> Davon abzugrenzen sind iatrogene, also im Rahmen von medizinischen Maßnahmen hervorgerufene Verletzungen. Diese können als Komplikationen bei diagnostischen und/oder operativen Maßnahmen auftreten. Durch den Vormarsch der Endoskopieverfahren zeichnet sich – in absoluten Zahlen betrachtet - eine Zunahme gastrointestinaler Perforationen ab, wobei deren Inzidenz beispielsweise bei rein diagnostischen Vorsorge-Darmspiegelungen mit 0,03 – 0,8 % relativ gering ist.<sup>5</sup> Das Risiko für unbeabsichtigte Perforationen ist bei zusätzlichen Interventionen wie etwa der Entfernung von Kolon-Polypen erhöht und kann je nach Lokalisation und Zustand des Patienten bis zu 10 % betragen.<sup>6,7</sup> Bei Endoskopien des oberen Gastrointestinaltraktes ist das Risiko für unbeabsichtigte Perforationen ebenfalls gering bei ca. 0,03 %.<sup>8</sup> Auch hier gehen spezielle Interventionen wie beispielsweise die Abtragung kleiner Tumore des Magens mit einem erhöhten Perforationsrisiko von bis zu 3,2 % einher.<sup>9</sup> Im Rahmen von abdominalchirurgischen Eingriffen wird das Lumen der gastrointestinalen Hohlgorgane regelhaft eröffnet. Bei der Rekonstruktion müssen die intestinale Kontinuität sowie die Barrierefunktion suffizient wiederhergestellt werden. Eine zentrale Aufgabe des Viszeralchirurgen ist daher der Verschluss bzw. die Verbindung von Hohlgorganen nach der Resektion von Organsegmenten. Die Verbindung unterbrochener Hohlgorgane wird als Anastomose bezeichnet und erfolgt durch eine Naht oder Klammernaht („Stapler“).<sup>10</sup> Durch Erzeugung einer Anastomose verwachsen die Organ-Enden in der Regel miteinander, sodass

die Passage der Nahrung und die Barriere-Funktion gewährleistet bleiben.<sup>11</sup> In einigen Fällen kommt es dabei jedoch zu Komplikationen: Besonders gefürchtet ist die sogenannte Anastomoseninsuffizienz. Dieser Begriff bezeichnet eine postoperativ unzureichend dichte Anastomose mit resultierender Leckage des Hohlorgans. In den meisten Fällen gelangen Verdauungssekret und Gase in das umliegende Gewebe, also die Peritonealhöhle, das Mediastinum oder den Retroperitonealraum, wodurch lebensbedrohliche Infektionen entstehen können.<sup>3</sup> Für das Auftreten von Anastomoseninsuffizienzen wurden zahlreiche Risikofaktoren identifiziert. Eine wesentliche Rolle scheint die Lokalisation der Anastomose zu spielen. Während für den unteren Gastrointestinaltrakt Inzidenzen von bis zu 8,7 % angegeben werden<sup>12,13</sup>, ist im Bereich des oberen Gastrointestinaltraktes nur in 1 bis 3 % der Fälle mit einer Anastomoseninsuffizienz zu rechnen.<sup>14,15</sup> Das Risiko für eine Insuffizienz ist also umso höher, je distaler (aboraler) eine Anastomose im Verlauf des Gastrointestinaltraktes angelegt wurde. Spezielle Untersuchungen in Bezug auf den oberen Gastrointestinaltrakt konnten außerdem die chirurgische Verschlusstechnik, ein fortgeschrittenes Patientenalter, pulmonale und renale Komorbiditäten sowie einen erhöhten intraoperativen Blutverlust, lange Operationsdauer und die simultane Entfernung des großen Netzes (Omentektomie) als Risikofaktoren für eine Anastomoseninsuffizienz identifizieren.<sup>10,16</sup> Die klinischen Befunde sind mitunter sehr variabel und reichen von inapparenten Verläufen oder milden, unspezifischen Symptomen bis hin zu sekundären Peritonitiden mit Septischem Schock und Multiorganversagen. Die Letalität beträgt je nach Studie und Lokalisation der Anastomose zwischen 7 und 17 %.<sup>8,15,17</sup> Zeitlich betrachtet manifestieren sich Anastomoseninsuffizienzen ganz überwiegend innerhalb der ersten drei Wochen nach der Operation, wobei wiederum eine Häufung zwischen dem dritten und fünften postoperativen Tag besteht.<sup>17</sup> Im praktischen Alltag kann der Zeitpunkt der klinischen Manifestation Hinweise auf die Ursache geben. Anastomoseninsuffizienzen aufgrund chirurgisch-technischer Mängel treten oft frühzeitig und innerhalb der ersten 48 Stunden auf. Das Auftreten im späteren postoperativen Verlauf ist häufiger durch patienteneigene oder äußere Faktoren bedingt.<sup>18,19</sup> Diagnostisch bedeutend sind neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung bildgebende Verfahren wie die Computertomographie (CT), die Röntgenkontrastuntersuchung und die Endoskopie. Die CT bietet den höchsten positiven prädiktiven Wert mit ca. 90 %.<sup>17,20</sup> Mit der Endoskopie steht hingegen die Option zur simultanen Intervention zur Verfügung. Das adäquate Therapieverfahren muss unter Berücksichtigung operativ-technischer und funktioneller Eigenschaften des einzelnen

Patienten ausgewählt werden.<sup>21</sup> Prinzipiell kommen zunehmend Clips, Stents, Fibrinkleber oder Vakuum-basierte Techniken zum Einsatz. Diese werden endoskopisch platziert, sodass in manchen Fällen durch eine minimalinvasive Strategie eine erneute Operation vermieden werden kann.<sup>18,21–23</sup>

Wie bereits erwähnt kann nicht nur die Anlage von Anastomosen, sondern auch der sichere Verschluss kleiner, umschriebener Defekte eine Herausforderung darstellen. Ein besonderes Szenario ist die gezielte Eröffnung von Hohlorganen im Rahmen neuartiger Operationstechniken, den sogenannten NOTES-Verfahren (Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery) dar. Der Begriff „NOTES“ wurde im Jahr 2006 eingeführt, nachdem im Jahr 2004 erstmals ein endoskopischer Zugangsweg durch die Magenwand zur Bauchhöhle an Schweinen beschrieben worden war.<sup>24</sup> Daraufhin gründeten sich Arbeitsgemeinschaften in den USA (NOSCAR) und Europa (EuroNOTES), die die Grundidee von NOTES systematisch weiterverfolgten. Mittlerweile ist „NOTES“ ein etablierter Überbegriff für diagnostische und interventionelle Verfahren, bei denen natürliche Körperöffnungen als Zugangswege für operative Eingriffe genutzt werden. Prinzipiell kommen ein transanaler, transvaginaler, transvesikaler und transgastrischer Zugangsweg in Betracht.<sup>25</sup> Über ein in das jeweilige Hohlorgan eingeführte Endoskop kann eine lokale Intervention auf endoluminaler Seite vorgenommen werden, oder mittels Inzision der Organwand ein Zugang zur Bauchhöhle geschaffen werden. Durch die Vermeidung von Hautschnitten erhofft man sich reduzierte Inzidenzen für Wundheilungsstörungen und Narbenhernien. Durch Schonung der Hautdecke könnten postoperative Schmerzen verringert und äußerlich sichtbare Narben völlig vermieden werden. Im Rahmen klinischer Studien sind bereits einzelne Verfahren mit guten Ergebnissen erprobt worden. Die bisher prominentesten Beispiele sind die Perorale Endoskopische Myotomie (POEM) bei Achalasie<sup>26</sup>, die endoskopische Resektion kleiner Tumoren im oberen und unteren Gastrointestinaltrakt<sup>27,28</sup> sowie die Transanale Minimalinvasive Chirurgie (TAMIS) zur Resektion rektaler Tumoren.<sup>29</sup> Bei den genannten Verfahren handelt es sich vorwiegend um Eingriffe zur Behandlung intraluminal oder intramural lokalisierter Pathologien, deren chirurgische Entfernung meist ohne Vollwand-Inzision möglich ist. Bei NOTES-Verfahren mit intraperitonealen Zielstrukturen wie der transvaginalen Cholezystektomie<sup>30–32</sup> oder Operationen im Bauchraum mit transgastralem Zugangsweg müssen die jeweiligen Organe, also die Vagina bzw. der Magen gezielt perforiert werden.<sup>33</sup> Diese Organdefekte bedürfen auch im Rahmen von NOTES einer sichereren Rekonstruktion am Ende der Prozedur,



wobei dies mitunter die größte Hürde für die Einführung von NOTES in die klinische Routine darstellt. Dies erklärt, warum sich bisher nur der transvaginale Zugang in einer randomisiert-kontrollierten Studien behaupten konnte<sup>30</sup>, wobei zu bedenken gilt, dass beim transvaginalen Zugangsweg starre Instrumente verwendet werden können und der Verschluss vaginaler Inzisionen durch eine (Hand-)Naht möglich ist. Der transgastrale Zugang hingegen erfordert eine flexible endoskopische Technik und ist dementsprechend mit technisch größeren Herausforderungen - insbesondere in Hinblick auf die Verschlusstechnik - verbunden.<sup>34</sup> Insuffizient verschlossene Gastrotomien mit konsekutiver Bauchfellentzündung treten nach transgastrischen NOTES-Eingriffen unter Studienbedingungen in 2,3 % der Fälle auf.<sup>35</sup> Aufgrund der unzureichenden Datenlage und der bisher nicht nachgewiesenen Überlegenheit von NOTES gegenüber Standardverfahren wie der Laparoskopie, rechtfertigt eine rationale Nutzen-Risiko-Abwägung die Implementierung transgastraler Eingriffe derzeit noch nicht.

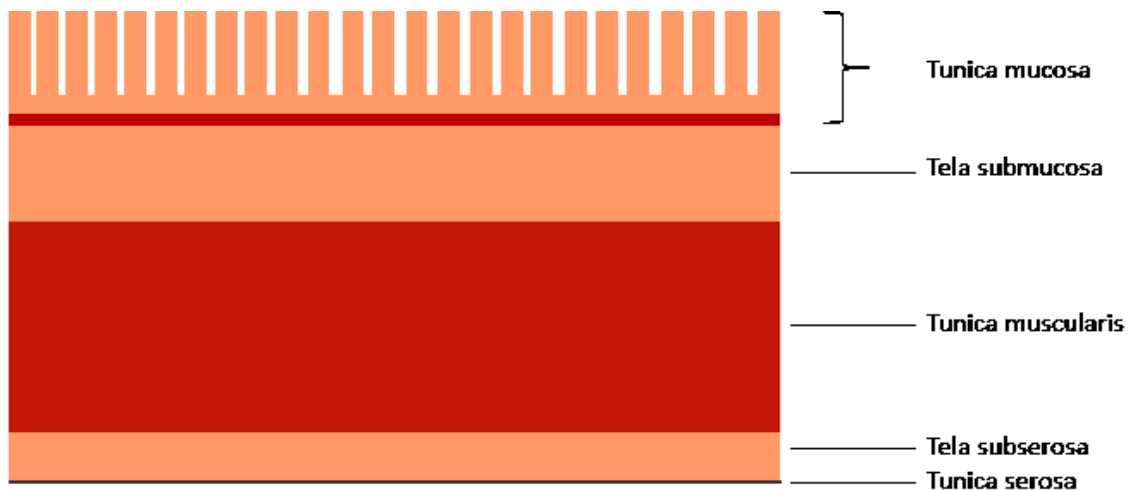
Die Vielzahl der aufgezeigten Problemfelder verdeutlicht die Relevanz optimierter Therapieoptionen bei gastrointestinalen Hohlorgandefekten. Angesichts der zahlreichen und heterogenen Szenarien, die mit strukturellen Defekten der gastrointestinalen Hohlorgane einher gehen können, bedarf es sicherer und für den Spezialfall zugeschnittenen Behandlungsoptionen.

## 1.2 Anatomie und Physiologie des Magens

Der Magen liegt in der Bauchhöhle, also intraperitoneal und unterhalb des Zwerchfells im Oberbauch, dem sogenannten Epigastrium. Die Magenvorderseite liegt der Bauchwand an, während die hintere Seite die ventrale Begrenzung des Netzbeutels, der sogenannten Bursa omentalis bildet. Bei der Form des Magens unterscheidet man eine große und eine kleine Krümmung, entlang derer die wichtigsten Blutgefäße verlaufen und arkadenförmige Gefäßverbindungen (Anastomosen) bilden. Der Magen verfügt daher über eine sehr gute Blutversorgung mit vier arteriellen Hauptästen, welche dem Stromgebiet des Truncus coeliacus entspringen. Die venöse Drainage erfolgt via Pfortader in die Leber, der lymphatische Abfluss über drei Lymphknotenstationen in den Ductus thoracicus. Der mikroskopische Wandaufbau des Magens ist schematisch in **Abbildung 1** dargestellt. Histologisch lassen sich die Schichten Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis, Tela subserosa und Tunica serosa unterscheiden. Die Tunica mucosa lässt sich weiter

untergliedern in Lamina epithelialis, Lamina propria und Lamina muscularis mucosae. Die Schleimhaut ist von Drüsen durchsetzt, welche über sogenannten „Magengrübchen“ (Foveolae gastricae) Sekret nach endoluminal sezernieren. Die schlauchförmig (tubulös) geformten Drüsen werden hauptsächlich von drei Zelltypen gebildet: Man unterscheidet die Nebenzellen, Parietalzellen und Hauptzellen. In wesentlich geringerer Zahl findet man außerdem Stammzellen und endokrine Zellen. Das Verhältnis der einzelnen Zelltypen variiert je nach Lokalisation im Magen. Anhand dieser Verteilungsmuster gliedert sich der Magen von oral nach aboral in die Abschnitte Pars cardiaca, Fundus gastricus, Corpus gastricum und Pars pylorica. Die Tunica muscularis umfasst die unterschiedlich verlaufenden Muskelschichten Fibrae obliquae, Stratum circulare und Stratum longitudinale. Die nervale Innervation des Magens übernimmt wie im gesamten Gastrointestinaltrakt das in zwei Plexus angelegte enterische Nervensystem, welches dem modulierenden Einfluss des vegetativen Nervensystems, also Sympathikus und Parasympathikus unterliegt.

Funktionell übernimmt der Magen eine Reservoir-Funktion und sorgt für die Zerkleinerung der Nahrung. Den verschiedenen Drüsenzellen entstammen unterschiedliche Sekrete, die an der Verdauung der Nahrung beteiligt sind. So produzieren die Hauptzellen Vorstufen von Verdauungsenzymen. Die Belegzellen erzeugen durch Abgabe von Wasserstoffionen, also Protonen, das saure Milieu im Magen. Dieses wiederum erfordert eine Schutzschicht, die ihn von innen auskleidet und vor der „eigenen Verdauung“ schützt. Dafür sorgen Eiweiß-Zucker-Moleküle, welche in den Nebenzellen produziert werden und sich schützend über die Magenschleimhaut legen. Kommt es an der Magenwand zu einem Missverhältnis zwischen aggressiven und protektiven Faktoren, können Entzündungen, Ulzerationen oder gar Perforationen resultieren. Die hier skizzierten anatomischen und (patho-)physiologischen Eigenschaften des Magens sind beim Menschen und den verwendeten Versuchstieren im Wesentlichen identisch.<sup>36</sup>



**Abbildung 1:** Schematischer Aufbau der Magenwand im Querschnitt. Gewebeschicht zur luminalen Seite des Magens oben (*Tunica mucosa*), äußere Schicht zur Bauchhöhle hin unten (*Tunica serosa*). Dazwischen befindet sich die Bindegewebsschicht (*Tela submucosa*) sowie die prominente glatte Muskulatur (*Tunica muscularis*).

### 1.3 Wundheilung im Gastrointestinaltrakt

Bei Verletzungen gastrointestinaler Hohlorgane reagiert der Organismus mit einer typischen Prozesskaskade, welche auf die Wiederherstellung der Struktur und Funktion des jeweiligen Organs abzielt. Chronologisch betrachtet kann man die drei Phasen *Inflammation*, *Proliferation* und *Reparation* unterscheiden. Die Inflamationsphase wird unmittelbar durch das Trauma initiiert und dauert ca. 4 Tage. Die vordergründigen pathophysiologischen Vorgänge sind dabei die Blutgerinnung mit Exsudation von Fibrin und die Ödembildung. Durch die nachfolgende Einwanderung von Abwehrzellen kommt es zur Entzündung, also einer Inflamationsreaktion. Wichtige Zelltypen sind dabei Neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Sie dienen der Abwehr eindringender Mikroorganismen und produzieren Signalstoffe (sog. Zytokine), welche die Einwanderung weiterer Immunzellen fördern. Des Weiteren sezernieren sie Gewebe-abbauende Enzyme und bewerkstelligen den Abtransport von Zell- und Geweberesten. Zentraler Prozess der Inflamationsphase ist der Abbau des alten Kollagens durch Enzyme wie Kollagenasen, vor allem im Bereich der Submucosa. Zunächst überwiegt daher der Kollagen-Abbau die Kollagen-Synthese bis zum ca. fünften postoperativen Tag. Dabei ist die mechanische Belastbarkeit der Anastomose initial sehr gering und hängt in diesem Zeitintervall vorwiegend von der Haltbarkeit der angelegten Naht ab. Hierzu sei angemerkt, dass aufgrund dieser Tatsache Anastomoseninsuffizienzen innerhalb der ersten postoperativen Tage oft auf technische Mängel zurückzuführen sind.<sup>11</sup>

Die anschließende Proliferationsphase kennzeichnet sich durch Einwanderung von Fibroblasten, Gefäßeinsprossungen und Migration von Endothelzellen, was als Granulationsgewebe bezeichnet wird. Die Fibroblasten sind für die Kollagensynthese, vor allem im Bereich der Submukosa zuständig. Auf dieser Gewebsschicht liegt nach Abschluss der Wundheilung die mechanische Hauptlast. Zunächst wird vor allem elastisches Kollagen-III gebildet, im Verlauf kommt es zu einer vermehrten Produktion von reißfestem Kollagen I. Gleichzeitig wandern Epithelzellen von den Wundrändern in den Defektbereich ein und bilden eine neue luminale Barrierschicht. Diese Vorgänge spielen sich in der Regel innerhalb der ersten 14 Tage ab. Anschließend setzt die Reparationsphase ein und es kommt zu langwierigen Wiederherstellungsprozessen (*Remodeling*). Diese gehen mit weiteren Modifikationen der Kollagenfibrillen einher, wodurch die Reißfestigkeit erhöht wird. Der Anknüpfungspunkt der in dieser Arbeit untersuchten Methode ist die gezielte Platzierung von autologen, also körpereigenen Fibroblasten im Wundgebiet mit Hilfe einer biokompatiblen Matrix. Die Fibroblasten werden dabei als Effektorzellen eingesetzt, welche vor allem eine frühzeitige Kollagensynthese gewährleisten und damit die Wundheilung beschleunigen sollen.

## **1.4 Etablierte Methoden zum Verschluss der eröffneten**

### **Magenwand**

Nach Eröffnung der Magenwand im Rahmen von operativen Eingriffen, erfolgt die Rekonstruktion in der Regel mittels Hand- oder Klammernaht.<sup>37</sup> Diese Techniken stellen den Goldstandard dar, an denen sich neue Methoden messen müssen.<sup>38</sup> Die Bestrebungen hin zu möglichst minimaler Invasivität bei viszeralchirurgischen Interventionen machen allerdings neuartige, insbesondere endoskopisch anwendbare Verschlussstechniken erforderlich. Hierzu hat die zuständige europäische Fachgesellschaft (ESGE) im Jahr 2014 Handlungsempfehlungen für verschiedenen Situationen formuliert.<sup>39</sup> Im Rahmen von Endoskopien unmittelbar erkannte Perforationen mit bis zu 30mm Durchmesser sollen primär endoskopisch mit Clips versorgt werden, da dies eine klinische Erfolgsrate von über 90 % erwarten lässt.<sup>40</sup> Bei kleinen Defekten bis ca. 10 mm Durchmesser werden sogenannte Endoclips empfohlen. Dabei handelt es sich um Metallclips, welche durch den Arbeitskanal des Endoskops platziert werden können.<sup>41</sup> Seit der Einführung Mitte der 1970er Jahre wurde

diese Technik optimiert und zum Verschluss kleiner Defekte oder zur Blutstillung im Gastrointestinaltrakt eingesetzt. Bei größeren Defekten im Bereich von 10 – 30 mm Durchmesser sollen sogenannte Over-The-Scope-Clips (OTSC) verwendet werden.<sup>39,42</sup> OTSC sind Metallklammern deren Mechanismus mit dem einer sich schließenden „Bärenfalle“ vergleichbar ist. Seit deren Einführung im Jahr 2007 haben sich OTSC als endoskopische Technik zur Behandlung von Perforationen, Anastomoseninsuffizienzen, Fisteln und Blutungen etabliert. Es liegt eine vergleichsweise hohe Anzahl wissenschaftlicher Untersuchungen zu dieser Technologie vor. In einer systematischen Übersichtsarbeit zur Therapie von Vollwanddefekten gastrointestinaler Hohlorgane wurde der technische Erfolg mit 80 bis 100 % sowie die klinische Erfolgsrate mit 57 bis 100 % ermittelt.<sup>43</sup> Eine aktuelle Metaanalyse, in der 351 Perforations-Fälle und 97 Anastomoseninsuffizienzen mit OTSC behandelt wurden, bescheinigte in 84,6 % bzw. 66 % klinischen Erfolg.<sup>44</sup> Die relativ geringe Erfolgsrate bei Anastomoseninsuffizienzen führen die Autoren auf den sekundären Einsatz der Technik und die damit einhergehende zeitliche Verzögerung zurück. Die Konstellation unmittelbar erkannter und relativ kleiner Vollwanddefekte liegt analog auch bei transgastralen NOTES-Verfahren vor, sodass der suffiziente Verschluss - den genannten Empfehlungen entsprechend - problemlos zu bewerkstelligen sein dürfte. In experimentellen Tierstudien wurde die Machbarkeit von Clip-basierten Verschluss-Techniken bei transgastrischen NOTES gezeigt, was auch in klinischen Studien mit guten Ergebnissen reproduziert werden konnte.<sup>45</sup> Weitere neue Methoden zum endoskopischen Defektverschluss am Magen wurden bisher nur präklinisch erprobt. Zu nennen sind Kombinationen verschiedener Clip- und Occluder-Techniken<sup>39,46</sup>, sowie völlig neu entwickelte Apparate, welche (Klammer-) Nähte auf endoskopischer Ebene ermöglichen. Eine weitere erwähnenswerte Technologie ist OverStitch.<sup>47-49</sup> Obwohl sich einige Methoden wie z. B. OTSC bereits etablieren konnten, wird die Suche nach neuen Technologien weiter vorangetrieben. Im Fokus neuerer Untersuchungen stehen auch biotechnologische Konzepte, die das Armamentarium zur Therapie gastrointestinaler Defekte in Zukunft ergänzen könnten.<sup>46,50</sup>

## 1.5 Tissue Engineering

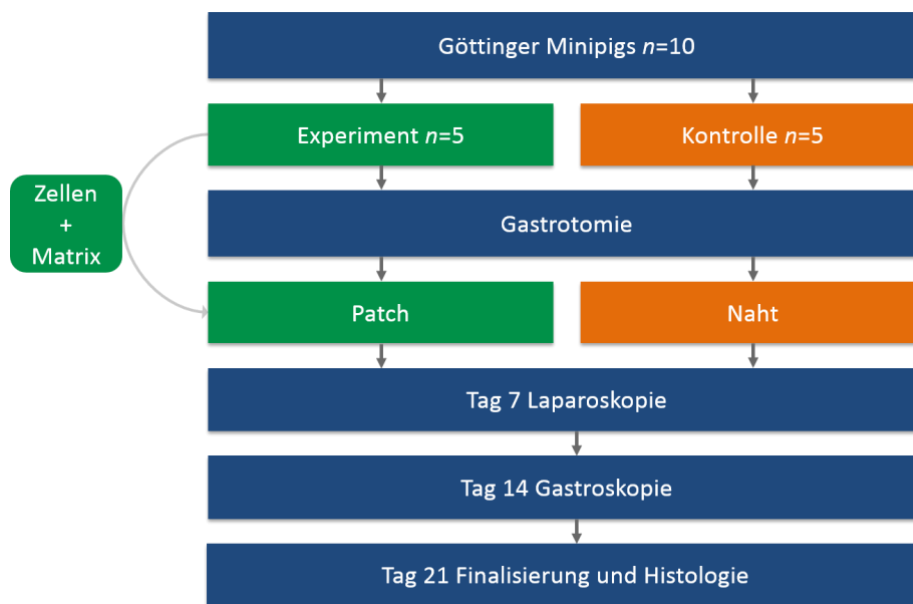
Der Begriff „Tissue Engineering“ beschreibt ein interdisziplinäres Forschungsgebiet und stellt ein Teilgebiet der Regenerativen Medizin dar. Im Fokus steht die Produktion personalisierter Implantate, welche die strukturelle und funktionelle Regeneration geschädigter Organe unterstützen sollen. Die Vorteile sind die Unabhängigkeit von Organspenden, Vermeidung von Abstoßungsreaktionen und die Möglichkeit der individuellen Anpassung der Implantate. Neben diesen kurativen Ansätzen wurden in-vitro produzierte Gewebe auch als Testsysteme für die pharmakologische, infektiologische und die onkologische Forschung etabliert. Durch die dreidimensionale Anordnung der kultivierten Zellen sollen biologische Prozesse genauer simuliert werden als eine 2D-Zellkultur es leisten kann.<sup>51,52</sup> Grundvoraussetzung für alle Methoden des Tissue Engineering ist die Gewinnung von Zellen aus entsprechenden Gewebeproben. Im Labor - der sogenannten *Zellkultur* - werden die Zellen isoliert und vermehrt, bei Bedarf konserviert und schließlich auf biokompatible Trägermaterialien unterschiedlicher Form und Größe ausgesiedelt. Auf diese Weise erhält man nach einer gewissen Inkubationszeit Zell-basierte Konstrukte, welche als Implantate oder Testsysteme eingesetzt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde ein klassisch-kuratives Tissue Engineering-Verfahren untersucht, weshalb auf die Thematik der Testsysteme nicht weiter eingegangen werden soll. Das Prinzip, gezüchtete Gewebe zur Heilung bzw. Regeneration struktureller Defekte zu verwenden, wurde inzwischen von zahlreichen medizinische Fachdisziplinen aufgegriffen. Schwerpunkte bisheriger Forschung auf dem Gebiet des Tissue Engineering sind bisher vor allem Herzklappen, Haut, Knorpel und Kreuzbändern, aber auch Luftröhren, Blutgefäßen und Hornhaut.<sup>53</sup> Dabei liegt eine besondere Herausforderung in der Entwicklung verbesserter Trägerstrukturen (Matrix),<sup>54</sup> die den Zellen die Möglichkeit zur Adhärenz geben und immunologisch verträglich sind. Außerdem sollen die Materialien primär Stabilität gewährleisten, um Substanzdefekte mechanisch überbrücken zu können. Darüber hinaus muss das Einwachsen von Blutgefäßen sowie die Resorption durch den Organismus erfolgen können, um den Ersatz durch neu produziertes Gewebe zu ermöglichen (Remodeling). Als Trägermaterialien werden Konstrukte aus Polymeren, also großen Molekülketten verwendet.<sup>54</sup> Man unterscheidet natürliche und synthetische Polymere: Erstere orientieren sich an biologischer Extrazellulärmatrix und umfassen Proteine (Kollagen, Elastin, Seide) sowie Polysaccharide (Chitosan, Hyaluronsäure, Alginat). Als synthetische Bausteine

kommen Poly-(Milchsäure)Ester (z. B. PLA, PLGA) in Frage. Für alle Materialien stehen prinzipiell unterschiedliche Herstellungstechniken wie Elektrosponning, 3D-Druck, Hydrogele und Mikropartikel zu Verfügung.<sup>53,55</sup> Diese künstlich erzeugten Trägermaterialien werden jedoch den genannten Anforderungen bisher nicht gerecht. Als Trägermaterialien werden daher noch überwiegend azellularisierte Gewebe menschlichen oder tierischen Ursprungs verwendet, die durch Azellularisierung von Geweben bzw. Organen gewonnen werden. So erhält man immunologisch weitgehend neutrale und morphologisch präformierte Trägerstrukturen. Die Herstellungsmethoden und Qualitätsanforderungen sind bisher jedoch international kaum standardisiert oder gar vergleichbar.<sup>56</sup> Relativ verbreitet und gut untersucht ist die sogenannte Small intestinal submucosa (kurz SIS) die aus azellularisiertem Schweinedünndarm besteht. In zahlreichen präklinischen Arbeiten konnte das Potential in der Regenerationsförderung mit guter Biokompatibilität gezeigt werden.<sup>57</sup> Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde SIS aus Institut-interner Herstellung verwendet und mit autologen (Körper-eigenen), kutanen Fibroblasten besiedelt.

## **1.6 Fragestellung und Strategie**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Erprobung einer neuartigen biotechnologischen Therapiemethode für Vollwanddefekte des Magens. Das Forschungsprojekt gliederte sich in einen zellbiologischen Laborteil, die Phase der Großtierversuche sowie histologische Untersuchungen. Für das Großtiermodell wurden zehn Göttinger Minischweine in zwei Gruppen (Experimental- und Kontrollgruppe) mit jeweils fünf Tieren aufgeteilt. Für die Tiere der Experimentalgruppe wurden zellbasierte Implantate nach dem klassischen Prinzip des Tissue Engineerings hergestellt. Es erfolgten die primären Operationen, bei welchen alle Tiere eine Oberbauchlaparotomie mit anschließender Eröffnung der Magenwand erhielten. In der Experimentalgruppe dienten die zuvor hergestellten Implantate der Defektdeckung, während in der Kontrollgruppe ein Nahtverschluss als Goldstandard vorgenommen wurde. Die Nachbeobachtung war im Sinne eines Überlebensversuches über vier Wochen angelegt. Neben der allgemeinen täglichen Beobachtung erfolgten nach 7 Tagen Bauchspiegelungen und nach insgesamt 14 Tagen Magenspiegelungen, um die makroskopischen Verhältnisse zu beurteilen. Nach vier Wochen wurden alle Tiere euthanasiert, die entsprechenden Magenanteile explantiert und der histologischen Aufarbeitung zugeführt. Das primäre Ziel

war die erfolgreiche Durchführung der Einzelschritte im Labor und im Tier-OP sowie deren Verknüpfung zu einem realistischen Gesamtkonzept. Die einzelnen Verfahren im Labor und insbesondere die Implantat-Herstellung basierten auf einzelnen etablierten Methoden. Der Ablauf des Forschungsprojektes ist in **Abbildung 2** dargestellt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Projektes mit wesentlichen Teilschritten. Die beiden Vergleichsgruppen sind farblich hervorgehoben (Experimentalgruppe grün, Vergleichsgruppe orange), identische Schritte in beiden Gruppen sind blau hinterlegt.

## 2 Material und Göttinger Minischweine

### 2.1 Material

**Tabelle 1:** Geräte und Verbrauchsmaterial.

Bezeichnung	Modell/Markenname	Hersteller
Absaugeinrichtung	BVC control	Vacubrand, Wertheim (D)
Blutröhrchen EDTA / Serum	n.a.	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnbrecht (D)
Brutschrank	BBD 6220	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Dampfgarer	MultiGourmet 3216	Braun, Kronberg im Taunus (D)



Deckgläser	24 x 24mm BB024024A1	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig (D)
Deckgläser	24 x 60mm 9.160830	Lab Logistics Group GmbH, Hambuch (D)
Dunstabzug	n.a.	Prutscher, Neudörfel (D)
Einbettautomat	Microm STP 120	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Einbettkassetten	n.a.	n.a.
Einmalpipetten	5/10/25/50 ml Stabpipette, nerbe-plus bzw. greiner bio	
Endoskopie-Einheit	TELE PACK VET X	Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen (D)
Fettstift	Dako Pen	Dako, Glostrup (DK)
Gastroskop	n.a.	Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen (D)
Glasbehälter	diverse Volumina	Schott AG, Mainz (D)
Glasküvetten	n.a.	n.a.
Glaspipetten	n.a.	n.a.
Heizspirale	ET basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen (D)
Inversionsmikroskop	Axiovert 40	Carl Zeiss AG, Oberkochen (D)
Kassettendrucker	n.a.	VOGEL GmbH & Co. KG, Fernwald (D)
Kühlplatte	EG1150C	Leica Biosystems, Nussloch (D)
Kühlschrank	HERAFreeze HFU B	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Kryoröhrchen	n.a.	n.a.
Laparoskop 30°-Optik	n.a.	Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen (D)
Mikroskop	Keyence	Osaka (JPN)
Nahtmaterial	3 PDS SH 1	Markierungsfaden

	1 PDS II CTX PLUS 48 mm 1/2c 90 cm Ethicon	Fasziennaht
	2-0 Prolene FS 26 mm 3/8 75 cm	Hautnaht
	3-0 Vicryl Plus SH plus 26 mm 1/2c 90 cm Ethicon	Verschluss Gastrotomie
	5-0 PDS II JRB-1 Ethicon	Haltefäden Patch
	6-0 Vicryl P-1 11 mm 3/8 45 cm	Naht Patch
Hämozytometer	Neubauer-Zählkammer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Objektträger	Polysine®	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig (D)
Objektträgerdrucker	n.a.	VOGEL GmbH & Co. KG, Fernwald (D)
Paraffinausgießstation	EG1150H	Leica Biosystems, Nussloch (D)
Pasteurpipetten	n.a.	n.a.
Petrischalen	diverse Größen	TPP AG, Trasadingen (CH)
Pinzetten	n.a.	n.a.
Pipetten	Research® Plus 10/100/1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Pipettenspitzen	n.a.	n.a.
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim (D)
Pulsoxymeter	n.a.	n.a.
Reagiergefäße	SafeSeal Micor Tubes	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht (D)
Schlittenmikrotom	SM2010R	Leica Biosystems, Nussloch (D)
Sicherheitswerkbank	SAFE 2020 1.8 DIN 12469: 2000, Class II	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Skalpelle	n.a.	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen (D)
Sprühpflaster	Hansaplast®	Beiersdorf AG, Hamburg (D)
Trägerkörbe	Glas/Metall	n.a.
Trokare mm	n.a.	n.a.

Trockenofen	TDO 66	Medite, Burgdorf (D)
Urinbecher	n.a.	n.a.
Verschlussfolie	Parafilm <sup>®</sup> M	Bemis, Oshkosh (USA)
Wasserbad	Paraffin-Streckbad 1052	GFL GmbH, Burgwedel (D)
Wellplatten	Zellkulturtestplatte 12-/96-fach	TPP AG, Trasadingen (CH)
Wundversorgungsset	VW-Set, Behandlungseinheit nach Art. 12 der Richtlinie über Medizinprodukte 93/42/EWG Lot Nr. 77599x	Covidien <sup>™</sup> , Dublin (IRL)
Zellkronen		TERM Würzburg
Zellkulturflaschen	T75 90076	TPP AG, Trasadingen (CH)
Zentrifuge	Multifuge X1R	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Zentrifugenröhrchen	CELLSTAR <sup>®</sup> 15/50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster (D)
Zytozentrifuge	Cytospin <sup>™</sup> 4	Thermo Scientific, Waltham (USA)

**Tabelle 2:** Chemikalien der Zellkultur und Histologie (in-vitro).

Bezeichnung	Produktbezeichnung/Handelsname	Hersteller
Ablösepuffer	Trypsin/EDTA 0,05% in PBS <sup>-</sup> im Verhältnis 1:10	n.a.
Alcianblau	8 GS C.I. 74240 10 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Alkalischer Alkohol	n.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Antikörper	$\alpha$ -smooth-muscle-actin	IgG2a, ab7817, Abcam plc, Cambridge (UK)
	CD31/PECAM1	Rabbit polyclonal IgG ABIN726140, antikörper-online.de, Aachen (D)

	Desmin	Rabbit polyclonal IgG, ABIN965994, antikörper-online.de, Aachen (D)
	Kollagen III	Anti-COL3A1, Sigma- Aldrich, Heidelberg (D)
	Vimentin	Mouse Anti-Vimentin antibody IgG1, ab8069, Abcam plc, Cambridge (UK)
Antikörper- Verdünnungspuffer	LabLine 500 ml	Innovative Diagnostik- Systeme, Hamburg (D)
Antibiotika	Penicillin-Streptomycin 10.000 Units Penicillin G, 10 mg Streptomycin/mL	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
	Gentamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
	Metronidazol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Antimykotika	Amphotericin B	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Brillant Crocein- Säurefuchsin	n.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Citratpuffer	n.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Dimethylsulfoxid	D2438-50	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Dispase	Dispase® 17105-041 5 g 4 U/ml	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Eindeckmittel	Entellan®	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Enthaarungscreme	Veet	Reckitt Benckiser, Heidelberg (D)
Eosin B	Lot Nr. MKBL4929V	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Essigsäure	Acetic acid ReagentPlus® ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethanol	99 % 5 l	Walter CMP GmbH & Co. KG, Kiel (D)
Fetales Kälberserum (FCS)	F7524, LOT N° 022M3395	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Roti®-Histofix	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Flüssignahrung	Fresubin® original Drink 4 x 200 ml Schokolade/Vanille	Fresenius Kabi, Bad Homburg (D)
	Fresubin® original 1500 ml	
Gefrierbehälter	Mr. Frosty™	ThermoFisher Scientific
Hämatoxylin nach Mayer	Art.Nr. 10231	Morphisto Evolutionforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main (D)
Hämatoxylin nach Weigert A/B	Eisenhämatoxyline A: 2E-032/B: 2E-052	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster (D)
Hautantiseptikum (Isopropylalkohol 70%, Chlorhexidingluconat 2%)	ChloroPrep© gefärbt, 26 ml Applikator	CareFusion Corporation U.K. 244 LTD., Reigate (UK)
HCl-Alkohol	n.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
IHC-Kit	SuperVision 2 HRP	Innovative Diagnostik- Systeme, Hamburg (D)
Isopropanol	ACS reagent ≥ 99,8 %,	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Kollagenase	10103586001 0,253 U/ml, 500 mg	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
Kulturmedium	90 % DMEM	
	10 % FCS	
Leitungswasser	Würzburger Versorgungs-und Verkehrs-GmbH pH 7,15 (Analyse: August 2016)	
Lichtgrün	n.a.	Chroma-Gesellschaft Schmid & Co., Stuttgart-Untertürkheim (D)
PBS <sup>+</sup> /PBS Fertiglösung	n.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
PBS <sup>-</sup> Pulver	L 182-50	Biochrom GmbH, Berlin (D)
Phosphorwolframsäure	n.a.	n.a.
Phosphorwolframsäure- Orange G	n.a.	n.a.
Ponceau de Xylidine	1B-207 10 g, Lot Nr. 322722	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster (D)
Saffron du Gatinais	n.a.	
Säurefuchsin	S 1B-525 10 g, Lot Nr. 211824	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster (D)
Trypanblau	T8154 0,4 % 100 ml	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Voll-entsalztes Wasser	n.a.	
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Perhydrol <sup>®</sup> 30 % 107209	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Xylol	ACS reagent ≥ 98,5 % xylenes	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

**Tabelle 3** Medikamente (in-vivo).

Wirkstoff (Handelsname)	Konzentration	Applikationsform	Erklärung
Azaperon (Stresnil®) Janssen-Cilag GmbH, Neuss (D)	40 mg/ml	i.m.	Hypnotikum
Ketaminhydrochlorid (Ketavet®) Pharmacia & Upjohn, Uppsala (SE)	100 mg/ml	i.m.	Hypnotikum, Analgetikum
Atropin	0,5 mg/ml	i.m.	Parasympathikolyse
Ursotamin®	100 mg/ml	i.m.	Hypnotikum, Analgetikum
Fentanyl	0,1mg/ml	i.v.	Analgetikum
Isofluran	1,5 – 3 %	p.i.	Hypnotikum
Flunixin (Finadyne®)	50 mg/ml		Analgetikum, Antiphlogistikum, Antipyretikum
Vetrimoxin LA® (Amoxicillin)	150 mg/ml	i.v.	Antibiotikum
Pantoprazol	40 mg	i.v.	Protonenpumpeninhibitor
Heparin	5.000 I.E.=0,2 ml	s.c.	Antikoagulans
Ringerlösung, B.Braun	500 ml	i.v.	Kristalloid
Embutramid + Mebezonium + Tetracain (T61®), MSD-Tiergesundheit, Unterschleissheim (D)	200 + 50 + 5 mg / 1 ml	i.v.	Mischpräparat zur Euthanasierung von Tieren

## 2.2 Göttinger Minischweine

Sogenannte Minischweine werden seit den 1940er Jahren gezielt für die medizinische Forschung gezüchtet. Forschungslabore auf der ganzen Welt haben inzwischen eigene Züchtungen hervorgebracht, weshalb Bezeichnungen wie „Minnesota“, „Yucatan“ oder

„Göttingen“ verwendet werden. In dieser Arbeit fanden speziell Göttinger Minischweine Verwendung. Sie wurden Anfang der 1960er Jahre in der gleichnamigen deutschen Stadt aus anderen Minischweinearten und deutschen Landrasse-Schweinen gezüchtet. Die Vorteile von Minischweinen sind ihre vergleichsweise geringe Körpergröße und -masse, was die Haltung erleichtert und den Bedarf an Futtermittel und Medikamenten reduziert.<sup>36</sup> Gleichzeitig ist die Anatomie und Physiologie dem des menschlichen Körpers sehr ähnlich, sodass sie ein ideales Tiermodell für die medizinische Forschung darstellen. Insbesondere der Gastrointestinaltrakt ist dem des Menschen ähnlich.<sup>58</sup> Um das neuartige Verfahren operativ-technisch und hinsichtlich der menschlichen Proportionen bestmöglich beurteilen zu können, wurde dieses Großtiermodell herangezogen. In den Tabellen 4 und 5 sind die Tiere der beiden Gruppen mit ihren Merkmalen deskriptiv aufgeführt.

**Tabelle 4:** Merkmale der Kontrollgruppe.

<b>Tier-Nr.</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter bei primär-OP</b>	<b>Gewicht bei primär-OP [kg]</b>
91	männlich/kastriert	3 Jahre + 5 Monate	33
80	männlich/kastriert	2 Jahre + 11 Monate	34
83	männlich/kastriert	2 Jahre + 4 Monate	40
76	männlich/kastriert	3 Jahre + 4 Monate	29
84	männlich/kastriert	2 Jahre + 4 Monate	29

**Tabelle 5:** Merkmale der Experimentalgruppe.

<b>Tier-Nr.</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter bei primär-OP</b>	<b>Gewicht bei primär-OP [kg]</b>
75	männlich/kastriert	3 Jahre + 4 Monate	33
88	männlich/kastriert	3 Jahre + 5 Monate	42
90	weiblich	3 Jahre + 5 Monate	37



78	männlich/kastriert	3 Jahre + 4 Monate	39
79	weiblich	3 Jahre + 4 Monate	38

## 2.3 Small intestinal submucosa (SIS)

Zur Herstellung der Implantate wurde als Trägerstruktur sogenannte „Small intestinal submucosa“ (SIS), also azellularisierter Dünndarm von Schweinen verwendet. SIS ist bereits vielfach als biokompatibles Material mit und ohne Zellbesiedelung zur Defektdeckung z.B. bei chronischen Wunden, Herzfehlern und gastrointestinalen Erkrankungen erfolgreich untersucht worden.<sup>59-61</sup> SIS besteht vorwiegend aus Kollagen, Fibronectin, Glykosaminoglykanen sowie Proteoglykanen und ist reich an Wachstumsfaktoren wie „Fibroblast Growth Factor“ (FGF-2) sowie „Transforming Growth Factor -Beta-1“. Die Dicke des Materials wird je nach Quelle mit 50 bis 300 µm angegeben<sup>57,60</sup>, wobei auch die mehrschichtige Anwendung des Materials beschrieben wurde.<sup>60</sup> In Tierstudien mit SIS konnte außerdem eine geringe Immunogenität und eine gute Biokompatibilität nachgewiesen werden<sup>62</sup>, was bedeutet, dass kaum Abstoßungsreaktionen auftreten und im Anschluss eine Resorption des Materials erfolgt. Vor diesem Hintergrund fiel die Wahl auf SIS als Trägerstruktur für die Implantate. Das Material wurde in einem internen Herstellungsverfahren des Instituts gemäß der entsprechenden SOP gewonnen. Für die Implantate der vorliegenden Arbeit erfolgte der Einsatz von SIS der Charge Nr. 1 (22.11.2013) verwendet.

## 3 Methoden

### 3.1 Methoden der Zellkultur

#### 3.1.1 Entnahme von Hautbiopsien

Im Zuge der Biopsat-Entnahme befanden sich alle fünf Tiere der Experimentalgruppe in einem adäquat analgosedierten Zustand. Hierfür wurden - wie in der Veterinärmedizin bei Schweinen üblich – 5 ml Stresnil und 2 ml Ketavet im Nackenbereich intramuskulär appliziert. Nach Wirkeintritt dieser Medikamente konnten die Tiere auf den Rücken gedreht und Enthaarungscreme in beide Inguinalfalten aufgebracht werden. Es erfolgte die Lagerung

auf dem Rücken, Abspreizen der Hinterläufe, die Enthaarung und Desinfektion der Inguinalfalten. Zur Enthaarung hatte in Vorübungen das Auftragen einer handelsüblichen Enthaarungscreme mit anschließend mechanischer Haarentfernung gute Ergebnisse geliefert. Als Hautdesinfektion kam ein handelsübliches Gemisch aus Isopropanol und Chlorhexidin (Chloraprep®) zum Einsatz, welches mithilfe des Fertig-Applikators aufgetragen wurde. Pro Versuchstier wurde mit einem sterilen Skalpell aus beiden Leisten jeweils ein ca. 2,5 x 2,0 cm großes Hautstück exzidiert und in kaltes Transportmedium in sterilen Urinbechern überführt. Der Wundverschluss erfolgte mit einer fortlaufenden überwendlichen Naht nach Kürschner und dem Auftragen von Sprühpflaster. Als Transportmedium für die Hautproben diente 50 ml DMEM mit 1% v/v Penicillin/Streptomycin und 1% v/v Gentamycin ohne Zusatz von FCS. Da am Entnahmeort (Tierstall) Temperaturen um den Gefrierpunkt herrschten und der Transport in einer Isoliertasche (ohne Eis) erfolgte, konnte eine ununterbrochene Kühlkette bis zum Eintreffen im Labor (nach ca. einer Stunde) sichergestellt werden. Dort wurden die Proben in einen Kühlschrank mit 4 °C überführt und innerhalb von 6 Stunden wie unten beschrieben weiterverarbeitet.

### **3.1.2 Isolation primärer Fibroblasten aus Schweinehaut**

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten an einer Sicherheitswerkbank und gemäß den üblichen Methoden der Zellkulturtechnik (Abschnitt 3.1.3). Da eine hohe mikrobielle Keimbelastung der Hautproben im Milieu des Tierstalls vermutet wurde, lag bei der Überführung der Biopsate ins Labor ein besonderes Augenmerk auf der Verhinderung der mikrobiellen Kontamination. Alle Proben wurden unter der Sicherheitswerkbank in sterilen Petrischalen fünf Mal mit PBS-Spüllösung gewaschen, in schmale Streifen geschnitten und in frischen Petrischalen erneut drei Mal gewaschen. Über Nacht lagerten die Gewebestreifen in 10 ml Dispase-Lösung bei 4 °C. Das Enzym Dispase gehört zu den Proteasen und löst Zell-Matrix-Kontakte auf. Nach ca. 16 Stunden Einwirkzeit und erneutem Spülen mit PBS<sup>+</sup> konnte die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis abgezogen werden. Nach Verwerfen der Epidermis wurde die verbliebene Dermis mit einem Skalpell in einer frischen Petrischale zerkleinert. Nach Zugabe von 10 ml Kollagenase-Lösung und Überführen in ein Zentrifugenröhrchen erfolgte eine Inkubation für 45 Minuten im Brutschrank bei 37 °C, eine Zentrifugation bei 1200 rpm für fünf Minuten und die Entfernung des Überstandes. Das

Gewebe wurde mit 10 ml Kulturmedium gewaschen und schließlich mit 3 ml Kulturmedium in eine T75-Zellkulturflasche gegeben. Am Folgetag wurden 2 ml Kulturmedium mit 1 % v/v Penicillin/Streptomycin, 1 % v/v Gentamycin sowie 1 % v/v Metronidazol zugegeben und weitere 2 Tage später die Gewebereste aus den Kulturflaschen entfernt. Alle 48 Stunden erfolgte dreimaliges vorsichtiges Spülen der Kulturen mit PBS<sup>+</sup> und die Zugabe von 9 ml frischem Kulturmedium. Insgesamt 10 Tage nach Gewinnung der Proben wurden die Zellen je nach Grad der Konfluenz im Verhältnis 1:3 oder 1:2 passagiert (Abschnitt 3.1.4), beziehungsweise weiter inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für 12 Tage bei -80 °C konserviert. Ab dem Zeitpunkt der Reaktivierung nach der Konservierung, also ab der zweiten Passage kamen keine Antibiotika mehr zum Einsatz. Nach Reaktivierung und vor Besiedlung der SIS erfolgte eine Subkultivierung (somit P3).

### **3.1.3 Allgemeine Arbeitstechnik in der Zellkultur**

In der Zellkultur erfolgen sämtliche Prozeduren an geöffneten Behältnissen unter einer Sicherheitswerkbank, d.h. die gesamte Arbeitsfläche befindet sich hinter einer Glasscheibe und eine Lüftungsanlage generiert einen laminaren Luftstrom, der aerogene Kontaminationen verhindert. Als Instrumente und Behälter kommen sowohl autoklavierte Mehrweg- als auch sterile Einmalartikel zur Anwendung. Für Arbeitsschritte, die außerhalb der Sicherheitswerkbank stattfinden, müssen fest verschließbare Behälter verwendet werden. Eine mikrobielle Kontamination durch Bakterien, Pilze und Mykoplasmen kann durch diese Maßnahmen effektiv verhindert werden. Sämtliche Lösungen, welche bei 4 °C bzw. -20 °C lagern, werden vor der Verwendung im Wasserbad auf ca. 37 °C erwärmt, um eine thermische Schonung der Zellen und das physiologische Temperaturoptimum der eingesetzten Enzyme sicherzustellen. Bei der täglichen Kontrolle der Zellkulturen vermittelt die Farbe des Mediums einen orientierenden Eindruck, da es Phenolrot als pH-Indikator enthält. In der Regel ist das Medium burgunderrot, wobei die Metabolisierung von Glukose zu Lactat und damit ein Absinken des pH-Wertes einen Farbumschlag (Gelbfärbung) herbeiführt. Dies kann entweder auf eine Verstoffwechslung durch die kultivierten Zellen oder eine mikrobielle Kontamination hinweisen. Zur näheren Kontrolle der Kulturen wird das Umkehrmikroskop verwendet. Beurteilt werden in erster Linie zellspezifische Morphologie, Zustand und Wachstum der Zellen sowie etwaige Kontaminationen.

### 3.1.4 Passagieren und Zellzahlbestimmung

Durch die Vermehrung, also Proliferation der kultivierten Zellen nimmt der Anteil der besiedelten Fläche in der Kulturflasche zu. Als Maß für diese „Zelldichte“ verwendet man den Begriff der *Konfluenz*. Diese wird in Prozent angegeben, d.h. bei 100 % Konfluenz ist der Boden der Kulturflasche vollständig mit Zellen bedeckt. Mit zunehmender Konfluenz der Zellen nimmt die Proliferationsrate durch Kontakthemmung ab. Durch das frühzeitige Aufteilen der Zellen auf mehrere Kulturflaschen kann diesem Phänomen vorgebeugt werden, was als *Passagieren* oder *Subkultivieren* bezeichnet wird. Bei Fibroblasten hat sich dieser Schritt bei ca. 80 bis 90 % Konfluenz bewährt. Die Durchführung im Rahmen dieser Arbeit orientierte sich an der SOP „Passagieren von Zellen“ (Stand 23.11.2012).

Nach Absaugen des alten Kulturmediums und Spülen mit PBS<sup>-</sup> werden 5 ml Ablösepuffer (Trypsin/EDTA) in die Kulturflasche (T75) gegeben und für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Trypsin bricht als Enzym bestehende Zellkontakte auf. EDTA komplexiert als Chelator zweiwertige Kationen (Calcium, Magnesium), welche für die Ausbildung von Zellkontakten notwendig sind. Somit kommt es zu einer Auflösung der Kontakte zwischen adhären Zellen und Flaschenboden. Dieser Ablösevorgang kann unter dem Mikroskop als Abrunden der Zellen beobachtet und durch vorsichtiges Beklopfen der Kulturflasche unterstützt werden. Die Zugabe von FCS beendet die Enzymreaktion nach einigen Minuten, sodass eine Schädigung der Zellen verhindert wird. Die Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und durch funfminütiges Zentrifugieren bei 1200 rpm aufgetrennt. Nach Absaugen des Überstandes wird das zurückbleibende Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Üblicherweise erfolgt nun die Ermittlung von Zellzahl und -vitalität, hier gemäß der SOP „Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Neubauerzählkammer (Stand 08.05.2014). Hierfür werden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau, also 1:2 in einer 96er Wellplatte gemischt und davon 10 µl in eine Zählkammer nach Neubauer (Hämozytometer) pipettiert. Das Zählen erfolgt mithilfe eines Umkehrmikroskops. Hier zeigen sich vitale Zellen farblos, da die intakte Zellmembran das Eindringen des Farbstoffs ins Zytosol verhindert. Totes (Zell-)Material hingegen ist dunkelblau und wird in dieser Arbeit bei der Zellzählung nicht berücksichtigt, d.h. alle Zahlen beziehen sich auf vitale Zellen. Zur Berechnung der relativen Zellzahl in der Suspension wird folgende Formel gemäß Angabe des Herstellers herangezogen:

$$\text{MW}_{\text{vitale Zellen}} \times \text{VF} \times \text{KF} = \text{Zellzahl} / 1 \text{ ml}$$

$\text{MW}_{\text{vitale Zellen}}$  = Mittelwert der Zellzahlen in den 4 Quadranten der Zählkammer

VF = Verdünnungsfaktor, hier: „2“

KF = Kammerfaktor der Neubauer-Zählkammer, hier: „10<sup>4</sup>“

Zur Berechnung der Zellvitalität wird die Anzahl der vitalen (farblosen) Zellen mit der Anzahl aller Zellen (farblos und blaugefärbt) ins Verhältnis gesetzt, mit dem Faktor 100 multipliziert und in Prozent angegeben.

### 3.1.5 Kryokonservierung

Um die Verfügbarkeit der Zellen sicherzustellen und deren Passagezahl möglichst niedrig zu halten, wurden diese zwischenzeitlich kryokonserviert. Dabei wurden die Zellen abgelöst, gezählt, und die Zellzahl durch Zugabe einer entsprechenden Menge Medium auf ca. 1 Mio. pro 1 ml eingestellt. Davon wurde jeweils 1 ml in ein Kryoröhrchen gegeben und jeweils 100 µl FCS und 100 µl DMSO beigemischt. DMSO dient dem Schutz der Zellen, indem es die Bildung von Eiskristallen verhindert. Spezielle Gefrierbehälter ermöglichen im -80 °C-Gefrierschrank eine gleichmäßige Abkühlrate von 1 °C pro Minute. Dies soll sich laut Hersteller schonend auf die Zellen auswirken. Anschließend wurden die Röhrchen in einfachen Kunststoff-Haltern bei -80 °C gelagert. Zur Kryokonservierung im engeren Sinne werden die Zellen in -196 °C kalten Flüssigstickstoff verbracht. Auf diesen Schritt wurde im Zuge dieser Arbeit, aufgrund der kurzen Lagerungszeit von 12 Tagen verzichtet, da Erfahrungen im Vorfeld gezeigt hatten, dass dermale Fibroblasten eine Lagerung über wenige Wochen bei -80 °C tolerieren, d.h. die Ausbeute an vitalen Zellen nach der Reaktivierung ausreichend ist.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank bzw. aus dem -80 °C-Gefrierschrank in ein Wasserbad mit 37 °C gegeben und zügig aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 9 ml temperiertem Kulturmedium gegeben, um das bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkende DMSO zu verdünnen.

Anschließend erfolgte Zentrifugieren bei 1200 rpm für 5 Minuten, Absaugen des Überstands, Resuspension mit Medium und Aussäen der Zellen.

### **3.1.6 Zytospins**

Bei der Anfertigung sogenannter Zytospins werden Zellen mithilfe einer Zentrifuge auf einem Objektträger fixiert. Man erhält Präparate in einem üblichen histologischen Format, sodass in Analogie zu Gewebeschnitten (immun-)zytochemische Färbungen und die anschließende Mikroskopie vorgenommen werden können. Die Herstellung erfolgte anhand der entsprechenden SOP (Stand 04.06.2014). Es werden zunächst die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst (Abschnitt 3.1.4), gezählt und durch Suspension mit einem entsprechenden Volumen an Medium auf eine Konzentration von 15.000-20.000 Zellen pro 50 µl eingestellt, 50 µl dieser Suspension in spezielle Trichter pipettiert, welche entsprechend der Richtung der Zentrifugalkraft auf Polysine-Objektträger gerichtet und befestigt sind. Nach Zentrifugation bei 500 rpm für 5 Minuten haften die zellulären Bestandteile der Suspension auf den Objektträgern. Diese werden für eine halbe Stunde luftgetrocknet und anschließend bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur über wenige Minuten und anschließend kurzer Fixierung mit 4 % PFA können (immun-)zytochemische Färbungen erfolgen.

### **3.1.7 Mycoplasmen-PCR**

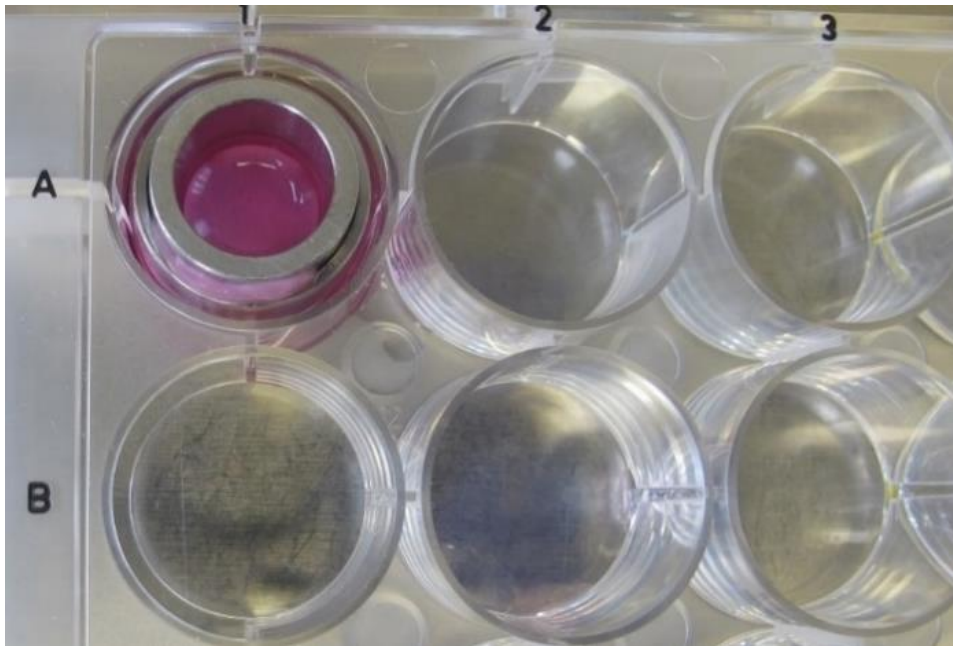
Mycoplasmen sind aufgrund ihrer Größe im Lichtmikroskop nicht zu sehen, verursachen aber ernstzunehmende und gefährliche Kontaminationen der Zellkultur.<sup>63</sup> Regelmäßige Kontaminationskontrollen mittels PCR hinsichtlich Mycoplasmen sollten daher standardmäßig im Sinn guter Praxis in der Zellkultur vorgenommen werden. Der SOP des Instituts folgend werden zur Vorbereitung aus den Kulturen bei 90-100 % Konfluenz jeweils 200 µl 5 Tage altes Medium abgenommen. Es folgt eine Inkubation bei 95 °C für 5 Minuten im Thermocycler, Kühlen auf Eis für 3 Minuten und Zentrifugieren bei 13.000rpm für 10 Sekunden und schließlich Lagerung bei -20 °C. Die eigentlichen PCRs wurden im Rahmen von großen Kollektivuntersuchungen des Instituts durchgeführt, weshalb hier auf Details zur Durchführung nicht näher eingegangen wird.

### 3.1.8 Herstellung der Implantate

Als Matrix für die Züchtung der Implantate diente azellularisierter Dünndarm – sogenannte Small intestinal submucosa, kurz SIS. Hiervon bestehen zwei Varianten: SISmuc und SISser. Die Zusatzbezeichnungen „muc“ und „ser“ werden voneinander abgegrenzt und beziehen sich auf den Herstellungsprozess der Matrix. Bei der SISmuc wird die Serosa zusätzlich zur chemischen Azellularisierung mechanisch entfernt, die Mucosa wird belassen. Gegenteilig verhält es sich bei der SISser. Diese Unterscheidung ist hinsichtlich der zu besiedelnden Seite zu beachten. Bezüglich der detaillierten Matrixherstellung sei an dieser Stelle auf die SOP „Azellularisierung der SISmuc“ des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin Würzburg verwiesen (Stand 06.02.2012). Parallel zur Besiedelung der Matrix erfolgte die Anfertigung von Zytospins mit anschließender immunhistochemischer Charakterisierung der verwendeten Zellen.



**Abbildung 3:** SISmuc und demontierte Zellkrone



**Abbildung 4:** Mit SIS<sub>2</sub> bestückte Zellkrone.  
Lagerung in sterilen Wellplatten und Zugabe von Nährmedium in das Innere sowie um die Zellkrone herum (rötliche Flüssigkeit).

## 3.2 Methoden der Großtierstudie

### 3.2.1 Primäre Operationen

Im Vorfeld der Tierversuche wurde beim Tierschutzbeauftragten der Universität Würzburg sowie der Regierung von Unterfranken eine offizielle Genehmigung eingeholt. Dies erfolgte gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes unter folgender Tierversuchsnummer: 55.2-2531.01-99/13. Sämtliche Eingriffe wurden an den Versuchstieren unter Allgemeinanästhesie und in Anwesenheit eines erfahrenen Veterinärmediziners durchgeführt. In der Woche vor der ersten Operation erhielten die Tiere ausschließlich hochkalorische Flüssignahrung, um die vollständige Magenentleerung zum Zeitpunkt der Operation sicherzustellen. Am Abend vor der Operation erhielten die Tiere lediglich freien Zugang zu Wasser, jedoch keine Flüssignahrung mehr. Zur Stressreduktion und zur Verbesserung der Kooperativität erhielten die Tiere vor allen Eingriffen eine sedierende Prämedikation durch intramuskuläre Applikation von Stresnil® und Ketamin. Zur Atemwegsicherung wurden die Tiere endotracheal intubiert und anschließend maschinell kontrolliert beatmet. Die Speichelproduktion wurde hierfür durch Atropin-Gaben reduziert.



**Tabelle 6:** Primäre Operation – Medikamente.

Wirkstoff (Handelsname)	Dosierung
Azaparon (Stresnil®) 40 mg/ml	2,0 - 4,0 ml i.m.
Ketamin 100 mg/ml	2,0 ml i.m.
Atropin 0,5 mg/ml	1,0 ml i.m.
Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®) 100 mg/ml	4,0 ml i.v.
Fentanyl 50 µg/ml	0,2 - 0,3 mg i.v. initial 0,1 - 0,2 mg i.v. intraoperativ
Isofluran	1,5 – 3 % p.i.
Flunixin (Finadyne) 83 mg/ml	2,0 - 2,5 ml i.m.
Amoxicillin (Vetrimoxin LA) 150 mg/ml	4,0 - 4,5 ml i.v. vor Schnitt
Pantoprazol	40 mg i.v. intraoperativ
Unfraktioniertes Heparin	5000 I.E. s.c 2 Stunden präoperativ
Vollelektroly-Lösung (Ringer)	500 ml bzw. 10 ml/kg perioperativ

Nach Wirkeintritt der prämedizierenden Substanzen und vor Narkoseinduktion erhielten die Tiere einen peripheren Venenzugang am Ohr. Außerdem wurden die Körpertemperatur (rektal) sowie das Körpergewicht ermittelt.

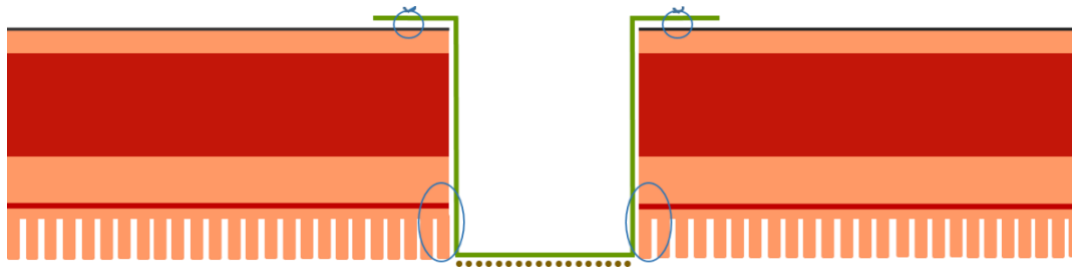
#### **Identische Operationsschritte in beiden Gruppen:**

Die Narkoseinduktion erfolgte durch intravenöse Bolusapplikation von Fentanyl und Ketamin. Zur Aufrechterhaltung wurden das volatile Anästhetikum Isofluran sowie Fentanyl als Opioidanalgetikum im Sinne einer balancierten Allgemeinanästhesie verabreicht. Zusätzlich wurden Einmalgaben von Flunixin, Amoxicillin und Pantoprazol intravenös appliziert. Flunixin diente als Nichtopioid-Analgetikum als Komponente einer multimodalen Schmerztherapie. Amoxicillin diente - wie auch in der klinischen Routine üblich - der präoperativen Antibiotika-Prophylaxe zur Verhinderung einer bakteriellen Wundinfektion. Der Protonenpumpeninhibitor Pantoprazol kam zur Reduktion der Säureproduktion des Magens und zum Schutz vor stress-induzierten Entzündungen der Magenschleimhaut zur

Anwendung. Nach Applikation sämtlicher Medikamente wurden die Schweine in Rückenlage auf dem Operationstisch gelagert, die Vorder- und Hinterläufe mit Mullbinden in abgespreizter Position fixiert. Die abdominelle Haut wurde rasiert, gründlich mit Chloraprep® desinfiziert und die Bereiche um das OP-Gebiet mit Tüchern steril abgedeckt. Anschließend wurde die Bauchhaut im Sinne einer epigastrischen Medianlaparotomie mit einer Länge von ca. 10 cm inzidiert und die Bauchwand nach subkutaner Blutstillung schichtgerecht präpariert. Es folgte die Inzision der Linea alba, vorsichtiges Eröffnen des Peritoneums und die Darstellung der Magenvorderwand. Nach Exploration der einsehbaren Bereiche und Identifikation eines geeigneten Areales wurde drei Haltefäden an der Magenvorderwand angebracht. Unter leichtem Zug an den Haltefäden wurde mit dem Elektrokauter eine circa 3 cm lange Gastrotomie angelegt. Diese wurde im Anschluss, der Gruppe entsprechend und wie unten beschrieben, mit der jeweiligen Methode verschlossen. Im Anschluss wurde bei einigen Tieren probeweise eine Markierungsnaht (3 PDS SH 1) um das operierte Magenareal angelegt, um den Bereich im Verlauf lokalisieren zu können. Zum Abschluss des Eingriffs wurden die Haltefäden am Magen entfernt und die Bauchwand mit einer fortlaufenden Fasziennaht (1 PDS II CTX PLUS 48 mm 1/2c 90cm Ethicon) sowie einer Hautnaht (2-0 Prolene) verschlossen. Die Entfernung der Hautfäden erfolgte am siebten postoperativen Tag in Allgemeinanästhesie im Rahmen der laparoskopischen Eingriffe.

### **Spezifische Operationsschritte in der Patch-Gruppe:**

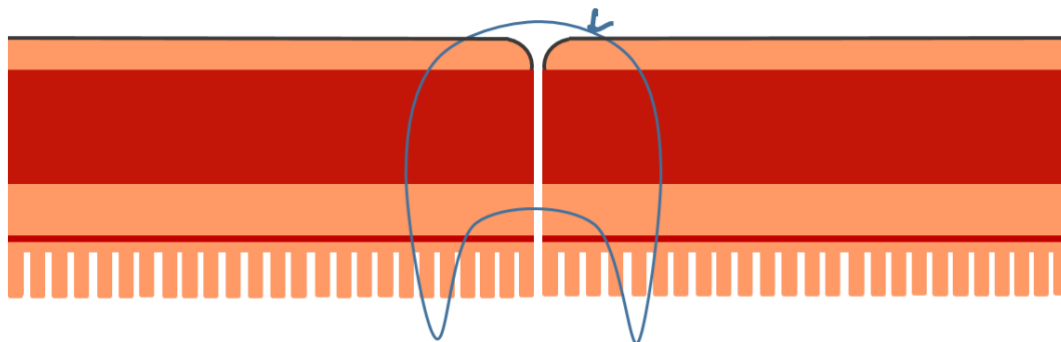
Präoperativ wurden die Implantate zeitnah in den Großtier-OP transportiert und vorübergehend im Wärmeschrank bei 37 °C gelagert. Intraoperativ erfolgte die Entnahme der Zellkronen aus den sterilen Wellplatten und die Demontage auf einer sterilen Arbeitsfläche. Nach Benetzung mit 0,2 ml (= 5.000 I.E.) Heparin wurden die Implantate an allen vier Ecken mit Haltefäden (5-0 PDS II JRB-1 Ethicon) versehen und in Vierhand-Technik in den OP-Situs überführt. Dabei wurde die mit Zellen besiedelte Seite nach endoluminal ausgerichtet und eine zirkulär-fortlaufende Nahtreihe (6-0 Vicryl P-1 11 mm 3/8 45 cm) zwischen Patch und Mucosa/Submucosa angelegt, sodass die besiedelte Fläche auf Schleimhaut-Niveau zu liegen kam. Durch eine zweite fortlaufende Nahtreihe konnte der überstehende (unbesiedelte Rand) auf die Serosa genäht werden (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Schema des Defektverschlusses in der Experimentalgruppe.  
Darstellung des implantierten Patch mit SISmuc (grün) und Fibroblasten (braune Punkte). Annäht des Patch mit Nahrtreiben (blau) auf Niveau der (Sub-)Mucosa und der (Sub-)Serosa.

### Spezifische Operationsschritte in der Kontrollgruppe:

Bei den Kontrolltieren wurden zum Vollwandverschluss der Gastrotomien Einzelnähte in der Technik nach Gambee (3-0 Vicryl Plus SH plus 26 mm 1/2c 90 cm Ethicon) angelegt. Die Verknotung erfolgte unter sorgfältigem Invertieren der Schnittländer der Serosa.



**Abbildung 6:** Schema des Defektverschlusses in der Kontrollgruppe.  
Vollwandverschluss der Gastrotomie mittels Gambee-Naht (Fadenmaterial blau) mit schichtgerechter Adaptation der Wundränder.

### 3.2.2 Erhebung klinischer Parameter

Im gesamten postoperativen Verlauf wurde der Allgemeinzustand, die Körperhaltung und insbesondere das Fressverhalten sowie die Wundverhältnisse der Tiere beurteilt. Im Sinne eines postoperativen „Kostaufbaus“ erhielten die Tiere ab dem ersten postoperativen Tag eine tägliche Ration hochkalorischer Flüssignahrung. Die rektale Körpertemperatur sowie das Körpergewicht der Tiere wurde unmittelbar präoperativ sowie jeweils an den postoperativen Tagen 2, 7, 14 und 21 ermittelt. Durch Punktion der Vena jugularis interna

unter Sedierung mit Azaperon wurden unmittelbar präoperativ, sowie am zweiten und siebten postoperativen Tag Blutproben gewonnen. Laborchemisch wurde die Leukozytenkonzentration bestimmt. Dieser Werte ist ein gängiger Infektparameter der in der klinischen Routine der Detektion eines möglichen Infektgeschehens im postoperativen Verlauf dient.

### 3.2.3 Explorative Laparoskopie

Bei der sogenannten Laparoskopie, auch „Bauchspiegelung“ genannt, werden über kleine Schnitte in der Bauchwand eine starre Kameraoptik sowie Instrumente in die Bauchhöhle eingebracht. Das Einführen erfolgt über spezielle Kunststoffhülsen, sogenannte Trokare, welche über Kanäle verfügen, über die Gas (meist Kohlendioxid) in die Peritonealhöhle insuffliert werden kann. Auf diese Weise wird die Bauchwand angehoben und ein künstlicher Raum (Kapnoperitoneum) geschaffen, der eine gute Sicht auf die Bauchorgane zulässt. Durch die Kamera wird das Bild auf einen Monitor übertragen und auf diesem vergrößert dargestellt. Diese Technik ermöglicht einen idealen „Rundumblick“, gerade im Bereich der Peritonealhöhle. Vorteilhaft ist außerdem die geringe Invasivität aufgrund der kleinen Hautschnitte, womit die Laparoskopie die Voraussetzung für minimalinvasive Eingriffe schafft. Im Rahmen dieser Arbeit diente die Laparoskopie - in rein diagnostischer Anwendung - der Inspektion von Bauchhöhle und Magenwand. Sie wurde am siebten postoperativen Tag nach dem Primäreingriff bei allen Tieren beider Gruppen in Allgemeinanästhesie durchgeführt.

**Tabelle 7:** Laparoskopie – Medikamente.

Wirkstoff (Handelsname)	Dosierung
Azaperon (Stresnil®) 40 mg/ml	2,5 - 3,5 ml i.m.
Ketamin 100 mg/ml	2,0 ml i.m.
Atropin 0,5 mg/ml	1,0 ml i.m.
Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®) 100 mg/ml	4,0 ml i.v.
Fentanyl 50 µg/ml	100 - 200 µg i.v.
Isofluran	1,5 – 3 %

Flunixin (Finadyne) 83 mg/ml	1,5 - 2,0 ml i.m. intraoperativ
Amoxicillin (Vetrimoxin LA) 150 mg/ml	3,5 - 4,5 ml i.v. vor Schnitt

Die Bauchdecke wurde desinfiziert, rings um das OP-Gebiet steril mit Tüchern abgedeckt und paraumbilical inzidiert (ca. 1,5 cm). Nach Vorlegen zweier Haltefäden an der Bauchfaszie folgte das Einbringen eines Kameratrokars über welchen ein Kapnoperitoneum etabliert wurde. Über das eingeführte Laparoskop erfolgte die Exploration der Peritonealhöhle sowie die nähere Inspektion der Magenvorderwand. Über einen pararektal links eingebrachten 5 mm-Arbeitstrokars wurde eine Faszange eingeführt, um den Blick auf die relevanten Bereiche freizulegen. Eine Fotodokumentation über die 30°-Optik wurde durchgeführt. Abschließend erfolgten der Faszienschluss mittels der vorgelegten Fäden sowie die Hautnaht in Einzelknopftechnik (2-0 Prolene).

### 3.2.4 Gastroskopie

Die Gastroskopie ist eine endoskopische Methode und bezeichnet die Betrachtung des Magens von endoluminal. Über eine flexible Glasfaseroptik – Gastroskop genannt - wird das Bild von einer Kamera aufgenommen und per Bildwandler auf einen Monitor übertragen. Über zwei Hebel kann das vordere Ende des Gastroskops in sämtliche Richtungen (360°-Rundumblick) abgewinkelt werden. Über zusätzliche Kanäle innerhalb des Gastroskops kann Luft insuffliert werden, um durch Aufdehnung der Hohlorgane die Sicht zu verbessern. Im Anschluss wird diese Luft wieder über das Gastroskop abgesaugt. Des Weiteren ist es möglich, Spüllösungen zu applizieren bzw. Flüssigkeit oder Blut abzusaugen. Feine Instrumente, welche über einen Arbeitskanal des Endoskops bis an dessen Ende vorgeschoben werden, können zur Biopsatentnahme, Blutstillung oder Defektverschlüssen mittels Clips dienen.

Unter Allgemeinanästhesie wurden die Tiere erneut auf dem Rücken gelagert und das Gastroskop unter Luftinsufflation bis in den Magen eingeführt. Nach eingehender Inspektion und Entfernung von Nahrungsresten durch Spülen mit Wasser erfolgte das Aufsuchen und die Beurteilung der operierten Areale sowie die Fotodokumentation.

**Tabelle 8:** Gastroskopie – Medikamente.

<b>Wirkstoff (Handelsname)</b>	<b>Dosierung</b>
Azaperon (Stresnil®) 40 mg/ml	2,0 - 3,0 ml i.m.
Ketamin 100 mg/ml	2,0 ml i.m.
Atropin 0,5 mg/ml	1,0 ml i.m.
Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®) 100 mg/ml	4,0 ml i.v.
Fentanyl 50 µg/ml	100-200 µg i.v.
Isofluran	1,5 – 3 %
Flunixin (Finadyne) 83 mg/ml	2,0 ml i.m. intraoperativ
Amoxicillin (Vetrimoxin LA) 150 mg/ml	4,0 ml i.v. vor Schnitt

### 3.2.5 Finalisierung

Die Euthanasierung der Tiere wurde in Analgosedierung nach intramuskulärer Applikation von Azaperon und Ketamin vorgenommen. Über einen peripheren Venenkatheter am Ohr wurden 8,0 ml T61 unter pulsoxymetrischer Kontrolle verabreicht. T61 ist ein Mischpräparat und ist ausschließlich für die Veterinärmedizin zugelassen. Enthalten sind das Hypnotikum Embutramid, das Muskelrelaxans Mebezonium sowie das Lokalanästhetikum Tetracain. Damit wirkt T61 hypnotisch, peripher muskelrelaxierend und kardio- sowie neurotoxisch. Laut Fachinformation darf das Medikament unter keinen Umständen an wachen Tieren angewendet werden, da die periphere vor der zentralen Wirkung eintreten und in diesem Fall zu einem qualvollen, bewusst erlebten Atemstillstand führen kann. Dies wurde durch vorangehende intravenöse Applikation zweier Hypnotika sichergestellt. Unmittelbar nach Feststellung des Herz-Kreislaufstillstandes durch den stets anwesenden Veterinärmediziner wurden die Tiere auf den Rücken gedreht und das Abdomen eröffnet. Die entsprechenden Areale der Magenvorderwand wurden identifiziert, mit einigen Zentimetern Sicherheitsabstand exzidiert und in Fixierlösung (PFA 4 %) überführt. Es folgte der Transport in das Histologie-Labor, wo die Präparate über 24 h in PFA 4 % bei 4 °C gelagert wurden. Im Anschluss erfolgte die histologische Aufarbeitung, welche weiter unten im Detail erläutert wird.

**Tabelle 9:** Finalisierung – Medikamente.

<b>Wirkstoff (Handelsname)</b>	<b>Dosierung</b>
Azaperon (Stresnil®) 40mg/ml	2,0 - 3,0 ml i.m.
Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®) 100 mg/ml	3,0 ml i.m.
Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid, Embutramid (T61)	8,0 ml i.v. als Bolus zur Euthanasierung

### 3.3 Histologie

Die Histologie stellt die Wissenschaft der Gewebe dar. Nach Gewinnung von vitalen Gewebeproben werden diese im Labor fixiert d.h. sämtlichen Proteine werden denaturiert und somit in ihrer aktuellen Form und Lokalisation „festgehalten“. Um die Proben später lichtmikroskopisch beurteilen zu können, müssen diese in feinen Schichten geschnitten und mit speziellen Methoden gefärbt werden. Dafür erfolgt die sogenannte Einbettung in Paraffinblöcken aus denen sehr feine Schnitte im einstelligen µm-Bereich angefertigt werden können. Diese Schnitte können nach verschiedenen Prinzipien angefärbt werden, um zu untersuchende Grundgewebe und feine Strukturen voneinander differenzieren zu können. Im Zuge dieser Arbeit kamen sowohl herkömmliche Standardfärbungen mit einfachen Farblösungen als auch immunhistochemische Methoden mit spezifischen Antikörpern zum Einsatz. Sämtliche Arbeitstechniken erfolgten gemäß den SOPs des Instituts. Histologische Untersuchungen wurden von synchron gezüchteten Kontroll-Implantaten und den exzidierten Magenarealen nach Euthanasierung der Tiere vorgenommen. Die Beurteilung und Fotodokumentation der Präparate erfolgte an einem computergesteuerten Lichtmikroskop in 20- bis 400-facher Vergrößerung.

#### 3.3.1 Allgemeine Methoden: FFPE-Präparate

##### Fixierung

Bei der sogenannten Fixierung histologischer Proben werden darin enthaltene Proteine mithilfe spezieller Fixierlösungen miteinander vernetzt, in ihrer aktuellen Form und

Lokalisation „festgehalten“ und damit sämtliche physiologischen Prozesse gestoppt. Man bezeichnet dies auch als Denaturierung. Notwendig ist dieser Schritt, da sich die Morphologie der Gewebeprobe nach Entnahme durch autolytische Prozesse („Selbstverdauung“) rasch verändert und keine histologische Beurteilung mehr möglich ist. Die gängigste Methode ist die Fixierung mit Formalin 4 % mit folgenden Einwirkzeiten (Erfahrungswerte): Für SIS zwei Stunden bei Raumtemperatur, für Biopsate aus Schweinemagen über Nacht bei +4 °C. Um die Anlagerung von Antikörpern an spezifische Proteinstrukturen (sog. Epitope) bei der Immunhistochemie zu ermöglichen, ist hier zunächst eine Aufhebung der Fixierung erforderlich. Dieser Vorgang wird Demaskierung genannt und erfolgt durch Behandlung mit Gewebe-spezifischen Lösungen.

## Einbetten

Um die Gewebeprobe in dünne, lichttransparente Schnitte schneiden zu können, müssen sie in eine Trägermasse eingebettet werden. Dafür werden die fixierten Gewebeprobe mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in sogenannte Einbettkassetten aus Kunststoff gegeben. Auf eine Beschriftung mit einem Bleistift oder speziellen Filzstift ist zu achten. Die unten aufgeführten Einzelschritte übernimmt ein Automat, der die Proben für definierte Zeiträume in einer Reihe von Lösungen badet. In einer sogenannten aufsteigenden Alkoholreihe werden die Proben entwässert und schließlich mit durch Wärme verflüssigtem Paraffin durchtränkt. Der gesamte Prozess des Einbettens im Automaten erfolgt über Nacht. Am Folgetag werden die Proben aus dem Paraffinbad genommen und zum Aushärten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

**Tabelle 10:** Paraffineinbettung (nach SOP, Stand 14.06.2010).

<b>Zeiten [h]</b>	<b>Lösung</b>	<b>Erklärung</b>
1-2	Leitungswasser	Auswaschen der Fixierlösung
Über Nacht	Ethanol 50 %	Aufsteigende Reihe: Entwässern
1	Ethanol 70 %	
1	Ethanol 90 %	
1	Ethanol 96 %	



1	Isopropanol I	
1	Isopropanol II	
1	Isopropanol/Xylol (1:2)	
1	Xylol I	
1	Xylol II	
3	Paraffin I	
3	Paraffin II	

## Blocken

In diesem Schritt werden die Proben in kleine Metallförmchen gelegt, dabei im 90°-Winkel zur späteren Schnittebene ausgerichtet und die Förmchen mit flüssigem Paraffin ausgegossen. Der untere Teil der Kunststoff-Einbettkassette wird daraufgelegt und dient später als Halterung zum exakten Einspannen am Mikrotom. Anschließend härten die Proben über Nacht bei Raumtemperatur aus. Auf diese Weise hergestellte Proben werden auch als „FFPE-Gewebe“ bezeichnet, was eine Abkürzung für den englischen Begriff „formalin-fixed paraffin-embedded tissue“ darstellt.

## Schneiden

Vor dem Schneiden werden die Proben auf einer Kühlplatte auf ca. -20 °C abgekühlt, am Schlittenmikrotom eingespannt und in der Horizontalen und Vertikalen parallel zur Klinge ausgerichtet. An einem Einstellrad variiert man die relative Höhe der Probe zur Klinge, sodass beim Schneiden unterschiedliche Schnittdicken erzeugt werden können. Hier haben sich Werte zwischen 3 bis 5 µm Schnittdicke bewährt. Es werden sogenannte Serien- oder Stufenschnitte unterschieden, je nachdem, ob Material zwischen den einzelnen Schnitten verworfen wird. Zur vollständigen Beurteilung wurden Stufenschnitte aus unterschiedlichen Niveaus innerhalb einer Gewebeprobe vorgenommen, um der besonderen Größe im Sinne repräsentativer Präparate gerecht zu werden. Die Schnitte werden dann mit einem Pinsel oder einer feinen Pinzette in ein Wasserbad gegeben und dort unter Einfluss der Oberflächenspannung gestreckt. Nach dem Aufziehen auf Objektträger erfolgt kurzes Eintauchen in ca. 40 °C warmes Wasser, wobei durch Schmelzen des Paraffins ein fester Halt der Schnitte auf den Objektträgern erzielt wird. Anschließend lagern die Proben über Nacht im Wärmeschrank bei 40 °C, um einen weiteren Wasserentzug zu erzielen. Treten

beim Schneiden Artefakte auf, sollte die Klinge gewechselt, die Proben eventuell erneut abgekühlt oder die Schnittdicke angepasst werden.

## **Entparaffinieren**

Um die zu färbenden Gewebe im Präparat für die Farbstoffe zugänglich zu machen, muss vor allen Färbungen zunächst das Paraffin aus den Schnitten herausgelöst und das Gewebe rehydriert werden. Hierzu werden die Proben für eine Stunde im Trockenofen für ca. eine Stunde bei 60 °C gelagert und so das Paraffin zum Schmelzen gebracht. Anschließend erfolgt die sogenannte absteigende Alkoholreihe in der Reihenfolge Xylol, Ethanol 96/96/70/50 % und schließlich VE-Wasser. Ab hier sollte auf eine stete Befeuchtung der Präparate geachtet werden, da durch Austrocknung schnell Artefakte entstehen.

## **Eindecken**

Um eine langfristige Haltbarkeit der gefärbten Präparate zu gewährleisten, gibt man auf die Objektträger mit den gefärbten Präparaten ein Eindeckmittel – in dieser Arbeit Entellan™ – und drückt ein Deckgläschen darauf. Dieser Schritt erfordert besondere Sorgfalt, da auch hier später Artefakte durch Luftblasen hervorgerufen werden können. Nach dem Aushärten des Eindeckmittels unter dem Abzug können die Proben mikroskopiert, fotografiert und über Jahre archiviert werden.

### **3.3.2 Übersichtsfärbungen**

Anhand der klassischen Übersichtsfärbungen können histologische Schnitte orientierend beurteilt werden. Es werden grobe Strukturen wie Zellkerne, Zytoplasma oder Bindegewebsfasern angefärbt, wobei man sich Ladungsunterschiede der Moleküle zu Nutze macht, sodass sich die verwendeten Farbstoffe entsprechend ihrer eigenen Affinität in den Präparaten anreichern. Bei einem Präparat können verschiedene Farbstoffe nacheinander angewendet werden, weshalb man auch von Bi-, Tri- oder Pentachromfärbung spricht.

## **Hämatoxylin-Eosin**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist die gängigste histologische Färbemethode überhaupt. Das basische, positiv geladene Hämatoxylin nach Mayer (Aluminiumlack) färbt basophile Strukturen wie Nukleinsäuren, also die Zellkerne, blau.

Eosin ist sauer und färbt das eosinophile Zytoplasma und Kollagengewebe rot. Diese Färbung wurde im Zuge der Arbeit zur Kontrolle der Patch-Züchtung, sowie der abschließenden histologische Evaluation der relevanten Magenareale verwendet.

**Tabelle 11:** HE-Färbung (nach SOP, Stand 07.12.2010).

<b>Zeiten [min]</b>	<b>Lösung/Behandlung</b>	<b>Erklärung</b>
60	Warmeschrank 60 °C	Schmelzen des Paraffins
10	Xylol I	Absteigende Reihe: Entparaffinieren und Rehydrieren
10	Xylol II	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 96 % I	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 96 % II	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 70 %	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 50 %	
0,5	VE-Wasser	
8	Hämatoxylin nach Mayer	Färben der Zellkerne
0,5	VE-Wasser	Spülen
2 x kurz eintauchen	HCl-Alkohol	Differenzieren der Hämalaun-Färbung
	VE-Wasser	Spülen
5	Leitungswasser (lauwarm)	„Bläuen“
1	Eosin B	Färben von Zytosol und Extrazellulärmatrix
	VE-Wasser	Spülen
2 x kurz eintauchen	Ethanol 70 %	Aufsteigende Reihe: Entwässern
2	Ethanol 96 %	
5	Isopropanol I	
5	Isopropanol II	
5	Xylol I	
5	Xylol II	
Eindecken mit Entellan und Deckglas		

## Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Bei dieser Färbung kommen drei Farbstoffe zum Einsatz. Hämatoxylin nach Weigert färbt Zellkerne braun-schwarz. Ponceau-Säurefuchsin das Zytoplasma rot und Lichtgrün Bindegewebe grün. Als weitere klassische Methode stellte sie eine Ergänzung zur HE-Färbung dar.

**Tabelle 12:** Trichromfärbung nach Masson-Goldner (nach SOP, Stand 22.02.2011).

Zeiten [min]	Lösung/Behandlung	Erklärung
60	Wärmeschrank 60 °C	Schmelzen des Paraffins
10	Xylol I	Absteigende Reihe: Entparaffinieren und Rehydrieren
10	Xylol II	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 96 % I	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 96 % II	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 70 %	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 50 %	
0,5	VE-Wasser	
1-2	Hämatoxylin nach Weigert	Färben der Zellkerne
0,5	VE-Wasser	Spülen
10	Leitungswasser	Bläuen
5-10	Ponceau-Säurefuchsin	Färben
0,5	Essigsäure 1 %	Spülen
unter mikroskopischer Kontrolle	Wolframphosphorsäure- Orange G	Differenzieren
0,5	Essigsäure 1%	Spülen
5	Lichtgrün	Färben
5	Essigsäure 1%	Spülen
5	Ethanol 96%	Aufsteigende Reihe: Entwässern
5	Isopropanol	
5	Xylol	

Eindecken mit Entellan und Deckglas
-------------------------------------

## Pentachrom nach Movat

Bei dieser recht aufwändigen Methode entsteht durch Anwendung von fünf Färbelösungen ein farbenreiches Präparat. Hämatoxylin färbt die Zellkerne blau, Brilliant Crocein Säurefuchsin färbt Zytoplasma, elastische Fasern und Muskelgewebe rot, Saffron du Gattinai färbt Kollagenfasern gelb-grünlich und Alcianblau Proteoglykane, Glykoproteine und interstitielle Flüssigkeit (Grundsubstanz) blau.

**Tabelle 13:** Pentachromfärbung nach Movat (nach SOP, Stand 22.02.2011).

Zeiten [min]	Lösung/Behandlung	Erklärung
60	Warmeschrank 60 °C	Schmelzen des Paraffins
10	Xylol I	Absteigende Reihe: Entparaffinieren und Rehydrieren
10	Xylol II	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 96 % I	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 96 % II	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 70 %	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 50 %	
0,5	VE-Wasser	Spülen
10	Alcianblau	Färbung Glukosaminoglykane
5	VE-Wasser	Spülen
60	alkalischer Alkohol	Fixierung Alcianblau
5	VE-Wasser	Spülen
10	Eisenhämatoxylin	Färbung der Zellkerne
1	VE-Wasser	Spülen
15	Leitungswasser	
30	Brilliant Crocein Säurefuchsin	Färbung von elastischen Fasern und Zytoplasma
0,5	Essigsäure 0,5 %	Spülen

15	Phosphorwolframsäure 5 %	Differenzieren
5	Essigsäure 0,5 %	Spülen
2 x 5	Ethanol 99 %	Spülen
60	Saffron du Gattinai	Färbung von mineralisierten Knochen- und Kollagengewebe
2 x 4	Ethanol 96 %	Entwässern
5	Xylol	
Eindecken mit Entellan und Deckglas		

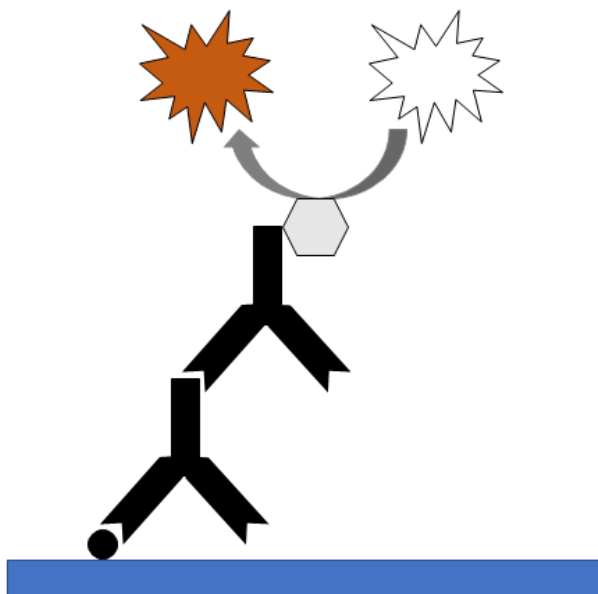
### 3.3.3 Immunhistochemische Färbungen

Das Prinzip der Immunhistochemie liegt darin, bestimmte Strukturen eines histologischen Präparates durch Behandlung mit spezifischen Antikörpern zu markieren. Um den Ort der Antikörperbindung sichtbar zu machen wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, welcher selbst gegen Antikörper gerichtet ist. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Enzym oder Farbstoff beladen, sodass durch Lokalisation einer Farbreaktion bzw. Anfärbung eine Detektion der Bindungsstellen und damit der gewünschten Struktur erfolgt. Durch stufenweises Vorgehen, d.h. Anwendung zweier Antikörper, wird das Farbsignal verstärkt, da an den primären Antikörper mehrere sekundäre Antikörper binden können. Man spricht daher auch von einer „amplifizierenden“ Technik. Spezifische Antikörper werden klassischerweise durch Immunisierung von Tieren gewonnen. Dabei werden nach parenteraler Antigen-Applikation, Antikörper gegen die körperfremden Strukturen gebildet. Diese Antikörper sind in der Regel polyklonal, d.h. sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Bindungsstelle (Epitop) an derselben Struktur. Eine weitere Methode ist die Hybridom-Technik, bei der Plasmazellen immunisierter Tiere mit Myelomzellen, also maligne entarteten Plasmazellen, fusioniert werden. Diese sogenannten Hybridomzellen produzieren unaufhaltsam monoklonale Antikörper, welche ein und dasselbe Epitop eines Moleküls spezifisch binden. Alle Schritte nach Applikation des Primärantikörpers wurden in dieser Arbeit - dem institutseigenen Standard folgend - mit dem sogenannten HRP-basierten Nachweissystems durchgeführt und ein kommerzielles Kit verwendet. Zur zweifelsfreien Beurteilung der Färbung sollte eine Positiv- sowie eine Isotyp-Kontrolle erfolgen. Für die Positivkontrolle wird der Primärantikörper auf Gewebeproben angewendet, bei denen die

Expression der Zielstruktur bekannt ist. So soll sichergestellt werden, dass der Antikörper „funktioniert“ und das Ergebnis nicht falsch-negativ ausfällt. Sämtliche Genprodukte sind hinsichtlich ihrer Expression in unterschiedlichen Zellen und Geweben in einer Internet-Datenbank ([www.proteinatlas.net](http://www.proteinatlas.net)) zu finden.<sup>64</sup> Anhand der dort hinterlegten Daten können Positivgewebe für die jeweilige Antikörper-basierte Methode ausgewählt werden. Die sogenannte Isotyp-Kontrolle dient zum Ausschluss unspezifischer, also falsch-positiver Bindungen des Primärantikörpers. Hierfür erfolgt die parallele Anwendung eines Antikörpers welcher der gleichen Untergruppe (IgG1, IgG2, IgM, etc.) wie der Primärantikörper angehört sowie von der gleichen Spezies (Kaninchen, Maus, Ziege etc.) gewonnen wurde.

Um die Anlagerung von Antikörpern an spezifische Proteinstrukturen (sog. Epitope) bei der Immunhistochemie zu ermöglichen, ist zunächst eine Aufhebung der Fixierung erforderlich. Diesen Vorgang nennt man *Demaskierung*. Dafür werden die Schnitte entweder thermisch (Kochen in Citratpuffer) oder enzymatisch behandelt. Die geeignetere Methode zur Demaskierung ist den Herstellerangaben des Antikörpers zu entnehmen bzw. muss durch entsprechende Vorversuche individuell getestet und an das jeweilige Gewebe angepasst werden. Anschließend werden die Gewebeproben auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrandet, sodass kleine Mengen an Lösung aufgetragen werden können, ohne zu verlaufen bzw. ohne sich zu vermischen. Zwischen den weiteren Einzelschritten werden die Objektträger fortan in einen Waschpuffer gegeben, um das Einwirken der jeweiligen Lösung zu beenden bzw. um ungebundene Antikörper zu entfernen. Das hier verwendete Nachweissystem basiert auf einer Enzymreaktion mit dem Enzym Peroxidase. Dieses Enzym ist auch als körpereigenes Protein im Gewebe vorhanden und muss zur Vermeidung verfälschender Farbreaktionen inaktiviert werden. Dies geschieht durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid. In Vorversuchen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass dieser Schritt bezüglich Magengewebe ausgesprochen wichtig ist und länger bzw. einige Male hintereinander erfolgen sollte. Der folgende Polymer-Enhancer bindet an den Fc-Teil des Primär-Antikörpers und erzeugt Bindungsstellen für das HRP-Polymer-Reagenz. Zugegebene DAB-Lösung wird nun an denjenigen Orten, an denen Meerrettichperoxidase vorhanden ist oxidiert und bildet ein braunes Farbprodukt. Abschließend werden die Zellkerne in Analogie zur HE-Färbung mit Hämalaun blau angefärbt. Das korrekte Endergebnis ist eine braune Färbung an Stellen mit dem gesuchten Protein sowie eine blaue Färbung der Zellkerne.

Die Methode der Immunhistochemie kam im Rahmen dieser Arbeit in drei verschiedenen Abschnitten zur Anwendung: Zum einen wurde sie zur Identifizierung der aus den Hautproben isolierten Zellen als Fibroblasten verwendet, um die subjektive morphologische Beurteilung durch eine objektive Nachweismethode zu ergänzen. Dabei kamen Antikörper gegen folgende Strukturen zum Einsatz: Vimentin, alpha-smooth muscle-actin, CD31, Desmin. Vimentin gehört zu den Intermediärfilamenten des perinukleären Zytoskeletts und gilt als Marker für Zellen mesenchymalen Ursprungs, zu denen auch Fibroblasten gezählt werden. Alpha smooth muscle actin wird von glatten Muskelzellen sowie Myofibroblasten exprimiert und befindet sich intrazellulär.<sup>65</sup> Desmin ist ein Intermediärfilament und Marker für Muskelzellen, wird aber nicht von Fibroblasten und Myofibroblasten exprimiert.<sup>66</sup> CD31 ist der gängige Marker für Endothelzellen.<sup>67</sup> Die fertigen Implantate wurden ebenfalls mittels Immunhistochemie untersucht. Zielstrukturen waren hier Vimentin und alpha-smooth muscle-actin zur Detektion von Fibroblasten auf bzw. innerhalb der Matrix. Der dritte Einsatz der Methode war die immunhistochemische Färbung der explantierten Magenareale nach Finalisierung der Tiere. Hier kamen Antikörper gegen alpha smooth muscle actin und Kollagen III zum Einsatz, um die Morphologie und die Zusammensetzung des Gewebes noch differenzierter als durch die Standardfärbungen allein beurteilen zu können.



**Abbildung 7:** Vereinfachtes Prinzip der Immunhistochemie. Antigen als schwarzer Punkt auf Objektträger (blau) mit gebundenen Primär- und Sekundär-Antikörpern (schwarz); Farbumschlag der DAB-Lösung (weiß zu braun) durch Reaktion mit an Antikörper gebundenem Enzym (graues Sechseck).



**Tabelle 14:** Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem (nach SOP, Stand 15.01.2013).

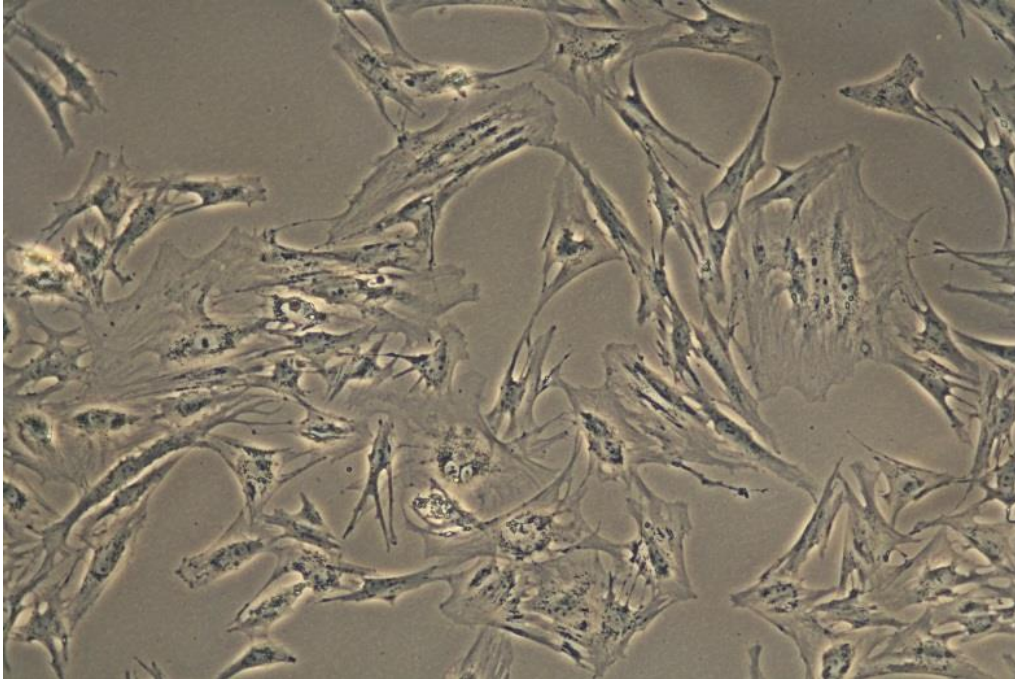
<b>Zeiten [min]</b>	<b>Lösung/Behandlung</b>	<b>Erklärung</b>
60	Warmeschrank 60 °C	Schmelzen des Paraffins
10	Xylol I	Absteigende Reihe: Entparaffinieren und Rehydrieren
10	Xylol II	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 96 % I	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 96 % II	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 70 %	
3 x auf- und abtauchen	Ethanol 50 %	
0,5	VE-Wasser	Spülen
20	Kochen in Citratpuffer, alternativ:	Demaskierung der Epitope
12	Enzym (nach AK-Datenblatt)	
Umranden der Schnitte mit einem Fettstift, um Verlaufen der AK-Lösung zu vermeiden		
5	Waschpuffer	
10 (evtl. Mehrmals, mikroskopische Kontrolle!)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3 %	Blockieren der endogenen Peroxidase
5	Waschpuffer	
60 bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei +4 °C	Primärer AK in Konzentration laut Datenblatt	
3 x 5	Waschpuffer	Entfernen ungebundener AK
10	Polymer-Enhancer	Amplifizierung
3 x 5	Waschpuffer	
20	HRP-Polymer-Reagenz	
3 x 5	Waschpuffer	
5	DAB-Lösung	Farbreaktion
5-7	Waschpuffer	

0,5	Hämalaun	Gegenfärben der Zellkerne
1	Leitungswasser	Bläuen
2 x kurz eintauchen	Ethanol 70 %	Aufsteigende Reihe: Entwässern
2	Ethanol 96 %	
5	Isopropanol I	
5	Isopropanol II	
5	Xylol I	
5	Xylol II	
Eindecken mit Entellan und Deckglas		

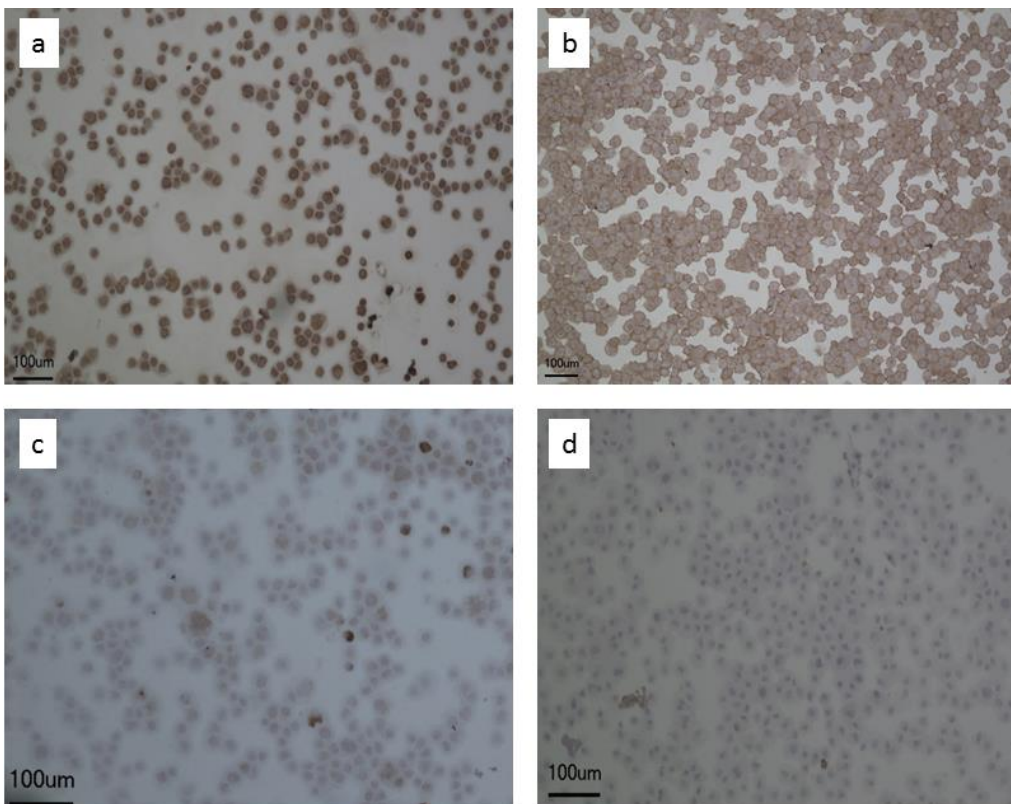
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellisolation und -charakterisierung

Die Verarbeitung der Hautbiopsate zur Zellisolation entsprechend dem Vorgehen nach SOP gestaltete sich problemlos. Ein regelrechtes Auswachsen von Fibroblasten war zu beobachten. Das Medium war stets tiefrot. Nach 8 Tagen zeigten vier von fünf Kulturen Konfluenz und wurden am 9. Tag passagiert. In einer Kultur war das Zellwachstum vergleichsweise geringer, sodass hier auf das Passagieren zunächst verzichtet wurde. Antibiotisch wurden die Kulturen weiterhin mit Penicillin, Streptomycin, Gentamycin und Metronidazol (jeweils 1 %) abgedeckt. Unmittelbar vor der Kryokonservierung lag die absolute Zellausbeute pro Kultur im Mittel bei  $1,57 \times 10^6$  ( $\pm 0,66 \times 10^6$ ). Bei Rekultivierung der Zellen nach 12-tägiger Konservierung bei  $-80^\circ\text{C}$  wurde im Vergleich zum Ausgangswert eine mittlere Zellausbeute von 68,0 % ( $\pm 35,5$  %) erzielt. In Abbildung 8 sind die Fibroblasten in Kultur exemplarisch gezeigt. Die Immunhistochemie der Zytospins zeigte für Vimentin und etwas schwächer für  $\alpha$ -smooth-muscle eine positive Anfärbung. Bei Desmin und CD31 war keine Anfärbung zu beobachten (Abb. 9).



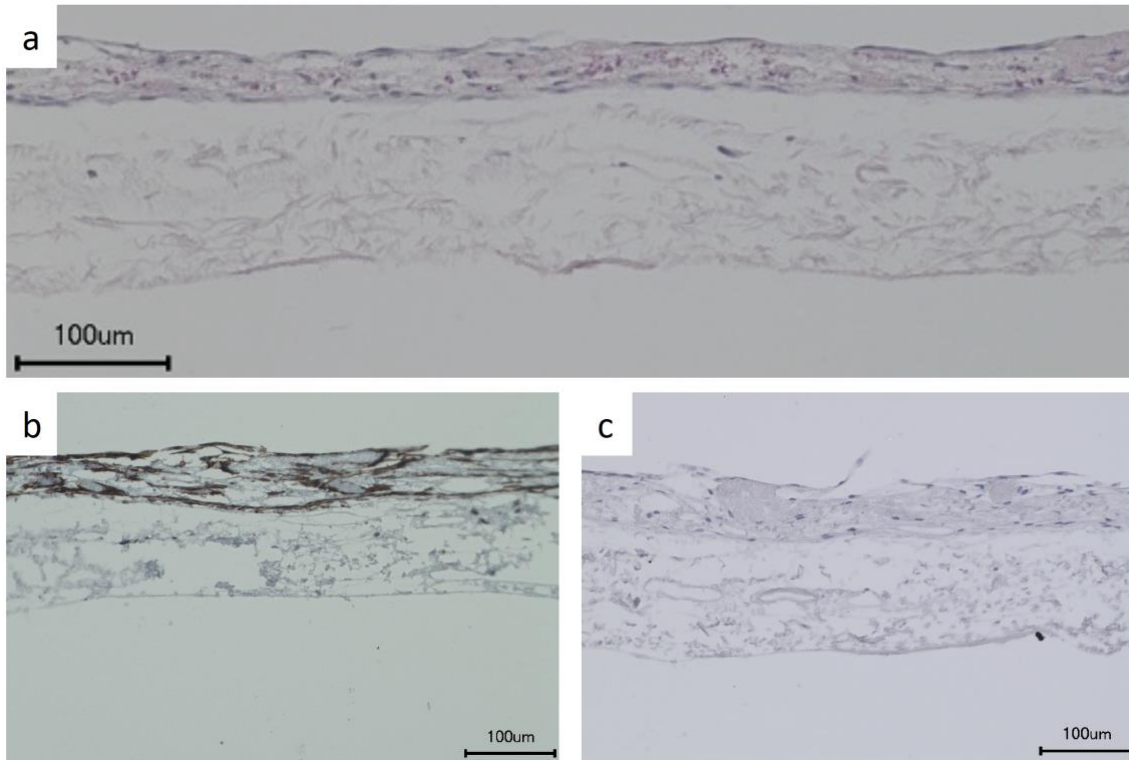
**Abbildung 8:** Phasenkontrastmikroskopie der primären Fibroblasten. Mikroskopie der adhärenenten Zellen nach der 3. Passage in Zellkultur.



**Abbildung 9:** Lichtmikroskopie der Cytospins nach Immunhistochemischen Färbungen. Vimentin (a), alpha-smooth-muscle actin (b), Desmin (c), CD31 (d).

## 4.2 Patch-Züchtung

Zur Herstellung der Patch-förmigen Implantate kam als Matrix SISmuc zum Einsatz, welche mit autologen Fibroblasten besiedelt wurde. In diesem Projekt wurde SISmuc der institutseigenen Charge Nr. 1 vom 22.11.2013 verwendet, die wie üblich bei 4 °C in steriler Pufferlösung gelagert war. Die Besiedelung der SISmuc mit Fibroblasten erfolgte anhand der entsprechenden SOP des Instituts. 24 Stunden vor der Besiedelung wurden SIS-Stücke in 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 40 ml Kulturmedium (DMEM ohne FCS) gegeben und im Brutschrank bei 37 °C ü.N. gelagert. Es erfolgten das Zuschneiden einzelner SIS-Stücke von ca. 3 x 3 cm und das Anbringen auf den autoklavierten Zellkronen, wobei die korrekte Orientierung der Matrix genaue Beachtung fand, da Zellen erfahrungsgemäß nur von der ursprünglichen luminalen/mucosalen Seite in die SIS einwachsen. Pro Versuchstier wurden sicherheitshalber jeweils 3 Ansätze eines Patch hergestellt: einer für die eigentliche Implantation, einer als Ersatz für den Fall eines Sterilitäts-Verlustes und einer zur histologischen Kontrolle. Zur sterilen Lagerung der Zellkronen kamen 12er Wellplatten zum Einsatz. So konnten die Zellkronen jederzeit von außen mit 1,5 ml und innen mit 0,5ml Kulturmedium benetzt werden. Vor der Besiedelung mit den Zellen wurden die Zellkronen mit der darauf montierten Matrix zunächst für zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Es folgte das Ablösen der Zellen, deren Zählung und Einstellen der Zelldichte auf ca. 120.000 Zellen/0,5 ml in der Suspension mit Kulturmedium. Jeweils 0,5 ml der Zellsuspensionen wurden in die Zellkronen gegeben. Auf die genaue Zuordnung und Kennzeichnung der Tier-spezifischen Ansätze wurde streng geachtet. Das Medium der Zellkronen wurde erstmals nach zwei Tagen, im Verlauf alle zwei bis drei Tage vorsichtig abgenommen und erneuert. Auf den Einsatz von Antibiotika bzw. Antimykotika im Kulturmedium wurde bei der Inkubation der Implantate verzichtet. Am 20. bzw. 21. und 22. Tag nach Besiedelung wurde das Kulturmedium durch DMEM ohne FCS ersetzt, die Wellplatten mit den Zellkronen in Parafilm verpackt und in einer Isoliertasche in den Tier-OP transportiert. Parallel wurde jeweils eines der drei Exemplare des Implantats für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Fixierlösung (PFA 4 %) getränkt und wie üblich zur Histologie vorbereitet. Es erfolgten eine HE-Färbung sowie Immunhistochemie für Vimentin.



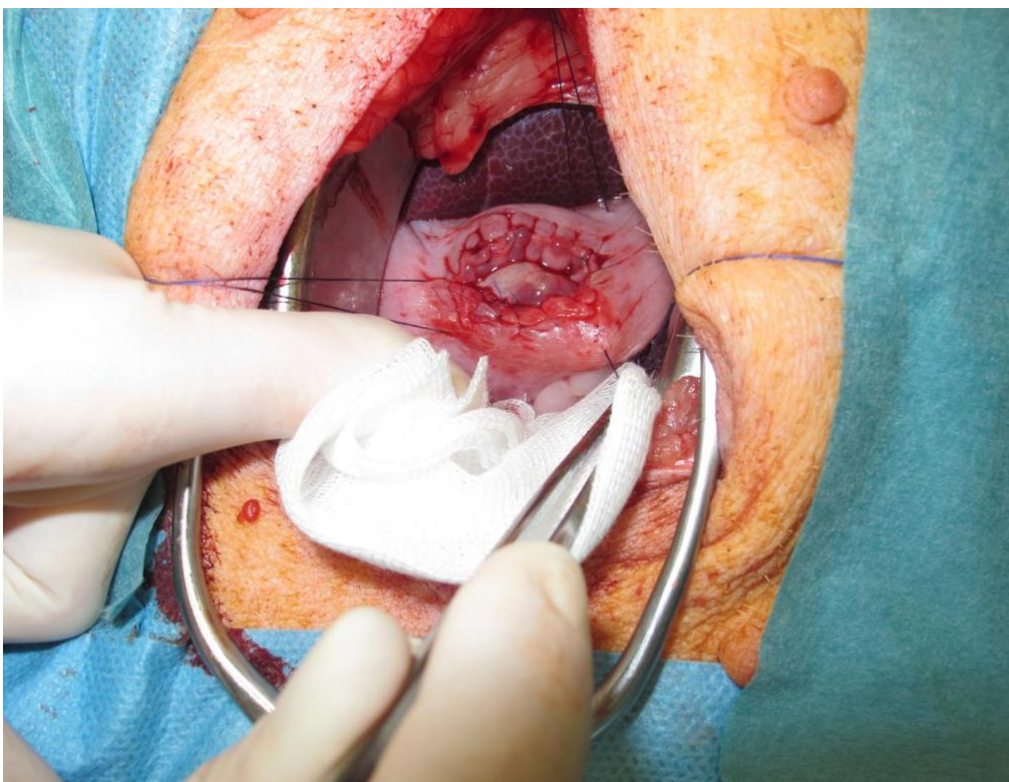
**Abbildung 10:** Kontrollpräparate der mit Fibroblasten besiedelten Matrix in der Lichtmikroskopie. HE (a), Immunhistochemie für Vimentin (b), Isotypenkontrolle (c). In allen Färbungen zeigen sich Zellen im Bereich der ursprünglichen Submucosa der SISmuc mit blauen Zellkernen, die Immunhistochemie bestätigt die Expression von Vimentin.

### 4.3 Implantation

Im Vorfeld der eigentlichen Operationen wurden Vorübungen an Schweinemägen von geschlachteten Schweinen sowie an unbesiedelter Matrix durchgeführt, um einer Verzerrung der Ergebnisse durch die zu erwartende Lernkurve entgegenzuwirken. Hierbei kristallisierten sich mehrere entscheidende Arbeitsschritte heraus: Nach Abnehmen der Matrix von den Zellkronen zeigt diese eine starke Tendenz, sich zusammen zu ziehen, was die korrekte Ausrichtung der besiedelten Seite nach endoluminal zunächst erschwerte. Dieses Problem wurde durch vorheriges Anbringen von Haltefäden an allen vier Ecken der Matrix und Knotenmarkierungen gelöst. Das Einbringen der Implantate in die Tiefe des Operationssitus erforderte eine koordinierte Zusammenarbeit in Vierhand-Technik. Initial zeigte die Matrix an den Einstichstellen eine deutliche Vulnerabilität und es kam stellenweise zum Einreißen der Matrix. Dem wurde im Rahmen der Vorübungen durch Optimierung des Fadenmaterials (feinere Stärke) begegnet. Im Rahmen der eigentlichen Operationen waren trotz mehrtägiger,



ausschließlich flüssiger Fütterung noch reichlich faserhaltige Futterreste in den Mägen vorhanden, was die Implantationen zunächst erschwerte. Dem wurde mit konsequentem Zug an den Haltefäden nach kranial (Abb. 11) begegnet, sodass die Kontamination der Bauchhöhle mit Mageninhalt vermieden werden konnte. Ansonsten traten keine intraoperativen Besonderheiten auf, sodass die Operationen bei allen Tieren bis zum Ende erfolgreich durchgeführt werden konnten. Die mittlere Schnitt-Naht-Zeit betrug in der Experimentalgruppe  $75 \pm 28$  Minuten und in der Kontrollgruppe  $39 \pm 24$  Minuten.

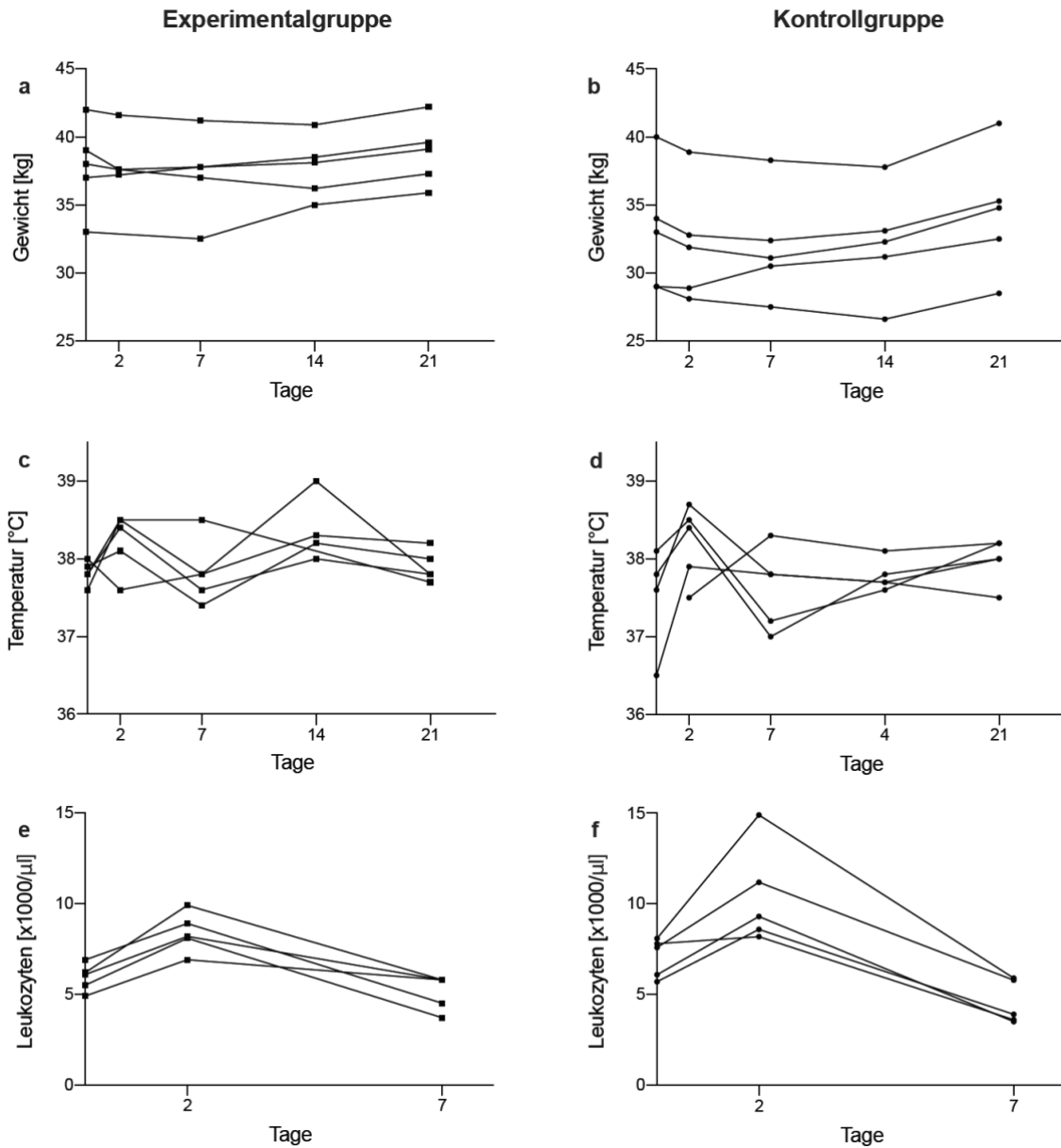


**Abbildung 11:** *Operationssitus der Experimentalgruppe. Eröffnete Bauchwand und -höhle mit Blick auf den Intraoperitonealraum, Magenvorderwand in der Mitte mit drei Haltefäden und implantiertem Patch (äußere Nahtreihe auf der Serosa erkennbar), Anteile der Leber oberhalb des Magens sichtbar (dunkelrotes Gewebe).*

#### 4.4 Klinischer Verlauf

Die primären Operationen konnten bei allen Tieren beider Gruppen ohne Komplikationen durchgeführt werden. Auch der postoperative Verlauf war in allen Fällen frei von Komplikationen. Anhand der Klinik konnten weder allgemeine Komplikationen wie

Nachblutungen, Wunddehiszenzen oder Darmverschlüsse beobachtet werden, noch kam es zu speziellen Problemen wie Abstoßungsreaktionen oder Peritonitiden aufgrund gastraler Leckagen. Am zweiten postoperativen Tag wurden die Pflaster über den Hautnarben entfernt. Bei allen Tieren zeigten sich reizlose Wundverhältnisse. Das Fressverhalten war ebenfalls unauffällig. Das Körpergewicht war bei allen Tieren stabil bzw. nahm im Verlauf sogar zu (Abb. 12 a-b). Die Körpertemperaturen wurden bei jeweils einem Tier der Experimental- und der Kontrollgruppe aus organisatorischen Gründen präoperativ nicht erhoben. Bei den anderen Tieren zeichnete sich in beiden Gruppen nach dem Primäreingriff ein leichter Temperaturanstieg im Vergleich zu den basalen Messungen ab (Abb. 12 c-d). Die Leukozytenwerte waren am zweiten postoperativen Tag bei allen Tieren innerhalb des Normbereiches leicht angestiegen und am siebten postoperativen Tag in allen Fällen wieder abgefallen (Abb. 12 e-f). Die CRP-Werte waren bei allen Tieren sowohl präoperativ als auch am zweiten und siebten postoperativen Tag normwertig.



**Abbildung 12:** Klinische Verlaufsparemeter. Körpergewicht (a, b), rektale Körpertemperatur (c, d), Leukozytenkonzentration (e, f) an den jeweiligen postoperativen Tagen.

## 4.5 Laparoskopie

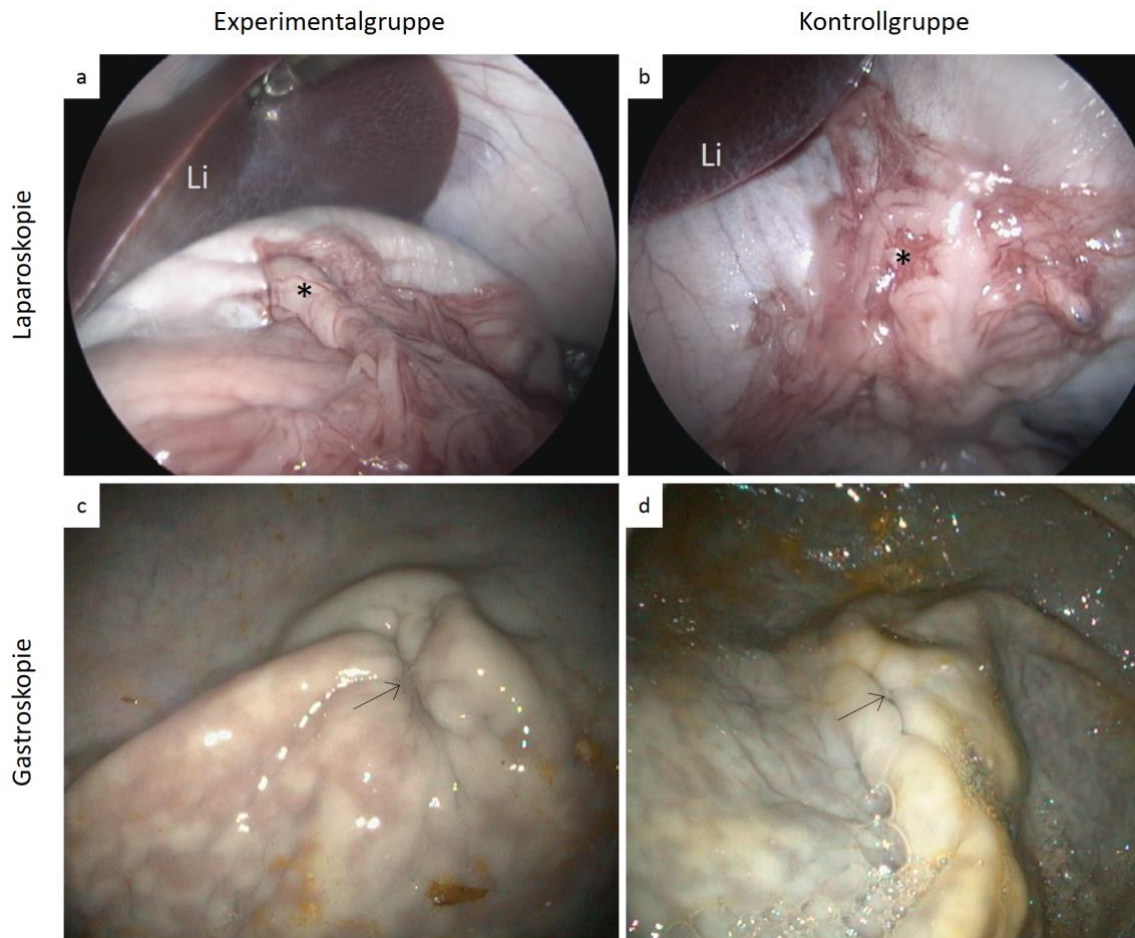
Laparoskopisch fanden sich am siebten postoperativen Tag bei allen Tieren unauffällige intraperitoneale Verhältnisse. Auch in den typischen Bereichen wie der parakolischen Rinne und dem Douglas-Raum zeigten sich keine Abszesse oder Flüssigkeitsverhalte. Die operierten Magenareale konnten schnell identifiziert werden, da bei allen Tieren Verwachsungen des Omentum majus entstanden waren. Auch lokal im Bereich der



ursprünglichen Gastrotomien gab es in beiden Gruppen keine Anzeichen für Insuffizienzen. In den Bereichen der Verwachsungen war das Gewebe vulnerabel und es kam in einem Fall der Experimentalgruppe nach mechanischer Exploration zu einer Sickerblutung, die spontan sistierte.

## **4.6 Gastroskopie**

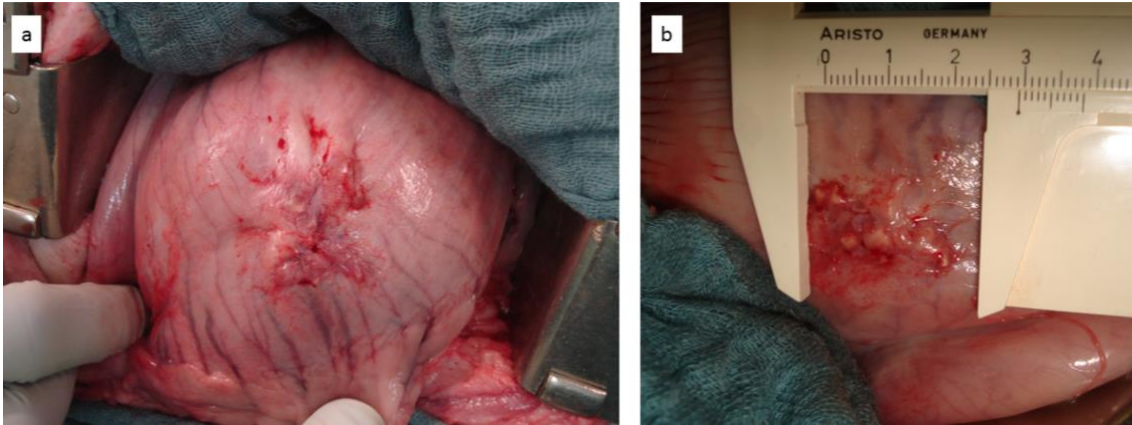
Die gastroskopische Beurteilung und die gleichzeitig durchgeführte Fotodokumentation wurden durch Nahrungsreste im Magen erschwert, was bei einigen Tieren zunächst eine Spülung via Magensonde und anschließend gezieltes Spülen über das Endoskop erforderte. Sowohl bei den Patch-Tieren, als auch in den Kontrollen waren die operierten Areale zwischen den Magenfalten nach der üblichen Luftinsufflation auffindbar. In beiden Gruppen zeigten sich Schleimhautvorwölbungen im ursprünglichen Defektbereich. Die Mucosa war bis auf einen kleinen zentralen Bereich makroskopisch durchgehend intakt, wobei insgesamt eine etwas bessere Adaption der Mucosa in der Kontrollgruppe vorlag. In allen Fällen waren die Verhältnisse ansonsten reizlos.



**Abbildung 13:** *Laparoskopie und Gastroskopie im postoperativen Verlauf. Sicht auf die Magenvordwand mit Verwachsung des Omentum majus im Bereich des Defektes in beiden Gruppen (\*) am siebten postoperativen Tag (a, b), Li=Leber. Gastroskopische Sicht auf die Magenwand von endoluminal mit Aufreibung der Mucosa um den Defekt in beiden Gruppen am 14. postoperativen Tag, Speisereste (gelbe Flecken) nach ausgiebiger Spülung via Gastroskop.*

## 4.7 Finalisierung

Die dreiwöchige Phase der klinischen Nachbeobachtung wurde durch die Euthanasie der Tiere beendet und konnte in allen Fällen ohne Besonderheiten vorgenommen werden. Die intraperitonealen Verhältnisse waren, den vorangegangenen laparoskopischen Befunden entsprechend, bei allen Tieren unauffällig und die Verwachsungen unverändert. Der ursprüngliche Defektbereich war in allen Fällen ca. Walnuss-groß und derb zu tasten.



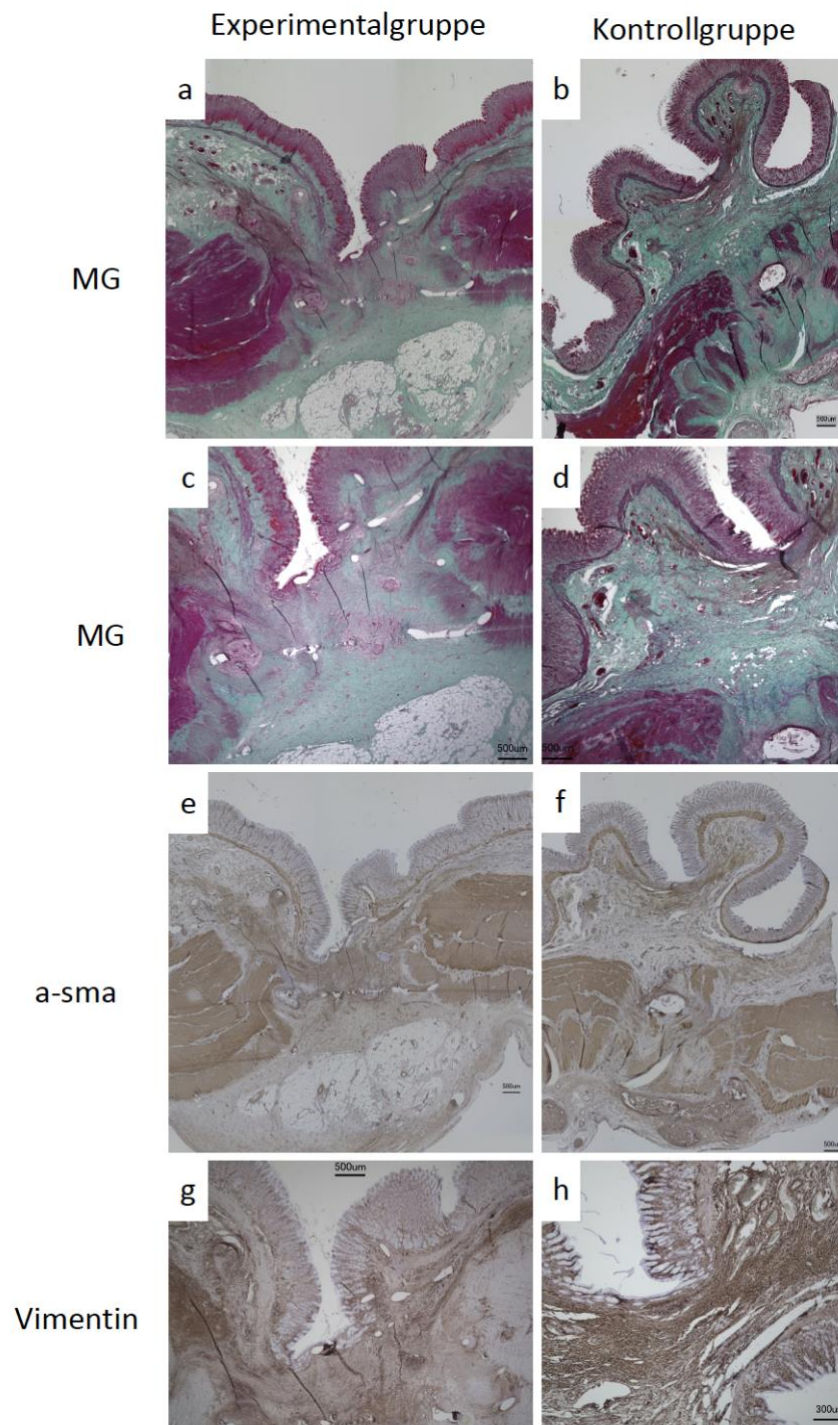
**Abbildung 14:** Postmortale Ansicht der Magen Vorderwand in der Experimentalgruppe. Abgebildeter Zustand nach Adhäsionslyse der bereits laparoskopisch festgestellten Verwachsungen des Omentum majus mit dem Defekt in der Magen Vorderwand (a, b).

## 4.8 Histologie

Die histologische Aufarbeitung der Proben war mit einigen Problemen behaftet. Die Magenwand war in den betroffenen Arealen durch Auftreibung der glatten Muskulatur um den ehemaligen Defekt deutlich verdickt. Daher fielen die exzidierten Proben sehr groß aus, was die Handhabung beim Zuschneiden nach Fixierung sehr erschwerte. Die makroskopisch sichere Orientierung für eine repräsentative Schnittführung war nur teilweise möglich, sodass die zentralen Defektbereiche in einigen Fällen vermutlich nur tangential getroffen wurden. Beim Schneiden der Proben am Mikrotom riefen Reste von Fadenmaterial und deren Stichkanäle regelmäßige Artefakte hervor. Erhebliche Anteile der Proben gingen daher bereits beim Schneiden aufgrund von starker Beschädigung verloren.

In den histologischen Übersichtsfärbungen zeigt sich in allen Fällen eine suffizient verschlossene Magenwand. Die drüsige Architektur der Mucosa war in beiden Gruppen im Defektbereich abgeflacht bzw. fehlte Artefakt-bedingt. Im Niveau der Submucosa imponierte eine deutliche Auftreibung. Die Muskelschichten (Muscularis mucosae bzw. propria) zeigten in den Übersichtsfärbungen deutliche Unterbrechungen, welche mit Bindegewebe überbrückt waren. Die Muskelschichten kamen in der immunhistologischen Markierung für alpha smooth muscle actin besonders zur Darstellung und zeigten in beiden Gruppen deutliche Unterbrechungen der Muskelschichten. Das Bindegewebe war in der HE-Färbung hellrot, in der Masson-Goldner-Färbung grün und in der Pentachrom-Färbung gelb-grün gefärbt. Abluminal der Muscularis propria lag reichlich Binde- sowie farbloses

Fettgewebe des Omentum majus vor, welches in allen Fällen Verwachsungen im Bereich der Defektzone zeigte.



**Abbildung 15:** Histologie der postmortalen Magen-Präparate. Masson-Goldner-Färbung in der Übersicht (a, b) und höhere Vergrößerung im Bereich des jeweils noch vorhandenen Defektes (c, d). Immunhistochemische Färbung gegen alpha-smooth muscle actin (e, f). Immunhistochemische Färbung gegen Vimentin (g, h).

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte die Machbarkeit einer neuartigen Verschlussmethode für Vollwanddefekte des Magens am Großtiermodell gezeigt werden. Die Herstellung autolog-zellbesiedelter Implantate im Tissue Engineering-Verfahren wurde etabliert und die chirurgische Verwendung derselben in einem sich anschließenden Großtierversuch an Göttinger Minischweinen erfolgreich demonstriert. Anhand einer Kontrollgruppe wurden der klinische Verlauf sowie das histologische Resultat der neuartigen Verschlusstechnik mit dem Goldstandard verglichen. Hier zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

### 5.1 Entwicklung der Implantate

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Herstellungsprozess für autolog-zellbesiedelte Implantate etabliert. Dabei war die Gewinnung von Fibroblasten aus Hautproben als ein Teilschritt bereits etabliert und konnte anhand der entsprechenden SOP des Instituts problemlos durchgeführt werden. Innerhalb weniger Tage waren jeweils ausreichend viele Primärzellen aus Hautproben der Experimental-Tiere in der Zellkultur vorhanden, um die vorab geplanten Zahlen zur Besiedelung zu erfüllen. Eine mikrobielle Kontamination der Primärzellen konnte weder makroskopisch noch mittels Mycoplasmen-PCR detektiert werden. Dabei muss jedoch der exzessive Einsatz antimikrobieller Medikamente berücksichtigt werden. Vor dem Hintergrund zunehmender Antibiotikaresistenzen und der nicht zu vernachlässigenden Effekte von Antibiotika auf die Zellphysiologie sollten derartige Maßnahmen in Zukunft streng abgewogen werden.<sup>68</sup> Optimierungen der aseptischen Maßnahmen bei der Entnahme von Biopsien sind hier erforderlich. Die zellbiologische Zuordnung und Charakterisierung der gewonnenen Zellen wurden anhand der mikroskopischen Morphologie sowie durch immunhistochemische Färbungen erzielt. Da ein standardisierter immunologischer Marker für die heterogene Zellgruppe der Fibroblasten bisher nicht verfügbar ist<sup>69</sup> musste ein Ausschlussverfahren zur näheren Eingrenzung des Zelltyps angewendet werden. Dafür wurden in dieser Arbeit Zytospins der Primärzellen angefertigt und diese immunhistochemisch untersucht. Hinsichtlich einer objektiven Nachweismethode wären alternativ auch andere, jedoch insgesamt aufwändigere Antikörper-basierte Methoden wie die Immunfluoreszenz in Kammerobjektträgern oder die Durchflusszytometrie denkbar gewesen.<sup>70,71</sup> Der Vorteil der



simplen Anfertigung von Zytospins relativiert sich bei der Auswertung der Färbungen. Die durch Zentrifugieren auf Objektträger fixierten Zellen befinden sich in einem unphysiologischen, abgerundeten Zustand und sind daher schwerer zu beurteilen als beispielsweise gefärbte Zellen auf Kammerobjektträgern. Da jedoch die mikroskopische Beurteilung anhand der typischen Morphologie der Fibroblasten recht eindeutig war, wurde zur weiteren Differenzierung des Zelltyps ein eher einfaches Verfahren als ausreichend genau und zugleich praktikabel erachtet. Zur immunhistochemischen Positiv-Markierung von Fibroblasten sind Vimentin und alpha-smooth muscle actin geeignet. Eine Expression von Vimentin und alpha smooth muscle actin in den isolierten Zellen konnte durch positive Antikörper-markierung gezeigt werden. Im Fall von Desmin sowie CD31 war die Färbung negativ, wodurch die Abwesenheit glatter Muskelzellen sowie von Endothelzellen gezeigt wurde. Insgesamt ließ sich daran objektiv festhalten, dass es sich um mesenchymale Zellen mit kontraktilelementen, also Myofibroblasten vom sogenannten VA-Typ nach Powell handelte.<sup>72</sup> Dieser Zelltyp wird auch als sogenannter „aktivierter“ Fibroblast bezeichnet. Zu einer Aktivierung von Fibroblasten kommt es im Rahmen inflammatorischer Prozesse, durch mechanische Stimulation oder - wie in diesem Fall - bei Kultivierung der Zellen in FCS-haltigem Medium.<sup>66,73</sup> Diese zelluläre Differenzierung der Fibroblasten war für den vorgesehenen Einsatz zur Unterstützung der Wundheilung ausdrücklich erwünscht, wobei jedoch keine weitere Untersuchung der Zellen hinsichtlich ihrer Differenzierung, Funktion oder Vitalität erfolgte, sodass eine nicht zu vernachlässigende Unsicherheit bezüglich des Schicksals der Zellen anzunehmen war. Im Rahmen der Implantat-Herstellung konnte eine kontrollierte zeitliche Unterbrechung der Produktion durch Zellkonservierung erzielt werden. Auch dieser Vorgang war bereits gut etabliert und konnte anhand einer SOP durchgeführt werden. Die Zellkonservierung wurde im Rahmen dieser Arbeit vereinfacht und damit für das vorliegende Projekt praktikabel gestaltet. Aufgrund des relativ kurzen Zeitintervalls, welches zu überbrücken war, wurden die initial übliche Lagerung bei -80 °C für den gesamten Zeitraum beibehalten. Auf eine zeitnahe Überführung in einen Stickstofftank - wie bei langfristiger Konservierung üblich - wurde verzichtet. Die Rate vitaler Zellen betrug bei Reaktivierung im Mittel 68,0 % ( $\pm$  35,5 %) und lag damit in einem zu erwartenden Bereich mit großer Streuung.<sup>74</sup> Durch Lagerung der Zellen in Flüssigstickstoff bei -196 °C, Umsetzung neuer Erkenntnisse bezüglich zellspezifischer Kryoprotektiva und Biopsientnahme aus anderen Hautarealen könnte die Zellausbeute vermutlich gesteigert werden.<sup>74,75</sup> Konservierte Zellen könnten auf diese Weise auch nach Jahren zur Generierung

autologer Implantate verwendet werden.<sup>76</sup> Bei der Besiedelung und Inkubation der Zellen auf der Matrix handelte es sich um die zuvor am wenigsten etablierten Schritte der Implantatherstellung. Diese wurden allein auf der Basis von Erfahrungswerten aus anderen Projekten vorgenommen. Hier wurde retrospektiv Potential für Optimierungen erkannt. Cimini und Kollegen konnten die Inkubationsdauer als entscheidenden Parameter für das räumliche Ausmaß der Fibroblasten-Migration in SIS identifizieren. Die Zellzahl bei Besiedelung spielt ihren Erkenntnissen zufolge eine untergeordnete Rolle.<sup>77</sup> Folglich sollte in weiterführenden Untersuchungen eine minimal erforderliche Inkubationsdauer ermittelt werden, um die Herstellung der Implantate möglichst kurzfristig und damit klinisch praktikabel gewährleisten zu können. Insgesamt betrachtet ist die erfolgreiche Herstellung der Implantate mit den Einzelschritten der Zellgewinnung und -vermehrung, der zwischenzeitlichen Zellkonservierung sowie der Matrix-Besiedelung und schließlich der Implantation als Erfolg zu werten.

## **5.2 Erprobung am Großtiermodell**

In einem Großtiermodell wurden iatrogene Vollwanddefekten des Magens mithilfe der experimentellen Methode versorgt. Hinsichtlich der beiden Hauptzielgrößen Morbidität und Mortalität lieferte das neue Verfahren innerhalb der vierwöchigen Nachbeobachtung gleichwertige Ergebnisse wie der Goldstandard. Die klinischen Befunde sowie laborchemischen Werte waren in beiden Gruppen und bei allen Tieren im postoperativen Verlauf weitgehend unauffällig. Die makroskopischen Beurteilungen mittels Laparoskopie und Gastroskopie zeigten am siebten bzw. 14. postoperativen Tag eine regelrechte und gleichwertige Wundheilung in beiden Gruppen. Signifikante Leckagen der Magenwand und daraus potenziell resultierende Folgen wie Peritonitiden wurde ausgeschlossen. So konnte gezeigt werden, dass die Implantate prinzipiell zur chirurgisch-technischen Implantation geeignet sind. Der explorative Charakter dieser Arbeit gebietet jedoch eine äußerst kritische Betrachtung der Ergebnisse. Die kleinen Kollektive mit jeweils fünf Tieren in der Versuchs- bzw. Kontrollgruppe sind als Pilotstudie zu betrachten und es können keine Aussagen zur Sicherheit des neuen Verfahrens abgeleitet werden. Weiterführende Untersuchungen mit größeren Tiergruppen sind daher nötig. Die Verwachsungen des Omentum majus mit den Defektarealen an der Magenvorderwand waren bereits am siebten postoperativen Tag im Zuge der Laparoskopien zu beobachten und auch nach Euthanasierung noch vorhanden. Derartige Verwachsungen treten postoperativ bei über 50 % der Patienten mit abdominalen

Eingriffen auf und in 80 % ist das Omentum majus involviert.<sup>78</sup> Das Omentum majus, auch großes Netz genannt, stellt eine Duplikatur des Peritoneums an der großen Kurvatur des Magens dar und hat offenbar einen protektiven Einfluss im Falle intraperitonealer Verletzungen und Infektionen.<sup>79</sup> Das gezielte Ausnutzen dieser natürlichen Eigenschaften ist in verschiedenen Bereichen der Viszeralmedizin untersucht worden. Beispielsweise konnte in randomisiert kontrollierten Studien ein schützender Effekt einer gezielten Anheftung des Omentums (Omentopexie) an Anastomosen im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden.<sup>80-82</sup> In einer experimentellen Arbeit konnten Vollwanddefekte des Magens bei Schweinen erfolgreich durch gezieltes Anheften des Omentum versorgt werden.<sup>83</sup> Auch die europäische Fachgesellschaft für gastrointestinale Endoskopie misst der Verwendung des Omentums einen Stellenwert zur Beherrschung großer iatrogenen Defekte bei.<sup>39</sup> Bemerkenswert waren die Ergebnisse zweier Großtierstudien in denen überraschenderweise weder die Morbidität noch die Mortalität erhöht war, nachdem transgastrische Zugänge zur Peritonealhöhle bewusst nicht verschlossen wurde. Auch in diesen Arbeiten wurden im postoperativen Verlauf Verwachsungen des Omentum mit dem Magen beobachtet.<sup>84,85</sup> Eine retrospektive Analyse mit 645 Patienten, die einen ileoanalen Pouch erhalten hatten, fand eine Korrelation zwischen der Entfernung des Omentums und einer erhöhten Inzidenz postoperativer Septitiden.<sup>86</sup> Allgemein ist die Bedeutung des Omentum majus schon seit langer Zeit bekannt. So wurde beispielsweise 1937 erstmals die Technik des sogenannten Graham-Patches beschrieben, bei der das Omentum majus durch eine Naht an den perforierten Magen bzw. Darm angeheftet wird (Omentopexie).<sup>87</sup> Die genauen Mechanismen hinter diesen Beobachtungen sind zwar noch unklar, der hohe Stellenwert des Omentum majus ist in der klinischen Praxis aber unbestritten und darf bei der Interpretation der hier erbrachten Ergebnisse nicht vernachlässigt werden. Da in dieser Arbeit in allen Fällen Verwachsungen auftraten, ist eine Verzerrung und eventuell sogar eine Überbewertung der Ergebnisse möglich. In weiteren Tierversuchen dürfte mit ähnlichen Ergebnissen zu rechnen sein. Um einer erneuten Limitierung der Ergebnisse proaktiv zu begegnen, sollte eine simultane Entfernung des Omentum majus, eine sog. Omentektomie in einer gesonderten Gruppe erwogen werden.<sup>62</sup>

In Bezug auf die Implantate stellt sich die Frage nach dem Schicksal der autologen Zellen nach der Implantation. Der pH-Wert des Magensekrets beträgt bei Minischweinen im Durchschnitt  $3,65 \pm 0,11$  und liegt damit in einem ähnlichen Bereich wie beim Menschen.<sup>88,89</sup>



Des Weiteren besteht das Magensekret aus zahlreichen proteolytischen sowie lipolytischen Enzymen.<sup>90</sup> Diesem insgesamt sehr aggressiven Milieu dürften die Implantate und damit auch die Fibroblasten unmittelbar ausgesetzt gewesen sein, sodass von einem gewissen Verlust vitaler Zellen auszugehen ist. Über den Zustand der Implantate und insbesondere der Zellen nach Implantation kann jedoch nur spekuliert werden, da eine in-vivo-Kontrolle in den ersten postoperativen Tagen nicht durchgeführt wurde. Der Effekt bzw. die Notwendigkeit einer Zellbesiedelung bleibt daher ungeklärt. In zwei kleinen Großtierstudien konnte gezeigt werden, dass auch SIS alleine ohne Zellbesiedelung zufriedenstellende Ergebnisse bei der Deckung von Vollwanddefekten des Colons bzw. des Magens liefern kann.<sup>62,91</sup> Die Überlegenheit zellbasierter Implantate gegenüber reiner Matrix muss anhand einer Kontrollgruppe erst gezeigt werden. Zur genaueren Untersuchung könnte das Überleben der Zellen in Zukunft mithilfe von Nanopartikel oder nuklearmedizinischer Techniken in-vivo evaluiert werden.<sup>92,93</sup> Ein anderer denkbarer Ansatz zur Herstellung von Implantaten wäre ein umgekehrtes Prinzip, also die Verwendung von Zellen ohne Matrix. Etabliert ist bereits die Technologie der sogenannten Cell Sheets. Dabei handelt es sich um „Zellfolien“, welche ohne Matrix auskommen. Hierzu kultiviert man Zellen auf speziellen Materialien, deren Oberflächeneigenschaften durch Temperaturänderung gezielt variiert werden können. Bei über 32 °C adhären Zellen auf dem Material, bei geringeren Temperaturen lösen sie sich ab, während die Zell-Zell-Kontakte erhalten bleiben. Mit diesem recht simplen Prinzip können Cell Sheets aus unterschiedlichen Zelltypen gezüchtet werden.<sup>94</sup> Cell Sheets aus autologen Myofibroblasten wurden bereits zum Verschluss von Vollwanddefekten des Magens in Ratten erfolgreich implantiert.<sup>95</sup> In einer Studie an Schweinen wurden Cell Sheets aus mesenchymalen Stammzellen zur „Sicherung“ von Anastomosen erfolgreich eingesetzt.<sup>96</sup> Klinischen Erfahrungen an Patienten gibt es bisher nur in Bezug auf die Herstellung von Cells Sheets aus Zellen der Mundschleimhaut.<sup>97</sup> Der entscheidende Vorteil der Cell Sheets ist die Unabhängigkeit von Trägermaterialien. Da außerdem die Zellbesiedelung des Trägermaterials und die anschließende Inkubationszeit wegfallen, dürfte der Herstellungsprozess vergleichsweise einfacher, zügiger sowie kostengünstiger zu bewerkstelligen sein. Die mechanische Belastbarkeit von Cell Sheets ist aufgrund der Beschaffenheit aber gering, was wiederum das Anwendungsspektrum limitiert.

## 5.3 Histologie

In Analogie zur klinischen Nachbeobachtung der Tiere und der makroskopischen Beurteilung der Präparate zeigte die mikroskopische Begutachtung einen suffizienten Verschluss der Defektareale bei allen Tieren der beiden Gruppen. Die Implantate waren strukturell nicht mehr abzugrenzen, was mit den zu erwartenden Resorptionsvorgängen der Wundheilung in Einklang steht. In allen Fällen zeigte sich aufgetriebenes, kollagenes Bindegewebe als Überbrückung der ursprünglichen Lücke in der Magenwand. Ein initiales Remodeling der Mucosa war in beiden Gruppen zu beobachten. Diese Beobachtungen sind allerdings nur eine Momentaufnahme des strukturellen Zustands nach vier Wochen. Die Frage nach einem vollständigen Remodeling der Magenwand im Sinne einer funktionell intakten Mucosa sowie einer durchgehenden Muscularis kann nicht beantwortet werden. Eine vollständige Regeneration dürfte bis zu einem Jahr oder mehr in Anspruch nehmen<sup>11</sup>, sodass eindeutige Erkenntnisse hierzu durch entsprechend längere Nachbeobachtungen gewonnen werden müssen.

Hinsichtlich der histologischen Aufarbeitung ergaben sich methodisch diverse Probleme. Makroskopisch konnte die Lokalisation der ursprünglichen Defekte bei den Proben nur vermutet werden, da auf eine Fadenmarkierung in den meisten Fällen verzichtet wurde. Folglich mussten die Proben vor dem Einbetten mit großzügigem Sicherheitsabstand zugeschnitten werden. Am Mikrotom entstanden Artefakte beim Zuschneiden der großen Proben, was zu einem erheblichen Verlust an Probenmaterial führte. Zudem waren in den Gewebeproben reichlich Fadenmaterial bzw. residuelle Stichkanäle vorhanden, die ebenfalls Artefakte hervorriefen. Für die histologische Aufarbeitung derartiger Proben könnte eine alternative Fixierungsmethode wie die Kryofixierung erwogen werden, um das Zuschneiden eventuell zu verbessern.

## 6 Fazit

Die prinzipielle Machbarkeit des neuen Konzeptes wurde in dieser Arbeit gezeigt. Zellbiologische und chirurgische Teilschritte konnten als schlüssiges Gesamtkonzept durchgeführt werden. Dabei wurden auch Limitationen hinsichtlich des Studiendesigns und der Aussagekraft der Ergebnisse festgestellt. Somit konnten auf Basis dieser Pilotstudie

entsprechende Optimierungen zur Planung weiterführender Untersuchungen abgeleitet werden.

## 7 Zusammenfassung

**Einleitung:** Strukturelle Defekte der gastrointestinalen Hohlgane stellen ein allgegenwärtiges Problem im klinischen Alltag dar. Sie entstehen meist auf dem Boden einer entzündlichen oder tumorösen Grunderkrankung und können außerdem traumatisch sowie durch medizinische Eingriffe hervorgerufen werden. In der Folge kommt es zur Kontamination des umliegenden Gewebes mit Magen- bzw. Darminhalt, wodurch deletäre Folgen wie eine systemische Infektion, also eine Sepsis mit Multiorganversagen drohen können. Vor diesem Hintergrund sind gastrointestinale Defekte immer als potenziell lebensbedrohlich für den Patienten zu betrachten. Die adäquate und kausale Behandlung erfolgt je nach Ätiologie und Zustand des Patienten durch eine Operation oder eine endoskopische Intervention. Hierzu stehen zahlreiche etablierte, operative und interventionelle Therapiemethoden zur Verfügung. In manchen Fällen stoßen die etablierten Techniken jedoch an ihre Grenzen. Bei Patienten mit schwerwiegenden Komorbiditäten oder im Rahmen neuer medizinischer Verfahren sind Innovationen gefragt. Die Grundidee der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer biotechnologischen Therapieoption zur Versorgung gastrointestinaler Hohlorganperforationen.

**Methoden:** Zur Durchführung einer Machbarkeitsstudie wurden zehn Göttinger Minischweine in zwei Gruppen mit jeweils 5 Tieren aufgeteilt. Den Tieren der Experimentalgruppe wurden Hautbiopsien entnommen und daraus Fibroblasten isoliert, welche vorübergehend konserviert wurden. Unter Verwendung von azellularisiertem Schweinedarm erfolgte die Herstellung von Implantaten nach den Prinzipien des Tissue Engineerings. Die Tiere beider Gruppen wurden einer Minilaparotomie und einer ca. 3cm-Inzision der Magenvorderwand unterzogen. Die anschließende Versorgung wurde in der Experimentalgruppe durch Implantation der neuartigen Konstrukte erzielt. In der Kontrollgruppe wurde im Sinne des Goldstandards eine konventionelle Naht durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere für vier Wochen beobachtet. Eine bzw. zwei Wochen nach dem primären Eingriff wurde bei allen Tieren beider Gruppen eine Laparoskopie bzw. Gastroskopie durchgeführt. Am Ende der klinischen Observationsphase wurden die

Versuchstiere getötet und die entsprechenden Magenareale zur histologischen Untersuchung explantiert.

**Ergebnisse:** Die Herstellung der Implantate konnte auf der Basis standardisierter zellbiologischer Methoden problemlos etabliert werden. Alle Tiere beider Gruppen überlebten den Primäreingriff sowie das vierwöchige Nachbeobachtungsintervall und zeigten dabei keine klinischen Zeichen möglicher Komplikationen. Die durchgeführten Laparoskopien und Gastroskopien ergaben bei keinem der Tiere Hinweise auf Leckagen oder lokale Infektionsprozesse. Die histologische Aufarbeitung zeigte im Bereich des ursprünglichen Defekts eine bindegewebige Überbrückung sowie ein beginnendes Remodeling der Magenschleimhaut in beiden Gruppen.

**Schlussfolgerungen:** Durch die Verknüpfung von Einzelprozessen der Zellkultur und dem Großtier-OP konnte ein neues Verfahren zum Verschluss gastrointestinaler Defekt erfolgreich demonstriert und etabliert werden. Das Projekt konnte reibungslos durchgeführt werden und lieferte Ergebnisse, die dem Goldstandard nicht unterlegen waren. Aufgrund der kleinen Fallzahl und weiterer methodischer Limitationen sind jedoch nur eingeschränkt Schlussfolgerungen möglich, weshalb die Durchführung größerer und gut geplanter Studien notwendig ist. Die Erkenntnisse dieser Pilotstudie liefern eine solide Basis für die Planung weiterführender Untersuchungen.

## 8 Summary

**Introduction:** Structural defects of the gastrointestinal hollow organs are a common problem in clinical routine. They mostly arise from inflammatory or malignant pathologies as well as trauma or medical procedures. Contamination of adjacent tissue with faeces is a consequence of this, which can lead to systemic infection e.g. sepsis with multiple organ failure. Bearing this in mind gastrointestinal defects are always potentially life-threatening for the patient. Considering the aethiology and the patient's general condition an appropriate therapy namely operation or endoscopic intervention will be performed. Though, these techniques have limitations in certain cases. For example there are patients with severe comorbidities or history of previous operations. And there are also new surgical procedures emerging. Therefore, innovations are needed in this field. The main purpose of the present

study is the fabrication of a new biotechnological method for therapy of gastrointestinal hollow organ perforation.

**Methods:** A feasibility study with Göttinger Minipigs was performed. Ten animals were randomly split up in two groups regarding closure technique. Skin biopsies were obtained from the animals of the experimental group (n=5) in order to obtain dermal fibroblasts. Using acellularised porcine small intestine seeded with the autologous dermal fibroblasts implants were manufactured following the principles of tissue engineering. All animals underwent laparotomy and a 3cm gastrical incision. Subsequently, animals of the experimental group received a novel implant in order to close the defect. Animals of the control group received a conventional suture as a gold standard technique. All animals were observed for four weeks. One and two weeks after primary surgery all animals underwent laparoscopy and gastroscopy respectively. Observation was completed after four weeks and all animals were euthanized. Relevant specimens of the gastric wall were explanted for histological examination.

**Results:** Fabrication of the implants was based on well-established cell culture methods. All animals survived within four weeks after primary surgery and showed no signs for possible complications. Neither laparoscopy nor gastroscopy revealed leakage or local infection in both groups. Histological examinations showed connective tissue in the defect-area predominantly but also initial remodeling of gastric mucosa.

**Conclusions:** In this trial, a novel method based on cell culture methods and surgery were combined creating a new technique for closure of gastrointestinal defect. The project was carried out smoothly and results showed non-inferiority compared with the gold standard. Though, evidence generated from this study is limited due to the small scaled design and methodological issues. Thus, further investigations with larger animal groups and proper planning are required. Nevertheless, this pilot study will contribute to improvement of trial designs in the future.

## 9 Literaturverzeichnis

1. van Ruler, O. & Boermeester, M. A. Surgical treatment of secondary peritonitis. A continuing problem. *Der Chirurg: Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* **88**, 1–6; 10.1007/s00104-015-0121-x (2017).
2. Dimou, F. & Velanovich, V. Perforations of the esophagus and stomach: what should I do? *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **19**, 400–406; 10.1007/s11605-014-2702-2 (2015).
3. Mulari, K. & Leppaniemi, A. Severe secondary peritonitis following gastrointestinal tract perforation. *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society* **93**, 204–208; 10.1177/145749690409300306 (2004).
4. Goh, B. K. P. *et al.* Perforation of the gastrointestinal tract secondary to ingestion of foreign bodies. *World journal of surgery* **30**, 372–377; 10.1007/s00268-005-0490-2 (2006).
5. Schmidt, A., Fuchs, K.-H., Caca, K., Kullmer, A. & Meining, A. The Endoscopic Treatment of Iatrogenic Gastrointestinal Perforation. *Deutsches Ärzteblatt international* **113**, 121–128; 10.3238/arztebl.2016.0121 (2016).
6. Raju, G. S., Saito, Y., Matsuda, T., Kaltenbach, T. & Soetikno, R. Endoscopic management of colonoscopic perforations (with videos). *Gastrointestinal endoscopy* **74**, 1380–1388; 10.1016/j.gie.2011.08.007 (2011).
7. Heldwein, W. *et al.* The Munich Polypectomy Study (MUPS): prospective analysis of complications and risk factors in 4000 colonic snare polypectomies. *Endoscopy* **37**, 1116–1122; 10.1055/s-2005-870512 (2005).
8. Merchea, A. *et al.* Esophagogastroduodenoscopy-associated gastrointestinal perforations: a single-center experience. *Surgery* **148**, 876-80; discussion 881-2; 10.1016/j.surg.2010.07.010 (2010).
9. Zhao, Y. & Wang, C. Long-Term Clinical Efficacy and Perioperative Safety of Endoscopic Submucosal Dissection versus Endoscopic Mucosal Resection for Early

- Gastric Cancer: An Updated Meta-Analysis. *BioMed research international* **2018**, 3152346; 10.1155/2018/3152346 (2018).
10. Deng, X.-F., Liu, Q.-X., Zhou, D., Min, J.-X. & Dai, J.-G. Hand-sewn vs linearly stapled esophagogastric anastomosis for esophageal cancer: a meta-analysis. *World journal of gastroenterology* **21**, 4757–4764; 10.3748/wjg.v21.i15.4757 (2015).
  11. Marjanovic, G. & Hopt, U. T. Physiology of anastomotic healing. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* **82**, 41–47; 10.1007/s00104-010-1898-2 (2011).
  12. Frasson, M. *et al.* Risk Factors for Anastomotic Leak After Colon Resection for Cancer: Multivariate Analysis and Nomogram From a Multicentric, Prospective, National Study With 3193 Patients. *Annals of surgery* **262**, 321–330; 10.1097/SLA.0000000000000973 (2015).
  13. Ruggiero, R. *et al.* Post-operative peritonitis due to anastomotic dehiscence after colonic resection. Multicentric experience, retrospective analysis of risk factors and review of the literature. *Annali italiani di chirurgia* **82**, 369–375 (2011).
  14. Inokuchi, M. *et al.* Systematic review of anastomotic complications of esophagojejunostomy after laparoscopic total gastrectomy, 01.01.2015.
  15. Smith, M. D. *et al.* Technical factors associated with anastomotic leak after Roux-en-Y gastric bypass. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery* **11**, 313–320; 10.1016/j.soard.2014.05.036 (2015).
  16. Deguchi, Y. *et al.* Identification of risk factors for esophagojejunal anastomotic leakage after gastric surgery. *World journal of surgery* **36**, 1617–1622; 10.1007/s00268-012-1559-3 (2012).
  17. Hyman, N., Manchester, T. L., Osler, T., Burns, B. & Cataldo, P. A. Anastomotic leaks after intestinal anastomosis: it's later than you think. *Annals of surgery* **245**, 254–258; 10.1097/01.sla.0000225083.27182.85 (2007).
  18. Kahler, G. Anastomotic Leakage after Upper Gastrointestinal Surgery: Endoscopic Treatment. *Visceral medicine* **33**, 202–206; 10.1159/000475783 (2017).
  19. Sparreboom, C. L. *et al.* Different Risk Factors for Early and Late Colorectal Anastomotic Leakage in a Nationwide Audit. *Diseases of the colon and rectum* **61**, 1258–1266; 10.1097/DCR.0000000000001202 (2018).

20. Kim, H. C., Yang, D. M., Kim, S. W. & Park, S. J. Gastrointestinal tract perforation: evaluation of MDCT according to perforation site and elapsed time. *European radiology* **24**, 1386–1393; 10.1007/s00330-014-3115-z (2014).
21. Ong, G. K. B. & Freeman, R. K. Endoscopic management of esophageal leaks. *Journal of thoracic disease* **9**, S135-S145; 10.21037/jtd.2017.03.100 (2017).
22. Virgilio, E., Ceci, D. & Cavallini, M. Surgical Endoscopic Vacuum-assisted Closure Therapy (EVAC) in Treating Anastomotic Leakages After Major Resective Surgery of Esophageal and Gastric Cancer. *Anticancer research* **38**, 5581–5587; 10.21873/anticancer.12892 (2018).
23. Clifford, R. E., Fowler, H., Govindarajah, N., Vimalachandran, D. & Sutton, P. A. Early anastomotic complications in colorectal surgery: a systematic review of techniques for endoscopic salvage. *Surgical endoscopy* **33**, 1049–1065; 10.1007/s00464-019-06670-9 (2019).
24. Kalloo, A. N. *et al.* Flexible transgastric peritoneoscopy: a novel approach to diagnostic and therapeutic interventions in the peritoneal cavity. *Gastrointestinal endoscopy* **60**, 114–117 (2004).
25. Lehmann, K. S. *et al.* Natural orifice transluminal endoscopic surgery in Germany: Data from the German NOTES registry. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* **86**, 577–586; 10.1007/s00104-014-2808-9 (2015).
26. Zhang, X. *et al.* Per-oral endoscopic myotomy in patients with or without prior Heller's myotomy: comparing long-term outcomes in a large U.S. single-center cohort (with videos). *Gastrointestinal endoscopy* **87**, 972–985; 10.1016/j.gie.2017.10.039 (2018).
27. Moehler, M. *et al.* German S3-guideline "Diagnosis and treatment of esophagogastric cancer". *Zeitschrift für Gastroenterologie* **49**, 461–531; 10.1055/s-0031-1273201 (2011).
28. Pox, C. *et al.* S3-guideline colorectal cancer version 1.0. *Zeitschrift für Gastroenterologie* **51**, 753–854; 10.1055/s-0033-1350264 (2013).
29. Thompson, E. V. & Bleier, J. I. S. Transanal Minimally Invasive Surgery. *Clinics in colon and rectal surgery* **30**, 112–119; 10.1055/s-0036-1597315 (2017).



30. Schwaitzberg, S. D. *et al.* The NOVEL trial: natural orifice versus laparoscopic cholecystectomy-a prospective, randomized evaluation. *Surgical endoscopy*; 10.1007/s00464-017-5955-5 (2017).
31. Bulian, D. R. *et al.* Transvaginal/transumbilical hybrid--NOTES--versus 3-trocar needlescopic cholecystectomy: short-term results of a randomized clinical trial. *Annals of surgery* **261**, 451–458; 10.1097/SLA.0000000000000218 (2015).
32. Bulian, D. R. *et al.* Analysis of the First 217 Appendectomies of the German NOTES Registry. *Annals of surgery* **265**, 534–538; 10.1097/SLA.0000000000001742 (2017).
33. Nau, P. *et al.* A review of 130 humans enrolled in transgastric NOTES protocols at a single institution. *Surgical endoscopy* **25**, 1004–1011; 10.1007/s00464-010-1369-3 (2011).
34. Bingener, J. & Gostout, C. J. Update on natural orifice transluminal endoscopic surgery. *Gastroenterology & hepatology* **8**, 384–389 (2012).
35. Magdeburg, R. & Kaehler, G. Natural orifice transluminal endoscopic surgery in humans: feasibility and safety of transgastric closure using the OTSC system. *Surgical endoscopy* **30**, 73–77; 10.1007/s00464-015-4163-4 (2016).
36. McAnulty, P., Dayan, A., Ganderup, N.-C. & Hastings, K. *The Minipig in Biomedical Research* (CRC Press, 2011).
37. Jiang, H.-P., Lin, L.-L., Jiang, X. & Qiao, H.-Q. Meta-analysis of hand-sewn versus mechanical gastrojejunal anastomosis during laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. *International journal of surgery (London, England)* **32**, 150–157; 10.1016/j.ijssu.2016.04.024 (2016).
38. Voermans, R. P. *et al.* In vitro comparison and evaluation of seven gastric closure modalities for natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES). *Endoscopy* **40**, 595–601; 10.1055/s-2008-1077409 (2008).
39. Paspatis, G. A. *et al.* Diagnosis and management of iatrogenic endoscopic perforations: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Position Statement. *Endoscopy* **46**, 693–711; 10.1055/s-0034-1377531 (2014).
40. Mangiavillano, B., Viaggi, P. & Masci, E. Endoscopic closure of acute iatrogenic perforations during diagnostic and therapeutic endoscopy in the gastrointestinal tract

- using metallic clips: a literature review. *Journal of digestive diseases* **11**, 12–18; 10.1111/j.1751-2980.2009.00414.x (2010).
41. Romagnuolo, J. Endoscopic clips: past, present and future. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* **23**, 158–160 (2009).
42. Li, Y. *et al.* New devices and techniques for endoscopic closure of gastrointestinal perforations. *World journal of gastroenterology* **22**, 7453–7462; 10.3748/wjg.v22.i33.7453 (2016).
43. Weiland, T., Fehlker, M., Gottwald, T. & Schurr, M. O. Performance of the OTSC System in the endoscopic closure of iatrogenic gastrointestinal perforations: a systematic review. *Surgical endoscopy* **27**, 2258–2274; 10.1007/s00464-012-2754-x (2013).
44. Kobara, H. *et al.* Over-the-scope clip system: A review of 1517 cases over 9 years. *Journal of gastroenterology and hepatology*; 10.1111/jgh.14402 (2018).
45. Bai, Y. *et al.* Role of transgastric natural orifice transluminal endoscopic surgery in the diagnosis of ascites of unknown origin (with videos). *Gastrointestinal endoscopy* **80**, 807–816; 10.1016/j.gie.2014.03.025 (2014).
46. Sanz, A. F. *et al.* In vivo assessment of a biological occluder for NOTES gastrotomy closure. *Surgical laparoscopy, endoscopy & percutaneous techniques* **24**, 322–326; 10.1097/SLE.0b013e3182a1c31b (2014).
47. Arezzo, A. & Morino, M. Endoscopic closure of gastric access in perspective NOTES: an update on techniques and technologies. *Surgical endoscopy* **24**, 298–303; 10.1007/s00464-009-0593-1 (2010).
48. Halvax, P. *et al.* Endoluminal full-thickness suture repair of gastrotomy: a survival study. *Surgical endoscopy* **29**, 3404–3408; 10.1007/s00464-015-4084-2 (2015).
49. Kobayashi, M. *et al.* Closure of iatrogenic large mucosal and full-thickness defects of the stomach with endoscopic interrupted sutures in in vivo porcine models: are they durable enough? *BMC gastroenterology* **15**, 5; 10.1186/s12876-015-0230-5 (2015).
50. Londono, R. & Badylak, S. F. Regenerative Medicine Strategies for Esophageal Repair. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **21**, 393–410; 10.1089/ten.TEB.2015.0014 (2015).

51. Appelt-Menzel, A. *et al.* Establishment of a Human Blood-Brain Barrier Co-culture Model Mimicking the Neurovascular Unit Using Induced Pluri- and Multipotent Stem Cells. *Stem cell reports* **8**, 894–906; 10.1016/j.stemcr.2017.02.021 (2017).
52. Stratmann, A. T. *et al.* Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean in silico model. *Molecular oncology* **8**, 351–365; 10.1016/j.molonc.2013.11.009 (2014).
53. Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T. & Kumar, D. S. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application. A Review. *International Journal of Polymer Science* **2011**, 1–19; 10.1155/2011/290602 (2011).
54. Hendow, E. K. *et al.* Biomaterials for hollow organ tissue engineering. *Fibrogenesis & tissue repair* **9**, 3; 10.1186/s13069-016-0040-6 (2016).
55. Stratton, S., Shelke, N. B., Hoshino, K., Rudraiah, S. & Kumbar, S. G. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive materials* **1**, 93–108; 10.1016/j.bioactmat.2016.11.001 (2016).
56. Aamodt, J. M. & Grainger, D. W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials* **86**, 68–82; 10.1016/j.biomaterials.2016.02.003 (2016).
57. Shi, L. & Ronfard, V. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review. *International journal of burns and trauma* **3**, 173–179 (2013).
58. Kararli, T. T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & drug disposition* **16**, 351–380 (1995).
59. Chang, C. W. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Seeding of Porcine Small Intestinal Submucosal Extracellular Matrix for Cardiovascular Applications. *PloS one* **11**, e0153412; 10.1371/journal.pone.0153412 (2016).
60. Cazzell, S. M., Lange, D. L., Dickerson, J. E., JR & Slade, H. B. The Management of Diabetic Foot Ulcers with Porcine Small Intestine Submucosa Tri-Layer Matrix: A Randomized Controlled Trial. *Advances in wound care* **4**, 711–718; 10.1089/wound.2015.0645 (2015).

61. Andree, B., Bar, A., Haverich, A. & Hilfiker, A. Small intestinal submucosa segments as matrix for tissue engineering: review. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **19**, 279–291; 10.1089/ten.TEB.2012.0583 (2013).
62. de la Fuente, Sebastian G *et al.* Evaluation of porcine-derived small intestine submucosa as a biodegradable graft for gastrointestinal healing. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **7**, 96–101 (2003).
63. Olarerin-George, A. O. & Hogenesch, J. B. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic acids research* **43**, 2535–2542; 10.1093/nar/gkv136 (2015).
64. Thul, P. J. *et al.* A subcellular map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)* **356**; 10.1126/science.aal3321 (2017).
65. Shamis, Y. *et al.* Fibroblasts derived from human embryonic stem cells direct development and repair of 3D human skin equivalents. *Stem cell research & therapy* **2**, 10 (2011).
66. Darby, I. A., Zakuan, N., Billet, F. & Desmouliere, A. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **73**, 1145–1157; 10.1007/s00018-015-2110-0 (2016).
67. Lertkiatmongkol, P., Liao, D., Mei, H., Hu, Y. & Newman, P. J. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Current opinion in hematology* **23**, 253–259; 10.1097/MOH.0000000000000239 (2016).
68. Llobet, L., Montoya, J., Lopez-Gallardo, E. & Ruiz-Pesini, E. Side Effects of Culture Media Antibiotics on Cell Differentiation. *Tissue engineering. Part C, Methods* **21**, 1143–1147; 10.1089/ten.TEC.2015.0062 (2015).
69. Ravikanth, M., Soujanya, P., Manjunath, K., Saraswathi, T. R. & Ramachandran, C. R. Heterogeneity of fibroblasts. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP* **15**, 247–250; 10.4103/0973-029X.84516 (2011).
70. Chang, H. Y. *et al.* Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12877–12882; 10.1073/pnas.162488599 (2002).

71. Chapman, M. A., Meza, R. & Lieber, R. L. Skeletal muscle fibroblasts in health and disease. *Differentiation; research in biological diversity* **92**, 108–115; 10.1016/j.diff.2016.05.007 (2016).
72. Powell, D. W. Myofibroblasts: paracrine cells important in health and disease. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **111**, 271-92; discussion 292-3 (2000).
73. Rieder, F., Brenmoehl, J., Leeb, S., Schölmerich, J. & Rogler, G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* **56**, 130–139; 10.1136/gut.2006.090456 (2007).
74. Fernandes, I. R. *et al.* Fibroblast sources: Where can we get them? *Cytotechnology* **68**, 223–228; 10.1007/s10616-014-9771-7 (2016).
75. Naaldijk, Y., Johnson, A. A., Friedrich-Stockigt, A. & Stolzing, A. Cryopreservation of dermal fibroblasts and keratinocytes in hydroxyethyl starch-based cryoprotectants. *BMC biotechnology* **16**, 85; 10.1186/s12896-016-0315-4 (2016).
76. Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American journal of physiology* **247**, C125-42; 10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125 (1984).
77. Cimini, M., Boughner, D. R., Ronald, J. A., Johnston, D. E. & Rogers, K. A. Dermal fibroblasts cultured on small intestinal submucosa: Conditions for the formation of a neotissue. *Journal of biomedical materials research. Part A* **75**, 895–906; 10.1002/jbm.a.30493 (2005).
78. Bruggmann, D. *et al.* Intra-abdominal adhesions: definition, origin, significance in surgical practice, and treatment options. *Deutsches Ärzteblatt international* **107**, 769–775; 10.3238/arztebl.2010.0769 (2010).
79. Collins, D., Hogan, A. M., O'Shea, D. & Des Winter, C. The omentum: anatomical, metabolic, and surgical aspects. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **13**, 1138–1146; 10.1007/s11605-009-0855-1 (2009).
80. Yuan, Y., Zeng, X., Hu, Y., Xie, T. & Zhao, Y. Omentoplasty for esophagogastrotomy after esophagectomy. *The Cochrane database of systematic reviews* **11**, CD008446; 10.1002/14651858.CD008446.pub2 (2012).
81. Nasiri, S., Mirminachi, B., Taherimehr, R., Shadbakhsh, R. & Hojat, M. The Effect of Omentoplasty on the Rate of Anastomotic Leakage after Intestinal Resection: A Randomized Controlled Trial. *The American surgeon* **83**, 157–161 (2017).

82. Zhou, D. *et al.* Anastomotic reinforcement with omentoplasty reduces anastomotic leakage for minimally invasive esophagectomy with cervical anastomosis. *Cancer management and research* **10**, 257–263; 10.2147/CMAR.S145917 (2018).
83. Dray, X. *et al.* Omentoplasty for gastrotomy closure after natural orifice transluminal endoscopic surgery procedures (with video). *Gastrointestinal endoscopy* **70**, 131–140; 10.1016/j.gie.2008.10.035 (2009).
84. Bergman, S. *et al.* Do gastrotomies require repair after endoscopic transgastric peritoneoscopy? A controlled study. *Gastrointestinal endoscopy* **71**, 1013–1017; 10.1016/j.gie.2010.01.025 (2010).
85. Jagannath, S. B. *et al.* Peroral transgastric endoscopic ligation of fallopian tubes with long-term survival in a porcine model. *Gastrointestinal endoscopy* **61**, 449–453 (2005).
86. Ambroze, W. L., JR *et al.* Let sleeping dogs lie: role of the omentum in the ileal pouch-anal anastomosis procedure. *Diseases of the colon and rectum* **34**, 563–565 (1991).
87. Istl, A. C. & Gray, D. K. Roscoe R. Graham: An enduring legacy in the 21st century. *The journal of trauma and acute care surgery* **82**, 216–220; 10.1097/TA.0000000000001286 (2017).
88. Bode, G. *et al.* The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **62**, 196–220; 10.1016/j.vascn.2010.05.009 (2010).
89. Ange, K. D., Eisemann, J. H., Argenzio, R. A., Almond, G. W. & Blikslager, A. T. Effects of feed physical form and buffering solutes on water disappearance and proximal stomach pH in swine. *Journal of animal science* **78**, 2344–2352 (2000).
90. Schubert, M. L. Gastric exocrine and endocrine secretion. *Current opinion in gastroenterology* **25**, 529–536; 10.1097/MOG.0b013e328331b62a (2009).
91. Hoepfner, J. *et al.* Small intestinal submucosa as a bioscaffold for tissue regeneration in defects of the colonic wall. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **13**, 113–119; 10.1007/s11605-008-0639-z (2009).
92. Hasan, A. *et al.* Nanoparticles in tissue engineering: applications, challenges and prospects. *International journal of nanomedicine* **13**, 5637–5655; 10.2147/IJN.S153758 (2018).

93. Nam, S. Y., Ricles, L. M., Suggs, L. J. & Emelianov, S. Y. Imaging strategies for tissue engineering applications. *Tissue engineering, Part B, Reviews* **21**, 88–102; 10.1089/ten.TEB.2014.0180 (2015).
94. Yang, J. *et al.* Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials* **26**, 6415–6422; 10.1016/j.biomaterials.2005.04.061 (2005).
95. Tanaka, S. *et al.* Cell sheet technology for the regeneration of gastrointestinal tissue using a novel gastric perforation rat model. *Surgery today* **47**, 114–121; 10.1007/s00595-016-1360-2 (2017).
96. Maruya, Y. *et al.* Autologous adipose-derived stem cell sheets enhance the strength of intestinal anastomosis. *Regenerative therapy* **7**, 24–33; 10.1016/j.reth.2017.06.004 (2017).
97. Takagi, R. *et al.* Cell sheet technology for regeneration of esophageal mucosa, 01.01.2012.

## 10 Anhang

### 10.1 Abkürzungen

Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
CD	Cluster of Differentiation
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ionen
n.a.	nicht verfügbar
NOTES	Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery
PBS+	Phosphat-buffered Saline mit Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>
PBS	Phosphat-buffered Saline ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	per inhalationem
% v/v	Volumenprozent
s.c.	subcutan
SIS	Small intestinal submucosa
SOP	Standard Operating Procedure
Ü.N.	über Nacht
VE	vollentsalzt
z. B.	zum Beispiel



## 10.2 Einheiten

cm	Zentimeter
d	Tage
°	Grad
°C	Grad Celsius
kg	Kilogramm
l	Liter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
rpm	Umdrehungen pro Minute
U	Einheiten

## 10.3 Abbildungen

<b>Abbildung 1:</b> Schematischer Aufbau der Magenwand im Querschnitt. ....	6
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des Projektes mit wesentlichen Teilschritten. ....	11
<b>Abbildung 3:</b> SISmuc und demontierte Zellkrone. ....	26
<b>Abbildung 4:</b> Mit SISmuc bestückte Zellkrone. ....	27
<b>Abbildung 5:</b> Schema des Defektverschlusses in der Experimentalgruppe. ....	30
<b>Abbildung 6:</b> Schema des Defektverschlusses in der Kontrollgruppe. ....	30
<b>Abbildung 7:</b> Vereinfachtes Prinzip der Immunhistochemie. ....	43
<b>Abbildung 8:</b> Phasenkontrastmikroskopie der primären Fibroblasten. ....	46
<b>Abbildung 9:</b> Cytospins mit Immunhistochemie. ....	46
<b>Abbildung 10:</b> Histologische Kontrolle der mit Fibroblasten besiedelten Matrix. ....	48
<b>Abbildung 11:</b> Operationssitus der Experimentalgruppe. ....	49
<b>Abbildung 12:</b> Klinische Verlaufparameter. ....	51
<b>Abbildung 13:</b> Laparoskopie und Gastroskopie im postoperativen Verlauf. ....	53
<b>Abbildung 14:</b> Postmortale Ansicht der Magenvorderwand in der Experimentalgruppe. .	54
<b>Abbildung 15:</b> Histologie der postmortalen Magen-Präparate. ....	55

## 10.4 Tabellen

<b>Tabelle 1:</b> Geräte und Verbrauchsmaterial.....	11
<b>Tabelle 2:</b> Chemikalien der Zellkultur und Histologie (in-vitro).....	14
<b>Tabelle 3</b> Medikamente (in-vivo).....	18
<b>Tabelle 4:</b> Merkmale der Kontrollgruppe. ....	19
<b>Tabelle 5:</b> Merkmale der Experimentalgruppe. ....	19
<b>Tabelle 6:</b> Primäre Operation – Medikamente. ....	28
<b>Tabelle 7:</b> Laparoskopie – Medikamente. ....	31
<b>Tabelle 8:</b> Gastroskopie – Medikamente.....	33
<b>Tabelle 9:</b> Finalisierung – Medikamente.....	34
<b>Tabelle 10:</b> Paraffineinbettung (nach SOP, Stand 14.06.2010).....	35
<b>Tabelle 11:</b> HE-Färbung (nach SOP, Stand 07.12.2010).....	38
<b>Tabelle 12:</b> Trichromfärbung nach Masson-Goldner (nach SOP, Stand 22.02.2011).....	39
<b>Tabelle 13:</b> Pentachromfärbung nach Movat (nach SOP, Stand 22.02.2011). ....	40
<b>Tabelle 14:</b> Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem.....	44

## 10.5 Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Schlesinger T, Walles H, Krajinovic K: Autologous Fibroblasts on Small Intestinal Submu cosa for Gastrotomy Closure: A Proof of Concept in a Porcine Model. October 2015. Eur Surg Res 2015; 55:198–289

## 10.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und übernommene Inhalte eindeutig gekennzeichnet habe. Das Promotionsvorhaben wurde unabhängig von kommerziellen Interessen vorgenommen und gemäß den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Würzburg durchgeführt. Ich habe die Arbeit zuvor weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

---

Ort, Datum

Tobias Schlesinger

## 10.7 Affidavit

I hereby affirm that I have written the present work independently and have clearly identified the contents. The doctoral project was undertaken independently of commercial interests and the rules of good scientific practice of the University of Würzburg were followed. Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form

---

City, Date

Tobias Schlesinger



## 10.9 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Heike Walles für das spannende Promotionsthema, die Bereitstellung der zahlreichen Geräte und Materialien, die im Rahmen dieses vielfältigen Forschungsprojektes zum Einsatz kamen.

Ein herzliches Dankeschön richte ich an Herrn PD Dr. Marco Metzger für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens und die große Hilfsbereitschaft in der letzten Phase dieser Arbeit.

Bei Herrn Professor Dr. Germer bedanke ich mich für die Mitbetreuung meiner Arbeit als Mitglied des Promotionskomitees.

Bei Frau Privatdozentin Dr. Katica Krajinovic bedanke ich mich besonders für die intensive und lehrreiche Zusammenarbeit während der Tierversuche und insbesondere die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen, die mir zur Anfertigung dieser Arbeit die entscheidenden Anregungen geben haben. Danke auch für die vielen wertvollen Impulse, die mein Denken und Handeln auch im klinischen Alltag noch prägen.

Mein weiterer Dank gebührt allen Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, die mich in fachlichen Fragen unterstützt und kollegial im Labor aufgenommen haben. Besonders hervorheben möchte ich Frau Dr. Angela Rossi, Herrn Dr. Matthias Schweinlin und Herrn Dr. Tobias Weigel, die mir viele Fragen zur Laborarbeit beantwortet und hilfreiche Tipps gegeben haben.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern Dr. med. Dorothea Schlesinger und Dr. med. Martin Schlesinger, die immer bedingungslos hinter mir stehen, mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mich besonders in arbeitsintensiven Phasen unterstützen.

Meinen wärmsten Dank richte ich an Pia, die mich vor allem beim Abschluss der Arbeit sehr motiviert hat und mir grundsätzlich bei meiner Arbeit als forschender Arzt immer den Rücken freihält.