

Untersuchung von Reaktionen auf gelatinebasierte Implantate in verschiedenen Organsystemen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Larissa Grupp

aus Heilbronn-Neckargartach

Tübingen, 2011

Tag der mündlichen Qualifikation:

15.12.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Burkhard Schlosshauer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hanspeter Mallot

Für meine Eltern

Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen ein Ozean.

Sir Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS..... | I |
| ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| EINLEITUNG | 3 |
| 1. <i>Das Nervensystem.....</i> | 3 |
| 1.1. Anatomie und Physiologie peripherer Nerven | 5 |
| 1.2. Pathophysiologie und Regeneration peripherer Nerven | 6 |
| 1.3. Therapien peripherer Nervendefekte..... | 11 |
| 1.3.1. <i>Implantate zur Unterstützung der Regeneration.....</i> | 12 |
| 1.3.2. <i>Gelatine als Implantatmaterial.....</i> | 14 |
| 2. <i>Der abdominale Bauchraum</i> | 15 |
| 2.1. Grundlagen abdominaler Adhäsionen | 15 |
| 2.2. Peritoneale Regeneration und Adhäsionsbildung..... | 17 |
| 2.2.1 <i>Adhäsionsbildung.....</i> | 19 |
| 2.3. Adhäsionstherapie und -prophylaxe | 21 |
| 2.4. Adhäsionsbarrierentestung..... | 23 |
| 3. <i>Zielsetzung.....</i> | 24 |
| MATERIAL UND METHODEN | 25 |
| 1. <i>Material</i> | 25 |
| 1.1 Geräte | 25 |
| 1.2 Verbrauchsmaterialien..... | 27 |
| 1.3 Chemikalien..... | 27 |
| 1.4 Puffer/Lösungen | 29 |
| 1.5 Farbstoffe und Antikörper | 31 |
| 1.5.1 <i>Verwendete Farbstoffe</i> | 31 |
| 1.5.2 <i>Verwendete Primärantikörper.....</i> | 32 |
| 1.5.3 <i>Verwendete Sekundärantikörper.....</i> | 33 |
| 1.6 Zellen und Nährmedien | 33 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1.6.1 | <i>Schwann Zellen und primäre Fibroblasten</i> | 33 |
| 1.6.2 | <i>Hinterwurzelganglien (DRGs)</i> | 33 |
| 1.6.3 | <i>HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)</i> | 34 |
| 1.6.4 | <i>L929 – Fibroblasten</i> | 34 |
| 1.6.5 | <i>Neuro-2A Tet-ON Zellen</i> | 34 |
| 1.7 | <i>Gelatine</i> | 34 |
| 1.8 | <i>Tiere</i> | 35 |
| 1.8.1 | <i>Hühnchen</i> | 35 |
| 1.8.2 | <i>Mäuse</i> | 35 |
| 1.8.3 | <i>Ratten</i> | 35 |
| 1.9 | <i>Software</i> | 36 |
| 1.10 | <i>Statistik</i> | 37 |
| 2. | <i>Methoden</i> | 37 |
| 2.1 | <i>Zellkulturen</i> | 37 |
| 2.1.1 | <i>Vorbehandlung von Zellkulturmaterialien</i> | 37 |
| 2.1.2 | <i>Umstellung der Schwann Zellen auf Rattenserum</i> | 38 |
| 2.1.3 | <i>Kryokonservierung von Zellen</i> | 39 |
| 2.1.4 | <i>DRG Kulturen</i> | 40 |
| 2.2 | <i>Immuncytologie</i> | 41 |
| 2.3 | <i>Zytotoxizität (MTS –Assay ISO 10993-5)</i> | 42 |
| 2.4 | <i>Kontaktvermittelte Zytotoxizität</i> | 43 |
| 2.5 | <i>Zellmigration durch mit Transglutaminase quervernetzte Gelatine</i> | 43 |
| 2.5.1 | <i>Migration durch Transwellfilter</i> | 43 |
| 2.5.2 | <i>Beurteilung der Migration mit Hilfe von Cryoschnitten</i> | 44 |
| 2.6 | <i>Transglutaminase Aktivitäts ELISA</i> | 44 |
| 2.7 | <i>Stabilität von Gelatineimplantaten</i> | 45 |
| 2.7.1 | <i>Stabilität in Puffer</i> | 45 |
| 2.7.2 | <i>Stabilität in Gegenwart von Zellen</i> | 45 |
| 2.7.3 | <i>Stabilität beim Vernähen</i> | 46 |
| 2.8 | <i>Semipermeabilität - Einschließen von Zellen in Implantate</i> | 47 |
| 2.9 | <i>Chorioallantois-Membran (CAM) – Assay</i> | 47 |

| | | |
|-------------------------|--|-----------|
| 2.9.1 | <i>Fenstern der Hühnereier</i> | 47 |
| 2.9.2 | <i>Implantation von Testmaterial</i> | 48 |
| 2.9.3 | <i>Makroskopische Betrachtung der Blutgefäße</i> | 49 |
| 2.10 | <i>Implantationen in vivo</i> | 49 |
| 2.10.1 | <i>Subkutan Implantationen in der Maus</i> | 49 |
| 2.10.2 | <i>Ischiasimplantationen in der Ratte</i> | 50 |
| 2.10.3 | <i>SFI</i> | 52 |
| 2.10.4 | <i>Elektrophysiologische Messungen</i> | 55 |
| 2.10.5 | <i>Explantation und histologische Aufarbeitung der Gewebe</i> | 56 |
| 2.10.6 | <i>Induktion von Adhäsionen und Testung von Adhäsionsbarrieren in vivo</i> | 56 |
| 2.11 | <i>Histologie</i> | 59 |
| ERGEBNISSE | | 64 |
| 1. | <i>Übersicht</i> | 64 |
| 2. | <i>Untersuchungen im peripheren Nervensystem</i> | 64 |
| 2.1. | <i>Transglutaminase quervernetzte Nervenleitschiene</i> | 66 |
| 2.1.1. | <i>Quellverhalten</i> | 66 |
| 2.1.2. | <i>Langzeitstabilität in vitro</i> | 67 |
| 2.1.3. | <i>Stabilität in vivo</i> | 70 |
| 2.1.4. | <i>Transglutaminase Restaktivität</i> | 74 |
| 2.1.5. | <i>Zelldifferenzierung auf Nervenleitschienen</i> | 78 |
| 2.1.6. | <i>Zelldifferenzierung in Nervenleitschienen</i> | 80 |
| 2.1.7. | <i>Zellinfiltration</i> | 82 |
| 2.1.8. | <i>Zusammenfassung</i> | 84 |
| 2.2. | <i>Gelatinekleber</i> | 85 |
| 2.2.1. | <i>Zytotoxizität</i> | 85 |
| 2.2.2. | <i>Als Wachstumsmatrix</i> | 87 |
| 2.2.3. | <i>Induktion von Angiogenese</i> | 91 |
| 2.2.4. | <i>Inflammatorische Reaktion</i> | 92 |
| 2.2.5. | <i>Transglutaminase Restaktivität</i> | 94 |
| 2.2.6. | <i>Zellmigration</i> | 97 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|------------|
| 2.2.7. | <i>Zusammenfassung</i> | 101 |
| 2.3. | Nervenimplantationen..... | 102 |
| 2.3.1. | <i>Kleben oder Nähen?</i> | 102 |
| 2.3.2. | <i>Vorbereitung von Schwann Zellen auf Implantation</i> | 103 |
| 2.3.3. | <i>In vivo Implantationen</i> | 105 |
| 2.3.4. | <i>Zusammenfassung</i> | 125 |
| 3. | <i>Untersuchungen im abdominaler Bauchraum</i> | 126 |
| 3.1 | Entwicklung eines in vivo Modells zur Testung von Adhäsionsbarrieren | 127 |
| 3.1.1 | <i>OP – Modell</i> | 127 |
| 3.1.2 | <i>Auswertungen</i> | 133 |
| 3.2 | Testung eines Implantates..... | 136 |
| 3.2.1 | <i>Makroskopische Analyse</i> | 137 |
| 3.2.2 | <i>Tensiometrie</i> | 138 |
| 3.2.3 | <i>Histologie</i> | 140 |
| 3.3 | <i>Zusammenfassung</i> | 142 |
| | DISKUSSION | 143 |
| 1. | <i>Regeneration im peripheren Nervensystem</i> | 143 |
| 1.1. | <i>Möglichkeiten der Überbrückung</i> | 143 |
| 1.2. | <i>Nervenimplantate</i> | 144 |
| 1.2.1. | <i>Verschiedene Materialien</i> | 144 |
| 1.2.2. | <i>Gelatine</i> | 147 |
| 1.2.3. | <i>Innere Struktur von Nervenleitschienen</i> | 151 |
| 1.2.4. | <i>Gewebekleber</i> | 153 |
| 1.3. | <i>Methodische Betrachtungen</i> | 157 |
| 1.3.1. | <i>Tiermodelle</i> | 157 |
| 1.3.2. | <i>Sciatic Function Index</i> | 159 |
| 1.3.3. | <i>Elektrophysiologische Messungen</i> | 162 |
| 1.4. | <i>Fazit und Ausblick: Peripheres Nervensystem</i> | 163 |
| 2. | <i>Intraperitoneale Adhäsionen</i> | 164 |
| 2.1. | <i>Therapie vs. Prophylaxe</i> | 164 |
| 2.2. | <i>Adhäsionsbarrieren</i> | 165 |

| | |
|--|------------|
| 2.2.1. <i>Materialien im Vergleich</i> | 165 |
| 2.2.2. <i>Gelatine als Material für Adhäsionsbarrieren</i> | 168 |
| 2.3. <i>Tiermodelle und Analysemethoden im Vergleich</i> | 169 |
| 2.4. <i>Fazit und Ausblick: Abdominaler Bauchraum</i> | 172 |
| AUSBLICK | 174 |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 175 |
| ANHANG | 177 |
| 1. <i>Tabelle Ischias – OPs</i> | 177 |
| 2. <i>Tabelle Adhäsions – OPs</i> | 184 |
| 3. <i>Explantationsprotokollblatt Adhäsionen</i> | 187 |
| LITERATUR | 189 |
| DANKSAGUNG | 210 |
| VERÖFFENTLICHUNGEN | 211 |
| <i>Publikationen</i> | 211 |
| <i>Kongressbeiträge</i> | 211 |
| <i>Poster</i> | 211 |

Zusammenfassung

Gelatine ist ein Biomaterial, das gegenüber anderen Materialien sehr viele Vorteile besitzt. Es ist ein amphipathisches Polymer, das kaum immunogen wirkt, biokompatibel und bioresorbierbar ist und in seinen physiochemischen Eigenschaften leicht verändert werden kann. Außerdem ist Gelatine von der FDA für verschiedene Anwendungen und für den Einsatz als Biomaterial im Menschen zugelassen.

In dieser Arbeit wurden die biologischen Reaktionen zweier Organsysteme auf drei gelatinebasierte Implantate untersucht. Es wurden eine Nervenleitschiene und ein Gewebekleber im peripheren Nervensystem, sowie eine Adhäsionsbarriere im abdominalen Bauchraum untersucht.

Die Regeneration läsionierter Nerven ist im peripheren Nervensystem grundsätzlich möglich. Bei größeren Verletzungen ist dafür allerdings der Einsatz eines Implantats notwendig. In dieser Arbeit wurde das Konzept einer biokompatiblen, semipermeablen Nervenleitschiene verfolgt, die gleichzeitig Regenerationshemmende Fibroblasten aus dem Inneren der Leitstruktur ausschließen soll. Dazu wurden die Gelatineröhren hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften charakterisiert. Mittels zellbiologischer Tests wurde dann die Permissivität für Schwann Zellen und Neurone, Semipermeabilität für Nährstoffe und Ausschlusseigenschaften für infiltrierende Fibroblasten an Gelatineröhren getestet. Abschließend wurde das Implantat im Ischiasmodell der Ratte eingesetzt.

Bei der Untersuchung des Gewebeklebers lag der Fokus auf der Analyse der Biokompatibilität, der Restaktivität der Transglutaminase nach Vernetzung des Implantates und der Zellmigration durch den Kleber.

Abdominale Adhäsionen gehören zu den häufigsten postoperativen Komplikationen nach einem den Bauchraum betreffenden chirurgischen Eingriff. Einer der vielversprechendsten Ansätze um eine Adhäsionsausbildung zu verhindern stellt das Einbringen eines Biomaterials in Form einer festen Adhäsionsbarriere dar.

In dieser Arbeit wurde ein Tiermodell etabliert, um Implantate zur Verhinderung von Adhäsionen im abdominalen Bauchraum untersuchen und entwickeln zu können. Anschließend wurde die *in vivo* Methode durch Testung eines neuen gelatinebasierten Implantates verifiziert. Sie soll biokompatibel sein und während der

Zusammenfassung

Regeneration des Gewebes innerhalb von drei Wochen resorbiert werden, dabei sollen Adhäsionen verhindert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter Verwendung zahlreicher zellbiologischer Versuche, sowie verschiedener Tiermodelle ein transdisziplinärer Brückenschlag zwischen Materialwissenschaft und Biologie bei der Entwicklung innovativer Therapiekonzepte geleistet werden. Weiter trug diese Arbeit sowohl zum Verständnis von Mechanismen während der Neuroregeneration, als auch während der Regeneration, sowie der Adhäsionsbildung des Peritoneums bei.

Einleitung

1. Das Nervensystem

Das Nervensystem stellt als übergeordnete Kommunikations- und Kontrollinstanz aller essentiellen Körperfunktionen einen der wichtigsten Teile des menschlichen Lebens dar. Es ist, zusammen mit den Sinnesorganen und dem endokrinen System für den Erhalt und die Regulation der Homöostase verantwortlich und ermöglicht einem Organismus sich den ständig ändernden inneren und äußeren Bedingungen anzupassen. Letztendlich ermöglichen diese beiden Systeme sein Überleben.

Allgemein kann man das Nervensystem von Wirbeltieren in zwei anatomische Bereiche unterteilen: das zentrale und das periphere Nervensystem. Das zentrale Nervensystem (ZNS) umfasst das Gehirn und das Rückenmark. Das periphere Nervensystem (PNS) setzt sich aus dem Nervengewebe außerhalb des ZNS zusammen. Dieses besteht unter anderem aus den 12 Paar Hirnnerven und den Spinalnerven, die aus dem Rückenmark hervortreten und deren Zellkörper, die sowohl in Ganglien in unmittelbarer Nähe zum Rückenmark, sowie tief im Bauchraum zu finden sind. Das PNS verbindet das ZNS sowohl absteigend (afferent), als auch aufsteigend (efferent) mit den sensorischen, motorischen und sekretorischen Organen.

Das zentrale, wie auch das periphere Nervensystem bestehen aus komplexen Zusammenschlüssen von Neuronen und anderen Zellen (z.B. Gliazellen). Diese können abhängig von ihrer Lage und Funktion unterschiedliche Phänotypen und dreidimensionale Formen einnehmen. Neurone bilden die grundlegende Einheit des Nervensystems und bestehen im Allgemeinen aus einem Zellkörper (Soma) und davon ausgehenden Ausläufern (Neuriten; Abb. 1). Eines der Hauptmerkmale der Nervenzellen von anderen Zelltypen unterscheidet, ist ihre elektrische Erregbarkeit. Informationen von benachbarten Rezeptor- oder Nervenzellen werden über die Dendriten gesammelt, am Zellkörper integriert und schließlich über das Axon weitergeleitet. Dendriten und Axone werden zusammen als Neuriten bezeichnet.

Einleitung

Das Axon entspringt proximal am Axonhügel und ist am distalen Ende häufig baumartig verzweigt. Hier endet es in den Axonterminalen, die den präsynaptischen Teil einer Synapse darstellen. Das elektrische Signal wird am Axonhügel generiert und kann im PNS über eine Distanz von mehr als einem Meter durch das Axon weitergeleitet werden.

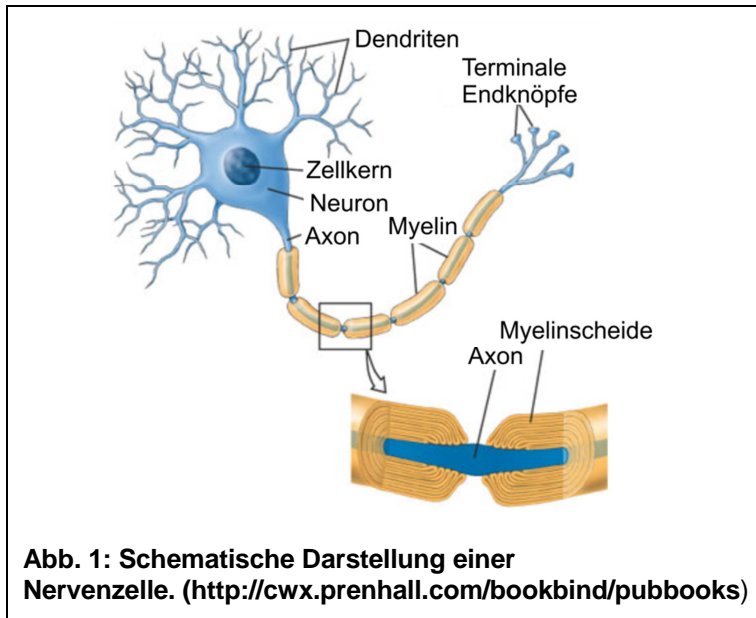


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Nervenzelle. (<http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks>)

Um dennoch eine ausreichend schnelle Reizweiterleitung zu gewährleisten, sind Axone in der Regel von einer von Gliazellen gebildeten Isolations-schicht, der Myelin-scheide, umhüllt. Diese Axone werden dann als myelinisierte Nervenfasern bezeichnet. Im PNS übernehmen Schwann Zellen die Bildung einer Myelinscheide. Die in

regelmäßigen Abständen unterbrochene Myelinisierung der Axone ermöglicht eine sprungartige (saltatorische) Erregungsweiterleitung und dadurch eine wesentlich höhere Leitungsgeschwindigkeit als in nicht-myelinisierten Axonen (Mumenthaler, Stöhr et al. 2003).

1.1. Anatomie und Physiologie peripherer Nerven

Die meisten Nerven im PNS sind gemischte Nerven, d.h. sie enthalten sowohl afferente als auch efferente Neurite. Je nach Zielgebiet werden sie weiter unterteilt in willentlich kontrollierbare (somatische) und autonom arbeitende (vegetative) Neurone.

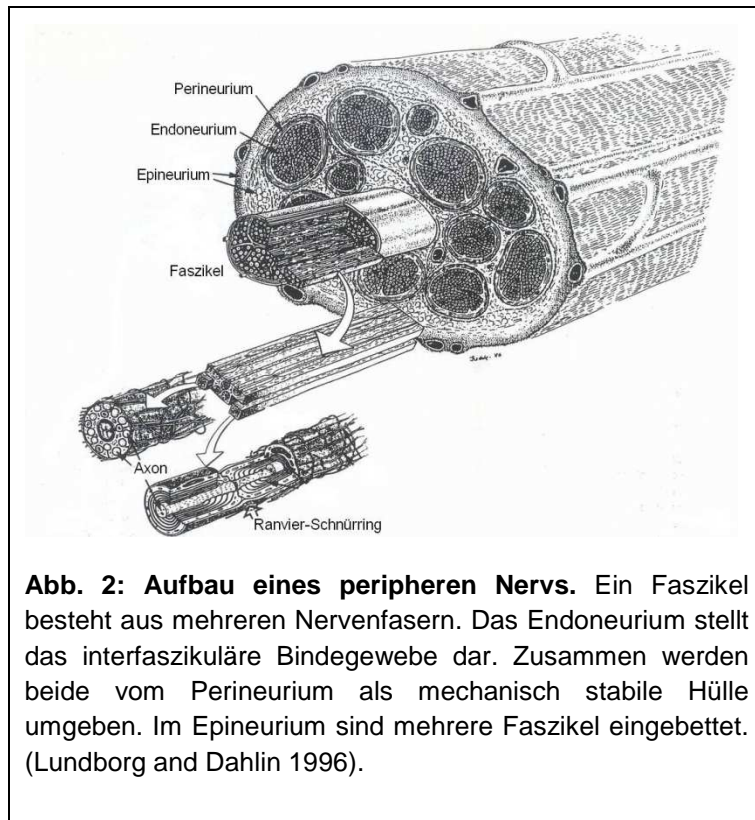


Abb. 2: Aufbau eines peripheren Nerven. Ein Faszikel besteht aus mehreren Nervenfasern. Das Endoneurium stellt das interfaszikuläre Bindegewebe dar. Zusammen werden beide vom Perineurium als mechanisch stabile Hülle umgeben. Im Epineurium sind mehrere Faszikel eingebettet. (Lundborg and Dahlin 1996).

Durch das vegetative Nervensystem wird hauptsächlich die Homöostase aufrechterhalten. Das somatische Nervensystem dient mit Hilfe der sensorischen und motorischen Neuronen im Wesentlichen der Aufrechterhaltung der Beziehungen zur Außenwelt.

Fasern des sensorischen Nervensystems nehmen Reize auf und leiten sie weiter, während über das motorische Nervensystem Zielorgane wie z. B. ein Muskel angesprochen,

und zu einer zentralnervös regulierten Bewegung gebracht werden. In den peripheren Nerven ist die Zusammensetzung der Anteile somatischer und vegetativer Neuronen sehr unterschiedlich.

Der Komplex aus Axon und Schwann Zelle zusammen mit der diesen umgebenden Basallamina wird als Nervenfasern bezeichnet (Abb. 2). Viele Nervenfasern zusammengefasst ergeben wiederum einen Faszikel (Faserbündel), der vom Perineurium umhüllt wird. Das Perineurium ist die im physiologischen Sinne eigentliche Nerven-hülle und gewährleistet durch elastische Fasern und Kollagenfaserbündel mechanische Stabilität. Das mehrschichtige zirkulär orientierte Gewebe aus abgeflachten Zellen stellt außerdem eine Diffusionsbarriere zwischen dem Faszikelinneren und -äußeren dar (Martin 1964; Rechthand and Rapoport 1987). Der Raum zwischen den einzelnen Faszikeln wird vom interfaszikulären Epineurium (Endoneurium) ausgefüllt. Es enthält neben den Nervenfasern einige Fibroblasten, wenige Bindegewebskomponenten und Mastzellen (Lundborg and

Einleitung

Dahlin 1996). Das epifaszikuläre Epineurium umhüllt den Zusammenschluss der einzelnen Faszikel zu einem Nervenstrang. Es erhöht somit seine Elastizität und verringert zusammen mit Adipocyten seine Druckempfindlichkeit. Es enthält außerdem Blut- und Lymphgefäße und vermittelt die strukturelle Beziehung zu den Nachbargeweben (Lundborg and Kanje 1996).

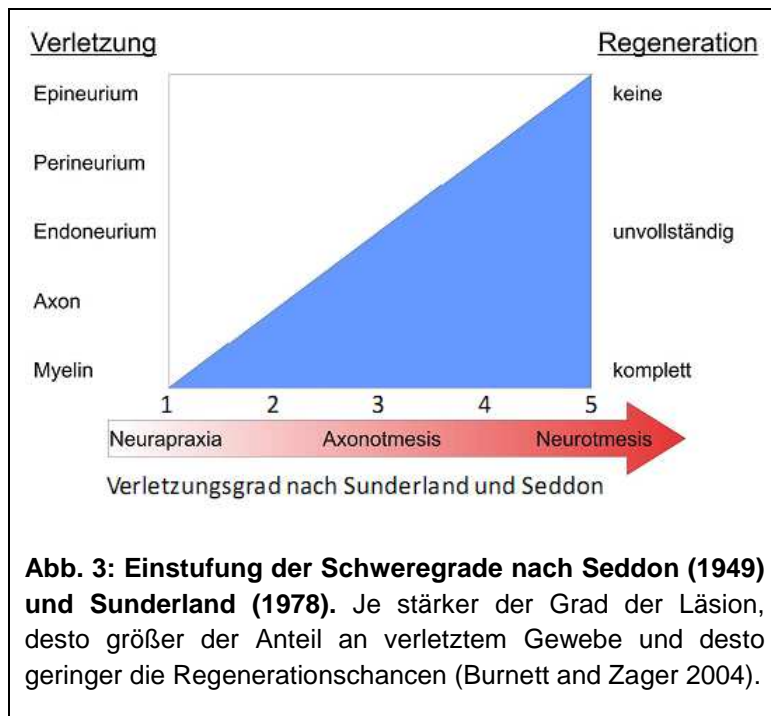
1.2. Pathophysiologie und Regeneration peripherer Nerven

Unfälle, menschliche Übergriffe und operative Eingriffe oder Erkrankungen wie Infektionen, Tumore und Autoimmunerkrankungen sind häufig die Ursache für Verletzungen im peripheren Nervensystem. Die Nervenstränge besitzen zwar durch die wellenförmige Anordnung der Faszikel im Epineurium und ihren kollagenhaltigen Aufbau eine gewisse Dehnfähigkeit, dennoch gehen Verletzungen wie oben beschrieben oftmals mit einer starken körperlichen Beeinträchtigung des Patienten einher, da der Nerv häufig seine Fähigkeit Reize weiterzuleiten, verliert. Überdehnung von Nerven, gefolgt von leichten Verletzungen des Epineurium bis hin zur vollständigen Durchtrennung des Nerven und Nervenquetschungen sind die am häufigsten auftretenden Nervenverletzungen (Burnett and Zager 2004). In Extremfällen gehen diese Verletzungen mit Totalverlust von sensorischer und motorischer Funktion einher, was wiederum zu Lähmungen, Gefühlsstörungen und Störungen des vegetativen Systems führen kann.

Seddon und Sunderland entwickelten gegen Mitte bzw. Ende des letzten Jahrhunderts eine Einteilung der Nervenläsionen in Schweregrade, um eine relative Aussage über die Regenerationsfähigkeit einer Nervenverletzung treffen zu können. Nach ihrer Nomenklatur werden die Nervenläsionen in drei übergeordnete Schweregrade eingeteilt: die *Neurapraxie*, die *Axonotmesis* und die *Neurotmesis*. Sunderland definierte 1978 außerdem noch zwei Zwischenstufen (Abb. 3; (Seddon 1949; Sunderland 1978)).

Die *Neuropraxie* stellt unter den oben genannten den leichtesten Grad der Verletzungen dar. Hier treten auf Grund einer Kompression leichte temporäre Funktionsstörungen der Reizweiterleitung auf. Die Symptome sind hierbei vermutlich auf veränderte Myelinstrukturen und lokale Ladungsstörungen zurückzuführen. Der Nerv behält dabei seine vollständige Kontinuität und eine spontane Heilung der

Verletzung erfolgt meist innerhalb weniger Wochen bis hin zu drei Monaten. Bei der *Axonotmesis* kommt es zu einem Abreißen von Axonen und des umgebenden Myelins durch Zug- und Stoßbewegungen des Nervs. Epineurium und Perineurium bleiben allerdings intakt, so dass in vielen Fällen eine erfolgreiche Regeneration innerhalb von mehreren Monaten stattfinden kann (Donoff 1995). Nervenverletzungen 3. und 4. Grades (nach Sunderland) treten auf, wenn zu einer *Axonotmesis* noch eine Verletzung des Endoneuriums hinzukommt (Grad 3) bzw. nur noch das Epineurium erhalten bleibt (Grad 4). Ohne eine operative Behandlung ist eine vollständige funktionale Regeneration vor allem nach einer Grad 4 Verletzung ausgeschlossen. Von *Neurotmesis* sprechen Seddon und Sunderland, wenn es zu



einer vollständigen Durchtrennung des Nervs kommt. Dies hat einen totalen Funktionsverlust zur Folge, der ohne einen chirurgischen Eingriff vor allem auf Grund von Narbenbildung und Verlust der Leitstruktur eine Regeneration unmöglich macht (Burnett and Zager 2004).

Das periphere Nervensystem besitzt also prinzipiell die Fähigkeit zu regenerieren.

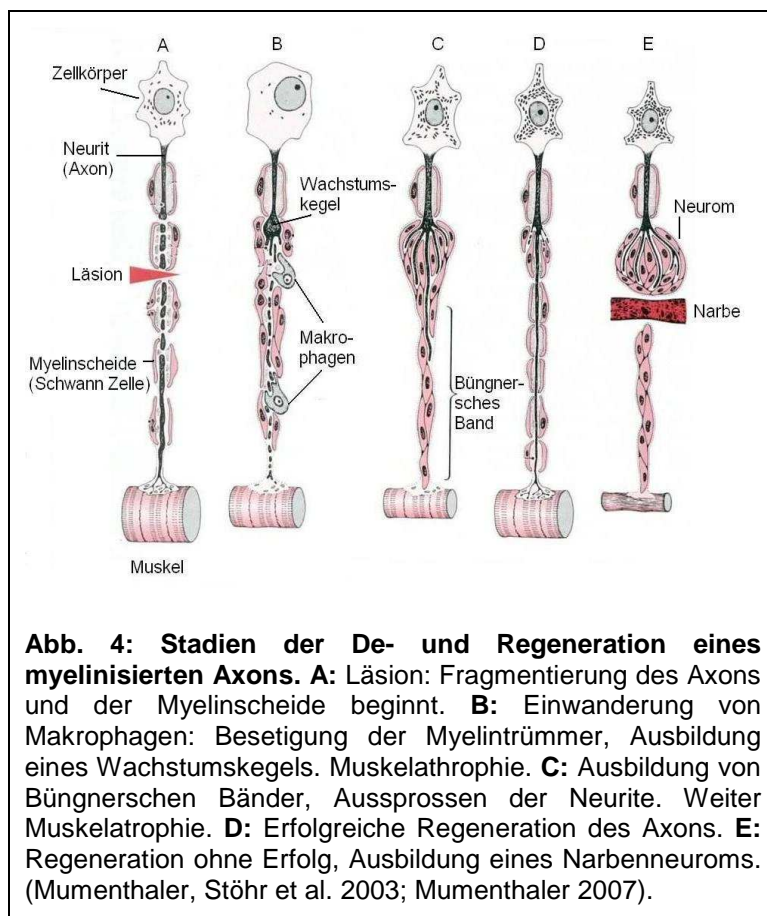
Diese Regeneration ist aber auf das Auswachsen von Zellfortsätzen der Neurone beschränkt. Eine Neubildung von Neuronen ist bis auf wenige Ausnahmen (z.B. von Stammzellen) nicht möglich. Kommt es zu einer Läsion, die nicht zu nah am Zellkörper liegt, werden allerdings zunächst einige Prozesse der Degeneration angestoßen. Hierbei kommt es zu Veränderungen biochemischer und morphologischer Art.

Einleitung

Nach der Läsion zieht sich die verletzte Spitze des proximalen Nervenstumpfes zunächst einige Millimeter zurück. Es kommt zu degenerativen Veränderungen, die sich in der Regel jedoch nur über ein Markscheidensegment erstrecken (Fu and Gordon 1997; Fenrich and Gordon 2004). Während dieses als retrograde Degeneration bezeichneten Prozesses, proliferieren die proximalen Schwann Zellen stark und wandern tendenziell in Richtung des distalen Stumpfes (Mumenthaler, Stöhr et al. 2003). Erst nach ein paar Tagen wachsen die Neuriten wieder aus, ihre Spitzen bilden dabei filopodienartige neuronale Wachstumskegel.

Distal zur Läsion des verletzten Nervs gelegen, setzt schon nach wenigen Stunden (24 – 45 h) die sogenannte

Wallerische Degeneration ein. Dieser Prozess wurde nach seinem Erstbeschreiber Augustus Waller benannt, der ihn bei Versuchen an Fröschen 1850 entdeckte (Waller 1850). Sie beginnt am Ort der Läsion und wandert distalwärts mit einer Geschwindigkeit, die der Dicke und der Internodenlänge der betroffenen Fasern umgekehrt proportional ist. Weiter hängt sie vom Fasertyp und der Entfernung von der Läsionsstelle ab und beträgt somit



zwischen 46 und 250 mm pro Tag (Mumenthaler, Stöhr et al. 2003). Im Verlauf der Degeneration lösen axonale Proteasen neuronale Fortsätze auf, außerdem kommt es zu einem Zerfall und der Auflösung der Myelinscheiden (Abb. 4 A). Der Abbau beginnt ausgehend von der Mitte der Internodien und die entstehenden Segmente werden Ovoide genannt (Smith 1984). Für den weiteren Abbau der Markscheidenfragmente sind zunächst Schwann Zellen, später, nach ca. 24 bis 96 Stunden vor allem einwandernde Makrophagen, angelockt durch chemoattraktive

Faktoren wie Interleukin-1 β und Tumor Nekrose Faktor- β (TNF- β), zuständig (Tofaris, Patterson et al. 2002); Abb. 4 B). Dabei phagozytieren Makrophagen den größeren Anteil des Zelldebris und sind vereinzelt auch noch nach 6- 10 Wochen nachweisbar (Crang and Blakemore 1986). Zeitgleich kommt es 2 bis 4 Tage nach der Faserdurchtrennung zur Proliferation von Schwann Zellen innerhalb der Basallamina (Crang and Blakemore 1986). Die Basallamina bleibt über den Verlauf der Degenerationsprozesse intakt. Nach 30 bis 40 Tagen hat dieser Prozess sein Maximum erreicht und die Anzahl der Schwann Zellen hat sich je nach Fasertyp bis auf das Achtfache vervielfacht. Sie ordnen sich zu bipolaren langsorientierten Zellbändern an (Crang and Blakemore 1986; Stoll and Muller 1999) und bilden in Form der so genannten Büngnerschen Bänder eine leitende Struktur für auswachsende Axone, die eine wesentliche Funktion für eine erfolgreiche Regeneration hat (Büngner 1891; Cajal 1928; Holmes and Young 1942; Tohyama, Ide et al. 1983) (Abb. 4 C).

SZ bieten neben ihrer im physikalischen Sinne richtungsleitenden Aufgabe, die nach Dedifferenzierung zu einem prä-/nichtmyelinisierendem Phänotyp ausgelöst durch fehlenden Axonkontakt (Bunge 1993), ein für die Regeneration optimales Milieu. Hierbei kommt es zunächst zu einem Herunterregulieren verschiedener auf das Axonwachstum inhibierend wirkender Myelinkomponenten, wie dem *Myelin basischen Protein (MBP)*, dem *Myelin assoziierten Glykoprotein (MAG)*, dem *Protein P0*, dem *peripheren Myelinprotein-22 (PMP22)* und dem *Peraxin* (LeBlanc and Poduslo 1990; Spreyer, Kuhn et al. 1991; Scherer, Xu et al. 1995).

Diese Prozesse laufen innerhalb von zwei Tagen nach der Faserdurchtrennung ab. Durch die Erhöhung der Produktion und Sekretion neurotropher Faktoren, wie z.B. der *Chemoattraktoren nerve growth factor (NGF)*, *brain derived neurotrophic factor (BDNF)* und *basic fibroblast growth factor (bFGF)* nehmen SZ auf das Überleben und Auswachsen der Neurone Einfluss (Bunge 1993). Parallel dazu kommt es zur Hochregulierung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs), wie *L1* und *NCAM*, sowie von Proteinen wie dem *p75 Nervenwachstumsfaktor- Rezeptor (p75NTR)*, dem *glialen fibrillaren sauren Protein (GFAP)* (Johnson, Taniuchi et al. 1988; Martini and Schachner 1988; Einheber, Hannocks et al. 1995).

Die Zelladhäsionsmoleküle *L1* und *NCAM* wurden zusammen mit *N- Cadherin* mit Hilfe von Pertubationsstudien *in vitro* als die wichtigsten das Axonwachstum

Einleitung

fördernde CAMs identifiziert (Bixby, Lilien et al. 1988; Seilheimer, Persohn et al. 1989; Bixby and Zhang 1990; Williams, Furness et al. 1994).

Unabhängig voneinander wiesen verschiedene Arbeitsgruppen mittels *in situ* Hybridisierung nach Quetschung oder Durchtrennung des Ischiasnervs bei Ratten eine erhöhte Expression der drei Adhäsionsmoleküle vor allem distal der Läsion nach (Martini and Schachner 1988; Thornton, Mantovani et al. 2005; Zelano, Wallquist et al. 2006).

Der Erfolg der Regeneration hängt allerdings von den proximal aussprossenden Neuriten ab und ob sie den distalen Nervenstumpf erreichen. Sie dringen nach einiger Zeit in die Büngnerschen Bänder ein und wachsen mit einer Geschwindigkeit von 1 bis 5 mm am Tag entlang der natürlichen Leitschiene zum Zielorgan (Fugleholm, Schmalbruch et al. 1994; Mumenthaler, Stöhr et al. 2003; Schmidt and Leach 2003), um dieses zu reinnervieren (Abb. 4 D).

Ist der Abstand zwischen Läsion und Zielorgan sehr groß (mehrere Zentimeter) so kann die Regeneration des gesamten Nervs allerdings mehrere Monate betragen. Weiter spielt der Faktor Zeit eine entscheidende Rolle. Vergeht zu viel Zeit zwischen Läsion und Regeneration, können durch den durch fehlende Innervation ausgelösten Atrophievorgang z.B. an der Muskulatur bleibende Schäden des Zielgewebes die Folge sein. Deshalb ist der unverzügliche Beginn der Regeneration nach einer Läsion im PNS entscheidend. Ein weiteres großes Problem für die vollständige Regeneration ist die Bildung von Narbengewebe durch Fibroblasten. Vor allem wenn bei der Läsion zwischen proximalem und distalem Stumpf eine Lücke entsteht, kommt es durch einwanderende Fibroblasten zur Bildung einer Narbe. Die Fibroblasten schütten dann unter anderem Wachstumsinhibierende Faktoren aus, die die Regeneration verhindern und sezernieren Kollagen Typ IV, welches als Gerüst für weitere inhibierende Extrazellulärmatrixkomponenten wirkt.

Finden die auswachsenden Neuriten aufgrund dieser Barriere nicht zum distalen Stumpf, kommt es häufig zur Ausbildung eines kleinen derben und schmerzhaften Tumors, dem Narbenneurom, das durchsetzt ist von unregelmäßig angeordneten, ungerichteten Neuriten ohne synaptische Verbindung zu einem Zielorgan (Herndon and Lander 1990; Mumenthaler, Stöhr et al. 2003; Dreesmann, Lietz et al. 2005) (Abb. 4 E).

1.3. Therapien peripherer Nervendefekte

Der natürlichen Regenerationsfähigkeit des PNS sind bei einer Neurotmesis, der vollständigen Durchtrennung des Nervs, Grenzen gesetzt. Kommt es bei einer Läsion des Nervs zu keiner Entstehung einer Lücke zwischen proximalen und distalen Nervenstumpf, so können die beiden Nervenenden jedoch im Zuge eines chirurgischen Eingriffs mittels End-zu-End-Adaption (Koaptation) wieder miteinander verbunden

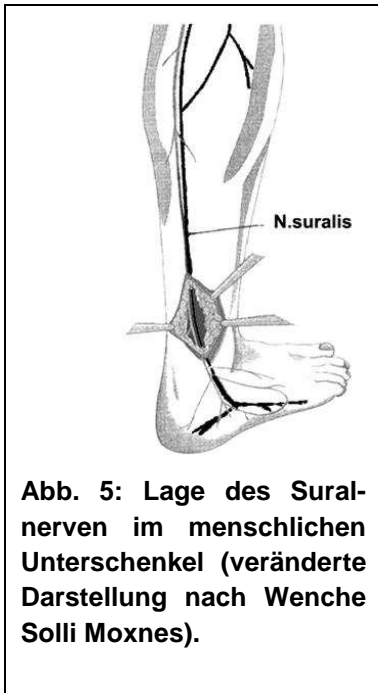


Abb. 5: Lage des Suralnerven im menschlichen Unterschenkel (veränderte Darstellung nach Wenche Solli Moxnes).

und somit eine Regeneration des Nervs erreicht werden (Seckel, Jones et al. 1995; Ahmed, Underwood et al. 2003).

Diese Möglichkeit der Wiederherstellung ist bei Nervenläsionen, die sich über eine längere Distanz erstrecken nicht möglich. Ohne Leitstruktur wachsen in solchen Fällen die Axone durcheinander und es kommt häufig zur Bildung eines Narbenneuroms (s.o.). Derzeit stellt die autologe Nerventransplantation den sogenannten Goldstandard in der plastischen Chirurgie dar (Millesi 1967; Doolabh, Hertl et al. 1996; Dahlin and Lundborg 2001; Schlosshauer, Muller et al. 2003). Hierbei werden körpereigene sensorische Nerven verwendet, deren Fehlen sich in möglichst geringen

funktionalen Defiziten äußert. Der dafür am häufigsten verwendete Nerv ist der *Nervus suralis* (Suralnerv), die sensible Versorgung der Wade und des Fußaußenristes (Abb. 5). Allerdings birgt diese Methode auch einige Nachteile in sich. So stehen für eine Transplantation nur begrenzte Mengen an Material zur Verfügung (max. 2 x 25 cm), so dass größere Verletzungen oft nur ungenügend versorgt werden können. Für den Patienten besteht mit der Entnahme des Suralnervs, neben der Morbidität im Donorbereich, das Risiko von Entzündungen oder Infektionen an der Entnahmestelle, die wiederum die Gefahr der Bildung eines Neuroms birgt.

1.3.1. Implantate zur Unterstützung der Regeneration

Um diese Probleme zu umgehen gibt es in der experimentellen und präklinischen Anwendung bereits zahlreiche biologische und artifizielle Ansätze. Als biologische Implantate kommen u.a. Blutgefäße, azelluläres Muskelgewebe oder isoliertes Epineurium zum Einsatz (Ayhan, Yavuzer et al. 2000; Fansa, Schneider et al. 2001). Bei der Verwendung von körperfremdem Gewebe wird eine Vorbehandlung notwendig, wodurch möglichst viele immunogene Komponenten entfernt werden (Johnson, Duhamel et al. 1982; Gulati and Cole 1994; Sondell, Lundborg et al. 1998). Trotz der Behandlung der Patienten mit Immunsuppressiva nach erfolgter Implantation zeigen Vergleiche mit autologen Transplantaten, dass die Regeneration verzögert wird. Es konnte bisher mit keiner der genannten Methoden eine Regeneration erreicht werden, wie sie bei autologen Transplantaten erzielt wurde (Kerns, Danielsen et al. 2003). Diesen Ansätzen gegenüber stehen zahlreiche Bemühungen in der Entwicklung synthetischer Nervenleitschienen mit Materialien wie synthetischen Polymeren aus Silikon, biologischen Polymeren wie Kollagen und Gelatine oder biologisch-abbaubaren, nicht resorbierbaren Polymeren wie Polyvinylalkohole, die ebenfalls getestet wurden und zum Teil bereits eine Zulassung für die Anwendung am Menschen haben (Dreesmann, Lietz et al. 2005; Schlosshauer, Dreesmann et al. 2006; Schlosshauer, Dreesmann et al. 2007; Sinis, Schaller et al. 2007). In der Weiterentwicklung dieser Neuroprothesen können diese, durch die Besiedelung mit Zellen oder molekularen Beschichtungen mit z. B. neurotrophen Substanzen, zusätzlich veredelt werden.

Generell sind Nervenimplantate feste oder poröse Gerüste oder Röhren aus natürlichen oder synthetischen Polymeren, die dazu bestimmt sind, natürliche Transplantate zu ersetzen.

An ein Implantat werden viele Anforderungen gestellt, um die bei der bisherigen Vorgehensweise zur Wiederherstellung eines verletzten Nervs beschriebenen Probleme und Risiken auszuschließen.

Das wichtigste Merkmal des für die Herstellung der Implantate verwendeten Materials ist die Biokompatibilität. Weiter darf das Implantatmaterial keine Entzündungs- oder Immunreaktionen hervorrufen oder eine Narbenbildung begünstigen. Sie sollen neben einer gewissen Steifigkeit, um ein Kollabieren der Röhre zu vermeiden, so flexibel sein, dass sie bei Bewegungen des Körpers nicht brechen. Ein weiteres Charakteristikum stellt die Semipermeabilität dar, wobei die

Diffusion von Metaboliten und Gasen ermöglicht, das Einwandern von narbenbildenden Fibroblasten aber verhindert werden soll (Belkas, Shoichet et al. 2004; Vleggeert-Lankamp, de Ruiter et al. 2007). Gleichzeitig ist die Resorbierbarkeit *in vivo* sehr wichtig. Hierbei sollten sich allerdings während des Abbaus keine toxischen Endprodukte bilden oder es zu einer Änderung des pH-Wert kommen. Regenerierende Neurite nehmen durch die Myelinisierung im Laufe der Zeit an Umfang zu. Auch vor diesem Hintergrund ist ein allmählicher Abbau wichtig, damit eine Kompression des neu entstandenen Gewebes vermieden wird (Merle, Dellon et al. 1989).

Vorangegangene Versuche haben gezeigt, dass Schwann Zellen eine hohe regenerative Wirkung für Nervenfasern haben (Yannas and Hill 2004). Aus diesem Grund sollen sie in der folgenden Arbeit vor der Implantation im Implantat angesiedelt werden. Schwann Zellen geben Wachstumsfaktoren wie NGF, BDNF und IGF-1 ab. Außerdem stellen sie ein Substrat für auswachsende Axone *in vitro* und *in vivo* dar (Steuer, Fadale et al. 1999). Schlosshauer, Muller et al. haben 2003 gezeigt, dass Axone *in vitro* bis zu achtmal schneller auswachsen als SZ migrieren. *In vivo* wachsen sie dabei nicht über die Schwann Zellen hinaus. Daher scheint das langsame Migrieren der SZ der zeitlimitierende Faktor während der Regeneration innerhalb eines Implantates zu sein (Hobson, Green et al. 2000; Schlosshauer, Muller et al. 2003).

In der heutigen Zeit wird artifiziellen Nervenimplantaten ein größerer Regenerationserfolg prognostiziert, als den autologen Transplantaten (Ijkema-Paassen, Jansen et al. 2004). Nur wenige Nervenleitschienen haben bereits eine Zulassung für die Anwendung am Menschen (Schlosshauer, Dreesmann et al. 2006). In Fachpublikationen findet man allerdings eine Reihe verschiedener Implantate, die in Tierversuchen eingesetzt wurden.

Auf diese Weise standardisiert produzierte Nervenleitschienen wären unbegrenzt für den Patienten verfügbar und es wären keine aufwendigen Sekundäroperation zur Entfernung des Implantats mehr notwendig.

1.3.2. Gelatine als Implantatmaterial

Für die hier vorliegende Arbeit diente Gelatine als Ausgangsmaterial für die Produktion und Entwicklung einer Nervenleitschiene. Gelatine wird aus dem Kollagen von Tierknochen und Tierhäuten (Kozlov 1983) gewonnen und als Bindemittel verwendet. Das Kollagen setzt sich aus drei Polypeptidketten zu einer Triplehelix zusammen, die aus 1050 Aminosäuren besteht, wovon 30 % Glycin, 13 % Prolin und 9 % Hydroxyprolin sind. Das ist gleichzeitig auch die Aminosäurezusammensetzung von Gelatine.

Bei der Herstellung von Gelatine können unterschiedliche Verfahren verwendet werden. Man unterscheidet ein saures Verfahren für Gelatine des Typs A und ein alkalisches Verfahren für Gelatine des Typs B (Veis and Schlueter 1964; Otani, Tabata et al. 1998).

Während des sauren Verfahrens werden überwiegend Schweineschwarten, beim alkalischen Verfahren ausschließlich Ossein (entfetteter Knochenschrot) und Rinderspalt (Bindehaut des Rinds) aufgeschlossen. Beide Verfahren führen zu einer Strukturveränderung des zuvor wasserunlöslichen Kollagens, genauer der Entwindung der Triplehelixstruktur, was zur Löslichkeit der Polypeptidketten führt, die dadurch in warmem bis siedendem Wasser extrahiert werden können.

Es folgen verschiedene Reinigungs- und Entwässerungsprozesse, über die die hochkonzentrierte Gelatinelösung abgekühlt. Währenddessen kommt es neben der teilweisen Rekonstruktion der Triplehelixstruktur zur amorphen Verflechtungen der Polypeptidketten. Nach weiteren Trocknungs- und Zerkleinerungsschritten steht die so gebildete wasserlösliche Gelatine zur Weiterverarbeitung zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich Gelatine vom Typ A verwendet.

Gelatine wird als ungefährliches Biomaterial schon sehr lange, sowohl im Lebensmittel- als auch im pharmazeutischen Bereich verwendet. Daher wird sie von der FDA (United States Food and Drug Administration) als gefahrloses Biomaterial eingestuft (Courts 1977) und ist dadurch für den Einsatz im Menschen ohne Bedenken einsetzbar. Aufgrund ihrer Stabilität und biologischen Resorbierbarkeit ist sie somit z.B. in der Pharmakotherapie ein gebräuchlicher Ausgangsstoff zum gezielten und zeitlich abgestimmten Einsatz von Arzneimitteln oder Hormonen in Form von Gelatine-Kapseln.

Ein Problem von Gelatine für den Einsatz als Implantatmaterial ist der schnelle Abbau *in vivo* durch spezielle Gelatinasen. Eine Erhöhung des Anteils kovalenter

Verbindungen innerhalb des Gelatinematerials kann durch bestimmte Vernetzungsagenzien erfolgen (wie z.B. Aldehyde oder Enzyme). Dies führt zu einer erhöhten Stabilität (Kuijpers, Engbers et al. 2000) und macht Gelatine als sogenanntes Biopolymer speziell für die Anwendung in Nervenimplantatmaterialien interessant, da es auf lange Sicht gesehen biologisch resorbierbar ist, aber trotzdem über längere Zeit stabil bleibt. Besonders enzymvernetzte gelatinebasierte Implantate, z.B. vernetzt mit mikrobieller Transglutaminase (TGase), sind vielversprechend, da sie weniger Toxizität aufweisen, als Aldehyd-vernetzte Implantate (Broderick, O'Halloran et al. 2005).

2. Der abdominale Bauchraum

Als abdominaler Bauchraum (*Cavitas abdominalis*) wird der Bereich der Körperhöhle verstanden, der nach oben vom Zwerchfell und nach unten vom Beckenboden begrenzt wird. Er beherbergt die Bauchorgane, wie Magen, Darm, Leber, Milz, die Gallenblase, sowie Teile der Speiseröhre und die Bauchspeicheldrüse, die hier dicht gepackt zusammenliegen. Ausgekleidet wird der abdominale Bauchraum durch das Peritoneum (Bauchfell), das als Wandblatt des Peritoneums (*Peritoneum parietale*) deren Außenwände auskleidet und sich als viszerales Peritoneum (*Peritoneum viscerale*, Eingeweideblatt) auf die Bauchorgane fortsetzt und diese überzieht. Ein seröser Flüssigkeitsfilm (*Liquor peritonei*), der die Oberflächen aller Organe bzw. deren peritoneale Auskleidung überzieht, gewährleistet die Verschiebbarkeit der Bauchorgane gegeneinander.

2.1. Grundlagen abdominaler Adhäsionen

Adhäsionen sind Verwachsungen zwischen zwei verletzten von Peritoneum überzogenen Gewebeoberflächen (Lamont 1992; Haney and Doty 1994). Sie entstehen vor allem nach operativen Eingriffen an inneren Organen, können aber auch nach Infektionen, allergischen Reaktionen, Traumata, wiederholter peritonealer Dialyse oder durch das Vorhandensein von Debris auftreten (diZerega 1996; Al-Musawi 2001; Boland and Weigel 2006). Oftmals bleiben die Verwachsungen im Bauchraum ohne direkte Konsequenzen oder Probleme für den Patienten. Sie stellen erst im Falle eines erneuten Eingriffs Schwierigkeiten dar. Dabei kann es zu ernsten

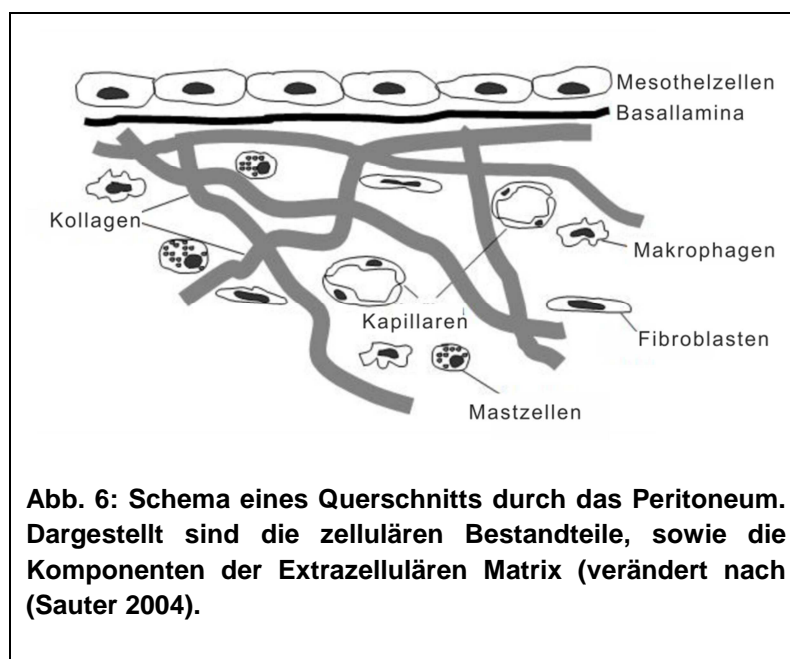
Einleitung

Komplikationen, wie etwa Dünndarmverschluss, chronischen Schmerzen oder Infertilität kommen. Wissenschaftliche Studien ergaben, dass sich abdominale Adhäsionen bei 67 % - 97 % der Patienten nach Bauchraumoperationen entwickelten. Bei Menschen ohne vorhergehende Operation wiesen immerhin 28 % eine Adhäsion auf, die sich vor allem auf intraabdominale Infektionen zurückführen ließen (Weibel and Majno 1973; Menzies and Ellis 1990; Menzies 1992).

Durch steigende Operationszahlen in diesem Bereich der Chirurgie ist ein Anstieg der Kosten im Gesundheitswesen sehr wahrscheinlich, so werden gegenwärtig schon etwa 3 % der durchgeführten Laparotomien zur Therapie von Adhäsionen durchgeführt, was im Jahr 1995 in den USA zu Kosten von etwa 2 Mrd US\$ geführt hat (Sullivan 1998).

Adhäsionen entstehen im Rahmen der Narbenbildung in Folge von Verletzungen des den Bauchraum auskleidenden Gewebes, des Peritoneums.

Das Peritoneum besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel, den Mesothelzellen, die auf einer Basallamina aufsitzen. Diese überdeckt eine Bindegewebsschicht, die überwiegend aus Kollagen besteht, in der jedoch auch Kapillaren und Zellen wie zum Beispiel Mastzellen, Fibroblasten und Makrophagen eingelagert sind (DiZerega 2000) (Abb. 6).

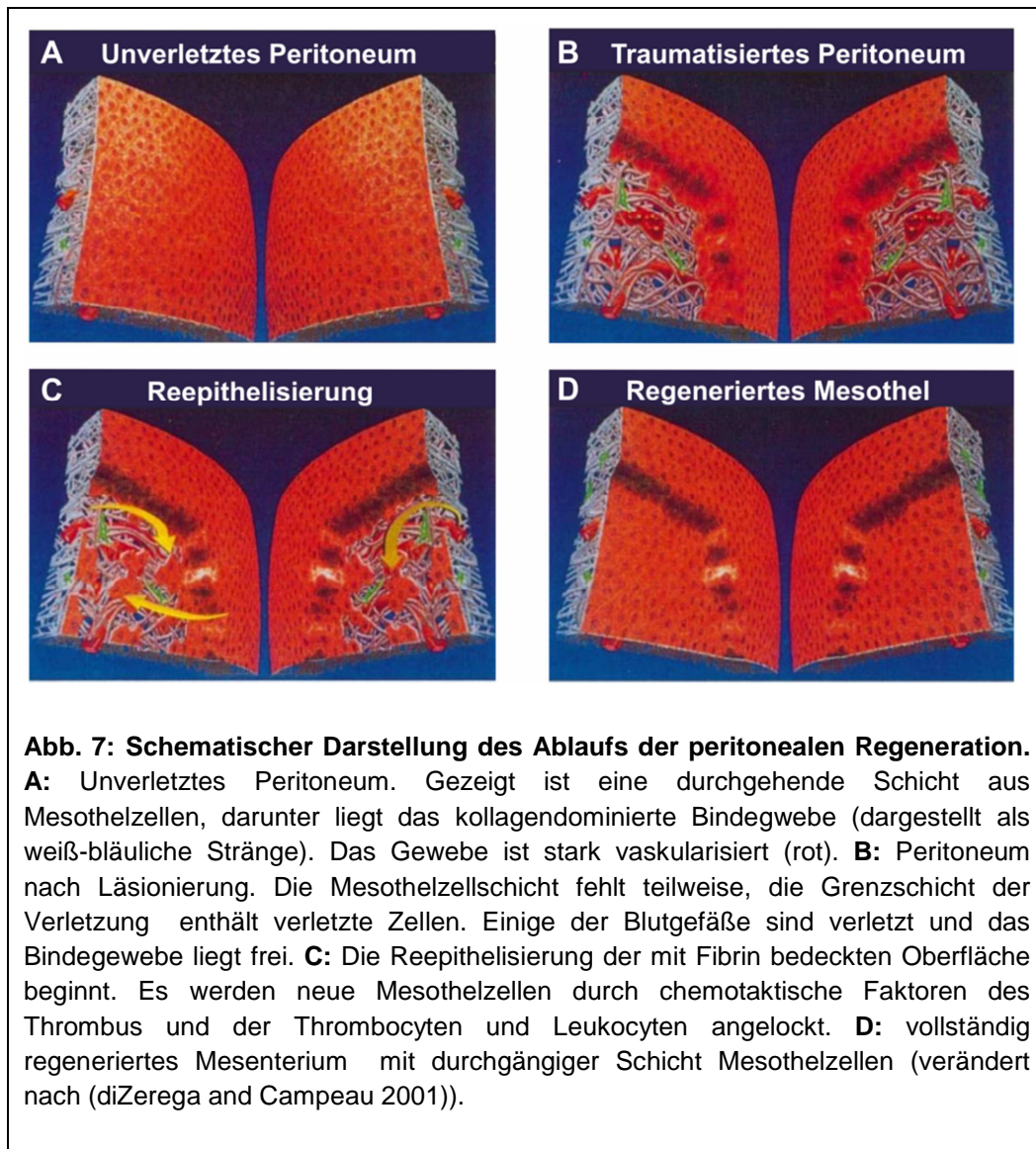


Wird das Peritoneum verletzt, kommt es zunächst zu einer Einblutung durch die verletzten Kapillaren. Es entsteht im Rahmen des Wundverschlusses Fibrin, das die Wunde versiegelt. Anschließend kommt es zur peritonealen Regeneration (van der Wal and Jeekel 2007).

2.2. Peritoneale Regeneration und Adhäsionsbildung

Schon 1919 wurde von Hertzler gezeigt, dass sich der peritoneale Heilungsprozess von dem anderer epithelialer Oberflächen, wie z.B. der Haut unterscheidet (Hertzler 1919). Während bei der Heilung des Epithels das Gewebe von den Wundrändern aus aufeinander zuwächst und so von außen nach innen die Läsion schließt, treten die neuen Mesothelzellen an jedem Punkt der Wunde gleichzeitig auf. Dies resultiert beispielsweise in der Tatsache, dass die Regenerationszeit einer 4 cm² großen Läsion vergleichbar mit einer nur 0,25 cm² großen Läsion ist (Ellis, Harrison et al. 1965). Je nach Literaturangabe ist die Regeneration des Mesothels nach fünf bis zehn Tagen abgeschlossen (Glucksmann 1966; Hubbard, Khan et al. 1967; Raftery 1973). In den folgenden Abschnitten sollen die beiden Heilungsprozesse noch einmal genauer unterschieden werden.

Der Verschluss der epidermalen Läsion, z.B. nach Verletzung der Haut, durchläuft vier Phasen (Abb. 7). In der ersten Phase, der exsudativen Phase, kommt es zu einem Wundverschluss über die Gerinnung von Fibrin. Zeitgleich tritt eine inflammatorische Reaktion mit der Abgabe lokaler Entzündungsmediatoren auf. Danach, in der resorptiven Phase, werden Zellabfälle durch einwandernde neutrophile Granulozyten phagozytiert. Parallel wandern Fibroblasten in die läsionierte Stelle ein. Etwa am 3. Tag beginnt mit der Proliferation der Fibroblasten die dritte Phase der Regeneration. Während diesem Stadium werden außerdem Kapillaren durch Angioblasten und Extrazellulärmatrix durch Myofibroblasten gebildet. Es entsteht ein zellhaltiges Bindegewebe, das vaskularisiert ist und vom Wundrand in die Defektstelle einwächst. Die letzte Phase ist die reparative Phase. Hierbei wird das neu entstandene Gewebe durch massive Kollageneinlagerung in Narbengewebe umgewandelt. Die Wundheilung der dermalen Oberfläche ist damit abgeschlossen (Wild 2006).



Nach einer Läsion des Peritoneums kommt es ebenfalls zur Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren. Serotonin, Bradykinin, Histamin und Prostaglandin führen zu einer lokal begrenzten Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Es tritt dadurch ein sero-fibrinöses Exsudat aus und sammelt sich in der Bauchhöhle. Fibrinogen, welches in dieser Flüssigkeit enthalten ist, wird mit Hilfe von Gewebsthrombokinase zu Fibrin umgewandelt. Daraufhin wandern in den folgenden Tagen große Mengen an Makrophagen ein. Sie treiben durch die Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 die lokale Inflammation voran (diZerega and Campeau 2001). Innerhalb von zwei Tagen sind sie in ein stabiles Fibringerüst eingebettet und ein Großteil der defekten Oberfläche wird von ihnen bedeckt. Nach weiteren zwei Tagen sind zudem

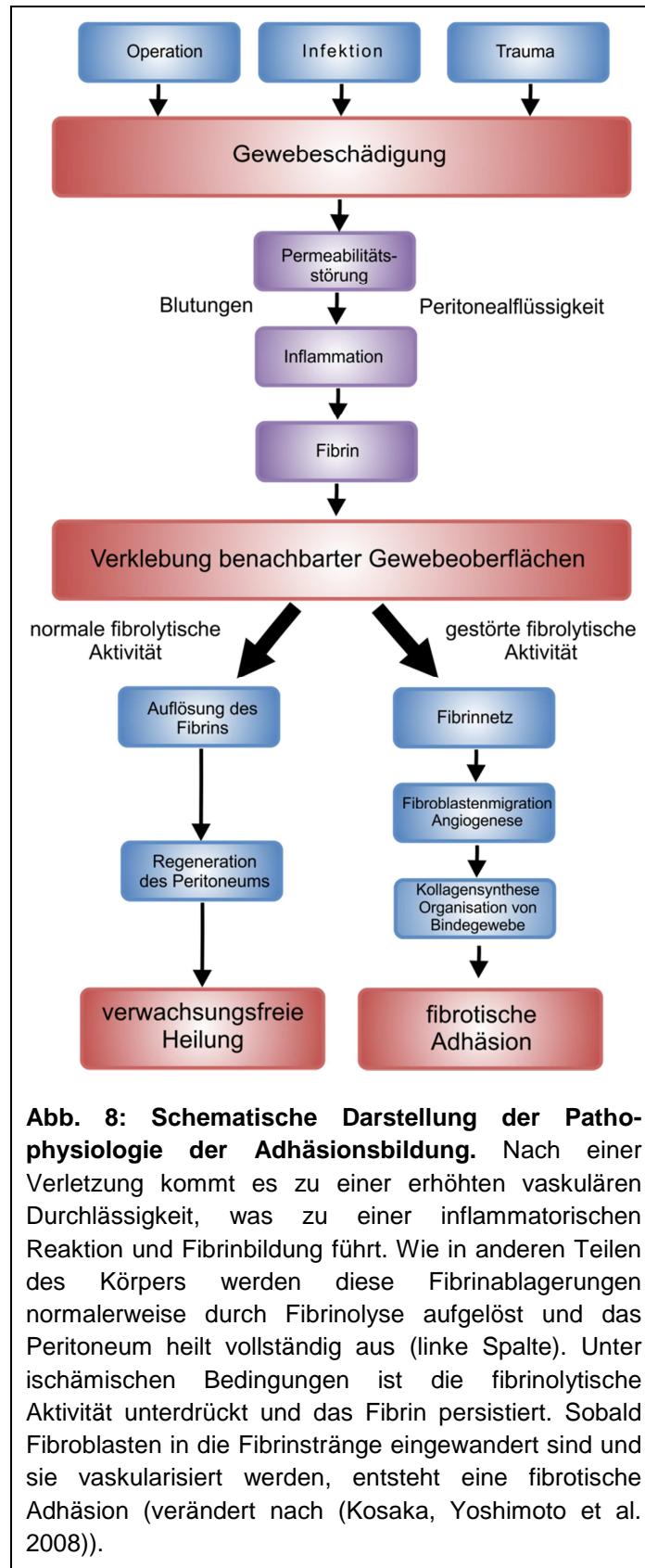
Fibroblasten und mesenchymale Vorläuferzellen eingewandert. Beide Zelltypen proliferieren im Wundbereich (Raftery 1973).

Nach insgesamt etwas mehr als 6 Tagen ist die verletzte Oberfläche nahezu vollständig von neuen Mesothelzellen bedeckt. Nur die Basallamina ist noch nicht vollständig wiederhergestellt. Mit Tag 8 ist die Regeneration abgeschlossen und eine komplette Schicht neuer Mesothelzellen bedeckt die ursprüngliche Läsion (Abb. 7; (diZerega 1996)).

Die Mesothelzellen stammen vermutlich aus verschiedenen Quellen, ihr Ursprung ist aber bis heute unklar. Sie können zum einen aus dem benachbarten Gewebe einwandern, es können transformierte Zellen aus dem Peritoneum sein oder es kann eine Metaplasie von Zellen aus dem subperitonealen Gewebe stattfinden. Außerdem können sich neue Mesothelzellen auch aus mesenchymalen Stammzellen entwickeln (diZerega and Campeau 2001).

2.2.1 Adhäsionsbildung

Bei der Entstehung abdominaler Adhäsionen ist die normale, physiologische Regeneration des Peritoneums gestört. Die Aktivität des fibrinolytischen Systems ist durch die Schädigung des Gewebes lokal beeinträchtigt. In der normalen, physiologischen Situation wird die entstandene Fibrinmatrix durch die Rekrutierung von Plasmin getriggert vom Gewebsplasmin Aktivator (*tissue plasminogen activator; tPA*) aus Plasminogen abgebaut (Weisel 2005). Durch die erhöhte Konzentration an inflammatorischen Zytokinen wird vom Mesothel allerdings vermehrt Plasminogen Activator Inhibitor (PAI) synthetisiert, der tPA inhibiert, was zum Verbleib des Fibrins auf dem Gewebe führt. Damit beginnt eine Kaskade, die zu einer Adhäsionsausbildung führt (Abb. 8; (Kosaka, Yoshimoto et al. 2008)).





In den so entstandenen Fibrinclot wandern Fibroblasten und andere Zellen ein. Sie beginnen sehr schnell mit einer Reorganisation des Fibrins und sezernieren Kollagen. Durch diesen narbigen Umbau bildet sich eine stabile Adhäsion aus (Abb. 9). Erst nach etwa 7 Tagen ist der kritische Zeitraum für die Ausbildung einer Adhäsion vorüber (Monk, Berman et al. 1994).

2.3. Adhäsionstherapie und -prophylaxe

Eine bereits ausgebildete Adhäsion lässt sich bis heute ausschließlich durch eine Adhäsioolyse, also dem (erneuten) Eröffnen der Bauchhöhle und der Durchtrennung des Adhäsionsgewebes therapieren (Szomstein, Lo Menzo et al. 2006). Durch diese Art der Therapie kommt es zwar meistens zu einer kurzfristigen Besserung der Symptome, langfristig bedeutet der erneute Eingriff aber auch die Gefahr einer erneuten Adhäsionsausbildung. Die Prävention einer Adhäsionsbildung verspricht deshalb, im Gegensatz zur bereits etablierten Therapie, die bessere Lösung zu sein.

Die verschiedenen Ansätze der Prävention können in drei Kategorien unterteilt werden. Zum ersten Ansatz zählt die Vermeidung von Traumata durch vorsichtiges Operieren oder minimalinvasive Eingriffe, um größere Verletzungen und Gewebeirritationen zu vermeiden. Der Einsatz von Pharmaka, die in die adhäsionsbildenden biochemischen Signalwege eingreifen, werden zur zweiten Kategorie zusammengefasst. Ein letzter Ansatz verfolgt das Ziel, Adhäsionen mit der Applikation von flüssigen oder festen Implantaten, die im Körper verbleiben, zu verhindern (Zawaneh and Putnam 2008). Zu diesem Zweck werden therapeutisch

Einleitung

zum einen langsam resorbierbare Gele oder flüssige Lösungen (z.B. Adept[®] der Firma Baxter) eingesetzt, sowie antiadhäsiv wirkende Folien. Zurzeit werden in der Klinik hauptsächlich zwei Folien, Interceed[®] (Johnson & Johnson) und Seprafilm[®] (Genzyme) verwendet, die allerdings auch einige Probleme aufweisen. Die Folien müssen teilweise vernäht werden, wodurch eine neue Provokation für Narbenbildung und damit Adhäsionsausbildung entsteht. Im Hinblick auf den minimalinvasiven Einsatz sind diese Implantate oft problematisch in der Handhabung.

Auch der Einsatz von flüssigen Lösungen oder Gelen, die in den Bauchraum injiziert werden und dort für ca. eine Woche verbleiben, bevor sie vom Körper resorbiert werden, weisen einige Schwächen auf. Sie sind nicht lokal applizierbar und müssen somit den ganzen Bauchraum ausfüllen. Durch den dadurch entstehenden Druck auf die inneren Organe können neue Komplikationen entstehen. Weiter weist keine der oben beschriebenen Methoden eine ausreichende Verhinderung von Adhäsionen auf (Rajab, Wallwiener et al. 2010).

Auf Grund dieser Problematik werden große Forschungsanstrengungen betrieben neue Barrieren zu entwickeln.

An eine neue Adhäsionsbarriere müssen gewisse Forderungen auf Basis des Einsatzes durch den Chirurgen, den Einsatzort und die Funktionalität gestellt werden. Zunächst sollte eine Barriere biokompatibel, resorbierbar und nicht immunogen sein. Sie muss in der Lage sein verletzte Oberflächen voneinander getrennt zu halten und die Fibrinstrangbildung zwischen den läsionierten Geweben zu verhindern. Für den Einsatz in der Klinik muss sie einfach in der Handhabung und Applikation, auch bei minimalinvasiven Eingriffen, sein. Weiter sollte eine Barriere über den kritischen Zeitraum von 7 Tagen funktional sein, was bedeutet, dass sie an Ort und Stelle bleiben muss und noch nicht aufgelöst sein darf. Dies sollte jedoch ohne ein Vernähen möglich sein, um keine neuen Adhäsionen zu provozieren (Saravolos and Li 1996; Al-Musawi 2001; Zawaneh and Putnam 2008).

2.4. Adhäsionsbarrierentestung

Bevor ein neues Implantat zur Adhäsionsprophylaxe in der Klinik zum Einsatz kommt, müssen Tests *in vitro* und präklinische Tests *in vivo* durchgeführt werden. Zunächst werden *in vitro* Aspekte wie Zytotoxizität und Resorbierbarkeit analysiert, wobei hierfür bereits standardisierte Testsysteme, wie etwa der MTS-Assay für Toxizitätsanalysen (Mosmann 1983), existieren. Wenn eine potentielle neue Adhäsionsbarriere die *in vitro* Tests besteht, muss in weiteren Ansätzen ein „proof of concept“ erbracht werden, damit die Funktion der Adhäsionsbarriere zu überprüfen. Derartige Versuche beruhen bis heute ausschließlich auf der Verwendung von Tiermodellen.

Verwendet werden vor allem Ratten und Kaninchen, es existieren jedoch auch Modelle mit Versuchen an Großtieren, etwa dem Hund (Asano, Takazawa et al. 2006). Die Tiere werden einer adhäsionsinduzierenden Operation unterzogen, wobei hier verschiedene Operationstechniken etabliert sind. In Kaninchen wird vor allem das cecale Abrasionsmodell verwendet, bei dem an Blinddarm und die Bauchwand Verletzungen gesetzt werden, um eine Adhäsion auszulösen (Ito, Yeo et al. 2007; Lang, Gruntzig et al. 2007; Weis and Odermatt 2007). Auch in Ratten wird häufig dieses Modell verwendet (Burns, Skinner et al. 1996; Ersoy, Ozturk et al. 2008; Kece, Yildiz et al. 2010), jedoch gibt es hier ein weiteres häufig verwendetes Modell, bei dem durch das Abbinden von Bereichen des Bauchfells sogenannte „ischemic buttons“ erzeugt, und auf diese Art ebenfalls Adhäsionen induziert werden (Wallwiener, Brucker et al. 2006; Rajab, Wallwiener et al. 2009; Rajab, Wallwiener et al. 2010). Bei all diesen Versuchen werden häufig große Tierzahlen verwendet, da zum einen die Auslösung von Adhäsionen in den Kontrolltieren nicht standardisiert funktioniert, zum anderen große Probleme durch eine enorm gesteigerte Letalität vor Ende des Versuches auftreten.

3. Zielsetzung

Gelatine wird schon sehr lange als unbedenkliches Biomaterial im pharmazeutischen Bereich verwendet. In dieser Arbeit sollen wissenschaftliche Fragestellungen potenzieller auf Gelatine basierender Implantatmaterialien für den Einsatz im peripheren Nervensystem und im abdominalen Bauchraum mit Hilfe verschiedener *in vitro* und *in vivo* Assays untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollen außerdem die jeweiligen Reaktionen der Zellen bzw. Gewebe auf die Materialien analysiert werden. Zu diesem Zweck werden einige Methoden etabliert und weiter entwickelt.

Für das periphere Nervensystem sollen eine Nervenleitschiene und ein Gewebekleber analysiert werden. Zunächst werden für die Nervenleitschiene Fragestellungen physikalischer Eigenschaften, wie Quellverhalten und Langzeitstabilität, untersucht. Anschließend sollen biologische Eigenschaften genauer analysiert werden. Nach dem Konzept der Nervenleitschiene soll das Implantat den Stoffaustausch über die Röhrenwand ermöglichen, gleichzeitig aber das Einwandern von Narben bildenden Fibroblasten verhindern. Mittels zellbiologischer Assays sollen außerdem Fragen dahingehend beantwortet werden, in wie weit auswachsende Neurone und Schwann Zellen das Material als Matrix verwenden können. Der Gewebekleber soll neben der Funktionalität auch auf Biokompatibilität und Permissivität untersucht werden. Dabei sollen verschiedene immunhisto- und immunzytochemische und mikroskopische Verfahren zur Charakterisierung des Zellverhaltens auf den unterschiedlichen Matrizes eingesetzt werden. Für beide Implantattypen sollen außerdem Fragestellungen bezüglich der Gewebe- und Immunreaktion, sowie dem Abbauverhalten subkutan in der Maus analysiert werden. Abschließend sollen die Implantate in durchtrennten Nerven des *Nervus ischiadicus* der Ratte implantiert werden und die Regeneration funktionell, elektrophysiologisch und histologisch untersucht werden.

Für den abdominalen Bauchraum soll die Entwicklung einer potenziellen Adhäsionsbarriere vorangebracht werden. Hierfür soll zunächst ein Tiermodell mit entsprechenden Analysemethoden entwickelt werden, um dann anschließend eine Adhäsionsbarriere auf Gelatinebasis *in vivo* testen zu können.

Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

| | |
|-----------------------------------|---|
| Analysenwaage | Mettler Toledo GmbH, Gießen |
| Autoklav Systec VX-95 | Systec GmbH, Wettenberg |
| Binokular Stemi SV6 | Zeiss, Oberkochen |
| Brutschrank CB 150 | Binder, Tuttlingen |
| Brutschrank Bruja Motorbrüter | 68/ EM Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hamburg |
| Digitalcamcorder Canon FS 10 | Canon, Japan |
| Digitalkamera AxioCam MR3 | Zeiss, Oberkochen |
| Digitalkamera AxioCam MRm | Zeiss, Oberkochen |
| Digitalkamera DFC 320 | Leica Microsystems, Wetzlar |
| Digitalkamera Nikon Coolpix 990 | Nikon, Japan |
| Digitalkamera Nikon Coolpix P5100 | Nikon, Japan |
| Federwaage | Haerte und Wertstofftechnik GmbH, Weinstadt |
| Feinwaage PE 3600 | Mettler Toledo GmbH, Gießen |
| Fluostar OPTIMA | BMG Labtech, Offenburg |
| Gefrierschrank | Liebherr, Biberach |
| Heizwasserbad | Julabo, Seelbach |
| Homogenisator ElektroMotor RW20 | Janke + Kunkel, Staufen |
| Kryostat Leica CM 1950 | Leica Microsystems, Wetzlar |

Material und Methoden

| | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| Kühleinheit TES 99.420 | Medite Medizintechnik, Burgdorf |
| Laborboy „Swiss Boy 115“ | Rudolf Grauer AG, Schweiz |
| Laborständer | Bodum Laborbedarf, Weilburg |
| Laborwaage Modell PE3600 | Mettler, Giessen |
| LSM 510 Meta | Zeiss, Oberkochen |
| Magnetrührer RCT basic | IKA, Staufen |
| Mikroskop Axiovert 200M | Zeiss, Oberkochen |
| Mikroskop Axiovert 35 | Zeiss, Oberkochen |
| Mikroskop Axiophot | Zeiss, Oberkochen |
| pH-Meter | Mettler Toledo GmbH, Gießen |
| Plasmacleaner | Boc Edwards, England |
| Sterilbank | BDK, Sonnenbühl- Genkingen |
| Opsys Plate Reader | Dynex, USA |
| Ultraschallbad Sonorex RK 102 A | Bandelin electronic, Berlin |
| Wärmeschrank ULM 400 | Memmert, Schwabach |
| Wärmeplatte Typ 12501 | Medax, Rendsbur |
| Wasserbad SW-20C | Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach |
| Zellzähler CASY1® | Schärfe System, Reutlingen |
| Zentrifuge 5415 C | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge Universal 16A | Hettich, Schweiz |
| Zugprüfmaschine | Zwick/Roell, Ulm |

1.2 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Corning, USA; Eppendorf, Hamburg; Ethicon, Belgien; Greiner bio-one, Frickenhausen; Henry Schein, Stuttgart, H. Saur Laborbedarf, Reutlingen und Roth, Karlsruhe bezogen.

1.3 Chemikalien

| | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| Aceton | Roth, Karlsruhe |
| BSA | PAA Laboratories, Österreich |
| Braunol | B.Braun, Melsungen |
| Calciumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Dako Fluorescence Mounting Medium | DakoCytomation, USA |
| DMSO | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| EDTA | PAA, Pasching Österreich |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Fötales Kälberserum | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Formaldehydlösung (37%) | Merck, Darmstadt |
| Gelatinelösung 2% | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Gentamycin | PAA Laboratories, Österreich |
| Glutamin | PAA Laboratories, Österreich |
| Hank's BSS (1x) | PAA Laboratories, Österreich |
| ImmEdge™ Pen | Linaris, Wertheim |

Material und Methoden

| | |
|--|--|
| Kaliumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Ketamin, 10% | Bela Pharm, Vechta |
| BD Matrigel™ (<i>high concentration</i>) | BD, Heidelberg |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumcitrat | Merck, Darmstadt |
| Neo-Mount | Merck, Darmstadt |
| Paraffin Tissuewax | Medite Medizintechnik, Burgdorf |
| PBS | Carl Roth, Karlsruhe |
| Paraformaldehyd (PFA) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Rattenserum | PAN-Biotech, Aidenbach |
| Rimadyl; Carprofen, 50mg/ml | Pfizer, Berlin |
| Roti- Histol | Roth, Karlsruhe |
| Saccharose | PAA, Pasching Österreich |
| Silikonpaste, mittelviskös | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tissue Tek | O.C.T. Compound, Sakura; Torrance Kanada |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Trypsin-EDTA | PAA Laboratories, Österreich |
| Trypsin | Serva, Heidelberg |

Tween 20 Merck, Darmstadt

Xylazin, 2% Animedica, Senden-Bösensell

1.4 Puffer/Lösungen

BrdU Fixierlösung: 0,375 g Glyzin
100 ml Aqua dest.
233 ml 100 % Ethanol
0,5 ml HCl rauchend, pH 2,0

1 % BSA/PBS: 10 g BSA
ad 1 l PBS

1% BSA/5% NGS/PBS: 10 g BSA
50 g NGS
ad 1 l PBS

5 µg/ml DAPI: 1,5 ml DAPI (500 µg/ml)
148,5 ml PBS

0,2% Eosin-Lösung: 0,5 g Eosin G
225 ml 96 % Ethanol
25 ml Aqua dest.
2-3 Tropfen Eisessig

Material und Methoden

70 % Ethanol: 700 ml 100% Ethanol
ad 1 l H₂O

Hämatoxylin (Weigert):

Stammlösung A:

1 g Hämatoxylin (certified)
100 ml 96% Ethanol

Stammlösung B:

1,2 g Eisen(III)-chlorid
1 ml Salzsäure, rauchend (37 %)
99 ml Aqua dest.

Stammlösung A und B 1:1 mischen

0,9% NaCl:

9 g NaCl
ad 1 l Aqua dest.

50 µg/ml PDL:

200 µl PDL (500 µg/ml)
1,8 ml H₂O

4 % PFA/PBS:

40 g PFA
ad 1 l PBS

10%/20%/30% Saccharose:

100 g/ 200 g/ 300 g Saccharose
jeweils ad 1 l Aqua dest.

0,2 % Triton X-100:

2 ml Triton X-100

| | |
|------------------------|-----------------------------------|
| | ad 998 ml H ₂ O |
| Trypsin-Arbeitslösung: | 50 mg Trypsin |
| | 100 mg Calciumchlorid |
| | 100 ml Aqua dest. |
| | pH mit 1N NaOH auf 7,8 einstellen |
| 0,05% Tween20/PBS | 500 µl Tween 20 |
| | ad 1 l PBS |

1.5 Farbstoffe und Antikörper

1.5.1 Verwendete Farbstoffe

| Farbstoff | Hersteller | Anwendung |
|---|------------------------------------|-------------------------------|
| BrdU <i>Cell Labeling and Detection kit I</i> | Roche, Mannheim | Zellproliferation |
| Calcein- AM | Molecular Probes, USA | Zellvitalfärbung |
| DAPI | Sigma-Aldrich, Steinheim | Zellkernfärbung |
| Dil-Ac-LDL | Biomedical Technologies, Inc., USA | Markierung von Endothelzellen |
| Hämatoxylin | Merck, Darmstadt | Zellkernfärbung |
| Eosin | Merck, Darmstadt | Zytoplasmafarbstoff |
| Masson-Trichrom Kit | Färbesigma-Aldrich, Steinheim | Anfärbung von Kollagen |

Propidiumiodid Sigma-Aldrich, Steinheim Zellkernfärbung

1.5.2 Verwendete Primärantikörper

| Primärantikörper | Wirt | Hersteller | Verdünnung |
|------------------------------------|-----------------|---|-------------------|
| Anti – 2 A10 Hybridomaüberstand | Maus | (Schlosshauer, Stier et al. 1993) | unverdünnt |
| Anti-BrdU | Maus | Roche | 1:50 |
| ED1 – CD68 | Maus | AbD Serotec | 1:200 |
| P75 | Maus | Alomone Labs | 1:100 |
| Phalloidin Oregon Green 488 | direkt markiert | Sigma Aldrich | 1:100 |
| S100 | Maus | Sigma Aldrich | 1:100 |
| SMI31 | Maus | Covance | 1:3000 |
| Thy1.1 | Maus | AbD Serotec | 1:500 |

1.5.3 Verwendete Sekundärantikörper

| Sekundärantikörper | Wirt | Hersteller | Verdünnung |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------|------------|
| anti-Kaninchen IgG Cy3 | Ziege (polyklonal) | Dianova | 1:300 |
| anti-Kaninchen IgG Alexa 488 | Ziege (polyklonal) | Invitrogen | 1:300 |
| anti-Maus-IgG Cy3 | Ziege (polyklonal) | Jackson Laboratories | 1:300 |
| anti-Maus-IgG Alexa 488 | Ziege (polyklonal) | Invitrogen | 1:300 |

1.6 Zellen und Nährmedien

1.6.1 Schwann Zellen und primäre Fibroblasten

Es wurde mit primären Schwann Zellen (SZ), Ischias Fibroblasten (Ischias FB) und Haut Fibroblasten (Haut FB) gearbeitet, die in der Arbeitsgruppe aus neonatalen Lewisratten P0/P1 präpariert wurden (Brockes, Fields et al. 1979; Morgan 1995). Alle Versuche wurden mit SZ der Passagen (P) 4 – 12 (Funk, Fricke et al. 2007) bzw. Ischias FB und Haut FB der Passagen 8 - 14 durchgeführt. Zur Kultivierung der primären SZ, Ischias und Haut FB aus der Ratte diente Dulbeccos Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose (DMEM high glucose), das mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 0,5 % Gentamycin versetzt wurde.

1.6.2 Hinterwurzelganglien (DRGs)

Die genutzten primären Hinterwurzelganglien (DRGs) wurden von Hühnerembryonen (Embryonaltag 8 (E8)) gewonnen. Primäre DRGs wurden in Neurobasal™-A Medium kultiviert. Dem Medium wurden 0,2 % B27 Supplement-Mix, 1 % L-Glutamin und 0,5 % Gentamycin hinzugefügt.

1.6.3 HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*)

Die verwendeten HUVEC wurden von der Firma PromoCell bezogen. Die Zellen wurden zwischen den Passage P3 und P9 für die Versuche verwendet.

Zur Kultivierung der HUVEC wurde Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell) mit Endothelial Cell Growth Medium SupplementPack (PromoCell) und mit 50 U/ml Penicillin (PAA) und 50 µg/ml Streptomycin (PAA) verwendet.

1.6.4 L929 – Fibroblasten

Die Mausfibroblasten Zelllinie L929 gearbeitet wurde ursprünglich aus dem Bindegewebe von Mäusen gewonnen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate aus.

Zur Kultivierung der L929 wurde das Medium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) verwendet, das mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 0,5 % Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) versetzt wurde.

1.6.5 Neuro-2A Tet-ON Zellen

Um eine pharmakologisch induzierte Genexpression von Zellen durch die Wandung von Gelatineröhren hindurch zu testen, wurden Neuro-2A Tet-ON Zellen verwendet. Diese sind retroviral mit einem Tetracycline Response Element (TRE) und GFP transduziert worden (Abteilung Molekularbiologie, NMI Reutlingen). Dieses TRE-Element bewirkt eine spezifische GFP-Expression, wenn zu den Zellen Doxycycline (dox) (2 µg/mL) zugegeben wurde. Zur Kultivierung dieser Zellen wurde EMEM verwendet, das mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 0,5 % Gentamycin versetzt wurde.

1.7 Gelatine

Als Ausgangsstoff wurde herkömmliche Gelatine vom Typ A (Gelita AG) verwendet. Stabilisiert wurde die Gelatine durch Vernetzung mit bakterieller Transglutaminase oder mit Formaldehyd und einer anschließenden Oberflächenbehandlung. In der vorliegenden Arbeit wurden 50 µm dünne Formaldehyd vernetzte

Gelatinemembranen als Adhäsionsbarriere verwendet, Nervenleitschienen aus Transglutaminase vernetzter Gelatine mit einem Durchmesser von ca. 1 mm und einer Wandstärke von ca. 150 μm (Einfachröhre) und Gelatinekleber, bestehend aus einem Zweikomponenten – Spritzen – System (Gelatinelösung 10 % und Transglutaminaselösung Konzentrationen von 2-30 U/ml).

1.8 Tiere

1.8.1 Hühnchen

Für die Präparation der Hühnchen Hinterwurzelganglien (DRGs) und der Implantation von Implantaten auf der Chorioallantoismembran wurden Hühnereier der Rasse *Hisex weiss/brown* verwendet. Die Eier wurden von der Firma A.C. Weiss, Kirchberg/Iller bezogen und in einem Brutschrank bei 60-80 % Luftfeuchtigkeit bebrütet.

1.8.2 Mäuse

Für die subkutane Implantation der unterschiedlichen Gelatineproben wurden Mäuse vom Stamm Balb/C mit einem Alter von 10 Wochen und einem Gewicht von 20 g verwendet. Die Tiere wurden von der Firma Charles River, Sulzfeld bezogen. Sie wurden in Makrolon Käfigen (Typ III) in Gruppen von 3 bis 7 Tieren bei einer Raumtemperatur von 22 ± 2 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 % und einem Tages/Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h auf Standardeinstreu für Labortiere (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gehalten und erhielten ssniff R/M-Haltungsfutter und Wasser ad libitum.

1.8.3 Ratten

Für die Nervenimplantationen und die Testung von Adhäsionsbarrieren wurden weibliche Lewis-Ratten (bezogen von Charles River, Sulzfeld oder Janvier, Frankreich) mit einem Gewicht von ca. 200 g verwendet. Sie wurden in Käfigen (Makrolon Typ IV) mit Standardeinstreu für Labortiere (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) in Gruppen von 2-4 Tieren bei einer Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 %, einer Temperatur von 22 ± 2 °C und einem Tages-/Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h

gehalten. Die Tiere erhielten Standardtrockenfutter (ssniff R/M-Haltungsfutter, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser ad libitum.

1.9 Software

Für die Verarbeitung numerischer und graphischer Daten und Texte wurden folgende Programme verwendet:

| Programm | Hersteller | Anwendung |
|------------------------|--------------------|---|
| Cellworks 6.1.2 | NPI | Aufnahme und Verarbeitung von elektrophysiologischen Signalen |
| Cellworks Reader 6.1.1 | NPI | Verarbeitung von elektrophysiologischen Signalen |
| Corel Draw X5 | Corel | Bildverarbeitung |
| EndNote4 | Adept Scientific | Bibliografieerstellung |
| InStat 3 | Graph Pad Software | Statistik |
| ImageJ | Wayne Rasband | Bildverarbeitung |
| Irfan View | Irfan Skiljan | Bildverarbeitung |
| IM 50 | Leica | Bildaufnahme |
| QWin | Leica | Bildverarbeitung |
| Excel | Microsoft | Datenverarbeitung |
| Word | Microsoft | Textverarbeitung |
| Photoshop4 | Adobe | Bildverarbeitung |
| Zeiss Axiovision | Zeiss | Bildaufnahme |
| LSM Image Browser | Zeiss | Bildaufnahme |

1.10 Statistik

Die statistische Analyse der Daten wurde mit Hilfe der Software „JMP 7“ (SAS, Cary, USA) und Microsoft Excel (Microsoft Corp., USA) durchgeführt. Es wurden ein- bzw. zweiseitige t-Tests verwendet und der P-Wert angegeben. Zur Ermittlung der Normalverteilung und der Varianz der ermittelten Werte wurde eine einfaktorielle ANOVA (Analysis of Variance) durchgeführt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen.

2. Methoden

2.1 Zellkulturen

Die Zellkulturrhaltung erfolgte als offenes System in einem CO₂-Brutschrank bei 37 °C, ca. 80 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Als Kultivierungsmedien dienten DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute), Endothelial cell growth medium und Neurobasal™-A Medium. Vor dem Gebrauch wurden die Medien supplementiert (siehe oben).

Die Kulturflaschen wurden für die Schwann Zellen vor Gebrauch mit PDL beschichtet. Der Medienwechsel erfolgte alle drei Tage. Die Zellen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:3 ausgesät. Zu der laufenden Zellkultur wurden die Schwann Zellen mit 2 µM Forskolin versetzt, was die Proliferation dieser Zellen fördert. Vor der etwa zehnminütigen Inkubation mit Trypsin, einer Protease, die zum Ablösen der Zellen vom Untergrund eingesetzt wird, wurden sie kurz mit PBS gewaschen.

2.1.1 Vorbehandlung von Zellkulturmaterialien

Reinigung von Deckgläschen und Folien

Die Deckgläschen (DG) und Folien, die für die Zellkultur verwendet wurden, wurden zunächst in 96 % Ethanol entfettet. Anschließend wurden die DG im Ultraschallbad für 15 min gereinigt, fünf bis sechs Mal mit Aquabidest gespült und im Autoklaven bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Nach der Sterilisation wurden die DG in Aquabidest in einer verschlossenen Flasche bei RT (Raumtemperatur) aufbewahrt. Deckgläschen

Material und Methoden

wurden für primäre Schwann Zellen, Fibroblasten, DRGs (dorsale Hinterwurzelganglien) verwendet.

Für die Reinigung der Folien wurde eine unbeschichtete Kopierfolie in 2 cm x 1 cm große Stücke geschnitten. Die Folienstücke wurden im PlasmaCleaner 30 sec mit Sauerstoffplasma behandelt, um sie zu sterilisieren und die Oberfläche zu aktivieren, damit Beschichtungen besser adhäreren können. Anschließend wurden die Folien sofort für Versuche weiterverwendet.

Poly-D-Lysin Beschichtung von Deckgläschen, Folien und Zellkulturflaschen

Schwann Zellen und dorsale Hinterwurzelganglien (DRGs) benötigen für ihr Wachstum in Kulturschalen und auf Deckgläschen (DG) einen positiv geladenen Untergrund. Dazu wurde der Boden der Kulturflaschen, DG und Folien mit

50 µg/ml Poly-D-Lysin (PDL) bedeckt, welches ein synthetisches Molekül ist und wodurch die negative geladene Oberfläche eine positive Ladung bekommt. Nach 60 min bei 37 °C/5 % CO₂ wurde das PDL wieder entfernt und dreimal mit Aquabidest gewaschen. Anschließend wurden die Kulturschalen, DG und Folien unter der Sterilbank getrocknet und bei 4 °C bis zu drei Monaten gelagert.

Laminin Beschichtung von Deckgläschen

Für die Lamininbeschichtung wurden 20 µg/ml Laminin pro PDL-beschichtetem Deckgläschen (DG) aufgetragen und 30-60 min bei 37 °C/5 % CO₂ inkubiert. Zur Beendigung der Inkubationszeit wurde das Laminin abgesaugt. Da freies Laminin an die Integrinrezeptoren bindet und Zellen durch die besetzten Bindestellen nicht am DG adhäreren könnten, wurde anschließend mit PBS gewaschen. Die DG wurden direkt verwendet, um ein Eintrocknen des Laminins auszuschließen.

2.1.2 Umstellung der Schwann Zellen auf Rattenserum

Für *in vivo* Implantationen am Ischiasnerv der Ratte wurden die Schwann Zellen (SZ) auf 10 % Ratten serum umgestellt. Zu diesem Zweck wurde eine zu 75 % konfluente

Zellkulturflasche mit SZ P6 verwendet. Es wurde täglich Medium gewechselt und dabei immer mehr FCS entfernt und durch Rattenserum (RS) ersetzt:

1. Tag: DMEM + 10 % FCS
2. Tag: 9 Teile DMEM + 10 % FCS und 1 Teil DMEM + 10 % Rattenserum
3. Tag: 8 Teile DMEM + 10 % FCS und 2 Teile DMEM + 10 % Rattenserum

usw.

9. Tag: 10 Teile DMEM + 10 % Rattenserum
10. Tag: Splitten in reinem DMEM + 10 % Rattenserum
14. Tag: Einfrieren
15. Tag: Auftauen und auf DGs aussäen
16. Tag: Immunfluoreszenzfärbung

Während der gesamten Umstellungsphase wurden nach jedem Splitten (insgesamt 2-mal) 2 μ M Forskolin zugesetzt.

2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zelllinien und primären Zellen (Schwann Zellen und Fibroblasten) wurden regelmäßig kryokonserviert und bei Bedarf rekultiviert.

Die Zellen einer konfluenten T75-Kulturflasche wurden durch Trypsinbehandlung abgelöst und bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Niederschlag in 1 ml kaltem Einfriermedium, das 10 % kryoprotektives Dimethylsulfoxid (DMSO) und 90 % FCS enthielt, resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und für 24-48 h in einer Einfrierbox bei -80 °C, danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Dann wurde die Zellsuspension zum schnellen Verdünnen des zytotoxischen DMSO in 10 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min). Die abzentrifugierten Zellen wurden in 5 ml frischem Medium resuspendiert

Material und Methoden

und in T25-T75 Kulturflaschen ausgesät. Nach 24 h bei 37 °C/5 % CO₂ wurde ein Mediumwechsel zum Entfernen toter Zellen durchgeführt.

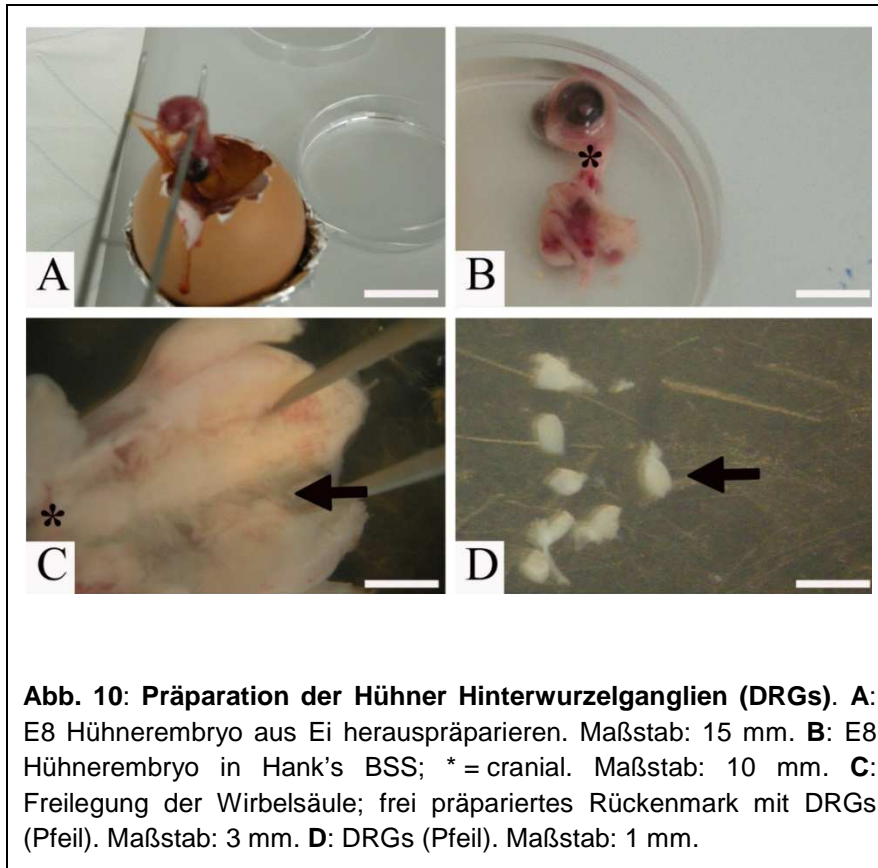
2.1.4 DRG Kulturen

Dorsale Hinterwurzelganglien (DRGs) der Ratte oder von Hühnchen wurden in Neurobasal™-A Medium mit 1 % L-Glutamin, 0,5 % Gentamycin und 0,2 % B27-Supplement für bis zu 7 Tage kultiviert. Um das Axonwachstum zu stimulieren, wurden 25 ng/ml NGF dem Medium zugesetzt.

Hühner DRG Präparation

Befruchtete Eier (E1) wurden aus dem Kühlschrank in den Brutschrank eingelegt, so dass sie sich nicht berührten. Ruckartige Bewegungen und Erschütterungen wurden vermieden, um einen Bewegungsschock der Embryonen zu verhindern. Die Eier wurden bis E8 bei 37,5-38 °C und 60-80 % Luftfeuchtigkeit bebrütet. Anschließend wurden die Embryonen aus den Eiern freipräpariert. Die Eier wurden an der stumpfen Seite aufgeklopft und mit einer Pinzette vorsichtig die Eierschale entfernt (Abb. 10 A).

Anschließend wurde die Chorionallantois-membran aufgeklappt und der Embryo aus dem Ei herausgeholt und in eine Petrischale mit Hank's BSS überführt (Abb. 10 B).



Die Embryonen wurden auf den Rücken gelegt, der Bauchraum wurde eröffnet und die inneren Organe wurden herauspräpariert, so dass die Wirbelsäule frei vorlag (Abb. 10C). Die DRGs wurden herauspräpariert und in eine kleine Petrischale überführt (Abb. 10D). Für die Verwendung der DRGs als Explantatkulturen wurden sie anschließend auf PDL- und Laminin-beschichteten DGs oder entsprechendem Implantatmaterial ausgesät und Neurobasal™-A Medium mit Zusätzen zugegeben.

2.2 Immuncytologie

Für die Färbungen der Zellkultur wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 % PFA/PBS pH 7,4 fixiert. Die aus Hühnchen präparierten Hinterwurzelganglien wurden mit 4 % PFA/10 % Saccharose pH 7,4 für 30 min bei Raumtemperatur fixiert (Kapfhammer, Xu et al. 2007). Nach dreimaligem Waschen mit PBS (je 1 min) wurden unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde mit 1 % BSA/PBS blockiert. Der Primärantikörper wurde anschließend in PBS verdünnt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS (je 1 min) der in PBS verdünnte Sekundärantikörper zugegeben. Die Inkubationszeit wurde nach einer Stunde beendet und nach erneutem Waschen

(3 mal, je 1 min) mit PBS wurden durch Zugabe von DAPI die Zellkerne angefärbt. Nach kurzem Entsalzen in Aqua_{bidest.} wurden die Proben mit Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, USA) eingebettet. Die Präparate wurden bei 4 °C gelagert.

2.3 Zytotoxizität (MTS –Assay ISO 10993-5)

Da die Implantate nach der Implantation einen Fremdkörper darstellten und eine heilungsfördernde Funktion von diesen ausgehen sollte, musste sichergestellt werden, dass sie eine möglichst hohe Biokompatibilität und damit einhergehende geringe Toxizität aufwiesen. Die nahe an der nativen Biologie des Gewebes orientierte Testmethode an allogenen Zellen in Kultur ermöglicht eine erste Einschätzung möglicher Toxizität. Hierzu wurden Mausfibroblasten L929 verwendet.

Es wurde mit dem *Cell Titer 96 AQueous One Solution Assay* (MTS, Promega, Mannheim) gearbeitet. Das zu untersuchende Material wurde 24 h in einem 15 mL Falconröhrchen in frischem Medium (RPMI mit Zusätzen), bei 37 °C und einem Verhältnis von 150 µl Medium/mg Trockengewicht inkubiert. Danach wurde mit dem Extrakt der MTS nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden Verdünnungen des Extraktes von 100 % – 1 % hergestellt und außerdem die Materialprobe direkt auf die Zellen gegeben. Der MTS beruht auf einer kolorimetrischen Methode zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen und ist sowohl für Proliferations- als auch Zytotoxizitätsmessungen geeignet (Riss and Moravec 2004). Kern des Assays stellt die Mischung aus MTS (3-(4,5-Dimethyl-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium) und PES (Phenazin Ethosulfat) dar.

Die gebrauchsfertige Lösung wurde direkt auf die Zellen gegeben, für 1-4 h inkubiert und mit der Gesamtlösung abschließend eine Absorptionmessung bei 490 nm durchgeführt. Gemessene Farbveränderungen entsprachen der Menge an gebildetem Formazanprodukt und waren linear proportional zur Anzahl enthaltener lebender Zellen in der Suspension. Als Negativkontrolle diente konzentriertes Dimethylsulfoxid (DMSO), ein weitverbreitetes Lösungsmittel mit zytotoxischer Wirkung bei Raumtemperatur. Der MTS unterliegt natürlichen Schwankungen von 30 %, wobei ein Material mit einer Zellviabilität von unter 70 %, als zytotoxisch eingestuft wurde.

2.4 Kontaktvermittelte Zytotoxizität

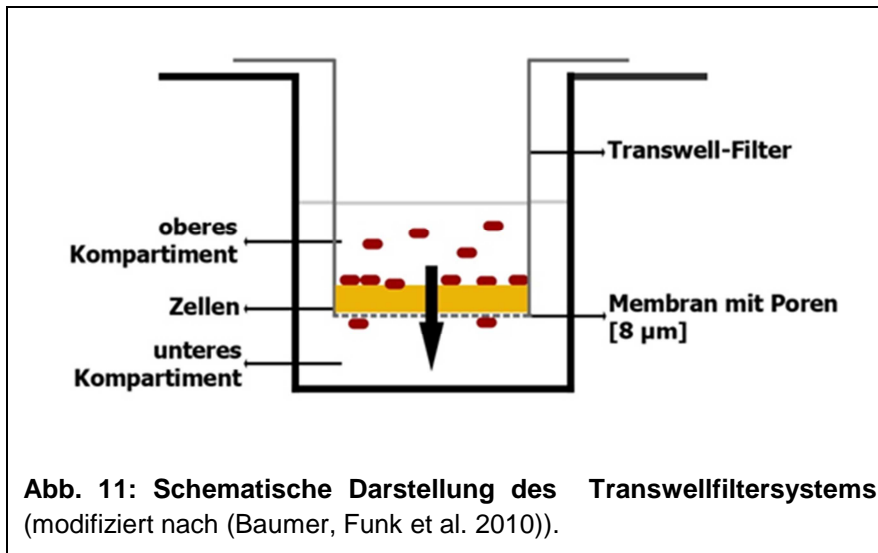
Implantate können auch eine kontaktvermittelte Zytotoxizität auslösen. Um auszuschließen, dass die später *in vivo* angewendeten Implantate zytotoxisch wirken, wurde zusätzlich zum MTS-Assay ein kontaktvermittelter Zytotoxizitätsassay angewendet. Hierfür wurden die Prüfmaterialien zurechtgeschnitten und in die Wells einer 6-Well Platte gelegt.

Anschließend wurden die Proben mit L929 Zellen besiedelt (20.000 Zellen/cm²) und für 24 h und 7 Tage weiterkultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde sowohl eine Zellvitalitätsfärbung wie auch Phasenkontrastmikroskopie durchgeführt.

2.5 Zellmigration durch mit Transglutaminase quervernetzte Gelatine

2.5.1 Migration durch Transwellfilter

Hierfür wurden L929 Fibroblasten auf mit Gelatinekleber beschichtete Transwell-Filter (Corning, 8 µm Porengröße; Abb. 11) ausgesät und ein bis vier Tage kultiviert. Um den Zellen einen Anreiz für das Wandern durch die Filter zu geben, wurden sie zuvor für 48 h ohne FCS kultiviert. Der Gelatinekleber wurde mit RPMI Medium mit 5 % FCS angesetzt und das Medium unterhalb der Filter enthielt 10 % FCS. Den hungrigen Zellen wurde somit ein Gradient von Nährstoffen geboten. Der Kleber war außerdem unterschiedlich stark vernetzt, um die Abhängigkeit der potenziellen Migration der Zellen von der Vernetzung des Gelatineklebers feststellen zu können. Hierbei wurden TGase-Konzentrationen von 1 – 30 U/ml eingesetzt. Nach der jeweiligen Kultivierungsdauer wurde zunächst das Gelatinegel mit einem Spatel vom Filter entfernt und der Filterboden anschließend mit einem Wattestäbchen ausgewischt. Anschließend wurden die Filter für 10 Minuten in 4 % PFA/PBS fixiert und die übrigen Zellen mit DAPI angefärbt. Zur Auswertung wurden die Filter am Mikroskop begutachtet und die Zellzahl pro Filter bestimmt.



2.5.2 Beurteilung der Migration mit Hilfe von Cryoschnitten

Dafür wurden L929 Fibroblasten auf mit Gelatinekleber beschichtete Deckgläschen gesetzt und für 1, 2, 3, 4 und 7 Tage kultiviert. Der Gelatinekleber wurde mit RPMI Medium mit 5 % FCS angesetzt und mit verschieden stark konzentrierter Transglutaminase quervernetzt (4, 7,5 und 30 U). Anschließend wurden die Zellen und der Gelatinekleber in 4 % PFA/PBS über Nacht bei 4 °C fixiert. Nach 24 h wurden die Proben in 30 % Succrose überführt, weitere 24 h später in Tissue Tek (alles bei 4 °C und jeweils über Nacht). Danach wurden am Cryotom Querschnitte erstellt. Diese wurden nach einer DAPI-Zellkernfärbung unter dem Mikroskop hinsichtlich der Struktur des Gelatineklebers und Einwanderung der Zellen begutachtet.

2.6 Transglutaminase Aktivitäts ELISA

Für die Bestimmung der Restaktivität von Transglutaminase in den vernetzten Gelatineimplantaten wurde ein ELISA von Sigma verwendet. Im Assay enthalten sind Cadaverin-beschichtete 96-Well Platten. Mit dem Assaymix wird Biotin zugegeben, dessen kovalente Bindung an freie Aminogruppen des Cadaverins durch Transglutaminase katalysiert wird. Nachgewiesen wird das entstandene Reaktionsprodukt mit Streptavidin-Peroxidase. Aus der Menge an gebundenem Biotin kann man dann auf die Menge an aktiver Transglutaminase schließen. Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Dafür wurden 50 µl Probensuspension je Well vorgelegt. Anschließend wurden je 50 µl Assaymix zu den Probelösungen hinzugefügt und dieser Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Platte dreimal mit Aqua bidest gewaschen (3-mal) und anschließend 100 µl Streptavidin-Peroxidase Lösung pro Well hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde dann 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte erneut dreimal mit PBS-Tween gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 200 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB-Lösung) je Well zugegeben und diese 2 Minuten inkubiert. Die Farbentwicklung wurde dann mit je 100 µl Stopplösung gestoppt. Zum Auslesen der Platte wurde der Dynex Opsys-MR Plate Reader verwendet.

2.7 Stabilität von Gelatineimplantaten

2.7.1 Stabilität in Puffer

Hierfür wurde jeweils ein Nervenimplantat in 50 ml PBS bei 37 °C schüttelnd (50 rpm) gelagert, um die Geschwindigkeit des zellfreien Abbaus makroskopisch zu bestimmen.

2.7.2 Stabilität in Gegenwart von Zellen

Hier wurden die Nervenleitschienen der Länge nach aufgeschnitten und die so entstandene Fläche mit L929-Fibroblasten besiedelt. Dabei sollte die Stabilität der Röhre in Anwesenheit von Zellen bestimmt werden. Für die Auswertung wurden Phasenkontrastaufnahmen gemacht.

2.7.3 Stabilität beim Vernähen

In diesem Versuchsteil sollte die potenzielle Vernähbarkeit von TGase vernetzten Röhren quantitativ bestimmt werden.

Dafür wurde der *N. ischiadicus* aus Ratten präpariert und unter einem Binokular mit der Gelatineröhre vernäht. Mit Hilfe eines 9-0 Ethilion Fadens wurde das Epineurium des Nerven mit zwei gegenüberliegenden Einzelknopfheften in der Gelatineröhre befestigt (Abb. 12).

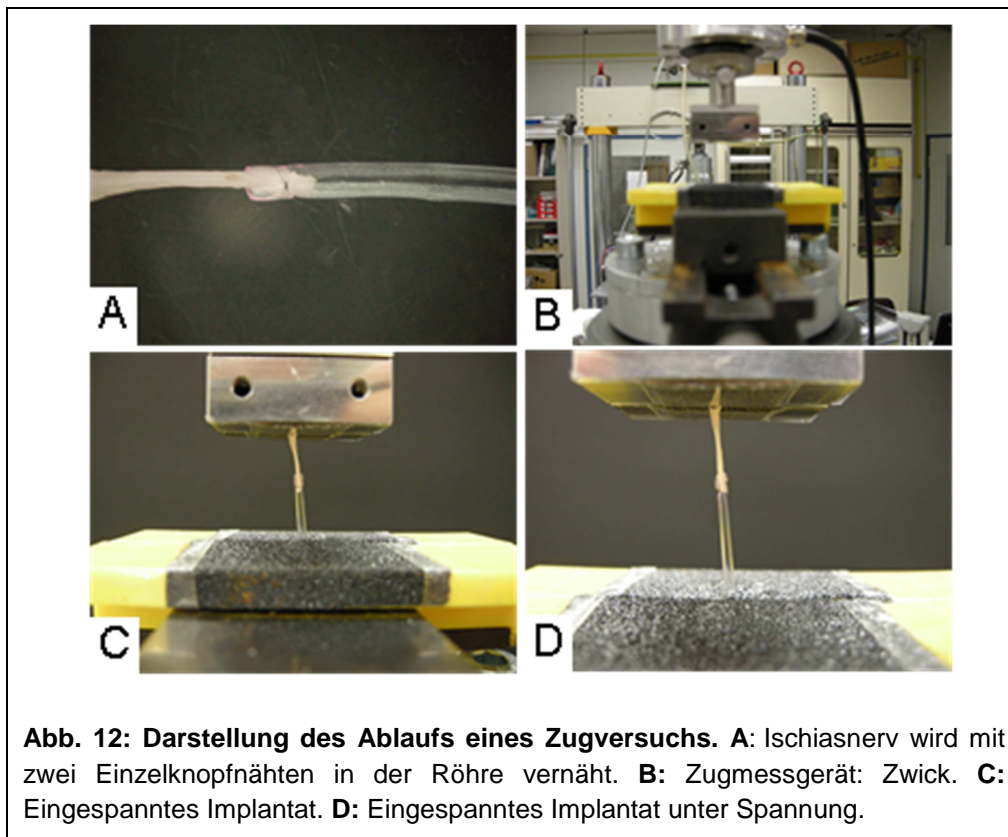


Abb. 12: Darstellung des Ablaufs eines Zugversuchs. A: Ischiasnerv wird mit zwei Einzelknopfnähten in der Röhre vernäht. **B:** Zugmessgerät: Zwick. **C:** Eingespanntes Implantat. **D:** Eingespanntes Implantat unter Spannung.

Die erfolgreich vernähten Implantate und intakten Ischiasnerven als Kontrollen wurden zur Messung der Zugkraft in eine Zugprüfmaschine (Zwick) eingespannt (Abb. 12). Hierfür wurden die Präparate mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min auseinandergezogen und die zunehmende Kraft als Kurvenverlauf bis zum Abriss verfolgt.

2.8 Semipermeabilität - Einschließen von Zellen in Implantate

Zur Bestimmung der Semipermeabilität der Nervenleitschienen wurden Schwann Zellen und DRGs im Inneren der Gelatineröhrchen verkapselt. Zu diesem Zweck wurden Plastikstreifen (folex imaging, X-70, 0,100 mm Dicke, 0,8 mm Breite) mittels Plasmacleaner, wie vorher beschrieben, hydrophilisiert, anschließend PDL/Laminin-beschichtet und mit Schwann Zellen (50.000 SZ/cm²) und/oder DRGs besiedelt. Nach zwei Stunden wurde der besiedelte Streifen in eine Gelatineröhre geschoben. Um die Röhre zu verschließen, wurden die Enden mit Hilfe von Ligaclips (Ethicon) verschlossen (Abb. 13 A). Ligaclips sind kleine metallische Klammern und werden normalerweise für den Verschluss von Gefäßen bei Operationen verwendet. Als Kontrolle diente eine Kunststoffröhre, die zum Einschließen der Zellen mit Dentalwachs verschlossen wurde (Abb. 13 B). Diese Konstrukte wurde anschließend 5 Tage in Zellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Um eine SMI31/DAPI-Färbung durchzuführen wurden die Streifen vor der Färbung aus den Röhren entnommen.

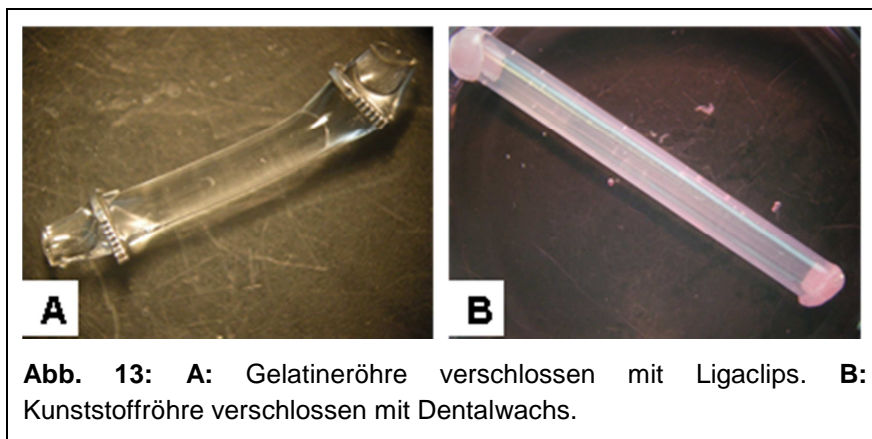


Abb. 13: A: Gelatineröhre verschlossen mit Ligaclips. B: Kunststoffröhre verschlossen mit Dentalwachs.

2.9 Chorioallantois-Membran (CAM) – Assay

2.9.1 Fenstern der Hühnereier

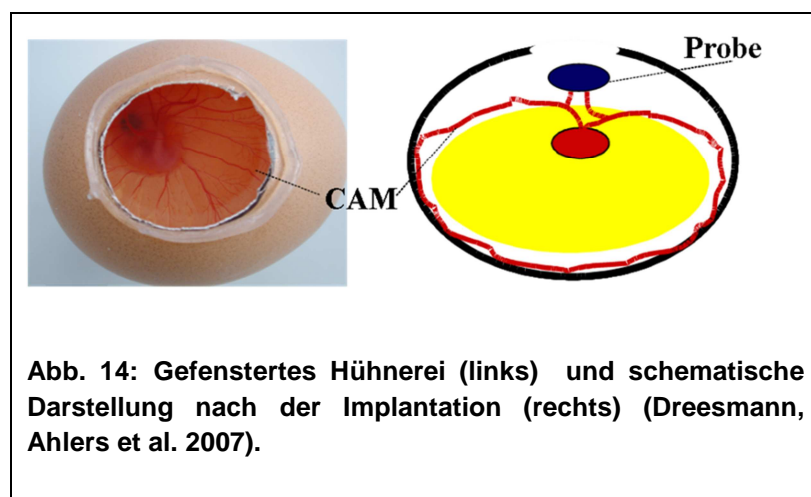
Am Embryonaltag 3 wurde mit einer spitzen Pipette ein Loch in das stumpfe Ende der Eier gestochen und mit einer 0,9 x 40 mm (20 G x 1 ½ ") Kanüle 2-3 ml Eiweiß abgesaugt, um eine künstliche Luftblase zu schaffen. Das Loch wurde anschließend wieder mit Silikonpaste verschlossen. Mit einer Schere wurde die Eischale eröffnet. Dieses Fenster wurde mithilfe von Silikonpaste, welche um den Rand des Loches aufgetragen wurde, und dem Deckel einer sterilen Petrischale (ø 3,5 cm)

geschlossen. Der Embryo wurde für weitere 5 Tage bis zur Implantation von Testmaterial an E8 weiter inkubiert, wobei die gefensterter Eier nicht mehr gewendet werden dürften. Modifiziert nach (Ribatti, Nico et al. 2006).

2.9.2 Implantation von Testmaterial

Für die Implantation wurden je 200 µl Gelatinegel polymerisiert und auf die Chorioallantois Membran überführt. Es folgte eine weitere Bebrütung für 5 Tage bis E13. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Als Positivkontrolle diente ein kommerziell erhältlicher Kollagenschwamm (Collatamp, Innocoll, Athlone, Irland). Eine Scheibe des Schwammes (Durchmesser 13 mm, Höhe 1,5 mm) wurde halbiert und je eine Hälfte des Schwammes wurde kurz in PBS getränkt und anschließend auf die CAM überführt (n=2).



Vor der Explantation der CAM mit dem Implantat wurde diese fotografiert. Zum Fixieren des Gewebes wurde die CAM anschließend mit 4 % PFA/PBS überschichtet und nach 6-stündiger Inkubation bei RT konnte die CAM aus dem Ei geschnitten werden. Die explantierte CAM wurde in 4 % PFA/PBS überführt, erneut fotografiert und ÜN bei 4 °C inkubiert.

2.9.3 Makroskopische Betrachtung der Blutgefäße

Mithilfe der Fotos nach der Explantation wurden Blutgefäße der CAM um die Implantate betrachtet und qualitativ ausgewertet.

2.10 Implantationen *in vivo*

2.10.1 Subkutan Implantationen in der Maus

Vor der Implantation wurden die Tiere individuell gewogen und dem Gewicht entsprechend betäubt (1 mL 10 % Ketamin + 0.5 mL Xylazin, ad 10 mL Ringer-Lsg., davon 0.1 mL s.c. pro 10 g Gewicht). Ausreichende Anästhesie wurde durch den Corneal- und den Zehenreflex geprüft. Dann wurde das Fell auf dem Rücken der Tiere mit Ethanol angefeuchtet, rasiert und ein kleiner Hautschnitt (ca. 1 cm) im Nacken durchgeführt. Dabei wurde sehr vorsichtig vorgegangen, um mechanische Irritationen und Traumata zu vermeiden, welche durch Wundheilungsreaktionen eine Fibrosierung des OP-Bereichs begünstigen könnten. Das Implantationsgebiet wurde mit einer antiseptischen Lösung gereinigt. Nach der operativen Präparation der subkutanen Taschen wurden die Implantate lateral auf dem Rücken der Tiere implantiert. Die Proben wurden ungefähr 1 cm von der Mitte aus platziert. Die Größe der elastischen Prüfkörper war ca. 5 x 5 mm (Länge, Breite) bei ca. 3 mm Höhe. Anschließend wurde die Wunde mit einem monofilen Prolene-Faden 5/0 vernäht. Die Tiere wurden nach der Operation einzeln auf Wärmeplatten bei 37 °C gehalten und bedeckt, bis die Narkose abgeklungen war. Danach wurden sie in Gruppen (3-7 pro Käfig) gehalten. Nach 7 d, 14 d, 21 d und 56 d (1, 2, 3 und 8 Wochen) wurden die Tiere getötet und die Implantate zusammen mit dem umliegenden Gewebe entnommen.

Hierfür wurde das Gewebe in 4 % PFA/PBS immersionsfixiert, über eine aufsteigende Sucrosereihe entwässert und anschließend in TissueTek zur Herstellung von Cryoschnitten eingebettet. Die Cryoschnitte wurden dann zum einen mittels HE für eine Übersicht, zum anderen mit spezifischen Antikörpern angefärbt.

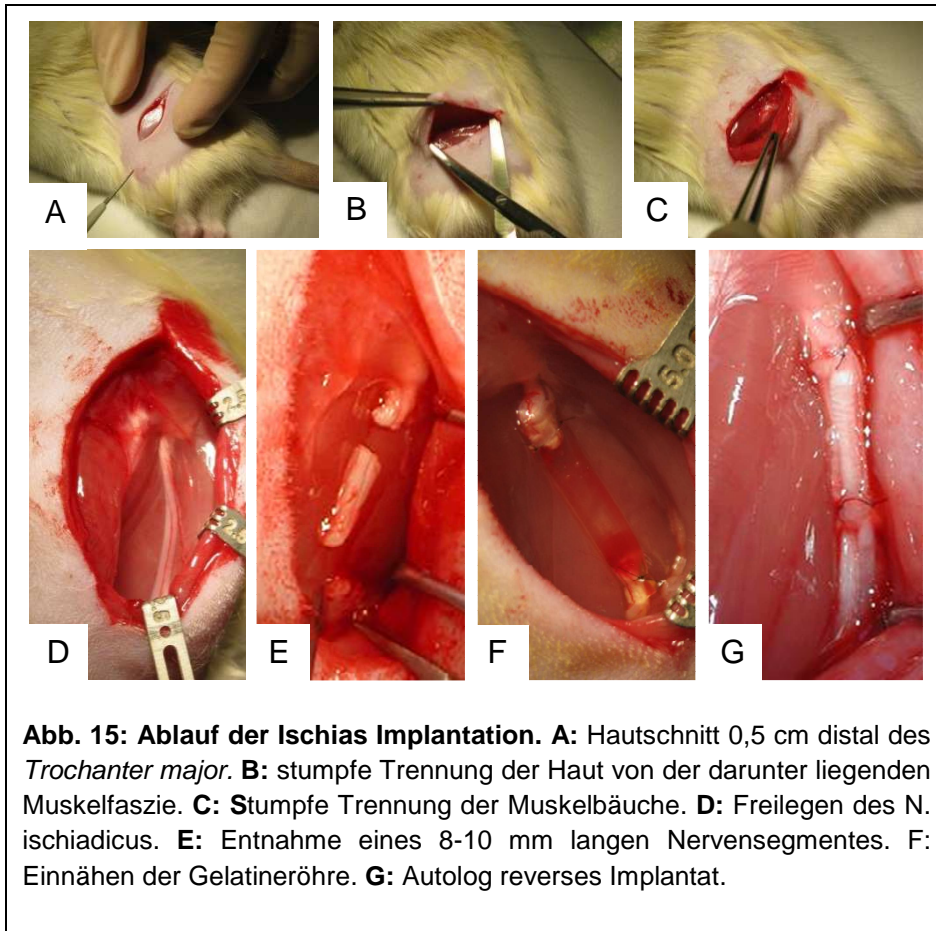
Vor Beginn der operativen Phase wurden die Tiere an den menschlichen Umgang gewöhnt und auf die Durchführung von Verhaltenstest vorbereitet. Nach dem Handling wurden die Tiere gezielt auf den Ablauf des funktionalen Verhaltenstests trainiert.

2.10.2 Ischiasimplantationen in der Ratte

Die 66 Versuchstiere (Lewis Ratten, weiblich, 180 bis 200 g) wurden dann vor Beginn der OPs in neun Gruppen á 6 Tiere eingeteilt (Schein OP jeweils nur 4 Tiere), autolog revers, Gelatineröhre mit und ohne Schwann Zellen). Die Zeitpunkte zur Explantation wurden auf 3, 6 und 9 Monate festgelegt. Der Eingriff erfolgte jeweils am *N. ischiadicus* der linken Seite.

Alle Tiere wurden vor dem Eingriff individuell gewogen und dem Gewicht entsprechend mit einem Gemisch aus Ketamin/Xylazin (100 mg/kg Körpermasse (KM) Ketamin, 3 mg/kg KM Xylazin) betäubt. Die Operation wurde mit Hilfe eines Operationsmikroskops (OPMI 6C, Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die Operationsmethode ist durch zahlreiche Publikationen bereits etabliert (Gamez, Goto et al. 2004; Ijkema-Paassen, Jansen et al. 2004; Rochkind, Astachov et al. 2004; Phillips, Bunting et al. 2005; Haastert, Lipokatic et al. 2006). Während der gesamten Operation lagen die Tiere auf einem beheizten Operationsplatz. In regelmäßigen Abständen wurde die Rektaltemperatur der Tiere gemessen. Zur Implantation der Gelatineröhre an den *N. ischiadicus* der linken Hinterextremität wurde das Tier in Seitenlage fixiert und der linke Oberschenkel leicht hochgelagert. Der Zugang zum *N. ischiadicus* erfolgte am linken Oberschenkel der Ratte von lateral. Nach sorgfältiger Reinigung, Nassrasur, Entfettung und Desinfektion wurde anhand der natürlichen Landmarken der Hautschnitt durchgeführt. Der Schnitt wurde 0,5 cm distal des *Trochanter major* ca. 0,5 cm parallel zum *Femur* nach kaudal versetzt bis kurz vor das Knie geführt. Nach weiträumiger, stumpfer Trennung der Haut von der darunter liegenden Muskelfaszie wurden die Muskelbäuche des *M. biceps femoris*, *M. gluteus maximus* und *M. tensor fasciae latae* aufgesucht und stumpf voneinander getrennt. Der nun sichtbar gewordene *Vastus lateralis* des *M. quadriceps femoris* wurde zur Seite geschoben, wodurch der eindeutig zu identifizierende *N. ischiadicus* freigelegt war. Das Operationsfeld wurde mittels Wundspreizer offen gehalten. Spätestens zu diesem Zeitpunkt wurde ausschließlich mit dem Operationsmikroskop und mikrochirurgischem Instrumentarium gearbeitet. Der *N. ischiadicus* wurde schonend von umgebendem Binde- und Fettgewebe freipräpariert.

Nach distal teilt sich dieser in seine Hauptäste *N. tibialis* und *N. peroneus communis* sowie den dünneren *N. suralis* auf. Abgehende Hautäste wurden durchtrennt. Der *N. ischiadicus* wurde möglichst weit distal durchtrennt, so dass sich der proximale Stumpf nicht in die Muskulatur zurückzog. Anschließend wurde ein 8-10 mm langes Stück proximal der Bifurkation entnommen (außer Schein OP), um eine regenerative Verbindung zwischen proximalen und distalen Nervenanteilen zu verhindern.



Nachfolgend sind die Operationsvorgänge der verschiedenen OPs beschrieben:

Schein OP: Freipräparieren des *N. ischiadicus* über eine Strecke von ca. 2 cm.

Implantat autolog revers: Freilegen des *N. ischiadicus* über eine Strecke von ca. 2 cm. Durchtrennen des *N. ischiadicus* und Entnahme eines 8 bis 10 mm langen Segments. Reverse Koaption des Segments an proximales – und distales Ende (4 Nähte über Epineurium – 2 distal; 2 proximal).

Implantat ohne Schwann Zellen: Freilegen des *N. ischiadicus* über eine Strecke von ca. 2 cm. Durchtrennen des *N. ischiadicus* und Entnahme eines 8 bis 10 mm langen

Segments. Einnähen der Hohlröhre 4 Nähte über Epineurium (2 distal 2 proximal); Defektstrecke 8 bis 10 mm. Zugkontrolle auf Festigkeit des Implantats.

Die Hohlröhren wurden vor der Operation jeweils für 5 min in sterilem 0,9 % NaCl quellen gelassen.

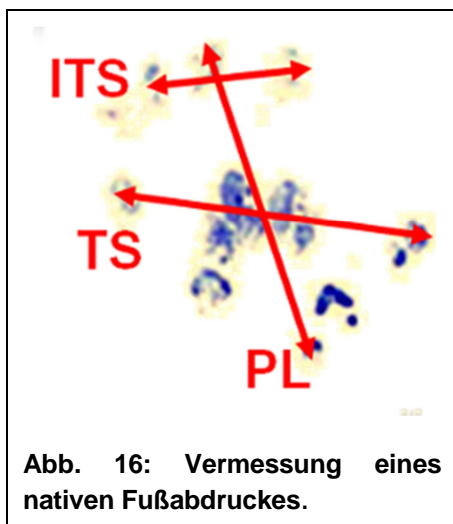
Implantat mit Schwann Zellen: Freilegen des *N. ischiadicus* über eine Strecke von ca. 2 cm. Durchtrennen des *N. ischiadicus* und Entnahme eines 8 bis 10 mm langen Segments. Einnähen der befüllten Hohlröhre (befüllt mit einem Gemisch aus Matrigel, Kulturmedium und Rattenschwanzzellen (rSZ Passage 9; $1,6 \times 10^6$ rSZ(p9)/mL Matrigel)). Die Defektstrecke betrug hierbei 8 bis 10 mm. Zugkontrolle auf Festigkeit des Implantats.

Die Hohlröhren wurden vor der Operation jeweils für 5 min in sterilem 0,9 % NaCl quellen gelassen.

Für den Abschluss der OP wurden der *M. quadriceps femoris* und der *M. biceps femoris* mittels zweier Einzelknopfhette zusammengenäht, und die Hautwunde mit einer Wundnaht verschlossen. Während der gesamten Versuchsdauer kam es bei keinem der Tiere zu Automutilation oder anderen schmerzbezüglichen Verhaltensweisen.

2.10.3_SFI

Um die funktionale Regeneration des *N. ischiadicus* von operierten Ratten erfassen



und beobachten zu können, wurde die ursprünglich von De Medinaceli (Medinaceli, Freed et al. 1982) beschriebene Bewertungsmethode des Sciatic function index (SFI) eingesetzt. Der SFI stellt die Projektion der Nervenfunktionalität auf einer Skala von „0“ bis „-100“ dar. Per Definition hat ein gesundes Tier mit intaktem *N. ischiadicus* einen SFI von „0“ während ein Tier mit Totalausfall des Nervs bei „-100“ liegt. Dies ermöglicht eine Beurteilung des komplexen Laufverhaltens aufgrund von Zahlenwerten.

Diese Testmethode stellt heute einen der meistverwendeten funktionalen Tests bei Verletzung peripherer Nerven dar (Bain, Mackinnon et al. 1989; Meek, Dijkstra et al. 1999; Dijkstra, Meek et al. 2000; Koka and Hadlock 2001; Meek, van der Werff et al.

2003; Varejao, Melo-Pinto et al. 2004; Kim, Lee et al. 2007). Für diese Analyse wurden die Tiere der 6 und 9 Monats-Zeiträume verwendet. Zur Messung wurden die Hinterläufe der Tiere mit Stempelkissenfarbe (Pelikan, Hannover), eingefärbt und über ein Papier laufen gelassen. Im Anschluss daran wurden diese Laufabdrücke mit einem Geodreieck vermessen und die Werte in vorbereitete Exceltabellen eingetragen. Nach Eingabe der Werte wurden automatisch die Differenzen und SFI-Werte eines jeden Individuums, nach der in Formel 1 dargestellten Formel, berechnet. Die Analyse und grafische Aufbereitung dieser Daten erfolgte ebenfalls in Excel.

Zur Quantifizierung und Auswertung der Rattenfußabdrücke wurden drei Messgrößen verwendet: die Länge des Fußabdruckes (PL – paw length), der Abstand zwischen dem ersten und fünften Zeh (TS - toe spread) und der Zwischenraum zwischen zweitem und viertem Zeh (ITS – inter toe spread; Abb. 16).

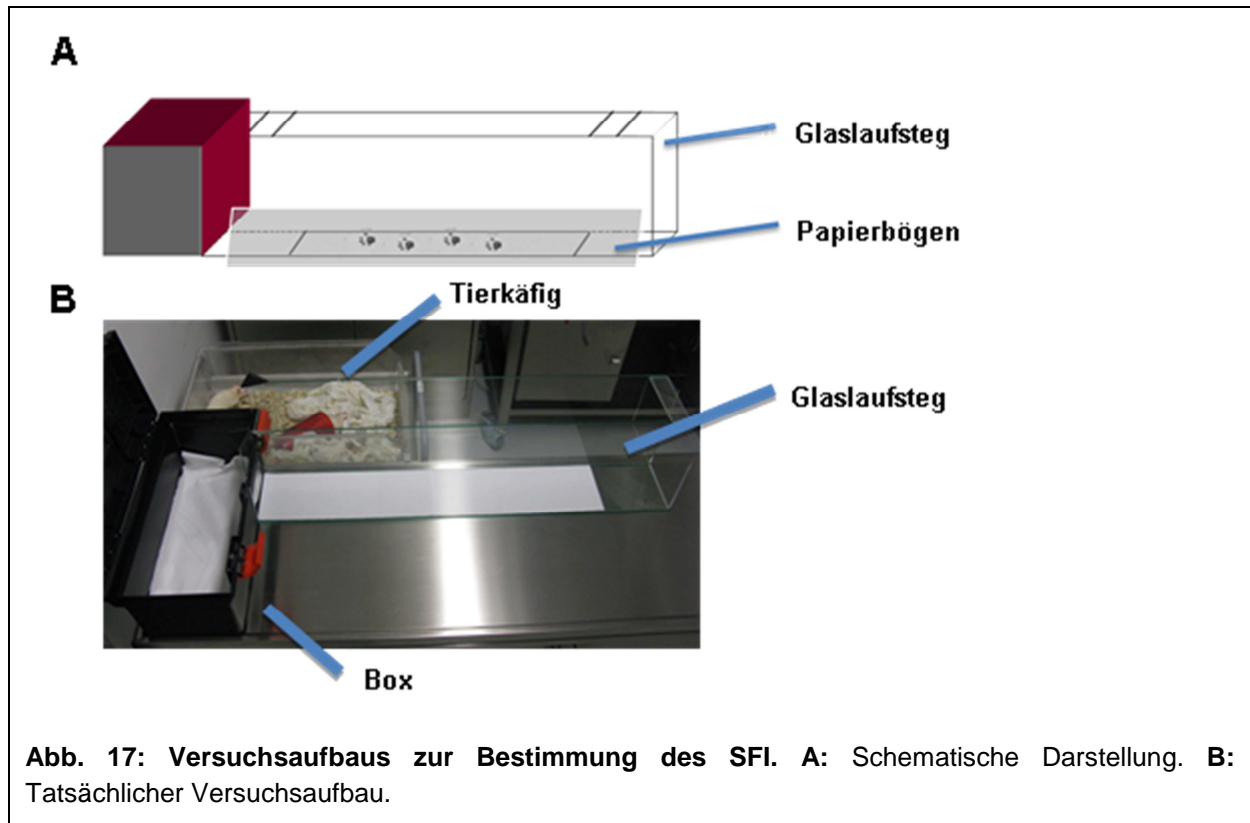
Es werden die Differenzen dieser Parameter beider Hinterläufe eines Individuums berechnet und in eine empirisch ermittelte Formel zur Berechnung des SFI (Bain, Mackinnon et al. 1989) eingegeben.

$$\text{SFI} = -38,3(\text{EPL}-\text{NPL}/\text{NPL})+109,5(\text{ETS}-\text{NTS}/\text{NTS})+13,3(\text{EITS}-\text{NITS}/\text{NITS})-8,8$$

Formel 1: Berechnung des SFI. Die drei Messgrößen PL – Paw length (Abdrucklänge); TS – Toe spread (äußerer Zehabstand); IST – Inter toe spread (innerer Zehabstand) des natürlichen (N) und experimentellen Abdrucks (E) werden auf den unbehandelten Hinterlauf normiert, mit empirisch ermittelten Faktoren multipliziert und zum SFI verrechnet.

Versuchsaufbau

Nach der Beschreibung von Bain et al (Bain, Mackinnon et al. 1989) wurde eine einfache Messapparatur, bestehend aus einem u-förmigen Glaslaufsteg (30x15x100 cm) mit einer dunklen Kiste (Werkzeugkasten aus PVC 50x26x28 cm, Baumarkt) an einem Ende, einem Stempelkissen und halbseitigen, weißen DinA3 Papierstreifen, aufgebaut. Am Ende des Laufsteges wurde eine schwarze Kiste so zugeschnitten und platziert, dass die später am anderen Ende des Steges hineingesetzten Tiere diese als Fluchort wählen und direkt in diesen hineingehen konnten (Abb. 17). Der Heimatkäfig wurde neben dieser Kiste so platziert, dass die Tiere nach dem Durchlaufen direkt in den Käfig zurück klettern konnten.



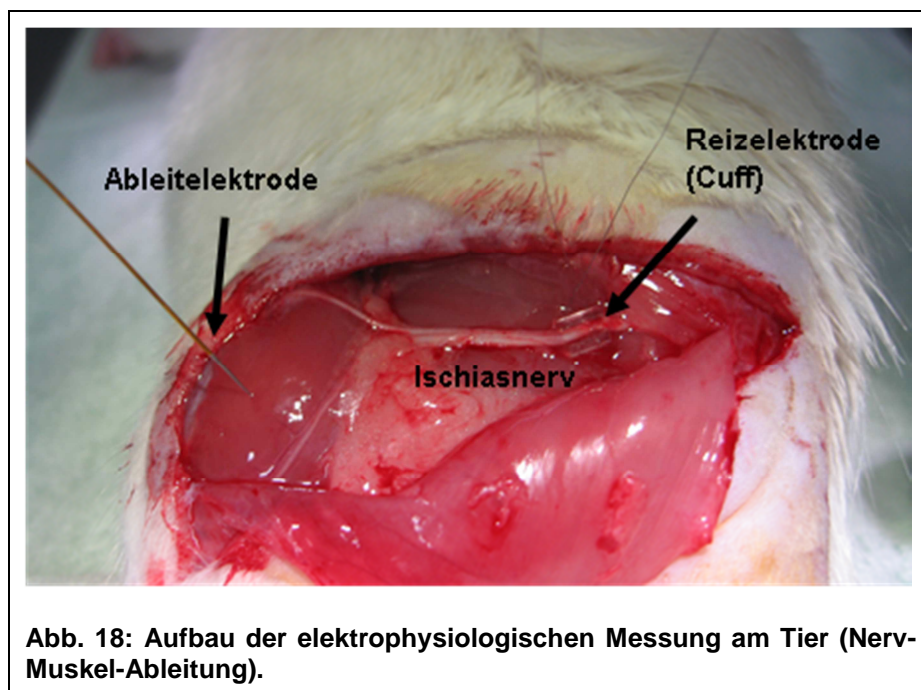
Vor jeder Messung wurden die Tiere mit ihren Hinterpfoten auf ein Stempelkissen gedrückt und anschließend über den mit Papier ausgelegten Laufsteg laufen gelassen. Zu jedem Zeitpunkt wurden von jedem Tier fünf unabhängige Läufe durchgeführt. Da stets die Differenzen der Fußabdrücke beider Hinterläufe eines Tieres verglichen wurden, stellte jedes Tier seine eigene Kontrolle dar und es wurden individuelle Gangunterschiede berücksichtigt und statistisch ausgeglichen.

Für den Versuch wurden die Tiere jeweils zwei Wochen vor dem Eingriff an den Versuchsaufbau gewöhnt. Hierfür liefen die Tiere ohne Tinte an ihren Füßen den Versuchsaufbau mehrmals ab. Als Belohnung dienten der Heimatkäfig und aus Joghurt und Zucker gefertigte Drops (Vitakraft, Bremen). Zur Bestimmung des SFI lief jedes Tier 5-mal pro Laufzeitpunkt den Parcours ab und es wurden pro Lauf jeweils 5 Fußabdrücke (rechts und links) vermessen.

Bis zur Explantation der Implantate wurde der SFI von jedem Tier alle zwei Wochen bestimmt, die Werte über eine Exceltabelle gemittelt und die Kurve anschließend graphisch dargestellt.

2.10.4 Elektrophysiologische Messungen

Zur weiteren Analyse der Nervenregeneration wurde vor der Explantation des Nervengewebes eine elektrophysiologische Ableitung durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere erneut in Narkose gelegt und der Ischiasnerv freigelegt. Zur Analyse der Reizweiterleitung wurden eine Reizelektrode proximal am Nerv und eine Ableitelektrode am Muskel (*M. gastrocnemius*) im standardisierten Abstand von 3 cm angebracht (siehe Abb. 18). Die Tiere wurden über einen um das rechte Hinterbein gewickelten chlorierten Silberdraht geerdet. Diese wurde regelmäßig mit Kochsalzlösung beträufelt, um den Kontakt zu optimieren. Zur Vermeidung weiterer Störsignale wurde die ganze Messung unter einem Faraday'schen Käfig durchgeführt. Der Käfig umschloss das narkotisierte Tier und die Elektroden, die von Mikromanipulatoren (Npi Electronics, Tamm) gehalten wurden. Zur elektrophysiologischen Stimulation wurden bipolare „cuff“ – Elektroden verwendet (Abb. 18), die am NMI gebaut wurden. Die Muskelaktivität wurde mit einer monopolen Ableitelektrode, die mit einem aufnahmefähigen Verstärker (Ext-10C) verbunden war, registriert.



Zunächst wurde bei jedem Tier die Reizschwelle bestimmt. Hierbei wurden mit dem Programm Cellworks Reize mit ansteigender Amplitude (50 – 3000 mV) verabreicht. Als Reizschwelle galt der Reiz, bei dem ein CAMP (compound muscle action potential) ausgelöst werden konnte. Anschließend wurden ausgehend von dieser

Reizschwelle jeweils 20 Reize (1 Reiz/Sekunde) gegeben und die Antwortsignale des Muskels aufgezeichnet. Mit dem Programm Cellworks Reader 6.1.1 wurden anschließend alle aufgezeichneten Signale bezüglich ihrer Amplitude und der Latenz ausgewertet. Zur Auswertung der Amplitude wurde manuell die erste Signalkurve jedes Reizes ausgewertet und über Excel eine Grafik erstellt (gemittelt über alle Tiere einer Gruppe pro Zeitpunkt). Eine verringerte Amplitude gibt Auskunft über eine verringerte Anzahl an Muskelfasern, Nervenfasern und Axonen (Bischoff 2008; Werdin, Grussinger et al. 2009). Für die Latenz wurde die Zeit abgelesen, die der Reiz vom ersten Peak des Reizartefaktes bis zur ersten Signalkurve braucht. Diese Werte wurden ebenfalls mit Hilfe von Excel in einer Grafik dargestellt und verglichen.

2.10.5 Explantation und histologische Aufarbeitung der Gewebe

Nach der Erhebung der elektrophysiologischen Daten wurden die Tiere mit Hilfe von CO₂ euthanasiert und die Implantate bzw. Nerven zur weiteren histologischen Untersuchung entnommen. Hierfür wurden die Implantate in 4 % PFA/PBS Immersionsfixiert, über eine aufsteigende Sucrosereihe entwässert und anschließend in Tissue Tek zur Herstellung von Cryoschnitten eingebettet. Die Cryoschnitte wurden dann zum einen HE, für eine Übersicht, zum anderen mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Hierbei wurde vor allem SMI31 zur Darstellung von phosphoryliertem Neurofilament, S100 für Schwann Zellen und ED1 für Makrophagen verwendet, um die Regeneration und eine eventuelle inflammatorische Reaktion darstellen zu können.

Außerdem wurden jeweils von der rechten (gesunden) und der linken (verletzten) Körperseite der *M. gastrocnemius* entnommen und das Gewicht bestimmt.

2.10.6 Induktion von Adhäsionen und Testung von Adhäsionsbarrieren in vivo

Die Operationsmethode ist eine weiterentwickelte Methode, basierend auf einer Methode, die schon vielfach publiziert wurde (Burns, Skinner et al. 1996; Ersoy, Ozturk et al. 2008). Alle Tiere wurden vor dem Eingriff individuell gewogen und dem Gewicht entsprechend mit einem Gemisch aus Ketamin/Xylazin (100 mg/kg Körpermasse (KM) Ketamin, 3 mg/kg KM Xylazin) betäubt. Während der gesamten Operation lagen die Tiere auf einem beheizten Operationsplatz. In regelmäßigen

Abständen wurde die Rektaltemperatur der Tiere gemessen. Vor Beginn der eigentlichen Operation erhielten die Tiere zusätzlich ein Schmerzmittel (Rimadyl 5 mg/kg Körpergewicht) subkutan gespritzt, dessen Wirkung über die nächsten 24 h anhielt. Dieses wurde zusätzlich nach 24 h und 48 h subkutan nachgespritzt, um die Tiere schmerzfrei zu halten.

Anschließend wurde das narkotisierte Tier auf den Rücken gelegt und am Bauch eine ca. 4 cm breite Fläche vom Sternum bis zum Vortex pilorium (convergens umbilicalis) rasiert. Weiter wurde die rasierte Fläche mit Braunol desinfiziert. Durch einen ca. 4 cm langen Hautschnitt entlang der weißlich durchscheinenden Linea alba wurde das Operationsfeld eröffnet. Anschließend folgte der Muskelschnitt ebenfalls entlang der Linea alba. Zum Setzen der Verletzungen wurde zunächst mit dem Skalpell eine 10x10 mm große Fläche an der rechten abdominalen Wand die Serosa abgeschabt, bis es zu petechialen Blutungen kam. Zur Verstärkung der Verletzung wurden weiter gitterförmige Einschnitte auf der Verletzungsfläche gesetzt (10 x 10 im Abstand von je 1 mm). Danach wurde die verletzte Stelle für 30 s mit einer elektrischen Zahnbürste (Braun, Kronberg/Taunus) behandelt. In einem weiteren Schritt wurde das Cecum lokalisiert und aus dem Bauchraum exponiert. Auch hier wurde eine 10x10 mm große Verletzungsfläche gesetzt. Diese wurde durch Abschaben der Fläche mit einer Kompresse auf der Oberfläche des blinden Darmendes gesetzt. Es folgte eine weitere Verstärkung durch das Aufsetzen der elektrischen Zahnbürste für 30 s.

Zur Generierung einer Adhäsion wurden anschließend die beiden Verletzungsflächen mit Hilfe von drei Einzelknopfnähten (Vicryl violett 5/0) adaptiert. Bei der Testung einer Adhäsionsbarriere wurde diese zwischen den beiden verletzten Geweben angebracht. Die verwendeten Gelatinemembranen wurden zusätzlich mit zwei der drei Adaptionenähte vernäht. Anschließend wurde die Wunde in zwei Lagen wieder verschlossen:

Zuerst wurde die Linea Alba der Muskelschicht adaptiert. Hierfür wurden die Muskeln mit einer stumpfen Pinzette zusammengezogen und mit 5 bis 6 Einzelknopfnähten vernäht (Vicryl rapide, 5/0).

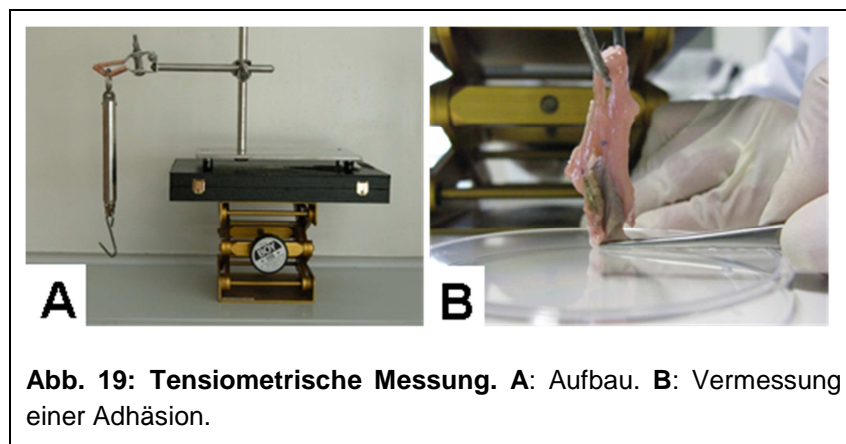
Als nächstes wurde die Hautschicht adaptiert. Hierzu wurden die Hautlappen zusammengezogen und die Wunde mit 5-6 Einzelknopfnähten fest vernäht (Prolene, 5/0).

Explantation der Gewebe und makroskopische Analyse

Nach Ablauf der Implantationszeit wurden die Tiere mit CO₂ euthanasiert und für die Explantation der Gewebe das Tier ventral mit Hilfe eines U-Schnittes eröffnet. Die Explantation folgte einem Explantationsprotokoll, in dem der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere bis hin zur Beurteilung der Adhäsion (Formblatt siehe Anhang) aufgeführt wurde. Alle aufgeführten Details wurden außerdem mit einer Fotokamera dokumentarisch festgehalten.

Tensiometrie (quantitativ)

Für die Auswertung der Adhäsionen wurde eine Apparatur zur Messung von Zugresistenzen (Lehmann 2009) für die Vermessung von Geweben weiterentwickelt. Dazu wurde das Gewebe mit der Muskelschicht an einem an einer Federwaage (Haerte und Wertstofftechnik GmbH, Weinstadt) befestigten Haken eingehängt. Die Federwaage war an einem Laborständer befestigt, der auf einem manuell höhenverstellbaren Laborboy stand (Abb. 19). Anschließend wurde das an der Muskelschicht verwachsene Darmgewebe mit einer Pinzette auf einer Petrischale fixiert.



Die gesamte Apparatur wurde schließlich langsam mittels des Laborboys angehoben. Beim Auseinanderreißen der Gewebe konnte die Zugresistenz dann auf der Federwaage in Gramm abgelesen werden. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer Videokamera (Canon, Japan) oder einer Fotokamera (Canon, Japan) aufgezeichnet.

Fixierung der Gewebe und histologische Auswertung

Zur Fixierung der Adhäsionen wurde das Gewebe für 20-30 s in flüssigen Stickstoff getaucht und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Zur histologischen Auswertung wurde von den Geweben 10 µm Cryoschnitte hergestellt und diese anschließend mit Hilfe einer HE und einer Masson Trichrom Färbung analysiert.

2.11 Histologie

Hämatoxylin – Eosin Färbung

Hämatoxylin wird als Pflanzenextrakt aus dem Blauholz (*Haematoxylum campechianum*) gewonnen und kann in den Farbstoff Hämalaun überführt werden, welcher bei der HE-Färbung verwendet wird. Hämalaun ist positiv geladen und bindet an negativ geladene DNA. Die blaue Färbung der Zellkerne entsteht allerdings erst beim Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Eosin wird häufig als Gegenfärbung benutzt und führt zu einer Rosafärbung von Zytoplasma, Erythrozyten, Kollagen und Keratin.

10 µm dicke Gefrierschnitte wurden kurz in Aqua dest. gewaschen und anschließend für 8 min in Hämatoxylin inkubiert, gefolgt von 10-minütigem Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser und mehrmaligem Waschen in Aqua dest. Die Schnitte wurden anschließend für 4 min in 0,2 %-iger Eosin-Lösung gefärbt und erneut gewaschen. Es folgte die Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 min 70 % Ethanol, 1 min 96 % Ethanol, 2 x 1 min 100 % Ethanol, 2 min in 100 % Ethanol:Roti-Histol (1:1) und 2 x 2 min in Roti-Histol). Die Schnitte wurden mithilfe von Neo-Mount Medium eingedeckelt und über Nacht bei RT getrocknet. Die endgültige Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Masson – Trichrom Färbung

Die Masson-Trichrom-Färbung beruht auf einer Färbung von Zellkernen durch Hämatoxylin nach Weigert (schwarz), einer Färbung von Zytoplasma und Muskel durch Biebrich-Scharlachrot Säurefuchsin (rot) und einer Kollagenfärbung durch Anilinblau (blau).

Material und Methoden

10 µm dicke Gefrierschnitte wurden zunächst 5 min in PBS und anschließend kurz in Aqua dest. gewaschen. Um eine bessere Aufnahme der Farbstoffe zu erreichen, wurden die Schnitte über Nacht in Bouin's Fixativ fixiert und bis zur Entfernung des gelben Farbstoffs unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander in Aqua dest. gewaschen, 5 min in Hämatoxylin (nach Weigert) gefärbt, 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut, in Aqua dest. gewaschen und 5 min in Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gewaschen, 5-10 min in einem Gemisch aus 2,5 % Phosphormolybdänsäure und 2,5 % Phosphorwolframsäure inkubiert und für 5 min in Anilinblau-Lösung gefärbt. Bevor die Schnitte für 3 min in 1 % Essigsäure differenziert wurden, was dem Herauslösen von unspezifisch gebundenem Anilinblau dient, wurden die Schnitte erneut in Aqua dest. gewaschen. Die Alkoholreihe und das Eindeckeln wurden entsprechend der Angaben bei der HE-Färbung durchgeführt.

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)

Mithilfe von DAPI können Zellkerne fixierter bzw. toter Zellen dargestellt werden. DAPI gelangt durch poröse Zellmembranen in die Zelle und anschließend in den Zellkern, wo der Farbstoff einen stark fluoreszierenden Komplex mit (Adenin-Thymin-) AT-reichen Sequenzen der DNA eingeht. Fixierte Zellen bzw. fixierte Gewebe wurden zur besseren Aufnahme des Farbstoffs für 10 min mit 0,2 % Triton X-100/PBS permeabilisiert, anschließend für eine Minute mit 5 µg/ml DAPI inkubiert und mit PBS gewaschen. Für die Lebend-Tot Färbung wurden die Zellen nicht permeabilisiert, sondern ausschließlich für 5 min mit 5 µg/ml DAPI inkubiert, einmal mit Medium gewaschen und anschließend wieder in Medium aufgenommen. Die Detektion der gefärbten Zellkerne erfolgte bei 358 nm am Epifluoreszenzmikroskop.

Propidiumiodid

Propidiumiodid ist ein roter, membranundurchlässiger fluoreszenter Farbstoff, welcher in die Nukleinsäure interkaliert. Mit diesem Farbstoff können nur tote Zellen, deren Membran nicht mehr intakt ist, angefärbt werden.

Für die Lebend-Tot Färbung wurden die Zellen nach der Inkubation mit Calcein für 5 min mit 3,33 µg/ml Propidiumiodid in Zellkulturkulturmedium behandelt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen und erneut in Medium aufgenommen. Die Detektion erfolgte unmittelbar bei einer Wellenlänge von 536 nm im Epifluoreszenzmikroskop.

Calcein AM

Calcein-AM wurde verwendet, um lebende Zellen darzustellen. Die AM-Gruppe maskiert denjenigen Teil des Moleküls, welcher für die Chelatisierung von Calcium zuständig ist. So kann Calcein-AM durch die Membran in das Zytoplasma lebender Zellen transportiert werden. Dort wird die AM-Gruppe durch Esterasen, welche nur in lebenden Zellen in ausreichenden Mengen vorhanden sind, enzymatisch abgespalten. Nach der Abspaltung kann Calcein an Calcium-Ionen der Zelle binden, was zu einer starken grünen Fluoreszenz führt, welche bei 494 nm im Epifluoreszenzmikroskop detektierbar wird. Für die Lebend-Tot Färbung wurden 1 mg/ml Calcein 1:1000 in dem entsprechenden Zellkulturmedium verdünnt und die Zellen damit für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit DAPI gefärbt und direkt im Anschluss mikroskopiert.

Phalloidin Oregon Green 488

Phalloidin ist ein Toxin und wird aus dem Grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) gewonnen. Molekularbiologisch wird seine Affinität zu F-Aktin genutzt, um das Zytoskelett von Zellen, durch Kopplung an den Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488, sichtbar zu machen.

Die Zellen wurden für 20 min in 2,5 % Glutaraldehyd/PBS bei RT fixiert, 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min in 0,2 % Triton X-100/PBS permeabilisiert. Die Färbung der Zellen erfolgte für 2 h bei RT im Dunklen mit einer Verdünnung von 1:50. Bevor die Zellen erneut 3-mal in PBS gewaschen wurden, wurden die Zellkerne, wie oben beschrieben, mit DAPI gefärbt.

Material und Methoden

Dil – Ac – LDL

Durch Aufnahme von Dil-Ac-LDL (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-acetyliertes-low density lipoprotein) können Endothelzellen markiert werden. Das Lipoprotein Ac-LDL wird intrazellulär von lysosomalen Enzymen abgebaut, wobei sich der Fluoreszenzfarbstoff Dil in intrazelluläre Membranen einlagert. Die Vitalität der Zellen wird dabei nicht beeinträchtigt.

Dil-Ac-LDL wurde zur Verwendung in Medium auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen. Die Detektion erfolgte bei 549 nm im Epifluoreszenzmikroskop.

BrdU – Markierung (5-Bromo-2'-deoxy-Uridin)

BrdU ist ein synthetisches Thymidinanalogon, welches während der Zellproliferation kompetitiv anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Durch Verwendung eines monoklonalen AK gegen BrdU können proliferierende Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Färbung wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt (www.roche-applied-science.com). Das BrdU Reagenz wurde 1:1000 in dem entsprechenden Zellkulturmedium verdünnt, um die Zellen damit für 5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ zu inkubieren. Anschließend wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen und für 20 min bei -20 °C in BrdU Fixierlösung fixiert. Die Säure in der Fixierlösung dient der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, als Vorbereitung für die Behandlung mit dem primären AK, welcher nur an einzelsträngige DNA binden kann. Nach der Fixierung wurden die Zellen für 30 min mit einer 1:50 Verdünnung der AK-Lösung in Inkubationspuffer bei 37 °C inkubiert, 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend mit Anti-Maus-Ig-Fluoreszein in PBS (1:50) bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach erneute m Waschen in PBS wurden Zellkerne für 10 min mit DAPI gefärbt.

Immunhistochemische Färbungen

Bei immunhistochemischen Färbungen wird ein Antigen durch spezifische Antigen-Antikörper (AK) Bindungen detektiert. Der verwendete Primärantikörper bindet an das Antigen, der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper bindet anschließend an die konstante Domäne des primären AK (Fc-Fragment), wodurch die Lokalisation des Antigens durch Epifluoreszenzmikroskopie detektiert werden kann.

10 µm dicke Gefrierschnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und 3-mal mit 0,05 % Tween 20/PBS gewaschen, um Reste des Tissue Tek-Einbettmediums von dem Objektträger zu entfernen. Eine *Antigen Retrieval* Behandlung für 20 min bei 37 °C mit Trypsin-Arbeitslösung diente der Wiederherstellung der Antigenstruktur, welche durch 4 % PFA-Fixierung teilweise verloren geht. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 15 min bei RT mit 0,2 % Triton X-100/PBS permeabilisiert. Um einer unspezifischen Bindung des ersten AKs entgegen zu wirken, wurden die Schnitte mit 5 % NGS/1 % BSA/PBS blockiert.

Die Inkubation mit dem Primär-AK erfolgte bei RT für 1 h in PBS. Die eingesetzten Konzentrationen können der Tabelle (siehe oben) entnommen werden. Vor Zugabe des Sekundär-AK wurden die Schnitte 3-mal mit 0,05 % Tween 20/PBS gewaschen. Der zweite AK wurde in PBS verdünnt, die Inkubation der Schnitte erfolgte für 1 h bei RT im Dunklen. Anschließend wurden die Zellkerne für 1 min mit 5 µg/ml DAPI gefärbt, die Schnitte erneut 3-mal gewaschen und mit *Dako Fluorescence Mounting Medium* eingedeckelt. Die Schnitte wurden ÜN bei RT im Dunklen getrocknet, die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4 °C.

Ergebnisse

1. Übersicht

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von gelatinebasierten Implantaten für verschiedene Organsysteme und die Untersuchung der biologischen Reaktionen auf diese Implantate. Hierbei wurde der Fokus zum einen auf das periphere Nervensystem gelegt und hier auf die Entwicklung einer Nervenleitschiene zur Unterstützung der Regeneration. Zum anderen wurde in einem zweiten Kapitel ein Implantat für den abdominalen Bauchraum untersucht, um zukünftig Adhäsionen verhindern zu können. Allen in dieser Arbeit verwendeten Implantate war gemeinsam, dass sie aus hydrolisiertem Kollagen (Gelatine) hergestellt wurden.

2. Untersuchungen im peripheren Nervensystem

Im folgenden Kapitel sollte eine Nervenleitstruktur aus Gelatine genauer untersucht und entwickelt werden. Diese Nervenleitschiene war wie eine Röhre geformt und bestand aus einer Transglutaminase (TGase) quervernetzten Gelatinemembran. Diese Membran sollte biokompatibel sein und während der Regeneration *in vivo* im zeitlichen Verlauf resorbiert werden, narbenbildende Fibroblasten ausschließen und die Diffusion von Nährstoffen gewährleisten.

Als zweiter Bestandteil des Implantates wurde zur Adaption der Nervenleitschiene im peripheren Nervensystem ein Gelatinebasierter Kleber genauer untersucht. Der Gelatinekleber bestand aus einem Zwei-Komponenten System, Gelatine und Transglutaminase als Vernetzer. Bei der Untersuchung des Klebers lag der Fokus auf der Analyse der Biokompatibilität, der Restaktivität der TGase nach Vernetzung des Implantates und der Zellmigration durch den Kleber.

Im Folgenden ist ein Fließdiagramm mit den einzelnen Versuchen dargestellt, die im Rahmen dieses Kapitels durchgeführt wurden.

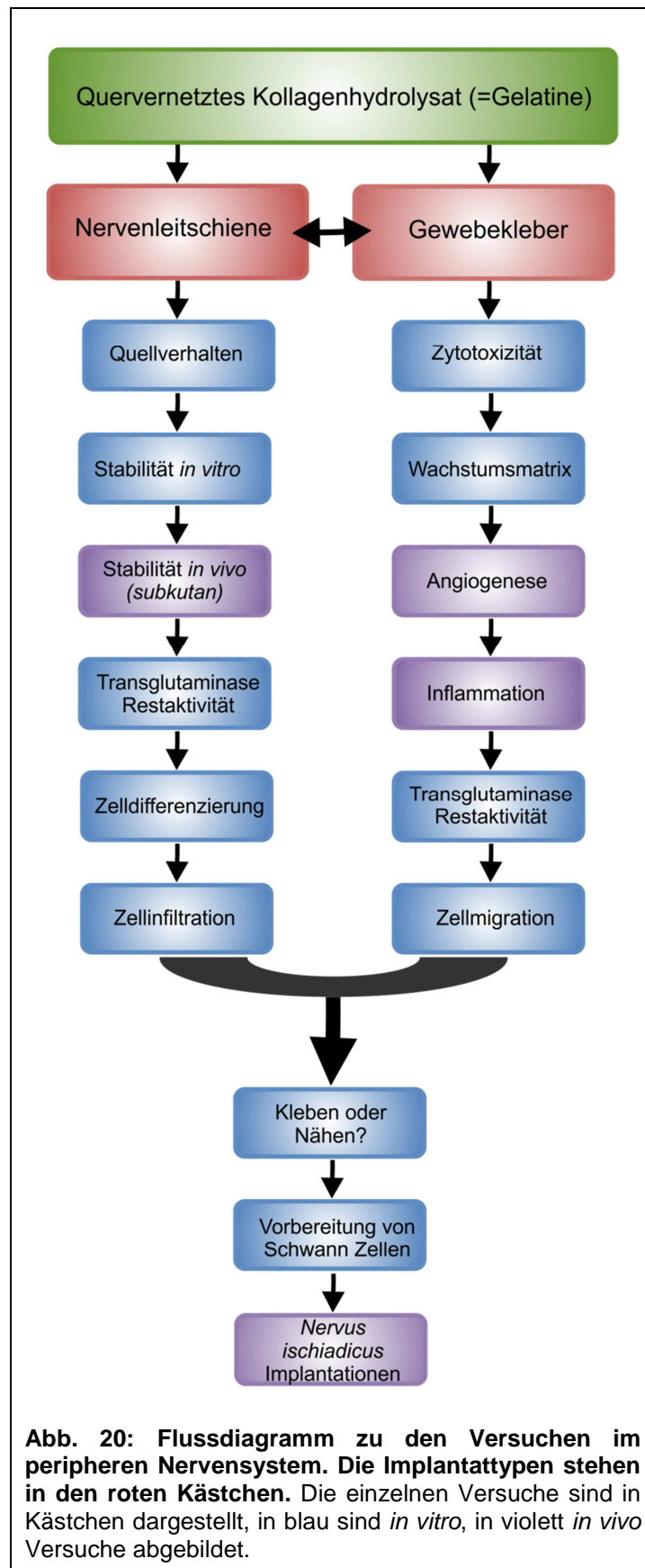


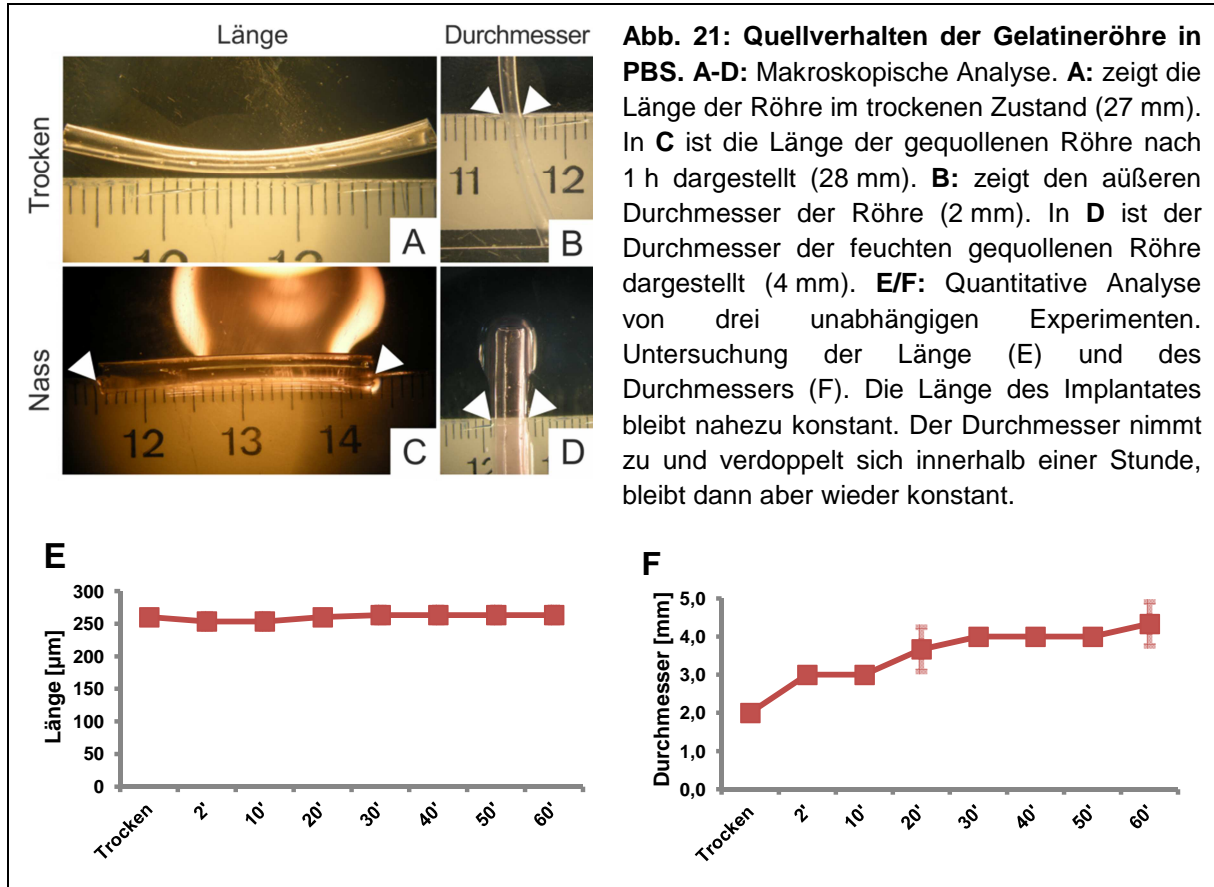
Abb. 20: Flussdiagramm zu den Versuchen im peripheren Nervensystem. Die Implantattypen stehen in den roten Kästchen. Die einzelnen Versuche sind in Kästchen dargestellt, in blau sind *in vitro*, in violett *in vivo* Versuche abgebildet.

2.1. Transglutaminase quervernetzte Nervenleitschiene

2.1.1. Quellverhalten

Erste Untersuchungen bezüglich der Materialeigenschaften der Gelatineimplantate wurden mit getrockneten unsterilen Röhrchen durchgeführt. Die Implantate sollten zunächst auf ihr Quellverhalten untersucht werden, um zu überprüfen ob sie bei Flüssigkeitsaufnahme ihre Morphologie verändern. Für eine Implantation in vivo muss gewährleistet sein, dass die Implantate formstabil bleiben.

Die Röhrchen wurden hierfür in PBS gelegt und alle 10 Minuten ihre Länge und der äußere Durchmesser gemessen. Die Länge der Implantate blieb mit 250 μm über eine Stunde hinweg gleich (Abb. 21 A, C und E). Der äußere Durchmesser verdoppelte sich innerhalb des Beobachtungszeitraums von einer Stunde (Abb. 21 B, D und F). Der innere Durchmesser blieb über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant (0,8 – 1,1 mm). In den darauf folgenden 24 h konnten keine weiteren Veränderungen sowohl der Länge als auch des Durchmessers festgestellt werden. Die Implantate scheinen somit nach einer Stunde quellen in wässriger Lösung mit Flüssigkeit gesättigt zu sein.



Fazit

Die Länge des Implantates verändert sich kaum durch den Quellvorgang.

Der Durchmesser verdoppelt sich innerhalb von einer Stunde und bleibt dann weitgehend konstant.

2.1.2. Langzeitstabilität *in vitro*

Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Materialeigenschaften der Gelatineimplantate wurden mit Röhrchen und Membranen durchgeführt. Dabei sollte die Stabilität der Implantate genauer analysiert werden, um zu überprüfen wie lange die Gelatine stabil ist, da später im Nervenimplantat eine Stabilität von nicht unter drei Monaten für kurze Defektstrecken und deutlich über sechs Monaten für längere Nervenläsionen gewährleisten sein muss. Die Gelatineimplantate wurden in Puffer (PBS; Röhrchen) und mit Fibroblasten (Membranen) bei 37°C kultiviert und einmal wöchentlich makroskopisch und mikroskopisch untersucht. Hatte sich ein Implantatmaterial komplett aufgelöst oder waren lediglich einzelne Fragmente vorhanden, wurde es als nicht mehr stabil gewertet. Zum Einsatz kamen dabei Materialien, die sich auf Grund der unterschiedlichen Sterilisation unterscheiden ließen. In den schematischen Darstellungen sind die Implantate mit MeD – Nummern und dem Sterilisationstyp gekennzeichnet. Dabei steht γ -steril für die Sterilisation mit γ -Strahlung und temp.-steril für ein Hochtemperatur-Sterilisationsverfahren.

Generell erwiesen sich die unsterilen Röhrchen und Membranen (MeD0923-1) als ungemein stabil, sowohl in reinem PBS, als auch in Gegenwart von Zellen (Abb. 22, Abb. 23 und Abb. 24). Erst nach 13 Monaten war die unsterile Röhre sowohl in PBS als auch besiedelt mit Zellen vollständig aufgelöst. Die temperatursterile Röhre (MeD0941) war nach sechs Monaten in PBS aufgelöst, in Gegenwart von Zellen war die Membran nach acht Monaten stark angegriffen und fragmentiert, es waren aber noch lebende Zellen auf den Fragmenten zu finden. Die γ -sterile Röhre (MeD0941) war nach zwei Wochen in PBS komplett abgebaut, mit Zellen besiedelt bekam die Membran nach ca. 1 Monat eine Gel-artige Konsistenz, war aber noch als Wachstumsfläche erkennbar und mit Zellen besiedelt. Nach 8 Monaten wies

Ergebnisse

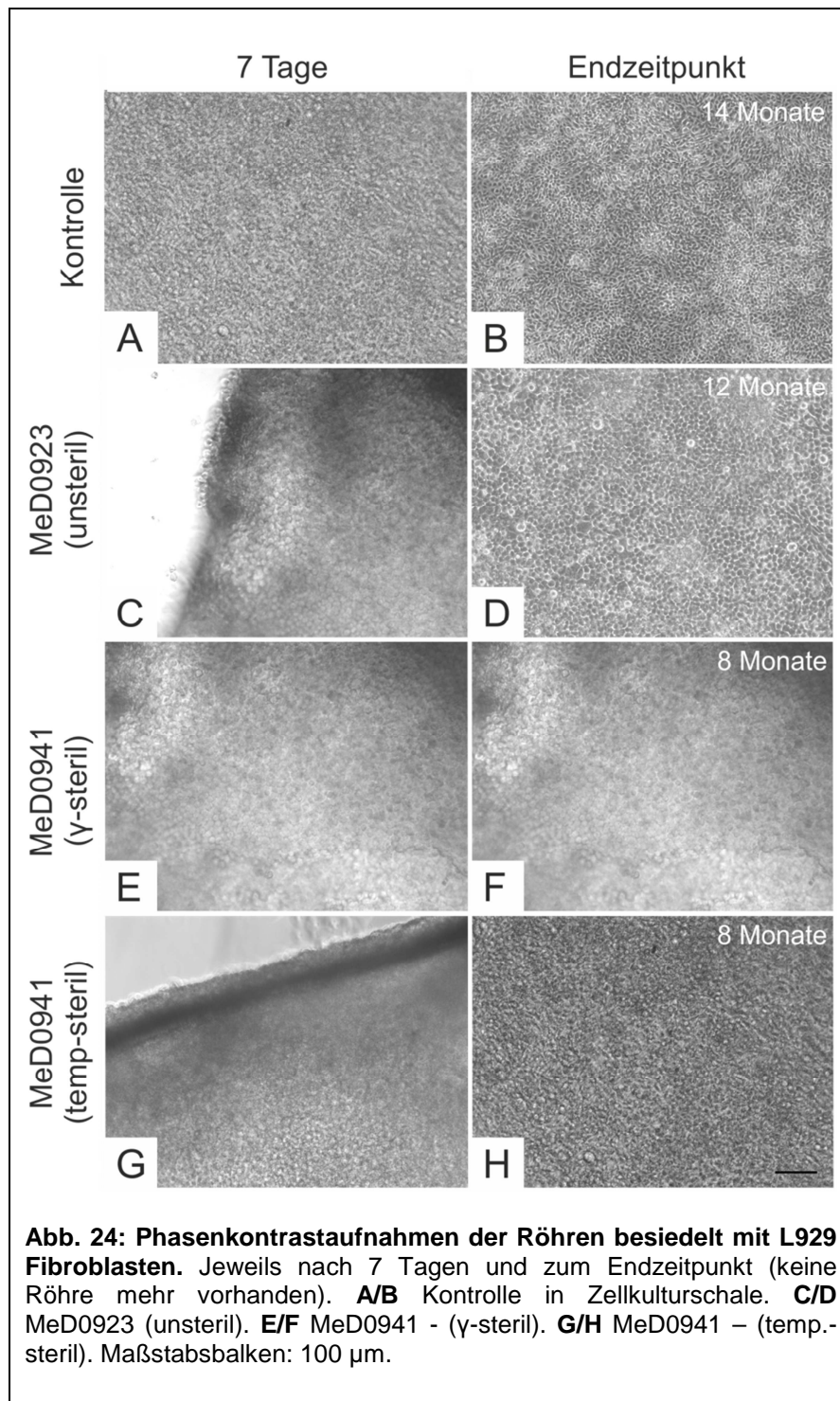
dieses Implantatmaterial ebenfalls eine stark angegriffene und fragmentierte Struktur auf.

| Resorptionszeit bei 37°C in PBS | 0 | 2 Mo | 4 Mo | 6 Mo | 8 Mo | 10 Mo | 12 Mo | 14 Mo |
|------------------------------------|---|-------|------|------|------|-------|-------|-------|
| MeD0923-1 (unsteril) | | ————— | | | | | | |
| MeD0941 (γ-steril) | | | | | | | | |
| MeD0941 (temp.-steril) | | ————— | | | | | | |

Abb. 22: Schematische Darstellung der Resorptionszeit von Transglutaminase quervernetzten Röhren bei 37°C in Puffer (PBS).

| Resorptionszeit besiedelt mit Zellen | 0 | 2 Mo | 4 Mo | 6 Mo | 8 Mo | 10 Mo | 12 Mo | 14 Mo |
|---|---|-------|------|------|------|-------|-------|-------|
| MeD0923-1 (unsteril) | | ————— | | | | | | |
| MeD0941 (γ-steril) | | ————— | | | | | | |
| MeD0941 (temp.-steril) | | ————— | | | | | | |

Abb. 23: Schematische Darstellung der Resorptionszeit von Transglutaminase quervernetzten Röhren bei 37°C besiedelt mit Mausfibroblasten (L929).



Fazit

Auch nach der Sterilisation vor allem mit hohen Temperaturen erweist sich die Gelatineröhre als relativ stabil.

Ergebnisse

2.1.3. Stabilität *in vivo*

In diesem Versuchsabschnitt sollte die Stabilität, das Degradationsverhalten und die potentiell ausgelöste Immunreaktion der Transglutaminase quervernetzten Röhre *in vivo* untersucht werden.

Hierfür wurden je Maus zwei 0,5 cm lange zuvor gequollene Röhren (entweder 2x temp. – oder 2x γ - steril) in kleine Hauttaschen rechts und links vom Nacken subkutan implantiert.

Nach sechs Wochen, drei und sechs Monaten wurden die Röhren wieder explantiert. Die Auswertung erfolgte beim Eröffnen der Tiere zunächst rein makroskopisch. Anschließend wurden die Proben entnommen, fixiert und histologisch ausgewertet.

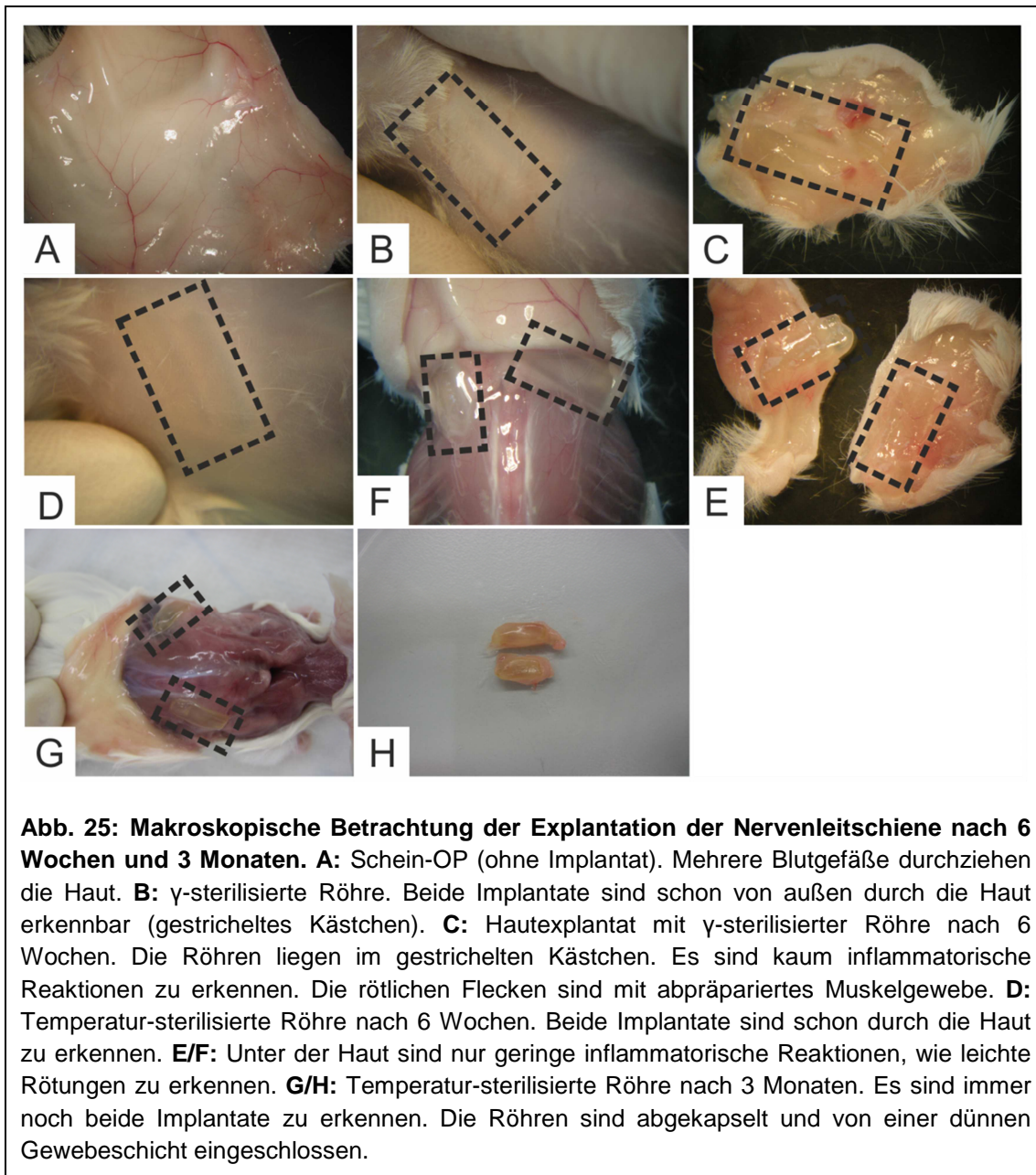
Bei der Explantation der Röhren nach 6 Wochen wurde deutlich, dass es bei den beiden Implantattypen nur zu einer schwachen Inflammationsreaktion und kaum Einkapselung kam.

Beim Abbau sah man allerdings deutliche Unterschiede. Die γ -sterilisierte Röhre wurde in allen Tieren zum großen Teil abgebaut und war nur noch als Gelatinerest zu erkennen (Abb. 25 B und C).

Die temperatursterilisierten Röhren dagegen konnten in allen Tieren intakt wiedergefunden und auch als Röhre identifiziert werden. Makroskopisch gab es kaum Anzeichen für einen ersten Abbau der Röhren (Abb. 25 D, E und F).

Bei der Explantation der temperatursterilisierten Röhre nach 3 Monaten war makroskopisch ebenfalls nur eine schwache inflammatorische Reaktion in Form von einer leichten Rötung und Einkapselung der Implantate zu erkennen. Die Röhren waren noch als intakte Leitschienen zu erkennen und es gab keine Anzeichen für einen Abbau der Röhre (Abb. 25 G und H). Von der γ -sterilisierten Röhre waren nach 3 Monaten keine Reste mehr zu erkennen.

Nach sechs Monaten waren beide Röhrentypen komplett resorbiert und es waren makroskopisch wie mikroskopisch keinerlei Reste der Implantate zu erkennen.



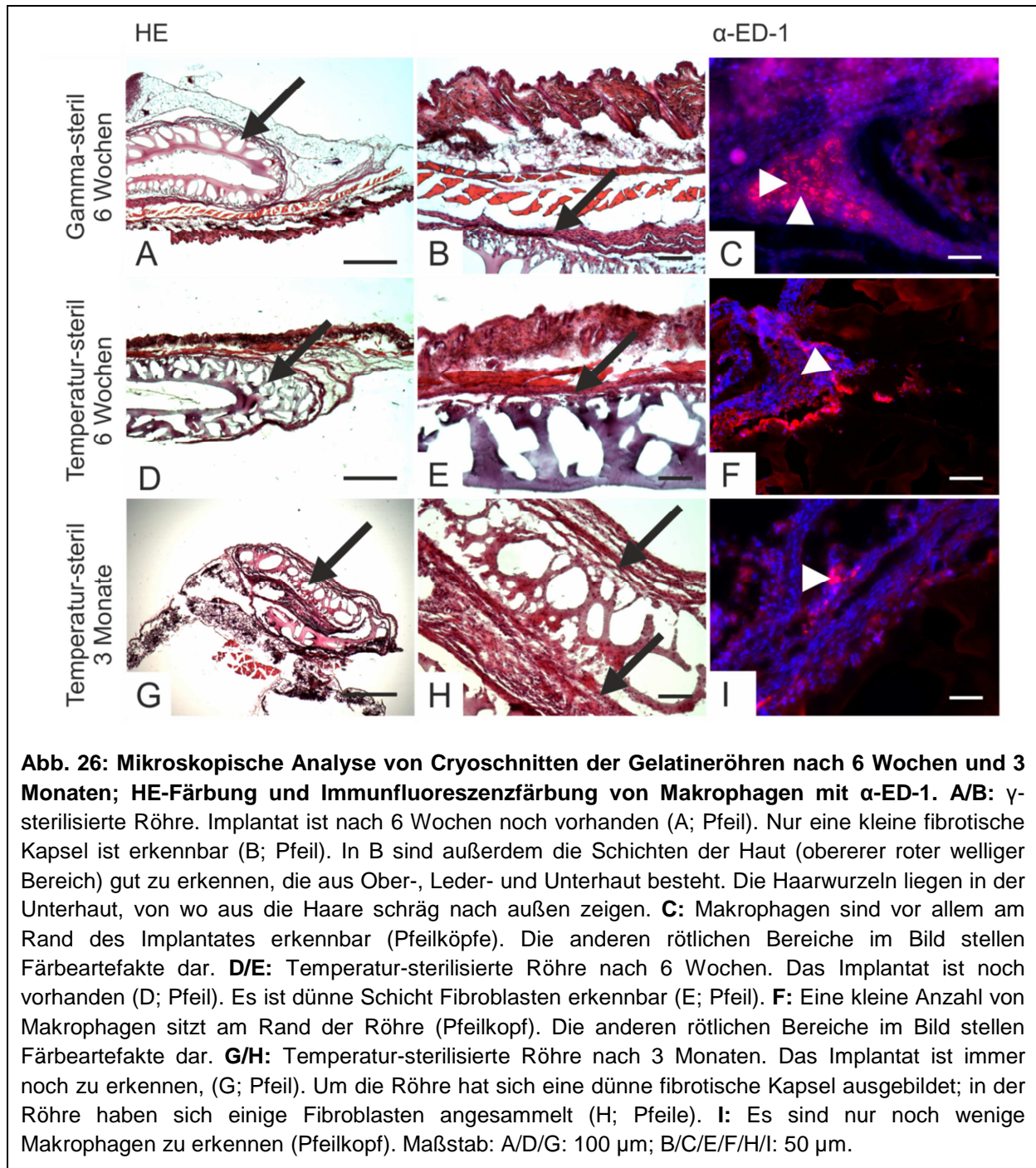
In Abb. 26 (HE-Färbungen) ist zu erkennen, dass es bei den Röhren nach sechs Wochen und drei Monaten zu morphologischen Änderungen kam. So war die γ -sterilisierte Röhre schon nach 6 Wochen stark angegriffen und wies große Löcher im Inneren der Membran auf (Abb. 26 A, Pfeil). Durch die Cryotechnik (Einfrieren und Schneiden) wirken diese Löcher allerdings größer als sie wahrscheinlich ursprünglich sind, da sie durch die Schnittprozedur erweitert werden. Das umliegende Gewebe bildete eine dünne Schicht aus Fibroblasten. Somit ist eine Abkapselung des Fremdkörpers vom umliegenden Gewebe zu beobachten (Abb. 26 B Pfeil).

Ergebnisse

Die temperatur-sterilisierte Röhre wies nach sechs Wochen auch eine große Anzahl an Löchern in der Membran auf, allerdings schienen die Löcher hier meist kleiner zu sein. Die Membran erschien deshalb insgesamt nicht so stark angegriffen und die entstandenen Gelatinestege innerhalb der Membran wirkten noch sehr stabil (Abb. 26 D Pfeil und E). Auch hier bildete das umliegende Gewebe eine dünne fibrotische Schicht zur Abkapselung des Fremdkörpers (Abb. 26 E Pfeil).

Nach 3 Monaten war die temperatur-sterilisierte Röhre stärker angegriffen. Neben den Löchern waren die Gelatinestege innerhalb der Membran jetzt dünner (Abb. 26 G Pfeil). Weiter war noch immer eine fibrotische Schicht gebildet vom umliegenden Gewebe zu erkennen (Abb. 26 H; Pfeil). Im Lumen der Röhre hatten sich außerdem einige Fibroblasten angesammelt, die für den fortschreitenden Abbau der Röhre sprechen (Abb. 26 Pfeil rechts).

Bei beiden Röhrentypen waren Ansammlungen von Makrophagen am Rand der Implantate zu erkennen (Abb. 26 C und F). Diese sind weitere Anzeichen für eine Fremdkörperreaktion. Nach 3 Monaten waren allerdings kaum noch Makrophagen vorhanden (Abb. 26 I).



Fazit

Das temp.-sterile Implantat bleibt *in vivo* (subkutan) über mindestens 3 Monate stabil.

Die Implantate zeigen einige Abkapselungs- und Immunreaktionen, die nach 3 Monaten mit dem Abbau des Implantates, vor allem bezüglich der Makrophagen, weniger werden.

2.1.4. Transglutaminase Restaktivität

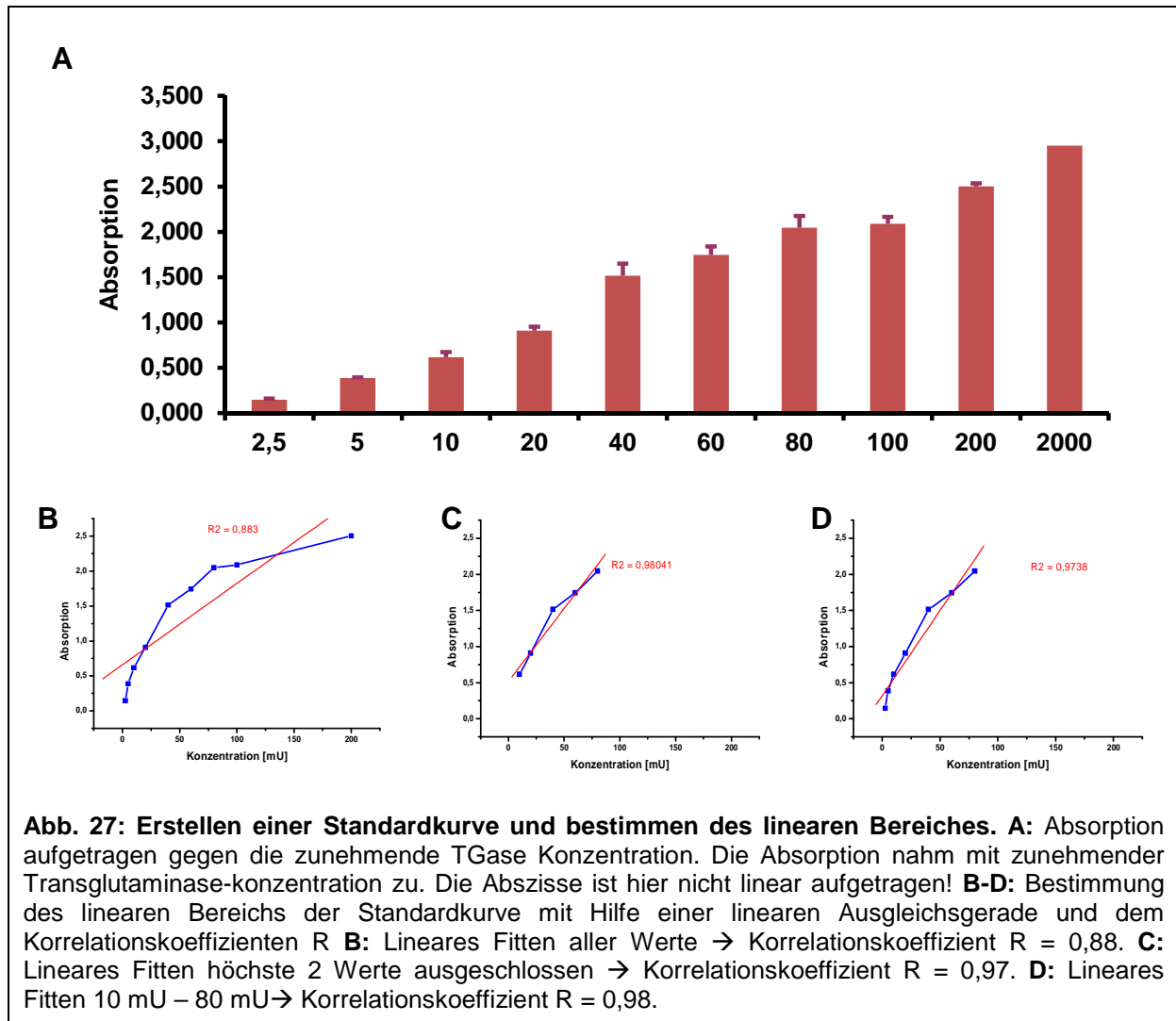
Transglutaminase (TGase) ist ein hoch konserviertes Enzym, das in allen Lebewesen vorkommt und in der Zelle hauptsächlich für die Modifikation von Proteinen zuständig ist (Griffin, Casadio et al. 2002). Da die Nervenimplantate mit TGase vernetzt waren, könnte während des Abbaus noch aktives Enzym aus dem Implantat austreten und das umliegende Gewebe beeinflussen.

In diesem Versuchsteil sollte die Transglutaminase (TGase) -Aktivität nach Vernetzung der Nervenimplantate untersucht werden. Hierfür wurde zunächst ein ELISA basierend auf einem Assay-Kit etabliert. Im Assay enthalten waren Cadaverin-beschichtete 96-Well Platten. Mit dem Assaymix wurde Biotin zugegeben, dessen kovalente Bindung an freie Aminogruppen des Cadaverins durch Transglutaminase katalysiert wird. Nachgewiesen wurde das entstandene Reaktionsprodukt mit Streptavidin-Peroxidase. Aus der Menge an gebundenem Biotin kann man dann auf die Menge an aktiver Transglutaminase schließen.

Die ersten Schritte für die Etablierung des Assays waren die Erstellung einer Standardkurve für die in den Implantaten verwendete Transglutaminase. Zum Erstellen der Standardkurven der bakteriellen Transglutaminase wurde zunächst eine Verdünnungsreihe (von 2,5 mU – 2 U) pipettiert und der ELISA anschließend nach dem Schema, wie in den Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Für die Standardkurve sollte außerdem der lineare Bereich festgelegt werden.

Die Absorption nahm mit steigender Konzentration an Transglutaminase zu (Abb. 27 A). Zur Bestimmung des linearen Bereichs der Standardkurve wurde mit Hilfe des Programmes *Origin* eine Gerade durch die entstandene lineare Kurve gelegt und der

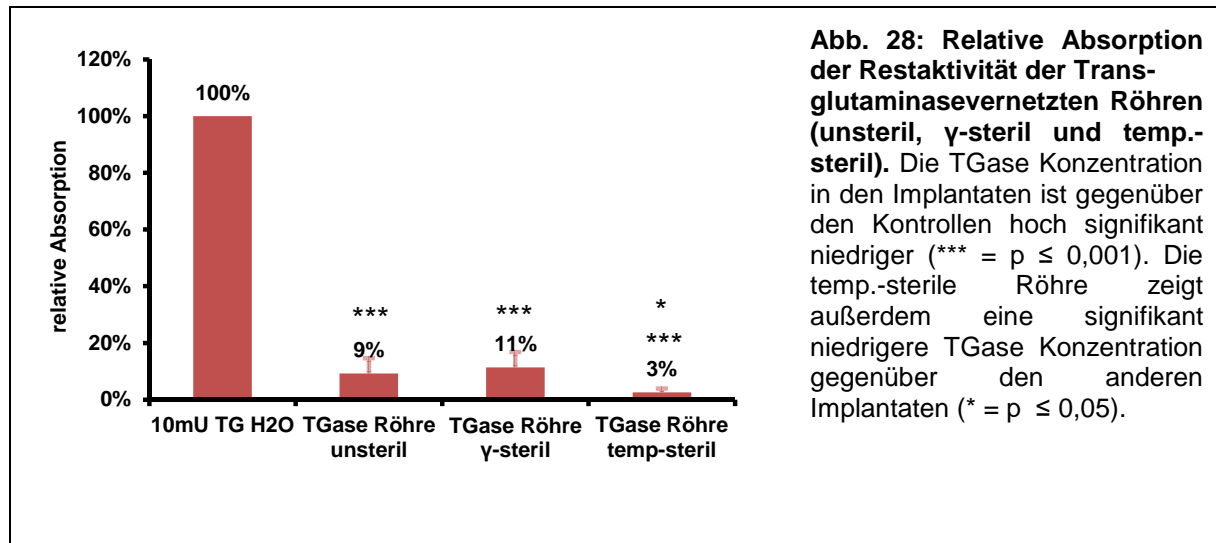
Korrelationskoeffizient bestimmt (Abb. 27 B-D). Dieser lag für Werte der Standardkurve von 10 mU bis 80 mU bei 0,98 (Abb. 27 D).



Weitere Versuche sollten zeigen, ob die Transglutaminase vernetzten Nervenleitschienen (unsteril, γ -steril und temp.-steril) noch eine Restaktivität der Transglutaminase aufweisen. Hierfür wurden die Röhren wie im Material und Methoden Teil beschrieben behandelt und in dem ELISA eingesetzt.

Alle Röhren zeigten eine signifikante Reduktion der Transglutaminase Aktivität (Abb. 28). Das temperatursterilisierte Implantat zeigte außerdem einen signifikanten Rückgang der TGase Aktivität gegenüber dem unsterilen und dem γ -sterilen Implantat, die sich kaum unterschieden. Die Unterschiede könnten auf den Sterilisationsvorgang zurückzuführen sein, wobei Änderungen in der Kollagenstruktur und deren Verbindungen auftreten.

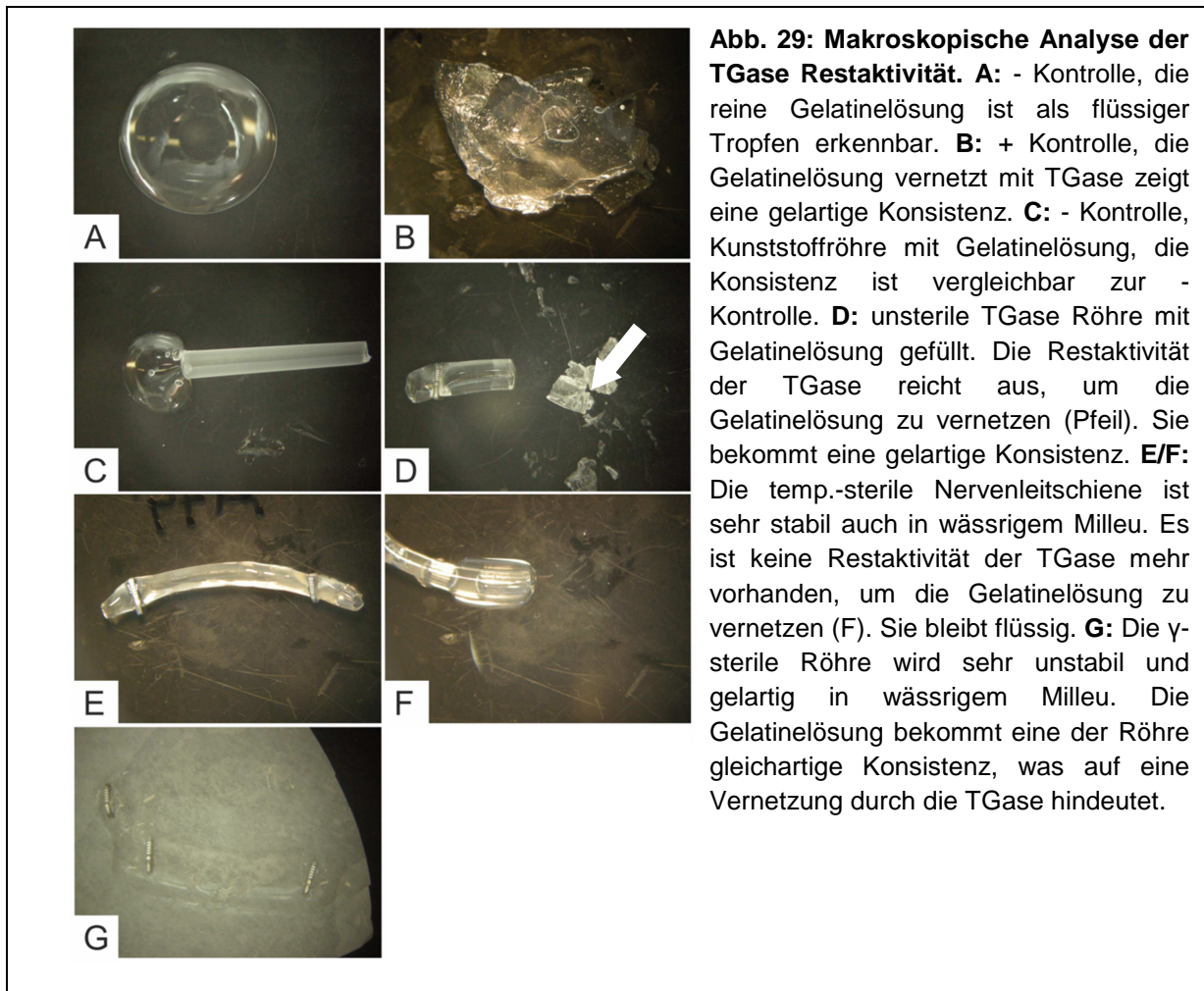
Ergebnisse



Zur Bestätigung der obigen Ergebnisse wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Hierbei wurden die Gelatineröhren mit 10 %iger Gelatinelösung gefüllt, verschlossen und für sieben Tage in feuchtem Milieu bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen dienten 1. reine Gelatinelösung, 2. Gelatinelösung vernetzt mit Transglutaminase und 3. Gelatinelösung in einer Kunststoffröhre. Mit diesem Assay sollte nachgewiesen werden, ob die Implantate so viel TGase freisetzen, dass eine Gelatinelösung zu einem Hydrogel quervernetzt wurde. Die Ergebnisse der makroskopischen Auswertung sind in Abbildung dargestellt.

Die Gelatinelösung (- Kontrolle, A) blieb wie erwartet flüssig und war auch als Tropfen noch erkennbar. Bei der vernetzten Gelatinelösung nahm die Gelatine eine viskose gelartige Konsistenz an (+ Kontrolle, B). Die Gelatinelösung in der Kunststoffröhre blieb auch wie erwartet flüssig und war von der Konsistenz vergleichbar mit der reinen Gelatinelösung. In der unsterilen und in der γ -sterilen TGase-Röhre waren allerdings keine flüssigen Lösungen mehr erkennbar (D/G). Es konnte lediglich eine gelartige Masse aus den Röhren entfernt werden, wobei die γ -sterile Röhre sehr an Stabilität verloren hatte und es nicht mehr möglich war das Implantat von der eingefüllten Gelatinelösung zu unterscheiden (G). Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass die 10 %ige Restaktivität der Transglutaminase, die über die Röhrenwand innerhalb der sieben Tage langsam herausdiffundiert, ausreicht, um eine Gelatinelösung erneut zu vernetzen. Die Temperatur-sterile Röhre behielt im Verlauf des Versuches einen sehr stabilen Habitus (Abb. E). Weiter konnte nach Ende der Inkubationszeit lediglich flüssige Gelatinelösung aus der Röhre

gewonnen werden. Somit wird klar, dass eine Sterilisation der Implantate mit Hitze ausreicht, um die Transglutaminase zu inaktivieren.



Fazit

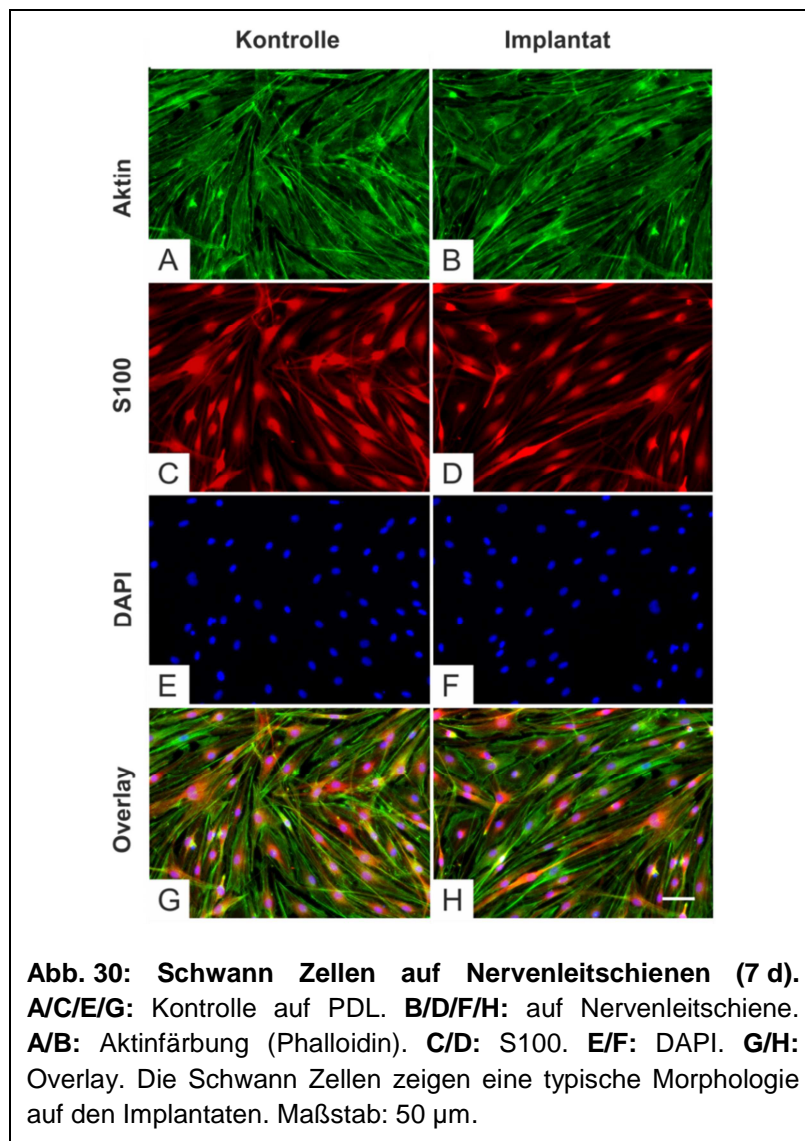
Die Implantate zeigen eine TGase Restaktivität.

Hochtemperatursterilisation reicht aus, um die Restaktivität auf ein Minimum zu reduzieren.

2.1.5. Zelldifferenzierung auf Nervenleitschienen

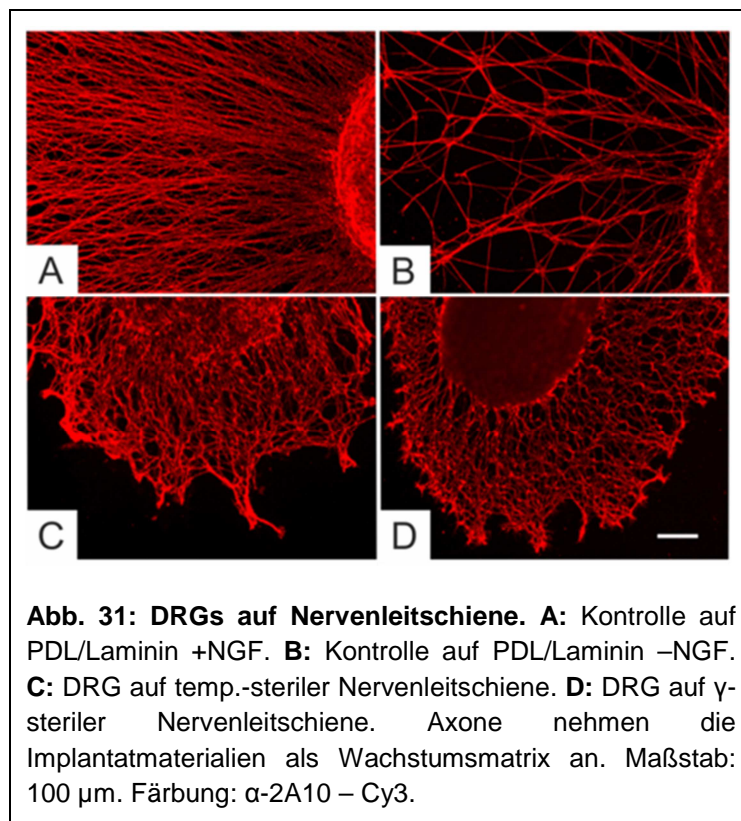
In diesen Untersuchungen wurden die Implantate auf ihre Zytokompatibilität analysiert. Hierbei wurden Zellen verwendet, die auch später innerhalb der Implantate wachsen sollen. Zunächst wurden Schwann Zellen auf dem Implantatmaterial ausgesiedelt, anschließend fixiert und mit typischen Differenzierungsmarkern wie Phalloidin für Aktin und S100 zur Identifizierung von SZ angefärbt.

Wie in Abb. 30 zu erkennen ist, befand sich ein gleichmäßig dichter Zellrasen auf den Implantaten, der, vergleichbar mit der Kontrolle, aus ausdifferenzierten SZ bestand und größtenteils positiv für S100 war (Abb. 30 D). Die Zellen nahmen den Untergrund des Implantatmaterials als Wachstumsmatrix an und bildeten ein typisches Aktinzytoskelett aus (Abb. 30 B).



In weiteren Versuchen wurden dorsale Hinterwurzelganglien aus Hühnerembryonen präpariert und auf der Gelatinemembran ausgesiedelt. Für diese Analyse wurden hochtemperatur sterilisierte Implantate und γ -sterile Röhren verwendet.

Bei den Kontrollen zeigte sich ein Unterschied zwischen der Zugabe von NGF und ohne NGF über 24 h. Mit NGF wuchsen wesentlich mehr Axone aus (Abb. 31 A) als ohne die Zugabe des Wachstumsfaktors (Abb. 31 B). Außerdem waren die Axone länger und bildeten mehr Wachstumskegel aus. Auf den Implantaten wurden die Axone mit NGF behandelt. Hier war zu beobachten, dass die Axone auswuchsen und die typischen Wachstumskegel bildeten, allerdings wuchsen die Axone im Gegensatz zur Kontrolle nicht so weit aus. Sie bildeten vielmehr ein dichtes Netz aus Axonen, die sich oft übereinander anlagerten (Abb. 31 C und D). Dennoch nahmen die Axone die Implantate als Wachstumsmatrix an.



Fazit

Schwann Zellen nehmen die Gelatineimplantate als Wachstumsmatrix an und differenzieren.

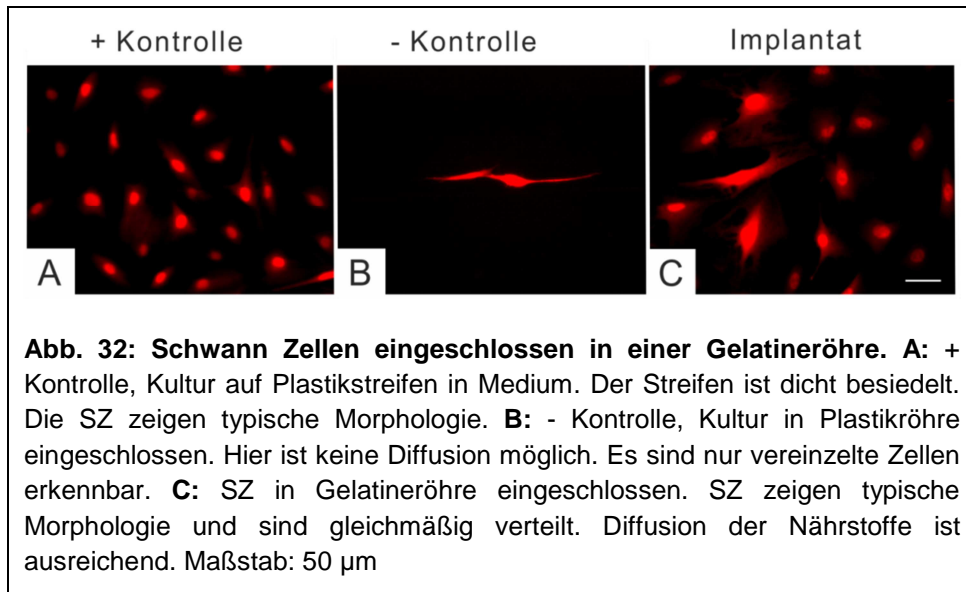
Axone können auf den Implantaten auswachsen.

2.1.6. Zelldifferenzierung in Nervenleitschienen

Um zu zeigen, ob durch die Wand der Nervenleitschiene genügend Nährstoffe diffundieren können, damit Zellen ausdifferenzieren, wurden Schwann Zellen und Tet-ON GFP Neuro2a Zellen auf beschichteten Plastikstreifen ausgesiedelt und in der Leitschiene eingeschlossen. Als Kontrollen dienten zum einen nicht eingeschlossene Zellen auf Plastikstreifen angesiedelt (+ Kontrolle) und zum anderen Zellen, die in eine nicht-permeable Kunststoffröhre eingeschlossen wurden (- Kontrolle).

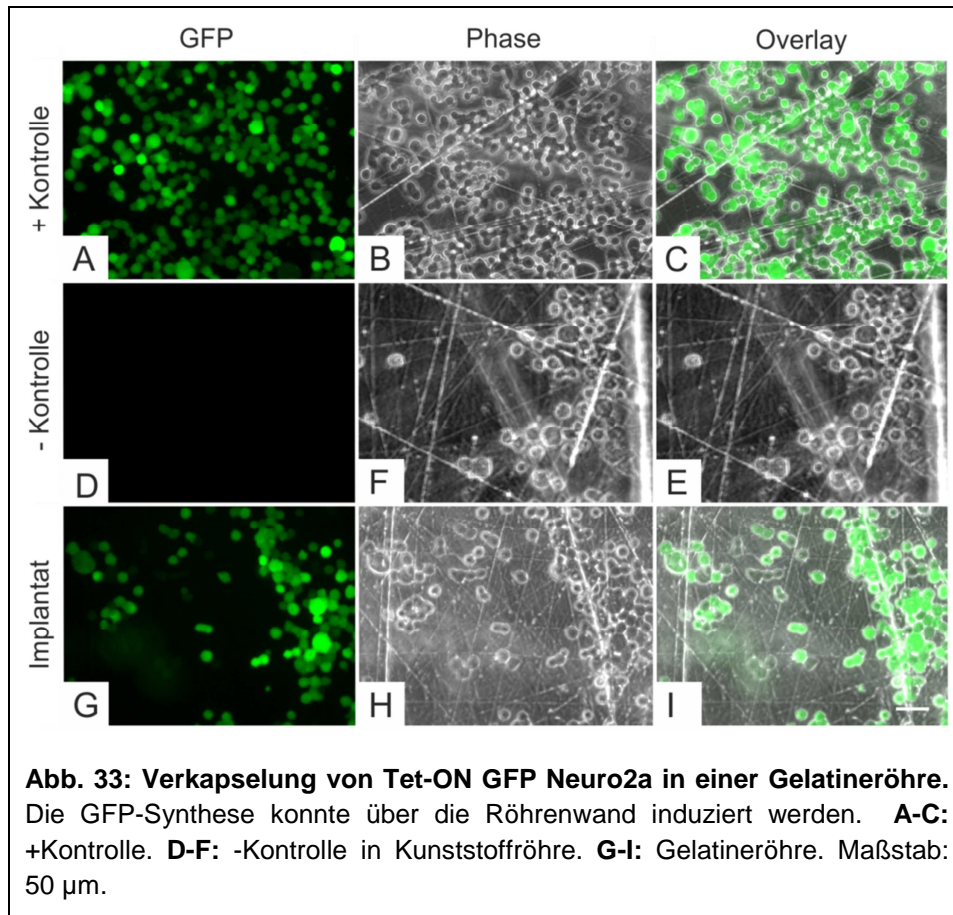
Die Schwann Zellen wurden für eine Woche in den Röhren inkubiert. Anschließend wurden die Streifen aus den Implantaten entnommen, die Zellen fixiert und in einer Immunfluoreszenzfärbung gegen S100 angefärbt.

Auf den Plastikstreifen der nicht eingeschlossenen Zellen waren die Zellen gleichmäßig verteilt und wiesen eine fusiforme SZ Morphologie auf. Die meisten Zellen waren positiv für S100 (Abb. 31 A). Bei der – Kontrolle waren nur noch sehr wenige SZ zu erkennen, was darauf hindeutet, dass nur noch wenige Nährstoffe innerhalb der Kunststoffröhre vorhanden waren und von außen keine Nährstoffe in die Röhre eindringen konnten. Die überlebenden Zellen waren allerdings positiv für S100 und wiesen die für SZ typische langgestreckte Form auf (Abb. 31 B). Die SZ, die im Implantat eingeschlossen waren, waren gleichmäßig verteilt und wiesen eine teilweise langgestreckte, teilweise fusiforme SZ Morphologie auf. Alle Zellen waren positiv für S100 (Abb. 31 C). Durch die Röhrenwand schienen genügend Nährstoffe diffundiert zu sein, um SZ überleben und ausdifferenzieren zu lassen.



Die Tet-ON GFP Neuro2a Zellen wurden ebenfalls eine Woche inkubiert. Hier wurde allerdings in das die Röhre umgebende Medium Doxycyclin gegeben. Anschließend wurden die Streifen aus den Implantaten entnommen und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

GFP wird exprimiert, wenn das Doxycyclin durch Diffusion das Innere der Gelatineröhre erreicht und so bei den Neuro2a-Zellen der Promotor für das GFP-Gen aktiviert wird. Dies äußert sich dann in einer grün fluoreszierenden Färbung der Zellen, die unter dem Mikroskop beobachtet werden kann. Wie in der Abb. 32 deutlich zu sehen, konnte neben den Nährstoffen auch das Doxycyclin in das Lumen diffundieren. Die Vitalität der Zellen, gemessen an der Morphologie war sehr gut. Ebenso war die GFP Expression gegenüber der – Kontrolle sehr ausgeprägt (D und G). Die GFP Expression war sogar vergleichbar mit der + Kontrolle (A-C).



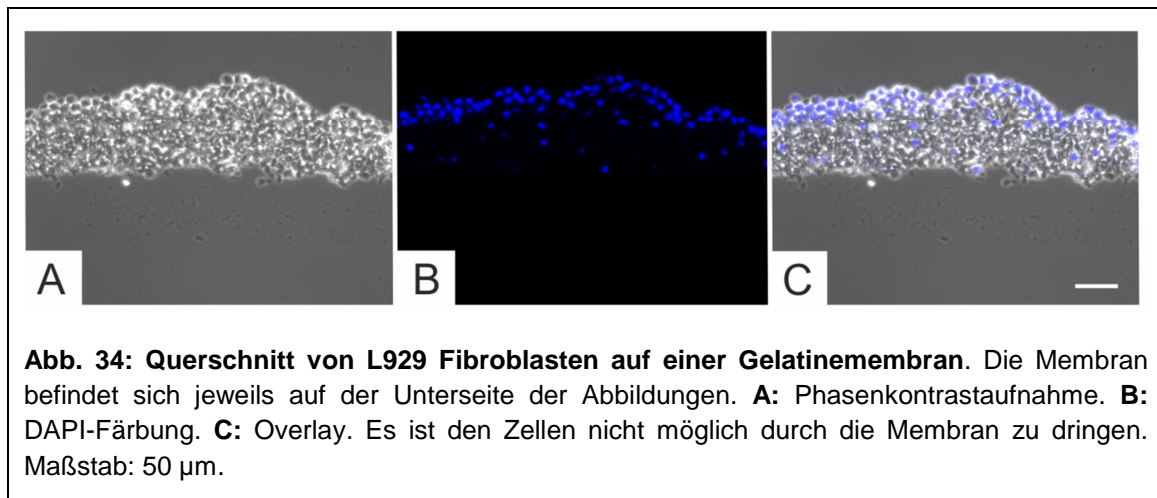
Fazit

Die Diffusion durch die Röhrenwand ist ausreichend um Zellen ausdifferenzieren zu lassen und mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen.

2.1.7. Zellinfiltration

In diesem Versuchsteil sollte untersucht werden, ob Fibroblasten in die Gelatinemembran der Röhren einwandern können. Durch das Einwandern von Fibroblasten könnten sich Poren bilden, die die Diffusionskapazität für Nährstoffe verbessern, die Stabilität der Membran aber reduzieren. Dafür wurden die Membranen verwendet, die in ihrer Dicke der Wandstärke der Nervenimplantate entsprachen. Diese wurden mit L929 Fibroblasten besiedelt und für sieben Tage mit Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Membranen inklusive der Zellen fixiert, Cryoschnitte angefertigt und mit DAPI angefärbt.

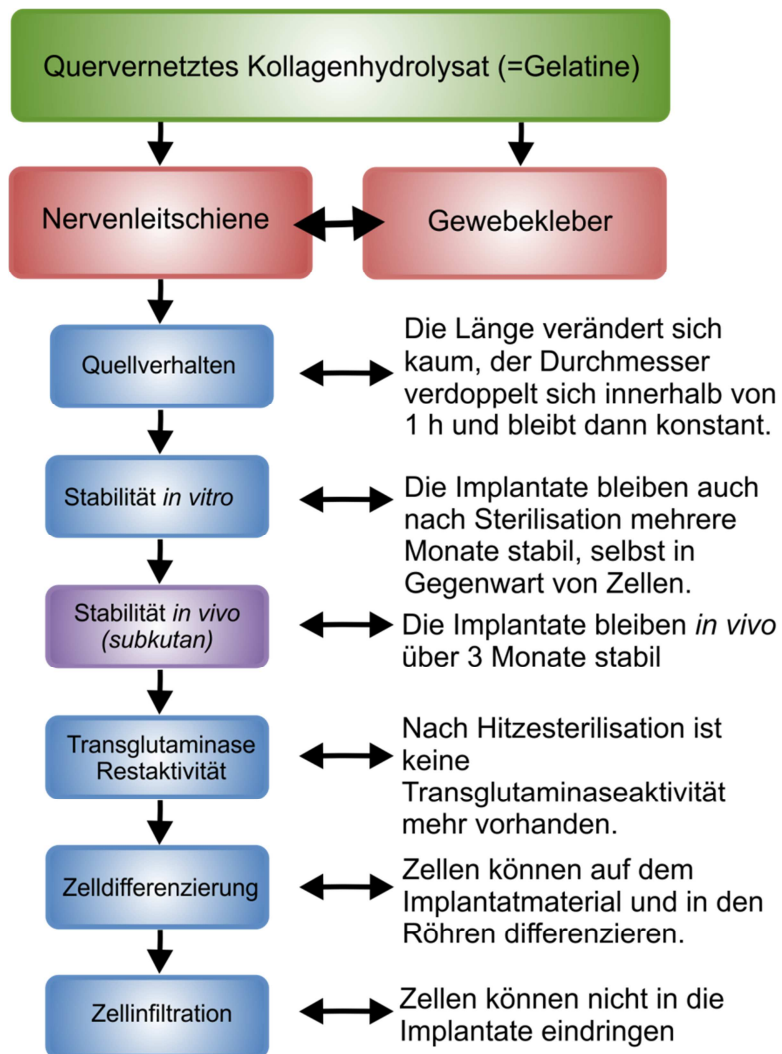
In Abb. 34 liegt die (nicht-sichtbare) Membran jeweils in der unteren Bildhälfte. Mit DAPI angefärbte Zellkerne der Fibroblasten befinden sich ausschließlich oberhalb der Membran (Abb. 34 B/C). In der Überlagerung von DAPI und Phasenkontrastaufnahme ist zu erkennen, dass außerdem unterhalb der Zellen eine Menge Zelldebris vorhanden ist (in Abb. 34 nicht mit DAPI angefärbt). Die Fibroblasten schienen nicht in der Lage zu sein innerhalb einer Woche durch die Wand der Gelatineröhre zu dringen.



Fazit

Fibroblasten können innerhalb von einer Woche nicht durch die Gelatineröhre in Innere einwandern.

2.1.8. Zusammenfassung



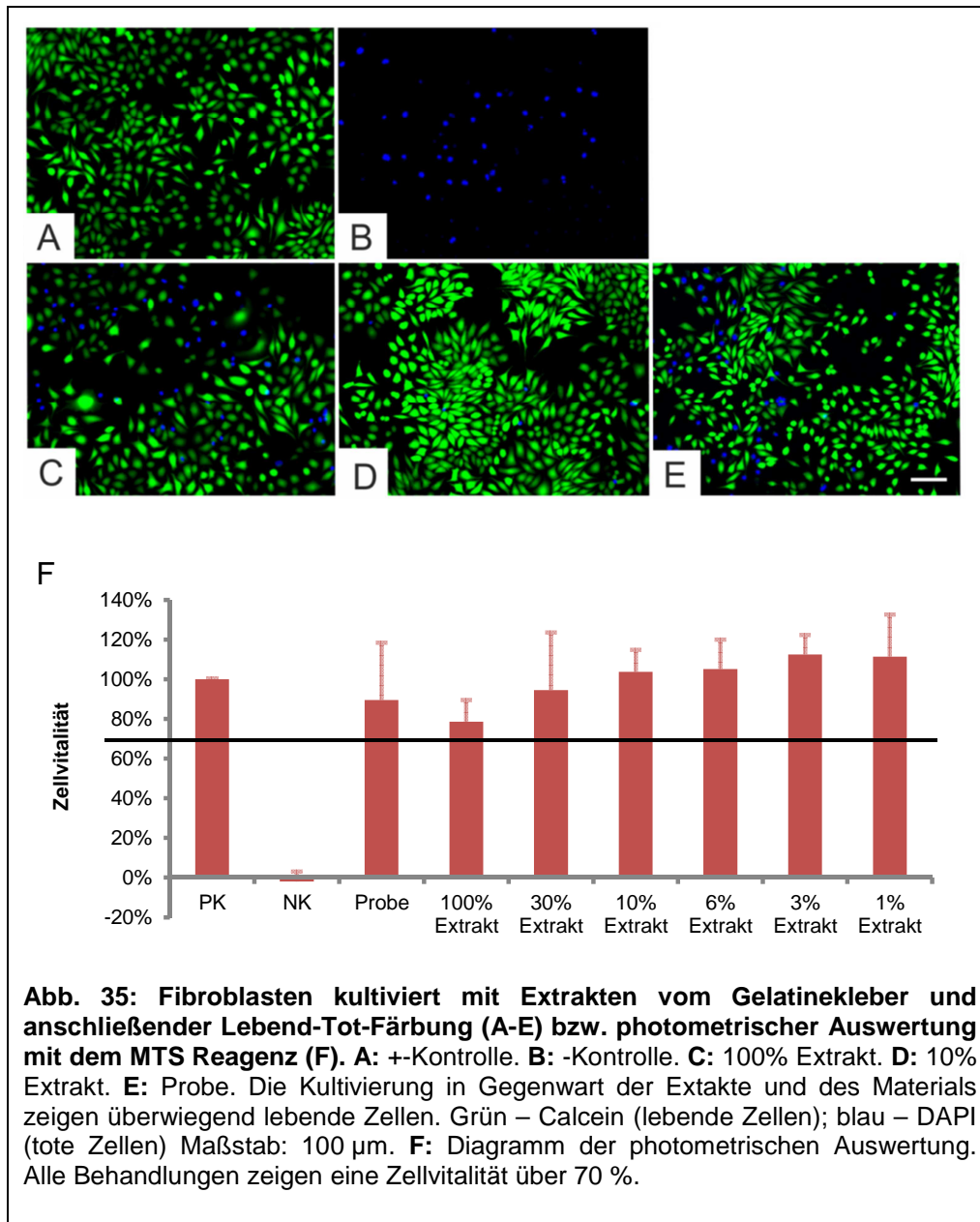
2.2. Gelatinekleber

2.2.1. Zytotoxizität

Es wurde zunächst untersucht, ob der Gelatinekleber vor dem Einsatz in weiteren *in vitro* und *in vivo* Versuchen biokompatibel ist. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe aus Extrakten des auspolymerisierten Gelatineklebers mit Zellkulturmedium hergestellt und diese auf zuvor ausgesiedelte Fibroblasten (L929) gegeben. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen dann mit dem *CellTiter 96 AQ-One Solution Reagent (Promega)* photometrisch oder mit Hilfe einer Lebend - Tot - Färbung (Calcein – DAPI) mikroskopisch ausgewertet. Als Positivkontrolle wurde normales Kulturmedium verwendet, als Negativkontrolle diente Kulturmedium, das mit 10 % DMSO versetzt war. Zusätzlich zu den Extrakten wurde außerdem in einem weiteren Ansatz der direkte Einfluss des Materials in Gegenwart der Zellen untersucht („Probe“).

Weder die Extrakte des Gelatineklebers noch eine direkte Probe des auspolymerisierten Klebers zeigen einen toxischen Effekt auf die Zellen (Abb. 35). Bei der mikroskopischen Auswertung sind bei beiden untersuchten Verdünnungsstufen des Extraktes überwiegend lebende (durch Calcein grün angefärbte) Zellen zu erkennen. Selbst in Gegenwart eines auspolymerisierten Tropfens Gelatinekleber überwiegen die vitalen Zellen deutlich. Die Positivkontrolle zeigt bei beiden Versuchen eine sehr hohe Vitalität (Abb. 35 A; in F auf 100 % gesetzt). Die Negativkontrolle ergibt die erwartete Reduktion auf 0 % (Abb. 35 F) bzw. in der mikroskopischen Auswertung waren keine lebenden Zellen mehr zu erkennen (Abb. 35 B). Ein Anteil von 10 % DMSO im Kulturmedium hat einen stark toxischen Effekt auf die Zellen.

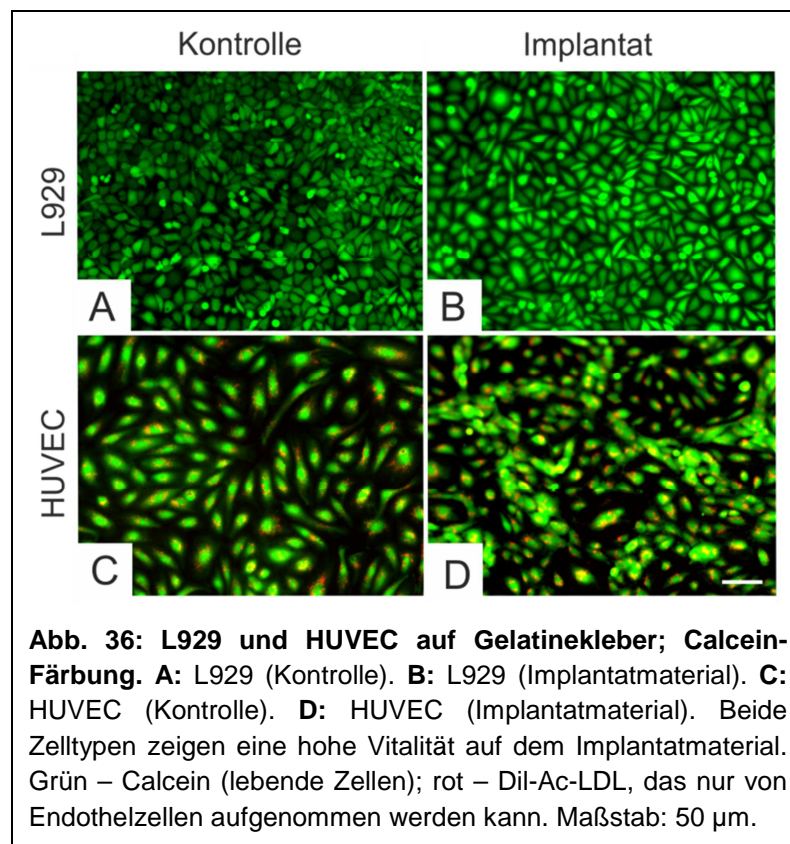
Ergebnisse



Da bei diesem Versuchsablauf nur sich herauslösende toxische Stoffe untersucht werden können, wurde in einem weiteren Assay das Zellverhalten bei direktem Kontakt der Zellen mit dem Gelatinekleber untersucht. Hierfür wurden L929-Fibroblasten und Endothelzellen (HUVEC) auf die Oberfläche des auspolymerisierten Klebers (1 h bei 37°C) gegeben und für mehrere Tage inkubiert.

Wie in Abb. 36 zu erkennen zeigte sich bei der Calceinfärbung eine große Anzahl von adhärennten Zellen, sowohl bei den Fibroblasten, als auch bei den Endothelzellen. Die Morphologie der Zellen und Intensität ihrer Färbung lässt auf äußerst vitale Zellen schließen, die gut an der Oberfläche des Klebers haften. Der

Gelatinekleber zeigt also auch bei Kontakt mit Zellen eine sehr hohe Biokompatibilität.



Fazit

Der Gelatinekleber zeigt eine sehr gute Biokompatibilität.

2.2.2. Als Wachstumsmatrix

In diesem Versuchsabschnitt sollte analysiert werden, ob verschiedene Zelltypen und dorsale Hinterwurzelganglien den auspolymerisierten Gelatinekleber als Wachstumsmatrix annehmen und differenzieren. Zu diesem Zweck wurden L929 Fibroblasten, primäre Hautfibroblasten und Schwann Zellen aus der Ratte und dorsale Hinterwurzelganglien aus Hühnerembryonen auf dem Gelatinekleber angesiedelt und für sieben Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurden die

Ergebnisse

Zellen fixiert und mit typischen Zellmarkern oder Phalloidin angefärbt, um die Zelldifferenzierung beurteilen zu können.

Alle Zelltypen zeigten eine sehr gute Adhärenz auf dem auspolymerisierten Gelatinekleber. Sowohl die L929 wie auch die Hautfibroblasten hatten eine typische Fibroblasten-Morphologie und waren stark abgeflacht mit filopodienartigen Ausläufern (Abb. 37 A-D). Alle Schwann Zellen waren positiv für den SZ-Marker S100, vergleichbar mit den Zellen der Kontrolle. Sie hatten eine typische spindelförmige Zellform und waren gleichmäßig über den Kleber verteilt (Abb. 37 E/F). Bei den dorsalen Hinterwurzelganglien (DRGs) kam es zu einem Auswachsen von Axonen, allerdings ähnlich wie bei den Gelatineröhrchen, waren vermehrt Axonbündelungen zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass die Axone zwar Auswachsen, aber den direkten Kontakt zum Untergrund eher mieden und bevorzugt aufeinander wuchsen.

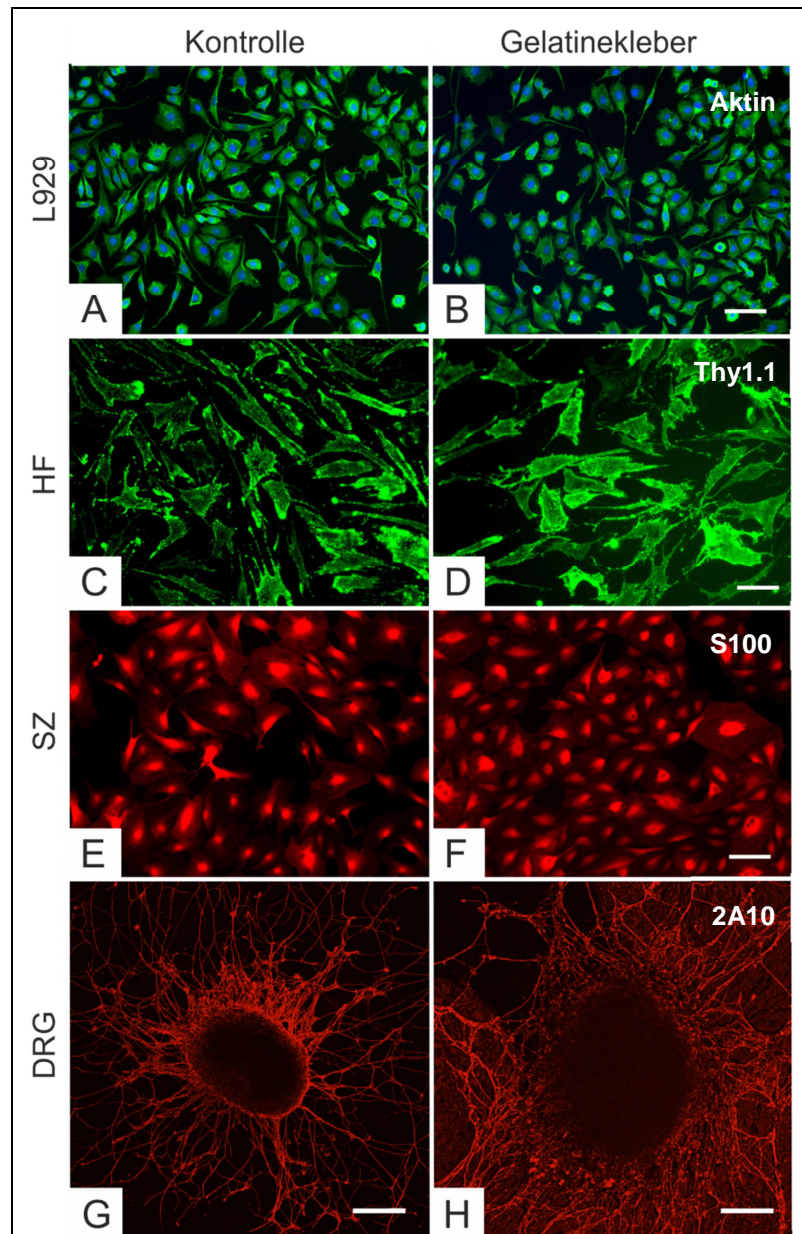
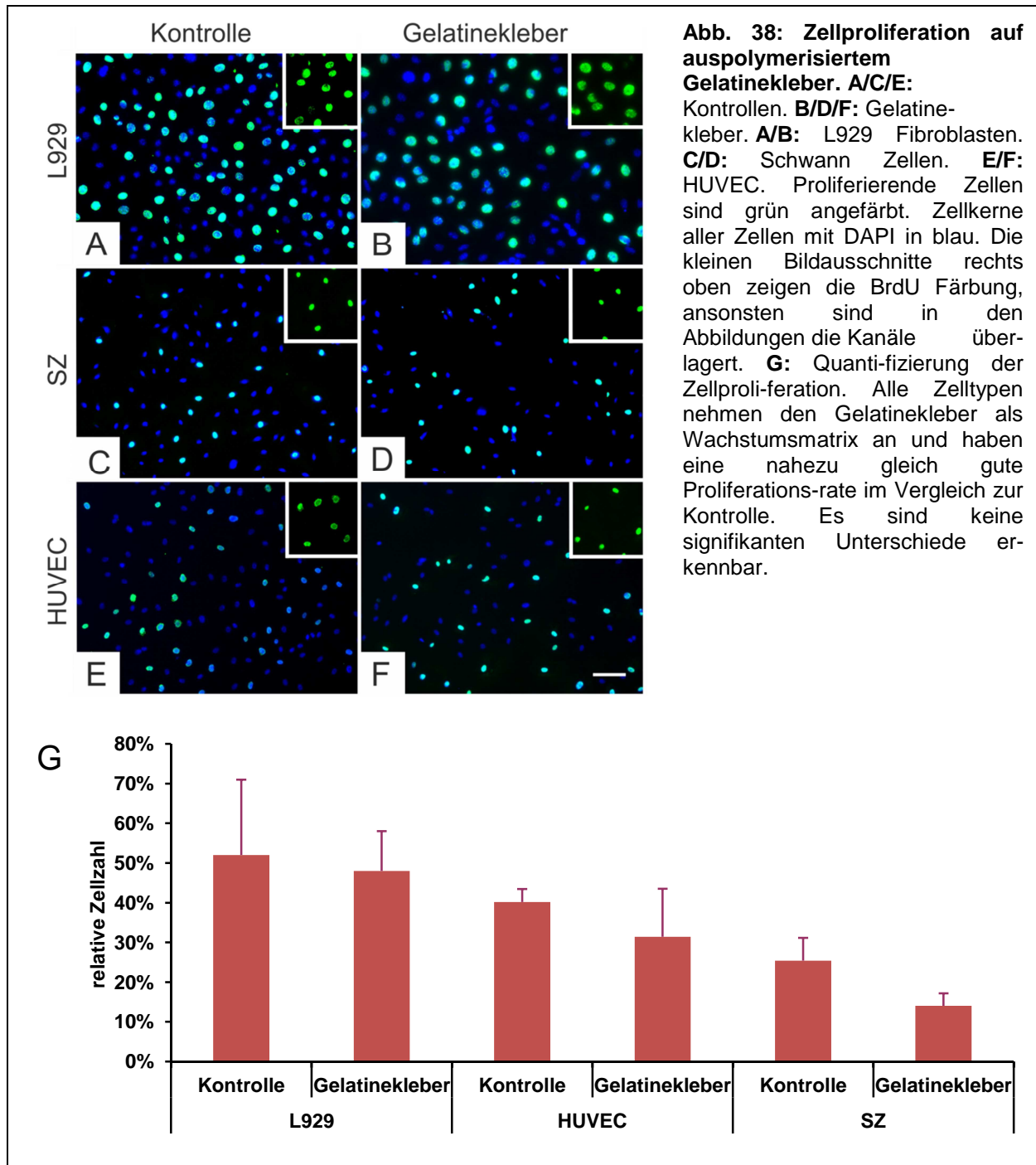


Abb. 37: Zelldifferenzierung auf Gelatinekleber. A/C/E/G: Kontrollen. **B/D/F/H:** Gelatinekleber. **A/B:** L929 Fibroblasten. Immunfärbung gegen Aktin (grün). Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau). **C/D:** Hautfibroblasten (HF). Die Zellen sind gegen Thy 1.1 grün angefärbt. **E/F:** Schwann Zellen (SZ). Sie sind rot gegen S100 angefärbt. **G/H:** Dorsale Hinterwurzelganglien aus Hühnchen. Die Axone sind rot gegen 2A10 angefärbt. Alle Zellen nehmen den Gelatinekleber als Wachstumsmatrix an und differenzieren. Axone sind in der Lage auszuwachsen. Maßstab: A-F 100 µm; G/H: 200 µm.

Ergebnisse

Um den Gelatinekleber weiter zu charakterisieren, sollte in einem nächsten Versuch die Proliferationsrate verschiedener Zelltypen auf dem Gelatinekleber bestimmt werden. Dafür wurden erneut verschiedene Zelltypen auf auspolymerisierter Gelatine ausgesät, für einige Stunden mit BrdU inkubiert und anschließend die neu entstandenen Zellen über eine Immunfärbung angefärbt. Um den Anteil proliferierender Zellen bestimmen zu können, wurden die Zellen anschließend noch mit dem Kernfarbstoff DAPI gegengefärbt.



Alle Zelltypen zeigten eine ähnlich hohe Proliferationsrate auf dem Gelatinekleber im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 38). Auf den mikroskopischen Aufnahmen ist kaum ein Unterschied zwischen den Kontroll- und Testbedingungen erkennbar. Bei der quantitativen Analyse der Daten wurde deutlich, dass die L929 Fibroblasten und die HUVEC eine wesentlich höhere Proliferationsrate besaßen, als die primären Schwann Zellen. Zwischen den verschiedenen Bedingungen konnte allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden, obwohl auf den Gelatineoberflächen stets niedrigere Werte gemessen wurden.

Fazit

Verschiedene Zelltypen nehmen den Gelatinekleber als Wachstumsmatrix an und differenzieren und proliferieren ähnlich wie unter Kontrollbedingungen.

2.2.3. Induktion von Angiogenese

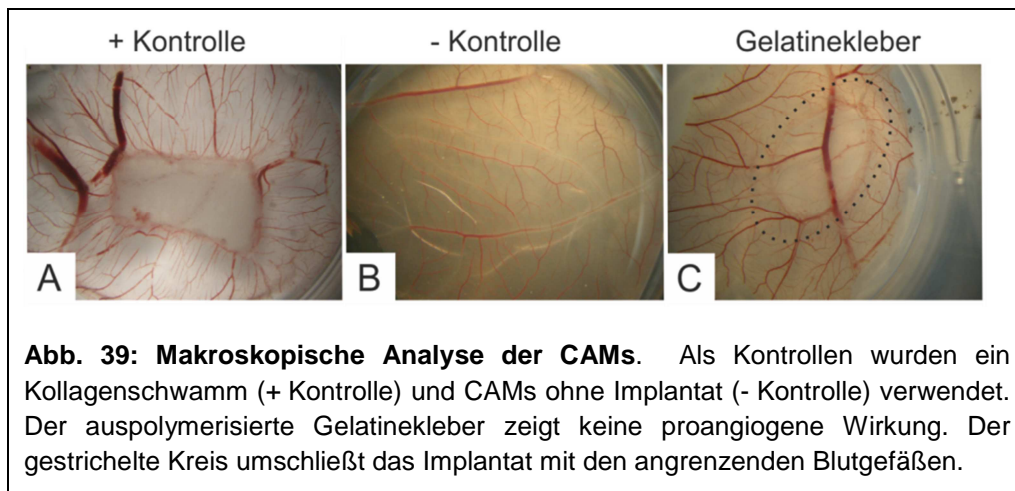
In der Wissenschaft hat sich im letzten Jahrhundert das Chorioallantoismembran (CAM) -Modell bereits zur Beantwortung vieler Fragenstellungen bewährt. So dient es unter anderem als *in vivo* Modell zur Bewertung von Angiogenese- und Antiangiogenese- Molekülen (Folkman 1984) sowie zur Studie der normalen Angiogenese (Rizzo and DeFouw 1993; Rizzo, Kim et al. 1995). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Modell verwendet, um die proangiogene Wirkung des Gelatineklebers zu bestimmen.

Wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, wurde das Ei bebrütet und anschließend gefenstert, um nach Ausbildung der Chorioallantoismembran eine Probe aufzulegen und für weitere sieben Tage zu inkubieren.

Nachdem die CAM entnommen und fixiert wurde, fand eine makroskopische Analyse der Proben statt. Dabei wurde mit einem Binokular die Probe mitsamt dem Umgebungsgewebe fotografiert. Dies sollte eine Einordnung der angiogenetischen Effekte oder Wechselwirkungen zwischen Probe und CAM ermöglichen. Als Kontrollen kamen dabei ein kommerziell erhältlicher Kollagenschwamm (Collatamp, Innocoll, Athlone, Irland) und CAMs ohne Implantat zum Einsatz. Als Ausgangsmaterial zur Analyse von Gelatineproben wurde der Gelatinekleber als

Ergebnisse

200 µl Tropfen angesetzt in 10 %iger Gelatine vernetzt mit Transglutaminase (30 U/ml) verwendet.



Wie in der Abb. 39 deutlich zu erkennen, führte ein Auflegen der Probe zu keiner Neuorientierung der Blutgefäße hin zur Probe. Nur bei der Kollagenkontrolle konnte innerhalb der Kultivierungsdauer von 7 d beobachtet werden, wie die Blutgefäße sich in einer strahlenförmigen Anordnung um das Implantat verteilen und es immer mehr umschließen (Abb. 39 A). Die – Kontrolle ohne Implantat zeigte keine Veränderung der Orientierung der Blutgefäße (Abb. 39 B) vergleichbar mit dem aufgelegten Gelatineklebertropfen (Abb. 39 C).

Fazit

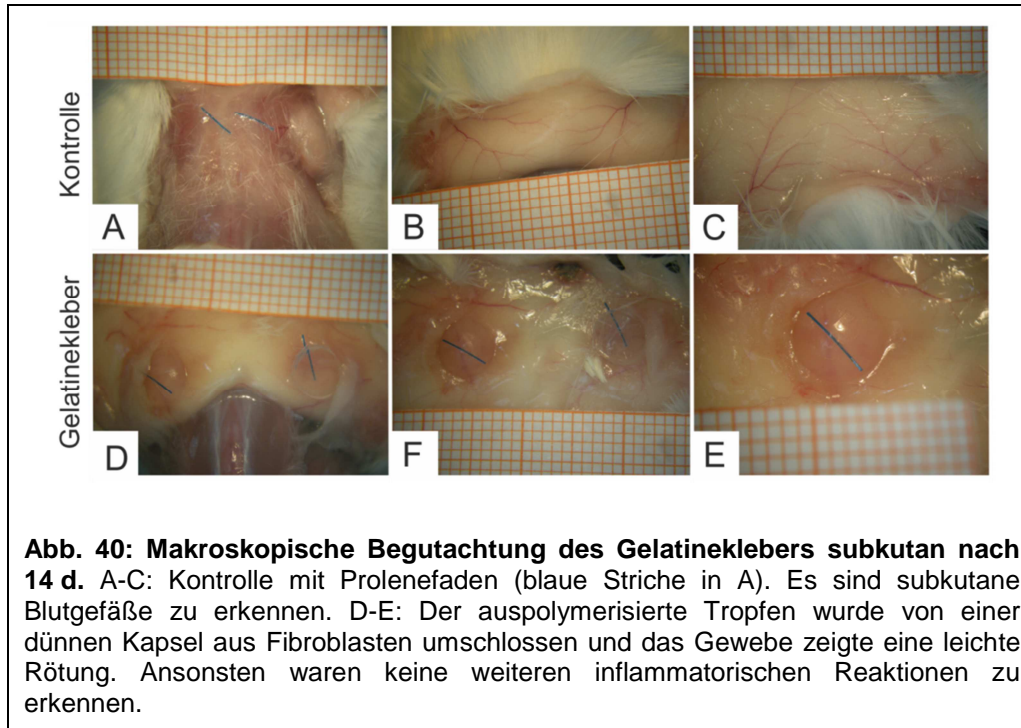
Der Gelatinekleber wirkt nicht proangiogen.

2.2.4. Inflammatorische Reaktion

Nachdem der Gelatinekleber ausführlich *in vitro* und *in ovo* getestet worden war, sollte er nun als auspolymerisierter Tropfen subkutan in die Maus implantiert werden, um die eventuelle Immunreaktion genauer untersuchen zu können. Hierfür wurden auspolymerisierte 200 µl Tropfen hergestellt und in je zwei Hauttaschen pro Maus implantiert. Als Kontrollen dienten Tiere, die pro Hauttasche je ein Stück (0,5 cm) Prolenefaden erhielten. Die Operation der Tiere wurde wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte beim Eröffnen der

Tiere makroskopisch, anschließend wurden die Implantate freipräpariert und samt umliegendem Gewebe entnommen.

Der Gelatinekleber zeigte, vergleichbar mit der Kontrolle, kaum inflammatorische Reaktionen, wie starke Rötungen oder das Einwachsen von Blutgefäßen. Es war lediglich eine dünne Kapsel aus Fibroblasten um das Implantat zu erkennen.



Fazit

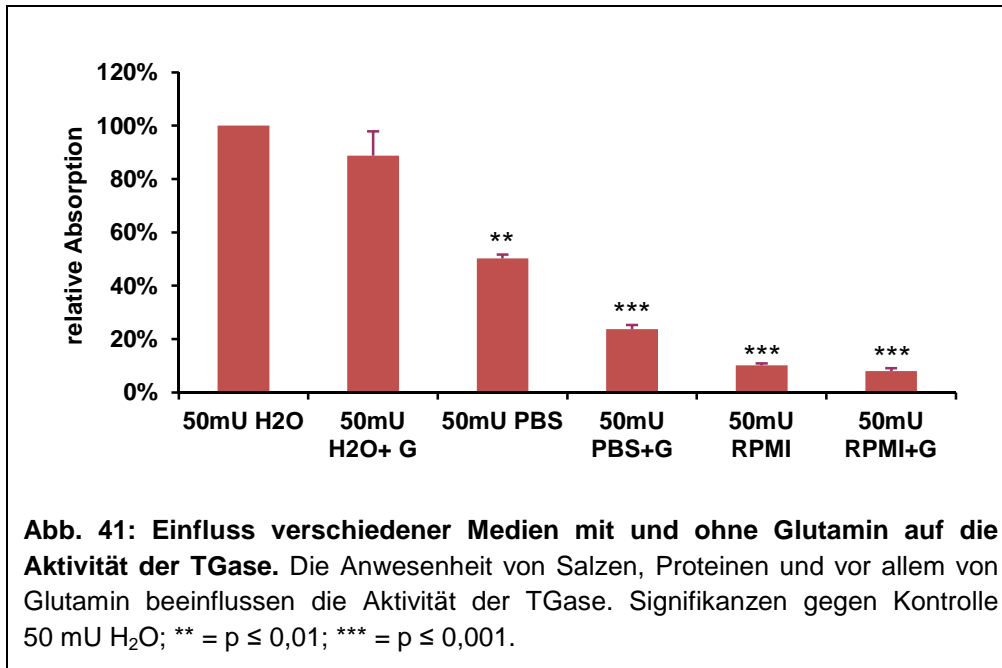
Der Gelatinekleber löst nach einer makroskopischen Analyse subkutan implantiert nur eine geringe inflammatorische Reaktion aus.

2.2.5. Transglutaminase Restaktivität

In diesem Versuchsteil sollte die Transglutaminase (TGase) -Aktivität nach Auspolymerisierung des Gelatineklebers untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde erneut der bereits etablierte ELISA basierend auf einem Assay-Kit verwendet. Im Assay enthalten waren Cadaverin-beschichtete 96-Well Platten. Mit dem Assaymix wurde Biotin zugegeben, dessen kovalente Bindung an freie Aminogruppen des Cadaverins durch Transglutaminase katalysiert wird. Nachgewiesen wurde das entstandene Reaktionsprodukt mit Streptavidin-Peroxidase. Aus der Menge an gebundenem Biotin kann man dann auf die Menge an aktiver Transglutaminase schließen.

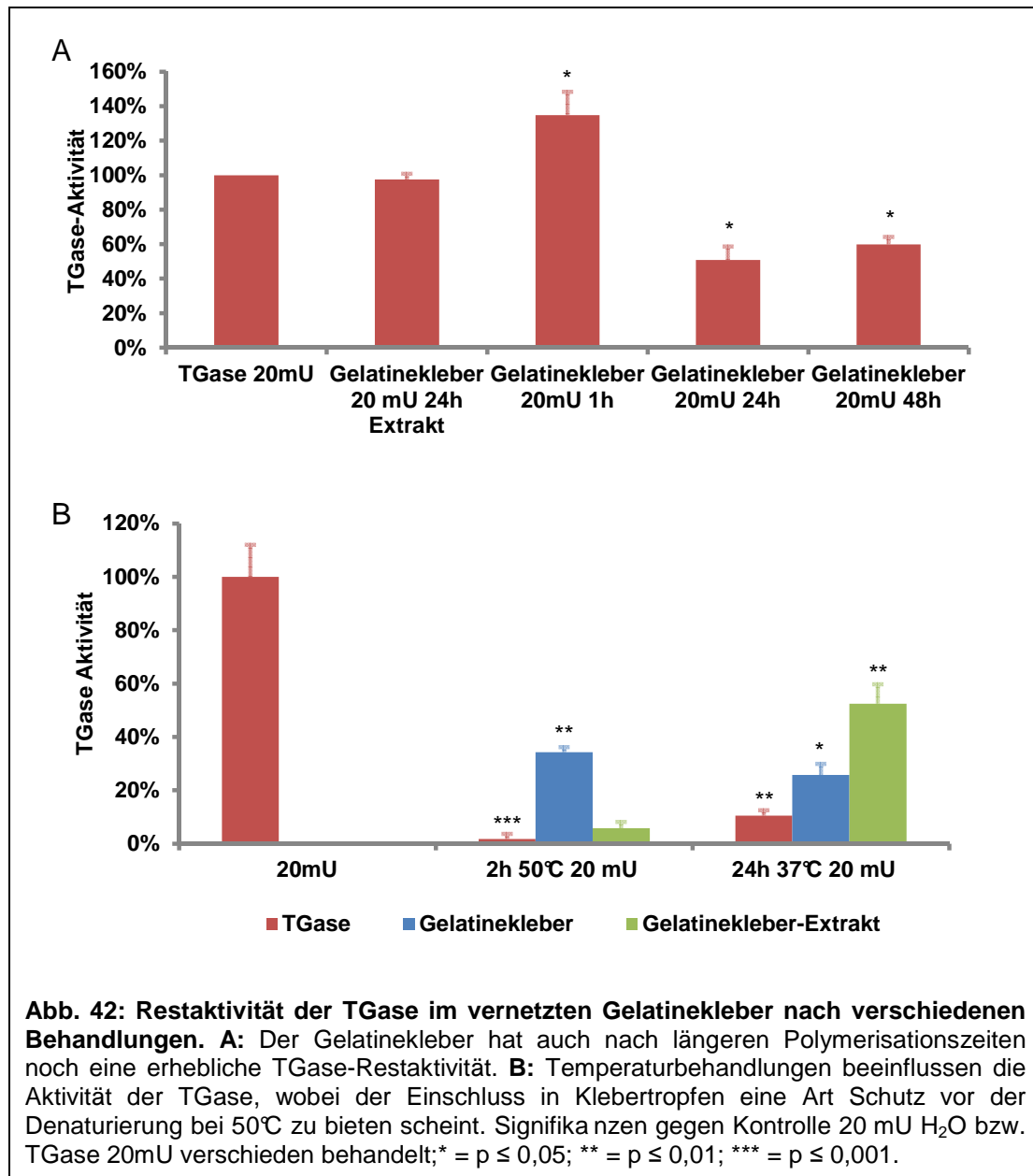
Zur weiteren Charakterisierung des Assays wurde zunächst untersucht, ob verschiedene Medien und die Zugabe von Glutamin einen Einfluss auf die gemessene TGase Aktivität hat. Hierfür wurde Transglutaminase (50 U/ml) in H₂O, PBS und im Zellkulturmedium RPMI jeweils mit und ohne Glutamin angesetzt und als Proben in den ELISA pipettiert.

In Abb. 41 sind die normierten Ergebnisse des ELISAs dargestellt. Es wird deutlich, dass mit zunehmender Konzentration an Salzen und Proteinen die TGase Aktivität niedriger wurde. Dies könnte entweder ein Hinweis darauf sein, dass der Assay durch diese beeinflusst wurde, oder dass die TGase in ihrer Aktivität durch die Anwesenheit von Salzen und Proteinen herabgesetzt wurde. Deutlich wird außerdem, dass die Aktivität der TGase stark von Glutamin in den Medien beeinflusst wurde. Dies war allerdings nicht weiter verwunderlich, da Glutamin ein Substrat der TGase ist (Griffin, Casadio et al. 2002).



In weiteren Versuchen wurde nun die Restaktivität des Gelatineklebers nach dem Auspolymerisieren bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Klebertropfen auspolymerisiert und anschließend in Wasser zerkleinert, um die Proben in den Assay einbringen zu können. Für einige Proben wurde ein Extrakt des Klebertropfens hergestellt, für andere wurde der Gelatinekleber direkt in Wasser gelöst zugegeben.

In Abb. 42 sind die Ergebnisse des ELISAs dargestellt. Im auspolymerisierten Kleber war noch eine erhebliche Restaktivität der TGase festzustellen. Selbst nach mehreren Stunden Polymerisationszeit oder der Herstellung des Extraktes war die Restaktivität immer noch bei mind. 50 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 42 A).



In einem weiteren Ansatz sollte nun untersucht werden, ob Hitze die Aktivität der TGase beeinflusst. Das Temperaturoptimum der TGase liegt bei 37°C und nimmt bei Erhöhung der Temperatur rasch ab. Es wurden wiederum Klebertropfen direkt und deren Extrakt bei verschiedenen Temperaturen untersucht (Abb. 42 B). Die Aktivität der TGase nimmt in Anwesenheit hoher Temperaturen (2 h 50°C) oder wenn sie für längere Zeit ihrem Temperaturoptimum (24 h 37°C) ausgesetzt ist signifikant ab (Abb. 42 B, rote Balken). Bei 50°C scheint der Einschluss in den Gelatinekleber eine Art schützende Wirkung zu haben. Hier ist die Aktivität zwar gegenüber der Kontrolle ohne Temperatureinfluss erniedrigt, aber auch signifikant erhöht gegenüber der

reinen TGaselösung. Ähnliches gilt für die Werte bei 37°C. Hier hat allerdings auch der Extrakt eine unerwartet signifikant höhere Restaktivität.

Fazit

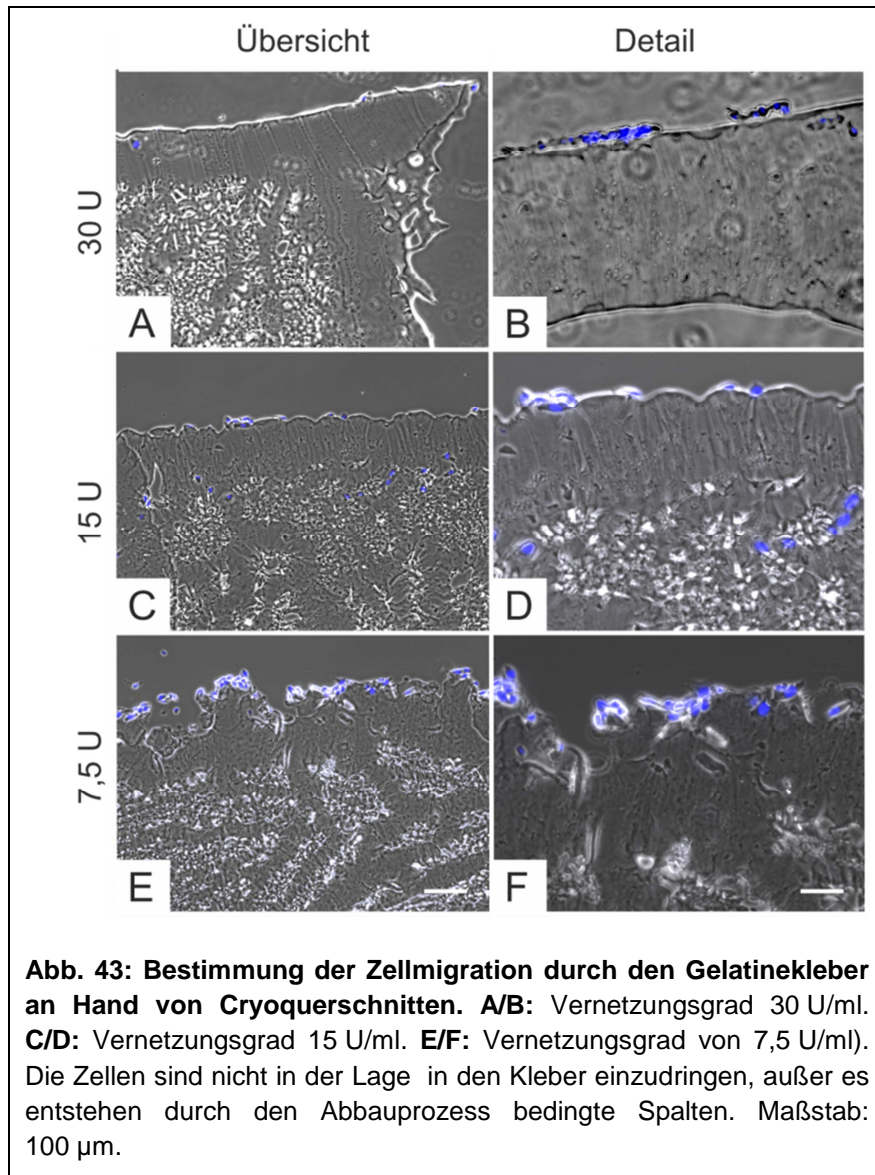
Salze und Proteine, vor allem Glutamin, haben einen hohen Einfluss auf die messbare TGase Aktivität.

Der Gelatinekleber zeigt eine hohe TGase-Restaktivität, die durch Temperaturbehandlung nur bedingt reduziert werden kann.

2.2.6. Zellmigration

Soll der Gelatinekleber zur Implantation der Nervenleitschiene verwendet werden, so muss es Zellen und Axonen möglich sein diesen zu durchdringen. Im folgenden Versuchsabschnitt wurden zur Untersuchung dieses Sachverhalts zwei Assays etabliert, um zu analysieren, ob Fibroblasten in der Lage sind Gelatinekleber verschiedener Vernetzungsgrade zu durchwandern.

In einem ersten Ansatz wurden Zellen auf zuvor auspolymerisierte Gelatineklebertropfen ausgesiedelt und über mehrere Tage in Kultur genommen. Anschließend wurden die Zellen in PFA fixiert und Cryoquerschnitte hergestellt. Zur besseren Ansicht der Zellen wurden die Zellkerne vor der mikroskopischen Betrachtung mit DAPI angefärbt.

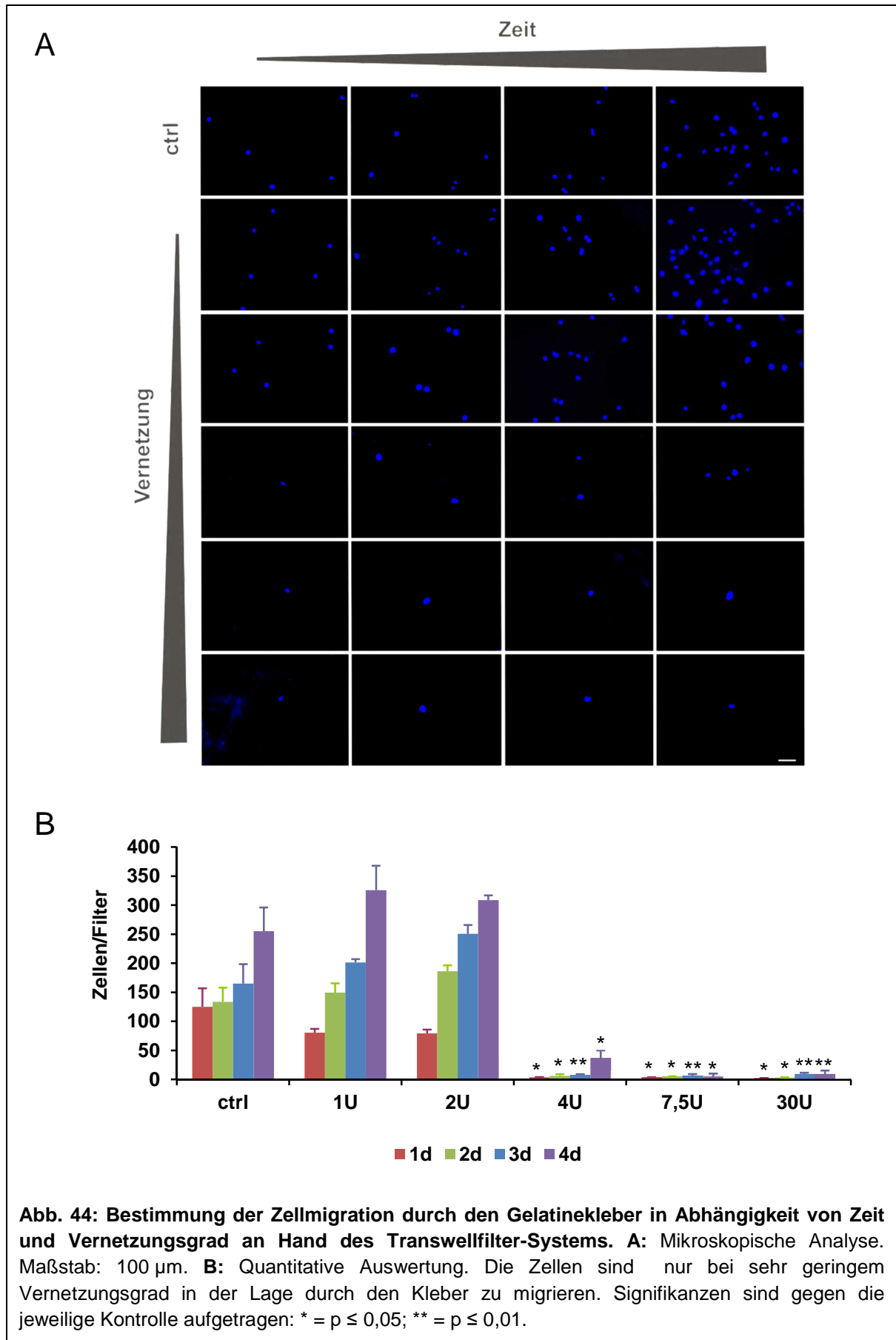


In diesem Versuchsteil wurde deutlich, dass die Zellen unabhängig vom Vernetzungsgrad nicht durch den Kleber wandern konnten (Abb. 43). Nur wenn im Laufe des Abbauprozesses Ritzen und Spalten im Gelatinekleber entstanden, war es den Zellen möglich in diese zu migrieren.

Zur Bestätigung der Ergebnisse des ersten Versuchsabschnitts wurde außerdem ein zweiter Versuchsansatz etabliert. Hierfür wurden Transwellfilter, wie im Material und Methoden Teil beschrieben, mit verschieden stark vernetztem Gelatinekleber beschichtet und mit Fibroblasten besiedelt. Nach verschieden langen Inkubationszeiträumen wurde anschließend die Zellzahl bestimmt, die durch den

Filter gewandert war, indem der Filter in PFA fixiert und anschließend mikroskopisch die Zellzahl unterhalb des Filters bestimmt wurde.

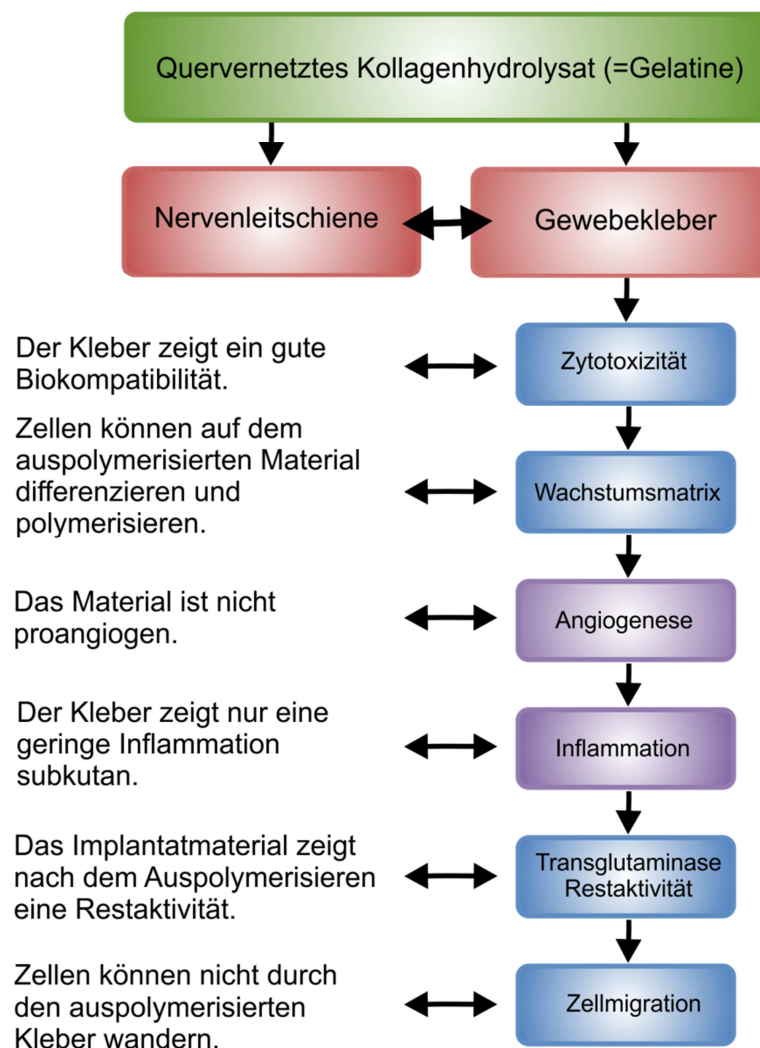
Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde deutlich, dass auch hier die Zellen unabhängig von Zeit und Vernetzungsgrad des Klebers nicht in der Lage waren diesen zu durchdringen (Abb. 44). Lediglich bei einer Vernetzung des Klebers mit 1 und 2 U/ml Transglutaminase konnten die Zellen den beschichteten Filter durchwandern. Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass diese Kleber eine sehr wässrige Struktur hatten und wahrscheinlich bei Zugabe der Zellen in Medium sich vom Filter abgelöst haben. Auch bei der quantitativen Analyse der Versuche wurde deutlich, dass ab einer Vernetzung von 4 U/ml, die zum Implantieren einer Nervenleitschiene mindestens notwendig wären, kaum Zellen in der Lage waren durch den Kleber zu migrieren.



Fazit

Fibroblasten ist es nicht möglich durch den Gelatinekleber zu migrieren, unabhängig von Zeit und Vernetzungsgrad.

2.2.7. Zusammenfassung



2.3. Nervenimplantationen

2.3.1. Kleben oder Nähen?

Für die *in vivo* Implantationen der Nervenleitschiene muss getestet werden mit Hilfe welches Verfahrens das Implantat an den Nervenstümpfen befestigt werden kann. Es wurde analysiert, ob sich die Nervenleitschienen mit chirurgischem Nahtmaterial vernähen lassen oder ob die Implantate geklebt werden müssen. Zu diesem Zweck wurden gesunde aus Ratten explantierte Ischiasnerven in die Gelatineröhrchen genäht oder geklebt und anschließend zur Überprüfung der Zugfestigkeit in eine Zugprüfmaschine eingespannt. Als Kontrollen dienten ein gesunder intakter Nerv, sowie ein Nerv, dessen Enden nach Durchtrennung anschließend wieder über Nahtfäden adaptiert wurden.

Alle Röhrentypen (temp.-steril, γ -steril und unsteril) konnten mit den Nerven vernäht werden. Die γ -sterilen Röhren rissen aber bei der geringsten Belastung aus, so dass es nicht möglich war, sie in die Zugprüfmaschine einzuspannen. Der intakte Nerv erreichte bei der Zugprüfung eine Maximalkraft von 1,1 N (Abb. A). Im Gegensatz dazu waren die Kräfte des vernähten Nerven und der adaptierten Implantate teils hoch signifikant darunter. Die vernähten Implantate wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf, allerdings lag die Zugkraft der temp.-sterile Röhre dem vernähten Nerven am nächsten. Die geklebte Röhre zeigte mit 0,04 N die schwächste Zugkraft der untersuchten Proben.

In Abb. B sind außerdem noch exemplarische Verläufe (Kraft gegen Weg) der Zugprüfung einzelner Implantate aufgetragen. Hier wird deutlich, dass der intakte und der vernähte Nerv zunächst einen sehr steilen Anstieg der Kraft zeigen. Dies könnte auf die Flexibilität des Nervengewebes zurückzuführen sein. Der kurze Einbruch der Zugkraft des intakten Nerven bei 5,5 mm Wegstrecke hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass einzelne wenige Nervenfasern zu diesem Zeitpunkt reißen. Alle vernähten oder geklebten Implantate zeigten einen eher flachen, fast linearen Anstieg der Zugkraft bis zu einem plötzlichen steilen Abfallen auf null. Bei diesem Zeitpunkt kam es zum Abriss der Röhre. Alle Implantate rissen bei ihrer erreichten maximalen Zugkraft an den Nähten aus (Abb. C).

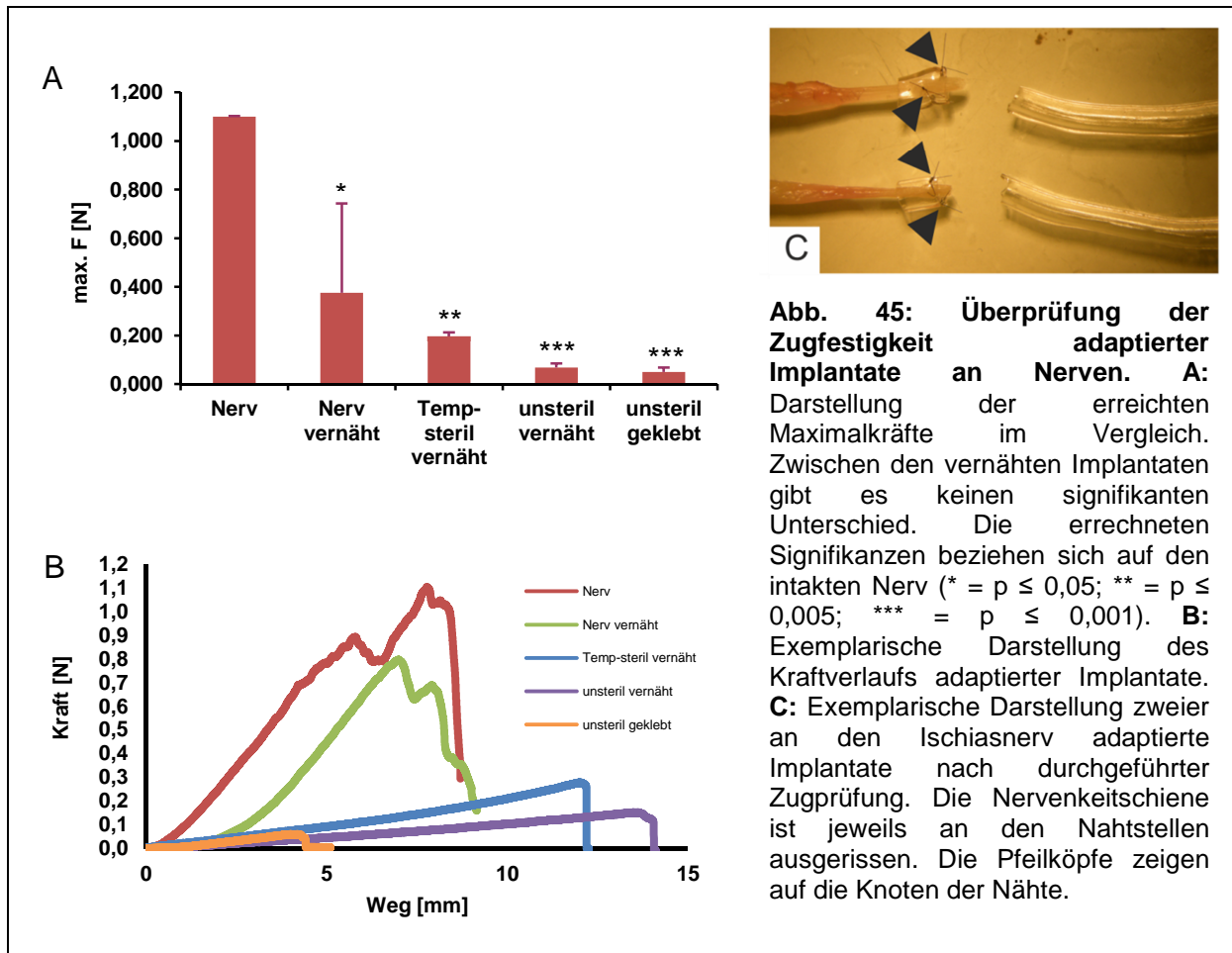


Abb. 45: Überprüfung der Zugfestigkeit adaptierter Implantate an Nerven. **A:** Darstellung der erreichten Maximalkräfte im Vergleich. Zwischen den vernähten Implantaten gibt es keinen signifikanten Unterschied. Die errechneten Signifikanzen beziehen sich auf den intakten Nerv (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$). **B:** Exemplarische Darstellung des Kraftverlaufs adaptierter Implantate. **C:** Exemplarische Darstellung zweier an den Ischiasnerv adaptierte Implantate nach durchgeführter Zugprüfung. Die Nervenkeitschiene ist jeweils an den Nahtstellen ausgerissen. Die Pfeilköpfe zeigen auf die Knoten der Nähte.

Fazit

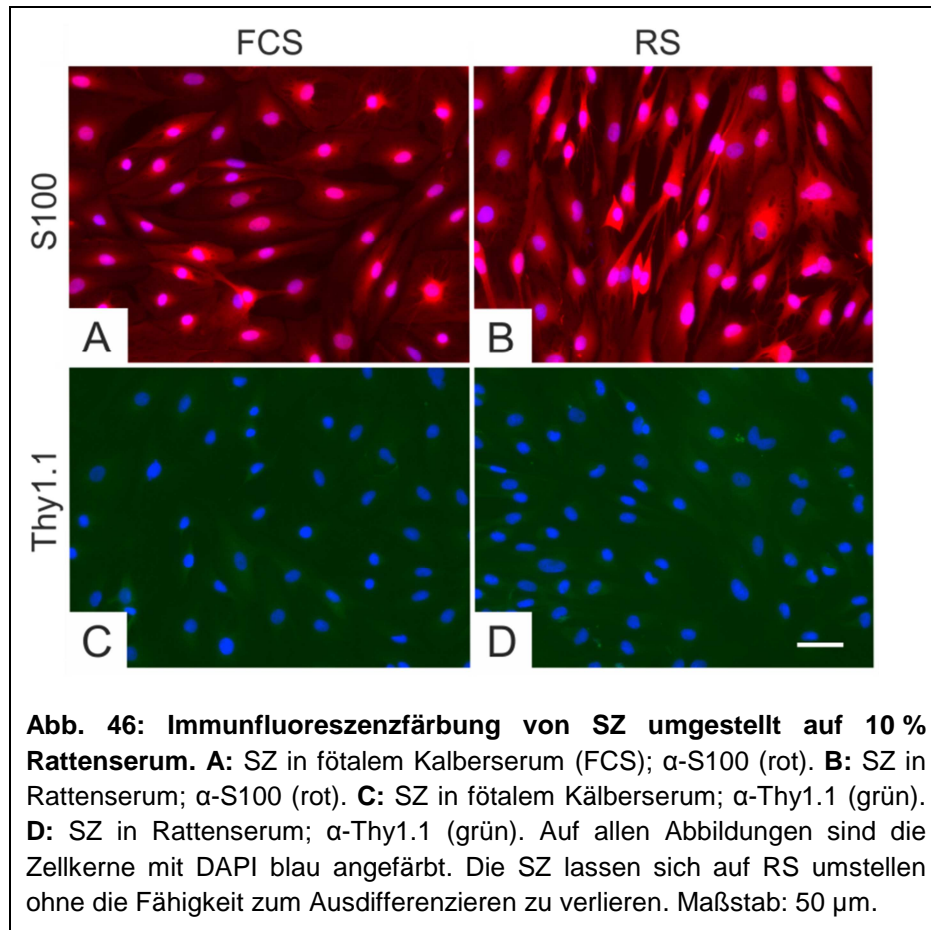
Die Gelatineimplantate können erfolgreich vernäht werden, dabei zeigte die hochtemperatursterilisierte Röhre die höchste Zugkraft.

2.3.2. Vorbereitung von Schwann Zellen auf Implantation

Um die Schwann Zellen für die folgenden *in vivo* Implantationen im Gelatineimplantat verwenden zu können, müssen sie zunächst auf ein anderes Medium umgestellt werden. Vor allem soll durch die Umstellung möglicherweise immunogenes Fremdprotein aus dem Medium entfernt werden. Deshalb wurde in dem folgenden Versuchsabschnitt versucht das fötale Kälberserum (FCS) durch ein Serum aus der Ratte (RS) zu ersetzen. Hierfür wurde schrittweise wie oben beschrieben der Anteil an FCS verringert und durch RS ersetzt. Nach der erfolgten Umstellung auf reines

Ergebnisse

RS wurden die Zellen noch zwei Mal gesplittet, abschließend fixiert und mit einem typischen Marker für Schwann Zellen (S100) angefärbt. Zur Überprüfung der Reinheit der Kultur und um möglicherweise de-differenzierte Zellen anzufärben wurde außerdem mit einem Antikörper gegen das für Fibroblasten typische Thy1.1 gefärbt.



Die Immunfluoreszenz der Zellen zeigte eine starke Anfärbung der Zellen für den SZ typischen Marker S100 (Abb. 46 B). Die Schwann Zellen de-differenzieren also im Verlauf und auch nach Ende der Umstellung auf Rattenserum nicht. Sie zeigen außerdem immer noch die für SZ typische Morphologie (Abb. 46 B). Vergleichbar mit der Kontrolle ist die Kultur immer noch eine reine SZ Kultur, die keine positiven Zellen für Thy1.1 aufweist (Abb. 46 C und D). Für die folgenden *in vivo* Implantationen können Zellen kultiviert in Medium mit 10 % Rattenserum also verwendet werden.

Fazit

Schwann Zellen können erfolgreich auf Rattenserum umgestellt und damit kultiviert werden.

2.3.3. *In vivo* Implantationen

Für die *in vivo* Implantationen wurden 66 Versuchstiere (Lewis Ratten, weiblich) vor Beginn der OPs in neun Gruppen á 4-6 Tiere eingeteilt (Schein OP, autolog revers, Gelatineröhre mit und ohne Schwann Zellen). Die Zeitpunkte zur Explantation wurden auf 3, 6 und 9 Monate festgelegt. Der Eingriff erfolgte jeweils am *N. ischiadicus* der linken Seite und wurde jeweils wie im Material und Methoden-Teil beschrieben durchgeführt. Als Implantate wurden hitzesterilisierte Gelatineröhren verwendet, in die die Nervenstümpfe eingenäht wurden. Die Gelatineröhren wurden vor der Operation jeweils für 5 min in sterilem 0,9 % NaCl quellen gelassen.

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse verschiedener Analysemethoden beschrieben.

Funktionale Untersuchung der Nervenregeneration (SFI)

Mit Hilfe der Laufabdruckmusteranalyse (*Sciatic function index* - SFI) kann die Regeneration des *N. ischiadicus* extern und nicht-invasiv evaluiert werden (u.a.). Sie ermöglicht eine Aussage über den zeitlichen Verlauf des Heilungsprozesses der Tiere ohne den Einfluss einschreitender Schritte wie beispielweise erneute operative Eingriffe in Kauf nehmen zu müssen.

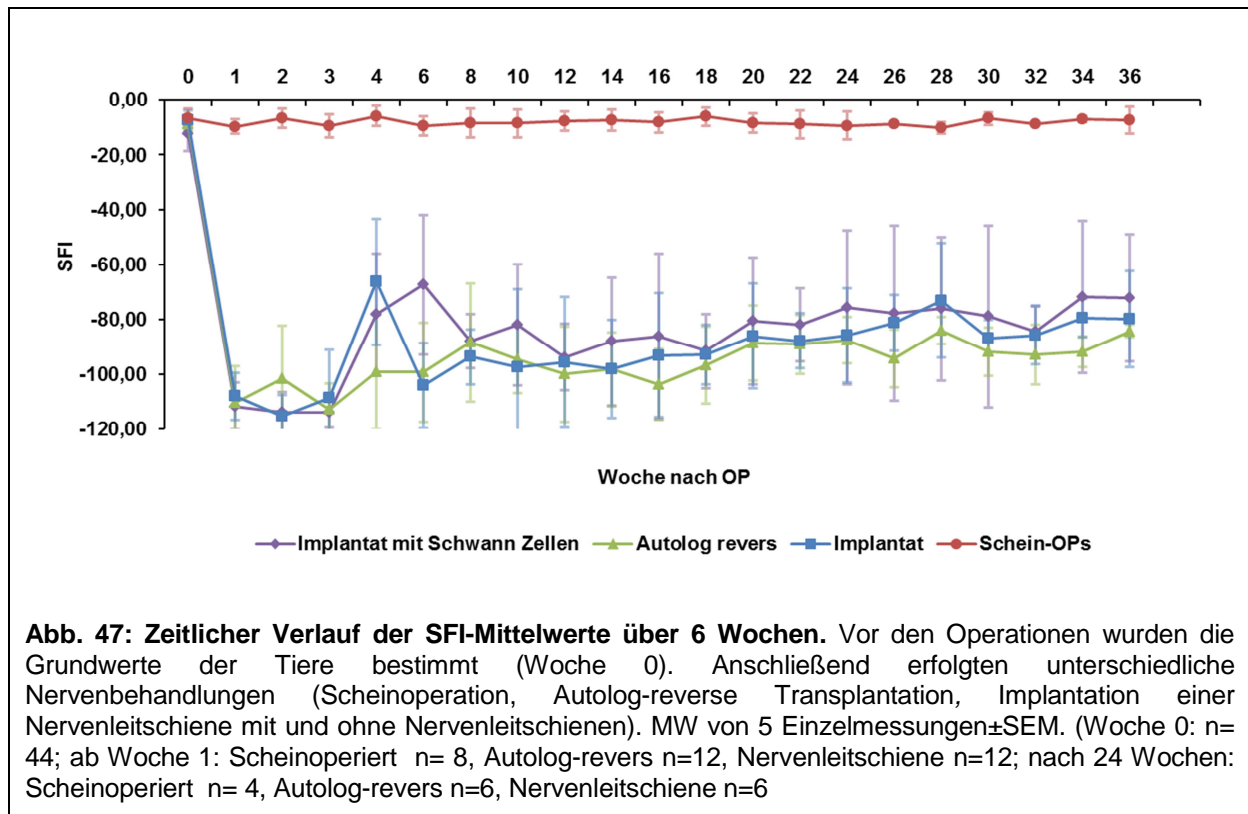
Zur Messung des SFI wurden die Tiere mit den Hinterläufen auf ein Stempelkissen gesetzt und anschließend durch einen Laufsteg über Papier laufen gelassen. Für die Messungen wurden die Tiere, die nach 6 – und 9 – Monaten explantiert wurden (44 Tiere), analysiert. Bei den 3 – Monats Tieren wurde auf eine Analyse verzichtet, da die Datenerhebung mit einer Belastung für die Tiere einhergeht, sehr aufwendig ist und in diesem Fall mit einer erheblichen Redundanz verbunden wäre (die Werte bis zu 3 Monaten werden mit Hilfe der anderen Tiere auch erhoben).

Vor Beginn der Operationen wurden die trainierten Tiere zur Bestimmung einer Grundlinie jeweils einmal (entspricht jeweils fünf individuellen Läufen) ausgemessen

Ergebnisse

(präoperative Messungen). Nachdem die Tiere sich eine Woche lang von den Strapazen des Eingriffs erholt hatten, wurden sie erneut gemessen und dies dann über einen Zeitraum von 6 – 9 Monaten hinweg in einem 14 – tägigen Turnus durchgeführt. Bei jedem Tier diente dabei der nicht-operierte Hinterlauf (rechts) als individuelle Kontrolle.

Die Mittelwerte der Ergebnisse sind in Abb. 47 dargestellt.



Die scheinoperierten Kontrolltiere blieben während des gesamten Versuches, auch nach der erfolgten Operation in ihren Laufmustern konstant und wiesen keinerlei signifikante Unterschiede in ihren SFI-Werten auf.

Nach den Operationen waren die Laufabdrücke aller anderen Tiere deutlich verändert im Vergleich zur Ausgangsmessung. Dadurch kam es, entsprechend der Definition, zu starken Abfällen der SFI-Werte (Abb. 47).

Die Tiere mit artifiziellen Implantaten fielen postoperativ zunächst auf einen niedrigeren Wert im Vergleich zur Ausgangsmessung ab, schienen sich dann bis Woche 4 bzw. 6 langsam zu erholen, um dann erneut abzufallen. Dieser dann erreichte Unterschied blieb während der weiteren Messungen konstant. Beide Kurven näherten sich

bestenfalls leicht an die der scheinoperierten Tiere an. Die Werte der Tiere mit autolog reversen Implantat zeigten über die alle Messzeitpunkte ein Auf und Ab. Nach 9 Monaten hatte sich die Kurve aber auch kaum an die der scheinoperierten Tiere angenähert.

Während des gesamten Versuches war kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der autolog-reversen und röhrenimplantierten Gruppe feststellbar. Der Unterschied zu den Tieren der scheinoperierten Gruppen war allerdings zu jedem Zeitpunkt postoperativ signifikant. In den 9 Monaten zeigten sich keine signifikanten Verbesserungen der SFI im Vergleich zur Woche 1, so dass sich die Werte der Tiere zum Abschluss der Experimente immer noch signifikant von den präoperativen Messungen unterschieden.

Innerhalb der einzelnen Gruppen waren die Varianzen zu allen Zeitpunkten der Messung sehr groß.

Abb. 48 zeigt exemplarische Fußabdrücke der Versuchsgruppen nach 6 Monaten. Es war ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen mit Implantat (Im) und den scheinoperierten (SO) Tieren zu erkennen. So konnte von den läsierten Beinen oftmals nicht mal der ganze Fußabdruck erkannt werden, da die Tiere seitlich auftraten (Abb. 48 Bsp. von Gruppe Im+SZ) oder die Zehen einzogen (Abb. 48 Bsp. von Gruppe AR).

Eine postoperative Analyse der Länge der Fußabdrücke der unbehandelten, rechten Hinterläufe zeigte, dass die Tiere Änderungen im Laufverhalten aufwiesen.

So waren die Fußabdrucklängen länger im Vergleich zu den präoperativen Messungen. Diese Abweichung fiel bei der scheinoperierten Kontrollgruppe minimal aus (0,15 cm). Bei den Tieren mit autologen Transplantaten und denen mit implantierter Nervenleitschiene waren die Differenzen höher (Autolog revers: 0,36 cm; Implantat: 0,41 cm und Implantat mit Schwann Zellen: 0,43 cm). Die Differenzen verbesserten sich während der Versuchszeit, erreichten jedoch bei keinem der Tiere das Ausgangsniveau (Abb. 48).

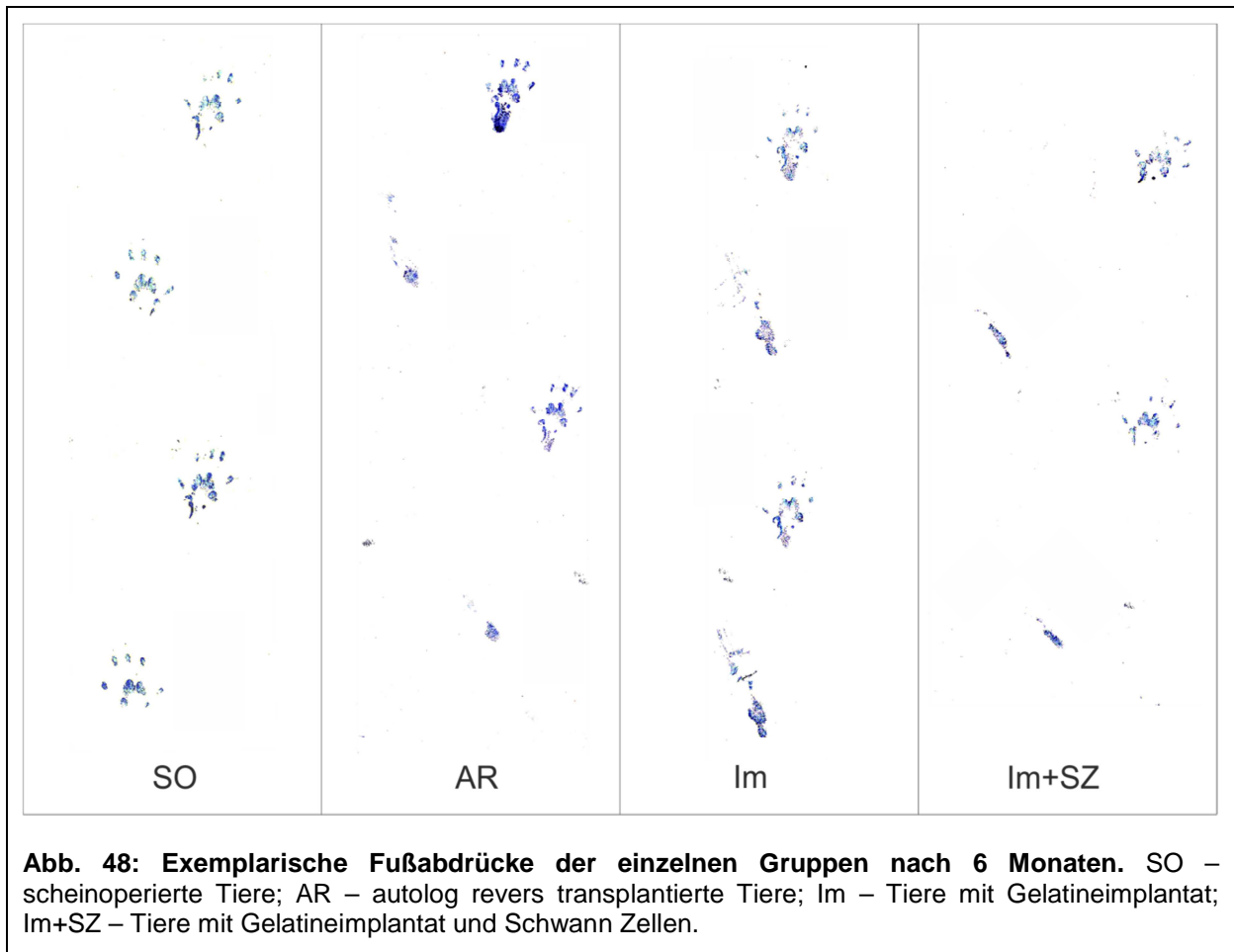
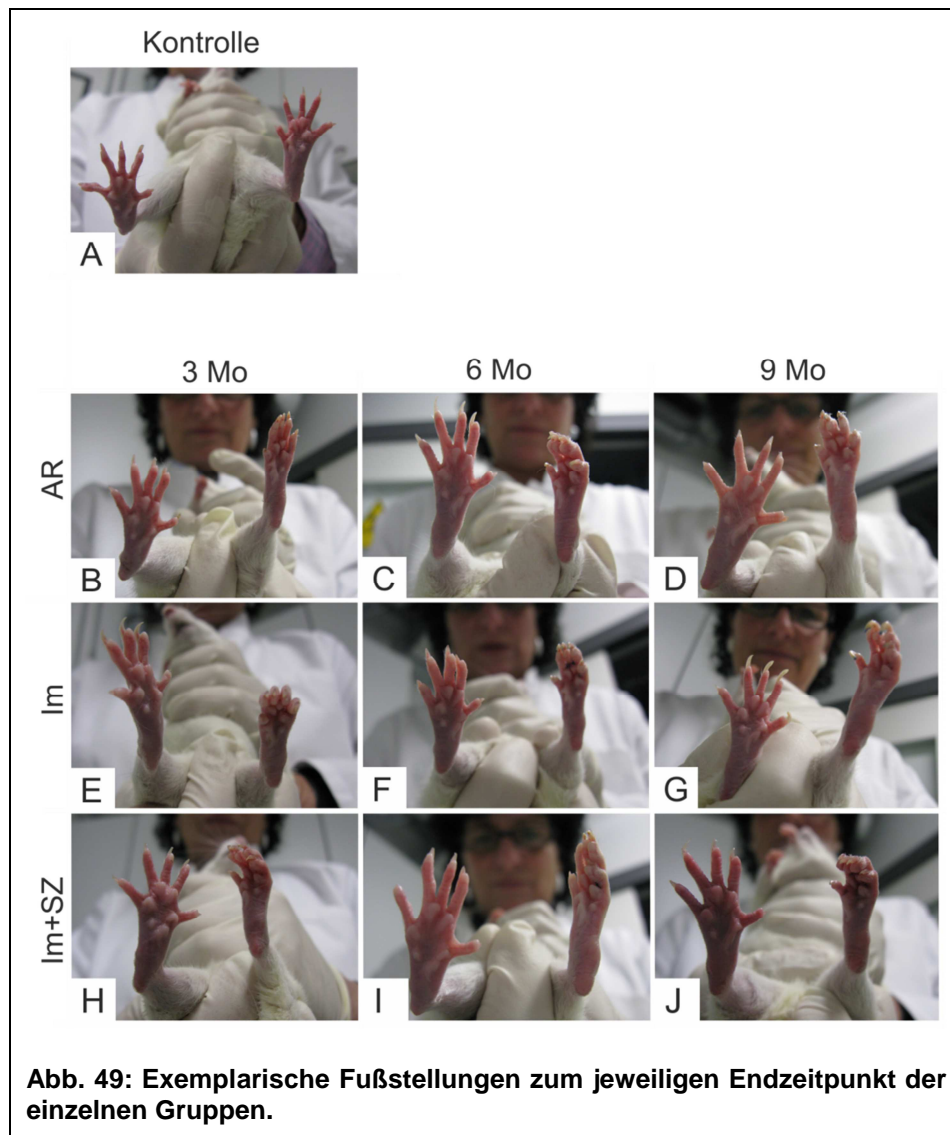


Abb. 48: Exemplarische Fußabdrücke der einzelnen Gruppen nach 6 Monaten. SO – scheinoperierte Tiere; AR – autolog revers transplantierte Tiere; Im – Tiere mit Gelatineimplantat; Im+SZ – Tiere mit Gelatineimplantat und Schwann Zellen.

Zusätzlich zur Erhebung der Daten des SFI wurden die Füße der Tiere kurz vor der jeweiligen Explantation der Nerven makroskopisch begutachtet, um einen weiteren Hinweis auf den Regenerationsfortschritt zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden die Tiere in der Luft so gehalten, dass die Hinterbeine fotografiert werden konnten.

In Abb. 49 sind exemplarische Bilder zu den einzelnen Gruppen dargestellt.

Hierbei wird deutlich, dass keines der Tiere den Ausgangszustand der Fußstellung erreichte. Wenn man sich allerdings die verschiedenen Gruppen im zeitlichen Verlauf betrachtet, so wird deutlich, dass bei dem autolog reversen Implantat sowie beim Gelatineimplantat ohne Schwann Zellen eine gewisse Spreizung der Zehen zu erkennen ist. Vor allem der große Zeh wurde von den meisten Tieren nach neun Monaten abgespreizt, was auf einen Fortschritt der Regeneration hinweist.



Fazit

Scheinoperierte Kontrolltiere zeigten über den gesamten Versuchsverlauf keinen Abfall der SFI-Werte

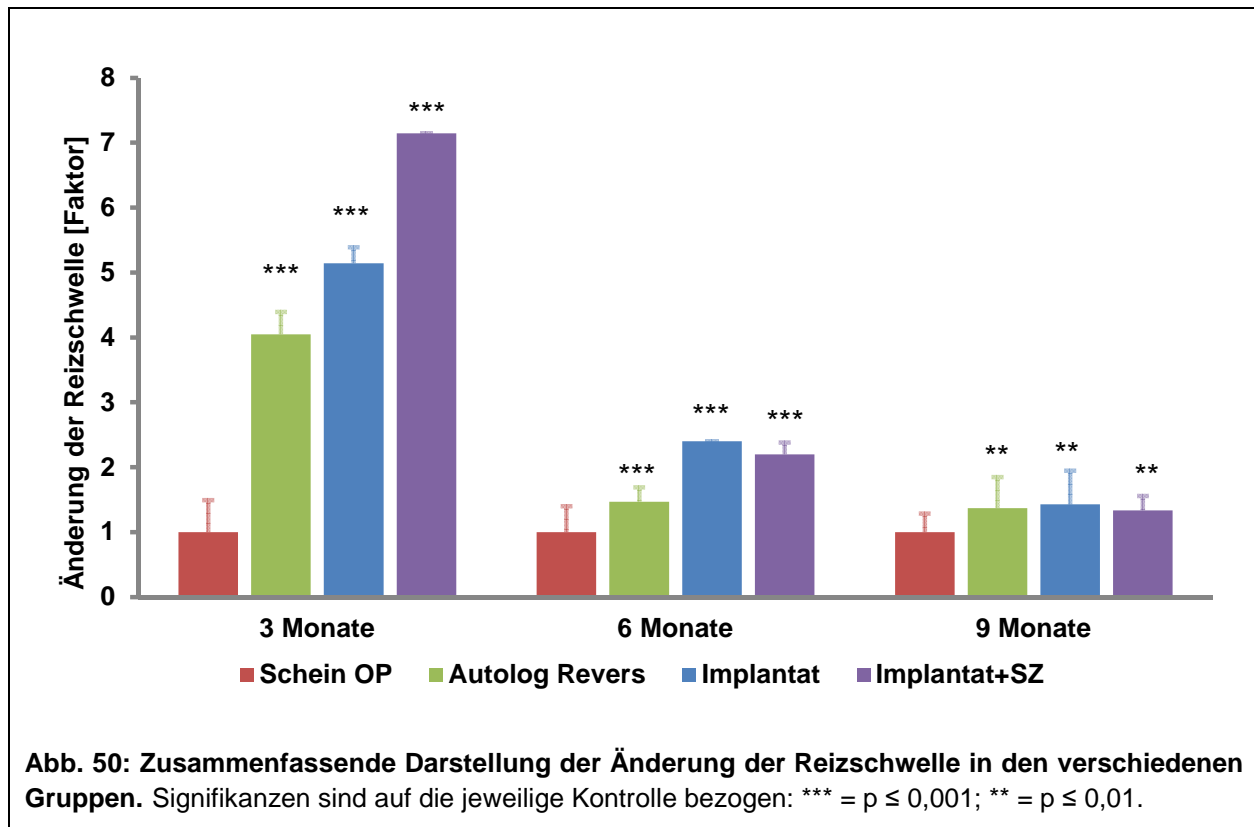
Bei Autolog-revers operierten und Tieren mit implantierter Nervenleitschiene kommt es zu keiner SFI-Regeneration.

Ergebnisse

Elektrophysiologische Ableitungen

Als weitere funktionelle Auswertung der regenerierten Nerven wurde elektrophysiologisch das „compound muscle action potential“ (CMAP) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere erneut in Narkose gelegt und der linke Ischiasnerv freipräpariert. Zur Analyse der Reizweiterleitung wurden eine Reizelektrode proximal am Nerv und eine Ableitelektrode am Muskel (*M. gastrocnemius*) angebracht. Zunächst wurde bei jedem Tier die Reizschwelle bestimmt. Hierbei wurden Reize mit ansteigender Amplitude (50 – 3000 mV) verabreicht. Als Reizschwelle galt der Reiz, bei dem ein CMAP ausgelöst werden konnte. Anschließend wurden ausgehend von dieser Reizschwelle jeweils 20 Reize (1 Reiz/Sekunde) gegeben und die Antwortsignale des Muskels aufgezeichnet. Dann wurden alle aufgezeichneten Signale bezüglich ihrer Amplitude und der Latenz ausgewertet. Zur Auswertung der Amplitude wurde manuell die erste Signalkurve jedes Reizes ausgewertet und über Excel eine Grafik erstellt (gemittelt über alle Tiere einer Gruppe pro Zeitpunkt). Eine verringerte Amplitude gibt Auskunft über eine verringerte Anzahl an Muskelfasern, Nervenfasern und Axonen (Bischoff 2008; Werdin, Grussinger et al. 2009; Werdin et al., 2009). Für die Latenz wurde die Zeit abgelesen, die der Reiz vom ersten Peak des Reizartefaktes bis zur ersten Signalkurve braucht. Diese Werte wurden ebenfalls mit Hilfe von Excel in einer Grafik dargestellt und verglichen.

In Abb. 50 ist die Änderung der Reizschwelle in den verschiedenen Gruppen dargestellt. Zu allen Zeitpunkten zeigten die unterschiedlichen Implantattypen eine signifikant höhere Reizschwelle im Vergleich zur jeweils entsprechenden Kontrolle. Allerdings war über die verschiedenen Zeitpunkte eine Tendenz der Annäherung an den Zustand der Kontrolle sichtbar. Dies ist ein Zeichen dafür, dass der *N. ischiadicus* auch nach 9 Monaten noch nicht seinen Ursprungszustand bezüglich der Zusammensetzung der Axone und Nervenfasern erreicht hat. Zwischen den verschiedenen Implantattypen gab es bei keinem der gemessenen Zeitpunkte einen Unterschied.



Auch die Auswertung der Amplituden ergab einen signifikanten Unterschied der verschiedenen Implantattypen gegenüber den jeweiligen Kontrollen an allen gemessenen Zeitpunkten (Abb. 51 A). Erstaunlicherweise nahm allerdings die Amplitude der scheinoperierten Tiere über die Messzeitpunkte von 3 nach 9 Monaten zu. Bei den autolog revers transplantierten Tieren war die Amplitude beim Vergleich der Implantate immer am höchsten, nach 3 Monaten sogar signifikant höher als die der scheinoperierten Tiere. Insgesamt zeigte sich innerhalb der Gruppen eine sehr hohe Varianz unter den Tieren.

Beim Vergleich der Latenzen war die Reizweiterleitung nach 3 Monaten Regenerationszeit in allen untersuchten Gruppen signifikant schlechter im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle (Abb. 51 B). Zwischen den Implantaten zeigte das autolog reverse Implantat die schnellste Erregbarkeit, das Gelatineimplantat mit Schwann Zellen schnitt am schlechtesten ab. Nach 6 Monaten war kein signifikanter Unterschied zwischen allen Gruppen zu erkennen. Allerdings zeigte sich auch hier oft eine sehr hohe Varianz innerhalb der einzelnen Gruppen und die gemessene Latenz lag im Mittel insgesamt sehr hoch. Nach 9 Monaten waren wieder signifikante Unterschiede zwischen den Implantaten und der zugehörigen Kontrolle erkennbar.

Ergebnisse

Hier war die Latenz der autolog revers transplantierten Tiere am höchsten, sie hatte sich im Gegensatz zu den 6 Monats Tieren nicht verändert. Die Tiere mit den artifiziellen Implantattypen zeigten eine Verbesserung der Latenz von 6 nach 9 Monate. Bei der Auswertung erschwerte die Tatsache, dass auch hier die scheinoperierten Tiere eine sehr hohe Varianz aufwiesen.

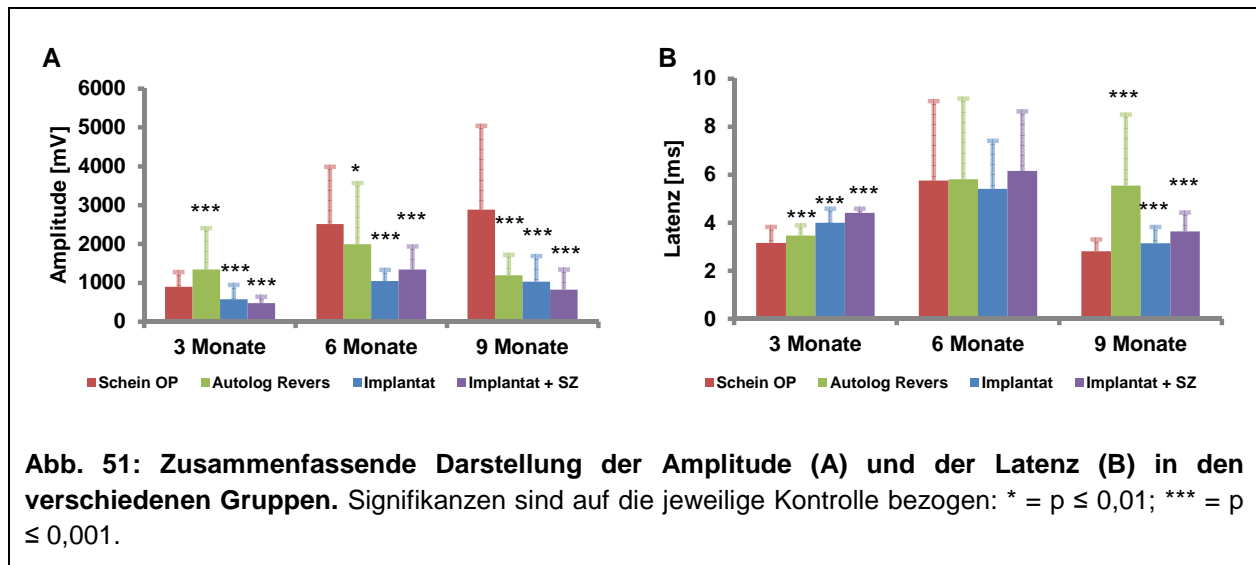


Abb. 51: Zusammenfassende Darstellung der Amplitude (A) und der Latenz (B) in den verschiedenen Gruppen. Signifikanzen sind auf die jeweilige Kontrolle bezogen: * = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Fazit

Bezüglich der Erregbarkeit des *N. ischiadicus*, haben die Nerven bei allen Implantattypen auch nach 9 Monaten nicht den Ausgangszustand erreicht.

Bezüglich der Reizschwelle kam es zu einer Annäherung an die scheinoperierte Kontrolle.

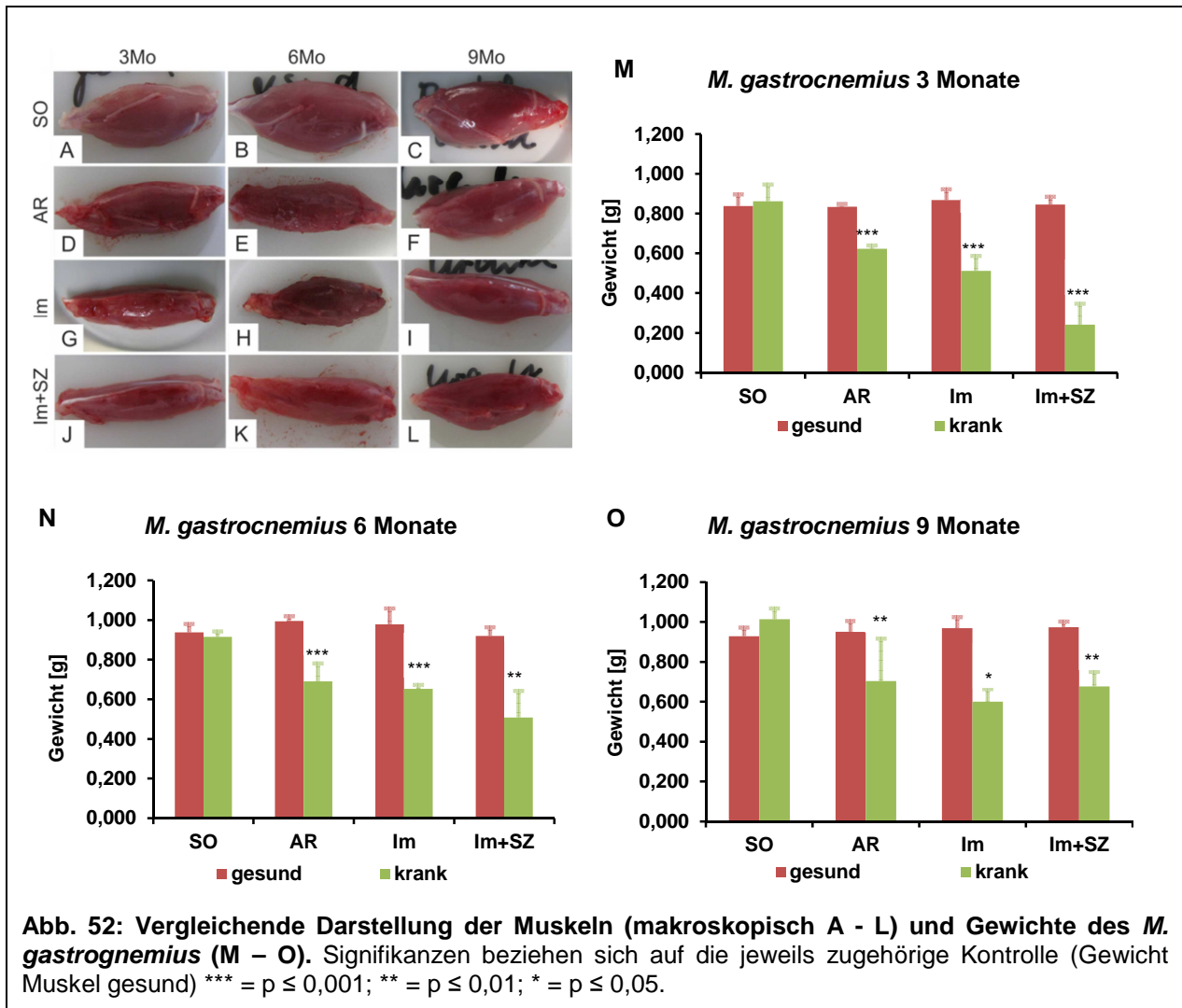
Gewicht *M. gastrocnemius*

Eine weitere Methode die Nervenregeneration zu analysieren, ist die Bestimmung des Muskelgewichtes. Der Ischiasnerv innerviert eine Vielzahl von Muskeln im Bein- und Fußbereich, unter anderem auch den großen Wadenmuskel, den *Musculus gastrocnemius*. Nach den funktionalen Untersuchungen der Nervenregeneration (Bestimmung des SFI) und den elektrophysiologischen Ableitungen wurden die Tiere

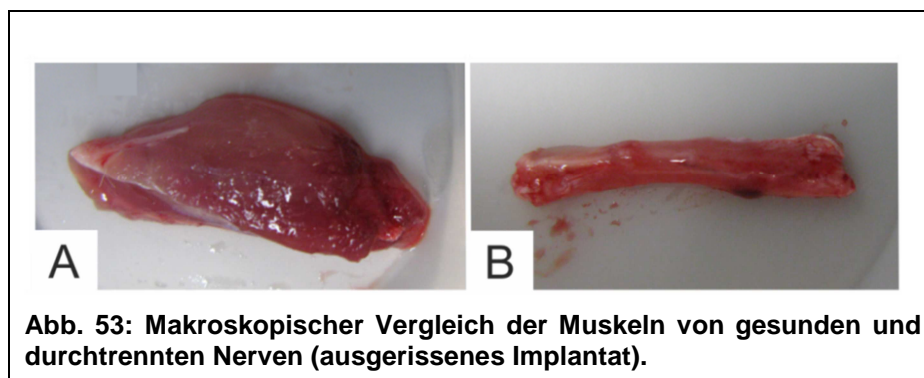
eingeschläfert und der *M. gastrocnemius* der gesunden und der kranken Seite entnommen, makroskopisch analysiert und gewogen.

Zwischen den gesunden Muskeln und den Muskeln der scheinoperierten Tiere gab es makroskopisch zu keinem der untersuchten Explantationszeitpunkte einen Unterschied (Abb. 52 A-C). Dies ist auch in den Diagrammen über die Muskelgewichte deutlich zu erkennen. Bei den Tieren mit autologen Transplantaten erschien der Muskel dünner im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren (Abb. 52 D-F). Auch nach 9 Monaten erreichte die Muskeln nicht die Größe derer der scheinoperierten Tiere. Gleiches galt auch für die Muskeln der Tiere mit artifiziellem Implantat. Diese Muskeln waren außerdem stets kleiner als die der autolog revers transplantierten Tiere.

Beim Vergleich der Muskelgewichte wurde dieser makroskopisch gewonnene Eindruck noch bestätigt. So waren die Muskelgewichte der Tiere mit Implantat zu jedem Zeitpunkt signifikant verschieden von den jeweiligen Kontrollen. Auch wenn sich die Gewichte von gesundem und erkranktem *M. gastrocnemius* über die Zeit annäherten. Die Muskeln der gesunden Beine waren durch die Gruppen und alle Zeitpunkte hinweg gleich schwer und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.



Bei einigen Tieren kam es zu einem herausreißen des Implantates (2x bei Tieren mit Implantat und 4x bei Tieren mit Implantat + SZ). In so einem Fall war der *M. gastrocnemius* stark verkümmert (Abb. 53). Er wog gerade mal zwischen 0,1 und 0,2 g.



Fazit

Zu allen Zeitpunkten kam es zu einer signifikanten Muskeldegeneration des *Musculus gastrocnemius*.

Die Muskeln der Implantate nahmen nach 9 Monaten an Dicke zu.

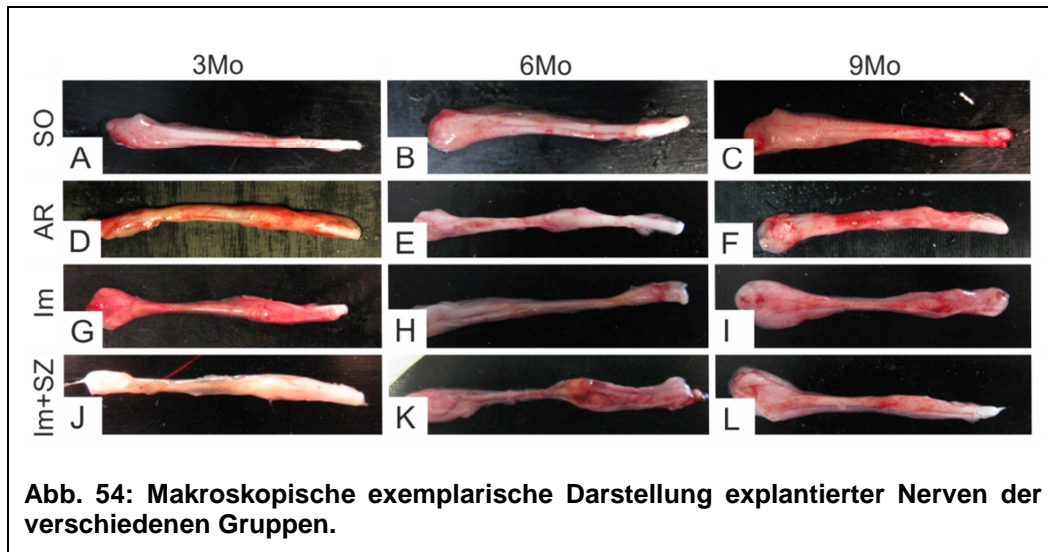
Explantation Nerven

Alle operierten Tiere haben die Eingriffe gut überstanden und zeigten im Verlauf der Versuchszeit keine unerwarteten Auffälligkeiten. Bei keinem der Tiere konnte eine Rötung oder Entzündung der Hautnaht festgestellt werden.

Die Nerven der Tiere der scheinoperierten Gruppe zeigten zu allen Zeitpunkten keinerlei makroskopisch sichtbaren Auffälligkeiten im Vergleich zu vor den Operationen. Die ursprünglich mobilisierten Nerven waren nach der ersten Woche im umgebenden Gewebe erneut durch eine feine Bindegewebshülle verankert und es war bei keinem der Tiere eine Entzündung zu sehen (Abb. 54 A-C).

Bei den Tieren mit autolog-revers transplantierten Nerven waren deutlich die Nähte und das rücklings eingesetzte Segment zu erkennen. Es war schon nach 3 Monaten zu einer bereits makroskopisch sichtbaren Verwachsung zwischen Nervenstümpfen und Transplantat gekommen. Außerdem war die gesamte Struktur von einer deutlich erkennbaren Bindegewebshülle umgeben, die teilweise sehr dick ausfiel. Nach 9 Monaten war außerdem eine deutliche Zunahme der Dicke der regenerierten Nerven festzustellen. Bei keinem der Tiere war außer der verdickten Bindegewebshülle eine starke inflammatorische Reaktion zu erkennen.

Ergebnisse



Bei den Tieren mit artifiziellen Gelatineimplantaten waren die Röhren schon nach 3 Monaten beinahe vollständig aufgelöst. Makroskopisch konnten nur noch Reste der Röhren erkannt werden. Bereits ab 3 Monaten war in allen operierten Tieren ein durchgängiger Nerv zu sehen. Die Nähte der Implantatfixierung und das regenerierte Segment waren deutlich zu erkennen. Die gesamte Struktur war von einer deutlich erkennbaren Bindegewebshülle umgeben, die teilweise sehr dick ausfiel, vor allem bei den Tieren mit implantierten Schwann Zellen. Nach 9 Monaten war eine deutliche Zunahme der Dicke der regenerierten Nerven festzustellen, die bei den Nerven der Implantate mit Schwann Zellen etwas weniger stark ausfiel. Bei keinem der Tiere war außer der verdickten Bindegewebshülle eine starke inflammatorische Reaktion zu erkennen (Abb. 54).

Insgesamt kam es bei sechs von 54 Tieren mit Implantat zu einem Ausreißen des Implantates. In Tabelle 1 ist die Anzahl nach den einzelnen Gruppen sortiert aufgelistet. Bei den autolog revers transplantierten Tieren kam es zu keinem Ausreißen der Nerven. Bei den Tieren mit Gelatineimplantat waren es zwei ausgerissene Nerven, bei den Tieren mit Gelatineimplantat und Schwann Zellen kam es zu vier ausgerissenen Nerven.

Tabelle 1: Übersicht über die Anzahl der ausgerissenen Implantate in den einzelnen Gruppen. Anzahl der ausgerissenen Implantate / Anzahl der operierten Tiere.

| | 3 Monate | 6 Monate | 9 Monate |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| SO (schein-operiert) | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
| AR (Autolog revers) | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| Im (Implantat) | 0/6 | 1/6 | 1/6 |
| Im+SZ (Implantat mit Schwann Zellen) | 2/6 | 2/6 | 0/6 |

Nach Explantation und Fixierung der Präparate wurden diese schließlich entwässert und in Tissue Tek eingebettet. Mit dem Cryotom wurden dann 10 µm dicke Längs – und Querschnitte angefertigt. Diese wurden dann durch klassisch-histopathologische und immunhistochemische Färbemethoden angefärbt und unter dem Mikroskop untersucht.

Ziel dieser Untersuchungen war es, die unterschiedlichen Zustände der regenerierenden Nerven qualitativ zu beschreiben.

Es wurden insgesamt vier verschiedene Färbungen eingesetzt: Hämatoxylin-Eosin (HE), Antikörper gegen Neurofilament (α -SMI31), Schwann Zellen (α -S100) und Makrophagen (α -ED-1).

In den folgenden Abbildungen sind exemplarische angefärbte Schnitte der Nerven aller Versuchsgruppen in längs und quer gezeigt.

Im Längsschnitt der HE-Färbung eines gesunden, scheinoperierten Nervs fallen einem die wellig und parallel verlaufenden Nervenfasern mit randständig-liegenden Zellkernen auf (Abb. 55 A-C). Auch die regelmäßigen Abstände der Axone untereinander sind deutlich zu erkennen. Diese ungefärbten Zwischenräume, die besonders in den Querschnitten erkennbar sind, werden von Schwann Zellen bzw. ihren Myelinscheiden ausgefüllt. In den Querschnitten kann man außerdem erkennen, dass der *Nervus ischiadicus* aus drei Teilnerven, dem *Nervus tibialis* und den zwei Teilen des *Nervus fibularis* (*N. fibularis profundus* und *N. fibularis superficialis*) besteht. Weiter kann man in unregelmäßigen Abständen kleinere und größere Blutgefäße sehen, die für die Versorgung des nativen Gewebes zuständig sind. Bei keinem der

Ergebnisse

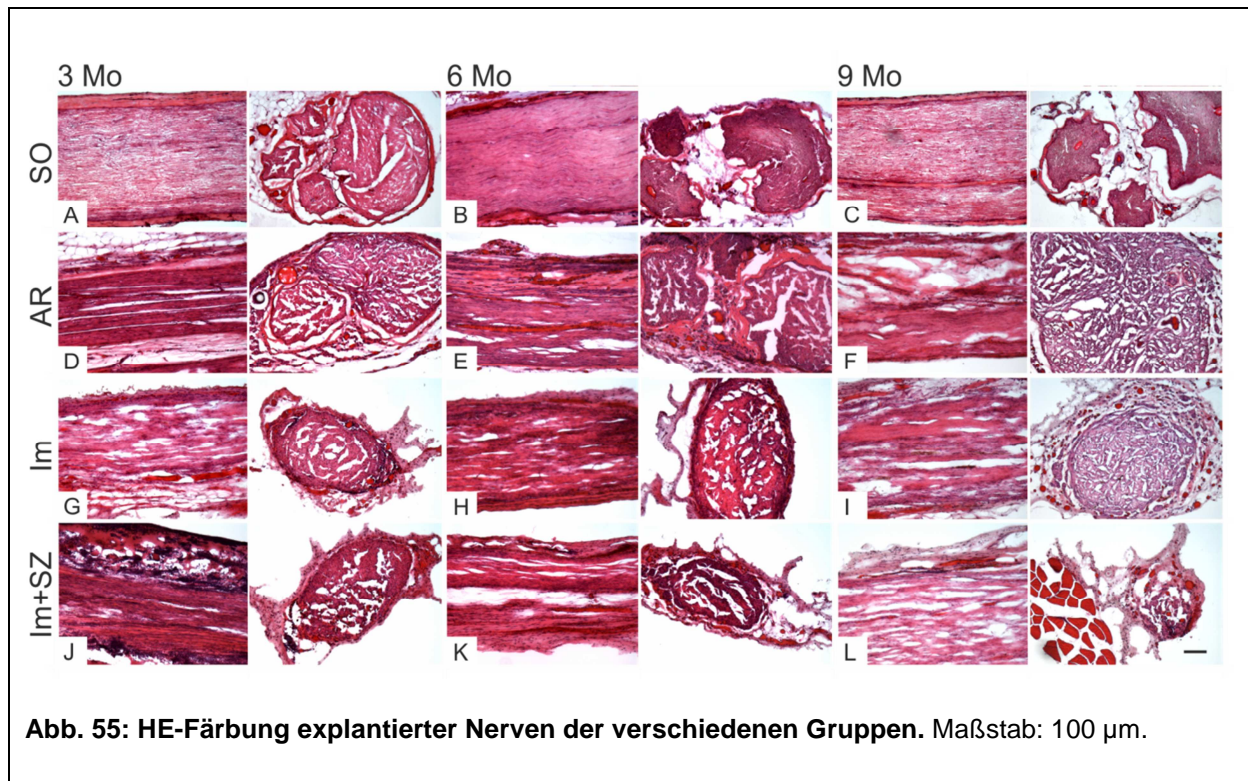
Tiere waren Entzündungsreaktionen oder Verletzungen des umgebenden Gewebes zu sehen.

In den Längsschnitten der autolog revers transplantierten Tiere waren auch zunächst schmale Bereiche mit parallel verlaufenden Nervensträngen zu erkennen, die über die Zeit an Dicke zunahmen (Abb. 55 D-F). Im Epineurium und den Endoneurien kam es zu einer erhöhten Anzahl an größeren und kleineren Blutgefäßen (Abb. 55 Querschnitte). Das Epineurium war zusätzlich von einer Bindegewebsartigen Hülle umgeben, was für eine leichte inflammatorische Reaktion spricht. In den Querschnitten war die 3-Teilung der Nerven nur noch teilweise erkennbar. Oftmals, vor allem nach 9 Monaten, war nur noch ein einzelner kompakter Nervenstrang zu erkennen.

Bei den Tieren mit Gelatineimplantat ohne Schwann Zellen waren nach 3 Monaten ebenfalls schon schmale Bereiche mit parallel verlaufenden Nervenfasern zu erkennen. Im Vergleich zu den autolog reversen Transplantaten war der regenerierte Nerv allerdings sehr viel dünner und kompakter. Dies wurde vor allem auch im Querschnitt deutlich. In den Längsschnitten konnten Reste der Implantate ausgemacht werden, die von einer dünnen Zellschicht umgeben waren. Im Epineurium und den Endoneurien kam es vergleichbar mit den autolog reversen Transplantaten zu einer erhöhten Anzahl an größeren und kleineren Blutgefäßen (Abb. 55 Querschnitte). Über den Verlauf der Explantationszeitpunkte nahm die Dicke des regenerierenden Nerven zu, eine Teilung in mehrere Nerven konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Tiere mit SZ im Implantat wiesen nach 3 Monaten eine erhöhte Anzahl an Zellen innerhalb der Röhre und des regenerierenden Nerven auf. Diese Zellen könnten auf die implantierten SZ zurückzuführen oder eine Ansammlung von Immunzellen auf Grund einer immunologischen Reaktion sein. Auch hier waren bereits nach 3 Monaten parallel verlaufende Nervenfasern zu erkennen. Im Vergleich zu den autolog reversen Transplantaten und den Gelatineimplantaten ohne SZ war der regenerierte Nerv allerdings sehr viel dünner. Dies wurde vor allem auch im Querschnitt deutlich. In den Längsschnitten konnten nach 3 Monaten noch Reste der Implantate ausgemacht werden, die von einer dünnen Zellschicht umgeben waren. Im Epineurium und den Endoneurien kam es vergleichbar mit den autolog reversen

Transplantaten zu einer erhöhten Anzahl an größeren und kleineren Blutgefäßen (Abb. 55 Querschnitte). Über den Verlauf der Explantationszeitpunkte nahm die Dicke der regenerierenden Nerven zu, eine Teilung in mehrere Nerven konnte allerdings nicht beobachtet werden. Insgesamt hatten die Nerven dieser Gruppe allerdings am wenigsten an Dicke zugenommen.



Die Immunfärbungen des Neurofilaments und der Schwann Zellen hat nicht für alle Nerven gleich gut funktioniert, was eine vergleichende Analyse erschwerte. Auch nach mehrfachen Wiederholungen, konnte kein besseres Ergebnis erzielt werden. Dennoch soll im folgenden Kapitel eine qualitative, vergleichende Beschreibung der Färbungen durchgeführt werden.

In der Neurofilamentfärbung der gesunden scheinoperierten Nerven konnte man noch deutlicher die gleichmäßige Struktur der Axone erkennen, die aufgrund ihres dreidimensionalen und gewellten Verlaufs, mal als gerade Linie, teilweise aber auch nur als quergeschnittene Fragmente, zu sehen waren (Abb. 56 A-C grün). Die Schwann Zellkörper waren als rote flache Punkte parallel zu den Nervenfasern zu erkennen. Im Querschnitt konnte man deutlich sehen, dass immer ein punktförmiges

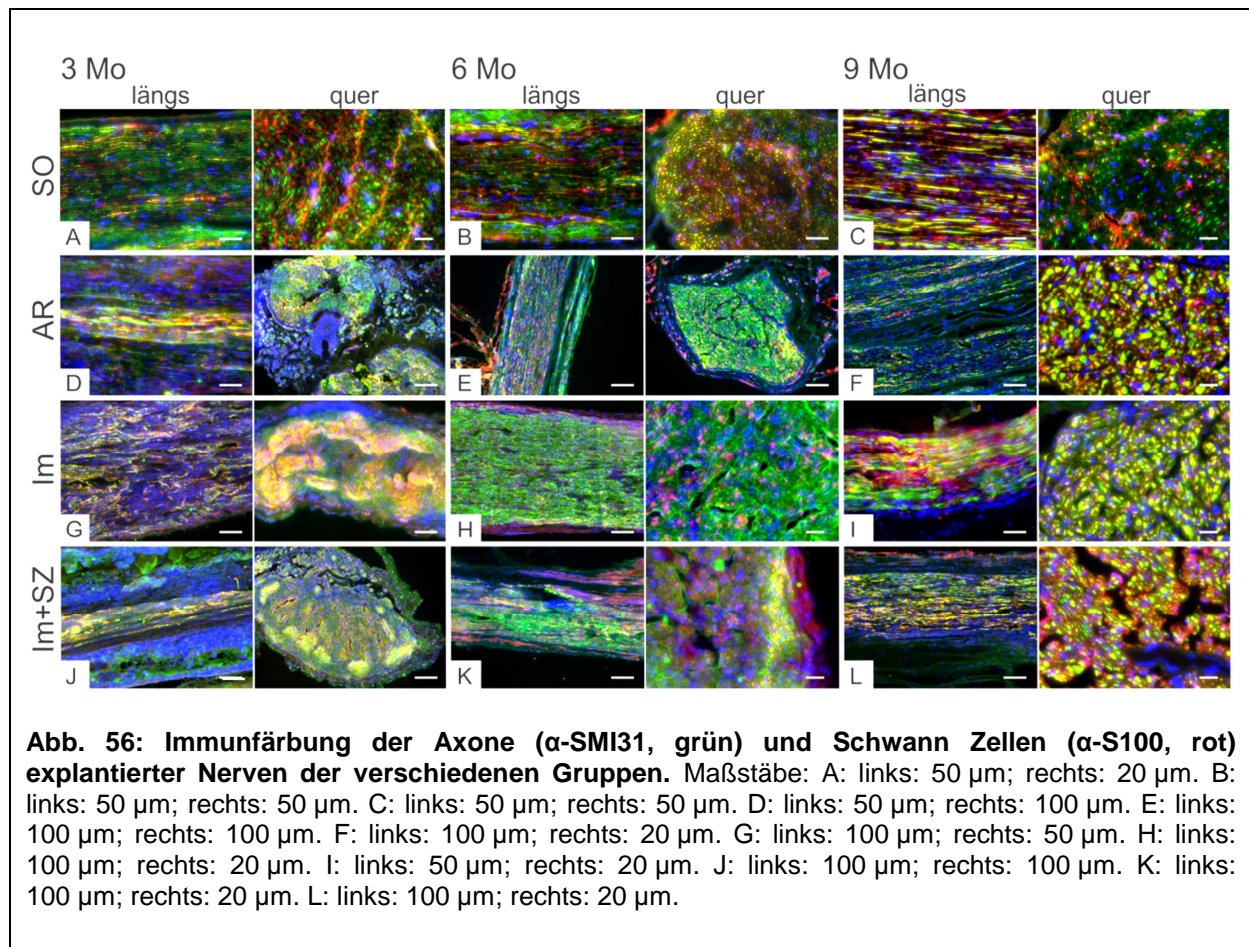
Ergebnisse

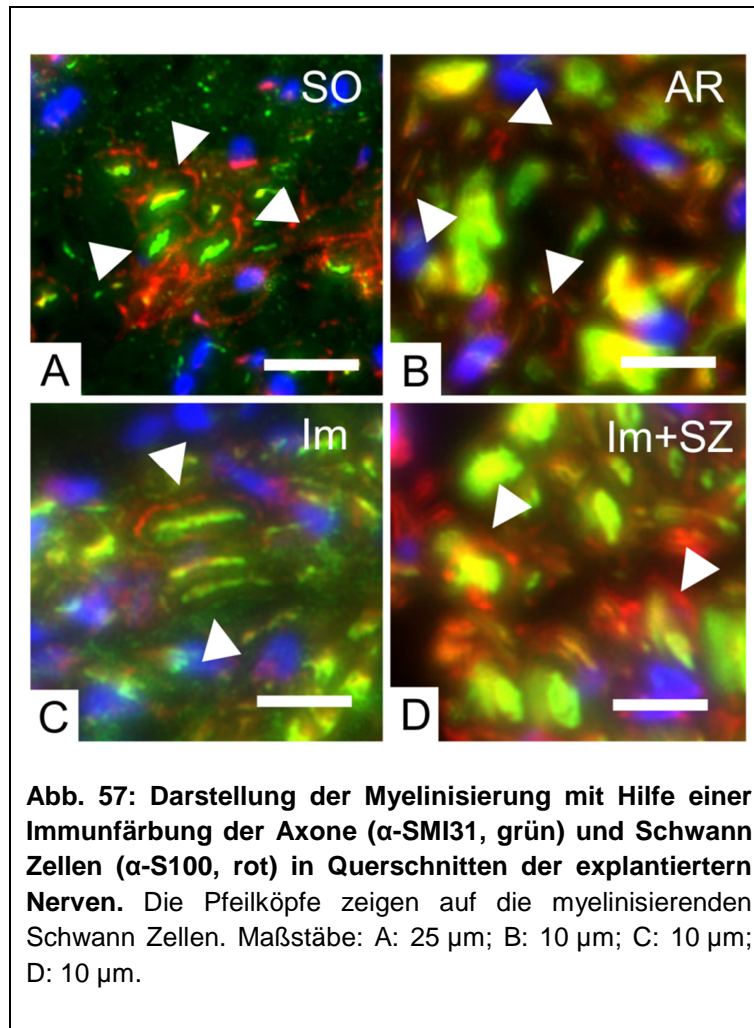
grünes Axon von einer roten SZ umgeben war (Abb. 57). Hier wird die myelinisierende Funktion der SZ deutlich.

In den Längsschnitten der autolog revers transplantierten Tiere waren nach 3 Monaten auch schon einige dieser parallelen Nervenfasern zu erkennen. Hier war das Neurofilament deutlich angefärbt. Größtenteils erschienen die Nervenfasern zu diesem Zeitpunkt aber noch ungeordnet. Im Querschnitt waren viele SZ zu erkennen, die aber in diesem Stadium noch keine myelinisierende Funktion ausübten. Nach 6 und 9 Monaten konnten mehr parallel angeordnete Nervenfasern ausgemacht werden, die jetzt teilweise auch schon von Myelinbildenden SZ umgeben waren (Abb. 57).

Bei den Tieren mit Gelatineimplantaten ohne Schwann Zellen waren nach 3 Monaten ebenfalls schon schmale Bereiche mit parallel verlaufenden Nervenfasern zu erkennen (Abb. 56 G). Im Vergleich zu den autolog reversen Transplantaten war der regenerierte Nerv allerdings sehr viel dünner und es war weniger geordnetes Neurofilament vorhanden. Nach 6 und 9 Monaten nahmen diese Bereiche zu, außerdem konnten vor allem nach 9 Monaten im Querschnitt auch schon myelinisierende SZ erkannt werden (Abb. 57).

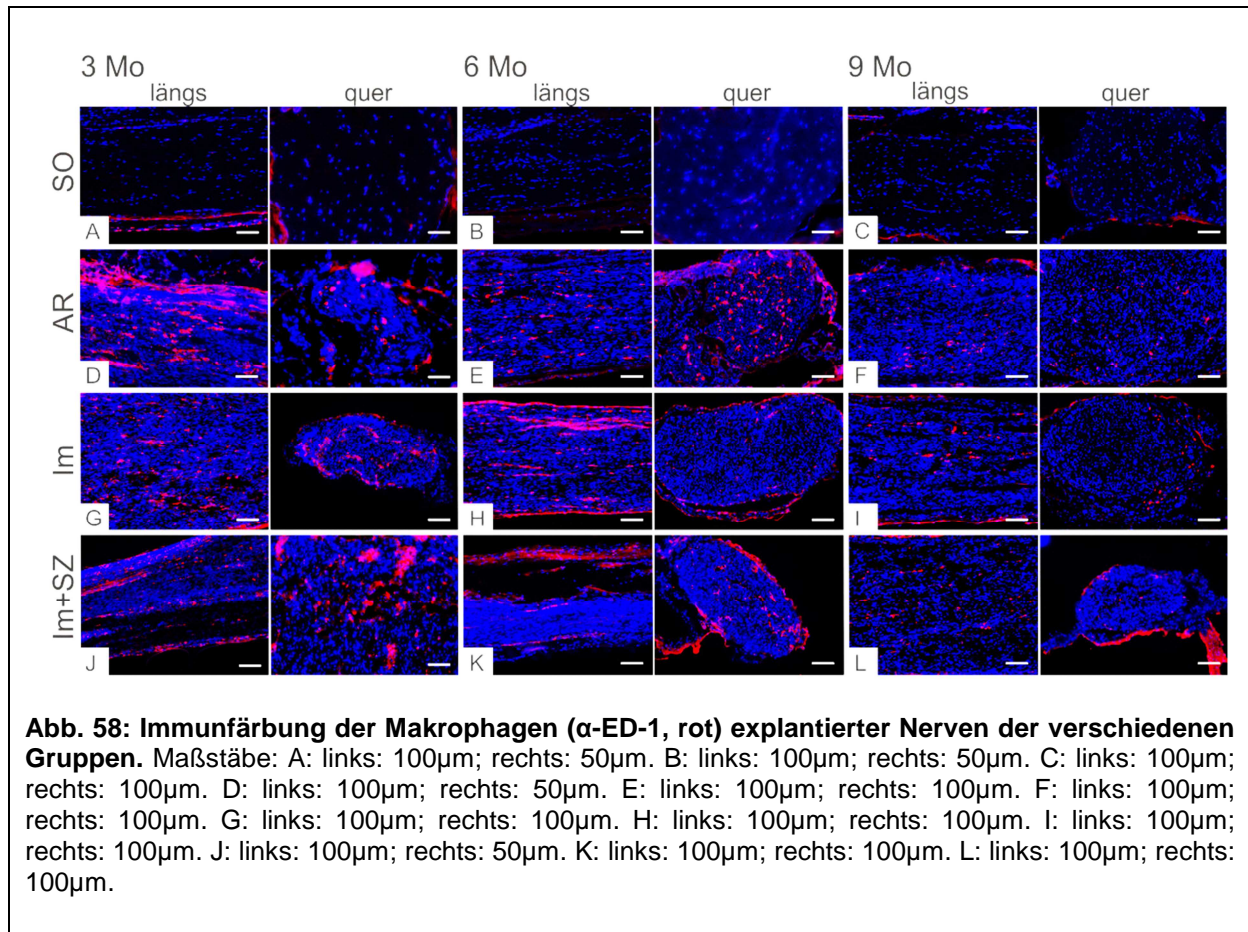
Tiere mit SZ im Implantat wiesen nach 3 Monaten eine erhöhte Anzahl an Zellen innerhalb der Röhre und des regenerierenden Nerven auf. Diese Zellen konnten nicht mit dem SZ typischen Marker S100 angefärbt werden, was zu der Vermutung führte, dass es sich hierbei um Immunzellen handelt, die auf das Implantat reagieren (Abb. 56 J). Trotzdem waren auch hier bereits nach 3 Monaten einige parallel verlaufende grün angefärbte Nervenfasern zu erkennen. Im Vergleich zu den autolog reversen Transplantaten und den Gelatineimplantaten ohne SZ war der regenerierte Nerv allerdings sehr viel dünner. Über den Verlauf der Explantationszeitpunkte nahm die Dicke der regenerierenden Nerven zu. Insgesamt hatten die Nerven dieser Gruppe allerdings am wenigsten an Dicke zugenommen. Vor allem nach 9 Monaten konnten im Querschnitt auch schon myelinisierende SZ erkannt werden (Abb. 57).





Um die Implantate und das umliegende Gewebe weiter histologisch zu charakterisieren und eine eventuelle inflammatorische Reaktion besser bewerten zu können wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Makrophagen durchgeführt. In Abb. 58 sind exemplarisch für jede Gruppe jeweils ein gefärbter Längs- und Querschnitt durch die Implantatregion gezeigt. Bei den scheinoperierten Tieren ergab sich wie erwartet kaum eine Anfärbung von Makrophagen. Lediglich einige wenige konnte man im Epineurium erkennen. Bei allen Implantattypen hingegen konnten Makrophagen angefärbt werden. Im Verlauf der Regeneration wurde diese Immunreaktion allerdings weniger, so dass nach neun Monaten bei allen Implantattypen kaum noch Makrophagen vorhanden waren (Abb. 58 F/I/L). Nach 3 Monaten war vor allem bei den autolog revers transplantierten Tieren und dem Gelatineimplantat mit Schwann Zellen eine erhöhte Anzahl an Makrophagen im mittleren Implantatbereich zu erkennen. Beim Gelatineimplantat war die Anzahl der Makrophagen geringer, hielt aber auch noch nach 9 Monaten an. Nach 6 Monaten

waren bei allen Implantattypen Makrophagen vorhanden (Abb. 58 E/H/K). Diese sind vor allem in den Querschnitten gut zu erkennen.



Eine Auffälligkeit gab es bei allen eingenähten Implantaten. Jeweils um den Nahtfaden herum sammelten sich sehr viele Zellen an und bildeten eine Art Kapsel um den Fremdkörper, die in der HE-Färbung deutlich zu erkennen war (Abb. 59 A/B). Färbte man diese Kapsel mit einem Antikörper gegen Makrophagen rot an, so wurde deutlich, dass diese Zellen alle Makrophagen waren, die auf den Faden reagierten (Abb. 59 C/D). So löste der Nähfaden häufig eine stärkere immunologische Reaktion aus als das Gelatineimplantat.

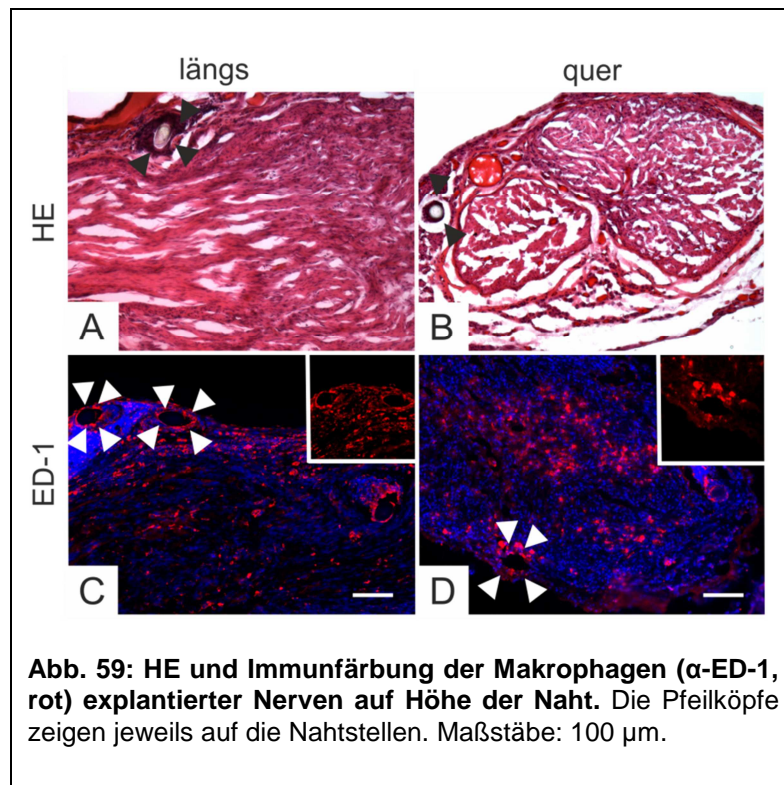


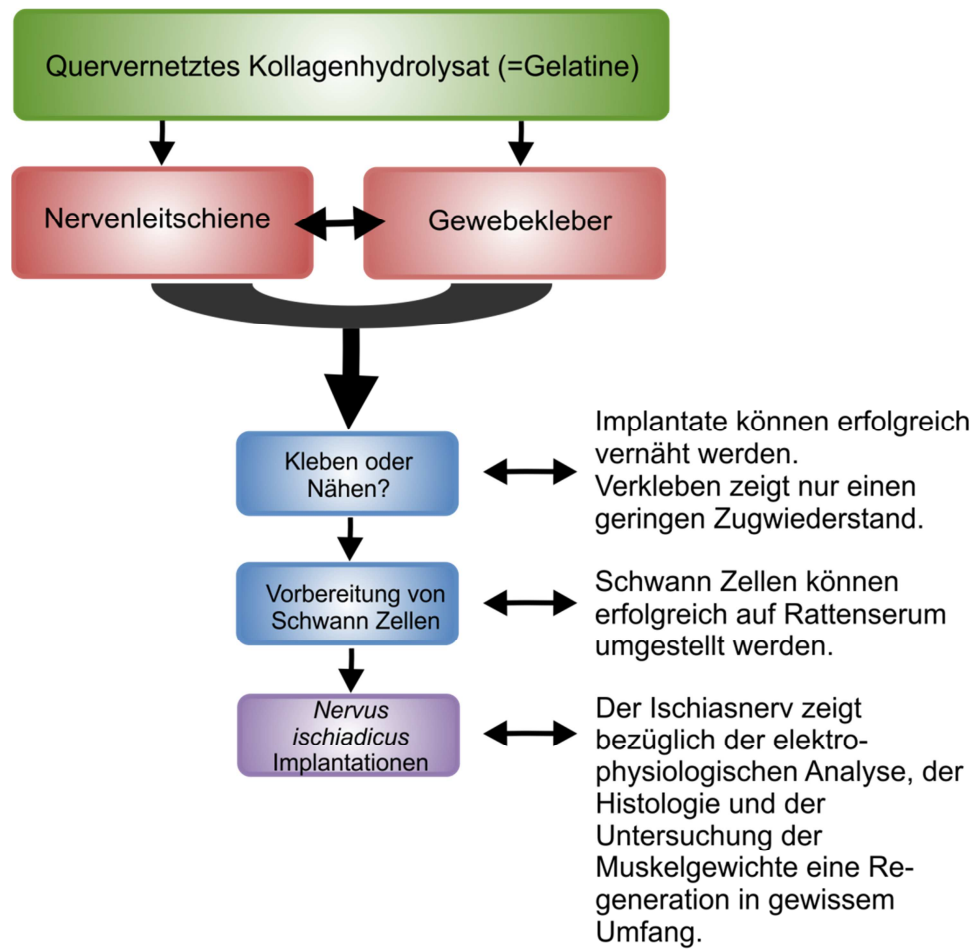
Abb. 59: HE und Immunfärbung der Makrophagen (α -ED-1, rot) explantierter Nerven auf Höhe der Naht. Die Pfeilköpfe zeigen jeweils auf die Nahtstellen. Maßstäbe: 100 μ m.

Fazit

Mit Hilfe der artifiziellen Implantate kann der Ischiasnerv vergleichbar zur Kontrolle in begrenztem Umfang regenerieren.

Die inflammatorische Reaktion ist gering.

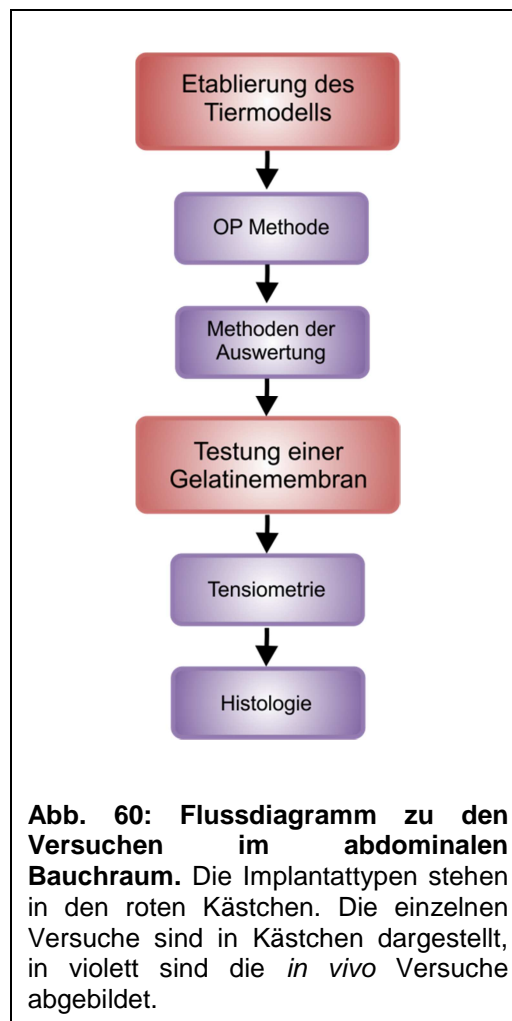
2.3.4. Zusammenfassung



3. Untersuchungen im abdominalen Bauchraum

Im anschließenden Kapitel sollte ein Tiermodell etabliert werden, um Implantate zur Verhinderung von Adhäsionen im abdominalen Bauchraum besser untersuchen und entwickeln zu können. Anschließend wurde die *in vivo* Methode durch Testung eines neuen gelatinebasierten Implantates verifiziert. Das Implantat ist eine quervernetzte Gelatinemembran. Sie soll biokompatibel sein und während der Regeneration des Gewebes innerhalb von drei Wochen resorbiert werden, dabei sollen Adhäsionen verhindert werden.

Im Folgenden ist ein Flussdiagramm mit den einzelnen Versuchen dargestellt, die im Rahmen dieses Kapitels durchgeführt wurden.

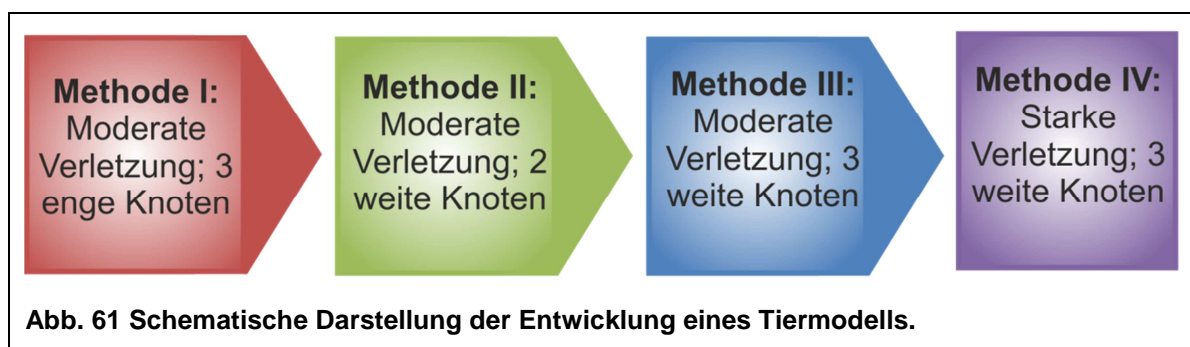


3.1 Entwicklung eines *in vivo* Modells zur Testung von Adhäsionsbarrieren

3.1.1 OP – Modell

Die Entstehung postoperativer intraabdominaler Adhäsionen stellt ein großes Problem für die Chirurgie dar. Alle bis heute getesteten und teilweise auch zugelassenen Adhäsionsbarrieren ergaben in präklinischen *in vivo* Studien oft widersprüchliche Ergebnisse. Ein wichtiger Faktor für die Durchführung dieser *in vivo* Studien ist die Wahl des Tiermodells. Um zukünftig neue Implantate entwickeln und schon im Tierversuch besser für ihren Einsatz in der Klinik abschätzen zu können, sollte ein zuverlässiges Tiermodell in der Ratte etabliert werden. Kriterien für das gewünschte Tiermodell waren: 1. Die standardisierte Durchführung der Operationen, 2. Die zuverlässige Ausbildung einer Adhäsion in den Kontrolltieren, 3. Die zuverlässige Unterscheidung der spezifischen von unspezifischen Adhäsionen (z.B. an Nahtstellen) und 4. Der Möglichkeit einer quantitativen Auswertung.

Zur Etablierung eines Tiermodells zur Testung von Adhäsionsbarrieren *in vivo* wurden vier in Frage kommende Methoden getestet (Abb. 61).



Im Folgenden sollen diese OP Methoden genauer erläutert werden.

Bei allen im Folgenden beschriebenen Methoden wurden die Tiere zunächst mit einer Mischung aus Ketamin und Xylazin betäubt. Nach Ausfallen der Reflexe wurde das Tier in die Rückenlage gebracht und die ventrale Seite rasiert.

Zur Eröffnung der Bauchhöhle wurde zunächst ein ca. 4 cm langer Hautschnitt auf Höhe der durchscheinenden Linea alba gemacht. Anschließend wurde die Linea alba mit einer 4 cm langen Inzision durchtrennt.

Ergebnisse

a) Moderate Verletzung, 3 eng aneinander liegende Knoten:

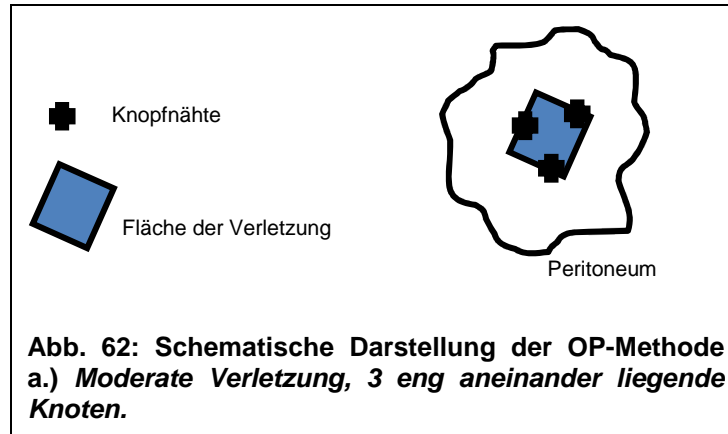
Mit Hilfe eines Skalpell wurde durch Abschaben an der abdominalen peritonealen Wand eine 10 x 10 mm große Verletzung bis zur Entstehung von petechialen Blutungen gesetzt.

Nach der Lokalisation des Cecum wurde auch hier eine 10 x 10 mm große Verletzung durch Schaben einer Kompresse auf der Oberfläche des blinden Darmendes gesetzt. Dabei sollte eine Blutung entstehen.

Anschließend wurden Cecum und Peritoneum mit 3 Einzelknopfnähten adaptiert, so dass die beiden Verletzungsstellen aufeinander lagen. Die Knoten lagen dabei am Rand der verletzten Stellen.

Für die Testung von Implantaten wurde die Membran mit 2 der 3 Nähte zwischen Cecum und Peritoneum fixiert (diese Knoten entsprachen den Fixationsknoten des Darmes am Peritoneum). Anschließend wurden die Wunden mit Nähfäden verschlossen.

Ein Schema der OP Methode ist in Abb. 62 dargestellt.

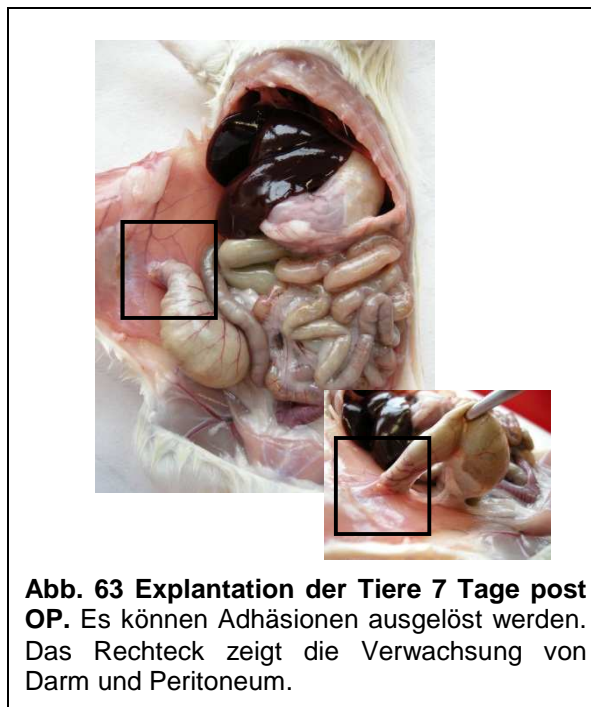


Die Operationen konnten standardisiert durchgeführt werden und es wurde zuverlässig eine Adhäsion ausgelöst (Abb. 63).

Schwieriger war die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Adhäsionen. Die Knoten, die zum Vernähen des Cecums mit dem Peritoneum benötigt wurden, lösten ihrerseits auch Adhäsionen aus und lagen innerhalb der spezifischen Adhäsion. Mit Entfernen der Knoten, wurde auch ein Teil der eigentlichen Adhäsion weggeschnitten und man erhielt somit ein verfälschtes

Ergebnis. Eine quantitative Bestimmung der Adhäsionsstärke war somit auch verfälscht.

Die Adhäsionsbarriere ließ sich über die Verbindungsknoten von Cecum und Peritoneum gut fixieren. Allerdings wurde nach der Explantation deutlich, dass die Barriere mit endogenem Fettgewebe verwachsen war.

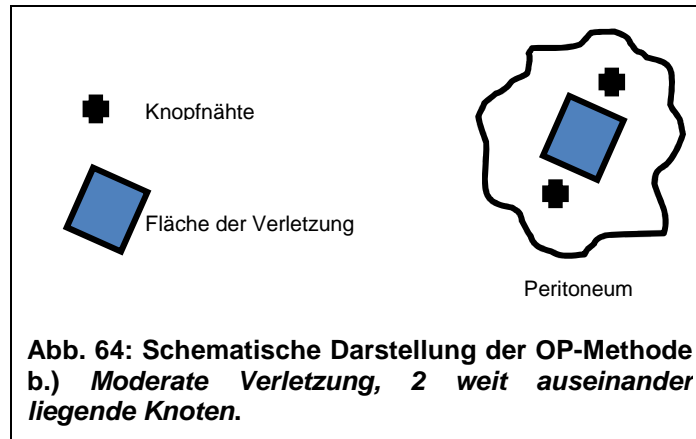


→ Zur Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Adhäsionen sollten die Fixierungsknoten weiter von der Läsion entfernt sein.

b) Moderate Verletzung, 2 weit auseinander liegende Knoten:

Für diese Methode wurde die Operation in gleicher Art und Weise durchgeführt wie oben (siehe a.) beschrieben ist, allerdings wurden Cecum und Peritoneum nur mit 2 Einzelknopfnähten adaptiert, so dass die beiden Verletzungsstellen aufeinander lagen. Außerdem lagen die Knoten dabei entfernt vom Rand der Verletzungsstelle.

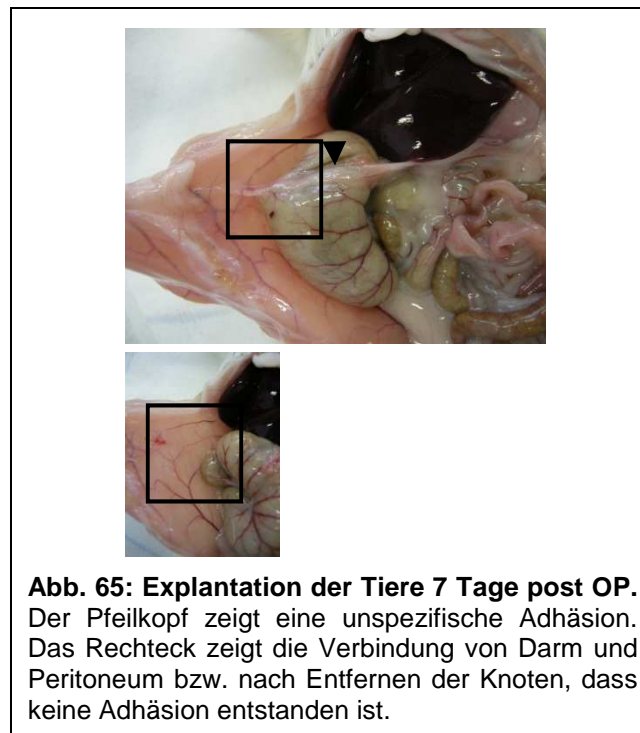
Ein Schema der OP Methode ist in Abb. 64 dargestellt.



Die OP-Methode konnte wiederum standardisiert durchgeführt werden und die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Adhäsionen war dieses Mal auch möglich. Die Knoten, die zum Vernähen des Cecums mit dem Peritoneum benötigt wurden, haben zwar ihrerseits auch Adhäsionen ausgelöst, diese lagen aber außerhalb der spezifischen Adhäsion und konnten ohne Probleme entfernt werden.

Allerdings bildete sich mit dieser Methode keine zuverlässige Adhäsion aus (Abb. 65).

Die Adhäsionsbarriere ließ sich über die beiden Verbindungsknoten von Cecum und Peritoneum gut fixieren.



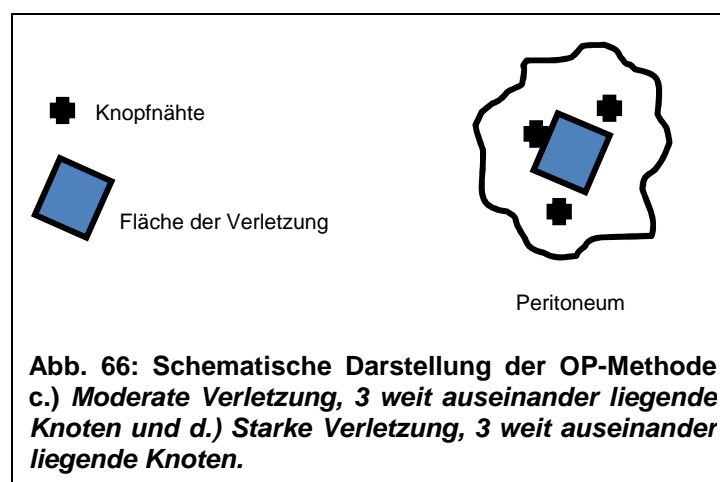
→ Damit eine zuverlässige Adhäsion ausgelöst werden kann, muss entweder die Kontaktfläche vergrößert werden (z.B. über 3 Fixierungsknoten) und/oder die Verletzung verstärkt werden.

c) Moderate Verletzung, 3 weit auseinander liegende Knoten:

Für diese Methode wurde die Operation in gleicher Art und Weise durchgeführt wie in a.) beschrieben ist. Im Unterschied zu b.) wurden Cecum und Peritoneum dieses Mal mit 3 Einzelknopfnähten adaptiert, so dass die beiden Verletzungsstellen aufeinander lagen. Außerdem lagen die Knoten dabei entfernt vom Rand der Verletzungsstelle.

Für die Testung von Implantaten wurde die Membran mit 2 der 3 Nähte zwischen Cecum und Peritoneum fixiert (diese Knoten entsprechen zweien der Fixationsknoten des Darmes am Peritoneum).

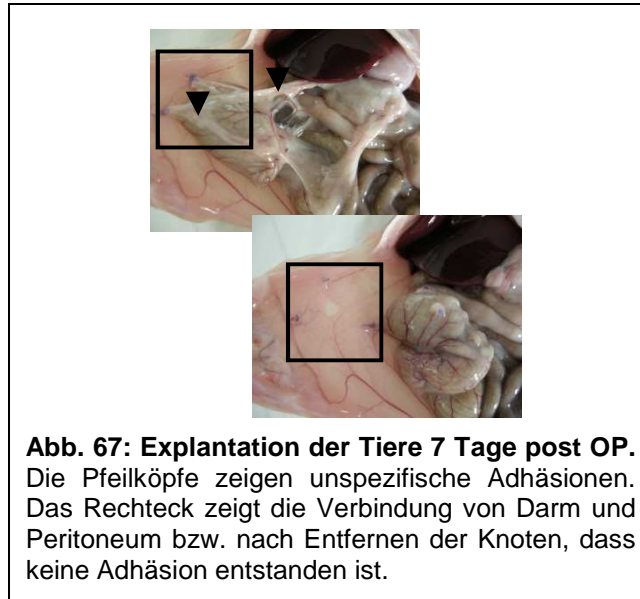
Ein Schema der OP Methode ist in Abb. 66 dargestellt.



Die Operationen konnten standardisiert durchgeführt werden und die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Adhäsionen war möglich. Die Knoten, die zum Vernähen des Cecums mit dem Peritoneum benötigt wurden, lösen zwar ihrerseits auch Adhäsionen aus, diese lagen aber außerhalb der spezifischen Adhäsion und konnten ohne Probleme entfernt werden.

Allerdings bildete sich auch mit der Vergrößerung der Kontaktfläche der Läsionen keine zuverlässige Adhäsion aus (Abb. 67).

Die Adhäsionsbarriere ließ sich über zwei der drei Verbindungsknoten von Cecum und Peritoneum gut fixieren.



→ **Selbst durch die Vergrößerung der Kontaktfläche kann keine zuverlässige Adhäsion ausgelöst werden. Eine Lösung wäre die Verstärkung der Verletzung.**

d) Starke Verletzung, 3 weit auseinander liegende Knoten:

Für diese Methode wurde die Operation in gleicher Art und Weise durchgeführt wie in a.) beschrieben ist. Im Unterschied dazu beide Verletzungen außerdem noch mit einer elektrischen Zahnbürste (15.000 U/min) verstärkt. Sie wurde für jeweils 30 s auf den verletzten Stellen angewendet.

Cecum und Peritoneum wurden wiederum mit 3 Einzelknopfnähten adaptiert, so dass die beiden Verletzungsstellen aufeinander lagen. Außerdem lagen die Knoten dabei entfernt vom Rand der Verletzungsstelle.

Für die Testung von Implantaten wurde die Membran mit 2 der 3 Nähte zwischen Cecum und Peritoneum fixiert (diese Knoten entsprechen zweien der Fixationsknoten des Darmes am Peritoneum).

Das Schema entspricht der Methode in c.) und ist in Abb. 66 dargestellt.

Die Operationen konnte standardisiert durchgeführt werden und die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Adhäsionen war einfach. Die Knoten, die zum Vernähen des Cecums mit dem Peritoneum benötigt

wurden, lösten zwar ihrerseits auch Adhäsionen aus, diese lagen aber außerhalb der spezifischen Adhäsion und konnten ohne Probleme entfernt werden.

Mit der Verstärkung der Läsion und der vergrößerten Kontaktfläche konnte eine zuverlässige Adhäsion ausgelöst werden (Abb. 68).

Die Adhäsionsbarriere ließ sich über zwei der drei Verbindungsknoten von Cecum und Peritoneum gut fixieren.

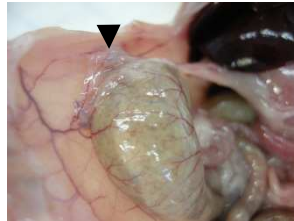


Abb. 68: Explantation der Tiere 7 Tage post OP. Die Pfeilköpfe zeigen unspezifische Adhäsionen. Es konnte eine spezifische Adhäsion ausgelöst werden.

→ Über die Vergrößerung der Kontaktfläche und der verstärkten Verletzung kann eine Adhäsion zuverlässig ausgelöst werden.

3.1.2 Auswertungen

Neben der Entwicklung eines standardisiert durchführbaren Tiermodells ist es außerdem wichtig die Methoden der Auswertung zu etablieren. Die bisherige Auswertung der Adhäsionsbildung wurde an Hand von makroskopischen Analysen der Gewebe gemacht.

Für die Auswertung der Testung von Adhäsionsbarrieren sollten im folgenden Abschnitt drei weitere Methoden vorgestellt werden.

a.) Explantationsprotokoll

Für eine erste Einschätzung wurde ein Explantationsprotokoll entwickelt (siehe Anhang). In diesem Schriftstück wird die Beurteilung folgender Punkte abgefragt:

1. Gesundheitszustand allgemein
2. Wunde
3. Subkutan Raum

Ergebnisse

4. Bauchraum/Knotenadhäsion
5. Implantat
6. Darm (-läsion)
7. Peritoneum (-läsion)
8. Adhäsion
9. Zugexperiment
10. Gewebeentnahme

Für jedes in der Zukunft operierte Tier wurde ein solches Protokoll ausgefüllt.

b.) Tensiometrie

Zum Zwecke der quantitativen Auswertbarkeit der Ergebnisse wurde ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes System für die Analyse von Gewebe weiterentwickelt.

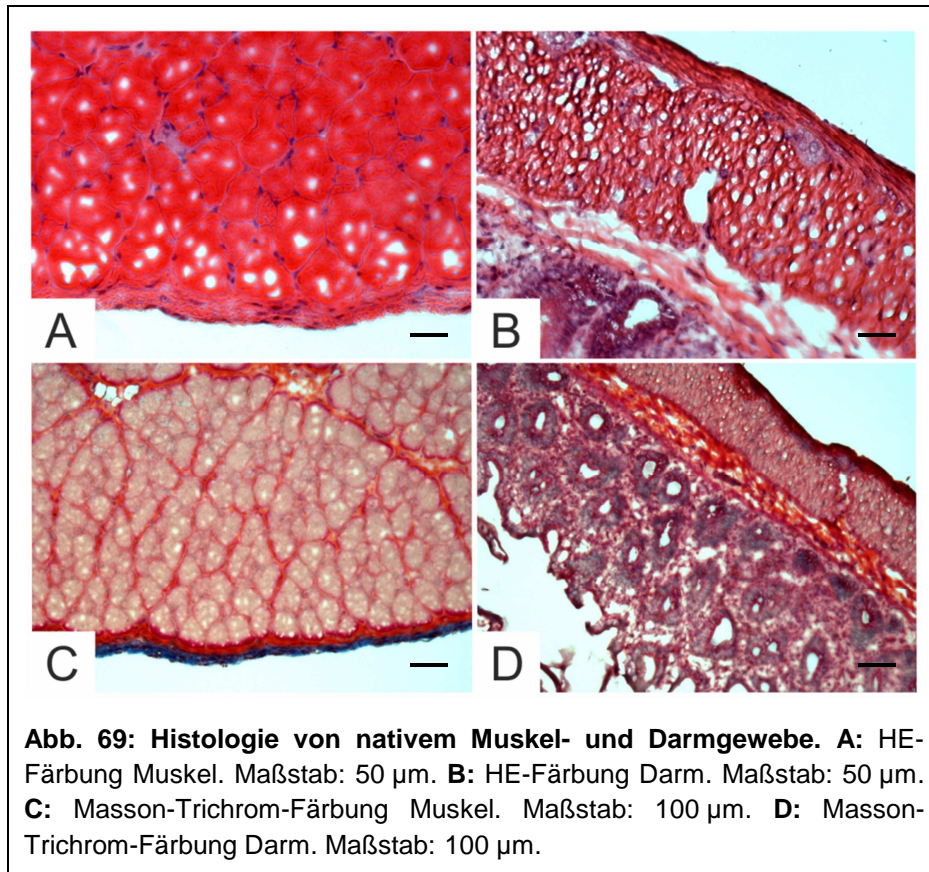
Dazu wurde das verwachsene Gewebe mit der Muskelschicht an einem an einer Federwaage befestigten Haken eingehängt. Die Federwaage war an einem Laborständer befestigt, der auf einer manuell höhenverstellbaren kleinen Hebebühne stand. Anschließend wurde das an der Muskelschicht verwachsene Darmgewebe mit einer Pinzette auf einer Petrischale fixiert. Die gesamte Apparatur wurde schließlich langsam mittels der Hebebühne angehoben. Beim Auseinanderreißen der Gewebe konnte die Zugresistenz dann auf der Federwaage in Gramm abgelesen werden. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer Videokamera oder einer Fotokamera aufgezeichnet (siehe auch Material und Methoden Teil für Abbildungen).

Für die Auswertung wurden die ermittelten Werte mit Hilfe von Excel aufgearbeitet, Diagramme erstellt und Signifikanzen errechnet.

c.) Mikroskopie – Histologie

Das explantierte Gewebe sollte außerdem histologisch aufgearbeitet werden. Zu diesem Zweck wurde es in flüssigem Stickstoff schock gefroren und anschließend für die Herstellung von Cryoschnitten in Tissue Tek eingebettet. Nach erfolgter Schnittherstellung wurden die Gewebeschnitte mit Hilfe einer HE- und einer Masson-Trichrom Färbung analysiert. In Abb. 69 sind beide Färbungen an nativem Muskel- und Darmgewebe dargestellt. Mit der HE-Färbung kann ein

allgemeiner Überblick über den Aufbau der verschiedenen Gewebe gewonnen werden. Bei Adhäsionen wäre hier zusätzliches Gewebe in Form von Fibroblasten und Kollagenablagerungen zu erwarten. Mit Hilfe der Masson-Trichrom Färbung kann dieses Gewebe noch genauer analysiert werden. Kollagen wird hier in dunklem blau angefärbt (Abb. 69 C).



Fazit

Mit der Methode „Starke Verletzung, 3 weit auseinander liegende Knoten“ konnte eine Tier – OP – Methode zur *in vivo* Testung von Adhäsionsbarrieren in der Ratte etabliert werden.

Zur Auswertung wurden 3 weitere Methoden etabliert: 1. Explantationshabitus, 2. tensiometrische Messung und 3. histologische Auswertung.

3.2 Testung eines Implantates

Für die Testung von Adhäsionsbarrieren *in vivo* wurde nun das im oberen Teil etablierte Tiermodell verwendet. In der im Folgenden beschriebenen Versuchsserie wurden ein Implantattyp auf Kollagenderivatbasis (MeD0850-1) und zwei Explantationszeitpunkte (7 und 21 Tage) gewählt.

Die Versuchstiere wurden hierfür in vier Gruppen eingeteilt:

- 1 - 1. Kontrollgruppe: 13 Tiere ohne Implantat; Zeitpunkt der Explantation: 7 Tage post OP
- 2 - 2. Kontrollgruppe: 12 Tiere ohne Implantat; Zeitpunkt der Explantation: 21 Tage post OP
- 3 - 1. Versuchsgruppe: 12 Tiere mit Implantat (MeD0850-1); Zeitpunkt der Explantation: 7 Tage post OP
- 4 - 2. Versuchsgruppe: 12 Tiere mit Implantat (MeD0850-1); Zeitpunkt der Explantation: 21 Tage post OP

Die Operationen wurden wie oben beschrieben durchgeführt und anschließend qualitativ und quantitativ ausgewertet. Die Auswertung der Adhäsionen erfolgte zunächst makroskopisch. Anschließend wurde bei vorhandenen Adhäsionen ein Zugexperiment durchgeführt, indem das verwachsene Cecum und Peritoneum mit Hilfe einer Federwaage auseinandergezogen wurden.

Für die histologische Auswertung wurden je Gruppe 2 weitere Tiere operiert. Die Gewebe dieser Tiere wurden nach der Explantation in flüssigem Stickstoffschockgefroren und anschließend Schnitte mit dem Cryotom hergestellt. Die Schnitte wurden dann mit Hilfe von histologischen Färbungen (HE-, Masson-Trichrom-Färbung) weiter analysiert.

Die Tiere aller Versuchsgruppen haben die OPs gut überstanden und zeigten bis zur Explantation kein auffälliges Verhalten oder offensichtliche Beschwerden. Die OP-Wunden waren weder gerötet, noch zeigten sich Schwellungen. Bei sehr wenigen Tieren traten kleine subkutane Hämatome oder teilweise aufgebissene Nähte auf, was aber auf das Verheilen der Wunde keinerlei Einfluss hatte.

3.2.1 Makroskopische Analyse

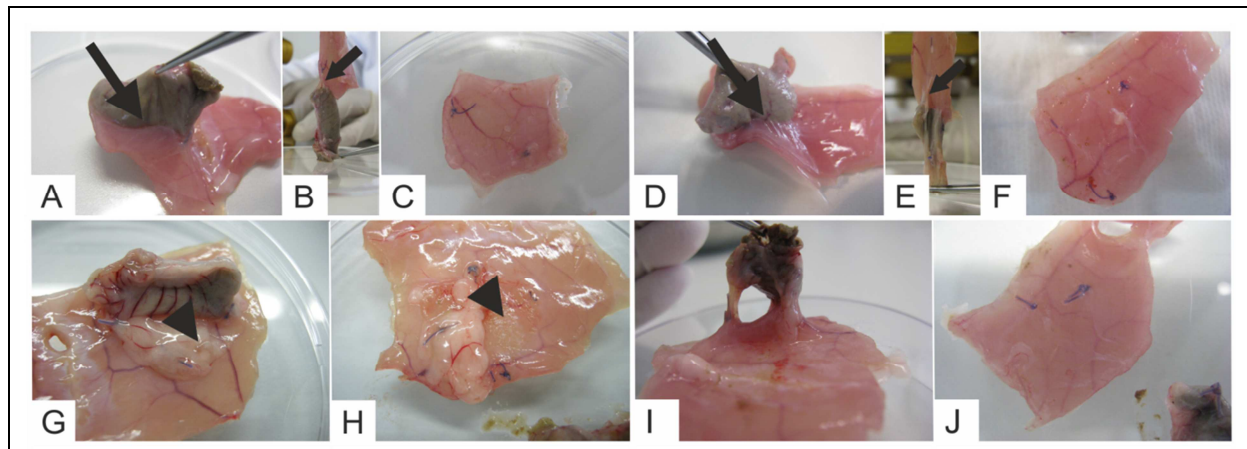


Abb. 70: Makroskopische Analyse der Gewebe. A/B/C: Kontrolle nach 7 d. Es ist eine Adhäsion vorhanden (B). Die Pfeile zeigen auf das Adhäsionsgewebe. Das Bauchfell ist gerötet und zeigt leichte Gewebeerkrankungen (C). **D/E/F:** Kontrolle nach 21 d. Es ist eine Adhäsion vorhanden. Das zeigt auch die tensiometrische Messung (E). Die Pfeile zeigen auf das Adhäsionsgewebe. Das Bauchfell ist gerötet und zeigt Gewebeerkrankungen (F). **G/H:** Adhäsionsbarriere nach 7 d. Die Adhäsionsbarriere verhindert größtenteils eine Adhäsion. Sie ist aber von endogenem Fettgewebe eingewachsen und das Bauchfell ist leicht gerötet. Pfeilköpfe zeigen auf die noch erhaltene Adhäsionsbarriere. **I/J:** Adhäsionsbarriere nach 21 d. Die Adhäsionsbarriere ist vollständig resorbiert und verhindert größtenteils eine Adhäsion. Das Bauchfell zeigt keinerlei Rötung oder Verdickung.

In Gruppe 1 (Kontrolle 7 d) wiesen 12 von 13 Tieren eine Adhäsion auf. Abb. 70 zeigt die Adhäsion zwischen Darm und Peritoneum als weißlichen Film (Abb. 70 A/B, siehe Pfeile). In diesen exemplarischen Abbildungen wurden die unspezifischen Adhäsionen bereits entfernt. Nach dem Auseinanderreißen der Gewebestücke waren vor allem auf dem Muskel Rötungen und eine Gewebeerkrankung (Abb. 70 C) zu erkennen, die auf die Verwachsungen zwischen den Geweben zurückgeführt werden kann.

Nach 21 Tagen Inkubation wiesen 10 der 12 Kontrolltiere eine Adhäsion auf. In Abb. 70 (B/F) ist ein exemplarisches Beispiel für den Habitus der Verwachsungen dargestellt. Auch hier ist die Adhäsion als weißlicher Gewebefilm zu erkennen, der nach der Trennung der Gewebe durch die tensiometrische Messung vor allem auf dem Muskel wiederzufinden war (Abb. 70 F).

In der Versuchsgruppe mit Implantat 7 Tage post OP (MeD0850-1) zeigten 6 von 12 Tieren keine Adhäsion. Das Implantat war bei allen Tieren noch intakt und kaum

Ergebnisse

abgebaut. Es zeigte häufig eine starke Einwachsung von endogenem Fettgewebe (Abb. 70 G/H, Pfeilköpfe) und war immer zumindest einseitig mit dem Peritoneum verwachsen (auf dieser Seite war kein Fettgewebe zu finden) Das umschließende Fettgewebe war oft von großen Blutgefäßen durchzogen und das Peritoneum wies eine rötliche Färbung auf. Beides könnten Hinweise auf eine inflammatorische Reaktion sein.

Nach 21 Tagen zeigten 9 von 12 Tieren mit Implantat (MeD0850-1) keine Adhäsion. Das Implantat war bei den meisten Tieren fast vollständig abgebaut (Abb. 70 I/J). Auch das einwachsende Fettgewebe war stark reduziert, was für einen Abbau der Einwachsung parallel zum Abbau des Implantates spricht. Die Blutgefäßbildung im umliegenden Fettgewebe war ebenfalls reduziert gegenüber zwei Wochen zuvor. Die letzten beiden Punkte deuten darauf hin, dass die überschießende inflammatorische Reaktion zurückgegangen sein muss.

3.2.2 Tensiometrie

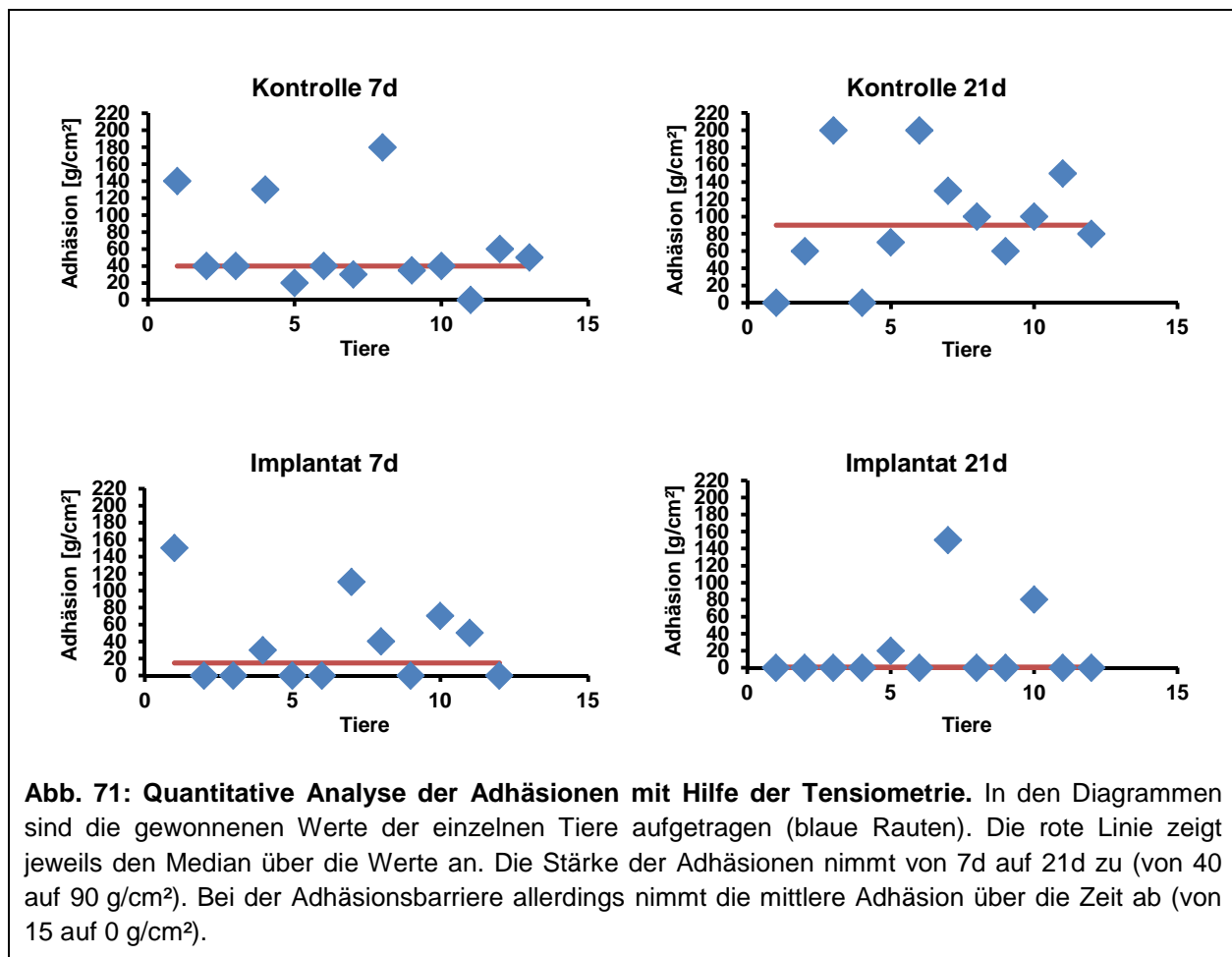
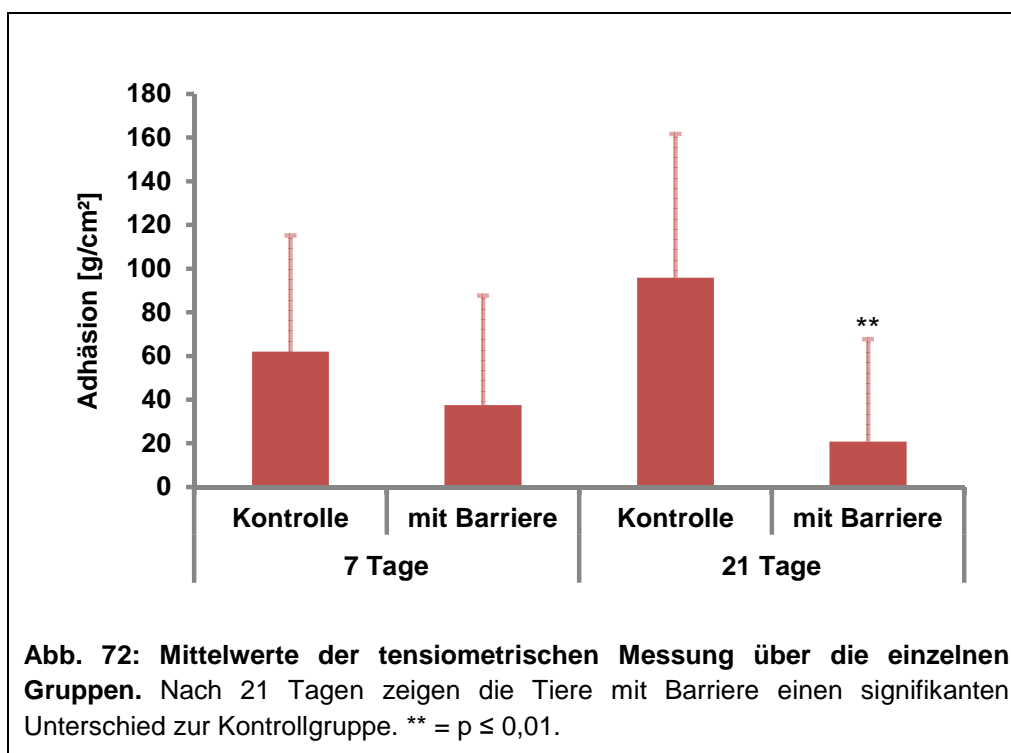


Abb. 71: Quantitative Analyse der Adhäsionen mit Hilfe der Tensiometrie. In den Diagrammen sind die gewonnenen Werte der einzelnen Tiere aufgetragen (blaue Rauten). Die rote Linie zeigt jeweils den Median über die Werte an. Die Stärke der Adhäsionen nimmt von 7d auf 21d zu (von 40 auf 90 g/cm²). Bei der Adhäsionsbarriere allerdings nimmt die mittlere Adhäsion über die Zeit ab (von 15 auf 0 g/cm²).

Die quantitative Auswertung der 1. Kontrollgruppe (7 d post OP) ergab einen Median von 40 g/cm² (Abb. 71, rote Linie). 9 der 13 operierten Tiere zeigten eine Adhäsion, die nahe an diesem Median lag. Ein Tier zeigte keine Adhäsion und 3 Tiere eine Adhäsion zwischen 130 und 180 g/cm² (Abb. 71, blaue Rauten). Nach 21 Tagen zeigte die 2. Kontrollgruppe, dass es in der Tendenz zu einer Verstärkung der Adhäsion kam. Der Median lag hier bei 90 g/cm². Zwei der 12 Tiere zeigten keine Adhäsion, zwei Tiere hatten eine Adhäsion mit einer Stärke von 200 g (Abb. 71).

Die quantitative Auswertung der Tiere mit Implantat nach 7 d zeigte, dass es im Mittel zu einer leichten Adhäsion kam. Der Median lag hier bei 15 g/cm². Sechs der 12 Tiere zeigten eine Adhäsion zwischen 30 und 160 g/cm² (Abb. 71). Nach 21 Tagen kam es bei neun der 12 untersuchten Tiere mit der Adhäsionsbarriere MeD0850-1 zu keiner Adhäsion kam. Der Median lag hier bei 0 g/cm². Drei der 12 Tiere zeigten eine Adhäsion zwischen 20 und 140 g/cm² (Abb. 71).



Vergleicht man die Mittelwerte der einzelnen Gruppen untereinander, so wird deutlich, dass die Barriere schon nach sieben Tagen eine Verbesserung der Adhäsionsbildung zeigt (Abb. 72). Allerdings wurde dieser Trend erst nach 21 Tagen

Ergebnisse

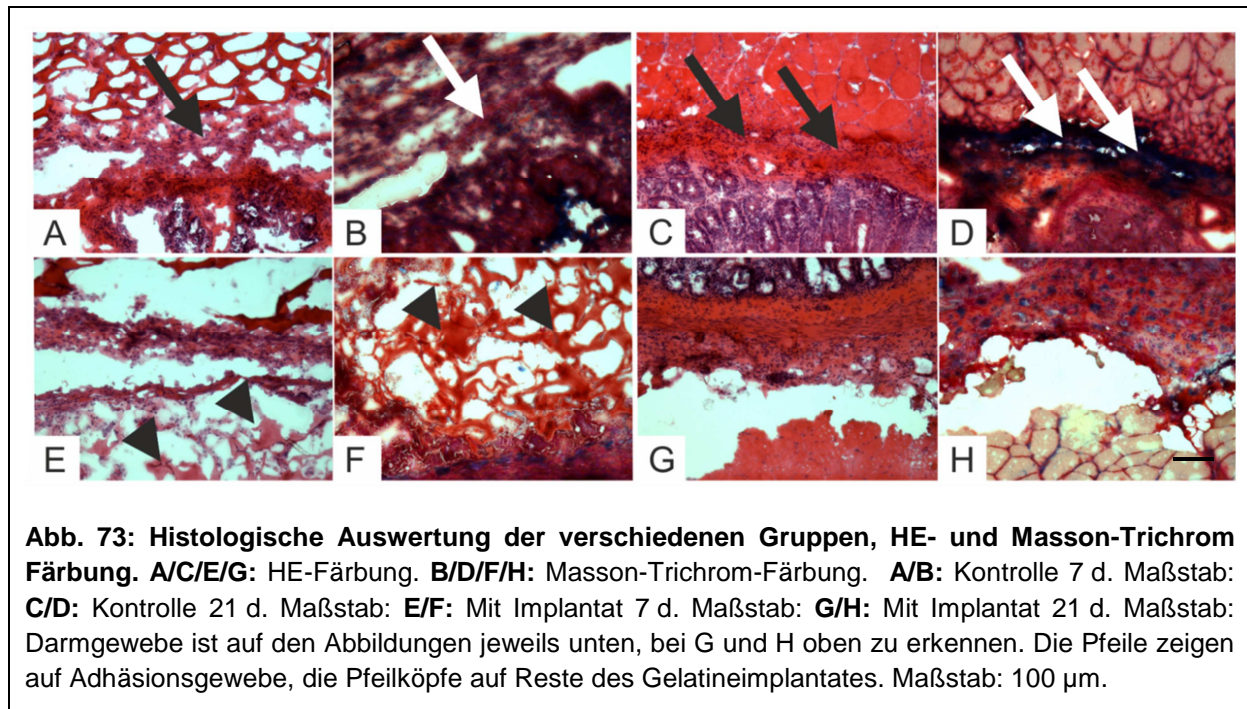
signifikant gegenüber der Kontrolle, was sicher auch an der hohen Varianz der ermittelten Werte lag.

3.2.3 Histologie

Bei der histologischen Auswertung konnte deutlich das Adhäsionsgewebe in den Kontrollgruppen erkannt werden (Abb. 73 A-D, Pfeile). So ist schon nach sieben Tagen eine deutliche Gewebezunahme zwischen Darm und Muskel auszumachen. Durch die Masson-Trichrom-Färbung konnten außerdem nachgewiesen werden, dass bis zu diesem Zeitpunkt nur sehr wenig Kollagen in diesem Gewebe abgelagert wurde (Abb. 73 B). Nach 21 Tagen war dieses Gewebe sehr viel kompakter (Abb. 73 C, Pfeile) und es waren starke Kollagenablagerungen sichtbar (Abb. 73 D, Pfeile). Bis zu diesem Zeitpunkt konnten keine Blutgefäßbildungen im Adhäsionsgewebe beobachtet werden.

In den Versuchsgruppen mit Adhäsionsbarriere war das Implantat sieben Tage post OP noch deutlich zu erkennen (Abb. 73 E/F, Pfeilköpfe). Zwischen dem Darm und Muskel war auch zusätzliches Gewebe zu erkennen, allerdings war lediglich die Muskelschicht mit dem Implantat verwachsen, zwischen Darm und Implantat kam es zu keiner Verwachsung. In der Masson-Trichrom-Färbung waren keinerlei Kollagenablagerungen zu erkennen. Nach 21 Tagen waren histologisch keine Reste der Implantate mehr zu sehen. Darm und Muskel zeigten keine Verwachsungen oder zusätzliches Gewebe zwischen den beiden Geweben (Abb. 73 G/H).

Bei allen durchgeführten histologischen Untersuchungen war der Gewebeerhalt teilweise sehr schlecht. Dies konnte an der Aufarbeitung der Gewebe liegen, eventuell muss für zukünftige Untersuchungen das Gewebe in Paraffin eingebettet werden.

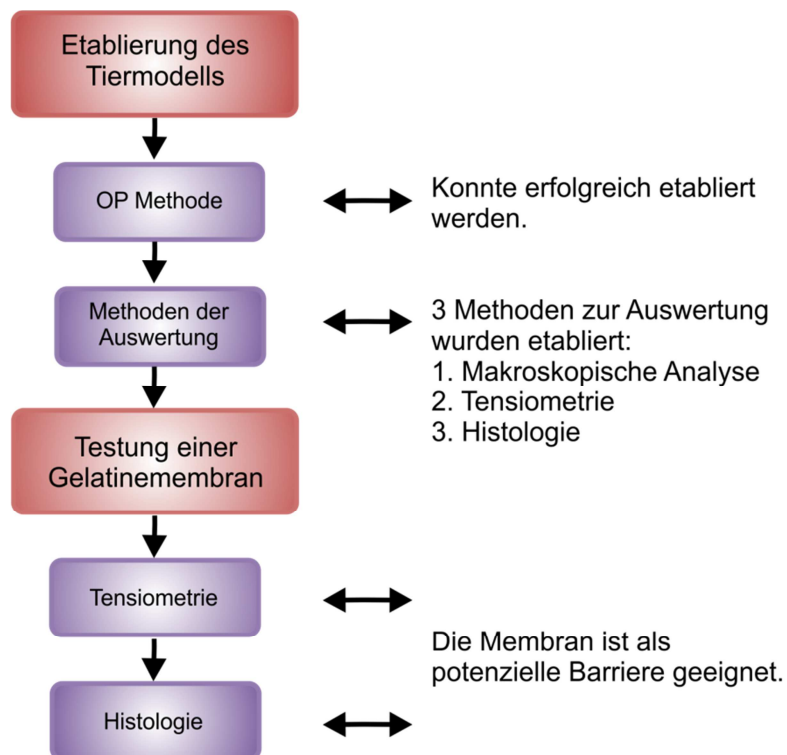


Fazit

Das Gelatinebasierte Implantat ist als Adhäsionsbarriere geeignet.

Die Verkapselungsreaktion nach 7d hat sich nach 21d wieder zurückgebildet.

3.3 Zusammenfassung



Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, gelatinebasierte Implantate auf ihre biologischen Reaktionen im peripheren Nervensystem und im abdominalen Bauchraum zu untersuchen. Gleichzeitig sollte die Funktionalität dieser Implantate bezüglich der Nervenregeneration und der Inhibition abdominaler Adhäsionen analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden einige *in vitro* und *in vivo* Assays durchgeführt und neu etabliert.

Im Folgenden sollen die gewonnenen Ergebnisse in den jeweiligen Organsystemen zunächst getrennt voneinander diskutiert werden. Anschließend folgt eine Gesamtbetrachtung von gelatinebasierten Implantaten.

1. Regeneration im peripheren Nervensystem

Lange Zeit galt es in der Wissenschaft als zentrales Dogma, dass die Regeneration des Nervensystems im adulten Organismus nicht möglich ist. In der Tat ist die Regeneration von Nerven ein sehr komplexer biologischer Prozess. Dennoch ist nunmehr schon längere Zeit bekannt, dass das periphere Nervensystem (PNS) die Fähigkeit zur Regeneration besitzt. Auch das zentrale Nervensystem (ZNS) kann, wie man vor ca. 30 Jahren herausfand, in sehr begrenztem Umfang regenerieren (David and Aguayo 1981). Bei einer Verletzung im PNS kann der Nerv ohne äußere Beeinflussung durch körpereigene Prozesse regenerieren, vorausgesetzt die Verletzung ist minimal. Bei größeren Defekten muss ein chirurgischer Eingriff durchgeführt werden, um die Wiederherstellung der Funktion zu gewährleisten.

1.1. Möglichkeiten der Überbrückung

Obwohl der erste Versuch Nerven mit Hilfe von operativen Eingriffen zu schon 1608 dokumentiert wurde (Ferrara 1608), waren die Versuche, läionierte periphere Nerven chirurgisch zu behandeln von wenig Erfolg gekrönt (Huber 1895). Erst Mitte der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts war es mit der Einführung der Mikrochirurgie möglich durch End-zu-End Vernähen durchtrennter Nerven bessere Ergebnisse zu erzielen (Millesi 1967). Im weiteren Verlauf wurde die Koaptation die klassische Methode bei Nervenläsionen (Bora 1967; Grabb 1970).

Diskussion

In der heutigen Zeit wird ein durchtrennter Nerv wenn möglich direkt vernäht oder bei größeren Lücken mit Autotransplantaten aus anderen Regionen des Patienten überbrückt. Die erste Operation dieser Art wurde von Albert (Albert 1885) durchgeführt, sie verlief allerdings wenig zufriedenstellend (Ingebrigsten 1915).

Im Verlauf des Zweiten Weltkriegs wurde die Wiederherstellung der Funktion läsionierter Nerven weiter gefördert. Woodhall kam in der Nachuntersuchung einiger Patienten, die während des Krieges behandelt wurden, zu dem Ergebnis, dass die Behandlung von Verletzungen des *Nervus medianus* eine funktionelle Wiederherstellung von über 50% zur Folge hatte. Für andere Nerven wurden allerdings deutlich schlechtere Behandlungserfolge erzielt (Woodall and Beebe 1956).

Probleme bei dieser Art der Autotransplantation können durch die Sekundärverletzung im Donorbereich auftreten. Sie kann beispielweise eine Morbidität und die Gefahr einer Neurombildung nach sich ziehen (Ortiguela, Wood et al. 1987). Weiter steht das autologe Material nur in begrenztem Umfang zu Verfügung und meistens auch nicht in der passenden Größe, bezogen auf den Nervendurchmesser (Mackinnon and Hudson 1992).

Die oben beschriebenen Möglichkeiten, sowie die Erkenntnis, dass eine funktionale Regeneration im PNS möglich ist, förderten die Suche nach einem Ersatz für das autologe Nerventransplantat bei der Überbrückung vor allem großer Defektstrecken. Aus diesen Gründen ist das Ziel jahrzehntelanger Bemühungen die Entwicklung von artifiziellen Nervenleitschienen.

1.2. Nervenimplantate

1.2.1. *Verschiedene Materialien*

Schon im neunzehnten Jahrhundert wurden bereits zahlreiche biologische und nicht biologische Materialien getestet, um durchtrennte Nerven im PNS überbrücken zu können.

Es wurden dekalzifizierte Knochen (Gluck 1880), Metallröhren (Payr 1900) und Fettgewebe (Kirk and Lewis 1915) als potenzielle Leitstrukturen verwendet. Bereits damals hatte sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass eine Struktur für die Leitung der

Nerven zum Zielorgan im Bereich der Durchtrennung zu einem deutlich besseren Heilungserfolg führt.

Anforderungen, die eine solche Struktur erfüllen muss, wurden schon in einigen Publikationen formuliert (Hudson, Evans et al. 1999; Huang and Huang 2006).

Eines der ersten möglichen Konzepte war die Verwendung von nicht abbaubaren Röhren. Die Vorteile an diesen nicht biologischen Materialien liegen vor allem darin, dass sie kaum Immunantworten auslösen und keine Krankheitserreger, z.B. aus dem Spenderorganismus, übertragen werden. Bei kurzen Distanzen kann für diese meist aus Silikon bestehenden Röhren ein guter Regenerationserfolg erzielt werden (Midgley and Woolhouse 1968; Lundborg, Dahlin et al. 1990; Lundborg, Rosen et al. 1997; Dahlin and Lundborg 2001). Da diese Implantate nicht permeabel für Metabolite und Gase sind, ist eine Regeneration ab einer Defektstrecke von 1,5 cm nicht mehr möglich. Die Nährstoffversorgung, die von den Nervenstümpfen ausgeht, ist bei einer solchen Länge nicht mehr ausreichend, um Zellen und regenerierende Axone im Inneren der Röhre zu versorgen (Lundborg and Hansson 1980; Strauch 2000).

Aebischer et al. konnten 1988 zeigen, dass die verbesserte Diffusion in einer semipermeablen Polymerröhre die Nervenregeneration signifikant erhöht (Aebischer, Winn et al. 1988). In einer anderen Studie wurde allerdings gezeigt, dass eine zu starke Diffusion auch inhibitorisch auf die Nervenregeneration wirken kann. So können dadurch inhibitorisch wirkende Moleküle aus der Wundheilungsumgebung in den Läsionsbereich eindringen (Aebischer, Salessiotis et al. 1989).

Da der Körper nicht in der Lage ist Röhren aus Silikon abzubauen, eine voranschreitende Regeneration des Nervs aber mit einem Dickenwachstum verbunden ist, kam es zu inflammatorischen Reaktionen, chronischen Kompressionen, und schließlich zum Verlust der teilweise wiedererlangten neuronalen Funktion. Im Laufe der Zeit wurden weitere nicht resorbierbare Materialien wie z.B. Gore-Tex (ePTFE) (Pogrel, McDonald et al. 1998; Stanec and Stanec 1998; Stanec and Stanec 1998; Vasconcelos and Gay-Escoda 2000; Pitta, Wolford et al. 2001; Miloro, Halkias et al. 2002) eingesetzt, allerdings konnte sich keines der Materialien durchsetzen.

Diskussion

In heutiger Zeit werden aus den oben genannten Gründen beinahe ausschließlich resorbierbare Leitschienen aus biologischen oder nicht biologischen Materialien untersucht. Ein Vorteil biologischer Materialien ist, dass sie vollständig vom Körper resorbiert werden können und somit keine schädigenden Substanzen hinterlassen.

Mit Venen konnten schon in den 80er Jahren gute Erfolge erzielt werden (Chiu, Janecka et al. 1982; Risitano, Cavallaro et al. 1989; Walton, Brown et al. 1989; Chiu 1999; Risitano, Cavallaro et al. 2002). Bis zu einer Defektstrecke von 3 cm und bei sofortiger Anwendung der Implantate konnte in Tierversuchen und klinischen Anwendungen eine verbesserte Regeneration erzielt werden (Walton, Brown et al. 1989; Tang 1993; Tang, Gu et al. 1993; Tang 1995; Chiu 1999). Venen bilden allerdings kein optimales Substrat für auswachsende Neuriten, weshalb eine Überbrückung größerer Nervendefekte mit derartigen Implantaten nicht möglich ist. Oft ist ihre Wand auch zu dünn, was leicht zu einem Kollabieren der Röhre führen kann, zudem birgt die Narbenbildung um die Röhre die Gefahr, dass diese abgeschnürt wird.

Weitere verwendete biologische Materialien sind Muskeln (Norris, Glasby et al. 1988; Glasby 1991; Pereira, Palande et al. 1991; Rath and Green 1991; Glasby, Hems et al. 1992; Glasby, Mountain et al. 1993; Chen, Seaber et al. 1994; Glasby, Clutton et al. 1995; Wang, Hung et al. 1997; Lenihan, Carter et al. 1998) oder Sehnen (Luo and Chao 1989; Brandt, Dahlin et al. 1999; Brandt, Dahlin et al. 2002). Muskeln besitzen eine längsorientierte Basallamina, die nutzbar gemacht wird, indem die vorhandenen Zellen durch abwechselndes Einfrieren und Auftauen des Muskels abgetötet werden. Mit Hilfe dieses Implantates konnten bis heute allerdings auch nur kurze Defektstrecken (ca. 1 cm) überbrückt werden (Glasby, Gschmeissner et al. 1986; Norris, Glasby et al. 1988; Chen, Seaber et al. 1994). Die größte Gefahr besteht in der Bildung eines Neuroms durch fehlgeleitete Neurite. Weiter können nicht abgetötete Muskelzellen im Implantat von auswachsenden Neuronen reinnerviert werden (Kerns, Danielsen et al. 2003). Dieser in sich selbst zuckende Nerv kann sich durch die selbst ausgelöste Muskelaktivität Schmerz und eine Schädigung des Nervs hervorrufen.

Dies alles sind Gründe dafür, dass oft der Einsatz von biologischen Polymeren, wie Fibronektin (Whitworth, Brown et al. 1995; Whitworth, Terenghi et al. 1995; Ahmed, Brown et al. 1999; Ahmed, Underwood et al. 2003), Laminin (Kauppila, Jyvasjarvi et al. 1993), Hyaluronsäure (Seckel, Jones et al. 1995) Kollagen (Ansselin, Fink et al.

1997; Ceballos, Navarro et al. 1999; Dubey, Letourneau et al. 1999), Gelatine (Gamez, Goto et al. 2004; Chen, Chen et al. 2005; Chen, Chang et al. 2005), und weiteren abbaubaren Materialien, wie Alginat (Hashimoto, Suzuki et al. 2002; Wu, Suzuki et al. 2002; Kataoka, Suzuki et al. 2004), Agarose (Balgude, Yu et al. 2001) und Chitosan (Itoh, Suzuki et al. 2003; Yuan, Zhang et al. 2004), vorgezogen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden enzymatisch vernetzte (Transglutaminase) Röhrenimplantate aus Gelatine verwendet.

1.2.2. Gelatine

Gelatine wird von der FDA (United States Food and Drug Administration) als gefahrloses Biomaterial eingestuft (Courts 1977) und ist für den Einsatz im Menschen bedenkenlos verwendbar. Dies wird jedoch durch die Verwendung von Additiven, wie chemischen Quervernetzern eingeschränkt.

Gelatine wird aus Kollagen hergestellt, wobei verschiedene thermische, physikalische oder chemische Denaturierungsmethoden zum Einsatz kommen können.

Es gibt einige Arbeitsgruppen, die sich mit der Entwicklung von Nervenleitschienen aus Kollagen für die Regeneration beschäftigen (Archibald, Krarup et al. 1991; Yoshii and Oka 2001; Yoshii and Oka 2001; Yoshii, Oka et al. 2001; Inada, Morimoto et al. 2005; Phillips, Bunting et al. 2005; Yoshitani, Fukuda et al. 2007). Außerdem ist eine Leitschiene aus Kollagen am Markt zugelassen (Mackinnon, Dellon et al. 1985; Li, Archibald et al. 1992; Archibald, Shefner et al. 1995). Kollagen ist gegenüber Gelatine aber relativ teuer und kann unter physiologischen Bedingungen eine Immunreaktion auslösen (Chang, Lin et al. 2007).

Das ist einer der Gründe, weshalb Gelatine als erstes biologisch abbaubares Material für die Applikation als Nervenleitschiene verwendet wurde (Lotheissen 1901; Braun 1964). Gelatine ist kostengünstiger, zeigt eine hervorragende Biokompatibilität und Plastizität und Zellen können sehr gut adhären.

Die guten biologischen Eigenschaften von Gelatine wurden in der Vergangenheit versucht mit den Charakteristika von Polymeren zu verbinden. So konnte gezeigt werden, dass bei herkömmlichen Polymeren, wie z.B. Polylaktid, eine Beschichtung mit Komponenten der Extrazellulärmatrix dabei hilft, dass Zellen besser darauf adhären können (Lazzeri, Cascone et al. 2006).

Diskussion

In weiteren Versuchen mit einer Kombination aus Gelatine und Agarose für den Einsatz im Tissue Engineering, wurden ebenfalls positive biologische Eigenschaften nachgewiesen. Es konnte eine ähnlich gute Adhäsion der Zellen wie auf Zellkulturschalen und eine ebenso gute Proliferation festgestellt werden (Sakai, Hashimoto et al. 2007).

Gelatine allein kann als Implantatmaterial nur verwendet werden, wenn die Gelatinefragmente vernetzt werden. *In vivo* wird nicht vernetzte Gelatine sehr schnell aufgelöst und von spezifischen Gelatinasen abgebaut (Broderick, O'Halloran et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Vernetzung der Nervenleitschienen und des Gewebekleber eine bakterielle Transglutaminase (TGase) verwendet.

Transglutaminasen sind natürlich vorkommende Enzyme, die den Acyl-Transfer zwischen der Aminogruppe von Lysin auf die Carboxyamidgruppe von Glutamin katalysieren (Ikura 1980; Motoki 1983; Griffin, Casadio et al. 2002). Seit der Entdeckung der bakteriellen TGase, gewonnen aus einer Variante von *Streptovorticillium mobaraense*, ist dieses Enzym für viele Anwendungen interessant geworden (Kurth 1984). Die bakterielle TGase ist Calcium-unabhängig und katalysiert kovalente Verbindungen zwischen Glutamin und Lysin-Resten in Proteinen. Durch diese Eigenschaften hat sie vor allem in der Lebensmittelindustrie breiten Einsatz gefunden (Ikura 1980; Motoki 1983; Kurth 1984; Ando, Adachi et al. 1989) und ist von der FDA für den humanen Verzehr zugelassen (Choi, Hong et al. 1999).

In einer ersten Studie haben Broderick et al. auch Gelatine mit der bakteriellen TGase vernetzt, um Materialien für das Tissue Engineering herzustellen. Sie fanden heraus, dass Gelatine mit TGase stabilisiert werden kann und dass das Material weitgehend biokompatibel ist (Broderick, O'Halloran et al. 2005). 2007 konnten Yung et al. zeigen, dass TGase vernetzte Gelatine selbst für eingeschlossene Zellen eine gute Matrix darstellt und dass die enzymatische Degradationszeit des Materials für den Einsatz als Implantat akzeptabel ist (Yung, Wu et al. 2007).

An einer Nervenleitschiene aus mit TGase vernetzter Gelatine wurde bis jetzt noch nicht geforscht, obwohl dieses Material vielversprechende Eigenschaften für eine solche Leitstruktur besitzt.

In der Literatur finden sich verschiedene Ansätze bei der Entwicklung von Nervenleitschienen aus Gelatine.

So kann die Gelatine auch mit Aldehyden vernetzt werden, um stabil zu bleiben. Die zytotoxischen Effekte können mit Hilfe von Waschschrritten minimiert werden, so dass Zellen ohne Probleme adhärieren und Neurone auswachsen können (Sung, Huang et al. 1999). Die Waschprozedur führte wiederum zu einem nicht erwünschten Verlust der Steifigkeit des Materials, was einen Einsatz als Nervenleitstruktur kaum zulässt. Allerdings konnte in diesen Versuchen auch gezeigt werden, dass Gelatine als Material für die Nervenregeneration durchaus geeignet ist (Mligiliche, Tabata et al. 1999).

Auch eine Vernetzung mit Glutaraldehyd (GA) erhöht den Widerstand der Gelatine gegen enzymatischen Abbau *in vivo* (Meade and Silver 1990; Damink, Dijkstra et al. 1995; Bigi, Bracci et al. 1998). Dabei maskiert diese chemische Modifikation der Gelatine wahrscheinlich spezifische Bindungsstellen der Enzyme, so dass diese schlechter agieren können (Broderick, O'Halloran et al. 2005). Zunächst wurde in einer Arbeitsgruppe die Biokompatibilität und Zytotoxizität untersucht (Lin, Yao et al. 1998).

Dabei kam heraus, dass es in einer ersten Phase zu einer graduellen Abgabe von Glutaraldehyd kam und sich die Zellzahl erst nach Überdauern dieser Phase, signifikant erhöhte. Für weiterführende Versuche wurde *nerve growth factor* (NGF) an die Membranen gebunden. Gelatine ist in der Lage über primäre Carboxylgruppen Wachstumsfaktoren durch deren Aminogruppen zu binden. Zellen zeigten auf den so behandelten Membranen eine natürlichere Morphologie, allerdings konnte trotz positiver Ergebnisse eines MTS-Versuchs, keine Erhöhung der Proliferation erreicht werden (Chen, Chen et al. 2004; Chen, Chen et al. 2005).

Eine weitere Erkenntnis dieser Studien war, dass Gelatine über einen Zeitraum von 2 Monaten konstant Wachstumsfaktoren abgeben konnte. Dieses so behandelte Implantatmaterial wurde dann in einer ersten Studien für den Einsatz in der Nervenregeneration getestet (Chen, Chen et al. 2005). Zu diesem Zweck wurden Glutaraldehyd vernetzte Röhren und Silikonröhren als Kontrolle in der Ratte implantiert. Nach 6 Monaten kam es in funktionellen, elektrophysiologischen und morphologischen Untersuchungen zu signifikanten Verbesserungen gegenüber der Kontrolle. Das Muskelaktionspotential war doppelt so hoch und die

Diskussion

Gesamtnervfläche erhöhte sich sogar um den Faktor 6 im Vergleich zur Kontrolle. Dies sind einige der ersten Versuche, wo neben der histologischen Analyse auch die funktionelle Wiederherstellung untersucht wurde.

Als weitere Möglichkeit der Vernetzung kann Styrol an Gelatine gekoppelt werden. Eine Arbeitsgruppe in Japan verwendete dieses Aren, um die Gelatine photoreaktiv zu machen und sie dann durch Lichtapplikation auszuhärten. In ersten Untersuchungen konnte nur eingeschränktes Wachstum von Schwann Zellen und Axonen auf dem Material beobachtet werden (Gamez, Ikezaki et al. 2003). Erst die Zugabe von bioaktiven Substanzen, wie Laminin oder Matrigel, verbesserte das Wachstum der Zellen. Keine der oben erwähnten negativen Effekte sind in zahlreichen anderen Untersuchungen, inklusive der unseren, beschrieben. Wahrscheinlich bringt die Kopplung von Gelatine an Styrol einen biologisch inaktiven Komplex hervor, worauf Zellen nicht adhären können. In weiterführenden Versuchen wurde diese Nervenleitschiene am Ischiasnerv der Ratte getestet (Gamez, Goto et al. 2004).

Nach 2 Monaten war die Röhre vollständig resorbiert und unter funktionellen (Messung des Sciatic function index), elektrophysiologischen und morphologischen Gesichtspunkten waren erste Anzeichen einer Nervenregeneration erkennbar, aber nur wenn die Röhre zusätzlich mit einer Innenstrukturierung versehen war.

Ein weiterer Stoff, der zur Vernetzung von Gelatine verwendet werden kann, ist Genipin. Es wird aus der Pflanze *Gardenia jasminoides* isoliert und ist signifikant weniger toxisch als die Aldehyde und das Styrol. Zunächst wurde dieses Material als Matrix einer Silikonröhre untersucht. Nach 6 Wochen konnten auch erste Anzeichen einer Regeneration festgestellt werden, allerdings ist dieser Zeitpunkt sehr früh gewählt, um valide Aussagen treffen zu können. Die Arbeitsgruppe kam aber trotzdem zu dem Entschluss, dass Genipin vernetzte Gelatine sich als Matrix für die Nervenregeneration eignet, da sich die Anzahl der Axone auf einem vergleichbaren Niveau wie die der Kontrolle mit Kollagen bewegte (Liu, Yao et al. 2004). Weitere Arbeiten dieser Gruppe (Chen, Chang et al. 2005) zeigten, dass diese Nervenleitschienen subkutan in der Ratte implantiert keine Entzündungsreaktionen auslösen. Es bildete sich lediglich eine dünne Gewebekapsel um das Implantat. In weiteren Versuchen wurde die Effektivität der Röhre bei der Nervenregeneration am Ischiasnerv der Ratte analysiert. Zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 Wochen wurde mit

Hilfe von histologischen Untersuchungen und Messungen der Aktionspotentiale des Muskels durchgeführt. Es konnten eine steigende Anzahl von myelinisierten Axonen, sowie eine Erhöhung der Aktionspotentiale und somit eine Verbesserung der Nervenregeneration festgestellt werden. Allerdings gab es keine Vergleichswerte zu einem gesunden Nerv, um die Ergebnisse in Relation setzen zu können. Auch die gewählten Untersuchungszeitpunkte (8 Wochen) sind für valide Aussagen hinsichtlich der Regeneration funktioneller Fähigkeiten zu früh. Eine weitere Feststellung, weshalb sich die Arbeitsgruppe schließlich einer neuen Vernetzungsmethode zuwendete, war, dass sich Genipin vernetzte Röhren nur langsam abbauen.

1.2.3. Innere Struktur von Nervenleitschienen

Für die weitere Verbesserung der Regeneration mit Hilfe von Nervenleitschienen ist ein Ansatz den auswachsenden Neuriten innerhalb des Implantates eine Matrix vorzugeben. Mit Hilfe dieser Matrix sollen die natürlich entstehenden Büngnerschen Bänder nachgestellt werden. Bisher wurden dahingehend drei verschiedene Ansätze verfolgt. Der erste Ansatz basiert auf der Verwendung von längs gerichteten Filamenten, die beispielsweise aus PLLA (Poly-L-Laktid) (Ngo, Waggoner et al. 2003; Cai, Peng et al. 2004; Cai, Peng et al. 2005), PCL (Polycaprolacton; (Ribeiro-Resende, Koenig et al. 2009), PDO (Polydioxanon; (Nichterwitz, Hoffmann et al. 2010)) oder Gelatine (Gamez, Goto et al. 2004) bestehen. Ein zweiter Ansatz ist die Verwendung schwammartiger Strukturen, z.B. aus Kollagen (Chamberlain, Yannas et al. 2000; Matsumoto, Ohnishi et al. 2000; Toba, Nakamura et al. 2001; Toba, Nakamura et al. 2002; Ito, Nakamura et al. 2003; Inada, Morimoto et al. 2004) oder Fibronectin (Ahmed, Underwood et al. 2003). Ein Nachteil der Schwämme ist, dass sie gegenüber den Filamenten nicht über eine durchgehende Längsstruktur ohne Unterbrechung verfügen, so dass die auswachsenden Neuriten nicht auf direktem Weg zu ihrem Ziel geleitet werden können. Dagegen kann ein Schwamm gleichmäßiger in der Röhre verteilt werden, als die meist sehr dünnen Filamente.

Im dritten Ansatz, eine innere Struktur zu erzeugen, werden die Nervenleitschienen mit Gelen ausgefüllt. Dies können beispielsweise Matrigel (Rodriguez, Verdu et al. 2000; Navarro, Rodriguez et al. 2003; Udina, Rodriguez et al. 2004; Sinis, Schaller et al. 2005; Novikova, Mosahebi et al. 2006), Alginat (Mosahebi, Simon et al. 2001;

Diskussion

Mosahebi, Wiberg et al. 2003; Novikova, Mosahebi et al. 2006) oder Kollagen (Ceballos, Navarro et al. 1999; Rosner, Siegel et al. 2003) sein. Dabei scheint Kollagen am vorteilhaftesten, da man die einzelnen Makromoleküle über Zugkräfte ausrichten kann und somit eine Orientierung für die auswachsenden Neuriten vorgibt (Phillips, Bunting et al. 2005).

Viele dieser Ansätze und Materialien können auch miteinander kombiniert und außerdem auf molekularer Ebene unterstützt werden. Es können zum Beispiel neurotrophe Faktoren wie Neuregulin (Lemke 1996; Falls 2003), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *neurotrophin-3* (NT-3), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *glial cell line-derived growth factor* (GDNF), *nerve growth factor* (NGF) oder *fibroblast growth factor* (FGF) (Yip and So 2000; Schmidt and Leach 2003) eingesetzt werden. All diese Faktoren fördern das Überleben, Auswachsen und letztlich die Regeneration von Nerven.

Weiter sind Moleküle, wie z.B. Kollagen, Fibronectin, Laminin, Heparansulfatproteoglykan (HSPG) oder das *neural cell adhesion molecule* (N-CAM) denkbar, denn sie dienen der Verbesserung der Zelladhäsion (Paratcha, Ledda et al. 2003).

Allerdings verspricht man sich am meisten Erfolg von der Verwendung von Schwann Zellen in einer Nervenleitschiene (Ogden, Feng et al. 2000; Mirsky, Jessen et al. 2002; Auld and Robitaille 2003; Schlosshauer, Muller et al. 2003). Sie bieten den auswachsenden Neuriten ein optimales Substrat über die Bildung von Büngerschen Bändern und der Bereitstellung von Extrazellulärmatrix und Adhäsionsmolekülen. Gleichzeitig produzieren sie verschiedenste trophische Faktoren für die regenerierenden Neuriten (Ide 1996). Die meisten Einflüsse der oben genannten Faktoren sind in ihrem Ablauf noch nicht entschlüsselt. Weiter ist zurzeit nicht abzuschätzen, welche Faktoren in welchen Konzentrationen, Kombinationen und zu welchem Zeitpunkt sezerniert werden, um eine optimale Regeneration zu erzielen.

Bei der Applikation von Schwann Zellen werden, vermutlich über Rückkopplungsmechanismen, die für die Nervenregeneration nötigen Komponenten lokal und zeitlich abgestimmt hergestellt und je nach Status der Regeneration und der äußeren Einflüsse abgegeben.

In der vorliegenden Arbeit kam es zu keiner Verbesserung der Nervenregeneration nach Zugabe von Schwann Zellen in die Nervenleitschiene. Dieses Ergebnis steht zwar im Widerspruch zur Literatur, kann aber verschiedene Gründe haben. Die Schwann Zellen wurden vor der Implantation auf Rattenserum umgestellt, um die Immunreaktion auf Fremdproteine, z.B. auf das Rinderserums des Kulturmediums zu minimalisieren. Trotz des Nachweises, dass die Schwann Zellen noch SZ-typische Marker exprimierten und nicht dedifferenzierten, könnten sie in ihren Eigenschaften beeinflusst worden sein. Durch die Umstellung dieser primären Zellen wurden die SZ außerdem erst in Passage 15 implantiert. Das Alter der SZ kann ebenfalls einen Einfluss darauf haben, inwiefern die SZ noch in der Lage sind, die Regeneration der Nerven zu unterstützen (Funk, Fricke et al. 2007). Weiter spielt die Anzahl der implantierten Schwann Zellen eine große Rolle. Werden zu viele Zellen implantiert, so reichen die Nährstoffe, die durch die Röhrenwand diffundieren wahrscheinlich nicht aus, um alle Zellen zu versorgen. Der so entstehende Zelldebris kann sich dann wieder inhibierend auf die Regeneration auswirken. Werden zu wenige Zellen implantiert, reichen die Zellen nicht aus, um Büngnersche Bänder zu bilden. Es müssen zuerst körpereigene SZ in die Röhre einwandern bzw. proliferieren, was wiederum zu einer Verzögerung der Regeneration führt.

1.2.4. Gewebekleber

Neben der Gelatineröhre wurde in der vorliegenden Arbeit auch ein Gewebekleber auf der Basis von Gelatine untersucht. In *in vitro* und *in vivo* Experimenten stellte sich heraus, dass der Kleber biokompatibel ist und von Zellen als Wachstumsmatrix angenommen wird. Allerdings wurde auch festgestellt, dass der Kleber im auspolymerisierten Zustand nicht von Zellen durchdrungen werden kann und er bei der Befestigung von Nervenleitschienen am Ischiasnerv der Ratte nur verhältnismäßig wenig Zugkraft aushalten kann.

Schon seit den frühen 80iger Jahren werden medizinische Kleber in der Klinik angewendet. Dabei wurde hauptsächlich mit Fibrinklebern gearbeitet, die eine vergleichbare Alternative zur herkömmlichen Naht darstellen (Ventura, Torri et al. 1980). Bei Experimenten zu den zellulären Vorgängen der Regeneration, konnte kein großer Einfluss auf die Zellen oder eine Verzögerung bei der Regeneration beobachtet werden (Becker, Gueuning et al. 1985; Becker, Gueuning et al. 1985).

Diskussion

Tissuocol (Baxter) ist ein sich bereits auf dem Markt befindlicher Fibrinkleber. Er basiert auf humanen Plasmaproteinen und Thrombin und kann dadurch vor allem bei mehrmaliger Anwendung zu Immunreaktionen führen (Seyednejad, Imani et al. 2008).

Gewebekleber auf Gelatinebasis wurden bislang beinahe ausschließlich in der kardiovaskulären Chirurgie und hier vor allem bei Eingriffen an der Aorta eingesetzt. BioGlue (CryoLife Inc.) ist ein auf Gelatine basierender Kleber, der seit einigen Jahren auf dem Markt ist (Hewitt, Marra et al. 2001; Fehrenbacher and Siderys 2006; Mitrev, Belostotskii et al. 2007). Er enthält 10% Glutaraldehyd und 45% Albumin als Vernetzer (Chao and Torchiana 2003). Trotz einzelner Fälle, bei denen toxische Nebenwirkungen nachgewiesen werden konnten (Bingley, Gardner et al. 2000; Martinelli, Graffigna et al. 2000), erhielt der Kleber 2001 die Zulassung der FDA. Glutaraldehyd ist dafür bekannt, dass es für Zelltod verantwortlich sein kann und die Proliferation von Fibroblasten inhibiert. Es erhöht die Neigung von Gewebe zu mineralisieren und fördert die Reaktion von Mastzellen bei Freisetzung aus Implantaten (Huang-Lee, Cheung et al. 1990; Beauchamp, St Clair et al. 1992; Erasmi, Sievers et al. 2002; Furst and Banerjee 2005).

In zwei klinischen Studien wurden 138 respektive 269 Patienten mit diesem Gelatinekleber behandelt (Shiono, Hata et al. 2006; Suzuki, Imoto et al. 2006). In nachfolgenden Operationen konnten keinerlei Nekrosen des Gewebes oder Immunreaktionen beobachtet werden. Der Gewebekleber verbesserte die chirurgischen Resultate und zeigt außerdem eine gute Adhäsion am Gewebe. Zuvor befürchtete Komplikationen aufgrund der toxischen Wirkung des Aldehyds konnten nicht festgestellt werden, allerdings wurden die Gewebe auch nicht histologisch untersucht.

Der Vergleich verschiedener Wundverschlüsse der Haut mit Hilfe eines Gelatineklebers und der herkömmlichen Nahtmethode zeigte bei Überprüfung der Zugbelastbarkeit keine Unterschiede zwischen beiden Varianten (Sung, Huang et al. 1999). Nur der Heilungsverlauf war bei der Naht schneller als bei dem Gelatinekleber. Die Gefahr einer Entzündung war bei beiden Methoden gleich niedrig. Die Autoren schlussfolgerten also, dass beide Methoden für den Einsatz in der Klinik gleichwertig sind. Ähnliche Ergebnisse bekam eine Arbeitsgruppe, die einen biologischen Gewebekleber mit der herkömmlichen Nahtmethode bei der

Reparatur von peripheren Nerven verglich. Der Gewebekleber zeigte eine gleich starke mechanische Belastbarkeit, wie die Nähte (Nishimura, Mazzer et al. 2008).

Ein weiterer auf Gelatine basierender Gewebekleber ist der Gelatine-Resorcin-Formaldehyd-Kleber (GRF; Bard). Er wird hauptsächlich zum Verschluss des *false Lumens* der Aorta und zur Verstärkung der Aorta nach chirurgischen Eingriffen verwendet. Er scheint gute klinische Ergebnisse zu liefern (Bachet, Goudot et al. 2000; Shiono 2008). Trotzdem ist das Aldehyd im Kleber dafür bekannt, dass es stark zytotoxisch wirkt. Es steuert die Entstehung von Nekrose und scheint in Spätfolgen für die Dehiszenz der Gewebe zu sein (Fukunaga, Karck et al. 1999; Kazui, Washiyama et al. 2001; von Oppell, Karani et al. 2002; Nakajima, Kawazoe et al. 2005).

Beim einer histologischen Vergleichsstudie von Tissucol, BioGlue und von GRF im Aortic Dissection Model von Witter et al. 2010 zeigte sich, dass der Fibrinkleber Tissucol am wenigsten negative Effekte auf das Gewebe hat. Die beiden anderen Kleber wirkten sich, vermutlich durch die Vernetzung mit Aldehyden, vor allem auf die Struktur der Aorta aus und zeigten eine erhöhte Immunreaktion (Witter, Tonar et al. 2010).

In Tabelle 2 sind die in den oberen Abschnitten beschriebenen Gewebekleber noch einmal zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über Gewebekleber

| Gewebekleber | Zusammensetzung | Einsatzbereich | Nebenwirkungen | Literatur |
|-------------------|--|--|---|--|
| Tissuecol® | Humanes Plasmaprotein Thrombin | Gewebeklebung Blutstillung Wundheilung Gefäßchirurgie | Immunreaktionen | (Seyednejad, Imani et al. 2008) |
| BioGlue® | Doppelkammerspritze: Gelatine 10% Glutaraldehyd 45% Albumin | Gefäßchirurgie | Toxizität Mineralisierung von Gewebe Aktivierung von Mastzellen | (Huang-Lee, Cheung et al. 1990; Beauchamp, St Clair et al. 1992; Erasmi, Sievers et al. 2002; Furst and Banerjee 2005) |
| GRF | Gelatine Resorcin Formaldehyd | Gefäßchirurgie | Nekrosen Dehiszenz | (Fukunaga, Karck et al. 1999; Kazui, Washiyama et al. 2001; von Oppell, Karani et al. 2002; Nakajima, Kawazoe et al. 2005) |

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es bereits zahlreiche Anwendungen von Gelatine und anderen Materialien im Bereich der Nervenregeneration gibt. Sie unterscheiden sich allerdings maßgeblich in ihren physikalischen und biologischen Eigenschaften aufgrund der gewählten Vernetzungsmethoden. Diese sind für das Konzept einer Leitstruktur aus Gelatine von großer Bedeutung, besonders vor dem Hintergrund der konkurrierenden Konzepte basierend auf anderen Materialien.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse sind hinsichtlich Parameter wie Biokompatibilität oder Resorption auf einem vergleichbaren Niveau einzuordnen. Bezüglich der Nervenregeneration müssen noch Verbesserungen am Implantat vorgenommen werden.

1.3. Methodische Betrachtungen

1.3.1. Tiermodelle

In dieser Arbeit wurde der Ischiasnerv der Ratte als Läsionsmodell für die Regeneration im peripheren Nervensystem verwendet.

Heutzutage werden bevorzugt Ratten als Tiermodell zur Untersuchung peripherer Nervenregeneration verwendet. Bei einer Vielzahl der Untersuchungen von Nervenverletzungen wird der *N. ischiadicus* als Läsionsmodell verwendet. Der Ischiasnerv ist ein gemischter Nerv und besteht sowohl aus sensorischen als auch aus motorischen Fasern. Dies hat den Vorteil, dass die Regeneration von beiden Teilen untersucht werden kann, führt aber vor allem bei morphologischen Untersuchungen oft zu Fehleinschätzungen, da sensorische Fasern in der Lage sind schneller als motorische zu wachsen (Kawasaki, Yoshimura et al. 2000).

Der *N. ischiadicus* bietet unter anderem die Möglichkeit Verhaltensuntersuchungen zur funktionellen Regeneration durchzuführen.

Die Regenerationsfähigkeit des läsierten Nervs ist abhängig von der gewählten Spezies und Rasse (Calvert, Doolabh et al. 2001), dem Ort und dem Nervendurchmesser. Der Durchmesser eines gesunden *N. ischiadicus* einer adulten Ratte beträgt durchschnittlich ca 0,7 mm (Jenq and Coggeshall 1986) und es wird eine Wachstumsgeschwindigkeit von 0,5 – 1 mm pro Tag angegeben (Williams, Longo et al. 1983).

Die Defektstrecken, die in diesem Tiermodell verwendet werden, liegen im Bereich von 6 bis 30 mm, wobei sich die Mehrzahl der Lücken um 10 mm befindet (Danielsen, Muller et al. 1988a; Kakinoki, Nishijima et al. 1997; Hadlock, Elisseeff et al. 1998; Bryan, Holway et al. 2000; Hadlock, Sundback et al. 2000). Die in dieser Arbeit gesetzte Defektstrecke von 10 mm lag somit im Durchschnitt.

Auch der Beobachtungszeitraum spielt neben der Länge des Defektes eine entscheidende Rolle für die Aussagekraft der Ergebnisse. Er darf dabei nicht zu lange gewählt werden, um eine Unterscheidung zwischen den Gruppen noch möglich zu machen (Anselin, Fink et al. 1997), aber auch nicht zu kurz sein, weil sonst noch keine Regeneration messbar wäre.

Die Beobachtungszeiträume unterscheiden sich in den meisten publizierten Arbeiten stark. Sie liegen bei wenigen Wochen bis zu 16 Monaten (Hare, Evans et al. 1992;

Diskussion

Ijkema-Paassen, Jansen et al. 2004). Für die Untersuchung der Histologie parallel zu funktionellen Assays wird bei stärkeren Verletzungen ein Zeitraum von mindestens 3 Monaten empfohlen, um eine valide Aussage über das Wiedererlangen der Funktion machen zu können (Dijkstra, Meek et al. 2000; Koka and Hadlock 2001; Meek, van der Werff et al. 2003). Es gibt allerdings auch Arbeiten, die die Überbrückung kleiner Defektstrecken in einem Zeitraum von 6 Wochen sowohl histologisch, als auch mit funktionellen Methoden untersucht haben (Zhang, He et al. 2005; Marchesi, Pluderi et al. 2007).

Die in dieser Arbeit ausgewählten Untersuchungszeiträume (3, 6 und 9 Monate) waren demnach deutlich ausreichend sowohl für histologische Untersuchungen der Regeneration, als auch für die Funktionalitätsregeneration der autolog-transplantierten und röhrenimplantierten Tiere.

Ein häufiges Problem bei funktionalen Untersuchungen bezüglich der Regeneration im peripheren Nervensystem in Ratten stellt die Autotomie der Tiere nach Nervenoperationen dar. Vermutlich ist diese Reaktion auf eine Reorganisation des somatosensorischen Cortex aufgrund der peripheren Denervation zurückzuführen, wodurch Phantomschmerzen entstehen. Die Tiere beginnen sich selbst zu verstümmeln (Al-Adawi, Dawe et al. 2002). Dabei gibt es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Rattenstämmen. Sprague Dawley (SD) Ratten zeigen mit das stärkste autotomische Verhalten, während Lewisratten kaum bis gar nicht zur dieser Art der Selbstverstümmelung neigen (Carr, Best et al. 1992; Hare, Evans et al. 1992; Chamberlain, Yannas et al. 1998; Chamberlain, Yannas et al. 2000; Al-Adawi, Dawe et al. 2002). Weiter haben auch weibliche Ratten im Vergleich zu männlichen gemeinhin eine deutlich geringere Autotomierate (Weber, Proctor et al. 1993). Selbst durch das Zusammenhalten von männlichen und weiblichen Tieren wirkt sich auf die Selbstverstümmelung der Männchen positiv aus und die Anzahl wird minimiert (Zellem, Miller et al. 1989). Weitere Hilfsmittel können eine abwechslungsreiche Gestaltung der Käfigeinrichtung oder das Bestreichen der Füße mit bitteren oder sehr scharfen Mitteln sein (Sporel-Ozokat, Edwards et al. 1991; Hadlock, Sundback et al. 1999). In ganz extremen Fällen wäre auch ein Eingreifen mit pharmakologischen Substanzen, wie z.B. Antidepressiva denkbar.

In vielen publizierten Studien werden dennoch Tiere der Problemstämme für funktionale Studien verwendet, so dass es häufig im Laufe des Versuches zum Ausscheiden einer größeren Zahl von Tieren im Verhaltenstest kommt. Oft werden

diese Tiere doch im Versuch belassen und als Totalausfall gewertet, so dass es zu einer starken Beeinflussung der Gesamtergebnisse kommt (Dijkstra, Meek et al. 2000; Meek, van der Werff et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem aus den oben genannten Gründen ausschließlich weibliche Lewisratten gewählt. Die Richtigkeit dieser Wahl bestätigte sich dahingehend, da es bei keinem der 66 Tiere zu Automutilation kam.

1.3.2. Sciatic Function Index

In dieser Arbeit wurde die Nervenregeneration an Hand von histologischen, elektrophysiologischen und funktionellen Aspekten beurteilt. Die ursprüngliche Leitfähigkeit des Ischiasnervs sollte wiederhergestellt werden und damit auch die Funktion der betroffenen Muskulatur. Dies wurde zunächst mit Hilfe der Bestimmung des Sciatic function index (SFI) durchgeführt.

Die Laufmusteranalyse mit der damit verbundenen Berechnung des SFI nach De Medinaceli (Medinaceli, Freed et al. 1982) ist ein Test zur Evaluation motorischer und sensorischer Regeneration nach einer Nervenläsion. Sie stellt den momentanen Goldstandard der funktionalen Tests im Ischiasmodell von Mäusen und Ratten dar (Magill, Tong et al. 2007; Meek, Ijkema-Paassen et al. 2007).

In einigen Studien wurde zwar die Messung des Extensor postural thrust (EPT; (Thalhammer, Vladimirova et al. 1995; Koka and Hadlock 2001) bereits als Ersatzmessung des sehr aufwendig zu bestimmenden SFI diskutiert und eingesetzt (Varejao, Cabrita et al. 2003; Luis, Amado et al. 2007), dennoch wird in den meisten Studien der SFI eingesetzt.

Oftmals wird in der Literatur empfohlen eine Kombination aus mehreren funktionellen Tests einzusetzen, um eine umfassende Aussage über eine funktionelle Regeneration machen zu können (Varejao, Melo-Pinto et al. 2004). Dabei wird der SFI am häufigsten in Kombination mit dem Withdrawal-Test eingesetzt, bei welchem die Tiere einem unangenehmen Temperaturreiz ausgesetzt werden und man auf diese Weise neben der motorisch-sensorischen des SFI auch sensorisch-nozizeptive Regeneration messen kann (Dijkstra, Meek et al. 2000; Varejao, Cabrita et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings nur der SFI als funktionelle Analyse verwendet. Auch nach 9 Monaten kam es zu keiner Regeneration bezüglich des SFI.

Diskussion

Die Fußabdrücke der Tiere waren zum Teil sehr schwer auszuwerten, obwohl es zu keiner Automutilation bei den Tieren kam.

Vor den operativen Eingriffen lagen die SFI in allen Gruppen etwa bei 0 und fielen, im Fall der autolog-reversen Transplantation und der Schienenimplantation postoperativ auf einen Wert um -100 ab, was den Totalverlust der Funktion des *N. ischiadicus* bedeutete. Die scheinoperierten Kontrollen blieben über die gesamte Versuchsdauer konstant bei annähernd 0.

Die Ergebnisse sind mit denen anderer Arbeitsgruppen, die mit ähnlichen Tier- und Läsionsmodellen und Defektstrecken von 8-15 mm gearbeitet haben nicht vergleichbar (Dijkstra, Meek et al. 2000; Valero-Cabre and Navarro 2002; Meek, van der Werff et al. 2003; Varejao, Cabrita et al. 2004). Bei der Durchtrennung von Nerven und dem Einsatz von Nervenleitschienen der autologen Transplantaten kommt es zwar in keinem der Fälle zu einer vollständigen Erholung der motorischen Funktion bezüglich der SFI Messungen, allerdings liegen die Regenerationserfolge beim SFI trotzdem durchschnittlich zwischen 20 und 65 % (Dijkstra, Meek et al. 2000). Es gibt aber auch aktuelle Publikationen ohne eine Regeneration des SFI (Clavijo-Alvarez, Nguyen et al. 2007).

Bei geringen Erfolgen wurden in der Literatur häufig Kontrakturen der Zehen und Autotomien als -100 gewertet oder diese Tiere ganz von der Auswertung ausgeschlossen, so dass die Gesamtstatistiken meist massiv beeinflusst waren. Bei vielen Studien, besonders mit Lewisratten, gab es häufig keine oder nur geringe Ausfälle aufgrund von Verstümmelungen. Dadurch ergaben sich durchschnittliche Regenerationserfolge von über 60% (Hebebrand, Zohman et al. 1997; Meek, van der Werff et al. 2003). Allerdings gibt es auch Studien, die zeigen, dass besonders Lewisratten zu Kontrakturen der Zehen neigen. Durch die fehlende Innervation der Muskeln kam es zu einer Verkrümmung des Fußes aufgrund einer Flexion der Zehen. Dieses ist ebenfalls ein häufig beobachtetes Phänomen nach der Transsektion des *N. ischiadicus* (Griffin, Pan et al. 2010), das die Evaluation des SFI erschwert. Vermutlich war dies auch bei den Tieren in dieser Arbeit der Fall. Selbst nach 9 Monaten zeigten einige der Tiere besonders ausgeprägte Kontrakturen, obwohl mit weiteren Analysemethoden eine Regeneration gezeigt werden konnte.

Ein weiteres Problem ist der subjektive Einfluss des Experimentators bei der Vermessung der Pfotenabdrücke (Griffin, Pan et al. 2010). Außerdem kam es zu

Ungenauigkeiten in den Messungen, da die Tiere oftmals nicht gleichmäßig über das Papier liefen. Durch Stehenbleiben und Aufrichten der Tiere kommt es zu einer Gewichtsverlagerung auf die Hinterpfoten und somit ebenfalls zu einem veränderten Fußabdruck (Varejao, Meek et al. 2001).

Dass die Laufmuster nicht wieder auf das präoperative Niveau regenerieren können, kann aber auch vielerlei anderer Gründe haben. Wenn beispielsweise ein Neurom gebildet wird oder die Neurite nur unzureichend ausgewachsen oder remyelinisiert sind, so kann dies zu einer fehlenden Reinnervation der Zielmuskulatur führen. Auch die falsche Innervation von Muskulatur aufgrund fehlgeleiteter Regeneration kann eine Ursache schlechter Laufeigenschaften darstellen (Ijkema-Paassen, Jansen et al. 2004). Um eine geringere Kontraktionsrate und vor allem in der frühen Phase der Regeneration bessere Regenerationserfolge zu erhalten, wird daher ein moderates Training empfohlen und bereits in verschiedenen Gruppen erfolgreich eingesetzt (van Meeteren, Brakkee et al. 1997; Varejao, Meek et al. 2001). Dies entspricht auch dem Einsatz am Menschen, da nach Operationen von Nerven in der Regel intensive Physiotherapien durchgeführt werden.

Zur Messung des SFI wird stets ein unoperiertes Bein als Kontrolle verwendet. In diesem Zusammenhang wurde bereits kontrovers diskutiert, ob die Tiere mit dem gesunden Hinterlauf ein kompensierendes Laufmuster entwickeln (Dellon and Dellon 1991) oder nicht (Hare, Evans et al. 1992).

In dieser Arbeit konnte eine solche Kompensation festgestellt werden. Sie äußerte sich in Form einer deutlich verlängerten Auftrittfläche. Allerdings hatte dies keine signifikanten Auswirkungen auf die Ergebnisse.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ähnliche Ergebnisse auch schon in anderen Arbeitsgruppen auftraten. Um in Zukunft valide Aussagen über die funktionelle Regeneration machen zu können, sollten andere Verhaltenstests, wie die Messung des EPTs oder der Withdrawl Test durchgeführt werden. Bei beiden Tests spielt die Fußstellung nur eine untergeordnete Rolle.

1.3.3. Elektrophysiologische Messungen

Als weitere Analysemethode für die funktionelle Nervenregeneration wurde in dieser Arbeit die Messung von elektrophysiologischen Potentialen eingesetzt. Dabei wurden die Reizschwelle, die Latenz und das *Compound Muscle Action Potential* (CMAP) gemessen.

Für einige dieser Parameter gibt es vergleichbare Messungen, die in der Klinik angewendet werden. Die Latenz gibt die Zeit an, die der Reiz nach der neuronalen Stimulation braucht, um über eine bestimmte Wegstrecke den Muskel zu depolarisieren. In der klinischen Diagnostik wird hierfür die distale motorische Latenz bestimmt (Bischoff 2008). Über die Bestimmung der Latenz kann eine qualitative Aussage über die schnellleitenden Nervenfasern getroffen werden. Mit dem Compound Muscle Action Potential dagegen können Aussagen über den Verlust an Axonen, Nerven- und Muskelfasern gemacht werden (Bischoff 2008). Der 3. Parameter, der gemessen wurde, war die Reizschwelle. Als Reizschwelle gilt der Reiz, bei dem ein CMAP gerade ausgelöst werden kann.

All diese Messungen können durch äußere Einflüsse massiv gestört werden. Zunächst ist es wichtig zu wissen, dass sowohl die Tiefe der Narkose, als auch das Gewicht der Tiere einen enormen Einfluss haben kann. Besonders flüchtige Anästhetika beeinflussen neuroelektrische Messungen und zeigen einen dosis abhängigen unterdrückenden Effekt (Zandieh, Hopf et al. 2003). Weiter hat die Art der Präparation der Nerven vor der Messung einen großen Effekt. Mit Hilfe der Elektrophysiologie sollen kleinste Ströme und Änderungen des Membranpotentials gemessen werden, deshalb ist es überaus wichtig, dass der Operateur weder den Nerv direkt berührt, noch verletzt oder quetscht (Mumenthaler 2007; Strecker, Baylor et al. 2008). Ein Punkt dabei ist auch die stabile Anbringung der Elektroden (Phongasart, Wertsch et al. 2002).

Weiterhin beeinflusst jegliche Bewegung der Tiere (Muskelzuckungen, Aufwachen aus der Narkose), Änderungen der Temperatur, ineffektive Erdung oder Störungen in Hard- und Software die Messung der neuromuskulären Potentiale (Jonas, Bischoff et al. 1999; Bretschneider and de Weille 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht all diese störenden Einflüsse zu minimieren und die Messungen so standardisiert wie möglich durchzuführen.

Dennoch war lediglich bei der Reizschwelle eine Tendenz in Richtung der Werte der scheinoperierten Tiere zu erkennen. Die beiden anderen Parameter zeigten zu jedem der Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren. Zwischen den Implantattypen war allerdings kein Unterschied zu erkennen.

1.4. Fazit und Ausblick: Peripheres Nervensystem

Das periphere Nervensystem besitzt die Fähigkeit auch in einem adulten Organismus zu regenerieren. Dennoch stößt es vor allem nach einer Neurotmesis an seine Grenzen. Ohne Leitstruktur wachsen in solchen Fällen die Axone ungerichtet durcheinander und es kommt häufig zur Bildung eines Narbenneuroms.

In Europa und den USA werden jedes Jahr über 100.000 Patienten auf Grund von Verletzungen im peripheren Nervensystem neurochirurgisch behandelt (Schlosshauer, Dreesmann et al. 2006). Diese Zahl und andere Beispiele machen deutlich, dass eine geeignete Heilmethode auch in wirtschaftlicher Hinsicht notwendig ist.

Da das autologe Nerven­transplantat, der derzeitige Goldstandard in der Klinik, viele Nachteile mit sich bringt, ist das Ziel vieler Forschungs­unternehmungen weltweit die Entwicklung einer künstlichen Nerven­leitschiene. Diese soll der Regenerationsfähigkeit mittels autologen Nerven gleich kommen oder besser noch, diese sogar übertreffen. Die bis zum heutigen Zeitpunkt erforschten Leitstrukturen sind meistens semipermeable und resorbierbare Röhren, teilweise mit einer inneren Struktur versehen, eingebrachten Wachstumsfaktoren oder mit Schwann Zellen besiedelt.

Die hier von mir untersuchte gelatinebasierte Röhre bildet unter Umständen eine gute Ausgangsbasis für die Entwicklung einer funktionierenden Nerven­leitschiene. Es konnte gezeigt werden, dass sie biokompatibel und resorbierbar ist und dass Nervenregeneration bis zu einem gewissen Grad möglich ist. Durch weitere materialtechnische Anpassungen und der Entwicklung einer Innenstrukturierung können die erreichten Ergebnisse noch verbessert werden.

In Zukunft werden sich, vor allem durch ein besseres Verständnis der biologischen Abläufe der Nervenregeneration, durch neue Wachstumsfaktoren und neue Verarbeitungstechniken von biologischen Materialien, die Implantate und damit die

Regeneration deutlich verbessern. Dabei könnte auch eine zeitlich kontrollierte Abgabe von eingeschlossenen Wachstumsfaktoren beim graduellen Abbau der Nervenleitschiene eine Rolle spielen. Allerdings müsste bei dieser Art von Wachstumsinduktion darauf geachtet werden, dass es durch unkontrolliertes Wachsen der Axone nicht zur Bildung von Kollateralen und letztlich Neuomen kommt. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, muss wie bei der natürlichen Regeneration, auf das Gleichgewicht der Faktoren für Wachstum und Inhibition geachtet werden.

2. Intraperitoneale Adhäsionen

2.1. Therapie vs. Prophylaxe

Die Ausbildung einer Adhäsion im abdominalen Bauchraum ist eine der häufigsten Komplikationen nach operativen Eingriffen an Organen der Bauchhöhle (Liakakos, Thomakos et al. 2001). Meistens kommt es zwar zu keinen oder nur leichten Beschwerden, allerdings können Adhäsionen z.B. auch die Bewegungsfähigkeit des Darms erheblich beschränken und sogar zu einem Dünndarmverschluss mit tödlichem Ausgang führen (Cheong, Laird et al. 2001; Wallwiener, Brucker et al. 2006).

Die einzige Therapiemethode ist die Adhäsiolelyse. Sie stellt aufgrund der Gefahr der Ausbildung neuer Verwachsungen allerdings keinen besonders zufrieden stellenden Ansatz dar und wird nur im Falle schwerwiegender Komplikationen durchgeführt (Shayani, Siegert et al. 2002). Aus diesem Grund werden in der heutigen Zeit massive Anstrengungen unternommen, eine Adhäsionsprophylaxe zu entwickeln. Dabei werden verschiedene Ansätze verfolgt. Ein Ansatz untersucht die pharmakologische Verhinderung der Adhäsionsausbildung (Reed, Stucchi et al. 2008), vor allem durch eine Koagulationshemmung des Fibrins, oder durch eine Stimulierung des fibrinolytischen Systems (Reed, Stucchi et al. 2008). Weiter wird durch eine Verbesserung der abdominalen Operationsmethodiken versucht, möglichst wenig Schaden am Gewebe des Bauchraumes zu verursachen (Swank, Van Erp et al. 2003). Darüber hinaus werden große Anstrengungen unternommen das Verkleben zweier Oberflächen durch das Einbringen resorbierbarer Materialien

(physikalische Adhäsionsbarrieren) in den Wundbereich zu verhindern (Moreira, Wexner et al. 2000).

2.2. Adhäsionsbarrieren

In der vorliegenden Arbeit wurde eine auf Gelatine basierende Adhäsionsbarriere (gepresster Schwamm) untersucht und *in vivo* auf ihre Funktion getestet. Nach 7 d konnte in über 80 %, nach 21 d sogar in über 90 % der operierten Tiere eine Adhäsion verhindert werden. Das Material war nach 21 d vollständig resorbiert und die Immunreaktion (7 d) war nach Resorption des Implantates (21 d) nicht mehr vorhanden.

2.2.1. Materialien im Vergleich

In der Vergangenheit wurden einige Materialien bezüglich ihrer Eigenschaften Adhäsionen zu verhindern, untersucht. Einige dieser Materialien sind inzwischen von der FDA zugelassen und werden teilweise regelmäßig in der Klinik eingesetzt.

Zu diesen Materialien gehören sowohl flüssige Lösungen, wie ADEPT[®] oder Hyskon[®] und Gele, z.B. Hyaloglide[®] und Spraygel[®], als auch feste Barrieren wie Interceed[®] und Seprafilm[®]. Daneben gibt es eine Reihe von präklinisch untersuchten Barrieren auf der Basis von Hyaluronsäure (HA), Polyethylen-Glykol (PEG) und Carboxymethylcellulose (CMC).

ADEPT[®] ist eine 4 %ige Icodextrin Lösung, die über die Hydrolyse von Maisstärke hergestellt wird. Die Inhibition der Adhäsionsausbildung basiert, wie bei allen flüssigen Adhäsionsbarrieren, auf dem Prinzip der Hydroflotation, also dem Fluten des abdominalen Raumes, um die Organe voneinander getrennt zu halten (Zawaneh and Putnam 2008). Sowohl in präklinischen (Verco, Peers et al. 2000; Muller, Treutner et al. 2003), als auch in klinischen Studien (diZerega, Verco et al. 2002; Brown, Luciano et al. 2007) konnte die Effektivität von ADEPT[®] gezeigt werden. Allerdings werden zwischenzeitlich einige Nebenwirkungen mit der 4 %igen Lösung in Verbindung gebracht. So traten neben Abszessbildungen und Schmerzen im abdominalen Bereich auch Fälle von Peritonitis auf (Del Rosso, Di Liberato et al. 2000; Reichel, Schulze et al. 2001; Muller, Treutner et al. 2003).

Diskussion

Als zweite flüssige Adhäsionsbarriere wird in der Klinik Hyskon[®] eingesetzt. Hyskon[®] basiert auf einer 32 %igen Dextran-Lösung, ist vergleichbar mit ADEPT[®] einfach zu applizieren und hat einen anicoagulativen Effekt (Polishuk and Bercovici 1971; Verco, Peers et al. 2000). Einige präklinische (Vemer, Boeckx et al. 1982; Fabri, Ellison et al. 1983; Dlugi and deCherney 1984) und klinische Studien (Jansen 1985) zeigten kontroverse Ergebnisse. Weiter wird Hyskon[®] auf Grund seiner Nebenwirkungen, wie Schmerzen im Abdominalbereich, allergischen Reaktionen, Infektionen und Ödembildungen, nicht so häufig eingesetzt wie ADEPT[®] (Krinsky, Haseltine et al. 1984; Gauwerky, Heinrich et al. 1986).

Neben den flüssigen Adhäsionsbarrieren gibt es eine Reihe von Materialien, die je nach Verarbeitung, sowohl gelförmig, als auch als feste Membranen für die Verhinderung von Adhäsionen eingesetzt werden.

Eines dieser Materialien ist Hyaluronsäure (HA). HA ist ein linear aufgebautes Polysaccharid mit sich wiederholenden Einheiten von Natrium – D – Glucuronat und N-acetyl-D-Glukosamin. Es kommt natürlicherweise in der Haut, der Gelenkflüssigkeit und im Bindegewebe vor, wobei es eine große Rolle als Schutzmittel für Zellen und bei der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Gewebe spielt (Allison and Grande-Allen 2006; Almond 2007). Gelförmig wird HA z.B. als Hyaloglide[®] eingesetzt. Hyaloglide ist ein HA-Derivat. Es bildet ein hochviskoses Gel, das über auto-cross-linking funktioneller Gruppen gebildet wird. Das Material ist biokompatibel, resorbierbar und einfach in der Handhabung und zu applizieren (De Iaco, Stefanetti et al. 1998; Acunzo, Guida et al. 2003; Brunelli, Longinotti et al. 2005). In verschiedenen präklinischen (De Iaco, Stefanetti et al. 1998; De Iaco, Muzzupapa et al. 2001; Brunelli, Longinotti et al. 2005) und klinischen Studien (Acunzo, Guida et al. 2003; Pellicano, Bramante et al. 2003; Guida, Acunzo et al. 2004; Mais, Bracco et al. 2006) konnte Hyaloglide[®] die Bildung von Adhäsionen verhindern. Dennoch wird es nicht häufig in der Klinik eingesetzt.

Seprafilm[®] ist die in der Klinik am häufigsten verwendete Adhäsionsbarriere. Sie besteht aus einer Kombination von HA und CMC (Carboxymethylcellulose). Das Material ist biokompatibel, nicht immunogen und bildet nach dem Auflegen auf verletztes Gewebe ein viskoses Gel (Zawaneh and Putnam 2008). Nachteile beim Handling sind die Brüchigkeit des Materials und die sofortige Klebrigkeit an Handschuhen und am Gewebe, weshalb man es akkurat plazieren muss (Al-Musawi 2001; Tingstedt, Isaksson et al. 2007). Auch der hohe Preis wird in vielen Fällen als

großer Nachteil empfunden (Wilson, Menzies et al. 2002; Bristow, Santillan et al. 2007). In vielen präklinischen *in vivo* Studien hat Seprafilm[®] seine antiadhäsive Wirkung bereits bewiesen (Eroglu, Oral et al. 1996; Burns, Colt et al. 1997; Buckenmaier, Pusateri et al. 1999) und in der Klinik führte der Einsatz dieser Barriere häufig zu einer Verminderung der Inzidenz, der Schwere und dem Ausmaß postoperativer Adhäsionen (Becker, Dayton et al. 1996; Diamond 1996; Beck 1997). Trotzdem gibt Seprafilm[®] Anlass zur Diskussion (Beck, Cohen et al. 2003; Reijnen, Bleichrodt et al. 2003; Marianne, Babak et al. 2005; Uchida, Urata et al. 2005; Zeng, Yu et al. 2007). So wurden Fälle von Abszessbildungen (Zeng, Yu et al. 2007), erhöhten inflammatorischen Reaktionen (Marianne, Babak et al. 2005), Peritonitis, Bildung von Fisteln (Beck, Cohen et al. 2003) und Anastomoseninsuffizienz (Beck, Cohen et al. 2003; Zeng, Yu et al. 2007) gefunden.

Ein weiteres Material, welches zur Herstellung von Adhäsionsbarrieren verwendet wird ist Polyethylen-Glykol (PEG). Es ist ein inertes, biokompatibles und nicht immunogenes Polymer und wird als Biomaterial bereits für viele andere Anwendungen verwendet (Harris and Zalipsky 1997).

Spraygel[®] besteht aus zwei individuellen PEG Lösungen, die erst am Einsatzort miteinander vermischt werden und sich dort zu einem Gel verbinden. Das Gel ist biokompatibel und einfach zu applizieren (Dunn, Lyman et al. 2001; Ferland, Mulani et al. 2001), allerdings zeigte es in präklinischen (Dunn, Lyman et al. 2001; Ferland, Mulani et al. 2001; Bennett, Melanson et al. 2003) und klinischen Studien (Johns, Ferland et al. 2003; Mettler, Audebert et al. 2004) unterschiedliche Ergebnisse.

Eines der meistuntersuchtesten Implantate, das als Adhäsionsbarriere eingesetzt wird, ist Interceed[®]. Es wird aus oxidiertem regeneriertem Cellulose hergestellt und ist biokompatibel, inert, nicht immunogen, innerhalb von 28 Tagen resorbierbar, leicht applizierbar und besitzt antibakterielle Eigenschaften (Dineen 1976; Larsson 1996). Allerdings ist es auch als Coagulan aktiv, verrutscht sehr leicht und wirkt oft nicht in der Anwesenheit von Blut (Larsson 1996; Wiseman, Gottlick-larkowski et al. 1999; Wiseman, Trout et al. 1999). In präklinischen Studien war es als Adhäsionsbarriere nur teilweise erfolgreich, es verhinderte eine Adhäsion in ebensovielen Studien (Linsky, Diamond et al. 1987; Diamond, Linsky et al. 1991; Wiseman, Gottlick et al. 1992; Diamond 1996) wie es versagte (Best, Rittenhouse et al. 1991; Best, Rittenhouse et al. 1992; Haney and Doty 1992; Pagidas and Tulandi 1992).

Diskussion

In einigen klinischen Studien konnte allerdings die Effektivität von Interceed® nachgewiesen werden (Sekiba 1992; Azziz 1993; Mais, Ajossa et al. 1995; Mais, Ajossa et al. 1995).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es schon eine Reihe von Materialien gibt, die teils zufriedenstellende Adhäsionsbarrieren hervorbringen. Allerdings wurden in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien auch einige Nachteile und Unzulänglichkeiten diskutiert. Bis heute gibt es keine Barriere, die in der Klinik ohne Bedenken und bei jedem operativen Eingriff im abdominalen Bauchraum eingesetzt werden kann.

In dieser Arbeit wurde Gelatine als Basismaterial für Implantate eingesetzt.

2.2.2. Gelatine als Material für Adhäsionsbarrieren

Gelatine wurde bisher weder in präklinischen noch in klinischen Studien als Material für eine Adhäsionsbarriere für den abdominalen Bauchraum verwendet. Es gibt lediglich eine Arbeitsgruppe, die 2002 eine mit UV-Strahlung vernetzte Gelatinemembran als Adhäsionsbarriere im Tiermodell getestet hat. Allerdings lieferte diese Studie keine zufriedenstellenden Erfolge, weshalb sich die Arbeitsgruppe anderen Materialien zuwendete (Matsuda, Se et al. 2002).

Wie bereits in einem der oberen Abschnitte erwähnt, wird reine Gelatine von der FDA (United States Food and Drug Administration) als gefahrloses Biomaterial eingestuft (Courts 1977) und ist für den Einsatz im Menschen bedenkenlos verwendbar.

Gelatine ist kostengünstig, zeigt eine hervorragende Biokompatibilität und Plastizität. Sie kann allein allerdings nur als Implantatmaterial verwendet werden, wenn die Gelatinefragmente vernetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Vernetzung der Adhäsionsbarriere Formaldehyd verwendet. Nach 7 Tagen war eine überschießende inflammatorische Reaktion zu erkennen, wie sie auch von Matsuda et al. für stärker vernetzte Gelatinemembranen beschrieben wurde. Hier wurde die Adhäsion durch die Gelatinemembran (stark vernetzt) sogar noch verstärkt und das Material eingekapselt (7 Tage post OP) (Matsuda, Se et al. 2002). In der hier vorliegenden Arbeit kam es 7 Tage post OP ebenfalls zu einer überschießenden inflammatorischen Reaktion. Das Implantat war vollständig mit endogenem Fettgewebe bewachsen, verhinderte aber dennoch

teilweise eine Adhäsion. Nach 21 Tagen war diese Immunreaktion mit dem Abbau des Implantates komplett verschwunden. Eine Adhäsion konnte größtenteils verhindert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Implantat mit der Literatur vergleichbare Ergebnisse liefert.

2.3. Tiermodelle und Analysemethoden im Vergleich

In der Literatur werden eine Vielzahl von Tiermodellen vor allem in Ratten und Kaninchen, vorgestellt, um Adhäsionen zu erzeugen und potentielle Adhäsionsbarrieren testen zu können.

Eines der Modelle, welches häufig in Ratten angewendet wird, ist das „Ischemic buttons“ – Modell, bei dem durch das Abbinden von Bereichen des Bauchfells sogenannte „ischemic buttons“ erzeugt, und auf diese Art Adhäsionen induziert werden (Buckenmaier, Pusateri et al. 1999; Reed, Fruin et al. 2002; Lim, Morrill et al. 2008; Rajab, Wallwiener et al. 2010; Wallwiener, Kraemer et al. 2010). Grundsätzlich werden dabei zwei verschiedene Methoden angewendet. Eine Arbeitsgruppe um Karen Reed verwendet eine Methode bei der jeweils 3-4 „ischemic buttons“ pro Tier erzeugt werden. Durch Umwickeln mit Hilfe von Nahtmaterial werden ca. 5 mm große Bereiche des Peritoneums abgeschnürt (Reed, Fruin et al. 2002; Reed, Fruin et al. 2004; Aarons, Cohen et al. 2007; Cohen, Aarons et al. 2007; Cohen, Gower et al. 2007; Lim, Morrill et al. 2008). Mit dieser Art der Adhäsionsinduktion kann eine Adhäsion in bis zu 80 % der Fälle erreicht werden. Meistens verwächst bei diesem Tiermodell das im Bauchraum der Ratte sehr häufig auftretende endogene Fettgewebe mit den erzeugten Verletzungen. Da dieses nicht aktiv verletzt wird, ist es dem Zufall überlassen, wie viel und an welchen Stellen des Fettgewebestranges es adhärirt. Eine weitere Methode zur Erzeugung der „ischemic buttons“ ist die Erzeugung einer Verletzung mit Hilfe eines elektrischen Coagulators und anschließendem Setzen von Nähten (Rajab, Wallwiener et al. 2009; Rajab, Wallwiener et al. 2010; Wallwiener, Kraemer et al. 2010). Hierbei wird über eine Strecke von 5 cm das Peritoneum der Bauchwand mit einem Coagulator verletzt. Anschließend werden zusätzlich in einem Abstand von jeweils 1 cm Nähte auf die coagulierten Stellen gesetzt. Mit dieser Methode erreicht man teilweise eine

Diskussion

Adhäsionsinduktion von bis zu 100 %. Aber auch hier verwächst das im Bauchraum der Ratte sehr häufig auftretende endogene Fettgewebe mit den erzeugten Verletzungen. Da dieses nicht aktiv verletzt wird, ist es dem Zufall überlassen, wie viel und an welchen Stellen des Fettgewebestranges es adhärirt. Selten verwachsen auch andere Organe mit den verletzten Stellen. Ein weiteres Problem dieser Methode ist, dass es durch die sehr starke Verletzung häufig zu Todesfällen kommt und man, um eine statistische Auswertung durchführen zu können, eine sehr hohe Tierzahl pro Gruppe benötigt ($n = 30$) (Rajab, Wallwiener et al. 2009; Rajab, Wallwiener et al. 2010; Wallwiener, Kraemer et al. 2010).

In Kaninchen wird vor allem das cecale Abrasionsmodell verwendet, bei dem an Blinddarm und die Bauchwand Verletzungen gesetzt werden, um eine Adhäsion auszulösen (Ito, Yeo et al. 2007; Weis and Odermatt 2007; Lang, Weisgerber et al. 2009). Für die Verletzungen werden entweder das Peritoneum und Teile vom abdominalen Transversalmuskel entfernt und eine entsprechende Verletzung auf dem Cecum durch Abreiben mit einer Gaze gesetzt (Weis, Odermatt et al. 2004; Lang, Gruntzig et al. 2007; Weis and Odermatt 2007; Jaenigen, Weis et al. 2009), oder beide Gewebeoberflächen solange abgerieben, bis petechiale Blutungen entstehen (Ito, Yeo et al. 2007; Yeo, Ito et al. 2007). Mit diesem Modell kann eine Adhäsionsinduktion von bis zu 100 % erreicht werden. Durch die Verletzung von zwei Gewebeoberflächen entsteht auch in allen Fällen eine spezifische Adhäsion zwischen diesen beiden Flächen. Allerdings ist die Haltung und Pflege von Kaninchen deutlich aufwendiger, als von kleinen Nagetieren, wie Mäusen oder Ratten.

Das oben beschriebene cecale Abrasionsmodell wird häufig auch in Ratten in verschiedenen Variationen verwendet (Burns, Skinner et al. 1996; Ersoy, Ozturk et al. 2008; Kece, Yildiz et al. 2010). Für die Induktion einer Adhäsion werden entweder das Cecum (Aysan, Dincel et al. 2008; Lauder, Garcea et al. 2010; Wang, Mo et al. 2010); oder Cecum und Peritoneum verletzt (Ryan and Sax 1995; Burns, Skinner et al. 1996; Ersoy, Ozturk et al. 2008; Hoffmann, Siddiqui et al. 2009; Ozturk, Yilmazlar et al. 2010). Dabei können die Verletzungen durch Abreiben mit einer Gaze, einer chirurgischen Bürste oder einem Skalpell gesetzt werden. Im Modell einer brasilianischen Arbeitsgruppe werden am Peritoneum 4 Nähte parallel zum Bauchschnitt gesetzt und das Cecum mit einer Gaze abgerieben, um die Adhäsionen

zu erzeugen (Paulo, de Brito e Silva et al. 2009). In anderen Modellen werden das Peritoneum der Bauchdecke und das Cecum durch das Abreiben mit einer Gaze und einem Skalpell verletzt (Burns, Skinner et al. 1996; Ersoy, Ozturk et al. 2008; Comert, Karakaya et al. 2010). Ersoy et al nähten die beiden verletzten Oberflächen zusätzlich noch aneinander (Ersoy, Ozturk et al. 2008). Mit diesen Modellen kann, je nach Stärke der Verletzung eine Adhäsionsinduktion von 80 – 100 % erreicht werden, wobei die 100 % nur sehr starken Verletzungen und zusätzlichem Vernähen der beiden Gewebeoberflächen auftraten.

Bei all den oben vorgestellten Tiermodellen werden häufig große Tierzahlen verwendet, da oft das Auslösen von Adhäsionen in den Kontrolltieren nicht standardisiert funktioniert oder große Probleme durch eine enorm gesteigerte Letalität vor Ende des Versuches auftreten.

Für die vorliegende Arbeit wurde zum Testen der Adhäsionsbarriere ein Tiermodell basierend auf dem cecalen Abrasionsmodell in der Ratte weiterentwickelt und etabliert. Die stärksten und zuverlässigsten Adhäsionen (85 – 95%) wurden bei einer Verletzung des Cecums mit einer Gaze und anschließender Behandlung des verletzten Gewebes mit einer elektrischen Zahnbürste und der zusätzlichen Verletzung des Peritoneums an der lateralen Bauchwand mit Hilfe eines Skalpells und der elektrischen Zahnbürste ausgelöst. Die beiden verletzten Gewebe wurden anschließend durch Aneinandernähen in räumliche Nähe zueinander gebracht. In weiteren Versuchen wurde sogar eine Adhäsionsinduktion von 100 % erreicht, indem die Verletzung am Peritoneum durch zusätzliche Einschnitte noch weiter verstärkt wurde (Ergebnisse in dieser Arbeit nicht gezeigt).

Mit diesem Modell konnte eine Methode etabliert werden, mit der zuverlässig Adhäsionen in den Kontrolltieren ausgelöst werden. Die Tierzahl kann auf Grund der hohen Zuverlässigkeit und nicht auftretenden Letalität ebenfalls gering gehalten werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Etablierung eines Tiermodells ist die Entwicklung geeigneter, standardisiert durchführbarer Analysemethoden der ausgebildeten Adhäsionen. In der Literatur weit verbreitet ist die semi-quantitative Auswertung an Hand eines subjektiv erstellten makroskopischen Scores (Greca, de Paula et al. 2001; Yeo, Ito et al. 2007; Ersoy, Ozturk et al. 2008; Lang, Weisgerber et al. 2009;

Paulo, de Brito e Silva et al. 2009). Eine weitere semiquantitative Methode zur Bestimmung der Adhäsionsstärke ist die prozentuale Schätzung der verwachsenen Gewebeoberflächen bezüglich der gesetzten Verletzung (Weis, Odermatt et al. 2004; Lang, Gruntzig et al. 2007). Beide Methoden sind allerdings sehr subjektiv und dienen durch ihre Semiquantifikation nur zu einer Einschätzung der Adhäsionsstärke. Eine wesentlich höhere Aussagekraft bietet die quantitative Messung der Adhäsion mit Hilfe der Tensiometrie. Hierbei werden die verwachsenen Gewebeoberflächen auf jeder Seite fixiert und mit Hilfe eines Tensiometers auseinandergezogen (Lang, Gruntzig et al. 2007). Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit etabliert. Dabei wurde für die Messung eine Federwaage verwendet. Mit Hilfe der Waage konnte die Stärke der Adhäsion in g/Fläche bestimmt werden. Für zukünftige Experimente soll das verwachsene Gewebe allerdings in einer Zugprüfmaschine fixiert werden, um so direkt die Stärke der Adhäsion in Newton ablesen zu können. Eine weitere wichtige Methode zur Analyse der Adhäsion sind histologische Färbungen, vor allem mit Hilfe der HE-Färbung (Burns, Skinner et al. 1996; Ersoy, Ozturk et al. 2008; Jaenigen, Weis et al. 2009; Rajab, Wallwiener et al. 2009). In dieser Arbeit wurde das Gewebe mit Hilfe von Cryoschnitten aufgearbeitet und mittels HE – und Masson Trichrom – Färbung analysiert. Das Gewebe konnte zwar hinsichtlich des Adhäsionsgewebes untersucht werden, allerdings war der Gewebeerhalt nicht besonders gut. Für die Zukunft soll eine Auswertung mit Hilfe von Paraffinschnitten etabliert werden, obwohl in der Literatur häufig Cryoschnitte verwendet werden (Burns, Skinner et al. 1996; Ersoy, Ozturk et al. 2008; Jaenigen, Weis et al. 2009).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das etablierte Modell und die weiterentwickelten Analysemethoden vergleichbare und teilweise sogar bessere Ergebnisse als die der Literatur lieferten.

2.4. Fazit und Ausblick: Abdominaler Bauchraum

Abdominale Adhäsionen treten bei 67 – 97 % der Patienten nach Eingriffen im Bauchraum auf. Je nach Verlauf kann die Bildung solcher Verwachsungen zu ernststen Komplikationen und damit auch zu hohen Kosten für das Gesundheitssystem führen. Für die präklinische Testung neuer Implantate ist ein standardisiert durchführbares Tiermodell von enormer Wichtigkeit, um die Funktion und

Nebenwirkungen potentieller Materialien abschätzen zu können. Zwar sind die Ergebnisse solcher Tierversuche nicht eins zu eins auf den Menschen übertragbar, dennoch ist eine Analyse der Gewebereaktionen auf das Implantat im Tier unabdingbar und unbedingt notwendig.

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich ein Tiermodell zur Testung von Adhäsionsbarrieren *in vivo* weiterentwickelt und etabliert werden. Der hier vorgestellte Ansatz beruht auf der Basis des cecalen Abrasionsmodells in der Ratte. Im Vergleich zu anderen Tiermodellen bietet er ein hohes Maß an Zuverlässigkeit und wird durch die Standardisierung des Eingriffes und der Analysemethoden nur in sehr geringem Maße durch Subjektivität beeinflusst.

Mit der Testung eines neuen gelatinebasierten Implantates konnte das Modell bestätigt und gleichzeitig der Implantatprototyp auf seine Funktionsfähigkeit getestet werden. Das Implantat reduzierte erfolgreich die Inzidenz aber auch die Stärke der ausgebildeten Adhäsion und konnte *in vivo* innerhalb von 21 Tagen resorbiert werden.

Bis heute gibt es keine Barriere, die in der Klinik ohne Bedenken und bei jedem operativen Eingriff im abdominalen Bauchraum eingesetzt werden kann. Deshalb ist die Forschung und Entwicklung neuer Materialien und Strategien besonders wichtig. In dieser Arbeit konnte zum einen eine wichtige Methode für diese zukünftige Forschung etabliert werden und zum anderen ein Material getestet werden, welches für neu entwickelte Implantate sicher noch eine große Rolle spielen wird.

Ausblick

Gelatine ist ein Biomaterial, das gegenüber anderen Materialien sehr viele Vorteile besitzt. Es ist ein amphipathisches Polymer, das kaum immunogen wirkt, biokompatibel und bioresorbierbar ist und in seinen physiochemischen Eigenschaften leicht verändert werden kann. Außerdem ist Gelatine von der FDA für verschiedene Anwendungen und für den Einsatz als Biomaterial im Menschen zugelassen.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedlich vernetzte und verarbeitete Implantate untersucht, die auf Gelatine basieren. In allen Experimenten konnte bestätigt werden, dass das Material biokompatibel ist. Eine überschießende Immunreaktion auf die Adhäsionsbarriere klang mit der Resorption des Implantates rasch wieder ab. Die Nervenleitschiene löste subkutan in der Maus nur eine geringe Gewebereaktion in Form von Verkapselungen aus. Auch im Ischiasmodell der Ratte war nach wenigen Monaten im Gegensatz zum autologen Nerventransplantat nur noch wenige Immunzellen, wie Makrophagen, vorhanden.

Vernetzte Gelatine kann vom Körper resorbiert werden und ist *in vivo* je nach Vernetzungsgrad ca. 3 Wochen (Aldehyd vernetzte Adhäsionsbarriere) oder 3 – 6 Monate (TGase quervernetzte Nervenleitschiene) haltbar.

Für beide in dieser Arbeit untersuchten Ansätze stellten die Implantatprototypen eine gute Basis für die Entwicklung von Nervenleitschienen und Adhäsionsbarrieren dar. Auf Grund der einfachen Manipulation des Basismaterials könnten in Zukunft Implantate auf Gelatinebasis für unterschiedlichste Anwendungen in der Klinik zum Einsatz kommen.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| μ | mikro |
| α | anti |
| AK | Antikörper |
| Brd-U | 5-Bromo-2'-Desoxy-Uridin |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CAM | Chorioallantois Membran |
| CAMP | <i>Compound muscle action potential</i> |
| CMC | Carboxymethylcellulose |
| d | Tag |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dilactate |
| Dil-Ac-LDL | 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate-acetyliertes-low density lipoprotein |
| DG | Deckglas |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethyl Sulfoxid |
| DRG | Dorsal Root Ganglia (Hinterwurzelganglion) |
| E | Embryonaltag |
| EDTA | Ethylenedinitrilotetraacetic acid |
| FCS | fötale Kälberserum |
| FDA | United States Food and Drug Administration |
| g | Gramm |
| GA | Glutaraldehyd |
| GFP | <i>Green Fluorescence Protein</i> |
| GFAP | <i>Glial fibrillary acidic Protein</i> |
| h | Stunden |
| HA | Hyaluronsäure |
| HE | Hämatoxylin Eosin |
| HUVEC | <i>human umbilical vein endothelial cells</i> |
| Ischias FB | Ischiasfibroblasten |
| ITS | <i>Inter toe spread</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| KM | Körpermasse |
| Lsg. | Lösung |
| min | Minuten |
| NaCl | Natriumchlorid |
| OP | Operation |
| PAI | <i>Plasminogen activator inhibitor</i> |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| PDL | <i>Poly-D-Lysine</i> |
| PEG | Polyethylen-Glykol |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PGA | Polyglykolsäure |
| PL | <i>Paw length</i> |
| PNS | peripheres Nervensystem |
| RPMI 1640 | <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i> |
| RS | Rattenserum |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunden |
| SFI | <i>Sciatic function index</i> |
| SZ | Schwann Zelle |
| TGase | Transglutaminase |
| tPA | <i>Tissue plasminogen activator</i> |
| TS | <i>Toe spread</i> |
| TRE | Tetracycline response element |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Anhang

1. Tabelle Ischias – OPs

| Tiere | Gruppe | Zeitpunkt | Nerv | Implan- tat | SFI | Muskel [g] Krank/gesund | Reiz- schwelle | Amplitude [mV] | Latenz [s] |
|----------------|--------|-----------|------|----------------|--------|----------------------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 6 – B1 | SO | 9 Mo | +++ | / | 0,09 | 1,013 0,968 | 500 | 446 | 3 |
| 7 – B2 | SO | 9 Mo | +++ | / | -9,14 | 0,954 0,893 | 500 | 4828 | 3 |
| 8 – B3 | SO | 9 Mo | +++ | / | -10,4 | 1,006 0,956 | 250 | 2898 | 4 |
| 9 – B4 | SO | 9 Mo | +++ | / | -9,84 | 1,084 0,886 | 500 | 5230 | 2 |
| 10 – C1 | Im | 9 Mo | ++ | abgebaut | -88,76 | 0,519 0,899 | 500 | 1874 | 3 |
| 11 – C2 | Im | 9 Mo | ++ | abgebaut | / | / | / | / | / |
| 12 – C3 | Im | 9 Mo | ++ | abgebaut | -76,85 | 0,718 1,001 | 1000 | 1143 | 10 |
| 13 – C4 | Im | 9 Mo | ++ | abgebaut | -98,90 | 0,716 0,955 | 500 | 1063 | 4 |
| 14 – C5 | Im | 9 Mo | + | abgebaut | -52,10 | 0,265 0,954 | 750 | 953 | 5 |

Anhang

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-------|------|----|----------|--------|-------|-------|------|------|---|
| 15 – D1 | Im | 9 Mo | ++ | abgebaut | -83,51 | 0,784 | 1,039 | 250 | 287 | 3 |
| 16 – D2 | Im+SZ | 9 Mo | ++ | abgebaut | -85,90 | 0,738 | 1,038 | 250 | 285 | 2 |
| 17 – D3 | Im+SZ | 9 Mo | ++ | abgebaut | -86,63 | 0,697 | 0,943 | 1000 | 523 | 3 |
| 18 – D4 | Im+SZ | 9 Mo | - | abgebaut | -42,75 | 0,075 | 0,967 | / | / | / |
| 19 – D5 | Im+SZ | 9 Mo | - | abgebaut | -41,84 | 0,164 | 1,021 | / | / | / |
| 20 – E1 | Im+SZ | 9 Mo | ++ | abgebaut | -90,47 | 0,683 | 0,985 | 500 | 1799 | 3 |
| 21 – E2 | Im+SZ | 9 Mo | ++ | abgebaut | -85,35 | 0,589 | 0,885 | 750 | 1501 | 4 |
| 22 – E3 | AR | 9 Mo | ++ | / | -87,46 | 0,617 | 0,963 | 750 | 288 | 4 |
| 23 – E4 | AR | 9 Mo | ++ | / | -84,69 | 0,64 | 0,928 | 500 | 483 | 5 |
| 24 – E5 | AR | 9 Mo | ++ | / | -81,52 | 0,645 | 0,987 | 500 | 1853 | 3 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|----|------|-----|---|--------|-------|-------|-----|------|---|
| 25 – F1 | AR | 9 Mo | ++ | / | -81,86 | 0,715 | 0,990 | 500 | 832 | 3 |
| 26 – F2 | AR | 9 Mo | ++ | / | -85,80 | 0,776 | 0,958 | 750 | 794 | 4 |
| 27 – F3 | AR | 9 Mo | ++ | / | -84,94 | 0,773 | 0,920 | 500 | 718 | 3 |
| 28 – F4 | SO | 6 Mo | +++ | / | -4,05 | 0,895 | 0,991 | 250 | 4350 | 8 |
| 29 – F5 | SO | 6 Mo | +++ | / | -6,36 | 0,955 | 0,980 | 500 | 1116 | 7 |
| 30 – G1 | SO | 6 Mo | +++ | / | -6,96 | 0,910 | 0,897 | 250 | 3208 | 3 |
| 31 – G2 | SO | 6 Mo | +++ | / | -2,15 | 0,900 | 0,956 | 250 | 1395 | 6 |
| 32 – G3 | AR | 6 Mo | ++ | / | -84,96 | 0,797 | 0,915 | 500 | 5000 | 9 |
| 33 – G4 | AR | 6 Mo | ++ | / | -85,30 | 0,709 | 0,976 | 250 | 2060 | 8 |
| 34 – G5 | AR | 6 Mo | ++ | / | -83,57 | 0,689 | 1,001 | 500 | 785 | 4 |

Anhang

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-------|------|----|----------|---------|-------|-------|-----|------|---|
| 35 – H1 | AR | 6 Mo | ++ | / | -87,38 | 0,755 | 0,977 | 500 | 1010 | 4 |
| 36 – H2 | AR | 6 Mo | ++ | / | -88,16 | 0,661 | 0,945 | 500 | 644 | 4 |
| 37 – H3 | AR | 6 Mo | ++ | / | -90,10 | 0,537 | 0,910 | 500 | 1643 | 4 |
| 38 – H4 | Im | 6 Mo | ++ | abgebaut | -85,53 | 0,674 | 0,908 | 750 | 1357 | 4 |
| 39 – H5 | Im | 6 Mo | ++ | abgebaut | -88,94 | 0,661 | 0,976 | 750 | 895 | 5 |
| 40 – I1 | Im | 6 Mo | ++ | abgebaut | -90,06 | 0,622 | 0,934 | 750 | 910 | 5 |
| 41 – I2 | Im | 6 Mo | ++ | abgebaut | -107,77 | 0,648 | 0,990 | 750 | 898 | 5 |
| 42 – I3 | Im | 6 Mo | - | abgebaut | -43,59 | 0,125 | 0,912 | / | / | / |
| 43 – I4 | Im | 6 Mo | ++ | abgebaut | -110,68 | 0,658 | 0,927 | 750 | 1270 | 8 |
| 44 – I5 | Im+SZ | 6 Mo | ++ | abgebaut | -109,10 | 0,668 | 0,982 | 750 | 790 | 8 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-------|------|-----|----------|---------|-------|-------|------|------|---|
| 45 – J1 | Im+SZ | 6 Mo | + | abgebaut | -52,35 | 0,358 | 0,906 | 750 | 1283 | 7 |
| 46 – J2 | Im+SZ | 6 Mo | ++ | abgebaut | -111,59 | 0,556 | 0,889 | 750 | 1275 | 5 |
| 47 – J3 | Im+SZ | 6 Mo | ++ | abgebaut | -112,39 | 0,450 | 0,965 | 500 | 2033 | 5 |
| 48 – J4 | Im+SZ | 6 Mo | - | abgebaut | -43,24 | 0,115 | 0,897 | / | / | / |
| 49 – J5 | Im+SZ | 6 Mo | - | abgebaut | -42,39 | 0,103 | 0,867 | / | / | / |
| 50 – K1 | SO | 3 Mo | +++ | / | / | 0,805 | 0,870 | 100 | 466 | 3 |
| 51 – K2 | SO | 3 Mo | +++ | / | / | 0,797 | 0,772 | 250 | 688 | 3 |
| 52 – K3 | SO | 3 Mo | +++ | / | / | 0,979 | 0,900 | 250 | 1143 | 4 |
| 53 – K4 | SO | 3 Mo | +++ | / | / | 0,865 | 0,810 | 100 | 1300 | 2 |
| 54 – K5 | AR | 3 Mo | ++ | / | / | 0,624 | 0,824 | 1000 | 535 | 4 |

Anhang

| | | | | | | | | | | |
|----------------|----|------|----|----------|---|-------|-------|------|------|---|
| 55 – L1 | AR | 3 Mo | ++ | / | / | 0,640 | 0,839 | 750 | 3493 | 3 |
| 56 – L2 | AR | 3 Mo | ++ | / | / | 0,608 | 0,831 | 500 | 399 | 4 |
| 57 – L3 | AR | 3 Mo | ++ | / | / | 0,619 | 0,841 | 500 | 1220 | 3 |
| 58 – L4 | AR | 3 Mo | ++ | / | / | 0,642 | 0,852 | 500 | 1539 | 4 |
| 59 – L5 | AR | 3 Mo | ++ | / | / | 0,602 | 0,812 | 1000 | 868 | 3 |
| 60 – M1 | Im | 3 Mo | ++ | abgebaut | / | 0,548 | 0,886 | 750 | 214 | 4 |
| 61 – M2 | Im | 3 Mo | - | abgebaut | / | 0,117 | 0,951 | / | / | / |
| 62 – M3 | Im | 3 Mo | ++ | abgebaut | / | 0,560 | 0,845 | 1250 | 904 | 4 |
| 63 – M4 | Im | 3 Mo | + | abgebaut | / | 0,381 | 0,792 | 750 | 315 | 5 |
| 64 – M5 | Im | 3 Mo | ++ | abgebaut | / | 0,527 | 0,890 | 750 | 1115 | 4 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-------|------|----|----------|---|-----------|-------|------|-----|---|
| 65 – N1 | Im | 3 Mo | ++ | abgebaut | / | 0,544 | 0,841 | 1000 | 333 | 3 |
| 66 – N2 | Im+SZ | 3 Mo | ++ | abgebaut | / | 0,362 | 0,805 | 1250 | 267 | 5 |
| 67 – N3 | Im+SZ | 3 Mo | + | abgebaut | / | 0,316 | 0,847 | / | / | / |
| 68 – N4 | Im+SZ | 3 Mo | ++ | abgebaut | / | 0,310 | 0,840 | 1250 | 600 | 4 |
| 69 – N5 | Im+SZ | 3 Mo | + | abgebaut | / | 0,215 | 0,883 | / | / | / |
| 70 – O1 | Im+SZ | 3 Mo | + | abgebaut | / | 0,14 1 | 0,801 | / | / | / |
| 71 – O2 | Im+SZ | 3 Mo | + | abgebaut | / | 0,101 | 0,896 | / | / | / |

2. Tabelle Adhäsions – OPs

| Tierbezeichnung | Gruppe | Zeitpunkt | Adhäsion | Zugversuch | Implantat |
|------------------------|---------------|------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| 38 – A1 | ctrl | 1 Wo | ja | 140 g | / |
| 39 – A2 | ctrl | 1 Wo | ja | 40 g | / |
| 40 – A3 | ctrl | 1 Wo | ja | 40 g | / |
| 42 – B1 | ctrl | 1 Wo | ja | 130 g | / |
| 43 – B2 | ctrl | 1 Wo | ja | 20 g | / |
| 45 – B4 | ctrl | 1 Wo | ja | 40 g | / |
| 46 – C1 | MeD0850 | 3 Wo | ja | Histo | abgebaut |
| 47 – C2 | MeD0850 | 3 Wo | nein | / | abgebaut |
| 48 – C3 | MeD0850 | 3 Wo | nein | / | abgebaut |
| 49 – C4 | MeD0850 | 3 Wo | nein | / | abgebaut |
| 50 – D1 | MeD0850 | 1 Wo | ja | 150 g | vorhanden |
| 52 – D3 | MeD0850 | 3 Wo | nein | / | abgebaut |
| 53 – D4 | MeD0850 | 3 Wo | ja | 20 g | abgebaut |
| 57 – E4 | MeD0850 | 1 Wo | nein | / | vorhanden |
| 58 – F1 | ctrl | 1 Wo | ja | 30 g | / |
| 59 – F2 | ctrl | 1 Wo | ja | 180 g | / |
| 60 – F3 | ctrl | 1 Wo | ja | 35 g | / |
| 61 – F4 | ctrl | 1 Wo | ja | 40 g | / |
| 62 – F5 | ctrl | 1 Wo | nein | / | / |
| 63 – G1 | MeD0850 | 1 Wo | nein | / | |

| | | | | | |
|-----------------|---------|------|------|-------|-----------|
| 64 – G2 | MeD0850 | 1 Wo | ja | 30 g | vorhanden |
| 65 – G3 | MeD0850 | 1 Wo | nein | / | vorhanden |
| 66 – G4 | ctrl | 1 Wo | ja | 60 g | / |
| 67 – G5 | ctrl | 1 Wo | ja | 50 g | / |
| 68 – H1 | MeD0850 | 1 Wo | nein | / | vorhanden |
| 69 – H2 | ctrl | 3 Wo | nein | / | / |
| 70 – H3 | ctrl | 3 Wo | ja | 60 g | / |
| 72 – I1 | ctrl | 3 Wo | ja | 200 g | / |
| 73 – I2 | ctrl | 3 Wo | nein | / | / |
| 74 – I3 | ctrl | 3 Wo | ja | 70 g | / |
| 96 – B2 | ctrl | 3 Wo | ja | 200 g | / |
| 97 – B3 | ctrl | 3 Wo | ja | 130 g | / |
| 98 – B4 | ctrl | 3 Wo | ja | 100 g | / |
| 99 – C1 | ctrl | 3 Wo | ja | 60 g | / |
| 100 – C2 | ctrl | 3 Wo | ja | 100 g | / |
| 101 – C3 | ctrl | 3 Wo | ja | 150 g | / |
| 102 – C4 | ctrl | 3 Wo | ja | 80 g | / |
| 107 – A1 | MeD1010 | 3 Wo | ja | 150 g | abgebaut |
| 108 – A2 | MeD1010 | 3 Wo | nein | / | abgebaut |
| 109 – A3 | MeD1010 | 3 Wo | nein | / | abgebaut |
| 110 – A4 | MeD1010 | 3 Wo | ja | 80 g | abgebaut |
| 111 – A5 | MeD1010 | 3 Wo | nein | / | abgebaut |

Anhang

| | | | | | |
|-----------------|---------|------|------|------------|-----------|
| 112 – B1 | MeD1010 | 3 Wo | nein | / | abgebaut |
| 117 – C1 | MeD1010 | 1 Wo | ja | 110 g | vorhanden |
| 118 – C2 | MeD1010 | 1 Wo | ja | 40 g | vorhanden |
| 119 – C3 | MeD1010 | 1 Wo | ja | 70 g | vorhanden |
| 120 – C4 | MeD1010 | 1 Wo | ja | 50 g | vorhanden |
| 121 – C5 | MeD1010 | 1 Wo | nein | / | vorhanden |
| 122 – D1 | MeD1010 | 1 Wo | nein | / | vorhanden |
| 125 – A1 | ctrl | 3 Wo | ja | Histologie | / |
| 126 – A2 | ctrl | 3 Wo | ja | Histologie | / |
| 127 – A3 | MeD1010 | 3 Wo | nein | Histologie | abgebaut |
| 128 – A4 | MeD1010 | 3 Wo | nein | Histologie | abgebaut |
| 129 – B1 | ctrl | 1 Wo | ja | Histologie | / |
| 130 – B2 | ctrl | 1 Wo | ja | Histologie | / |
| 131 – B3 | MeD1010 | 1 Wo | nein | Histologie | vorhanden |
| 132 – B4 | MeD1010 | 1 Wo | nein | Histologie | vorhanden |

3. Explantationsprotokollblatt Adhäsionen

Explantation

Tier-Nr.

Datum

1. Gesundheitszustand allgemein

| | m.B. | o.B |
|-----------|------|-----|
| Motilität | | |
| Fell | | |
| Teint | | |
| Verhalten | | |

2. Wunde

| | ja | nein |
|------------|----|------|
| Rötung | | |
| Schwellung | | |
| Nähte | | |

3. Subkutan Raum

| | | |
|--------------------|--|--|
| Subkutanes Hämatom | | |
| Nähte Muskel | | |

4. Bauchraum/Knotenadhäsion

| | | |
|-----------------------------|--|--|
| Fettstränge Naht | | |
| Fettstränge Implantat | | |
| Fettstränge Implantatknoten | | |
| Fettstränge Darmknoten | | |
| Darm-Knotenresorption | | |
| Implantat-Knotenresorption | | |

5. Implantat

| | | |
|--------------------------------|--|--|
| Position | | |
| mit Gewebeläsion colokalisiert | | |
| Resorption | | |
| Habitus | | |

6. Darm

| | | |
|------------------------------|--|--|
| Position | | |
| Gewebeläsionen colokalisiert | | |
| Ileus | | |

7. Peritoneum-Läsion

| | ja | nein |
|--|----|------|
| erkennbar? | | |
| Größe | | |
| Beschreibung | | |
| (Rötung; Blutung; Angiogenese; Hämatom) | | |

8. Adhäsion

| | |
|--------------------------|--|
| - Keine Adhäsion | |
| - dünner Film | |
| - singular klar umgrenzt | |
| - multipel kompakt | |
| - vaskularisiert | |

9. Zugexperiment

| | |
|-------|--|
| Gramm | |
|-------|--|

10. Gewebeentnahme

| | |
|--------------|--|
| Beschreibung | |
|--------------|--|

Literatur

- Aarons, C. B., P. A. Cohen, et al. (2007). "Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) decrease postoperative adhesions by increasing peritoneal fibrinolytic activity." Ann Surg **245**(2): 176-184.
- Acunzo, G., M. Guida, et al. (2003). "Effectiveness of auto-cross-linked hyaluronic acid gel in the prevention of intrauterine adhesions after hysteroscopic adhesiolysis: a prospective, randomized, controlled study." Human reproduction **18**(9): 1918-1921.
- Aebischer, P., A. N. Salessiotis, et al. (1989). "Basic fibroblast growth factor released from synthetic guidance channels facilitates peripheral nerve regeneration across long nerve gaps." J.Neurosci.Res. **23**: 282-289.
- Aebischer, P., S. R. Winn, et al. (1988). "Transplantation of neural tissue in polymer capsules." Brain Res **448**(2): 364-368.
- Ahmed, Z., R. A. Brown, et al. (1999). "Nerve growth factor enhances peripheral nerve regeneration in non-human primates." J.Anat. **197**: 591-605.
- Ahmed, Z., S. Underwood, et al. (2003). "Nerve guide material made from fibronectin: assessment of in vitro properties." Tissue Eng **9**(2): 219-231.
- Al-Adawi, S., G. S. Dawe, et al. (2002). "Central noradrenergic blockade prevents autotomy in rat: implication for pharmacological prevention of postdenervation pain syndrome." Brain research bulletin **57**(5): 581-586.
- Al-Musawi, D. T., JN (2001). "Adhesion prevention: state of the art." Gynaecol Endosc **10**: 1.
- Albert, E. (1885). "Einige Operationen an Nerven." Wien Med Presse **25**: 1285-1288.
- Allison, D. D. and K. J. Grande-Allen (2006). "Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool." Tissue engineering **12**(8): 2131-2140.
- Almond, A. (2007). "Hyaluronan." Cellular and molecular life sciences : CMLS **64**(13): 1591-1596.
- Ando, H., M. Adachi, et al. (1989). "Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms." Agricult Biol Chem **53**: 2613-1617.
- Anselin, A. D., T. Fink, et al. (1997). "Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells." Neuropathol Appl Neurobiol **23**(5): 387-398.
- Archibald, S. J., C. Krarup, et al. (1991). "A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates." J Comp Neurol **306**(4): 685-696.
- Archibald, S. J., J. Shefner, et al. (1995). "Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 4109-4123.
- Asano, T., R. Takazawa, et al. (2006). "Transplantation of an autologous mesothelial cell sheet prepared from tunica vaginalis prevents post-operative adhesions in a canine model." Tissue engineering **12**(9): 2629-2637.
- Auld, D. S. and R. Robitaille (2003). "Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation." The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry **9**(2): 144-157.
- Ayhan, S., R. Yavuzer, et al. (2000). "Use of the turnover epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve gaps." Journal of reconstructive microsurgery **16**(5): 371-378.
- Aysan, E., O. Dincel, et al. (2008). "Polypropylene mesh covered colonic anastomosis. Results of a new anastomosis technique." International journal of surgery **6**(3): 224-229.

Literatur

- Azziz, R. (1993). "Microsurgery alone or with INTERCEED Absorbable Adhesion Barrier for pelvic sidewall adhesion re-formation. The INTERCEED (TC7) Adhesion Barrier Study Group II." Surgery, gynecology & obstetrics **177**(2): 135-139.
- Bachet, J., B. Goudot, et al. (2000). "Surgery of acute type A dissection: what have we learned during the past 25 years?" Zeitschrift fur Kardiologie **89 Suppl 7**: 47-54.
- Bain, J. R., S. E. Mackinnon, et al. (1989). "Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat." Plast Reconstr Surg **83**(1): 129-138.
- Balgude, A. P., X. Yu, et al. (2001). "Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures." Biomaterials **22**(10): 1077-1084.
- Baumer, Y., D. Funk, et al. (2010). "Does telomerase reverse transcriptase induce functional de-differentiation of human endothelial cells?" Cellular and molecular life sciences : CMLS **67**(14): 2451-2465.
- Beauchamp, R. O., Jr., M. B. St Clair, et al. (1992). "A critical review of the toxicology of glutaraldehyde." Critical reviews in toxicology **22**(3-4): 143-174.
- Beck, D. E. (1997). "The role of Seprafilm bioresorbable membrane in adhesion prevention." The European journal of surgery. Supplement. : = Acta chirurgica. Supplement(577): 49-55.
- Beck, D. E., Z. Cohen, et al. (2003). "A prospective, randomized, multicenter, controlled study of the safety of Seprafilm adhesion barrier in abdominopelvic surgery of the intestine." Diseases of the colon and rectum **46**(10): 1310-1319.
- Becker, C., C. Gueuning, et al. (1985). "[Peripheral nerve repair: value of biological glues and epiperineural suture in late interventions. Experimental study in rats]." Ann Chir Main **4**(3): 259-262.
- Becker, C. M., C. O. Gueuning, et al. (1985). "Sutures or fibrin glue for divided rat nerves: Schwann cell and muscle metabolism." Microsurgery **6**(1): 1-10.
- Becker, J. M., M. T. Dayton, et al. (1996). "Prevention of postoperative abdominal adhesions by a sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane: a prospective, randomized, double-blind multicenter study." Journal of the American College of Surgeons **183**(4): 297-306.
- Belkas, J. S., M. S. Shoichet, et al. (2004). "Peripheral nerve regeneration through guidance tubes." Neurol Res **26**(2): 151-160.
- Bennett, S. L., D. A. Melanson, et al. (2003). "Next-generation hydrogel films as tissue sealants and adhesion barriers." Journal of cardiac surgery **18**(6): 494-499.
- Best, C. L., D. Rittenhouse, et al. (1991). "A comparison of TC7 and 32% dextran 70 for prevention of postoperative adhesions in hamsters." Obstetrics and gynecology **78**(5 Pt 1): 858-860.
- Best, C. L., D. Rittenhouse, et al. (1992). "Evaluation of interceed(TC7) for reduction of postoperative adhesions in rabbits." Fertility and sterility **58**(4): 817-820.
- Bigi, A., B. Bracci, et al. (1998). "Drawn gelatin films with improved mechanical properties." Biomaterials **19**(24): 2335-2340.
- Bingley, J. A., M. A. Gardner, et al. (2000). "Late complications of tissue glues in aortic surgery." Ann Thorac Surg **69**(6): 1764-1768.
- Bischoff, A. D., R., Hopf HC (2008). Elektromyographie, Nervenleituntersuchungen, Thieme.
- Bixby, J. L., J. Lilien, et al. (1988). "Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth in Schwann cells in vitro." J.Cell.Biol. **107**: 353-361.
- Bixby, J. L. and R. Zhang (1990). "Purified N-Cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth." J.Cell.Biol. **110**: 1253-1260.

- Boland, G. M. and R. J. Weigel (2006). "Formation and prevention of postoperative abdominal adhesions." The Journal of surgical research **132**(1): 3-12.
- Bora, F. W., Jr. (1967). "Peripheral nerve repair in cats. The fascicular stitch." J Bone Joint Surg Am **49**(4): 659-666.
- Brandt, J., L. B. Dahlin, et al. (2002). "Functional recovery in a tendon autograft used to bridge a peripheral nerve defect." Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg **36**(1): 2-8.
- Brandt, J., L. B. Dahlin, et al. (1999). "Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects." J Hand Surg [Br] **24**(3): 284-290.
- Braun, R. M. (1964). "Experimental peripheral nerve repair tubulation." Surg. Forum **15**: 452-454.
- Bretschneider, F. and J. de Weille (2006). Introduction to electrophysiological methods and instrumentation, Academic Press.
- Bristow, R. E., A. Santillan, et al. (2007). "Prevention of adhesion formation after radical hysterectomy using a sodium hyaluronate-carboxymethylcellulose (HA-CMC) barrier: a cost-effectiveness analysis." Gynecologic oncology **104**(3): 739-746.
- Brockes, J. P., K. L. Fields, et al. (1979). "Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve." Brain Res **165**(1): 105-118.
- Broderick, E. P., D. M. O'Halloran, et al. (2005). "Enzymatic stabilization of gelatin-based scaffolds." Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials **72**(1): 37-42.
- Brown, C. B., A. A. Luciano, et al. (2007). "Adept (icodextrin 4% solution) reduces adhesions after laparoscopic surgery for adhesiolysis: a double-blind, randomized, controlled study." Fertility and sterility **88**(5): 1413-1426.
- Brunelli, G., C. Longinotti, et al. (2005). "Adhesion reduction after knee surgery in a rabbit model by Hyaloglide, a hyaluronan derivative gel." Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society **23**(6): 1377-1382.
- Bryan, D. J., A. H. Holway, et al. (2000). "Influence of glial growth factor and Schwann cells in a bioresorbable guidance channel on peripheral nerve regeneration." Tissue Eng **6**(2): 129-138.
- Buckenmaier, C. C., 3rd, A. E. Pusateri, et al. (1999). "Comparison of antiadhesive treatments using an objective rat model." The American surgeon **65**(3): 274-282.
- Bunge, R. P. (1993). "Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration." Curr Opin Neurobiol **3**(5): 805-809.
- Büngner, O. v. (1891). "Über die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen." Beitr. Pathol. Anat. **10**: 321-387.
- Burnett, M. G. and E. L. Zager (2004). "Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review." Neurosurg Focus **16**(5): E1.
- Burns, J. W., M. J. Colt, et al. (1997). "Preclinical evaluation of Seprafilm bioresorbable membrane." Eur J Surg Suppl(577): 40-48.
- Burns, J. W., K. Skinner, et al. (1996). "A hyaluronate based gel for the prevention of postsurgical adhesions: evaluation in two animal species." Fertility and sterility **66**(5): 814-821.
- Cai, J., X. Peng, et al. (2004). "Synergistic improvements in cell and axonal migration across sciatic nerve lesion gaps using bioresorbable filaments and heregulin-beta1." J Biomed Mater Res A **69**(2): 247-258.
- Cai, J., X. Peng, et al. (2005). "Permeable guidance channels containing microfilament scaffolds enhance axon growth and maturation." J Biomed Mater Res A **75**(2): 374-386.
- Cajal, R. S. (1928). Degeneration an regeneration of the nervous system, London, Oxford UP.

Literatur

- Calvert, G. T., V. B. Doolabh, et al. (2001). "Rat-strain differences in recovery following peripheral-nerve allotransplantation." Journal of reconstructive microsurgery **17**(3): 185-191.
- Carr, M. M., T. J. Best, et al. (1992). "Strain differences in autotomy in rats undergoing sciatic nerve transection or repair." Annals of plastic surgery **28**(6): 538-544.
- Ceballos, D., X. Navarro, et al. (1999). "Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration." Exp Neurol **158**(2): 290-300.
- Chamberlain, L. J., I. V. Yannas, et al. (1998). "Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft." Experimental neurology **154**(2): 315-329.
- Chamberlain, L. J., I. V. Yannas, et al. (2000). "Near-terminus axonal structure and function following rat sciatic nerve regeneration through a collagen-GAG matrix in a ten-millimeter gap." J Neurosci Res **60**(5): 666-677.
- Chang, J. Y., J. H. Lin, et al. (2007). "In vivo evaluation of a biodegradable EDC/NHS-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material." Macromol Biosci **7**(4): 500-507.
- Chao, H. H. and D. F. Torchiana (2003). "BioGlue: albumin/glutaraldehyde sealant in cardiac surgery." J Card Surg **18**(6): 500-503.
- Chen, L. E., A. V. Seaber, et al. (1994). "Denatured muscle as a nerve conduit: a functional, morphologic, and electrophysiologic evaluation." J Reconstr Microsurg **10**(3): 137-144.
- Chen, M., P. Chen, et al. (2005). "An in vivo study of tricalcium phosphate and glutaraldehyde crosslinking gelatin conduits in peripheral nerve repair." J Biomed Mater Res B Appl Biomater. **77**(1): 89-97.
- Chen, P. R., M. H. Chen, et al. (2004). "Biocompatibility of NGF-grafted GTG membranes for peripheral nerve repair using cultured Schwann cells." Biomaterials **25**(25): 5667-5673.
- Chen, Y.-S., J.-Y. Chang, et al. (2005). "An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material." Biomaterials **26**(18): 3911-3918.
- Cheong, Y. C., S. M. Laird, et al. (2001). "Peritoneal healing and adhesion formation/reformation." Hum Reprod Update **7**(6): 556-566.
- Chiu, D. T. (1999). "Autogenous venous nerve conduits. A review." Hand Clin **15**(4): 667-671, ix.
- Chiu, D. T., I. Janecka, et al. (1982). "Autogenous vein grafts as conduit for nerve regeneration." Surgery **91**: 226-233.
- Choi, Y. S., S. R. Hong, et al. (1999). "Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge." J Biomed Mater Res **48**(5): 631-639.
- Clavijo-Alvarez, J. A., V. T. Nguyen, et al. (2007). "Comparison of biodegradable conduits within aged rat sciatic nerve defects." Plastic and reconstructive surgery **119**(6): 1839-1851.
- Cohen, P. A., C. B. Aarons, et al. (2007). "The effectiveness of a single intraperitoneal infusion of a neurokinin-1 receptor antagonist in reducing postoperative adhesion formation is time dependent." Surgery **141**(3): 368-375.
- Cohen, P. A., A. C. Gower, et al. (2007). "A neurokinin-1 receptor antagonist that reduces intraabdominal adhesion formation increases peritoneal matrix metalloproteinase activity." Wound Repair Regen **15**(6): 800-808.
- Comert, M., K. Karakaya, et al. (2010). "Does intraabdominal use of Ankaferd Blood Stopper cause increased intraperitoneal adhesions?" Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi = Turkish journal of trauma & emergency surgery : TJTES **16**(5): 383-389.
- Courts, W. (1977). The Science and

Technology of Gelatin. New York, Academic Press, Inc.

Crang, A. J. and W. F. Blakemore (1986). "Observations on Wallerian degeneration in explant cultures of cat sciatic nerve." J Neurocytol **15**(4): 471-482.

Dahlin, L. B. and G. Lundborg (2001). "Use of tubes in peripheral nerve repair." Neurosurg Clin N Am **12**(2): 341-352.

Damink, O., P. Dijkstra, et al. (1995). "Glutharaldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials." J Mater Sci Mater Med **6**: 460-472.

Danielsen, N., H. Muller, et al. (1988a). "Rat amnion membrane matrix as a substratum for regenerating axons from peripheral and central neurons: Effects in silicone chamber model." Devl Brain Res. **39**: 39-50.

David, S. and A. J. Aguayo (1981). "Axonal elongation into peripheral nervous system 'bridges' after central nervous system injury in adult rats." Science **214**(4523): 931-933.

De Iaco, P. A., G. Muzzupapa, et al. (2001). "Efficacy of a hyaluronan derivative gel in postsurgical adhesion prevention in the presence of inadequate hemostasis." Surgery **130**(1): 60-64.

De Iaco, P. A., M. Stefanetti, et al. (1998). "A novel hyaluronan-based gel in laparoscopic adhesion prevention: preclinical evaluation in an animal model." Fertility and sterility **69**(2): 318-323.

Del Rosso, G., L. Di Liberato, et al. (2000). "A new form of acute adverse reaction to icodextrin in a peritoneal dialysis patient." Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association **15**(6): 927-928.

Dellon, E. S. and A. L. Dellon (1991). "Functional assessment of neurologic impairment: track analysis in diabetic and compression neuropathies." Plast Reconstr Surg **88**(4): 686-694.

Diamond, M. P. (1996). "Reduction of adhesions after uterine myomectomy by Seprafilm membrane (HAL-F): a blinded, prospective, randomized, multicenter clinical study. Seprafilm Adhesion Study Group." Fertility and sterility **66**(6): 904-910.

Diamond, M. P., C. B. Linsky, et al. (1991). "Synergistic effects of INTERCEED(TC7) and heparin in reducing adhesion formation in the rabbit uterine horn model." Fertility and sterility **55**(2): 389-394.

Dijkstra, J. R., M. F. Meek, et al. (2000). "Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex." J Neurosci Methods **96**(2): 89-96.

Dineen, P. (1976). "Antibacterial activity of oxidized regenerated cellulose." Surgery, gynecology & obstetrics **142**(4): 481-486.

diZerega, G. S. (1996). "Use of adhesion prevention barriers in ovarian surgery, tubalplasty, ectopic pregnancy, endometriosis, adhesiolysis, and myomectomy." Current opinion in obstetrics & gynecology **8**(3): 230-237.

DiZerega, G. S. (2000). Peritoneal Surgery. New York, Springer-Verlag.

diZerega, G. S. and J. D. Campeau (2001). "Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation." Hum Reprod Update **7**(6): 547-555.

diZerega, G. S., S. J. Verco, et al. (2002). "A randomized, controlled pilot study of the safety and efficacy of 4% icodextrin solution in the reduction of adhesions following laparoscopic gynaecological surgery." Human reproduction **17**(4): 1031-1038.

Dlugi, A. and A. deCherney (1984). "Prevention of postoperative adhesion formation." Semin Reprod Endocrinol **2**: 125.

Literatur

- Donoff, R. B. (1995). "Nerve regeneration: basic and applied aspects." Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists **6**(1): 18-24.
- Doolabh, V. B., M. C. Hertl, et al. (1996). "The role of conduits in nerve repair: a review." Rev Neurosci **7**(1): 47-84.
- Dreesmann, L., M. Ahlers, et al. (2007). "The pro-angiogenic characteristics of a cross-linked gelatin matrix." Biomaterials **28**(36): 5536-5543.
- Dreesmann, L., M. Lietz, et al. (2005). Tissue engineering of nerve guides and associated cell interactions. 4th Annual meeting of the European Tissue Engineering Society, Munich.
- Dubey, N., P. C. Letourneau, et al. (1999). "Guided neurite elongation and schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration." Exp Neurol **158**(2): 338-350.
- Dunn, R., M. D. Lyman, et al. (2001). "Evaluation of the SprayGel adhesion barrier in the rat cecum abrasion and rabbit uterine horn adhesion models." Fertility and sterility **75**(2): 411-416.
- Einheber, S., M. J. Hannocks, et al. (1995). "Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions." J Cell Biol **129**(2): 443-458.
- Ellis, H., W. Harrison, et al. (1965). "The Healing of Peritoneum under Normal and Pathological Conditions." The British journal of surgery **52**: 471-476.
- Erasmi, A. W., H. H. Sievers, et al. (2002). "Inflammatory response after BioGlue application." The Annals of thoracic surgery **73**(3): 1025-1026.
- Eroglu, E., S. Oral, et al. (1996). "Reducing seroma formation with fibrin glue in an animal mastectomy model." European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology **22**(2): 137-139.
- Ersoy, E., V. Ozturk, et al. (2008). "Effect of polylactic acid film barrier on intra-abdominal adhesion formation." The Journal of surgical research **147**(1): 148-152.
- Fabri, P. J., E. C. Ellison, et al. (1983). "High molecular weight dextran--effect on adhesion formation and peritonitis in rats." Surgery **94**(2): 336-341.
- Falls, D. L. (2003). "Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies." Exp Cell Res **284**(1): 14-30.
- Fansa, H., W. Schneider, et al. (2001). "Revascularization of tissue-engineered nerve grafts and invasion of macrophages." Tissue Eng **7**(5): 519-524.
- Fehrenbacher, J. W. and H. Siderys (2006). "Use of BioGlue in aortic surgery: proper application techniques and results in 92 patients." The heart surgery forum **9**(5): E794-799.
- Fenrich, K. and T. Gordon (2004). "Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances." Can J Neurol Sci **31**(2): 142-156.
- Ferland, R., D. Mulani, et al. (2001). "Evaluation of a sprayable polyethylene glycol adhesion barrier in a porcine efficacy model." Human reproduction **16**(12): 2718-2723.
- Ferrara, G. (1608). "Nuova Selva di chirurgia divisia tre parti Venice." S Combi.
- Folkman, J. (1984). "What is the role of endothelial cells in angiogenesis?" Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology **51**(6): 601-604.
- Fu, S. Y. and T. Gordon (1997). "The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration." Mol Neurobiol **14**(1-2): 67-116.

- Fugleholm, K., H. Schmalbruch, et al. (1994). "Early peripheral nerve regeneration after crushing, sectioning, and freeze studied by implanted electrodes in the cat." J Neurosci **14**(5 Pt 1): 2659-2673.
- Fukunaga, S., M. Karck, et al. (1999). "The use of gelatin-resorcin-formalin glue in acute aortic dissection type A." European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery **15**(5): 564-569; discussion 570.
- Funk, D., C. Fricke, et al. (2007). "Aging Schwann cells in vitro." Eur J Cell Biol **86**(4): 207-219.
- Furst, W. and A. Banerjee (2005). "Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity." The Annals of thoracic surgery **79**(5): 1522-1528; discussion 1529.
- Gamez, E., Y. Goto, et al. (2004). "Photofabricated gelatin-based nerve conduits: nerve tissue regeneration potentials." Cell Transplant **13**(5): 549-564.
- Gamez, E., K. Ikezaki, et al. (2003). "Photoconstructs of nerve guidance prosthesis using photoreactive gelatin as a scaffold." Cell Transplant **12**(5): 481-490.
- Gauwerky, J. F., D. Heinrich, et al. (1986). "Complications of intraperitoneal dextran application for prevention of adhesions." Biological research in pregnancy and perinatology **7**(3): 93-97.
- Glasby, M. A. (1991). "Interposed muscle grafts in nerve repair in the hand: an experimental basis for future clinical use." World J Surg **15**(4): 501-510.
- Glasby, M. A., R. E. Clutton, et al. (1995). "Repair of the facial nerve in the cerebellopontine angle using freeze-thawed skeletal muscle autografts. An experimental surgical study in the sheep." Acta Neurochir (Wien) **136**(3-4): 151-159.
- Glasby, M. A., S. G. Gschmeissner, et al. (1986). "The dependence of nerve regeneration through muscle grafts in the rat on the availability and orientation of basement membrane." J Neurocytol **15**(4): 497-510.
- Glasby, M. A., T. E. Hems, et al. (1992). "The use of coaxially aligned freeze-thawed skeletal muscle autografts in the repair of the cauda equina--in the sheep." Acta Neurochir (Wien) **117**(3-4): 210-214.
- Glasby, M. A., R. E. Mountain, et al. (1993). "Repair of the facial nerve using freeze-thawed muscle autografts. A surgical model in the sheep." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **119**(4): 461-465.
- Gluck, T. (1880). "Über Neuroplastik auf dem Wege der Transplantation." Arch Klin Chir **25**: 606-616.
- Glucksmann (1966). "Serosal integrity and intestinal adhesions." Surgery **60**: 3.
- Grabb, W. C. (1970). "Management of nerve injuries in the forearm and hand." Orthop Clin North Am **1**(2): 419-431.
- Greca, F. H., J. B. de Paula, et al. (2001). "The influence of differing pore sizes on the biocompatibility of two polypropylene meshes in the repair of abdominal defects. Experimental study in dogs." Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery **5**(2): 59-64.
- Griffin, J. W., B. Pan, et al. (2010). "Measuring nerve regeneration in the mouse." Experimental neurology **223**(1): 60-71.
- Griffin, M., R. Casadio, et al. (2002). "Transglutaminases: nature's biological glues." The Biochemical journal **368**(Pt 2): 377-396.
- Guida, M., G. Acunzo, et al. (2004). "Effectiveness of auto-crosslinked hyaluronic acid gel in the prevention of intrauterine adhesions after hysteroscopic surgery: a prospective, randomized, controlled study." Human reproduction **19**(6): 1461-1464.

Literatur

- Gulati, A. K. and G. P. Cole (1994). "Immunogenicity and regenerative potential of acellular nerve allografts to repair peripheral nerve in rats and rabbits." Acta Neurochir (Wien) **126**(2-4): 158-164.
- Haastert, K., E. Lipokatic, et al. (2006). "Differentially promoted peripheral nerve regeneration by grafted Schwann cells over-expressing different FGF-2 isoforms." Neurobiol Dis **21**(1): 138-153.
- Hadlock, T., J. Elisseff, et al. (1998). "A tissue-engineered conduit for peripheral nerve repair." Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg. **124**: 1081-1086.
- Hadlock, T., C. Sundback, et al. (2000). "A polymer foam conduit seeded with schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration." Tissue Engineering **6**: 119-127.
- Hadlock, T., C. Sundback, et al. (1999). "A novel, biodegradable polymer conduit delivers neutrophin and promoters nerve regeneration." The Laryngoscope **109**: 1412-1416.
- Haney, A. F. and E. Doty (1992). "Murine peritoneal injury and de novo adhesion formation caused by oxidized-regenerated cellulose (Interceed [TC7]) but not expanded polytetrafluoroethylene (Gore-Tex Surgical Membrane)." Fertility and sterility **57**(1): 202-208.
- Haney, A. F. and E. Doty (1994). "The formation of coalescing peritoneal adhesions requires injury to both contacting peritoneal surfaces." Fertility and sterility **61**(4): 767-775.
- Hare, G. M., P. J. Evans, et al. (1992). "Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery." Plast Reconstr Surg **89**(2): 251-258.
- Harris, J. M. and S. Zalipsky (1997). Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications. American Chemical Society Symposium Series, Washington DC.
- Hashimoto, T., Y. Suzuki, et al. (2002). "Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons." Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale **146**(3): 356-368.
- Hebebrand, D., G. Zohman, et al. (1997). "Nerve xenograft transplantation. Immunosuppression with FK-506 and RS-61443." Journal of hand surgery **22**(3): 304-307.
- Herndon, M. E. and A. D. Lander (1990). "A diverse set of developmentally regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system." Neuron **4**(6): 949-961.
- Hertzler (1919). The Peritoneum. St. Louis; Mosby.
- Hewitt, C. W., S. W. Marra, et al. (2001). "BioGlue surgical adhesive for thoracic aortic repair during coagulopathy: efficacy and histopathology." The Annals of thoracic surgery **71**(5): 1609-1612.
- Hobson, M. I., C. J. Green, et al. (2000). "VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy." J Anat **197 Pt 4**: 591-605.
- Hoffmann, N. E., S. A. Siddiqui, et al. (2009). "Choice of hemostatic agent influences adhesion formation in a rat cecal adhesion model." The Journal of surgical research **155**(1): 77-81.
- Holmes, W. and J. Z. Young (1942). "Nerve regeneration after immediate and delayed suture." J Anat **77**: 63-96.
- Huang-Lee, L. L., D. T. Cheung, et al. (1990). "Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks." Journal of biomedical materials research **24**(9): 1185-1201.
- Huang, Y. C. and Y. Y. Huang (2006). "Biomaterials and strategies for nerve regeneration." Artif Organs **30**(7): 514-522.
- Hubbard, T. B., Jr., M. Z. Khan, et al. (1967). "The pathology of peritoneal repair: its relation to the formation of adhesions." Annals of surgery **165**(6): 908-916.

- Huber, G. C. (1895). "A study of operative treatment for loss of nerve substance in peripheral nerves." J Morphol **11**: 629.
- Hudson, T. W., G. R. Evans, et al. (1999). "Engineering strategies for peripheral nerve repair." Clin Plast Surg **26**(4): 617-628, ix.
- Ide, C. (1996). "Peripheral nerve regeneration." Neurosci Res **25**(2): 101-121.
- Ijkema-Paassen, J., K. Jansen, et al. (2004). "Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation." Biomaterials **25**(9): 1583-1592.
- Ikura, K. K., T., Sasaki, R., Chiba, H. (1980). "Crosslinking of soybean 7S and 11S protein by transglutaminase." Agricult Biol Chem **44**: 2979-2984.
- Inada, Y., S. Morimoto, et al. (2005). "Surgical relief of causalgia with an artificial nerve guide tube: Successful surgical treatment of causalgia (Complex Regional Pain Syndrome Type II) by in situ tissue engineering with a polyglycolic acid-collagen tube." Pain **117**(3): 251-258.
- Inada, Y., S. Morimoto, et al. (2004). "Regeneration of peripheral nerve gaps with a polyglycolic Acid-collagen tube." Neurosurgery **55**(3): 640-648.
- Ingebrigsten, R. (1915). "A contribution to the biology of peripheral nerves in transplantation." J Exp Med **22**: 418-428.
- Ito, T., T. Nakamura, et al. (2003). "Biodegradation of polyglycolic acid-collagen composite tubes for nerve guide in the peritoneal cavity." Asaio J **49**(4): 417-421.
- Ito, T., Y. Yeo, et al. (2007). "Dextran-based in situ cross-linked injectable hydrogels to prevent peritoneal adhesions." Biomaterials **28**(23): 3418-3426.
- Itoh, S., M. Suzuki, et al. (2003). "Development of a nerve scaffold using a tendon chitosan tube." Artificial organs **27**(12): 1079-1088.
- Jaenigen, B. M., C. Weis, et al. (2009). "The new adhesion prophylaxis membrane A-part--from in vitro testing to first in vivo results." Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials **89B**(2): 293-299.
- Jansen, R. P. (1985). "Failure of intraperitoneal adjuncts to improve the outcome of pelvic operations in young women." American journal of obstetrics and gynecology **153**(4): 363-371.
- Jenq, C. B. and R. E. Coggeshall (1986). "Regeneration of transected rat sciatic nerves after using isolated nerve fragments as distal inserts in silicone tubes." Exp Neurol **91**(1): 154-162.
- Johns, D. A., R. Ferland, et al. (2003). "Initial feasibility study of a sprayable hydrogel adhesion barrier system in patients undergoing laparoscopic ovarian surgery." The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists **10**(3): 334-338.
- Johnson, E. M., Jr., M. Taniuchi, et al. (1988). "Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells." Trends Neurosci **11**(7): 299-304.
- Johnson, P. C., R. C. Duhamel, et al. (1982). "Preparation of cell-free extracellular matrix from human peripheral nerve." Muscle Nerve **5**(4): 335-344.
- Jonas, D., C. Bischoff, et al. (1999). "Influence of different types of surface electrodes on amplitude, area and duration of the compound muscle action potential." Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology **110**(12): 2171-2175.
- Kakinoki, R., N. Nishijima, et al. (1997). "Nerve regeneration over a 25 mm gap in rat sciatic nerves using tubes containing blood vessels: the possibility of clinical application." Int Orthop **21**(5): 332-336.
- Kapfhammer, J. P., H. Xu, et al. (2007). "The detection and quantification of growth cone collapsing activities." Nature protocols **2**(8): 2005-2011.

Literatur

- Kataoka, K., Y. Suzuki, et al. (2004). "Alginate enhances elongation of early regenerating axons in spinal cord of young rats." Tissue engineering **10**(3-4): 493-504.
- Kaupilla, T., E. Jyvasjarvi, et al. (1993). "A laminin graft replaces neurorrhaphy in the restorative surgery of the rat sciatic nerve." Exp Neurol **123**(2): 181-191.
- Kawasaki, Y., K. Yoshimura, et al. (2000). "Identification of myelinated motor and sensory axons in a regenerating mixed nerve." The Journal of hand surgery **25**(1): 104-111.
- Kazui, T., N. Washiyama, et al. (2001). "Role of biologic glue repair of proximal aortic dissection in the development of early and midterm redissection of the aortic root." The Annals of thoracic surgery **72**(2): 509-514.
- Kece, C., F. Yildiz, et al. (2010). "Synergistic effects of hyperbaric oxygen and granulocyte colony stimulating factor on postoperative adhesion formation in a rat cecal abrasion model." Bratislavske lekarske listy **111**(3): 115-120.
- Kerns, J. M., N. Danielsen, et al. (2003). "A comparison of peripheral nerve regeneration in acellular muscle and nerve autografts." Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg **37**(4): 193-200.
- Kim, S.-M., S.-K. Lee, et al. (2007). "Peripheral nerve regeneration using a three dimensionally cultered Schwann cell conduit." The Journal of Craniofacial Surgery **18**(3): 475-488.
- Kirk, E. G. and D. Lewis (1915). "Fascial tubulization in the repair of nerve defects." JAMA **65**: 486-492.
- Koka, R. and T. A. Hadlock (2001). "Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection." Exp Neurol **168**(1): 192-195.
- Kosaka, H., T. Yoshimoto, et al. (2008). "Interferon-gamma is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation." Nature medicine **14**(4): 437-441.
- Kozlov (1983). "The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification." Polymer **24**: 651-666.
- Krinsky, A. H., F. P. Haseltine, et al. (1984). "Peritoneal fluid accumulation with dextran 70 instilled at time of laparoscopy." Fertility and sterility **41**(4): 647-649.
- Kuijpers, A. J., G. H. Engbers, et al. (2000). "Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications." Journal of biomaterials science. Polymer edition **11**(3): 225-243.
- Kurth, L., Rogers, P.J. (1984). "Transglutaminase catalysed crosslinking of myosin to soya protein, casein and gluten." J Food Sci **49**: 573-589.
- Lamont, P. M. D. E., H (1992). "Intra-abdominal adhesion formation between two adjacent deperitonealised surfaces." Surg Res Commun **13**: 4.
- Lang, R. A., P. M. Gruntzig, et al. (2007). "Polyvinyl alcohol gel prevents abdominal adhesion formation in a rabbit model." Fertility and sterility **88**(4 Suppl): 1180-1186.
- Lang, R. A., P. M. Gruntzig, et al. (2007). "Polyvinyl alcohol gel prevents abdominal adhesion formation in a rabbit model." Fertil Steril **88**(4 Suppl): 1180-1186.
- Lang, R. A., C. Weisgerber, et al. (2009). "Polyvinyl alcohol gel prevents adhesion re-formation after adhesiolysis in a rabbit model." The Journal of surgical research **153**(1): 12-16.
- Larsson, B. (1996). "Efficacy of Interceed in adhesion prevention in gynecologic surgery: a review of 13 clinical studies." The Journal of reproductive medicine **41**(1): 27-34.
- Lauder, C. I., G. Garcea, et al. (2010). "Use of a Modified Chitosan-Dextran Gel to Prevent Peritoneal Adhesions in a Rat Model." The Journal of surgical research.
- Lazzeri, L., M. G. Cascone, et al. (2006). "Gelatine/PLLA sponge-like scaffolds: morphological and biological characterization." J Mater Sci Mater Med **17**(12): 1211-1217.

- LeBlanc, A. C. and J. F. Poduslo (1990). "Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve." J Neurosci Res **26**(3): 317-326.
- Lehmann (2009). "Mesenterial culture system for adhesion barrier tests in vitro." Biomaterialien **3/4**.
- Lemke, G. (1996). "Neuregulins in development." Mol Cell Neurosci **7**(4): 247-262.
- Lenihan, D. V., A. J. Carter, et al. (1998). "An electrophysiological and morphological comparison of the microwave muscle graft and the freeze-thawed muscle graft." Br J Plast Surg **51**(4): 300-306.
- Li, S.-T., S. J. Archibald, et al. (1992). "Peripheral nerve repair with collagen conduits." Prog.Neurobiol. **33**: 87-134.
- Liakakos, T., N. Thomakos, et al. (2001). "Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology, and clinical significance. Recent advances in prevention and management." Digestive surgery **18**(4): 260-273.
- Lim, R., J. M. Morrill, et al. (2008). "An FDA approved neurokinin-1 receptor antagonist is effective in reducing intraabdominal adhesions when administered intraperitoneally, but not orally." Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract **12**(10): 1754-1761.
- Lin, F. H., C. H. Yao, et al. (1998). "Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin." Biomaterials **19**(10): 905-917.
- Linsky, C. B., M. P. Diamond, et al. (1987). "Adhesion reduction in the rabbit uterine horn model using an absorbable barrier, TC-7." The Journal of reproductive medicine **32**(1): 17-20.
- Liu, B. S., C. H. Yao, et al. (2004). "A novel use of genipin-fixed gelatin as extracellular matrix for peripheral nerve regeneration." J Biomater Appl **19**(1): 21-34.
- Lotheissen, G. (1901). "Zur Nerven- und Sehnennaht." Arch Klin Chir **64**(310-3).
- Luis, A. L., S. Amado, et al. (2007). "Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp." Journal of neuroscience methods **163**(1): 92-104.
- Lundborg, G. and L. B. Dahlin (1996). "Anatomy, function, and pathophysiology of peripheral nerves and nerve compression." Hand Clin **12**(2): 185-193.
- Lundborg, G., L. B. Dahlin, et al. (1990). "Vibration exposure and peripheral nerve fiber damage." J Hand Surg [Am] **15**(2): 346-351.
- Lundborg, G. and H. A. Hansson (1980). "Nerve regeneration through preformed pseudosynovial tubes. A preliminary report of a new experimental model for studying the regeneration and reorganization capacity of peripheral nerve tissue." J Hand Surg [Am] **5**(1): 35-38.
- Lundborg, G. and M. Kanje (1996). "Bioartificial nerve grafts. A prototype." Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg **30**(2): 105-110.
- Lundborg, G., B. Rosen, et al. (1997). "Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: early results from a prospective, randomized, clinical study." J Hand Surg [Am] **22**(1): 99-106.
- Luo, Y. X. and D. C. Chao (1989). "An experimental study of using "tendon bridge" or "tendon tunnel" as a conduit for nerve regeneration." J Tongji Med Univ **9**(2): 103-106.
- Mackinnon, S. E., A. L. Dellon, et al. (1985). "A primate model for chronic nerve compression." J.Reconstr.Microsurg. **1**(3): 185-194.
- Mackinnon, S. E. and A. R. Hudson (1992). "Clinical application of peripheral nerve transplantation." Plast Reconstr Surg **90**(4): 695-699.

Literatur

- Magill, C. K., A. Tong, et al. (2007). "Reinnervation of the tibialis anterior following sciatic nerve crush injury: a confocal microscopic study in transgenic mice." Exp Neurol **207**(1): 64-74.
- Mais, V., S. Ajossa, et al. (1995). "Reduction of adhesion reformation after laparoscopic endometriosis surgery: a randomized trial with an oxidized regenerated cellulose absorbable barrier." Obstetrics and gynecology **86**(4 Pt 1): 512-515.
- Mais, V., S. Ajossa, et al. (1995). "Prevention of de-novo adhesion formation after laparoscopic myomectomy: a randomized trial to evaluate the effectiveness of an oxidized regenerated cellulose absorbable barrier." Human reproduction **10**(12): 3133-3135.
- Mais, V., G. L. Bracco, et al. (2006). "Reduction of postoperative adhesions with an auto-crosslinked hyaluronan gel in gynaecological laparoscopic surgery: a blinded, controlled, randomized, multicentre study." Human reproduction **21**(5): 1248-1254.
- Marchesi, C., M. Pluderi, et al. (2007). "Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection." Glia **55**(4): 425-438.
- Marianne, D., S. Babak, et al. (2005). "Paradoxical inflammatory reaction to Seprafilm: case report and review of the literature." South Med J **98**: 1039.
- Martin, K. H. (1964). "[Studies on the Perineurial Diffusion Barrier in Freeze-Dried Nerves.]" Z Zellforsch Mikrosk Anat **64**: 404-428.
- Martinelli, L., A. Graffigna, et al. (2000). "Coronary artery narrowing after aortic root reconstruction with resorcin-formalin glue." Ann Thorac Surg **70**(5): 1701-1702.
- Martini, R. and M. Schachner (1988). "Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve." J Cell Biol **106**(5): 1735-1746.
- Matsuda, S., N. Se, et al. (2002). "Evaluation of the antiadhesion potential of UV cross-linked gelatin films in a rat abdominal model." Biomaterials **23**(14): 2901-2908.
- Matsumoto, K., K. Ohnishi, et al. (2000). "Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves." Brain Res **868**(2): 315-328.
- Meade, K. R. and F. H. Silver (1990). "Immunogenicity of collagenous implants." Biomaterials **11**(3): 176-180.
- Medinaceli, L. D., W. J. Freed, et al. (1982). "An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks." Exp Neurol **77**: 634-643.
- Meek, M. F., J. R. Dijkstra, et al. (1999). "Functional assessment of sciatic nerve reconstruction: biodegradable poly (DLLA-e-Cl) nerve guides versus autologous nerve grafts." Microsurgery **19**(381-388).
- Meek, M. F., J. Ijkema-Paassen, et al. (2007). "Functional recovery after transection of the sciatic nerve at an early age: a pilot study in rats." Developmental medicine and child neurology **49**(5): 377-379.
- Meek, M. F., J. F. van der Werff, et al. (2003). "Functional nerve recovery after bridging a 15 mm gap in rat sciatic nerve with a biodegradable nerve guide." Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg **37**(5): 258-265.
- Menzies, D. (1992). "Peritoneal adhesions. Incidence, cause, and prevention." Surgery annual **24 Pt 1**: 27-45.
- Menzies, D. and H. Ellis (1990). "Intestinal obstruction from adhesions--how big is the problem?" Annals of the Royal College of Surgeons of England **72**(1): 60-63.

- Merle, M., A. L. Dellon, et al. (1989). "Complications from silicon-polymer intubulation of nerves." Microsurgery **10**(2): 130-133.
- Mettler, L., A. Audebert, et al. (2004). "A randomized, prospective, controlled, multicenter clinical trial of a sprayable, site-specific adhesion barrier system in patients undergoing myomectomy." Fertility and sterility **82**(2): 398-404.
- Midgley, R. D. and F. M. Woolhouse (1968). "Silicone rubber sheathing as an adjunct to neural anastomosis." Surg Forum **19**: 519-520.
- Millesi, H. (1967). "[Nerve transplantation for reconstruction of peripheral nerves injured by the use of the microsurgical technic]." Minerva Chir **22**(17): 950-951.
- Miloro, M., L. E. Halkias, et al. (2002). "Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **93**(1): 27-34.
- Mirsky, R., K. R. Jessen, et al. (2002). "Schwann cells as regulators of nerve development." J Physiol Paris **96**(1-2): 17-24.
- Mitrev, Z., V. Belostotskii, et al. (2007). "Suture line reinforcement using suction-assisted biogluce application during surgery for acute aortic dissection." Interactive cardiovascular and thoracic surgery **6**(2): 147-149.
- Miligiliche, N. L., Y. Tabata, et al. (1999). "Nerve regeneration through biodegradable gelatin conduits in mice." East Afr Med J **76**(7): 400-406.
- Monk, B. J., M. L. Berman, et al. (1994). "Adhesions after extensive gynecologic surgery: clinical significance, etiology, and prevention." American journal of obstetrics and gynecology **170**(5 Pt 1): 1396-1403.
- Moreira, H., Jr., S. D. Wexner, et al. (2000). "Use of bioresorbable membrane (sodium hyaluronate + carboxymethylcellulose) after controlled bowel injuries in a rabbit model." Diseases of the colon and rectum **43**(2): 182-187.
- Morgan, L. (1995). Schwann cell culture. Neural cell culture. J. Cohen and G. P. Wilkin. Oxford, Oxford University Press: 221-237.
- Mosahebi, A., M. Simon, et al. (2001). "A novel use of alginate hydrogel as schwann cell matrix." Tissue Engineering **7**(5): 525-534.
- Mosahebi, A., M. Wiberg, et al. (2003). "Addition of fibronectin to alginate matrix improves peripheral nerve regeneration in tissue-engineered conduits." Tissue Eng **9**(2): 209-218.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J.Immunol.Meth. **65**: 55-63.
- Motoki, M., Nio, N. (1983). "Crosslinking between different food proteins by transglutaminase." J Food Sci **48**: 561-566.
- Muller, S. A., K. H. Treutner, et al. (2003). "Effect of intraperitoneal antiadhesive fluids in a rat peritonitis model." Archives of surgery **138**(3): 286-290.
- Mumenthaler, C. S., M. (2007). Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome, Thieme Verlag.
- Mumenthaler, M., M. Stöhr, et al. (2003). Läsionen peripherer Nerven und redikuläre Syndrome, Thieme Verlag.
- Nakajima, T., K. Kawazoe, et al. (2005). "Effective use of fibrin glue for acute aortic dissection." The Annals of thoracic surgery **79**(5): 1793-1794.
- Navarro, X., F. J. Rodriguez, et al. (2003). "Engineering an artificial nerve graft for the repair of severe nerve injuries." Med Biol Eng Comput **41**(2): 220-226.

Literatur

- Ngo, T.-T. B., P. J. Waggoner, et al. (2003). "Poly(L-Lactide) microfilaments enhance peripheral nerve regeneration across extended nerve lesions." J Neurosci Res **72**(2): 227-238.
- Nichterwitz, S., N. Hoffmann, et al. (2010). "Bioengineered glial strands for nerve regeneration." Neuroscience letters **484**(2): 118-122.
- Nishimura, M. T., N. Mazzer, et al. (2008). "Mechanical resistance of peripheral nerve repair with biological glue and with conventional suture at different postoperative times." Journal of reconstructive microsurgery **24**(5): 327-332.
- Norris, R. W., M. A. Glasby, et al. (1988). "Peripheral nerve repair in humans using muscle autografts. A new technique." J Bone Joint Surg Br **70**(4): 530-533.
- Novikova, L. N., A. Mosahebi, et al. (2006). "Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation." Journal of biomedical materials research. Part A **77**(2): 242-252.
- Ogden, M. A., F. Y. Feng, et al. (2000). "Safe injection of cultured schwann cells into peripheral nerve allografts." Microsurgery **20**(7): 314-323.
- Ortiguela, M. E., M. B. Wood, et al. (1987). "Anatomy of the sural nerve complex." J Hand Surg [Am] **12**(6): 1119-1123.
- Otani, Y., Y. Tabata, et al. (1998). "Effect of additives on gelation and tissue adhesion of gelatin-poly(L-glutamic acid) mixture." Biomaterials **19**(23): 2167-2173.
- Ozturk, E., A. Yilmazlar, et al. (2010). "The effectiveness of local anesthetics in preventing postoperative adhesions in rat models." Techniques in coloproctology **14**(4): 337-340.
- Pagidas, K. and T. Tulandi (1992). "Effects of Ringer's lactate, Interceed(TC7) and Gore-Tex Surgical Membrane on postsurgical adhesion formation." Fertility and sterility **57**(1): 199-201.
- Paratcha, G., F. Ledda, et al. (2003). "The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands." Cell **113**(7): 867-879.
- Paulo, N. M., M. S. de Brito e Silva, et al. (2009). "Use of chitosan membrane associated with polypropylene mesh to prevent peritoneal adhesion in rats." Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials **91**(1): 221-227.
- Payr, E. (1900). "Beiträge zur Technik der Blutgefäß- und Nervennaht nebst Mitteilung über die Verwendung eines resorbierbaren Metalles in der Chirurgie." Arch Klin Chir **62**: 67-93.
- Pellicano, M., S. Bramante, et al. (2003). "Effectiveness of autocrosslinked hyaluronic acid gel after laparoscopic myomectomy in infertile patients: a prospective, randomized, controlled study." Fertility and sterility **80**(2): 441-444.
- Pereira, J. H., D. D. Palande, et al. (1991). "Denatured autologous muscle graft in leprosy." Lancet **338**(8777): 1239-1240.
- Phillips, J. B., S. C. Bunting, et al. (2005). "Neural Tissue Engineering: A Self-Organizing Collagen Guidance Conduit." Tissue Eng **11**(9-10): 1611-1617.
- Phongasart, G., J. Wertsch, et al. (2002). "Effect of reference electrode position on the compound muscle action potential (CMAP) onset latency." Muscle Nerve **25**: 816-821.
- Pitta, M. C., L. M. Wolford, et al. (2001). "Use of Gore-Tex tubing as a conduit for inferior alveolar and lingual nerve repair: experience with 6 cases." J Oral Maxillofac Surg **59**(5): 493-496; discussion 497.
- Pogrel, M. A., A. R. McDonald, et al. (1998). "Gore-tex tubing as a conduit for repair of lingual and inferior alveolar nerve continuity defects: a preliminary report." J Oral Maxillofac Surg **56**: 319-321.
- Polishuk, W. Z. and B. Bercovici (1971). "Intraperitoneal low molecular dextran in tubal surgery." The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth **78**(8): 724-727.

- Raftery, A. T. (1973). "Regeneration of parietal and visceral peritoneum: an electron microscopical study." Journal of anatomy **115**(Pt 3): 375-392.
- Rajab, T. K., C. W. Wallwiener, et al. (2009). "Adhesion prophylaxis using a copolymer with rationally designed material properties." Surgery **145**(2): 196-201.
- Rajab, T. K., M. Wallwiener, et al. (2010). "A direct comparison of seprafilm, adept, intercoat, and spraygel for adhesion prophylaxis." The Journal of surgical research **161**(2): 246-249.
- Rath, S. and C. J. Green (1991). "Lack of topographical specificity in sensory nerve regeneration through muscle grafts in rats." J Hand Surg [Br] **16**(5): 524-530.
- Rechthand, E. and S. I. Rapoport (1987). "Regulation of the microenvironment of peripheral nerve: role of the blood-nerve barrier." Prog Neurobiol **28**(4): 303-343.
- Reed, K. L., A. B. Fruin, et al. (2002). "Neurokinin-1 receptor and substance P messenger RNA levels increase during intraabdominal adhesion formation." J Surg Res **108**(1): 165-172.
- Reed, K. L., A. B. Fruin, et al. (2004). "A neurokinin 1 receptor antagonist decreases postoperative peritoneal adhesion formation and increases peritoneal fibrinolytic activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(24): 9115-9120.
- Reed, K. L., A. F. Stucchi, et al. (2008). "Pharmacologic inhibition of adhesion formation and peritoneal tissue-type plasminogen activator activity." Seminars in reproductive medicine **26**(4): 331-340.
- Reichel, W., B. Schulze, et al. (2001). "A case of sterile peritonitis associated with icodextrin solution." Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis **21**(4): 414-415.
- Reijnen, M. M., R. P. Bleichrodt, et al. (2003). "Pathophysiology of intra-abdominal adhesion and abscess formation, and the effect of hyaluronan." The British journal of surgery **90**(5): 533-541.
- Ribatti, D., B. Nico, et al. (2006). "The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay." Nat Protoc **1**(1): 85-91.
- Ribeiro-Resende, V. T., B. Koenig, et al. (2009). "Strategies for inducing the formation of bands of Bungner in peripheral nerve regeneration." Biomaterials **30**(29): 5251-5259.
- Risitano, G., G. Cavallaro, et al. (1989). "Autogenous vein and nerve grafts: a comparative study of nerve regeneration in the rat." J Hand Surg [Br] **14**(1): 102-104.
- Risitano, G., G. Cavallaro, et al. (2002). "Clinical results and thoughts on sensory nerve repair by autologous vein graft in emergency hand reconstruction." Chir Main **21**(3): 194-197.
- Riss, T. L. and R. A. Moravec (2004). "Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays." Assay and drug development technologies **2**(1): 51-62.
- Rizzo, V. and D. O. DeFouw (1993). "Macromolecular selectivity of chick chorioallantoic membrane microvessels during normal angiogenesis and endothelial differentiation." Tissue & cell **25**(6): 847-856.
- Rizzo, V., D. Kim, et al. (1995). "Ontogeny of microvascular permeability to macromolecules in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis." Microvascular research **49**(1): 49-63.
- Rochkind, S., L. Astachov, et al. (2004). "Further development of reconstructive and cell tissue-engineering technology for treatment of complete peripheral nerve injury in rats." Neurol Res **26**(2): 161-166.
- Rodriguez, F. J., E. Verdu, et al. (2000). "Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration." Exp Neurol **161**(2): 571-584.

Literatur

- Rosner, B. I., R. A. Siegel, et al. (2003). "Rational design of contact guiding, neurotrophic matrices for peripheral nerve regeneration." Ann Biomed Eng **31**(11): 1383-1401.
- Ryan, C. K. and H. C. Sax (1995). "Evaluation of a carboxymethylcellulose sponge for prevention of postoperative adhesions." American journal of surgery **169**(1): 154-159; discussion 159-160.
- Sakai, S., I. Hashimoto, et al. (2007). "Synthesis of an agarose-gelatin conjugate for use as a tissue engineering scaffold." J Biosci Bioeng **103**(1): 22-26.
- Saravolos, H. G. and T. C. Li (1996). "Physical barriers in adhesion prevention." The Journal of reproductive medicine **41**(1): 42-51.
- Sauter (2004). Der Einfluss von Hyaluronan auf die Synthese von Fibrinolysefaktoren in humanen peritonealen Mesothelzellen. München, Medizinische Poliklinik - Innenstadt Klinikum München, Ludwigs-Maximilian-Universität München. **91**.
- Scherer, S. S., Y. T. Xu, et al. (1995). "Periaxin expression in myelinating Schwann cells: modulation by axon-glial interactions and polarized localization during development." Development **121**(12): 4265-4273.
- Schlosshauer, B., L. Dreesmann, et al. (2007). "Development of pro-angiogenic nerve guide implant." Conference June 13-16, Regenerate - Termis NA. Toronto, Canada.
- Schlosshauer, B., L. Dreesmann, et al. (2006). "Synthetic nerve guide implants in humans: a comprehensive survey." Neurosurgery **59**(4): 740-747; discussion 747-748.
- Schlosshauer, B., E. Muller, et al. (2003). "Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration." Brain Res **963**(1-2): 321-326.
- Schlosshauer, B., H. Stier, et al. (1993). "Graded distribution of the neural 2A10 antigen in the developing chicken retina." Brain Res Dev Brain Res **76**(1): 13-22.
- Schmidt, C. E. and J. B. Leach (2003). "Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration." Annu Rev Biomed Eng **5**: 293-347.
- Seckel, B. R., D. Jones, et al. (1995). "Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat." J Neurosci Res **40**(3): 318-324.
- Seddon, H. J. (1949). "Transplantation of pectoralis major for paralysis of the flexors of the elbow." Proc R Soc Med **42**(10): 837.
- Seilheimer, B., E. Persohn, et al. (1989). "Neural cell adhesion molecule expression is regulated by Schwann cell-neuron interactions in culture." J Cell Biol **108**(5): 1909-1915.
- Sekiba, K. (1992). "Use of Interceed(TC7) absorbable adhesion barrier to reduce postoperative adhesion reformation in infertility and endometriosis surgery. The Obstetrics and Gynecology Adhesion Prevention Committee." Obstetrics and gynecology **79**(4): 518-522.
- Seyednejad, H., M. Imani, et al. (2008). "Topical haemostatic agents." The British journal of surgery **95**(10): 1197-1225.
- Shayani, V., C. Siegert, et al. (2002). "The role of laparoscopic adhesiolysis in the treatment of patients with chronic abdominal pain or recurrent bowel obstruction." JLS : Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons / Society of Laparoendoscopic Surgeons **6**(2): 111-114.
- Shiono, M. (2008). "Surgery for acute aortic dissection using gelatin-resorcin-formalin glue: perspective from 10 years of follow-up at a single center." Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs **11**(1): 19-23.
- Shiono, M., M. Hata, et al. (2006). "Late results of gelatin-resorcin-formalin glue-aided repair in acute type A aortic dissection." Artif Organs **30**(12): 962-965.

- Sinis, N., H.-E. Schaller, et al. (2005). "Nerve regeneration across a 2-cm gap in the rat median nerve using a resorbable nerve conduit filled with Schwann cells." J Neurosurg **103**(6): 1067-1076.
- Sinis, N., H. E. Schaller, et al. (2007). "Long nerve gaps limit the regenerative potential of bioartificial nerve conduits filled with Schwann cells." Restor Neurol Neurosci **25**(2): 131-141.
- Smith, M. E. B., J. A. (1984). Model systems for study of perturbations of myelin metabolism. New York, Plenum Press.
- Sondell, M., G. Lundborg, et al. (1998). "Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction." Brain Res **795**(1-2): 44-54.
- Sporel-Ozokat, R. E., P. M. Edwards, et al. (1991). "A simple method for reducing autotomy in rats after peripheral nerve lesions." Journal of neuroscience methods **36**(2-3): 263-265.
- Spreyer, P., G. Kuhn, et al. (1991). "Axon-regulated expression of a Schwann cell transcript that is homologous to a 'growth arrest-specific' gene." The EMBO journal **10**(12): 3661-3668.
- Stanec, S. and Z. Stanec (1998). "Reconstruction of upper-extremity peripheral-nerve injuries with ePTFE conduits." J Reconstr Microsurg **14**(4): 227-232.
- Stanec, S. and Z. Stanec (1998). "Ulnar nerve reconstruction with an expanded polytetrafluoroethylene conduit." Br J Plast Surg **51**(8): 637-639.
- Steuer, H., R. Fadale, et al. (1999). "Biohybride nerve guide for regeneration: degradable polylactide fibers coated with rat Schwann cells." Neurosci Lett **277**(3): 165-168.
- Stoll, G. and H. W. Muller (1999). "Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights." Brain Pathol **9**(2): 313-325.
- Strauch, B. (2000). "Use of nerve conduits in peripheral nerve repair." Hand Clinics **16**: 123-130.
- Strecker, M., K. Baylor, et al. (2008). "Acute nerve compression and the compound action potential." J Brachial Plexus Peripheral Nerve Injury **3**: 1-9.
- Sullivan (1998). "Adhesion Barriers Present an Emerging Market Opportunity."
- Sunderland, S. (1978). Nerves and nerve injuries. Edinburgh, Churchill-Livingstone.
- Sung, H. W., D. M. Huang, et al. (1999). "Gelatin-derived bioadhesives for closing skin wounds: an in vivo study." J Biomater Sci Polym Ed **10**(7): 751-771.
- Suzuki, S., K. Imoto, et al. (2006). "Aortic root necrosis after surgical treatment using gelatin-resorcinol-formaldehyde (GRF) glue in patients with acute type A aortic dissection." Ann Thorac Cardiovasc Surg **12**(5): 333-340.
- Swank, D. J., W. F. Van Erp, et al. (2003). "A prospective analysis of predictive factors on the results of laparoscopic adhesiolysis in patients with chronic abdominal pain." Surgical laparoscopy, endoscopy & percutaneous techniques **13**(2): 88-94.
- Szomstein, S., E. Lo Menzo, et al. (2006). "Laparoscopic lysis of adhesions." World journal of surgery **30**(4): 535-540.
- Tang, J. B. (1993). "Group fascicular vein grafts with interposition of nerve slices for long ulnar nerve defects: report of three cases." Microsurgery **14**(6): 404-408.
- Tang, J. B. (1995). "Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects." J Reconstr Microsurg **11**(1): 21-26.
- Tang, J. B., Y. Q. Gu, et al. (1993). "Repair of digital nerve defect with autogenous vein graft during flexor tendon surgery in zone 2." J Hand Surg [Br] **18**(4): 449-453.
- Thalhammer, J. G., M. Vladimirova, et al. (1995). "Neurologic evaluation of the rat during sciatic nerve block with lidocaine." Anesthesiology **82**(4): 1013-1025.

Literatur

- Thornton, M. R., C. Mantovani, et al. (2005). "Quantification of N-CAM and N-cadherin expression in axotomized and crushed rat sciatic nerve." Journal of anatomy **206**(1): 69-78.
- Tingstedt, B., K. Isaksson, et al. (2007). "Prevention of abdominal adhesions--present state and what's beyond the horizon?" European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes **39**(5): 259-268.
- Toba, T., T. Nakamura, et al. (2002). "Evaluation of peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap using a polyglycolic acid (PGA)--collagen nerve conduit filled with laminin-soaked collagen sponge in dogs." Int J Artif Organs **25**(3): 230-237.
- Toba, T., T. Nakamura, et al. (2001). "Regeneration of canine peroneal nerve with the use of a polyglycolic acid-collagen tube filled with laminin-soaked collagen sponge: a comparative study of collagen sponge and collagen fibers as filling materials for nerve conduits." J Biomed Mater Res **58**(6): 622-630.
- Tofaris, G. K., P. H. Patterson, et al. (2002). "Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF." J Neurosci **22**(15): 6696-6703.
- Tohyama, K., C. Ide, et al. (1983). "Nearest-neighbor distance of intermediate filaments in axons and Schwann cells. Distinction between axons and schwann cell processes in the denervated and reinnervated peripheral nerves." Acta neuropathologica **60**(3-4): 194-198.
- Uchida, K., H. Urata, et al. (2005). "Seprafilm does not aggravate intraperitoneal septic conditions or evoke systemic inflammatory response." Surgery today **35**(12): 1054-1059.
- Udina, E., F. J. Rodriguez, et al. (2004). "FK506 enhances regeneration of axons across long peripheral nerve gaps repaired with collagen guides seeded with allogeneic Schwann cells." Glia **47**(2): 120-129.
- Valero-Cabre, A. and X. Navarro (2002). "Functional impact of axonal misdirection after peripheral nerve injuries followed by graft or tube repair." J Neurotrauma **19**(11): 1475-1485.
- van der Wal, J. B. and J. Jeekel (2007). "Biology of the peritoneum in normal homeostasis and after surgical trauma." Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland **9 Suppl 2**: 9-13.
- van Meeteren, N. L., J. H. Brakkee, et al. (1997). "Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat." Arch Phys Med Rehabil **78**(1): 70-77.
- Varejao, A. S., A. M. Cabrita, et al. (2003). "Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model." Exp Neurol **183**(2): 695-699.
- Varejao, A. S., A. M. Cabrita, et al. (2004). "Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp." Journal of neurotrauma **21**(11): 1652-1670.
- Varejao, A. S., M. F. Meek, et al. (2001). "Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis." J Neurosci Methods **108**(1): 1-9.
- Varejao, A. S., P. Melo-Pinto, et al. (2004). "Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration." Neurological research **26**(2): 186-194.
- Vasconcelos, B. C. and C. Gay-Escoda (2000). "Facial nerve repair with expanded polytetrafluoroethylene and collagen conduits: an experimental study in the rabbit." J Oral Maxillofac Surg **58**(11): 1257-1262.
- Veis, A. and R. J. Schlueter (1964). "The Macromolecular Organization of Dentine Matrix Collagen. I. Characterization of Dentine Collagen." Biochemistry **3**: 1650-1657.
- Vemer, H. M., W. Boeckx, et al. (1982). "Use of dextrans for the prevention of postoperative peritubal adhesions in rabbits." British journal of obstetrics and gynaecology **89**(6): 473-475.

- Ventura, R., G. Torri, et al. (1980). "Experimental suture of the peripheral nerves with "fibrin glue"." Ital J Orthop Traumatol **6**(3): 407-414.
- Verco, S. J., E. M. Peers, et al. (2000). "Development of a novel glucose polymer solution (icodextrin) for adhesion prevention: pre-clinical studies." Human reproduction **15**(8): 1764-1772.
- Vleggeert-Lankamp, C. L., G. C. de Ruiters, et al. (2007). "Pores in synthetic nerve conduits are beneficial to regeneration." J Biomed Mater Res A **80**(4): 965-982.
- von Oppell, U. O., Z. Karani, et al. (2002). "Dissected aortic sinuses repaired with gelatin-resorcin-formaldehyde (GRF) glue are not stable on follow up." The Journal of heart valve disease **11**(2): 249-257.
- Waller, A. (1850). "Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers." Philos. Trans. R. Soc. London **140**: 423-429.
- Wallwiener, C. W., B. Kraemer, et al. (2010). "The extent of adhesion induction through electrocoagulation and suturing in an experimental rat study." Fertility and sterility **93**(4): 1040-1044.
- Wallwiener, M., S. Brucker, et al. (2006). "Innovative barriers for peritoneal adhesion prevention: liquid or solid? A rat uterine horn model." Fertil Steril **86 Suppl 4**: 1266-1276.
- Walton, R. L., R. E. Brown, et al. (1989). "Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study." Plast Reconstr Surg **84**(6): 944-949; discussion 950-942.
- Wang, D., J. Mo, et al. (2010). "Prevention of postoperative peritoneal adhesions by O-carboxymethyl chitosan in a rat cecal abrasion model." Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale **33**(4): E254-260.
- Wang, Y., L. K. Hung, et al. (1997). "Bridging nerve defects with differently treated muscle grafts: assessment of microsphere technique for measurement of blood flow in rats." Chin Med J (Engl) **110**(10): 774-777.
- Weber, R. A., W. H. Proctor, et al. (1993). "Autotomy and the sciatic functional index." Microsurgery **14**(5): 323-327.
- Weibel, M. A. and G. Majno (1973). "Peritoneal adhesions and their relation to abdominal surgery. A postmortem study." American journal of surgery **126**(3): 345-353.
- Weis, C. and E. K. Odermatt (2007). "A-part gel-an efficient adhesion prevention barrier." Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials **82**(1): 174-182.
- Weis, C. and E. K. Odermatt (2007). "A-part gel-an efficient adhesion prevention barrier." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **82**(1): 174-182.
- Weis, C., E. K. Odermatt, et al. (2004). "Poly(vinyl alcohol) membranes for adhesion prevention." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **70**(2): 191-202.
- Weisel, J. W. (2005). "Fibrinogen and fibrin." Advances in protein chemistry **70**: 247-299.
- Werdin, F., H. Grüssinger, et al. (2009). "An improved electrophysiological method to study peripheral nerve regeneration in rats." Journal of neuroscience methods **182**(1): 71-77.
- Whitworth, I. H., R. A. Brown, et al. (1995). "Orientated mats of fibronectin as a conduit material for use in peripheral nerve repair." J Hand Surg [Br] **20**(4): 429-436.
- Whitworth, I. H., G. Terenghi, et al. (1995). "Targeted delivery of nerve growth factor via fibronectin conduits assists nerve regeneration in control and diabetic rats." Eur J Neurosci **7**(11): 2220-2225.
- Wild, T. A., J. (2006). Manual der Wundheilung. New York, Springer Verlag.

Literatur

- Williams, E. J., J. Furness, et al. (1994). "Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-Cadherin." Neuron **13**: 583-594.
- Williams, L. R., F. M. Longo, et al. (1983). "Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay." J Comp Neurol **218**(4): 460-470.
- Wilson, M. S., D. Menzies, et al. (2002). "Demonstrating the clinical and cost effectiveness of adhesion reduction strategies." Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland **4**(5): 355-360.
- Wiseman, D. M., L. Gottlick-larkowski, et al. (1999). "Effect of different barriers of oxidized regenerated cellulose (ORC) on cecal and sidewall adhesions in the presence and absence of bleeding." Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research **12**(3): 141-146.
- Wiseman, D. M., L. E. Gottlick, et al. (1992). "Effect of thrombin-induced hemostasis on the efficacy of an absorbable adhesion barrier." The Journal of reproductive medicine **37**(9): 766-770.
- Wiseman, D. M., J. R. Trout, et al. (1999). "Metaanalysis of the safety and efficacy of an adhesion barrier (Interceed TC7) in laparotomy." The Journal of reproductive medicine **44**(4): 325-331.
- Witter, K., Z. Tonar, et al. (2010). "Tissue reaction to three different types of tissue glues in an experimental aorta dissection model: a quantitative approach." Histochemistry and cell biology **133**(2): 241-259.
- Woodall, B. and W. Beebe (1956). In peripheral nerve regeneration: A follow-up study of 3656 World War II injuries. Washington DC, US Government Printing Office.
- Wu, S., Y. Suzuki, et al. (2002). "Repair of facial nerve with alginate sponge without suturing: an experimental study in cats." Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery / Nordisk plastikkirurgisk forening [and] Nordisk klubb for handkirurgi **36**(3): 135-140.
- Yannas, I. V. and B. J. Hill (2004). "Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model." Biomaterials **25**(9): 1593-1600.
- Yeo, Y., T. Ito, et al. (2007). "In situ cross-linkable hyaluronan hydrogels containing polymeric nanoparticles for preventing postsurgical adhesions." Ann Surg **245**(5): 819-824.
- Yip, H. K. and K. F. So (2000). "Axonal regeneration of retinal ganglion cells: effect of trophic factors." Progress in retinal and eye research **19**(5): 559-575.
- Yoshii, S. and M. Oka (2001). "Collagen filaments as a scaffold for nerve regeneration." J Biomed Mater Res **56**(3): 400-405.
- Yoshii, S. and M. Oka (2001). "Peripheral nerve regeneration along collagen filaments." Brain Res **888**(1): 158-162.
- Yoshii, S., M. Oka, et al. (2001). "Bridging a peripheral nerve defect using collagen filaments." J Hand Surg [Am] **26**(1): 52-59.
- Yoshitani, M., S. Fukuda, et al. (2007). "Experimental repair of phrenic nerve using a polyglycolic acid and collagen tube." J Thorac Cardiovasc Surg **133**(3): 726-732.
- Yuan, Y., P. Zhang, et al. (2004). "The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro." Biomaterials **25**(18): 4273-4278.
- Yung, C. W., L. Q. Wu, et al. (2007). "Transglutaminase crosslinked gelatin as a tissue engineering scaffold." Journal of biomedical materials research. Part A **83**(4): 1039-1046.
- Zandieh, S., R. Hopf, et al. (2003). "The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials in the rat." Spinal cord **41**(1): 16-22.

- Zawaneh, P. N. and D. Putnam (2008). "Materials in surgery: a review of biomaterials in postsurgical tissue adhesion and seroma prevention." Tissue engineering. Part B, Reviews **14**(4): 377-391.
- Zelano, J., W. Wallquist, et al. (2006). "Expression of nectin-1, nectin-3, N-cadherin, and NCAM in spinal motoneurons after sciatic nerve transection." Experimental neurology **201**(2): 461-469.
- Zellem, R. T., D. W. Miller, et al. (1989). "Experimental peripheral nerve repair: environmental control directed at the cellular level." Microsurgery **10**(4): 290-301.
- Zeng, Q., Z. Yu, et al. (2007). "Efficacy and safety of Seprafilm for preventing postoperative abdominal adhesion: systematic review and meta-analysis." World journal of surgery **31**(11): 2125-2131; discussion 2132.
- Zhang, P., X. He, et al. (2005). "Bridging small-gap peripheral nerve defects using biodegradable chitin conduits with cultured schwann and bone marrow stromal cells in rats." Journal of reconstructive microsurgery **21**(8): 565-571.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die auf unterschiedlichste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Burkhard Schlosshauer, der mir das interessante, innovative Thema zur Bearbeitung zur Verfügung gestellt hat. Er hat mich stets unterstützt, wodurch er zum Erfolg dieser Arbeit und zu meiner persönlichen Entwicklung wesentlich beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Hanspeter Mallot danke ich für die Bereitschaft, meine Doktorarbeit zu begutachten.

Für die Finanzierung meiner Doktorarbeit, sowie die stets hervorragende Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Gelatineimplantate möchte ich mich bei Dr. Steffen Oesser, Heike Sych und Uwe Ahrweiler von der GELITA AG bedanken.

Der erfolgreiche Abschluss meiner Doktorarbeit wäre ohne die Unterstützung meiner Kollegen aus der Abteilung Regenerative Medizin I nicht möglich gewesen. Deshalb danke ich allen voran Elke Rist, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat beistand und mich auch in meinen schwersten Stunden immer unterstützte und aufbaute. Ohne sie wäre auch die Durchführung der zahlreichen *in vivo* Versuche nicht möglich gewesen.

Bei Dr. Hanna Hartmann, Dr. Ursula Mittnacht, Dr. Yvonne Baumer, Elvira Bublitz-Zaha, Reiner Hajosch, André Lehmann, Susanne Nichterwitz, Jochen Penzialek, Beate Scholz, Stefanie Vollmer, Nadine Hoffmann, Liane Schuster, Martina Baur und Peter Neckel möchte ich mich für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, die tolle Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Schließlich möchte ich dem ganzen NMI mit allen Mitarbeitern für die schöne Zeit während der Erstellung dieser Arbeit danken. Die Zeit am NMI wird mir nicht nur wegen der stets kompetenten fachlichen Unterstützung, sondern auch wegen des hervorragenden Betriebsklimas immer in sehr guter Erinnerung bleiben.

Das größte Dankeschön geht an meine Familie, meinen Lebenspartner und meine Freunde, die mich während dieser Doktorarbeit zu jeder Zeit auch in den schweren Phasen unterstützt haben und mir immer Rückhalt gaben!

Veröffentlichungen

Während dieser Arbeit wurden folgende Veröffentlichungen angefertigt:

Publikationen

1. R Hajosch, **L Grupp**, S Nichterwitz, B Schlosshauer: *A novel microsurgical nerve implantation technique preserving outer nerve layers*. Journal of Neuroscience Methods, 2010. Jun 15; 189 (2): 205-9.

Kongressbeiträge

Poster

1. R Hajosch, L Dreesmann, **L Grupp**, M Ahlers, B Schlosshauer: *Biodegradable nerve guide conduit with angiogenetic potential*. 3rd Congress on Regenerative Biology and Medicine (Biostar) October 9-11, 2008 Stuttgart, Germany. → Poster Prize for excellent presentation.
2. R Hajosch, L Dreesmann, **L Grupp**, M Ahlers, B Schlosshauer: *Biocompatible nerve guide conduit with the potential to induce angiogenesis in vivo*. ICNF-Symposium – Regeneration and reorganization in the injured nervous system March 6-7, 2009 Frankfurt, Germany.
3. *R Hajosch, **L Grupp**, S Nichterwitz, B Schlosshauer*: *A gelatin-based adhesionbarrier prevents adhesion in an improved rat sidewall abrasion model*. 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine (Biostar) October 13-15, 2010 Stuttgart, Germany.
4. **L Grupp**, *E Tetling, B Schlosshauer*: *New Nerve implantation Method preserving the epineural tube* 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine (Biostar) October 13-15, 2010 Stuttgart, Germany.

Orale Präsentationen

1. **L Grupp:** *Zellinteraktionen in Nervenimplantaten.* Doktorandenseminar NMI, Januar 2009, Reutlingen, Germany.
2. **L Grupp:** *Biologische Analyse eines enzymvernetzten Gewebeklebers zur Fixierung von Nervenleitschienen.* Doktorandenseminar NMI, Juni 2009, Reutlingen, Germany.
3. **L Grupp, R Hajosch, L Dreesmann, M Ahlers, B Schlosshauer.** Biocompatible gelatin-based adhesive to immobilize nerve implants. DGBM (Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien) - Kongress October 8-10, 2009 Tübingen, Germany.
→ Abstract veröffentlicht in Biomaterialien, 10. Jahrgang, Heft 3/4, Oktober 2009.
4. **L Grupp, R Hajosch, L Dreesmann, M Ahlers, B Schlosshauer.** Gelatin-based Tissue glue. WCRM-Kongress – World Congress on regenerative medicine, October 29-31, 2009 Leipzig, Germany.
→ Abstract veröffentlicht in einem Supplement von Regenerative Medicine, 2009. Nov, 4(6), (Suppl. 2): S92.
5. **L Grupp:** *Analyse eines enzymvernetzten Gewebeklebers.* Doktorandenseminar NMI, Januar 2010, Reutlingen, Germany.
6. **L Grupp:** *Weiterentwickeltes Tiermodell zur Testung von Adhäsionsbarrieren.* Doktorandenseminar NMI, Juli 2010, Reutlingen, Germany.
7. **L Grupp:** *Weiterentwickeltes Tiermodell zur Testung von Adhäsionsbarrieren.* Doktorandenseminar NMI, Januar 2011, Reutlingen, Germany.
8. **L Grupp:** *Abdominale Adhäsionen: Still a sticky subject?* Institutsseminar NMI, Mai 2011, Reutlingen, Germany.