

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Ehemalige Klinik und Poliklinik für Kinder- und Neugeborenenchirurgie  
-Direktor: Em. Univ.-Prof. Dr. G. H. Willital

Anale Inkontinenz als Folge angeborener Enddarmfehlbildungen: Experimentelle  
Untersuchungen zur Substitution des Musculus sphincter ani internus durch Tissue  
Engineering

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Feddermann, Nina  
aus Münster  
2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms  
Universität Münster

Dekan: Univ.- Prof. Dr. V. Arolt

1. Berichterstatter: Em. Univ.- Prof. Dr. G. H. Willital

2. Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. E.-J. Speckmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Ehemalige Klinik und Poliklinik für Kinder- und Neugeborenenchirurgie  
Direktor: Em. Univ.-Prof. Dr. G. H. Willital  
Referent: Em. Univ.-Prof. Dr. G. H. Willital  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. E.-J. Speckmann

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Anale Inkontinenz als Folge angeborener Enddarmfehlbildungen-  
Experimentelle Untersuchungen zur Substitution des Musculus sphincter ani  
internus durch Tissue Engineering  
Nina Feddermann

Die Analatresie stellt eine schwerwiegende Missbildung des Enddarmabschnittes mit Muskeldefiziten dar. Als Hauptproblem wird die anale Inkontinenz gesehen, die zumeist durch eine nur rudimentär angelegte Schließmuskulatur verursacht wird. Bisher gibt es für die Schließmuskulatur kein bioartifizielles Implantat, das klinisch Anwendung findet. Auf dieser Wissensgrundlage entstand die Idee einer fortführenden Therapie mittels der Kultivierung eines glattmuskulären Gewebeverbandes zur Unterstützung des insuffizienten oder nur rudimentär angelegten glattmuskulären Musculus sphincter ani internus (IAS).

Über die Funktionalität der glatten Muskelzellen des Intestinaltraktes auf zellulärer Ebene ist wenig bekannt. Mit Ausnahme eines Beitrages von Hecker et al. wurde bis dato in der Literatur kein Eintrag zur Kultivierung von funktionellen, glatten Muskelzellen des IAS gefunden. Diese leisten jedoch mit 80 % den Hauptanteil für die Kontinenz. Daher wurden nach den Prinzipien des Tissue Engineerings in einem Grosstiermodell des Hausschweins glatte Muskelzellen aus dem IAS gewonnen, in vitro kultiviert, auf drei unterschiedliche Trägermaterialien überbracht und wieder reimplantiert. (Genehmigungsbescheid vom 26.04.2002, Az.: 50.0835.1.0 (G18/2002)). Mittels Übersichtsfärbungen wurden die Zellen in vitro im Hinblick auf Morphologie und Proliferationsverhalten untersucht. Die in vivo Untersuchungen legten den Schwerpunkt auf die Vaskularisation und Integration der Implantate ins native Gewebe. Die immunhistochemische Charakterisierung mittels  $\alpha$ -SM-Aktin erfolgte zur Untersuchung des Differenzierungsgrades. Das optische Registrierverfahren diente der Erprobung eines neuen Verfahrens: Mittels der Registrierung von Fluoreszenzänderungen konnten Membranpotentialänderungen, elektromechanische Kopplung und die Vitalität der Zellen nachgewiesen werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2007

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die anale Inkontinenz als Folge der Analtresie .....	1
1.1.1	Die anale Inkontinenz .....	1
1.1.2	Kontinenzfaktoren .....	3
1.1.3	Das Sphinktersystem .....	5
1.1.4	Anorektale Fehlbildungen.....	5
1.1.5	Konservative Behandlungsmethoden der Inkontinenz .....	8
1.1.6	Eine Auswahl an kontinenzverbessernden Operationstechniken .....	10
1.2	Tissue Engineering.....	13
1.2.1	Definition .....	13
1.2.2	Geschichtlicher Rückblick .....	13
1.2.3	Aktueller Stand der Forschung.....	14
1.2.4	Anforderungsprofil an das durch Tissue Engineering generierte Gewebe.....	16
1.3	Zielsetzungen der Arbeit .....	18
<b>2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1	Gewebe-Gewinnung.....	20
2.1.1	Vorbereitungen.....	20
2.1.2	Gewinnung des Gewebes aus dem M. spincter ani internus (IAS) .....	21
2.2	Zellkultur.....	22
2.2.1	Verwertung des explantierten Gewebes zur Kultivierung .....	22
2.2.2	Zellkultivierung .....	22
2.2.3	Transfer der gezüchteten, vitalen Zellen auf die Trägersubstanz	23
2.3	Zellkultur auf der Trägersubstanz.....	25
2.4	Zellkultur im Gewebe.....	25
2.4.1	Transfer der mit Zellen besiedelten Gewebegerüste ins Gewebe .....	25
2.4.2	Entnahme der Gewebegerüste .....	28
2.5	Histochemie .....	28
2.5.1	Paraffineinbettung .....	28
2.5.2	Hämatoxylin Eosin-Färbung (H. E.-Färbung) nach Mayer.....	29
2.5.3	Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner .....	31
2.5.4	Azan-Färbung nach Heidenhain.....	32
2.5.5	Immunhistologische Färbung .....	33
2.6	Elektrophysiologischer Nachweis der reizinduzierten Membranpotentialänderungen .....	35
2.6.1	Muskelzellgewebe im Experiment .....	35
2.6.2	Versuchskammer und Badlösungen.....	37

---

2.6.3	Optisches Registrierverfahren.....	38
2.6.4	Versuchsanordnung .....	40
2.6.5	Auswertung .....	41
2.6.6.	Elektrophysiologisches Registrierverfahren und elektrische Stimulation .....	42
<b>3</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>43</b>
3.1	Verwendete Tiere .....	43
3.2	Trägermaterialien .....	43
3.2.1	Tutomesh <sup>®</sup> -H-Gewebegerüst .....	43
3.2.2	Surgisis <sup>®</sup> -Weichgewebetransplantat .....	44
3.2.3	Ethisorb <sup>®</sup> Dura Patch .....	45
3.2.4	Übersicht: Trägermaterialien .....	46
3.3	Geräte und Computerprogramme .....	47
3.4	Glas- und Kunststoffwaren .....	48
3.5	Laborartikel .....	51
3.6	Fadenmaterial und Kleber .....	52
3.7	Zellkulturmedien und sonstige Reagenzien.....	52
3.8	Färbungen.....	53
3.9	Antikörper und Antikörperzusätze .....	54
3.10	Antibiotika und Anästhetika .....	55
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>
4.1	In vitro Untersuchungen .....	56
4.1.1	Zellkultur.....	56
4.1.2	Tutomesh <sup>®</sup> -H.....	59
4.1.3	Surgisis <sup>®</sup> Weichgewebetransplantat.....	64
4.1.4	Ethisorb <sup>®</sup> -Dura Patch .....	69
4.2	In vivo Untersuchungen.....	76
4.2.1	Tutomesh <sup>®</sup> -H.....	76
4.2.2	Ethisorb <sup>®</sup> Dura Patch .....	81
4.3	Optisches Registrierverfahren.....	88
4.3.1	Fluoreszenzstrahlen .....	90
4.3.2	Säulendiagramm .....	125
4.3.3	Farbliche Darstellung der Reizantworten .....	137

---

<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>147</b>
	5.1 Zellisolationstechnik .....	147
	5.2 Verhalten der Zellen in Kultur .....	147
	5.3 Das optische Registrierverfahren als Vitalitätsnachweis .....	149
	5.3.1 Beurteilung und Vergleich der unterschiedlichen Auswertungsverfahren .....	149
	5.3.2 Fluoreszenzstrahlen und Säulendiagramme .....	150
	5.3.3 Area plot.....	150
	5.4 Beurteilung und Vergleich der drei besiedelten Transplantate .....	151
	5.4.1 Motivation für den Einsatz der gewählten Trägermaterialien .....	151
	5.4.2 In vitro-Untersuchungen: Tutomesh <sup>®</sup> -H, Surgisis <sup>®</sup> und Ethisorb <sup>®</sup> im Vergleich.....	152
	5.4.3 In vivo-Studien .....	154
	5.5 Differenzierungsgrad der kultivierten glatten Muskelzellen .....	157
	5.6 Schlussfolgerungen.....	160
	5.7 Aussagekraft der experimentellen Ergebnisse .....	161
	5.8 Perspektiven des Tissue Engineerings in der Therapie von glattmuskulären Defekten insbesondere der Analtresie .....	162
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>163</b>
<b>7</b>	<b>Literaturhinweise .....</b>	<b>164</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>170</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>172</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>174</b>
<b>11</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>175</b>
<b>12</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>I</b>
<b>13</b>	<b>Genehmigungsbescheid .....</b>	<b>IX</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1. Die anale Inkontinenz als Folge der Analatresie

Die Analatresie stellt eine schwerwiegende Fehlbildung des Enddarmabschnittes dar, die wegen des vorhandenen Ileus der sofortigen chirurgischen Behandlung bedarf. Das Überleben von Neugeborenen mit dieser Missbildung ist heute nicht mehr gefährdet. Ausnahmen stellen weitere assoziierte Fehlbildungen dar (Zusatzinformationen s. Kap. 12, Abb.12-1). Die operative Korrektur der Analatresie ist, in Abhängigkeit des Schweregrades, noch immer eine sehr aufwendige Operation. So wird langfristig bei der Mehrzahl der Kinder neben Obstipation und urologischen Problemen die anale Inkontinenz beobachtet (Willital and Lehmann 2000<sup>1</sup>; Levitt and Pena 2005). Einen Überblick über die Kontinenzergebnisse geben die Abb. 12-2, 12-3, Kap. 12. Diese Folgeerscheinung kann bei den betroffenen Kindern zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität führen und so die Persönlichkeitsentwicklung behindern (Doede, Zenker et al. 2002). Die Fähigkeit der willkürlichen Kontrolle des Stuhlgangs ist ein integraler Bestandteil körperlichen Wohlbefindens (Buchmann, Rechsteiner et al. 1997).

### 1.1.1 Die anale Inkontinenz

#### **Definition**

Unter analer Kontinenz wird die Fähigkeit zur Perzeption, Retention und Ausscheidung von Rektuminhalt verstanden. Dieser Vorgang stellt einen komplexen Mechanismus dar, der von der Integrität des M. sphincter ani externus (EAS), des M. sphincter ani internus (IAS), des M. puborectalis, des M. levator ani, der rektalen Kapazität, der analen Sensitivität und der Stuhlkonsistenz beeinflusst wird (Go and Dunselman 1988; Felt-Bersma, Gort et al. 1991; Hordnes and Bergsjö 1993). Kontinenz ist während der frühen Kindheitsphase zu erlernen. Die anale Inkontinenz ist definiert als „unkontrollierter Stuhl- und Windabgang, dessen Ursache angeboren oder erworben sein kann und zurückzuführen ist auf eine muskuläre oder neuronale Schwäche oder Störung“



(Willital and Lehmann 2000<sup>2</sup>). Der Übergang zwischen Kontinenz und Inkontinenz ist fließend.

### **Häufigkeit und Klassifikation**

In der Bundesrepublik Deutschland gibt es ca. 3,5 Millionen Kinder, Jugendliche und Erwachsene, die an einer analen Inkontinenz leiden (Willital and Lehmann 2000).

Eine Klassifikation der analen Inkontinenz wurde von verschiedenen Autoren vorgeschlagen. Im Folgenden wird die Kontinenzenteilung nach Willital vorgestellt. Willital unterscheidet vier Kontinenzgrade:

- k1 = Kontinent für festen Stuhl oder flüssigen Stuhl und für Darmgase; normales Stuhldranggefühl
- tk2 = Teilkontinent: kontinent für festen Stuhlgang, flüssigen Stuhlgang, inkontinent für Darmgase; gestörtes Stuhldranggefühl
- tk3 = Teilkontinent: kontinent für festen Stuhlgang, inkontinent für flüssigen Stuhlgang und Darmgase; fehlendes Stuhldranggefühl
- ik4 = Inkontinent: inkontinent für festen und flüssigen Stuhlgang und für Darmgase; fehlendes Stuhldranggefühl

### **Abkürzungen**

- k kontinent
- tk teilkontinent
- ik inkontinent
- 1 (numerisch) kontinent
- 2 (numerisch) teilkontinent, Tendenz zur Kontinenz
- 3 (numerisch) teilkontinent, Tendenz zur Inkontinenz
- 4 (numerisch) komplett inkontinent (Willital and Lehmann 2000<sup>3</sup>).

Die Klassifikation erfolgte auf Grund des klinischen Befundes, der Sektor-manometrie, des endoanal Ultraschalls und der Funktionsendoskopie (Zusatzinformationen s. Kap. 12, Abb. 12-4, 12-5).

### **Ursachen**

Die Ursachen der analen Inkontinenz sind nach Willital auf angeborene Störungen, erworbene Veränderungen, iatrogene Schäden aus dem muskulären oder neurologischen Bereich oder auf Störungen aus der Entwicklung des Steißbeins zurückzuführen (Willital and Lehmann 2000<sup>4</sup>):

1. Anorektale Anomalien: suprlevatorisch, intermediär, tief
2. Verletzungen: v. a. Pfählungsverletzungen des Enddarms und Beckenfrakturen
3. Tumore: v. a. sakrokokzygeale Teratome
4. Überfließinkontinenz: v. a. Megarektum, Megasigma
5. Iatrogene Störungen:  
v. a. Muskelrekonstruktion bei anorektalen Fehlbildungen
6. Dickdarmresektion im Rahmen des Morbus Hirschsprung
7. Steißbeinanomalien (Zusatzinformation s. Kap. 12, Abb. 12-6, Abb. 12-7):  
Aplasie/Dysplasie der Steißbeinsegmente 5, 4 und 3 aufwärts
8. Neurologische Ausfälle: Meningozele, Meningomyelozele, Störungen der Entwicklung des Neuralrohres, Ausfall der Sakralsegmente S 3, S 4
9. Vesico-intestinale Fissur: komplexes Fehlbildungssyndrom mit fehlendem Verschluss der Bauchdecke, fehlendem Verschluss der Blase, Fehlmündungen des Enddarms mit Anal- und Rektumatresie, Fehlbildungen des Beckens und Hypo- bzw. Apasie der Beckenbodenmuskulatur
10. Nicht korrekt durchgeführte Sphinktermyotomie (nach Lynn): Verletzung der Puborektalis- und Levatorschlinge, Abszesse, Beckenabszesse, Peritonitis, Anastomoseninsuffizienzen, gastrointestinale Fisteln, Osteomyelitis
11. Verletzungen der Beckenbodenmuskulatur: Pfählungsverletzungen bei Beckenfrakturen und Unfällen (Willital and Lehmann 2000<sup>5</sup>).

Neben der analen Sensorik und der Innervation der einzelnen Muskelemente, über die das anorektale Reflexverhalten gesteuert wird, sind die Muskelstrukturen als Hauptverantwortliche für eine ungestörte Kontinenz zu sehen. Das unzureichende Vorhandensein von Muskelanteilen durch Trauma, Tumor oder fehlende Anlage ruft das Krankheitsbild der Teil- bzw. Inkontinenz hervor.

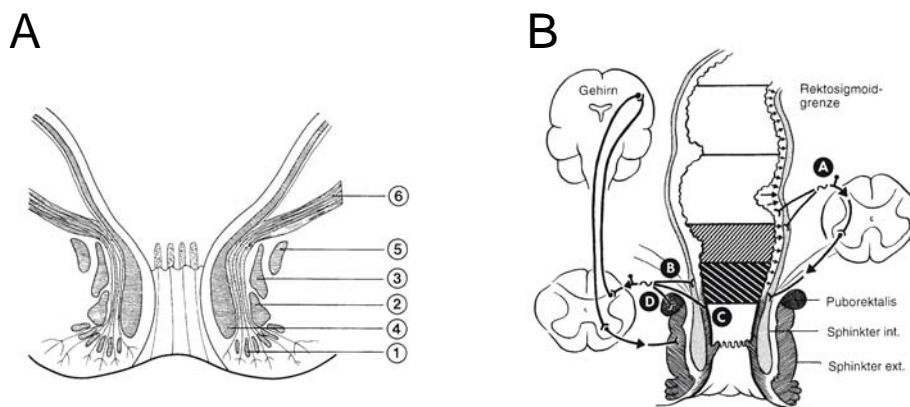
### **1.1.2 Kontinenzfaktoren**

Ein intaktes Kontinenzorgan stellt die Voraussetzung für den sicheren Verschluss des Darmes und für die Steuerung der Defäkation dar. Seine Funktion unterliegt dem Zusammenwirken von neuronalen und sensorischen, glattmuskulären und quergestreiften Elementen (Häring, Berlien et al. 1982; Imhof, Bruch et al. 1989; Lierse, Holschneider et al. 1993). Zur Präzision führte Willital

in diesem Zusammenhang den Begriff Kontinenzfaktoren ein. Bei Kontinenzfaktoren handelt es sich um eine Reihe von morphologischen Einheiten, die erst im Zusammenspiel miteinander das Gesamtbild der Kontinenz ergeben:

1. Muskelemente: M. sphincter ani externus (EAS) mit seinen drei Anteilen: oberflächlich, tief, mittelhoch; M. sphincter ani internus (IAS); M. puborectalis; M. levator ani
2. die anale Sensorik und
3. Dehnungsrezeptoren (Willital and Lehmann 2000<sup>6</sup>).

Die Dehnungsrezeptoren in der Darmwand und in der Puborektalmuskulatur dienen der ungestörten Innervation von Muskelementen und dem damit zusammenhängenden anorektalen Reflexverhalten. Die Muskelemente stellen eine morphologische und physiologische Einheit dar. Die Anteile sind lediglich durch dünne Bindegewebssepten voneinander getrennt. Daher stehen sie bzgl. Kontraktion und Relaxation in einem koordinativen Wechselspiel (Willital and Lehmann 2000<sup>7</sup>). Der Anus ist normalerweise, begründet durch die Dauerkontraktion der Sphinkteren, geschlossen (Fritsch 1996; Benninghoff and Drenckhan 2002).



**Abb. 1-1:** Überblick über die für die Kontinenz (A) wichtigen Muskelemente und (B) ihre Innervation: 1. M. sphincter ani externus oberflächlich, 2. M. sphincter ani externus tief, 3. M. sphincter ani externus mittelhoch, 4. M. sphincter ani internus, 5. M. puborectalis 6. M. levator ani; (A) Reflexbogen zwischen Rektum und M. sphincter internus über das Rückenmark (B) Reflexbogen zwischen Rektum und M. sphincter externus über das ZNS (C) Dehnungsrezeptoren (D) Sensoren im Epithel des Analkanals und in der Puborektalisschlinge. Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000), S. 488

### 1.1.3 Das Sphinktersystem

Das kompliziert gebaute Sphinktersystem umgibt das terminale Rektum und den Analkanal. Es besteht sowohl aus glatten Muskelfasern des viszeralen M. sphincter ani internus (IAS) als auch aus quergestreifter Muskulatur. Während die quergestreiften Muskelfasern von spezialisierten Teilen der Beckenbodenmuskulatur dargestellt werden, handelt es sich bei den glatten Muskelfasern um die Fortsetzung der inneren Ringmuskelschicht des Rektums (Buchmann, Rufli et al. 1994). Der M. levator ani und die äusseren Sphinkteranteile verharren in einer minimalen Kontraktion und werden willkürlich kontrahiert, während der IAS autonom innerviert ist und überwiegend in einer submaximalen Kontraktion verweilt (Buchmann, Rufli et al. 1994). Der passive Ruhedruck des IAS im gesamten Muskelkomplex trägt einen Anteil von 80 % für die Kontinenzkraft (Stelzner 2001; Erkenbrecht 2004).

### 1.1.4 Anorektale Fehlbildungen

#### ***Klassifikation***

Anorektale Fehlbildungen werden als in der frühen Embryonalzeit entstandene Hemmungsmisbildungen im Bereich des embryonalen Enddarms interpretiert (Willital and Lehmann 2000<sup>8</sup>). Sie wurden in den letzten 150 Jahren in viele verschiedene Unterformen eingeteilt, wobei sich die Melbourne Klassifikation der anorektalen Anomalien trotz ihrer Komplexität durchsetzen konnte (1970). Diese Klassifikation orientierte sich nach anatomischen Gegebenheiten in Bezug auf die Höhe der Analatresie, d. h. die topographische Beziehung des Enddarmblindsackes zum M. levator ani bzw. zu der von ihm gebildeten Puborektalisschlinge. Sie differenziert zwischen supralevatorischen und infralevatorischen Atresien und mittelhohen anorektalen Fehlbildungen (Smith 1976). Nach Willital, dessen Einteilung auf der Melbourne Klassifikation aufbaut, stellt die Analatresie einen Oberbegriff für 27 verschiedene Analatresietypen dar. Die Einteilung erfolgt auf Grund morphologischer Gegebenheiten im Hinblick auf die Distanz der Atresie zur äusseren Haut, auf Grund von Fistelverbindung zur Harnblase, Urethra, Vagina und zur äusseren Haut und des damit zusammen-

hängenden Vorhandenseins von M. sphincter ani externus (EAS), M. sphincter ani internus (IAS), M. levator ani und des M. puborectalis (Zusatzinformationen s. Kap. 12 Abb. 12-8, Abb.12-9, Abb. 12-10) (Willital 1976; Willital and Lehmann 2000<sup>9</sup>). Eine weitere Einteilung wurde 1984 in Wingspread, Wisconsin, USA, aufgestellt. Diese differenziert zwischen der hohen, intermediären und der tiefen Analatresie (Gupta 2005). Im Mai 2005 wurde eine neue internationale Einteilung der anorektalen Anomalien in Krickenbeck, Deutschland entwickelt (Gupta 2005). Die genaue Kenntnis des jeweiligen Anomalietyps bildet die Voraussetzung für eine kontinenzgewährleistende Korrektur. Das Vorhandensein des EAS, des IAS, des M. puborectalis und der Levatormuskulatur ist abhängig von der Höhenlokalisierung der anorektalen Missbildung. Während sich bei der tiefen anorektalen Anomalie der IAS zu 75 % normal entwickelt, kann die Rate der vorhandenen Sphinktermuskulatur bei supralevatorischen anorektalen Anomalien erheblich reduziert sein. Da der IAS für die Hauptkontinenz verantwortlich ist, wird folglich die postoperative Inkontinenz entscheidend durch das Ausmaß seiner Präsenz und Funktionalität mitverursacht (Häring, Berlien et al. 1982; Imhof, Bruch et al. 1989; Lierse, Holschneider et al. 1993; Willital and Lehmann 2000).

Analatresietyp (AAT)/ vorhandene Muskel- anteile in Prozent %	Hoch	Mittel	Tief
M. levator ani/ Puborectalissschlinge	84	92	100
M. sphincter ani externus	26	53	96
M. sphincter ani internus	/	21	76

**Tab. 1-2:** Korrelation von Analatresietyp und vorhandenen perirektalen Muskelementen. Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000), S. 433

### **Häufigkeit**

Die statistischen Häufigkeitsangaben bezüglich des Auftretens anorektaler Fehlbildungen sind sehr unterschiedlich. Sie differieren zwischen 1 : 7100 und 1:1700 Lebendgeburten und liegen im Durchschnitt bei 1 : 3500 (Willital and

Lehmann 2000<sup>10</sup>). In 50 bis 60 % der Fälle ist die Analatresie mit Fehlbildungen anderer Organe/Organsysteme kombiniert (Forrester and Merz 2002).

### **Epidemiologie**

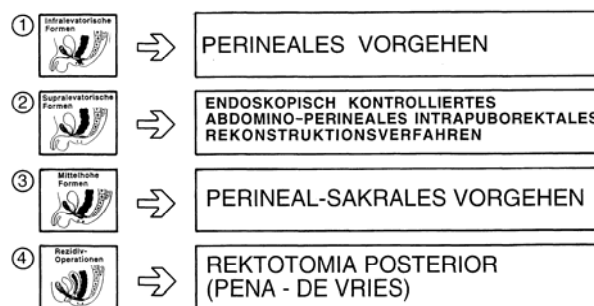
Nach Forrester und Merz, die in einer Studie die Beziehung zwischen Analatresie und ausgewählten demographischen und klinischen Faktoren über einen Beobachtungszeitraum von 14 Jahren untersucht haben, ist das Auftreten der Analatresie assoziiert mit den folgenden Faktoren:

- Alter der Mutter: größte Risikogruppe 25 bis 29 jährige Frauen
- Geschlecht: Jungen (60 %), Mädchen (40 %)
- Geburtsgewicht: < 3000 g
- Schwangerschaftsdauer: < 38 Wochen
- Anzahl der Geburten

Weder eine rassische/ethnische oder geographische Disposition, noch ein ungünstiger Schwangerschaftsverlauf oder die Schwangerschaftsvorsorge konnten als prädisponierende Faktoren festgestellt werden (Forrester and Merz 2002).

### **Gegenwärtige allgemeine Therapiemethoden anorektaler Anomalien**

Einen Überblick über das operative Grundkonzept bei unterschiedlichen Formen von anorektalen Anomalien gibt Abb. 1-4.



**Abb. 1-4:** Überblick über das operative Grundkonzept bei unterschiedlichen Formen von anorektalen Anomalien. Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000), S. 435

Da in Abhängigkeit der Höhe der Analtresie bei einer Vielzahl der Kinder postoperativ eine anale Teil- bzw. Inkontinenz festzustellen ist, wird meist eine konservative Therapie angeschlossen.

### **1.1.5 Konservative Behandlungsmethoden der Inkontinenz**

Zur Verbesserung der Inkontinenz finden die folgenden konservativen postoperativen Therapieverfahren Anwendung:

#### 1. Muskeltraining

- a. Aktives Muskeltraining (Beckenbodengymnastik durch Willkürkontraktion mit einem Trainingstampon, Koordinationstraining)  
(Zusatzinformationen s. Kap. 12, Abb.12-11)
- b. Passives Schließmuskeltraining (Biofeedback-Methode mit Elektromyostimulation)
- c. Kombination von aktivem und passivem Schließmuskeltraining (modifizierte Biofeedbackmethode)
- d. Schließmuskeltraining über einen implantierten Schrittmacher

#### 2. Toilettentraining/Stuhlentleerungstraining

#### 3. Kontinenztampons

Alle drei Behandlungsmethoden verfolgen das Ziel, die zum Teil ungenügend vorhandenen oder neu angelegten Muskelfasern des EAS, des M. puborectalis und des M. levator ani zu kräftigen. Zudem soll der Patient lernen, diese Strukturen in ihrer Funktion zu koordinieren. Als entscheidender Parameter für die korrekte und regelmäßige Anwendung der vom Arzt vorgegebenen Übungsprogramme ist die Mitarbeit und Compliance der betroffenen Kinder und Eltern zu sehen (Tischer and Festge 1984; Bleijenberg and Kuijpers 1987; Enck 1992; Willital and Lehmann 2000<sup>11</sup>; Barnert 2003).

Die Elektromyostimulation verfolgt das Ziel, mit Hilfe von elektrischen Impulsen und gezielt evozierten Muskelkontraktionen die hypotrophe Beckenboden- und Sphinktermuskulatur zu tonisieren und zu kräftigen. Ein implantierbares Schließmuskelreizgerät wird z. B. intraoperativ an der entsprechenden Muskulatur fixiert. Die Elektroden werden aus der Bauchdecke nach außen geleitet, so dass ein Impulsgeber angeschlossen werden kann (z. B. TIC MEDIZINTECH-

NIK GMBH & CO. KG, Bahnhofstr. 40, D-48599 Gronau). Die Impulse können in Dauer, Intensität und Form variiert werden. Eine Alternative besteht in der Anwendung eines externen Reizstromgerätes, das intraanal appliziert wird (Willital and Lehmann 2000).

Die Biofeedback-Methode eignet sich besonders zum Training der perirektalen Muskulatur bei Patienten, bei denen die Kooperationen zu einem aktiven Schließmuskeltraining nicht oder nur partiell gewährleistet ist (Neugeborene, Säuglinge, Kleinkinder) (Enck 1992; Bühlingen 1993; Willital and Lehmann 2000<sup>12</sup>). Bei der modifizierten Biofeedbackmethode wird ein EMG-Meßgerät mit einem Muskelstimulator kombiniert, so dass die Sphinkter- und die Beckenbodenmuskulatur gleichzeitig aktiv und passiv stimuliert werden. Sie beruht auf dem Prinzip der Summation von Impulsen: Eine willkürlich aktive Kontraktion des Schließmuskels durch den Patienten, die über ein EMG registriert wird, stellt die Grundlage für einen elektrischen Impuls des Reizstromgerätes auf die Sphinktermuskulatur dar (passiver Stimulationsreiz). Die Kooperation der Kinder wird bei dieser Methode vorausgesetzt (Herold, Bruch et al. 1989; Kirsch, Shandling et al. 1993; Bühlingen 1994). Ein Alternativverfahren zur Elektrostimulation und zum Biofeedback-Training stellt der implantierte anale Schrittmacher dar, bei dem durch elektrische Impulse die hypoplastische oder nur rudimentär angelegte Beckenbodenmuskulatur stimuliert und tonisiert werden soll. Der Vorteil dieses Gerätes liegt in der Unabhängigkeit vom Alter und von der Compliance des Patienten, denn die Schrittmachersonde ist bereits im Säuglingsalter zum Zeitpunkt der Rekonstruktion der Beckenbodenmuskulatur in die Muskulatur implantierbar (Willital and Lehmann 2000<sup>13</sup>).

Ein weiterer elementarer Faktor zur Verbesserung der Kontinenz stellt die regelmäßige Stuhlentleerung dar, die einerseits willkürlich, andererseits über spezielle Reflexmechanismen im Darm ausgelöst wird. Die Korrelation von unwillkürlicher Darmperistaltik und der Bahnung des Stuhlentleerungsreflexes muss bei Kindern mit Kontinenzstörung trainiert werden. Sie sollten morgens, mittags und abends ein Toilettentraining durchführen, d. h. die Toilette aufsuchen und eine Darmentleerung durch Betätigung der Bauchpresse hervorrufen. Diese Methode führt zu einer tageszeitlich determinierten Intensivierung der Darmperistaltik.



Dies vollzieht sich anfangs willkürlich, später reflektorisch mit Bahnung und Adaption des Stuhlentleerungsreflexes (Willital and Lehmann 2000<sup>14</sup>).

Kontinenztampons dienen der Verhinderung des unwillkürlichen Stuhlabgangs. Sie werden in Abhängigkeit der Darmkonfiguration für den Patienten individuell hergestellt. Sie sind mit Hygienetampons vergleichbar und besitzen ein konzentrisches Entlüftungsröhrchen, um Bauchkrämpfen entgegenzuwirken. Die Kombination mit einer Haftfolie dient der zusätzlichen Fixierung des Tampons an der Analhaut. Kontinenztampons, die mit einem Magnetstreifen ausgestattet sind, befinden sich in klinischer Erprobung. Bei Deformierung durch Stuhl sendet der Magnetstreifen dem Patienten den Defäkationsdrang über ein Infrarotsignal. Eine weitere Möglichkeit zur konservativen Therapie der analen Inkontinenz bietet die Implantation eines künstlichen Enddarmverschlusses (sakrale Sphinkterersatzplastik (SSE) bzw. anale Sphinkterersatzplastik (ASE)). Das Implantat besteht aus zwei Magnetringshälften, die zirkulär um den Darm gelegt werden, wodurch im Darm ein Magnetfeld aufgebaut wird. In den Darm wird ein mit einem Magnetstift ausgestatteter Analtampon eingeführt. Folglich wird der Analtampon sowohl über den Stift als auch über den Magnetring im Darm stabilisiert (Willital and Lehmann 2000<sup>15</sup>).

### **1.1.6 Eine Auswahl an kontinenzverbessernden Operationstechniken**

Wenn nach chirurgischer Rekonstruktion eines fehlgebildeten Sphinkterorgans und nach ausgereiztem Training im Rahmen der konservativen Therapie die Kontinenzergebnisse keine wesentlichen Fortschritte erkennen lassen, dann kann eine weitere chirurgische Maßnahme zur Kontinenzverbesserung indiziert sein: die Muskelerersatzplastik (Meissner and Schenk 1983; Imhof, Bruch et al. 1989). Im Folgenden wird selektiv das Prinzip gegenwärtiger operativer Therapieverfahren erläutert:

1. **Grazilisplastik:** Bei der Grazilisplastik, die ursprünglich von Pickrell et al. beschrieben worden ist (1953), wird der M. gracilis unter Beibehaltung seiner neurovaskulären Versorgung nach perineal transponiert. Der M. gracilis wird unter Schonung der ihn versorgenden Blutgefäße und seines zugehörigen Nervs distal durchtrennt, bevor er subkutan in die Analregion gezogen wird. Dann wird der M. gracilis um das Rektum geschlungen und am kontrala-

teralen Os ischii oder am Periost des Os pubis fixiert (Fritz and Schober 1972; Holschneider and Hecker 1981; Häring, Berlien et al. 1982; Buchmann, Rufli et al. 1994). Die Langzeitergebnisse sind jedoch aufgrund der fehlenden Fähigkeit zur tetanischen Kontraktion und der Ermüdung des quergestreiften Muskels nicht zufrieden stellend (Herold 2002).

2. Prochiantz-Plastik: Bei der Prochiantz-Plastik wird der Neosphinkter durch die bilateralen Anteile des M. gluteus maximus gebildet (Hienzsch 1955; Prochiantz and Gross 1982). Die Transposition gestaltet sich jedoch technisch schwieriger als die des M. gracilis (Baeten, Uludag et al. 2001).
3. Retrorektale Levatorplastik: Bei der Levatorplastik nach Kottmeier-Nixon wird der Hautschnitt als umgekehrt V-förmiger Schnitt über dem Os sacrum durchgeführt. Das Lig. ano-coccygeum wird durchtrennt und der infralevatorische Raum freipräpariert. Dann wird das Os coccygis abgetrennt und der supralevatorische Raum dargestellt. Dadurch wirkt der gesamte Zug des M. pubococcygeus auf das Rektum, woraus eine Akzentuierung des anorektalen Winkels resultiert. Außerdem wird so eine Identifizierung und Darstellung der retrorektal verlaufenden Muskelfasern ermöglicht. Manchmal müssen auch die seitlichen Partien des Darmes frei präpariert werden, weil sich bei einem fehlgeleiteten primären Durchzugsverfahren der Hauptanteil der Muskulatur auf der Vorderseite des Darmes befindet. In diesem Fall ist eine Durchtrennung der von lateral her zur Darstellung kommenden Levatorfasern seitlich des Darmes notwendig. Diese werden im Folgenden markiert und nach lateral weiter freipräpariert, bevor sie retrorektal mit Einzelknopfnähten miteinander verbunden werden. Wenn diese Form der Adaption nicht gelingt, dann wird ein doppelter Faszienstreifen retrorektal zwischen den kontraktiven Elementen der Levatormuskulatur interponiert (Willital and Lehmann 2000<sup>16</sup>).
4. Palmaris longus Plastik: Eine weitere operative Alternative stellt der M. palmaris longus für den Ersatz der Puborektalisschlinge dar. Diese Methode wird v. a. bei Kindern mit Inkontinenz nach Durchzugsoperation wegen einer hohen Analatresie eingesetzt (Buchmann, Rufli et al. 1994).

Oftmals sind diese Formen des Neosphinkters für eine erfolgreiche Kontinenzverbesserung jedoch nicht ausreichend. Der Patient muss postoperativ Trainingsprogramme (wie z. B. Beckenbodengymnastik, Biofeedback und Elektromyostimulation) konsequent durchführen. So lernt er die transponierten Muskelstrukturen zu koordinieren.

Eine Rekonstruktion des Sphinktersystems mit funktioneller Anpassung stellt die dynamische Graziisplastik dar: Ergänzend zur Muskeltransposition wird ein Stimulator subkutan implantiert. Dieser ermöglicht dem Patienten eine Kontrolle von Kontraktion und Relaxation (Willital and Lehmann 2000<sup>17</sup>; Koch and Baeten 2003). Die schnellen, rasch ermüdbaren Typ-2- Muskelfasern transformieren über eine Trainingsphase zu langsamen, ausdauernden Typ-1-Muskelfasern (Herold 2002). Der unversehrte, nicht atrophierte, gut innervierte M. gracilis bildet die Voraussetzung für den Erfolg. Die dynamische Graziisplastik stellt mittlerweile ein etabliertes Verfahren zur Behandlung der therapieresistenten faekalen Inkontinenz dar. Bei 76 % der 200 Patienten, die aufgrund schwerwiegender Inkontinenz nach dieser Methode therapiert wurden, konnten erfolgreiche Ergebnisse erzielt werden (Baeten, Uludag et al. 2001). Jedoch lag die Erfolgsrate der Patienten mit einer Analtresie deutlich unter denjenigen, bei denen die Inkontinenz durch ein Trauma hervorgerufen worden ist (Baeten, Uludag et al. 2001; Koch, Uludag et al. 2004). Insgesamt steht jedoch der Kontinenzrate von 55 % bis 83 % eine relativ hohe Komplikationsrate von bis zu 50 % gegenüber (Herold 2002). Ähnlich dem Prinzip der dynamischen Graziisplastik wurde zwar auch die bilaterale M. gluteus maximus Transposition modifiziert, jedoch konnten keine besseren Ergebnisse als bei der Graziisplastik erzielt werden (Christiansen, Hansen et al. 1995).

Alternativen zu den o. g. Plastiken stellen die Verwendung eines Venenstrips, z. B. V. saphena magna (Imhof, Bruch et al. 1989), bioaktive anale Tampons, z. B. von der Firma Erothitan, Erlangen und der künstliche Enddarmverschluss dar (Willital and Lehmann 2000<sup>18</sup>). Letztere ist dann indiziert, wenn die vorherigen Methoden misslungen sind, oder wenn diese aufgrund eines avitalen, denergierten Muskels nicht einsetzbar sind (Koch and Baeten 2003).

Die Vielzahl der zur Kontinenzoptimierung entwickelten Operationstechniken und die ständigen Modifizierungen der Muskelerersatzplastiken sind ein Beweis dafür, dass bereits weite Fortschritte zur Kontinenzverbesserung erfolgt sind, dass aber eine ideale Operationsmethode bisher noch nicht gefunden werden konnte.

## **1.2. Tissue Engineering**

### **1.2.1 Definition**

Für den Begriff Tissue Engineering (TE) existieren unterschiedliche Definitionen. Die „National Science Foundation“ der USA beschrieb dieses Forschungsgebiet mit den folgenden Worten: TE kombiniert die Prinzipien der Ingenieur- und der Geisteswissenschaften mit der Zell- und Molekularbiologie und mit der Biomaterialforschung. Das Verständnis der Beziehung von Struktur und Funktion in physiologischem und in pathologischem Gewebe dient der Entwicklung von biologischem Ersatz zur 1. Wiederherstellung, 2. Stabilisierung oder 3. zur Verbesserung der Funktion von menschlichem Gewebe (Langer and Vacanti 1993; Fuchs, Nasser et al. 2001; Lalan, Pomerantseva et al. 2001; Vacanti 2003). So stellt die Implantation autologer, in vitro kultivierter Zellen zur Aktivierung der körpereigenen Regenerationsfähigkeit oder zur Unterstützung einer eingeschränkten bzw. aufgehobenen Organfunktion eines der wesentlichen Ziele des TE dar (Stock and Vacanti 2001; Minuth, Strehl et al. 2003<sup>1</sup>) (Lalan, Pomerantseva et al. 2001; Griffith and Naughton 2002).

### **1.2.2 Geschichtlicher Rückblick**

Der Begriff „Tissue Engineering“ ist erst im Jahre 1987 den in Kap 1.2.1 genannten Definitionen in die Medizin eingeführt worden. Die Ursprünge des Gewebe-/Organersatzes reichen jedoch weit zurück, wobei medizinischere Ansätze erst mit dem Beginn der Renaissance eingeläutet wurden.

Bis 1910 hatten sich viele Arbeitsgruppen gebildet, die ihre Forschungsarbeiten in Zell-Kultur Laboratorien aufnahmen, wobei das Rockefeller Institut in New York, gegründet von A. Carrel und M. T. Burrows das bekannteste wurde. A.

Carrel wurde zu Beginn des letzten Jahrhunderts zum Hauptpionier der Organtransplantation gekrönt, da er die Prinzipien der Gefäßanastomosen erklärte (Carrel 1902). Seine Arbeit verfolgte schon damals das Ziel, Gewebe und Organe in vitro lebensfähig zu halten, um sie zu einem späteren Zeitpunkt wieder implantieren zu können (Atala and Lanza 2002<sup>1</sup>). Die erste erfolgreiche menschliche Nierentransplantation wurde im Dezember 1954 unter der Leitung von J. Murray im Bostoner Peter Bent Brigham Hospital durchgeführt (Murray, Merrill et al. 1955; Merrill, Murray et al. 1956; Vacanti 2003). Heute gehören Organtransplantationen zum Standard der medizinischen Versorgung. Im Jahr 2005 wurden nach Auskunft der Deutschen Stiftung für Organspende (DSO) 4377 Organe in Deutschland gespendet ([www.dso.de](http://www.dso.de)).

Weitere Therapiemethoden sind parallel zur Organtransplantation in der Klinik etabliert worden: der Einsatz mechanischer Prothesen als Gelenkersatz, die Dialyse für niereninsuffiziente Patienten und der pharmakologische Ersatz von Produkten fehlenden oder geschädigten Gewebes (z. B. Insulin bei Diabetes mellitus Typ I). Für jedes dieser Verfahren gibt es Optimierungsmöglichkeiten. Bei den Nachteilen der synthetisch hergestellten Implantate handelt es sich z. B. um die fehlende Regenerationsfähigkeit, das Risiko einer periprothetischen Infektion, eine geringe Haltbarkeit und um die Gefahr der Thrombosebildung. Die Organtransplantation weist beispielhaft die folgenden Probleme auf:

1. Mangel an Spendern (Amiel, Yoo et al. 2000; Bücheler 2002; Vogelbach, Pfefferkorn et al. 2004): Im Jahr 2003 warteten 80.000 Patienten in den USA auf ein lebendes Organ (Vacanti 2003).
2. Verschiedene Formen der Transplantatabstoßung (Amiel, Yoo et al. 2000).
3. Lebenslange immunsuppressive Therapie mit den Komplikationen: erhöhte Infektionsgefahr, eingeschränkte Wundheilung, Risiko der Entstehung einer Thrombose, Osteoporose oder die Entstehung maligner Tumore (Amiel, Yoo et al. 2000; Bücheler 2002).

### **1.2.3 Aktueller Stand der Forschung**

Der aktuelle Zweig des autologen Gewebeersatzes wurde im wesentlichen von C. A. und J. P. Vacanti, C. Patrick, A. Mikos, L. McIntire und dem chemischen

Ingenieur R. Langer Mitte der 1980er Jahre begründet. Mit der erfolgreichen Implantation von engineerter Haut gelang den Forschern der internationale Durchbruch (Minuth, Strehl et al. 2003<sup>2</sup>). Bis Dezember 2005 existieren drei fundamentale Ansätze des TE: Der erste Ansatz umfasst die direkte Applikation von isolierten Zellen, z. B. die autologe Stammzell-Transplantation nach Hochdosis-Chemotherapie bei Lymphom-Erkrankung (Herold 2004). Der zweite Versuch beinhaltet die Injektion von Gewebeförderungsfördernden Substanzen wie z. B. die Substitutionstherapie bei Hypophysenvorderlappeninsuffizienz (Herold 2004). Der dritte Ansatz befasst sich mit der Zell-Besiedlung von Trägermaterialien, die zu einem späteren Zeitpunkt wieder implantiert werden. Das implantierte Gewebe kann entweder heterologen, allogenen oder autologen Ursprungs sein (Chaignaud, Langer et al. 1997).

Im April 2003 gelang im Tierversuch erstmalig die Generierung von funktionsfähigem Vaginalgewebe: Vaginale Epithel- und glatte Muskelzellen wurden weiblichen Kaninchen entnommen und kultiviert, auf PGA-Gewebeegerüste gesät und die zellbesiedelten Trägermaterialien bei Nacktmäusen subkutan implantiert (De Filippo, Yoo et al. 2003). Im Juli 2003 stellten J. P. Vacanti et al. in einem Tiermodell einen in vitro hergestellten Magen vor: Der Neomagen wurde aus Gewebeeinheiten des Magenepithels von neugeborenen und erwachsenen Ratten gebildet (Grikscheit, Srinivasan et al. 2003; Maemura, Shin et al. 2003). Im August 2005 erfolgte die erste Veröffentlichung zur Entwicklung eines in vitro hergestellten, drei-dimensionalen physiologischen Modells des IAS. Die isolierten Muskelzellen entstammten Kaninchen (Hecker, Baar et al. 2005).

Trotz der enormen Fortschritte, die sich gegenwärtig im Forschungsgebiet des TE ereignen, wurden in Form von klinischen Studien bisher lediglich die folgenden Gewebe angewandt:

- Engineerte Haut als Ersatz bei Verbrennungen (Gallico, O'Connor et al. 1984; Bücheler 2002; Kramer-Schultheiss and Schultheiss 2002)
- Engineertes Knorpel z. B. als Hilfsmittel bzw. Prothesenersatz bei degenerativen Knorpelveränderungen im Kniegelenk (Brittberg, Lindahl et al. 1994; Bücheler 2002; Vacanti 2003; Galois, Freyria et al. 2005)

- Chondrozyten-Injektionen zur Therapie des vesikourethralen Reflux und der Harninkontinenz (Atala, Cima et al. 1993; Atala, Kim et al. 1994)
- Engineerter Knochen zur Therapie der Osteoporose oder als Ersatz bei Knochtumoren (Vacanti 2003)
- Engineerte Blutgefäße als Ersatz bei Koronarsklerose (Vacanti 2003; Teebken, Wilhelmi et al. 2005; Vara, Salacinski et al. 2005).

Die Generierung von Urothel, der Einsatz von glatten Muskelstrukturen der Hohlorgane und die Kultivierung von Skelettmuskelgewebe befinden sich in den frühen präklinischen Stadien (Bücheler 2002; Vacanti 2003).

#### **1.2.4 Anforderungsprofil an das durch Tissue Engineering generierte glatte Muskelgewebe**

Ein funktioneller, glattmuskulärer Zellverband stellt ein dreidimensionales Gewebe dar, das durch eine antiparallele Anordnung der einzelnen Zellen gekennzeichnet ist. Es besteht aus langgestreckten, spindelförmigen Zellen mit einer Länge von 30 bis 800  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 5 bis 10  $\mu\text{m}$ . Die Zellen enthalten einen kontraktilem Apparat und intrazelluläre Kalziumspeicher. Die Myofilamente Aktin und Myosin sind innerhalb des Zytoplasmas nicht wie bei der quergestreiften Muskulatur regelmäßig angeordnet. Stattdessen sind sie diffus verteilt und weisen keine Querstreifung auf. Glatte Muskelzellen (SMC) sind immer in ein Gewebe oder Organ strukturell und funktionell eingefügt, da sie von keiner extrazellulären Hülle umrandet werden. Im Gegensatz zur hoch differenzierten Skelettmuskulatur verfügen sie durch Hyperplasie oder durch Hypertrophie über die Fähigkeit zur Regeneration (Rohen and Lütjen-Drecoll 2000; Benninghoff and Drenckhan 2002; Junqueira, Carneiro et al. 2002; Illingworth 2003; Minuth, Strehl et al. 2003<sup>3</sup>; Schmidt and Unsieker 2003).

Zur Generierung eines dreidimensionalen Gewebes ist die Kultivierung von Zellen in einer Trägersubstanz notwendig, die eine Entdifferenzierung der isolierten SMC verhindert. Um ein geeignetes Gewebavolumen erreichen zu können, muss die Möglichkeit einer umfassenden in vitro Expansion der Muskelzellen garantiert sein. Darüber hinaus sollte ein möglichst hoher Differenzierungsgrad der kultivierten Muskelzellen beibehalten werden. Dies bedeutet:

1. Entwicklung des kontraktiven Apparates (Aktin, Myosin, Desmin, Vimentin, Quervernetzungszone)
2. Ausbildung intrazellulärer Kalziumspeicher
3. Elektrische Kopplung der Zellen durch Gap junctions
4. Erhalt und Ausbildung des Rezeptorbesatzes: Modulation des Kontraktionsverhaltens und Fortleitung des Aktionspotentials durch Neurotransmitter (Acetylcholin und Noradrenalin).

Aus den folgenden Gründen arbeiten die glatten Muskelzellen besonders ökonomisch:

1. Geringes Myosin-Aktin Verhältnis,
2. geringe ATPase Aktivität und
3. geringe Kontraktionsgeschwindigkeit (Illingworth 2003)

Diese Eigenschaften bestätigen, dass die glatten Muskelzellen des IAS ideal für die Behandlung der analen Inkontinenz, verursacht durch das Krankheitsbild der Analatresie geeignet sind. Sie sollten daher in diesem Bereich den quergestreiften Muskelzellen vorgezogen werden.

**Voraussetzungen: Ein ideales Gewebegerüst**

Das Gewebegerüst dient den Zellen als Transport-System (Chaignaud, Langer et al. 1997). So ermöglicht es die Transplantation einer großen Anzahl von Zellen und/oder biologisch aktiven Faktoren an die gewünschte Stelle im menschlichen Organismus (Kim and Mooney 1998; Terada, Sato et al. 2000). Weltweit werden in Abhängigkeit ihrer Herkunft zwei unterschiedliche Gruppen von Gewebegerüsten verwendet:

1. Natürlich-hergestellte Materialien
  - a. Zelluläre Trägermaterialien: z. B. Kollagen oder Alginat
  - b. Azelluläre Gewebematrizen: z. B. Submukosa
2. Synthetisch hergestellte Polymere wie z. B. Polyglycolsäure (PGA) oder Polylactid (PLA) (Terada, Sato et al. 2000).



Diese Materialien sind in Form von Folien, Membranen oder drei-dimensionalen Faserstrukturen wie Flies bzw. Textilien einsetzbar, um Zellen als Anheftungsunterlage zu dienen (Minuth, Strehl et al. 2003<sup>4</sup>).

Ein optimales Gewebegerüst zur Zellkultivierung ist durch die folgenden Charakteristika gekennzeichnet:

1. Angiogenese (Hodde 2002)
2. Atoxizität (Rudert, Hirschmann et al. 2000; Pariente, Kim et al. 2002)
3. Biokompatibilität (Hodde 2002)
4. Biodegradierbarkeit (Mooney, Cima et al. 1992; Hutmacher, Goh et al. 2001)
5. Mechanische Stabilität (El-Ghannam 2005)
6. Oberflächenbeschaffenheit/Möglichkeit der Verankerung von Zellen an der Trägersubstanz  
(Rudert, Hirschmann et al. 2000; Hutmacher, Goh et al. 2001)
7. Porösität (Folkman and Hochberg 1973; Rudert, Hirschmann et al. 2000; El-Ghannam 2005)
8. Reproduzierbarkeit (Rudert, Hirschmann et al. 2000)

Die Auswahl eines Gewebegerüsts ist primär abhängig von dem Gewebe, das generiert werden soll und dessen Spezialisierung: Bei Bindegewebe z. B. wird das benutzte Gewebegerüst zur Entwicklung von mechanisch belastbaren Strukturen (Knorpel oder Knochen) eingesetzt und soll so der Synthese von extrazellulärem Hartmaterial dienen. Im Gegensatz dazu muss das verwendete Trägermaterial bei Muskelgewebe aus flexiblen Komponenten zusammengesetzt sein, damit sich die neu entstehenden Strukturen kontrahieren können (Minuth, Strehl et al. 2003<sup>5</sup>).

### **1.3. Zielsetzungen der Arbeit**

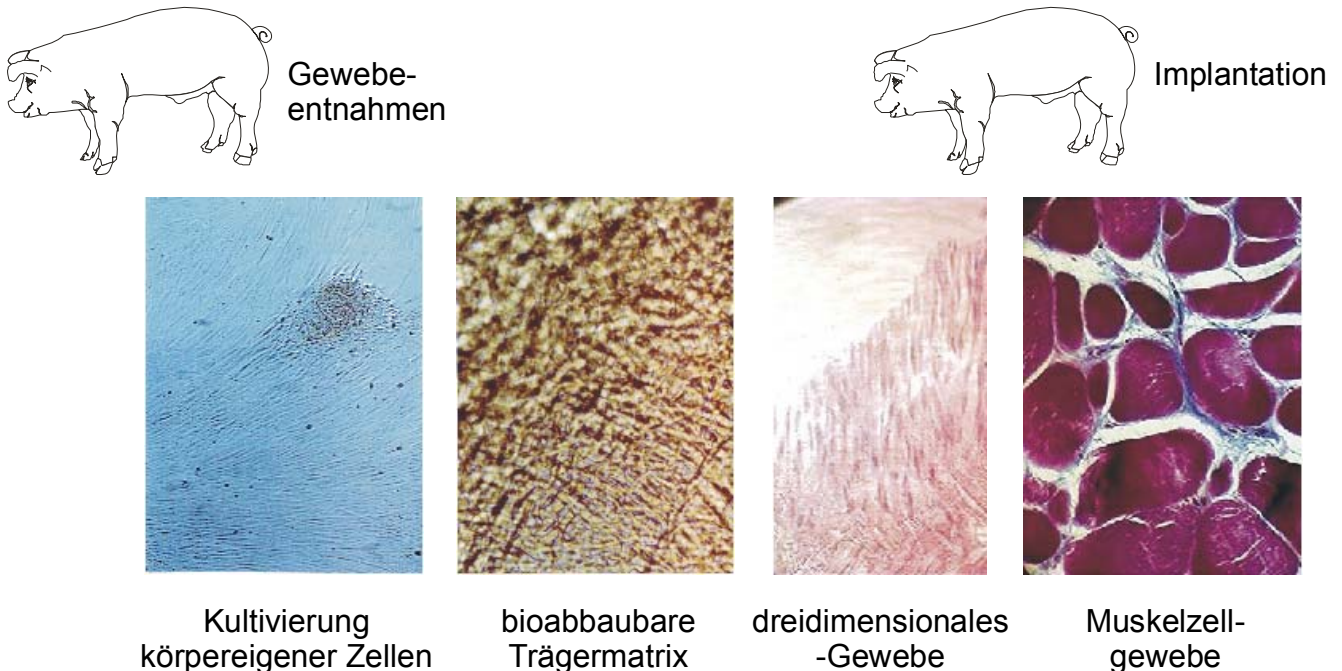
Die Arbeit verfolgt das Ziel, die Grundlagen für die Etablierung einer weiterführenden Therapiemethode zur Behandlung der Analtresie zu legen. Durch die Generierung von dreidimensionalen, autologen, glatten Muskelzelltransplantaten soll Kindern, die z. B. als Folge der Analtresie an Inkontinenz leiden, durch IAS-Ersatz geholfen werden.

Zur Klärung der folgenden Fragestellungen wurden im Tierversuch Muskelzellen aus glattem Muskelgewebe isoliert, in einer Monolayerkultur vermehrt, auf drei unterschiedliche Zell-Transport-Systeme überführt und wieder ins Gewebe des Spenders transplantiert.

- Die Arbeit beobachtet und vergleicht das Wachstumsverhalten der gewonnenen Muskelzellen in Kultur und auf drei unterschiedlichen Trägermaterialien in Hinblick auf Proliferation, Differenzierung und Adhäsion.
- Ein weiterer Gegenstand der Arbeit ist die Erprobung einer neuen Methodik bzgl. des Nachweises der Vitalität und Funktionalität von in vitro generierten Zellen auf elektrophysiologischem Weg: Das optische Registrierverfahren wurde bisher erfolgreich beim Hippocampus und beim Neokortex der Ratte und des Meerschweinchens angewandt (Köhling, Höhling et al. 2002; Köhling, Reinel et al. 2002; Köhling, Straub et al. 2002; Köhling and Speckmann 2003; Redecker, Hagemann et al. 2005).
- Nach der Implantation werden die besiedelten Trägermaterialien im Hinblick auf Vaskularisierung und Integration in das Gewebe des Empfängers untersucht. Als Vergleich dienen die nativen Trägermaterialien.

## 2 Methoden

### 2.1 Gewebe-Gewinnung



**Abb. 2-1:** Zielvorstellung des Tissue Engineerings zur körpereigenen Muskelzellimplantation: Eine Gewebeprobe wird dem Patienten entnommen, die Zellen werden isoliert, in vitro kultiviert und auf eine biokompatible bioabbaubare Trägermatrix gesät. Nach Erlangung einer dreidimensionalen Struktur werden die Gewebekonstrukte demselben Patienten wieder implantiert.

#### 2.1.1 Vorbereitungen

Die Prämedikation der Tiere (Genehmigung nach § 8 des Tierschutzgesetzes, Genehmigungsbescheid vom 26.04.2002-Az: 50.0835.1.0 (G 18/2002)) erfolgte durch intramuskuläre Injektion einer Kombination, bestehend aus 8 ml Keta-<sup>®</sup>nest, 2 ml Atropin und 4 ml Stressnil<sup>®</sup>. Nach ca. 10 Min waren die Tiere bei vorhandener Spontanatmung auf Berührungsreize weitgehend unempfindlich. In diesem Zustand konnten sie gewogen und auf den Operationstisch in linker Seitenlage positioniert werden. Die Schweine wurden an allen vier Extremitäten fixiert. Zur intraoperativen Überwachung wurden drei EKG-Elektroden befestigt. Das Anästhetikum Etomidate<sup>®</sup> wurde über einen venösen Zugang am rechten Ohr appliziert. Die Dosis wurde dem jeweiligen Gewicht des Tieres individuell

angeglichen (vgl. Tab. 2.2). So waren die Tiere schmerzunempfindlich bei gewährleisteter Spontanatmung.

Tier	Gewogenes Gewicht [kg]	Etomidate <sup>®</sup> [ml]	EKG
TE 1	40	10	Unauffällig
TE 2	43	10	Unauffällig
TE 3	30,5	5	Unauffällig
TE 4	32,5	3	Unauffällig
TE 5	40	8	Unauffällig
TE 6	34	5	Unauffällig
TE 7	36	7	Unauffällig
TE 8	37	7	Unauffällig
TE 9	31	5	Unauffällig
TE 10	39	9	Unauffällig

**Abb. 2-2:** Narkose der Tiere TE 1 bis TE 10

### 2.1.2 Gewinnung des Gewebes aus dem M. sphincter ani internus (IAS)

Nach gründlicher Hautdesinfektion im Analbereich mit Cutasept<sup>®</sup> wurde der IAS mittels intraanaler Ultraschalluntersuchung mit einer rotierenden Ultraschallsonde der Firma Bruel & Kjaer (7,5 MHz) dargestellt. Dadurch konnte die Schichtdicke der perirektalen Muskulatur gemessen werden. Dann wurde die Haut perirektal inzidiert (3 bis 9 h Steinschnittlage). Unter gründlicher Blutstillung wurde bis zum (IAS) vorpräpariert. Der weißlich schimmernde IAS wurde dargestellt und ein Stück der Kantenlänge 10 mm x 10 mm steril mit einem Skalpell entnommen. Dieses wurde direkt in ein mit 5 ml Kulturmedium gefüllten Röhrchen untergebracht und unter Eis innerhalb 45 Min ins Labor transportiert. Der zweite Teil der Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen der Sicherheitsbank (Lamina flow bench).

Die Hautnaht mit Prolene<sup>®</sup> 3/0 wurde in Einzelknopftechnik readaptiert und abschließend die genähte Wunde mit Fibrinkleber bestrichen. Direkt nach der Operation, 3 Tage nach der Gewebeentnahme und vor der Rückgabe zum Züchter (6 Tage nach der Operation), erhielten die Tiere eine Antibiotika-

Prophylaxe mit je 3 ml Tardomycel<sup>®</sup> i. m. Die Operationen verliefen bei allen Tieren komplikationslos. Die Wundverhältnisse und der Allgemeinzustand der Tiere wurden täglich kontrolliert. Die Wundverhältnisse erschienen reizlos, sie heilten primär. Der Allgemeinzustand der Tiere ergab keine Auffälligkeiten: Infektionen oder Hämatome traten nicht auf.

## **2.2 Zellkultur**

### **2.2.1 Verwertung des explantierten Gewebes zur Kultivierung**

Alle sterilen Arbeiten erfolgten an einer Sicherheitsbank (Lamina flow bench) mit horizontaler Belüftung. Alle Glaswaren wurden bei 150 °C für 5 h hitzesterilisiert, alle Plastikgefäße bei 121 °C und 1 bar für 30 Min autoklaviert.

Die Isolation der Muskelzellen aus dem Gewebestück erfolgte mittels der Explantatmethode nach Chamley-Campbell et al. (Chamley-Campbell, Campbell et al. 1979). Als erstes wurde jedes gewonnene Muskelgewebestück sorgfältig mit je 0,5 l NaCl und 0,5 l RingerLaktat gespült. Der nächste Schritt bestand in einer Entfernung von vorhandenem Binde- oder Fettgewebe. Im Folgenden wurde das Gewebe mechanisch mit einer Schere bzw. Klinge in einer Gewebekulturschale so lange zerkleinert, bis die Kantenlänge eines Stückes ca. 1 mm x 1 mm betrug. Diese Größe war nach 5 Min erreicht. Dann wurden diese kleinen Gewebestücke in Gewebekulturflaschen ausgestrichen. Die Dichte lag bei ca. 4 Stücke/cm<sup>2</sup>. In diesem Zustand wurden die Gewebestückchen für 10 Min belassen. Während dieser Zeit adhärten sie am Boden der Kulturbehälter, bevor vorsichtig 5 ml, auf 37 °C erwärmtes Kulturmedium hinzupipettiert wurde. Abschließend wurden die Gewebekulturflaschen in einen CO<sub>2</sub>-Inkubationsschrank überführt. Jedem Tier standen somit 4 Kulturen in Gewebekulturflaschen zur Verfügung.

### **2.2.2 Zellkultivierung**

Die Zellen wurden in einem Inkubator, der sie fortlaufend mit 5 % CO<sub>2</sub> begast hat, bei 37 °C kultiviert. Der Mediumwechsel fand dreimal wöchentlich statt. Nach 19 Tagen hatten die Zellen einen mit dem Phasen-Kontrastmikroskop

deutlich erkennbaren 60 bis 70 % konfluenten Monolayer gebildet. So wurden sie zum ersten Mal in neue Gefäße überführt.

Das Zellmaterial der 4 Flaschen eines Tieres wurde auf 8 Kulturflaschen passagiert: Zu Beginn erfolgte das Absaugen des Restmediums. Dann wurden die Zellen zweimal mit je 4 ml PBS (Phosphat buffered saline, Phosphatpuffer) 1 und dann 3 Min gewaschen. Das PBS diente der Entfernung von verbliebenen Resten an Nährmedium, die die Trypsinwirkung beeinträchtigen könnten. Ein Nebeneffekt äußerte sich in einer leichten Lockerung der adhärenen Zellen. Durch das Hinzufügen von ca. 2 ml auf 37 °C vorgewärmtes Trypsin in PBS (Konz. 0,25 %) wurden die adhärenen Zellen proteolytisch gelöst. Dieser Mechanismus wurde durch Klopfen der geschlossenen Gewebekulturflaschen auf dem Handrücken mechanisch unterstützt und nach 3 Min unter dem Lichtmikroskop sichergestellt, dass sich fast alle Zellen gelöst hatten. Nun folgte das mehrmalige Aufwirbeln der Suspensionen mit dem Pipettor, bevor sie in ein mit 2 ml Nährlösung gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt wurden. Der FCS-Anteil (fötale Kälberserum) des Nährmediums stoppte die Trypsinwirkung. Anschließend wurden die Röhrchen bei 4000 Um/Min für 5 Min zentrifugiert und danach der Überstand entfernt. Das übrig gebliebene Pellet wurde mit 4 ml Nährmedium resuspendiert. In einer Kulturflasche wurde 0,5 ml Nährmedium incl. Zellen auf 5 ml Nährmedium aufgefüllt. Da sich in dem Röhrchen noch ein Zellrest befand, wurde dieser mit Nährlösung in eine Gewebekulturflasche überführt. Am Ende der ersten Passage ergaben sich von jedem Tier 8 Kulturflaschen mit Muskelzellen. Nach 24 h wurden die Zellen erneut mikroskopisch in Bezug auf ihre mitotische Aktivität begutachtet. Darauf fand der Mediumwechsel an jedem 2. Tag statt, bis nach 33 Tagen ein konfluenten Monolayer am Boden lichtmikroskopisch zu beobachten war. Dies bedeutete, dass die Zellen nun bereit waren, auf die entsprechenden Gewebegerüste gesät zu werden.

### **2.2.3 Transfer der gezüchteten, vitalen Zellen auf die Trägersubstanz**

Die Übertragung der Muskelzellen auf das Gewebegerüst diente der Generierung einer dreidimensionalen Gewebekultur. Es wurden die in Kapitel 3.2 beschriebenen Trägermaterialien benutzt:

1. Tutomesh<sup>®</sup>-H-Gewebegerüst

2. Surgisis®-Weichgewebetransplantat

3. Ethisorb® Dura Patch

Die Gewebegerüste wurden unter sterilen Bedingungen auf eine Kantenlänge von 10 mm x 10 mm und 5 mm x 5 mm zurechtgeschnitten. Die Wahl von zwei unterschiedlichen Größen, die unter denselben Bedingungen kultiviert und mit dem gleichen Zellmaterial besät wurden, fand aus dem folgenden Grund statt: Das größere Trägermaterial diente der späteren Implantation, während das kleinere histologisch verarbeitet wurde. Im Folgenden wurden also je zwei unterschiedliche Größen des gleichen Gewebegerüst-Materials auf dem Boden einer Kulturschale befestigt.

Die natürlichen azellulären Gewebegerüste Tutomesh®-H und Surgisis® mussten vor ihrer Anwendung mindestens 5 Min in steriler NaCl-Lösung rehydriert werden. Hingegen konnte der synthetische Polymer Ethisorb® Dura Patch trocken benutzt werden. Vorversuche hatten ergeben, dass die Gewebegerüste dazu neigen, an der Oberfläche zu schwimmen, wodurch die Zelladhäsion verhindert wird. Um dieses Problem zu lösen, stellte sich als erfolgreichste Methode die Befestigung der Trägermaterialien mit einem Fibrinkleber heraus. Dieser wird in der Klinik zur Gewebeklebung, zur Nahtsicherung und zur Blutstillung eingesetzt. Er wird in vivo im Rahmen der Fibrinolyse auf physiologischem Weg abgebaut (vgl. Beipackzettel). Pro Gewebegerüst wurde nur eine sehr geringe Menge des Fibrinklebers benutzt.

Die Fibrinlösung wurde mit einer Spritze in zwei ca. 10 mm x 10 mm und 5 mm x 5 mm langen, parallelen Streifen auf den Boden der Kulturschale aufgetragen, so dass die Striche ca. 10 mm voneinander entfernt lagen. Direkt im Anschluss wurde eine geringe Menge Thrombin-Lösung hinzugefügt, um die Entfaltung der Klebewirkung zu induzieren. Danach wurden die Gewebegerüste vorsichtig mit einer Pinzette auf die parallelen Streifen des Fibrin-Thrombin-Komplex gedrückt. Dabei galt zu beachten, dass die Gewebegerüste ihre Form behalten.

Als Nächstes konnten die Matrizen mit Zellen besiedelt werden. Da die Öffnungen der Gewebekulturflaschen für die Trägermaterialien zu klein waren, wurden für das weitere Vorgehen die Gewebekulturschalen benutzt. Für eine Kulturschale bzw. für zwei Gewebegerüste wurde das Zellmaterial aus zwei bis drei

Kulturflaschen verwendet, zuvor aber das Nährmedium abgesaugt und der Monolayer passagiert (vgl. Kap. 2.2.2). Jedoch wurden die mit Zellen besiedelten Kulturschalen nur leicht mechanisch bewegt. Die Lösung der Zellen konnte lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Die jeweils 1 ml Zellsuspension einer Schale wurde analog Kap. 2.2.2 in ein mit 2 ml Serum enthaltendes Nährmedium überführt und für 5 Min bei 4000 Um/Min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das so entstandene Pellet mit 3 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und auf die 3 ausgewählten Matrizen gleichmäßig pipettiert (1 ml pro Kulturschale). Zu jeder Kulturschale wurden 9 ml Nährlösung ergänzt. Daraus resultierte, dass am Ende jedes der 3 unterschiedlichen Trägermaterialien mit Zellmaterial von jedem der 10 Tiere versorgt worden war. Somit ergaben sich insgesamt 30 Kulturschalen. Als Negativkontrolle wurden alle 3 Gewebegerüste nativ mit dem o. g. Fibrinkleber auf dem Boden je einer Kulturschale befestigt und mit 10 ml Nährmedium bedeckt. So sollte der Unterschied zwischen dem Verhalten von bewachsenen und nativen Gewebegerüsten in vitro und in vivo untermauert werden.

### **2.3 Zellkultur auf der Trägersubstanz**

Zur weiteren Kultivierung wurden alle Kulturschalen in den CO<sub>2</sub>-Inkubationsschrank gestellt. In der Lichtmikroskopie waren die Matrizen von Cook und Tutogen aufgrund ihrer Festigkeit nur beschränkt beurteilbar. Lediglich auf dem Transplantat der Firma Ethicon war Zellwachstum sichtbar. Nach 23 Tagen wurden die besiedelten Transplantate ins Gewebe implantiert.

Weitere Zellkulturen, die sich in den Gewebekulturflaschen befanden, wurden ebenfalls passagiert, vgl. Kap. 2.2.2. Die Zellen dienten dem optischen Registrierverfahren, vgl. Kap. 2.6.

### **2.4 Zellkultur im Gewebe**

#### **2.4.1 Transfer der mit Zellen besiedelten Gewebegerüste ins Gewebe**

Aufgrund des begrenzten Platzangebotes im Analbereich des Schweines war es nicht möglich, alle besiedelten Gewebegerüste zu implantieren. Die Surgisis<sup>®</sup>-Transplantate der Firma Cook schieden aus. Die Trägermaterialien Tuto-



mesh<sup>®</sup> und Ethisorb<sup>®</sup> wurden in 10 Tiere implantiert. So wurden die Konstrukte, die lichtmikroskopisch das erfolgreichste Wachstum im Randbereich bzw. im Inneren verzeichneten, zur Implantation ausgewählt. Diese wurden einzeln in Kulturröhrchen, die zuvor mit 10 ml Nährmedium gefüllt worden waren, überführt und so pro Tier 6 Matrizen jedes Typs implantiert. Die Implantation der nativen Gewebegerüste erfolgte heterotop unterhalb der Bauchdecke.

Die Prämedikation, Lagerung und Anästhesie erfolgten analog der in Kap. 2.1.2 beschriebenen Operationen. Aufgrund des höheren Gewichtes der Tiere wurde eine grössere Menge an Narkose benötigt (s. Abb. 2-3).

Tier	Gewogenes Gewicht [kg]	Etomidate <sup>®</sup> [ml]	EKG
TE 1	54	17	Unauffällig
TE 2	64	35	Unauffällig
TE 3	50	20	Unauffällig
TE 4	53	16	Unauffällig
TE 5	58	20	Unauffällig
TE 6	56	18	Unauffällig
TE 7	59	20	Unauffällig
TE 8	60	22	Unauffällig
TE 9	54	16	Unauffällig
TE 10	61	27	Unauffällig

**Abb. 2-3:** Narkose der Tiere TE 1 bis TE 10

### ***Perirektale Implantation***

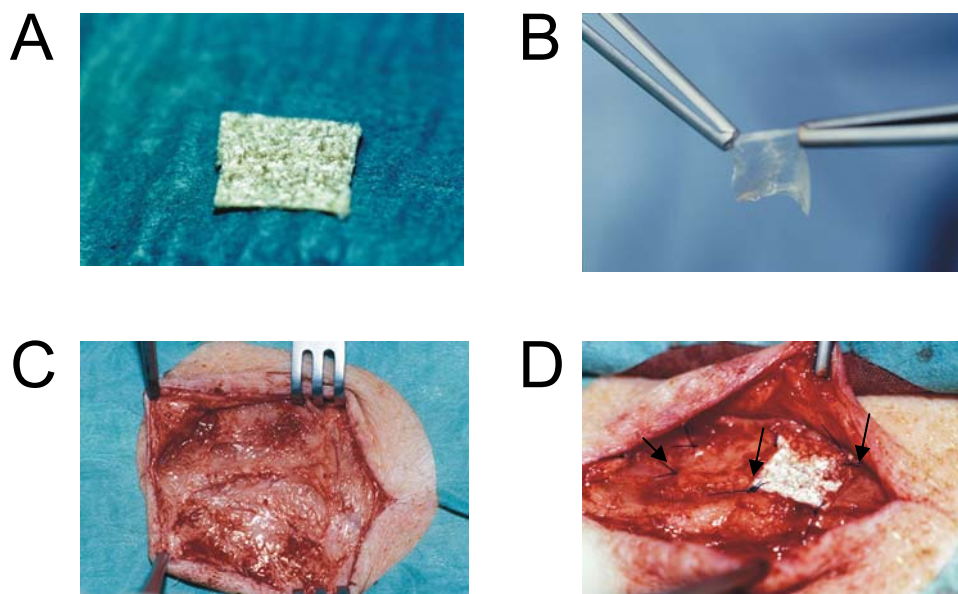
Bei allen 10 Tieren wurde das gleiche Operationsverfahren angewandt. Nach gründlicher Hautdesinfektion im Analbereich mit Cutasept wurde die Haut analog Kap. 2.1.2 inzidiert (retrorektale Schnittführung). Unter gründlicher Blutstillung wurde ohne Öffnung der Bauchhöhle bis zum IAS vorpräpariert. Die Implantation der Gewebegerüste erfolgte episphinktär. Pro Tier wurden vier Gewebegerüste im Analbereich implantiert. Die Matrizen wurden mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene<sup>®</sup> 3/0, EH 7691, Ethicon) fixiert, um eine spätere Widererkennung zu gewährleisten. Die Fadenlängen waren gleich. Die

zweite, kleinere Probe des gleichen Gewebegerüstes wurde jeweils zur histologischen Aufarbeitung in 3,5 % Formalin fixiert und der Paraffineinbettung zugewiesen. Die Hautnaht mit Prolene® 3/0, EH 7691 wurde in Einzelknopftechnik vollzogen. Abschließend wurde die genähte Haut mit Histoacryl®-Kleber zusätzlich gesichert.

Die Antibiotika-Prophylaxe mit 3 ml Tardomycel® erfolgte in gleicher Weise wie in 3.2.1. erläutert. Über einen Zeitraum von 10 Tagen blieben die Tiere zur Beobachtung im Tierstall. Danach kamen sie bis zur Explantation der Gewebegerüste zurück zum Züchter. Während dieser Periode gab es keinen Anhaltspunkt für eine Wundinfektion.

### ***Implantation der nativen Gewebegerüste auf die Linea alba***

Die nativen Gewebegerüste wurden in das Subkutangewebe der Bauchdecke über die Linea alba gelegt und analog Kap. 2.4.1 befestigt.



**Abb. 2-4:** (A) Unbesiedeltes Trägermaterial (Ethisorb®)  
 (B) Besiedeltes Trägermaterial (Ethisorb®)  
 (C) Ort der Implantation: Das Gewebe des Empfängers erscheint reizfrei.  
 (D) Implantation des nativen Gewebegerüstes: Die blauen nicht resorbierbaren Markierungsfäden (→) sind deutlich zu erkennen.

### **2.4.2 Entnahme der Gewebegerüste**

Nach 54 Tagen fand die Entnahme der Transplantate statt. Anästhesie, Prämedikation, Lagerung und Narkose erfolgten analog der in Kap. 2.1.2 beschriebenen Operationen. Da bei allen 10 Tieren das gleiche Operationsverfahren angewandt wurde, kann dies zusammengefasst werden.

Die Narben der Tiere erschienen alle reizlos. Da die Tiere nach der Gewebeentnahme getötet wurden, wurden sie nicht abgedeckt. Die Hautinzision erfolgte wiederum in 3 bis 9 h Steinschnitt. Die Haut wurde vorsichtig abpräpariert. Die nicht-resorbierbaren Fäden der Matrizen dienten der Orientierung. Die Gewebegerüste wurden mit einem Sicherheitsabstand von 3 mm en Block reseziert und auf ein Tuch gelegt. Zur späteren Identifizierung wurde ein Sicherheitsfaden (Prolene<sup>®</sup> 4/0, Ethicon), vom Tier aus betrachtet, kaudal rechts oben befestigt.

Um eine problemlose Paraffineinbettung zu gewährleisten, wurden die Blöcke, die eine Kantenlänge von 16 mm x 16 mm x 16 mm besaßen, geteilt und so zugleich sichergestellt, dass bei den Schnitten mit dem Schlittenmikrotome Transplantat enthalten war. Am Ende wurden die Schweine nach standardisierten Bedingungen mit Kaliumchlorid getötet (T 61<sup>®</sup>).

## **2.5 Histochemie**

### **2.5.1 Paraffineinbettung**

Die Paraffineinbettung erlaubt die Herstellung von Schnitten von 4 µm. Die zu untersuchenden Zellen bzw. Gewebeproben wurden für 2 Tage in dreieinhalb Prozent [V/V] Formalin fixiert. Zur Vorbereitung für die Einbettung in Paraffin wurden die Stücke zunächst in Form geschnitten, in kleine Plastikkassetten gelegt und unter fließendem Leitungswasser für 3 h ausgewaschen. Anschließend wurden die Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe und abschließend in absolutem n-Butyl Alkohol entwässert und schließlich in flüssiges Paraffin überführt (vgl. Tab. 2-5).

Medium	Prozent (%)	Verweildauer (Min)
Alkohol	50	90
Alkohol	60, 70, 96	Je 90
	3 x 99	Je 120
NB		2 x 150
Paraffin		2 x 60
Paraffin		Bis zur Weiterverarbeitung

**Tab. 2-5:** Methodik der Paraffineinbettung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe zur histologischen Untersuchung von implantierten nativen und besiedelten Gewebegerüsten.

Jedes Gewebestück wurde mit einer Wärmepinzette aus dem Paraffin genommen und so auf die Arbeitsfläche gelegt, dass sich der Faden links oben befand. Dann wurde der Gewebeblock mit dem Skalpell so in 3 Stücke mit einer Kantenlänge von 10 mm x 10 mm x 10 mm geschnitten, dass alle 4 Fäden erhalten blieben. Dieses Verfahren garantierte das Vorhandensein von Matrix in der Probe. Nachdem ein Giessförmchen mit flüssigem Paraffin gefüllt worden war, wurden die 3 Gewebestücke einzeln vertikal zur Schnittfläche mit der Wärmepinzette gestellt und vorsichtig festgedrückt. Im Folgenden wurde das Förmchen mit flüssigem Paraffin aufgefüllt und mit der laufenden Nummer gekennzeichnet. So konnten Verwechslungen ausgeschlossen werden. Zum Schluss wurde das Giessförmchen zum Festwerden auf die Kälteplatte gelegt.

Am Ende waren 10 in vivo Proben vorhanden. Um eine Auskristallisierung des Paraffins zu verhindern, wurden die Präparate im Anschluss zum Abkühlen in den Kühlschrank bei 4 °C zum Aushärten gestellt. Am nächsten Tag konnten sie mit dem Schlittenmikrotome geschnitten werden. Anschließend trockneten die 4 µm grossen Schnitte im Trockenschrank.

### 2.5.2 Hämatoxylin Eosin-Färbung (H. E.-Färbung) nach Mayer

Bei der H. E.- Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung. Sie dient der besseren morphologischen Beurteilung: Kerne erscheinen leuchtend blau, Kalk blau und Knorpel dunkelblau, alles Übrige wird in verschiedenen Tonabstufun-

gen rot gefärbt. Zur besseren Übersicht werden die Arbeitsschritte stichpunktartig skizziert.

1. Entparaffinieren in Rotihistol® (Roth)
2. Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.:  
je 5 Min in 98 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %
3. Hämatoxylin nach Mayer für 3 Min
4. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 Min
5. Entfärbung in 0,1 % Eosin
6. Spülen in 50 % Alkohol
7. Aufsteigende Alkoholreihe: 90 %, 96 %, 100 % Ethanol je 2 Min
8. Eindicken in Rotihistol® (Roth)
9. Eindicken in DePex® (Serva) für 5 Min

### ***Hämatoxylin nach Mayer***

Zunächst wurden 5 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua destillata gelöst, 0,2 g Natriumjodat ( $\text{NaJO}_3$ ) und 50 g Kaliumaluminiumsulfat hinzugefügt und ebenfalls gelöst. Als sich die Lösung blau-violett gefärbt hatte, wurden die folgenden zwei Komponenten hinzugefügt: 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalline Zitronensäure. Die Lösung verfärbte sich dabei rot violett. Die Zusammensetzung von Eosin ist in Abb. 2.6 dargestellt.

<b>Stammlösung</b>	500 ml Alkohol 96 % 500 ml Aqua destillata 10 g Eosin gelb (Fluka)
<b>Gebrauchslösung</b>	100 ml Stammlösung 100 ml 50 % Alkohol einige Tropfen Eisessig

**Abb. 2-6:** Darstellung der Stamm- und Gebrauchslösung von Eosin

### 2.5.3 Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner

Die Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner dient der Darstellung von Bindegewebe. Sie färbt kollagene und retikuläre Bindegewebsfasern grün, elastische blassgrün, Kerne bräunlich schwarz, Zytoplasma ziegelrot, Erythrozyten orangegelb und Muskelzellen orangerot.

Färbung:

1. Entparaffinieren bis zum Aqua dest.
2. Kerne anfärben: 2 Min WEIGERT's Hämatoxylin, vgl. Abb. 2-7
3. Spülen: 10 Min fließend wässern
4. 5 Min Säurefuchsin-Ponceau-Lösung, vgl. Abb. 2.8
5. Spülen: 1 % Essigsäure
6. Differenzierung: 30 s in Phosphormolybdänsäure-Orange-Lösung, vgl. Abb. 2-9
7. Spülen: 1 % Essigsäure
8. Gegenfärbung: 5 Min 1 % Lichtgrün (Farbstoff), vgl. Abb. 2-10
9. Auswaschen: 5 Min in 1 % Essigsäure
10. Ethanol (99,9 % ver. mit Petrolether) schwenken
11. analog Punkte 8. und 9. Kap. 2.5.2

WEIGERT's Hämatoxylin:

Stammlösung 1	1 g Hämatoxylin 100 ml 0,96 % Alkohol
Stammlösung 2	1 ml HCl (25 %) 98 ml Aqua destillata 1,16 g Eisen-III-Chlorid
Gebrauchslösung	1 : 2 mischen

**Abb. 2-7:** WEIGERT's Hämatoxylin

Ponceau-Säurefuchsin-Lösung:

Gebrauchslösung	2 g Ponceau de Xylidin 0,1 g Säurefuchsin 0,2 ml Eisessig 300 ml Aqua destillata
-----------------	---

**Abb. 2-8:** Ponceau-Säurefuchsin-Lösung

Phosphormolybdänsäure-Orange-Lösung:

Gebrauchslösung	4 g Phosphormolybdänsäure 2 g Orange G 100 ml Aqua destillata
-----------------	---

**Abb. 2-9:** Phosphormolybdänsäure-Orange-Lösung

Lichtgrün:

Stammlösung	0,2 g Lichtgrün 100 ml Aqua destillata
Gebrauchslösung	kurz vor Gebrauch 0,2 ml Eisessig hinzugeben

**Abb. 2-10:** Lichtgrün

#### 2.5.4 Azan-Färbung nach Heidenhain

Die Azan-Färbung nach Heidenhain dient der Darstellung von Binde- und Stützgewebe. Während kollagenes, retikuläres Bindegewebe scharf blau gefärbt wird, erscheint Muskelgewebe je nach Fixation rötlich bis orange, Kerne, Erythrozyten, Gliafibrillen rot, saure Mukosubstanzen blau und Sekretkörnchen der Drüsenzellen gelb, rot oder blau. Die folgenden Färbeschritte wurden durchgeführt:

1. Entparaffinieren bis zum Aqua dest.
2. Entdifferenzierung in Anilinalkohol für 5 Min
3. Abspülen mit Aqua dest. Für 5 Min
4. Färbung der Zellkerne mit Azokarmin bei 60° C (Heizplatte) für 5 Min
5. Abkühlen: 5 Min

6. Abspülen: Aqua dest.
7. Differenzieren in Anilinalkohol für 5 Min
8. Unterbrechung der Differenzierung: Kurzes Auswaschen des Anilins in essigsauerm Alkohol
9. Spülen: Aqua dest.
10. Beizung des BGW: 45 Min in 5 % wässrige Phosphorwolframsäure
11. Spülen in Aqua dest.
12. 5 Min Anilinblau-Orange-Eisessig
13. Spülen in Aqua dest.
14. analog Punkt 7.-9. Kap. 2.5.2

#### Lösungen:

1. Anilinalkohol: 1 ml Anilinöl in 1000 ml 96 % Alkohol
2. Essigsaurer Alkohol: 10 ml Eisessig in 1000 ml 96 % Alkohol
3. Azokarmin: 0,1 g Azokarmin G in 100 ml Aqua dest. lösen, aufkochen, abkühlen lassen und filtrieren
4. Anilinblau-Orange-Eisessig, vgl. Abb. 2-11
5. 5 % Phosphorwolframsäure in Aqua dest.

Stammlösung	0,5 g Anilinblau 2,0 g Goldorange G 8,0 ml Eisessig 100 ml Aqua destillata
Gebrauchslösung	Stammlösung 1:4 mit Aqua destillata verdünnen

**Abb. 2-11:** Anilinblau-Orange-Eisessig

### 2.5.5 Immunhistologische Färbung

Die Immunhistologie beruht auf dem speziellen Nachweis von Antigenen mit der Hilfe von Antikörpern, die z. B. von spezifischen Zellpopulationen exprimiert werden. Die Verwendung von Antikörpern gegen  $\alpha$ -SM-Aktin diente der lichtmikroskopischen Beurteilung der Quantität und Qualität von Muskelzellgewebe im Regenrat. In der vorliegenden Arbeit wurde der immunhistochemische Nach-



weis durch eine indirekte Färbung mittels der Avidin-Biotin-Methode durchgeführt. Durch den Einsatz von zwei Antikörpern (Primär- und Sekundär-Antikörper) wird die Empfindlichkeit des Nachweises erhöht: Diese Methode stützt sich auf die starke Affinität des Eiweißproteins Avidin für das Vitamin Biotin. Avidin verfügt über vier Bindungsstellen für Biotin. Zur Anwendung des Verfahrens wurden die folgenden drei Reagenzien benötigt:

1. Anti- $\alpha$ -SM-Aktin<sup>®</sup> (= Primärantikörper)
2. Goat Anti-Mouse Immunoglobulin<sup>®</sup> (= biotinylierter Sekundärantikörper)
3. ExtrAvidin<sup>®</sup>-konjugierte Peroxidase  
(= vorgeformter Avidin-Biotin-Enzymkomplex)

Der Primärantikörper (Anti- $\alpha$ -SM-Aktin) ist spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen ( $\alpha$ -SM-Aktin) gerichtet. Der mit Biotin konjugierte Sekundärantikörper (Goat Anti-Mouse Immunoglobulin) kann sich an den Primärantikörper binden. Der Peroxidase-konjugierte-Avidin-Biotin-Komplex (ExtrAvidin<sup>®</sup>-konjugierte Peroxidase) kann sich mit den freien Stellen des Avidinmoleküls an das Biotin des Sekundärantikörpers binden. Zur Sichtbarmachung des Enzyms Peroxidase und damit des gesuchten Antigen diente ein geeignetes Chromogen: AEC = 3-Amino-9-Ethylcarbazole in N,N-Dimethylformamide.

Die in Formalin fixierten und paraffinierten Gewebestücke wurden zunächst mit dem Schlittenmikrotome geschnitten und für 24 h auf den Objektträgern getrocknet.

Bevor die Schnitte deparaffiniert und hydriert wurden, mussten die Proben mit 0,1 % Trypsin für 20 Min angedaut werden. Die Deparaffinierung erfolgte anhand der in Tab. 2-5 aufgezeichneten absteigenden Alkoholreihe. Das Färbeverfahren für den Nachweis von  $\alpha$ -SM-Aktin orientierte sich an den Angaben der Firma Sigma Aldrich, Deutschland. Für alle Spülvorgänge kam PBS zur Anwendung. Zunächst wurde das endogene Peroxide mit 2 Tropfen 3 % Hydrogen-Peroxide für 5 Min entfernt, woraufhin die Objektträger vorsichtig gespült und abgewischt wurden. Als nächstes wurden die Schnitte mit dem Blocking Reagens (Goat Serum) für 10 Min inkubiert und dann das überschüssige Reagens abgewischt. Danach wurden 2 Tropfen des Primärantikörpers oder die negative Kontrolle auf die Proben gegeben und für 60 Min inkubiert. Im An-

schluss wurden die Objektträger wieder gespült und abgewischt. Darauf folgte die Zugabe von je 2 Tropfen des biotinylierten Sekundär-Antikörpers, der für 20 Min inkubiert wurde. Wiederum schloss sich ein Spülen und Abwischen der Objektträger an. Im nächsten Schritt wurden 2 Tropfen des Peroxidase-Reagens hinzugefügt und ebenfalls für 20 Min inkubiert, gespült und abgewischt. Nun wurde das Substrat-Reagens hergestellt. Es bestand aus den folgenden Komponenten:

- 4 ml deionisiertes Wasser
- 2 Tropfen Acetatpuffer
- 1 Tropfen AEC Chromogen und
- 1 Tropfen 3 % Hydrogen Peroxide.

Auf jeden Objektträger wurden 2 Tropfen des Gemisches gebracht und für 10 Min inkubiert. Nach Vergewisserung einer aussagekräftigen Färbung mittels mikroskopischer Kontrolle wurden die Objektträger vorsichtig in deionisiertem Wasser für 5 Min gespült, der Überschuss abgewischt und die Gegenfärbung mit Mayer`s Hämatoxylin durchgeführt. Um das Hämatoxylin zu bläuen, wurden die Objektträger unter laufendem Wasser für 10 Min gespült. Abschließend wurde der gefärbte Schnitt mit einem Tropfen Glycerolgelatine bedeckt und vorsichtig mit einem Deckgläschen verschlossen.

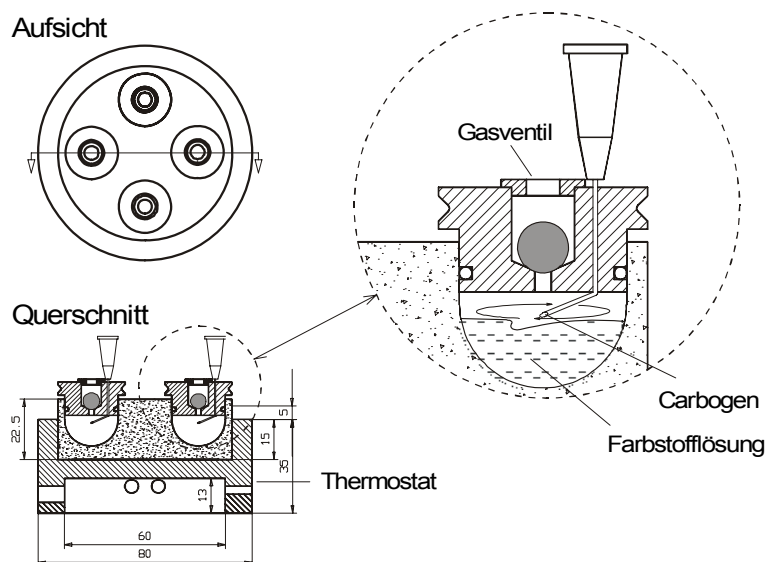
## **2.6 Elektrophysiologischer Nachweis der reizinduzierten Membranpotentialänderung**

### **2.6.1 Muskelzellgewebe im Experiment**

Die technischen Aufbauten zur Färbung der Zellkulturen sowie zur Registrierung der Fluoreszenzänderungen nach elektrischer Einzelreizung wurden vom Institut für Physiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster zur Verfügung gestellt.

Die vorliegende Versuchsreihe wurde mit in der dritten Generation kultivierter glatter Muskelzellen durchgeführt. Die Muskelzellen waren den 10 Hausschweinen aus den IAS entnommen, unter den in Kap. 2.2 erläuterten Bedingungen verarbeitet und in vitro angezüchtet worden. Nach der zweiten Passage wurde

das Zellmaterial auf Deckgläschen (Durchmesser 10 mm), die sich jeweils in einem der 48 Löcher einer Mikrotiter-Platte befanden, pipettiert. Es wurden drei unterschiedliche Dichten verwendet (1, 2, 3 Tropfen), um ein optimales Bewachsen der Deckgläschen zu erreichen. Die Zellen wurden am 1. und 3. Tag gefüttert. Am 4. Tag konnte das Zellmaterial in einer Dunkelkammer in das physiologische Institut transportiert werden. Hier wurde eines der bewachsenen Deckgläschen unter Lupenaufsicht an den Rändern mit zwei Pinzetten festgehalten, um eine Traumatisierung der Zellen zu verhindern und für 60 Min in einer mit Carbogen begasten Inkubationslösung bei einer Temperatur von 28 °C präinkubiert (vgl. Tab. 2-13 Lsg. 1). Nach diesem Vorgang wurden die Zellen in die Färbekammer überführt (vgl. Abb.: 2-12).



**Abb. 2-12:** Schematischer Aufbau der Färbekammer (Speckmann, Köhling et al. 2002)

Dort wurde das Zellmaterial 150 Min mit einem spannungssensitiven Farbstoff aus der Styrylgruppe (RH 795, Molecular Probes/Oregon/USA) gefärbt. Die Färbelösung bestand aus 12,5 µl RH 795 in 0,999 ml Y II-Lösung (vgl. Tab. 2-13, Lsg. Nr. 3). Die Färbung fand unter Lichtausschluss statt, da bei Ausbleichung der Farbstoff toxische Sauerstoffradikale freisetzen würde, die zu einer Schädigung der Muskelzellen führen. Die bewachsene Seite des Deckgläschen zeigte nach oben, um eine Manipulation der Zellen zu vermeiden. Zum

Erreichen von Diffusion und einheitlicher Verteilung des Farbstoffs und des Carbogens wurde der Behälter während des Färbens maschinell mit niedriger Frequenz geschüttelt. Danach wurde das Präparat 10 Min lang in einer mit Carbogen begaster Y II-Lösung ausgewaschen (vgl. Tab. 2-12 Lsg. Nr. 2). Diese Methode verfolgte das Ziel, den nicht-membrangebundenen Anteil des spannungssensitiven Farbstoffes dem Gewebe zu entziehen (Köhling, Reinel et al. 2000; Köhling, Höhling et al. 2002; Gorji, Moddel et al. 2003).

### 2.6.2 Versuchskammer und Badlösungen

Die sich auf dem Deckgläschen befindenden Muskelzellen wurden während der Ableitungen auf den Boden einer Kammer vom Submerge-Typ gelegt. Diese Kammer wurde mit einer kontinuierlichen Perfusionsgeschwindigkeit von 4 ml/Min mit einer Inkubationslösung durchspült (Substanz 2 Tab. 2-13). Das Badvolumen der Versuchskammer betrug 24 ml. So dauerte ein kompletter Austausch der Badlösung 6 Min.

Nr.	Substanz	Komponenten Angaben in mmol/l							
		NaCl	KCl	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	CaCl <sub>2</sub>	Glukose	Farbstoff
1	Präinkubationslösung (YI)	124	4	1,24	1,3	26	1	10	
2	Inkubationslösung (YII)	124	4	1,24	1,3	26	2	10	
3	Inkubationslösung (Y II) + Farbstoff	124	4	1,24	1,3	26	2	10	RH 795 12,5 µg/ml

**Tab. 2-13:** Chemische Komponenten der verwendeten Lösungen (YI: Yamamoto I, YII: Yamamoto II, Yamamoto, 1972, *Molecular Probes/Oregon/USA*)

Ein regelbarer Wärmetauscher diente der Einstellung der Temperatur der Lösung auf 32° C. Der pH-Wert wurde durch die stetige Begasung mit Carbogen auf 7,35 bis 7,45 festgelegt und beide Werte durch kontinuierliche Messungen in der Versuchskammer überprüft (Straub, Kuhnt et al. 2003). Die optische Kon-

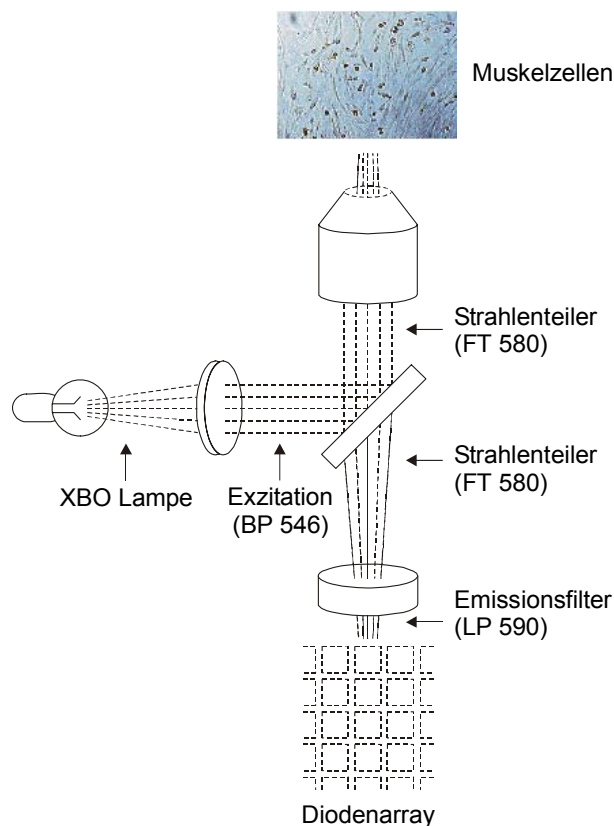
trolle der Zellen wurde durch ein inverses Mikroskop ermöglicht. Zur Dokumentation der Zellverbände mit den Ableitungs- und Reizelektroden wurde eine Digitalkamera verwendet.

### **2.6.3 Optisches Registrierverfahren**

Das optische Registrierverfahren verfolgt das Ziel, die intrazellulären Aktivitätszustände der Muskelzellen wiederzuspiegeln: Hierzu wird die Fluoreszenzänderung eines spannungssensitiven Farbstoffes gemessen. Während der Färbung lagert sich dieser Farbstoff direkt an die äußere Schicht der biologischen Doppelmembran der glatten Muskelzellen an. Änderungen des Membranpotentials der Muskelzellen führen zu einer Verlagerung des Farbmoleküls innerhalb der Zellmembran. Daraus resultiert ein spannungsabhängiges abnehmendes Fluoreszenzsignal. Das optische Registrierverfahren ermöglicht theoretisch eine Beurteilung des Depolarisationszustandes jeder einzelnen Muskelzelle. So können die Spannungsänderungen einer nur kleinen Zellpopulation aufgezeichnet werden (Köhling, Höhling et al. 2002; Hülsmann, Straub et al. 2003). Bei dem hier benutzten spannungsabhängigen Farbstoff führt eine Depolarisation, welche eine Positivierung des Membranpotentials (Erregungszunahme) repräsentiert, zu einer Fluoreszenzabnahme. In der bildlichen Darstellung wird diese Fluoreszenzabnahme einzelner Signale als Deflektion nach unten angezeigt. Die nach jeder Reizung registrierten Fluoreszenzintensitäten sind dargelegt als Fluoreszenzabnahme in Relation zur Restlichtintensität (RLI) vor der jeweiligen Reizung (Hülsmann, Straub et al. 2003). Die Abgrenzung der relativen von den absoluten Werten ist notwendig, da die Zellen aufgrund möglicher struktureller Differenzen inhomogen gefärbt sind. Des Weiteren nimmt im Verlauf des Versuches die RLI der Färbung ab. Daher ist eine mehrmalige Bestimmung der RLI essentiell.

Der Versuchsaufbau zur Registrierung der optischen Signale besteht aus mehreren optischen Filtersystemen und einer Lichtquelle zur Anregung der Muskelzellen. So wurde das Anregungslicht dieser Xenon-Kurzbogenlampe auf die Muskelzellen projiziert, die zuvor mit dem spannungssensitiven Farbstoff gefärbt worden waren. Bevor das Licht auf die Muskelzellen trifft, passiert es zuerst einen Bandpassfilter, der ausschließlich für die Wellenlängen 536 bis 556

nm durchgängig ist. In diesem Bereich wird der Fluoreszenzfarbstoff optimal angeregt. Dann wird dieses Licht am dichromatischen Teilerspiegel, der in einem Winkel von  $45^\circ$  zu der Muskelzellfläche liegt, zu den darüber positionierten Muskelzellen in die Submerge-Kammer reflektiert. Der Teilerspiegel reflektiert das vom Bandpassfilter kommende Licht mit einer Wellenlänge, die unter 580 nm liegt, fast vollständig. Ein Sperrfilter blendet nicht reflektiertes Licht aus. Licht, das über eine höhere Wellenlänge verfügt, wird fast vollständig durchgelassen. So regt das Licht, welches die Muskelzellen erreicht, den in der Zellmembran eingelagerten Farbstoff zur Fluoreszenz an. Das emittierte Fluoreszenzlicht wiederum passiert den dichromatischen Farbteiler in entgegengesetzter Richtung. Das emittierte Licht wird von einem Fotodiodenfeld (-array) aufgenommen. Die Schicht von Photodioden befindet sich unterhalb der Muskelzellen. Bei dieser Methode stehen Fluoreszenz und Membranpotential in fester Beziehung zueinander. Sie ermöglicht die Feststellung der Verteilung von hyperpolarisierten und depolarisierten Muskelzellen im Zellverband (Speckmann, Köhling et al. 2002).

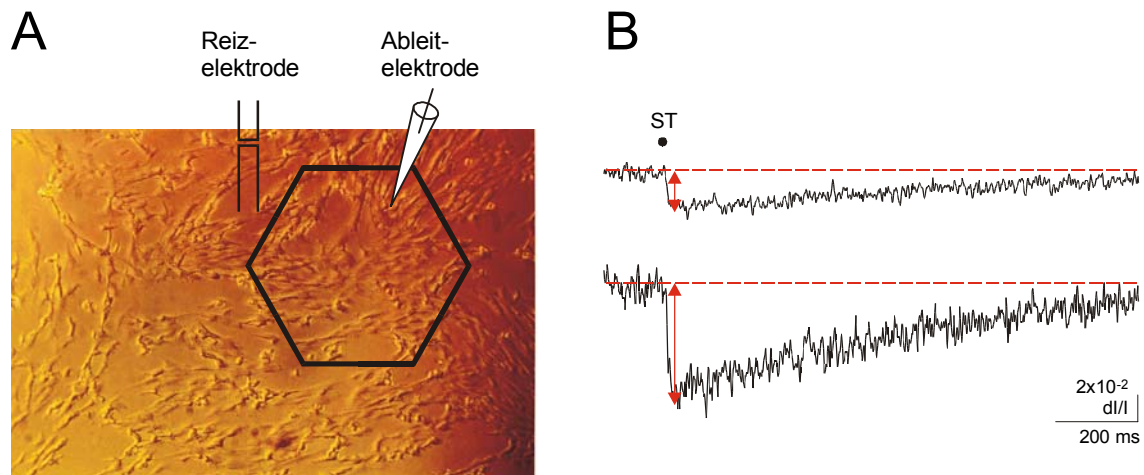


**Abb. 2-13:** Prinzip des optischen Ableitverfahrens (Speckmann, Köhling et al. 2002)

Zur Messung der reizausgelösten Erregungsausbreitung wurden die Einzelreize jeweils in einem zeitlich zugeordneten Belichtungsintervall durchgeführt. Dieses lag bei 1304 ms. Ein zeitlicher Abstand von 3 Min zwischen den einzelnen Reizungen diente dem Abbau von toxischen Radikalen, die durch die Reaktion der Zellen entstanden waren.

#### 2.6.4 Versuchsanordnung

Die Gabelelektrode zur elektrischen Reizung und eine Ableitelektrode wurden vorsichtig oberflächlich auf den Zellrasen positioniert: Die Reizelektrode diente der Zellreizung, während die Ableitelektrode mit dem betrachteten Areal verbunden war. Die Ableitung der optischen Signale wurde über Fotodioden durchgeführt. Das durch dieses Diodenfeld erfasste Zellareal wird durch das Mikroskopobjektiv in seiner Größe bestimmt.



**Abb. 2-14:** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung (A) des hexagonalen Diodenfeldes mit den für die Zellverbände repräsentativen Dioden und (B) den dazugehörigen Originalregistrierungen nach Stimulation.

Das untersuchte Areal wurde durch ein hexagonales Diodenfeld definiert. Dieses sechseckige Areal repräsentierte die optische Signalregistrierung. Es besteht aus 464 Dioden. Im durchgeführten Experiment wurde ein Objektiv verwendet, das eine zwanzigfache Vergrößerung aufwies. Daher umfasste das Hexagon eine Fläche von  $0,483 \text{ mm}^2$ , wobei jede einzelne Diode für eine runde

Fläche mit einem Durchmesser von 0,0364 mm stand. Sie registrierte die muskuläre Aktivität in genau diesem Bereich.

Das so verursachte Signal wurde über die Neuroplex-Software (Red Shirt Imaging, LLC, Fairfield, Connecticut) in Form einer Kurve aufgezeichnet (Abb. 2-14, B) (Köhling and Speckmann 2003). Es wurde mit zehn unterschiedlichen relativen Intensitäten gearbeitet und die Reizantworten der Zellen miteinander verglichen ( $I_{\max}$ ,  $I_{90\%}$ , ...  $I_{10\%}$ ). Ein Teilbereich des Hexagons wurde versuchsübergreifend gekennzeichnet: Die mit grau markierten Dioden wurden einer detaillierten Auswertung zugeführt, vgl. Kap. 4-3.

### **2.6.5 Auswertung**

Zur Beurteilung der optischen Signale wurde eine Ausgleichsgerade durch den Latenzbereich der Kurve gezogen. Dieser repräsentiert definitionsgemäß das Zeitintervall zwischen Stimulus und Beginn der Membranpotentialänderungen (Albowitz, Kuhnt et al. 1998). Es wurde die maximale Amplitude innerhalb der ersten 27 ms von Potentialbeginn gemessen.

Es erfolgte die Abbildung der ermittelten Messwerte in drei unterschiedlichen Darstellungsverfahren. Die Darstellung der Signale in Fluoreszenzstrahlen (vgl. Kap. 4.3.1), Säulendiagrammen (vgl. Kap. 4.3.2) und die räumlich zeitliche Darstellung im „area plot“ (vgl. Kap. 4.3.3) basiert auf der Ausmessung der in Kap. 4.3.1 erklärten Amplituden.

Die Auswertung der optischen Signale mittels der Bildung von Diodenreihen (Fluoreszenzstrahlen) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten wird in Kap. 4.3.1 erläutert. Die Darstellung der Signale im Säulendiagramm basiert auf den Amplitudenmesswerten, die, wie oben beschrieben, ermittelt wurden. Bei der graphischen Darstellung wurde so verfahren, dass die Achsenskalierung der jeweiligen Versuchssituation im Hinblick auf Reizort und Reizintensität angepasst wurde. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde jedoch eine spezifische Konstellation beibehalten. Zur Visualisierung der reizinduzierten Signale in der räumlich-zeitlichen Ausbreitung im Zellverband wurde das Diodenfeld in Falschfarben-Kodierung eingesetzt. Auf dieser Fläche ist die Signalausbreitung mit einer Farbcodierung dargestellt. Als Referenz für die Kodierung diente jeweils die zentrale Diode: Diese Darstellungsweise erlaubt



die Bewertung der räumlichen Ausdehnung des Reizeffektes. Um diese Raumdarstellung mit der Domäne Zeit in übersichtlicher Art zu verbinden, wurden charakteristische Zeitintervalle ausgesucht (Albowitz, Kuhnt et al. 1998; Köhling, Reinel et al. 2000; Köhling, Höhling et al. 2002; Hülsmann, Straub et al. 2003; Senner, Köhling et al. 2003; Straub, Kuhnt et al. 2003).

### **2.6.6 Elektrophysiologisches Registrierverfahren und elektrische Stimulation**

Die Feldpotentiale der Muskelzellen wurden mit einer Glasmikroelektrode gegen eine in der Badlösung befindliche KCl-Ausflusselektrode abgeleitet. Die Herstellung der Pipetten erfolgte mittels eines horizontalen Elektrodenziehgerätes. Dieses bestand aus Filament-Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 0,87 mm. Die Spitzen wurden auf einen Durchmesser von 8 bis 10  $\mu\text{m}$  zurückgebrochen. Nachdem sie mit der Inkubationslösung (Lsg. 2 Tab. 2-13) gefüllt worden waren, betragen die Elektrodenwiderstände zwischen 0,5 und 2 M $\Omega$ . KCl-AgCl-Brücken dienten der Verbindung der Ableitelektroden mit den Feldpotentialverstärkern. Die Ableitelektroden wurden durch Mikromanipulatoren an dem Deckgläschen platziert. Der zur Ableitung verwendete Verstärker wies eine untere Grenzfrequenz von 0,05 Hz zur AC-Registrierung (Wechselspannungsregistrierung) und eine obere von 1 kHz auf. Die Feldpotentiale wurden auf einem Direktschreiber, dessen obere Grenzfrequenz bei 2 Hz lag, registriert und zudem über eine Analog-Digital-Wandlerkarte und einen Computer gespeichert. Zur Aktivierung der Muskelzellen wurden einzelne elektrische Reizimpulse mit einer Intensität von 10  $\mu\text{A}$  (=100 %), 9  $\mu\text{A}$  (=90 %), 5  $\mu\text{A}$  (=50 %) und 1  $\mu\text{A}$  (=10 %) und einer Dauer von 100  $\mu\text{s}$  gesetzt.

## **3. Materialien**

### **3.1 Verwendete Tiere**

Bei den Versuchstieren handelte es sich um zehn weibliche Hausschweine des Züchters P. Rollie, 59302 Oelde (Züchter-Nr. 006340). Die Genehmigung erfolgte nach § 8 des Tierschutzgesetzes. Der Genehmigungsbescheid resultierte am 26.04.2002-Az.: 50.0835.1.0 (G 18/2002). Die Unterbringung und Pflege einschließlich der Betreuung der Tiere und ihre medizinische Versorgung erfolgte unter standardisierten Bedingungen der zentralen tierexperimentellen Einrichtungen des Universitätsklinikums Münster unter der Leitung von Dr. med. vet. M. Lücke, Von Esmarckstr. 56, 48149 Münster, Tel.: 0251/83-56237. Das Ausgangsgewicht der acht Wochen alten Tiere lag zwischen 30,5 und 43 kg. Die Tiere wurden mit den Namen TE 1 bis TE 10 gekennzeichnet.

### **3.2 Trägermaterialien**

Als Gewebegerüste wurden die drei in Kap. 2.2.3 bereits erwähnten unterschiedliche Materialien verwendet:

1. Tutomesh<sup>®</sup>-H der Firma Tutogen
2. Surgisis<sup>®</sup>-Weichgewebetransplantat der Firma Cook Surgisis
3. Ethisorb<sup>®</sup>-Gewebegerüst der Firma Ethicon

#### **3.2.1 Tutomesh<sup>®</sup>-H-Gewebegerüst**

Bei Tutomesh<sup>®</sup>-H von der Firma Tutogen Medical GmbH handelt es sich um ein rein biologisches Implantat, das aus bovinem Perikard gewonnen wird. Die Aufbereitung von Tutomesh<sup>®</sup>-H erfolgt mittels des Tutoplast<sup>®</sup>-Verfahrens. Diese Konservierungsmethode beinhaltet sechs Sicherheitsschritte, welche das Ausgangsgewebe durchläuft, bevor es als hochfeste, natürliche Kollagenmembran in der Klinik eingesetzt wird. Da bei biologischen Materialien immer von einer Kontamination mit Erregern infektiöser Krankheiten ausgegangen werden muss, erfolgen Auswahl und Verarbeitung der Tiere nach strengen Kriterien: Die Herzbeutel gesunder Schlachttiere werden aus regelmäßig tierärztlich überwachten BSE-freien Betrieben verwendet ([www.bse-test.de](http://www.bse-test.de)). Zudem werden durch das o. g. Tutoplast<sup>®</sup>-Verfahren die pathogenen Keime gezielt eliminiert.

Nach Angaben des Herstellers erfüllt das Perikard-Implantat höchste Sicherheitsanforderungen. Tutomesh<sup>®</sup>-H ist ein zertifiziertes Klasse III Medizinprodukt gemäß Klassifizierungsregel 17, Anhang IX, Richtlinie 93/42/EWG. Zudem stellt es ein Bioimplantat in der Hernienchirurgie dar (Klein 1990; Del Vas Cenal 1991; Peiper 2002). Simon et al. berichten von dem Einsatz von Tutopatch<sup>®</sup> beim Verschluss von Omphalozelen (Simon 2001). Der Perikard Patch besitzt die folgenden mechanischen Eigenschaften: Die Reißfestigkeit von Tutopatch<sup>®</sup> beträgt richtungsabhängig 42 N pro 10 mm (vgl. Dura mater 35 N, Faszie längs 135 N). Diese ist ca. um den Faktor 2,6 höher als die maximale Wandspannung der Bauchdecke, um sie zur Ruptur zu bringen (Decurtins and Buchmann 1982). Nach der Implantation nimmt die Reißkraft um bis zu 34 % zu (Decurtins and Buchmann 1982). Die Elastizitätsgrenze von Tutomesh<sup>®</sup>-H liegt bei 32 %, so dass sie sich den physiologischen Dehnungen der Bauchwand anpassen können (vgl. Dura mater 12 %, Faszie längs 12 %). Da Tutomesh<sup>®</sup>-H in vitales Bindegewebe umgebaut wird, bietet es Langzeitstabilität (Grözinger 1981). Die Herstellung von Tutomesh<sup>®</sup>-H erfolgt aus rein biologischem Gewebe (Kollagen). Fremdkörperreaktionen sind daher nahezu ausgeschlossen.

#### **3.2.2 Surgisis<sup>®</sup>-Weichgewebetransplantat**

Bei Surgisis<sup>®</sup> (SIS= small intestinal submucosa) handelt es sich um ein azelluläres Xenograft von der Firma Cook. SIS besteht vorwiegend aus Submukosa, die aus dem Dünndarm von Schweinen gewonnen wird. Das Gewebe wird nach einer patentierten Methode aufbereitet, so dass alle Zellen entfernt werden. Die Kollagenmatrix bleibt dabei unversehrt. Die Dicke beträgt ca 100 µm (Sachs and Gloeckner 1998). Mucosa, Serosa und die Tunica muscularis werden mechanisch abpräpariert (Nuininga, H. et al. 2004). Surgisis<sup>®</sup> besteht neben Kollagen Typ I als Hauptbestandteil aus den folgenden Komponenten: Kollagen Typ III und VI, Wachstumsfaktoren, Glycosaminoglykane (Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat A und B, Heparin und Heparansulfat), Proteoglykane und Glykoproteine (Voytik-Harbin, Brightman et al. 1998; Zhang, Kropp et al. 2000). Surgisis<sup>®</sup> stellt ein chirurgisches Mesh dar, das gegenwärtig für die Implantation zur Verstärkung von Weichteilgewebe verwendet wird. Im Detail handelt es sich um allgemeine Rekonstruktionen von Weichteilgewebe, uro-gynäkologische Eingriffe,

Rekonstruktionen des Beckenbodens, Wundbehandlungen und Reparaturen von Bauchwand- und Inguinalhernien (Badylak 1993; Kropp, Sawyer et al. 1996; Vecchia, Engum et al. 1999; Badylak, Kokini et al. 2002; Franklin, Gonzalez et al. 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SIS die Regeneration von verschiedenen Geweben fördert wie Aorta, V. cava, Herz, Ligament und die Haut (Cheng and Kropp 2000). Bis dato ist keine Abstoßungsreaktion von SIS bekannt (Cheng and Kropp 2000; Corvin, Feil et al. 2004). In einem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass acht bis zwölf Wochen nach der Implantation von Surgisis® kein Anhaltspunkt für das Vorhandensein des originalen Gewebegerüsts mehr vorhanden war (Badylak, Kropp et al. 1998).

### **3.2.3 Ethisorb® Dura Patch**

Das dritte verwendete Gewebegerüst heißt Ethisorb® Dura Patch, ein resorbierbares, alloplastisches Material, das von der Firma Ethicon hergestellt wird. Bei Ethisorb® Dura Patch handelt sich um ein 0,6 x 20 x 30 mm grosses, synthetisch hergestelltes Zweikomponentenvlies, welches aus Vicryl (Polyglactin 910) und Polydioxane (PDS®) besteht. Die Einzelkomponenten verfügen über unterschiedliche Schmelzpunkte (Polyglactin 910: 100° C, Poly-p-Dioxanon: 200° C). Daher kann es thermoplastisch zu einem dreidimensionalen Geflecht verbunden werden. Aufgrund der ebenfalls unterschiedlichen Resorptionszeiten und –wege der beiden Komponenten wird das Transplantat abgestuft resorbiert. Während Vicryl nach 45 bis 60 Tagen durch Hydrolyse im Rahmen des Kohlenhydratstoffwechsels abgebaut wird, erfolgt der Abbau von PDS® durch Hydrolyse zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O nach 80 bis 90 Tagen (Seidl, Todt et al. 2000). Der Ethisorb®-Patch Typ 6 wurde 1992 erstmalig in der Klinik vorgestellt. Ursprünglich wurde es für den Fachbereich der Neurochirurgie zur Defektdeckung von Dura perforationen, -rekonstruktionen und -erweiterungsplastiken nach intraoperativer Duraschrumpfung/-zerreiung entwickelt (Von Wild 1999). Das mechanisch stabile Flies kann mit der Dura vernäht oder mit Fibrinkleber befestigt werden. Klinische und histologische Untersuchungen konnten zeigen, dass keine Adhäsionen mit dem Hirngewebe stattfanden. Das Flies wird komplett resorbiert. Des Weiteren wird Ethisorb® mit Erfolg zur Behandlung der Orbita-Bodenfraktur eingesetzt (Kubler, Neugebauer et al. 2004; Büchel, Rabal et al. 2005).

Außerdem sind Schädelbasisdefekte bis zu einer Kantenlänge von 10 mm x 10 mm erfolgreich mit Ethisorb<sup>®</sup> behandelt worden (Seidl, Todt et al. 2000). PGA (Polyglykolsäure) konnte tierexperimentell auch erfolgreich zur Urethrarekonstruktion eingesetzt werden (Corvin, Feil et al. 2004).

### 3.2.4 Übersicht: Trägermaterialien

#### **Besiedelte Gewebegerüste**

<b>Perikard Patch</b>	
Tutomesh <sup>®</sup> -H Lot No.: K8381 000000010395192 BF-121-01.07.02	Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen, Deutschland <a href="http://www.tutogen.de">www.tutogen.de</a>
<b>Surgisis<sup>®</sup>-Gewebetransplantat (Submukosa)</b>	
Surgisis <sup>®</sup> REF: C-SLH-4S-2X10 LOT: F125309/SB102216 DESC: SURGISIS SOFT-TISSUE GRAFT	Cook, Mönchengladbach, Deutschland <a href="http://www.cooksis.com">www.cooksis.com</a>
<b>Vicryl-Netz</b>	
Ethisorb <sup>®</sup> Product Traceability Label 40x60 mm, EDP46 LOT: QC8DTSBO	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland

**Native Gewebegerüste**

<b>Perikard Patch</b>	
Tutomesch®-H Lot No.: K8381 000000010395319 BF-162-08.07.02	Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen, Deutschland <a href="http://www.tutogen.de">www.tutogen.de</a>
<b>Surgisis®-Gewebetplantat (Submukosa)</b>	
Surgisis® REF: C-SLH-1S-7X10 LOT: F148078/FB205282 DESC: SURGISIS SOFT-TISSUE GRAFT	Cook, Mönchengladbach, Deutschland <a href="http://www.cooksis.com">www.cooksis.com</a>
<b>Vicryl-Netz</b>	
Ethisorb® Product Traceability Label 40x60 mm, EDP46 LOT: QC8DTSBO PGA 910, Type 6 ZVP 614	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland <a href="http://www.ethicon.de">www.ethicon.de</a>

**3.3 Geräte und Computerprogramme**

<b>Autoklav</b>	
Kleinststerilisator	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland
<b>Bunsenbrenner</b>	Gasprofi, Warteweg Labortechnik, Göttingen, Deutschland
<b>CO<sub>2</sub> Begasungsbrutschrank</b>	
CO <sub>2</sub> -Inkubator, Typ 36150	Binder, Labortechnik GmbH, Tuttlingen, Deutschland
<b>Computerprogramme</b>	
NeuroPlex version 2.02 ophthmaging LLC (c1999)	Red Shirt Imaging, LLC, Fairfield, Connecticut, USA
Sigma Plot 8.0	
Corel Draw 8	
<b>Digitalvideokamera Recorder</b>	
Modell: DCR TRV900E	Sony Deutschland GmbH, Köln, Deutschland
<b>Digitalkamera Adapter</b>	
D40 M37/53 x 0,75	Firma Carl Zeiss AG, Geschäftsbereich Göttingen, Deutschland

<b>Digitalkamera Anpassung</b>	
1,0 für MC 80DX	Firma Carl Zeiss AG, Göttingen, D
<b>Färbekammer</b>	Physiologisches Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster, Deutschland
<b>Hämozytometer</b>	
Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm <sup>2</sup>	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
<b>Kälteplatte</b>	FTS Systems, Stone Ridge, NY, USA
<b>Laminar Air Flow Sicherheitsbank</b>	
Hera safe, Typ: HS12 1/PE AC	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
<b>Lichtmikroskop</b>	
Carl Zeiss Axiovert 25	Firma Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland
<b>Parraffin Dispenser</b>	©Lab-Tec Products, Miles Laboratories, North Aurora Rd. Naperville, IL, USA
<b>Pippetor</b>	
Pipetus <sup>®</sup> -Standart 230 V, 50 Hz, 2 Watt, Hirschmann <sup>®</sup>	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
<b>Schlittenmikrotom</b>	
Mikrotome	Enno Vieth Mikrotec GmbH, Wiesmoor, Deutschland
<b>Waage</b>	
400 x 0,1 g	Scout Florham Park NJ, USA
<b>Wasserbad</b>	
Temperatur – 10 bis + 100° C	Ernst Richter, Münster, Deutschland

### 3.4 Glas und Kunststoffwaren

<b>Deckgläser</b>	
10 mm Ø, Stärke 0,130 mm bis 0,170 mm, 100 Stück	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Menzel 18 x 18 ml, 1000 Stück	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
<b>Erlenmeyerkolben</b>	
Nalgene <sup>®</sup> 500ml	Schott Duran Produktions-GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland
Nalgene <sup>®</sup> 1000ml	Schott Duran Produktions-GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland

<b>Flaschen Top Filter</b>	
NALGENE <sup>®</sup> , 250 ml with Receiver PES 0,2 µm, 500 ml	Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
<b>Glasbecher</b>	
150 ml	Schott Duran Produktions GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland
<b>Glasflasche</b>	
sterilisierbar mit Deckel, 250ml	Schott Duran Produktions GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland
<b>Glasplättchen</b>	
10 mm Ø, Dicke 0,13 bis 0,17 mm, 50 Stück	W. Planet GmbH, Wetzlar, Deutschland
<b>Küvetten</b>	
Plastibrand Einmal-Küvetten, 1,5 ml	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland
<b>Konisches Röhrchen</b>	
Falcon <sup>®</sup> Tubes Blue Max <sup>™</sup> 50 ml, Polypropylen, 25 Stück	Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich
<b>Mikrotiterplatten</b>	
48-Loch-Platte	Mercateo AG, Köthen, Deutschland
<b>Pasteurpipetten</b>	
Serologisch, Glas, für Einmalgebrauch, 230 Stück	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
<b>Pasteurpipetten</b>	
225 mm	Fisher Scientific, GmbH, Schwerte, Deutschland
<b>Pipettor</b>	
Pipetus-Standard	Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
0,5 : 10, Witopet digital	Witec, Ulm, Deutschland
10,0 : 100, Witopet digital	Witec, Ulm, Deutschland
Labpette, 100 : 1000	National Labnet, Woodbridge NJ, USA
<b>Pipettenhaltergehäuse</b> für Pipetus-Akku,	Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
<b>Pipetten-Tips</b>	
100 µl, 100 Stück	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland
1000 µl, 100 Stück	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland



<b>Pipetten</b>	
Steril, 5 ml in 1/10 ml	Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Steril, 10 ml in 1/20	Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
<b>Probengefäße</b>	
Vol. 0,5 ml, Ø 30 x 8 mm, 1000 Stück	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
<b>Skalpell</b>	
Einmalgebrauch, Feather, 20 Stück	Pfm Produkte für die Medizin, AG, Köln, Deutschland
<b>Sterilfiltrationssysteme</b>	
250 ml, 0,2 µm, 12 Stück	Schott Duran Produktions GmbH und Co. KG, Mainz, Deutschland
500 ml, 0,3 µm, 12 Stück	Schott Duran Produktions GmbH und Co. KG, Mainz, Deutschland
<b>Vierkantflaschen</b>	
DURAN, 500 ml	Schott Duran Produktions GmbH und Co. KG, Mainz, Deutschland
DURAN, 250 ml	Schott Duran Produktions GmbH und Co. KG, Mainz, Deutschland
<b>Zellkulturflaschen</b>	
Nunclon, 50 ml, 250 Stück	Nunc GmbH und Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
<b>Zellkulturschalen</b>	
Dishes, 100 x 20 mm	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
60 x 15 mm, 500 Stück	NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Zentrifugenröhrchen</b>	
Polycarbonate, 16 x 76 mm, 13,5 ml, 25 Stück	Beckmann Instruments, Palo Alto, USA
Steril, 15 ml Centrifuge Tubes With Screw Caps, 50 Stück, Polystyren, Polyethylen	Labcon North America, San Rafael, Kalifornien, USA
Merck, 15 ml, 50 Stück	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Merck, 50 ml, 25 Stück	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## 3.5 Laborartikel

<b>Einmalhandschuhe</b>	
Unsteril, Safeskin SATIN PLUS™ Puderfreie Latex-Untersuchungshandschuhe Medium, 100 Stück	SafeSkin GmbH, Neufahrn, Deutschland
Steril Peha-taft, puderfrei, 50 Stück; Naturkautschuklatex	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
<b>Flaschenbürste</b>	
Länge 45 cm, Ø 5,5 cm	Reitenspiess Bürstenfabrik, Altdorf, Deutschland
Länge 30 cm, Ø 3 cm	Reitenspiess Bürstenfabrik, Altdorf, Deutschland
<b>Laborwischtücher</b>	
Kimwipes® Lite 200	Hakle Kimberly Deutschland-GmbH, Mainz, Deutschland
<b>Leukosilk®</b>	BSN medical GmbH & Co & KG, Hamburg, Deutschland
<b>Leukoplast</b> , 1,25 cm x 5m,	BSN medical GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
<b>Objektträger</b>	
Ohne Mattrand, 26 mm x 76 mm x 1mm, 50 Stück	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
<b>Mundschutz</b>	
Tie-On Operationsmaske	3 M Health Care, Vertrieb Borken, Deutschland
<b>OP-Haube</b>	
grün, Johnson & Johnson	Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
<b>OP-Kittel</b>	
grün, Johnson & Johnson	Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
<b>Steri-Indikatorband für Dampfsteri</b>	
19 mm	3M Health Care, St Paul, MN, USA
<b>Verbandzellstoff</b>	
38 x 58 cm	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland

### 3.6 Fadenmaterial und Kleber

<b>Hautnaht</b>	
Prolene <sup>®</sup> , 3,0	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
<b>Chirurgisches Nahtmaterial</b>	
Prolene <sup>®</sup> 3/0, nicht resorbierbar	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
<b>Befestigung der Gewebsgerüste</b>	
Prolene <sup>®</sup> 4/0	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
<b>Gewebekleber</b>	
Histoacryl <sup>®</sup>	B. BRAUN Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Fibrinkleber</b>	
Beriplast <sup>®</sup> P Combi-Set, 1 ml Fibrinogen-Konzentrat, 1 ml Aprotininlösung, 1 ml Thrombin, 1 ml Calciumchloridlösung	Aventis Behring GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

### 3.7 Zellkulturmedien und sonstige Reagenzien

<b>Alkohol</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 %</li> <li>• 60 %</li> <li>• 70 %</li> <li>• 96 %</li> <li>• 99 %</li> <li>• 100 %</li> </ul>	
<b>Aqua destillata</b> sterilisiert	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
<b>Desinfektionsspray</b>	
Neo-Kodan <sup>®</sup> farblos, 250ml, N2	Schülke & Mayer, Norderstedt, Deutschland
<b>DMEM</b> (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 1L, Lot 12K2384, steril filtriert, Endotoxin getestet, Lot 12K2384, 4500 mg Glucose/L-Pyridoxin. HCl, NaHCO <sub>2</sub> ohne L-Glutamin. Hinzuzufügen: 20,0 ml 200mM L-Glutamin-Lsg. oder 0,584g Gamma-irradiated L-Glutamine Puder/Liter Medium, 4500 ml, D5671	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>FBS</b> (Fetal Bovine Serum) 500 ml Lot 110K0941, F-0926, Hybridom getestet	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Formaldehyd-Lösung</b> 3,5 bis 3,7 %, neutral gepuffert	Otto Fischer GmbH & Co. KG Saarbrücken, Deutschland
<b>L-Glutamin-Penicillin Streptomycin (GPS)</b> 10 x 5 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Kaliumchlorid</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

	Taufkirchen, Deutschland
<b>Isotone Kochsalz-Lösung (NaCl) 0,9 %</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Nährmedium (1000 ml)</b> 1. 90 ml DMEM 2. 9 ml FBS 3. 1 ml GPS	
<b>Pufferlösung (Phosphat)</b> 1000 ml, pH 7,0 + - 0,02	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Paraffin</b>	Medizinische Diagnostik-Methoden GmbH, Giessen, Deutschland
<b>PBS-Dulbecco</b> (1x) w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Lot.: 1025EE	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
<b>Ringer-Lactat-Infusionslösung</b> 500 ml	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Salzsäure 1mol/l (1 N Lösung), 1000 ml</b>	E. Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Trypsin (1 : 250)</b> 2,5 % (w/v) in PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , 100ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

### 3.8 Färbungen

<b>Alkohol</b> • 50 % • 60 % • 70 % • 96 % • 99 % <b>Essigsaurer Alkohol</b> • 10 ml Eisessig • 1000 ml 96% Alkohol	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Anilinalkohol</b> • 1 ml Anilinöl • 1000 ml Alkohol 96%	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Anilinblau-Orange-Eisessig</b> • 0,5 g Anilinblau • 2,0 g Goldorange G • 8,0 ml Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Azocarmin</b> • 0,1 g Azocarmin • 100 ml Aqua dest.	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>DePex (Eindeckmedium)</b>	SERVA, Heidelberg, Deutschland
<b>Eosin</b> • 500 ml Alkohol 96 % • 500 ml Aqua destillata • 10 g Eosin gelb. (Fluka) • 100 ml Alkohol 50 % • Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Hämalaun (Mayer):</b> • 0,2 g Natriumjodat (NaJO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland

<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 g Kaliumaluminiumsulfat</li> <li>• 50 g Chloralhydrat</li> <li>• 1 g kristalline Zitronensäure</li> </ul> <b>Hämatoxilin (WEIGERT`s)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 g Hämatoxilin</li> <li>• 100 ml Alkohol 96%</li> <li>• 1 ml officinelle HCl 25%</li> <li>• 98 ml Aqua destillata</li> <li>• 1,16 g Eisen-III-Chlorid</li> </ul>	
<b>Lichtgrün</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 g Lichtgrün</li> <li>• 100 ml Aqua destillata</li> <li>• 0,2 ml Eisessig</li> </ul>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Phosphorwolframsäure</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Ponceau-Säurefuchsin-Lösung</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 g Ponceau de Xylidin</li> <li>• 0,1 g Säurefuchsin</li> <li>• 0,2 ml Eisessig</li> <li>• 300 ml Aqua destillata</li> </ul>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Phosphormolybdänsäure-Orange-Lösung</b> 4 g Phosphormolybdänsäure 2 g Orange G 100 ml Aqua destillata	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Roti<sup>®</sup>-Histol (Roth)</b>	Firma Carl Roth GmbH &Co, Karlsruhe Deutschland

### 3.9 Antikörper und Antikörperzusätze

<b>Monoclonal Anti-<math>\beta</math>-Actin</b> 0,2 ml Artikel-Nr. F5316	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Blocking Reagent</b> normal goat serum 5ml, Artikel-Nr.G9023	
<b>Negative Control</b> normal mouse serum 5ml, Artikel-Nr. M-5905	
<b>Mayer`s Hematoxylin Solution</b> 100 ml, Artikel-Nr. MHS-1	
<b>Glycerol Gelatin</b> 15 ml, Artikel-Nr. GG-1	
<b>Humidity Chamber</b> Artikel-Nr. H-6644	

---

### 3.10 Antibiotika und Anästhetika

<b>Atropin</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Etomidate<sup>®</sup></b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Ketanest<sup>®</sup></b>	Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland
<b>Nebacetin<sup>®</sup>-Spray</b> Lokalanthibiotikum Sprühdose 150 ml, Puder Spray	Yamanouchi Pharma GmbH, Deutschland
<b>Stressnil<sup>®</sup></b> Wirkstoff: Azaperon	Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland
<b>Tardomycel<sup>®</sup></b>	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

## 4 Ergebnisse

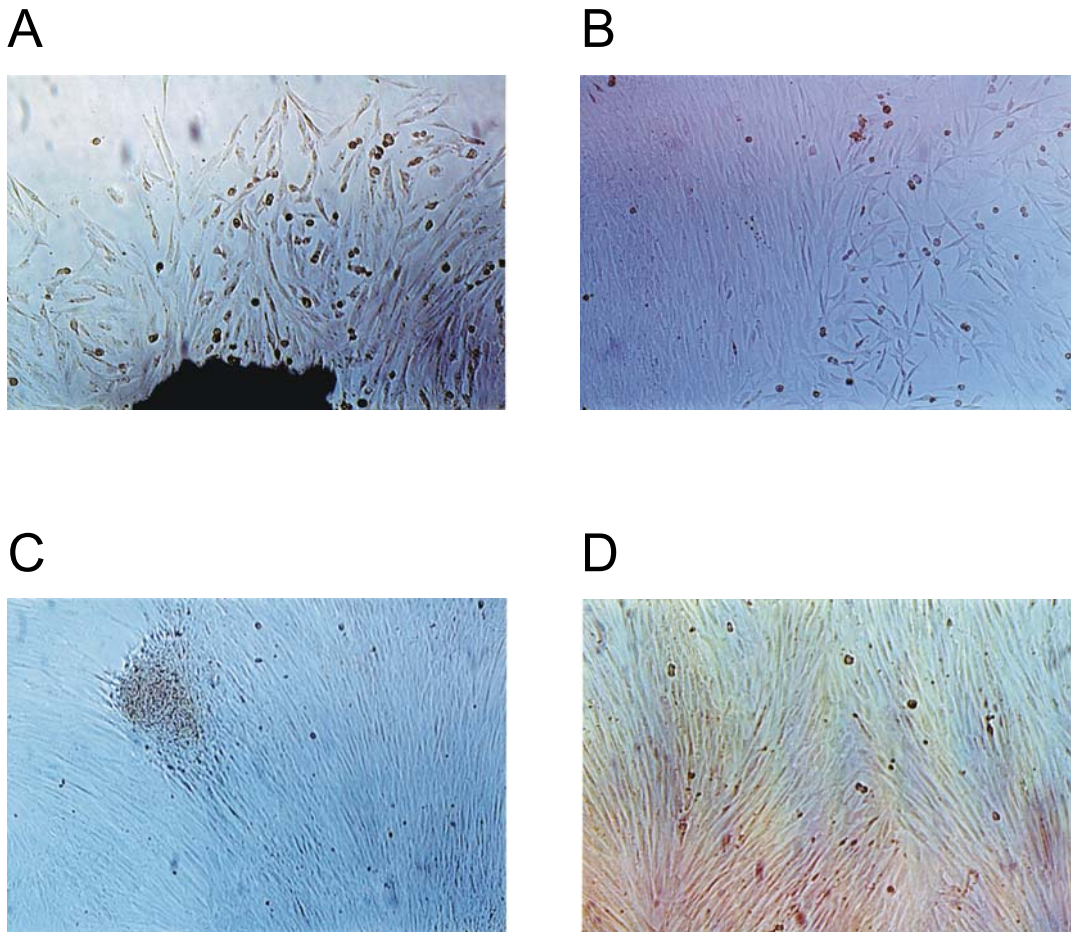
### 4.1 In vitro Untersuchungen

#### 4.1.1 Zellkultur

##### ***Morphologie und Proliferationsverhalten***

Die Gewebeproben wurden aus dem inneren Analsphinkter (IAS) von zehn Schweinen, wie in Kap. 2.1.2 ff beschrieben, präpariert und die gewonnenen Zellen in Kultur expandiert. Die Zellkulturen wurden fotografisch in verschiedenen Stadien dargestellt.

Nach 1 Tag war das grobe Erscheinungsbild unverändert. Der Großteil der Gewebeanteile war am Boden der Kulturschale adhäriert. Es lag kein Anhaltspunkt einer Zellteilung vor. Nach 2 Tagen waren vereinzelt Zellen zu sehen, als Zeichen der Zellteilung. Sie wuchsen sternenförmig aus den Gewebesegmenten. Die Zellen lagen alleine. Sie setzten sich am 4. Tag zirkulär in traubenförmigen Anhäufungen ab, vgl. Abb. 4-1 (A), (B). Es entstanden Schwankungen in der Aussaatdichte pro Schale bzw. Vertiefung. Am 8. Tag erschienen charakteristische Kolonien. Die typische spindelförmige Struktur der adhärent wachsenden Zellen war zu erkennen. Dicht gepackt und parallel angeordnet wuchsen sie als Zellrasen auf dem Boden der Kulturschale, vgl. Abb. 4-1 (C). Nach 14 Tagen hatten sich scherengitterartige Systeme gebildet, vgl. Abb. 4-1 (D). In der Konfluenz zeigten die Zellen ein heterogenes Multilayer. Während der Zellrasen an manchen Stellen mehrere Zellschichten übereinander aufwies, bestand er in anderen Bereichen aus großen flachen Zellen, die im Quasimono-layer wuchsen. Nach Ross wird diese Anordnung als Berg- und Tal-Wachstumsmuster („hill and valley-pattern“) bezeichnet und gilt allgemein als charakteristisch für glatte Muskelzellen. Nach 19 Tagen hatten die Zellen eine konfluente Zellschicht (Konfluenz ca. 60 % bis 70 %) gebildet. Daraufhin wurden die Zellen zum ersten Mal passagiert.



**Abb. 4-1:** (A), (B) Zellwachstum nach 4 Tagen. Die Zellen wachsen aus dem Gewebesegment (C) Zellwachstum nach 8 Tagen: Die spindelförmigen Zellen ordnen sich dicht und parallel an (D) Zellwachstum nach 14 Tagen: Bildung scherengitterartige Systeme. Vergr. (A) 60fach; (B), (C), (D) 40fach

Die zweite Passage fand nach 26 Tagen statt. Die Zellen wurden der dritten Passage nach 33 Tagen zugeführt.

#### ***Wachstum nach Subkultivation***

Als „subkultivierte Zellen“ sollen hier und im Folgenden alle Zellen benannt werden, die mindestens eine Passage in vitro durchgemacht haben. Das optische Aussehen ist leicht verändert gegenüber dem ursprünglichen Erscheinungsbild der primär gewonnenen Zellen. Während die primäre Zellpopulation überwiegend durch spindelförmige Zellen charakterisiert ist, findet man in den subkultivierten Zellpopulationen eine außerordentlich große Anzahl von sehr großen, flachen Zellen.



***Wachstumsverhalten der Zellen auf den Trägermaterialien***

Nach der dritten Passage wurden die Zellen, wie in Kap. 2.2.3 beschrieben, auf die Trägermaterialien gesät und für weitere 23 Tage in-vitro kultiviert.

Es zeigte sich ein Zusammenhang der Degradationsprozesse der Trägermaterialien in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Zellen in der Kultur. Die besiedelten Transplantate konnten 23 Tage in der Nährlösung kultiviert werden. Gegen Ende der Kulturzeit wiesen einige Trägermaterialien Degradationszeichen auf. Das Material begann ab ca. 20 Tagen in einzelne Fasern zu zerfallen. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen blieben die Proben mit den reinen Gewebegerüsten nur für maximal 12 Tage stabil, bevor sie sich in die einzelnen Fasern auflösten.

***Vermehrungsverhalten und Morphologie der Zellen***

Zur Beurteilung des Expansionsverhaltens der Zellen wurde auf eine rein deskriptive Arbeitsweise zurückgegriffen. Repräsentative Bereiche der besiedelten Trägermaterialien (Tutomech<sup>®</sup>-H, Surgisis<sup>®</sup>, Ethisorb<sup>®</sup>) wurden über den Zeitraum der Kultur hinweg makro- und lichtmikroskopisch beobachtet. Es wurde fotografisch das Zellwachstum innerhalb und am Rand jedes Gewebegerüsts dargestellt:

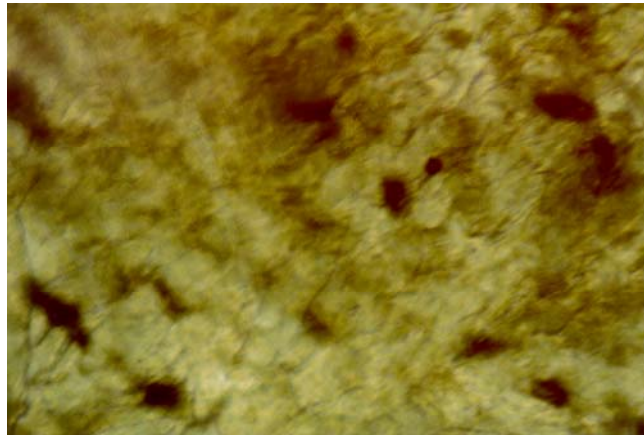
1. Nativ
2. Färbungen:
  - a. Hämatoxylin Eosin nach Mayer
  - b. Azan nach Heidenhain
  - c. Trichrom nach Goldner
  - d. Immunhistochemischer Nachweis: Die immunhistochemische Charakterisierung der Muskelzellen mittels Anti- $\alpha$ -smooth-muscle Aktin wurde mikroskopisch untersucht und ausgewertet. Positive Zellen zeigen eine braune Färbung, negative Zellen entsprechend der Gegenfärbung eine blaue Färbung.

Die Färbungen der in vitro Präparate fand im Allgemeinen 23 Tage nach dem Transfer der Zellen auf die Trägermaterialien statt. Die Färbungen der in vivo Transplantate erfolgte im Anschluss an die Gewebeentnahme.

#### 4.1.2 Tutomesh<sup>®</sup>-H

##### *Nicht besiedeltes Gewebegerüst*

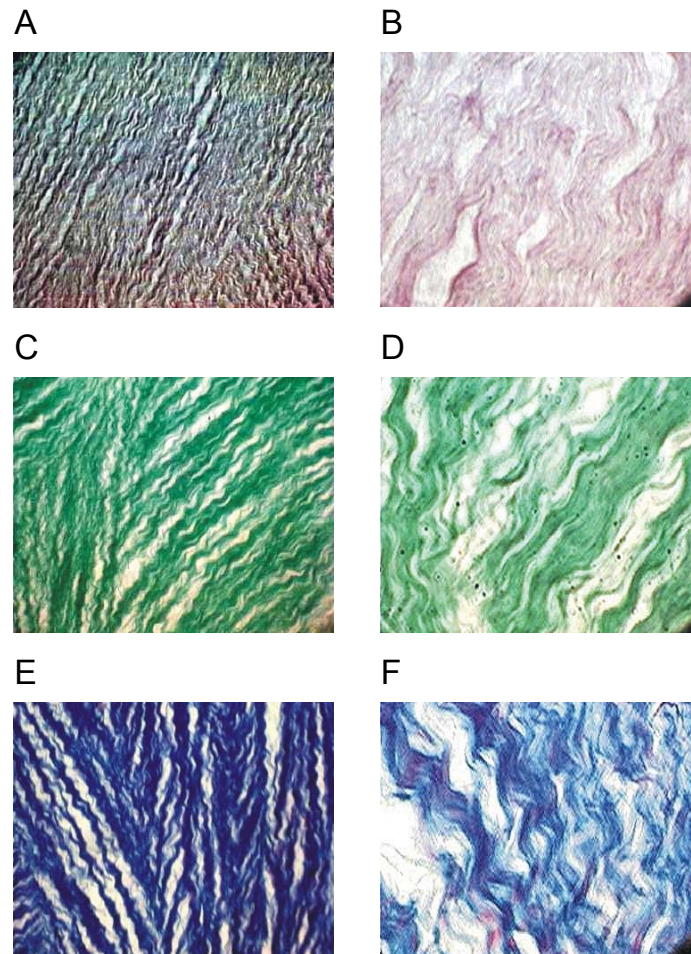
Lichtmikroskopisch waren die nativen und besiedelten Matrizes von Tutomesh<sup>®</sup>-H nur schwer darzustellen. Es bot sich das Bild einer sehr dichten Struktur, vgl. Abb. 4-2.



**Abb. 4-2:** Natives Tutomesh<sup>®</sup>-H-Gewebegerüst. Vergr. 40fach

##### *H. E.-, Trichrom-, Azan-Färbung*

In der H. E.-Färbung sind die wellige Struktur und die parallele Anordnung der schlanken Kollagenfasern deutlich zu erkennen, vgl. Abb. 4-3 (A), (B). Die Trichrom-Färbung und die Azan-Färbung bestätigen den in der H. E.-Färbung gewonnenen Eindruck. Die Matrix ist gleichmäßig einfarbig markiert, Abb. 4-3 (C), (D), (E), (F).



**Abb. 4-3, Tutomesh®-H nativ:** (A), (B) H. E.-Färbung; (C), (D) Trichrom-Färbung nach Goldner; (E), (F) Azan-Färbung nach Heidenhain. Vergr. (A), (C), (E) 40fach; (B), (D), (F) 100fach

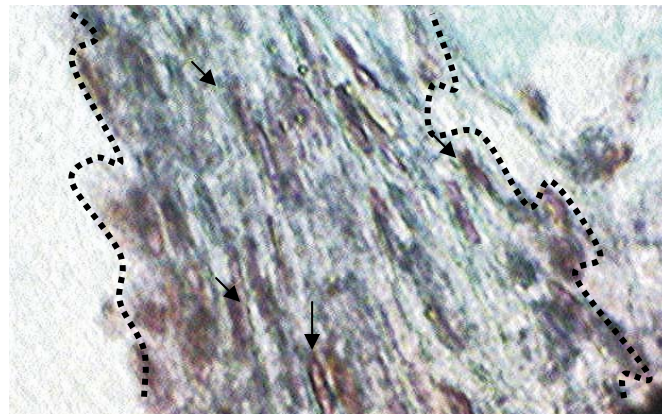
### ***Besiedeltes Gewebegerüst***

#### *Vermehrungsverhalten*

Makroskopisch konnten Zellen um das Gewebegerüst herum beobachtet werden. Mikroskopisch zeigte sich nach 14 Tagen eine Erhöhung der Zellzahl. Vor allem die Randbereiche wurden von den Zellen eingenommen, die Dichte der Proben stieg geringfügig an. In welchem Ausmaß die Faserzwischenräume mit Zellen ausgefüllt wurden, war lichtmikroskopisch schwer zu beurteilen.

### *Morphologie der Zellen*

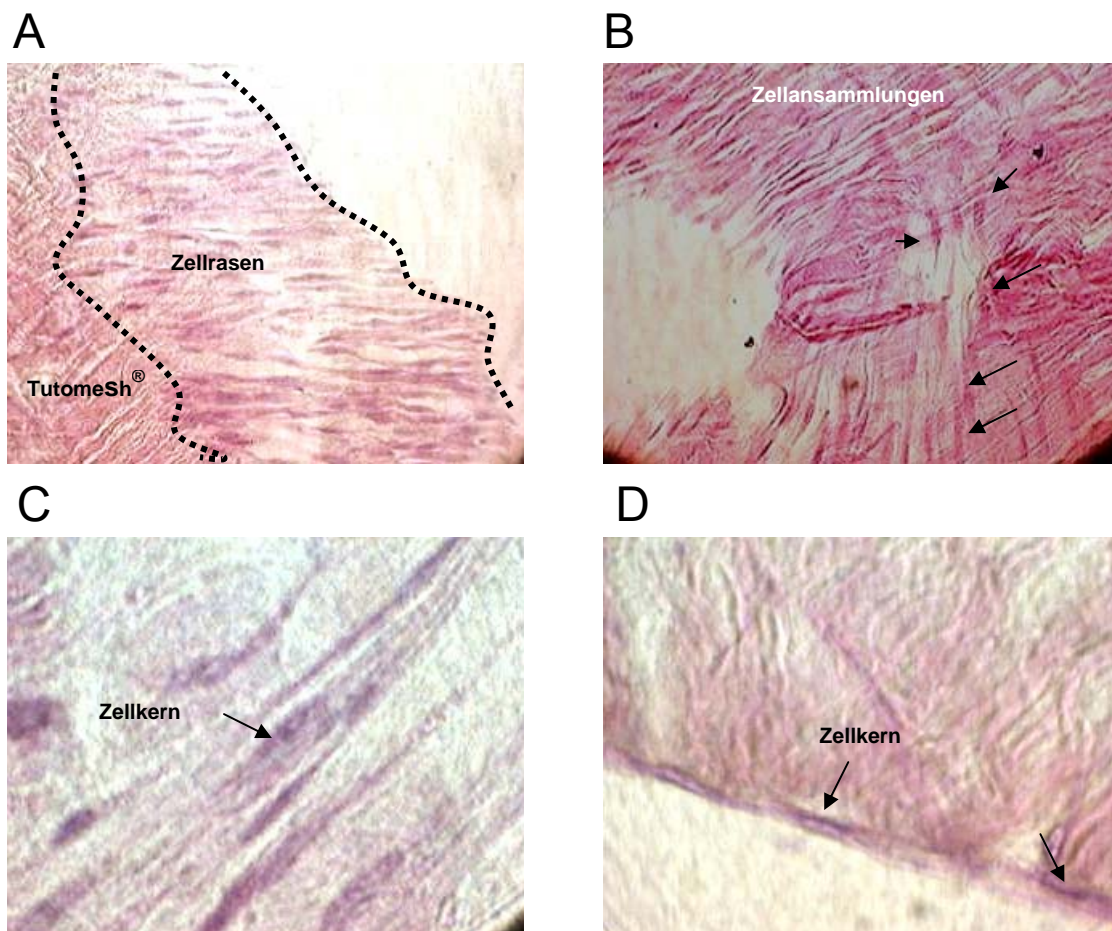
Das morphologische Erscheinungsbild der Zellen am Rand des Gewebegerüsts konnte zum Zeitpunkt der Aussaat als spindelförmig und mit Zellausläufern ähnlich Fibrozyten beurteilt werden. Bis zum Ende der *in vitro* Kulturzeit von 23 Tagen waren die Morphologie und die Verteilung der Zellen am Rand des Gewebegerüsts zu jedem Zeitpunkt der Kultur gut darstellbar, vgl. Abb. 4-4.



**Abb. 4-4, Tutomesh®-H:** Zellverband (Trichrom-Färbung nach Goldner). Vergr. 100fach

### *H. E.-Färbung, Trichrom-Färbung, Azan-Färbung*

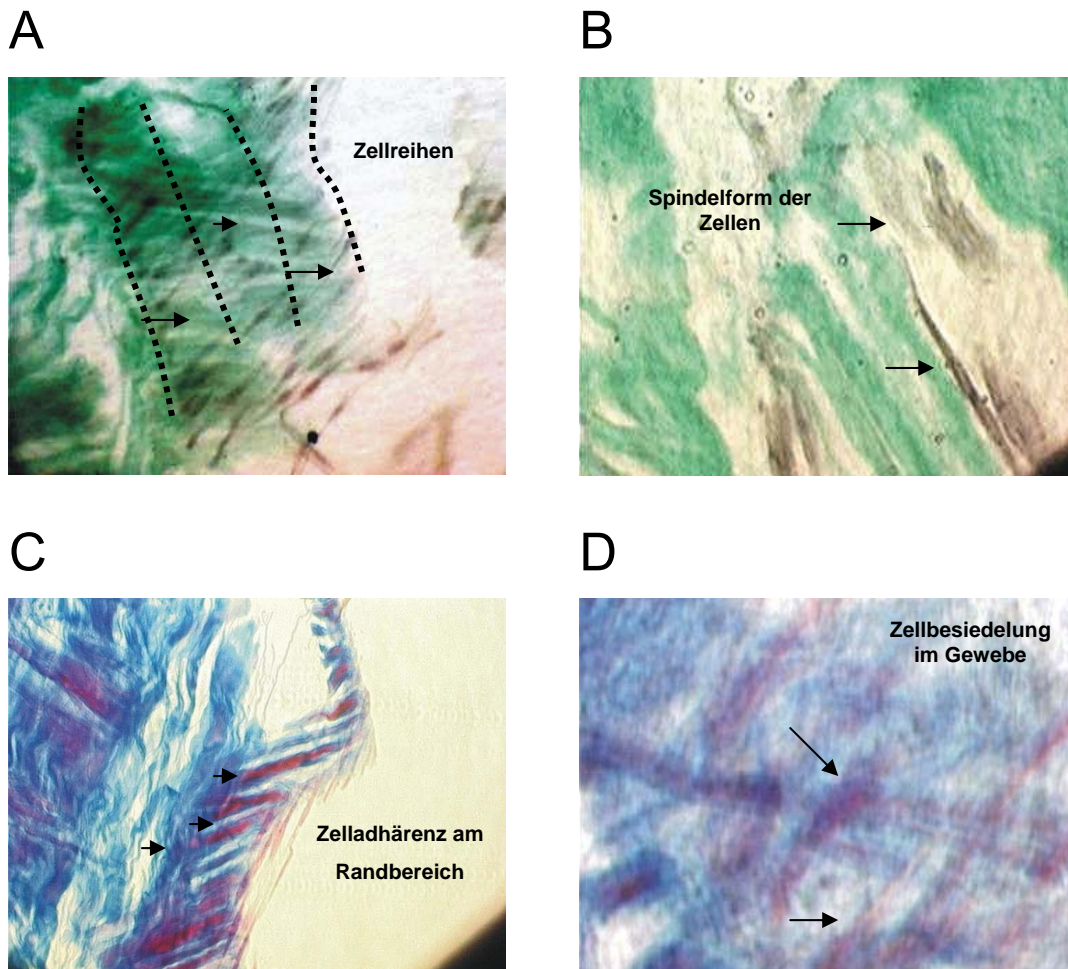
Die H. E.-Färbung zeigt die Adhäsion der Zellen am Rand des Trägermaterials. Die parallele Anordnung der spindelförmigen Zellen ist deutlich zu erkennen. Sie scheinen untereinander verbunden zu sein. Die Färbung zeigt, dass sich auch im Inneren des Trägermaterials vereinzelt Zellen befinden, vgl. Abb. 4-5.



**Abb. 4-5, TutomeSh®-H:** (A), (B): Übersichtsaufnahmen: Ein Zellrasen ist deutlich zu erkennen. Die Detailaufnahmen zeigen, dass sowohl (D) im Randbereich als auch (C) im Inneren, Zellen die Matrix besiedelt haben. Eine homogene Anordnung der Zellen ist deutlich zu erkennen. Zentral ist der Zellkern gelegen. Im Randbereich umschließen einzelne Zellen das Gerüst. Vergr. (A), (B) 40fach (C), (D) 100fach

Die Trichrom-Färbung bestätigt den in der H. E.-Färbung gewonnenen Eindruck. Auffällig erscheint die dichte parallele Anordnung der Zellen im Randbereich der Trägermaterialien, während im Inneren lediglich vereinzelt Zellen zu beobachten sind, vgl. Abb. 4-6 (A), (B).

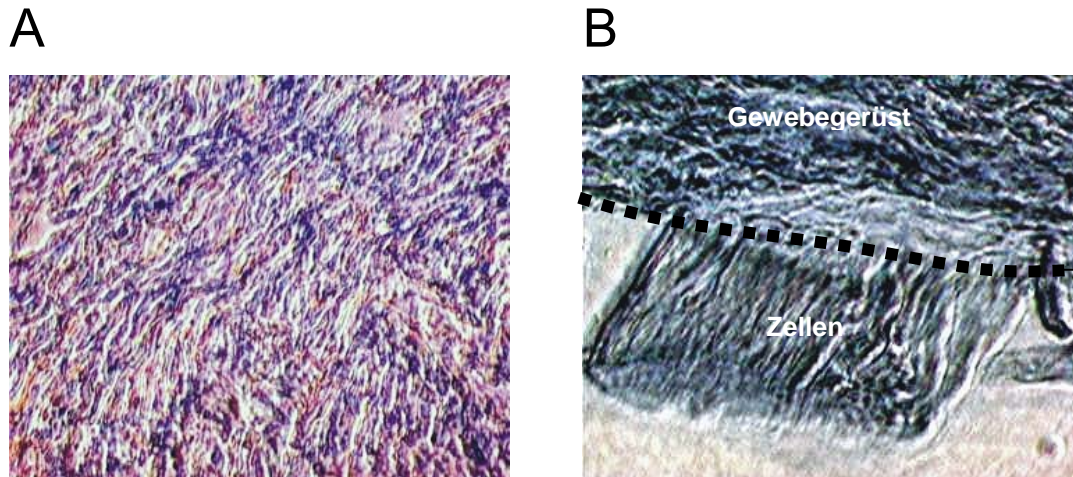
In der Azan-Färbung ist deutlich die parallele Anordnung der länglichen Zellen im Randbereich des Gewebegerüsts zu erkennen, vgl. Abb. 4-6 (C), (D).



**Abb. 4-6, Tutomesh®-H:** Trichrom-Färbung nach Goldner: Übersicht des Randbereiches von Tutomesh®. (A) Es haben sich zwei Zellreihen gebildet. (B) Detailaufnahme des Inneren der Trägersubstanz. Die Spindelform der Zellen, die sich in den Faserzwischenräumen niederlassen, ist deutlich zu sehen. Das Gewebegerüst ist stark hydroliert. (C) Azan-Färbung: Übersicht des Gewebegerüstes-Randbereich: Die Zellen bilden Reihen. Sie adhären sowohl parallel wie auch senkrecht an den Fasern des Tutomesh®-H. (D) Das Innere des Gewebegerüstes ist von Zellen besiedelt. Vergr. (A), (C) 40fach; (B) (D) 100fach

*Immunhistologie*

Mit Hilfe des immunhistologischen Verfahrens konnte  $\alpha$ -Aktin lichtmikroskopisch nicht dargestellt werden. Das Präparat ist homogen gefärbt, vgl. Abb. 4-7.



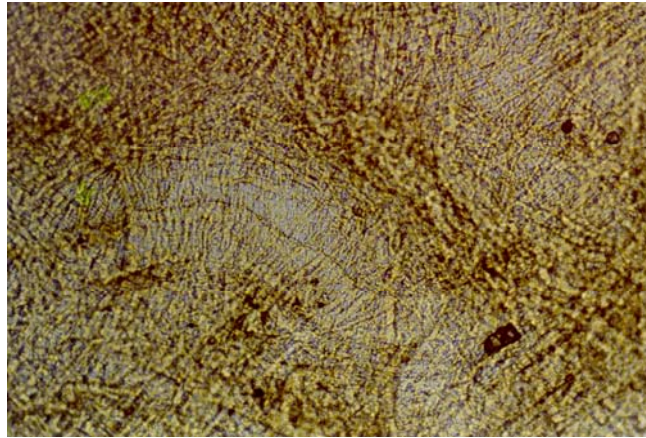
**Abb. 4-7, Tutomesh<sup>®</sup>-H:** (A) Übersichtsaufnahme der immunhistochemischen Färbung: Das Gewebegerüst ist homogen gefärbt. (B) Detailaufnahme der immunhistochemischen Färbung. Die fast senkrecht adhätierenden parallel angeordneten Zellen am Rand des Gewebegerüsts (→) sind wie das Gewebegerüst gefärbt. Vergr. (A) 40fach; (B) 100fach

#### 4.1.3 Surgisis<sup>®</sup>-Weichgewebetransplantat

##### *Unbesiedeltes Transplantat*

##### *Lichtmikroskopie*

Wie die Gewebegerüste der Firma Tutogen lassen sich auch die nativen und besiedelten Surgisis<sup>®</sup>-Weichgewebetransplantate lichtmikroskopisch nur schwer darstellen, vgl. Abb. 4-8. Die faserige Struktur des Gerüsts ist nur zu erahnen. Das Zellwachstum innerhalb der besiedelten Transplantate ist lediglich bei den Färbungen zu beurteilen.



**Abb. 4-8, Surgisis®-Weichgewebettransplantat:** nativ. Vergr. 40fach

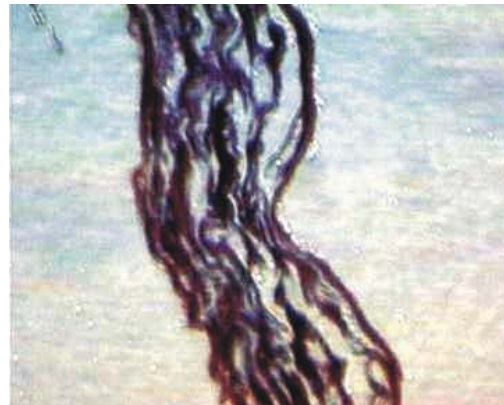
*H. E.-Färbung, Trichrom-Färbung nach Goldner, Azan-Färbung nach Heidenhain*

Die H. E.-Färbung zeigte keine klare Struktur. Die Trichrom-Färbung nach Goldner und die Azan-Färbung nach Heidenhain demonstrieren eine degradierte Matrix. Die Fasern scheinen voneinander losgelöst. Die Faserzwischenräume sind deutlich zu erkennen, vgl. Abb. 4-9.

A



B



**Abb. 4-9, Surgisis®:** (A) Übersicht Trichrom-Färbung nach Goldner und (B) Azan-Färbung nach Heidenhain. Die Trägersubstanzen sind in einzelne Fasern zerfallen. Vergr. 40fach



### ***Besiedeltes Gewebegerüst***

#### *Vermehrungsverhalten*

Nachdem die Muskelzellen auf Surgisis® transferiert worden waren, adhärirten sie am Rand, wo sie zwei parallele Schichten bildeten. Aus diesen entwickelte sich ein konfluenter Monolayer von Zellen. Während innerhalb der ersten 4 Tage keine Veränderungen innerhalb des Transplantates zu beobachten waren, konnten nach 8 Tagen vereinzelt Zellen in den Faserzwischenräumen erkannt werden.

#### *Hämatoxylin Eosin-Färbung*

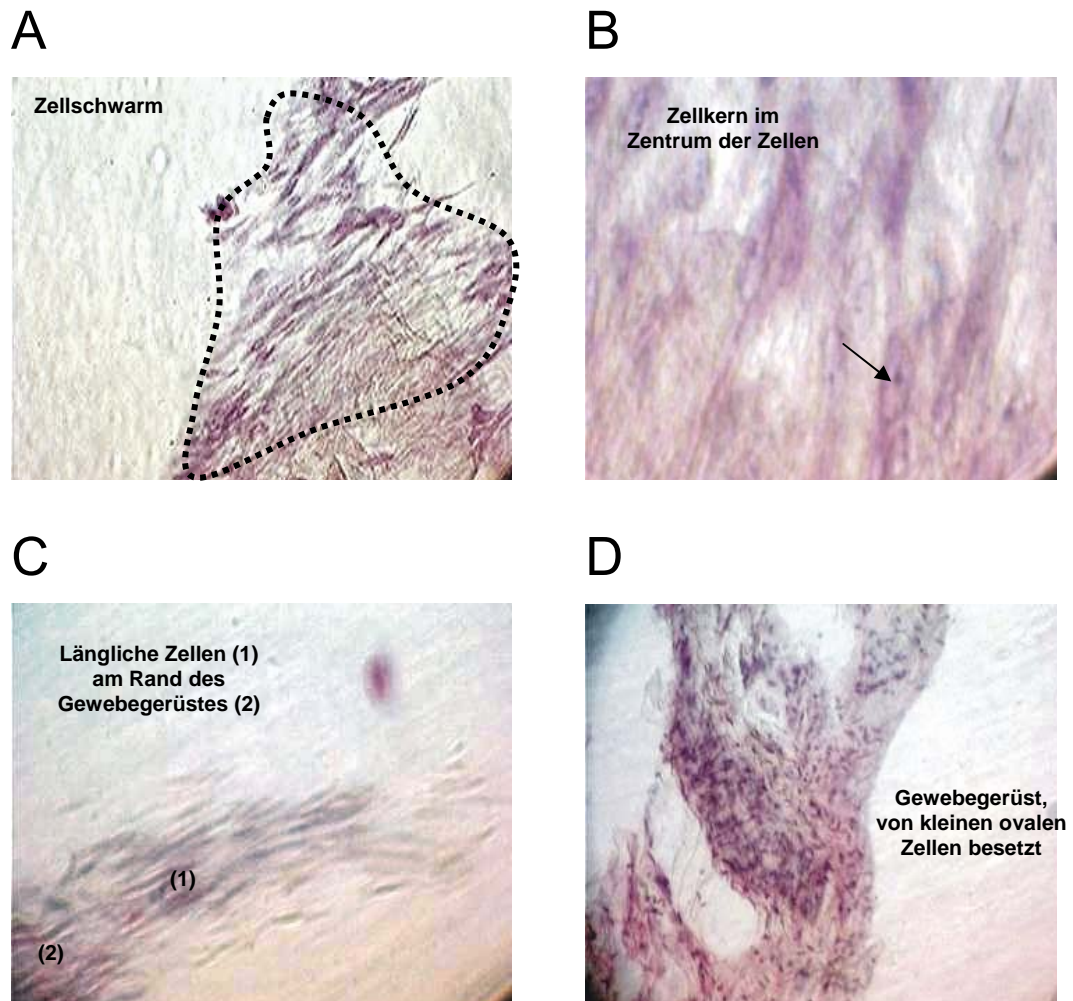
In der Morphologie erschienen die Zellen innerhalb des Gewebegerüstes zum Zeitpunkt der Aussat spindelförmig und mit Zellausläufern. Bis zum Ende der Kulturzeit veränderte sich das Erscheinungsbild. Die Zellen verloren teilweise ihre spindelförmige Form. Sie sahen kleiner und ovaler aus. Die homogene Anordnung war dennoch zu erkennen, vgl. Abb. 4-10.

#### *Trichrom-Färbung nach Goldner*

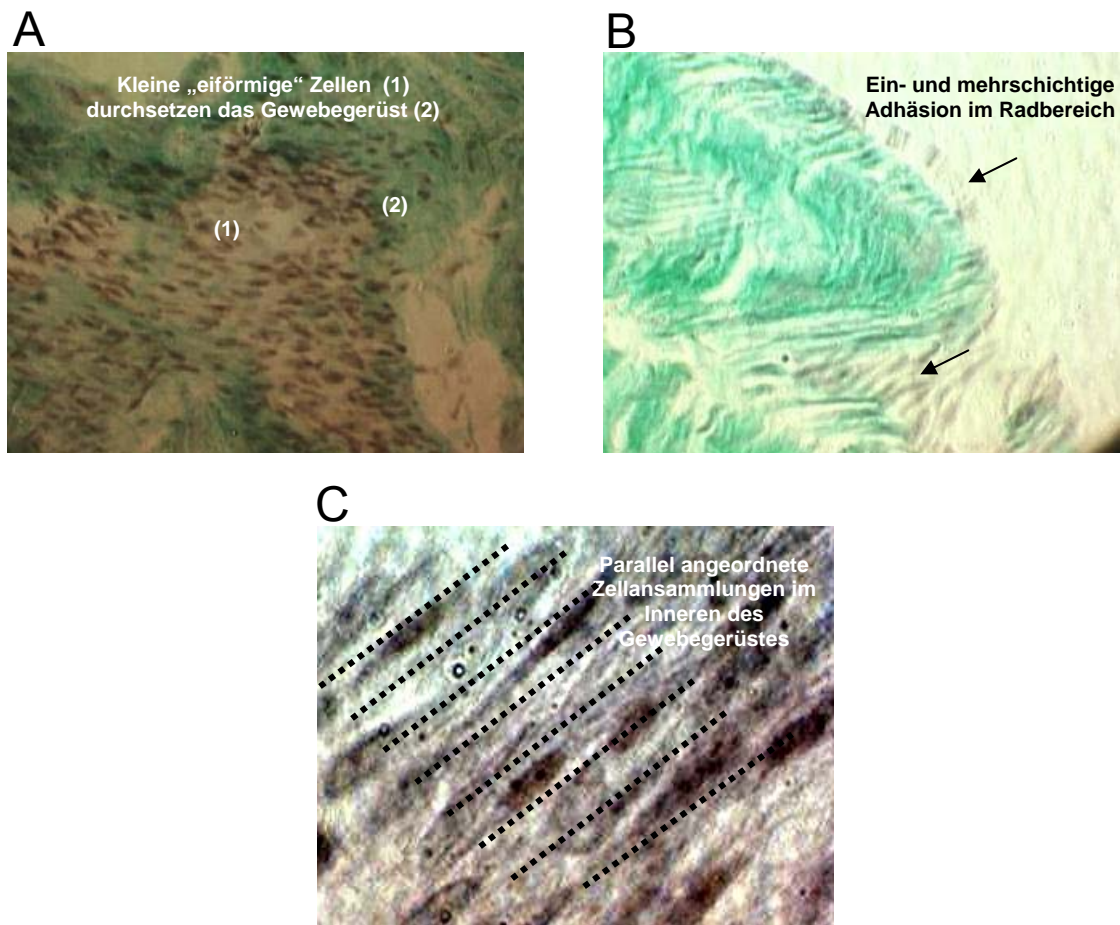
In der Trichrom-Färbung wird der in der H. E.-Färbung gewonnene Eindruck bestätigt. Die kleinen, ovalen, dicht aneinander liegenden Zellen sind hier besonders gut dargestellt, vgl. Abb. 4-11.

#### *Azan-Färbung*

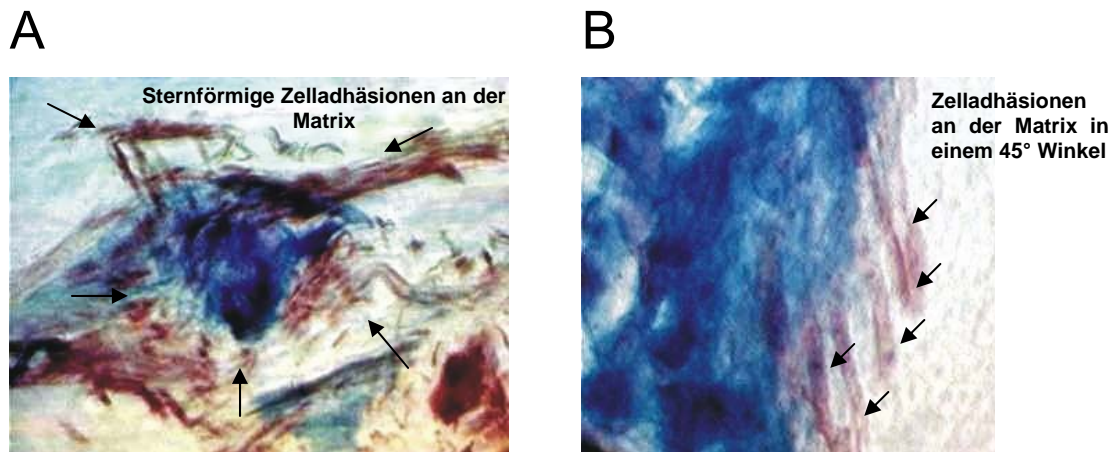
In der Azan-Färbung wird eine sternenförmige Anordnung der Zellen um die Randbereiche des Transplantates offensichtlich. An anderen Außenbezirken lassen sich parallel angeordnete, spindelförmige Zellen beobachten. Der Zellkern ist zentral gelegen, vgl. Abb. 4-12.



**Abb. 4-10, Surgisis®:** (A) Übersicht nach 8 Tagen. Die Zellen treten als Schwarm an das Gewebegerüst heran. (B) Detailaufnahme: Im Zentrum der Zelle ist der Zellkern (→) zu erkennen. (C) Detailaufnahme: Die dicht gepackten, länglichen Zellen adhäreren als Schwarm am Rand des Gewebegerüstes. (D) Übersicht nach 23 Tagen: Das Gewebegerüst ist von kleinen ovalen Zellen durchwachsen. Vergr. (A), (C), (D) 40fach; (B) 100fach



**Abb. 4-11, Surgisis®:** (A) Übersicht: Die kleinen eiförmigen Zellen durchsetzen traubenförmig das Gewebegerüst. (B) Im Randbereich sind einschichtige Adhäsionen zu erkennen. (C) Im Inneren sind die parallel angeordneten Zellen nur vereinzelt zu beobachten.  
Vergr. (A), (B) 40 fach; (C) 100fach



**Abb. 4-12, Surgisis®:** (A) Übersicht: Die Zellen adhäreren sternförmig an der Matrix. (B) Detailaufnahme: Die parallel formierten Zellen adhäreren die Matrix in einem 45° Winkel. Im Innern der Zellen ist der zentral gelegene Zellkern sichtbar. Vergr. (A) 40fach; (B) 100fach

#### *Immunhistochemische Charakterisierung*

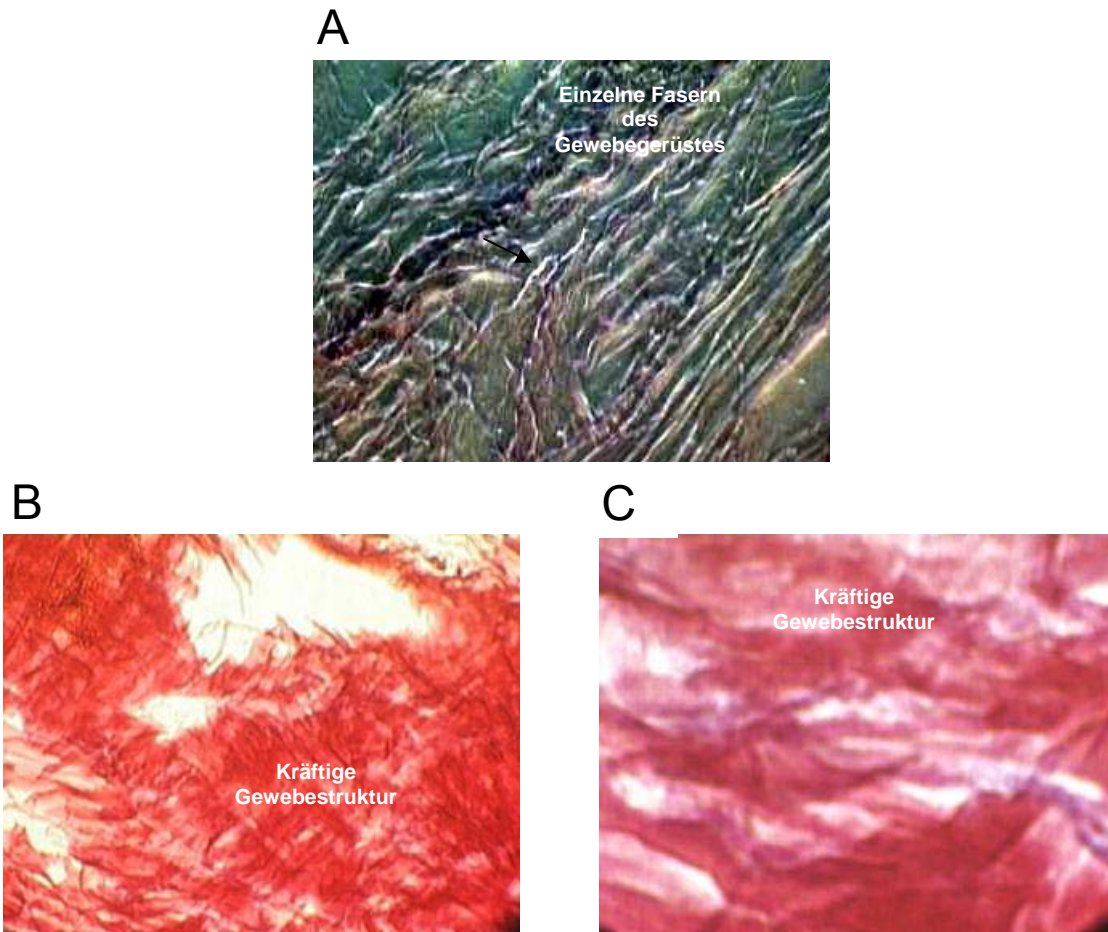
In der immunhistochemischen Untersuchung konnte  $\alpha$ -Aktin nicht erkannt werden. Das Gewebegerüst war zum Teil degradiert.

#### **4.1.4 Ethisorb® Dura Patch**

##### ***Unbesiedeltes Gewebegerüst***

*H. E.-Färbung, Trichrom-Färbung nach Goldner, Azan-Färbung nach Heidenhain*

Das Polymer der Firma Ethicon erschien in der H. E.-Färbung zum Teil degradiert. Auch in der Azan-Färbung weist das Gerüst Lücken auf als Zeichen der Degradation, vgl. Abb. 4-13. Die Trichrom-Färbung nach Goldner zeigte ein buntes Bild. Hier lag eine Kontamination vor.



**Abb. 4-13, Ethisorb® :** (A) H. E.-Färbung: Die einzelnen Fasern des Gewebegerüsts sind deutlich zu erkennen. (B), (C) Azan-Färbung nach Heidenhein: Die kräftige Struktur der Fasern ist sowohl in der Übersicht als auch in der Vergrößerung zu erkennen. Vergr. (A), (B), 40fach; (C) 100fach

### ***Besiedeltes Gewebegerüst***

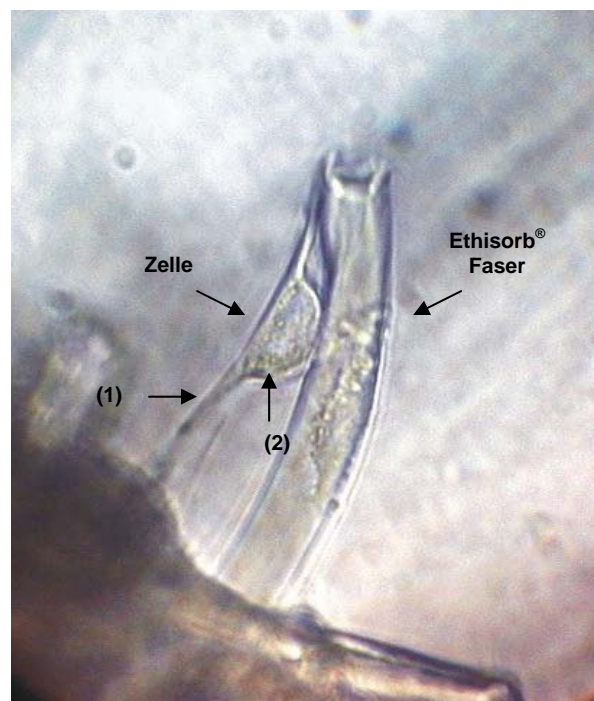
#### *Vermehrungsverhalten und Morphologie der Zellen*

Als die Zellen auf Ethisorb® transferiert worden waren, konnte anfangs lediglich ein ausgeprägtes Vermehrungsverhalten um das Gewebegerüst herum beobachtet werden. Während nach 5 Tagen ein Zellrasen den Boden der Kulturschale ausfüllte, adhärten zu diesem Zeitpunkt die Zellen nur vereinzelt am Randbereich und innerhalb des Gewebegerüsts.

Das morphologische Erscheinungsbild der Zellen war zum Zeitpunkt der Aussaat spindelförmig und mit Zellausläufern versehen, vgl. Abb. 4-14. Am 2. Tag konnten nackte Zellen beobachtet werden, die am Rand des Gewebegerüsts

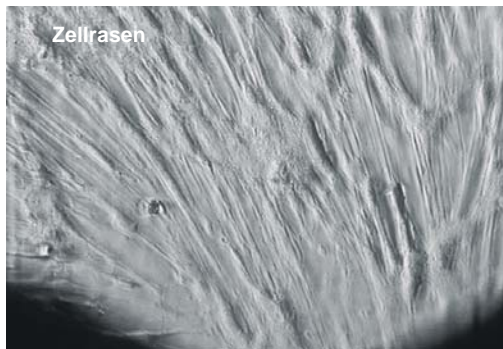
adhärierten. Nach 4 Tagen konnte eine Verbindung zwischen den einzelnen Fasern erkannt werden, vgl. Abb. 4-15. Kurz vor der Implantation waren die Gewebegerüste zu einem Teil abgebaut und ersetzt durch die von den Zellen produzierte Matrix.

Folglich waren die fixierten und in Formalin eingebetteten Proben nur schwer anzufärben.



**Abb. 4-14, Ethisorb®:** Die Zelle in der Mitte des Bildes zeigt deutlich breite Ausläufer (1) und lagert sich an eine Ethisorb® Faser. Sie sitzt dem Boden der Kulturschale breit auf. Im Zellinneren lässt sich der längliche Zellkern (2) erkennen. Im Querschnitt ist er häufig nicht darstellbar. Vergr. 200fach

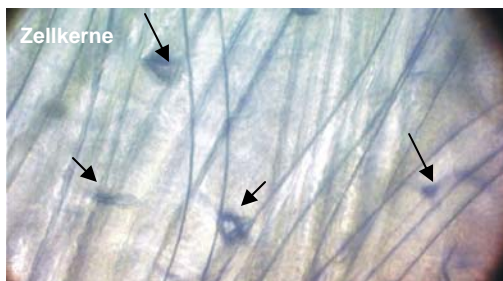
A



B



C



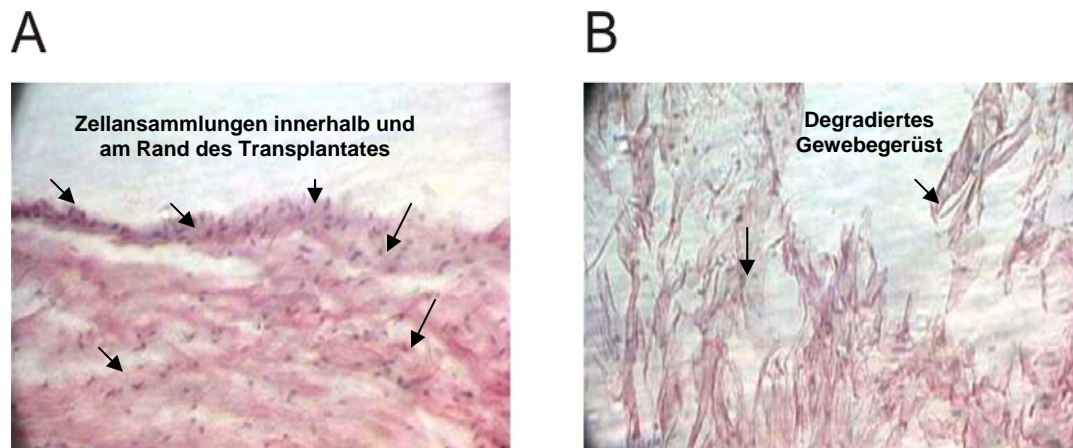
D



**Abb. 4-15, Ethisorb®:** (A) Die Übersicht zeigt einen Zellrasen, der sich um das Gewebegerüst gebildet hat. (B), (C), (D): In den Detailaufnahmen sind Adhäsionen einzelner Zellen in die Faserzwischenräume zu erkennen. Die Zellkerne sind sichtbar. Vergr. (A) 40fach; (B), (C), (D) 150fach

*H. E.-Färbung*

In einem frühen Stadium wird das Gewebegerüst von kleinen ovalen Zellen belagert. Kurz vor der Implantation ist Ethisorb® nahezu komplett degradiert, vgl. Abb. 4-16.

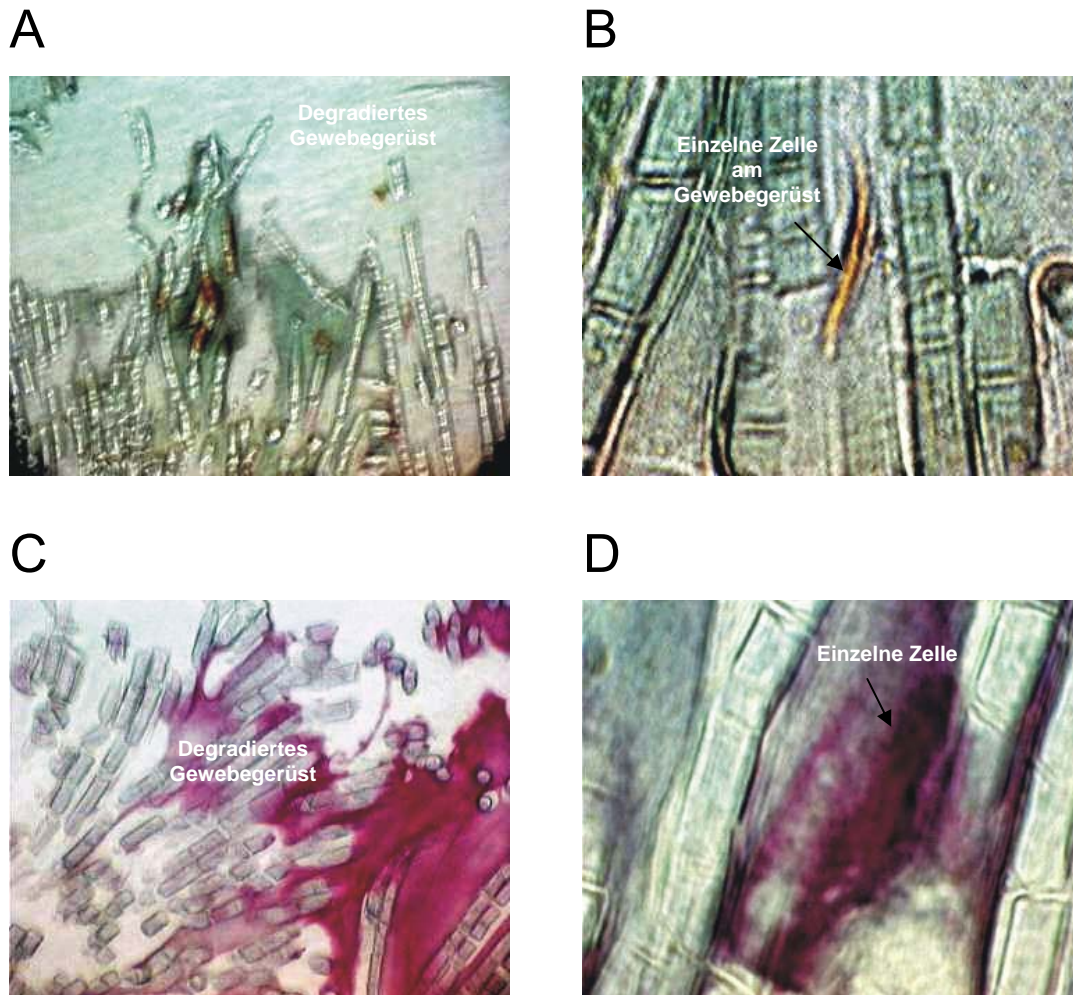


**Abb. 4-16, Ethisorb®:** (A), (B): H. E.-Färbung: Ethisorb® 10 Tage nach Besiedelung des Gewebegerüsts mit Zellen. Vergr. (A), (B) 40fach



*Trichrom-Färbung nach Goldner und Azan-Färbung*

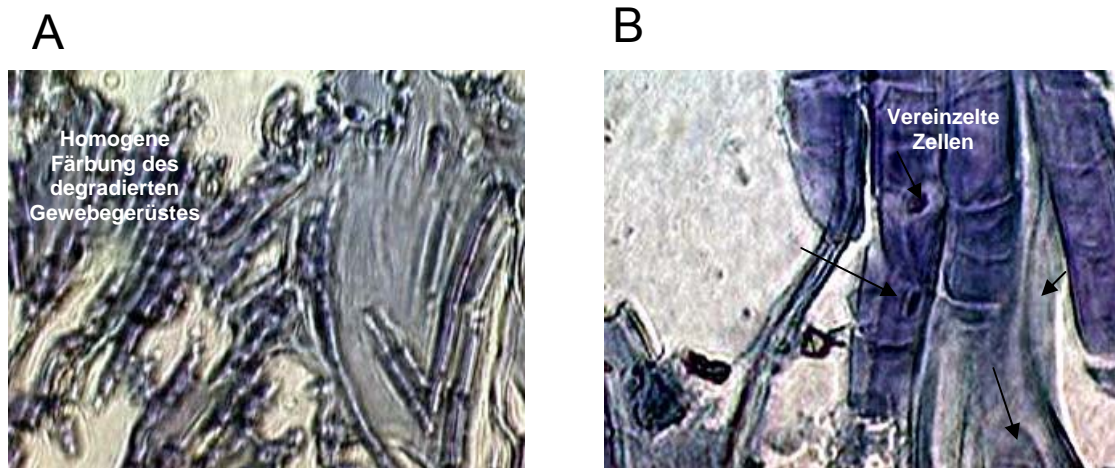
Auch diese Färbungen verdeutlichen die beginnende Degradation des Gewebegerüsts, vgl. Abb. 4-17.



**Abb. 4-17, Ethisorb®:** 23 Tage nach Zellbesiedelung, Trichrom-Färbung (A) Degradiertes Gewebegerüst (B) Eine einzelne Zelle adhärirt an einer Faser. Azan-Färbung (C) Degradiertes Gewebegerüst. (D) Eine einzelne Zelle befindet sich parallel an die Faser des Trägermaterials angelagert. Vergr. (A), (C) 60fach; (B), (D) 150fach

*Immunhistochemische Charakterisierung*

$\alpha$ -Aktin konnte mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises lichtmikroskopisch nicht erkannt werden. Die Zellen und die Reste des Gewebegerüsts sind sowohl in der Übersicht als auch in der Detailaufnahme homogen gefärbt, vgl. Abb. 4-18.



**Abb. 4-18, Ethisorb®:** (A) Übersichtsaufnahme: Degradiertes Gewebegerüst. (B) Detailaufnahme: Die Zellen sind nur vereinzelt darstellbar. Vergr. (A) 40fach; (B) 150fach

## 4.2 In vivo Untersuchungen

### 4.2.1 Tutomesh®-H-Trägermaterial

#### ***Unbesiedeltes Trägermaterial***

##### *Hämatoxylin Eosin-Färbung*

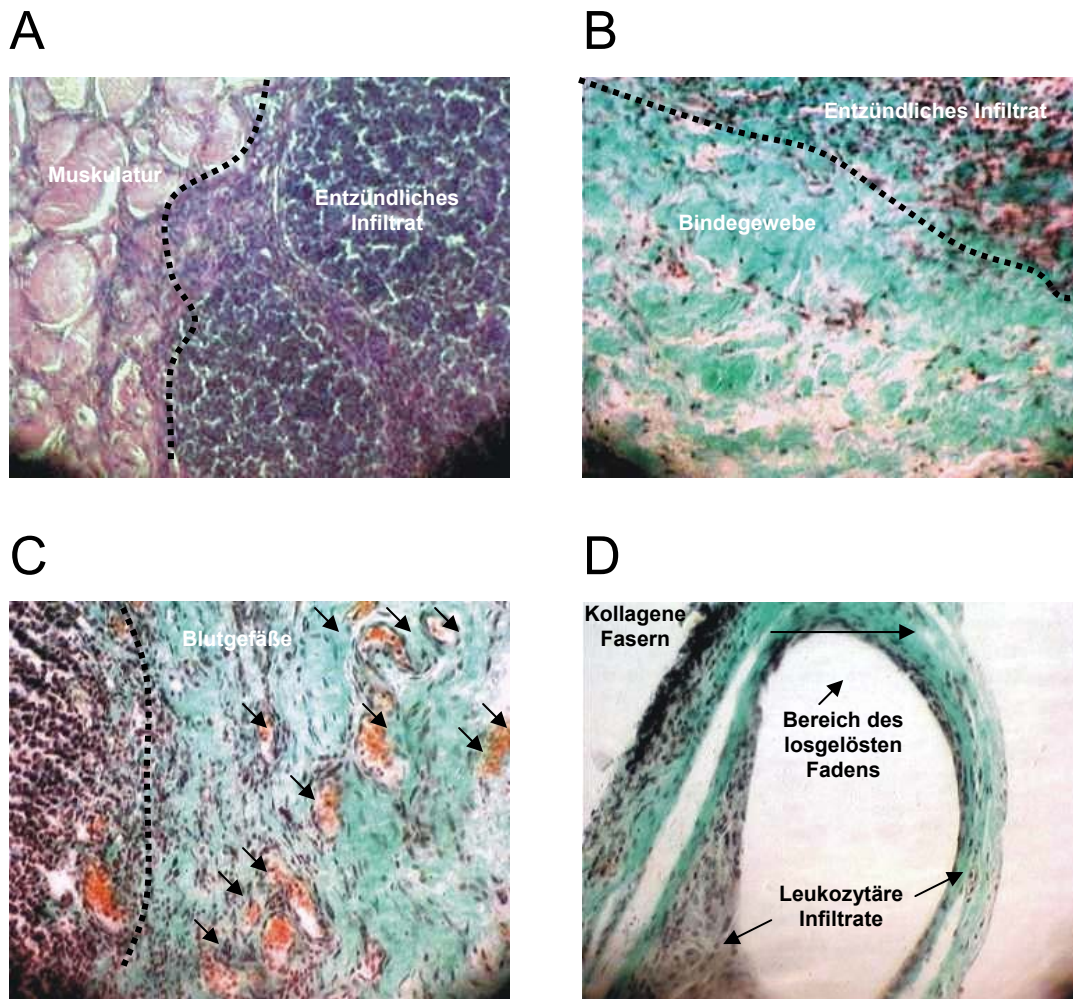
Das unbesiedelte Transplantat ist deutlich von dem nativen Gewebe abzugrenzen. Im Verlauf der vier Färbungen bietet sich ein heterogenes Bild. Die H. E.-Färbung zeigt Gebiete mit einer massiven Entzündungsreaktion, die sich weitgehend von der benachbarten Muskulatur abgrenzt, vgl. Abb. 4-19 (A).

##### *Trichrom-Färbung nach Goldner*

Mit der Trichrom-Färbung werden die inneren Bereiche des Gewebegerüstes dargestellt. Diese sehen zellreich aus und bestehen überwiegend aus Fibroblasten, locker gelegenen Kollagenfasern und kleinen Gefäßen, vgl. Abb. 4-19 (C). Entzündliche Infiltrate, die das Transplantat ummauern und deren Ausläufer ins Innere weisen, sind auch hier zu erkennen, vgl. Abb. 4-19 (B). Das Fadenmaterial ist von einer zirkulären Schicht von Entzündungszellen umschlossen, vgl. Abb. 4-19 (D).

##### *Azan-Färbung nach Heidenhain*

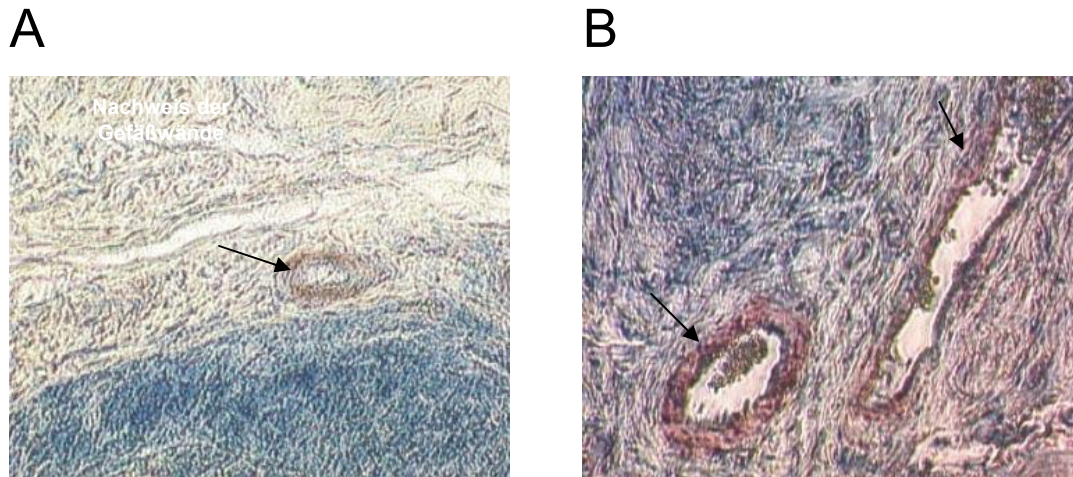
Die Azan-Färbung bestätigt den in den zuvor beschriebenen Färbungen gewonnenen Eindruck. Sie visualisiert die nur geringfügig entzündlich infiltrierten Bereiche und die kollagenen Fasern.



**Abb. 4-19, Tutomesh®-H:** (A) H. E.-Färbung: Die Übersichtsfärbung bietet das Bild einer massiven Entzündungsreaktion. (B), (C) Trichrom-Färbung: Im Inneren finden sich auch Areale mit kollagenen Fasern und Kapillaren. (D) Leukozytäre Infiltrate ummauern eine ovale Lücke, welche die Stelle des losgelösten Fadens darstellt. Vergr. (A), (B), (C) 40fach, (D) 60 fach

### *Immunhistologische Färbung*

Die immunhistologische Färbung des unbesiedelten Implantates fällt erwartungsgemäß negativ aus. Es bietet sich das Bild eines unauffälligen Gewebes, vgl. Abb. 4-20 (A), (B). Die glatte Muskulatur der kleinen Gefäße schimmert rötlich braun, als Zeichen des Vorhandenseins von  $\alpha$ -Aktin innerhalb der Gefäßwand.

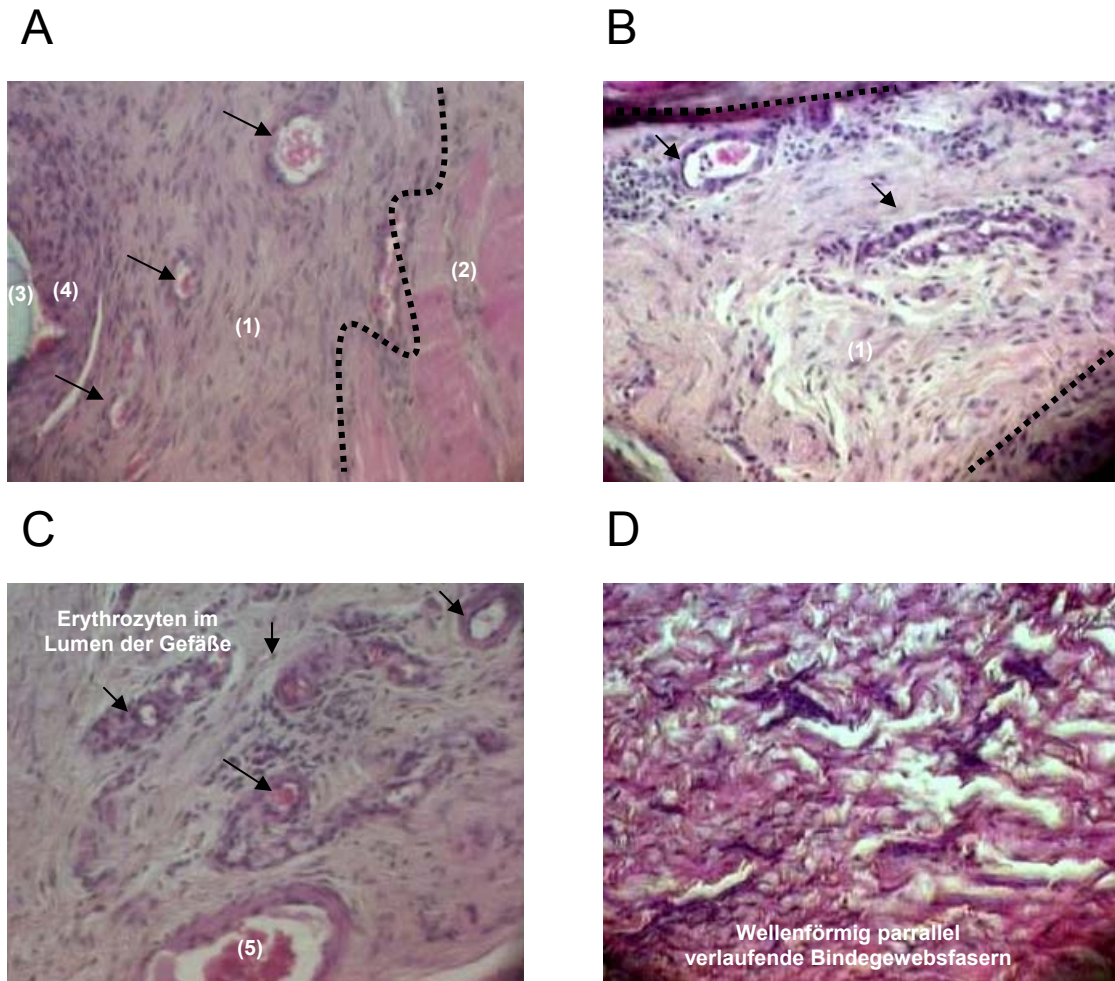


**Abb. 4-20, Tutomesh<sup>®</sup>-H:** (A), (B) Immunhistochemische Darstellung von  $\alpha$ -Aktin in einem Gewebeschnitt eines unbesiedelten Tutomesh<sup>®</sup>-Weichgewebetransplantates 54 Tage nach subkutaner Implantation.  $\alpha$ -Aktin ist in den Wänden der Blutgefäße nachweisbar ( $\rightarrow$ ). Vergr. (A) 40fach; (B) 100fach

### ***Besiedelte Trägermaterialien***

#### *H. E.-Färbung*

Wie schon bei den nativen Gewebegerüsten beobachtet, ist auch innerhalb dieser Präparate die Grenze zwischen Transplantat und nativem Gewebe deutlich zu ziehen. Die Histologie der Präparate erscheint sehr heterogen. Zum einen stechen Areale mit entzündlichen Infiltraten im Randbereich des Gewebegerüstes hervor. Zum anderen finden sich zellreiche Areale. Diese werden durch Fibroblasten und Kollagenfasern gebildet. Einige Gebiete sind frei von Zellen, hier finden sich lediglich sehr locker gelegene Kollagenfasern, ähnlich dem gefärbten *in vitro* Gewebegerüst. Auch bei diesem Präparat ist eine leukozytäre Infiltration, die den Haltefaden umkapselt, zu erkennen, vgl. Abb. 4-21.



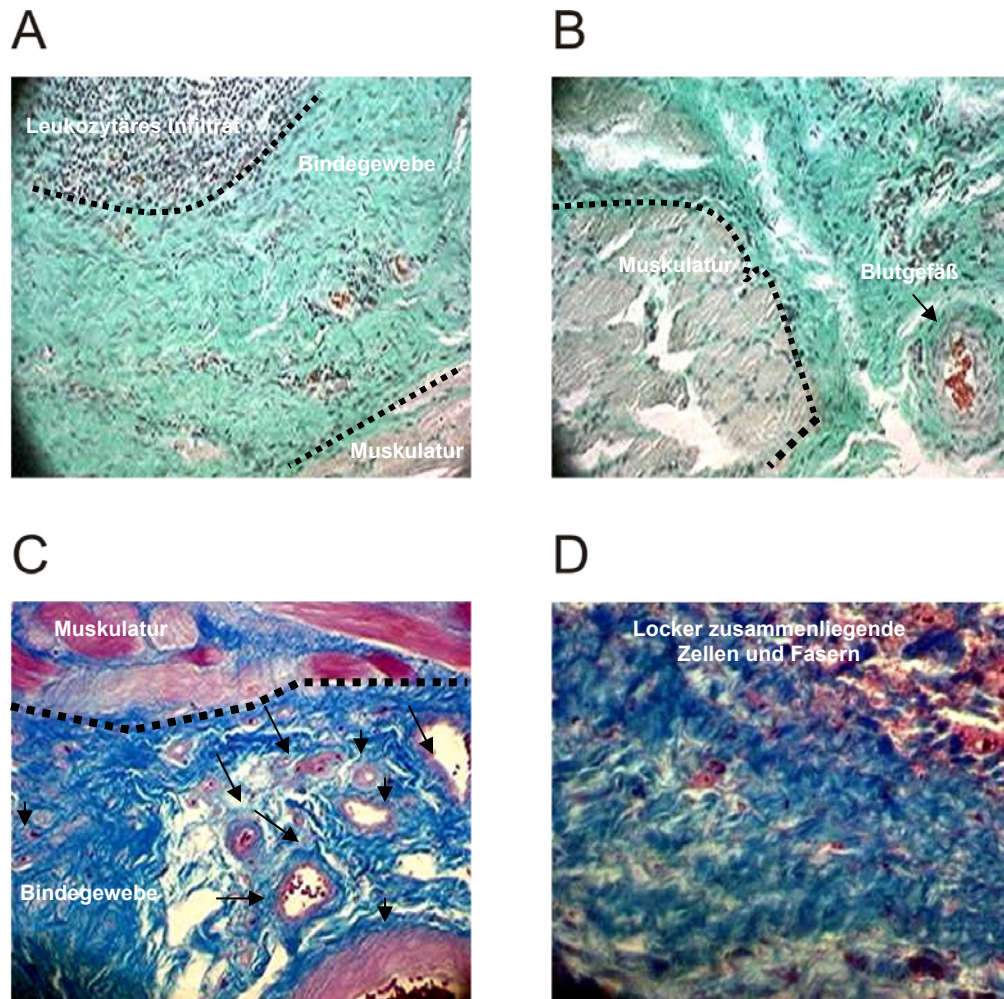
**Abb. 4-21, Tutomesh®-H:** H. E.-Färbung: Übersicht: (A) Es bietet sich ein sehr heterogenes Bild. Die Grenze zwischen Gewebegerüst (1) und umliegendem Muskelgewebe (2) ist deutlich zu ziehen. Am linken Bildrand ist der Rest des Befestigungsfadens (3) zu erkennen. Dieser wird von einem mehrschichtigen leukozytärem Infiltrat (4) ummauert. Im Inneren der Trägersubstanz sind vier kleine Gefäße (→) angeschnitten. Diese werden von einer Schicht Entzündungszellen umrandet. Im Lumen befinden sich Erythrozyten (5). Das umgebende ebenfalls zellreiche Gewebe besteht überwiegend aus kollagenen Fasern. (B) (C) Ausschnitt aus dem besiedelten Gewebegerüst. Dieses enthält viele, unterschiedlich große Blutgefäße. (D) Detail: Die locker gelegenen, wellenförmig parallel verlaufenden Bindegewebsfasern im Inneren des Gewebegerüsts sind scharf dargestellt. Vergr. (A), (B), 40fach; (C) 60fach (D) 100fach  
 (1) Gewebegerüst, (2) umliegendes Muskelgewebe (2), (3) Rest des Befestigungsfadens, (4) leukozytäres Infiltrat, (→) Gefäße, (5) Erythrozyten

#### *Trichrom-Färbung nach Goldner*

Die Trichrom-Färbung nach Goldner bestätigt den in der Übersichtsfärbung gewonnenen Eindruck: einerseits massive leukozytäre Infiltrate, die einen Bereich aus Kollagenfasern umschließen, andererseits zellfreie Areale, vgl Abb. 4-22 (A), (B).

*Azan-Färbung*

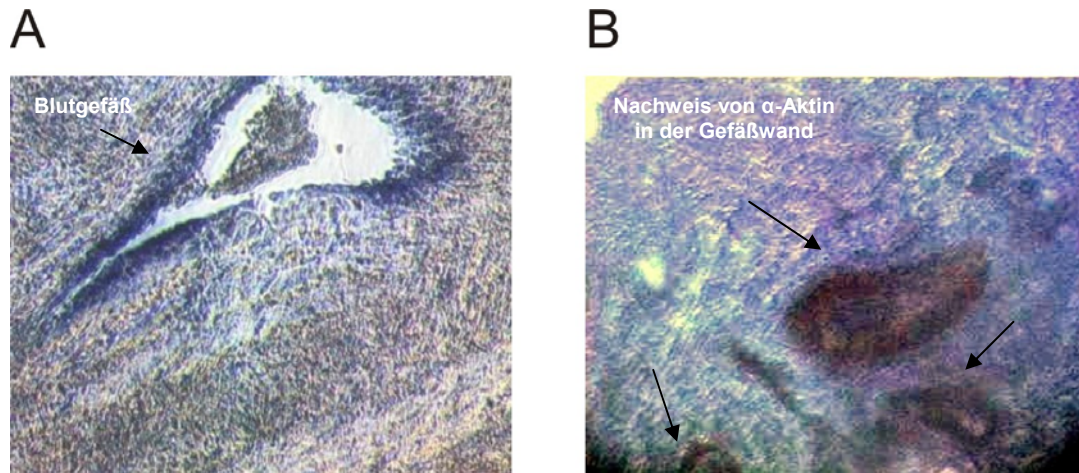
Durch die Azan-Färbung wird der massive Kollagengehalt des engineereten Gewebes offensichtlich. Die Unterscheidung der unterschiedlichen Strukturen wie Blutgefäße, kollagene Fasern, Muskulatur wird durch die unterschiedliche farbliche Kennzeichnung betont, vgl. Abb. 4-22.



**Abb. 4-22, Tutomesh®-H:** (A) Trichrom-Färbung: Die Dreischichtung ist deutlich zu erkennen: oberes Drittel massives, leukozytäres Infiltrat im Außenbereich des Gewebegerüsts, mittleres Drittel von Zellen durchsetztes, faserreiches Bindegewebe im Inneren der implantierten Matrix und unteres Drittel natives Muskelgewebe. (B) Am rechten äußeren Bildrand ist ein Blutgefäß angeschnitten (C), (D), Azan-Färbung: In dieser Färbung sind auch zellfreie Areale zu erkennen. Sie bestehen aus bindegewebigen Fasern, die deutlich von der umliegenden quergestreiften Muskulatur des M. sphincter externus zu trennen sind. Außerdem sind die zahlreichen Blutgefäße (→) sichtbar. (D) Das engineerete Gewebe besteht aus locker zusammen gelegenen Zellen und Fasern. Vergr. (A), (B), (C) 40fach; (D) 100fach

*Immunhistologische Färbung*

Die immunhistologische Färbung konnte  $\alpha$ -Aktin im engineerten Gewebe nicht nachweisen, vgl. Abb. 3-23.



**Abb. 4-23, Tutomesh®-H:** Immunhistochemische Färbung: (A) Zentral ist ein Blutgefäß quer angeschnitten. Im Lumen befinden sich Erythrozyten. (B) Im linken, unteren Bildbereich ist ein Blutgefäß quer und in der mittleren, rechten Bildhälfte längs angeschnitten. Die Gefäßwände beider Kapillaren werden durch braun-rötlich angefärbte Zellen gebildet, als Zeichen des Vorhandenseins von  $\alpha$ -Aktin. Im Lumen befinden sich Erythrozyten. Das umliegende Gewebe besitzt eine faserige Struktur. Vergr. 100fach

#### 4.2.2 Ethisorb® Dura Patch

##### *Unbesiedeltes Gewebegerüst*

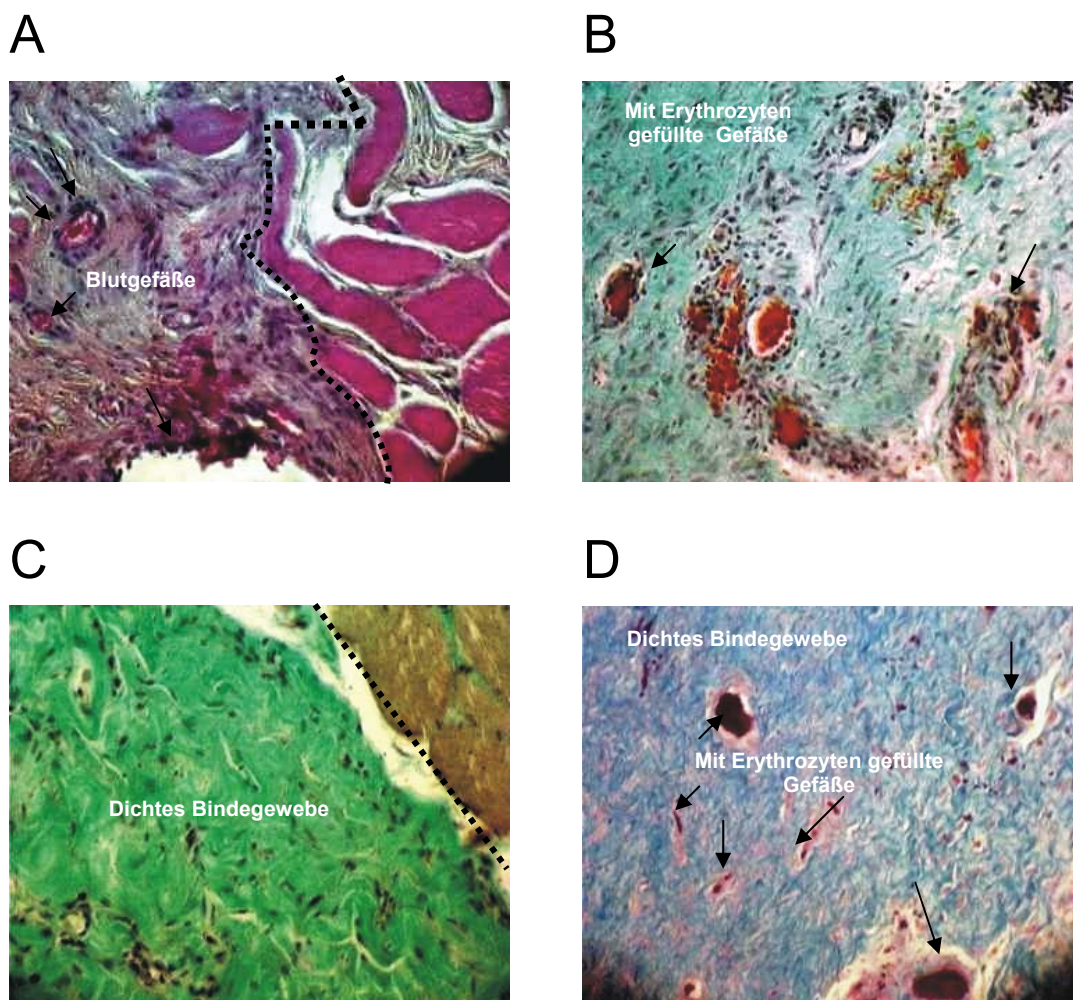
##### *Hämatoxylin Eosin-Färbung*

In der Übersichtsaufnahme sind das Ethisorb® Dura Patch bzw. dessen Residuen deutlich zum umliegenden Gewebe abgrenzbar. Auch in diesem Transplantat lassen sich leukozytäre Infiltrate erkennen, die die herausgelösten Befestigungsfäden umschließen. Bei dem das Gewebegerüst umgebenden Gewebe handelt es sich um Muskelzellverbände. Diese erscheinen reizfrei. Hinweise für Malignität sind nicht vorhanden, vgl. Abb. 4-24 (A).



*Trichrom-Färbung nach Goldner und Azan-Färbung nach Heidenhain*

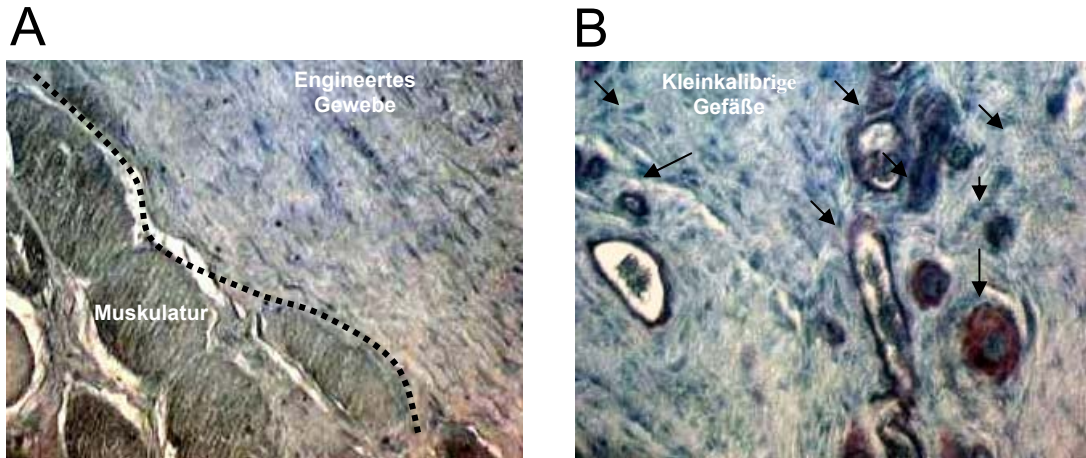
Die Trichrom-Färbung nach Goldner und die Azan-Färbung nach Heidenhain bestätigen die in der H. E.-Färbung erzielten Beobachtungen: Die inneren Anteile des Gewebegerüsts sind von einem entzündlichen Infiltrat durchsetzt. Die intensiv grüne Färbung stellt dichtes Bindegewebe an der Grenze zum nativen Gewebe dar, vgl. Abb. 4-24 (B), (C). Im unteren Bildbereich, vgl. Abb. 4-24 (B) ist ein Gefäß zu erkennen, welches im Lumen von Erythrozyten ausgefüllt ist.



**Abb. 4-24, Ethisorb®:** (A) H. E.-Färbung: Am unteren Bildrand fällt ein rundovales Loch auf. Es wird durch einen herausgelösten Befestigungsfaden des Gewebegerüsts hervorgerufen und wird von einer dünnen Schicht eines zellulären Infiltrats umrandet. Die Grenze zum angrenzenden quergestreiften Muskelgewebe ist deutlich zu ziehen. (B), (C) Die Trichrom-Färbung zeigt Anteile des Gewebegerüsts, in denen zahlreiche Kapillare (→) vorzufinden sind. Diese kleinen Gefäße (→) sind von einem perivaskulären Infiltrat begrenzt. (D) Auch in der Azan-Färbung wird der dichte Kollagengehalt des engineerten Gewebes offensichtlich. Darüber hinaus ist auch hier eine Vielzahl von Blutgefäßen zu erkennen. Vergr. 40fach

### Immunhistologische Färbung

In der immunhistologischen Färbung sind die inneren Gewebegerüstanteile erwartungsgemäß unauffällig angefärbt. Die intensivere Färbung wird durch leukozytäre Infiltrationen hervorgerufen, vgl. Abb. 4-25.



**Abb. 4-25, Ethisorb®:** Immunhistologische Färbung: (A) Die Grenze zwischen Muskulatur und engineerterem Gewebe ist deutlich zu ziehen (B) Detail: Es bietet sich das Bild einer faserigen Struktur. Zellen sind nicht zu erkennen. (A) 80fach; (B) 100fach

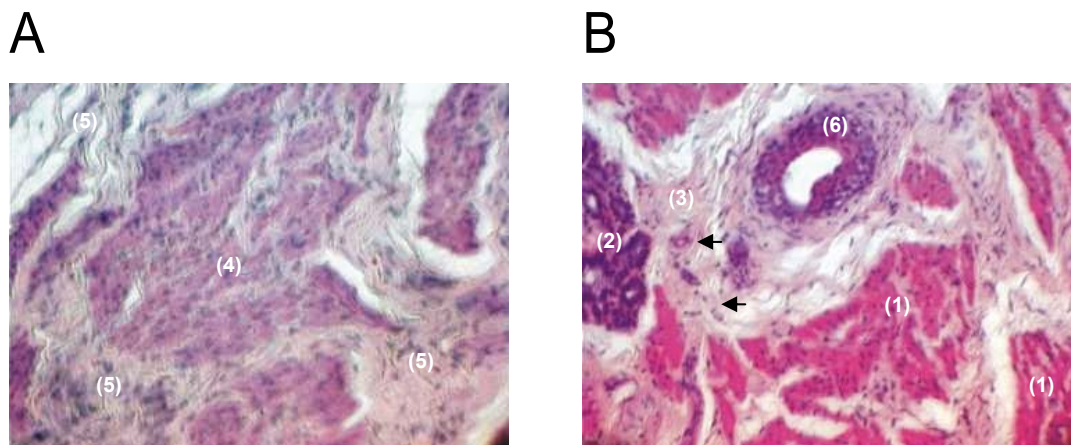
### Besiedeltes Gewebegerüst

#### H. E.-Färbung

Wie schon bei den vorherigen Transplantaten ist auch innerhalb dieser Präparate in der Übersichtsaufnahme das Gewebegerüst leicht zu demaskieren. Zum einen grenzt es sich gut gegen das umliegende Gewebe ab, zum anderen dienen die Haltefäden als Markierung. Bei dem übrigen Gewebe handelt es sich um glatte Muskelzellverbände. Wie bei dem azellulären Gewebegerüst sind auch hier die Befestigungsfäden von einer dezenter Schicht eines zellulären Infiltrates umschlossen. Des Weiteren ist die homogene Anordnung einer dichten Zellansammlung festzustellen. Innerhalb des Zellverbandes befinden sich kleinkalibrige Gefäße mit dezenter perivaskulärer Zellproliferation. In regelmäßigen Abständen lassen sich in dem Präparat kleine Zellverdichtungen nachweisen. Die stärkere Vergrößerung erlaubt eine genauere Beschreibung der in der Übersicht beobachteten Zellansammlungen. Diese werden durch rundliche,

polymorphe Zellen gebildet, wobei die Frage nach der Dignität nicht eindeutig beantwortet werden kann. Vermutlich handelt es sich um Makrophagen.

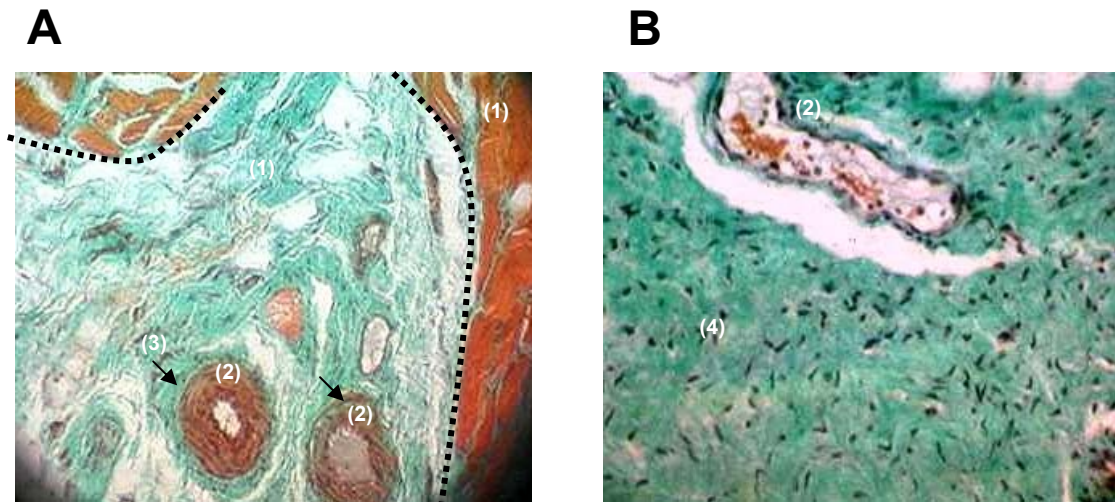
Die Grenze zum nativen Gewebe bildet ein zellreiches Bindegewebe, welches kapselartig das Gewebegerüst umschließt. Dieses setzt sich aus wellenförmig, unregelmäßig verlaufenden kollagenen Fasern zusammen. In der Detailaufnahme ist die Anlagerung von Fibroblasten zu beobachten. Die inneren Gewebegerüstanteile sind ebenfalls von einer Leukozyteninfiltration durchsetzt. Kleine Kapillaren sind vereinzelt in das implantierte Material eingesprosst, vgl. Abb. 4-26.



**Abb. 4-26, Ethisorb®:** (A), (B): Die H. E.-Färbung zeigt ein heterogenes Bild: Kollagene Fasern, entzündliche Infiltrate, kleine Blutgefäße. Vergr. 40fach  
 (1) Muskelzellverbände, (2) Zelluläres Infiltrat, (3) kleinkalibrige Gefäße mit dezenter perivaskulärer Zellproliferation, (4) zellreiches Bindegewebe, (5) kollagene Fasern, (6) losgelöster Haltefaden

*Trichrom-Färbung nach Goldner*

Die Trichrom-Färbung nach Goldner bestätigt den in der Übersichtsfärbung gewonnen Eindruck: einerseits massive leukozytäre Infiltrate, die einen Bereich aus Kollagenfasern umschließen, andererseits zellfreie Areale, vgl. Abb. 4-27.

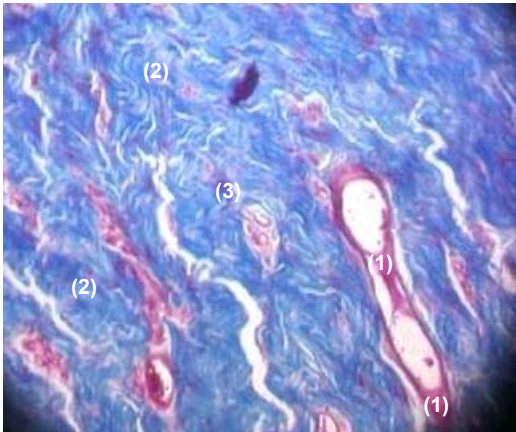


**Abb. 4-27, Ethisorb®.** (A) Am rechten Bildrand ist die Grenze zum Muskelgewebe (1) deutlich zu ziehen. Im inneren Gewebegerüstbereich sind Blutgefäße (2) sichtbar, die von einem perivaskulärem Infiltrat (3) ummauert sind. Einige Bereiche sind frei von Zellen, hier finden sich lediglich sehr locker gelegene Kollagenfasern (4) ähnlich dem gefärbten in-vitro Präparat. Auch das umliegende quergestreifte Muskelgewebe ist von vereinzelt leukozytären Zellen infiltriert. Es sieht so aus, als wenn das Gewebegerüst ins Empfängergewebe integriert worden ist. (B) Detailaufnahme: dichtes Bindegewebe von kleinen Zellen durchsetzt. Vergr. (A) 40fach; (B) 100fach

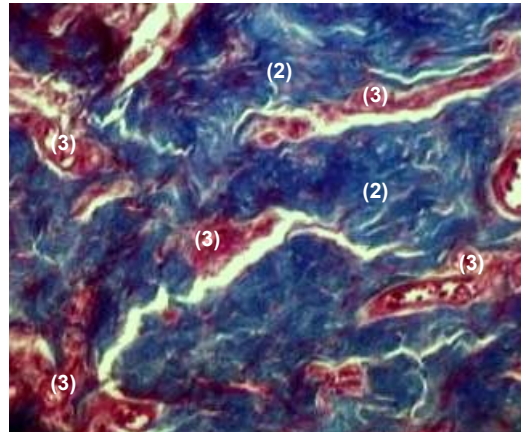
*Azan-Färbung*

Die Azan-Färbung gibt deutlicher als die anderen beiden Färbungen Hinweise auf Residuen des Gewebegerüsts. Außerdem wird der massive Kollagengehalt des engineereten Gewebes offensichtlich. Zahlreiche Blutgefäße sind zu demaskieren, vgl. Abb. 4-28.

A



B

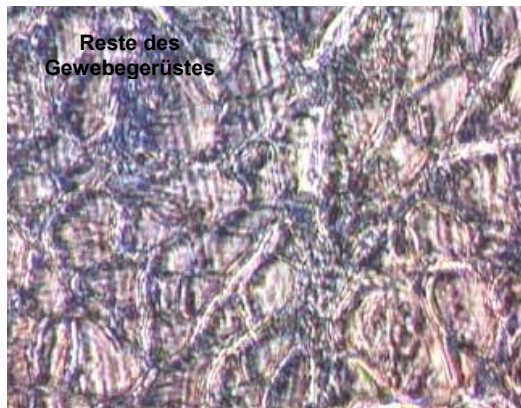


**Abb. 4-28, Ethisorb®:** (A) In der Übersicht fällt der massive Kollagengehalt des Gewebes auf. In der rechten Bildhälfte befinden sich zwei Löcher. Es handelt sich um die Stellen der losgelösten Befestigungsfäden. Diese sind von einem Infiltrat begrenzt. (B) Es bietet sich ein buntes Bild, welches aus kollagenen Fasern (2), quer und längs angeschnittenen Blutgefäßen (3) und Resten des Gewebegerüsts zusammengesetzt ist. Vergr. (A) 40fach, (B) 100fach

### *Immunhistologie*

Im immunhistochemischen Nachweis ist  $\alpha$ -Aktin im Bereich des Gewebegerüsts nicht zu erkennen, vgl. Abb. 4-29.

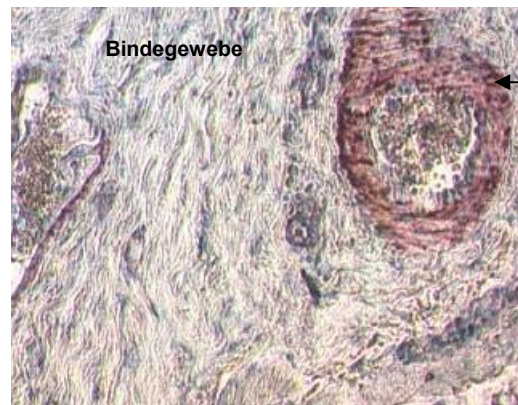
A



B



C



Nachweis von  $\alpha$ -Aktin in der Gefäßwand

**Abb. 4-29, Ethisorb®:** (A), (B), (C) In der immunhistochemischen Färbung bietet sich ein homogenes unauffälliges Bild.  $\alpha$ -Aktin ist in der glatten Muskulatur der Gefäßwand nachweisbar. Vergr. (A) 40fach; (B) (C) 100fach

### 4.3 Optisches Registrierverfahren

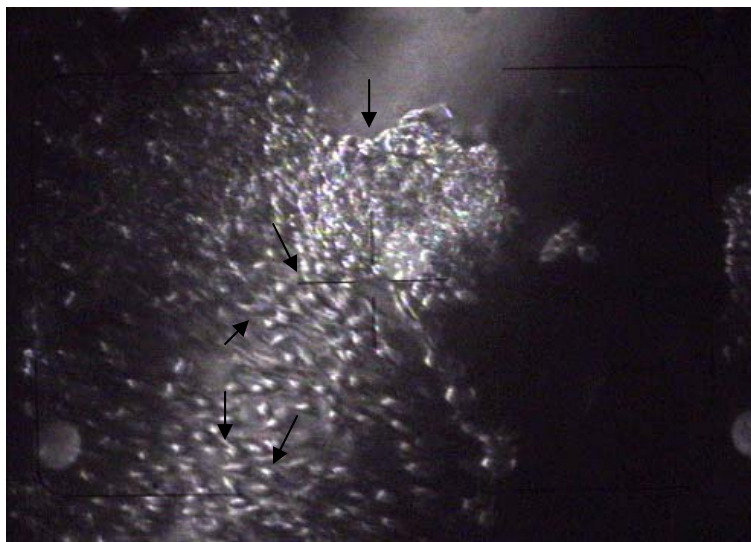
Der Nachweis der Vitalität und der Membranpotentialänderungen der kultivierten Zellen erfolgte in Form eines elektrophysiologischen Nachweises. Das bei dieser Methode verwendete optische Registrierverfahren dient dem Nachweis von Membranpotentialänderungen der Zelle mittels Fluoreszenzänderungen des spannungssensitiven Farbstoffes RH 795. So wird eine Beurteilung des Membranpotentials jeder einzelnen Zelle ermöglicht. Die Abbildungen 4-30 bis 4-32 zeigen die Reaktion einer Muskelzelle, die zuvor mit RH 795 markiert wurde, auf Zellreizung.



**Abb. 4-30:** Mit RH 795 markierte Zellen bei Zellreizung und gleichzeitiger Belichtung.  
Vergr. 150fach



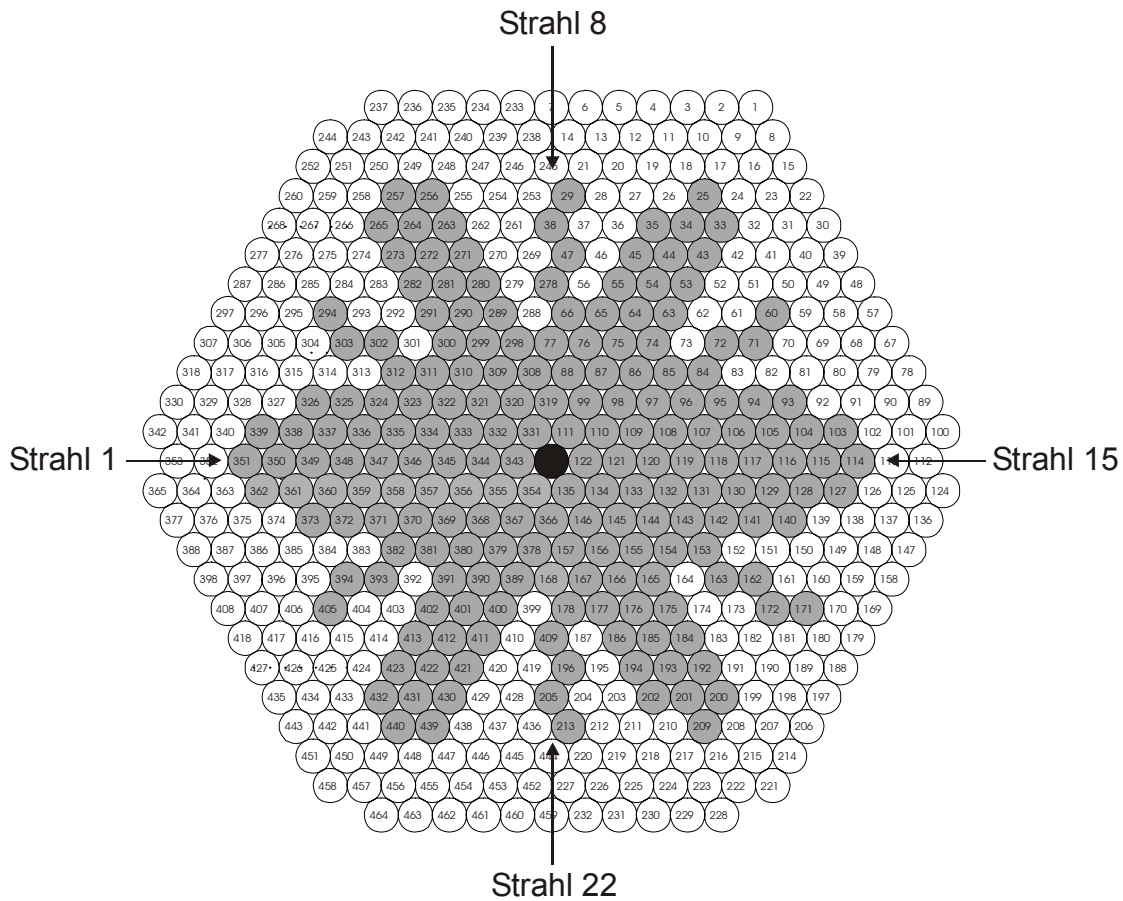
**Abb. 4-31:** Mit RH 795 markierte Zellen bei Zellreizung und gleichzeitiger Belichtung. Die Zellen scheinen über Ausläufer (→) miteinander verbunden zu sein. Vergr. 150 fach



**Abb. 4-32:** Mit RH 795 markierte Zellen bei Zellreizung und gleichzeitiger Belichtung. Die Zellen scheinen über Ausläufer (→) miteinander verbunden zu sein. Vergr. 150fach

Die Signale von 464 Dioden bildeten ein Hexagon. Die Dioden, deren aufgenommenen Fluoreszenzsignale Reizantworten erkennen ließen, wurden einer detaillierten Auswertung zugeführt. In der schematischen Darstellung sind sie markiert, vgl. Abb. 4-33. Die unmarkierten Dioden erfuhren keine weitere Berücksichtigung, da die von ihnen aufgenommenen Fluoreszenzsignale keine Membranpotentialänderungen erkennen ließen.





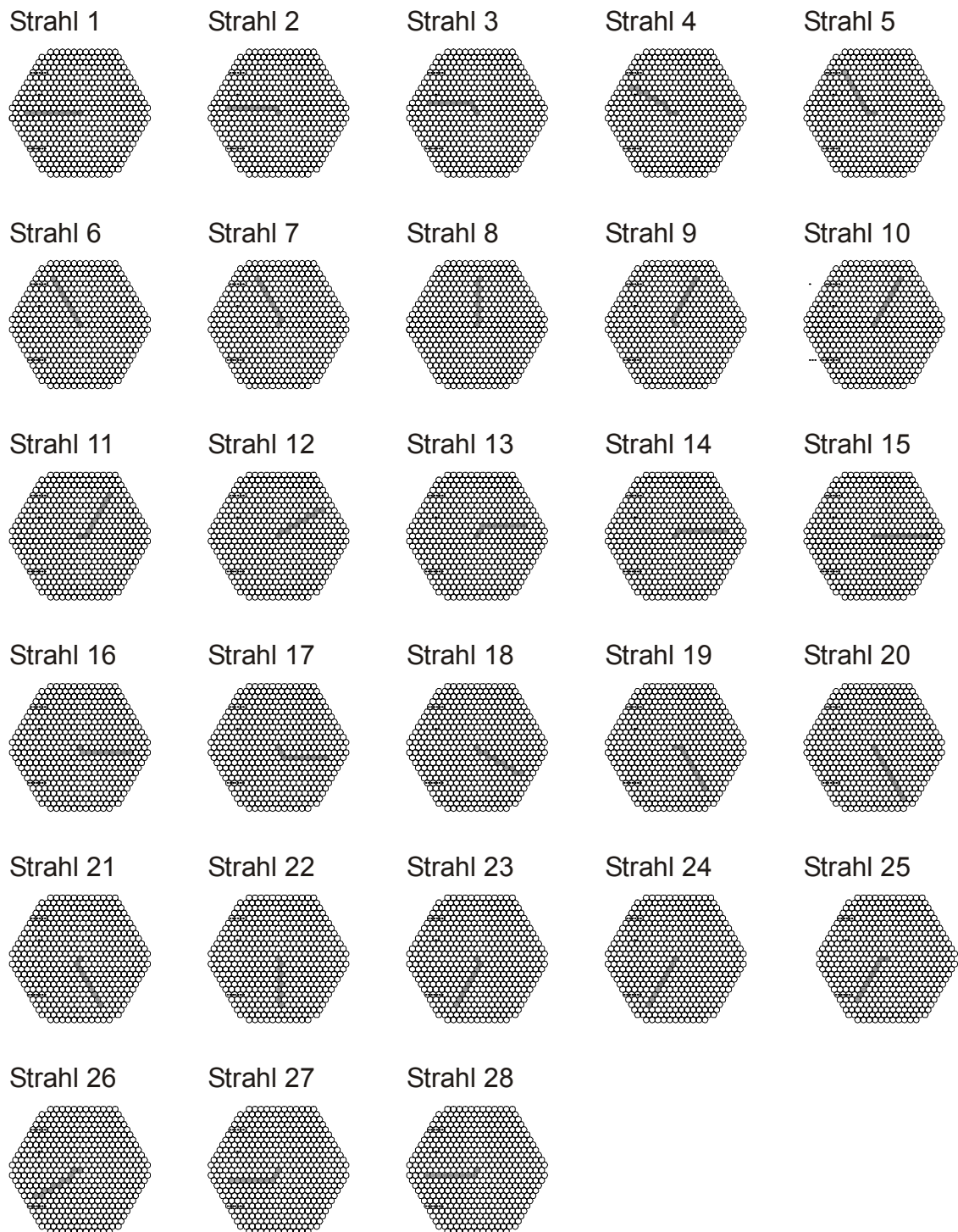
**Abb. 4-33:** Computerunterstützte graphische Darstellung der Dioden zur Aufnahme von Fluoreszenzsignalen. Abbildung der Dioden in Form eines Hexagons angeordnet und mit den Nummern 1 bis 464 bezeichnet. Die Signale, die über die grau markierten Dioden aufgenommen wurden, wurden einer detaillierten Auswertung zugeführt. Die übrigen fanden keine weitere Berücksichtigung, da die von ihnen aufgenommenen Fluoreszenzsignale keine Reizantworten erkennen ließen.

#### 4.3.1 Fluoreszenzstrahlen

Bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten wurden jeweils die Signale von Diodenreihen (Fluoreszenzstrahlen) ausgewertet und miteinander verglichen. Jeder Strahl wird von zehn benachbarten Dioden gebildet. Der Mittelpunkt des Hexagons stellt den Ausgangspunkt aller 28 Strahlen dar. Die Nummerierung der Strahlen erfolgt im Uhrzeigersinn, vgl. Abb. 4-34.

In allen 28 Strahlen sind negative Reizantworten als Hinweis auf eine Fluoreszenzzunahme/Hyperpolarisation festzustellen. Eine Ausnahme bilden die Strahlen 19, 21, 23, 25. Diese Strahlen bedürfen keiner näheren Erläuterung.

Die für unsere Untersuchung relevanten positiven Reizantworten werden in den Strahlen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 17, 26 und 28 beobachtet. In diesen Bereichen findet eine Fluoreszenzabnahme als Zeichen der Depolarisation statt. In diesen Arealen befinden sich vitale Zellen. Werden die Reizantworten bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten verglichen, wird offensichtlich, dass die Dioden bei Wechsel der relativen Reizintensität ähnliche Werte messen. Daraus folgt: Die Reizantworten der Zellen vollziehen sich unabhängig von der relativen Reizintensität, vgl. z. B. Abb. 4-46, Strahl 2. Trotz der Symmetrien sind jedoch auch gestreute Werte zu finden, vgl. z. B. Abb. 4-48, Strahl 5 oder Abb. 4-49, Strahl 6.



**Abb. 4-34:** Schematische Darstellung zum Auswertungsverfahren. Es wurden jeweils die Signale von Diodenreihen (Fluoreszenzstrahlen) ausgewertet. Die Position dieser Strahlen, ausgehend vom Mittelpunkt des Hexagons, ist jeweils markiert. Es ergeben sich 28 Fluoreszenzstrahlen.

## Originalregistrierungen

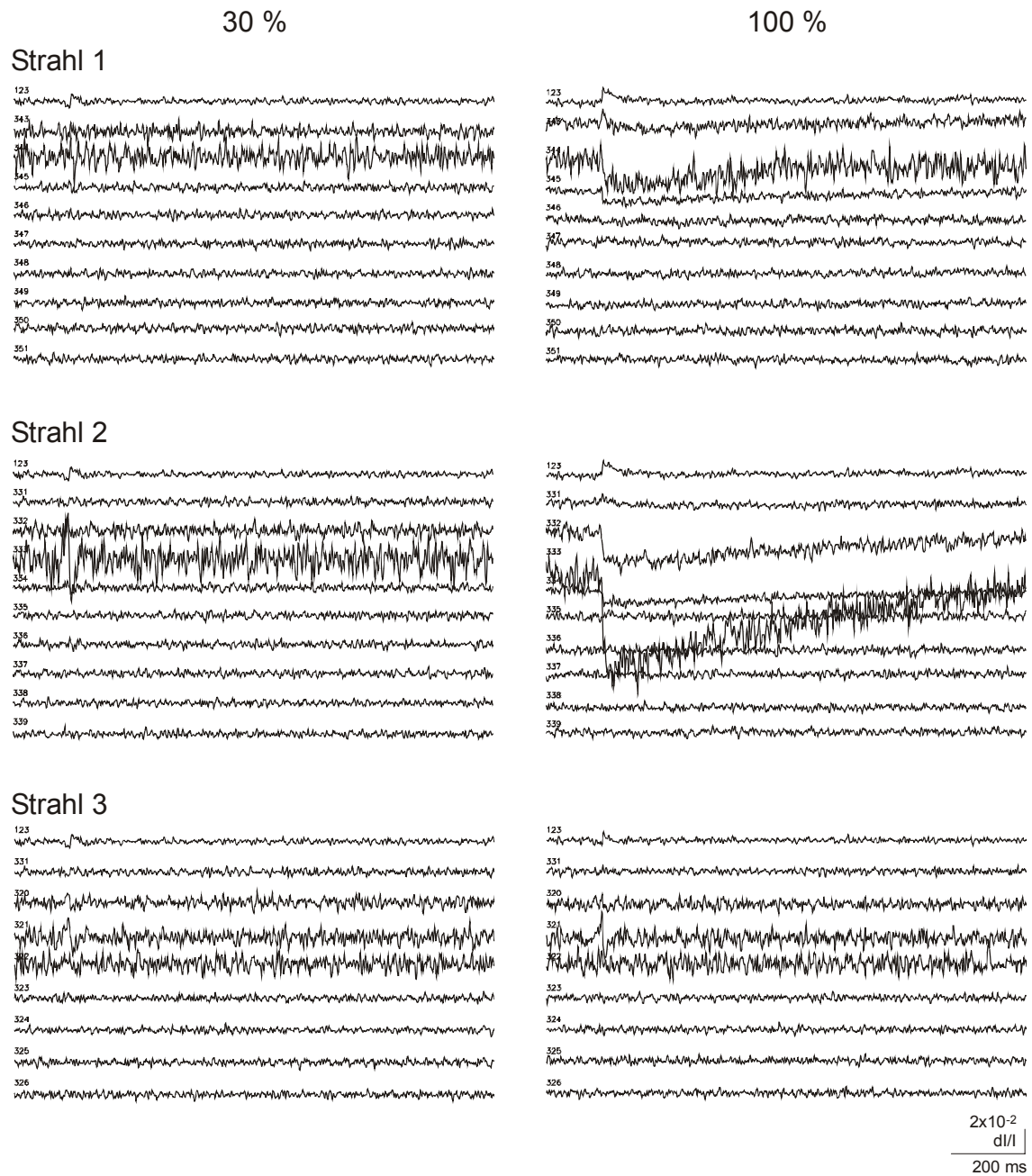
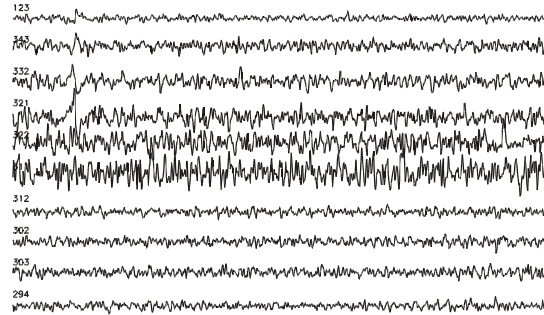
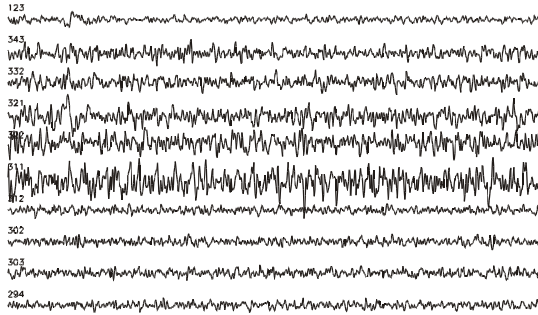


Abb. 4-35: Strahl 1 bis 3

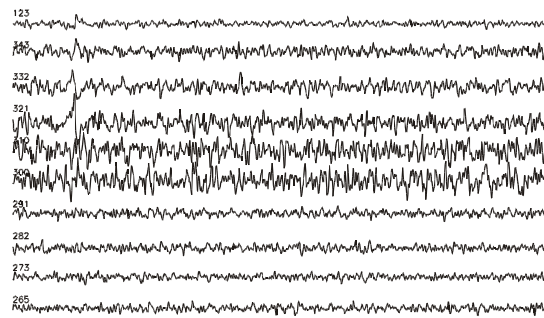
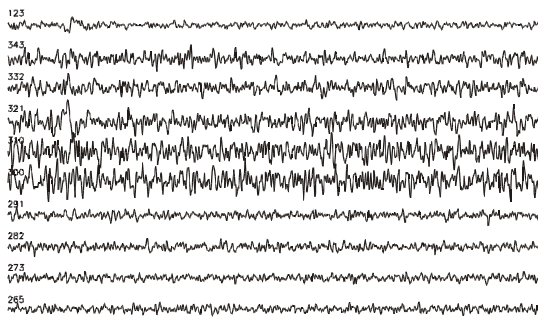
30 %

100 %

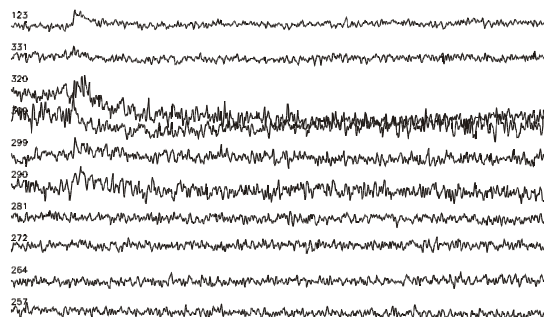
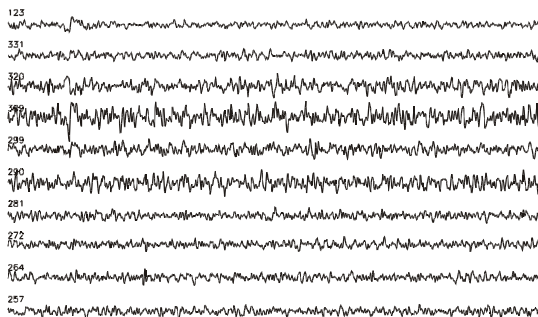
Strahl 4



Strahl 5



Strahl 6



$2 \times 10^{-2}$   
 $\frac{dl/l}{200 \text{ ms}}$

Abb. 4-36: Strahl 4 bis 6

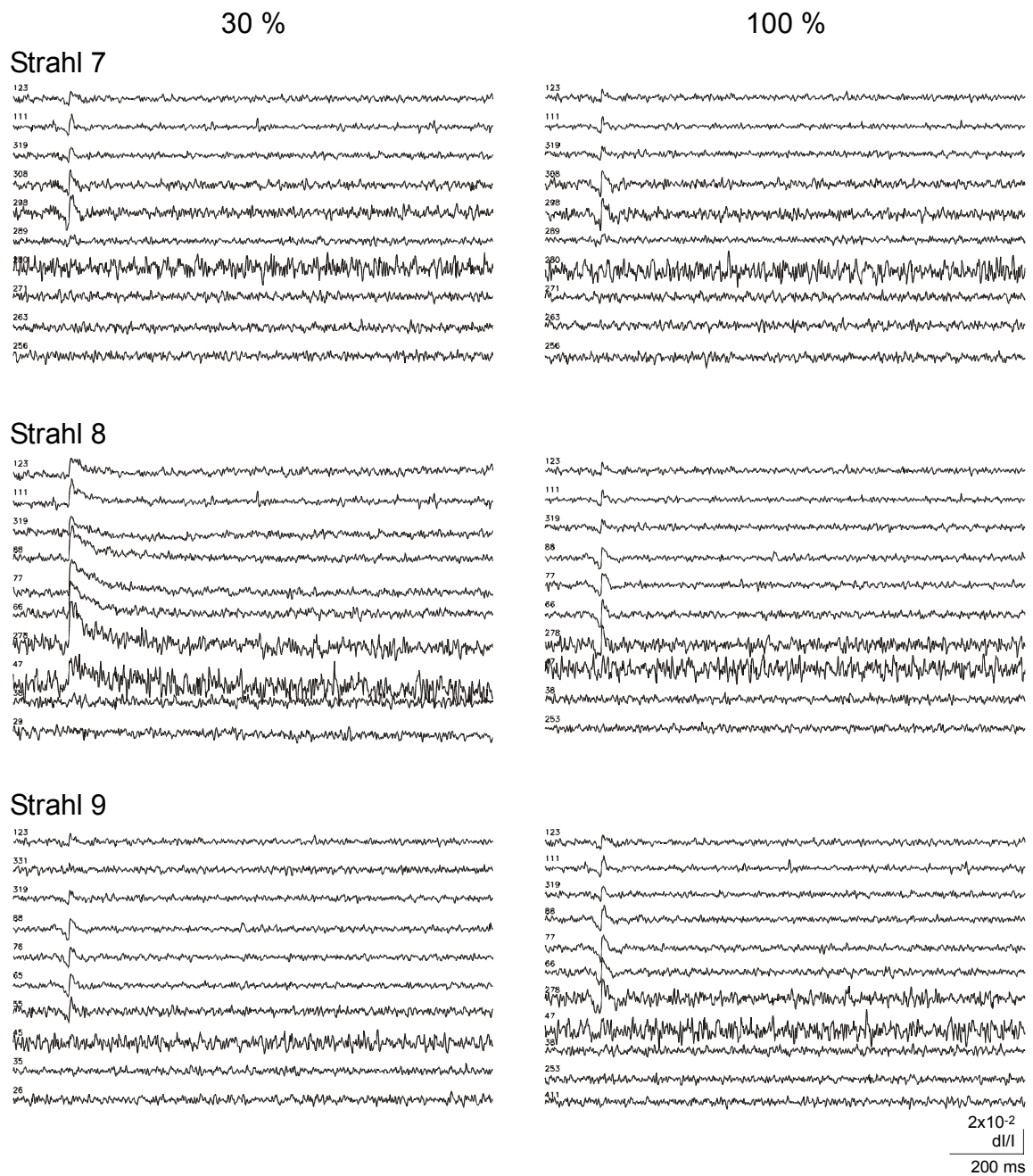


Abb. 4-37: Strahl 7 bis 9

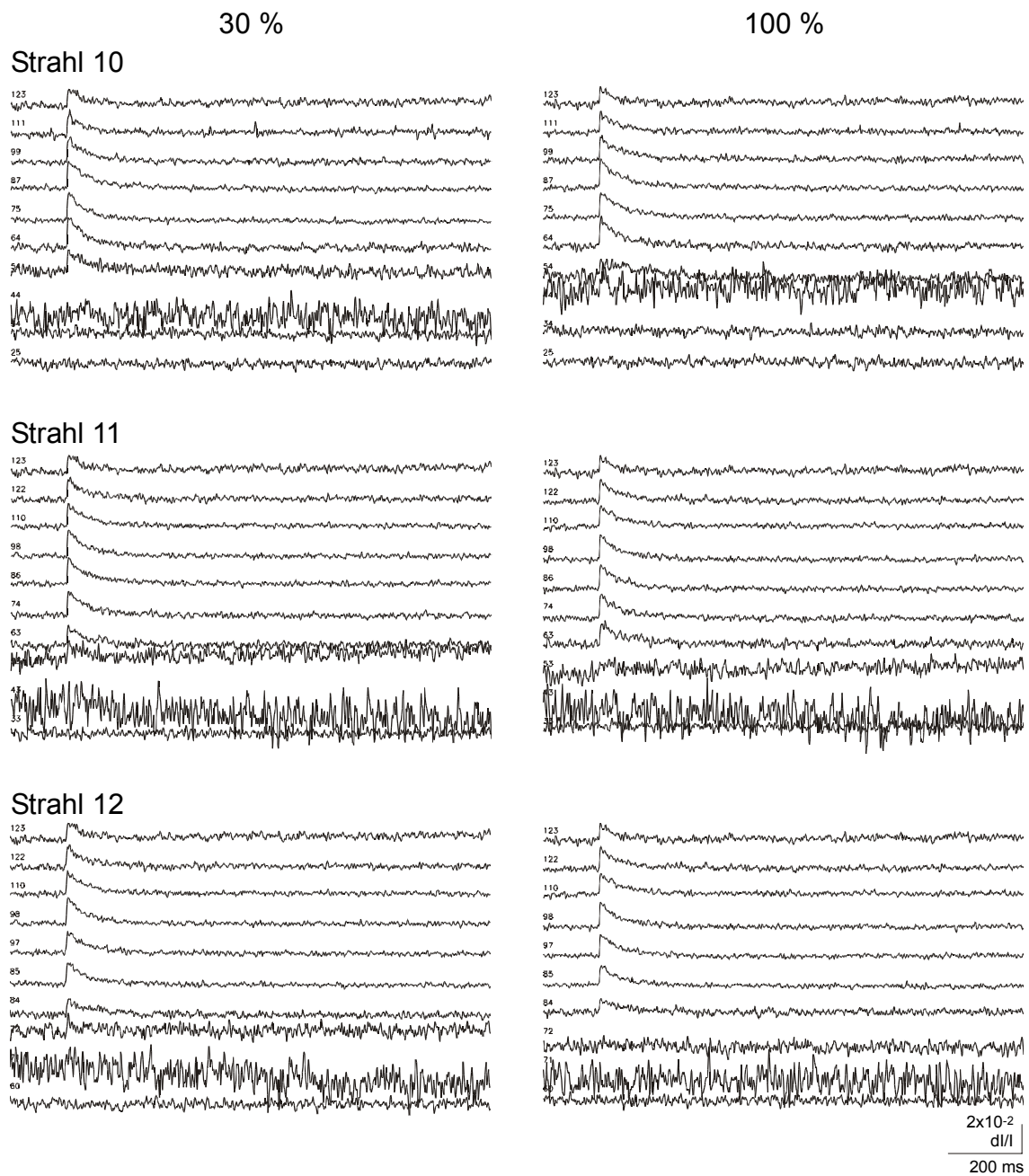


Abb. 4-38: Strahl 10 bis 12

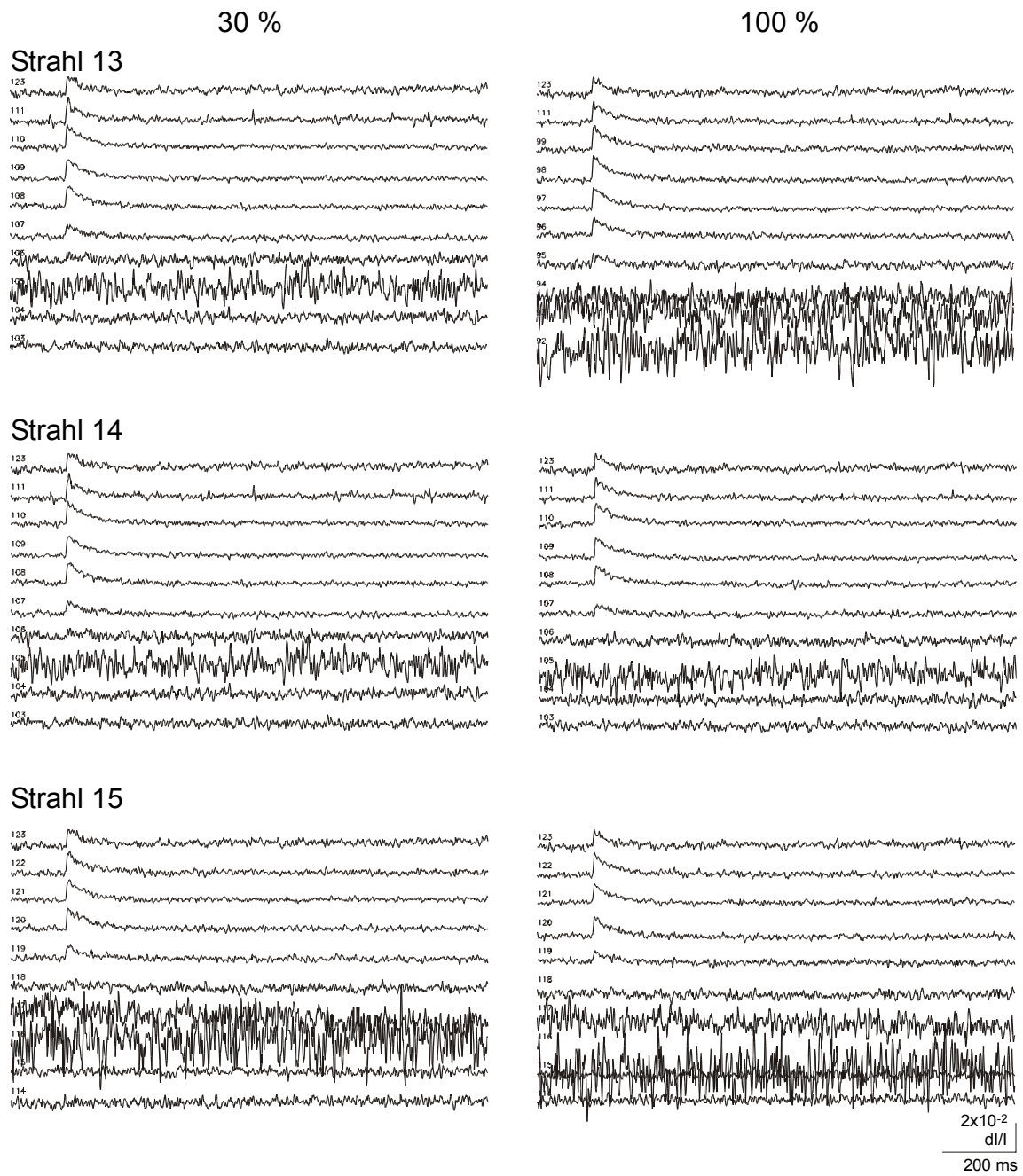


Abb. 4-39: Strahl 13 bis 15



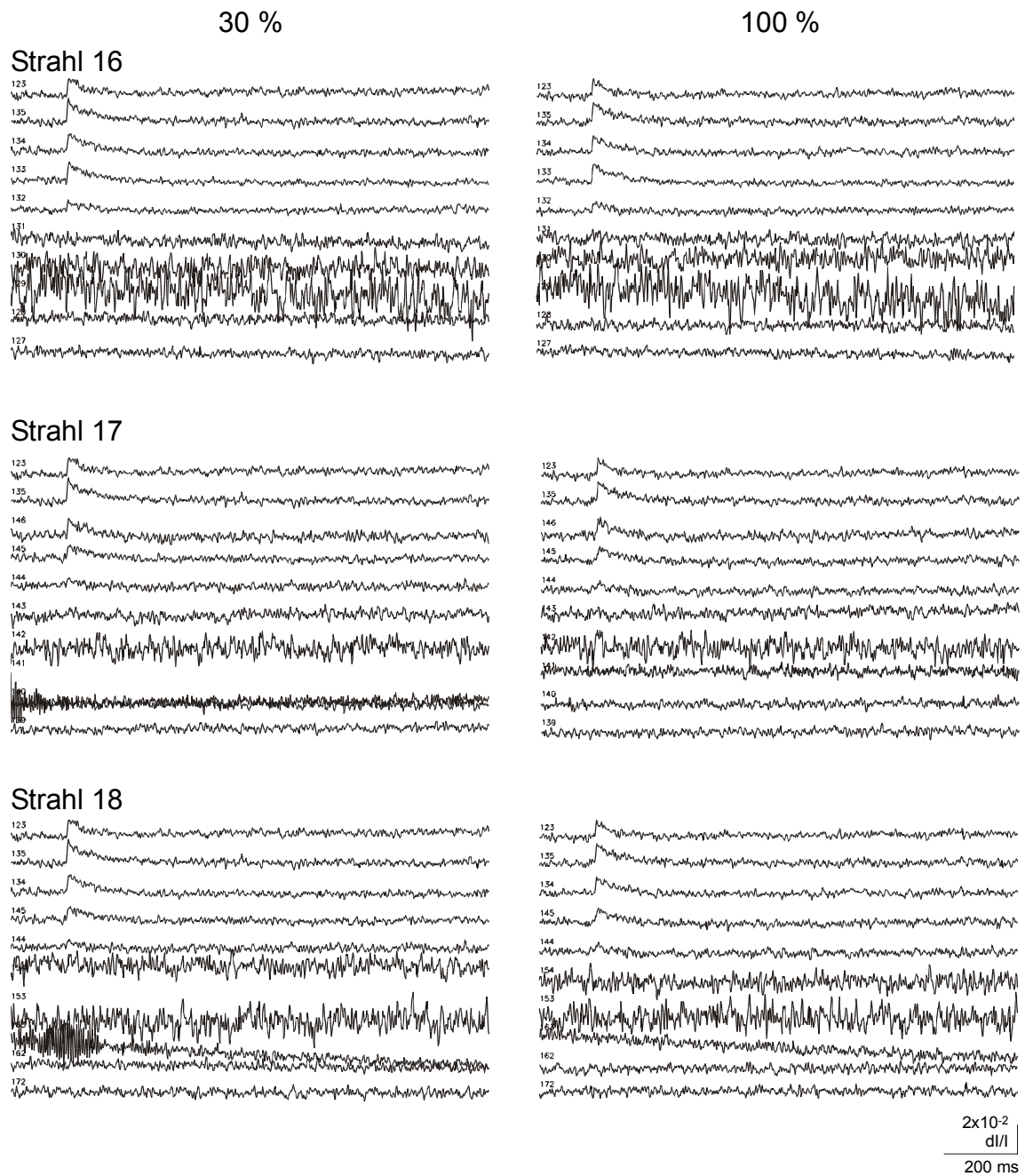


Abb. 4-40: Strahl 16 bis 18

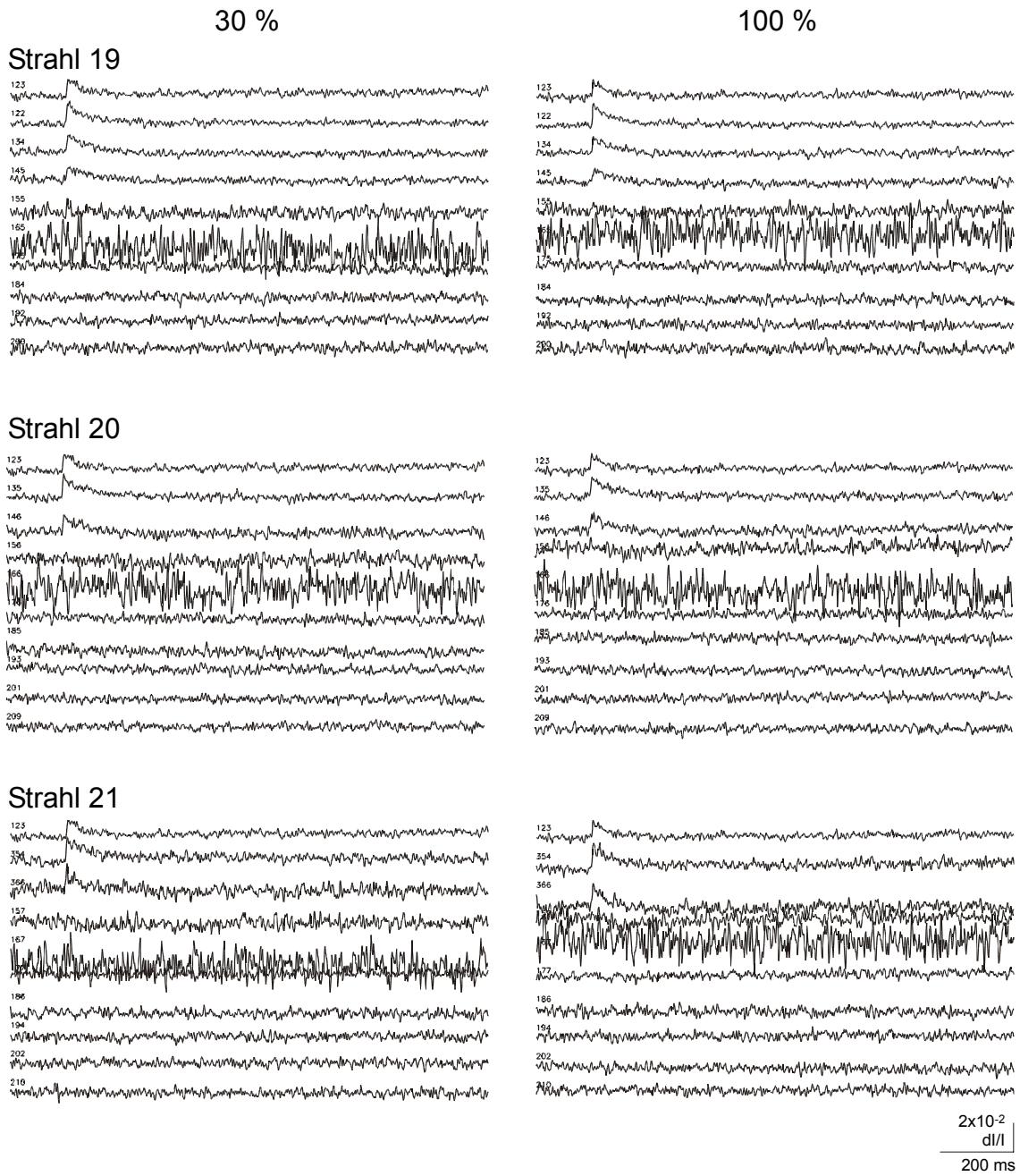


Abb. 4-41: Strahl 19 bis 21

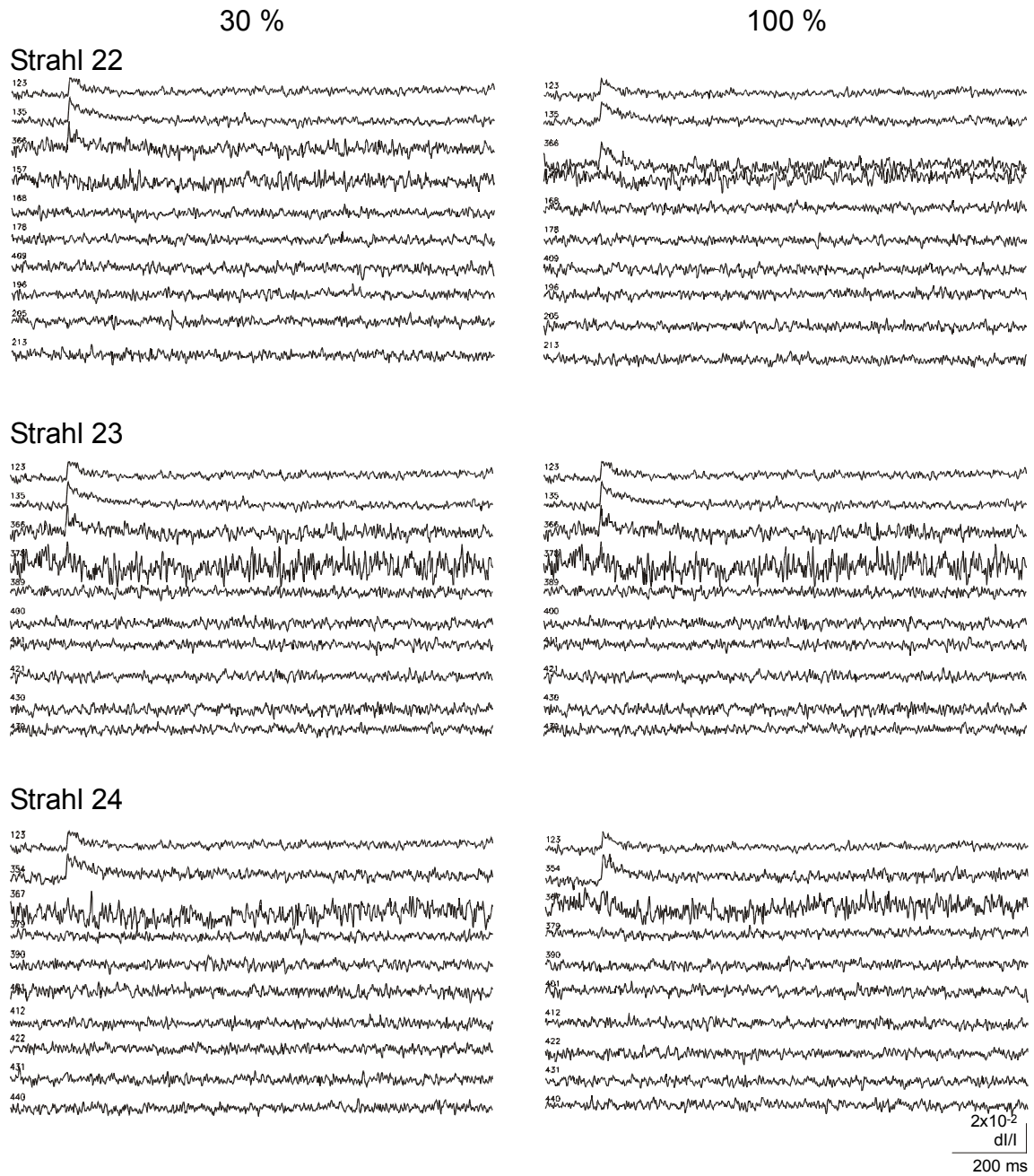
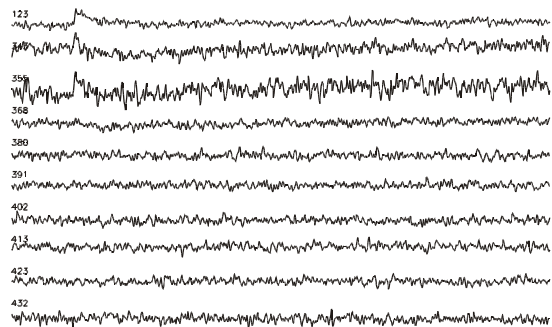
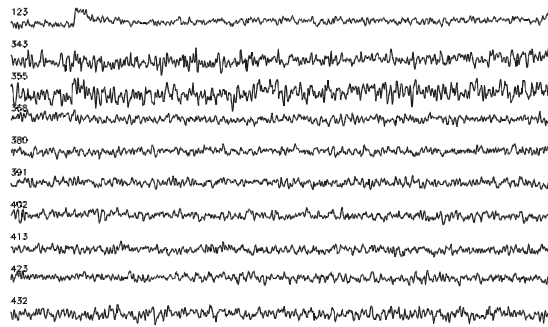


Abb. 4-42: Strahl 22 bis 24

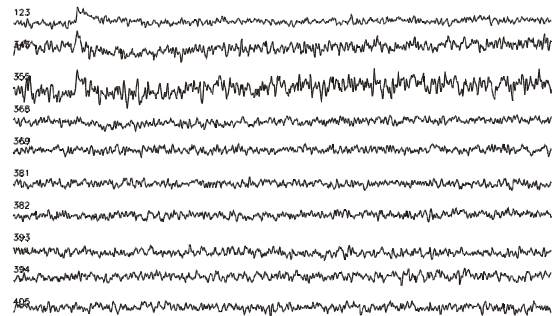
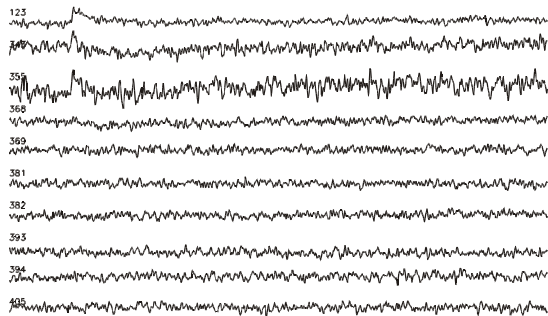
30 %

100 %

Strahl 25



Strahl 26



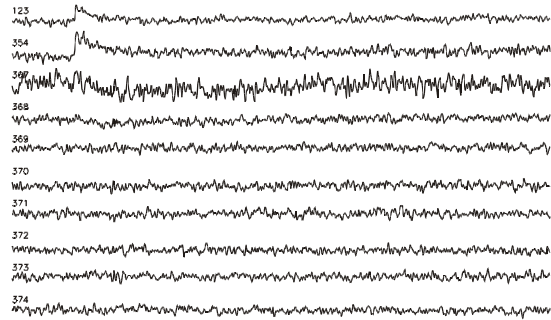
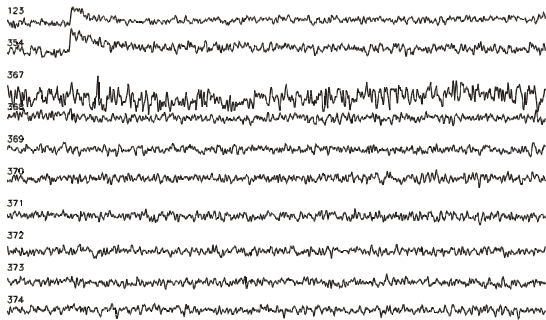
$2 \times 10^{-2}$   
d/I |  
200 ms

Abb. 4-43: Strahl 25 bis 26

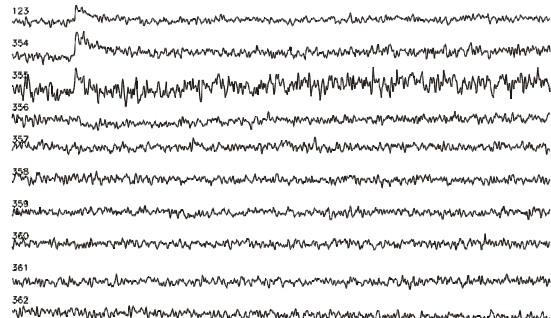
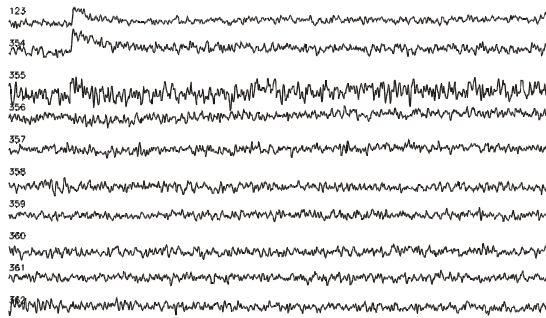
30 %

100 %

Strahl 27

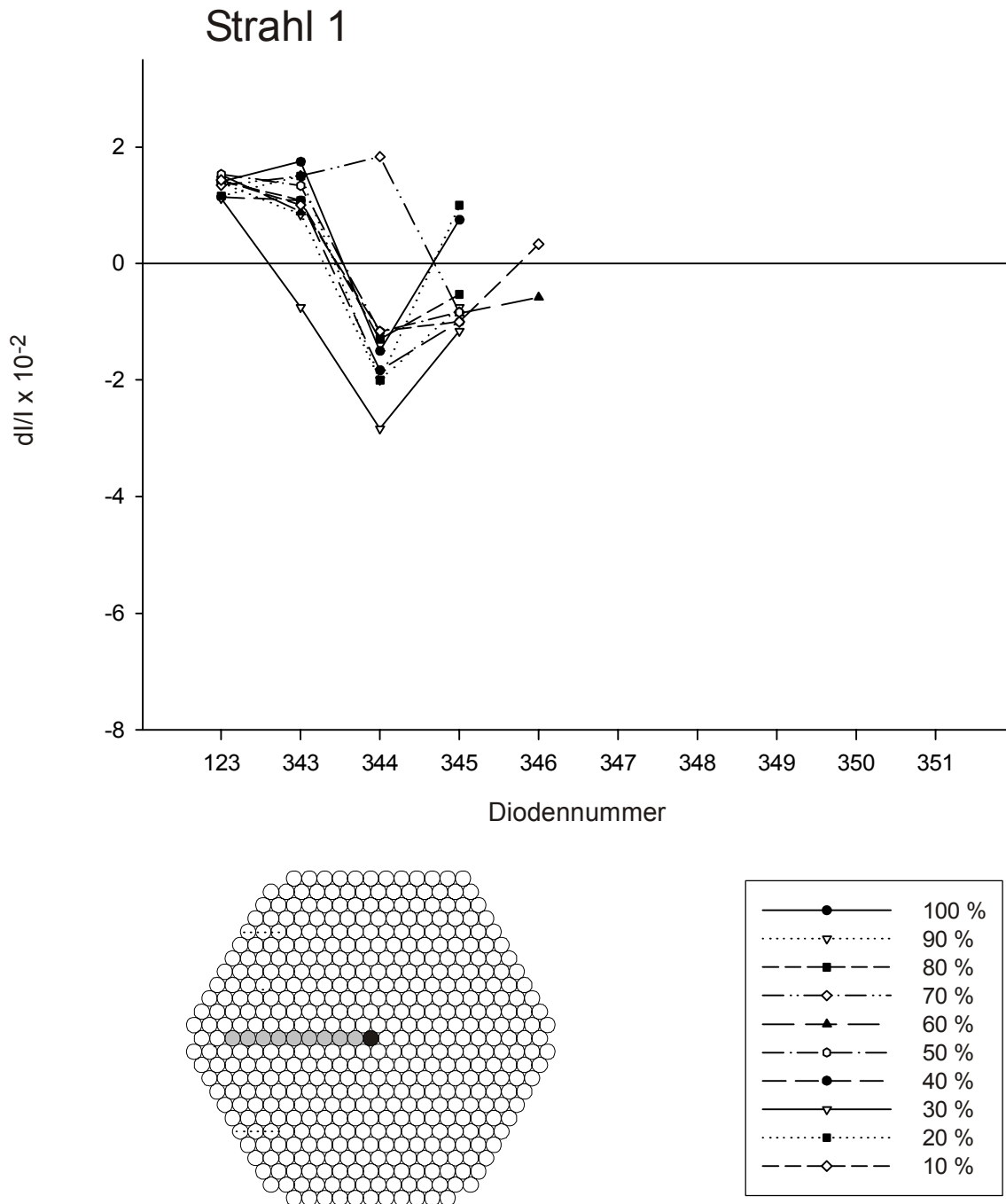


Strahl 28

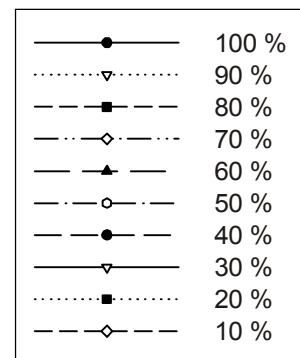
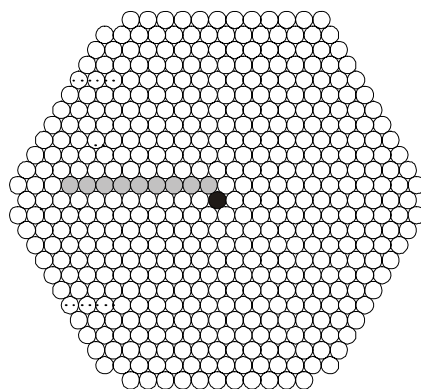
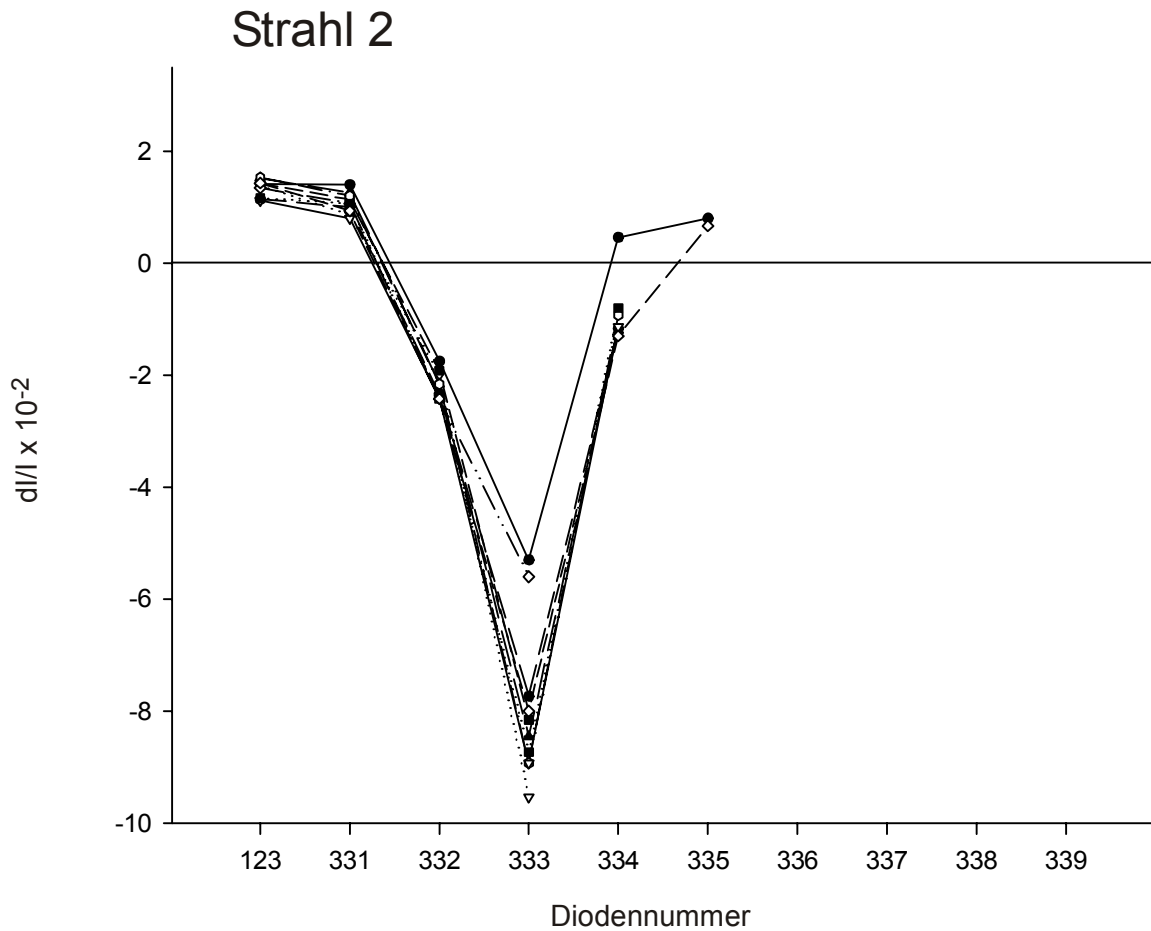


$2 \times 10^{-2}$   
dI/I  
200 ms

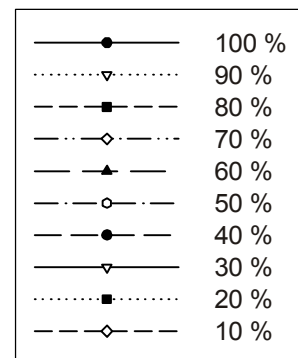
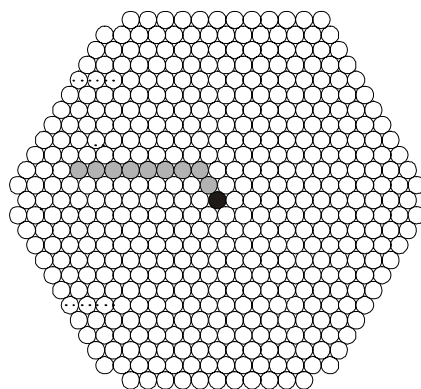
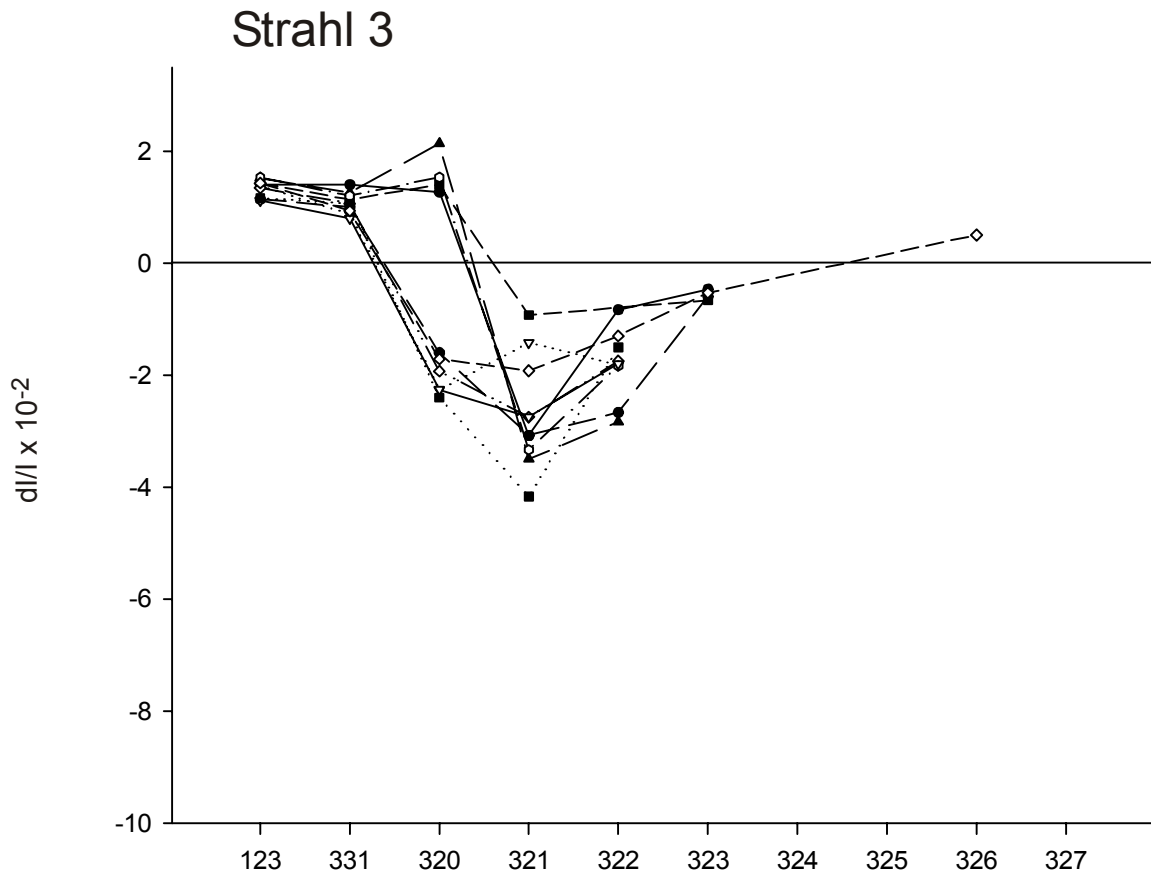
Abb. 4-44: Strahl 27 bis 28



**Abb. 4-45:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 1 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.

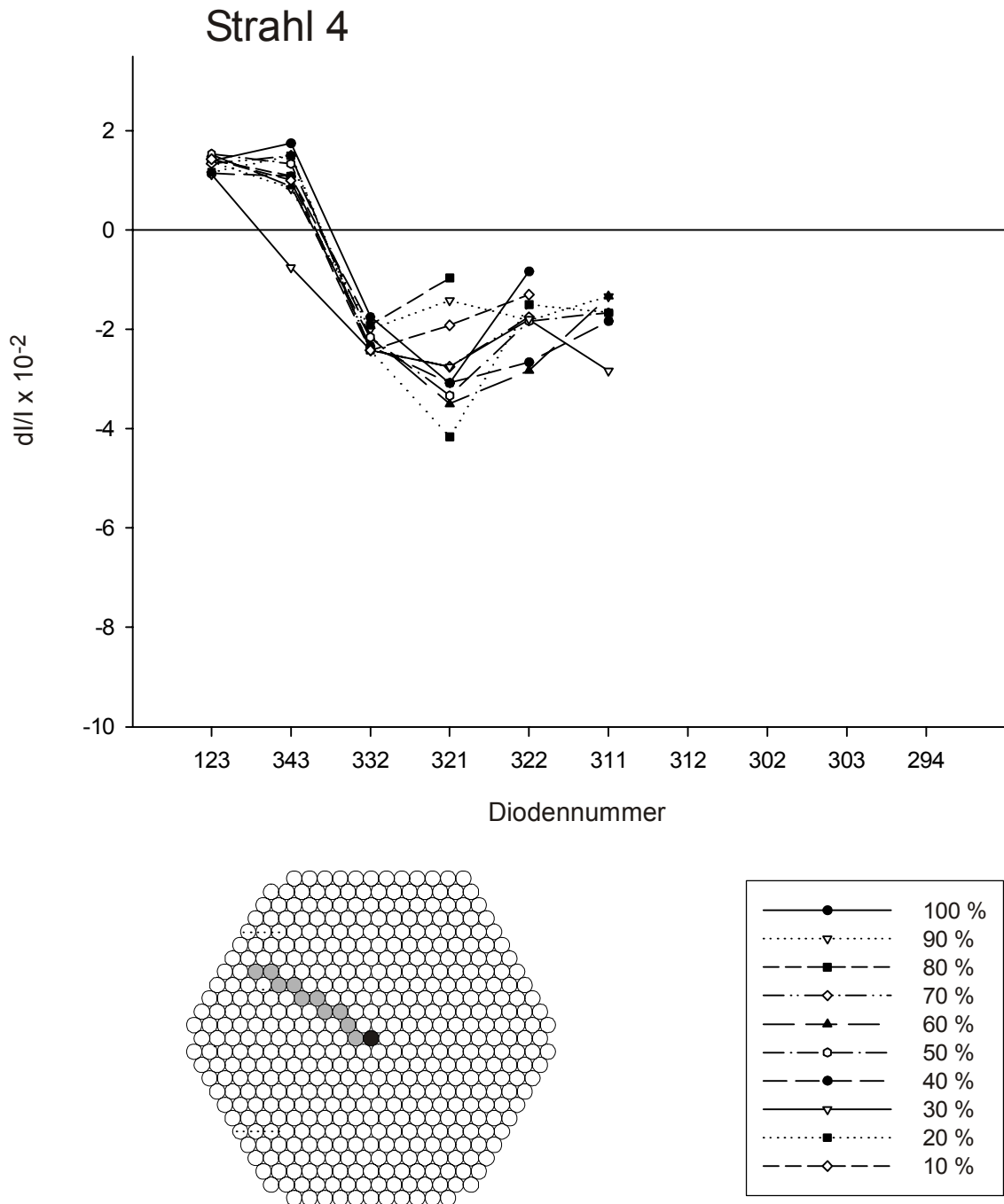


**Abb. 4-46:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 2 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.

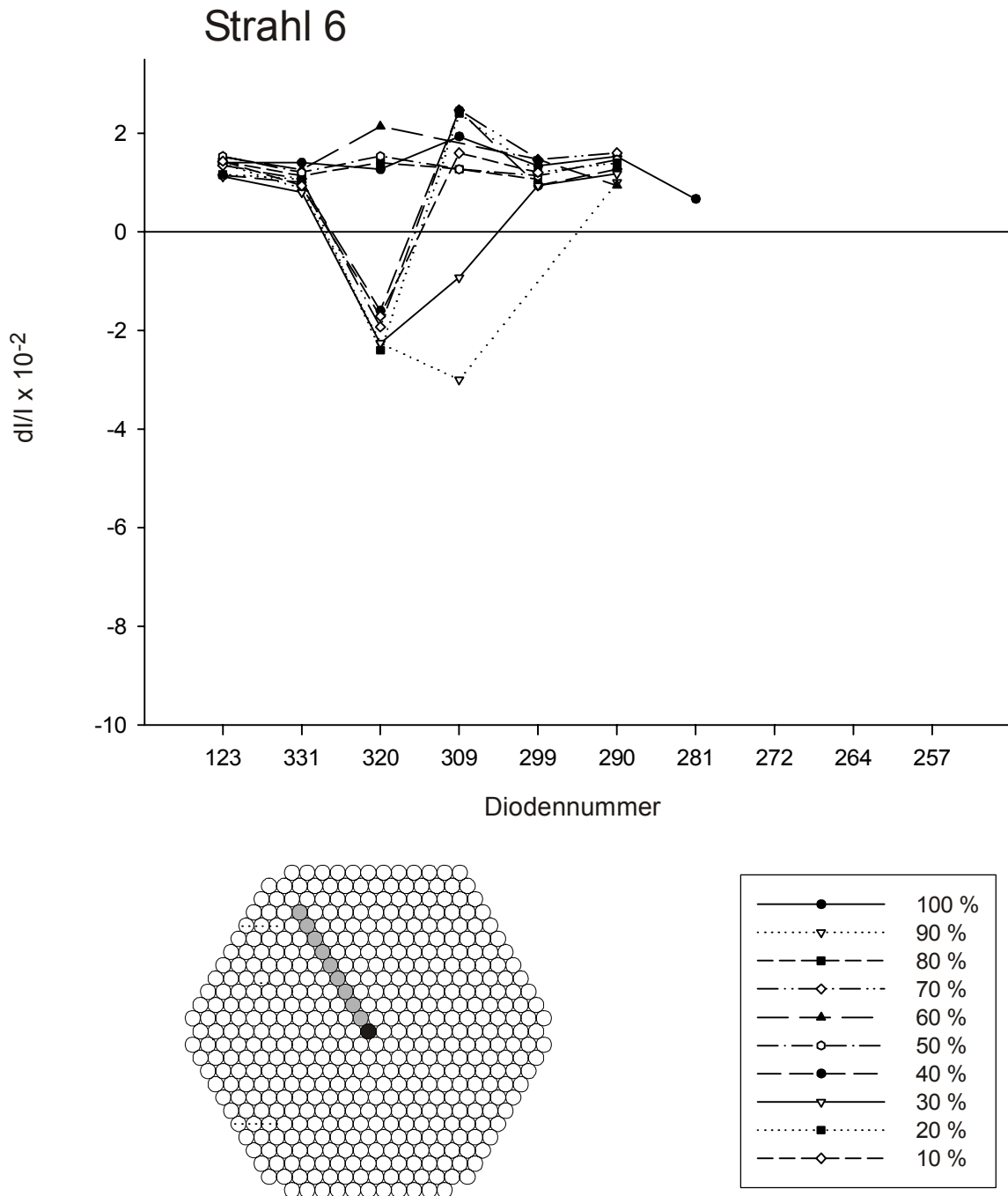


**Abb. 4-47:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 3 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diode Nummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.

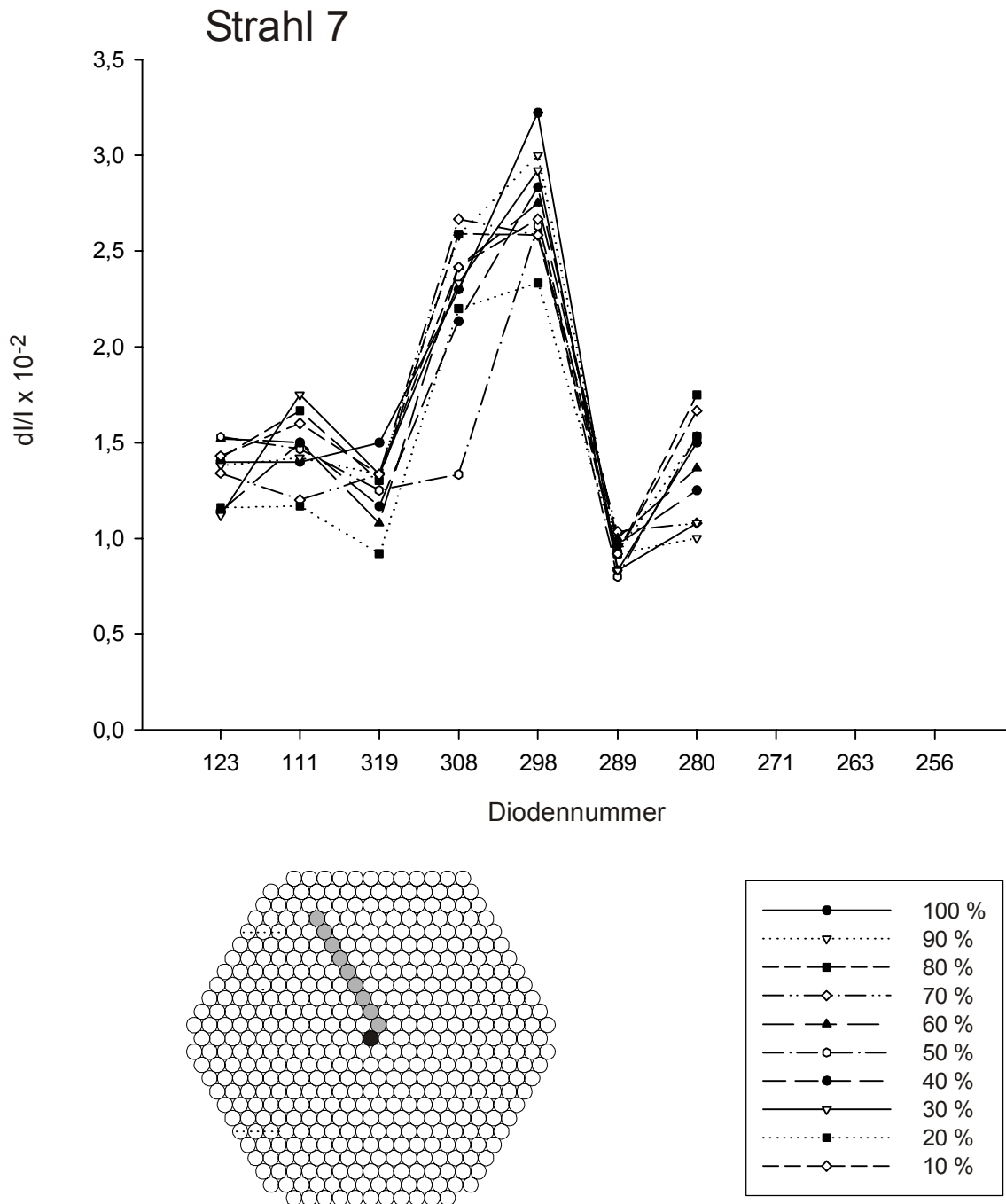




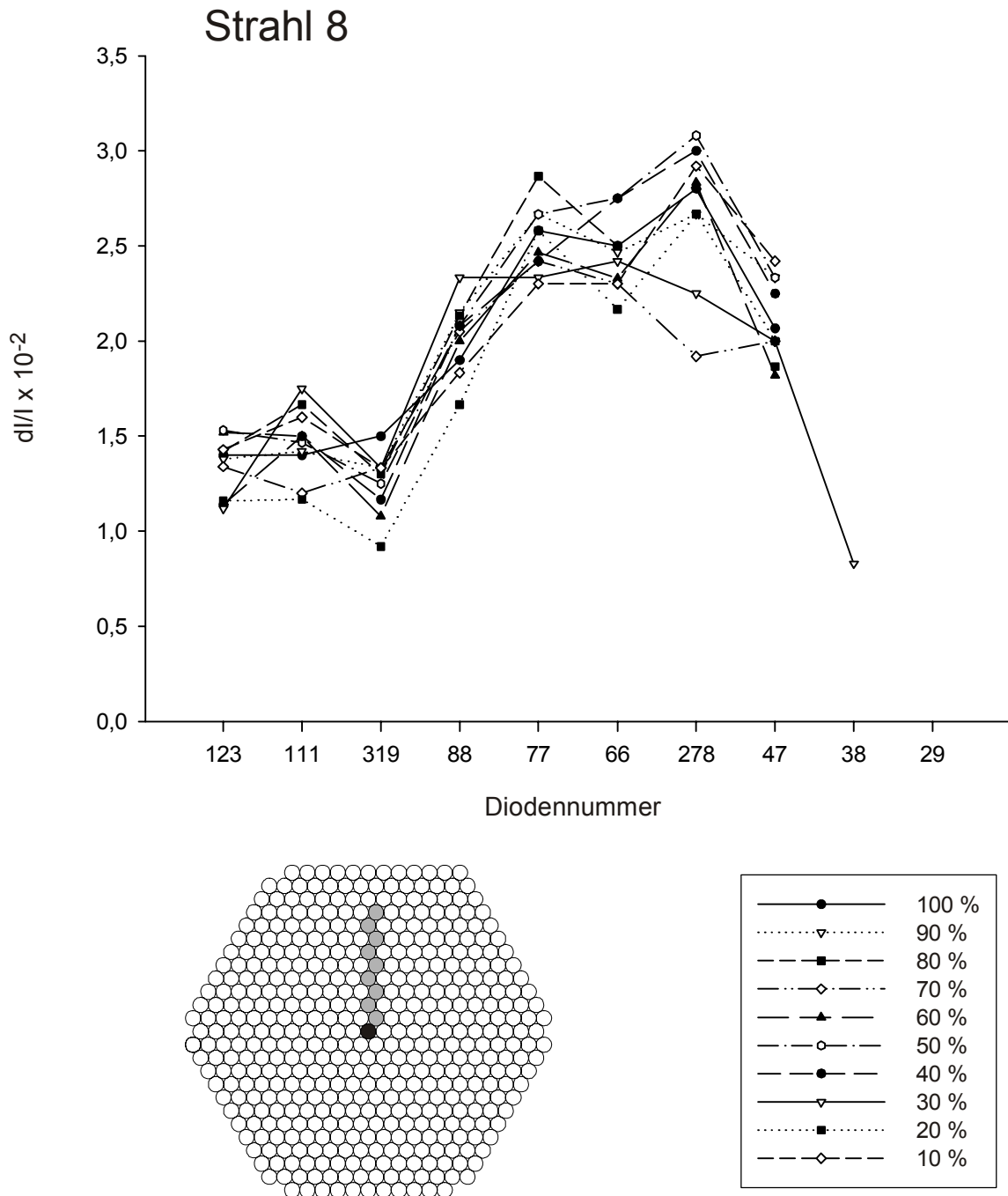
**Abb. 4-48:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 4 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.



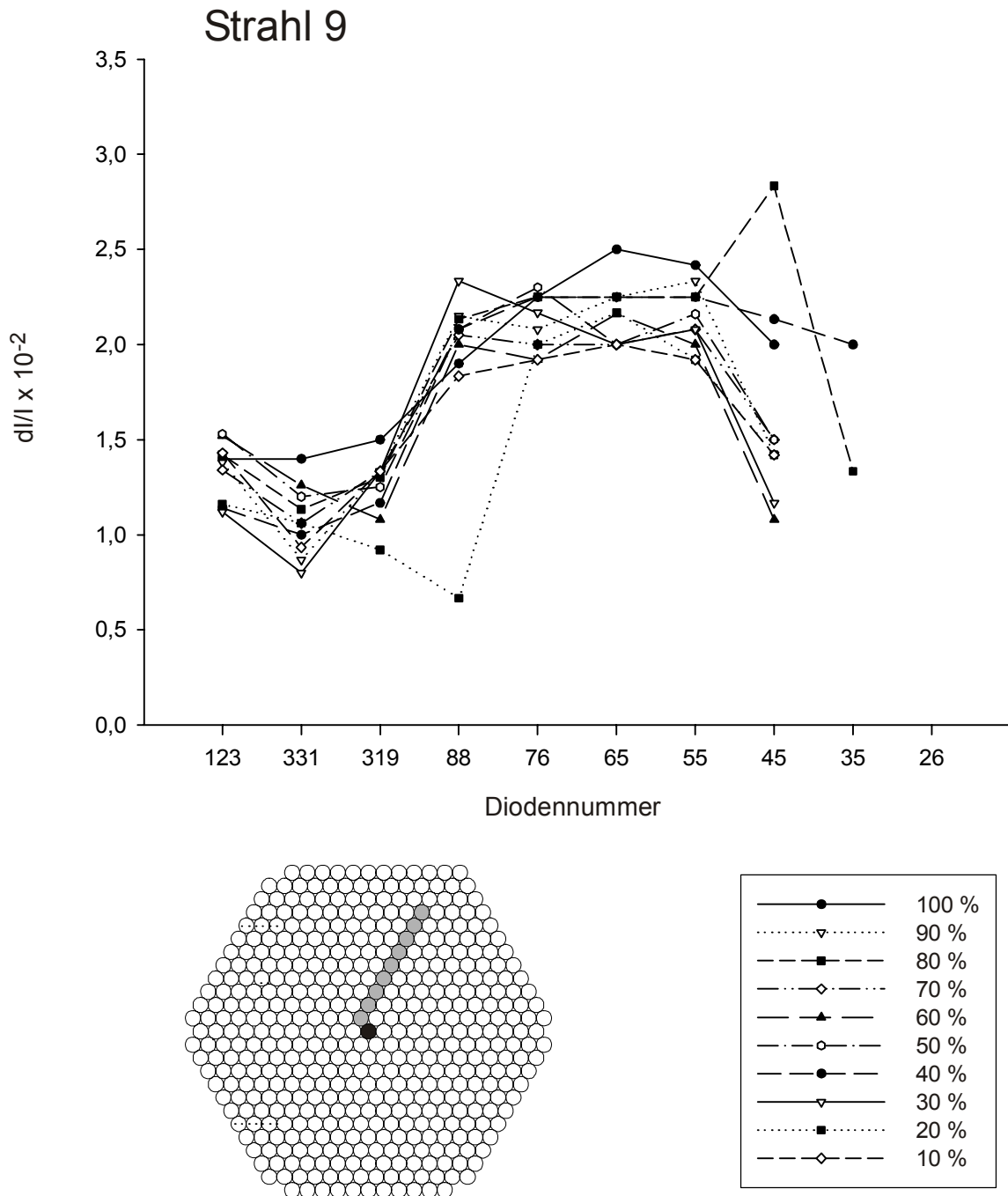
**Abb. 4-49:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 6 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^{-2}$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.



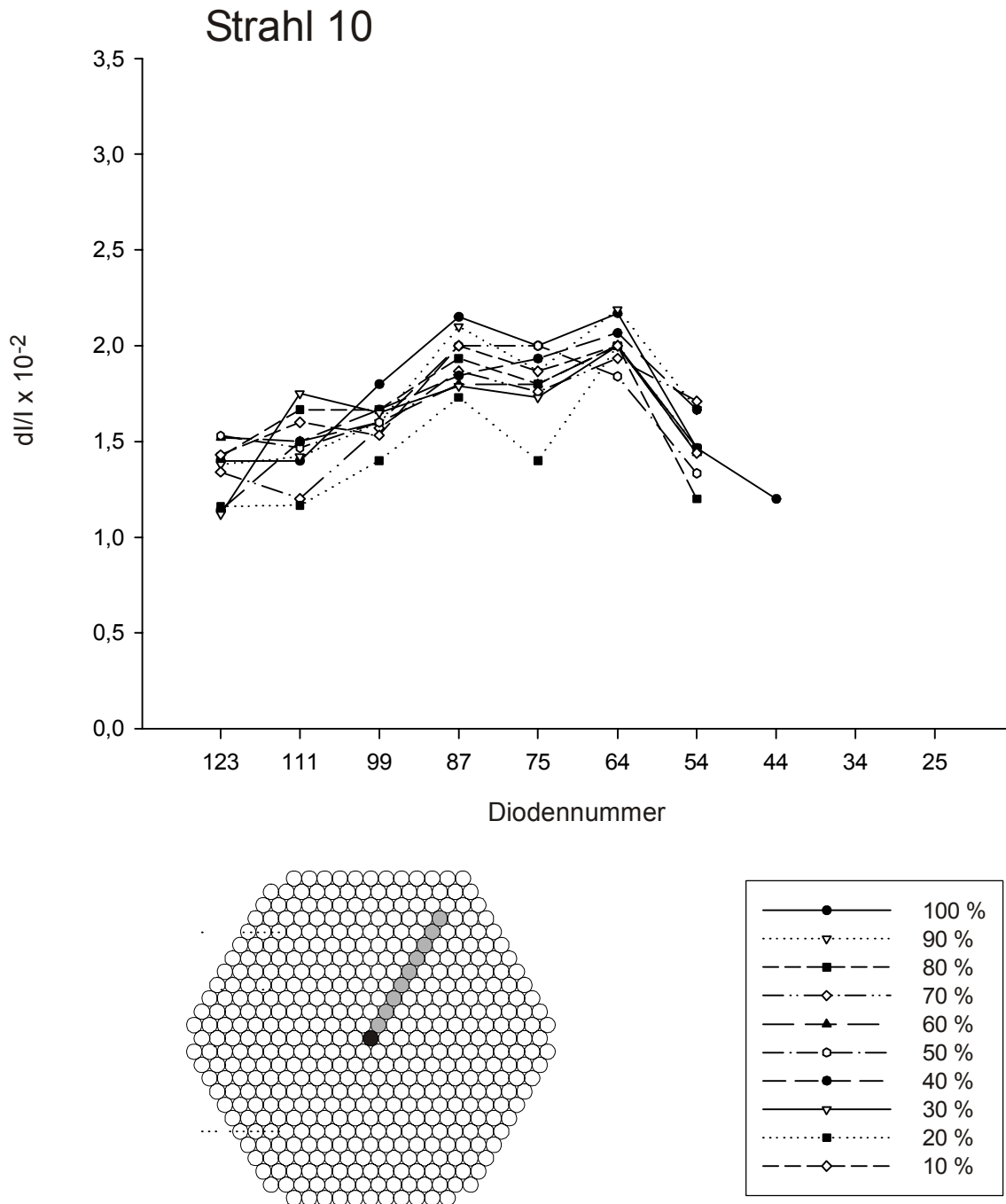
**Abb. 4-50:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 7 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^{-2}$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.



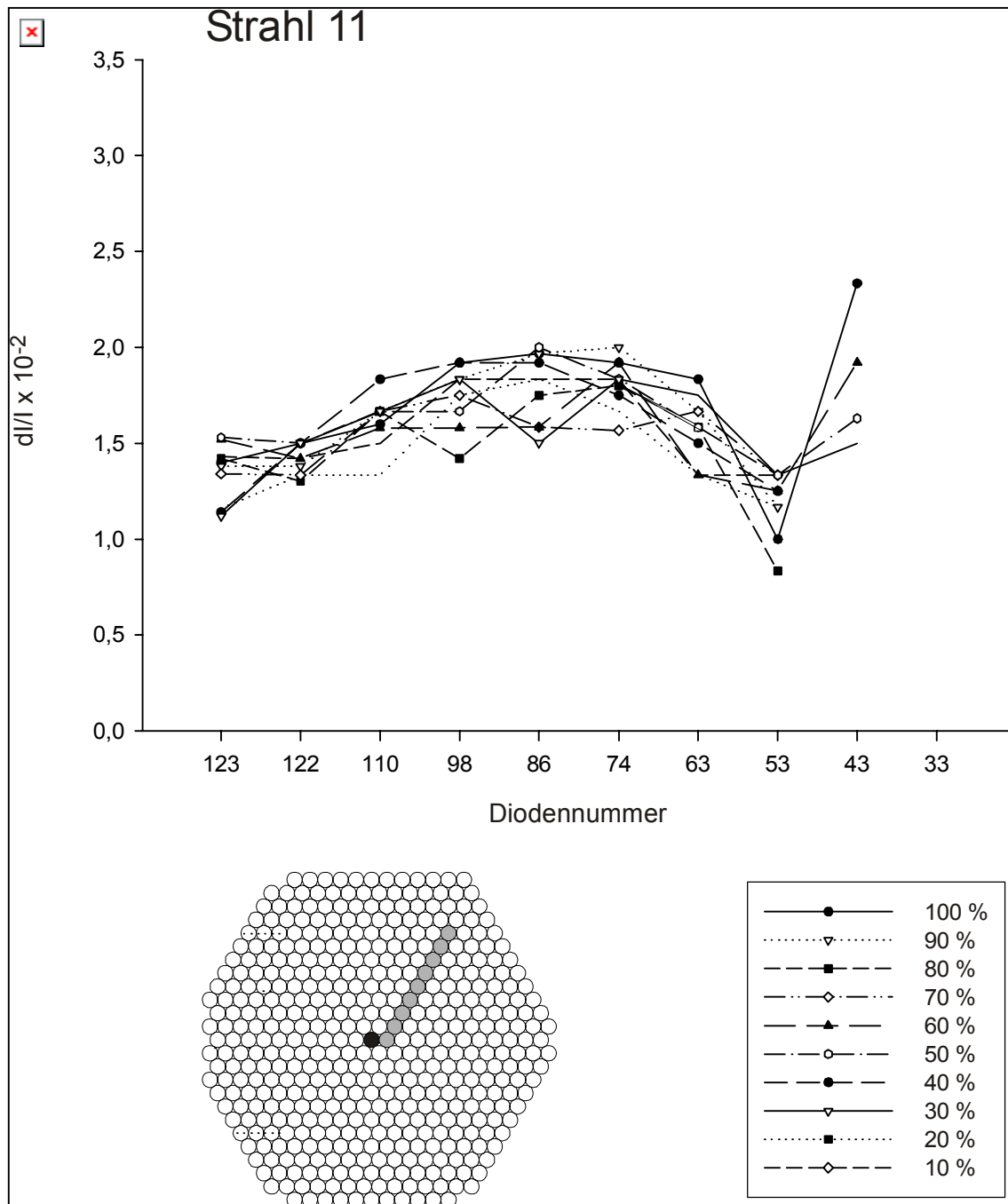
**Abb. 4-51:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 8 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^{-2}$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.



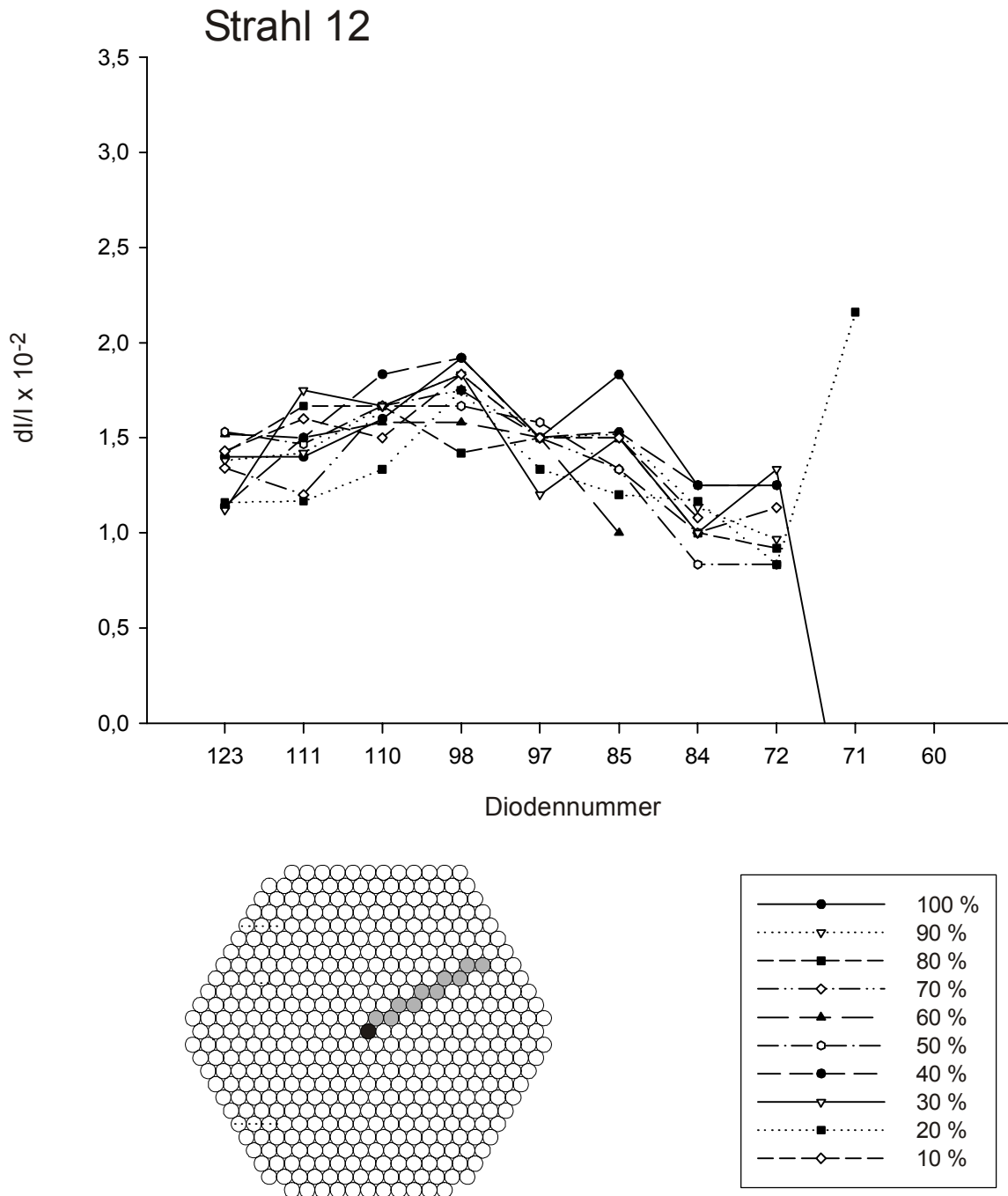
**Abb. 4-52:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 9 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.



**Abb. 4-53:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 10 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.

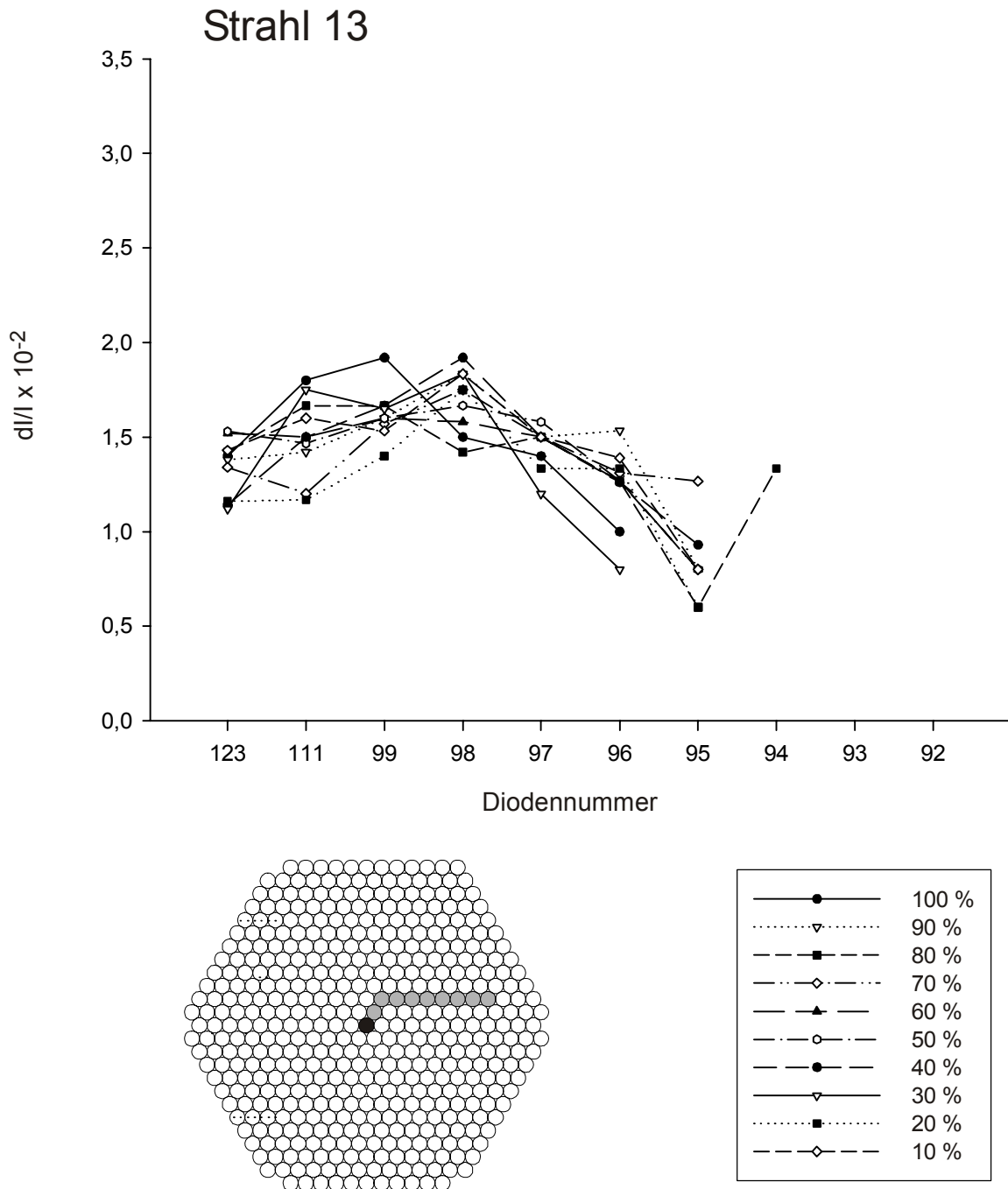


**Abb. 4-54:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 11 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.

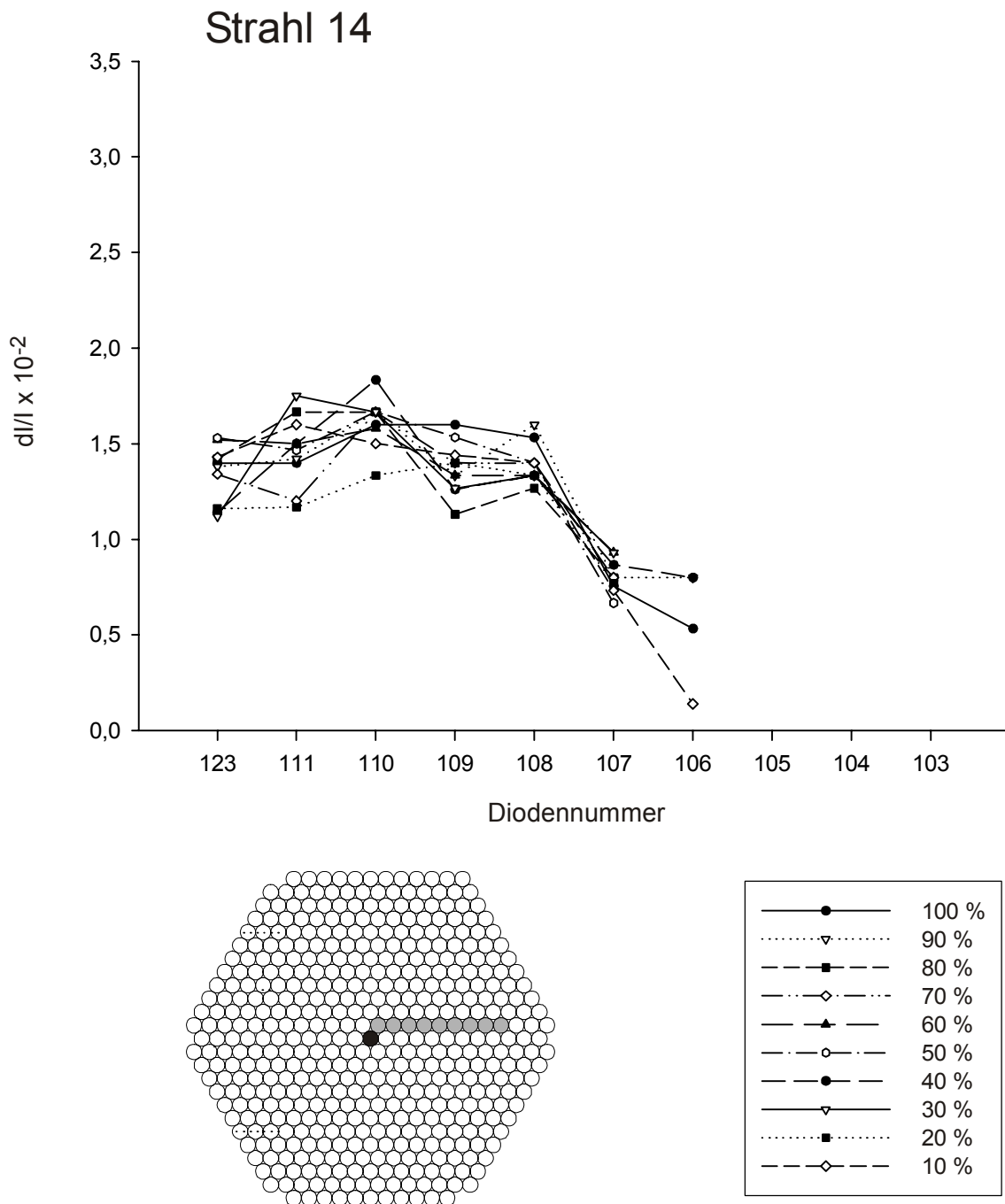


**Abb. 4-55:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 12 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.

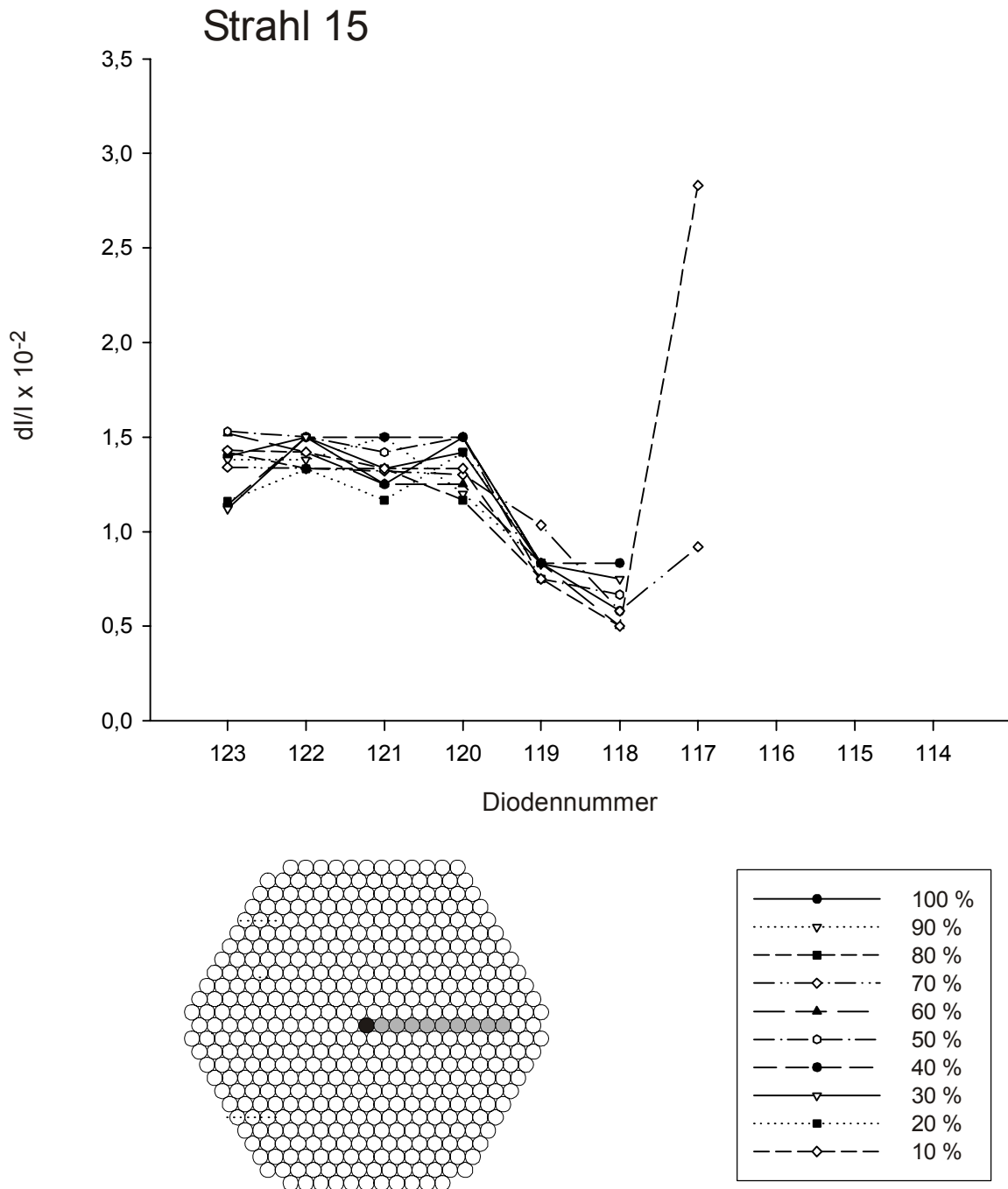




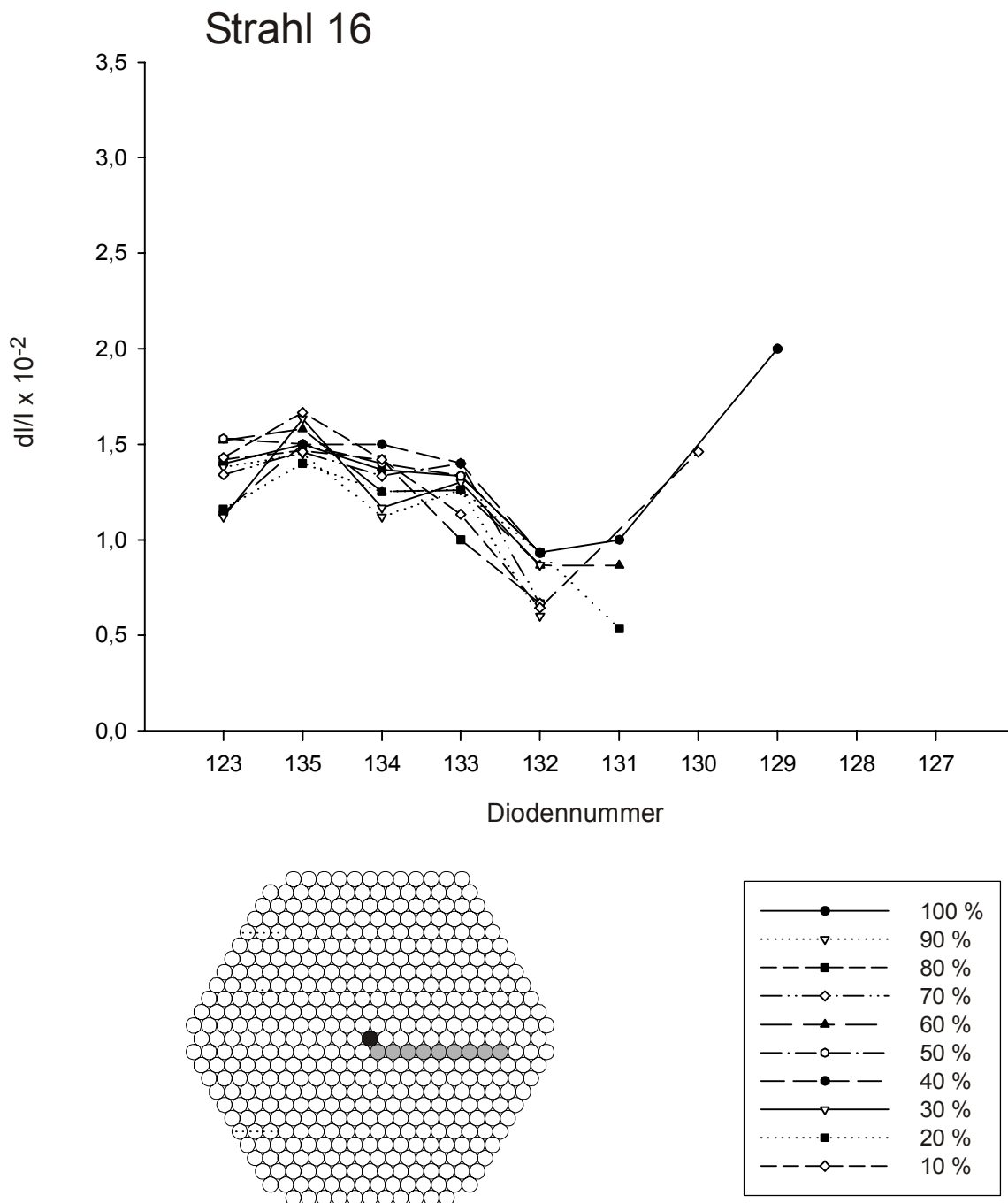
**Abb. 4-56:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 13 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.



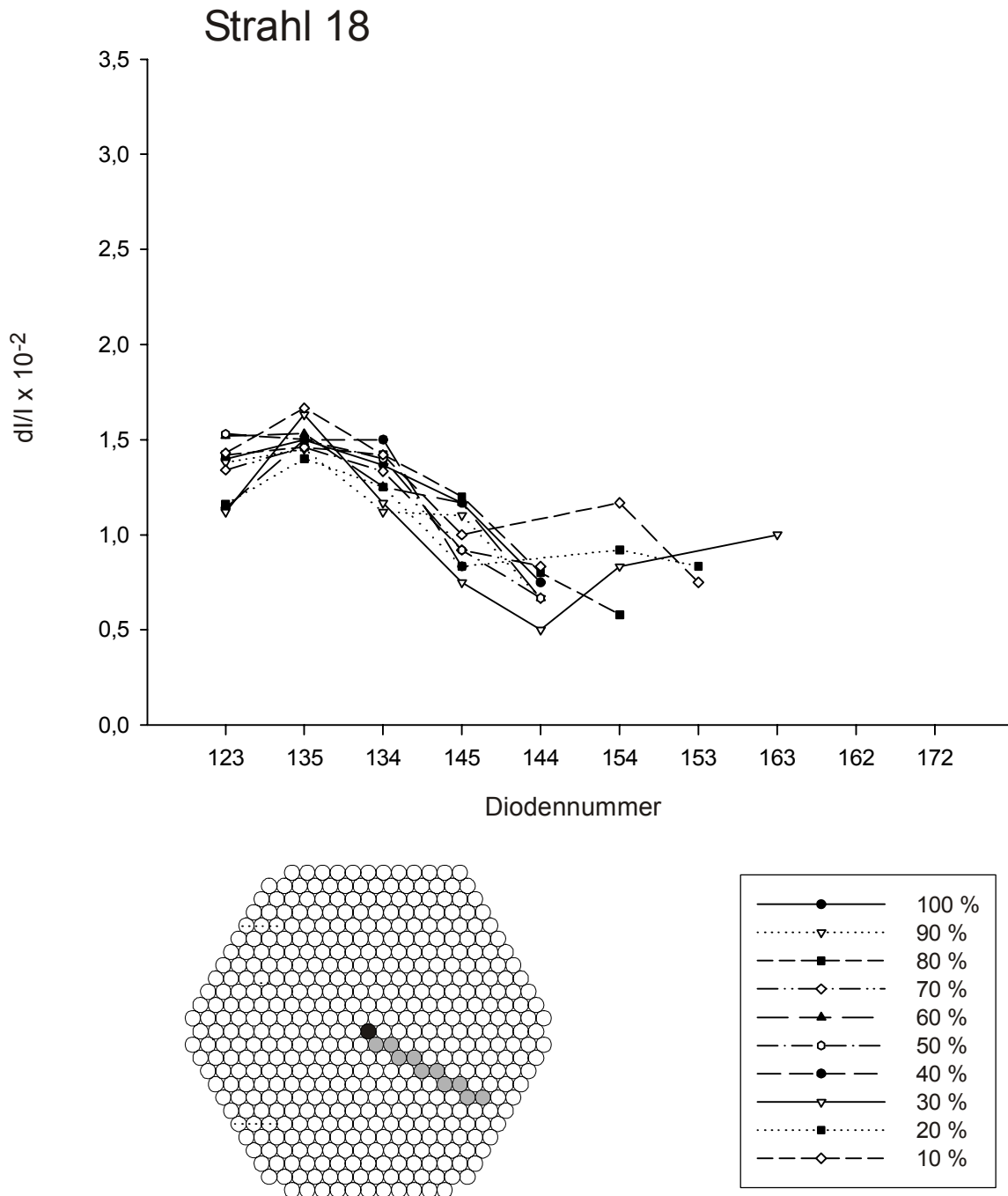
**Abb. 4-57:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 14 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation



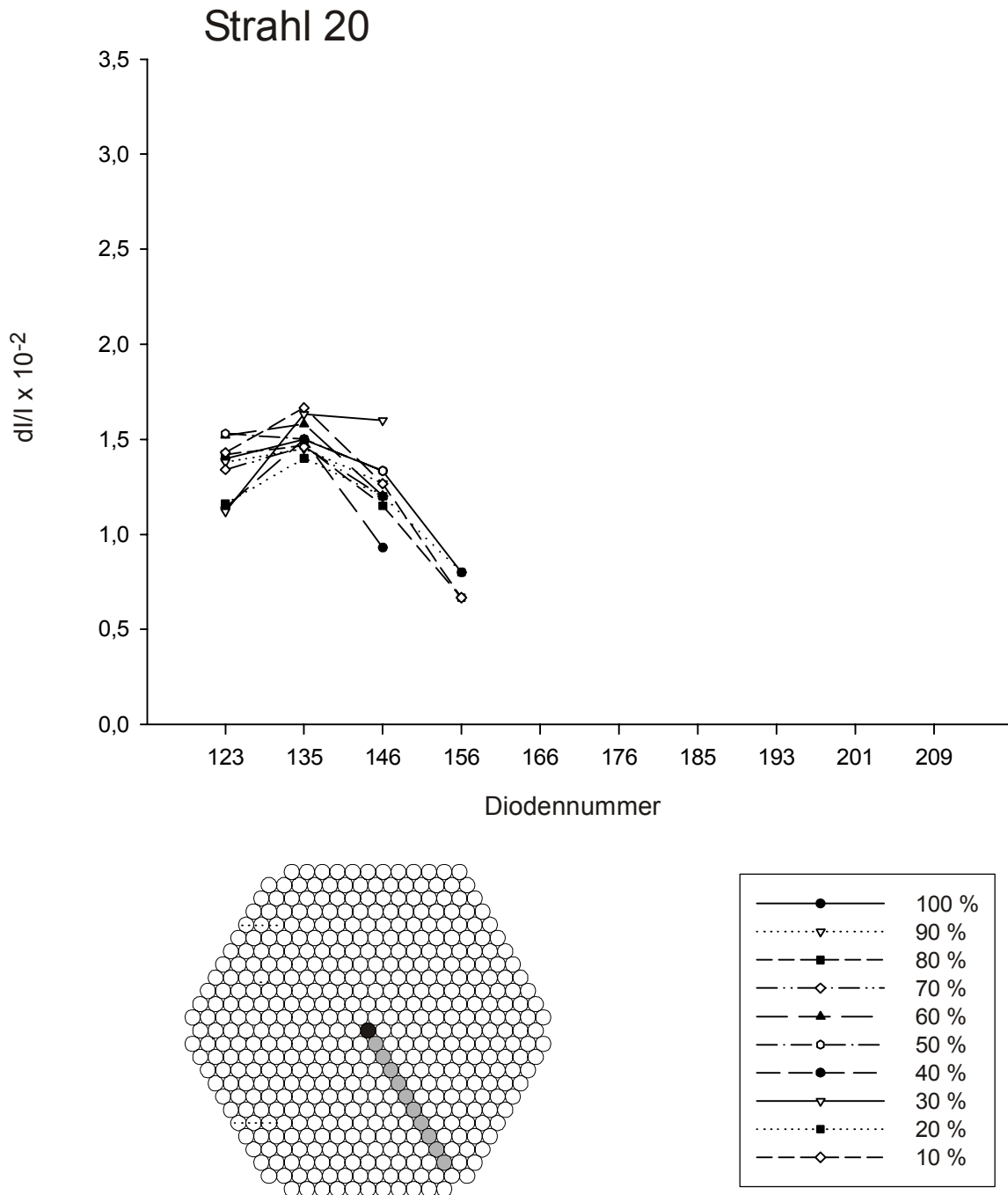
**Abb. 4-58:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 15 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.



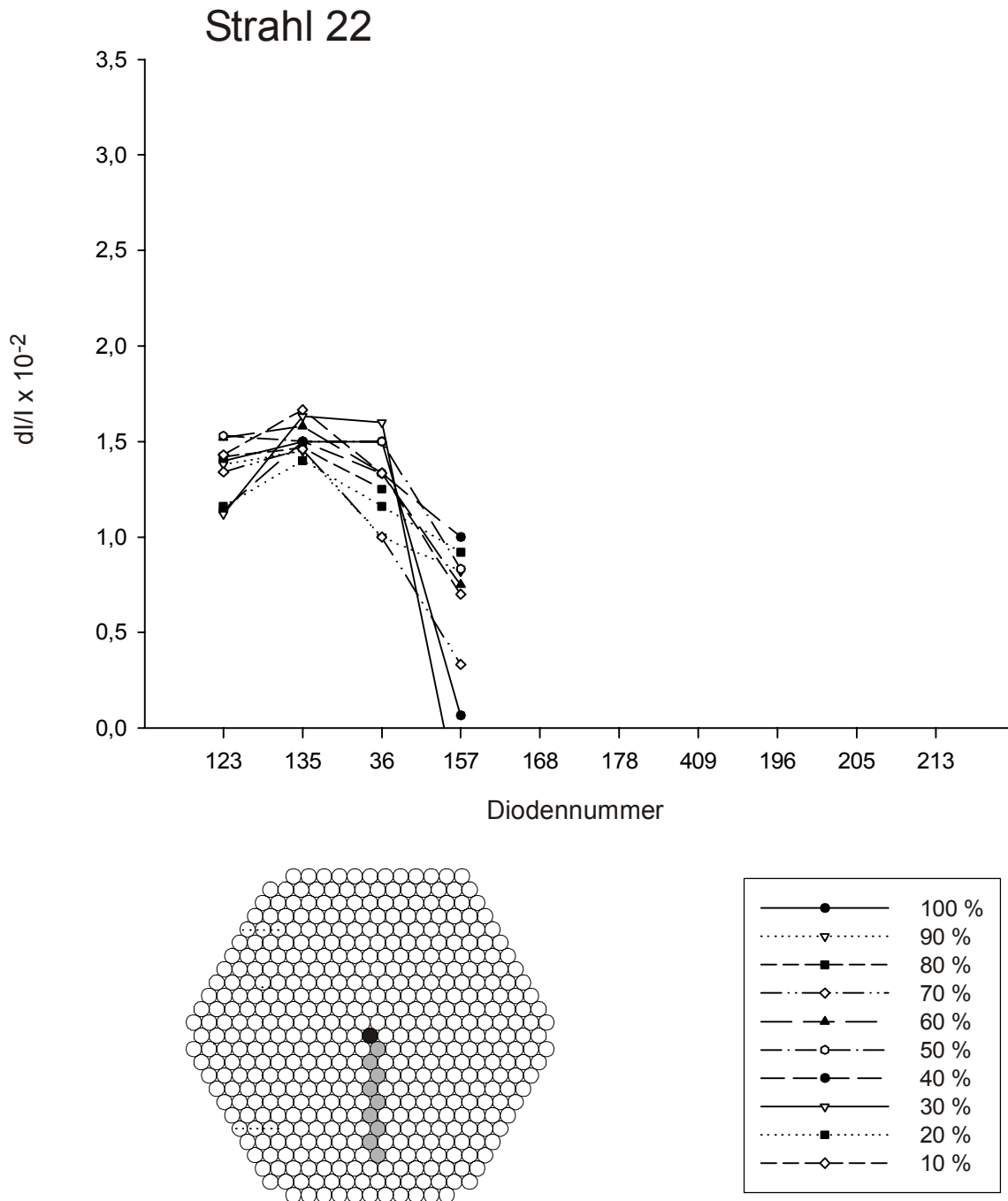
**Abb. 4-59:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 16 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.



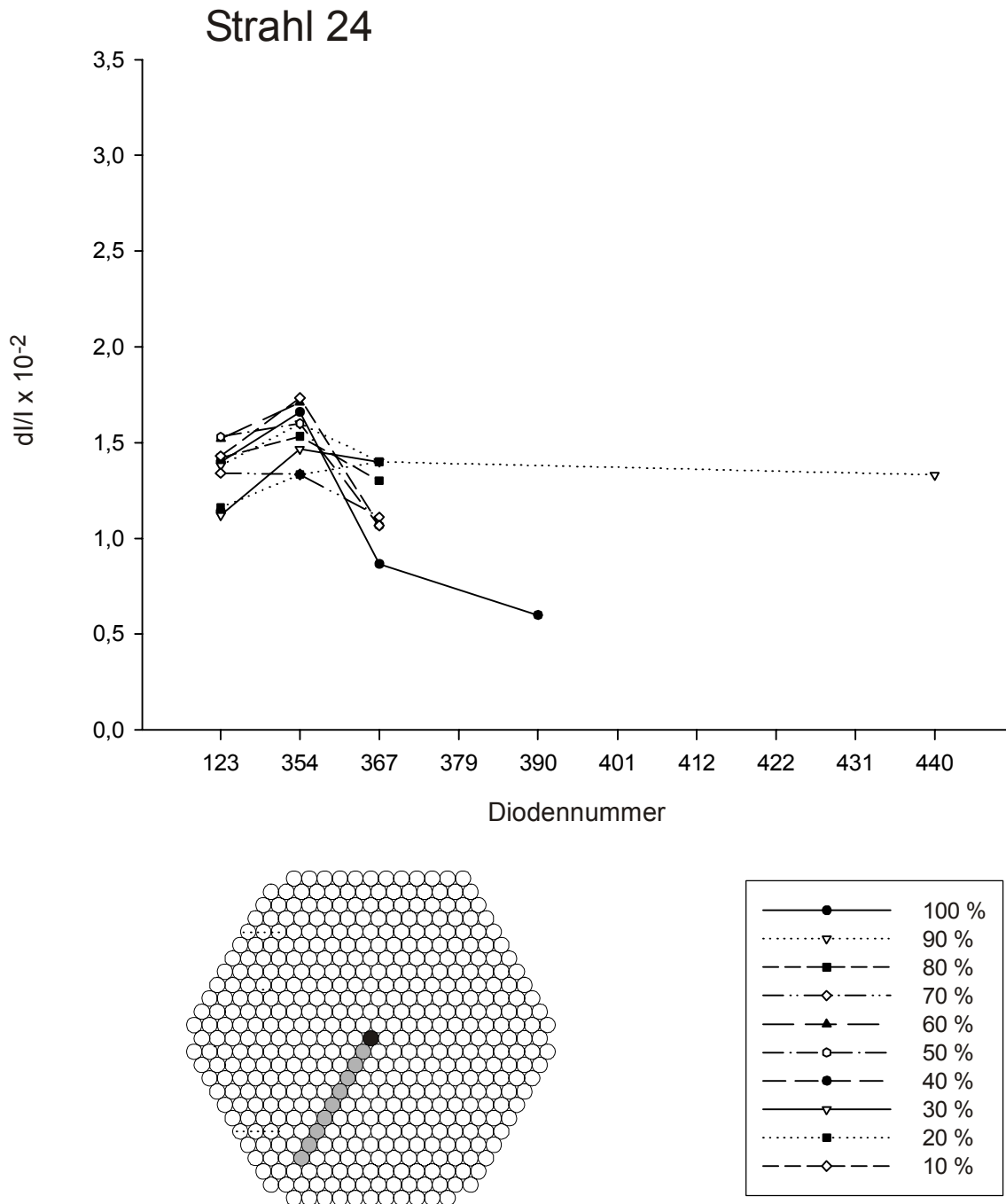
**Abb. 4-60:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 18 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.



**Abb. 4-61:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 20 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.

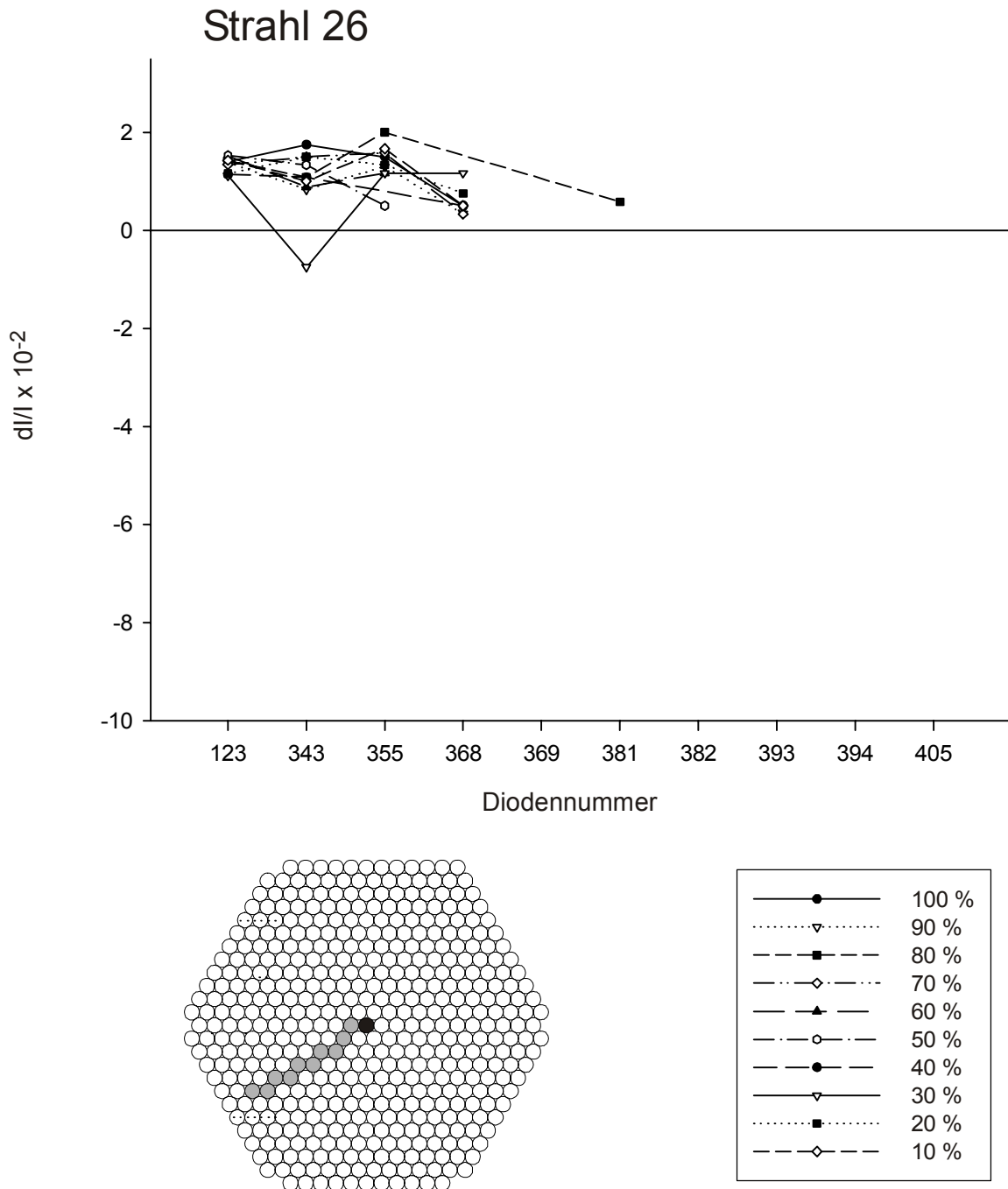


**Abb. 3-62:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 22 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90%, 80%, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.

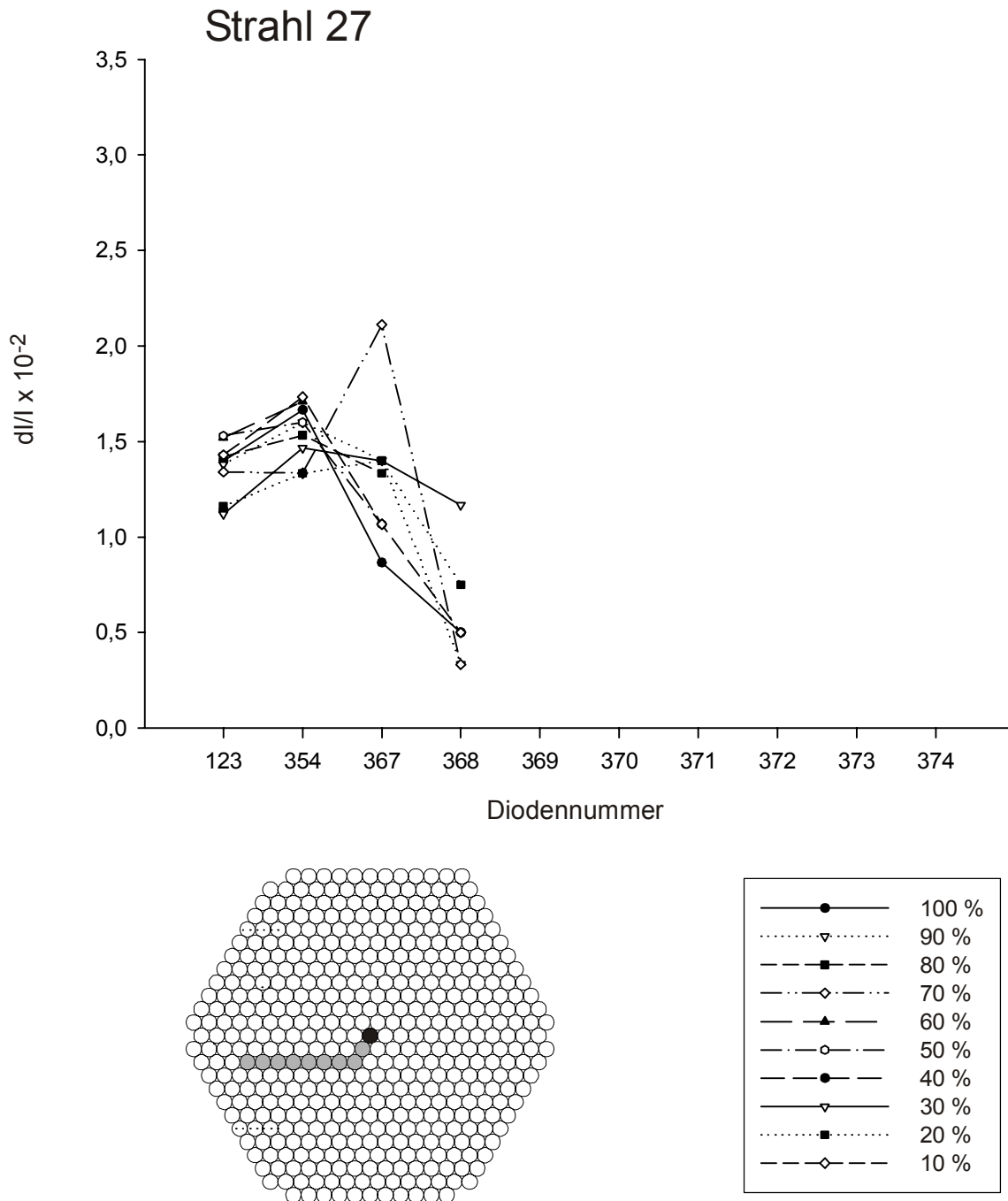


**Abb. 4-63:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 24 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^{-2}$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.

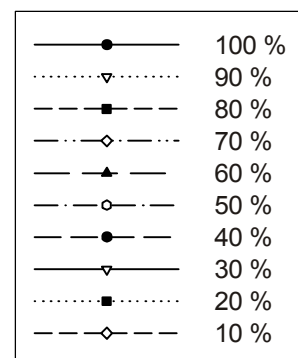
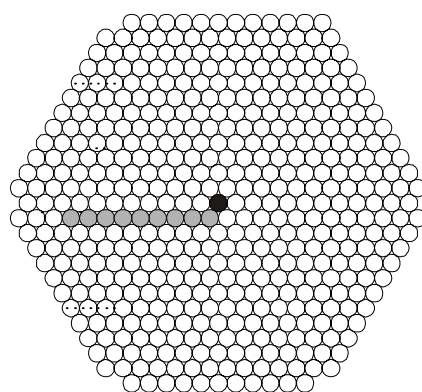
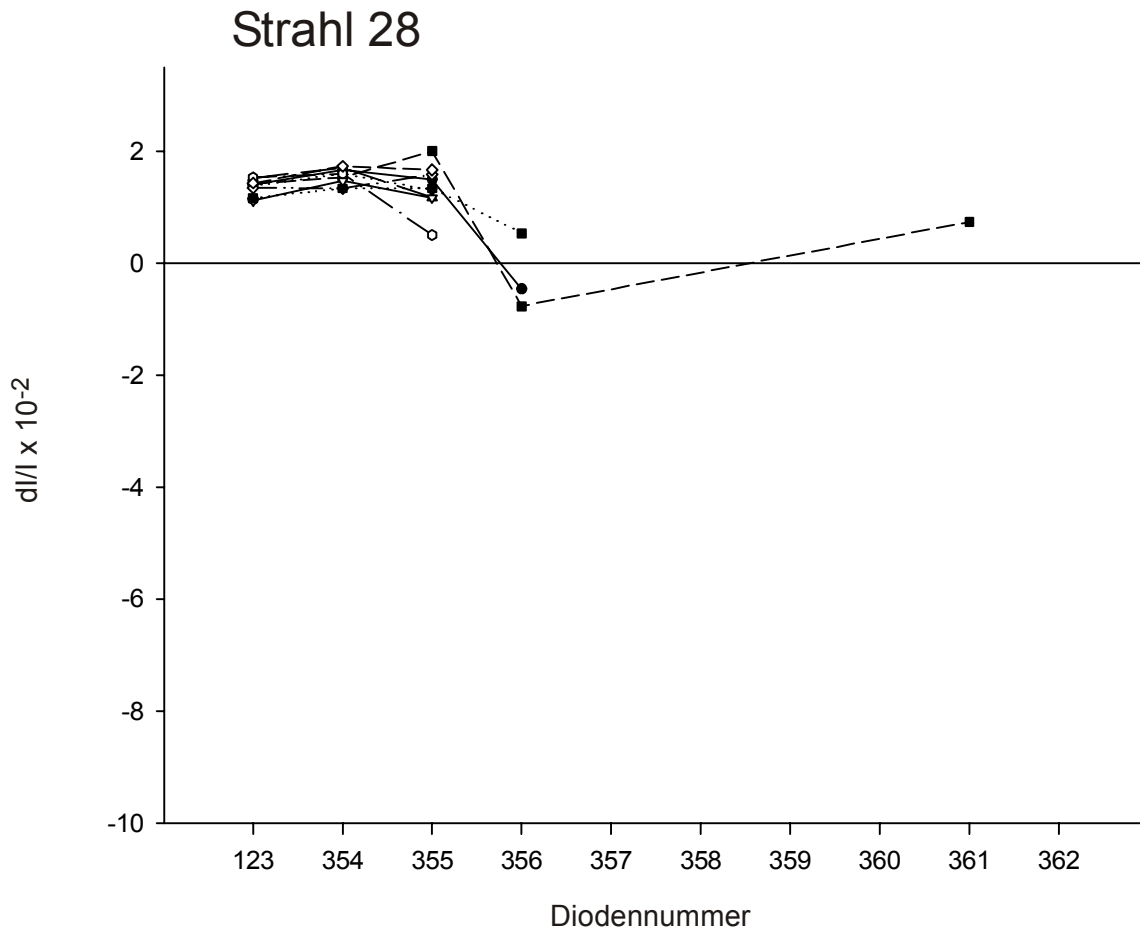




**Abb. 4-64:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 26 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diode nummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^{-2}$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.



**Abb. 4-65:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 27 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.



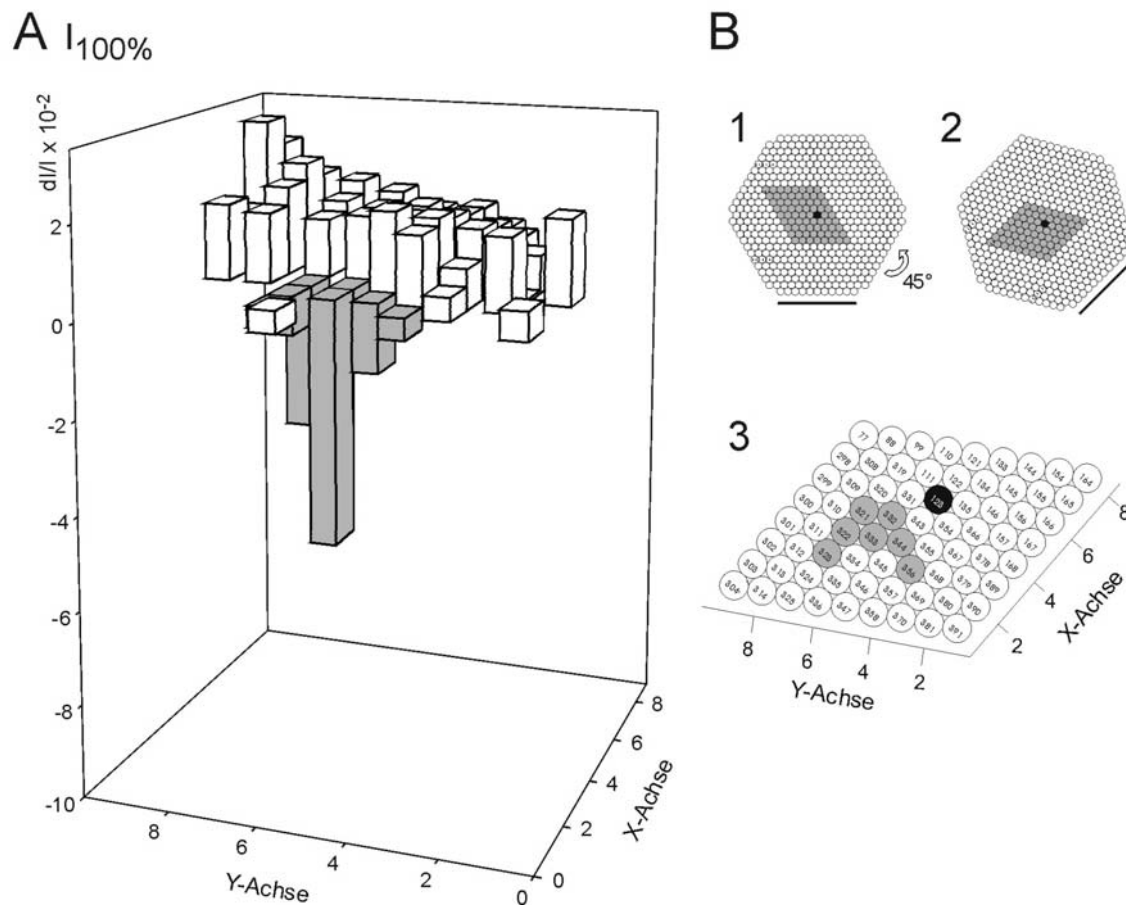
**Abb. 4-66:** Graphische Darstellung der maximalen Reizantworten im Verlauf des Diodenstrahls 28 (untere Bildhälfte) bei unterschiedlichen relativen Reizintensitäten (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Die Zuordnung der Auswertung zur Reizintensität ist durch unterschiedliche Symbole vorgenommen (untere Bildhälfte). Abszisse: Diodennummer in der Reihenfolge vom Zentrum in die Peripherie weisend, Ordinate: Reizintensität  $dI/I \times 10^2$ ; Abnahme der Fluoreszenzänderung bedeutet Depolarisation, Zunahme der Fluoreszenzänderung Hyperpolarisation.

### 4.3.2 Säulendiagramm

Bei dem drei-dimensionalen Darstellungsverfahren in Säulen werden die Reizantworten in einem definierten Diodenfeld bei stetiger relativer Reizintensität ausgewertet ( $I_{100\%}$ ,  $I_{90\%}$ ,  $I_{80\%}$ ,  $I_{70\%}$ ,  $I_{60\%}$ ,  $I_{50\%}$ ,  $I_{40\%}$ ,  $I_{30\%}$ ,  $I_{20\%}$ ,  $I_{10\%}$ ,  $I_{\max}$ ). In einem ersten Schritt wird der Bereich markiert, in dem bei den unterschiedlichen Reizintensitäten Fluoreszenzverminderungen messbar waren, vgl. Abb. 4-67 B1. In einem nächsten Schritt wird das Auswertefeld um  $45^\circ$  gedreht, um spätere Überlagerungen von Dioden zu verhindern, vgl. Abb. 4-67 B2. Dann werden die Dioden, die in die weitere Auswertung einbezogen werden, bezeichnet. Daraufhin ermöglicht eine Skalierung der Seiten mit x- und y-Achse eine genaue Lokalisation der einzelnen Dioden innerhalb des Säulendiagramms: Der Diodennummer 391 werden z. B. die Koordinaten 1/1 zugeteilt oder der Nr. 390 die Koordinaten 2/1. Auf diese Weise entsteht ein fast paralleler Boden zur x-, y-Ebene des Säulendiagramms, der die Übertragung, d.h. die Zuordnung der Zahlenwerte zu den entsprechenden Säulen vereinfacht.

Die Säulendiagramme skizzieren drei-dimensional die Dioden, an denen Membranpotentialänderungen gemessen worden sind. Die Höhe der Säulen korreliert mit der Stärke der registrierten Reizantwort. Die in den positiven Bereich weisenden Säulen zeigen Fluoreszenzzunahmen an. Die in den negativen Bereich weisenden Säulen repräsentieren die Dioden, an denen Fluoreszenzminierungen gemessen werden konnten. So kann der Bereich, in dem Fluoreszenzabnahmen gemessen worden sind, innerhalb des Hexagons lokalisiert werden. Die durch die Reizantworten hervorgerufenen Ausschläge ergeben ein inhomogenes Bild. Lediglich in einem kleinen Teilbereich sind Fluoreszenzminierungen festzustellen.

Beim Vergleich der Säulendiagramme werden, wie schon bei der Strahlenauswertung gesehen, Ähnlichkeiten der Reizantworten auf die unterschiedlichen relativen Reizintensitäten beobachtet.

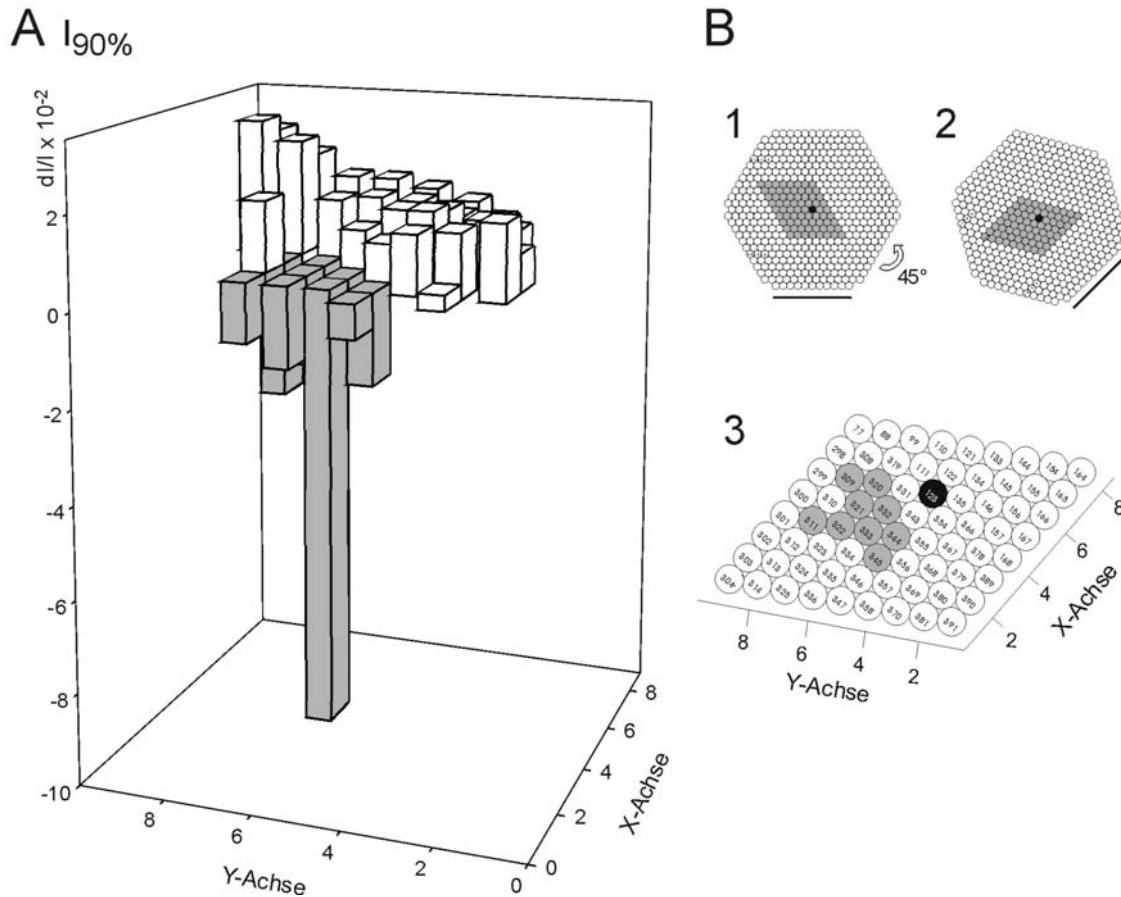
**Abb. 4-67:**

A: Säulendiagramm: Drei-dimensionale Darstellung der maximalen Reizantworten an unterschiedlichen Dioden bei einer relativen Reizintensität von 100 %, Abnahme der Fluoreszenzänderung (Depolarisation), Zunahme der Fluoreszenzänderung (Hyperpolarisation).

B1: Übersicht: Die Auswertung erfolgt im grau markierten Abschnitt. Die Diode 123 ist als zentraler Punkt schwarz markiert.

B2: Drehung des Ausschnitts um 45° nach rechts. Dadurch werden Überlagerungen von Dioden in der graphischen Säulen-Darstellung vermieden.

B3: Bezeichnung der Dioden, die in der Säulenauswertung in A berücksichtigt wurden. Die Dioden, die in Abhängigkeit von der Reizintensität eine Fluoreszenzabnahme (Depolarisation) signalisierten, sind mit hellgrau markiert.

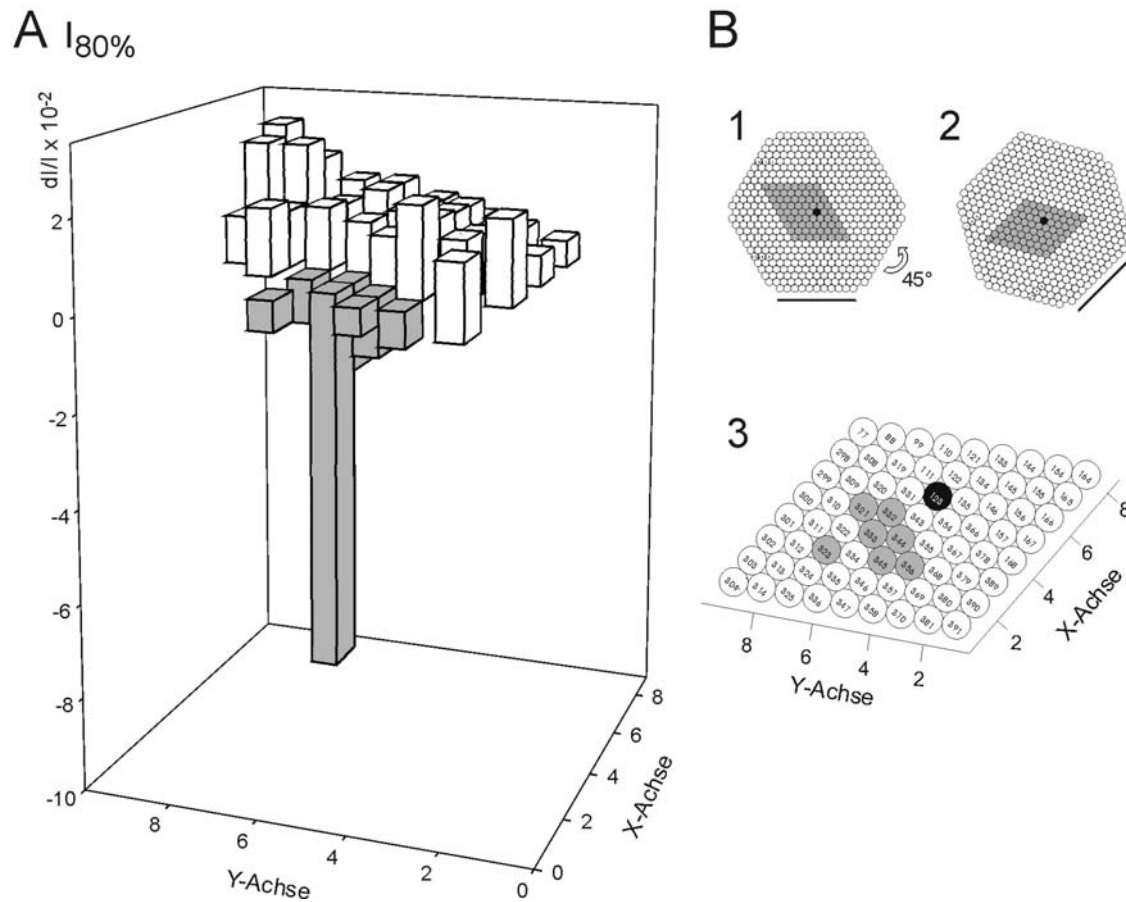
**Abb. 4-68:**

A: Säulendiagramm: Drei-dimensionale Darstellung der maximalen Reizantworten an unterschiedlichen Dioden bei einer relativen Reizintensität von 90 %, Abnahme der Fluoreszenzänderung (Depolarisation), Zunahme der Fluoreszenzänderung (Hyperpolarisation).

B1: Übersicht: Die Auswertung erfolgt im grau markierten Abschnitt. Die Diode 123 ist als zentraler Punkt schwarz markiert.

B2: Drehung des Ausschnitts um  $45^\circ$  nach rechts. Dadurch werden Überlagerungen von Dioden in der graphischen Säulen-Darstellung vermieden.

B3: Bezeichnung der Dioden, die in der Säulenauswertung in A berücksichtigt wurden. Die Dioden, die in Abhängigkeit von der Reizintensität eine Fluoreszenzabnahme (Depolarisation) signalisierten, sind mit hellgrau markiert.

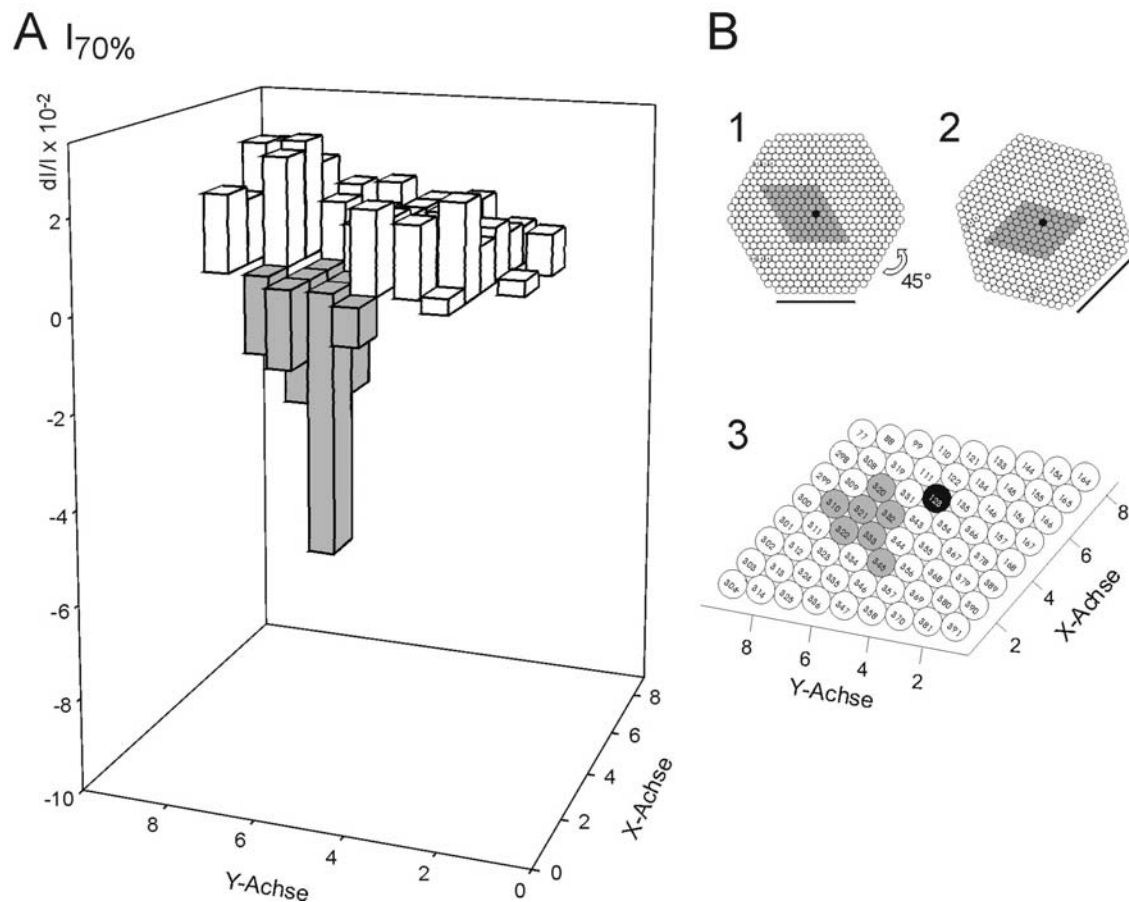
**Abb. 4-69:**

A: Säulendiagramm: Drei-dimensionale Darstellung der maximalen Reizantworten an unterschiedlichen Dioden bei einer relativen Reizintensität von 80 %, Abnahme der Fluoreszenzänderung (Depolarisation), Zunahme der Fluoreszenzänderung (Hyperpolarisation).

B1: Übersicht: Die Auswertung erfolgt im grau markierten Abschnitt. Die Diode 123 ist als zentraler Punkt schwarz markiert.

B2: Drehung des Ausschnitts um  $45^\circ$  nach rechts. Dadurch werden Überlagerungen von Dioden in der graphischen Säulen-Darstellung vermieden.

B3: Bezeichnung der Dioden, die in der Säulenauswertung in A berücksichtigt wurden. Die Dioden, die in Abhängigkeit von der Reizintensität eine Fluoreszenzabnahme (Depolarisation) signalisierten, sind mit hellgrau markiert.

**Abb. 4-70:**

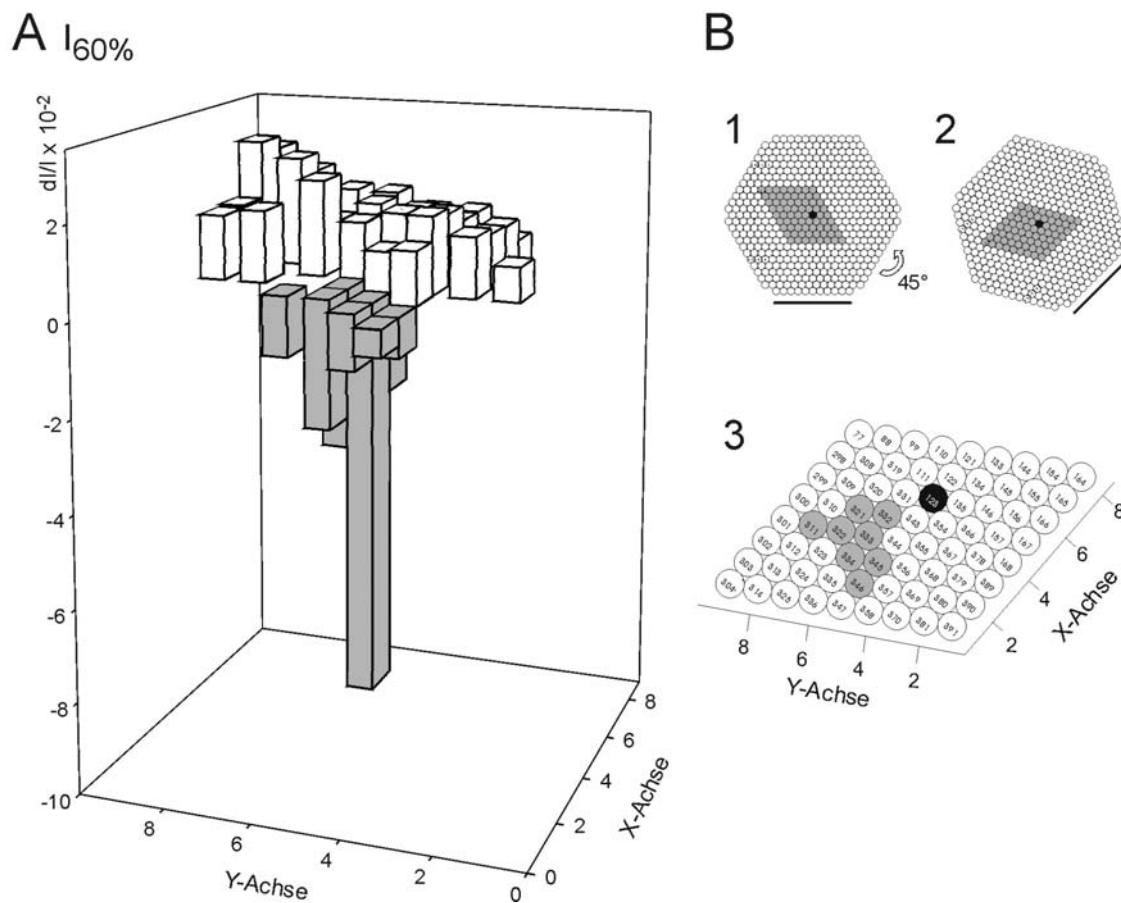
A: Säulendiagramm: Drei-dimensionale Darstellung der maximalen Reizantworten an unterschiedlichen Dioden bei einer relativen Reizintensität von 70 %, Abnahme der Fluoreszenzänderung (Depolarisation), Zunahme der Fluoreszenzänderung (Hyperpolarisation).

B1: Übersicht: Die Auswertung erfolgt im grau markierten Abschnitt. Die Diode 123 ist als zentraler Punkt schwarz markiert.

B2: Drehung des Ausschnitts um  $45^\circ$  nach rechts. Dadurch werden Überlagerungen von Dioden in der graphischen Säulen-Darstellung vermieden.

B3: Bezeichnung der Dioden, die in der Säulenauswertung in A berücksichtigt wurden. Die Dioden, die in Abhängigkeit von der Reizintensität eine Fluoreszenzabnahme (Depolarisation) signalisierten, sind mit hellgrau markiert.



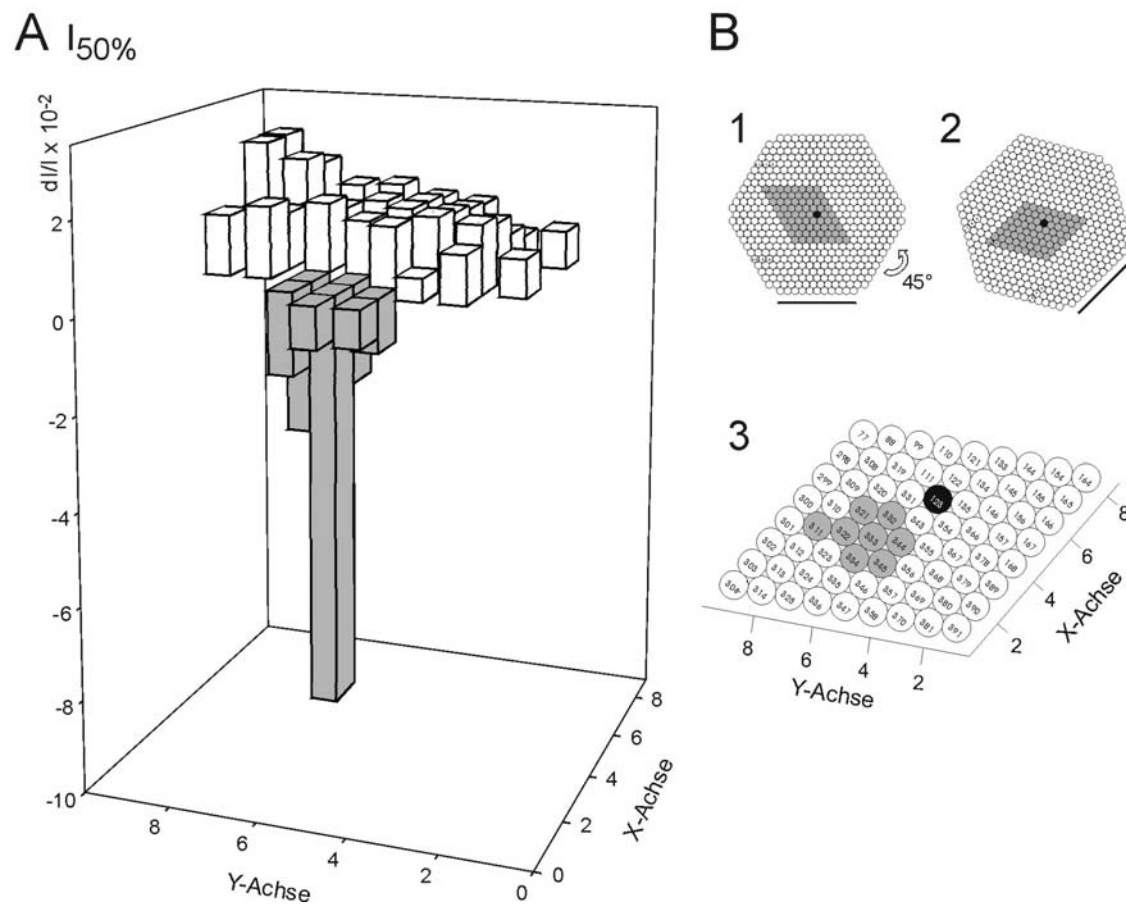
**Abb. 4-71:**

A: Säulendiagramm: Drei-dimensionale Darstellung der maximalen Reizantworten an unterschiedlichen Dioden bei einer relativen Reizintensität von 60 %, Abnahme der Fluoreszenzänderung (Depolarisation), Zunahme der Fluoreszenzänderung (Hyperpolarisation).

B1: Übersicht: Die Auswertung erfolgt im grau markierten Abschnitt. Die Diode 123 ist als zentraler Punkt schwarz markiert.

B2: Drehung des Ausschnitts um  $45^\circ$  nach rechts. Dadurch werden Überlagerungen von Dioden in der graphischen Säulen-Darstellung vermieden.

B3: Bezeichnung der Dioden, die in der Säulenauswertung in A berücksichtigt wurden. Die Dioden, die in Abhängigkeit von der Reizintensität eine Fluoreszenzabnahme (Depolarisation) signalisierten, sind mit hellgrau markiert.

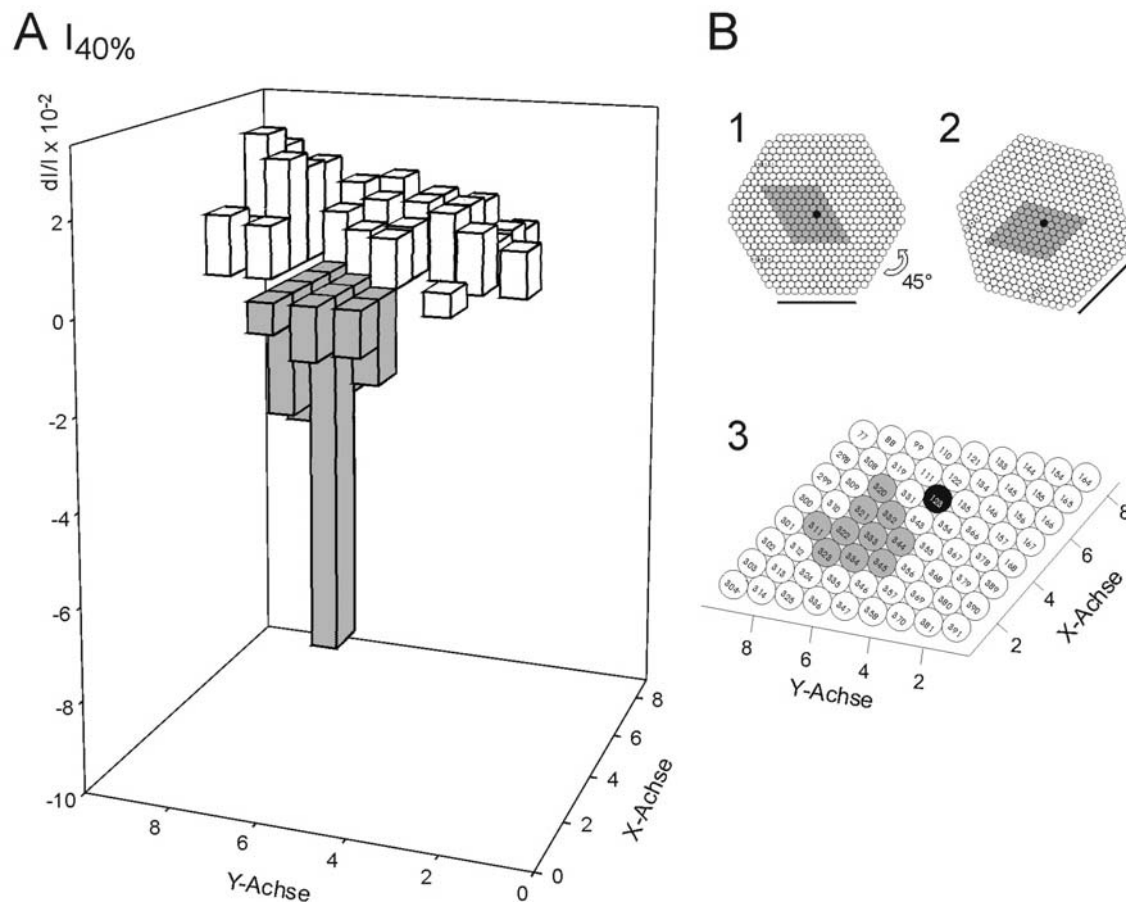
**Abb. 4-72:**

A: Säulendiagramm: Drei-dimensionale Darstellung der maximalen Reizantworten an unterschiedlichen Dioden bei einer relativen Reizintensität von 50 %, Abnahme der Fluoreszenzänderung (Depolarisation), Zunahme der Fluoreszenzänderung (Hyperpolarisation).

B1: Übersicht: Die Auswertung erfolgt im grau markierten Abschnitt. Die Diode 123 ist als zentraler Punkt schwarz markiert.

B2: Drehung des Ausschnitts um  $45^\circ$  nach rechts. Dadurch werden Überlagerungen von Dioden in der graphischen Säulen-Darstellung vermieden.

B3: Bezeichnung der Dioden, die in der Säulenauswertung in A berücksichtigt wurden. Die Dioden, die in Abhängigkeit von der Reizintensität eine Fluoreszenzabnahme (Depolarisation) signalisierten, sind mit hellgrau markiert.

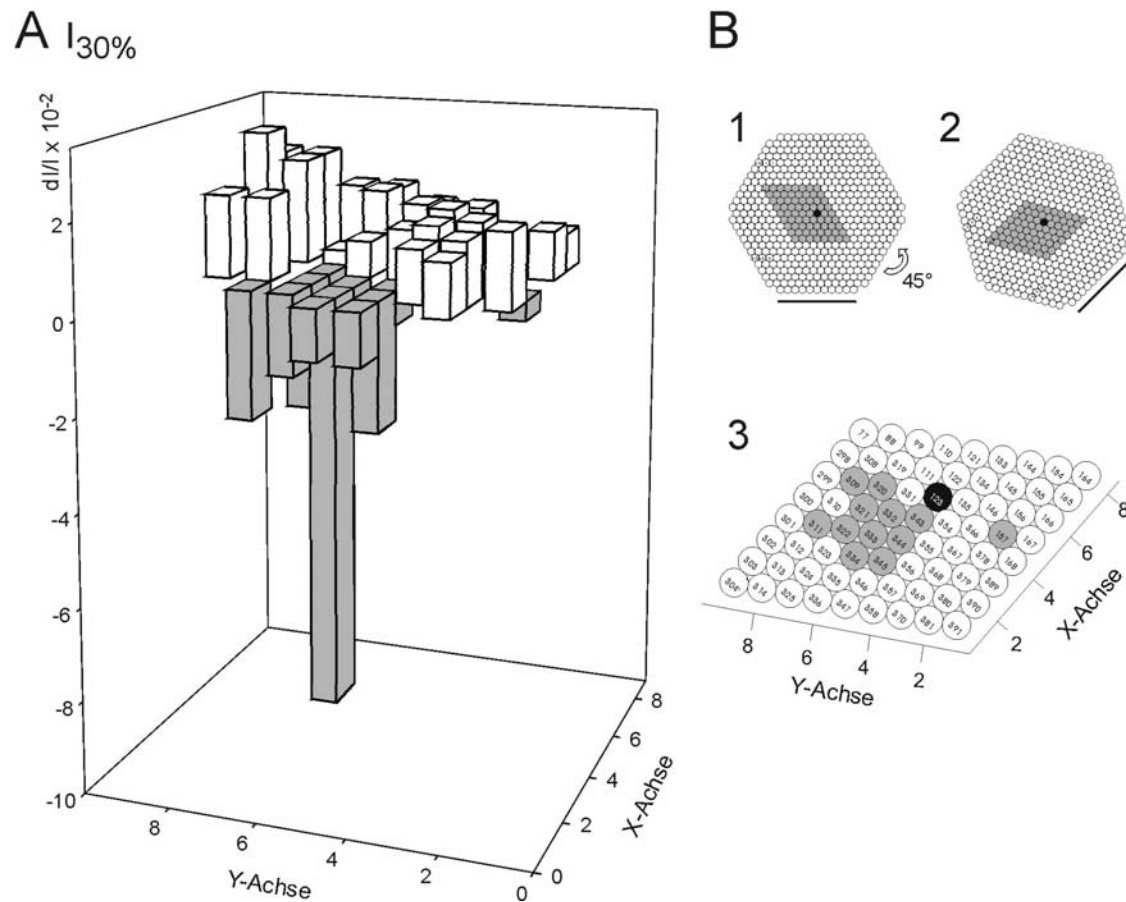
**Abb. 4-73:**

A: Säulendiagramm: Drei-dimensionale Darstellung der maximalen Reizantworten an unterschiedlichen Dioden bei einer relativen Reizintensität von 40 %, Abnahme der Fluoreszenzänderung (Depolarisation), Zunahme der Fluoreszenzänderung (Hyperpolarisation).

B1: Übersicht: Die Auswertung erfolgt im grau markierten Abschnitt. Die Diode 123 ist als zentraler Punkt schwarz markiert.

B2: Drehung des Ausschnitts um  $45^\circ$  nach rechts. Dadurch werden Überlagerungen von Dioden in der graphischen Säulen-Darstellung vermieden.

B3: Bezeichnung der Dioden, die in der Säulenauswertung in A berücksichtigt wurden. Die Dioden, die in Abhängigkeit von der Reizintensität eine Fluoreszenzabnahme (Depolarisation) signalisierten, sind mit hellgrau markiert.

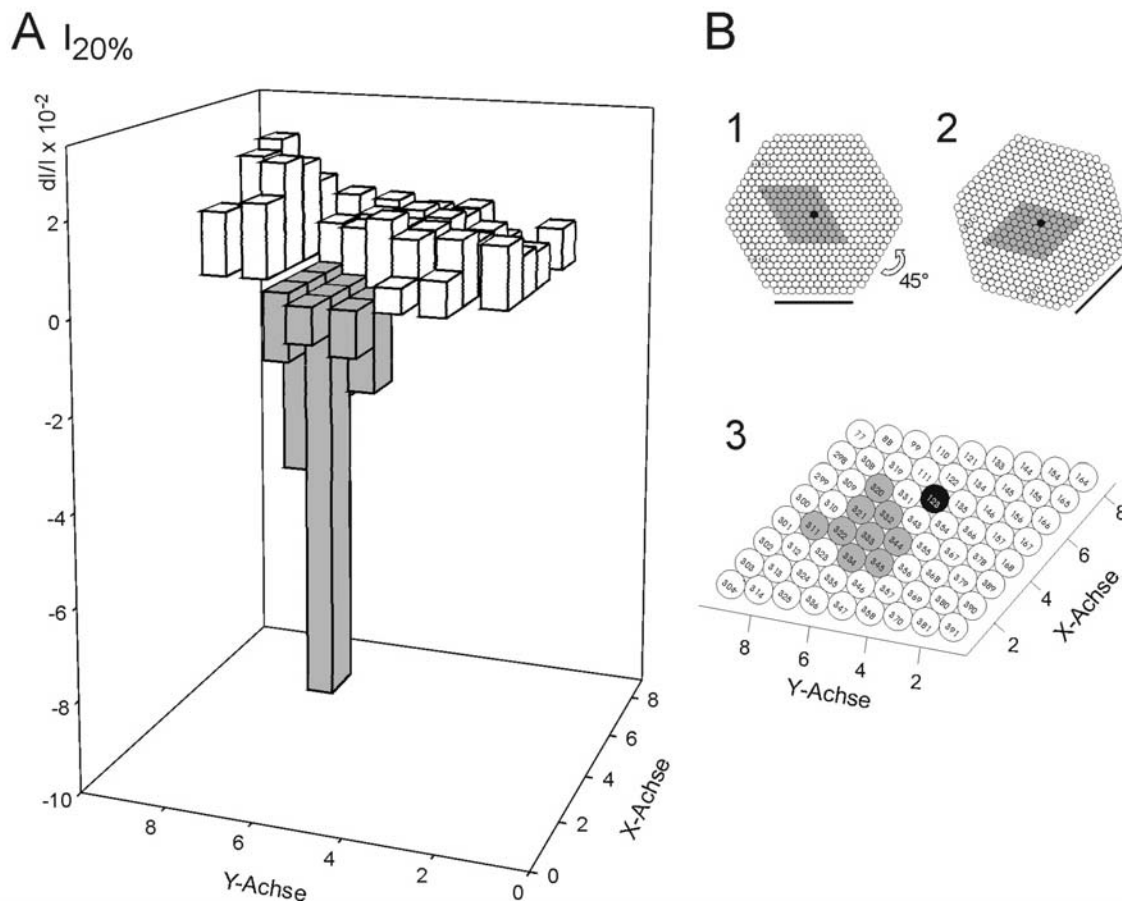
**Abb. 4-74:**

A: Säulendiagramm: Drei-dimensionale Darstellung der maximalen Reizantworten an unterschiedlichen Dioden bei einer relativen Reizintensität von 30 %, Abnahme der Fluoreszenzänderung (Depolarisation), Zunahme der Fluoreszenzänderung (Hyperpolarisation).

B1: Übersicht: Die Auswertung erfolgt im grau markierten Abschnitt. Die Diode 123 ist als zentraler Punkt schwarz markiert.

B2: Drehung des Ausschnitts um 45° nach rechts. Dadurch werden Überlagerungen von Dioden in der graphischen Säulen-Darstellung vermieden.

B3: Bezeichnung der Dioden, die in der Säulenauswertung in A berücksichtigt wurden. Die Dioden, die in Abhängigkeit von der Reizintensität eine Fluoreszenzabnahme (Depolarisation) signalisierten, sind mit hellgrau markiert.

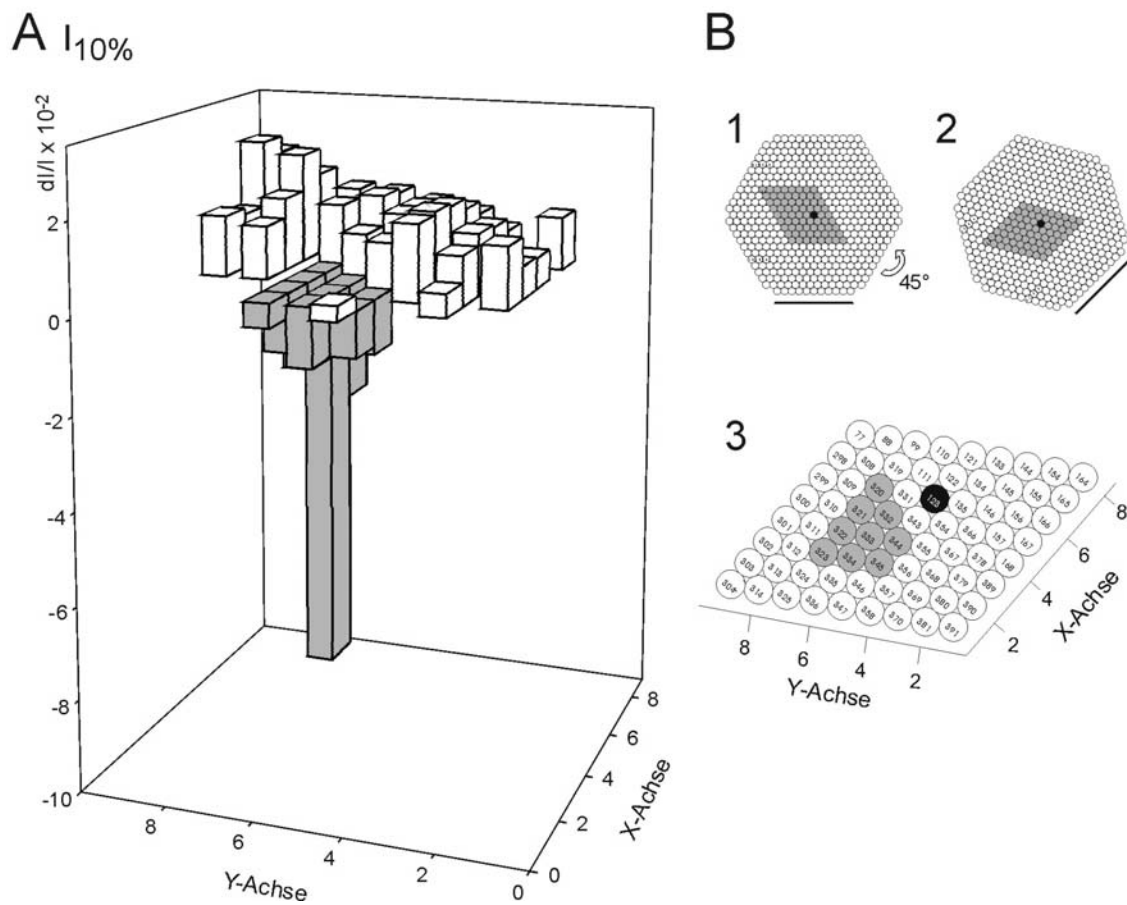
**Abb. 4-75:**

A: Säulendiagramm: Drei-dimensionale Darstellung der maximalen Reizantworten an unterschiedlichen Dioden bei einer relativen Reizintensität von 20 %, Abnahme der Fluoreszenzänderung (Depolarisation), Zunahme der Fluoreszenzänderung (Hyperpolarisation).

B1: Übersicht: Die Auswertung erfolgt im grau markierten Abschnitt. Die Diode 123 ist als zentraler Punkt schwarz markiert.

B2: Drehung des Ausschnitts um  $45^\circ$  nach rechts. Dadurch werden Überlagerungen von Dioden in der graphischen Säulen-Darstellung vermieden.

B3: Bezeichnung der Dioden, die in der Säulenauswertung in A berücksichtigt wurden. Die Dioden, die in Abhängigkeit von der Reizintensität eine Fluoreszenzabnahme (Depolarisation) signalisierten, sind mit hellgrau markiert.

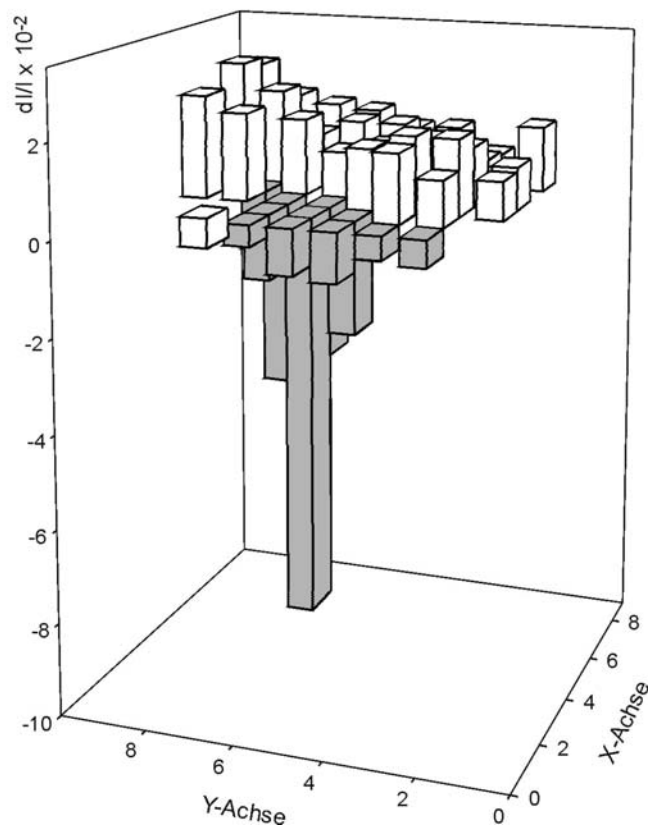
**Abb. 4-76:**

A: Säulendiagramm: Drei-dimensionale Darstellung der maximalen Reizantworten an unterschiedlichen Dioden bei einer relativen Reizintensität von 10 %, Abnahme der Fluoreszenzänderung (Depolarisation), Zunahme der Fluoreszenzänderung (Hyperpolarisation).

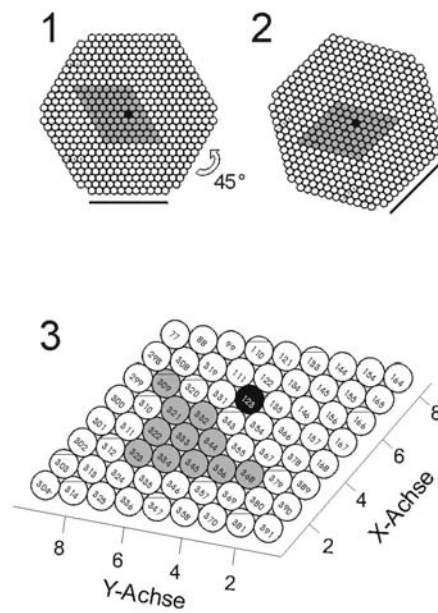
B1: Übersicht: Die Auswertung erfolgt im grau markierten Abschnitt. Die Diode 123 ist als zentraler Punkt schwarz markiert.

B2: Drehung des Ausschnitts um  $45^\circ$  nach rechts. Dadurch werden Überlagerungen von Dioden in der graphischen Säulen-Darstellung vermieden.

B3: Bezeichnung der Dioden, die in der Säulenauswertung in A berücksichtigt wurden. Die Dioden, die in Abhängigkeit von der Reizintensität eine Fluoreszenzabnahme (Depolarisation) signalisierten, sind mit hellgrau markiert.

A  $I_{max}$ 

## B

**Abb. 4-77:**

A: Säulendiagramm: Drei-dimensionale Darstellung der maximalen Reizantworten an unterschiedlichen Dioden bei einer relativen Reizintensität von  $I_{max}$ , Abnahme der Fluoreszenzänderung (Depolarisation), Zunahme der Fluoreszenzänderung (Hyperpolarisation).

B1: Übersicht: Die Auswertung erfolgt im grau markierten Abschnitt. Die Diode 123 ist als zentraler Punkt schwarz markiert.

B2: Drehung des Ausschnitts um  $45^\circ$  nach rechts. Dadurch werden Überlagerungen von Dioden in der graphischen Säulen-Darstellung vermieden.

B3: Bezeichnung der Dioden, die in der Säulenauswertung in A berücksichtigt wurden. Die Dioden, die in Abhängigkeit von der Reizintensität eine Fluoreszenzabnahme (Depolarisation) signalisierten, sind mit hellgrau markiert.

### 4.3.3 Farbliche Darstellung der Reizantworten

Die farblichen Darstellungen berücksichtigen die Reizantworten der Zellen bei den unterschiedlichen maximalen Reizintensitäten im räumlich zeitlichen Verlauf: Die erste Messung findet zum Zeitpunkt der Reizsetzung statt. In 16 definierten zeitlichen Intervallen folgen weitere Registrierungen. Die Messreihe endet mit der letzten durch die Dioden erfassbaren Reizantwort. Dieser Moment war nach 1130,3 ms erreicht.

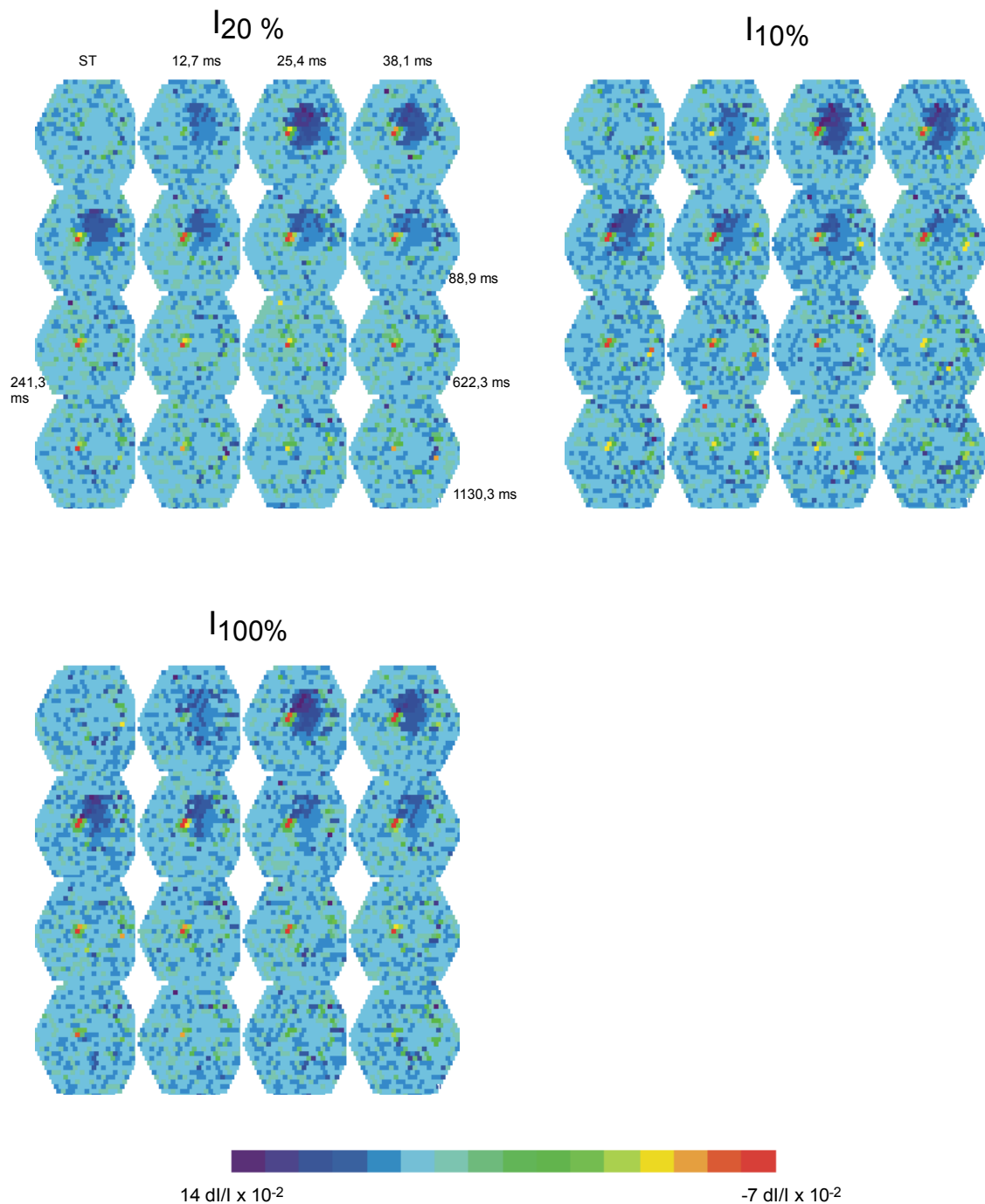
Bei dieser Auswertungsmethode bestätigten sich die zuvor gewonnenen Ergebnisse:

1. Fluoreszenzminderungen als Zeichen der Depolarisationen waren nur in einem Teilbereich des Hexagons nachweisbar.
2. Die Fluoreszenzänderungen vollziehen sich unabhängig der angewandten maximalen relativen Reizintensität.

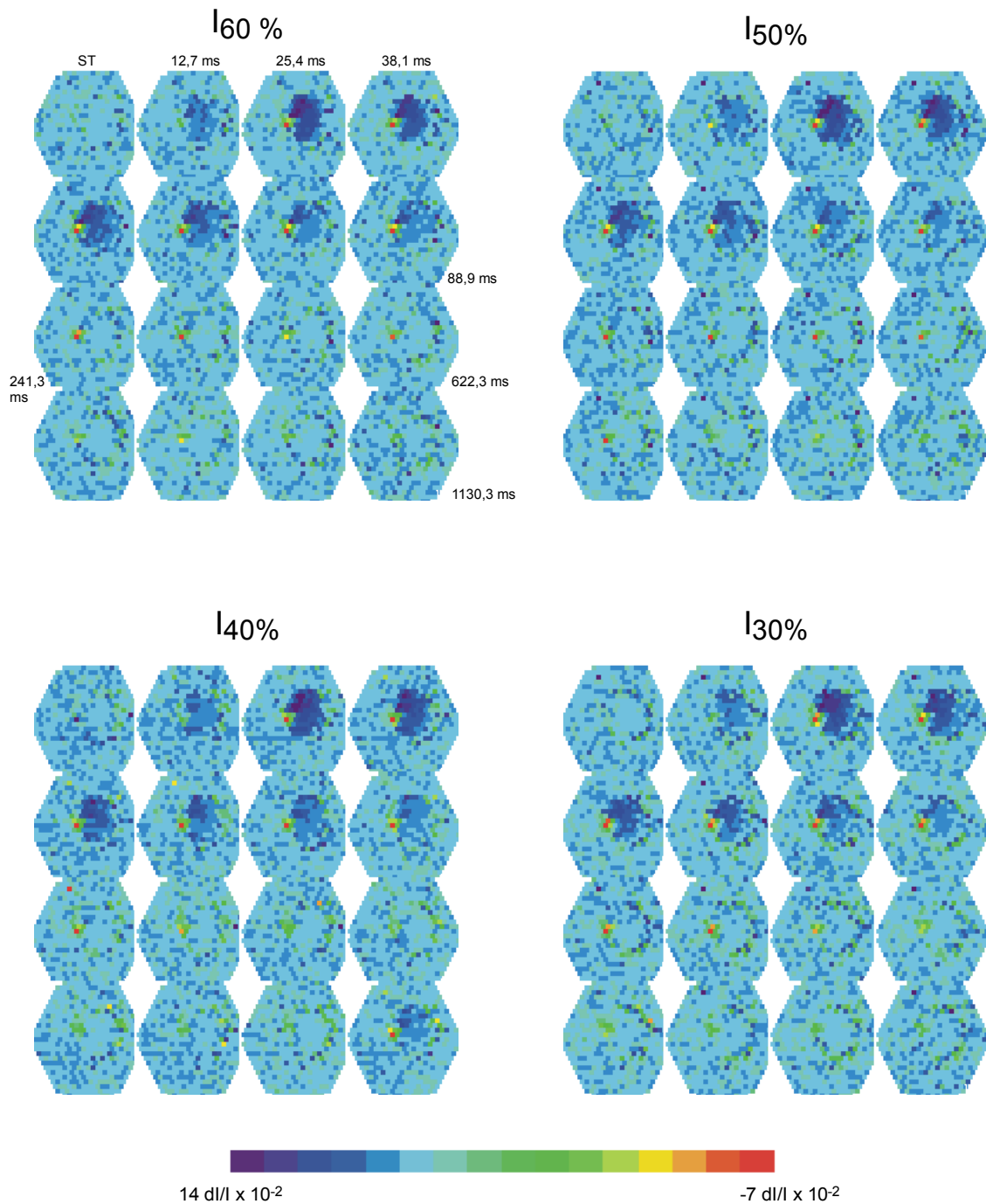
Des Weiteren informiert diese Methode über die Art der Reizantwort der Zellen:

3. Die, durch den Stimulus hervorgerufene Erregung, persistiert über einen Zeitraum von 1130 ms.

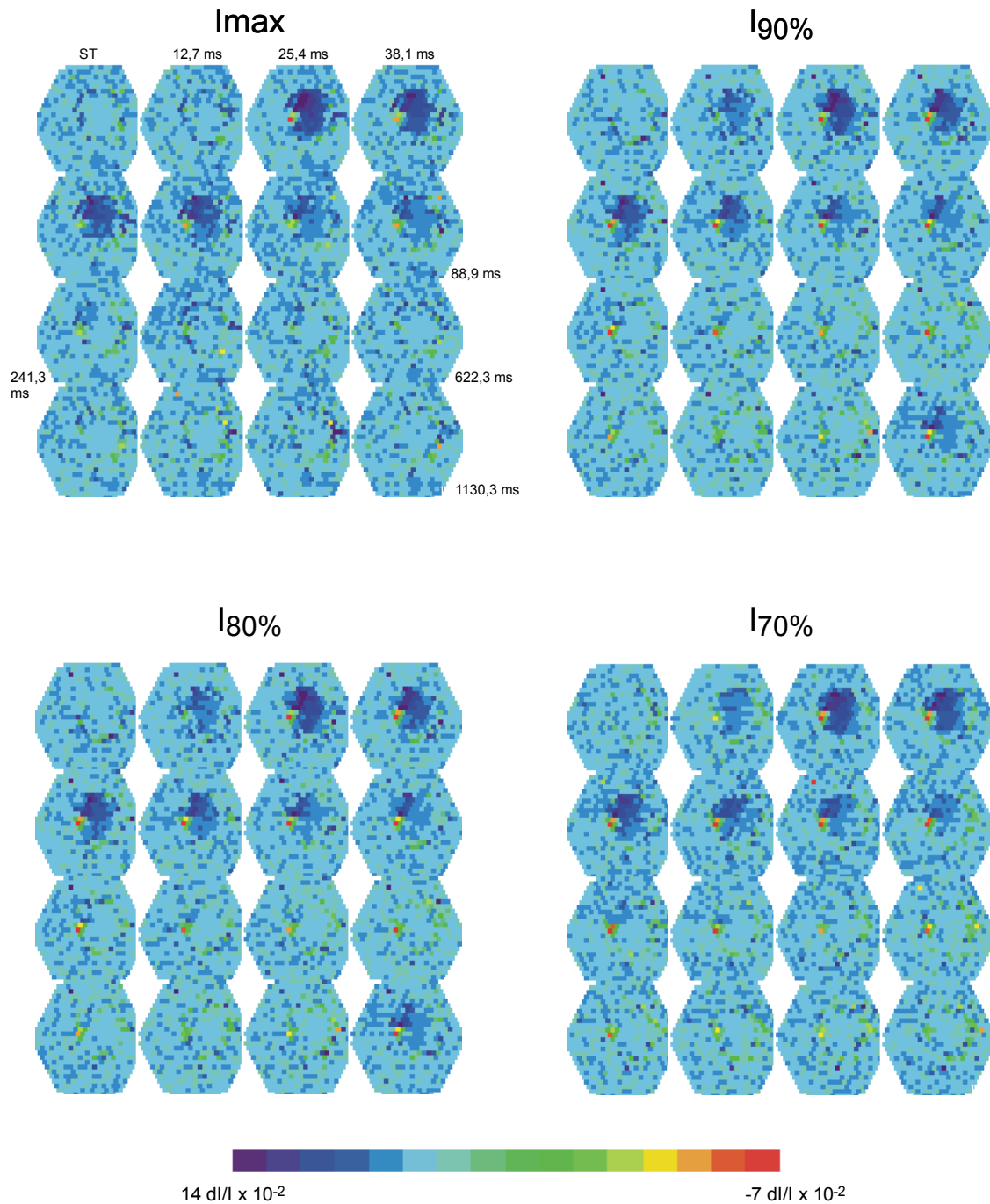


**Pixel**

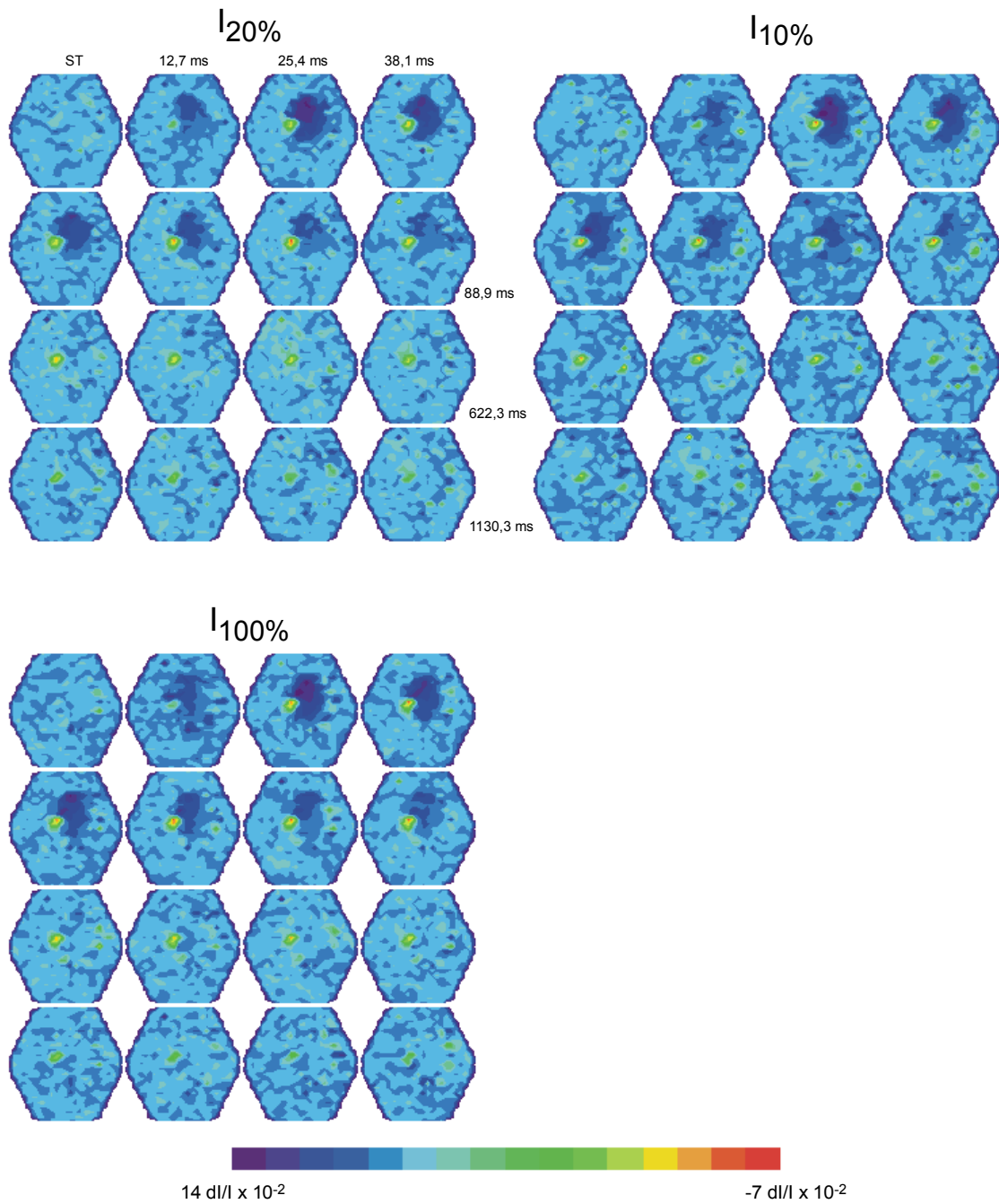
**Abb. 4-78:** Räumlich-zeitliche Darstellung der Erregungsausbreitung. Je 16 Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Array markierten Zellverbandes. Der Zeitabstand zwischen den Arrays beträgt für die ersten acht 12,7 ms, für die weiteren 127 ms. Der Zeitpunkt der Stimulation (ST) wurde als Ausgangspunkt gewählt.



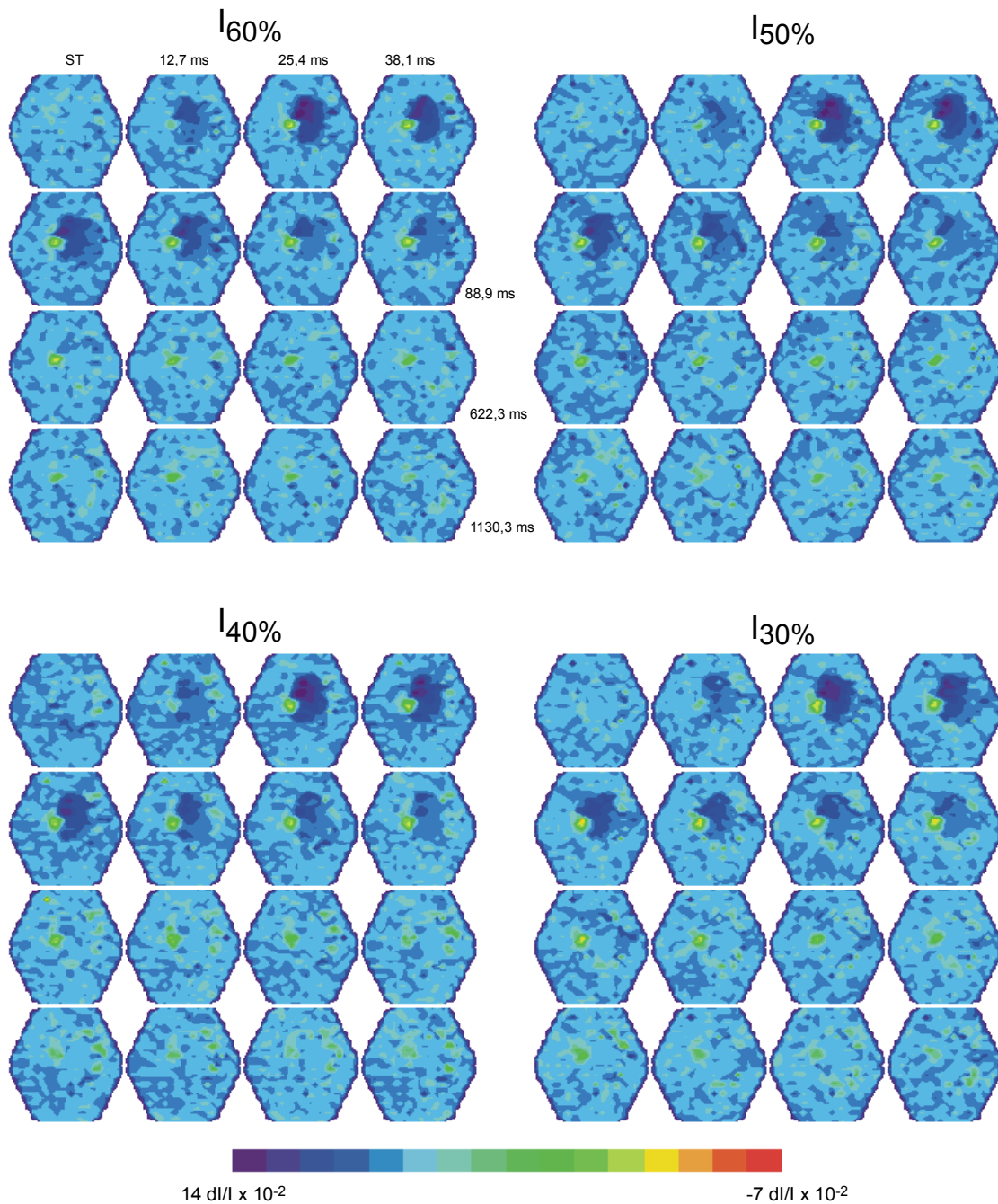
**Abb. 4-79:** Räumlich-zeitliche Darstellung der Erregungsausbreitung. Je 16 Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Array markierten Zellverbandes. Der Zeitabstand zwischen den Arrays beträgt für die ersten acht 12,7 ms, für die weiteren 127 ms. Der Zeitpunkt der Stimulation (ST) wurde als Ausgangspunkt gewählt.



**Abb. 4-80:** Räumlich-zeitliche Darstellung der Erregungsausbreitung. Je 16 Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Array markierten Zellverbandes. Der Zeitabstand zwischen den Arrays beträgt für die ersten acht 12,7 ms, für die weiteren 127 ms. Der Zeitpunkt der Stimulation (ST) wurde als Ausgangspunkt gewählt.

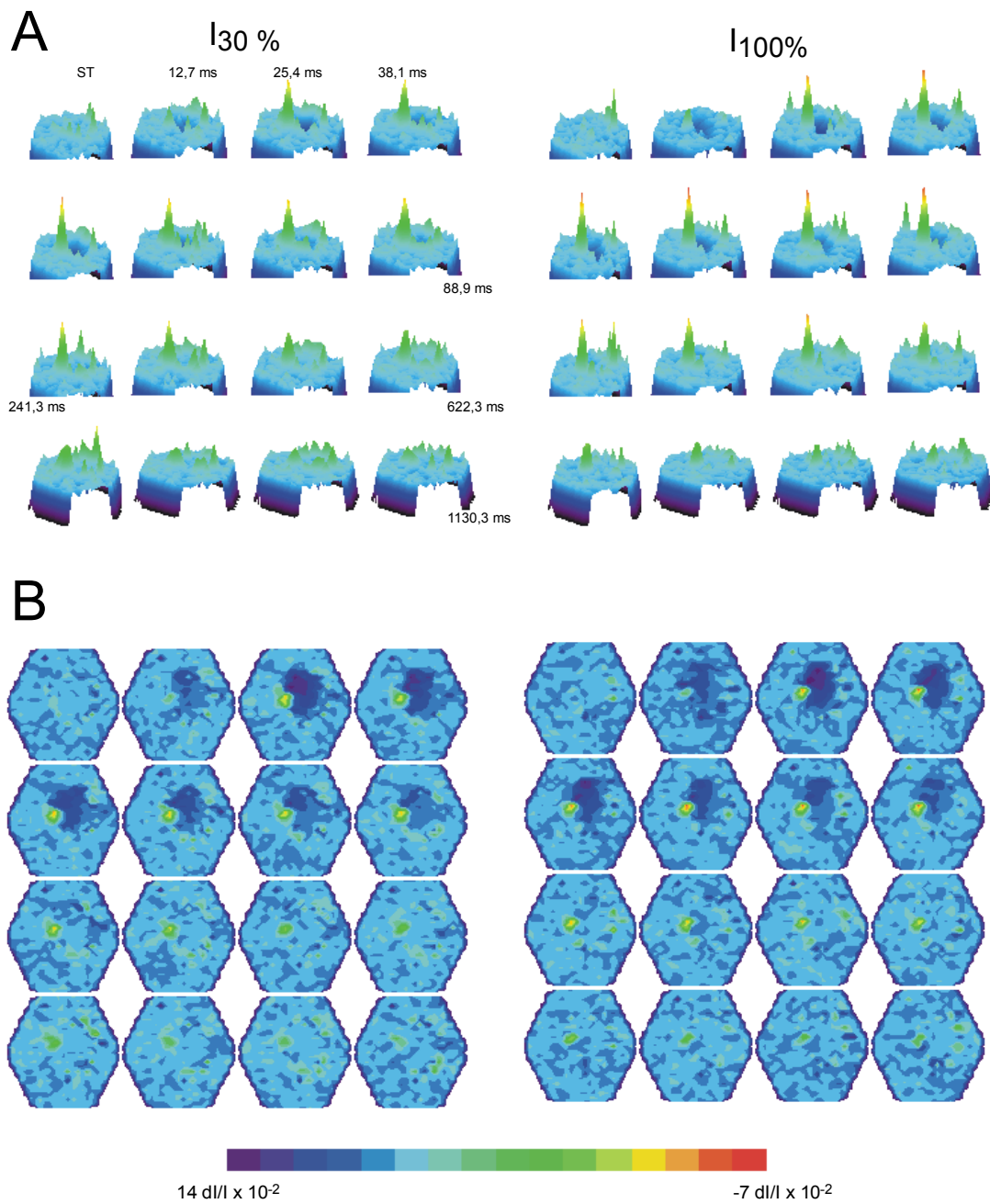


**Abb. 4-81:** Räumlich-zeitliche Darstellung der Erregungsausbreitung. Je 16 Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Array markierten Zellverbandes. Der Zeitabstand zwischen den Arrays beträgt für die ersten acht 12,7 ms, für die weiteren 127 ms. Der Zeitpunkt der Stimulation (ST) wurde als Ausgangspunkt gewählt.

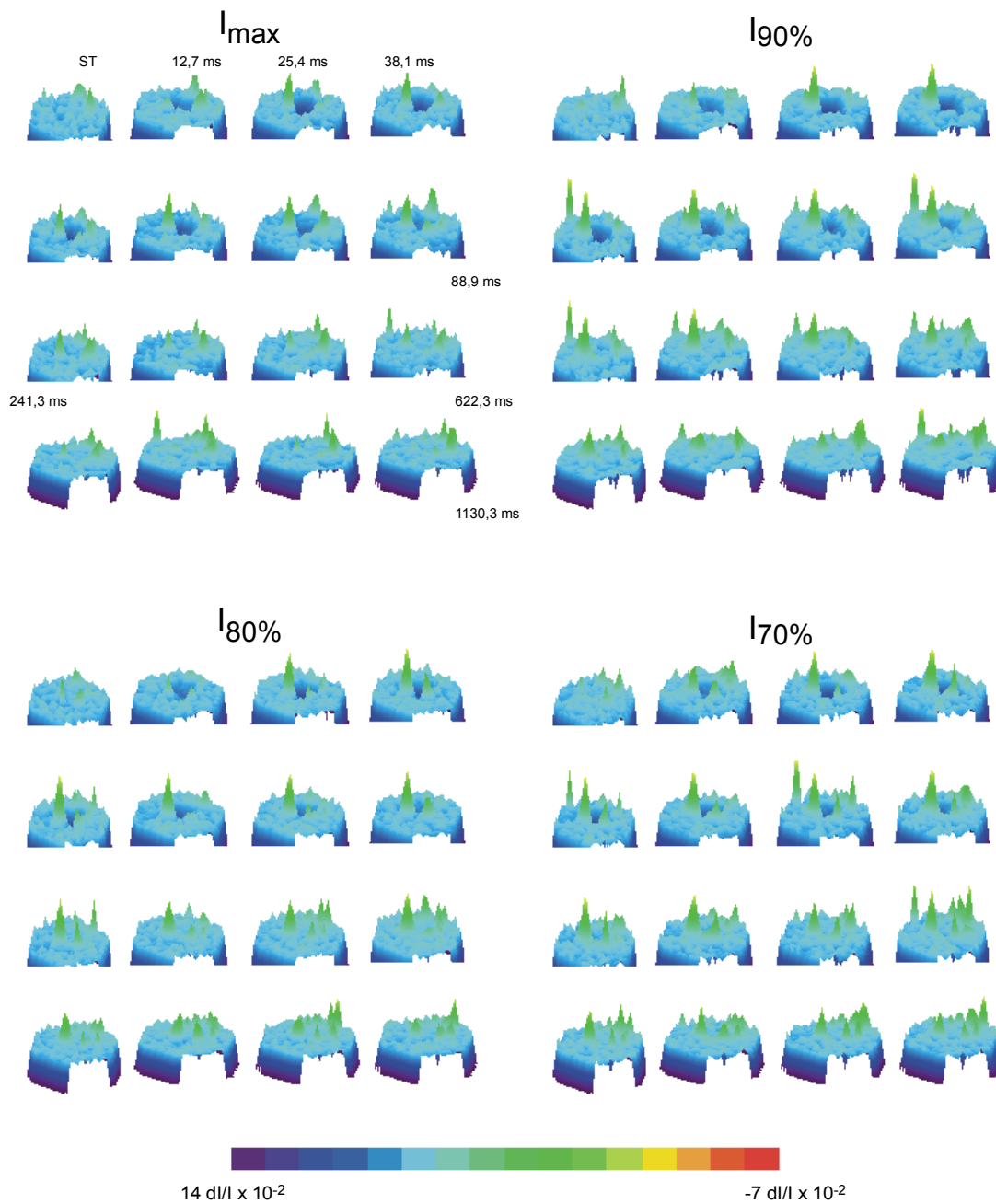


**Abb. 4-82:** Räumlich-zeitliche Darstellung der Erregungsausbreitung. Je 16 Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Array markierten Zellverbandes. Der Zeitabstand zwischen den Arrays beträgt für die ersten acht 12,7 ms, für die weiteren 127 ms. Der Zeitpunkt der Stimulation (ST) wurde als Ausgangspunkt gewählt.

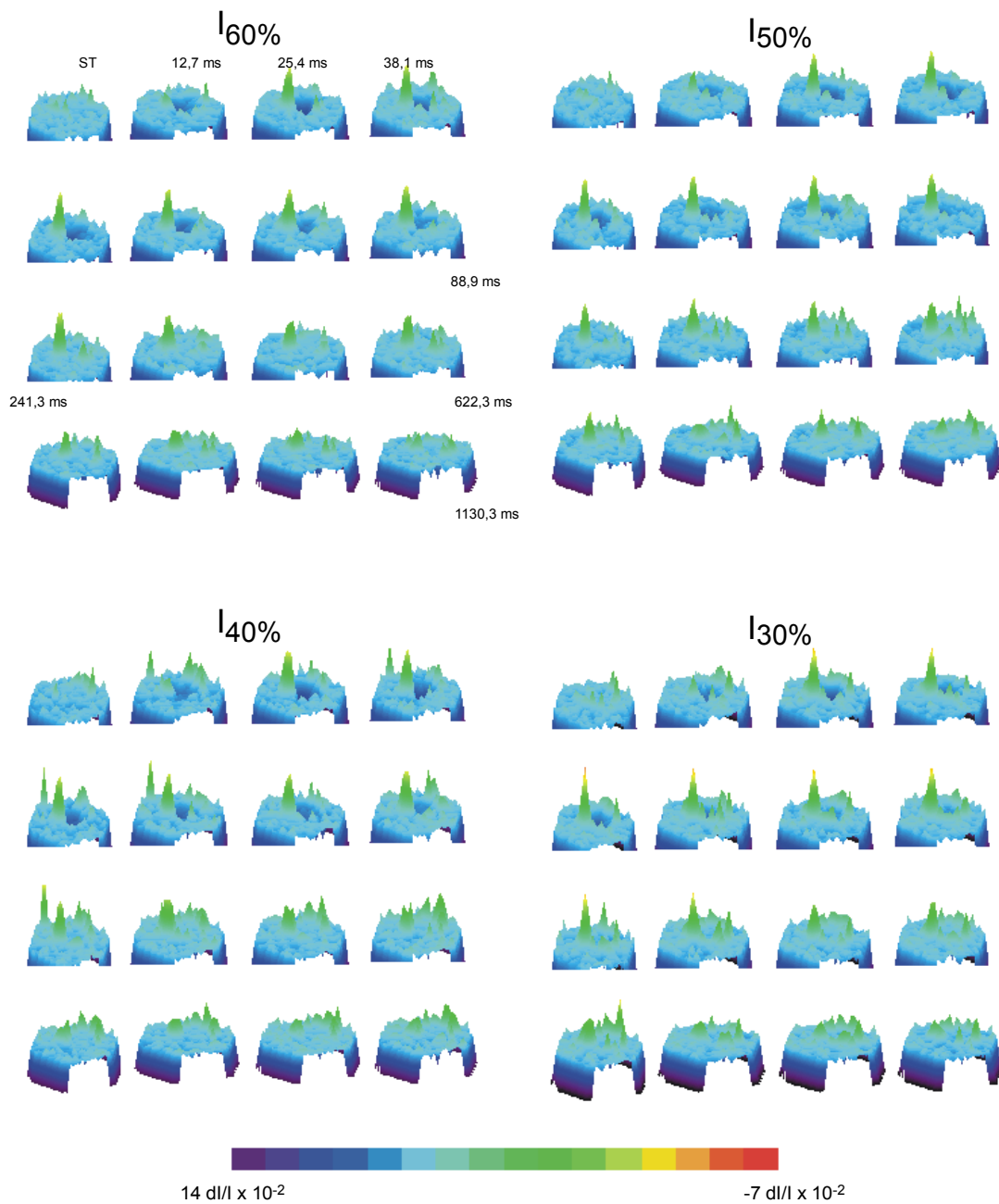
In dieser Darstellungsweise sind deutliche gelblich grün gefärbte Ausschläge in die Höhe zu erkennen.



**Abb. 4-83:** Räumlich-zeitliche Darstellung der Erregungsausbreitung. Je 16 Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Array markierten Zellverbandes. Der Zeitabstand zwischen den Arrays beträgt für die ersten acht 12,7 ms, für die weiteren 127 ms. Der Zeitpunkt der Stimulation (ST) wurde als Ausgangspunkt gewählt.

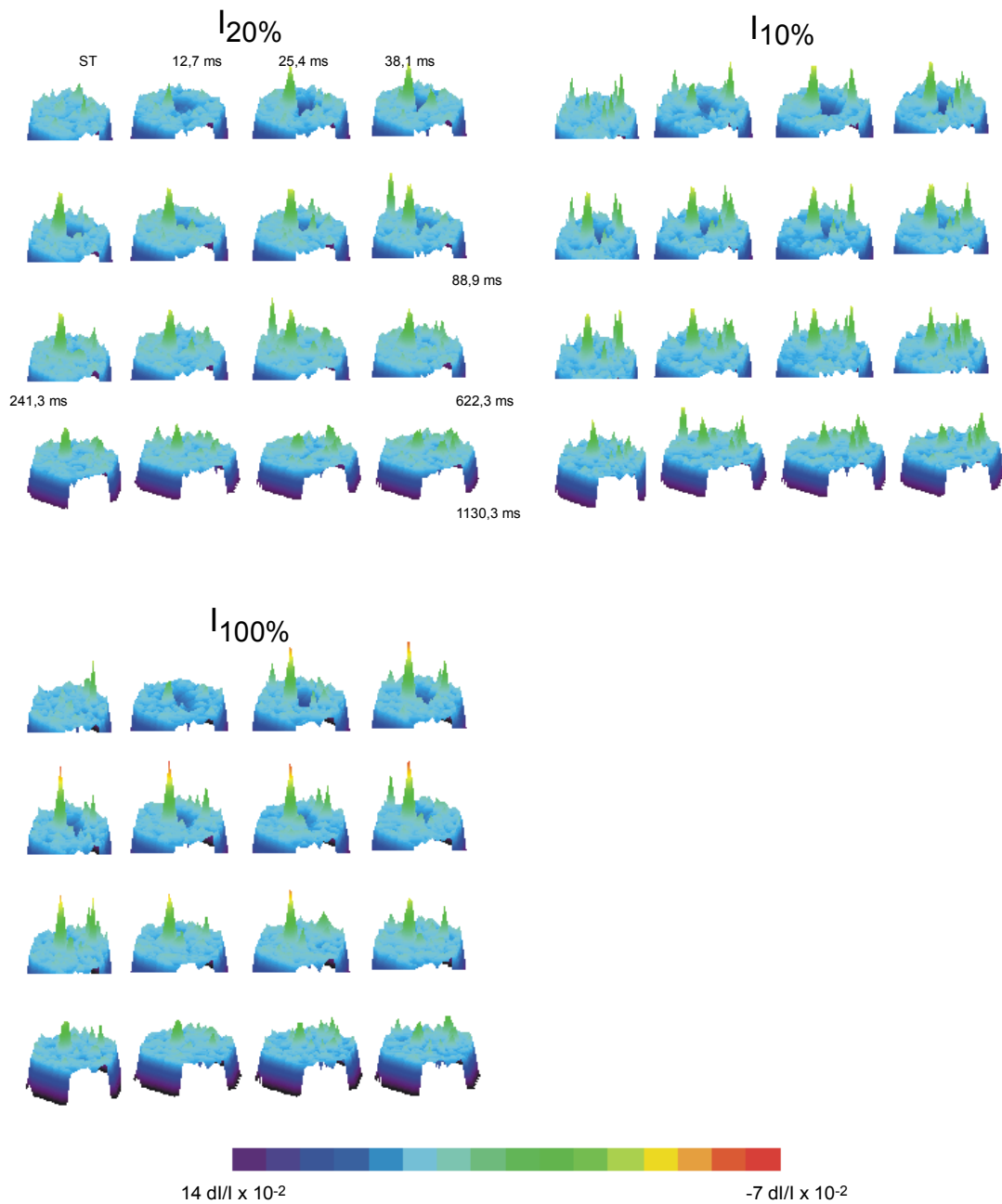


**Abb. 4-84:** Räumlich-zeitliche Darstellung der Erregungsausbreitung. Je 16 Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Array markierten Zellverbandes. Der Zeitabstand zwischen den Arrays beträgt für die ersten acht 12,7 ms, für die weiteren 127 ms. Der Zeitpunkt der Stimulation (ST) wurde als Ausgangspunkt gewählt.



**Abb. 4-85:** Räumlich-zeitliche Darstellung der Erregungsausbreitung. Je 16 Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Array markierten Zellverbandes. Der Zeitabstand zwischen den Arrays beträgt für die ersten acht 12,7 ms, für die weiteren 127 ms. Der Zeitpunkt der Stimulation (ST) wurde als Ausgangspunkt gewählt.





**Abb. 4-86:** Räumlich-zeitliche Darstellung der Erregungsausbreitung. Je 16 Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Array markierten Zellverbandes. Der Zeitabstand zwischen den Arrays beträgt für die ersten acht 12,7 ms, für die weiteren 127 ms. Der Zeitpunkt der Stimulation (ST) wurde als Ausgangspunkt gewählt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Zellisolationstechnik

Die spätere autologe Transplantation des kultivierten Gewebes stellt ein wichtiges Ziel des TE dar. Aus diesem Grunde können in der Klinik ausschließlich Zellen verwendet werden, die vom Patienten selbst entnommen worden sind. In der vorliegenden Arbeit wurden Muskelzellen des IAS des Hausschweins durch ein minimal invasives Verfahren gewonnen und kultiviert.

Es existieren, wie u. a. bei Chamley-Campbell et al. erörtert, zwei Alternativverfahren, glatte Muskelzellen aus dem Muskel zu isolieren: die Explantatmethode und die Enzymisolierung (Chamley-Campbell, Campbell et al. 1979, ). Letztere hat zum Vorteil, dass die Zellen direkt vom Zeitpunkt ihrer Inkulturnahme beobachtet werden können. Ein sehr wesentlicher Nachteil besteht darin, dass durch die benutzten Enzyme eine Zellschädigung mit der Folge z. B. des Verlustes der Proliferationsfähigkeit nicht ausgeschlossen werden kann (Atala and Lanza 2002<sup>2</sup>). Der Explantatmethode liegt das Prinzip der Migration zugrunde. Das Wachstum der Zellen geht von einem Gewebestück aus. Der Vorteil liegt in einer vollkommenen Unversehrtheit des erhaltenen Zellmaterials. Aufgrund des relativ geringen Gewebes, das aus dem IAS gewonnen werden konnte, wurde die Explantatmethode angewandt. So sollte ein Zellverlust vermieden werden. Die Explantatmethode wurde z. B. auch von Endlich et al. und Axel et al. zur Kultivierung von vaskulären Muskelzellen benutzt (Axel, Brehm et al. 1996; Endlich, Endlich et al. 2000; Dame, Yu et al. 2003).

### 5.2 Verhalten der Zellen in Kultur

Eine für die Gewebeneubildung ausreichende Zellzahl bildet die Voraussetzung für das Ziel des TE und somit auch für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit. Durch den Vorgang der mechanischen Isolierung wird nur eine geringe Anzahl von Zellen aus der gewonnenen Probe freigesetzt. Diese Zellzahl ist für eine therapeutisch verwendbare Züchtung viel zu niedrig. Daher ist es unabwendbar, die Zellen in vitro zu vermehren. Während die Charaktereigenschaften der glatten Muskelzellen der Blutgefäße schon intensiv untersucht wurden

(Berglund, Nerem et al. 2004; Stegemann, Hong et al. 2005), ist über das Kulturverhalten der Muskelzellen des Intestinaltraktes wenig bekannt.

Die anale Inkontinenz betrifft Menschen in allen Altersklassen und sozialen Schichten. Oftmals liegt diesem Krankheitsbild eine verminderte bzw. aufgehobene Funktion des IAS zugrunde (Hecker, Baar et al. 2005). Bei Kindern mit Analatresie ist häufig der IAS nur rudimentär angelegt. Dennoch gibt es in der Literatur wenige Untersuchungen über den IAS und den pathophysiologischen Mechanismus auf zellulärer Ebene (Hecker, Baar et al. 2005). Über das TE des IAS konnte bis dato lediglich der in Kap. 1.2.3 skizzierte Artikel gefunden werden. Hecker et al. stellten im Tierversuch ein dreidimensionales physiologisches Modell des IAS vor (Hecker, Baar et al. 2005). Dieses zeigt die Möglichkeit auf, die Auswirkungen verschiedener Medikamente, Wachstumsfaktoren und mechanischer Reize auf die Funktion der SMC des IAS zu erproben. Das Forschungsteam generierte mit der Hilfe von Fibrin-Gelen einen zylindrischen Ring, der aus isolierten SMC des IAS von Kaninchen bestand. Die kultivierten IAS-Ringe verfügten über einen spontanen Basaltonus. Die Stimulation mit 8-bromo-cAMP führte zu einer  $Ca^{2+}$  unabhängigen Relaxation, während die Zugabe von Acetylcholin eine nach 30 Sek eintretende  $Ca^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ -Konzentration abhängige Kontraktion der Zellen verursachte, die 4 Min anhielt. Ausserdem konnte ein erheblicher Unterschied in der Funktionalität der Ringe des IAS im Vergleich zu Ringen, die aus isolierten SMC des Kolons gebildet worden waren, festgestellt werden (Hecker, Baar et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Muskelzellen des IAS in geringer Dichte ausgesät, um eine maximale Expansion der Zellen pro Passage zu erlangen. In der Lichtmikroskopie ließen sich die Zellen zu jedem Zeitpunkt gut darstellen. Die Zellen wuchsen am 2. Tag sternenförmig aus dem Brocken und setzten sich am 4. Tag zirkulär in traubenhäufigen Anhäufungen vom Brocken ab. Diese Beobachtungen sind konform mit den Angaben von Graham et al. (Graham, Diegelmann et al. 1984). Entsprechend der Literaturangaben zum Zellwachstum wuchsen die Muskelzellen in dem charakteristischen Berg- und Tal-Muster. Dieses Phänomen wird auch in anderen Untersuchungen beschrieben (Eder, Corvin et al. 2000; Gesellman 2003; Lamby 2005). Die Zellen nahmen während

der Proliferation eine spindelförmige Gestalt an. Diese fibroblastenähnliche Morphologie wird in zahlreichen Arbeiten erwähnt (Graham, Diegelmann et al. 1984; Sas and Miller 1988; Absher, Woodcock-Mitchell et al. 1989). Am 8. Tag lagen die Zellen dicht gepackt und parallel angeordnet vergleichbar einem Zellrasen. Bis zum 19. Tag hatte sich ein Zellrasen gebildet. Vergleichbare Arbeiten bzgl. des konfluenten Wachstums am 19. Tag konnten nicht gefunden werden.

### **5.3 Das optische Registrierverfahren als Vitalitätsnachweis**

#### **5.3.1 Beurteilung und Aussagekraft der unterschiedlichen Auswertungsverfahren**

Eine weitere wesentliche Voraussetzung des TE ist, dass das generierte Gewebe seine typischen Eigenschaften in vitro und später in vivo beibehält. Das optische Registrierverfahren bietet die Chance zur Analyse eines geringen Zellmaterials im Hinblick auf Vitalität, Membranpotentialänderungen und elektromechanische Kopplung. Diese drei Faktoren wurden auf elektrophysiologischem Weg untersucht und die Ergebnisse einer detaillierten Auswertung zugeführt. Die bestbewachsene Zellkultur wurde nach drei Passagen für den elektrophysiologischen Nachweis ausgewählt. Einerseits wurden die Versuche zu dem gewählten Zeitpunkt anstelle einer Immunhistochemie durchgeführt, um Zellmaterial im Hinblick auf die folgenden Versuche sparen zu können. Andererseits diente diese Technik der Erprobung, ob Membranpotentialänderungen als Zeichen der Vitalität der Zellen nachweisbar sind. Die Versuche sollten die Grundlage legen für weitere statistisch auswertbare Untersuchungen, weil über das morphologische Verhalten des IAS auf zellulärer Ebene wenig bekannt ist (Hecker, Baar et al. 2005). Langfristig soll diese Form der Untersuchungen z. B. Aussagen über den Tonus der generierten SMC des IAS und dessen Beeinflussbarkeit durch Stimulatoren bzw. Inhibitoren erlauben.

Die Idee des detaillierten Auswertungsverfahrens entstand auf der Basis der Ergebnisse, die über das Verhalten der Zellen des Hippokampus und des Neokortex in Bezug auf die Pathogenese und Diagnostik des Krankheitsbildes der Epi-

lepsie von Speckmann et al. erreicht worden sind (Speckmann, Köhling et al. 2002).

Durch die Methodik des optischen Registrierverfahrens konnte eine Technik geschaffen werden, die mehrere wichtige Gesichtspunkte miteinander kombiniert:

1. Membranpotentialänderungen der in vitro generierten Zellen konnten nach elektrischer Reizung registriert werden.
2. Die in den Originalregistrierungen erfassten kleinen schnellen Zacken/scharfen Abweichungen spiegeln überwiegend die Aktionspotentiale der Zellen wieder.
3. Die Membranpotentialänderungen der Zellen konnten im sogenannten Dioden-Array mit Hilfe von 464 Dioden farbkodiert gedruckt werden.
4. Negative Antworten der Zellen kommen durch Aufladungen der Membranpotentiale durch die Reizelektrode zustande.

### **5.3.2 Fluoreszenzstrahlen und Säulendiagramme**

In der Auswertung der Ergebnisse in Form von Fluoreszenzstrahlen bot sich dem Betrachter ein inhomogenes Bild. Es entstanden unterschiedliche Reizantworten an nahe beieinander liegenden Dioden. Jedoch waren Ähnlichkeiten der Reizantworten auf die unterschiedlichen relativen Reizintensitäten festzustellen. Durch die Darstellung der Messwerte in Form von Säulen konnte der Bereich, in dem Fluoreszenzabnahmen gemessen wurden, lokalisiert werden. Die Änderungen der Membranpotentiale fanden unabhängig von der maximalen relativen Reizintensität in dem gleichen Bereich des Hexagons statt. Die Höhe der Amplituden war bei den unterschiedlichen relativen maximalen Reizintensitäten ungefähr gleich. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass es sich nicht um ein funktionelles Zellsynzidium handelt.

### **5.3.3 Area plot**

Die Darstellung in Raum und Zeit lieferte die folgenden Erkenntnisse:

1. Fluoreszenzminderungen als Zeichen der Depolarisation sind nur in einem Teilbereich des Hexagons nachweisbar.
2. Die Fluoreszenzänderungen vollziehen sich nahezu unabhängig von der angewandten maximalen relativen Reizintensität. Für die Klinik bedeutet dies,

dass ausschlaggebender Faktor für den Gesamttonus des kompletten IAS der Anteil an funktionsfähigen Zellen ist.

Des Weiteren informiert diese Methode über die Art der Reizantwort der Zellen:

3. Die durch den Stimulus hervorgerufene Erregung persistiert über einen Zeitraum von 1130 ms. Diese Feststellung bedeutet, dass bei der Erregungsrückbildung eine sehr lange Zeitkonstante vorherrscht.

Über den Differenzierungsgrad und die Funktionalität der einzelnen Zelle lassen sich nur bedingt Aussagen treffen. In der Mikroskopie konnten Kontraktionen gesehen werden.

Zusammenfassend konnte mittels des optischen Registrierverfahrens festgestellt werden, dass diese Methode die Möglichkeit bietet, Membranpotentialänderungen von einzelnen kultivierten Zellen zu registrieren. Somit ist die Vitalität der Zellen nachweisbar.

## **5.4 Beurteilung und Vergleich der drei besiedelten Transplantate**

### **5.4.1 Motivation für den Einsatz der gewählten Transportmedien**

Die Generierung einer dreidimensionalen Kultur stellt neben dem Erreichen einer ausreichend grossen Zellzahl und der Generierung eines funktionsfähigen Gewebes eine weitere Voraussetzung für das TE von glattem Muskelgewebe dar. Dem Biomaterial kommt dabei eine Schlüsselfunktion zu. Viele Publikationen konzentrieren sich auf die Analyse eines Gewebegerüsts (Wunsch, Ehlers et al. 2005). Um herauszufinden, welche Gewebemembran am förderlichsten für die Generierung von Muskelzellen des IAS geeignet ist, wurden in der vorliegenden Arbeit mit den natürlichen Gewebegerüsten Tutomesh<sup>®</sup>-H und Surgisis<sup>®</sup> und der synthetisch hergestellten Membran Ethisorb<sup>®</sup> drei unterschiedliche Materialien mit Zellen besiedelt. Die biologische Eignung der Matrizen Tutomesh<sup>®</sup>-H, Surgisis<sup>®</sup> und Ethisorb<sup>®</sup> konnte zum Teil bereits in Versuchen zur Generierung anderer Zellarten gezeigt werden. Das Ethisorb<sup>®</sup>-Weichgewebetransplantat hat sich bei der in vitro Generierung von Knorpel und Knochengewebe bewährt (Kubler, Neugebauer et al. 2004). Da die Ergebnisse die gute Biokompatibilität des synthetisch hergestellten Materials untermauern,

wurde es zur Generierung von Muskelzellen des IAS geprüft. Surgisis<sup>®</sup> stellt eine andere Matrix dar, die für die Kultivierung verschiedener Zellformen zum Ersatz folgender Gewebe im Tierversuch bereits erprobt wurde (Sachs and Gloeckner 1998): Harnblase (Kaninchen), Achillessehne (Hund), Dura Mater, Bauchdecke (Hund) und Gefäße (Kaninchen) (Sachs and Gloeckner 1998). Die Submukosa wurde zudem zur Generierung von urologischem Gewebe, wie z. B. für die Harnblasen- oder Urethra-Rekonstruktion verwendet (Cheng and Kropp 2000; Pariente, Kim et al. 2002; Nuininga, H. et al. 2004). A. Atala hält diese Kollagen-Matrix ebenfalls sehr nützlich für urologische Rekonstruktionen (Atala 2002). Mittels der Co-Kultur von Urothel- und SMC auf SIS präsentierte Zhang et al. Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, die durch die Submukosa hervorgerufen wurden (Zhang, Kropp et al. 2000). Zudem zeigte er in einer Versuchsreihe mit Nacktmäusen, dass mit SMC besiedelte SIS-Implantate eine organisierte Harnblasenregeneration induzieren (Zhang, Kropp et al. 2004). In der Klinik wurde SIS jedoch bisher noch nicht für den Harnblasenersatz eingesetzt. (Nuininga, H. et al. 2004). Tutomesh<sup>®</sup>-H findet als Implantat in der Hernienchirurgie und bei Omphalozelen Verwendung (Klein 1990; Del Vas Cenal 1991; Simon 2001; Peiper 2002).

Im Folgenden werden die Zell-Transplantat-Interaktionen *in vitro* verglichen sowie zusätzlich in Hinblick auf die Vaskularisation *in vivo* untersucht.

#### **5.4.2 In vitro-Untersuchungen: Tutomesh<sup>®</sup>-H, Surgisis<sup>®</sup> und Ethisorb<sup>®</sup> im Vergleich**

Aus den *in vitro* Untersuchungen der besiedelten Gewebegerüste konnten die folgenden Feststellungen gewonnen werden:

Zellzahl: Bei allen drei Gewebegerüsten zeigte sich im Verlauf der Kultur eine Erhöhung der Zellzahl. Die Zellverteilung des Randbereichs zum Inneren war jedoch unterschiedlich gewichtet. Bei Tutomesh<sup>®</sup>-H wurden vor allem die Randbereiche von parallel angeordneten Zellen besetzt. Im Inneren befanden sich lediglich vereinzelt Zellen. In der Literatur konnte keine vergleichbare Arbeit gefunden werden.

Die Zellverteilung auf Surgisis<sup>®</sup> verlief vergleichbar mit derjenigen von Tutomesh<sup>®</sup>-H. Die Zellen hafteten anfangs in ein bis zwei parallelen Schichten am

Rand ohne Verankerung in dem Trägermaterial. Nach einem zeitlichen Drittel und bis zum Ende der Kulturzeit konnten auch vereinzelt in den Faserzwischenräumen Zellen erkannt werden. Diese Beobachtungen wurden von Zhang et al., die unter ähnlichen Bedingungen die Generierung von einem dreidimensionalen glatten Muskelzellgewebe der Harnblase untersuchten, ähnlich beschrieben (Zhang, Kropp et al. 2000): Hier hatte sich nach 3 Tagen eine ein- bis zweischichtige Muskelzellkultur am Rand der Submukosa gebildet ohne Penetranz der Matrix. Nach 28 Tagen hatten sich 5 bis 7 Zellschichten in einer dreidimensionalen Struktur entwickelt. Der Hauptanteil der Zellen befand sich jedoch auf der Oberfläche der Submukosa mit wenigen Gebieten, in denen die Zellen in der Matrix verankert waren (Zhang, Gharaee-Kermani et al. 1997; Eder, Corvin et al. 2000).

Bei Ethisorb<sup>®</sup> konnte anfangs lediglich ein ausgeprägtes Vermehrungsverhalten um das Gewebegerüst herum ohne Kontakt zur Membran beobachtet werden. Während in den ersten Tagen nur vereinzelt Zellen am Randbereich und innerhalb des Gewebegerüsts verankert waren, stieg der Zellanteil im Inneren erheblich an, so dass am Ende der Kulturzeit die Trägermembran von Zellen durchmauert war. Eine vergleichbare Studie mit einem synthetischen Gewebegerüst wurde von Xu et al. zur Kultivierung von glatten Muskel- und Endothelzellen durchgeführt (Xu, Inai et al. 2004). Sie benutzten den Co-Polymer Poly-L-Lactid-Co-Epsilon-Caprolacton [P(LLA-CL)] (75 : 25), dessen mechanische Eigenschaften vergleichbar mit denen einer menschlichen Koronararterie sind. Beide Zelltypen behielten ihren Phänotyp bei. Außerdem wurden sie zur Bildung eines dreidimensionalen zellulären Netzwerkes in die Fasern des Gewebegerüsts integriert. Die Ergebnisse zeigen, dass P(LLA-CL) die Fähigkeit besitzt, die Verankerung und Proliferation von Zellen zu unterstützen. Auf diese Weise wurde die Anwendung in der Herstellung von Blutgefäßersatz erfolgreich bestätigt (Xu, Inai et al. 2004). Higgins et al. verwendeten in einer Studie PGA als Trägermembran zur Kultivierung von vaskulären glatten Muskelzellen. In den Gefäßen zeichneten sich die kultivierten Muskelzellen durch eine erhöhte Mitoserate und Dedifferenzierung aus (Higgins, Solan et al. 2003). Diesen Ergebnissen gegenüber steht die Studie von De Filippo et al.: Die Kultivierung von



Muskelzellen der Vagina, die Zytokeratin und  $\alpha$ -Aktin exprimierten, gelang mit Hilfe von PGA-Gewebegerüsten. Mittels elektrischer Feldstimulation wurde die Kontraktilität der Zellen nachgewiesen (De Filippo, Yoo et al. 2003). Das Trägermaterial Vicryl<sup>®</sup> fand ebenfalls in der Kultivierung von Muskelzellen Verwendung. Young et al. benutzten dieses synthetische Biomaterial zur Kultivierung von uterinen SMC. Nach Transfer der Zellen auf das Gewebegerüst konnte eine dreidimensionale Füllung der Poren beobachtet werden (Young, Schumann et al. 2003).

Morphologie: Zum Zeitpunkt der Aussaat konnte das morphologische Erscheinungsbild der Zellen als spindelförmig und mit Zellausläufern ähnlich Fibrozyten beurteilt werden. Bei Tutomesh<sup>®</sup>-H änderte sich dieser Phänotyp bis zum Ende der Kulturzeit kaum. Die Zellen, die auf Surgisis<sup>®</sup> transferiert worden waren, nahmen im Verlauf der Kultur eine kleinere und ovale Form an. Die homogene Anordnung blieb ihnen erhalten. Die Zellform der Ethisorb<sup>®</sup>-Gruppe lässt sich nicht eindeutig beschreiben, da sich die Präparate nur schwer anfärben ließen. Vergleichbare Studien der Morphologie der SMC auf den drei unterschiedlichen Gewebegerüsten konnten bis dato nicht gefunden werden. Daraus folgt, dass dies die ersten Ergebnisse bzgl. der Morphologie der durch TE kultivierten Zellen auf den o. g. drei unterschiedlichen Gewebegerüsten sind.

#### 5.4.3 In vivo Studien

##### ***Transplantation der besiedelten Matrizen auf den IAS des Hausschweins***

Um die Integration von transplantierten Muskelzellen ins Gewebe beurteilen zu können, empfiehlt sich ein Tiermodell, das der autologen Transplantation im Sinne des TE möglichst ähnlich ist. Da der Grundgedanke der Gewebekultivierung die anale Insuffizienz darstellte, war die Transplantation innerhalb des IAS in dem Spendertier vorteilhaft, dessen Muskelstruktur dem Menschen möglichst nahe kommt. Dieses Anforderungsprofil trifft für die Schließmuskелеlemente des Hausschweins zu, insbesondere, da dessen Größenverhältnisse am Enddarm analog denen des Säuglings sind (Willital and Metzelder 2001).

Die Weichgewebetransplantate Tutomesh<sup>®</sup>-H und Ethisorb<sup>®</sup> wurden vorsichtig auf den IAS gelegt und mit Markierungsfäden befestigt. Die Abgrenzung zu den

quergestreiften Faserzügen des EAS gestaltete sich nicht leicht. Wegen des geringen Platzangebotes konnte jeweils nur eine besiedelte Gewebemembran pro Tier implantiert werden. Aus demselben Grund waren auch die nativen Gewebegerüste unter die Bauchdecke auf die Linea alba gelegt und genäht worden. Hierbei galt zu beachten, dass der Vergleich unbesiedelt und besiedelt in Bezug auf den Transplantationserfolg bzgl. der Integration ins native Gewebe und der Vaskularisation wegen der Heterotopie nur begrenzt aussagekräftig war. Die Surgisis<sup>®</sup>-Gewebegerüste wurden bei der Implantation nicht eingesetzt.

Die Qualität eines Transplantationsmodells ist neben der Eignung des Tieres abhängig von der Möglichkeit der eindeutigen Identifikation der engineernten Zellen. Nur so wird ein Vergleich zum Empfängergewebe möglich sein. Es werden auch Versuchsreihen durchgeführt, die diese Identifikation nicht berücksichtigen. Sie konzentrieren sich auf eine Bewertung der generellen Veränderungen im Empfängerorganismus, wie z. B. die Studie von Pouzet und Mitarbeiter darlegt. Sie injizierten generierte Ratten-Myoblasten in das ischämische Myokard syngener Ratten und beobachteten die Veränderungen der kardialen Ejektionsfraktionen (Pouzet, Vilquin et al. 2001). Bei dieser Methode kann jedoch das Schicksal der Zell-Transplantate nur unzureichend beurteilt werden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die engineernten Zellverbände mit nicht-resorbierbaren Fäden an allen vier Seiten befestigt. So war garantiert, dass es sich bei der histologischen Aufarbeitung der Präparate eindeutig um das kultivierte Gewebe handelt.

### ***Implantationszeitpunkt***

Die besiedelten Gewebegerüste wurden 23 Tage nach Transfer der Zellen implantiert. Dies war der Zeitpunkt, an dem die Ethisorb<sup>®</sup>-Gewebegerüste lichtmikroskopisch von Zellen durchwachsen waren. Nach Angaben von Rudert et al. beginnt die Degradation von Ethisorb<sup>®</sup> in vitro schon nach 3 Wochen und ist nach 25 Wochen beendet (Rudert, Hirschmann et al. 2000).

***Explantation des generierten Gewebes: Beurteilung und Vergleich von Tutomesh<sup>®</sup>-H und Ethisorb<sup>®</sup>***

Das Tutomesh<sup>®</sup>-Transplantat ließ sich mikroskopisch sicher von dem Gewebe des Hausschweins unterscheiden, unabhängig von der Implantation unter der Bauchhaut oder am Enddarm. Es bot sich das Bild einer heterogenen Histologie: entzündliche Infiltrate im Randbereich, zellreiche Areale mit Fibroblasten und Kollagenfasern oder aber zellfreie Areale im Inneren des Implantates. Diese zeichneten sich durch locker gelegene Kollagenfasern aus, welche auf Reste der Gewebegerüste hindeuten. Die Trichrom- und die Azan-Färbung betonten den massiven Kollagengehalt des engineereten Gewebes. Außerdem waren zahlreiche kleine und vereinzelt größere Kapillaren zu erkennen, in deren Lumen sich Erythrozyten befanden. Sie waren in das engineerete Gewebe eingesprosst. Die Vaskularisation der Transplantate und somit die Integration ins Empfängergewebe war gewährleistet. Bei Vergleich der nicht-besiedelten und besiedelten Implantate war trotz Heterotopie kaum ein Unterschied sichtbar. Die Leukozyteninfiltration erschien jedoch bei den unbesiedelten Gewebegerüsten ausgeprägter als bei den besiedelten Transplantaten. Auch bei den Ethisorb<sup>®</sup>-Matrizen waren in der Übersichtsaufnahme die Residuen des Gewebegerüstes leicht zu demaskieren, da sie sich zum einen gut gegen das umliegende Gewebe abgrenzten, zum anderen die Haltefäden als Markierung dienten. Sowohl bei den unbesiedelten (d. h. ohne TE Zellen) als auch bei den besiedelten Gewebegerüsten (d. h. mit TE Zellen), waren die Befestigungsfäden von einer dezenter Schicht eines zellulären Infiltrates umschlossen. Die Grenze zum Empfängergewebe bildete ein zellreiches Bindegewebe, welches kapselartig das Gewebegerüst umschloss. Dieses setzt sich aus wellenförmig, unregelmäßig verlaufenden kollagenen Fasern zusammen. In der Detailaufnahme ist die Anlagerung von Fibroblasten zu beobachten. Die inneren Anteile des Gewebegerüstes sind ebenfalls von einer Leukozytenmigration durchsetzt. Kleinkalibrige Gefäße mit dezenter perivaskulärer Zellproliferation sind vereinzelt in das implantierte Material als Zeichen der Vaskularisation eingesprosst. Bei den in der stärkeren Vergrößerung beobachteten, rundlichen, polymorphen Zellen handelt es sich vermutlich um Makrophagen. In der

Trichrom- und besonders in der Azan-Färbung werden die in der Übersichtsfärbung gewonnenen Eindrücke bestätigt. Auch der massive Kollagengehalt wird gezeigt. Die Produktion von Kollagen ist als positives und Vitalitätszeichen der Zellen zu werten, die ihre eigene Matrix generiert haben.

Somit lassen sich aus den in vivo Untersuchungen die folgenden Erkenntnisse gewinnen:

1. Eine Matrixbildung wird sowohl bei dem Ethisorb<sup>®</sup> als auch bei Tutomesh<sup>®</sup>-H beobachtet. Die engineereten Zellen werden überwiegend aus Fibroblasten gebildet.
2. Die eingesprossenen Gefäße sind ein Zeichen dafür, dass das engineerete Gewebe in das native Gewebe integriert wurde.

### **5.5 Differenzierungsgrad der kultivierten glatten Muskelzellen**

Am Tag der Implantation der besiedelten Trägermaterialien und nach der Entnahme des engineereten Gewebes wurde der immunhistochemische Nachweis gegen  $\alpha$ -Aktin durchgeführt. Nach der 2. Passage wurde der elektrophysiologische Nachweis der reizinduzierten Membranpotentialänderung an einer Zellpopulation erprobt, vgl. Kap. 5.3.

Der benutzte Antikörper Anti-SM-Aktin stellt einen sehr sensitiven Marker für glatte Muskelzellen dar (Skalli, Ropraz et al. 1986). Daher diente er zur Identifizierung und zur Abgrenzung der SMC gegen Fibroblasten. Im englischen Sprachgebrauch wird die minimale Zellzahl, die benötigt wird, um eine Genexpression von Aktin hervorzurufen, als „critical mass of cells“ bezeichnet. Diese Grenze konnte unter den vorliegenden Bedingungen nicht erreicht werden. Wenn der Gehalt an  $\alpha$ -Aktin innerhalb der einzelnen Zellen zu gering ist, ist eine immunhistochemische Zellfärbung nicht auszulösen. Die Expression von  $\alpha$ -Aktin ist jedoch für die spezifische Funktion der Muskelzellen unerlässlich: Nach Iijima et al. ist  $\alpha$ -Aktin nicht nur für die Kontraktion, sondern auch für die Motilität und die Struktur der glatten Muskelzelle verantwortlich (Iijima, Yamamoto et al. 2001). Die Konzentration von  $\alpha$ -Aktin sinkt im Vergleich zu frisch isolierten Zellen nach Iijima et al. in den ersten 6 Tagen um 30 % (Iijima, Yamamoto et al. 2001). Vergleiche mit anderen Untersuchungen bestätigen, dass der Vorgang

der Dedifferenzierung eine der Hauptschwierigkeiten bei der Generierung von glatten Muskelzellen darstellt. Die Dedifferenzierung hängt von verschiedenen Faktoren ab. Iijima et al. beschreiben einen Zusammenhang zwischen  $\alpha$ -Aktin und der Differenzierung der glatten Muskelzelle, wobei sich dieses Forschungsteam auf Ergebnisse von Owens et al. 1986, Clowes et al. 1988, Campbell et al., 1989 bezieht (Iijima, Yamamoto et al. 2001). Higgins et al. kamen zu dem Resultat, dass die Abbauprodukte der Trägermaterialien PGA und GA am Ende der Kulturzeit zu einer gesteigerten Proliferation und Dedifferenzierung von glatten Muskelzellen der Gefäße des Schweines führen (Higgins, Solan et al. 2003). Zudem ereignet sich der Vorgang der Dedifferenzierung in unterschiedlichen Stadien der Zellkultivierung. Bei Untersuchungen der SMC von Blutgefäßen von Chamley et al. fand die Dedifferenzierung nach 9 Tagen in Kultur statt (Chamley, Campbell et al. 1977) während die SMC der Gallenblase bei Sas D. und Miller L. J. schon nach 5 Tagen in ein dedifferenziertes Stadium transformierten (Sas and Miller 1988). Die Teilungsrate der Zellen hängt erheblich von unklaren, individuellen Faktoren ab. Eine Voraussage ist nicht möglich. Aufgrund der starken Proliferationsrate der isolierten Zellen stellt sich die Frage, in welchem Zusammenhang SMC-Proliferation und -Differenzierung stehen. Iijima et al. untermauerten in ihren Untersuchungen 2001 die These, dass der Verlust der Kontraktilität von kultivierten SMC in engem Zusammenhang mit Veränderungen innerhalb der Proteinzusammensetzung steht. Des Weiteren berichteten Iijima, Yamamoto et al. von phänotypischen Veränderungen (Iijima, Yamamoto et al. 2001).

So stellt sich nun die Frage nach der Ursache und dem Zeitpunkt der SMC-Dedifferenzierung in der vorliegenden Arbeit. Basis der Dedifferenzierung von glatten Muskelzellen stellt die Verwandtschaft von Fibroblasten und glatten Muskelzellen dar. Beide Zelltypen entspringen dem Mesenchym, sind morphologisch konform und sprechen weitgehend auf die gleichen Wachstumsfaktoren an. Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten können beide in Kultur ausschließlich aufgrund der Ausprägung biochemischer Marker, wie z. B. der Aktivität der Kreatinkinase oder der Anfärbung bestimmter muskelspezifischer kontraktile Proteine wie  $\alpha$ -Aktin, differenziert werden (Saltzman, Parkhurst et al. 1992).

Der rasche Verlust von differenzierten Eigenschaften von vaskulären SMCs vollzieht sich nach Berlin und Richard sowohl nach der Explantatmethode als auch nach der enzymatischen Isolation der Zellen aus der Media (Chamley-Campbell, Campbell et al. 1979). Modifikationen der Kulturbedingungen ermöglichen den Zellen, einige ihrer Eigenschaften wiederzuerlangen. Die Kultivierung der Zellen wurde unter standardisierten Bedingungen (Temperatur: 37,5 °C, CO<sub>2</sub>-Gehalt: 5 %) und einem physiologischen pH-Wert von 7,4 durchgeführt (Saltzman, Parkhurst et al. 1992; Miller, Thapa et al. 2004). Die Nährlösung (90 % DMEM, 9 % FBS und 1% GPS) wurde von Miller et al. mit guten Resultaten zur Kultivierung von vaskulären Muskelzellen auf PLGA-Matrizen verwendet (Miller, Thapa et al. 2004). Menard et al. benutzten ebenfalls dieses Kulturmedium zum Nachweis von  $\alpha$ -SM-Aktin in kultivierten Osteoblasten (Menard, Mitchell et al. 2000). Die, das Differenzierungsverhalten beeinflussende, Zellverankerung am Boden der Kulturschalen bzw. an den Gewebegerüsten war soweit lichtmikroskopisch beurteilbar, zu jedem Zeitpunkt erfüllt (Minuth, Strehl et al. 2003<sup>6</sup>). Die Kultivierung der Zellen erfolgte aus technischen Gründen unter statischen Bedingungen. Nach Minuth sollten zur Aufrechterhaltung des Differenzierungsgrades der Muskelzellen die Gewebekulturschalen permanent mit frischem Kulturmedium perfundiert werden. So wird eine gewebetypische Umgebung simuliert und anfallende Metabolite können direkt eliminiert werden (Minuth, R. et al. 2004). Daniellson et al. fanden statische Bedingungen auch nicht optimal für die Kultivierung von SMC der Harnblase (Danielsson, Ruault et al. 2006). Zu gleichen Ergebnissen kam Jeong et al., die unter Verwendung der dynamischen Methode einen Verlust der phänotypischen Kontraktilität der vaskulären Muskelzellen verhindern konnten (Jeong, Kwon et al. 2005). Die Frage nach der Übertragbarkeit dieser Aussagen auf die glatten Muskelzellen des IAS bleibt dabei ungeklärt.

Zusammenfassend lassen sich die Fragen nach dem Zeitpunkt und der Ursache der Dedifferenzierung des SMC aufgrund unterschiedlicher Parameter in der vorliegenden Arbeit nicht beantworten.

## 5.6 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit kommt zu den folgenden Ergebnissen:

1. Optimale in vitro-Kulturbedingungen zur Generierung eines IAS bedürfen weiterer, grundlegender Untersuchungen, fortführend auf dem für den Technologietransfer geeignetem Level der vorliegenden Untersuchungsergebnisse.
2. Aufgrund der Vielzahl von kommerziell erhältlichen Trägermaterialien (Scaffolds) muss ihre Anwendung im Hinblick auf das Gewebe, das generiert werden soll, im Einzelnen immer genauestens analysiert und die Komponenten der Materialien untereinander verglichen werden.
3. Im Bereich der Generierung von glatten Muskelzellen besteht das Hauptproblem der irreversiblen Dedifferenzierung und damit der Funktionslosigkeit der Zellen. Auf diesen Punkt muss in Zukunft im Rahmen der Identitätskontrollen in einem speziellen Diagramm geachtet werden, wobei zytoproteinanalytische und elektronenmikroskopische Untersuchungen richtungsweisend sind.
4. In diesem Zusammenhang sollte weiterhin untersucht werden
  - a. wann diese Dedifferenzierung stattfindet,
  - b. wie die Zellen des IAS optimal im Hinblick auf Ihre Funktionalität beobachtet werden können,
  - c. wie diese Dedifferenzierung verhindert werden kann,
  - d. ob die Dedifferenzierung von einer Grundsubstanz oder vom Trägermaterial abhängt.
5. Das Endziel aller Untersuchungen ist der funktionsfähig determinierte Gewebeverband, der komplett in das Empfängergewebe implantiert und später integriert wird. Daher müssen in vivo weitere Untersuchungen erfolgen:
  - a. Bzgl. der Neurotisation (Einsprossung von Nerven) in den Muskelzellverband, z. B. durch manometrische Untersuchungen.
  - b. Bzgl. der funktionellen Angliederung an das Gewebe des Empfängers: Kontraktionsverhalten, das ebenfalls durch eine differenzierte sektormanometrische Untersuchung überprüft werden kann.

- c. Bzgl. der optimalen Versorgung der Zellen mit Sauerstoff, Kohlendioxid, Nährstoffen und biologischen Reizen.

Es ist aber auch möglich, dass Zellverbände suspendiert in einer Nährlösung und in einem Gewebekleber durch ein Injektionsverfahren unter dreidimensionaler Kontrolle Millimeter genau an den z. B. nur rudimentären Musculus sphincter internus platziert werden (Advanced Technologies in Tissue Replacement (ATTR)).

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass eine Vaskularisation im Bereich der Trägermaterialien stattgefunden hat. Am offensichtlichsten war dieser Vorgang bei den Trägermaterialien der Firma Ethicon® zu beobachten. Daraus folgt: Das transplantierte Gewebe wurde in den Empfängerorganismus integriert.

6. Zellkulturbedingungen können in vitro so weit adaptiert werden, dass eine Dedifferenzierung vermieden wird.
7. Alternativ sollte die Verwendung von Stammzellen in Erwägung gezogen werden, die sich durch das Hinzufügen von Wachstumsfaktoren in sämtliche Zellformen differenzieren können.

### **5.7 Aussagekraft der experimentellen Ergebnisse**

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Eignung von drei bzw. zwei Gewebegerüsten als dreidimensionale Zellträger für die Generierung von glatten Muskelzellen in vitro und in vivo. Die ausschlaggebenden Kriterien zur Bewertung der Materialien sind Biokompatibilität, Bioresorbierbarkeit und mechanische Stabilität. Die histologisch-morphologische Bewertung beinhaltete die in vitro Analyse von Vitalität, Proliferation, Differenzierung und Kontraktionsverhalten. Die in vivo Analyse bewertete Proliferation, Integration und Vaskularisation des engineered Gewebes.

Es zeigte sich, dass unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen zwar kein funktionstüchtiges Muskelzellgewebe generiert werden konnte, dass aber die Transplantate Ethicon® und Tutomesh®-H die Vaskularisation und die Integration des generierten Gewebes in das native Gewebe fördern.



### 5.8 Perspektive des Tissue Engineering in der Therapie von glattemuskulären Defekten insbesondere der Analtresie

Neben den in Kap. 1.2.4 aufgezählten allgemeinen Eigenschaften eines Gewebegerüsts kann eine Kontinenzverbesserung, notwendig infolge von angeborenen Fehlbildungen im Rahmen der Analtresie, Tumore oder Unfälle erreicht werden, wenn das tissue engierte Muskel-Konstrukt beispielhaft die in Abb. 4-1 aufgeführten Anforderungen erfüllt.

<b>Anforderungen an die generierten Muskelzellkonstrukte zur Verbesserung der insuffizienten Schließmuskulatur</b>	<b>Nachweismethode z. B.</b>
1. Vitalität/ Funktionalität des generierten Gewebes: Fähigkeit zur Kontraktion und Relaxation zusammen mit dem Körpergewebe	Immunhistochemie, Elektrophysiologischer Nachweis der reizinduzierten Membranpotentialänderung, Zytoproteinanalyse, Elektronenmikroskopie
2. Einheilung des Muskelkonstruktes in den perirektalen Schließmuskelkomplex	Manometrie
3. Neurotisation	Manometrie
4. Vaskularisation	Endoanaler, farbkodierter Ultraschall

**Abb. 4-1:** Anforderungen an die Muskelzellverbände, bevor sie implantiert werden und nach der Implantation

## 6 Zusammenfassung

Die Analtresie stellt eine schwerwiegende Missbildung des Enddarmabschnittes mit Muskeldefiziten dar, dessen Therapieergebnisse weiterhin optimiert werden können. Als postoperatives Hauptproblem wird die anale Inkontinenz gesehen, die zumeist durch eine nur rudimentär angelegte Schließmuskulatur hervorgerufen wird. Bisher gibt es für die Schließmuskulatur kein bioartifizielles Implantat, das klinisch Anwendung findet. Auf dieser Wissensgrundlage entstand die Idee einer fortführenden Therapie mittels der Kultivierung eines glattmuskulären Gewebeverbandes zur Unterstützung des insuffizienten oder nur rudimentär angelegten glattmuskulären Musculus sphincter ani internus (IAS).

Während die glatten Muskelzellen der Gefäße schon intensiv untersucht wurden, ist über die Funktionalität der glatten Muskelzellen des Intestinaltraktes auf zellulärer Ebene wenig bekannt. Mit Ausnahme eines Beitrages von Hecker et al. wurde bis dato in der Literatur kein Eintrag zur Kultivierung von funktionellen, glatten Muskelzellen des M. sphincter ani internus gefunden. Die glattmuskulären Strukturen des inneren Analsphinkters leisten jedoch mit 80 % den Hauptanteil für die Kontinenz. Daher wurden nach den Prinzipien des Tissue Engineerings in einem allogenen Grosstiermodell des Hausschweins glatte Muskelzellen aus dem IAS gewonnen (Genehmigungsbescheid vom 26.04.2002, Az.: 50.0835.1.0 (G18/2002)). Die Zellen wurden in vitro kultiviert, auf drei unterschiedliche Trägermaterialien (Surgisis<sup>®</sup> (Cook), Ethisorb<sup>®</sup>-Dura-Patch (Ethicon) und Tutomesh<sup>®</sup>-H Gewebegerüst (Tutogen)) überbracht, um eine Dreidimensionalität zu erreichen und die besiedelten Gewebegerüste wieder reimplantiert. Mittels Übersichtsfärbungen wurden die Zellen in vitro im Hinblick auf Morphologie und Proliferationsverhalten untersucht. Die in vivo Untersuchungen legten den Schwerpunkt auf die Vaskularisation und Integration der Implantate ins native Gewebe. Die immunhistochemische Charakterisierung mittels  $\alpha$ -SM-Aktin erfolgte zur Untersuchung des Differenzierungsgrades und somit zur Beurteilung der Funktionalität der kultivierten Zellen. Das optische Registrierverfahren diente der Erprobung eines neuen Verfahrens: Mittels der Registrierung von Fluoreszenzänderungen konnten Membranpotentialänderungen, elektromechanische Kopplung und die Vitalität der Zellen nachgewiesen werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Absher, M., J. Woodcock-Mitchell, et al. (1989). "Characterization of vascular smooth muscle cell phenotype in long-term culture." *In Vitro Cell Dev Biol* 25(2): 183-92.
- Albowitz, B., U. Kuhnt, et al. (1998). "Spatiotemporal distribution of epileptiform activity in slices of human neocortex: recordings with sensitive dyes." *Epileps Res* 32(224): 232.
- Amiel, G. E., J. J. Yoo, et al. (2000). "Renal therapy using tissue-engineered constructs and gene delivery." *World J Urol* 18(1): 71-9.
- Atala, A. (2002). "Experimental and clinical experience with tissue engineering techniques for urethral reconstruction." *Urol Clin North Am.* 29(2): 485-492, ix.
- Atala, A. and R. Lanza (2002). *Methods of Tissue Engineering*. San Diego, California, Academic Press: <sup>1</sup> Preface; <sup>2</sup> 287.
- Atala, A., L. Cima, et al. (1993). "Injectable polymers seeded with chondrocytes as a therapeutic approach." *J Urol* 150: 745.
- Atala, A., W. Kim, et al. (1994). "Endoscopic treatment of vesicourethral reflux with a chondrocyte-alginate suspension." *J Urol* 152(2 Pt 2): 641-3; discussion 644.
- Axel, D. I., B. R. Brehm, et al. (1996). "Induction of cell-rich and lipid-rich plaques in a transfilter coculture system with human vascular cells." *J Vasc Res* 33(4): 327-39.
- Badylak, S. (1993). *Small intestinal submucosa (SIS): a biomaterial conducive to smart tissue remodeling*. Tissue Eng: Current Perspectives. Cambridge, MA, Burkhauser's: 179-189.
- Badylak, S., B. Kropp, et al. (1998). "Small Intestinal Submucosa: A rapidly Resorbed Bioscaffold for Augmentation Cytoplasty in a Dog Model." *Tissue Eng* 4(4): 379-387.
- Badylak, S., K. Kokini, et al. (2002). "Morphologic study of small intestinal submucosa as a body wall repair device." *J Surg Res* 103: 190-202.
- Baeten, C. G., O. O. Uludag, et al. (2001). "Dynamic graciloplasty for fecal incontinence." *Microsurgery* 21(6): 230-4.
- Barnert, J. (2003). *Konservative Therapiemöglichkeiten bei der Stuhlinkontinenz*. 5. Deutscher Kongress der Gesellschaft zur Inkontinenzhilfe e. V., Sindelfingen.
- Benninghoff, A. and D. Drenckhan (2002). *Anatomie - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Band 1: Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. München, Jena, Urban & Fischer: 695, 696; 166-170.
- Berglund, J., R. Nerem, et al. (2004). "Incorporation of intact elastin scaffolds in tissue-engineered collagen-based vascular grafts." *Tissue Eng* 10(9-10): 1526-1535.
- Bleijenberg, G. and H. C. Kuijpers (1987). "Treatment of the spastic pelvic floor syndrome with biofeedback." *Dis Colon Rectum* 30(2): 108-11.
- Brittberg, M., A. Lindahl, et al. (1994). "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." *N Engl J Med* 331(14): 889-95.
- Büchel, P., A. Rabal, et al. (2005). "Reconstruction of Orbital Floor Fracture with Polyglactin 910/Polydioxanon Patch (Ethisorb): a Retrospective Study." *J Oral Maxillo Fac Surg* 63: 646-650.
- Bücheler, M. (2002). "Tissue Engineering in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie." *Laryngo-Rhino-Otol* 81 Supplement 1: 61-80.
- Buchmann, P., M. Rechsteiner, et al. (1997). "[Defecation problems: incontinence, constipation and impeded defecation; why and what can be done?]." *Ther Umsch* 54(4): 171-84.
- Buchmann, P., T. Ruffli, et al. (1994). *Stuhlinkontinenz*. Lehrbuch der Proktologie. P. Buchmann. Bern; Göttingen; Toronto; Seattle, Hans Huber Verlag. 3: 120-131.
- Bühlingen, U. (1993). *EMG-kontrolliertes Biofeedback, eine alternative Möglichkeit zur Selbstbehandlung der analen Inkontinenz*. 5. Deutscher Kongress der Gesellschaft für Inkontinenzhilfe e.V., Sindelfingen.
- Bühlingen, U. (1994). *Ein neues Prinzip des Biofeedback- die EMG getriggerte Elektromyostimulation als alternative Möglichkeit zur Selbstbehandlung der analen Inkontinenz*. 5. Deutscher Kongress der Gesellschaft für Inkontinenzhilfe e.V., Sindelfingen.
- Carrel, A. (1902). "La technique opératoire des anastomoses vasculaire et la transplantation des viscères." *Lyon Med* 13: 387.

- Chaignaud, B., R. Langer, et al. (1997). The History of Tissue Engineering using synthetic biodegradable Polymer Scaffolds and cells. Synthetic biodegradable Polymer Scaffolds. A. Atala and D. Mooney. Boston, Birkhäuser.
- Chamley, J. H., G. R. Campbell, et al. (1977). "Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and in subculture." *Cell Tissue Res* 177(4): 503-22.
- Chamley-Campbell, J., G. Campbell, et al. (1979). "The smooth muscle cell in culture." *Physiol Review* 59: 1-61.
- Cheng, E. and B. Kropp (2000). "Urologic tissue engineering with small-intestinal submucosa: potential clinical applications." *World J Urol* 18: 26-30.
- Christiansen, J., C. R. Hansen, et al. (1995). "Bilateral gluteus maximus transposition for anal incontinence." *Br J Surg* 82(7): 903-5.
- Corvin, S., G. Feil, et al. (2004). "Tissue Engineering der Harnröhre und des Harnleiters." *Urologe* 43: 1213-1216.
- Dame, M. K., X. Yu, et al. (2003). "A stepwise method for the isolation of endothelial cells and smooth muscle cells from individual canine coronary arteries." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39(10): 402-6.
- Danielsson, C., S. Ruault, et al. (2006). "Polyesterurethane foam scaffold for smooth muscle cell tissue engineering." *Biomaterials* 27: 1410-1415.
- De Filippo, R. E., J. J. Yoo, et al. (2003). "Engineering of vaginal tissue in vivo." *Tissue Eng* 9(2): 301-6.
- Decurtins, M. and P. Buchmann (1982). "Bovines Pericard- ein neues Material zur Deckung grosser Bauchwanddehiszenzen." *Res Exp Med (Berl)* 180: 11-14.
- Del Vas Cenal, A. (1991). "Verwendung von dehydratisierter Human-Dura-Mater als technische Lösung bei Abdominalwanddefekten von Erwachsenen. Unsere Erfahrungen." *Chirurgia Espanoa* 49(3).
- Doede, T., Zenker K., et al. (2002). "Langzeitergebnisse der Analatresie aus elterlicher Sicht." *Kinder- und Jugendmedizin* 2: A 142.
- Eder, I. E., S. Corvin, et al. (2000). "Selective culture conditions for different types of primary human bladder cells." *World J Urol* 18(5): 371-5.
- El-Ghannam, A. (2005). "Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering." *Expert Rev Med Devices* 2(1): 87-101.
- Enck, P. (1992). "Bei welcher Form der Analatresie empfiehlt sich die Behandlung mit Biofeedback? Welche unterschiedliche Verfahren werden eingesetzt?" *Kontinenz* 1(125).
- Endlich, N., K. Endlich, et al. (2000). "Culture of vascular smooth muscle cells from small arteries of the rat kidney." *Kidney Int* 57(6): 2468-75.
- Erkenbrecht, J. (2004). "Definition und Symptome, Epidemiologie, Diagnostik und Therapie - Obstipation ein alltägliches Problem." *Klinikerarzt* 33: 199-205.
- Felt-Bersma, R. J., G. Gort, et al. (1991). "Normal values in anal manometry and rectal sensation: a problem of range." *Hepatogastroenterology* 38(5): 444-9.
- Folkman, J. and M. Hochberg (1973). "Self-regulation of growth in three dimensions." *J Exp Med* 138(4): 745-53.
- Forrester, M. and R. Merz (2002). "Descriptive epidemiologie of anal atresia in Hawaii, 1986-1999." *Teratology* 66 Suppl 1: S12-6.
- Franklin, M., J. Gonzalez, et al. (2002). "Preliminary experience with new bioactive prosthetic material for repair of hernias in infected fields." *Hernia* 6: 171-174.
- Fritsch, H. (1996). "Klinische Anatomie des Kontinenzorgans." *Zentralbl Chir.* 121(8): 613.
- Fritz, W. and K. L. Schober (1972). "[Experiences with gracilis plasty for the management of fecal incontinence in childhood]." *Zentralbl Chir* 97(23): 763-71.
- Fuchs, J., B. Nasser, et al. (2001). "Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction." *Ann Thorac Surg* 72(2): 577-591.
- Gallico, G. G., 3rd, N. E. O'Connor, et al. (1984). "Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium." *N Engl J Med* 311(7): 448-51.
- Galois, L., A. Freyria, et al. (2005). "Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches." *Pathol Biol (Paris)* 53(10): 590-598.

- Gesellman, K. H. (2003). In-vitro Untersuchungen zur Beeinflussung der Migration glatter Gefäßmuskulaturzellen durch bakterielle Hyalurolyase. Institut für Arbeits- und Sozialmedizin. Tübingen, Universität Tübingen: 52.
- Go, P. M. and G. A. Dunselman (1988). "Anatomic and functional results of surgical repair after total perineal rupture at delivery." *Surg Gynecol Obstet* 166(2): 121-4.
- Gorji, A., G. Moddel, et al. (2003). "Background potassium concentrations and epileptiform discharges II. Involvement of calcium channels." *Brain Research* 959: 149-159.
- Graham, M. F., R. F. Diegelmann, et al. (1984). "Isolation and culture of human intestinal smooth muscle cells." *Proc Soc Exp Biol Med* 176(4): 503-7.
- Griffith, L. G. and G. Naughton (2002). "Tissue engineering- current challenges and expanding opportunities." *Science* 295(5557): 1009-14.
- Grikscheit, T., A. Srinivasan, et al. (2003). "Tissue-engineered stomach: a preliminary report of a versatile in vivo model with therapeutic potential." *J Pediatr Surg* 38(9): 1305-9.
- Grözinger, K. (1981). "Spätergebnisse nach Behandlung grosser Bauchwandbrüche mit lypophilisierter Dura." *Chir. Praxis* 28.
- Gupta, D. (2005). "Anorectal malformations- Wingspread to Krickenberg." *Journal of Indian Association of Pediatric Surgeon* 10(2): 75-77.
- Häring, R., P. Berlien, et al. (1982). "Die Rekonstruktion des Anus naturalis mit Hilfe quergestreifter Muskulatur." 53(10): 605-610.
- Hecker, L., K. Baar, et al. (2005). "Development of a three-dimensional physiological model of the internal anal sphincter bioengineered in vitro from isolated smooth muscle cells." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289(2): G188-96.
- Herold, A. (2002). Diagnostik und Therapie der anorektalen Inkontinenz. Mannheim, Enddarm-Zentrum: B2, 15-16.
- Herold, A., H. P. Bruch, et al. (1989). Biofeedback-Training und funktionelle Elektrostimulation zur Verbesserung der Inkontinenz bei Kindern mit Analatresie. *Langenbecks Arch Chir Suppl*.
- Herold, G. (2004). Maligne Lymphome. *Innere Medizin*. G. Herold. Köln, Herold, G.: 61.
- Hienzsch, E. (1955). "[Bigluteal reconstruction of sphincter ani in postoperative fecal incontinence]." *Zentralbl Chir* 80(51): 2029-35.
- Higgins, S. P., A. K. Solan, et al. (2003). "Effects of polyglycolic acid on porcine smooth muscle cell growth and differentiation." *J Biomed Mater Res A* 67(1): 295-302.
- Hodde, J. (2002). "Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration." *Tissue Eng* 8(2): 295-308.
- Holschneider, A. M. and W. C. Hecker (1981). "[Flapped and free muscle transplantation in the treatment of anal incontinence (author's transl)]." *Z Kinderchir* 32(3): 244-58.
- Hordnes, K. and P. Bergsjö (1993). "Severe lacerations after childbirth." *Acta Obstet Gynecol Scand* 72(6): 413-22.
- Hülsmann, S., H. Straub, et al. (2003). "Blockade of astrocyte metabolism causes delayed excitation as revealed by voltage-sensitive dyes in mouse brainstem slices." *Exp Brain Res* 150: 117-121.
- Hutmacher, D. W., J. C. Goh, et al. (2001). "An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications." *Ann Acad Med Singapore* 30(2): 183-91.
- Iijima, M., J. Yamamoto, et al. (2001). "Changes in Ca<sup>2+</sup> signaling and contractile protein isoforms in smooth muscle cells from guinea pig ileum during culture." *J Smooth Muscle Res* 37(2): 53-66.
- Illingworth, J. (2003). "Muscle Structure and Function." *School of Biochemistry and Molecular Biology*.
- Imhof, M., H. P. Bruch, et al. (1989). "[A new concept in surgical treatment of anal incontinence]." *Chirurg* 60(12): 862-5; discussion 865-6.
- Jeong, S. I., J. H. Kwon, et al. (2005). "Mechano-active tissue engineering of vascular smooth muscle using pulsatile perfusion bioreactors and elastic PLCL scaffolds." *Biomaterials* 26(12): 1405-11.
- Junqueira, L., J. Carneiro, et al. (2002). *Histologie*. Histologie. M. Gratzl. Berlin, Heidelberg, New York, Springer: 158-161.
- Kim, B. S. and D. J. Mooney (1998). "Engineering smooth muscle tissue with a predefined structure." *J Biomed Mater Res* 41(2): 322-32.

- Kirsch, S., B. Shandling, et al. (1993). "Continence following electrical stimulation and EMG biofeedback in a teenager with imperforate anus." *J Pediatr Surg* 28(10): 1408-1409, discussion 1409-1410.
- Klein, L. (1990). "The use of Dura mater allografts in operations of abdominal wall hernias." *Beitr. Orthop Traumatol* 37.
- Koch, S. and C. G. Baeten (2003). "Sphincter replacement grafts." *Chirurg* 74(1): 15.
- Koch, S., O. Uludag, et al. (2004). "Dynamic graciloplasty in patients born with an anorectal malformation." *Dis Colon Rectum* 47(10): 1711-1719.
- Köhling, R. and E. Speckmann (2003). "Spontane Netzwerkaktivität in chronisch epileptischem Hirngewebe des Menschen." *Z Epileptol* 16: 229-234.
- Köhling, R., H. Straub, et al. (2002). "Postoperative Untersuchungen in der Epilepsiechirurgie Bioelektrische Analysen mit konventionellen Methoden und spannungssensitiven Farbstoffen." *Klin Neurophysiol* 33: 163-167.
- Köhling, R., J. Höhling, et al. (2002). "Optical monitoring of neuronal activity during spontaneous sharp waves in chronically epileptic human neocortical tissue." *Journal of Cellular Biochemistry*: 2161-2165.
- Köhling, R., J. Reinell, et al. (2000). "Spatio-temporal patterns of neuronal activity: analysis of optical imaging data using geometric shape matching." *Journal of Neuroscience Methods* 114: 17-23.
- Kramer-Schultheiss, K. and D. Schultheiss (2002). "From wound healing to modern tissue engineering of the skin. A historical review on early techniques of cell and tissue culture." *Hautarzt* 53(11): 751-760.
- Kropp, B., B. Sawyer, et al. (1996). "Characterization of small intestinal submucosa-regenerated canine detrusor: assessment of reinnervation, in vitro compliance and contractility." *J Urol* 156: 599-607.
- Kubler, A. C., J. Neugebauer, et al. (2004). "[The use of a resorbable, synthetic membrane for the elevation of the sinus floor]." *Mund Kiefer Gesichtschir* 8(4): 256-60.
- Lalan, S., I. Pomerantseva, et al. (2001). "Tissue engineering and its potential impact on surgery." *World J Surg* 25(11): 1458-1466.
- Lamby, D. (2005). Die Charakterisierung der differentiellen Genexpression invasiver und nichtinvasiver humaner glatter Gefäßmuskelzellen. Dissertation. Medizinische Fakultät. Aachen, Rheinisch-Westfälische technische Hochschule.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." *Science* 260(5110): 920-6.
- Levitt, M. and A. Pena (2005). "Outcomes from the correction of anorectal malformations." *Curr Opin Pediatr* 17: 394-401.
- Lierse, W., A. M. Holschneider, et al. (1993). "The relative proportions of type I and type II muscle fibers in the external sphincter ani muscle at different ages and stages of development--observations on the development of continence." *Eur J Pediatr Surg* 3(1): 28-32.
- Maemura, T., M. Shin, et al. (2003). "A tissue-engineered stomach as a replacement of the native stomach." *Transplantation* 76(1): 61-5.
- Meissner, F. and E. M. Schenk (1983). "[Continence-improving operations in children]." *Padiatr Grenzgeb* 22(5): 333-9.
- Menard, C., S. Mitchell, et al. (2000). "Contractile behavior of smooth muscle actin-containing osteoblasts in collagen-GAG matrices in vitro: implant-related cell contraction." *Biomaterials* 21(18): 1867-77.
- Merril, J., J. Murray, et al. (1956). "Successful homotransplantation of human kidney between identical twins." *JAMA* 160: 277.
- Miller, D. C., A. Thapa, et al. (2004). "Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features." *Biomaterials* 25(1): 53-61.
- Minuth, W. W., R. Strehl, et al. (2003). Zukunftstechnologie Tissue Engineering- von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA: <sup>1,2</sup> 124-126; <sup>3</sup> 32, 33; <sup>4</sup> 174, 175; <sup>5</sup> 174-181; <sup>6</sup> 255, 256.
- Minuth, W. W., R. Strehl, et al. (2004). "Tissue Factory- Conceptual Design of a modular system for the in-vitro generation of functional diseases." *Tissue Eng* 10(1/2): 285-293.
- Mooney, D. J., L. Cima, et al. (1992). "Principles of Tissue Engineering and Reconstruction using Polymer-Cell Constructs." *Mat Res Soc Symp Proc* 252: 345-352.

- Murray, J., J. Merrill, et al. (1955). "Renal homotransplantation in identical twins." *Surg Forum* 6: 432.
- Nuininga, J., v. M. H., et al. (2004). "A rabbit model to tissue engineer the bladder." *Biomaterials*: 1657-1661.
- Pariente, J. L., B. S. Kim, et al. (2002). "In vitro biocompatibility evaluation of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human bladder smooth muscle cells." *J Urol* 167(4): 1867-71.
- Peiper, C. (2002). "Netze in der Leistenhernienreparation." *Zentralbl Chir* 127(7).
- Pouzet, B., J. T. Vilquin, et al. (2001). "Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation." *Ann Thorac Surg* 71(3): 844-50; discussion 850-1.
- Prochiantz, A. and P. Gross (1982). "Gluteal myoplasty for sphincter replacement: principles, results and prospects." *J Pediatr Surg* 17(1): 25-30.
- Redecker, C., G. Hagemann, et al. (2005). "Optical imaging of epileptiform activity in experimentally induced cortical malformations." *Experimental Neurology* 192: 288-298.
- Rohen, J. and E. Lütjen-Drecoll (2000). *Funktionelle Histologie - Kurzgefasstes Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen nach funktionellen Gesichtspunkten*. Stuttgart, New York, Schattauer. 4: 126-128.
- Rudert, M., F. Hirschmann, et al. (2000). "Bioartificial cartilage." *Cells Tissues Organs* 167(2-3): 95-105.
- Sachs, M. and D. Gloeckner (1998). "Quantification of the fiber architecture and biaxial mechanical behavior of porcine intestinal submucosa."
- Saltzman, W. M., M. R. Parkhurst, et al. (1992). "Three-dimensional cell cultures mimic tissues." *Ann N Y Acad Sci* 665: 259-73.
- Sas, D. and L. J. Miller (1988). "Culture behavior of healthy bovine gallbladder muscularis smooth muscle cells." *Am J Physiol* 255(5 Pt 1): G653-9.
- Schmidt, R. and K. Unsieker (2003). *Anatomie, Biochemie und Physiologie der Zelle: vom Molekül zur zellbiologischen Funktion*. Köln, Dt. Ärzte-Verl.
- Seidl, R., I. Todt, et al. (2000). "Rekonstruktion von traumatischen Schädelbasisdefekten mit einem alloplastischen, resorbierbaren Vlies (Ethisorb)." *HNO* 48: 753-757.
- Senner, V., R. Köhling, et al. (2003). "A new neurophysiological/neuropathological ex vivo model localizes the origin of glioma-associated epileptogenesis in the invasion area." *Acta Neuropathologica*.
- Simon, S. (2001). *Operativ induzierte Gewebeneubildung: Erfahrungen mit Implantaten bei kongenitalen Bauchwanddefekten*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie.
- Skalli, O., P. Ropraz, et al. (1986). "A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation." *J Cell Biol* 103(6 Pt 2): 2787-96.
- Smith, E. D. (1976). "The identification and management of anorectal anomalies. The factors ensuring continence." *Prog Pediatr Surg* 9: 7-40.
- Speckmann, E., R. Köhling, et al. (2002). "Perioperative Untersuchungen in der Epilepsiechirurgie - Eine Einführung." *Klin Neurophysiol* 33: 156-162.
- Stegemann, J., H. Hong, et al. (2005). "Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype." *J Appl Physiol* 98(6): 2321-2327.
- Stelzner, F. (2001). "Anatomie und Entwicklungsgeschichte des anorektalen Kontinenzorgans." *Chirurgische Gastroenterologie* 17: 194-201.
- Stock, U. A. and J. P. Vacanti (2001). "Tissue engineering: current state and prospects." *Annu Rev Med* 52: 443-51.
- Straub, H., U. Kuhnt, et al. (2003). "Stimulus-induced Patterns of Bioelectric Activity in Human Neocortical Tissue Recorded by a Voltage Sensitive Dye." *Neuroscience* 121: 587-604.
- Teebken, O., M. Wilhelmi, et al. (2005). "Tissue Engineering for heart valves and vascular grafts." *Chirurg* 76(5): 453-466.
- Terada, S., M. Sato, et al. (2000). "Tissue engineering in the twenty-first century." *Yonsei Med J* 41(6): 685-91.
- Tischer, W. and O. A. Festge (1984). "[Clinical course and therapy of fecal incontinence in children]." *Zentralbl Chir* 109(4): 236-44.
- Vacanti, J. P. (2003). "Tissue and organ engineering: can we build intestine and vital organs?" *J Gastrointest Surg* 7(7): 831-5.

- Vara, D., H. Salacinski, et al. (2005). "Cardiovascular tissue engineering: state of the art." *Pathol Biol (Paris)* 53(10): 599-612.
- Vecchia, L., S. Engum, et al. (1999). "Evaluation of Small Intestine Submucosa and Acellular Dermis as Diaphragmatic Prostheses." *J Pediatr Surg* 34(1): 167-171.
- Vogelbach, P., U. Pfefferkorn, et al. (2004). "[Living donors in organ transplantation--the solution for the organ shortage]." *Schweiz Rundsch Med Prax* 93(24): 1045-7.
- Von Wild, K. (1999). "Examination of the Safety and Efficacy of an absorbable Dura Mater Substitute (Dura Patch) in Normal Applications in Neurosurgery." *Surg Neurol* 52: 418-425.
- Voytik-Harbin, S., A. Brightman, et al. (1998). "Small Intestinal Submucosa: A Tissue Derived Extracellular Matrix That Promotes Tissue-Specific Growth and Differentiation of Cells in Vitro." *Tissue Eng* 4(2): 157-173.
- Willital, G. H. (1976). "Klassifikation angeborener, anorektaler Anomalien - Operationsindikationen." *Kinderchirurgie und Grenzgebiete*.
- Willital, G. H. (1976). "Klinische Erfahrungen mit Duraimplantationen in der Neugeborenenchirurgie." *Zeitschrift für Kinderchirurgie* 19(1).
- Willital, G. H. and M. Metzelder (2001). Antrag auf Genehmigung von Versuchsvorhaben Gem. Münster, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Neugeborenenchirurgie, Universitätsklinikum Münster: 1-12.
- Willital, G. H. and R. R. Lehmann (2000). 11. Rektum/Anus. *Chirurgie im Kindesalter*. G. H. Willital. Balingen, Spitta Verlag. 1:  
<sup>1</sup> 485; <sup>2</sup> 482; <sup>3</sup> 482, 483; <sup>4</sup> 485; <sup>5</sup> 485-487; <sup>6</sup> 487-489; <sup>7</sup> 487, 488; <sup>8,9</sup> 427 ff; <sup>10</sup> 428;  
<sup>11</sup> 491-495; <sup>12</sup> 495; <sup>13</sup> 493, 494; <sup>14</sup> 494; <sup>15,18</sup> 494, 495; <sup>16</sup> 495-498; <sup>17</sup> 493, 496.
- Wunsch, L., E. M. Ehlers, et al. (2005). "Matrix testing for urothelial tissue engineering." *Eur J Pediatr Surg* 15(3): 164-9.
- Xu, C., R. Inai, et al. (2004). "Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering." *Tissue Eng* 10(7-8): 1160-8.
- Young, R. C., R. Schumann, et al. (2003). "Three-dimensional culture of human uterine smooth muscle myocytes on a resorbable scaffolding." *Tissue Eng* 9(3): 451-9.
- Zhang, H. Y., B. Kropp, et al. (2004). "Bladder regeneration with cell-seeded small intestinal submucosa." *Tissue Eng* 10(1-2): 181-187.
- Zhang, H. Y., M. Gharaee-Kermani, et al. (1997). "Regulation of lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression, contractile phenotype, and apoptosis by IL-1beta." *J Immunol* 158(3): 1392-9.
- Zhang, Y., B. Kropp, et al. (2000). "Coculture of bladder urothelial and smooth muscle cells on small intestinal submucosa: potential applications for tissue engineering technology." *J Urol* 164(3 Pt 2): 928-934; discussion 934-935.



## 8 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACh	Azetylcholin
AC	Wechselspannung
AEC	AEC Chromogen
Ag	Antigen
ARM	Anorectal Malformations (anorektale Fehlbildungen)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASE	Anale Sphinkterersatzplastik
ATP	Adenosintriphosphat
Bsp.	Beispiel
Bzw.	Beziehungsweise
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
Ca	Circa/Ungefähr
°C	Grad Celsius
CO	Kohlenmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
D	Deutschland
DC	Gleichspannung
d. h.	Das heißt
DMEM	Dulbecco´s modified Eagles Medium
Dr. med. vet.	Doktor medicine veterane
DSO	Deutsche Stiftung für Organspende
ECM	Extracellulare Matrix
EMG	Elektromyographie
EH	Prolene EH
EKG	Elektrokardiographie
Evtl.	Eventuell
FBS	Fetal bovine serum (fötales Kälberserum)
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FDA	Food And Drug Administration
GA	Glycolsäure
GPS	Gentamicin, Penicillin, Streptomycin
H. E.	Hämatoxylin-Eosin
h	Stunde(n)
Hz	Herz
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
Konz.	Konzentration
kHz	KiloHerz
Lig.	Ligamentum
Lit.	Literatur

---

Lsg.	Lösung
M.	Musculus
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Min	Minute(n)
Ms	Millisekunde(n)
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbikarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumwasserstoffperoxid
NaJO <sub>3</sub>	Natriumjodat
NB	N-Buthyl
No.	number
Nr.	Nummer
o. a.	Oben angegeben
o. g.	Oben genannt
OP	Operation
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PGA	Polyglactin 910 (Vicryl)
PLA	Polylactidsäure (Polymilchsäure)
RLI	Restlichtintensität
Sek	Sekunden
SMC	Smooth muscle cells (Glatte Muskelzellen)
SM	Smooth muscle (Glatte Muskulatur)
SIS	Small intestinal submucosa
SSE	Sakrale Sphinkterersatzplastik
SSL	Steinschnittlage
ST	Stimulation, Stimulus
Tab.	Tabelle
TE	Tissue Engineering
Um/min	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
v.	Von
v. a.	Vor allem
Vgl.	Vergleiche
vs.	Versus
x	Multipliziert mit
µm	Mikrometer
YII	Yamamoto II Lösung
z. B.	Zum Beispiel
3-D	Dreidimensional
8-Br-cAMP	Zyklisches 8-Bromo-Adenosinmonophosphat

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. G. H. Willital, der die Begeisterung für die Zellkultur in mir geweckt hat, für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit, für die kontinuierliche Unterstützung und qualifizierte Betreuung und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Forschungszentrum Greven.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann gilt mein spezieller Dank für die stetige und kompetente Betreuung der experimentellen Untersuchungen bzgl. des optischen Registrierverfahrens, die lehrreichen Diskussionen, seine zahlreichen Ratschläge und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Frau I. Winkelhues bedanke ich mich besonders für die Hilfe bei der Auswertung des elektrophysiologischen Nachweises der reizinduzierten Membranpotentialänderung und für sämtliche Fragen bzgl. der Verarbeitung des Bildmaterials und der äußeren Form der Arbeit.

Frau B. Herrenpoth ein herzliches Dankeschön für die Hilfe bei der Durchführung der Versuchsreihe des optischen Registrierverfahrens.

In Fragen zu Zellkulturtechniken und Laborarbeit stand mir Frau M. Henschkovsky stets hilfreich zur Seite, wofür ich mich hiermit ausdrücklich bedanken möchte.

Frau S. Leder danke ich für das Heranführen an die Arbeiten im Tierstall und die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate und Färbungen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. R. R. Lehmann gilt mein Dank für das Heranführen an die Analyse der histologischen Bilder.

Frau J. Bergamos, Frau F. Eskioglu, Frau A. Voß und Frau G. Schlünkes danke ich für die Organisation und Bestellung der einzelnen Materialien.

Herrn Dr. med. A. Saxena danke ich für die Tips zur Zellkultur.

Meinem Mitdoktorandem Jens Minnerup danke ich für die spannende Zeit im Labor und für die interessanten Diskussionen.

Frau H. und Herrn W. Jansen gilt mein Dank für die Anpassung der Arbeit an die Regeln der Rechtschreibreform.

Bei meinem Freund Gregor Jürgen Görtz bedanke ich mich besonders für seine Unterstützung und Geduld.

Vielen herzlichen Dank an dieser Stelle auch an meine Brüder Christoph, Frank und Andreas, die mir bei formellen Dingen geholfen haben.

Meinen Eltern, die mir mein Medizinstudium und die Promotion ermöglicht haben, indem sie meinen langen Ausbildungsweg nicht nur finanziell unterstützt haben, sondern mir sehr viel Vertrauen, Freude und Zuversicht mit auf den Lebensweg gegeben haben und mir stets beratend zur Seite stehen, fühle ich mich zu tiefem Dank verpflichtet.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtstag 06.01.1978  
Familienstand: Ledig  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung

08/1984-06/1988 Grundschule Ladbergen  
08/1988-06/1997 Graf-Adolf Gymnasium Tecklenburg  
01/1995-04/1995 Senior High School Marquette, Michigan  
06/1997 Abitur

### Studium

10/1997-03/1999 Studium der Sportwissenschaft und Englisch an der Deutschen Sporthochschule und an der Universität zu Köln  
03/1999 Vordiplom  
04/1999-11/2005 Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
WS 2000/2001 Physikum  
SS 2002 1. Staatsexamen  
SS 2004 2. Staatsexamen

### Praktisches Jahr

10/2004-02/2005 Medizinische Klinik und Poliklinik -Innere Medizin A-Hämatologie-Onkologie, Universitätsklinikum Münster  
02/2005-05/2005 Abteilung für Chirurgie, Stadtspital Waid Zürich (CH)  
06/2005-09/2005 Orthopädische Chirurgie, Schulthess Klinik Zürich (CH)  
11/2005 3. Staatsexamen  
seit 01/06 Assistenzärztin Klinik für Allgemeine Orthopädie, Universitätsklinikum Münster

### Famulaturen

08/2001-09/2001 Klinik für Sportorthopädie/Sporttraumatologie, Universitätsklinikum Freiburg  
09/2002-10/2002 Klinik und Poliklinik für Kinder- und Neugeborenenchirurgie, 02/2004 Universitätsklinikum Münster  
02/2002-03/2002 Praxisfamulatur Dr. med. J. Elbrächter, Dr. med. B. Rickert, Fachärzte für Neurologie, Fachärzte für Psychiatrie, Münster  
08/2003 Abteilung für Akut-Psychiatrie, Westfälische Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie Münster

### Vorträge/Veröffentlichungen

09/2005 Jiri Dvorak & Nina Feddermann: „Cervical spondylotic myelopathy, diagnostical and therapeutical chalange. The European Federation of Neurological Societies, Athen 2005  
07/2006 “Glucocorticosteroids in football: use and misuse”, Jiri Dvorak Nina Feddermann, Katharina Grimm, British Journal of Sports Medicine 2006; 40(Suppl):i48-i54.doi: 10.1136/bjism.2006.027599

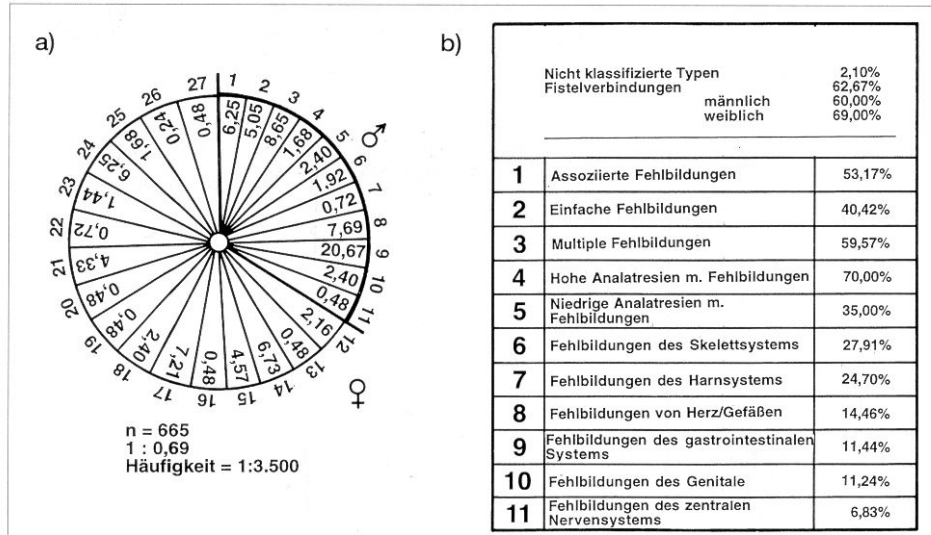
Münster, den 23.02.2007

## **11 Erklärung**

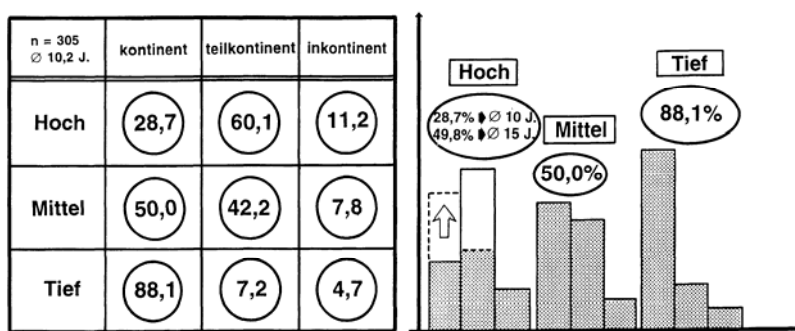
Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit ohne fremde Hilfe verfasst habe. Die wörtlich und inhaltlich zitierten Stellen habe ich alle einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht. Diese Dissertation habe ich keinem anderen Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt, und ich habe mich nicht anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben.

Nina Feddermann

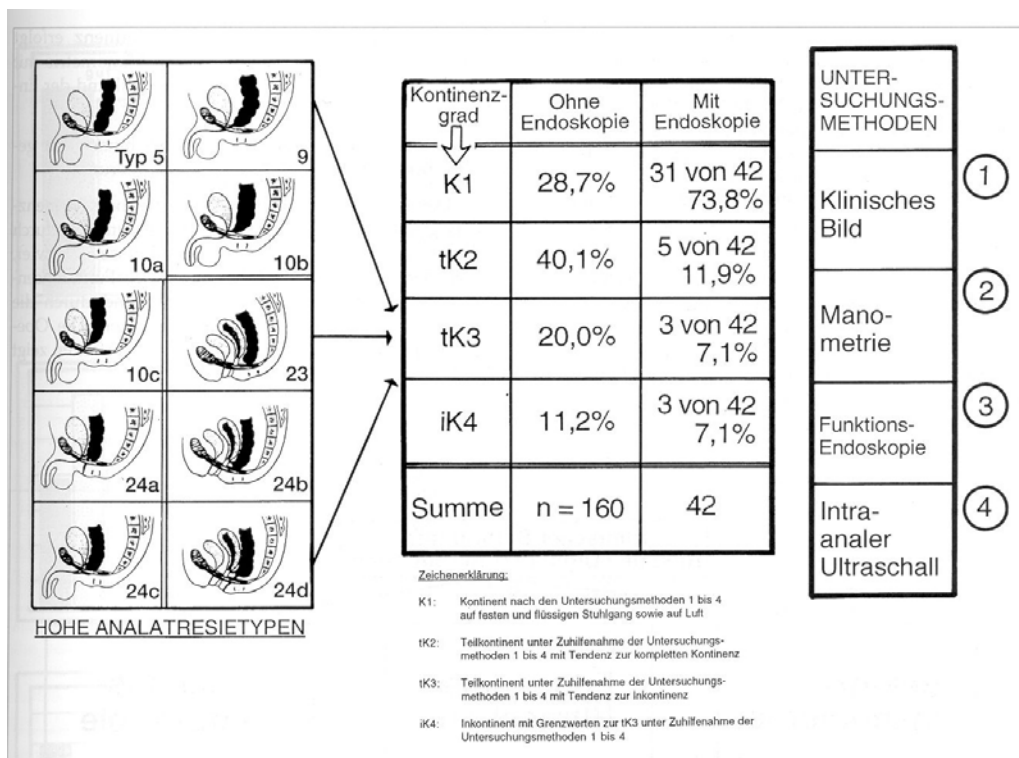
## 12 Anhang



**Abb. 12-1:** Übersicht über die Häufigkeit anorektaler Fehlbildungen, Geschlechtsverteilung und assoziierte Fehlbildungen (a), Übersicht über die Häufigkeitsverteilung der 27 verschiedenen anorektalen Fehlbildungen an Hand von 665 anorektalen Missbildungen. Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000) S. 430



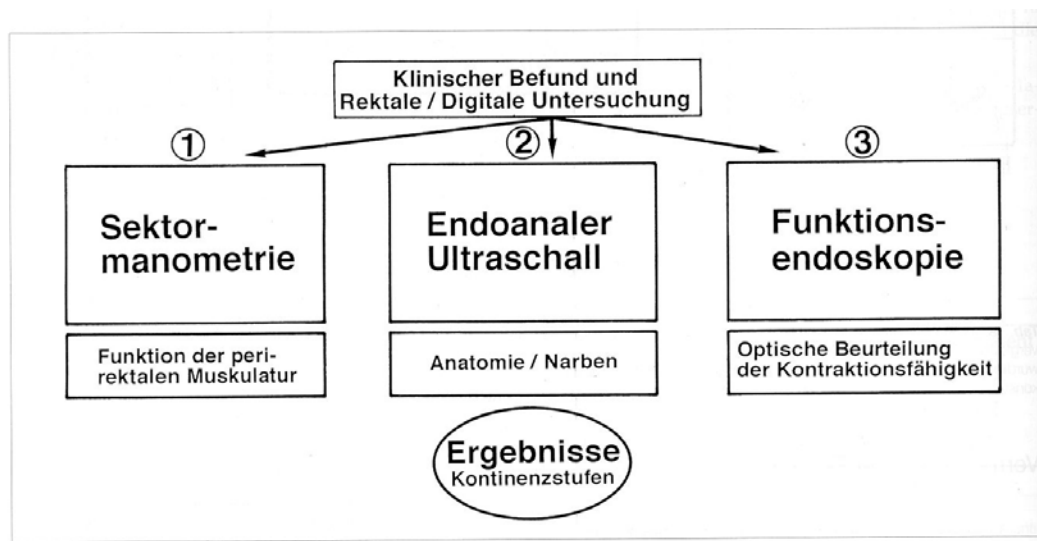
**Abb. 12-2:** Zusammenstellung der Langzeitergebnisse nach operativer Korrektur anorektaler Fehlbildungen (n=305) über einen durchschnittlichen Zeitraum von 10.2 Jahren, eingeteilt in unterschiedlichen Formen der anorektalen Fehlbildungen und klassifiziert in ein entsprechendes Kontinenzgrading unter Zuhilfenahme von Manometrie, Endoskopie und intraanaler Ultraschall in Prozentangaben. Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000), S. 464



**Abb. 12-3:** Zusammenstellung der Ergebnisse und der Kontinenzverhältnisse bei supralevatorischen Analatresien unter endoskopischer Kontrolle im Vergleich zu Kindern, bei denen das abdomino-perineale, endoskopisch kontrollierte, endopuborektale Rekonstruktionsverfahren nicht angewendet wurde. Verglichen wurden 160 Kinder, die ohne Endoskopieverfahren operiert wurden, mit 42 Kindern, bei denen das Endoskopieverfahren zur Rekonstruktion des Enddarms angewendet wurde.

Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000) S. 465





**Abb. 12-4:** Übersicht über Möglichkeiten und Methoden zur Determinierung der Kontinenz: Klinischer Befund und rektale Untersuchungen sind zunächst wichtige, allgemein orientierende Maßnahmen.

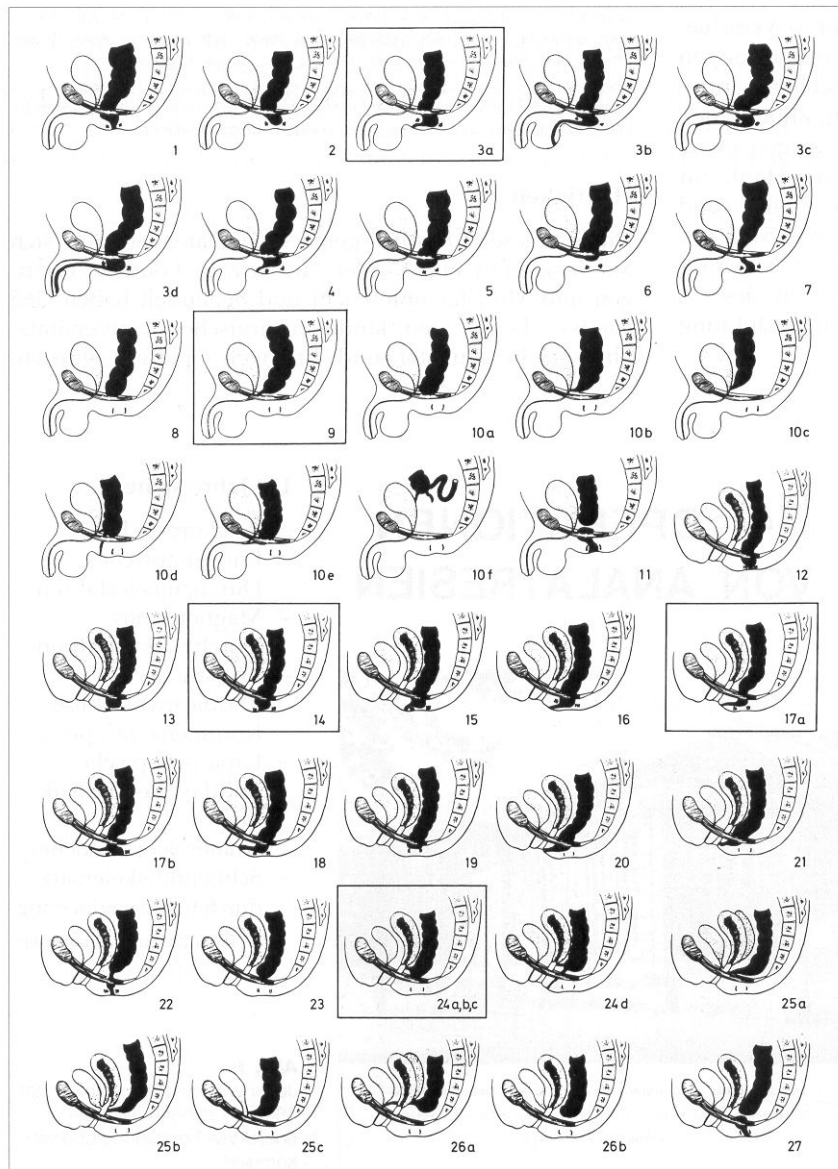
Die Objektivierung der jeweiligen Kontinenzlage erfolgt durch drei Untersuchungen: Sektormanometrie, endoanaler Ultraschall und Funktionsendoskopie. Durch die Manometrie können die Ruhedrucke und Relaxationsverhältnisse im Musculus sphincter internus und externus und der Levatormuskulatur sowie das Reflexverhalten überprüft werden. Durch den endoanal Ultraschall wird die Anatomie und Morphologie dieser Muskelanteile überprüft im Hinblick auf eine normale Konfiguration um den Enddarm oder eine asymmetrische Konfiguration, im Hinblick auf eine vollständige Ausbildung oder eine Aplasie bzw. Hypoplasie und im Hinblick auf die Funktion der muskelbehindernden Narben.

Die Funktionsendoskopie des Beckenbodens ermöglicht eine optische Beurteilung der Kontraktilität und des Verschlussmechanismus des Darmes, die Beurteilung eines inkompletten Verschlusses bzw eines offen stehenden Anus ohne Kontraktion, eines asymmetrischen Kontraktionsverschlusses bzw. eines kompletten Verschlusses des Enddarms, der jedoch durch Luftinsufflation leicht aufdehnbar ist. Diese drei Untersuchungen zusammen ergeben graduell unterschiedliche Ergebnisse entsprechend der jeweiligen Kontinenzlage. Daraus resultieren vier Kontinenzstufen, die ein objektivierbares Maß für die jeweilige Inkontinenzlage darstellen.

Es gibt alternative Methoden zur Beurteilung der Kontinenz nach Punktsystemen und anderen Kriterien (Schärli, Holschneider). Die Kontinenzbeurteilung, klassifiziert in die Kontinenzstufen K1, TK2, TK3, TK4, orientiert sich nach klinischen Befunden und Messwerten, die ein direktes Spiegelbild der jeweiligen Kontinenzlage darstellen.

Es gibt alternative Methoden zur Beurteilung der Kontinenz nach Punktsystemen und anderen Kriterien (Schärli, Holschneider). Die Kontinenzbeurteilung, klassifiziert in die Kontinenzstufen K1, TK2, TK3, TK4, orientiert sich nach klinischen Befunden und Messwerten, die ein jeweiliges Spiegelbild der jeweiligen Kontinenzlage darstellen.

Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000) S. 460




**Abb. 12-5:** Überblick über die verschiedenen Analatresietypen. Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000), S. 428

<b>9,3 %</b>	
HÄUFIGKEIT VON SAKRALEN FEHLBILDUNGEN	
	1 Sakralaplasie
	2 Sakralhypoplasie
	3 Sakraldysplasie
	4 Hemisakrum

**Abb. 12-6:** Überblick über die Häufigkeit von sakralen Fehlbildungen bei anorektalen Anomalien. Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000) S. 434

Aplasie/ Dysplasie	Morphologie des Levators	Kontinenz- situation
S1	fehlt	inkontinent
S2	dysplastisch	inkontinent
S3	rudimentär	teilingkontinent
S4	suffizient	kontinent
S5	normal	kontinent



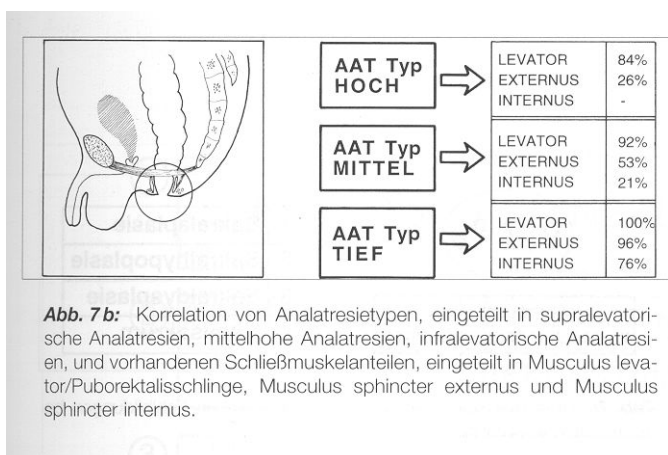
Das Diagramm zeigt ein vertikales Steißbein, das in fünf Segmente unterteilt ist, die von S1 bis S5 beschriftet sind. Jedes Segment enthält ein kleines Sternchen-Symbol, das die Position der Apasie/Dysplasie markiert. Die Segmente S1 bis S3 zeigen eine zunehmende Ausdehnung der Sternchen, was auf eine fortschreitende Dysplasie hinweist.

**Abb. 3:** Überblick über die unterschiedlichen Ausmaße der Steißbeinaplasien bzw. -dysplasien und der damit zusammenhängenden fehlerhaften Ausbildung der Puborektalmuskulatur und des Musculus sphincter internus/externus

**Abb. 12-7:** Überblick über die unterschiedlichen Ausmaße der Steißbeinaplasien bzw. dysplasien und der damit zusammenhängenden fehlerhaften Ausbildung der Puborektalmuskulatur und des Musculus sphincter internus/externus. Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000) S. 487



**Abb. 12-8:** Johann Ferdinand Heyfelder hat 1842 in Erlangen die erste anorektale Fehlbildung operativ korrigiert. Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000) S. 427



**Abb. 12-9:** Korrelation von Analatresietypen, eingeteilt in supralevatorische Analatresien, mittelhohe Analatresien, infralevatorische Anaatresien, und vorhandenen Schließmuskelanteilen, eingeteilt in Musculus levator/Puborektalisschlinge, Musculus sphincter externus und Musculus sphincter internus. Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000)

Typ	Form	Häufigkeit (%)
1	Analstenose	6,25
2	Analmembran	5,05
3	Anokutane Fistel	8,65
4	Perinealer Anus	1,68
5	Analagenesie	2,40
6	Analagenesie mit rektobulbärer Fistel	1,92
7	Anorektale Stenose	0,72
8	Anorektale Agenesie	7,69
9	Rektourethrale Fistel	20,67
10	Rektovesikale Fistel	2,40
11	Rektale Atresie	0,48
12	Analstenose	2,16
13	Analmembran	0,48
14	Anokutane Fistel	6,73
15	Perinealer Anus	4,57
16	Anovulväre Fistel	0,48
17	Anovestibuläre Fistel	7,21
18	Vestibulärer Anus	2,40
19	Analagenesie	0,48
20	Rektovestibuläre Fistel	0,48
21	Rektovaginale Fistel tief	4,33
22	Anorektale Stenose	0,72
23	Anorektale Agenesie	1,44
24	Rektovaginale Fistel hoch	6,25
25	Rektourogenitaler Sinus	1,68
26	Rektovesikale Fistel	0,24
27	Rektale Atresie	0,48

**Tab 1:** Einteilung der anorektalen Fehlbildungen in insgesamt 27 verschiedene Typen:

Typ 1 bis 11 sind anorektale Fehlbildungen beim Jungen.

Typ 12 bis 27 sind anorektale Fehlbildungen beim Mädchen.

**Abb. 12-10:** Einteilung der anorektalen Fehlbildungen in insgesamt 27 verschiedene Typen:

Typ 1 bis 11 sind anorektale Fehlbildungen beim Jungen.

Typ 12 bis 27 sind anorektale Fehlbildungen beim Mädchen.

Aus *Chirurgie im Kindesalter* (Willital and Lehmann 2000) S. 429



**Abb. 12-11:** Aktives Schließmuskeltraining mit Hilfe eines Trainingstampons. Der Tampon wird in den Enddarm eingeführt. Die hypoplastische Schließmuskulatur wird dadurch angespannt und vorgedehnt. Gegen den elastischen Widerstand des Tampons erfolgt dann die Willkürkontraktion der Schließmuskulatur, die am effektivsten ist, wenn sich die Muskulatur durch Vordehnung aktiv kontrahieren kann (Willital 2002).

**13 Genehmigungsbescheid vom 26. April 2002**

Entwurf/erstellt von:

Datum 26. April 2002

Az.: 50.0835.1.0 (G 18/2002)

Bearb.: Kerstin Stichling

Raum: 423

Tel.: 2104

Bearb.2:

Raum:

Tel.:

X.400: kerstin.stichling@bezreg-muenster.nrw.de

Fax:

Haus: Domplatz 1 - 3

Kopf: BR Münster

**1) Gegen Empfangsbekanntnis**

Herrn

Prof. Dr. G. H. Willital

Herrn

Dr. med. M. L. Metzelder

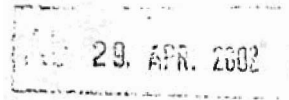
Klinik und Poliklinik für Kinder-

und Neugeborenenchirurgie

Universitätsklinikum Münster

Albert-Schweitzer-Str. 33

48149 Münster

**Tierschutz;****Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren**

Ihr Antrag vom 27.12.2001, hier eingegangen am 29.01.2002

Nachbesserung vom 01.03.2002, hier eingegangen am 05.03.2002

**Genehmigungsbescheid**Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Willital,  
sehr geehrter Herr Dr. Metzelder,gem. § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) in der zur Zeit geltenden Fassung, wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden **Versuchsvorhabens erteilt:****„Tierexperimentelle Untersuchung über das Transplantationsverhalten von durch Tissue Engineering transplantierten Muskelzellen und Bindegewebszellen“**