



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Untersuchungen zum Nutzen unterschiedlicher
Stammzellpopulationen zur Vaskularisierung und Integration einer
mit autologen Zellen besiedelten virusinaktivierten azellulären
humanen Dermis als Transplantat in standardisierten
Defektwunden**

Autor: Mario Vitacolonna
Institut / Klinik: Chirurgische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. P. Hohenberger

Ziel dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Etablierung eines Tissue Engineering Implantates, welches zur Verbesserung der Wundheilung chronischer Weichgewebedefekte, wie sie z. B. bei multimodalen Therapien von Tumoren vorkommen können, beitragen soll. Da nach Strahlentherapie die ortsständigen Reparaturzellen gravierend beeinträchtigt sind, könnte die Transplantation einer mit intakten autologen Zellen besiedelten humanen Dermis zu einer Verbesserung der Wundheilung führen. Jedoch besteht ein bislang ungelöstes Problem darin, dass die transplantierten Zellen in der Matrix nach der Implantation möglichst schnell mit Blut versorgt werden müssen, um ein Absterben der autologen Zellen zu verhindern. Die Kokultivierung adulter Stammzellen könnte die in-vivo Vaskularisation der implantierten Matrix verbessern helfen. Bisher besteht jedoch noch kein Konsens über die Wirksamkeit bestimmter Stammzellarten bezüglich ihres Vaskularisierungspotenzials. Um dies zu klären, wurden autologe Zellen wie Fibroblasten, mesenchymale Stammzellen (MSC), endotheliale Progenitorzellen (EPC) und Perizyten sowie die unseparierten Zellmischungen der stromalen-vaskulären Fraktion des Fettgewebes (SFV/ADSC) und des Knochenmarks (BMDC) daraufhin untersucht, ob mit ihnen eine verbesserte in-vivo Vaskularisation einer azellulären dermalen Matrix erreicht werden kann.

Dazu wurde zunächst die Besiedelung der humanen Dermis hinsichtlich der Besiedelungseffizienz, homogenen Verteilung und Eindringtiefe optimiert. Problematisch bei der Verwendung einer azellulären Dermis als Scaffold ist das dichte Proteinnetzwerk der extrazellulären Matrix, welches dazu führt, dass die Zellen nach statischer Besiedelung ausschließlich auf der Oberfläche der Dermis lokalisiert sind und kaum Tiefenwachstum stattfindet. Es wurden verschiedene Aussaatmethoden (statisch/dynamisch) miteinander verglichen und die besiedelten Matrizen über einen Zeitraum von 12 Tagen statisch kultiviert, um den Einfluss der jeweiligen Methode auf die Proliferation zu beurteilen. Die statischen Methoden beinhalteten die statische Oberflächenbesiedelung, Injektion der Zellsuspension, Einschneiden der Matrix zur Oberflächenvergrößerung und die Unterdruck- und Ultraschallbehandlung der Dermis, um eingeschlossene Luftblasen zu entfernen. Die dynamischen Methoden umfassten die Verwendung eines Orbital-Shaker und die Nutzung einer Zentrifuge mit verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten und -dauer. Es zeigte sich, dass durch die Verwendung rein statischer Methoden ohne Entgasung nur eine geringe Homogenität und Proliferationsrate erreicht werden konnte. Nach Entgasung fand eine deutliche Steigerung der Proliferation und des Tiefenwachstums statt. Die alleinige dynamische Besiedelung mit einer Zentrifuge erhöhte die Zellverteilung und die Proliferation innerhalb der Dermis nur insignifikant. Durch die Kombination von Zentrifugalkraft mit vorheriger Entgasung der Dermis konnte jedoch im Vergleich zu den anderen Methoden eine deutlich höhere Zellmasse und Homogenität im Innern der Dermis, sowie eine erhöhte Proliferationsrate bei der Langzeitbesiedelung erreicht werden. Die höchsten Werte konnten durch die Kombination von vorheriger Entgasung und anschließender Zentrifugation mit 300g/5x1min. erzielt werden. Es konnte damit gezeigt werden, dass Luft in den Poren der Dermis die Proliferation und die Eindringtiefe signifikant beeinflusst.

Um die Einwirkung verschiedener Körperflüssigkeiten und Bakterien auf die biomechanischen Eigenschaften der Matrix zu untersuchen, wurde die unbesiedelte Dermis für insgesamt 3 Wochen in verschiedenen humanen Körperflüssigkeiten (Urin, Vollblut und Duodenalsekret), in Ringerlösung und

einer Bakterienmischung, wie sie z. B. in einer Peritonitis vorkommen kann, inkubiert und die Veränderungen der mittleren Bruchfestigkeit nach 0,7,14 und 21 Tagen gemessen. Bei allen fünf Fluiden zeigte sich eine Abnahme der mittleren Bruchfestigkeit an Tag 21. Jedoch war das Duodenalsekret die einzige Flüssigkeit, welche die mechanische Festigkeit der Dermis, verglichen mit der Ringerlösung, nach 21 Tagen Inkubation signifikant reduzierte, sodass die Exposition mit diesem Sekret nach Implantation zu einem strukturellen Versagen führen kann.

In einer weiteren Teilstudie sollte die Frage geklärt werden, wie massiv die autologen Zellen auf der Dermis nach Implantation durch die zunächst mangelnde Blutversorgung in bestrahltem und unbestrahltem Gewebe geschädigt werden. Zusätzlich sollte beurteilt werden, ob die Anwendung von Poren in den Matrizen die Vaskularisierung und analog dazu die Zellproliferation verbessern kann. Dazu wurden 24 Ratten in 2 Hauptgruppen (bestrahlt/unbestrahlt) unterteilt und dorsale Rückenhautkammern implantiert. Die Ratten wurden mit je 20Gy unilateral epikutan bestrahlt. In beiden Hauptgruppen erhielten je 6 Tiere Fibroblasten-augmentierte Dermis mit Poren und je 6 ohne Poren. Intravitalmikroskopisch wurden an den Tagen 0,3,6,9 und 12 der zeitliche Verlauf der Proliferation und die Überlebensrate der Zellen durch Quantifizierung der auf der Oberfläche der Dermis lokalisierten Zellen bestimmt. Zum Zelltracking wurde ein Fluoreszenzplasmid in ein lentivirales Transduktionssystem kloniert und die Fibroblasten damit persistent transduziert. Generell zeigte sich in allen Gruppen ein Rückgang der Zellzahlen bis Tag 3 und ein Wiederanstieg ab Tag 6 bis 12 in unterschiedlichem Ausmaß. Bei den Gruppen ohne Bestrahlung konnten in der Gruppe mit Poren signifikant mehr Zellen gezählt werden als in der Gruppe ohne Poren. Bei den Gruppen mit Bestrahlung zeigte sich, dass die Bestrahlung die Zellproliferation zwar bedeutend hemmte, aber die Gruppe mit Poren eine deutlich höhere Proliferation als die Gruppe ohne Poren aufwies. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die autologe Zellen in-vivo zwar in der Dermis proliferieren konnten, die Bestrahlung des Wundgrundes aber die Proliferation und das Überleben der Zellen in der Dermis deutlich beeinträchtigte. Durch die Modifikation mit Poren konnte jedoch das Zellwachstum und das Zellüberleben signifikant erhöht werden, insbesondere in bestrahltem Gewebe. Um anschließend das Vaskularisationspotenzial autologer endothelialer Progenitorzellen und mesenchymaler Stammzellen in Kokultur mit Fibroblasten und Perizyten mit der alleinigen Besiedelung der Dermis mit Fibroblasten (Kontrollgruppe) zu vergleichen, wurden zunächst die o.g. adulten Stammzellen aus dem Knochenmark von Fischer-Ratten isoliert, charakterisiert und kultiviert. Zusätzlich zu den Stammzellen wurden auch unseparierte Zellen des Knochenmarks und der stromalen-vaskulären Fraktion von Fett verglichen, die beide eine heterogene Mischung unterschiedlicher Zellen und Stammzellen darstellen. Dazu bekamen 72 Ratten Rückenhautkammern implantiert, welche in 2 Hauptgruppen (bestrahlt/unbestrahlt) eingeteilt wurden. Die Hauptgruppen wurden jeweils in 6 weitere Gruppen mit n=6 Ratten eingeteilt. Die Bestrahlung erfolgte unilateral epikutan mit 20Gy. Die Gefäßdichte wurde intravitalmikroskopisch an den Tagen 0,3,6,9 und 12 ermittelt. Generell zeigte sich eine beginnende Vaskularisierung der Dermis meist ab dem 6. Tag, wobei die bestrahlten Tiere eine deutlich niedrigere Gefäßbildung als die unbestrahlten Ratten aufwiesen. Bei den unbestrahlten Tieren konnten ausschließlich mit der SVF-Gruppe zwischen Tag 6 und 12 im Vergleich zur reinen Fibroblasten-Besiedelung eine signifikant höhere Gefäßdichte erreicht werden, wobei bei der MSC- und SVF-Gruppe bereits ab dem 3. Tag Gefäßeinsprossungen sichtbar waren. Bei den bestrahlten Tieren erreichten die Gruppen mit MSCs und SVF signifikant höhere Gefäßdichten verglichen mit der Kontrollgruppe, jedoch zeigten sich nur bei der SVF-Gruppe Einsprossungen ab dem 3. Tag. Es hat sich damit gezeigt, dass mit der unseparierten SVF-Fraktion im Vergleich zu den restlichen getesteten Zellpopulationen bei unbestrahlten wie auch bestrahlten Wunden eine signifikant höhere Gefäßdichte nach der Implantation der Dermis erreicht werden konnte. Neben der einfachen Verfügbarkeit, der sofortigen Verwendbarkeit und der Zeitersparnis, verglichen mit den adulten Stammzellen, die zunächst isoliert und kultiviert werden müssen, liegt ein weiterer Vorteil dieser Fraktion darin, dass ein Verlust der Pluripotenz und Bildung spontaner Immortalisierung durch die lange Kultivierung vermieden werden kann.

Abschließend wurden die Auswirkungen einer Fibroblasten-augmentierten Dermis auf die Wundheilung nach multimodaler Therapie untersucht. Dazu wurde mit einem Ratten-Tiermodell eine Bronchusanastomose simuliert. Dazu wurden 64 Ratten in 8 Gruppen mit n=8 Tieren eingeteilt. 32 davon wurden transthorakal mit 20Gy bestrahlt und 32 Ratten wurden ohne Bestrahlung operiert. Alle Tiere erhielten eine Transsektion mit anschließender chirurgischer Anastomose des linken Hauptbronchus. Jeweils die Hälfte der Ratten aus beiden Hauptgruppen erhielt eine Fibroblasten-augmentierte Dermis manschettenförmig um die Bronchusanastomose gelegt. Die andere Hälfte erhielt nach der Anastomose keine Dermis-Manschette. Die Auswertung erfolgte jeweils nach einer und zwei Wochen. Ein μ CT-Scan wurde an den Tagen 7 und 14 durchgeführt, um eine Stenosenbildung auszuschließen. Als Parameter für die Wundheilung wurden die Berstdrücke sowie der Hydroxyprolin Gehalt als Marker für Gewebsneubildung gemessen. Um ergänzend das Überleben der autologen Zellen und die Wachstumskinetik innerhalb der Dermis-Manschette postoperativ zu

klären, bekamen 16 Ratten eine mit fluoreszierenden Fibroblasten besiedelte Matrizen implantiert. Nach Beendigung des Beobachtungszeitraumes von 7 und 14 Tagen wurden die Zellverteilung und die Zellzahl innerhalb der besiedelten Scaffolds histologisch und molekularbiologisch bestimmt. Zur quantitativen Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die GAPDH-Konzentration und zur Quantifizierung der fluoreszierenden Fibroblasten die spezifische Gensequenz des Fluoreszenzfarbstoffes mittels qReal-Time-PCR gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass bei den bestrahlten Gruppen die anastomotischen Berstdrücke bei den mit Dermis behandelten Tieren am 7. postoperativen Tag, nicht jedoch am 14. Tag, signifikant höher waren als bei den Tieren ohne Dermis. Die Messung der Hydroxyprolinkonzentrationen zeigte an Tag 7 ein ähnliches Ergebnis bei den bestrahlten Gruppen mit Dermis-Manschette. Die Auswertung der quantitativen RT-PCR und der histologischen Aufnahmen zeigten eine mit der Implantationsdauer zunehmende Rezellularisierung der Dermis. Jedoch konnten weder histologisch noch molekularbiologisch signifikante Mengen autologer Fibroblasten nachgewiesen werden, sodass davon auszugehen ist, dass diese kurz nach der Implantation, vermutlich infolge von Ischämie, abstarben. Obwohl bereits nach 7 Tagen keine autologen Zellen mehr nachweisbar waren, konnte gezeigt werden, dass die Behandlung einer bronchialen Anastomose mit einer besiedelten dermalen Matrix die frühe Wundbruchfestigkeit signifikant verbessern hilft. Die Rezellularisierung der Dermis mit aus dem Wundgrund migrierten Zellen könnte eine mögliche Erklärung für den positiven Effekt darstellen. Der Einsatz einer solchen Matrix bietet beispielsweise die Möglichkeit, eine frühe Anastomoseninsuffizienz nach neoadjuvanter Radiochemotherapie bei lokal fortgeschrittenem Lungenkrebs zu verhindern.