

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.-G. Machens)

Entwicklung eines Photosynthese betreibenden Hautersatzmaterials

Thilo Ludwig Schenck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H.-G. Machens
2. Priv.-Doz. Dr. St. Huber-Wagner

Diese Dissertation wurde am 27.06.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.02.2014 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN, SCHREIBWEISEN UND EINHEITEN	1
2	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....	4
3	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	5
4	MATERIAL UND METHODEN.....	10
4.1	Der Organismus und die Kultivierung von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10
4.2	Kollagenscaffold für den dermalen Hautersatz.....	10
4.3	<i>In vitro</i> Evaluation der bioaktivierten Scaffolds	11
4.3.1	Einsaat und Adhäsion von <i>Chlamydomonas reinhartii</i> im Scaffold.....	11
4.3.2	Distribution von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im Scaffold	11
4.3.3	Biokompatibilität von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im Scaffold	12
4.3.4	Sauerstoffproduktion durch bioaktivierte Scaffolds	12
4.4	<i>In vivo</i> Evaluation der bioaktivierten Scaffolds	13
4.4.1	Ethische Rechtfertigung und Genehmigung des Tierversuchsvorhabens.....	13
4.4.2	Vorbereitung der Scaffolds für <i>in vivo</i> Untersuchung	15
4.4.3	Vollhautdefektmodell	15
4.4.4	Verwendete Tierart.....	16
4.4.5	Haltung der Tiere	17
4.4.6	Setzen der Vollhautdefekte und Implantation.....	18
4.4.7	Postoperative Haltung der Tiere.....	20
4.4.8	Klinische Verlaufskontrolle am Tiermodell.....	20
4.4.9	Viabilität von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im implantierten Scaffold	23

4.4.10	Histologische Untersuchung nach Explantation des bioaktivierten Scaffolds.....	23
4.4.11	Immunantwort auf das bioaktivierte Scaffold.....	24
4.4.12	Sauerstoffproduktion des bioaktivierten Scaffolds <i>in vivo</i>	24
4.4.13	Statistische Auswertung.....	25
5	ERGEBNISSE	26
5.1	<i>In vitro</i> Ergebnisse.....	26
5.1.1	Einsaat und Adhäsion von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im Scaffold	26
5.1.2	Distribution von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im Scaffold	27
5.1.3	Biokompatibilität von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im Scaffold	28
5.1.4	Sauerstoffproduktion durch bioaktivierte Scaffolds	29
5.2	<i>In vivo</i> Ergebnisse	31
5.2.1	Klinische Verlaufskontrolle	31
5.2.2	Viabilität von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im implantierten Scaffold.....	32
5.2.3	Histologische Untersuchung nach Explantation des bioaktivierten Scaffolds.....	33
5.2.4	Immunantwort auf das bioaktivierte Scaffold.....	34
5.2.5	Sauerstoffproduktion des bioaktivierten Scaffolds <i>in vivo</i>	35
6	DISKUSSION.....	37
6.1	Klinische Situation	37
6.2	Die Rolle von Sauerstoff in der Wundheilung	37
6.3	Biomaterialien als Lösungsansätze	38
6.4	Bioaktivierung von Scaffolds	39
6.5	Alternative Ansätze zur Verbesserung der Gewebeoxygenierung	40

6.6	Photosynthese betreibende Kollagenscaffolds als Lösungsansatz	41
6.7	Diskussion der Ergebnisse	42
6.7.1	Einsatz und Adhäsion von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im Scaffold	42
6.7.2	Distribution von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im Scaffold	43
6.7.3	Biokompatibilität von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im Scaffold	43
6.7.4	Sauerstoffproduktion durch bioaktivierte Scaffolds	43
6.7.5	Klinische Verlaufskontrolle am Tiermodell.....	43
6.7.6	Viabilität von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> im implantierten Scaffold	44
6.7.7	Histologische Untersuchung nach Explantation des bioaktivierten Scaffolds.....	45
6.7.8	Immunantwort auf das bioaktivierte Scaffold.....	46
6.7.9	Sauerstoffproduktion des bioaktivierten Scaffolds <i>in vivo</i>	46
6.8	Fazit	48
7	ZUSAMMENFASSUNG	49
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	50
9	ANHANG	56
9.1	Verzeichnis der Geräte, Hilfsmittel und Software.....	56
9.2	Verzeichnis der Chemikalien, Medikamente und Verbrauchsmaterialien	57
9.3	Statistisches Gutachten	58
9.4	Antrag auf Genehmigung des Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes	58
10	LEBENS LAUF	81
11	DANKSAGUNG.....	85

1 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN, SCHREIBWEISEN UND EINHEITEN

Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
A.U.	Arbitrary units
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CA	Kalifornien
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CCL	CC Ligand
CR	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CW	cell wall deficient
CXCL	CXC Ligand
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DRT	Dermal regeneration template
EG	Europäische Gemeinschaft
et al.	et alii
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FDA	Food and Drug Administration
FELASA	Federation European Laboratory Animal Science Association
FL	Florida
g	Gramm

GMP	Good Manufacturing Practice
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 - alpha
i.d.R.	in der Regel
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
inkl.	inklusive
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzellen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μ m	Mikrometer
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm
MN	Minnesota
MTA	Medizinisch-Technische Assistentin
NaCl	Natriumchlorid
NJ	New Jersey
O ₂	Sauerstoff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

pg	Pikogramm
Ph.D.	Doctor of Philosophy
p.o.	per os
psbD	photosystem II protein D2
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
s.S.	siehe Seite
s.c.	subkutan
SDR	Sensor Dish Reader
SEM	Standard error of the mean
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
UV	ultraviolett
V.A.C.	Vacuum Assisted Closure
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel
ZPF	Zentrum für Präklinische Forschung
*	signifikant
**	hoch signifikant

2 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

- Abb. 1: Bisherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe
(Mit freundlicher Genehmigung von Tomás Egaña)
- Abb. 2: Zielsetzung der Arbeit; Konzept der Bioaktivierung durch *Chlamydomonas reinhardtii* (Mit freundlicher Genehmigung von Tomás Egaña)
- Abb. 3: Setzen der Vollhautdefekte und Implantation der Scaffolds
- Abb. 4: Verwendete Tierart und Operation
- Abb. 5: Einsaat und Adhäsion von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold
(Mit freundlicher Genehmigung von Tomás Egaña)
- Abb. 6: Distribution von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold
- Abb. 7: Biokompatibilität von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold
- Abb. 8: Sauerstoffproduktion durch bioaktivierte Scaffolds
- Abb. 9: Klinische Verlaufskontrolle am Tiermodell
- Abb. 10: Viabilität von *Chlamydomonas reinhardtii* im implantierten Scaffold
- Abb. 11: Histologische Untersuchung nach
Explantation des bioaktivierten Scaffolds
- Abb. 12: Immunantwort auf das bioaktivierte Scaffold
- Abb. 13: Sauerstoffproduktion des bioaktivierten Scaffolds *in vivo*
- Abb. 14: Vaskularisationsanalyse
- Tab. 1: Klinische Verlaufskontrolle am Tiermodell / Belastungs-Score-Sheets

3 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die Blutversorgung von Organen und Geweben ist eine elementare Voraussetzung für die Gesundheit des Menschen. Verschiedene Erkrankungen können zu unzureichender Gewebepfusion führen. Beispiele hierfür sind die arterielle Verschlusskrankheit, die venöse Insuffizienz, die Arteriosklerose und der Diabetes mellitus. Die Folge der Minderperfusion, die neben der fehlenden Nährstoffversorgung vor allem auch eine Hypoxie verursacht, manifestiert sich an der Haut häufig in Form von Ulzerationen und Wundheilungsstörungen.

Die Behandlung dieser Wunden ist häufig von Misserfolgen geprägt, so dass chronische Wunden eine ernste Bedrohung für betroffene Patienten darstellen. Der Verschluss von Hautdefekten ist eine Domäne der Plastischen und Rekonstruktiven Chirurgie. Je nach individueller Situation des Patienten werden verschiedene Verfahren zur Defektdeckung gewählt. Diese reichen von der Transplantation von Spalt- oder Vollhaut, über lokale und gestielte Lappenplastiken bis hin zur autologen Transplantation von freien Lappenplastiken, welche Ihre Perfusion durch mikrochirurgische Gefäßanschlüsse erhalten. Dennoch kommt es häufig, insbesondere an den unteren Extremitäten, zu ausbleibendem Heilungserfolg und chirurgisch nicht mehr therapierbaren Defekten. Oft verbleibt nur noch die Amputation als letzte Therapieoption.

Hautdefekte und chronische Wunden sind für eine Vielzahl von ambulanten und stationären Behandlungen ursächlich und sind neben der Belastung für die betroffenen Patienten auch ein erheblicher Kostenfaktor im Gesundheitssystem, da diese Behandlungen oft langwierig und materialintensiv sind.

In der Biotechnologie hat sich in den letzten beiden Jahrzehnten die Fachrichtung des Tissue Engineerings entwickelt. In dieses Fachgebiet werden große Hoffnungen gelegt, da hier neue Strategien zur Deckung von Gewebedefekten durch künstlich hergestellte Materialien entwickelt werden. Insbesondere die Entwicklung dermalen Hautersatzmaterialien gilt als neue, aussichtsreiche Therapieoption (Place et al. 2009). Hierbei werden zunehmend Materialien beschrieben, die die körpereigene Geweberegeneration unterstützen sollen (Machens et al. 2000). Die Verfahren des Tissue Engineerings, die die körpereigenen regenerativen Prozesse unterstützen

sollen, werden mittlerweile einer eigenen Disziplin, der regenerativen Medizin, zugeordnet (Machens et al. 2000). Zur Steigerung der regenerativen Kapazität dieser Materialien werden zunehmend Techniken erforscht, um die Materialien mit Zellen, z.B. autologen Mesenchymalen Stammzellen (Mesenchymal Stem Cells, MSC) zu besiedeln (Lü et al. 2011). Diese Verfahren an Gewebeersatzmaterialien werden als Bioaktivierung bezeichnet.

Trotz großer Fortschritte im Bereich des Tissue Engineerings ist der klinische Durchbruch derzeit noch ausstehend (Lutolf und Hubbell 2005). Als eine der Hauptursachen hierfür wird die ungenügende Sauerstoffversorgung innerhalb der Materialien aufgrund fehlender Blutgefäße gesehen (Priya et al. 2008). Eine Vielzahl an Forschungsergebnissen und Veröffentlichungen schreiben der Sauerstoffversorgung eine Schlüsselrolle im Wundheilungsprozess zu (Eisenbud, 2012), (Priya et al. 2008). Für den Wundheilungsprozess ist eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen der Wunde sowie der von dort in die Biomaterialien einwachsenden Zellen unabdingbar (Malda et al. 2007).

Auf Grund des ausbleibenden Erfolgs neuer Biomaterialien im klinischen Einsatz bleiben autologe Gewebetransplantationen durch Plastische Chirurgen der Goldstandard in der Defektdeckung (Lutolf et al. 2009), (Hubbell et al. 2009). Diese Gewebetransplantationen bergen jedoch auch Risiken und sind häufig mit dem Setzen zusätzlicher, neuer Defekte verbunden (Geary und Tiernan, 2009). Daher sind neue Methoden zur Verbesserung der Gewebeoxygenierung dringend erforderlich. Der Einsatz von bioaktivierten Hautersatzmaterialien gilt als vielversprechend. Es bedarf jedoch neuer Strategien, um das Problem der Hypoxie innerhalb von Material und Wunde zu lösen. Fortschritte in diesem Bereich könnten weitreichende klinische Konsequenzen mit sich bringen.

Der Ansatz dieser Arbeit ist es, den Sauerstoff im Biomaterial zu produzieren, von wo aus er direkt den in das Material eingewanderten Zellen sowie dem zu versorgenden Gewebe zukommen kann. Hierfür wurde ein bioaktiviertes Scaffold hergestellt, indem ein handelsübliches Kollagenscaffold mit photosynthetisch aktiven Algen der Gattung *Chlamydomonas reinhardtii* besiedelt wurde und sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht wurde. Die lokale Sauerstoffproduktion direkt am Ort des Verbrauchs und

unter Umgehung des Kreislaufsystems stellt ein Novum dar, welches bisher noch nicht in einem Organismus untersucht wurde.

Zielsetzung der Arbeit:

Die insuffiziente Sauerstoffversorgung von künstlichen Geweben wird allgemein als Ursache für deren fehlenden klinischen Erfolg verantwortlich gemacht. Ziel dieser Arbeit ist es, eine lokal wirkende und durchblutungsunabhängige Sauerstoffquelle für Gewebe zu entwickeln. Hierfür wurde durch den Betreuer dieser Arbeit, Herrn Dr. Tomás Egaña, Ph.D., das Konzept der lokalen Gewebeoxygenierung durch Photosynthese entwickelt.

Fragestellung dieser Arbeit ist, ob die Herstellung eines Gewebeersatzmaterials möglich ist, das bei Lichtexposition Sauerstoff durch Photosynthese erzeugen und diesen *in vitro* als auch *in vivo* abgeben kann. Als Modell für den Machbarkeitsnachweis lokaler Sauerstoffproduktion durch Photosynthese wurde die Herstellung eines Photosynthese betreibenden Kollagenscaffolds für die Hautregeneration gewählt (s. Abb. 2).

In unveröffentlichten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, der der Verfasser dieser Arbeit angehört, wurde bereits gezeigt, dass eine Ko-Kultur von murinen Zellen (3T3, Fibroblasten) und Zellen der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* möglich ist. Zudem wurde gezeigt, dass in einer Ko-Kultur von Fibroblasten und Algen, die Sauerstoffproduktion durch die Algen den Sauerstoffbedarf der Fibroblasten bedienen kann. Auch die Konzentration des von den Fibroblasten freigesetzten Hypoxiemarkers HIF-1 α war in der Ko-Kultur signifikant niedriger exprimiert als in der Fibroblasten Monokultur. Diese Vorarbeiten wurden durch Ursula Hopfner und Dr. Tomás Egaña, Ph.D. durchgeführt (s. Abb. 1).

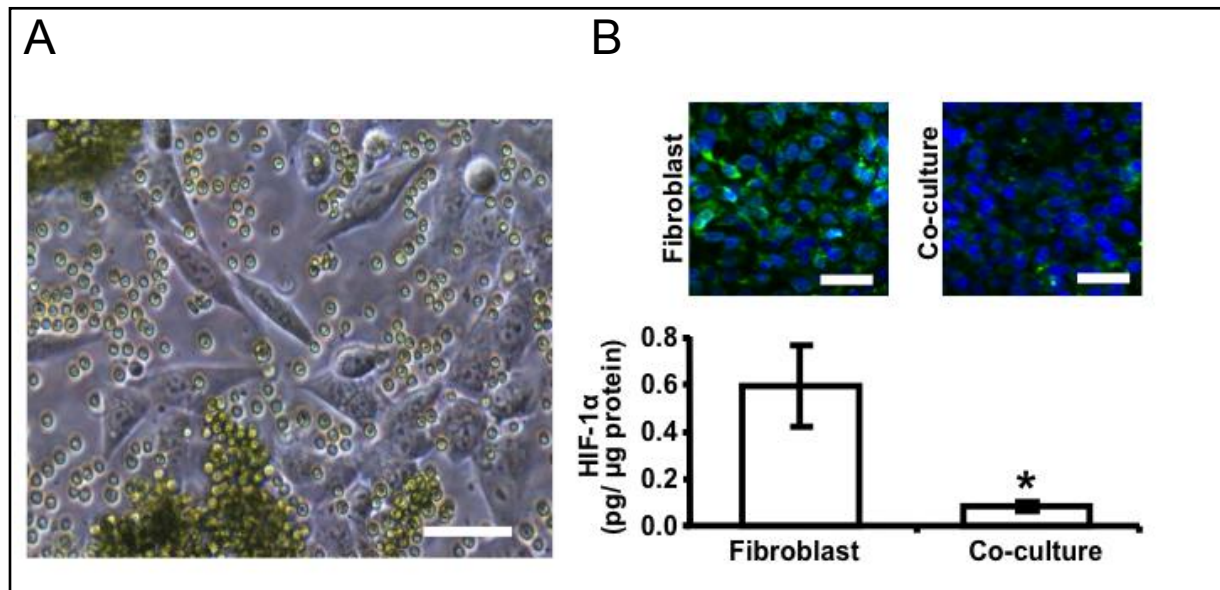


Abb. 1: Bisherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe:

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe (U. Hopfner & T. Egaña) konnte bereits gezeigt werden, dass die Kultivierung von murinen Fibroblasten (3T3) und Zellen der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* in Ko-Kultur möglich ist (A). Unter hypoxischen Bedingungen (1 % Sauerstoff) war der von Fibroblasten freigesetzte Hypoxiemarker HIF-1α in der Ko-Kultur signifikant niedriger exprimiert als in der Fibroblasten Monokultur (B). Hieraus wurde geschlossen, dass die Fibroblasten den durch die Algen produzierten Sauerstoff metabolisieren können.

Aufbauend auf den Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe wurden folgende Teilfragen formuliert:

1. Ist die zur Bioaktivierung der Kollagenscaffolds ausgewählte Algenart *Chlamydomonas reinhardtii* auf den ausgewählten Kollagenscaffolds *in vitro* adhären?
2. Ist *Chlamydomonas reinhardtii* auf den Kollagenscaffolds *in vitro* überlebensfähig (Biokompatibilität)?
3. Kann *Chlamydomonas reinhardtii* auf den Kollagenscaffolds *in vitro* weiterhin Photosynthese betreiben und Sauerstoff produzieren?
4. Sind die photosynthetisch aktiven Kollagenscaffolds bei der Implantation in Vollhautdefekte von Nacktmäusen für diese klinisch verträglich?
5. Kann *Chlamydomonas reinhardtii* im implantierten Scaffold überleben?
6. Kommt es zur Bildung eines chimären Gewebes aus *Chlamydomonas reinhardtii* und den in das Scaffold einwachsenden Zellen der Maus?

7. Kommt es zu einer Immunantwort des Tieres auf das photosynthetisch aktivierte Scaffold?
8. Sind die Scaffolds nach Implantation weiterhin in der Lage *in vivo* Sauerstoff zu produzieren?

Die Erwartungen an das neue Material sind, dass in Folge der besseren Oxygenierung die Viabilität der in das Material einwachsenden Zellen sowie des angrenzenden Gewebes verbessert wird. Die Ergebnisse der *in vivo* und *in vitro* Experimente sollen die Grundlagen für eine spätere Anwendung am Menschen legen. Als Ziel soll ein biologischer Gewebeersatz entstehen, der Lichtexposition vorausgesetzt, eine neue Therapieoption für ischämische und hypoxische Gewebe sein könnte. Primär ist an die Anwendung als Hautersatz und insbesondere an die Behandlung von Problemwunden gedacht.

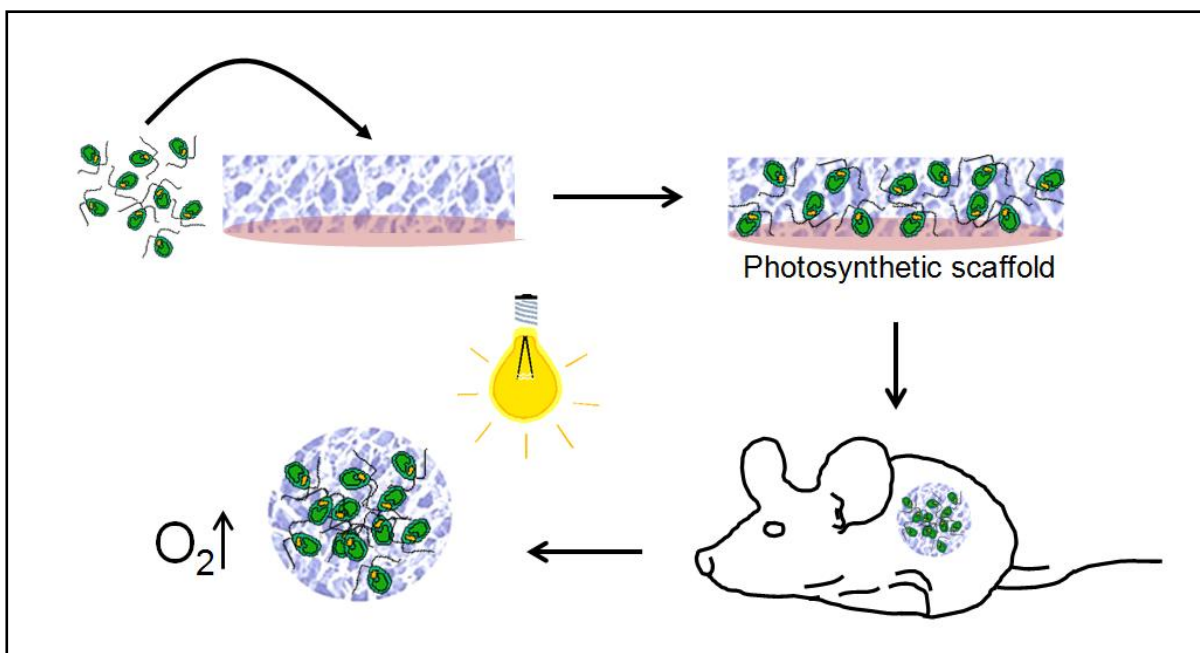


Abb. 2: Zielsetzung der Arbeit; Konzept der Bioaktivierung durch *Chlamydomonas reinhardtii*: Zielsetzung dieser Arbeit ist die Erstellung eines neuartigen Gewebeersatzmaterials durch die Implementierung der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* in handelsübliche Kollagenscaffolds. Dieser Gewebeersatz soll unter Lichtexposition mittels Photosynthese Sauerstoff produzieren und hiermit lokal und durchblutungsunabhängig das umliegende Gewebe und die in das Material einwachsenden Zellen versorgen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Der Organismus und die Kultivierung von *Chlamydomonas reinhardtii*:

Der verwendete Organismus *Chlamydomonas reinhardtii* ist eine weltweit im Süßwasser vorkommende Grünalge aus der Gattung *Chlamydomonas*. Die Alge ist ein kugelförmiger Einzeller von etwa 10 µm Durchmesser. In der vorliegenden Arbeit wurde der *Chlamydomonas reinhardtii* Mutant CW 15 verwendet, der sich durch das Fehlen der Zellwand auszeichnet. Die Algen wurden unserer Arbeitsgruppe vom Institut für Molekulare Pflanzenwissenschaften der Ludwig-Maximilians-Universität München, Planegg-Martinsried, Deutschland zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurde *Chlamydomonas reinhardtii* in TAPS Nährmedium (NH₄Cl, MgSO₄, CaCl₂, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, München, Deutschland) in Zellkulturinkubatoren bei 30 °C und 5 % CO₂ kultiviert (Gorman und Levine, 1965). Zählungen der Algen wurden durch elektronische Pulsflächenanalyse mittels Casy Counter TT (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Um die Algen mit ausreichend Licht zur Photosynthese zu versorgen, wurden sie einer Beleuchtung von 1.600 Lux Vollspektrumlicht ausgesetzt. Hierzu diente eine handelsübliche Aquarienlampe (Nano Light, 11 Watt, Dennerle, Vinningen, Deutschland), die in 40 cm Entfernung zu den Algen montiert wurde.

4.2 Kollagenscaffold für den dermalen Hautersatz:

Regenerative Ansätze zur Wiederherstellung der Gewebearchitektur zielen darauf ab, den Defekt durch körpereigene Zellen zu verschließen (Rahaman und Mao, 2005). Die Verwendung von dreidimensionalen Gerüsten als Leitstruktur für die gerichtete Proliferation und Migration von körpereigenen Zellen gilt als aussichtsreicher Ansatz des Tissue Engineerings (Hodgkinson und Bayat, 2011). Diese Gerüste, die auch Matrizen, Matrices, oder Scaffolds genannt werden, werden auch zur lokalen Applikation von Substanzen verwendet, die den regenerativen Prozess unterstützen sollen.

Für die Anwendung in dieser Arbeit wurde Integra™ Bilayer Matrix Wound Dressing (Integra® DRT, Integra Life Science Corporation, Plainsboro, NJ, USA) gewählt. Hierbei handelt es sich um ein bereits in Europa und in den USA (Food and Drug Administration, FDA) zugelassenes und in klinischer Anwendung befindliches dermales Hautersatzmaterial (Moiemen et al. 2006). Die Struktur entspricht einer porösen Matrix und besteht aus vernetztem, bovinem Kollagen und Glykosaminoglykanen (Machens et al. 2000). Das hier verwendete zweischichtige (bilayer) Produkt ist auf einer Seite mit einer semi-permeablen Silikonmembran beschichtet (Herstellerangabe; 02 /2013).

4.3 *In vitro* Evaluation der bioaktivierten Scaffolds:

4.3.1 Einsaat und Adhäsion von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold:

Um die Adhäsion von *Chlamydomonas reinhardtii* an den ausgewählten Kollagenscaffolds und die Verteilung der Algen im Material zu untersuchen, wurde *Chlamydomonas reinhardtii* in hoher Konzentration in die Scaffolds eingesät. Für die Einsaat wurden die feucht gelagerten Kollagenscaffolds zunächst durch Auspressen mit einer sterilen Kompresse (Gazin Mullkompressen 10 x 10 cm, Lohmann und Rauscher, Neuwied, Deutschland) getrocknet und dann mit der Silikonseite nach unten liegend gelagert. Anschließend wurden die Algen in ihrem TAPS-Nährmedium in einer Konzentration von 50×10^6 Algen/ml TAPS in 5 x 5 cm große Proben der Scaffolds mittels Pipette (Multipette plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingebracht und die Intensität und Verteilung der Grünfärbung beobachtet (s. Abb. 5).

4.3.2 Distribution von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold:

Für die klinische Anwendbarkeit eines durch Zelleinsaat bioaktivierten Scaffolds ist die Verteilung der Zellen innerhalb des Scaffolds ein wichtiger Erfolgsfaktor. Ziel ist es, mit der Einsaat auch innere Areale des Scaffolds zu erreichen.

Zur Untersuchung der räumlichen Verteilung und der Adhäsion der Algen wurde eine Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt (s. Abb. 6). Hierfür wurden 1×10^4 Algen

der Gattung *Chlamydomonas reinhardtii* auf 6 mm durchmessende, runde Scaffolds aufgebracht, welche zuvor durch Ausstanzen mit einer 6 mm Biopsiestanze (Acuderm® inc., Fort Lauderdale, FL, USA) hergestellt wurden. Anschließend wurden die Scaffolds für 4 Tage unter Lichtexposition inkubiert und nach Fixation durch 3 % Glutaraldehyd (Science Services, München, Deutschland) eine Dehydrierung durch aufsteigende Ethanollösungen durchgeführt (Ethanol \geq 99,8 %, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Nach Lufttrocknung erfolgte das Bedampfen mit 20 nm Gold (Sputter Coater Baltec, SCD 005; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland). Das Rasterelektronenmikroskop wurde mit einer Spannung von 5 kV gefahren (Hitachi, S-3500-N, Tokyo, Japan). (n = 3)

4.3.3 Biokompatibilität von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold:

Zum Nachweis der Biokompatibilität von *Chlamydomonas reinhardtii* mit dem Scaffold wurden die Algen in TAPS-Nährmedium auf 6 mm durchmessende, runde Proben der Scaffolds aufgebracht. Die Konzentration der Algen wurde vor der Einsaat so weit verdünnt, dass visuell noch keine Grünfärbung sichtbar war. Anschließend wurden die Scaffolds über 14 Tage unter permanenter Beleuchtung makroskopisch und mikroskopisch beobachtet und photographisch dokumentiert (s. Abb. 7). Hierbei wurde die Intensität der durch das Chlorophyll hervorgerufenen Grünfärbung als Rückschluss auf die Viabilität und die Proliferation von *Chlamydomonas reinhardtii* gewertet. (n = 3)

4.3.4 Sauerstoffproduktion durch bioaktivierte Scaffolds:

Der Nachweis der Sauerstoffproduktion durch die bioaktivierten Scaffolds als Maß für die Photosyntheseleistung erfolgte durch Messung der Sauerstoffpartialdrucke in den Scaffolds (s. Abb. 8). Hierfür wurde der SensorDish® Reader (SDR; PreSens GmbH, Regensburg, Deutschland) verwendet. Diese nicht invasive Sauerstoffmessung erfolgte in Echtzeit in speziellen 24er Mikrotitersensorplatten (OxoDish®; PreSens GmbH, Regensburg, Deutschland). Diese verfügen über Sauerstoffsensoren am Boden jedes Nöpfchens. Die Sensoren bestehen aus einem Lumineszenzfarbstoff, der nach Anregung durch den SensorDish® Reader ein vom Sauerstoffpartialdruck

abhängiges Signal zurückgibt (Beckers et al. 2009). Dieses wird von der Software des Geräts in den endgültigen prozentualen Sauerstoffpartialdruck transferiert.

Es wurden 10 mm durchmessende, runde Kollagenscaffolds erstellt (10 mm Biopsiestanze Acuderm[®] inc., Fort Lauderdale, FL, USA) und mit *Chlamydomonas reinhardtii* in einer Konzentration von $2,5 \times 10^7$ Algen/ml bioaktiviert. Vor der Messung der Sauerstoffpartialdrucke mit dem SensorDish[®] Reader wurden die bioaktivierten Kollagenscaffolds über 72 Stunden einer permanenter Lichtexposition ausgesetzt (s. oben). Während der Messungen des SensorDish[®] Readers wurde die Lichtquelle für wenige Sekunden abgeschaltet. Auf Grund eines Hinweises des zuständigen Tierschutzbeauftragten, die Photosyntheseleistung der bioaktivierten Kollagenscaffolds könnte im Tierversuch durch das Käfigmaterial (Tecniplast-IVC, Typ-I Superlong; Hohenpeißenberg, Deutschland) beeinträchtigt werden, wurde die Photosyntheseleistung auch bei Abschirmung der Lichtquelle durch das Käfigmaterial getestet. (n = 3; Kontrollgruppe in gleicher Größe)

4.4 *In vivo* Evaluation der bioaktivierten Scaffolds:

4.4.1 Ethische Rechtfertigung und Genehmigung des Tierversuchsvorhabens:

Gemäß den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes wurde erst nach Ausschöpfung aller Möglichkeiten der *in vitro* Experimente der Schritt zum *in vivo* Experiment getätigt. Für das Ziel des Versuchsvorhabens, die Entwicklung und Testung eines photosynthetisch aktiven dermalen Hautersatzes, wurde zuvor *in vitro* die Biokompatibilität, d.h. Adhärenz und Proliferationsfähigkeit von *Chlamydomonas reinhardtii* auf den Kollagenscaffolds sowie die Photosyntheseaktivität der Algen in den Kollagenscaffolds nachgewiesen. Nach Abschluss der *in vitro* Studien waren noch folgende Fragen offen:

1. Sind die photosynthetisch aktiven Kollagenscaffolds bei der Implantation in Vollhautdefekte von Nacktmäusen für diese klinisch verträglich?
2. Kann *Chlamydomonas reinhardtii* im implantierten Scaffold überleben?
3. Kommt es zur Bildung eines chimären Gewebes aus *Chlamydomonas reinhardtii* und den in das Scaffold einwachsenden Zellen der Maus?

4. Kommt es zu einer Immunantwort des Tieres auf das photosynthetisch aktivierte Scaffold?
5. Sind die Scaffolds nach Implantation weiterhin in der Lage *in vivo* Sauerstoff zu produzieren?

Für die Beantwortung dieser Fragestellungen war die Untersuchung der photosynthetisch aktiven Matrices im lebenden Organismus unabdinglich. Nur an lebenden Tieren kann die Auswirkung von *Chlamydomonas reinhardtii* auf das Allgemeinbefinden der Tiere, die Viabilität der Algen, die Interaktion der bioaktivierten Scaffolds mit dem umliegenden Gewebe, eine etwaige Immunreaktion untersucht werden und die Frage nach *in vivo* Sauerstoffproduktion durch Photosynthese beantwortet werden. Die Versuche sollen neben der Beantwortung der obengenannten Fragestellungen auch den Weg für eine spätere Verwendung von photosynthetisch aktivem dermalen Hautersatz beim Menschen vorbereiten.

Wegen der zu erwartenden Fortschritte und Verbesserungen im Bereich des dermalen Hautersatzes, nicht nur in der Plastischen Chirurgie, sondern auch in zahlreichen anderen Fachgebieten, stehen die Belastungen der Tiere in angemessenem Verhältnis zu dem erwarteten therapeutischen Erkenntnisgewinn. Die Versuche sind daher als ethisch vertretbar einzustufen.

Alle Versuchsprotokolle wurden in enger Zusammenarbeit mit dem Tierschutzbeauftragten und Leiter der zuständigen Tierversuchseinrichtung, Herrn Dr. med. Dr. med. vet. Thomas Brill, auf eine möglichst geringe Belastung für die Tiere ausgelegt. Jeder Schritt des Versuchsvorhabens wurde auf seine Belastungen für die Tiere untersucht und bewertet. Zusammenfassend stellen die Versuche eine mäßige Belastung für die Tiere dar. Um die Anzahl der verwendeten Tiere zu minimieren wurde beim Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München ein statistisches Gutachten zur Berechnung der Gruppengrößen in Auftrag gegeben (siehe Kap. 9.3). Das Versuchsvorhaben wurde bei der zuständigen Regierung von Oberbayern unter dem Titel „Entwicklung eines photosynthetisch aktiven dermalen Hautersatzes“ unter dem Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531-56-10 ordnungsgemäß beantragt und genehmigt (siehe Kap. 9.4).

Die Durchführung der Tierversuche sowie die Haltung der Tiere erfolgte am Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Ismaningerstr. 22 in 81675 München.

4.4.2 Vorbereitung der Scaffolds für *in vivo* Untersuchung:

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden die Algen, in folgenden Punkten abweichend vom oben beschriebenen *in vitro* Verfahren, auf die Kollagenscaffolds aufgebracht: Die runden Proben der Kollagenscaffolds wurden hierfür mit einer 12 mm Biopsiestanze (Acuderm® inc., Fort Lauderdale, FL, USA) ausgestanzt. Anders als in den *in vitro* Versuchen wurden die Algen nun enkapsuliert, um eine bessere Adhärenz an das Material zu erreichen sowie um eine mögliche Immunantwort des Empfängerorganismus zu minimieren (Hunt und Grover 2010). Hierfür wurden 50 µl des *Chlamydomonas reinhardtii* beinhaltenden TAPS-Nährmediums in einem 1:1 Verhältnis mit 50 µl Fibrin (Tissucol Duo S, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) gemischt und auf die Kollagenscaffolds pipettiert. Anschließend wurden 50 µl Thrombin (Tissucol Duo S, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) auf die Scaffolds pipettiert. Somit lag ein Gesamtvolumen von 150 µl des Gemisches von Fibrin, Thrombin, TAPS-Nährmedium inkl. Algen in den Scaffolds vor. Die maximale Flüssigkeitsaufnahme eines Kollagenscaffolds der verwendeten Größe war zuvor auf 160 µl bestimmt worden. Eine Stunde nach der Einsaat wurden die Scaffolds in das TAPS-Nährmedium gegeben. Die Endkonzentration von *Chlamydomonas reinhardtii* lag bei $2,5 \times 10^7$ Algen/ml. Vor der Implantation der bioaktivierten Scaffolds wurden diese über 72 Stunden bei Raumtemperatur und unter konstanter Beleuchtung beobachtet. Hierbei wurde die zunehmende Grünfärbung als Bestätigung für die Viabilität von *Chlamydomonas reinhardtii* in den Scaffolds beobachtet. Die Kollagenscaffolds der Kontrollgruppe wurden identisch vorbereitet, aber das TAPS-Nährmedium enthielt keine Algen.

4.4.3 Vollhautdefektmodell:

Für die *in vivo* Untersuchung der bioaktivierten Kollagenscaffolds wurde ein Vollhautdefektmodell gewählt (Egaña et al. 2009). Der Vollhautdefekt umfasste alle

Hautschichten inklusive Subkutis, so dass die Muskelfaszie frei lag. Dieser Defekt wurde durch das zu untersuchende Hautersatzmaterial ersetzt (s. Abb. 3). Neben der klinischen Verträglichkeit und der lokalen Wundsituation kann das nach Versuchsabschluss explantierte Hautersatzmaterial hinsichtlich Vaskularisation sowie histologisch und immunhistochemisch untersucht werden. Bei den Mitarbeitern der Forschungsgruppe liegt eine langjährige und ausreichende Erfahrung mit dem Tiermodell vor (Egaña et al. 2009a), (Egaña et al. 2009b). Das Setzen des Vollhautdefekts und die Implantation der Hautersatzmaterialien finden unter Vollnarkose statt und sind somit ohne große Belastungen für die Tiere durchzuführen. Da beim Setzen der Vollhautdefekte unter Narkose die sensiblen Nervenfasern der Haut durchtrennt werden, ist der entstandene Defekt asensibel. Die vom Gesetzgeber vorgeschriebene Einstufung der Schmerzen wurde anhand der „Orientierungshilfe des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter zur Einstufung in Belastungsgrade für genehmigungspflichtige Tierversuche“ (Thiel, 2004) durchgeführt. Das Setzen von Vollhautdefekten ist hierin nicht abgebildet, entspricht anatomisch und operationstechnisch aber einer Hautbiopsie, welche in Anlage 1.6.7. der oben genannten Orientierungshilfe als geringe Belastung beschrieben wird. Bei vergleichbaren Eingriffen am Menschen, wo Vollhautdefekte beispielsweise bei der Entfernung von Hauttumoren gesetzt und mit temporärem künstlichen Hautersatz gedeckt werden, bekommen die Patienten i.d.R. während der Operation eine Lokalanästhesie und ggf. eine geringe Schmerzmedikation am Operationstag. In den Folgetagen ist keine Schmerzmedikation notwendig. Die Hautersatzmaterialien und das Verbandsmaterial werden von den Tieren sehr gut vertragen und nur in seltenen Fällen wird in diesem Modell ein Lecken, Nagen oder Kratzen am Fremdkörper beobachtet.

4.4.4 Verwendete Tierart:

Für die Versuche wurden ausschließlich weibliche Nacktmäuse (Nu/Nu) in einem Alter von ca. 6 - 8 Wochen und einem Gewicht von 22 - 25 g verwendet (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Mäuse sind die kleinstmögliche Tierart, die zum Menschen vergleichbare anatomische Voraussetzungen bietet und für die Operation ausreichend groß dimensioniert ist.

Wegen der Möglichkeit einer Immunreaktion des Empfängerorganismus auf *Chlamydomonas reinhardtii*, fiel die Wahl auf Nacktmäuse, da diese immundefizient sind. Nacktmäuse sind eine Mutation der Hausmaus, die durch Thymusaplasie und fehlende Körperbehaarung gekennzeichnet ist (s. Abb. 4). Durch den fehlenden Thymus liegt eine stark verringerte Anzahl an T-Lymphozyten vor, so dass diese Tiere ein stark eingeschränktes Immunsystem aufweisen, wodurch sie als Transplantatempfänger besonders geeignet sind. Durch die fehlende Körperbehaarung kann eine direkte Lichtexposition auf die photosynthetisch aktiven Scaffolds erfolgen. In der Erprobung von Hautersatzmaterialien und insbesondere bei der Untersuchung der Neovaskularisation ist die Verwendung von Nacktmäusen ein weit verbreitetes und standardisiertes Verfahren und bietet exzellente Vergleichsmöglichkeiten (Egaña et al. 2009). Die Verwendung eines etablierten Standardmodells dient nicht zuletzt auch der Reduzierung der Versuchstieranzahl. Wegen der geringeren Rate an Immunreaktionen gegen das Implantat ist die Durchführung der Experimente mit einer geringeren Anzahl an Tieren möglich.

4.4.5 Haltung der Tiere:

Die Haltung der Tiere erfolgt in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen. Die Empfehlungen der „Federation European Laboratory Animal Science Association“ (FELASA) zum Hygienemanagement werden eingehalten und regelmäßige Untersuchungen von Sentinel-Tieren durchgeführt. Die Pflege der Tiere wurde durch ausgebildete Versuchstierpfleger gewährleistet. Die als Tierhaltungsräume konzipierten Räume der Einrichtung verfügen über eine Vollklimatisierung, Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase und eine personenlimitierte Zutrittskontrolle. Eine Klimaanlage sorgt für die Einhaltung einer Raumtemperatur von 22 - 23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 - 70 %.

Präoperativ wurden die Tiere in speziellen, einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Mäusen mit einer Grundfläche von 16 x 37 cm (Tecniplast-IVC, Typ- I Superlong; Hohenpeißenberg, Deutschland) in Gruppen von 4 bis 6 Mäusen gehalten. Postoperativ wurden die Tiere einzeln gehalten um ein gegenseitiges manipulieren am Kollagenscaffold sowie der Verbandsanordnung zu vermeiden. Die Tiere erhielten zu jedem Zeitpunkt freien Zugang zu autoklaviertem Mäusefutter (Altromin,

Lage, Deutschland) und autoklaviertem Trinkwasser. Ein für die Mäusehaltung spezifisches Holzgranulat diente als Einstreu und wurde mindestens einmal wöchentlich gewechselt.

4.4.6 Setzen der Vollhautdefekte und Implantation:

Vor den operativen Eingriffen erfolgte die Untersuchung und Dokumentation des Gesundheitszustands und des Gewichts der Tiere. Es wurden ausschließlich gesunde Tiere für die Versuche verwendet.

Das Setzen der Vollhautdefekte und die Implantation der bioaktivierten Kollagenscaffolds erfolgten in inhalativer Allgemeinanästhesie. Hierdurch wurde gewährleistet, dass die Schmerzen der Tiere auf ein Minimum reduziert und die Belastung der Tiere gering gehalten wurde.

30 Minuten vor dem Einleiten der Narkose wurde eine präemptive Analgesie der Tiere mit einmaliger Gabe von 0,05 bis 0,1 mg/kg Buprenorphin s.c. (Temgesic[®], Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Die Narkose wurde in einer Ganzkörperkammer mit Isofluran 3,5 % als Inhalationsnarkose eingeleitet und anschließend in einer Kopfkammer mit Isofluran 2,5 % weitergeführt (Isoflurane, Baxter Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland). Vor der Hautinzision wurde die Narkose auf ausreichende Tiefe hin überprüft und ggf. korrigiert. Um ein Absinken der Körpertemperatur zu vermeiden, wurden die Versuchstiere während der Operation auf einer Wärmematte in Bauchlage gelagert und zusätzlich von oben mittels einer UV-Wärmelampe gewärmt. Eine subkutane Injektion von 0,5 ml physiologischer NaCl Lösung wurde appliziert, um einer Exsikkose der Tiere vorzubeugen. Vor dem Eingriff erfolgte eine sorgfältige Desinfektion (Kodan[®] Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) und sterile Abdeckung des zu operierenden Areals. Die gesamte Operation erfolgte unter aseptischen Operationsbedingungen.

Nach Abschluss der Operationsvorbereitungen wurden am Rücken der Tiere bilateral, mit einer 10 mm Biopsiestanze (Acuderm[®] inc., Fort Lauderdale, FL, USA) zwei runde Vollhautdefekte gesetzt. Die Größeninkongruenz zu den 12 mm großen

Kollagenscaffolds wurde bewusst gewählt, da nach Setzen des Vollhautdefektes sich dieser durch die Elastizität des Gewebes um einige Millimeter vergrößert.

Zur Vermeidung von Artefakten beim späteren Entfernen der Matrices wurden vor dem Einbringen der bioaktivierten Kollagenscaffolds titanisierte Kunststoffnetze (TIMESH[®], PFM Medical AG, Köln, Deutschland) eingelegt. Diese Netze haben nur im Experiment, nicht aber in einer späteren klinischen Anwendung, eine Funktion. Nach Explantation erleichtern sie die Entfernung des Scaffolds und ermöglichen ein einfacheres Abgrenzen zwischen ursprünglichem Wundgrund und dem Scaffold.

Anschließend wurden die vorbereiteten, photosynthetischen Scaffolds in den Defekt eingebracht wobei darauf geachtet wurde, dass die Silikonseite nach außen orientiert war. Die Scaffolds wurden durch vier bis sechs Einzelknopfnähte mit einem 5-0 Ethilonfaden (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) am umliegenden Wundrand fixiert (s. Abb. 3). Anschließend wurde eine transparente Verbandsfolie (V.A.C.[®] Drape, KCI Medical Products, Wimborne Dorset, UK) ebenfalls durch Einzelknopfnähte so fixiert, dass sie beide Implantate bedeckte. Nach Ausleiten der Narkose wurden die Tiere noch bis zum vollständigen Erwachen und der ersten Nahrungsaufnahme gewärmt und dann in ihre Käfige zurückgesetzt.

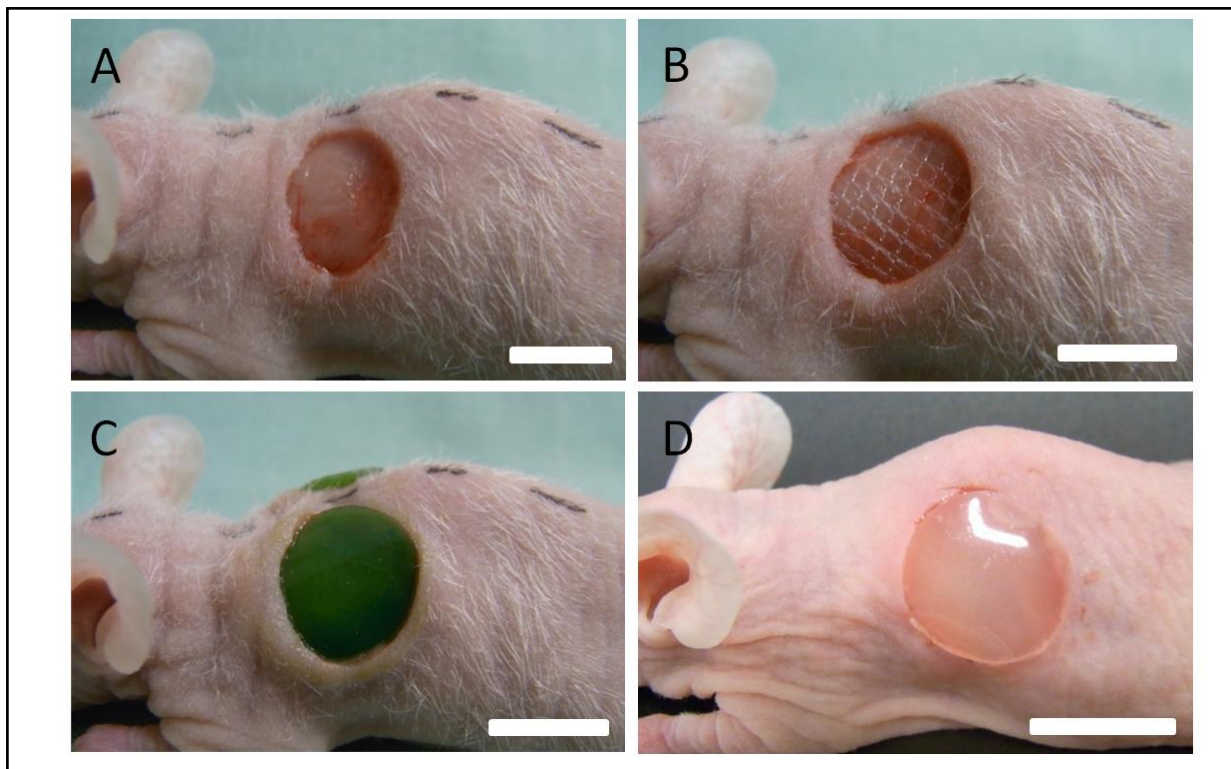


Abb. 3: Setzen der Vollhautdefekte und Implantation der Scaffolds:

Bilaterale Vollhautdefekte wurden unter Allgemeinanästhesie auf dem Rücken von Nacktmäusen gesetzt (A). Anschließend wurde ein titanisiertes Gitter eingesetzt um nach Explantation besser zwischen Wundgrund und Scaffold unterscheiden zu können (B). Die photosynthetisch aktiven Kollagenscaffolds wurden, mit der Silikonschicht nach außen zeigend, in die Defekte eingebracht (C). Analog wurden die Kontrollcaffolds in die Defekte eingebracht (D). Der abgebildete Maßstab gibt eine Länge von ca. 1 cm an.

4.4.7 Postoperative Haltung der Tiere:

Nach der Operation wurden die Tiere in Einzelhaltung gehalten. Nestbaumaterial und eine Mäusehütte wurde den Tieren nicht zur Verfügung gestellt, um die permanente Beleuchtung der Scaffolds über 12 Stunden täglich zu gewährleisten.

Postoperativ erfolgte analog zu den *in vitro* Versuchen eine Lichtexposition der Kollagenscaffolds. Hierfür wurden zwei handelsübliche Lampen für den Aquarienbedarf, auf den Käfigen montiert. Auf Anraten des zuständigen Tierschutzbeauftragten wurde zur Stressvermeidung der Tiere die Beleuchtung auf 12 Stunden pro Tag begrenzt. Die Leuchtstärke der verwendeten Lampen beträgt 11 Watt bzw. 900 Lumen. Bei dem Abstrahlwinkel von 170° und Abstand von 25 cm zu den Tieren entspricht dies etwa 35 Lux. Dies ist vergleichbar mit hellem Raumlicht und somit als geringe Belastung zu bewerten.

4.4.8 Klinische Verlaufskontrolle am Tiermodell:

Zur Evaluierung des Allgemeinzustandes und zur Beurteilung und Behandlung von Schmerzen wurden mehrmals täglich Kontrollen durch die Tierpflegerinnen und den Operateur (Thilo Schenck) durchgeführt. Bei den täglich durchgeführten Wundkontrollen wurden der adäquate Sitz des Verbandes und der Feuchtigkeitsgehalt der implantierten Hautersatzmaterialien untersucht (s. Abb. 9).

Anhand eines Belastungs-Score-Sheets (siehe Tabelle 1) wurden die Schmerzen beurteilt und über die Verabreichung von Analgetika entschieden. Gleichzeitig wurde an Hand von definierten Abbruchkriterien täglich über die Fortführung der Experimente entschieden. Während der ersten 24 Stunden nach der Operation

erhielten die Tiere alle 8 Stunden 0,05 bis 0,1 mg/kg Buprenorphin s.c.. Weitere Gaben von Buprenorphin sowie der zusätzlichen Bedarfsmedikation von 50 mg/kg KG Metamizol Tropfen p.o. (Novaminsulfon-Ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) wurden bei Anzeichen von Schmerzen vorgesehen, aber nur sehr selten verwendet.

Bei den regelmäßigen Untersuchungen wurden die Parameter Bewegung und Laufverhalten, Nahrungsverweigerung, Körpergewicht und Beschaffenheit der Exkreme sowie Verhaltensänderungen wie verminderte motorische und soziale Aktivität und Anzeichen von Aggression als allgemeine Anzeichen für Belastung der Tiere herangezogen. Als versuchsspezifische Parameter wurde auf das Auftreten von Infektionen, Blutungen und anderen möglichen postoperativen Komplikationen des operierten Areals sowie Toleranz der Tiere gegenüber dem Verband und der Wunde geachtet. Diese Parameter wurden in ein Belastungs-Score-Sheet integriert. Für die einzelnen Parameter wurden in diesem Sheet Punkte vergeben und aufsummiert. Ab einer Punktschme von 15 Punkten war eine vorzeitige Beendigung des Versuches durch Euthanasie geplant (s. Tab. 1).

Die Euthanasie der Tiere erfolgte am Ende der Beobachtungsdauer durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (Narcoren[®], Fa. Merial, Hallbergmoos, 150 mg/kg KG) in Überdosierung. Anschließend erfolgte die Explantation der Hautersatzmaterialien und der umliegenden Rückenhaut.

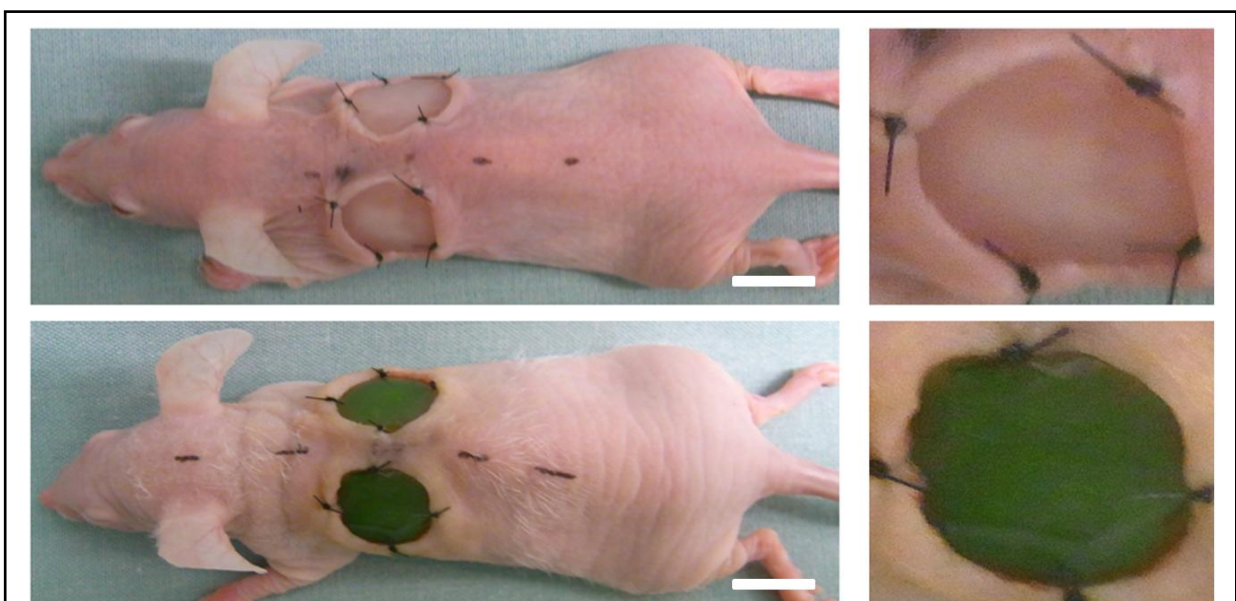


Abb. 4: Verwendete Tierart und Operation:

Für die Untersuchungen am Vollhautdefekt wurden 6 - 8 Wochen alte, weibliche Nacktmäuse (Nu/Nu) mit einem Gewicht von 22 - 25 g verwendet. Die auf Grund der Thymusaplasie immundefizienten Tiere sind ein Standardmodell zur Erprobung von Hautersatzmaterialien. Auf Grund der fehlenden Körperbehaarung eignen sie sich besonders zur direkten Lichtexposition der Algen. Die Operationen erfolgten unter aseptischen Operationsbedingungen in inhalativer Allgemeinanästhesie. Die Euthanasie der Tiere erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 4, 5 und 7 Tage) durch eine intraperitoneale Injektion einer Überdosis Pentobarbital. Der abgebildete Maßstab gibt eine Länge von ca. 1 cm an.

Allgemeine Kriterien:	0 Punkte	3 Punkte	15 Punkte
Bewegung und Laufverhalten	laufen munter	leicht träge	total schlapp
Körpergewicht	Gewichtsabnahme bis 5 %	bis 10 %	über 10 %
Beschaffenheit der Exkremente	fest	ungeformt	flüssig
Nahrungsaufnahme	normal	reduziert	keine
Abwehrverhalten beim Berühren	normal	leicht nervös	aggressiv und gereizt
Versuchsspezifische Kriterien:			
Infektion	reizlose Wunde	Rötung an den Wundrändern	deutliche Wundinfektion
Blutung	keine Blutung	Verband leicht blutig tingiert	Verband blutgetränkt
Toleranz gegenüber Verband und Wunde	Tier ignoriert den Verband	Geringfügige Verletzung bei Abwehr gegen Verband	Automutilation

Tab. 1: Klinische Verlaufskontrolle am Tiermodell / Belastungs-Score-Sheets:

Bei den täglichen Untersuchungen der Tiere wurde deren Belastung mit Hilfe eines Belastungs-Score-Sheets beurteilt und über analgetische Behandlung und Versuchsabbruch entschieden.

4.4.9 Viabilität von *Chlamydomonas reinhardtii* im implantierten Scaffold:

Zur Beantwortung der Frage, ob *Chlamydomonas reinhardtii* in den Kollagenscaffolds nach Implantation überleben kann, wurde ein Nachweis algenspezifischer Messenger RNA herangezogen. Photosynthetisch aktivierte Kollagenscaffolds sowie Kontrollcaffolds ohne Algen wurden in bilaterale Vollhautdefekte von Nacktmäusen implantiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere euthanasiert, die Scaffolds entfernt und eine RT-PCR Analyse durchgeführt. Hierbei erfolgte die Untersuchung auf die mRNA, die für psbD kodiert, eine Proteinuntereinheit des Photosystems von *Chlamydomonas reinhardtii* (s. Abb. 10). Nach Euthanasie und Explantation der Scaffolds wurden diese bis zur Untersuchung bei -80 °C in RNAlater (Qiagen, Hilden, Deutschland) konserviert. Die Isolation der RNA wurde mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ durchgeführt (Roche Applied Science GmbH, Mannheim, Deutschland). Zur Bestimmung der Expression von psbD mittels RT-PCR wurde der „Transcriptor One Step RT-PCR Kit“ verwendet. (Roche Applied Science GmbH, Mannheim, Deutschland). Die Primersequenz für psbD war: 5'-GCC GTA GGG TTG AAT G-3' und 5'-GTT GGT GTC AAC TTG GTG G-3'. Als konstitutiv exprimiertes Gen wurde das Gen für β -Aktin verwendet: 5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3' und 5'-TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG-3'. (Pro Zeitpunkt: n = 3; 3 Tiere à 1 Scaffold; Kontrollgruppe in gleicher Größe)

4.4.10 Histologische Untersuchung nach Explantation des bioaktivierten Scaffolds:

Anhand der histologischen Untersuchung sollte die räumliche Interaktion von *Chlamydomonas reinhardtii* und den in das Scaffold einwachsenden Zellen der Maus beurteilt werden. Hierfür wurden photosynthetisch aktivierte Kollagenscaffolds und Kontrollcaffolds in Vollhautdefekte am Rücken von Nacktmäusen implantiert. Nach fünf Tagen erfolgten die Euthanasie der Tiere und die Explantation der Scaffolds.

Die explantierten Scaffolds wurden über 24 Stunden bei 4 °C mit 3,7 % Formaldehyd fixiert (Science Services, München, Deutschland). Anschließend wurden die Proben in Tissue Tek Einbettmedium (Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande) schockgefroren. Es wurden Schnitte von 20 μ m Breite hergestellt und die Zellkerne mittels DAPI-Prolong-Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gemäß den Angaben des Herstellers eingefärbt. Auf eine algenspezifische Färbung wurde wegen der

Autofluoreszenz des Chlorophylls verzichtet. Die fertigen Schnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop photographiert (s. Abb. 11), (Axio Observer, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) und mit der Bildbearbeitungssoftware Axiovision bearbeitet und analysiert (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). (n = 6; 3 Tiere x 2 Scaffolds; Kontrollgruppe in gleicher Größe)

4.4.11 Immunantwort auf das bioaktivierte Scaffold:

Zur Untersuchung einer etwaigen Immunantwort der Nacktmaus auf die implantierten photosynthetischen Scaffolds wurden photosynthetisch aktivierte Kollagenscaffolds und Kontrollcaffolds in Vollhautdefekte am Rücken der Mäuse implantiert. Die Euthanasie und Explantation erfolgte am fünften postoperativen Tag. Die Proben wurden nach der Explantation in flüssigem Stickstoff gelagert und der „Mouse Cytokine Array Panel A“ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt (s. Abb. 12). Dieser antikörperbasierte Proteinsuchtest ermöglicht die gleichzeitige Messung von 40 Cytokinen, Chemokinen und Akut-Phase Proteinen, die im Rahmen der Immunantwort aktiv sind. (n = 3; 3 Tiere à 1 Scaffold; Kontrollgruppe in gleicher Größe)

4.4.12 Sauerstoffproduktion des bioaktivierten Scaffolds *in vivo*:

Photosynthetisch aktivierte Kollagenscaffolds und Kontrollcaffolds ohne Algen wurden zur Implantation in bilaterale Vollhautdefekte von Nacktmäusen vorbereitet. Abweichend zu obenstehender Vorbereitung der Scaffolds erfolgte die Einsaat am Vortag der Operation mit 150 µl TAPS-Nährlösung und einer Konzentration von 18×10^6 Algen / ml in Scaffolds von 12 mm Durchmesser. Die Euthanasie der Tiere und die Explantation erfolgten am siebten postoperativen Tag.

Zum Nachweis der Sauerstoffproduktion der Algen nach Explantation wurden die Scaffolds analog zu den oben beschriebenen *in vitro* Versuchen einer nicht invasiven Echtzeit- Sauerstoffmessung mittels SensorDish® Reader (SDR; PreSens GmbH, Regensburg, Deutschland) und Mikrotitersensorplatten (OxoDish®; PreSens GmbH, Regensburg, Deutschland) unterzogen (s. Abb. 13). Während der Messungen waren die explantierten Scaffolds einer permanenten Lichtexposition ausgesetzt, die nur

während der Messung des SensorDish[®] Readers für wenige Sekunden abgeschaltet wurde. Als Messwerte der Sauerstoffpartialdrucke wurden die Werte herangezogen, die nach Einpendeln der Werte auf ein stabiles Niveau vorlagen. (n = 8, 4 Tiere x 2 Scaffolds; Kontrollgruppe gleicher Größe)

4.4.13 Statistische Auswertung:

Die statistische Analyse erfolgte rechnergestützt durch GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (standard error of the mean, SEM) angegeben. Alle Versuche wurden mindestens in dreifacher Wiederholung durchgeführt. Es wurden zweiseitige Studentsche t-Tests durchgeführt. Als signifikant wurden Ergebnisse mit $p < 0,05$ und als hoch signifikant Ergebnisse mit $p < 0,01$ gewertet. Signifikante Ergebnisse sind durch „*“ und hoch signifikante Ergebnisse durch „***“ dargestellt.

5 ERGEBNISSE

5.1 *In vitro* Ergebnisse:

5.1.1 Einsaat und Adhäsion von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold:

Bei Einsaat von *Chlamydomonas reinhardtii* in hohen Konzentrationen von 50×10^6 Algen/ml TAPS zeigte sich bereits initial eine intensive und homogene Grünfärbung der Scaffolds (s. Abb. 5). Beim Wechsel der Scaffolds zwischen den mit TAPS-Nährlösung gefüllten Behältern zeigte sich jedoch ein „Auswaschen“ der Grünfärbung.

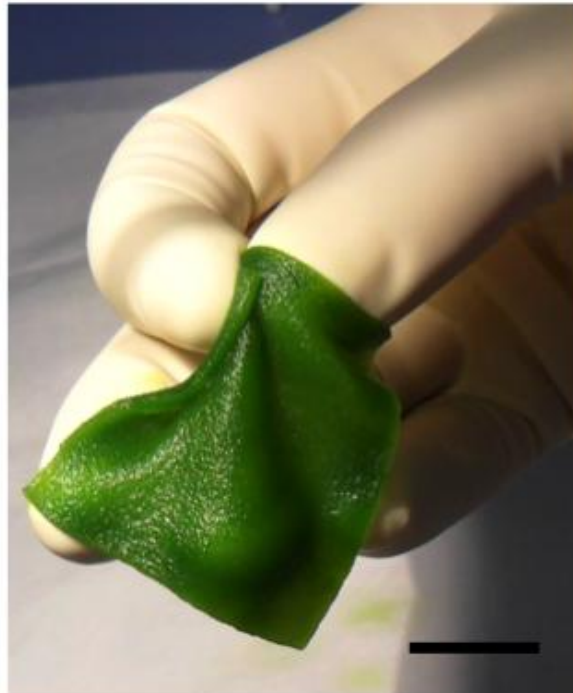


Abb. 5: Einsaat und Adhäsion von Chlamydomonas reinhardtii im Scaffold:

Nach Einsaat von Chlamydomonas reinhardtii in hohen Konzentrationen von 50×10^6 Algen/ml TAPS zeigte sich bereits initial eine intensive und homogene Grünfärbung der Kollagenscaffolds, die sich jedoch auswaschen lies. Der abgebildete Maßstab gibt eine Länge von ca. 1,5 cm an.

5.1.2 Distribution von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold:

Zur Beurteilung der räumlichen Verteilung von *Chlamydomonas reinhardtii* innerhalb der Kollagenscaffolds wurden 1×10^4 Algen auf 6 mm durchmessende, runde Scaffolds aufgebracht und nach 4 Tagen eine Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt.

Es konnten auch in den innersten Hohlräumen Algen nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich, dass die einzeln und in Gruppen sichtbaren Algen keine Adhärenz zum Material aufwiesen (s. Abb. 6). Insgesamt zeigte sich eine homogene Besiedelung des gesamten Kollagenscaffolds. Zur Verdeutlichung der Darstellung wurden die Algen in den Abbildungen durch Verwendung eines Bildbearbeitungsprogramms (Adobe Photoshop CS5, Adobe Systems, San Jose, CA, USA) grün eingefärbt. (n = 3)

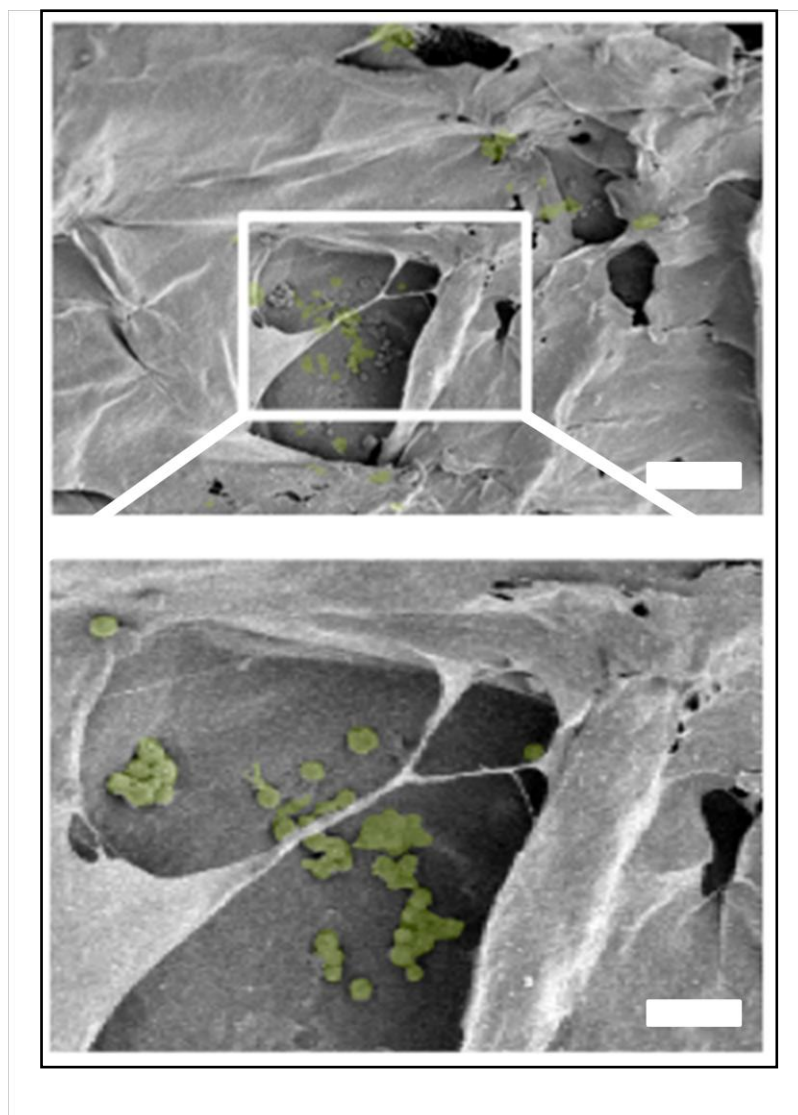


Abb. 6: Distribution von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold:

1×10^4 Algen der Gattung *Chlamydomonas reinhardtii* wurden auf 6 mm durchmessende, runde Scaffolds gesät und nach 4 Tagen Lichtexposition die Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt. Es zeigte sich eine homogene Verteilung der Algen im Kollagenscaffold, die sich bis in die innersten Hohlräume fortsetzte. Der abgebildete Maßstab gibt eine Länge von 200 μm (oben) und 50 μm (unten) an. ($n = 3$)

5.1.3 Biokompatibilität von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold:

Nach Einsaat von *Chlamydomonas reinhardtii* in geringen Konzentrationen wurde die Grünfärbung als Maß der Viabilität und Proliferation über 14 Tage unter Lichtexposition beobachtet (s. Abb. 7). Makroskopisch konnte eine zunehmende Intensität der Grünfärbung beobachtet werden. Auch mikroskopisch zeigte sich eine zunehmende Dichte der Algen, wodurch Rückschlüsse auf die Viabilität der Algen möglich sind. ($n = 3$)

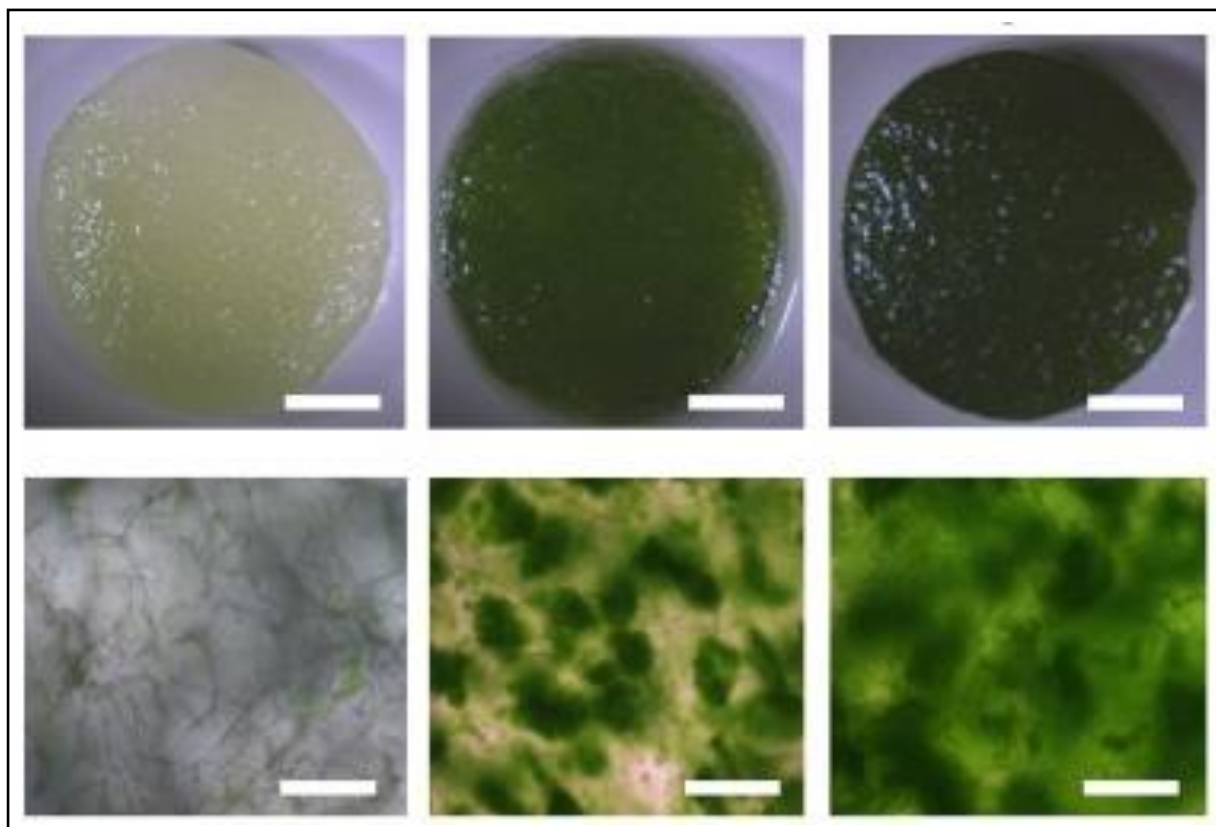


Abb. 7: Biokompatibilität von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold:

Bei Einsaat von *Chlamydomonas reinhardtii* in einer Konzentration die noch keine Grünfärbung aufweist, kann die im Verlauf zunehmende Grünfärbung als Indikator für die Viabilität und Proliferation der Algen in den Scaffolds herangezogen werden. Im zeitlichen Verlauf (von links

nach rechts: Tag 1, 7, und 14) zeigt sich eine zunehmende Grünfärbung, weshalb die Einsaat als erfolgreich bewertet wird und von einer zunehmenden Anzahl von Chlorophyll und somit Algen ausgegangen werden kann. Hieraus kann auf eine Biokompatibilität der Algen mit dem Material geschlossen werden. Der abgebildete Maßstab gibt in der oberen Reihe eine Länge von 2 mm, in der unteren Reihe eine Länge von 500 μm an. ($n = 3$)

5.1.4 Sauerstoffproduktion durch bioaktivierte Scaffolds:

Die für die Implantation hergestellten bioaktivierten Kollagenscaffolds mit dem Gemisch von Fibrin, Thrombin, TAPS-Nährmedium und Algen ($2,5 \times 10^7$ Algen/ml) wurden nach konstanter Beleuchtung über 72 Stunden auf ihre Sauerstoffproduktion hin untersucht. Hierfür wurden mit dem SensorDish[®] Reader die prozentualen Sauerstoffpartialdrucke in den Scaffolds gemessen (s. Abb. 8).

Die prozentualen Sauerstoffpartialdrucke in den Kontrollcaffolds betragen $21,2 \% \pm 0,4 \%$ (Mean \pm SEM). Die prozentualen Sauerstoffpartialdrucke in den photosynthetisch aktiven Scaffolds waren mit $51,5 \% \pm 0,8 \%$ (Mean \pm SEM) mit hoher Signifikanz höher als die der Kontrollcaffolds. Einer der Messwerte der photosynthetisch aktiven Scaffolds überstieg die Nachweisgrenze von 52,3 % und wurde daher in der statistischen Auswertung mit 52,3 % gewertet. Die Photosyntheseleistung bei Abschirmung der Lichtquelle durch das transparente Käfigmaterial wich nicht von der Photosyntheseleistung ohne Abschirmung ab. ($n = 3$, $p < 0,01$)

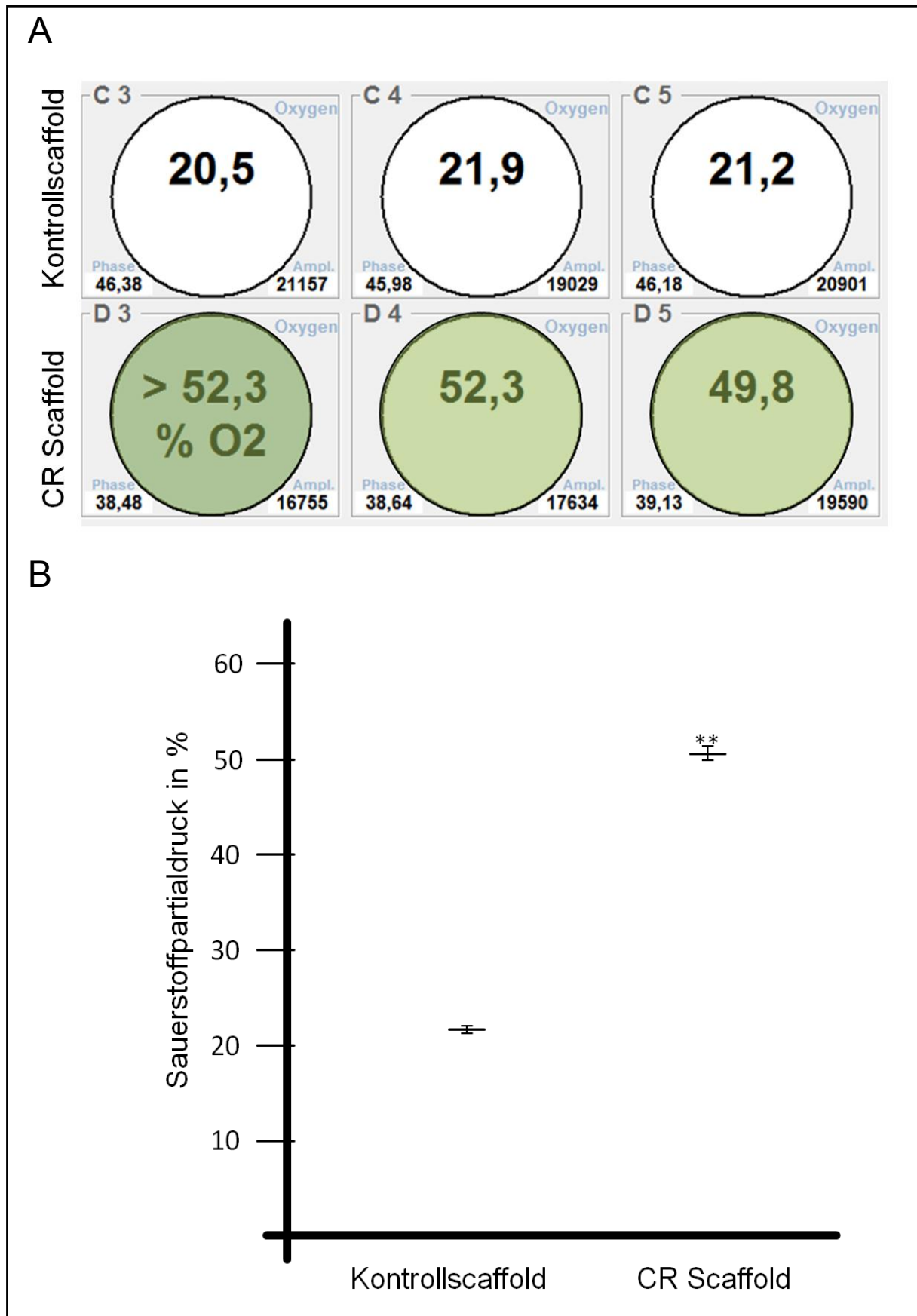


Abb. 8: Sauerstoffproduktion durch bioaktivierte Scaffolds:

*10 mm runde Kollagenscaffolds wurden mit Chlamydomonas reinhardtii in einer Konzentration von $2,5 \times 10^7$ Algen/ml bioaktiviert. 72 h später erfolgte die Messung der Sauerstoffpartialdrucke durch den SensorDish® Reader. Während die Kontrollcaffolds (A, obere Reihe) Partialdrucke ähnlich der atmosphärischen Sauerstoffpartialdrucke aufwiesen, zeigten sich in den bioaktivierten Kollagenscaffolds (A, untere Reihe) mehr als doppelt so hohe und Sauerstoffpartialdrucke (A). Einer der Werte des bioaktivierten Scaffolds lag oberhalb der Detektionsgrenze des SensorDish® Readers und wurde als 52,3 % gewertet (links, unten). Die prozentualen Sauerstoffpartialdrucke betragen $21,2 \% \pm 0,4 \%$ in den Kontrollcaffolds sowie $51,5 \% \pm 0,8 \%$ in den photosynthetisch aktiven Scaffolds (B). Der hoch signifikante Unterschied der Sauerstoffpartialdrucke lässt auf eine aktive Photosynthese der Scaffolds schließen. CR Scaffold = Chlamydomonas reinhardtii besiedeltes Scaffold. ($n = 3$, ** = hochsignifikant im Sinne von $p < 0,01$; Angaben als Mean \pm SEM).*

5.2 In vivo Ergebnisse:

5.2.1 Klinische Verlaufskontrolle:

Mit einer Ausnahme verliefen alle Operationen erfolgreich. Ein Tier der Kontrollgruppe verstarb beim Ausleiten der Narkose vermutlich an Hypothermie-induziertem Herz-Kreislauf-Versagen. Ein Zusammenhang mit den getesteten Materialien war nicht abzuleiten. Alle weiteren Operationen verliefen komplikationslos.

Der postoperative Verlauf gestaltete sich ebenfalls unauffällig. Bei den täglichen Untersuchungen der Tiere wurden weder in der Gruppe der Nacktmäuse mit den photosynthetisch aktiven Scaffolds noch in der Kontrollgruppe Auswirkungen auf den Allgemeinzustand und das Gewicht der Tiere festgestellt. Nahrungsaufnahme und Beschaffenheit der Exkreme waren stets unauffällig. Änderungen des Bewegungs- und Laufverhalten sowie Verhaltensänderungen wie verminderte motorische und soziale Aktivität wurden nicht beobachtet. Es traten keine Anzeichen von Aggression oder atypischem Abwehrverhalten beim Berühren auf.

Im Bereich der implantierten Scaffolds kam es weder zu Nachblutungen, Infektionen noch zu anderen Komplikationen (s. Abb. 9). Das Hautersatzmaterial und die Verbandsanordnung wurden von den Tieren gut toleriert und es wurden keine

intensiven Abwehrreaktionen wie z.B. Kratzen beobachtet. Ab dem ersten Tag nach der Operation wurden bei den Tieren keine Anzeichen auf Schmerzen festgestellt. Analgetische Maßnahmen wurden daher nur in geringer Dosierung aus Gründen der Schmerzantizipation fortgeführt.

In den täglich geführten Belastungs-Score-Sheets traten keine Summenscores von über 3 Punkten auf. Die Abbruchkriterien wurden nie erfüllt, so dass keines der Versuchstiere auf Grund der Belastungssituation vorzeitig euthanasiert werden musste. (n = 16)



Abb. 9: Klinische Verlaufskontrolle am Tiermodell:

Repräsentatives Foto eines in einen Vollhautdefekt einer Nacktmaus implantierten photosynthetisch aktiven Kollagenscaffolds. Die Abbildung zeigt den Wundzustand zum Zeitpunkt der Explantation am fünften postoperativen Tag. In der postoperativen Beobachtungsphase wurden bei den Tieren täglich die Parameter Bewegung, Laufverhalten, Nahrungsverweigerung, Körpergewicht, Beschaffenheit der Exkrememente sowie Verhaltensänderungen in einem Belastungs-Score-Sheet erfasst, auf dessen Grundlage die Entscheidung zu analgetischer Behandlung und Versuchsabbruch gefällt wurde. Diese Parameter waren stets unauffällig. Zudem wurden keine Nachblutungen, Infektionen oder andere Komplikationen beobachtet. Hautersatzmaterial und Verbandsanordnung wurden gut toleriert und es wurden keine intensiven Abwehrreaktionen beobachtet. Die Abbruchkriterien wurden bei keinem der Tiere erfüllt. (n = 16)

5.2.2 Viabilität von *Chlamydomonas reinhardtii* im implantierten Scaffold:

Bioaktivierte photosynthetisch aktive Kollagenscaffolds und Kontrollcaffolds wurden in Vollhautdefekten an der Nacktmaus eingesetzt und nach 0, 3, 4 und 5 Tagen

explantiert. Zum Nachweis der Vitalität von *Chlamydomonas reinhardtii* im implantierten Scaffold wurde eine RT-PCR Analyse auf die *Chlamydomonas reinhardtii* spezifische mRNA für das Protein psbD durchgeführt.

Es zeigt sich, dass psbD in den photosynthetisch aktivierten Scaffolds vier Tage nach der Implantation nachweisbar ist, wohingegen in der Kontrollgruppe der Nachweis negativ ausfällt (s. Abb. 10). Im zeitlichen Verlauf über fünf Tage zeigt sich in der semiquantitativen Analyse ein Abfall der Intensität des anfangs sehr starken Signals. (Pro Zeitpunkt: n = 3; 3 Tiere à 1 Scaffold; Kontrollgruppe in gleicher Größe)

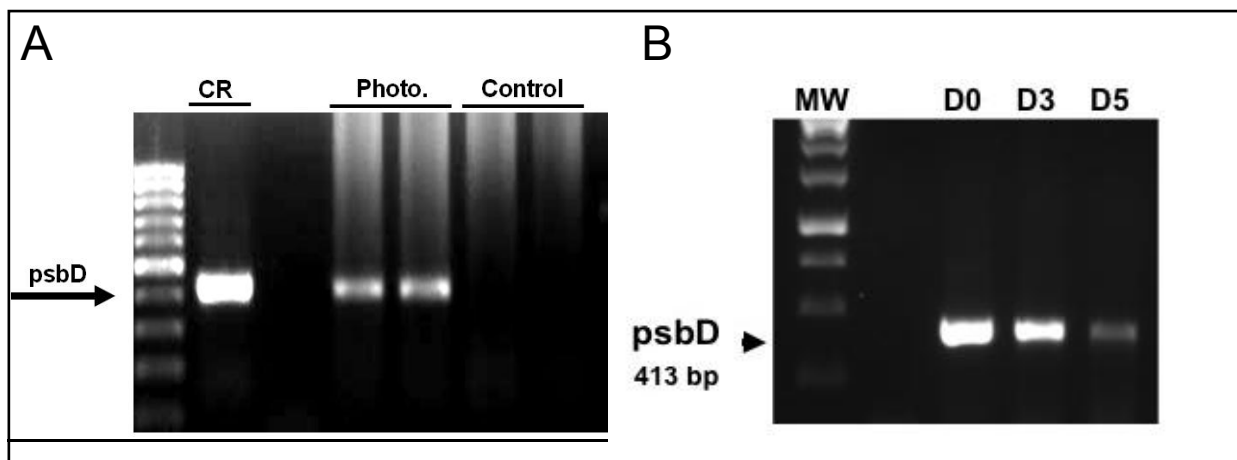


Abb. 10: Viabilität von *Chlamydomonas reinhardtii* im implantierten Scaffold:

Die implantierten Scaffolds wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 3, 4 und 5 Tage) explantiert und durch RT-PCR Analyse auf die *Chlamydomonas reinhardtii* spezifische mRNA für das Protein psbD untersucht, welches eine Untereinheit des Photosystems von *Chlamydomonas* darstellt. In den *Chlamydomonas reinhardtii* ($2,5 \times 10^7$ Algen/ml) enthaltenden Scaffolds (Photo.) lässt sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Control) auch 4 Tage nach Implantation psbD nachweisen (A). PsbD lässt sich über fünf Tage nachweisen, was als Beleg für die Vitalität von *Chlamydomonas reinhardtii* nach der Implantation in den Organismus der Maus gewertet wird. Das am Tag der Implantation sehr starke psbD Signal zeigt jedoch einen Abfall bis zum fünften Tag (B). (Pro Zeitpunkt: n = 3; 3 Tiere à 1 Scaffold; Kontrollgruppe in gleicher Größe), CR = *Chlamydomonas reinhardtii*

5.2.3 Histologische Untersuchung nach Explantation des bioaktivierten Scaffolds:

Photosynthetisch aktivierte Kollagenscaffolds und Kontrollcaffolds wurden an Nacktmäusen in Vollhautdefekte implantiert und nach fünf Tagen explantiert. Die

explantierten Scaffolds wurden fixiert und mittels DAPI gefärbt. *Chlamydomonas reinhardtii* ist durch die Autofluoreszenz des Chlorophylls sichtbar.

Es zeigte sich hierbei eine, das gesamte Scaffold umfassende räumliche Koexistenz von *Chlamydomonas reinhardtii* und den einwachsenden Zellen der Maus (s. Abb. 11). (n = 6; 3 Tiere x 2 Scaffolds; Kontrollgruppe in gleicher Größe)

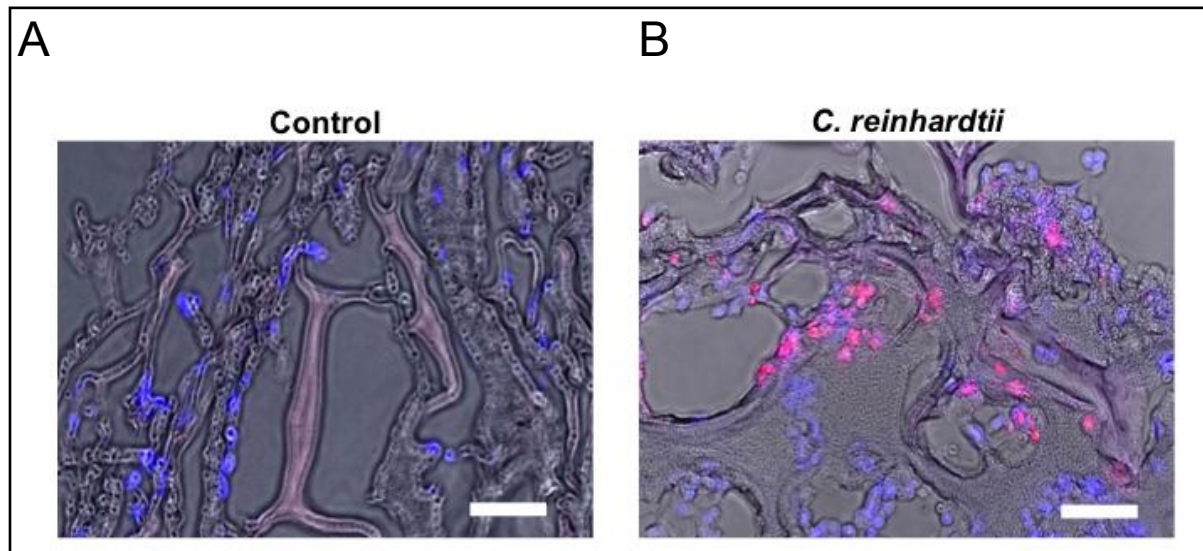


Abb. 11: Histologische Untersuchung nach Explantation des bioaktivierten Scaffolds:

Fünf Tage nach Implantation von photosynthetisch aktiven (Scaffolds $2,5 \times 10^7$ Algen/ml) (B) sowie Kontrollscaffolds (A) in Vollhautdefekte der Nacktmaus wurden diese explantiert und histologisch untersucht. Eine DAPI-Färbung (blau) diente der Visualisierung der Zellkerne. *Chlamydomonas reinhardtii* ist durch Autofluoreszenz des Chlorophylls (rot) sichtbar. In den photosynthetisch aktivierten Scaffolds zeigte sich eine das gesamte Scaffold umfassende enge räumliche Koexistenz von *Chlamydomonas reinhardtii* und den einwachsenden Zellen der Maus. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein chimäres Gewebe hergestellt wurde. Der abgebildete Maßstab gibt eine Länge $50 \mu\text{m}$ an. (n = 6; 3 Tiere x 2 Scaffolds; Kontrollgruppe in gleicher Größe)

5.2.4 Immunantwort auf das bioaktivierte Scaffold:

Um die Immunantwort auf *Chlamydomonas reinhardtii* zu untersuchen, wurden bioaktivierte Scaffolds und Kontrollscaffolds in Vollhautdefekte von Nacktmäusen implantiert und nach fünf Tagen explantiert.

Das Auftreten der meisten Immunmediatoren war in beiden Gruppen gleich stark ausgeprägt. Insbesondere zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen Häufigkeiten bei den Molekülen, die chemotaktisch auf immunoaktive Zellen wirken:

CXCL 1, CXCL 2, CXCL 9, CXCL 10, CXCL 13 sowie CCL 1, CCL 2, CCL 3, CCL 4, CCL 5. Auch in der Gruppe der Schlüsselmediatoren der Immunantwort, IFN- γ und den Interleukinen: IL 2, IL 3, IL 4, IL 5, IL 7, IL 10, IL 12, IL 13, IL 17, IL 23 und IL 27 zeigte sich kein erhöhtes Aufkommen in den bioaktivierten Scaffolds. Unter den 40 getesteten Substanzen waren in der Anwesenheit von *Chlamydomonas reinhardtii* nur zwei Substanzen signifikant erhöht: C5a und CCL 12 (s. Abb. 12). (n = 3; 3 Tiere à 1 Scaffold; Kontrollgruppe in gleicher Größe)

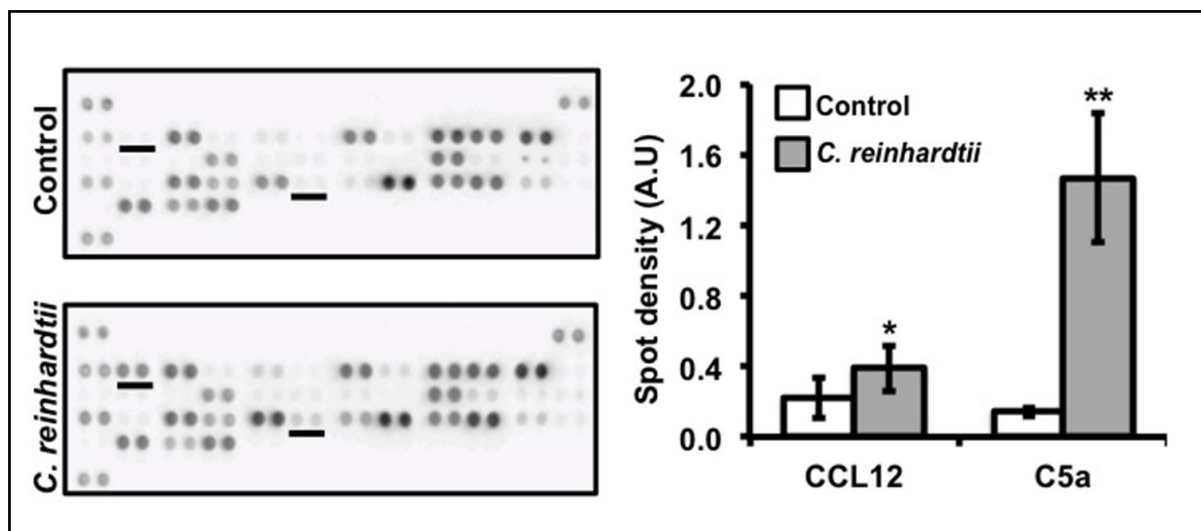


Abb. 12: Immunantwort auf das bioaktivierte Scaffold:

Photosynthetische Scaffolds ($2,5 \times 10^7$ Algen/ml) und Kontrollscaffolds wurden in Vollhautdefekte von Nacktmäusen implantiert und nach fünf Tagen explantiert. Ein antikörperbasierter Proteinsuchtest zur Messung von 40 Cytokinen, Chemokinen und Akut-Phase Proteinen zeigte, dass in beiden Gruppen fast alle Immunmediatoren, insbesondere die chemotaktischen Moleküle sowie die Schlüsselmediatoren der Immunantwort gleich stark ausgeprägt waren. In der Anwesenheit von *Chlamydomonas reinhardtii* waren nur C5a, ein Protein des Komplementsystems und das Chemokin CCL12 in signifikant erhöhter Menge nachweisbar. Es ist davon auszugehen, dass *Chlamydomonas reinhardtii* keine starke Immunreaktion im Organismus der Nacktmäuse hervorruft. (n = 3; 3 Tiere à 1 Scaffold; Kontrollgruppe in gleicher Größe; (* = signifikant im Sinne von $p < 0,05$; ** = hochsignifikant im Sinne von $p < 0,01$;))

5.2.5 Sauerstoffproduktion des bioaktivierten Scaffolds *in vivo*:

Zur Untersuchung der Sauerstoffproduktion der photosynthetisch aktivierten Scaffolds *in vivo* wurden diese in bilaterale Vollhautdefekte von Nacktmäusen

eingesetzt und nach 7 Tagen explantiert. Analog wurde mit Kontrollcaffolds verfahren. Dann erfolgte die Messung der Sauerstoffpartialdrucke durch das SensorDish® System.

Die Sauerstoffpartialdrucke betragen $10,2 \% \pm 1,6 \%$ in den photosynthetisch aktivierten Kollagenscaffolds und $4,93 \% \pm 0,9 \%$ in den Kontrollcaffolds ohne Algen (s. Abb. 13). Die photosynthetisch aktivierten Scaffolds boten somit signifikant höhere Sauerstoffpartialdrucke ($p = 0,0272$) ($n = 8$; 4 Tiere x 2 Scaffolds; Kontrollgruppe gleicher Größe).

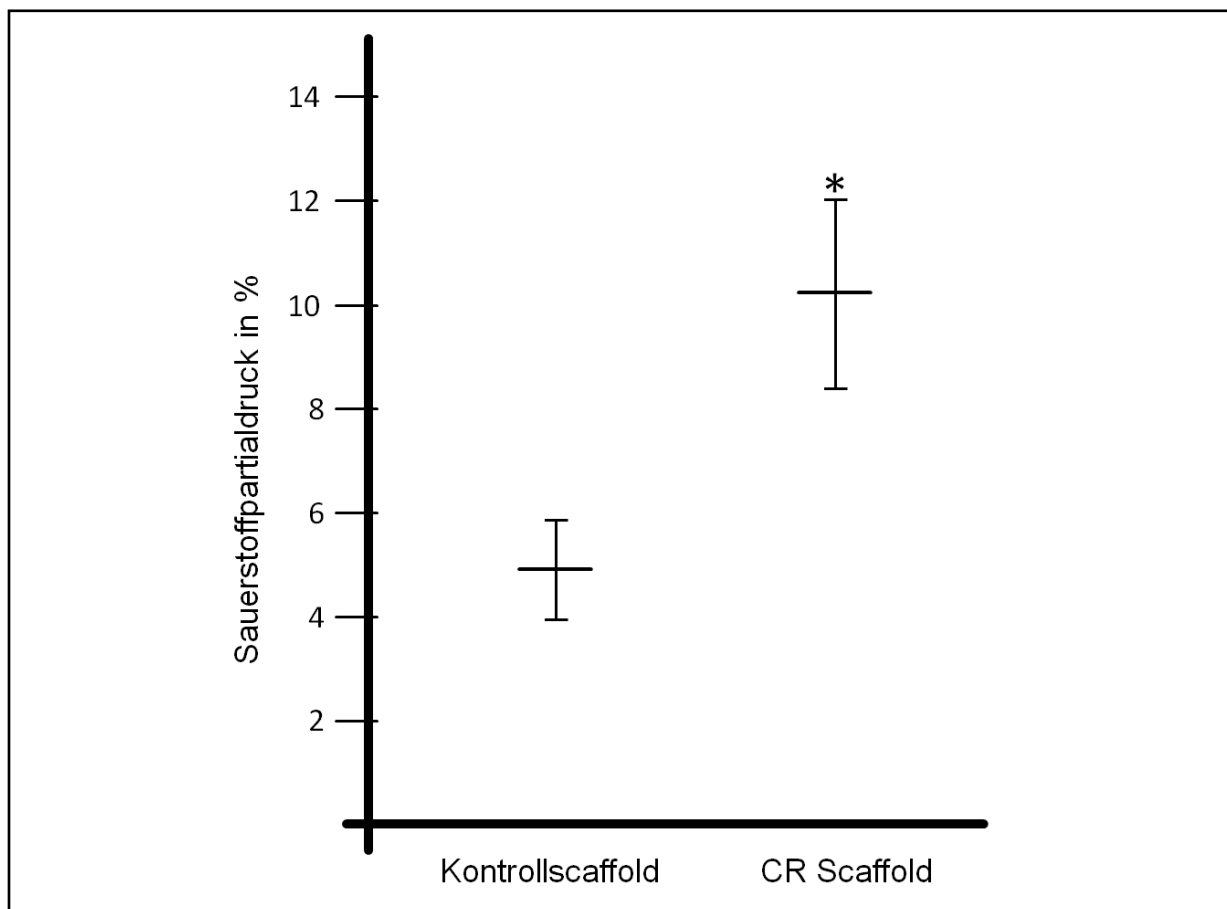


Abb. 13: Sauerstoffproduktion des bioaktivierten Scaffolds in vivo:

Photosynthetisch aktivierte Scaffolds (18×10^6 *Chlamydomonas reinhardtii* / ml) und Kontrollcaffolds wurden in bilaterale Vollhautdefekte von Nacktmäusen implantiert und nach 7 Tagen explantiert. Die Messung der Sauerstoffpartialdrucke durch das SensorDish® System ergab signifikant höhere Sauerstoffpartialdrucke ($10,2 \% \pm 1,6 \%$) in den photosynthetisch aktivierten Kollagenscaffolds als in den Kontrollcaffolds ohne Algen ($4,93 \% \pm 0,9 \%$). (* = signifikant im Sinne von $p < 0,05$; $n = 8$; 4 Tiere x 2 Scaffolds; Kontrollgruppe in gleicher Größe; Angaben als Mean \pm SEM). CR Scaffold = *Chlamydomonas reinhardtii* besiedeltes Scaffold.

6 DISKUSSION

6.1 Klinische Situation:

Hautdefekte und chronische Wunden sind eine große Belastung für die Betroffenen. Die Behandlung ist meist von langer Dauer und verursacht zudem hohe Behandlungskosten. Häufig sind wiederholte chirurgische Debridements und Folgeoperationen zur Defektdeckung notwendig.

6.2 Die Rolle von Sauerstoff in der Wundheilung:

Sauerstoff spielt in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen eine Schlüsselrolle. Sowie Hypoxie unvereinbar mit dem Überleben des gesamten menschlichen Organismus ist, so ist Hypoxie auch unvereinbar mit der Regeneration von Gewebe (Sen, 2009). Auch im Bereich der Wundheilung wurde die Gewebeoxygenierung als wichtige Voraussetzung für die korrekte Abfolge von Wundheilungsphasen der physiologischen Hautregeneration identifiziert (Malda et al. 2007).

Mittlerweile wird Hypoxie allgemein als Verursacher von chronischen Wunden verstanden (Tandara und Mustoe, 2004). Klinische und präklinische Studien beschreiben einen verzögerten Wundheilungsverlauf unter hypoxischen Bedingungen (Sen, 2009). In regenerierendem Gewebe wird Sauerstoff benötigt, um den hypermetabolen Zustand der Zellen zu bedienen und um freie reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) zu generieren, die u.a. in der Immunantwort gegen Bakterien benötigt werden. Zudem ist Sauerstoff beim Aufbau der extrazellulären Matrix zur Bildung und Polymerisation von Kollagenfasern nötig (Loenarz und Schofield, 2011).

Zusätzlich zu den kurzfristigen Folgen einer chronischen Wunde, dem Verlust von Flüssigkeit und Proteinen, kann es durch die Hypoxie zur Entstehung von Nekrosen kommen, die die insuffiziente Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie den Zustrom immunmodulierender Zellen zusätzlich vermindern. Dies wiederum begünstigt die Besiedlung der Wunde mit Keimen und führt somit zu weiteren Gewebeschäden mit der Gefahr von bakterieller Streuung und Sepsis.

6.3 Biomaterialien als Lösungsansätze:

Innerhalb der Biotechnologie befasst sich das Tissue Engineering mit der Herstellung von artifiziellen Geweben, die in der Lage sind Gewebedefekte zu ersetzen. Die meisten Ansätze beschäftigen sich mit der Herstellung von Gewebeersatz für den Bewegungsapparat (Knochen, Sehnen), die Blutgefäße und die Haut.

Prinzipiell lassen sich die Materialien des Tissue Engineerings in zwei Kategorien einteilen: Körper eigene Zellen und körperfremde Materialien. Hinzu kommt die Verwendung von verschiedenen Botenstoffen, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, die die Regeneration begünstigen sollen.

Zunehmend werden im Tissue Engineering regenerative Ansätze verfolgt. Hierbei wird versucht, durch das künstlich hergestellte Gewebe nur einen temporären Gewebeersatz zu gewährleisten und den Körper dabei zu unterstützen, den Defekt durch körpereigene Zellen zu ersetzen. Der künstlich hergestellte Gewebeersatz soll hierbei den körpereigenen Zellen als Leitstruktur dienen (Lutolf und Hubbell, 2005).

Die Auswahl der Materialien und Designs dieser Strukturen ist eines der großen Themen des Tissue Engineering (Rizzi et al. 2010). Für den Erfolg dieser Materialien ist entscheidend, dass die körpereigenen Zellen in das Material einwachsen können. Daher müssen die Materialien ausreichend miteinander verbundene Hohlräume bieten. Wegen ihrer meist gitterförmigen Struktur werden die verwendeten Materialien meist als Matrix oder Scaffold (dt. Gerüst) bezeichnet.

Mit zunehmendem Einwachsen von Zellen aus der Umgebung in die Scaffolds wird deren Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen immer wichtiger. Daher gilt das Einsprossen von Gefäßen, die sogenannte Neovaskularisation, als wichtige Bedingung für den Erfolg des Scaffolds (Kaully et al. 2009). Ungenügende Neovaskularisation führen zu unzureichender Perfusion der Scaffolds mit Zellen, Nährstoffen und Sauerstoff (Papavasiliou et al. 2010). Die Folge sind hohe Infektionsraten und niedriges Regenerationspotential der bisherigen Scaffolds (Zhong et al. 2012).

Für das bisherige Ausbleiben des klinischen Durchbruchs von Scaffolds wird die ausbleibende oder ungenügende Neovaskularisation der Scaffolds als hauptverantwortlich gesehen (Priya, 2008).

6.4 Bioaktivierung von Scaffolds:

Zur Verbesserung der Vaskularisation von Scaffolds werden derzeit viele verschiedene Strategien verfolgt. Die meisten neuen Verfahren setzen auf die Bioaktivierung der Scaffolds, wobei auf verschiedene Weise das regenerative Potential der körpereigenen Zellen stimuliert werden soll. So werden beispielsweise rekombinante pro-angiogene Wachstumsfaktoren in die Scaffolds eingebracht, die die Gefäßneubildung innerhalb der Scaffolds beschleunigen sollen (des Rieux et al. 2011). Ein weiterer Ansatz ist die Implementierung von Genvektoren innerhalb der Scaffolds, welche körpereigene Zellen transfizieren und sie somit zur Produktion von therapeutischen, insbesondere von pro-angiogenen Molekülen wie z.B. VEGF befähigen können (Reckhenrich et al. 2011). Andere Ansätze gehen das Problem der insuffizienten Neovaskularisation durch die Verwendung von Scaffolds an, welche bereits bei Implantation mit einem künstlichen oder natürlichen Gefäßsystem ausgestattet sind (Wang et al. 2010). Die meisten Ansätze verfolgen die Verwendung von Stammzellen. Hierbei sind insbesondere Mesenchymale Stammzellen in den Fokus des Interesses gerückt. Diese Zellen können einfach aus Fettgewebe der Patienten isoliert und im Labor unter GMP-Bedingungen (Good Manufacturing Practice) gezüchtet werden. Bei der Verwendung dieser Zellen nutzt man einerseits ihre Fähigkeit sich in Zellen des Bindegewebes, insbesondere in Endothelzellen der Blutgefäße, zu differenzieren (Ashara et al. 2011). Andererseits nutzt man ihre parakrinen Fähigkeiten (Caplan, 2009), (Danner et al. 2012). Die parakrine Aktivität dieser Zellen umfasst die Ausschüttung vieler Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF sowie chemotaktischer und regenerativer Faktoren (Bieback et al. 2012). Diese Faktoren können die Proliferation und Migration der körpereigenen Zellen unterstützen und das Einsprossen von Gefäßen beschleunigen.

Trotz aller Bemühungen, die Neubildung der Gefäßversorgung innerhalb von Scaffolds zu beschleunigen, muss davon ausgegangen werden, dass keines der genannten Verfahren in den ersten Tagen eine adäquate Gefäßversorgung

gewährleisten kann. Der klinische Einzug von Hautersatzmaterialien verläuft daher bis auf einige Indikationen, wie z.B. im Bereich der Verbrennungsmedizin, sehr zögerlich (Cuadra et al. 2012).

Das Problem der Hypoxie scheint durch bisherige Ansätze zur Verbesserung der Neovaskularisation nicht lösbar. Hautersatzmaterialien, die zur Unterstützung des Wundheilungsprozesses eine unmittelbare Sauerstoffversorgung bieten, sind nicht bekannt.

6.5 Alternative Ansätze zur Verbesserung der Gewebeoxygenierung:

Auch außerhalb des Tissue Engineerings wurden Verfahren zur Beseitigung von Gewebeschämien entwickelt. So können lokalisierte Gefäßstenosen durch das Einlegen von intraluminalen Stents oder durch Ballondilatation erweitert oder auch durch Gefäß-Bypässe umgangen werden. Diese etablierten Verfahren konnten zwar deutliche Erfolge erzielen, aber die weiterhin bestehende Zahl an Patienten mit Symptomen deren Ursache in der Gewebhypoxie, also der Minderversorgung von Geweben mit Sauerstoff, liegt macht den Bedarf neuer Therapien deutlich.

Während die meisten Ansätze zur Verbesserung der Gewebeoxygenierung auf eine Verbesserung der Durchblutung abzielen, gibt es nur wenige Lösungsansätze zur lokalen Gewebeoxygenierung. Ein Ansatz für eine gefäßunabhängige Gewebeoxygenierung ist die Verwendung von Hochdruckkammern zur Therapieunterstützung von chronischen Wunden (Thom 2011), (Kranke et al. 2012). Im Vergleich zum Ansatz der vorliegenden Arbeit ist durch Hochdruckkammern jedoch keine konstante, gerichtete und lokale Sauerstoffapplikation möglich. Die Therapie in der Kammer ist zudem als eine für den Patienten belastende Situation beschrieben worden und es verbleibt ein Restrisiko systemischer Nebenwirkungen der Hochdrucksauerstoffexposition (Rodriguez et al. 2008). Der Betrieb von Hochdruckkammern ist in der Klinik aus organisatorischer und monetärer Sicht schwierig umzusetzen.

Für die Patienten mit Hautdefekten und chronischen Wunden bedeutet dies, dass weiterhin die chirurgische Therapie im Vordergrund steht. Die Wunden müssen

hierbei meist mehrmals chirurgisch debridiert werden, d.h. die nekrotischem Gewebeanteile und Fibrinbeläge müssen unter Operationsbedingungen entfernt werden. In weiterer Folge erfolgt dann die Deckung des Defekts durch körpereigenes Gewebe wie beispielsweise mit Hauttransplantaten oder lokalen und freien Lappenplastiken. Alle diese Verfahren sind jedoch mit Risiken wie beispielsweise Verlust des Transplantates verbunden (Boudana et al. 2010). Zudem sind bei den meisten plastisch-chirurgischen Deckungen mit autologem Gewebe Entnahmedefekte nicht zu vermeiden. Bei ausgedehnten Defekten oder bei schweren Begleiterkrankungen kann die Verfügbarkeit von geeignetem autologen Gewebe begrenzt sein.

6.6 Photosynthese betreibende Kollagenscaffolds als Lösungsansatz:

Um eine Alternative zu den bekannten Behandlungen von Hautdefekten und chronischen Wunden zu entwickeln, wurde ein bioaktiviertes Hautersatzmaterial, also eine Kombination aus Kollagenmatrix und photosynthetisch aktiven Algen (*Chlamydomonas reinhardtii*) hergestellt (s. Abb. 2). Durch das neue Material soll Sauerstoff mittels Photosynthese direkt am Verbrauchsort, im Gewebeersatz und in der Wunde hergestellt werden.

Bioaktivierung durch Chlamydomonas reinhardtii:

Viele Zellen aus dem Pflanzenreich sind potentielle Kandidaten für den vorgestellten Ansatz. Die Wahl des Organismus fiel auf *Chlamydomonas reinhardtii*, da dieser ein Modellorganismus vieler genetischer Untersuchungen ist und im Bereich der regenerativen Medizin sehr häufig verwendet wird. Das gesamte Genom des Nukleus, der Mitochondrien und der Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii* ist bekannt (Merchant et al. 2007). Die Alge eignet sich daher zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, wie z.B. Antibiotika oder Wachstumsfaktoren. Viele verschiedene Mutanten wurden bereits entwickelt und sind käuflich zu erwerben. *Chlamydomonas reinhardtii* wird als biologisch sicher eingestuft und enthält nachweislich keine viralen oder bakteriellen Krankheitserreger (Johanningmeier und Fischer, 2010). Zudem ist die Alge einfach zu kultivieren. Bisher wurden keine schädlichen Wirkungen auf den Menschen beschrieben und eine Verwendung von *Chlamydomonas reinhardtii* gemäß der Richtlinie 2003/94/EG zur „Festlegung der

Grundsätze und Leitlinien der Guten Herstellungspraxis für Humanarzneimittel und für zur Anwendung beim Menschen bestimmte Prüfpräparate“, unter GMP Bedingungen (Good Manufacturing Practice, „Gute Herstellungspraktik“) ist möglich (Harris, 2009).

Weitergehende Ansätze der photosynthetisch aktiven Hautersatzmaterialien könnten genetisch modifizierte *Chlamydomonas reinhardtii*-Stämme verwenden, die neben Sauerstoff auch andere therapeutische Moleküle wie beispielsweise Antibiotika oder Wachstumsfaktoren produzieren und an ihre Umgebung abgeben.

Ein wichtiger Sicherheitsaspekt bei der Verwendung von *Chlamydomonas reinhardtii* ist die Möglichkeit durch Lichtentzug ein Absterben der Alge herbeizuführen. Dies ist im Hinblick auf spätere klinische Anwendungen relevant, da die Algen bei unerwünschtem Wachstum oder bei Therapieabschluss durch Abdecken der betroffenen Areale schnell beseitigt werden können. Die später funktionslosen Algenzellen können dann durch einwandernde Makrophagen beseitigt werden. Auch ein unerwünschtes Eindringen der Algen in den Körper ist wegen des Lichtbedarfs auszuschließen.

Nachteile der vorgestellten photosynthetisch aktiven Hautersatzmaterialien sind die notwendige Lichtexposition sowie die erforderliche Transparenz der Trägermaterialien.

6.7 Diskussion der Ergebnisse:

6.7.1 Einsaat und Adhäsion von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold:

Bei Einsaat von hohen Algenkonzentrationen (50×10^6 Algen/ml TAPS) zeigte sich eine hohe Intensität und homogene Verteilung der Grünfärbung (s. Abb. 5). Beim Wechsel der Scaffolds im Kulturmedium zeigte sich jedoch ein „Auswaschen“ der Algen aus dem Scaffold. Hieraus lässt sich die Frage nach Adhärenz der Algen zum Kollagenscaffold zunächst negativ beantworten. Die Adhäsion ist für die klinische Umsetzung eine wichtige Eigenschaft, da nur so der Verbleib der Algen im Bereich des Scaffolds und somit der Wunde gesichert ist. Als Konsequenz wurde für die *in vivo* Versuche eine Einkapsulierung der Algen mit Fibrin und Thrombin verwendet, um eine bessere Adhärenz zu erreichen.

6.7.2 Distribution von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold:

Bei der durchgeführten Rasterelektronenmikroskopie zeigte sich eine homogene Verteilung von *Chlamydomonas reinhardtii* im Kollagenscaffold, die auch die inneren Areale des Scaffolds umfasste (s. Abb. 6). Diese ist eine wichtige Voraussetzung für die klinische Anwendbarkeit eines bioaktivierten Scaffolds, weil gerade in den inneren Arealen der Scaffolds niedrige Sauerstoffkonzentrationen vorliegen und dies derzeit als größenlimitierender Faktor von Materialien im Bereich des Tissue Engineering gesehen wird (Volkmer et al. 2008). Die erfolgreiche Besiedelung der Kollagenscaffolds durch *Chlamydomonas reinhardtii* und die somit *in situ* stattfindende Sauerstoffproduktion könnte das Kernproblem des Tissue Engineerings, die unzureichende Oxygenierung lösen.

6.7.3 Biokompatibilität von *Chlamydomonas reinhardtii* im Scaffold:

Die im zeitlichen Verlauf zunehmende Intensität der Grünfärbung der Kollagenscaffolds nach Einsaat von *Chlamydomonas reinhardtii* wird als Hinweis für den Erfolg der Einsaat sowie für die Viabilität und Proliferation der Algen in den Kollagenscaffolds gewertet (s. Abb. 7). Es kann also von einer Biokompatibilität von *Chlamydomonas reinhardtii* und Kollagenscaffold ausgegangen werden.

6.7.4 Sauerstoffproduktion durch bioaktivierte Scaffolds:

Die prozentualen Sauerstoffpartialdrucke in den photosynthetisch aktiven Scaffolds überstiegen deutlich die Sauerstoffpartialdrucke der Kontrollgruppe und die der Atmosphäre (s. Abb. 8). Dies kann als Nachweis dafür gesehen werden, dass es gelungen ist, ein photosynthetisch aktives, Sauerstoff produzierendes Hautersatzmaterial zu konstruieren.

6.7.5 Klinische Verlaufskontrolle am Tiermodell:

Bei der *in vivo* Evaluation der photosynthetisch aktiven Scaffolds waren in der postoperativen Beobachtung die allgemeinen Parameter Bewegung, Laufverhalten,

Nahrungsverweigerung, Körpergewicht, Beschaffenheit der Exkremente sowie Verhalten der Tiere stets unauffällig. Auch bei den versuchsspezifischen Parametern, also der Beobachtung des implantierten Scaffolds und seiner Umgebung, wurden keine Besonderheiten wie Infektionen, Nachblutungen oder andere Komplikationen beobachtet (s. Abb. 9). Die Tiere scheinen das Hautersatzmaterial und die Verbandsanordnung gut zu tolerieren. Intensive Abwehrreaktionen gegen die Fremdkörper wurden nicht beobachtet. Es wurden keinerlei Unterschiede in der klinischen Verträglichkeit zwischen den photosynthetisch aktiven Scaffolds und den Kontrollscaffold beobachtet. Somit kann auf eine gute klinische Verträglichkeit des photosynthetisch aktiven Scaffolds bei der Nacktmaus geschlossen werden. Weiterführende Studien sollten etwaige negative Effekte auf die Zellen der Maus und den Wundheilungsverlauf durch die notwendige Beleuchtung untersuchen.

6.7.6 Viabilität von *Chlamydomonas reinhardtii* im implantierten Scaffold:

Bei der *in vivo* Evaluation der photosynthetisch aktiven Kollagenscaffolds im Vollhautdefektmodell an der Nacktmaus erfolgte mittels RT-PCR Analyse der Nachweis auf mRNA kodierend für *psbD*, einer Untereinheit des Photosystems von *Chlamydomonas reinhardtii*. Wegen der Kurzlebigkeit der Messenger RNA dieser für *Chlamydomonas* spezifischen Untereinheit *psbD*, wird der positive Nachweis dieser Moleküle als Zeichen der metabolischen Aktivität der Algen gewertet. Hieraus kann auf die Viabilität der Algen geschlossen werden. Bei Untersuchung der zu verschiedenen Zeitpunkten explantierten Scaffolds ließ sich *psbD* nur in den photosynthetisch aktivierten Scaffolds, nicht aber in den Kontrollscaffolds nachweisen (s. Abb. 10).

Die positiven *psbD*-Banden bis hin zum fünften Tag werden als erfolgreicher Nachweis der Vitalität von *Chlamydomonas reinhardtii* nach Implantation in einen Gesamtorganismus gewertet. Der Nachweis der Vitalität der Algen in der frühen Phase nach Implantation ist von besonderer Bedeutung, da in dieser Phase noch keine körpereigenen Blutgefäße eingewachsen sein können und die Hypoxie der Scaffolds besonders kritisch ist. Durch den Nachweis lebender Algen in den Scaffolds kann darauf geschlossen werden, dass sie weiterhin Sauerstoff produzieren und an ihre Umgebung abgeben.

Der Abfall der Signalintensität über fünf Tage könnte auf einen Rückgang der Algenpopulation hinweisen, wobei die Aussagekraft dieses Ergebnisses durch die nur semiquantitative Methodik eingeschränkt ist. Immunologische oder metabolisch-toxische Vorgänge könnten als Ursache für einen Rückgang der Algenpopulation in Frage kommen. Auch eine Verdrängung der Algen durch das Einwachsen der körpereigenen Zellen in die Scaffolds könnte diese Beobachtung erklären.

6.7.7 Histologische Untersuchung nach Explantation des bioaktivierten Scaffolds:

Die histologische Untersuchung der nach fünf Tagen explantierten photosynthetisch aktiven Scaffolds zeigt eine das gesamte Scaffold umfassende Koexistenz von *Chlamydomonas reinhardtii* und den einwachsenden Zellen der Maus (s. Abb. 11). Das Vorhandensein der Algen, des Thrombins und des Fibrins stellt offenbar kein Migrations- und Proliferationshindernis für die einwachsenden Zellen der Maus dar. Es kann gefolgert werden, dass ein chimäres Gewebe aus den Zellen einer Alge und den Zellen eines Säugetiers hergestellt wurde. Auf Grund der Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe (s. Einleitung) zur Koexistenz von Algen und Fibroblasten und dem dort erbrachten Nachweis, dass die Fibroblasten den Sauerstoff der Algen in ihrer Umgebung konsumieren, kann gefolgert werden, dass das photosynthetisch aktive Kollagenscaffold Sauerstoff an die einwachsenden Zellen der Maus abgibt.

Eine Chimäre aus *Chlamydomonas reinhardtii* und den einwachsenden Zellen der Maus ähnelt der symbiotischen Vereinigung, die sich bei der im Meer lebenden Schneckenart *Elysia chlorotica* findet. Diese Schnecke saugt als Jungtier die Zellen der Alge *Vaucheria litorea* aus und verteilt deren Chloroplasten über Kanäle an ihre Körperoberfläche (Rumpho et al. 2000). Daraufhin kann die Schnecke, ausreichende Lichtzufuhr vorausgesetzt, den Rest ihres Lebens durch den Sauerstoff und andere Stoffwechselprodukte der Chloroplasten, unabhängig von externer Nahrungs- oder Sauerstoffzufuhr, überleben (Rumpho et al. 2000). Das natürliche Vorkommen von Photosynthese betreibenden Tieren lässt das Ziel dieser Arbeit, die Entwicklung Photosynthese betreibender artifizierlicher Gewebe erreichbar erscheinen. Weiterführende Studien sollten zeigen, ob die Algen das von den Zellen der Maus produzierte Kohlenstoffdioxid nutzen. Dies würde eine Symbiose von Algen und Mauszellen belegen.

6.7.8 Immunantwort auf das bioaktivierte Scaffold:

Bei der *in vivo* Untersuchung der Immunantwort des Säugetierorganismus auf Kollagenscaffolds mit *Chlamydomonas reinhardtii* zeigten sich nur geringe Abweichungen von der Immunreaktion auf unbesiedelte Kollagenscaffolds (s. Abb. 12). Von 40 getesteten Cytokinen, Chemokinen und Akut-Phase Proteinen waren nur C5a, ein Protein des Komplementsystems, und das Chemokin CCL12 in signifikant erhöhter Menge nachweisbar.

Diese Daten zeigen, dass *Chlamydomonas reinhardtii* keine starke Immunreaktion im Organismus der Nacktmäuse hervorruft. Hierbei sollte jedoch die verwendete Enkapsulationsmethode der Algen mit Fibrin und Thrombin berücksichtigt werden, von der bekannt ist, dass sie die Immunantwort des Empfängerorganismus herabsetzt (Hunt und Grover, 2010). Auch die Verwendung des Nacktmausmodells limitiert die Aussage zur Immunantwort.

Den Ergebnissen sollte nun als nächster Schritt die Übertragung auf immunkompetente Tiere folgen. Hierfür sollten zunächst Wildtyp-Mäuse und, vor einer potentiellen Anwendung beim Menschen, Großtiere verwendet werden. So kann die Frage beantwortet werden, ob *Chlamydomonas reinhardtii* als Bestandteil eines bioaktivierten Hautersatzmaterials auch unter dem Druck des Immunsystems Sauerstoff produzieren kann. Sollten hierbei starke Immunreaktionen auftreten oder das Überleben der Algen und die Sauerstoffproduktion gemindert werden, ist die Verwendung von etablierten Verfahren der molekularen Kapselung geplant (Vaithilingam et al. 2008). Hierdurch könnten die Algen immunologisch unkenntlich gemacht werden und somit vor dem Zugriff durch das Immunsystem geschützt werden. Gängige Verfahren der Enkapsulation sind beispielsweise die Verwendung von Alginaten, Hydrogelen oder Fibrin und Thrombin. Diese werden bereits bei der Transplantation von Langerhanszellen des Pankreas eingesetzt (Teramura und Iwata, 2012). Es kann davon ausgegangen werden, dass das Problem einer etwaigen Immunantwort gegen *Chlamydomonas reinhardtii* gelöst werden kann.

6.7.9 Sauerstoffproduktion des bioaktivierten Scaffolds *in vivo*:

Das Überleben von *Chlamydomonas reinhardtii* in den implantierten Scaffolds und die immunologische Akzeptanz durch den Wirt sind wichtige Voraussetzungen für

den Erfolg eines photosynthetisch aktiven Hautersatzmaterials. Entscheidend für die Funktion des durch *Chlamydomonas reinhardtii* bioaktivierten Scaffolds, ist die weiterführende Sauerstoffproduktion nach Implantation. Bei der Explantation der bioaktivierten Scaffolds nach einer Woche zeigten sich signifikant höhere Sauerstoffpartialdrucke als in den Kontrollcaffolds (s. Abb. 13).

Trotz der signifikant höheren Sauerstoffkonzentration in den bioaktivierten Scaffolds waren diese Werte deutlich unter denen, die im *in vitro* Versuch erreicht werden konnten. Die niedrigeren Werte des *in vivo* Versuches könnten sich durch die höhere Zellmasse und somit höhere Dichte im Material erklären. Dieser Effekt könnte durch erneute *in vitro* Versuche mit unterschiedlichen Mengen an Fibroblasten im Scaffold überprüft werden. Ein weiterer Erklärungsansatz für die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen ist der kontinuierliche Verbrauch des produzierten Sauerstoffs durch die eingewachsenen Zellen. Eine andere Erklärung für die vergleichsweise niedrigen Werte der Sauerstoffproduktion ist, dass zum Zeitpunkt dieses Experimentes die oben beschriebene Enkapsulationsmethode noch nicht durchgeführt wurde und in Folge dessen die Überlebensraten von *Chlamydomonas reinhardtii* im implantierten Scaffold geringer waren. In weiterführenden Experimenten sollten neben verschiedenen Enkapsulationsverfahren auch verschiedene Algenkonzentrationen überprüft werden, um eine Maximierung der Sauerstoffproduktion herbeizuführen.

Die durch die photosynthetisch aktiven Scaffolds mögliche normoxische Ischämie stellt eine zellphysiologische Besonderheit dar. Die daraus resultierenden Konsequenzen auf den Zellmetabolismus und die Geweberegeneration sollten ebenfalls in weiterführenden Studien untersucht werden.

Eine weitere wichtige Folgestudie ist die Vaskularisationsanalyse der explantierten Scaffolds (Egaña et al. 2009 a). Hierzu werden die Scaffolds über einer starken Lichtquelle in Vergrößerung photographiert und somit ihre Gefäßstruktur sichtbar gemacht (s. Abb. 14). Softwaregestützt kann die Dichte, Länge und Verteilung der Mikrovaskulatur bestimmt werden. Es ist zu erwarten, dass die Oxygenierung der Scaffolds durch *Chlamydomonas reinhardtii* Änderungen dieser Gefäße mit sich bringt.

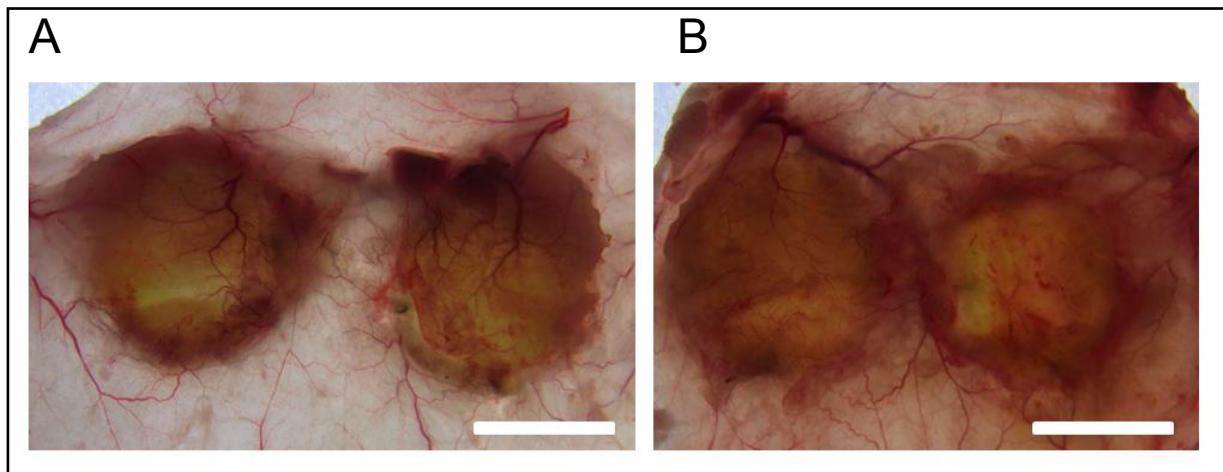


Abb. 14: Vaskularisationsanalyse:

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Aufnahmen zur Vaskularisationsanalyse der implantierten Kollagenscaffolds mit *Chlamydomonas reinhardtii* ($2,5 \times 10^7$ Algen/ml) (A) und Kontrollcaffolds (B). Explantation erfolgte fünf Tage nach Implantation in Vollhautdefekte der Nacktmaus. Auf Grund der geringen Fallzahl ($n = 2$) ließ sich hieraus keine Aussage über unterschiedliche Vaskularisationsmuster ableiten. Der abgebildete Maßstab gibt eine Länge 1 cm an.

6.8 Fazit:

Bezugnehmend auf die acht Teilfragen der vorliegenden Arbeit (s.S. 5) kann festgehalten werden, dass *Chlamydomonas reinhardtii* auf den ausgewählten Kollagenscaffolds *in vitro* wenig adhärent (1.), jedoch überlebensfähig (2.) und weiterhin in der Lage ist Sauerstoff zu produzieren (3.).

Die *in vivo* Untersuchungen zeigten bei den Tieren eine gute klinische Verträglichkeit der Scaffolds mit *Chlamydomonas reinhardtii* (4.), welche wiederum in den implantierten Scaffolds überleben konnten (5.) und in Symbiose mit den eingewanderten Zellen der Maus ein chimäres Gewebe bildeten (6.). Es entwickelte sich keine starke Immunreaktion auf die photosynthetisch aktiven Scaffolds (7.), die auch eine Woche nach Implantation noch Sauerstoff produzierten (8.).

7 ZUSAMMENFASSUNG

Biotechnologie und Tissue Engineering haben die Tür zur regenerativen Behandlung von Gewebedefekten und chronischen Wunden geöffnet. Die Verwendung bioaktivierter Materialien ist ein vielversprechender Ansatz. Der klinische Durchbruch dieser Materialien verläuft bisher noch zögerlich. Derzeit gilt unzureichende Vaskularisierung der Materialien und die damit verbundene Hypoxie als begrenzender Faktor für das regenerative Potential der Hautersatzmaterialien. Diese Arbeit stellt ein Photosynthese betreibendes Gewebeersatzmaterial vor, mit dessen Hilfe eine gefäßunabhängige Sauerstoffversorgung des Materials sowie seiner Umgebung ermöglicht werden soll. Hierzu wurde die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* in ein Kollagenscaffold implementiert und die Eigenschaften dieses Materials evaluiert.

Das Ziel dieser Arbeit, die Herstellung eines Photosynthese betreibenden Gewebeersatzmaterials, welches bei Lichtexposition Sauerstoff *in vitro* als auch *in vivo* abgeben kann, ist somit erreicht worden. Hierfür wurde ein Prototyp eines Photosynthese betreibenden Kollagenscaffolds für die Hautregeneration hergestellt, der, weiterführende Untersuchungen vorausgesetzt, als Wundaufgabe für die Anwendung am Menschen geeignet sein könnte.

Nach ausführlicher Literaturrecherche wurde kein Verfahren gefunden, dass eine lokale Sauerstoffproduktion in hypoxischem Gewebe beschreibt. Auch sauerstoffproduzierende Biomaterialien finden sich bisher nicht in der Literatur.

Lokale Oxygenierung durch Photosynthese könnte eine Vielzahl neuer Behandlungsmöglichkeiten für Gewebeischämien verschiedener Genese ermöglichen.

Bei dermalen Ersatzmaterialien ist eine Verbesserung des Überlebens der in das Material einwachsenden Zellen und somit eine verbesserte dermale Regeneration zu erwarten. Die Genesungszeit bei konservativer Wundtherapie könnte verkürzt und die Anzahl chirurgischer Intervention reduziert werden.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Asahara, T., Kawamoto, A., Masuda, H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells*. 29 (2011) 1650-1655
- Beckers, S., Noor, F., Müller-Vieira, U., Mayer, M., Strigun, A., Heinzle, E. High throughput, non-invasive and dynamic toxicity screening on adherent cells using respiratory measurements. *Toxicol In Vitro*. Mar;24(2) (2010) 686-694
- Bieback, K., Wuchter, P., Besser, D., Franke, W., Becker, M., Ott, M., Pacher, M., Ma, N., Stamm, C., Klüter, H., Müller, A., Ho, A.D. Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and f(r)iction. *J Mol Med (Berl)*. Jul 90(7) (2012) 773-782
- Boudana, D., Wolber, A., Coeugnet, E., Martinot-Duquennoy, V., Pellerin, P. History of skin graft. *Ann Chir Plast Esthet*. Aug;55(4) (2010) 328-332
- Caplan, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 217 (2009) 318-324
- Cuadra, A., Correa, G., Roa, R., Piñeros, J.L., Norambuena, H., Searle, S., Las Heras, R., Calderón, W. Functional results of burned hands treated with Integra® *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. Feb;65 (2) (2012)228-234
- Danner, S., Kremer, M., Petschnik, A.E., Nagel, S., Zhang, Z., Hopfner, U., Reckhenrich, A.K., Weber, C., Schenck, T.L., Becker, T., Kruse, C., Machens, H.-G., Egaña, J.T. The use of human sweat gland-derived stem cells for enhancing vascularization during dermal regeneration. *J Invest Dermatol*. Jun;132(6) (2012) 1707-1716
- des Rieux, A., Ucakar, B., Mupendwa, B.P., Colau, D., Feron, O., Carmeliet, P., Prétat, V. 3D systems delivering VEGF to promote angiogenesis for tissue engineering. *J Control Release*. 150 (2011) 272-278
- Egaña, J.T., Condurache, A., Lohmeyer, J.A., Kremer, M., Stöckelhuber, B.M., Lavandero, S., Machens, H.-G. Ex vivo method to visualize and quantify

- vascular networks in native and tissue engineered skin. *Langenbecks Arch SurgMar*; 394 (2) (2009, a) 349-356
- Egaña, J.T., Danner, S., Kremer, M., Rapoport, D.H., Lohmeyer, J.A., Dye, J.F., Hopfner, U., Lavandero, S., Kruse, C., Machens, H.-G. The use of glandular-derived stem cells to improve vascularization in scaffold-mediated dermal regeneration. *Biomaterials*. Oct 30 (2009, b) 5918-5926
- Egaña, J.T., Fierro, F.A., Krüger, S., Bornhäuser, M., Huss, R., Lavandero, S., Machens, H.-G. Use of human mesenchymal cells to improve vascularization in a mouse model for scaffold-based dermal regeneration. *Tissue Eng Part A*. 15 (5) (2009) 1191-1200
- Eisenbud, D.E. Oxygen in wound healing: nutrient, antibiotic, signaling molecule, and therapeutic agent. *Clin Plast Surg*. 39 (2012) 293-310
- Geary, P.M., Tiernan, E. Management of split skin graft donor sites - results of a national survey. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 62 Dec (2009) 1677-1683
- Gorman, D.S., Levine, R.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54 (1965) 1665-1669
- Harris, E.H. *The Chlamydomonas sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and its laboratory use*. Academic press, Elsevier, MA, USA. 2009
- Herstellerangabe von INTEGRA LifeSciences Corporation; (www.ilstraining.com/bmwd/bmwd/bmwd_it_01.html) Zugriff auf Internetseite am 27.02.2013
- Hodgkinson, T., Bayat, A. Dermal substitute-assisted healing: enhancing stem cell therapy with novel biomaterial design. *Arch Dermatol Res*. Jul;303(5): (2011) 301-315
- Hubbell, J.A., Thomas, S.N., Swartz, M.A. Materials engineering for immunomodulation. *Nature* 462 (2009) 449-460
- Hunt, N.C., Grover, L.M. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. *Biotechnol Lett*. 32. (2010) 733-742

- Johanningmeier, U., Fischer, D. Perspective for the use of genetic transformants in order to enhance the synthesis of the desired metabolites: Engineering chloroplasts of microalgae for the production of bioactive compounds. *Adv Exp Med Biol.* 698 (2010) 144-151
- Kaully, T., Kaufman-Francis, K., Lesman, A., Levenberg, S. Vascularization - the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng Part B Rev.* Jun;15(2) (2009) 159-169
- Kranke, P., Bennett, M.H., Martyn-St James, M., Schnabel, A., Debus, S.E. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev.* Apr 18;4 (2012) CD004123
- Loenarz, C., Schofield, C.J. Physiological and biochemical aspects of hydroxylations and demethylations catalyzed by human 2-oxoglutarate oxygenases. *Trends Biochem Sci.* 36 (2011) 7-18
- Lü, K., Xu, L., Xia, L., Zhang, Y., Zhang, X., Kaplan, D.L., Jiang, X., Zhang, F. An Ectopic Study of Apatite-Coated Silk Fibroin Scaffolds Seeded with AdBMP-2-Modified Canine bMSCs. *J J Biomater Sci Polym Ed.* 23 (1-4) (2012) 509-526
- Lutolf, M.P., Gilbert, P.M., Blau, H.M. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature* 462 (2009) 433-441
- Lutolf, M.P., Hubbell, J.A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotech.* 23 (2005) 47-55
- Machens, H.G., Berger, A.C., Mailaender, P. Bioartificial skin. *Cells Tissues Organs.* 167 (2000) 88-94
- Malda, J., Klein, T.J., Upton, Z. The roles of hypoxia in the *in vitro* engineering of tissues. *Tissue Eng.* 13 (9) (2007) 2153-2162
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., Marshall,

- W.F., Qu, L.H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.P., Riaño-Pachón, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martínez, D., Ngau, W.C., Otilar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., Grossman, A.R. The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* 318 (5848) (2007) 245–250
- Moiemen, N.S., Vlachou, E., Staiano, J.J., Thawy, Y., Frame, J.D. Reconstructive surgery with Integra dermal regeneration template: histologic study, clinical evaluation, and current practice. *Plast Reconstr Surg.* 117 (2006) 160S – 174S
- Papavasiliou, G., Cheng, M.H., Brey, E.M. Strategies for vascularization of polymer scaffolds. *J Investig Med.* Oct 58(7) (2010) 838-844
- Place, E.S., Evans, N.D., Stevens, M.M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater.*;8(6): (2009) 457-470. Review
- Priya, S.G., Jungvid, H., Kumar, A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 14 (2008) 105-118
- Rahaman, M.N., Mao, J.J. Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. *Biotechnol Bioeng.* Aug 5;91(3) (2005) 261-284

- Reckhenrich, A.K., Hopfner, U., Krötz, F., Zhang, Z., Koch, C., Kremer, M., Machens, H.-G., Plank, C., Egaña, J.T. Bioactivation of dermal scaffolds with a non-viral copolymer-protected gene vector. *Biomaterials*. 32 (2011) 1996-2003
- Rizzi, S.C., Upton, Z., Bott, K., Dargaville, T.R. Recent advances in dermal wound healing: biomedical device approaches. *Expert Rev Med Devices*. Jan 7 (1) (2010) 143-154
- Rodriguez, P.G., Felix, F.N., Woodley, D.T., Shim, E.K. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg*. 34 (2008) 1159-1169
- Rumpho, M.E., Summer, E.J., Manhart, J.R. Solar-powered sea slugs. Mollusc/algal chloroplast symbiosis. *Plant Physiol*. 123 (2000) 29-38
- Sen, C.K. Wound healing essentials: let there be oxygen. *Wound Repair Regen*. 17(1) (2009) 1-18
- Tandara, A.A., Mustoe, T.A. Oxygen in wound healing-more than a nutrient. *World J Surg*. 28 (2004) 294-300
- Teramura, Y., Iwata, H. Bioartificial pancreas microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans. *Adv Drug Deliv Rev*. 15;62(7-8) (2010) 827-840
- Thiel, R. (2004) Orientierungshilfe des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter zur Einstufung in Belastungsgrade für genehmigungspflichtige Tierversuche, Fassung 02.03.2004, Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragter, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin.; (<http://www.uni-regensburg.de/forschung/zentrale-tierlaboratorien/medien/informationen/belastungsgrade.pdf>)
Zugriff auf Internetseite am 26. Feb 2013
- Thom, S.R. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg*. 127 Suppl 1, (2011) 131S-141S
- Vaithilingam, V., Sundaram, G., Tuch, B.E. Islet cell transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. Dec;13(6) (2008) 633-638

Wang, L., Fan, H., Zhang, Z.Y., Lou, A.J., Pei, G.X., Jiang, S., Mu, T.W., Qin, J.J., Chen, S.Y., Jin, D. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized β -tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. Dec 31(36) (2010) 9452-9461

Zhong, S.P., Zhang, Y.Z., Lim, C.T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. Sep-Oct 2 (5) (2010) 510-525

9 ANHANG

9.1 Verzeichnis der Geräte, Hilfsmittel und Software:

Adobe Photoshop CS5	(Adobe Systems, San Jose, CA, USA)
Axio Observer	(Carl Zeiss AG, Oberkochen)
Axiovision	(Carl Zeiss AG, Oberkochen)
Brutschränke für die Zellkultur	(Life Sciences International, Frankfurt)
Casy Counter TT	(Roche Diagnostics, Mannheim)
Cx1 Digitalcamera	(Ricoh, Hannover)
GraphPad Prism 5 software	(GraphPad Software, La Jolla, CA)
Mikroskop Axiovert 25	(Zeiss, Jena)
Nano Light 11 Watt	(Dennerle, Vinningen)
Nu/Nu Nacktmäuse	(Charles River, Sulzfeld)
OxoDish®	(PreSens Gmbh, Regensburg)
Rasterelektronenmikroskop S-3500-N	(Hitachi, Tokyo, Japan)
SensorDish® Reader	(PreSens Gmbh, Regensburg)
Sputter Coater Baltec SCD 005	(Leica Microsystems, Wetzlar)
Tecniplast-IVC, Typ-I Superlong	(Tecniplast, Hohenpeißenberg)

9.2 Verzeichnis der Chemikalien, Medikamente und Verbrauchsmaterialien:

Alkohol, $\geq 99,8\%$	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Buprenorphin s.c.	(Temgesic [®] , Essex Pharma GmbH, München)
CaCl ₂	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
DAPI-Prolong-Gold	(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
Falconröhrchen, 15 ml	(TPP AG, Trasadingen, Schweiz)
Falconröhrchen, 50 ml	(TPP AG, Trasadingen, Schweiz)
Formaldehyd	(Science Services, München)
Gazin Mullkompressen 10x10 cm	(Lohmann und Rauscher, Neuwied)
Glutaraldehyd	(Science Services, München)
High Pure RNA Isolation Kit	(Roche Applied Science GmbH, Mannheim)
Isoflurane	(Baxter Deutschland, Unterschleißheim)
K ₂ HPO ₄	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
KH ₂ PO ₄	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Kodan [®]	(Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt)
Mäusepellets	(Altromin, Lage)
MgSO ₄	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Mouse Cytokine Array Panel A	(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
Multipette plus	(Eppendorf AG, Hamburg)
NH ₄ Cl	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Novaminsulfon	(Ratiopharm GmbH, Ulm)
Pentobarbital, Narcoren	(Fa. Merial, Hallbergmoos)
Petrischale \varnothing 40 mm	(TPP AG, Trasadingen, Schweiz)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)	
Pinzette	(Seidel Medizin, Gauting)
Pipettenspitzen (10-1000 μ l)	(Starlab GmbH, Hamburg)

RNAlater	(Qiagen, Hilden)
TIMESH®	(PFM Medical AG, Köln)
Tissucol Duo S	(Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim)
Tissue Tek	(Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande)
Transcriptor RT-PCR Kit	(Roche Applied Science GmbH, Mannheim)
V.A.C.® Drape	(KCI Medical Products, Wimborne Dorset, UK)
Zellkulturflasche, 175cm ²	(Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
6 mm Biopsiestanze	(Acuderm® inc., Fort Lauderdale, FL, USA)
10 mm Biopsiestanze	(Acuderm® inc., Fort Lauderdale, FL, USA)
12 mm Biopsiestanze	(Acuderm® inc., Fort Lauderdale, FL, USA)
5-0 Ethilonfaden	(Ethicon, Norderstedt)
6-Loch Mikrotiterplatte	(TPP AG, Trasadingen, Schweiz)
12-Loch Mikrotiterplatte	(TPP AG, Trasadingen, Schweiz)
24-Loch Mikrotiterplatte	(TPP AG, Trasadingen, Schweiz)
96-Loch Mikrotiterplatte	(TPP AG, Trasadingen, Schweiz)

9.3 Statistisches Gutachten:

s. S 59 und 60

9.4 Antrag auf Genehmigung des Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes:

s. S 61 bis 80



**Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie
des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München**



Direktor: Prof. Dr. K. A. Kuhn

Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie
Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Straße 22, 81675 München

Briefanschrift Ismaninger Str. 22
81675 München
Durchwahl (0 89) 41 40-4321
Fax (0 89) 41 40-4850
Internet www.imse.med.tu-muenchen.de

Tibor Schuster

Telefon (0 89) 41 40-4324
Fax (0 89) 41 40-4973
Email tibor.schuster@tum.de

München, den 26.1.2010

**Statistische Begutachtung
des Antrags auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des
Tierschutzgesetzes mit dem Titel:**

„Entwicklung eines photosynthetisch aktiven dermalen Hautersatzes“

Antragsteller:

Priv.-Doz. Dr. med. Riccardo Giunta

**Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie
Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München
Ismaningerstr.22**

Sehr geehrte Damen und Herren,

der o.g. Antrag wurde bezüglich seiner statistischen Annahmen begutachtet.

Nach den Angaben des Antragstellers liegen bisher keine Ergebnisse aus vergleichbaren Studien in der Literatur bzw. auch keine übertragbaren Ergebnisse aus eigenen Vorversuchen vor, die eine Fallzahlschätzung im Sinne einer konfirmatorischen Studienplanung erlauben würden.

Die geplanten Versuche müssen daher als explorative Orientierungsstudien betrachtet werden.

In dieser Art von Studien hat sich eine Gruppenfallzahl von 6 Tieren als unerlässliche Mindestgröße etabliert. Ziel der Orientierungsstudien ist es, klinische Hypothesen statistisch zu konkretisieren, d.h. aufgrund der gewonnenen Ergebnisse Schätzungen zugrunde liegender Unterschiede und Variabilitäten (Effektgrößen) zu gewinnen, die dann für die Planung konfirmatorischer Studien herangezogen werden können.

Eine hinreichende vertrauenswürdige Schätzung von Effekten (insbesondere von Lageparametern) ist durch eine Fallzahl von 6 insofern gewährleistet, dass zumindest bei quantitativen Messgrößen 95% Konfidenzintervalle für den Zentralwert (Median) unmittelbar (und ab dieser Fallzahl erstmals hinreichend) geschätzt werden können. So lässt sich zeigen, dass der minimale und maximale Messwert in einer Reihe von 6 Wertenhebungen den Grenzen eines 95%-igen Vertrauensintervalls für den Zentralwert entsprechen (¹*Documenta Geigy „Wissenschaftliche Tabellen“*, 7. Aufl. 1969). Da für die Interpretation des Zentralwertes keine Normalverteilung des zugrunde liegenden Merkmals erfüllt sein muss (welche oft auch nicht, aufgrund der mangelnden Vorkenntnisse in Orientierungsstudien, gesichert postuliert werden kann) ist die Anwendung dieser Konzeption für einen breiten Bereich interessierender (quantitativer) Zielgrößen geeignet.

Als primär interessierende Zielgrößen sollen in verschiedenen Versuchsreihen die Transillumination (Flächenprozentwerte), die Aktivität der hergestellten photosynthetisch aktiven Matrices (relative Unterschiede behandelte vs. unbehandelte Matrices), die Immunohistochemie (Proliferation und Zellzahlen) sowie die Histologie (Zellzahlen) betrachtet werden.

Da in den Versuchen drei unterschiedliche Verbleibdauern der Matrices im Hautdefekt sowie drei verschiedene Mengen an Algen in der Matrix untersucht werden sollen, resultieren insgesamt 9 notwendige Versuchsgruppen im Gesamtexperiment. Zusätzlich wird für jeden der Zeitpunkte noch eine Kontrollgruppe ohne jegliche Algenexposition untersucht.

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgt allgemein explorativ. Deskriptive Statistiken werden erstellt und Vertrauensintervalle für Lagemaße und Effektschätzungen (Unterschiede in Lageparametern) berechnet.

Da sowohl konditionale² als auch marginale³ Behandlungseffekte von Interesse sind, sollen für die statistische Analyse der Daten weiterführend *lineare gemischte Modelle* zum Einsatz kommen. In dieser Modellklasse wird zwischen experimentell festgelegten (Verbleibdauer, Menge an Algen) Einflüssen und zufälligen individuen- und experimentspezifischen Effekten unterschieden. Vorteil dieser Modellierungsstrategie ist, dass die Information aller Einzelversuche in einem (bzw. wenigen) Gesamtmodell(en) zusammengefasst und ausgewertet werden kann, was zu einer höheren Entdeckungswahrscheinlichkeit (Power) zugrundeliegender Sachverhalte führt. Über die Regressionsmodelle werden Schätzungen für die interessierenden Gruppenkontraste (Behandlungseffekte) und Variabilitäten vorgenommen und entsprechende Konfidenzintervalle berechnet. Diese Ergebnisse können dann für die Hypothesenbildung und biometrische Planung konfirmatorischer Studien herangezogen werden.

Da es sich um explorative Untersuchungen handelt werden alle statistischen Analysen zu einem zweiseitigen Signifikanzniveau von 5% vorgenommen.

Mit freundlichen Grüßen



Dipl.-Stat. T. Schuster

¹ Vertrauensgrenzen für Quantile tabelliert auf Seite 105 in *Documenta Geigy „Wissenschaftliche Tabellen“*, 7. Aufl. (1969), ausführliche Erläuterungen zur Berechnung zu finden auf Seiten 162 u. 188 der selben Ausgabe

² Verbleibdauerereffekte unter den verschiedenen Mengen an Algen bzw. Algeneffekte unter den verschiedenen Verbleibdauern

³ Verbleibdauerereffekte insgesamt („gemittelt“ über die verschiedenen Algenmengen) bzw. Algeneffekte insgesamt („gemittelt“ über die verschiedenen Verbleibdauern)

Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes¹

Von der Genehmigungsbehörde auszufüllen!

Geschäftszeichen

Antragstellende Einrichtung / Institut / Klinik:

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, vertreten durch den Kaufmännischen Direktor Dr. Philipp Ostwald

durchführende(s) Klinik/Institut: Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.-G. Machens) Klinikum rechts der Isar, Ismaningerstr.22 für die Technische Universität München, Fakultät für Medizin

Telefon:

089-4140-2171

Telefax:

089-4140-6013

E-Mail:

Machens@lrz.tu-muenchen.de

Verantwortliche Leiterin/verantwortlicher Leiter des Versuchsvorhabens:

Priv.-Doz. Dr. med. Riccardo Giunta

Dienstliche Anschrift (*Straße, Haus-Nr., Postleitzahl, Ort*)

s.o.

Telefon:

089-4140-2171

Telefax:

089-4140-6013

E-Mail:

R.Giunta@t-online.de

Stellvertretende Leiterin/stellvertretender Leiter des Versuchsvorhabens:

Dr. Tomas Egana (PhD)

Dr. Thomas Holzbach

Dienstlich Anschrift (*Straße, Haus-Nr., Postleitzahl, Ort*)

s.o.

Telefon:

089-4140-7510

Telefax:

089-4140-6013

E-Mail:

tomasega@gmail.com

Anlagen:

1. Liste der Literaturzitate (s. Punkt 1.1.2)
2. Belastungstabelle (s. Punkt 1.2.7)
3. Aufzeichnungsplan (s. Punkt 1.2.8)
4. Glossar der im Text verwendeten spezifischen Fachausdrücke
5. Statistisches Gutachten vorhanden nicht vorhanden
6. Sonstige:

Übersicht über Ablauf des Versuchs

Hinweise:

- Für jedes Versuchsvorhaben ist ein gesonderter Antrag zu stellen.
- Erläuterungen bitte fortlaufend in das Antragsformular einfügen – nicht auf Beiblatt!
- Sofern der Antragsteller nicht ausdrücklich auf die Anonymisierung verzichtet, sind in den Antragsexemplaren für die Kommission die Hinweise auf den Antragsteller unkenntlich zu machen.

¹ Alle Paragraphenangaben beziehen sich auf das Tierschutzgesetz in der jeweils geltenden Fassung

- Jeder Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens ist nach Absprache mit der zuständigen Regierung in **mehrfacher Ausfertigung** vorzulegen
- Die Planung des Versuchsvorhabens ist auf maximal 3 Jahre anzulegen (3 Jahre Genehmigungsdauer, ggf. zweimal um jeweils 1 Jahr Verlängerung nach hinreichender Begründung)

1. Angaben zum Versuchsvorhaben

Bezeichnung des Versuchsvorhabens ^{A)}
 Entwicklung eines photosynthetisch aktiven dermalen Hautersatzes

Kurzbezeichnung:
 Photosynthetisch aktiver Hautersatz

Finalversuch ^{B)} nach § 8 Abs. 5 a

1.1 Angaben zum wissenschaftlichen Hintergrund

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

Die Untersuchungen sind unerlässlich zum / zur:

- Vorbeugen, Erkennen oder Behandeln von Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder körperlichen Beschwerden oder Erkennen oder Beeinflussen physiologischer Zustände oder Funktionen bei Mensch und Tier
- Erkennung von Umweltgefährdungen
- Prüfung von Stoffen oder Produkten auf ihre Unbedenklichkeit für die Gesundheit von Mensch oder Tier oder auf ihre Wirksamkeit gegen tierische Schädlinge
- Grundlagenforschung

Erläuterungen:

Alltäglich sind Patienten in Krankenhäusern in Behandlung, die in Folge ihrer Grunderkrankungen wie der arteriellen Verschlusskrankheit, Diabetes, Adipositas etc. unter mangelhafter Durchblutung leiden. All diesen Patienten ist gemein, dass sie über den natürlichen Weg der Sauerstoffversorgung, den Weg der Blutgefäße nicht genug Blut und somit Sauerstoff, zur Versorgung ihrer Organe zu Verfügung haben. Die Folgen hiervon können von Wundheilungsstörungen über den Verlust von Extremitäten bis hin zum Tod reichen. Durch die bisher etablierten Methoden zur Verbesserung des Sauerstofftransports über die Blutbahn konnten zwar Erfolge erzielt werden, aber noch immer leiden viele Patienten unter Krankheiten und Symptomen deren Ursache in der Minderversorgung von Gewebe mit Sauerstoff liegt. Somit sind die Suche und die Erforschung von Methoden zur Verbesserung von Sauerstoffversorgung mehr als dringend erforderlich. Fortschritte im Bereich der Gewebeoxygenierung würden weitreichende klinische Konsequenzen nach sich ziehen.

Ein wichtiges Ziel der plastischen Chirurgie ist es den Hautmantel des Menschen wiederherzustellen. Eine wichtige Grundlage für dessen Heilungsprozess ist die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung[1]. Die Verwendung von künstlichen Hautersatzmaterialien zur Geweberegeneration wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht und vielfach beschrieben. Eine Vielzahl von Produkten zur Förderung der Regeneration der Haut sind im Handel erhältlich [2] [3]. Dennoch ist im klinischen Einsatz der künstliche Gewebersatz dem autologen Transplantat meist unterlegen. Insbesondere bei großen Hautdefekten und chronischen Wunden ist die Oxygenierung des Gewebes oft der kritische Punkt im Heilungsprozess [4]. Da bisherige künstliche Materialien für den Gewebersatz zunächst über keine Blutgefäße verfügen, kann nur ungenügende Sauerstoffversorgung stattfinden. Um den klinischen Erfolg von künstlichem Hautersatz voranzubringen, bedarf es daher neuer Strategien.

Alle bisherigen Ansätze zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung von Geweben zielten jedoch darauf ab, die Durchblutungssituation von erkranktem Gewebe zu verbessern in dem sie den Sauerstofftransport aus der Lunge in den Körper über die Blutbahn erleichtern. Unser Ansatz stellt ein völlig neues Novum dar, da in unserem Vorhaben der Sauerstoff direkt dort hergestellt und zur Verfügung gestellt werden soll, wo er gebraucht wird. Ansätze zur Sauerstoffproduktion direkt am Gewebe, also dem Ort des Verbrauchs, sind in der bisherigen Literatur noch unbeschrieben.

In unserem Projekt wird nun erstmalig der Versuch unternommen den Sauerstoffbedarf der Haut durch Produktion des Sauerstoffs direkt in der Haut zu bedienen. Hierfür wurde von unserer Arbeitsgruppe ein bioaktiviertes Scaffold, also eine Kombination aus Kollagenmatrix [5] und photosynthetisch aktiven Algen (*Chlamydomonas reinhardtii*) hergestellt. Wir erwarten, dass hierdurch die dermale Regeneration unterstützt werden kann.

Der verwendete Organismus *Chlamydomonas* ist ein natürlich vorkommender Organismus, der als biologisch sicher eingestuft wird und nachweislich keine viralen oder bakteriellen Krankheitserreger enthält. Es wurden bisher keinerlei schädliche Wirkungen auf den Menschen beschrieben. Zu dem kann er unter GMP Bedingungen (Good Manufacturing Practice, „Gute Herstellungspraktik“) gemäß der Richtlinie 2003/94/EG zur Festlegung der Grundsätze und Leitlinien der Guten Herstellungspraxis für Humanarzneimittel und für zur Anwendung beim Menschen bestimmte Prüfpräparate verwendet werden. Er ist zudem ein sehr vielversprechender und sehr häufig verwendeter Organismus im Bereich der regenerativen Medizin. Ein Grund hierfür ist u.a. die Möglichkeit, ihn bei Bedarf zur Herstellung von rekombinanten humanen Proteinen einzusetzen. Er ist ein Modellorganismus vieler genetischer Untersuchungen und sein gesamtes Genom ist bekannt.

Die lokale Sauerstoffproduktion stellt ein absolutes Novum dar, welches noch nie in einem Organismus untersucht wurde. Es handelt sich daher um eine orientierende Machbarkeitsstudie und nicht um den Nachweis der Überlegenheit eines Verfahrens. Eine Überlegenheit des vorgestellten Verfahrens zu alternativen Methoden der lokalen Gewebsoxygenierung ist nicht möglich oder sinnvoll, da hierzu bisher noch keine Methoden beschrieben wurden.

Unsere bisherigen Ergebnisse mit diesem photosynthetisch aktiven dermalen Hautersatz zeigen, dass die verwendeten Algen eine hohe Biokompatibilität mit der Kollagenmatrix haben und dass durch ihre photosynthetische Aktivität der Sauerstoffbedarf von Fibroblasten in hypoxischer Umgebung gedeckt werden kann. Die bisherigen Ergebnisse wurden an Hand von Experimenten mit isolierten Fibroblasten durchgeführt, da diese einen sehr großen Anteil der Zellen der Haut ausmachen. Zudem sind die Aufnahmemechanismen von Sauerstoff durch die Zellen bei den anderen Zellpopulationen ident, so dass von unseren erfolgreichen *in vitro* Experimenten mit Fibroblasten auf die anderen Hautzellen geschlossen werden kann.

In der hiermit beantragten Machbarkeitsstudie soll nun das entwickelte bioaktivierte Scaffold als Sauerstoffproduzent und –transporter im Wundbereich untersucht werden.

Die photosynthetischen Matrices sollen hierfür an Vollhautdefekten von Mäusen untersucht werden. Hierbei soll die dermale Regeneration und die Lebensfähigkeit der Algen *in vivo* untersucht werden. Am Rücken der Mäuse werden runde Vollhautdefekte gesetzt. Unter Vollhautdefekten versteht man Defekte bei denen werden alle Hautschichten inklusive Subcutis entfernt werden, so dass die Muskelfaszie freiliegt.

Diese Defekte werden in einer Gruppe durch Kollagenmatrices wie sie bereits im Handel sind und in der anderen Gruppe durch photosynthetisch aktive Kollagenmatrices gedeckt. Nach festgesetzter Zeit von 14 Tagen wird der Wundheilungsprozess verglichen und die Matrix entfernt. Die Matrices sollen nach Abschluss des Experiments entfernt werden und hinsichtlich Zellularisation und Vaskularisation histologisch, durch Western Blot und mittels PCR untersucht werden. Hierbei soll das Überleben der Algen, die Vaskularisation [6] und die Sauerstoffproduktion der Matrices gemessen werden.

Diese Machbarkeitsstudie soll am Nacktmausmodell durchgeführt werden. In diesem ersten *in vivo* Versuch wollen wir zeigen, dass durch lokale Produktion von Sauerstoff ein Beitrag zur Sauerstoffversorgung der Haut geleistet werden kann.

Die Verwendung von immundefizienten Tieren wird von uns als der angemessene Schritt gesehen, da die unbehandelten Algen evtl. eine Immunreaktion auslösen könnten. Die Untersuchung der Immunreaktion von Mäusen oder Menschen auf die Algen ist ausdrücklich kein Bestandteil der gegenwärtigen Untersuchungen. Sind unsere Versuche erfolgreich und wir können, wie unsere *in vitro* Ergebnisse erwarten lassen, zeigen, dass durch die Algen eine Sauerstoffversorgung stattfinden kann, so werden in weiteren Studien die Interaktion von Immunsystem und den Algen untersucht werden. In Folgestudien ist die Erprobung am immunkompetenten Tier und anschließend am Großtier geplant.

Sollten im immunkompetenten Tier starke Immunreaktionen auftreten, so haben wir geplant diesen Reaktionen durch das bereits etablierte Verfahren der molekularen Kapselung entgegenzuwirken. Dieses Verfahren, Antigene für das Immunsystem unsichtbar zu machen, ist bereits ausreichend er-

forscht und wird in der Behandlung von Patienten bei der Transplantation von Langerhanszellen des Pankreas eingesetzt^{2,3}. Sollten die Algen starke antigene Eigenschaften besitzen, so ließen sich diese durch Kapselung oder alternative Verfahren vermeiden.

Ein weiterer Aspekt für die Sicherheit späterer klinischer Anwendungen ist zu dem, dass die Algen bei Lichtentzug schnell absterben. Somit könnten die Algen durch Abdecken der betroffenen Areale bei unerwünschtem Wachstum oder bei Therapieabschluss schnell beseitigt werden. Ein unerwünschtes Eindringen der Algen in den Körper ist aus diesem Grund ebenfalls nicht möglich.

Diese Untersuchungen dienen dazu, die Grundlagen für eine spätere humane Anwendung zu schaffen. Langfristig soll mit diesem Modell ein hochinnovativer biologischer Gewebeersatz für Wundoberflächen geschaffen werden, welcher es ermöglicht, a) als Hautersatz zu fungieren und b) Problemwunden zur Abheilung zu bringen.

2 ² Vaithilingam V, Sundaram G, Tuch BE. Islet cell transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2008 Dec;13(6):633-8.

3 ³ Teramura Y, Iwata H. Bioartificial pancreas Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010 Feb 4.

1.1.2 **Wissenschaftlich begründete Darlegung der Unerlässlichkeit des Versuchsvorhabens unter Berücksichtigung des jeweiligen Standes der wissenschaftlichen Erkenntnisse (§ 7 Abs. 2 Satz 2 erster Halbsatz ^{c)})**

Erläuterungen:

Der bei der Photosynthese entstehende Sauerstoff ist Voraussetzung für das menschliche Leben auf der Erde [7]. Wir postulieren, dass lokale Gewebsoxygenierung mittels Photosynthese die Viabilität von Gewebe in hypoxischen Situationen verbessert. Durch eine photosynthetisch oxygenierte Matrix wird es Zellen, Fibroblasten wie einsprossenden Endothelzellen leichter fallen, in der primär avaskulären Matrix zu überleben und eine funktionelle Angiogenese in Gang zu setzen, welche dann eo ipso eine Verbesserung der Vaskularisierung und Zellularisierung in einem dann stabilisierten biologischen Milieu erreichen kann. Einwandernde Makrophagen können danach die transplantierten und später funktionslosen Algenzellen beseitigen.

Wir konnten bereits in vitro nachweisen, dass die verwendeten Algen eine hohe Biokompatibilität mit der Kollagenmatrix haben, indem sie der Matrix adhärent bleiben und dass durch ihre photosynthetische Aktivität der Sauerstoffbedarf von Bindegewebszellen (Fibroblasten) in hypoxischer Umgebung gedeckt werden kann. Da die Möglichkeiten der in vitro Versuche ausgeschöpft sind und diese Versuche vollständig und erfolgreich abgeschlossen wurden, ist es vor einer möglichen Anwendung am Menschen unerlässlich, die Algen-Kollagen-Matrix nun in einem Gesamtorganismus zu testen.

Das beantragte Versuchsvorhaben ist daher zunächst nötig, um die Hypothese zu bestätigen, dass Gewebeoxygenierung durch photosynthetischaktive Matrices möglich ist (Machbarkeitsstudie). Hierfür soll folgendes untersucht werden:

1. Überlebensfähigkeit, Verteilung und funktionelle Interaktion von Chlamydomonas, Trägermatrix und umliegendem Gewebe.
2. Photosyntheseaktivität der mit Chlamydomonas besiedelten Matrices in vivo.
3. Veränderung/Verbesserung der dermalen Regeneration durch photosynthetischaktive Matrices.
4. Vaskularisierung der photosynthetisch aktiven Matrices.

Kurze Zusammenfassung der Zielsetzungen des Versuchsvorhabens:

Das vorliegende Projekt soll die Hypothese bestätigen, dass Gewebeoxygenierung durch photosynthetischaktive Matrices möglich ist und fokussiert auf folgende Aspekte der Gesamtfragestellung:

- Überlebensfähigkeit, Verteilung und funktionelle Interaktion von Chlamydomonas, Trägermatrix und umliegendem Gewebe.
- Photosyntheseaktivität der mit Chlamydomonas besiedelten Matrices in vivo.
- Veränderung/Verbesserung der dermalen Regeneration durch photosynthetischaktive Matrices.
- Vaskularisierung der photosynthetisch aktiven Matrices.

1.1.3 **Wissenschaftlich begründete Darlegung, dass der Versuchszweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren (z. B. Zellkulturen, isolierte Organe etc.) als den Tierversuch erreicht werden kann (§ 7 Abs. 2 Satz 2 zweiter Halbsatz)**

Erläuterungen:

Das Ziel des Versuchsvorhabens ist die Entwicklung eines photosynthetisch aktiven dermalen Hautersatzes. In Vorbereitung auf diesen Antrag wurde bereits eine Reihe von Experimenten von uns in vitro durchgeführt. Hierdurch konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Chlamydomonas sind in Kollagen Matrices lebens- und proliferationsfähig.
- Chlamydomonas betreiben Photosynthese in den Matrices.
- Sauerstoffbedarf von Zellen in der Matrix kann durch Photosynthese der Algen gedeckt werden.

Mit diesen Ergebnissen soll nun der Schritt zur in vivo Machbarkeitsstudie getätigt werden.

Die noch offenen und oben genannten Fragestellungen erfordern die Untersuchung der photosynthetischaktiven Matrices im lebenden Organismus. Diese Fragen können nur durch Versuche an lebenden Tieren beantwortet werden, weil nur deren Gewebe entsprechende Vaskularisations- und Proliferationsaktivität aufweist und die Frage nach Gewebsoxygenierung durch Photosynthese nur im Gesamtorganismus beantwortet werden kann.

Neben der Beantwortung der oben genannten Fragestellungen sollen diese Versuche auch den Weg für eine spätere Verwendung von photosynthetisch aktivem dermalen Hautersatz beim Menschen vorbereiten.

1.1.4 Ausschöpfung zugänglicher Informationsmöglichkeiten (§ 8 Abs. 3 Nr. 1 Buchstabe b) Welche Informationsmöglichkeiten wurden genutzt ^{D)}?

- bitte Anlage „Liste der Literaturzitate“ beifügen -

Schlüsselwörter:

photosynthetic wound
photosynthetic dermal replacement
photosynthetic dermal
photosynthesis dermal regeneration
Chlamydomonas
Chlamydomonas wound
Chlamydomonas wound healing
Chlamydomonas matrix
Chlamydomonas tissue
Chlamydomonas tissue engineering
Chlamydomonas biocompatibility
Chlamydomonas human
Etc.

Bei der Recherche unter Verwendung dieser Suchbegriffe und der entsprechenden Erweiterungen ergaben sich keine Hinweise darauf, dass das hier beantragte Versuchsvorhaben bis dato publiziert wurde.

Erläuterungen (z.B. Art. der Recherche):

Die Arbeitsgruppe verfügt über eine umfangreiche Literatursammlung zur genannten Fragestellung auf der Grundlage einer wöchentlich aktualisierten MEDLINE Recherche.

1.1.5 Handelt es sich um einen Doppel- oder Wiederholungsversuch ^{E)}?

Ja Nein

Wenn ja, wissenschaftlich begründete Darlegung, dass die Überprüfung bereits bekannter Versuchsergebnisse durch das beantragte Versuchsvorhaben unerlässlich ist.

Erläuterungen:

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

1.1.6.1 Vorgesehene Tierarten und Begründung für die Wahl der Tierart (§ 9 Abs. 2 Satz 3 Nr. 1 ^{F)}). Ggf. Angabe des gentechnisch veränderten Tierstamms und Beschreibung dieser Linie.

Erläuterungen:

Das Experiment soll im Tiermodell der Nacktmaus (nude mice) durchgeführt werden. Es handelt sich dabei um die kleinstmögliche Tierart, die einerseits anatomisch zum Menschen vergleichbare Voraussetzungen bietet und gleichzeitig morphologisch ausreichend groß dimensioniert ist. Immundefiziente Mäuse werden verwendet, da die unbehandelten Algen evtl. eine Immunreaktion auslösen könnten.

Bisher wurden annähernd alle Versuche zur Neovaskularisation von dermalen Matrices mit dem Tiermodell der Nacktmaus durchgeführt. Durch Verwendung dieses Modells, welches ein weit verbreitetes und standardisiertes Verfahren ist, sind exzellente Vergleichsmöglichkeiten gegeben [8]. Durch Verwendung eines Standardmodells kann die Anzahl der Versuche reduziert werden. Mit diesem Tiermodell besteht in unserer Abteilung eine langjährige Erfahrung.[9]
Wegen der geringeren Rate an Immunreaktionen gegen das Implantat ist die Durchführung der Experimente mit einer geringeren Anzahl an Tieren möglich.

Die Versuche sind ohne gravierende Leiden für die Tiere durchführbar. Aus unserer Erfahrungen mit bisher über 200 Operationen mit diesem Modell an der Universität zu Lübeck wissen wir, dass die Tiere diese Fremdkörper sehr gut vertragen und nur in seltenen Fällen eine Autophagie betreiben. Ein Lecken, Nagen oder Kratzen an der Wunde wird in diesem Modell nur selten beobachtet.

1.1.6.2 Vorgesehene Anzahl und Begründung für die Anzahl der Tiere einschließlich Angaben zur biometrischen Planung (§ 9 Abs. 2 Satz 3 Nr. 2^{G)}

– ggf. Anlage „Statistisches Gutachten“ beifügen –

Tierart	Gesamtanzahl (incl. Reservetiere)
Nackt-maus	14 (12 + 2)

Angaben zur biometrischen Planung

Bitte achten Sie darauf, dass die Erläuterungen folgende Angaben enthalten:

- biometrische Auswertverfahren (mit Begründung)
- Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art
- Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art
- Biologisch relevante Differenz
- Annahmen zu Variabilität der Hauptzielgröße(n) (mit Begründung)

Erläuterungen:

Die oben genannten Zielgrößen sollen an zwei Gruppen untersucht und verglichen werden. In beiden Gruppen werden Defekte gesetzt und diese mit Kollagenmatrices bedeckt. Bilaterale Defekte mit Verwendung verschiedener Matrices und damit eines jeden Tieres als eigene Kontrolle sind in diesem Falle nicht sinnvoll, weil nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Bioaktivität biologisch verschiedener bilateraler Matrices eine gegenseitige zellmetabolische Beeinflussung generiert. In der Versuchsgruppe (Gruppe1) werden die bioaktivierten Scaffolds verwendet. In der Kontrollgruppe (Gruppe2) werden herkömmliche Kollagen Scaffolds verwendet. Für jede Gruppe ist es ausreichend 6 Tiere plus 1 Ersatztier zu verwenden. Eine Gesamtzahl an Tieren von 14 scheint daher angemessen.

Hauptzielgröße(n):

Die Hauptzielgrößen für beide Gruppen werden durch folgende Untersuchungen bestimmt:

Transillumination:

Vergleich der Vaskularisierung der photosynthetisch aktiven Matrices mit den unbehandelten Kollagenmatrices. Quantifizierung der Vaskularisierung der Matrices durch Transillumination (Hama, LP 5000K, Germany) und digitale Segmentierung und anschließende Angabe der vaskularisierten Fläche in Prozent der Gesamtfläche.

Erwartung: Wir erwarten, dass bei der Größe der vaskularisierten Fläche (in Prozent der Gesamtfläche) zu Unterschieden von etwa 10-20 % im Vergleich zur nicht behandelten Matrix kommt.

Photosyntheseaktivität der hergestellten photosynthetisch aktiven Matrices:

Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen in der Matrix nach Entfernung der Matrices aus der Wunde unter hypoxischen (1% O₂) Bedingungen. Die Sauerstoffproduktion in hypoxischer Umgebung wird über 16 h kontinuierlich gemessen (PreSence systems, Germany).

Erwartung: Wir erwarten, dass die Sauerstoffproduktion in den photosynthetisch aktiven Matrices nach 16h um mehrere Hundert Prozent höher ist als in den nicht behandelten Matrices.

Immunohistologie:

Proliferation, Hypoxie und Apoptose der Zellen in der Matrix als Parameter für die Wundregeneration.

Ki67 Proliferation

HIF-1 α Hypoxie

Caspases 3, 8 and 9 Apoptose

Western Blot:

Quantifizierung von Proliferation, Hypoxie und Apoptose:

Ki67 Proliferation

HIF-1 α Hypoxie

Caspases 3, 8 and 9 Apoptose

Erwartung: Wir erwarten dass die Zellzahl und Proliferationsrate in der photosynthetisch aktiven Matrix zumindest 10 % über der Zellzahl der unbehandelten Kollagenmatrix liegt und dass das Ausmaß an Hypoxie signifikant gesenkt wird.

Histologie:

Hauptzielgröße: Zellzahl: Anzahl der lebenden Chlamydomonas Algen pro mm² in den Matrices.

Erwartung: Wir erwarten, dass nach drei Wochen noch etwa 30% der ursprünglich eingebrachten Chlamydomonas Algen lebendig sind.

Als Nebenzielgröße wird vor der Explantation der Matrices die dermale Regeneration der Wunden untersucht. Hierfür wird das Ausmaß der Wundkontraktionen, Infektionen und Reepithelialisierung direkt am Tier beobachtet werden. (Die gesamte weitere Auswertung erfolgt an den explantierten Matrices.)

Nebenzielgrößen:

Die Gesamtzahl aller Zellen in den Matrices soll mittels DAPI Färbung ermittelt werden. Zusätzlich erfolgt Bestimmung von mRNA durch PCR zur Quantifizierung der Menge an Algen im Vergleich zur Ausgangsmenge.

Nebenzielgröße(n):

s.o.

Studientyp

a) Orientierungsstudie

b) Vergleichsstudie

Es werden folgende biometrische Verfahren zur Auswertung eingesetzt:

- Deskriptive Statistiken : Median, Spannweite, Mittelwert, Standardabweichungen, 95% Konfidenzintervalle Median / Mittelwert-
Explorative Analysen: lineare gemischte Modelle (3 x 3 Faktor-Design)

Die vorgesehene Tierzahl und Gruppengröße ist zur statistischen Absicherung mit

- einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art von

5% zweiseitig (lokales Signifikanzniveau innerhalb explorativer Analysen)

- einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art von

-entfällt-

- einer biologisch relevanten Differenz

-entfällt-

notwendig

Die biometrische Planung ist ggf. durch das Gutachten einer Statistikerin/eines Statistikers zu erläutern.

1.1.6.3 Handelt es sich um eigens für Tierversuche gezüchtete Tiere (§ 9 Abs. 2 Satz 3 Nr. 7 Satz 1 ^{H)})

Ja

Aus welcher/welchen Zucht/Zuchten (Name und Anschrift) stammen die Tiere?

Charles River Laboratorien, Sulzfeld

Nein

Es handelt sich um

Landwirtschaftliche Nutztiere ^{H)}

Antrag auf Zulassung einer Ausnahme nach § 9 Abs. 2 Satz 3 Nr. 7 Satz 2 ist gesondert beigefügt

für aus der Natur entnommene Tiere

für nicht aus der Natur entnommene Tiere

1.2 Angaben zur praktischen Durchführung

1.2.1 Angabe des Ortes der Versuchstierhaltung und des Durchführungsortes, vorgesehener Beginn (Datum) und voraussichtliche Dauer des Versuchsvorhabens (§ 8 Abs. 2 Satz 3 i.V.m. § 8a Abs. 2 Nr. 4)

Ort der Versuchstierhaltung:

Zentrum für Präklinische Forschung ZPFKlinikum rechts der Isar Technische Universität München Ismaningerstr.22 81675 München

Ort der Versuchsdurchführung

Zentrum für Präklinische Forschung ZPFKlinikum rechts der Isar Technische Universität München Ismaningerstr.22 81675 München

Beginn:

unmittelbar nach Genehmigung

Dauer:
3 Jahre

1.2.2 Beschreibung der Haltungsbedingungen, des Hygienemanagements und der Vorbereitung der Tiere auf den Versuch. ^{u)}

Erläuterungen:

Die Haltung der Tiere erfolgt in speziellen einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Mäusen (Tecniplast-IVC). 4 bis zu 6 Mäuse werden dabei in einem Mäusekäfig (Typ- I Superlong; Gundfläche 16 x 37 cm) gehalten. Futter (Autoklaviertes Mäusefutter Fa. Altromin) und Wasser (autoklaviertes Trinkwasser bei zweimaligem Flaschenwechsel pro Woche) erhalten die Tiere ad libitum. Spezielles Holzgranulat dient als Einstreu bei 0,5 – 2 Wechsel pro Woche. Nestbaumaterial wird als autoklavierter Zellstoff zur Verfügung gestellt. Die Räume sind speziell als Tierhaltungsräume konzipiert (Personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Klimatisierung, Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase). Die Haltung der Tiere erfolgt in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen.

Das Hygienemanagement erfolgt gem. den Empfehlungen der FELASA und basiert auf der regelmäßigen Untersuchung von Sentinel-Tieren. Die Untersuchungen werden von einem externen qualitätszertifizierten Fachlabor durchgeführt. Der Betriebsablauf innerhalb des ZPF ist durch entsprechende Hygieneregeln definiert (Hygiene SOPs).

Vorbereitung und Narkose der Tiere:

Die Narkose wird in der Ganzkörperkammer mit Isofluran 3,5% als Inhalationsnarkose eingeleitet und anschließend in der Kopfkammer mit Isofluran 2,5% weiter geführt.

Als präemptive Analgesie wird den Tieren nach dem Einleiten der Narkose einmalig Buprenorphin s.c. (0,01 mg/kg) verabreicht.

Als nächstes erfolgt die Lagerung des Versuchstieres auf einer Isoliermatte in Bauchlage mit lockerer Fixierung der Vorder- und Hinterläufe in Spreizstellung. Die Vorbereitungen schließen mit sorgfältiger Desinfektion und steriler Abdeckung des OP-Gebietes. Alle Operationen erfolgen unter sterilen Operationsbedingungen.

1.2.3 Beschreibung der praktischen Durchführung aller Eingriffe und Behandlungen bezogen auf die jeweilige Tierart in ihrer Art und Dauer und Berücksichtigung des Betäubungsverfahrens (§ 8 Abs. 2 Satz 3 i. V. m. § 8 a Abs. 2 Nr. 3 ^{u)}).

Erläuterungen:

Setzen der Vollhautdefekte:

Unter Narkose werden am Rücken bilaterale 15 mm durchmessende, runde Vollhautdefekte gesetzt. Unter Vollhautdefekten versteht man Defekte bei denen alle Hautschichten inklusive Subkutis entfernt werden, so dass die Muskelfaszie freiliegt.

Anschließend werden die Defekte mittels bioaktivierten Scaffolds(Gruppe 1) bzw. herkömmlicher Kollagenmatrix (Integra) (Gruppe 2), gedeckt. Zur Vermeidung von Artefakten beim späteren Entfernen der Matrices wird unter ihnen ein titanisiertes Kunststoffnetz (TIMESH, GfE Medizintechnik GmbH, Deutschland) eingelegt. Die Kunststoffnetze haben nur im Experiment eine Funktion; nicht jedoch in einer potentiellen klinischen Anwendung. Sie geben bei der Auswertung die Möglichkeit nach Explantation zwischen Zellen des ursprünglichen Wundgrunds und Zellen in der Matrix zu unterscheiden. Sie dienen zudem dazu, eine Revaskularisation aus dem Wundgrund unter standardisierten Bedingungen zu erhalten. Am Ende des Experiments nach 14 Tagen erleichtert das Titannetz die Entfernung der Matrix, so dass die Evaluation der Zellularisation und Vaskularisation der Matrix untersucht werden kann. In der Klinik wird die Heilungssituation etwas besser sein als mit dem Netz, welcher ein Fremdkörper darstellt.

In der Zeit bis zur Explantation werden die Tiere regelmäßig auf Anzeichen von Schmerzen untersucht:

Als mögliche Anzeichen von Schmerzen werden u.a. folgende Parameter herangezogen:
- reduziertes Allgemeinbefinden,

- Nahrungsverweigerung
- Bewegungsarmut
- Körperhaltung
- Änderungen der Verhaltensänderungen wie v. a. verminderte soziale wie motorische Aktivität (Sich-Zurückziehen) aber auch Anzeichen von Aggression.
- Das Bemühen der Tiere, die Fremdkörper zu entfernen.
- Abwehrreaktionen und Lautäußerungen bei Palpation der betroffenen Areale

Explantation:

Explantation erfolgt nach durchgeführter Euthanasie. Die Euthanasie erfolgt nach dem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen durch intraperitoneale Injektion von 150mg/kg KG Pentobarbital (Narcoren[®], Fa. Merial, Hallbergmoos).

1.2.4 Werden schmerzhaft Eingriffe ohne Betäubung durchgeführt?

- Ja Nein

Wenn ja:

Erläuterungen:

1.2.5 Beschreibung und Begründung von Maßnahmen bzw. deren Unterlassung zur Schmerzlinderung nach Abklingen der Betäubung

- Der Grad der zu erwartenden postoperativen Schmerzen ist so gering, dass eine analgetische Behandlung nicht erforderlich ist
- Präemptive Analgesie ist vorgesehen
- Die zu erwartenden Schmerzen und Leiden können wegen Beeinträchtigung des Versuchsablaufs nicht behandelt werden
- Sonstige

Erläuterungen:

Die Schmerzen durch Vollhautdefekte sind in der Regel gering. Beim Setzen der Defekte werden die sensiblen Nervenfasern der Haut durchtrennt. Daher ist der entstandene Defekt als asensibel (= ohne Empfindung) einzustufen. Zur Einstufung der Schmerzen haben wir uns an die vom Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragter herausgegebene „Orientierungshilfe des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter zur Einstufung in Belastungsgrade für genehmigungspflichtige Tierversuche“ orientiert. Vollhautdefekte sind hierin nicht expliziert aufgeführt. Das Setzen eines Vollhautdefektes entspricht anatomisch und operationstechnisch einer Hautbiopsie, so dass die Schmerzen entsprechend sind. In Anlage 1.6.7 werden dort Hautbiopsien als geringe Belastung beschrieben, selbst wenn sie nur unter Lokalanästhesie gesetzt werden. Zum Vgl.: Menschen denen Vollhautdefekte (z.B.: bei Entfernung von Hauttumoren) gesetzt werden und mit temporärem künstlichen Hautersatz gedeckt werden, bekommen i.d.R. nur während der OP und ggfs. am OP Tag eine Schmerzmedikation, aber nicht darüber hinaus.

Als präemptive Analgesie wird den Tieren nach dem Einleiten der Narkose einmalig Buprenorphin s.c. (0,01 mg/kg) verabreicht. Am Folgetag, ca. 12 h später ist eine weitere Dosis Buprenorphin s.c. (0,01 mg/kg) vorgesehen. Bei Anzeichen für weitere Schmerzen des Tieres werden weitere Dosen im 12h Takt zur Verwendung kommen.

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

Ja Nein

Wenn ja:

Erläuterungen:

1.2.7 Beschreibung und Bewertung der Belastung (Intensität und Dauer von Schmerzen oder Leiden) oder Schäden bezogen auf die jeweilige Tierart in Anlehnung an die Ausführungen zu Ziff. 1.2.3^{K)} unter Benennung konkreter Abbruchkriterien

- bitte Anlage „Belastungstabelle“ beifügen -

Erläuterungen:

Alle Eingriffe erfolgen in inhalativer Allgemeinnarkose, so dass während dieser Zeit keine Schmerzen oder Leiden zu erwarten sind. Bei komplikationslosem postoperativen Verlauf und unter systemischer Analgesie für die ersten postoperativen 24 h ist die Belastung der Tiere bis zum Beobachtungsende (14 Tage post-OP) als gering einzustufen. Um die Belastung der Tiere zu minimieren ist eine präemptive Analgesie der Tiere nach dem Einleiten der Narkose mit einmalig Buprenorphin s.c. (0,01 mg/kg) vorgesehen. Am Folgetag, ca. 12 h später ist eine weitere Dosis Buprenorphin s.c. (0,01 mg/kg) vorgesehen. Bei Anzeichen für weitere Schmerzen des Tieres werden weitere Dosen im 12h Takt zur Verwendung kommen.

Nach dem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen erfolgt die Euthanasie durch intraperitoneale Injektion von 150mg/kg KG Pentobarbital (Narcoren®, Fa. Merial, Hallbergmoos) und operative Entfernung der Matrices.

Allgemeine Abbruchkriterien:

- Gewichtsabnahme \geq 15%
- reduziertes Allgemeinbefinden / Nahrungsverweigerung / Bewegungsarmut

Versuchsspezifische Abbruchkriterien:

- Wundinfektion
- Automutilation

Durch diese Abbruchkriterien sollen den Tieren Belastungen, die mehr als „mäßig“ einzustufen sind, erspart werden.

1.2.8 Aufzeichnungen (§ 9 a^{L)})

Ein Muster des Aufzeichnungsplanes ist dem Antrag beizufügen.

1.3 Ethische Vertretbarkeit des Versuchs (§ 7 Abs. 3^{M)})

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

Erläuterungen:

Wundheilungsstörungen durch unzureichende Gewebeoxygenierung ist ein häufiges klinisches Problem. Eine Minderversorgung von Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen verhindert die korrekte Abfolge der physiologischen Wundheilung und es resultiert ein Verlust von Flüssigkeit und Proteinen. Die Entstehung von Nekrosen verschlechtert zusätzlich die insuffiziente Nährstoffversorgung des Gewebes, verhindert die Bildung von Granulationsgewebe und fördert die Besiedlung mit Keimen. Häufig werden schlecht heilende Wunden mehrmals einem chirurgischen Debridement mit Entfernung von nekrotischem Gewebe und Fibrinbelägen unterzogen und es erfolgt letztendlich die Defektdeckung mit körpereigenem Gewebe wie beispielsweise Spalthauttransplantaten oder freier Lappen-

plastiken. Dermaler Hautersatz mit verbesserter Gewebsoxygenierung durch Photosynthese könnte nicht nur die Heilungszeit verkürzen und die Notwendigkeit chirurgischer Intervention mit Risiken und möglichen Sekundärdefekten reduzieren, sondern schon die Entstehung von Wundheilungsstörungen verhindern.

Auf Grund der zu erwartenden Fortschritte und Verbesserungen im Bereich des dermalen Hautersatzes nicht nur im Feld der Plastischen Chirurgie sondern auch in zahlreichen anderen Fachgebieten stehen die Belastungen der Tiere in angemessenen Verhältnis zu dem erwarteten therapeutischen Erkenntnisgewinn. Wir halten die Versuche daher für ethisch vertretbar.

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

Erläuterungen:
nicht zutreffend

1.4 Verfahren am Versuchsende

Beabsichtigter Verbleib der Tiere:

- Tötung während des Versuchs bzw. vor Erwachen aus der Narkose (Methode:)
- Tötung nach einer Beobachtungszeit von 14 Tg. (Methode: intraperitoneale Injektion von 150mg/kg KG Pentobarbital)
- Weiterleben der Tiere ohne Beeinträchtigung des Wohlbefindens.

2. Personelle Voraussetzungen

2.1 Leitung des Versuchsvorhabens und Stellvertretung (§ 8 Abs. 3 Nr. 2^{NJ})

2.1.1 Leiterin/Leiter des Tierversuchsvorhabens

Name:

Priv.-Doz. Dr. med. Riccardo Giunta

- Tierärztin/Tierarzt
- Biologin/Biologe – Fachrichtung Zoologie
- Biologin/Biologe
- Ärztin/Arzt
- _____

Nachweis der Ausbildung und der tierexperimentellen Erfahrung (in welchen Bereichen wurde bisher tierexperimentell gearbeitet?):^O

- ist beigefügt
- ist bereits mit Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531-68/02 bei dieser Genehmigungsbehörde vorgelegt worden

2.1.2 Stellvertretende Leitung des Tierversuchsvorhabens

Name:

- Tierärztin/Tierarzt
- Biologin/Biologe – Fachrichtung Zoologie
- Biologin/Biologe
- Ärztin/Arzt
- _____

Nachweis der Ausbildung und der tierexperimentellen Erfahrung (in welchen Bereichen wurde bisher tierexperimentell gearbeitet?):^{o)}

- ist beigefügt
- ist bereits mit Geschäftszeichen _____ bei dieser Genehmigungsbehörde vorgelegt worden

2.2 Personen, die im Rahmen der Versuchsdurchführung Eingriffe und Behandlungen an Tieren durchführen^{p)}

Sofern für einzelne Personen eine Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs. 1 Satz 4 erforderlich ist, verwenden Sie bitte das eigens dafür vorgesehene Formular^{o)}

2.2.1 Personen mit abgeschlossenem Hochschulstudium (Approbation / Diplom beilegen)

Name	Studienrichtung	Art der Versuchsbeteiligung (operative, nichtoperative Eingriffe, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen u. Laborarbeiten etc.)	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde
Dr. Thilo Schenck	Medizin	Alle operativen Eingriffe	5 Monate	
Dr. Thomas Holzbach	Medizin	Alle operativen Eingriffe	6 Jahre	68/02

2.2.2 Doktorandinnen/Doktoranden bzw. Diplomandinnen/Diplomanden ohne Studienabschluss (Immatrikulationsbescheinigung beilegen)

Name	Studienrichtung	Art der Versuchsbeteiligung (operative, nichtoperative Eingriffe, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen u. Laborarbeiten etc.)	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde

2.2.3 Nichtakademisches, technisches und pflegerisches Personal

Name	Beruf	Art der Versuchsbeteiligung (Behandlungen, Verlaufskontrollen, Blutentnahmen u. Laborarbeiten etc.)	Tierexperimentelle, versuchstierkundliche Erfahrung bzw. Fachkenntnisse in Versuchstierhaltung und -pflege (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde

2.3 Im Falle einer Betäubung Namen der Personen, welche die Betäubung durchführen oder die Durchführung der Betäubung beaufsichtigen ^{R)}:

Name	Beruf	Tierexperimentelle, versuchstierkundl. Erfahrung (Zeitangabe)	Bereits vorliegende Geschäftszeichen dieser Genehmigungsbehörde
Priv.-Doz. Dr. med. R. Giunta	Arzt	8 Jahre	68/02
Dr. med. univ. Dipl. Wi.-Ing. (FH) Thilo Schenck	Arzt	5 Monate	
Dr. Tomas Egana (PhD)	Biologe	8 Jahre	
Dr. Thomas Holzbach	Arzt	6 Jahre	68/02

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

2.4.1 Sind die genannten Personen bei der Einrichtung beschäftigt?

Ja Nein

2.4.2 Wenn nein, sind sie mit Zustimmung der verantwortlichen Leitung der Einrichtung zur Benutzung der Einrichtung befugt?

Ja

Art und Umfang der Befugnisse:

Volle Zugangsberechtigung zu allen Tierräumen und volle Verfügungsgewalt über die Tiere.

2.5 Personen, die für die Pflege, Betreuung und medizinische Versorgung der Versuchstiere verantwortlich sind:

2.5.1 Namen, dienstliche Anschrift und Qualifikation der für die Pflege und Betreuung der Tiere verantwortlichen Personen:

Name	Dienstliche Anschrift	Qualifikation
R. Bergmeyer (Tierpflegemeisterin)	Zentrum für Präklinische Forschung - ZPF Klinikum rechts der Isar Technische Universität München Ismaningerstr.22 81675 München	Tierpflegemeisterin

2.5.2 Namen, dienstliche Anschrift und Qualifikation der für die medizinische Versorgung verantwortlichen Personen:

Name	Dienstliche Anschrift	Qualifikation
Priv.-Doz. Dr. med. R. Giunta	Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie Klinikum rechts der Isar Technische Universität München Ismaningerstr.22 81675 München	Facharzt für Plastische Chirurgie, Handchirurgie
Dr. med. univ. Dipl. Wi.-Ing. (FH) Thilo Schenck	Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie Klinikum rechts der Isar Technische Universität München Ismaningerstr.22 81675 München	Arzt
Dr. Tomas Egana (PhD)	Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie Klinikum rechts der Isar Technische Universität München Ismaningerstr.22 81675 München	Biologe
Dr. Thomas Holzbach	Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie Klinikum rechts der Isar Technische Universität München Ismaningerstr.22	Arzt

2.5.3 Name und dienstliche Anschrift der Tierärztin/des Tierarztes, der/dem nach Abschluss des Versuchs die überlebenden Tiere der in § 9 Abs. 2 Satz 3 Nr. 8 genannten Arten vorgestellt werden:

Name	Dienstliche Anschrift
entfällt	

3. Organisatorische Voraussetzungen

3.1 Tierschutzbeauftragte/Tierschutzbeauftragter

Name	Dienstliche Anschrift, Telefon, Telefax, E-Mail

Dr. Thomas Brill - amtsbekannt -	Zentrum für Präklinische Forschung - ZPF Klinikum rechts der Isar Technische Universität München Ismaningerstr.22 81675 München Tel: 089-4140-4464 Fax: 089-4140-6182
-------------------------------------	---

3.2 Sind die Voraussetzungen zur Aufgabenerfüllung der Tierschutzbeauftragten/des Tierschutzbeauftragten (§ 8 b)?

Ja Nein Siehe Stellungnahme Tierschutzbeauftragte/Tierschutzbeauftragter

3.3 Hat die Tierschutzbeauftragte/der Tierschutzbeauftragte eine Stellungnahme nach § 8 b Abs. 3 Nr. 3 abgegeben?

liegt bei wird nachgereicht

3.4 Sind die zur Durchführung des Versuchsvorhabens erforderlichen Anlagen, Geräte und sonstigen sachlichen Mittel vorhanden?

Ja Nein Siehe Stellungnahme Tierschutzbeauftragte/Tierschutzbeauftragter

3.5 Sind die notwendigen organisatorischen Voraussetzungen gegeben?

Ja Nein Siehe Stellungnahme Tierschutzbeauftragte/Tierschutzbeauftragter

3.6 Ist eine den Anforderungen des § 2 entsprechende Unterbringung und Pflege einschließlich der Betreuung der Tiere sowie ihre medizinische Versorgung sichergestellt an den jeweiligen Orten?

Ja Nein Siehe Stellungnahme Tierschutzbeauftragte/Tierschutzbeauftragter

Anonymisierung des Antrags:

Ich verzichte auf eine Anonymisierung des Antrags Ja Nein

(Im Falle einer gewünschten Anonymisierung müssen die für die Kommission vorgesehenen Unterlagen anonymisiert und gekennzeichnet beigefügt werden)

München 25.10.2009

Ort, Datum

 Unterschrift Antragstellerin/Antragsteller
 (Leitung der wissenschaftlichen Einrichtung)

 Unterschrift der verantwortlichen Leiterin/des verantwortlichen Leiters des Vorhabens

 Unterschrift der stellvertretenden Leiterin/des stellvertretenden Leiters des Vorhabens

Unterschrift der Tierschutzbeauftragten/des Tierschutzbeauftragten
(In den Regierungsbezirken Oberbayern, Niederbayern und
Schwaben zwingend erforderlich)

Hinweise:

- A) Die Bezeichnung des Vorhabens sollte möglichst knapp und prägnant formuliert sein, sowie maximal 2 Zeilen umfassen.
- B) Ein Finalversuch ist dadurch gekennzeichnet, dass der Versuch am betäubten Tier durchgeführt wird und das Tier noch unter dieser Betäubung getötet wird. Vor der Betäubung werden jedoch keinerlei Eingriffe oder Behandlungen an dem Tier vorgenommen.
- C) Die Unerlässlichkeit eines Versuchsvorhabens ist durch eine kurze, keine Spezialkenntnisse voraussetzende, wissenschaftlich begründete Darstellung der Problem- oder Fragestellung darzulegen. Hierbei sind die einschlägigen, den derzeitigen Erkenntnisstand widerspiegelnden Publikationen (Literaturzitate) einzubringen und auf ihre Relevanz oder auch Widersprüchlichkeit im Hinblick auf das Forschungsprojekt zu diskutieren. Aus dieser Diskussion sollte in verständlicher Form neben der eigenen Standortbestimmung auch das weitere Procedere zur Problemlösung und der zu erwartende Erkenntnisgewinn hervorgehen.
- D) Aus der Darlegung muss ersichtlich sein, inwieweit die zugänglichen Informationsmöglichkeiten (z. B. Literatur, Datenbanken) bereits hinreichende Erkenntnisse über das angestrebte Versuchsergebnis enthalten oder nicht. Die zu Ziff. 1.1.2 geforderten Literaturzitate sind auf einem Beiblatt mit Fundstelle aufzulisten. Hinsichtlich der Datenbankrecherchen sind die Schlüsselwörter anzugeben.
- E) Doppelversuche sind Versuchsvorhaben, die in einem gleichen Zeitraum mit gleichen Methoden, an derselben Tierart und mit gleicher Zielsetzung durchgeführt werden (z. B. Ringversuche zur Validierung und Standardisierung). Wiederholungsversuche sind Versuchsvorhaben, die zur Überprüfung bereits hinreichend bekannter Versuchsergebnisse durchgeführt werden.
- F) Versuche an höher entwickelten Tieren, insbesondere warmblütigen Tieren, dürfen nur durchgeführt werden, soweit Versuche an sinnesphysiologisch niedriger entwickelten Tieren für den verfolgten Zweck nicht ausreichen (§ 9 Abs. 2 Nr. 1). Bei der Beurteilung, ob ein Tier sinnesphysiologisch niedriger entwickelt ist, ist auf die vermutete geringere Schmerzempfindlichkeit abzustellen. Ein Maßstab für die Schmerzempfindlichkeit ist die sich in der zoologischen Systematik ausdrückende Zerebralentwicklung der Tiere. (Ferner dürfen Wirbeltiere für Tierversuche nur verwendet werden, wenn sie für diesen Zweck gezüchtet wurden. Eine Ausnahme hiervon kann dann zugelassen werden, wenn
- für Versuchszwecke gezüchtete Tiere der betreffenden Art nicht zur Verfügung stehen,
 - der Zweck des Tierversuchs die Verwendung von Tieren anderer Herkunft erforderlich macht (§ 9 Abs. 2 Nr. 7).
- Unter Berücksichtigung dieser grundsätzlichen Erwägungen ist das "Tiermodell" zu wählen, das versuchstechnisch gesehen eine möglichst optimale Beantwortung der Fragestellung erlaubt. Sind mehrere Tierarten oder Tiermodelle für die Beantwortung einer Fragestellung geeignet, müssen die Alternativen diskutiert und die endgültige Wahl begründet werden.)
- G) Die Planung sollte unter Einsatz biometrischer Verfahren aus vergleichbaren Versuchsansätzen vorgenommen werden. Auf die Ergebnisse dieser Planung ist in der Begründung einzugehen. Zusätzlich sind Angaben über die Einteilung in Versuchsgruppen bzw. Kontrollgruppen sowie über die Gruppengrößen vorzunehmen.
- H) Als zu Versuchszwecken gezüchtet (§ 9 Abs. 2 Nr. 7) sind nur Wirbeltiere anzusehen, die aus Versuchstierzuchten stammen, die für ihre Tätigkeit eine Erlaubnis nach § 11 Abs. 1 Nr. 1 erhalten haben, oder nachweislich aus Versuchstierzuchten außerhalb des Geltungsbereiches des deutschen Tierschutzgesetzes stammen. Bei der Verwendung von Versuchstieren aus Versuchstierzuchten außerhalb des Geltungsbereiches des Tierschutzgesetzes ist die Bestätigung der Anerkennung durch das Herkunftsland dem Genehmigungsantrag in Ablichtung beizufügen, sofern diese Zucht nach Kenntnis des Antragstellers der Genehmigungsbehörde nicht bekannt ist.
- I) Für Pferde, Rinder, Schweine, Schafe, Ziegen, Hühner, Tauben, Puten, Enten, Gänse und Fische ist eine Ausnahmegenehmigung nicht erforderlich.
- J) Es sind die Räumlichkeiten, evtl. vorhandene Hygieneschleusen, die Haltungssysteme, das Klima und die Besatzdichte der Käfige, bezogen auf die jeweilige Tierart, zu beschreiben. Welches Futter erhalten die Tiere? Der Ablauf des Versuches ist genau zu beschreiben, wenn möglich anhand einer graphischen Darstellung oder Tabelle. Inwieweit ist sichergestellt, dass nur Tiere verwendet werden, für die eine latente Erkrankung, die den Ablauf des Experiments zu beeinträchtigen vermag, ausgeschlossen werden kann? Wie werden die Tiere auf den Versuch vorbereitet (Adaption an Haltungs- und Versuchsbedingungen, Handling)?
- K) Bei der Beurteilung der Belastung der Tiere sind nachfolgende Kriterien besonders zu berücksichtigen: Voraussichtliche Belastungen der Versuchstiere durch Manipulation, die mit Schmerzen und Leiden verbunden sind oder Schäden setzen, während:
1. der Versuchsvorbereitung (z. B. nüchtern halten)
 2. ab dem Beginn von der Norm abweichende Haltungsbedingungen oder
 3. ab dem Eingriff oder der Behandlung bis
 4. zum Versuchsende oder bis
 5. zum Erreichen eines Zustandes ohne Schmerzen, Leiden oder Schäden im Verlauf des Beobachtungszeitraums
- Die Intensität der Belastung ist entsprechend der voraussichtlichen Allgemeinzustände der Versuchstiere nach klinischen Befunden sowie nach den zu erwartenden Körpergewichts- und Verhaltensänderungen zu beurteilen. **Versuchsabbruchkriterien sind konkret festzulegen.** Die Belastungen sind bei unterschiedlicher Intensität in ihrem zeitlichen Verlauf nach Kriterien "gering", "mäßig" oder "erheblich" zuzuordnen und **in die beiliegende Belastungstabelle (Anhang zu Anlage 1 der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des Tierschutzgesetzes) einzutragen.**
- L) Die Aufzeichnungen sind nach Versuchsende 3 Jahre aufzubewahren!
- Die Aufzeichnungen nach § 9a sollen folgende Angaben enthalten:
- Angaben zu den Versuchstieren
 - Tierart/Tierarten
- Bei Wirbeltieren zusätzlich: Herkunft, Anschrift und Name des Vorbesitzers
- Bei Hunden und Katzen: Wie oben, dazu Geschlecht, Rasse, Art und Zeichnung des Fells sowie ggf. zusätzliche Kennzeichnung

(Tätowiernummer)

- Tierzahl
- Bei Zusammenstellung zu Gruppen: Anzahl und deren Größe
- Versuchszweck
- Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde
- Angaben zur Versuchsdurchführung
- Tierversuche mit operativen Eingriffen: Dokumentation des Verlaufs durch das Führen von Narkose- Operations- und/oder Sektionsprotokollen- Tierversuche ohne operative Eingriffe: Kurzprotokollierung der Ergebnisse in regelmäßigen Zeitabständen.

- M)** In engem Bezug zu dem beantragten Versuchsvorhaben ist hier aus der Sicht der Wissenschaft darzulegen, in welchem Verhältnis Umfang und Schwere der möglichen Beeinträchtigungen bei den eingesetzten Tieren zu dem zu erwartenden wissenschaftlichen Fortschritt bzw. der Erkenntnismehrung stehen.
- N)** Aufgrund der Verantwortung, die Leitung und Stellvertretung (§ 9 Abs. 3) insbesondere hinsichtlich der Begrenzungen von zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden bei den Versuchstieren zu tragen haben, sind gehobene Ansprüche an deren fachliche Qualifikation zu stellen. Ärztinnen/Ärzte, Tierärztinnen/Tierärzte sowie Naturwissenschaftlerinnen/Naturwissenschaftler erfüllen die Voraussetzungen, sofern sie sich in mindestens dreijähriger tierexperimenteller Tätigkeit unter kundiger Anleitung spezielle Fachkenntnisse angeeignet haben. Der Nachweis der fachlichen Eignung ist durch Vorlage der entsprechenden Dokumente zu erbringen:
- abgeschlossenes Hochschulstudium der Medizin oder Veterinärmedizin:
 - durch ein deutsches Zeugnis über die tierärztliche, ärztliche oder zahnärztliche Prüfung oder
 - durch ein im Geltungsbereich des Tierschutzgesetzes als gleichwertig anerkanntes Prüfungszeugnis oder Diplom;
 - abgeschlossenes naturwissenschaftliches Hochschulstudium:
 - durch ein Diplom einer wissenschaftlichen Hochschule im Geltungsbereich des Tierschutzgesetzes oder
 - durch ein innerhalb des Geltungsbereiches des Tierschutzgesetzes als gleichwertig anerkanntes Diplom;
 - der Nachweis dreijähriger tierexperimenteller Tätigkeit kann durch eine Bestätigung der anleitenden Person erbracht werden.
- O)** Sofern der Nachweis in einem früheren Antrag gegenüber dieser Behörde erbracht wurde, genügt ein Hinweis auf diesen Antrag unter Angabe des Geschäftszeichens; die Nachweise der Ausbildung (Abschlusszeugnis, Diplom) sind in deutscher Sprache bzw. deutscher Übersetzung durch einen öffentlich bestellten und beeidigten Übersetzer – es genügt die Ablichtung des Originals – vorzulegen.
- P)** Sofern der Ausbildungsnachweis in einem früheren Antrag gegenüber dieser Behörde erbracht wurde, genügt ein Hinweis auf diesen Antrag unter Angabe des Geschäftszeichens; die Nachweise der Ausbildung (Abschlusszeugnis, Diplom etc.) sind in deutscher Sprache bzw. deutscher Übersetzung durch einen öffentlich bestellten und beeidigten Übersetzer – es genügt die Ablichtung des Originals – vorzulegen.
- Q)** Die für die Durchführung von Tierversuchen erforderlichen Fachkenntnisse werden i.d.R. durch geeignete Ausbildung und berufliche Erfahrung erworben. Die Anforderungen, die an diese Fachkenntnisse zu stellen sind, sind unterschiedlich und haben sich an der jeweils auszuführenden Tätigkeit zu orientieren.
- a) Bei Tierversuchen an wirbellosen Tieren sowie bei Tierversuchen i. S. des § 8 Abs. 7 Nr. 2, die als Impfungen, Blutentnahmen oder sonstige Maßnahmen diagnostischer Art nach bereits erprobten Verfahren vorgenommen werden und der Erkennung insbesondere von Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder körperlichen Beschwerden bei Mensch oder Tier oder der Prüfung von Seren oder Impfstoffen dienen, sind Erfahrungen im Umgang mit Versuchstieren der betreffenden Art sowie die sichere Beherrschung der erforderlichen Techniken als ausreichend anzusehen.
 - b) Entsprechende Fachkenntnisse für Behandlungen und nichtoperative Eingriffe an Wirbeltieren können bei Personen mit abgeschlossenem naturwissenschaftlichem Hochschulstudium sowie einer ausreichenden Anleitung in tierexperimentellen Techniken vorausgesetzt werden. Die Anleitung in tierexperimentellen Techniken kann auch im Rahmen des beantragten Versuchsvorhabens durch den Leiter oder Stellvertreter sowie den Tierschutzbeauftragten vorgenommen werden.
 - c) Für operative Eingriffe an Wirbeltieren können die erforderlichen Fachkenntnisse ohne Einschränkung vorausgesetzt werden bei Veterinärmedizinerinnen/Veterinärmedizinern und Medizinerinnen/Medizinern, die z. B. in den Fächern Physiologie, Pharmakologie, Toxikologie, Chirurgie, Pathologie oder Versuchstierkunde einschlägiges Spezialwissen erworben haben. Für sie und ebenso für Diplombiologinnen/Diplombiologen (Zoologie) gilt dies ebenfalls, sofern sie sich auf Grund einer ausreichenden Anleitung in tierexperimentellen Techniken oder versuchstierkundlichen Kursen die speziellen für dieses Vorhaben nötigen Kenntnisse erworben haben.
- Für technische Assistentinnen/Assistenten sowie für Personen, die die vorgenannten Bedingungen hinsichtlich der Ausbildung, aber auch hinsichtlich der praktischen Erfahrung nicht erfüllen (Doktorandinnen/Doktoranden, Diplomandinnen/Diplomanden usw.), ist in jedem Falle eine Ausnahmegenehmigung zu beantragen. Wurde bereits in früheren Genehmigungsbescheiden eine Sondergenehmigung erteilt, ist dies unter Angabe des Aktenzeichens zu vermerken.
- Als operative Eingriffe gelten alle instrumentellen Einwirkungen, bei denen die Haut oder darunterliegendes Gewebe eines lebenden Tieres mehr als punktförmig durchtrennt wird.
- R)** Die Betäubung eines warmblütigen Wirbeltieres ist grundsätzlich von einer Tierärztin/einem Tierarzt vorzunehmen (§ 5 Abs. 1 Satz 2). Die Betäubung eines warmblütigen Versuchstiers kann auch unter Aufsicht von anderen Personen durchgeführt werden, wenn sie durch geeignete Ausbildung und berufliche Erfahrung die hierfür nötigen Kenntnisse besitzen. Die im letztgenannten Fall Aufsichtführenden müssen nicht ständig anwesend sein, sie müssen jedoch im Bedarfsfall kurzfristig zur Verfügung stehen können (§ 9 Abs. 2 Nr. 4).

10 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name: Thilo Ludwig Schenck
 Wohnort: Ackerstr. 1, 81541 München, Deutschland
 Geburtsdatum: 29. November 1978
 Geburtsort: München
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufliche Erfahrung

10/08 bis heute	Arzt an der Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie, Klinikum rechts der Isar der TU München unter der Leitung von Klinikdirektor Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Günther Machens
02/05-04/05	Tutor des Präparierkurses am Institut für Anatomie und Muskuloskelettale Forschung, Paracelsus Medizinische Privatuniversität, Salzburg (A)
09/02-06/04	Academy Consult, München (D) Berater in der Studentischen Unternehmensberatung
02/02-06/02	Giesecke & Devrient, München (D) Praktikum Marketing und Business Intelligence
09/00-02/01	BluePrint AG, München (D) Praktikum Drucktechnik
09/98-09/99	Krankenhaus München Bogenhausen, München (D) Zivildienst

Aus- und Weiterbildung

04/08 - 08/08	Zertifikatslehrgang für Klinische Studien an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität, Salzburg (A)
09/03 - 07/08	Studium der Humanmedizin an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität, Salzburg (A) Diplomarbeit: "Wirkung der AMP-aktivierten Kinase auf die Aktivität von CFTR und NHE1 zur regulatorischen Erhöhung des Zellvolumens (RVI) in Kolonkrypten, unter besonderer Berücksichtigung der AMP-Kinase" Abschluss: Summa cum laude
04/07-08/07	Forschungsaufenthalt an der Yale University School of Medicine, Department of Surgery, New Haven (USA)
04/07	USMLE (United States Medical Licensing Examination) Step One , Score: 93 of 99
10/99 - 06/04	Diplomstudium Wirtschaftsingenieurwesen an der Hochschule für angewandte Wissenschaften - FH München (D) Fachrichtung: Biotechnologie und Umweltmanagement Diplomarbeit: "Verbreitung regenerativer Energietechnologien in Tansania über Enterprises of Trust: Rechenmodell zur Bewertung von Finanzierungsalternativen verschiedener Solarlampen" mit der Benotung 1,0
06/98	Abitur am St.-Anna-Gymnasium, München (D)
09/95 - 06/96	Colorado Springs Highschool, Colorado (USA)

Veröffentlichungen

Long-term preconditioning with Erythropoietin reduces ischemia-induced skin necrosis.

Rezaeian, F., Wettstein, R., Scheuer, C., Schenck, T.L., Egaña, J.T., Machens, H.-G., Menger, M.D., Harder, Y. Microcirculation. Mar 20 (2013)

Diallyl-disulfide is the effective ingredient of garlic oil that protects primary human osteoblasts from damage due to cigarette smoke.

Ehnert, S., Braun, K.F., Buchholz, A., Freude, T., Egana, J.T., Schenck, T.L., Schyschka, L., Neumaier, M., Doebele, S., Stöckle, U., Nüssler, A.K.

Food Chemistry. 132 (2012) 724–729

Role of AMP Kinase in Volume Control of Colonic Crypts: AMP-activated Kinase controls Regulatory Volume Increase of Colonic Crypts by modulating CFTR and NHE1 activity.

Schenck, T.L. Südwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften (2012) ISBN-10: 3838131797

The Use of Human Sweat Gland-derived Stem Cells for Enhancing Vascularization during Dermal Regeneration.

Danner, S., Kremer, M., Petschnik, A.M., Nagel, S., Zhang, Z., Hopfner, U., Reckhenrich, A.K., Weber, C., Schenck, T.L., Becker, T., Kruse, K., Machens, H.-G., Egaña, J.T. J Invest Dermatol. 6 (2012) 1707-1716

Handbook of Burns Volume 2: Reconstruction and Rehabilitation.

Kamolz, L.-P., Jeschke, M.G., Horch, R.E., Küntscher, M., Brychta, P.

Chapter: "Thermal injuries to the foot" Schenck, T.L., Giunta. R.E.

Springer, Wien (2011) 269-286

Quercetin Protects Primary Human Osteoblasts Exposed to Cigarette Smoke through Activation of the Antioxidative Enzymes HO-1 and SOD-1.

Braun, K.F., Ehnert, S., Freude, T., Egaña, J.T., Schenck, T.L., Buchholz, A., Schmitt, A., Siebenlist, S., Schyschka, L., Neumaier, M., Stöckle, U., Nüssler, A.K. Scientific World Journal. 11 (2011) 2348-2357

Green tea protects human osteoblasts from cigarette smoke-induced injury: possible clinical implication.

Holzer, N., Braun, K.F., Ehnert, S., Egaña, J.T., Schenck, T.L., Buchholz, A., Schyschka, L., Neumaier, M., Benzing, S., Stöckle, U., Freude, T., Nussler, A.K. Langenbecks Arch Surg. (2012) 397(3) 467-474

Cell-based resorption assays for bone graft substitutes.

Zhang, Z., Egaña, J.T., Reckhenrich, A.K., Schenck, T.L., Lohmeyer, J.A., Schantz, J.T., Machens, H.G., Schilling, A.F. Acta Biomater. 8(1) (2012) 13-19

Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe – Die bessere Alternative zu Knochenmarkszellen für das Tissue Engineering von Knochen? Ehnert, S., Häuser, J., Kerler, I., Schmitt, A., Olderøy, M., Freude, T., Neumaier, M., Egaña, T., Schenck, T., Stöckle, U., Nüssler, A.K. Regenerative Medizin 1 (2011) 3-8

Splints in birth-related brachial plexus injuries.

Schenck, T.L., Bayer, T., Enders, A., Marton, M.A., Machens, H.-G., Müller-Felber, W., Giunta, R.E. Handchir Mikrochir Plast Chir. 43(2) (2011) 105-111

High pressure injection injuries of the hand. Rare but often underestimated.

Schenck, T., Holzbach, T., Machens, H.-G., Giunta, R.E.

Unfallchirurg. 114(3) (2011) 263-267

Vaginal carcinoma in a female-to-male transsexual.

Schenck, T.L., Holzbach, T., Zantl, N., Schuhmacher, C., Vogel, M., Seidl, S., Machens, H.-G., Giunta, R.E. J Sex Med. 7(8) (2010) 2899-2902

11 DANKSAGUNG

Für die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit danke ich

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Günther Machens, Direktor der Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik durchzuführen sowie für seine stets konstruktive Begleitung.

Besonders danke ich

Herrn Dr. Tomás Egaña, Ph.D., durch dessen Initiative dieses Projekt möglich wurde und der mich herzlich in sein Team aufgenommen und stets gefördert hat. Sein unermüdliches Engagement, seine enormen Kenntnisse und seine große Hilfsbereitschaft bildeten eine großartige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie bei der Verfassung der Arbeit.

Frau Ursula Hopfner, leitende MTA im Labor Dr. Tomás Egaña, Ph.D., die mich in unendlicher Geduld in die Verwendung aller Instrumente und Geräte einwies und mir bei der Durchführung meiner Experimente stets hilfreich zur Seite stand.

Herrn Univ. Prof. Dr. med. Riccardo Giunta, Chefarzt der Handchirurgie, Plastischen Chirurgie und Ästhetischen Chirurgie der Ludwig-Maximilians Universität München, der mich in die Arbeit mit Versuchstieren eingeführt hat und die Leitung der Tierversuche übernommen hat.

Herrn Dr. med. Dr. vet. Thomas Brill, Tierschutzbeauftragter und Leiter des Zentrums für Präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die Unterstützung bei der Antragsstellung zur Genehmigung des Tierversuchsvorhabens.

Herrn Dr. rer. nat. Tibor Schuster, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die Erstellung des statistischen Gutachtens.

allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Tomás Egaña, Ph.D., für die stets freundliche und engagierte Zusammenarbeit: Dr. Ann Reckhenrich, Manuela Kirsch und Maymi Chavez.

meiner Familie für wiederholtes Korrekturlesen und wertvolle Anregungen.