

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

In vivo Analyse der Biokompatibilität, Vaskularisierung und Inkorporation verschiedener Netzmaterialien für die Hernienchirurgie

Als Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2017

vorgelegt von: Jörg Michael Häufel

geboren am: 07.05.1978 in Tübingen

Datum:

Dekan:

Berichterstatter:

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Einleitung	5
4. Ziel der Studie	10
5. Material und Methodik	11
5.1 Versuchstiere	11
5.2 Modell	11
5.2.1 Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer	11
5.2.2 Implantation der Rückenhautkammer	12
5.2.3 Materialeigenschaften der verwendeten Netze	14
5.2.4 Implantation der Netze in die Rückenhautkammer	16
5.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	17
5.3.1 Mikrozirkulatorische Parameter	18
5.3.1.1 Gefäßdurchmesser	19
5.3.1.2 Blutzellgeschwindigkeit	19
5.3.1.3 Scherrate.....	20
5.3.1.4 Blutvolumenfluss	20
5.3.1.5 Gefäßpermeabilität	20
5.3.1.6 Angiogenese-positive Felder	21
5.3.1.7 Funktionelle Kapillardichte	21
5.3.1.8 Fließverhalten der Leukozyten	22
5.3.1.9 Leukozytendichte in neugebildeten Gefäßen	23
5.4 WST-1-Assay	23
5.5 Histologie	24
5.6 Ausreißversuch	25
5.7 Experimentelles Protokoll.....	25
5.8 Statistik.....	28
6. Ergebnisse	29
6.1 Mikrozirkulation der Rückenhautkammer	29
6.2 Implantation und Vaskularisierung chirurgischer Netze	29
6.3 Reaktionen des Empfängergewebes auf die Implantation chirurgischer Netze	32
6.3.1 Entzündungsreaktion.....	32

6.3.1.1	Fließverhalten der Leukozyten	32
6.3.1.2	Gefäßpermeabilität	33
6.3.1.3	Entzündungsreaktion im netzfernen Kontrollgewebe.....	34
6.3.2	Mikrohämodynamik.....	34
6.3.3	Angiogenese und Netzinkorporation.....	35
6.3.4	Histologie.....	37
6.4	Biokompatibilität und Vaskularisierung von Prolene®, Ultrapro® und Vicryl®	38
6.4.1	Entzündungsreaktion.....	38
6.4.2	Mikrohämodynamik.....	39
6.4.3	Angiogenese	40
6.4.4	Histologie.....	42
6.4.5	Inkorporation der Netze.....	43
6.4.6	WST-1-Assay.....	43
6.5	Biokompatibilität und Vaskularisierung von Netzen in immunsupprimierten Tieren	44
6.5.1	Konzentration von Rapamycin und Cyclosporin A im Blut	44
6.5.2	Angiogenese und Vaskularisierung.....	44
6.5.3	Fließverhalten der Leukozyten.....	46
6.5.4	Histologie.....	48
6.5.5	Inkorporation der Netze.....	49
6.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	50
7.	Diskussion	53
7.1	Modell.....	53
7.2	Diskussion der Ergebnisse	54
7.2.1	Reaktionen des Empfängergewebes auf die Implantation chirurgischer Netze... ..	54
7.2.2	Biokompatibilität und Vaskularisierung von Prolene®, Ultrapro® und Vicryl®	55
7.2.3	Biokompatibilität und Vaskularisierung von Netzen in immunsupprimierten Tieren	57
7.3	Klinische Perspektiven.....	60
8.	Literaturverzeichnis	61
9.	Danksagung.....	70
10.	Publikationen.....	71
10.1	Originalarbeiten	71
10.2	Übersichtsarbeiten	71
10.3	Kongressbeiträge	71

1. Zusammenfassung

In der heutigen Hernienchirurgie ist die Implantation künstlicher Netzmaterialien zum Verschluss von Bruchlücken gängige Praxis. Es gibt insgesamt eine Vielzahl verschiedener chirurgischer Netze. Sie unterscheiden sich vor allem in Größe, Gewicht, Maschengröße und Material. Entscheidend für den klinischen Erfolg der Netzimplantation sind neben einer entzündungsarmen Inkorporation die rasche Vaskularisierung der Netze und eine gute Gewebeerträglichkeit. Trotz großer Fortschritte im Bereich der Materialforschung konnte bisher jedoch noch kein ideales Netz entwickelt werden, welches diese Eigenschaften in idealer Weise erfüllt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Modell zur Analyse implantierter chirurgischer Netze etabliert, mit dem erstmals *in vivo* die Biokompatibilität sowie die Vaskularisierung implantierter Netze mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden kann.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Syrischen Goldhamstern Ultrapro®-Netze in eine Rückenhautkammer implantiert. Mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie wurden zur Beurteilung der Biokompatibilität die venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und die makromolekulare Gefäßpermeabilität im Randbereich der Implantate analysiert. Außerdem wurde die Vaskularisierung der Ultrapro®-Netze sowie deren Inkorporation in das umliegende Empfängergewebe untersucht. Der Beobachtungszeitraum betrug 14 Tage. Die Implantation der Netze resultierte in einer kurzfristigen Entzündungsreaktion, die durch eine gesteigerte Leukozytenaktivierung sowie eine erhöhte Gefäßpermeabilität gekennzeichnet war. Bereits nach drei Tagen waren erste Zeichen einer beginnenden Angiogenese im Randbereich der Netze nachweisbar. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes bildete sich ein vollständiges Netzwerk neuer Blutgefäße im Bereich der implantierten Netze aus. Histologisch konnte die Ausbildung eines vaskularisierten Granulationsgewebes um die Netze nachgewiesen werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurden die klinisch häufig eingesetzten Netze Prolene®, Ultrapro® und Vicryl® miteinander verglichen. Dabei kam es bei den Vicryl®-Netzen zu einer stärkeren Ausbildung von vaskularisiertem Granulationsgewebe, welches im Vergleich zu Prolene®- und Ultrapro®-Netzen mit deutlich mehr Entzündungszellen infiltriert war. Die stärkere angiogene und inflammatorische Reaktion des Empfängergewebes auf das implantierte Vicryl®-Netz führte jedoch nicht zu einer verbesserten Inkorporation, sondern resultierte sogar in einer signifikant geringeren Stabilität im Ausreißversuch. Weiterführende

histologische Untersuchungen zeigten, dass das Granulationsgewebe um das Vicryl®-Netz hauptsächlich wegen eines geringen Kollagengehalts und der massiven Infiltration mit Entzündungszellen instabil war. Hieraus kann geschlossen werden, dass eine stärkere angiogene und inflammatorische Reaktion nicht notwendigerweise zu einer verbesserten Inkorporation eines Netzes in das Empfängergewebe führt.

Im dritten Teil der Arbeit wurde das Einwachsen chirurgischer Netze unter einer immunsuppressiven Behandlung untersucht, weil insbesondere nach Nieren- und Lebertransplantation Narbenhernien häufig als Komplikation auftreten. Zu diesem Zweck erfolgte die Implantation von Ultrapro®-Netzen in die Rückenhautkammer von Hamstern, die mit Rapamycin oder Cyclosporin A behandelt wurden. Vehikel-behandelte Tiere dienten als Kontrollgruppe. Die angiogene und inflammatorische Antwort des Empfängergewebes auf die Implantation wurde erneut über eine Dauer von 14 Tagen mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Im Vergleich zu Cyclosporin A-behandelten Hamstern und zu Kontrolltieren zeigte sich unter Rapamycin-Behandlung eine dosisabhängige Inhibition der Vaskularisierung der implantierten Netze. Dies ging mit einem geringeren Kollagengehalt des Granulationsgewebes um die Netze einher. Daraus resultierte eine verminderte Inkorporation des Netzmaterials in das umliegende Empfängergewebe. Die Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ergab keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Gruppen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Immunsuppression mit Rapamycin wesentlich das Einwachsen chirurgischer Netze beeinflusst und daher bei Patienten mit Narbenhernien nicht zur Anwendung kommen sollte.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit ein neues Modell zur systematischen Analyse der Biokompatibilität, Vaskularisierung und Inkorporation chirurgischer Netze etabliert werden. Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ist es dabei möglich, *in vivo* das Einwachsen neuer Blutgefäße in die Netze sowie die leukozytäre Entzündungsreaktion auf die verwendeten Materialien repetitiv über einen Zeitraum von 14 Tagen zu visualisieren und zu quantifizieren. Entsprechend kann dieses Modell zukünftig dazu verwendet werden, neue Erkenntnisse über das Einwachsen chirurgischer Netze zu erhalten, und somit zur Entwicklung verbesserter Netzmaterialien für die Hernienchirurgie beitragen.

2. Summary

Surgical repair of abdominal hernias is frequently performed by implantation of artificial mesh graft materials. A considerable number of such mesh grafts is currently available. They differ in size, weight, pore size and material composition. For the clinical success of mesh implantation, the implanted materials should exhibit a good biocompatibility. Moreover, they should be rapidly vascularized and incorporated into the surrounding tissue. However, despite major progress in the field of biomaterial research, no surgical mesh has been developed yet which ideally fulfills all of the aforementioned requirements.

In the present study, a new animal model for the analysis of implanted surgical meshes was established, which allows for the first time the *in vivo* assessment of their biocompatibility and vascularization by means of intravital fluorescence microscopy.

In a first set of experiments, Ultrapro[®] meshes were implanted into dorsal skinfold chambers of Syrian golden hamsters. To investigate the biocompatibility of the implants, leukocyte-endothelial cell interaction and macromolecular leakage were assessed. Furthermore, the incorporation of the biomaterial was determined by histology and the measurement of the explantation strength. The observation period was 14 days. The mesh implantation resulted in a short-term inflammatory host tissue response, as indicated by an increased adherence of leukocytes in venules at the borders of the implants as well as macromolecular leakage. After three days, first signs of angiogenesis could be observed in the border zones of the implants. Throughout the following observation period, a complete network of newly formed blood vessels developed around the implanted meshes. Additional histological analyses showed the formation of a vascularized granulation tissue surrounding the implants.

In a second set of experiments, biocompatibility and vascularization of three different types of mesh materials, namely Prolene[®], Ultrapro[®] and Vicryl[®], were compared to each other. The Vicryl[®] mesh induced the formation of a densely vascularized granulation tissue, which was infiltrated by more inflammatory cells when compared to the Prolene[®] and Ultrapro[®] mesh. However, the pronounced angiogenic and inflammatory host tissue response to the Vicryl[®] mesh was not associated with a better mesh incorporation, as indicated by a significantly lower explantation strength. Histological analyses showed that the granulation tissue surrounding the Vicryl[®] mesh was instable due to a low collagen content and a massive infiltration of inflammatory cells. Thus, it can be concluded that a stronger angiogenic and

inflammatory response to an implanted mesh does not necessarily result in a better mesh incorporation into the host tissue.

In a third set of experiments, the effect of an immunosuppressive therapy on the incorporation of surgical meshes was analyzed, because a frequently observed complication in patients with immunosuppressive therapy during liver transplantation are incisional hernias, which are then treated with surgical meshes. For this purpose, Ultrapro® meshes were implanted into dorsal skinfold chambers of hamsters, which were treated with either rapamycin or cyclosporin A. Untreated animals served as controls. The angiogenic and inflammatory host tissue response to the mesh implants were analyzed over a period of two weeks by means of intravital fluorescence microscopy. Mesh incorporation was additionally determined by histology. Treatment with Rapamycin but not with cyclosporin A dose-dependently inhibited the vascularization of the implanted meshes compared to untreated animals. Furthermore, the granulation tissue surrounding the meshes of rapamycin-treated animals exhibited a lower collagen content. Consequently, the meshes were poorly incorporated, as indicated by a significantly reduced explantation strength. The leukocyte-endothelial cell interaction in venules surrounding the implants did not markedly differ between the three groups. These results demonstrate that immunosuppression with rapamycin inhibits the incorporation of surgical meshes and, thus, should be omitted in patients with incisional hernias.

Taken together, it was possible in the present thesis to establish a novel model for the systematic analysis of biocompatibility, vascularization and incorporation of surgical meshes. By means of intravital fluorescence microscopy this model allows the visualization and quantification of the angiogenic and inflammatory host tissue response to mesh implants throughout an observation period of 14 days. Accordingly, the present model may be used to gain new insights into the incorporation of surgical meshes and, thus, contribute to the development of improved mesh materials for hernia surgery.

3. Einleitung

Der Einsatz von Biomaterialien spielt in der chirurgischen Medizin eine immer wichtigere Rolle. So sind insbesondere chirurgische Netze zum Bruchlückenverschluss aus der modernen Hernienchirurgie nicht mehr wegzudenken. Die Verwendung solcher Netze soll im Vergleich zum Bruchlückenverschluss mittels Faziendoppelung zu einem spannungsfreien Operationsergebnis führen. Infolgedessen berichten die Patienten über geringere postoperative Schmerzen. Sie sind bei geringeren Rezidivraten früher leistungs- und belastungsfähig [Zieren et al., 1998; Scott et al., 2002; Peralta & Latifi, 2012; Nguyen et al., 2014]. Herniotomien gehören zu den häufigsten Eingriffen mit über 800.000 Operationen in den USA [Rutkow, 2003] und bis zu 150.000 Operationen in Deutschland [Kingsnorth, 1995].

Der Ausdruck „Hernie“ stammt aus dem Griechischen („Knospe“, „Spross“) und beschreibt den Austritt von intraabdominalen Organen oder Organteilen (Bruchsackinhalt) in eine abnorme Peritonealausackung (Bruchsack) durch eine Lücke der Bauchdecke (Bruchpforte). Die Hernierung erfolgt auf unterschiedliche Weise. Der Bruchsack kann durch einen inkompletten Verschluss der Bauchwand in der Embryonalentwicklung entstehen oder bei erworbenen Hernien durch eine muskelschwache Lücke in der Bauchwand. Narbenhernien sind iatrogen durch Operationsnarben bedingt. Die deutsche Bezeichnung für Hernie lautet „Bruch“ und geht wohl auf die mittelalterliche Vorstellung zurück, dass bei einer Hernie die Bauchdecke „auseinander gebrochen“ ist.

Grundsätzlich werden je nach Lokalisation oder Ätiologie zahlreiche Hernientypen voneinander unterschieden. Im Folgenden wird neben der häufigsten Hernienform, der Leistenhernie, die Narbenhernie erwähnt, da zur Therapie beider Hernienformen regelmässig chirurgische Netze eingesetzt werden.

Das Risiko an einer Leistenhernie zu erkranken beträgt beim Mann 27%, was dazu führt, dass die Leistenhernienanierung eine der am häufigsten durchgeführten Operationen ist [Fitzgibbons & Forse, 2015]. Bezogen auf die Niederlande entspricht das 20.000 Operationen jährlich [Lange et al., 2016]. Die chirurgische Therapie von Hernien wurde erst im 19. Jahrhundert mit Einführung der Anästhesie und Antisepsis etabliert. Zunächst wurden vor allem netzfreie Operationstechniken zum Bruchlückenverschluss bei Leistenhernien angewendet. Die hierzu notwendige Rekonstruktion der Leistenkanalhinterwand durch Doppelung der *Fascia transversalis* wurde erstmals von Eduardo Bassini [1890] postuliert. Dennoch ist es der kanadische Chirurg Shouldice, der seit 1945 als Pionier der

Leistenkanalhinterwand-rekonstruktion gilt und entsprechend Eingang in die Literatur fand [Shouldice, 1945]. Seine Arbeit wird immer wieder als Grundlage für die aktuelle „Shouldice-Technik“ beschrieben, obwohl die nach ihm benannte Technik der Inzision und Doppelung der *Fascia transversalis* erst später von einem seiner Schüler publiziert wurde [Shearburn & Myers, 1969]. Mit der Shouldice-Technik steht ein bis heute verwendetes, etabliertes netzfreies Operationsverfahren zur Verfügung.

Als Gold-Standard zur Behandlung der Leistenhernie gilt inzwischen jedoch die Implantation von chirurgischen Netzen. Bereits 1987 prägte Lichtenstein [1987] den Begriff der „Tension-Free-Technik“, da er die Verwendung von Kunststoffmaterialien als eine Möglichkeit zur Vermeidung von Naht- und Gewebespannung sah. Im Vergleich zum Direktverschluss gibt es bei diesem Verfahren weniger Rezidive [Luijendijk et al., 2000]. Grundsätzlich kann die Netzimplantation sowohl mittels offenem Operationsverfahren als auch laparoskopisch durchgeführt werden [Zanghì et al., 2000]. Letzteres Verfahren führt bekanntlich zu geringeren Wundheilungsstörungen und einer niedrigeren Rezidivrate [Mekeel et al., 2007].

Ein weiterer häufiger Hernientyp, bei dem regelmäßig Netze Verwendung finden, ist die Narbenhernie. Die Inzidenz der Narbenhernie wird in der Literatur meist zwischen 2% und 13% [Bucknall et al., 1982; Hesselink et al., 1993; Santora & Roslyn, 1993; Le Huu Nho et al., 2012; Bosanquet et al., 2015], gelegentlich auch mit 15% bis 20% angegeben [Mudge & Hughes, 1985; Israelsson & Jonsson, 1997; Höer et al., 2002]. Bei immunsupprimierten Patienten mit Pankreas-, Nieren- oder Lebertransplantaten gelten Narbenhernien als besonders häufig beschriebene Komplikation [Gastaca et al., 2010; Piros et al., 2011; Varga et al., 2011; Montalti et al., 2012; Ayvazoglu Soy et al., 2017]. Tatsächlich hat die Häufigkeit von Hernien nach orthotoper Lebertransplantation in den letzten Jahren deutlich zugenommen [Kahn et al., 2007]. Beispielsweise berichten Toso et al. [2007], dass bei 34,3% (24/70) ihrer Patienten nach Lebertransplantation diese Komplikation zu finden war.

Die Entwicklung von Netzmaterialien zum Bruchlückenverschluss von Hernien hat eine lange Historie. Witzel [1900] verwendete hierzu Silberdraht, während Burton [1959] später Gold und Tantalum einsetzte. Ein gemeinsames Problem bei allen Metallimplantaten war jedoch die schlechte Gewebeverträglichkeit der meist wenig flexiblen Netze. Ermüdungsbrüche, Infekte, Serome oder Irritationen des umliegenden Gewebes waren die Folge. Von allen auf Metallbasis hergestellten Netzen konnte Babcock [1952] durch die Verwendung von gehärtetem Stahldraht noch die besten Ergebnisse erzielen. Laut Validire et al. [1986] lag hierbei bezogen auf die Versorgung großer Narbenbrüche in Onlay-Technik die Erfolgsquote bei 90%. Über 95% der Patienten waren anschließend sogar schmerzfrei.

Ende der 50er Jahre wurde bei der Entwicklung von Herniennetzen verstärkt auf Kunststoffmaterialien fokussiert [Usher & Gannon, 1959]. Auch hier waren die anfänglichen Versuche eher enttäuschend. Beispielsweise wurde der Einsatz eines Polyvinylschwammes (Ivalon®) von Adler & Darby [1960] als ungeeignet eingestuft. Umgekehrt berichteten Maloney et al. [1948] von einer fünfjährigen Rezidivrate unter 1% bei 253 Hernienreparationen mit einem Nylonnetz. Diese revolutionären Zahlen wurden allerdings durch andere Anwender nicht bestätigt [Doran et al., 1961]. Insbesondere bei dicken Nylonnetzen war die Infektrate sehr hoch. Dies konnte zwar durch dünnere Netze verbessert werden, dabei nahm allerdings auch die mechanische Stabilität der Implantate ab. Auch Versuche mit Teflon wurden aufgrund schlechter Biokompatibilität zunächst wieder aufgegeben [Gibson & Stafford, 1964]. Erst die Weiterentwicklung und Perfektion dieses Materials durch die Firmen Impra und WL Gore Assoc. (Arizona, USA) führte aufgrund der multidirektionalen Anordnung der einzelnen Netzfaser zu guten mechanischen Eigenschaften bei gleichzeitig minimaler Entzündungs- und Verwachsungsreaktion der Netze [Law & Ellis, 1988]. Die klinischen Ergebnisse dieser neuen Netztypen waren jedoch erneut widersprüchlich. Während manche Studien niedrige Rezidivraten und geringe Infektanfälligkeiten berichteten [Bauer et al., 1987], zeigten die Ergebnisse von DeBord et al. [1992] bei 62 Narbenhernienoperationen eine Infektrate von 9,7%. Bei den Infektionen war in fünf von sechs Fällen sogar eine Implantatentfernung notwendig [DeBord et al., 1992].

Heute werden häufig Netze verwendet, die aus nicht resorbierbaren Polymeren bestehen, wie zum Beispiel Polypropylen, Polyesther oder Polytetrafluorethylen [Beets et al., 1996; Bellon et al., 1996; Klosterhalfen et al., 2000]. Polyester besteht aus Äthylen, Glykol und Terephtalsäure-Polyäthylenterephtalat (Äquivalente: Dacron®, Mersilene®). Polypropylen ist ein Polymer aus Äthylen, das unter dem Namen Marlex® von Usher 1959 in die Hernienchirurgie eingeführt wurde [Usher & Gannon, 1959]. Laut einer Studie von Adler [1962] verwendeten bereits 1962 20% der Chirurgen in den USA Marlex®-Netze bei komplizierten Hernienoperationen.

Neuere Weiterentwicklungen von chirurgischen Netzen kombinieren resorbierbare Materialien wie zum Beispiel Polyglactin PG910 (Vicryl®) und Poliglecaprone 25 (Monocryl®) mit nicht resorbierbaren Netzanteilen mit der Idee, die biomechanischen Eigenschaften und die Wundheilung damit weiter zu verbessern [Klinge et al., 1999; Holzheimer, 2004].

Unabhängig vom verwendeten Operationsverfahren ist die Inkorporation der implantierten Netze in das umgebende Empfängergewebe Grundvoraussetzung für positive Langzeitergebnisse bezüglich der Stabilität des abdominalen Wundverschlusses. Daher sollten Netzimplantate Angiogenese induzieren, das heißt die Ausbildung neuer Blutgefäße

stimulieren. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die stabile und adäquate Inkorporation des Fremdmaterials in das Empfängergewebe [Menger et al., 1992]. Chirurgische Netze verursachen nachweislich eine Vielzahl von biologischen Gewebeanworten wie Aktivierung und Mobilisierung von Entzündungszellen [Rosch et al., 2003], die Entwicklung neuer Blutgefäße [Laschke et al., 2005] sowie die Ausbildung von Granulationsgewebe, welches das eingebrachte Netzmaterial in das Empfängergewebe integriert [Klinge et al., 2002; Laschke et al., 2005].

Sämtliche biologischen Reaktionen auf chirurgische Netze beeinflussen sich gegenseitig und sind abhängig von der Zusammensetzung des jeweiligen Materials. Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass die Gewebereaktion hauptsächlich durch die Netzmaschenweite [Greca et al., 2001; Klinge et al., 2002; Weyhe et al., 2006] und die Menge des implantierten Materials [Klinge et al., 1998; Klinge et al., 2002] beeinflusst wird. Dementsprechend wird postuliert, Netze mit großer Maschenweite zu verwenden, was eine optimale Biokompatibilität fördert und zu einem verbesserten Tragekomfort beim Patienten führen soll [O'Dwyer et al., 2005; Weyhe et al., 2007]. Im Gegensatz dazu wird von anderen Autoren propagiert, dass die biologische Antwort vielmehr von der Art und Zusammensetzung des verwendeten Polymers abhängig ist und weniger von der implantierten Materialmenge [Krause et al., 2006; Weyhe et al., 2007].

Diese sich teilweise widersprechenden Ansichten zeigen die Notwendigkeit, optimierte Netze für die klinische Praxis zu entwickeln. Trotz zahlreicher Versuche, das „ideale“ Netzmaterial zu entwickeln, gibt es bis heute kein chirurgisches Netz, welches nicht auch Nachteile aufweist. Weil chirurgische Netze aus synthetischen Materialien bestehen, induzieren sie nach Implantation eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Fremdkörperreaktion. Weiterhin verursachen sie typische Komplikationen wie chronische Schmerzen, Infektionen, Verwachsungen sowie Serom- und Fistelbildungen [O'Dwyer et al., 2005; Robinson et al., 2005].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein geeignetes Modell zur Implantation chirurgischer Netze zu etablieren, mit dem die Biokompatibilität, Vaskularisierung und Inkorporation der Implantate im Empfängergewebe systematisch analysiert werden kann. Als Empfängergewebe diente die quergestreifte Skelettmuskulatur in der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters [Endrich et al., 1980]. Mit Hilfe dieses Modells war es unter Verwendung der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie möglich, die leukozytäre Entzündungsreaktion und die Angiogenese repetitiv über einen Zeitraum von 14 Tagen zu visualisieren und zu quantifizieren.

Nach Etablierung dieses Modells in einem ersten Studienabschnitt wurden anschließend drei verschiedene Netze miteinander verglichen sowie der Einfluss einer immunsuppressiven Therapie auf die Inkorporation chirurgischer Netze untersucht.

4. Ziel der Studie

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war, zur Untersuchung von chirurgischen Netzen ein neues Modell am Syrischen Goldhamster zu etablieren, mit dem die Biokompatibilität, Vaskularisierung und Inkorporation der Implantate quantitativ analysiert werden können.

Dabei wurden folgende Fragestellungen näher untersucht:

1. Ist das Modell geeignet, um das Einwachsen neuer Blutgefäße in implantierte Netze und die leukozytäre Entzündungsreaktion zu visualisieren und quantitativ zu erfassen?
2. Wie unterscheiden sich Angiogenese und Entzündungsreaktion bei Implantation von Vicryl[®]-, Prolene[®]- und Ultrapro[®]-Netzen?
3. Welchen Einfluss hat eine immunsuppressive Therapie mit Rapamycin oder Cyclosporin A auf das Einwachsen chirurgischer Netze?

5. Material und Methodik

5.1 Versuchstiere

Sämtliche Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erfolgten an Syrischen Goldhamstern im Alter von acht bis zehn Wochen und einem Gewicht von 60–80g aus eigener Zucht (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar). Die Tiere wurden während der Versuche in einem klimatisierten Raum bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus in Einzelkäfigen gehalten. Als Nahrung erhielten sie Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Germany) und Wasser *ad libitum*. Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz durch die Genehmigungsbehörde des Saarlandes genehmigt.

5.2 Modell

5.2.1 Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer

Die Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters, welche quergestreifte Muskulatur, subkutanes Gewebe und Haut enthält, diente als tierexperimentelles Modell zur Untersuchung der Biokompatibilität, Vaskularisierung und Inkorporation chirurgischer Netzmaterialien (*Abbildung 1*).

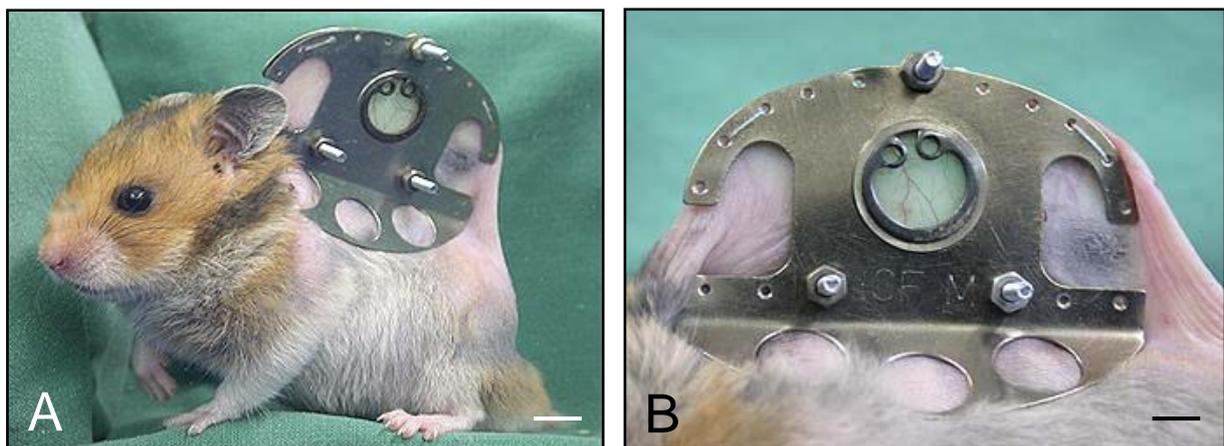


Abbildung 1: A: Syrischer Goldhamster mit Rückenhautkammer. B: Detailaufnahme des vorderen Titan-Rahmens mit Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer. Skalierung: A = 10mm, B = 5mm

Die erstmals von Endrich et al. [1980] am Hamster beschriebene Rückenhautkammerpräparation ermöglicht die intravitalmikroskopische Untersuchung verschiedener mikrozirkulatorischer Parameter. Mit Hilfe der Auflichtmikroskopie und der Gabe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe kann sowohl die gesamte Mikrozirkulation der

freipräparierten Rückenhautmuskulatur und des Subkutangewebes als auch die Bildung neuer Blutgefäße innerhalb implantierter Materialien visualisiert werden.

Durch die Möglichkeit der repetitiven Untersuchung bietet diese Technik zudem den Vorteil, dass die Ausbildung neuer Gefäßnetzwerke über einen Zeitraum von 14 Tagen schrittweise verfolgt und mit Hilfe eines entsprechenden Bildverarbeitungsprogramms anschließend quantifiziert werden kann.

5.2.2 Implantation der Rückenhautkammer

Zur Implantation der aus zwei symmetrischen Titan-Rahmen zusammengesetzten Rückenhautkammer wurde das Versuchstier durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50mg/kg Körpergewicht (KG); Narcoren[®], Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) narkotisiert. Anschließend wurde das Fell der Rückenhaut durch Elektrorasur (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und nachfolgende Depilation mit Pilca med Creme[®] (Asid Bonz, Böblingen, Deutschland) entfernt. Nach Reinigung der enthaarten Körperpartie mit warmem Wasser und anschließender Desinfektion mit 70%-igem Alkohol konnte mit der eigentlichen Präparation begonnen werden.

Zur Präparation der Kammer wurde das Versuchstier zunächst in Bauchlage gebracht. Die elastische Rückenhautfalte wurde angehoben und entlang ihrer Mittellinie mit zwei 5.0 Haltefäden vertikal aufgespannt. Unter Gegenlichtkontrolle konnte dann der rückseitige Rahmen der Rückenhautkammer an seinem Oberrand mit 5.0 Seide-Nähten kaudal der entlang der Schulterbasis verlaufenden Gefäße an der Hautfalte fixiert werden.

Im nächsten Schritt wurden im basalen Bereich der Hautfalte mit einer Präparierschere zwei kleine Inzisionen geschaffen, durch die die beiden Schrauben des Kammerrahmens geführt werden konnten. Dabei musste insbesondere darauf geachtet werden, die beiden Hauptgefäßstämme der Rückenhaut nicht zu verletzen. Danach wurde zur Kennzeichnung des Bereiches des späteren Beobachtungsfensters eine kreisrunde Markierung mit einem Durchmesser von ca. 15mm auf die Haut gezeichnet. Für das weitere Vorgehen wurden die Haltefäden wieder entfernt, das Versuchstier auf dem Operationstisch in Seitenlage gebracht und unter einem Stereo-Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Heerbrugg, Schweiz) positioniert. Nun konnten im zuvor markierten Bereich die dem Fenster zugewandte Kutis, Subkutis mit quergestreiftem Hautmuskel sowie die beiden Schichten des Retraktormuskels samt subkutanem Fettgewebe entfernt werden (*Abbildung 2*). Das freipräparierte Areal wurde dabei bewusst grösser gewählt als das eigentliche Beobachtungsfenster (Durchmesser 11mm). Dadurch konnte im weiteren Verlauf eine Beeinträchtigung der

Blutversorgung als Folge der Gewebekompression durch die symmetrischen Kammerrahmen vermieden werden.

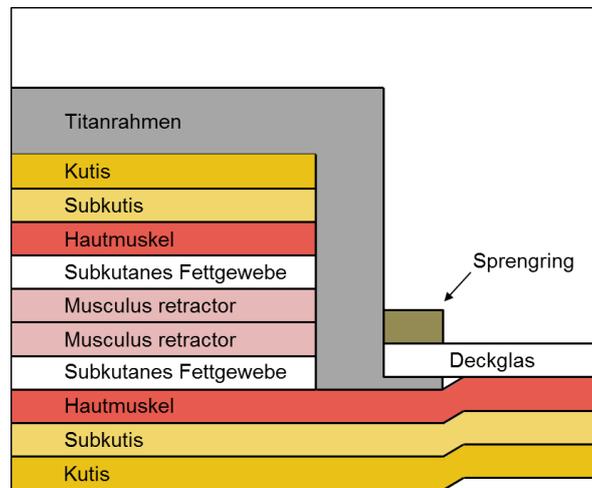


Abbildung 2: Schematische Darstellung der gedoppelten Rückenhaut (linke Bildhälfte) und der präparierten Gewebeschichten im Bereich des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer (rechte Bildhälfte).

Anschließend wurde die verbleibende Schicht, bestehend aus dem quergestreiften Hautmuskel, dem Subkutangewebe und der Kutis (*Abbildung 2*), sorgfältig mit einer sterilen Elektrolytlösung gespült. Dann konnte der vordere Titanrahmen mittels Stahlmuttern auf den Verbindungsschrauben in einem Abstand von 400-500µm zur Kammerrückseite befestigt werden. Zuletzt wurde das Deckglas des Beobachtungsfensters durch Adhäsion auf den freipräparierten Hautmuskel aufgebracht und mit einem Sprengring im Titan-Rahmen der Kammervorderseite fixiert (*Abbildung 1B*). Zusätzlich wurde auch der vordere Titanrahmen mit Hilfe von 5.0 Seide-Nähten am oberen Rand der Hautfalte fixiert.

Diese Anordnung ermöglichte es, durch Abnehmen des Sprengringes und des Deckglases jederzeit während des Versuchs freien Zugang zum Beobachtungsfeld zu erhalten. Bevor die eigentlichen Versuche begannen, konnten sich die Versuchstiere für mindestens 48 Stunden von der Narkose und dem chirurgischen Trauma erholen (*Abbildung 9*). Die Tiere tolerierten die Rückenhautkammer ohne größere Beeinträchtigung, was sich in einem normalen Putz- und Fressverhalten zeigte.

5.2.3 Materialeigenschaften der verwendeten Netze

In der vorliegenden Arbeit kamen insgesamt drei verschiedene Netze zur Anwendung. Im ersten und dritten Studienabschnitt wurde ein Ultrapro®-Netz (Ethicon Products, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Dieses leichtgewichtige Netz besteht aus Polypropylen (Prolene®) und absorbierbarem Poliglecaprone 25 (Monocryl®).

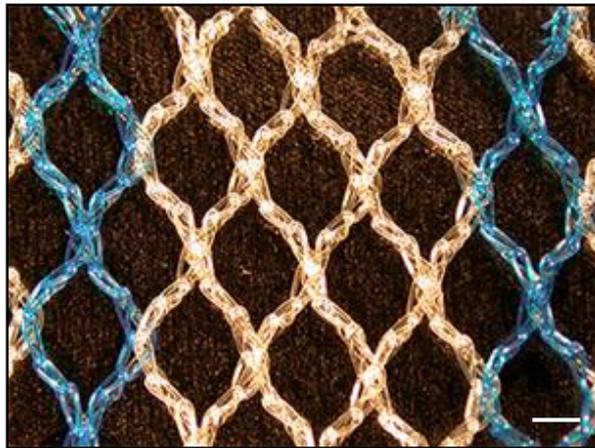


Abbildung 3: Detailaufnahme eines Ultrapro®-Netzes. Skalierung = 1500 μ m

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neben dem oben genannten Ultrapro®-Netz zwei weitere Netze verwendet: Vicryl® (Ethicon), bestehend aus vollständig resorbierbarem Poliglactin PG 910 sowie Prolene® (Ethicon), ein nichtresorbierbares Polypropylenetz. Prolene®- und Ultrapro®-Netze bestehen aus monofilamentem Material, wohingegen Vicryl® eine multifilamentäre Netzstruktur aufweist (*Abbildung 4 A – F; Tabelle 1*).

Die verschiedenen Netze wurden unter sterilen Bedingungen unter Zuhilfenahme eines Stereo-Operationsmikroskops mit Hilfe einer Schablone auf eine Größe von 3 x 3mm zugeschnitten.

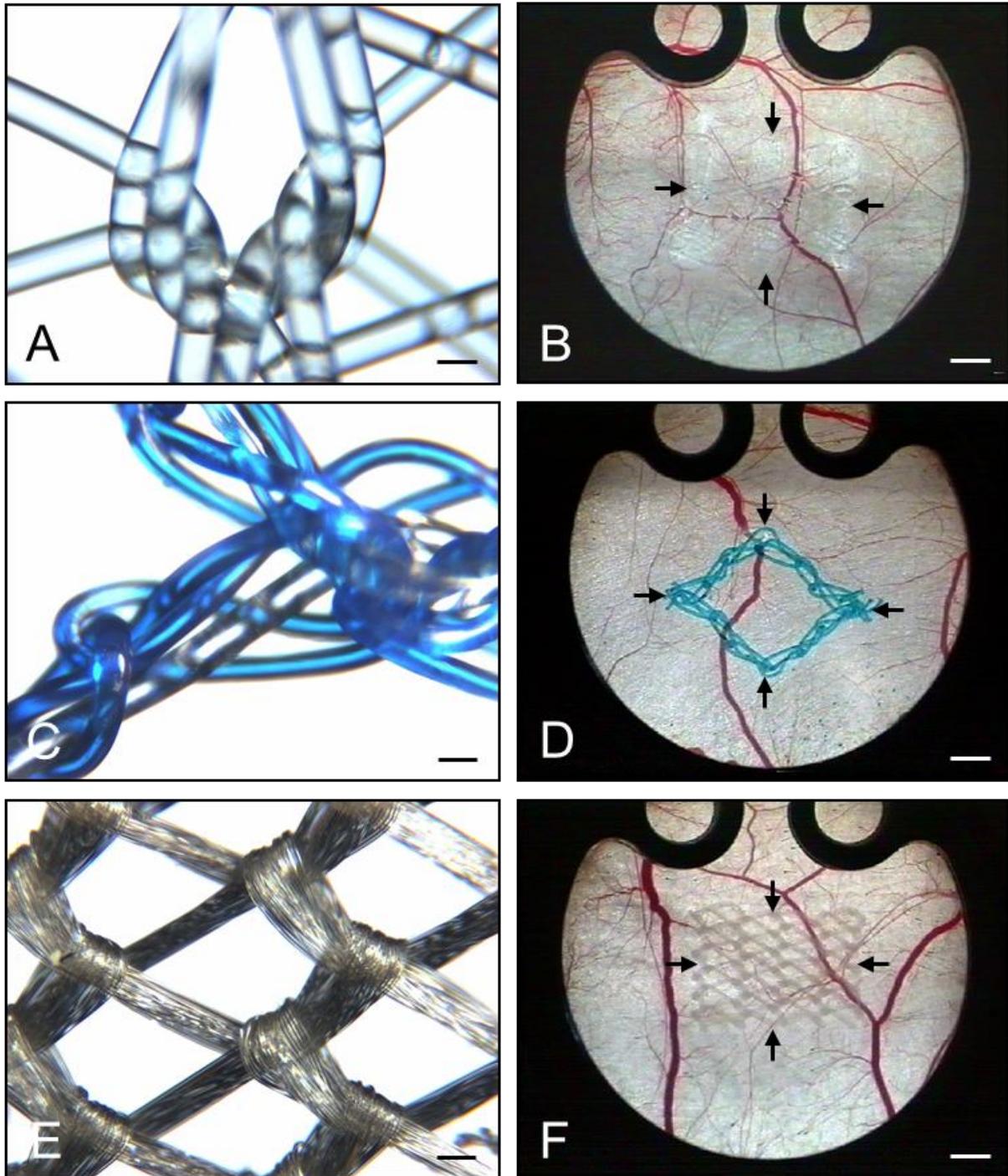


Abbildung 4: A, C, E: Detailaufnahmen der Faserstruktur von Prolene® (A), Ultrapro® (C) und Vicryl® (E). B, D, F: Rückenhautkammer direkt nach Implantation von Prolene® (B), Ultrapro® (D) und Vicryl® (F). Pfeile markieren die Netzgrenzen. Skalierung: A, C, E = 125µm; B, D, F = 1000µm

	Prolene®	Ultrapro®	Vicryl®
Polymer	Polypropylen	Polypropylen & Poliglecaprone	Polyglactin
Struktur	Mono-Filament	Mono-Filament	Multi-Filament
Porengröße	0,25mm ²	3,00mm ²	0,16mm ²
Gewicht	80g/m ²	55g/m ²	50g/m ²
Resorbierbarkeit	nein	teilweise (Poliglecaprone)	Ja
Resorptionszeit*	-	90 - 120 Tage	56 - 70 Tage

Tabelle 1: Materialeigenschaften der untersuchten Prolene®, Ultrapro®- und Vicryl®-Netze. * = Notwendige Zeitperiode für die vollständige Resorption des implantierten Materials.

5.2.4 Implantation der Netze in die Rückenhautkammer

Die Implantation der Netze fand nach einer Erholungsphase von 48 Stunden nach der Kammerpräparation statt, um mögliche Auswirkungen des durch die Präparation verursachten chirurgischen Traumas zu vermeiden. Hierzu wurden die Empfängertiere narkotisiert. Nach intraperitonealer Injektion von Pentobarbital (50mg/kg KG; Narcoren®) wurden die Versuchstiere in einer Plexiglas-Röhre immobilisiert und anschließend auf einer speziell dafür konstruierten Plexiglas-Bühne in Seitenlage mit einem Faden fixiert. Durch einen Längsschlitz in der Plexiglasröhre war der Zugriff auf die Rückenhautkammer ungehindert möglich.

Die Implantation der Netze erfolgte unter einem Stereo-Operationsmikroskop (Leitz). Zunächst wurde der Sprengring entfernt und anschließend das Deckglas des Beobachtungsfensters abgehoben. Danach wurde ein zugeschnittenes Netz der Größe 3 x 3mm auf die quergestreifte Hautmuskulatur der präparierten Kammer platziert. Um die Ausbildung von Luftblasen zu verhindern, wurden einige Tropfen einer 0,9%igen NaCl-Lösung zwischen die einzelnen Netzfaser eingebracht. Anschließend wurde die Kammer mit einem neuen Deckglas und einem Sprengring unter Luftausschluss verschlossen. Nach zwanzig Minuten erfolgte die erste intravitalmikroskopische Untersuchung (Tag 0).

5.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die implantierten Netze wurden mit Hilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Diese Technik eignet sich zur Untersuchung der angiogenen und inflammatorischen Reaktion auf implantierte Netze. Es besteht die Möglichkeit der repetitiven, direkten Visualisierung der Mikrozirkulation der Rückenhautkammer und die anschließende quantitative Auswertung verschiedener mikrohämodynamischer und inflammatorischer Parameter.

Vor jeder intravitalemikroskopischen Untersuchung wurden die Versuchstiere durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50mg/kg KG; Narcoren®) narkotisiert. Zur Kontrastverstärkung wurden den Tieren die Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran (5%; 0,15ml; Molekulargewicht (MG): 150.000Da; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zur Anfärbung des Blutplasmas (*Abbildung 5A*) und Rhodamin-6G (0,1%; 0,15ml; MG: 479Da; Sigma-Aldrich) zur *in vivo* Kontrastierung der Leukozyten (*Abbildung 5B*) retrobulbär intravenös injiziert. Anschließend wurden die Hamster in einer Plexiglasröhre immobilisiert und so auf einer Plexiglasbühne fixiert, dass das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer auf dem Mikroskoptisch in horizontaler Lage platziert werden konnte.

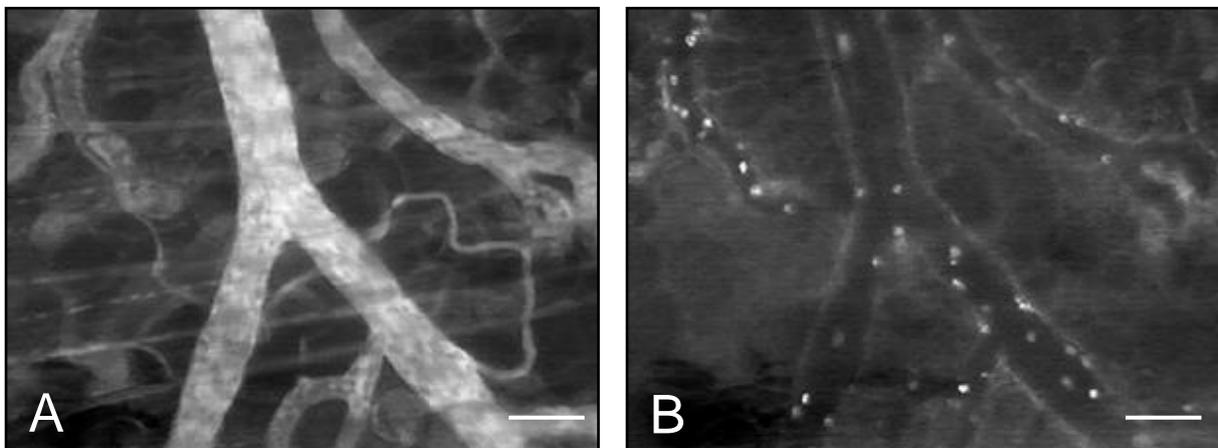


Abbildung 5: A, B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Sammelvenole und ihrer Zuflüsse in der Rückenhautkammer. Mittels des Fluoreszenzfarbstoffes 5% FITC-Dextran werden durch die Anfärbung des Blutplasmas die Blutgefäße in Blaulicht-Epi-Illumination dargestellt (A), während Rhodamin-6G in Grünlicht-Epi-Illumination (B) selektiv die Leukozyten als helle Punkte markiert. Skalierung = 60µm

Das verwendete Mikroskop war ein modifiziertes Leitz-Orthoplan-Mikroskop (Leitz GmbH, Wetzlar) mit Aufsicht- und Durchlicht-Einrichtung. Für die Aufsicht-Technik wurde eine 100W Quecksilber (HBO) Lichtquelle (Leitz) an ein Ploemopak-Illuminator System angepasst. Drei zwischengeschaltete Filterblöcke ermöglichten dabei eine Anregung mit Licht der Wellenlängen 330-390nm, 450-490nm und 530-560nm und eine Filterung des emittierten Lichts unterhalb 430nm, 515nm und 585nm. Die intravitalemikroskopischen Bilder konnten

unter Verwendung eines FSA-Tubus-GW sowie eines Vario-Zooms (Leitz) mit Hilfe einer CCD (charge coupled device)-Videokamera (CF 8/1 FMC; Kappa Messtechnik GmbH, Gleichen-Rheinhausen, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgenommen werden. Unter Zwischenschaltung eines Videotimers (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Tokyo, Japan) zur Dokumentation der Versuchstiernummer und des Untersuchungszeitpunktes wurden die Bilder auf ein $\frac{3}{4}$ Zoll Videobandgerät (Panasonic AG 7350; Matsushita Electric Ind. Co., Ltd., Kadoma, Japan) übertragen und auf einem Videomonitor (PVM 1444; Sony, Tokyo, Japan) wiedergegeben. Für Übersichtsaufnahmen wurde ein 4x-Objektiv (Numerische Apertur (n.a.): 0.16; Olympus, Graz, Österreich) bzw. ein 6.3x-Objektiv (n.a.: 0.16; Zeiss, Jena, Deutschland) mit langem Arbeitsabstand verwendet. Für Detailaufnahmen diente ein 10x-Objektiv (n.a.: 0.30; Zeiss) und ein 20x-Objektiv (n.a.: 0,32; Zeiss) mit langem Arbeitsabstand. Mittels dieser optischen Systeme konnten Vergrößerungen von x86, x136, x216 und x432 unter Verwendung des Vario-Zooms auf dem Monitor erzielt werden.

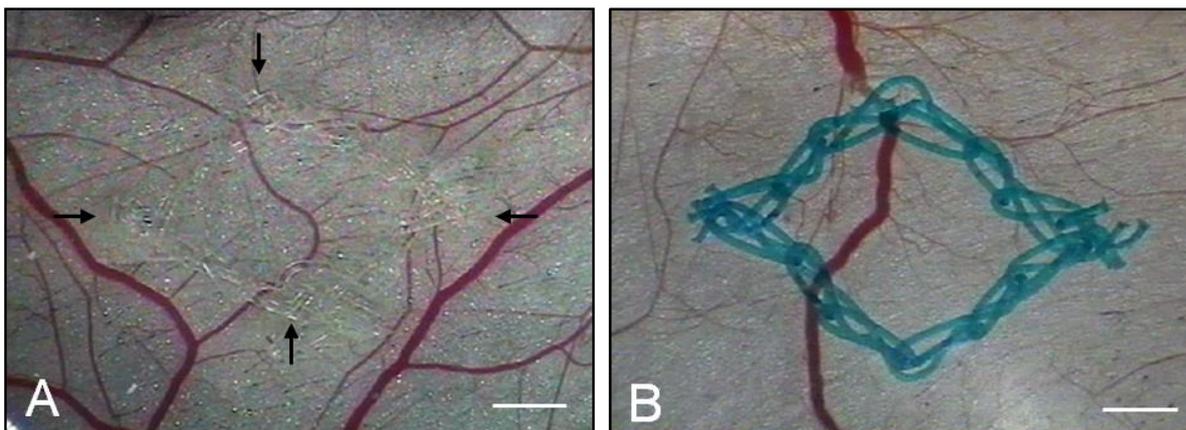


Abbildung 6: Stereomikroskopische Aufnahmen von Rückenhautkammern mit implantierten Netzen. A: Prolene®-Netz (Grenzen sind mit Pfeilen markiert). B: Ultrapro®-Netz. Skalierung = 1000µm

Um einen Überblick über den Zustand der Kammer und der implantierten Netze zu erhalten, wurden zusätzlich Aufnahmen der Rückenhautkammerpräparation mit einem Stereo-Operationsmikroskop (Leica) gemacht (Abbildung 6).

5.3.1 Mikrozirkulatorische Parameter

Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, die etwa 15-20 Minuten pro Tier und Untersuchungstag dauerte, wurden folgende Parameter bestimmt, welche nachfolgend detailliert beschrieben werden:

- Gefäßdurchmesser (µm)
- Blutzellgeschwindigkeit (µm/s)

- Scherrate (s^{-1})
- Blutvolumenfluss (pl/s)
- Gefäßpermeabilität
- Angiogenese-positive Felder (%)
- Funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2)
- Fließverhalten der Leukozyten
- Leukozytendichte in neugebildeten Gefäßen

Unter Verwendung des 10x-Objektivs konnten die Angiogenese-positiven Felder und die funktionelle Kapillardichte bestimmt werden. Das 20x-Objektiv diente zur Bestimmung mikrohämodynamischer Parameter wie Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit sowie zur Analyse des Fließverhaltens der Leukozyten.

Die Auswertung sämtlicher Parameter erfolgte „off-line“, das heißt nach Beenden der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie durch Abspielen der Videobänder mit dem computer-assistierten Bildbearbeitungssystem CapImage (Version 6.02; Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland). Dadurch konnte der Untersuchungszeitraum und die Belastung des einzelnen Tieres auf ein Minimum reduziert werden.

5.3.1.1 Gefäßdurchmesser

Zur Bestimmung der Einzelgefäßdurchmesser wurden im Standbildmodus jeweils zwei sich gegenüberliegende Randpunkte eines Gefäßes durch eine senkrecht zum Gefäßverlauf liegende Durchmesserstrecke verbunden und deren Länge in μm bestimmt. Da durch die Verwendung des Plasma-Markers FITC-Dextran für die Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie auch der erythrozytenfreie Plasmasaum dargestellt wurde, konnten die Gefäßgrenzen eindeutig bestimmt werden. Zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten wurden pro Versuchstier jeweils vier Einzeldurchmesser von Venolen in der Umgebung der Netze bestimmt und aus den Werten das arithmetische Mittel gebildet.

5.3.1.2 Blutzellgeschwindigkeit

Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit erfolgte an denselben Gefäßen, an denen zuvor der Gefäßdurchmesser gemessen wurde. Hierzu wurde die computer-assistierte Line-Shift-Diagramm-Methode angewandt [Klyscz et al., 1997]. Hierzu wurde eine Messlinie entlang der Flussrichtung des zu messenden Gefäßes zentral ins Lumen und parallel zur Gefäßwand gelegt. Anschließend wurde das Videoband für zehn Sekunden in Echtzeit abgespielt. Während dieser Beobachtungszeit wurde für jedes Halbbild entlang der Messlinie ein Grauwertprofil erstellt und in einem Bildspeicher aufgezeichnet. Aus den

aneinandergereihten Grauwertprofilen erstellte der Computer ein Line-Shift-Diagramm. Darin waren helle bzw. dunkle schräge Linien zu erkennen, wenn sich während der Messung Plasmalücken bzw. Erythrozyten entlang der Messlinie bewegt hatten. Durch „Anklicken“ dieser schrägen Linien im Line-Shift-Diagramm konnte automatisch deren Steigung ermittelt und daraus die Geschwindigkeit berechnet werden, welche in $\mu\text{m/s}$ angegeben wurde.

5.3.1.3 Scherrate

Die Scherrate wurde als Quotient aus Blutzellgeschwindigkeit (v) und Gefäßdurchmesser (d) basierend auf der Newton'schen Definition berechnet: $Y = 8 * (v/d)$.

5.3.1.4 Blutvolumenfluss

Zur Berechnung des mikrovaskulären Blutvolumenflusses wurde für größere Blutgefäße die Blutzellgeschwindigkeit mit dem Gefäßquerschnitt multipliziert. Da jedoch das Geschwindigkeitsprofil über den gesamten Querschnitt eines Mikrogefäßes nicht gleich ist, sondern ein parabolisches Profil mit geringeren Randgeschwindigkeiten im Vergleich zum Zentralstrom zeigt, würde die obige Berechnung zu einer Überschätzung des Blutvolumenflusses führen. Aus diesem Grund wurde ein Korrekturfaktor verwendet, der die Diskrepanz zwischen der gemessenen Fließgeschwindigkeit im Zentralstrom gegenüber der durchschnittlichen Fließgeschwindigkeit ausgleicht. Dieser Faktor wird nach seinen Erstbeschreibern als Baker-Wayland-Korrekturfaktor bezeichnet [Baker & Wayland, 1974]. Daraus ergibt sich für die Berechnung des mikrovaskulären Blutflusses die untenstehende Formel, wobei die Variable d für den Durchmesser des Einzelgefäßes, die Variable v für die gemessene Blutzellgeschwindigkeit im Zentralstrom und die Zahl 1.6 für den Korrekturfaktor stehen. Letzterer wird entsprechend der Durchmessergrößen von verschiedenen Autoren unterschiedlich groß angegeben. Aufgrund der in dieser Studie vorgefundenen Gefäßdurchmesser wurde ein Faktor von 1.6 festgelegt: Blutvolumenfluss $Q = \pi * (d/2)^2 * v / 1.6$ [$\mu\text{l/s}$].

5.3.1.5 Gefäßpermeabilität

Die Veränderungen der Gefäßpermeabilität konnten densitometrisch nach intravenöser Gabe des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran (5%) bestimmt werden [Pries, 1988]. Dieser hochmolekulare Plasmamarker (MG: 150,000Da) zeichnet sich unter physiologischen Bedingungen durch eine nur geringe Extravasation aus. Dadurch werden die Gefäße hell dargestellt, wohingegen sich der Extravasalraum dunkel darstellt. Kommt es jedoch unter pathologischen Bedingungen (Entzündung) zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, stellt sich auch der Extravasalraum heller dar. Mit Hilfe des Computers wurden die unterschiedlichen

Grauwerte des angefärbten Blutplasmas (E_2) und des Extravasalraumes (E_1) bestimmt und zueinander in Relation gesetzt: $E = E_1/E_2$.

Unter physiologischen Bedingungen ergibt sich ein Wert, der gegen null strebt. Unter pathologischen Bedingungen erhöht sich der Wert stetig, wobei er den Wert 1 auch übersteigen kann, falls mehr Fluoreszenzfarbstoff im Extravasalraum als im intravasalen Blutplasma vorhanden ist.

5.3.1.6 Angiogenese-positive Felder

Zur Analyse der Vaskularisierung wurden je fünf Beobachtungsfelder im Randbereich der implantierten Netze (rot markiert) sowie im umliegenden Empfängergewebe (Kontrolle, blau markiert) an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten mit dem 10x-Objektiv (216-fache Vergrößerung) aufgenommen (*Abbildung 7*).

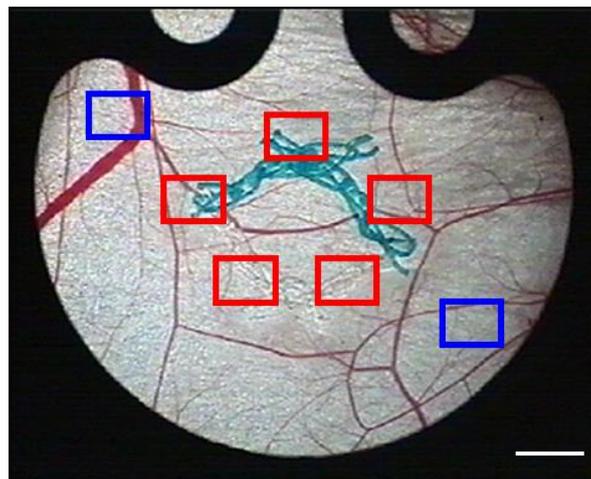


Abbildung 7: Schematische Darstellung der einzelnen Mikroskopie-Felder. Rot markierte Felder zeigen den Randbereich des implantierten Netzes. Die blauen Felder zeigen die zur Kontrolle dienenden Mikroskopie-Felder außerhalb des Bereichs des implantierten Netzes. Skalierung = 1400µm

Unterschieden wurde zwischen Angiogenese-positiven und Angiogenese-negativen Beobachtungsfeldern. Als positiv wurden Felder bewertet, die zum Untersuchungszeitpunkt bereits Zeichen der Angiogenese, wie Kapillarsprossen oder neugebildete, bereits perfundierte Blutgefäße, aufwiesen [Laschke et al., 2007]. Anschließend wurde der Prozentsatz Angiogenese-positiver Felder von der Gesamtzahl der ausgewerteten Felder bestimmt.

5.3.1.7 Funktionelle Kapillardichte

Zur genaueren Quantifizierung der Vaskularisierung im Bereich der Implantate wurde die funktionelle Kapillardichte gemessen. Hierzu wurde die Länge der neugebildeten Kapillaren

pro Beobachtungsfeld in cm/cm^2 errechnet [Rücker et al., 2006]. Dabei wurden nur neugebildete Kapillaren gewertet, die zum Untersuchungszeitpunkt bereits mit FITC-Dextran-markiertem Blutplasma und Erythrozyten perfundiert waren. Die Messungen erfolgten an den schon zuvor verwendeten Beobachtungsfeldern zur Auswertung der Angiogenese. Durch Berechnung des arithmetischen Mittels der fünf Einzelfelder konnte auf diese Weise für jeden Untersuchungstag die funktionelle Kapillardichte der neu entstandenen Gefäßnetzwerke im Bereich der Netze bestimmt werden.

5.3.1.8 Fließverhalten der Leukozyten

Die Leukozyten wurden im 20x-Objektiv (432-fache Vergrößerung) aufgenommen und deren Fließverhalten beurteilt. Zur intravitalmikroskopischen Darstellung wurden die Leukozyten mit dem Fluoreszenzmarker Rhodamin-6G (0,1%) *in vivo* angefärbt [Hoffmann et al., 2002]. Auf diese Weise konnte quantitativ die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in Netznähe beurteilt werden. Hierzu wurden fünf verschiedene Beobachtungsfelder gewählt (*Abbildung 7*). In jedem Beobachtungsfeld wurden eine bis drei Venolen mit einem Durchmesser von $\sim 20\text{-}60\mu\text{m}$ aufgesucht und das Fließverhalten der Leukozyten bestimmt. An nachfolgenden Untersuchungstagen wurden die identischen Beobachtungsfelder für die Messung erneut aufgesucht.

Die Leukozyten wurden hierzu wie folgt unterschieden:

- i. frei fließende Leukozyten
- ii. rollende Leukozyten, die durch eine Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit (weniger als $2/5$ der Zentralstromgeschwindigkeit des jeweiligen Blutgefäßes) aufgrund kurzzeitigen Endothelkontaktes gekennzeichnet sind [Laschke et al., 2007]
- iii. adhärenente Leukozyten, die für mindestens 20 Sekunden an der Gefäßwand fest anhaften [Menger et al., 1992]

Zur Messung wurden die Videobänder in Echtzeit abgespielt und die Anzahl der rollenden und der adhärenenten Leukozyten erfasst. Rollende Leukozyten wurden als Anzahl Zellen angegeben, welche pro Minute einen definierten Referenzpunkt im Gefäß passierten (n/min). Adhärenente Leukozyten wurden als Anzahl Zellen pro Endotheloberfläche (n/mm^2) angegeben.

5.3.1.9 Leukozytendichte in neugebildeten Gefäßen

Zur quantitativen Erfassung der adhärennten Leukozyten in den neugebildeten Gefäßnetzwerken, die sich um die chirurgischen Netze ausbildeten, wurden mit Hilfe des 20x-Objektivs zehn Beobachtungsfelder standardisiert aufgenommen und anschließend mit Hilfe des CapImage-Bildverarbeitungsprogramms ausgewertet. Nachdem die funktionelle Kapillardichte der Felder gemessen worden war, wurden anschließend die adhärennten Leukozyten in den Feldern gezählt. Hierdurch wurde es möglich, die Leukozytendichte in den neugebildeten Gefäßen als adhärennte Leukozyten/Kapillardichte anzugeben.

5.4 WST-1-Assay

Zur *in vitro* Analyse der Zytotoxizität der Prolene[®]-, Ultrapro[®]- und Vicryl[®]-Netze wurde ein water soluble tetrazolium (WST)-1-Assay durchgeführt (Roche, Mannheim, Germany).

Der WST-1-Assay ist eine Weiterentwicklung des MTT-Tests (3-[4,5 Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) [Mosmann, 1983]. Diese Untersuchungsmethode basiert auf der Erkenntnis, dass zur Umsetzung eines schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalses in ein dunkelrotes Formazan viable Zellen mit einer intakten Atmungskette notwendig sind. Das Tetrazoliumsals wird von zellulären mitochondrialen Dehydrogenasen in Formazan umgewandelt, dessen Farbintensität mittels Absorptionsmessung fotometrisch bestimmt und quantifiziert werden kann [Hamasaki et al., 1996; Ishiyama et al., 1996]. Entsprechend ist die Aktivität der Dehydrogenasen zur Umwandlung von hellrotem Tetrazoliumsals zu dunkelrotem Formazan abhängig von der Stoffwechselrate der Zellen und demnach von deren Viabilität. Letztere stellt also einen Vitalitätsmarker dar. Im WST-1-Assay wird folglich die Aktivität des mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems (STRS) bestimmt.

Der WST-1-Assay wurde wie folgt ausgeführt: Unter sterilen Bedingungen wurden 3 x 3mm große Proben der einzelnen Netze (Ultrapro[®], Prolene[®], Vicryl[®]) mit einer Schere zugeschnitten und in 96-Wellplatten gelegt (BD Falcon, Heidelberg, Deutschland). Anschließend wurde Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 10% FCS; PAA, Cölbe, Deutschland) zusammen mit 2 x 10⁴ Mausfibroblasten (L929; CLS, Heidelberg, Deutschland) hinzugefügt und in befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden 10µl WST/100µl Medium in jedes Well pipettiert. Nach zwei weiteren Stunden bei 37°C wurde die Farbreaktion bei 450nm/620nm gemessen. Als Kontrollgruppe dienten Mausfibroblasten in DMEM ohne Netz. Die Messung wurde jeweils vier Mal durchgeführt.

5.5 Histologie

Mit Hilfe der Histologie war es möglich, die Inkorporation der verwendeten Netzmaterialien in das Empfängergewebe zu untersuchen. Zudem konnten neugebildete Gefäße dargestellt und mögliche Entzündungsreaktionen nachgewiesen werden. Als Zeichen einer Entzündungsreaktion diente der Nachweis von Leukozyten in unmittelbarer Netznähe.

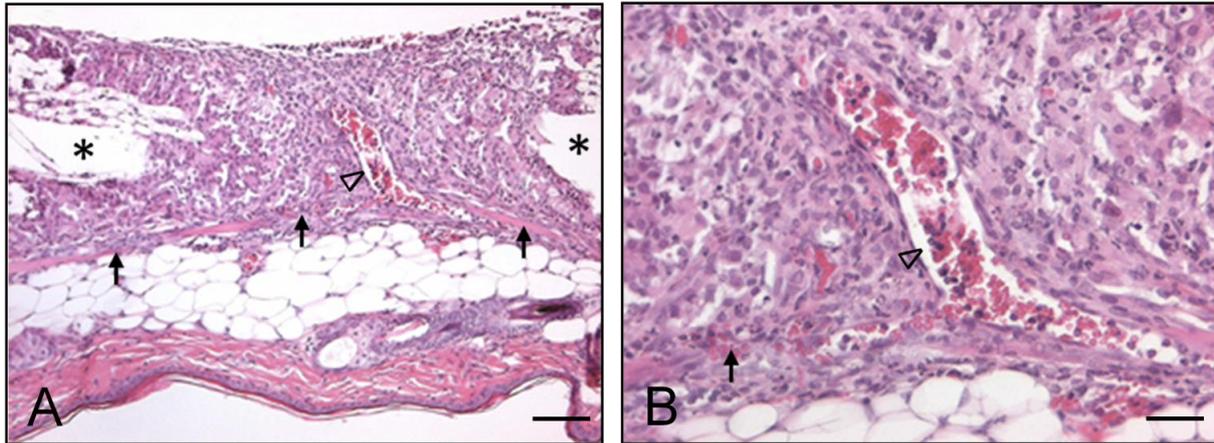


Abbildung 8: A, B: HE-gefärbte histologische Präparate eines Vicryl®-Netzes. Die Pfeile zeigen die Muskelschicht, darüber angeschnittene Netzfäsern (markiert mit *) sowie reichlich Granulationsgewebe mit neugebildeten Gefäßen (markiert mit Δ). Skalierung: A = 100 μ m; B = 20 μ m

Für die histologischen Untersuchungen am Ende der jeweiligen Versuchsreihen wurden die exziierten Rückenhautkammer-Präparationen samt implantierter Netze in 4%-iger Formalinlösung bei 4° für 24 Stunden fixiert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin sowie die Anfertigung von Serienschnitten mit einer Schichtdicke von 4 μ m. Die Schnitte wurden gemäß Standardprotokoll mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Hämatoxylin färbt hierbei alle sauren Zellstrukturen (Zellkerne, DNA) blau an, wohingegen Eosin die basischen Zellstrukturen (Proteine) rot markiert.

Einzelne Schnitte wurden mittels Chlor-Acetat-Esterase (CAE) gefärbt, um Leukozyten (dunkelrot) im Bereich der implantierten Netze zu identifizieren. Zusätzlich wurden Schnitte mit Sirius-red gefärbt, welches Kollagenfasern im neugebildeten Granulationsgewebe rot anfärbt. Anhand der angefertigten Präparate konnte so die Inkorporation der Netze in das Kammergewebe und das Vorliegen einer Entzündungsreaktion im Bereich der Implantate histomorphologisch untersucht werden. Zur Färbung der Serienschnitte wurden diese zunächst vom Paraffin gereinigt und mit Wasser hydriert. Anschließend wurden einzelne Schnitte entweder für sieben Minuten mit Hämatoxylin gefolgt von 25 Sekunden Eosin oder mit CAE-Reagenz für 30 Minuten oder mit picro-sirius-red Lösung für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Schnitte gewaschen, in 70%-igem Ethanol dehydriert und drei mal drei

Minuten in Xylol getaucht. Sämtliche Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (BX60 Olympus, Hamburg, Deutschland) untersucht.

5.6 Ausreißversuch

Die Inkorporation der implantierten Netze in das umgebende Empfängergewebe wurde am Tag 14 zusätzlich mit Hilfe eines Ausreißversuches analysiert. Hierzu wurden die Versuchstiere mittels intraperitonealer Injektion von Pentobarbital anästhesiert (50mg/kg), in einer Plexiglasröhre immobilisiert und die Rückenhautkammer auf einer Plexiglasbühne fixiert. Danach wurden die implantierten Netze mittels eines 7.0-Prolene-Fadens an einer Präzisionsfederwaage (Lightline 100g; Pesola, Schweiz) fixiert und mittels konstant ansteigender Zugkraft von $1\text{cN/mm}^2/\text{s}$ aus dem Kammergewebe gezogen [Menger et al., 1990; Laschke et al., 2005]. Dabei wurde die maximale Kraft in cN/mm^2 gemessen, die notwendig war, um die Implantate vollständig aus dem Gewebe zu lösen.

5.7 Experimentelles Protokoll

Im Anschluss an die Präparation der Rückenhautkammer konnten sich die Versuchstiere zunächst für 48 Stunden erholen, um für die nachfolgenden Untersuchungen Beeinträchtigungen der Mikrozirkulation infolge des chirurgischen Traumas zu vermeiden. Während des gesamten Versuchszeitraums wurde makroskopisch die Rückenhautkammer und die darin befindlichen Implantate beurteilt. Ebenso wurde das Verhalten der Tiere (z.B. Nahrungsaufnahme und Putzverhalten) täglich beurteilt, sodass Tiere mit pathologischem Verhalten beziehungsweise entzündeter Rückenhaut-kammer rechtzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen werden konnten.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte bei allen Tieren am Tag der Implantation der Netze (vor Implantation [Baseline]; 20 Minuten nach Implantation [Tag 0]), sowie am 1., 3., 7. und 14. Tag (*Abbildung 9*). Direkt vor der Untersuchung wurden den Versuchstieren die Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran (5%) und Rhodamin-6G (0,1%) im Mischungsverhältnis 1:1 retrobulbär injiziert.

Mit Hilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie, die etwa 15-20 Minuten pro Tier und Untersuchungstag dauerte, wurden folgende Parameter bestimmt:

- Gefäßdurchmesser (μm)
- Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)
- Scherrate (s^{-1})

- Blutvolumenfluss (pl/s)
- Gefäßpermeabilität
- Angiogenese-positive Felder (%)
- Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²)
- Fließverhalten der Leukozyten
- Leukozytendichte in neugebildeten Gefäßen

Nach der letzten intravitalmikroskopischen Untersuchung am 14. Tag wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital (200mg/kg intraperitoneal) eingeschläfert und bei der Hälfte der Tiere die Rückenhautkammerpräparationen zur histologischen Untersuchung exzidiert. Bei der anderen Hälfte wurde mit Hilfe einer Präzisionsfederwaage ein Ausreißversuch durchgeführt.

Die Studie erfolgte an insgesamt 52 Hamstern. In einem ersten Teil der Arbeit wurden zur Etablierung des Modells mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie die Biokompatibilität, Vaskularisierung und das Einwachsen von Ultrapro[®]-Netzen an 8 Hamstern untersucht. Für den zweiten Teil, bei dem drei verschiedene, klinisch häufig eingesetzte Netze (Prolene[®], Ultrapro[®] und Vicryl[®]) untersucht wurden, kamen 21 Hamster zum Einsatz. Zusätzlich wurde zur Untersuchung der Zytotoxizität ein WST-1-Assay durchgeführt.

Im dritten Teil der Arbeit wurde das Einwachsen von chirurgischen Netzmaterialien unter immunsuppressiven Bedingungen an 23 Hamstern untersucht. Hierzu wurden insgesamt 23 Ultrapro[®]-Netze in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster implantiert. Als Immunsuppressiva wurden Rapamycin (Wyeth Pharma GmbH, Münster, Deutschland) und Cyclosporin A (Sigma Aldrich) verwendet. Beginnend 48 Stunden vor Netzimplantation wurden die Tiere wie folgt therapiert:

- Tägliche Rapamycin-Gabe (0,08mg/kg intraperitoneal) (n=6)
- Tägliche Rapamycin-Gabe (1,5mg/kg intraperitoneal) (n=5)
- Tägliche Cyclosporin A-Gabe (20mg/kg intraperitoneal) (n=5)
- Kontrollgruppe ohne Immunsuppressiva (n=7)

Die Medikamente und deren Dosierung wurden bereits bei vorangehenden Studien in Nagetieren angewandt [Vajkoczy et al., 1999; Guba et al., 2002; Stepkowski, 2003; Laschke et al., 2006; Holstein et al., 2008].

Als Kontroll-Gruppe dienten 7 Hamster, welche keiner immunsuppressiven Therapie zugeführt wurden. Drei Tieren pro Gruppe wurde jeweils zusätzlich Blut aus der Jugularis-

Vene entnommen, um die systemischen Leukozytenzahlen und die Blutkonzentration von Rapamycin und Cyclosporin A unter Baseline-Bedingungen sowie an Tag 14 zu bestimmen.

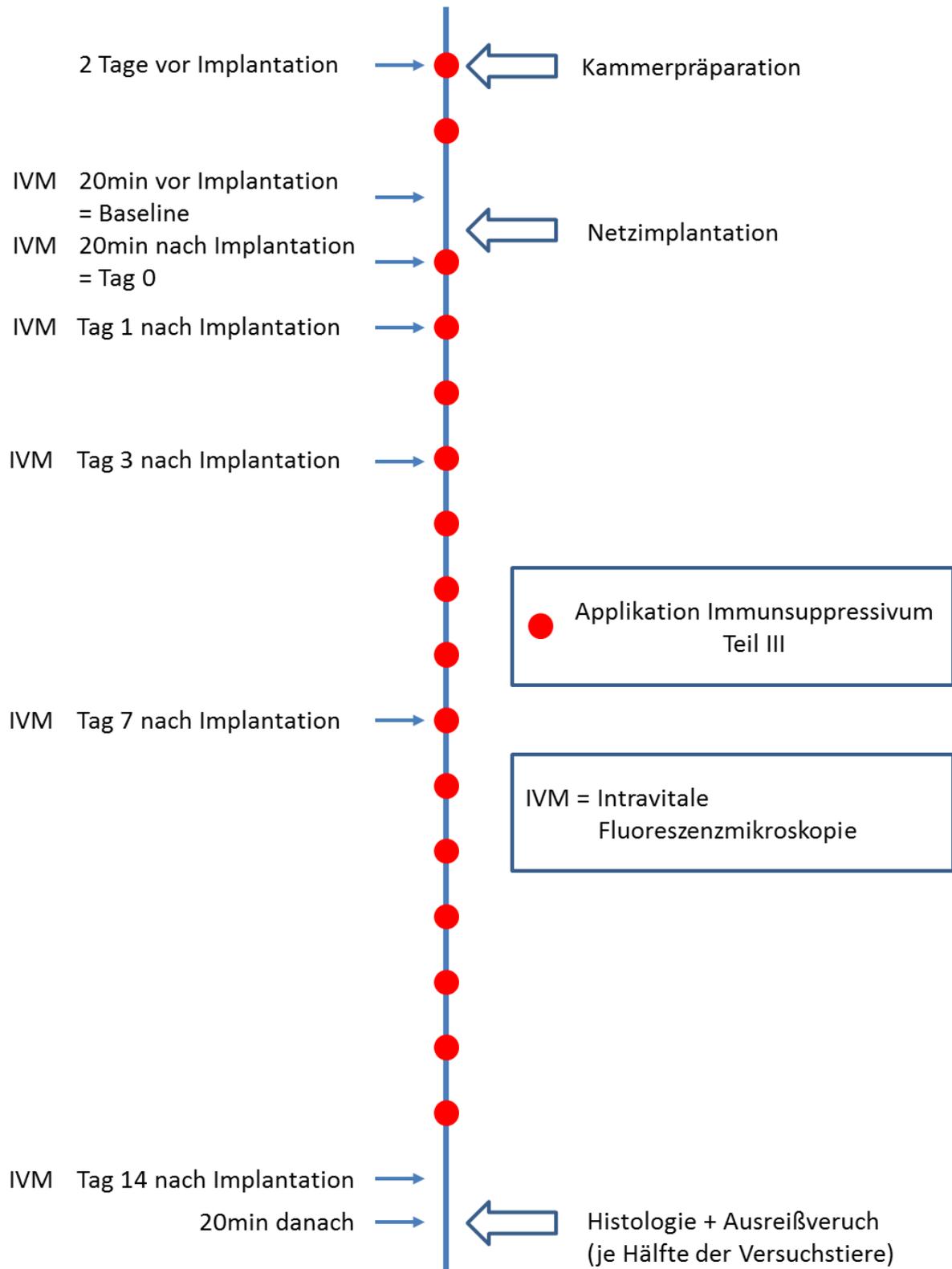


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

5.8 Statistik

Sämtliche gemessenen Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm$ SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Softwarepaketes SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

Die Daten wurde zunächst auf Normalverteilung und Varianzgleichheit geprüft. Anschließend erfolgte der Vergleich zwischen zwei Gruppen an den einzelnen Untersuchungstagen mittels Student's t-Test für den unverbundenen Paarvergleich.

Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte mit einer One way analysis of variance (ANOVA) gefolgt von einem Student-Newman-Keuls-Test zur Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni.

Um wiederholte Messungen in einer Gruppe zu vergleichen, wurde eine ANOVA für wiederholte Messungen gefolgt vom Student-Newman-Keuls-Test zur Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni durchgeführt.

Bei allen Prüfungen wurden Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

6. Ergebnisse

6.1 Mikrozirkulation der Rückenhautkammer

Der quergestreifte Hautmuskel der Rückenhautkammer diente als Empfängergewebe für die Implantation der chirurgischen Netze. Dessen Gefäßversorgung konnte nach intravenöser Gabe des Plasmamarkers FITC-Dextran (5%) kontrastreich dargestellt werden. FITC-Dextran zeichnet sich aufgrund seines Molekulargewichts von 150.000Da durch eine nur geringe Extravasation unter physiologischen Bedingungen aus.

Das Gefäßsystem des quergestreiften Hautmuskels der Rückenhautkammer besteht aus terminalen Arteriolen, nutritiven Kapillaren, postkapillaren Venolen und Sammelvenolen. Die terminalen Arteriolen ($d = 40-60\mu\text{m}$) haben einen streng geradlinigen Verlauf und eine glatte Wandstruktur. Sie verzweigen sich in einem Winkel von $120-150^\circ$ in nachgeschaltete Arteriolen mit Durchmessern von $20-40\mu\text{m}$, die ihrerseits das einschichtige nutritive Gefäßbett der Kapillaren mit sauerstoffreichem Blut versorgen. Die Kapillaren verlaufen typischerweise parallel und stehen zum Teil durch strickleiterartige Querverbindungen in Kontakt. Aus ihnen wird wiederum das sauerstoffarme Blut in postkapillare Venolen ($d = 20-40\mu\text{m}$) und größere Sammelvenolen ($d = 40-120\mu\text{m}$) drainiert. Diese unterscheiden sich von den terminalen Arteriolen intravitalmikroskopisch neben der Flussrichtung durch eine unregelmäßigere Wandstruktur und einen langsameren Blutfluss.

6.2 Implantation und Vaskularisierung chirurgischer Netze

Nach Zuschneiden der einzelnen Netze ($3 \times 3\text{mm}$) wurden diese in die Rückenhautkammer implantiert. Anschließend war es mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie möglich, das Einwachsen neuer Blutgefäße in die einzelnen Implantate über einen Zeitraum von 14 Tagen zu analysieren.

Die Ausbildung neuer mikrovaskulärer Netzwerke um die Netzfaser vollzog sich hierbei in charakteristischen Schritten. Bereits am dritten Untersuchungstag war eine angiogene Reaktion des umgebenden Empfängergewebes auf die Implantate zu beobachten (*Abbildung 10*), welche je nach verwendetem Netzmaterial unterschiedlich stark ausgeprägt war.

Neben der Vasodilatation einzelner Gefäße waren die ersten Gefäßwandknospen und -sprossen im Randbereich der Implantate nachweisbar, die größtenteils von den Hautmuskelkapillaren und zu einem geringeren Anteil von postkapillaren Venolen stammten.

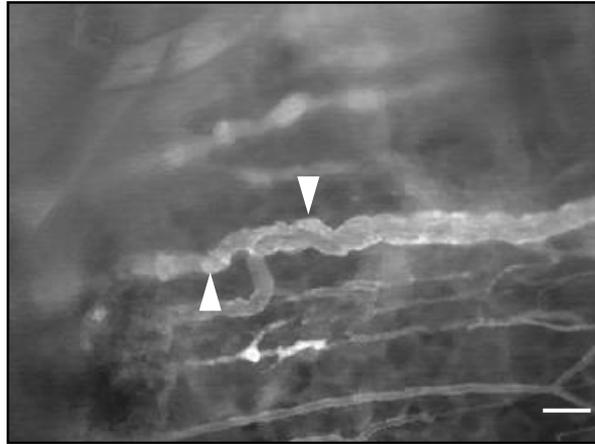


Abbildung 10: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit typischen Zeichen beginnender Angiogenese am dritten Tag nach Implantation eines chirurgischen Netzes. Das Bild zeigt die unregelmäßigen Wandstrukturen einer postkapillaren Venole des Hautmuskels mit ersten Gefäßwandknospen (Pfeilspitzen) in unmittelbarer Nähe zum implantierten Netz. Skalierung = $63\mu\text{m}$

Bis zum 14. Tag entwickelte sich ausgehend von diesen Gefäßsprossen ein Netzwerk aus neugebildeten Gefäßen, welches die Netzfasern in das Empfängergewebe integrierte (Abbildung 11 – 13).

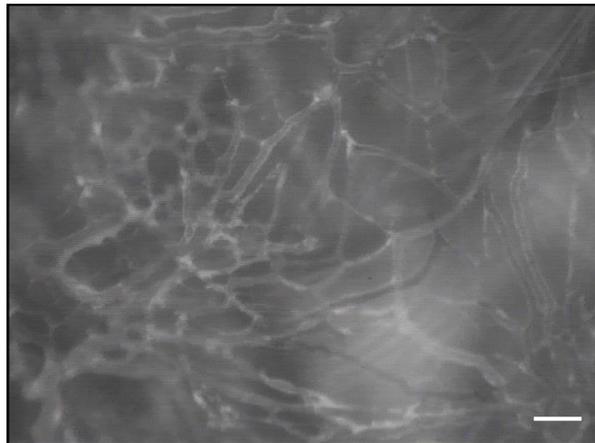


Abbildung 11: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Vicryl®-Netzes mit typischer Vaskularisierung an Tag 14 nach Implantation. Das Bild zeigt ein neugebildetes Gefäßnetzwerk, das die Netzmaschen überwächst. Skalierung = $63\mu\text{m}$

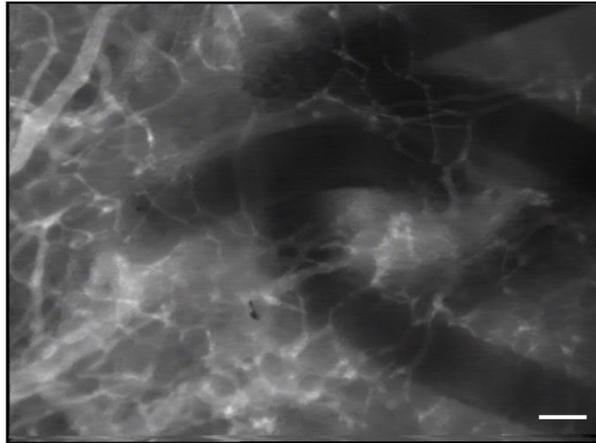


Abbildung 12: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Ultrapro®-Netzes mit typischer Vaskularisierung an Tag 14 nach Implantation. Das Bild zeigt ein neugebildetes Gefäßnetzwerk, das die Netzmaschen überwächst. Skalierung = 63µm

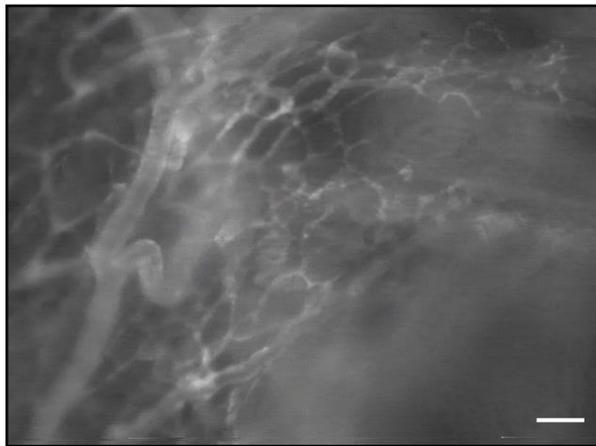


Abbildung 13: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Prolene®-Netzes mit typischer Vaskularisierung an Tag 14 nach Implantation. Das Bild zeigt ein neugebildetes Gefäßnetzwerk, das die Netzmaschen überwächst. Skalierung = 63µm

Die neugebildeten Gefäße konnten aufgrund ihrer Anordnung von der physiologisch bereits bestehenden Gefäßarchitektur des Kammergewebes unterschieden werden. Während die Hautmuskelkapillaren parallel zueinander in einer Ebene angeordnet waren, verliefen die neuen Gefäße nicht parallel zueinander und zusätzlich in unterschiedlichen Ebenen. Bereits wenige Tage nach Netzimplantation wurden einzelne Netzfaser bereits von neuen Blutgefäßen überwachsen.

6.3 Reaktionen des Empfängergewebes auf die Implantation chirurgischer Netze

In einem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Einsatz der Rückenhautkammer zur Untersuchung von Netzimplantaten untersucht. Hierzu wurden Ultrapro®-Netze implantiert. Die Biokompatibilität, Vaskularisierung und Inkorporation der Implantate wurde mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

6.3.1 Entzündungsreaktion

6.3.1.1 Fließverhalten der Leukozyten

Die Implantation des Ultrapro®-Netzes führte zu einer vorübergehenden Aktivierung von Leukozyten in postkapillaren Venolen an der Implantatstelle. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg von adhärenenten Leukozyten 20 Minuten und 24 Stunden nach Implantation (Abbildung 14A, 15A und B). Nach drei Tagen normalisierte sich die Anzahl der adhärenenten Leukozyten wieder auf Werte, wie sie unter Baseline-Bedingungen gemessen wurden (Abbildung 14A).

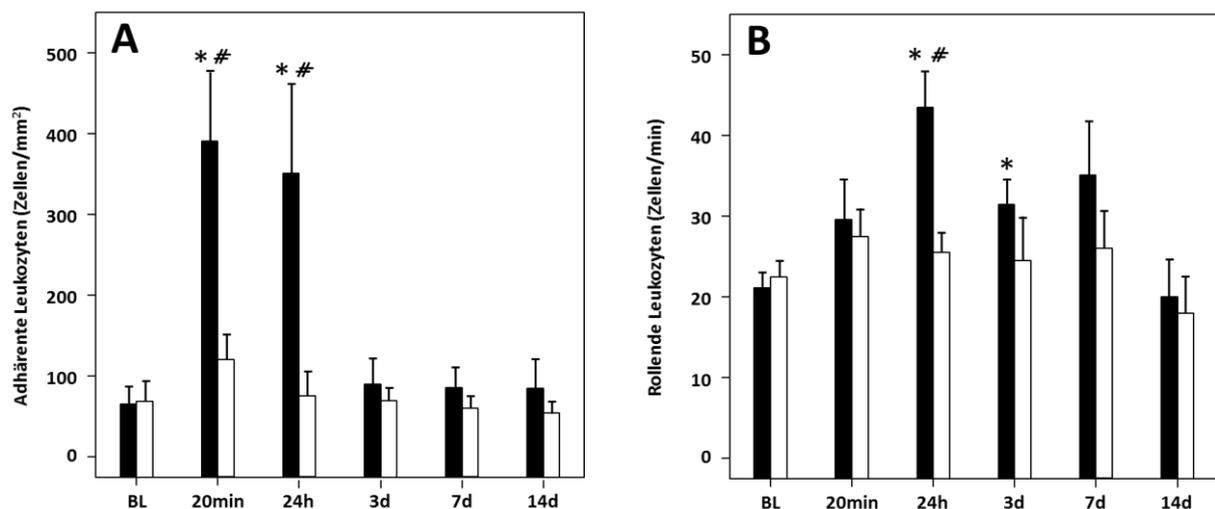


Abbildung 14: Anzahl der adhärenenten Leukozyten (Zellen/mm²) (A) und der rollenden Leukozyten (Zellen/min) (B) in postkapillaren Venolen und Sammelvenolen in netznahem (schwarze Balken) und netzfernem Kontrollgewebe (weiße Balken). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Baseline (BL); # $p < 0,05$ vs. Kontrollgewebe.

Parallel zum Anstieg der adhärenenten Leukozyten verdoppelte sich die Anzahl der rollenden Leukozyten 24 Stunden nach Implantation im Vergleich zur Baseline. Die Anzahl der rollenden Leukozyten blieb insgesamt bis sieben Tage nach Implantation leicht erhöht (Abbildung 14B, 15A und B).

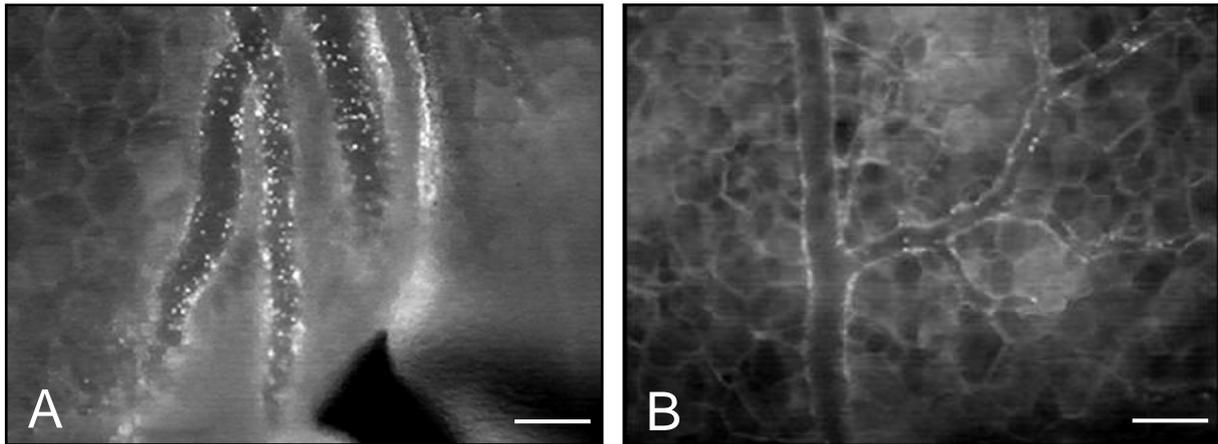


Abbildung 15: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Venolen im Randbereich der Netzhäute (A) und im netzfernen Kontrollgewebe (B) 24 Stunden nach Implantation. Die Venolen im Randbereich der Netzhäute zeigen eine massive Akkumulation von adhärenenten und rollenden Leukozyten (A), was im netzfernen Kontrollgewebe nicht der Fall ist (B). Skalierung = 105µm

6.3.1.2 Gefäßpermeabilität

Als Folge der temporären leukozytären Entzündungsreaktion kam es auch zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität im Bereich der implantierten Netze. Die makromolekulare Gefäßpermeabilität zeigte einen vorübergehenden Anstieg von $0,33 \pm 0,03$ (Baseline) auf $0,58 \pm 0,02$ drei Tage nach Implantation (Abbildung 16, 17A und B). Am 14. Tag lagen die Werte für die Gefäßpermeabilität wieder im Bereich der Baseline-Werte.

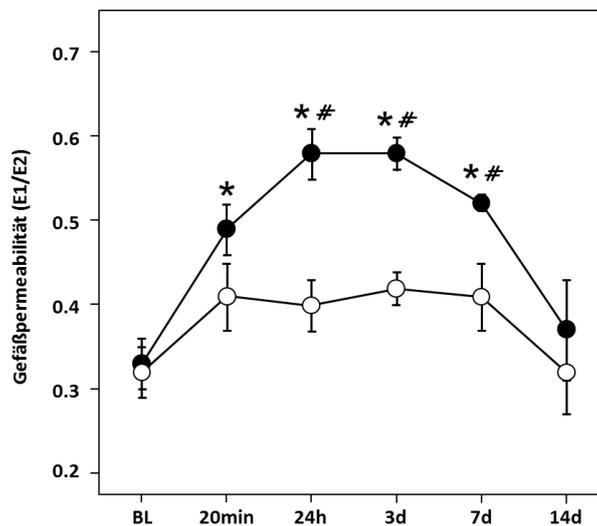


Abbildung 16: Makromolekulare Gefäßpermeabilität (E_1/E_2) in Netznähe (schwarze Punkte) und im netzfernen Kontrollgewebe (weiße Punkte). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Baseline (BL); # $p < 0,05$ vs. Kontrollgewebe.

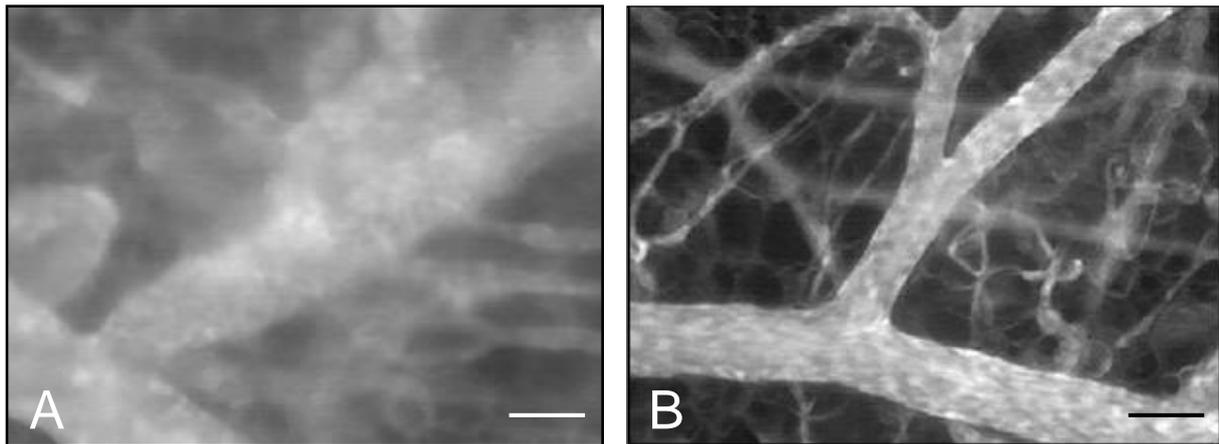


Abbildung 17: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Venolen im Randbereich der Netzimplantate (A) und im netzfernen Kontrollgewebe (B) an Tag 3 nach Implantation. In Netznähe (A) ist die makromolekulare Gefäßpermeabilität deutlich erhöht, was eine gestörte Endothelzellintegrität infolge der temporären Entzündungsreaktion anzeigt. Skalierung = $60\mu\text{m}$

6.3.1.3 Entzündungsreaktion im netzfernen Kontrollgewebe

Im netzfernen Kontrollgewebe waren alle entzündungsspezifischen Parameter (adhärente und rollende Leukozyten, makromolekulare Gefäßpermeabilität) während des gesamten 14-tägigen Beobachtungszeitraums konstant und zeigten keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu den Baseline-Messungen (Abbildung 14 – 17).

6.3.2 Mikrohämodynamik

Zu Beginn der Experimente wurden Venolen innerhalb der Rückenhautkammer mit Durchmessern zwischen $20\text{-}40\mu\text{m}$ ausgewählt. In diesen Venolen erfolgte die Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Die Messwerte für die Blutzellgeschwindigkeit in den Gefäßen lagen dabei im Bereich von $300\text{-}500\mu\text{m/s}$, für den Blutvolumenfluss zwischen $200\text{-}400\text{pl/s}$ und für die Scherrate zwischen $60\text{-}100\text{s}^{-1}$. Über den gesamten Zeitraum von 14 Tagen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Gefäßdurchmesser in Netznähe im Vergleich zu den Gefäßen im Kontrollgewebe des Kammerrandbereiches (Tabelle 2). In unmittelbarer Netznähe waren die Werte der Blutzellgeschwindigkeit, des Blutvolumenflusses und der Scherrate im Vergleich zum Kontrollgewebe leicht reduziert. Dieser Unterschied wurde mit großer Wahrscheinlichkeit durch eine Kompression des Gewebes durch die implantierten Netze verursacht.

	Baseline	20min	24h	3d	7d	14d
<u>Gefäßdurchmesser [μm]</u>						
Netznähe	36,1 \pm 2,5	34,2 \pm 2,2	42,7 \pm 2,1	46,3 \pm 3,8	42,9 \pm 2,2	41,6 \pm 3,9
Kontrollgewebe	37,2 \pm 2,7	42,1 \pm 3,3	37,1 \pm 3,0	40,0 \pm 2,4	43,2 \pm 4,9	41,9 \pm 8,6
<u>Blutzellgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]</u>						
Netznähe	328,1 \pm 43,3	323,8 \pm 35,0	346,1 \pm 50,1	393,9 \pm 51,3	485,8 \pm 66,1	280,5 \pm 23,9
Kontrollgruppe	352,6 \pm 42,2	396,8 \pm 58,9	518,9 \pm 75,1	525,7 \pm 75,8	575,5 \pm 112,6	415,3 \pm 114,1
<u>Blutvolumenfluss [pl/s]</u>						
Netznähe	205,0 \pm 31,5	201,9 \pm 43,2	338,8 \pm 78,2	407,4 \pm 64,2	444,5 \pm 82,1	251,1 \pm 53,8
Kontrollgruppe	212,3 \pm 42,7	362,2 \pm 80,3	407,4 \pm 97,6	441,9 \pm 100,7	535,2 \pm 115,8	465,0 \pm 198,9
<u>Scherrate [s^{-1}]</u>						
Netznähe	77,0 \pm 14,1	75,2 \pm 5,3	63,3 \pm 6,7	71,5 \pm 11,2	92,7 \pm 14,3	54,7 \pm 4,4
Kontrollgewebe	70,9 \pm 8,5	77,3 \pm 12,5	108,1 \pm 11,2	105,0 \pm 14,8	113,9 \pm 26,2	78,7 \pm 16,9

Tabelle 2: Gefäßdurchmesser (μm), Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$), Blutvolumenfluss (pl/s) und Scherrate (s^{-1}) in postkapillaren Venolen und Sammelvenolen in Netznähe und im netzfernen Kontrollgewebe. Mittelwert \pm SEM

6.3.3 Angiogenese und Netzinkorporation

Erste Anzeichen einer Gefäßneubildung in Netznähe konnten bereits drei Tage nach Implantation beobachtet werden. Diese waren durch eine Vasodilatation einzelner Kapillaren und durch Bildung von Gefäßwandsprossen charakterisiert, welche ihren Ursprung hauptsächlich in den Hautmuskelkapillaren und zu einem geringeren Teil in den postkapillaren Venolen hatten (*Abbildung 18 A-D und 19*).

Im weiteren zeitlichen Verlauf wuchsen diese Sprossen in die Netzfasern ein und verbanden sich schließlich zu neuen, perfundierten mikrovaskulären Netzwerken (*Abbildung 18 A-D*). Nach 14 Tagen wurde ein Ausreißversuch durchgeführt. Dabei wurde eine Kraft von $8,13 \pm 0,77 \text{ cN/mm}^2$ benötigt, um das implantierte chirurgische Netzmaterial vollständig aus dem Empfängergewebe der Rückenhautkammer zu lösen.

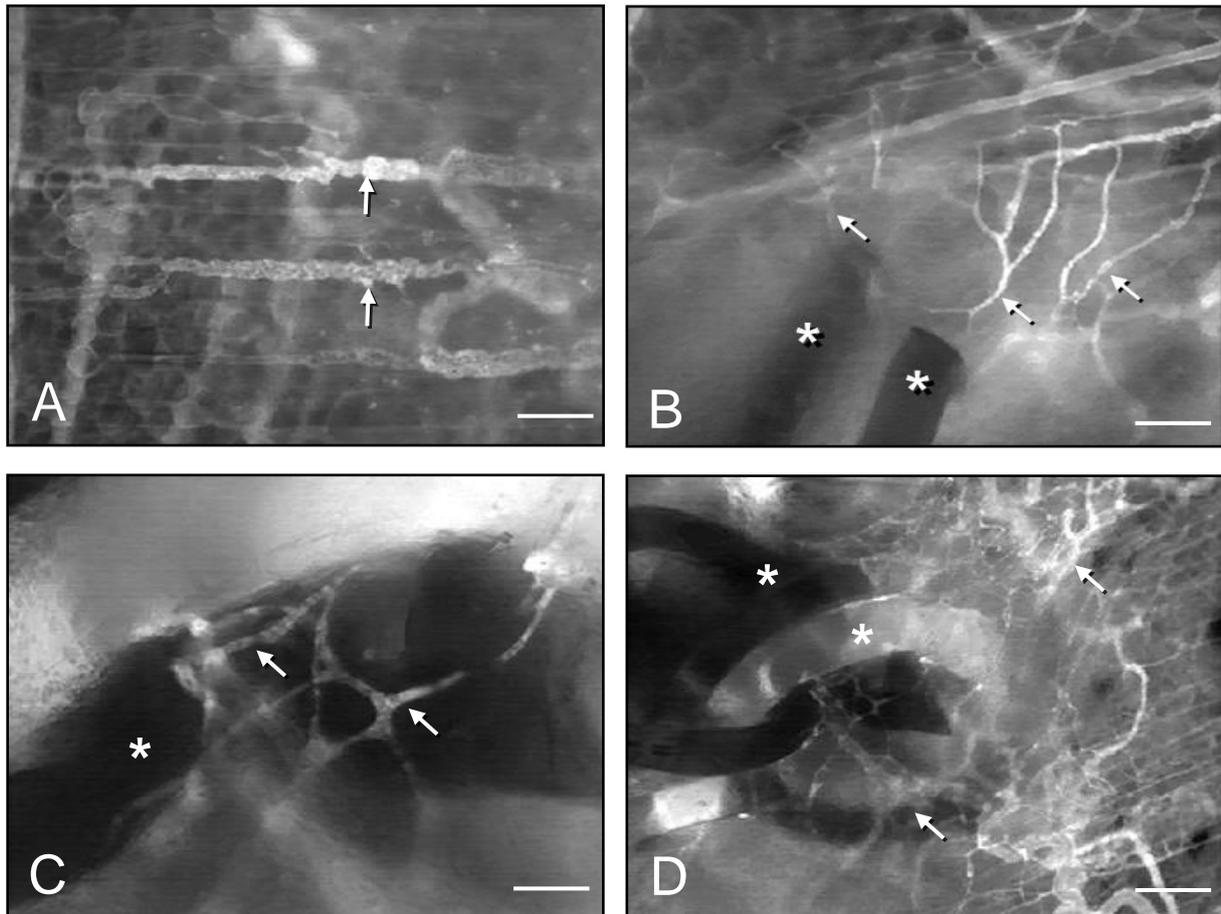


Abbildung 18: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Venolen im Randbereich der Netzimplantate (markiert mit *). Am dritten Tag zeigen sich erste Zeichen der Angiogenese, die durch Kapillardilatationen (A, Pfeile) und Kapillarsprossen (B, Pfeile) ausgehend von den parallel verlaufenden Kapillaren der quergestreiften Hautmuskulatur charakterisiert sind. Im weiteren Zeitverlauf bilden sich hieraus neue Gefäße, die in Richtung der Netzmaschen wachsen (C, Pfeile), bevor sich ein neugebildetes Gefäßnetzwerk über die Netzfasern ausbreitet (D, Pfeile). Skalierungen: A, B = 105µm; C = 50µm und D = 170µm

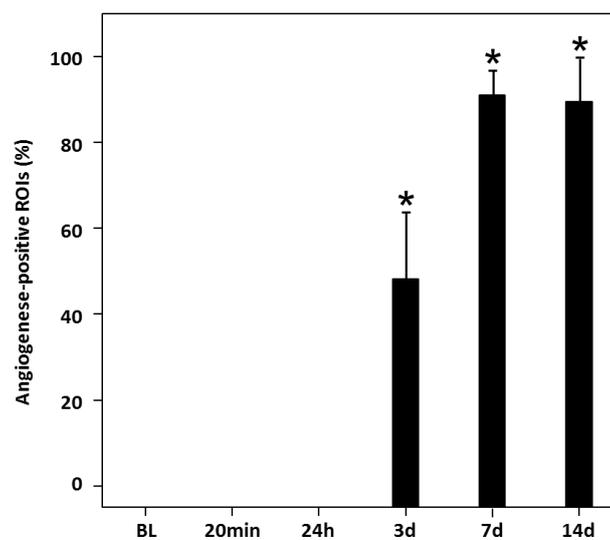


Abbildung 19: Angiogenese-positive ROIs (%) nach Implantation von Ultrapro®-Netzen. Als Angiogenese-positive ROIs wurden die Bereiche definiert, bei denen erste Zeichen einer Gefäßneubildung identifiziert werden konnten. Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Baseline (BL)

6.3.4 Histologie

Histologische Untersuchungen der exziierten Rückenhautkammern 14 Tage nach Netzümplantation bestätigten die bereits mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie gefundenen Ergebnisse. In Nähe der Netzümplantate zeigte sich keine vermehrte Infiltration von Entzündungszellen. Es waren lediglich wenige Fremdkörper-Riesenzellen nachweisbar. Weiterhin entwickelten sich zahlreiche neue Blutgefäße im Granulationsgewebe, das die Netzfaser umschloss. Diese Resultate zeigen eine adäquate, entzündungsarme Inkorporation des chirurgischen Ultrapro®-Netzes in das umgebende Empfängergewebe (Abbildung 20 A und B).

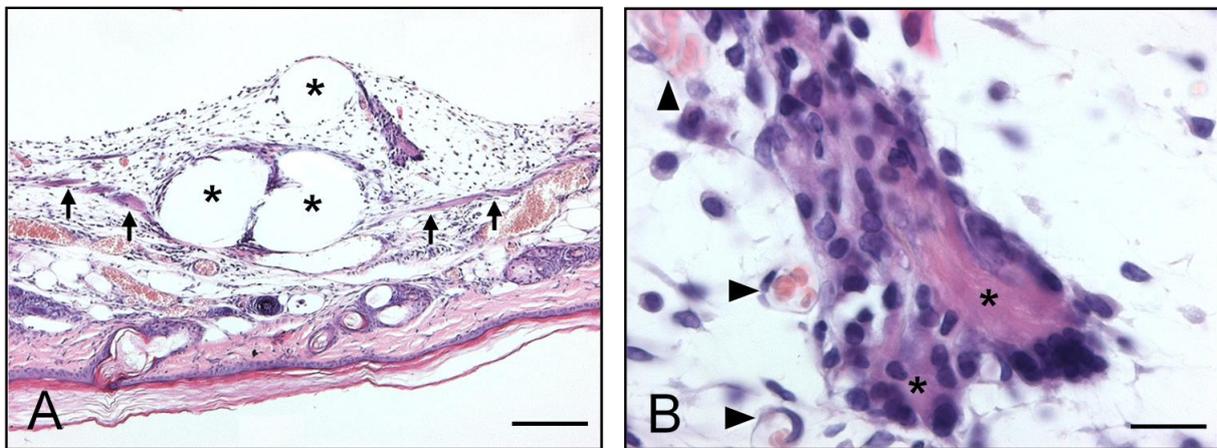


Abbildung 20: A: HE-gefärbter Schnitt eines chirurgischen Ultrapro®-Netzes (*), das 14 Tage nach Implantation auf die Muskelschicht (Pfeile) der Rückenhautkammer in ein Granulationsgewebe inkorporiert wurde. Skalierung = 130µm. B: In höherer Vergrößerung zeigen sich die neugebildeten Blutgefäße (Pfeilspitzen) und mehrkernige Fremdkörper-Riesenzellen (*), welche durch die Fusion einzelner Makrophagen entstanden sind. Skalierung = 20µm

6.4 Biokompatibilität und Vaskularisierung von Prolene[®], Ultrapro[®] und Vicryl[®]

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde das Modell der Rückenhautkammer zur Untersuchung dreier verschiedener Netze eingesetzt. Hierbei wurden Prolene[®]-, Ultrapro[®]- oder Vicryl[®]-Netze implantiert. Anschließend wurde die Biokompatibilität, Vaskularisierung sowie die Inkorporation der unterschiedlichen Netze mit Hilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

6.4.1 Entzündungsreaktion

Unmittelbar vor Implantation der Netze (Baseline) betrug die Anzahl rollender bzw. adhärenter Leukozyten 22-29 Zellen pro Minute bzw. 69-87 Zellen/mm² ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (*Tabelle 3*). Durch Implantation der verschiedenen Netze in die Rückenhautkammer wurde eine vorübergehende Entzündungsreaktion ausgelöst. Dies äußerte sich in einer signifikant erhöhten Anzahl adhärenter Leukozyten (*Tabelle 3*). Spätestens nach drei Tagen erreichten die gemessenen Werte jedoch wieder Baseline-Niveau. Weiterhin zeigte die Anzahl der rollenden Leukozyten sowohl über die Zeit als auch zwischen den einzelnen Gruppen keine wesentlichen Unterschiede.

	Baseline	20min	24h	3d	7d	14d
<u>Rollende Leukozyten (Zellen/min)</u>						
Prolene [®]	29,2 ± 4,0	22,7 ± 4,5	35,6 ± 4,3	34,2 ± 4,8	27,4 ± 6,3	27,2 ± 4,9
Ultrapro [®]	21,8 ± 1,9	25,1 ± 2,7	45,2 ± 5,0*	30,7 ± 3,3	34,2 ± 6,3	18,4 ± 2,9
Vicryl [®]	28,6 ± 4,0	22,5 ± 2,2	40,5 ± 5,2	36,8 ± 8,4	43,5 ± 8,1	37,1 ± 8,7
<u>Adhärente Leukozyten (Zellen/mm²)</u>						
Prolene [®]	79,2 ± 26,1	230,8 ± 68,5*	123,0 ± 36,3	108,8 ± 32,2	131,2 ± 29,0	53,5 ± 14,2
Ultrapro [®]	69,2 ± 22,3	334,4 ± 87,3*	233,1 ± 27,6*	69,9 ± 29,9	87,8 ± 23,5	90,6 ± 35,5
Vicryl [®]	86,7 ± 17,0	283,3 ± 45,7	86,3 ± 21,0	150,3 ± 31,7	165,6 ± 36,7	194,4 ± 63,3

Tabelle 3: Rollende (Zellen/min) und adhärente Leukozyten (Zellen/mm²) in postkapillaren Venolen und Sammelvenolen in der Nähe von Prolene[®] (n=7), Ultrapro[®] (n=7) und Vicryl[®] (n=7) vor Implantation (Baseline) sowie 20min, 24h, 3, 7 und 14d nach Implantation. Mittelwert ± SEM

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Nähe der Implantate durch die Netzimplantation nur wenig beeinträchtigt wurde.

Im Gegensatz hierzu unterschied sich die Anzahl der adhärenenten Leukozyten in den neugebildeten Blutgefäßen, welche zwischen die Netzfäsern einwuchsen, signifikant zwischen den drei Gruppen (*Abbildung 21*).

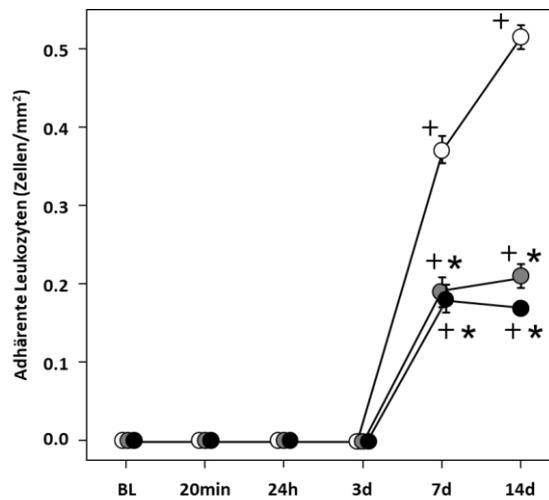


Abbildung 21: Adhärenente Leukozyten (Zellen/mm²) in Netznähe vor Implantation (Baseline) sowie 20min, 24h, 3, 7 und 14d nach Implantation von Prolene® (schwarze Punkte), Ultrapro® (graue Punkte) und Vicryl® (weiße Punkte). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Baseline (BL); * $p < 0,05$ vs. Vicryl®

In der Vicrylgruppe stieg die Anzahl der adhärenenten Leukozyten verglichen mit der Prolene® und Ultrapro®-Gruppe am Tag 7 und 14 signifikant an. Dies weist darauf hin, dass durch die Vicryl®-Netze die Leukozyten aktiviert werden (*Abbildung 22C*). Im Gegensatz hierzu konnten innerhalb der neugebildeten Gefäße in Nähe der Prolene®- und Ultrapro®-Netze nur wenige Leukozyten nachgewiesen werden (*Abbildung 22A und B*).

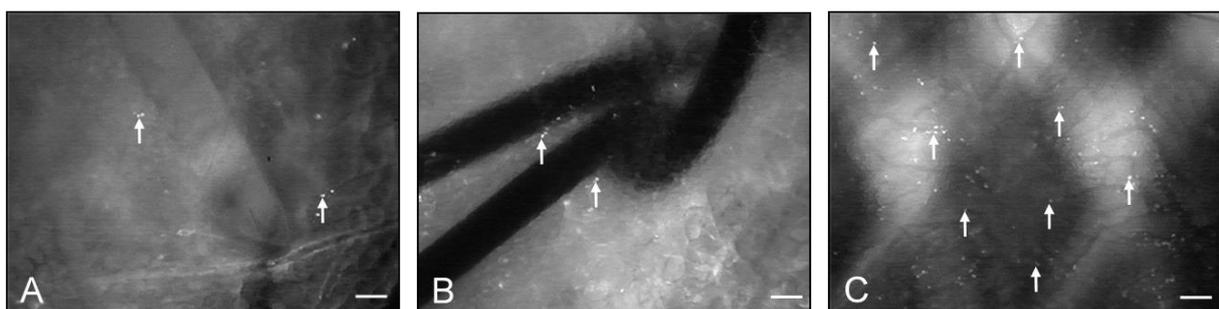


Abbildung 22: A - C: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Rhodamin-6G-gefärbter Leukozyten (Pfeile), welche am Tag 14 nach Implantation in den neugebildeten Blutgefäßen im Bereich der Netzfäsern von Prolene® (A), Ultrapro® (B) und Vicryl® (C) akkumulieren. Skalierung = 63µm

6.4.2 Mikrohämodynamik

Die Analyse der Mikrohämodynamik in den Venolen der Implantationsstelle zeigte konstante Gefäßdurchmesser im Bereich zwischen 34-47µm ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (*Tabelle 4*).

Unter Baseline-Bedingungen betrug in netznahen Gefäßen die Fließgeschwindigkeit des Blutes 300-350µm/s. Sowohl in der Prolene®- als auch in der Ultrapro®-Gruppe zeigten sich während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 4). Demgegenüber fand sich in der Vicryl®-Gruppe nach 14 Tagen ein signifikanter Anstieg auf Werte von bis zu 700µm/s. Demzufolge war in den untersuchten Gefäßen in der Vicryl®-Gruppe auch der Blutvolumenfluss sowie die Scherrate signifikant erhöht (Tabelle 4).

	Baseline	20min	24h	3d	7d	14d
<u>Gefäßdurchmesser (µm)</u>						
Prolene®	37,9 ± 1,1	42,2 ± 1,5	43,9 ± 2,3	42,4 ± 1,0	39,1 ± 2,2	41,9 ± 2,0
Ultrapro®	37,1 ± 2,4	34,0 ± 2,1	41,6 ± 1,5	47,0 ± 3,7	41,8 ± 2,4	40,7 ± 3,8
Vicryl®	37,5 ± 2,8	37,2 ± 0,7	39,2 ± 1,7	41,3 ± 2,2	39,5 ± 1,1	40,1 ± 1,1
<u>Fließgeschwindigkeit (µm/s)</u>						
Prolene®	309,7 ± 33,1	251,0 ± 48,8	300,2 ± 37,0	332,2 ± 51,2	366,6 ± 81,8	379,3 ± 43,4
Ultrapro®	294,0 ± 49,1	318,1 ± 37,1	311,4 ± 46,3	369,5 ± 53,4	491,4 ± 63,4	295,9 ± 37,3
Vicryl®	365,6 ± 45,2	332,1 ± 64,1	523,4 ± 80,0	451,6 ± 52,7	588,3 ± 65,7	703,7 ± 68,5
<u>Blutvolumenfluss (pl/s)</u>						
Prolene®	221,3 ± 30,1	215,4 ± 37,3	297,4 ± 50,9	295,3 ± 48,8	267,5 ± 48,3	319,5 ± 29,3
Ultrapro®	194,4 ± 34,8	195,4 ± 43,7	280,1 ± 60,1	396,3 ± 66,6	436,8 ± 85,5	250,8 ± 53,6
Vicryl®	278,0 ± 63,3	223,7 ± 40,1	413,7 ± 78,4	379,2 ± 49,7	449,8 ± 53,8	559,3 ± 68,8
<u>Scherrate (s⁻¹)</u>						
Prolene®	77,8 ± 7,4	71,9 ± 14,5	106,0 ± 15,6	89,8 ± 13,1	120,0 ± 14,1	140,4 ± 12,5
Ultrapro®	67,0 ± 14,8	74,3 ± 5,9	58,9 ± 7,0	65,9 ± 11,4	95,5 ± 13,6	59,1 ± 7,5
Vicryl®	77,8 ± 7,4	71,9 ± 14,5	106,0 ± 15,6	89,8 ± 13,1	120,0 ± 14,1	140,4 ± 12,5

Tabelle 4: Gefäßdurchmesser (µm), Blutzellgeschwindigkeit (µm/s), Blutvolumenfluss (pl/s) und Scherrate (s⁻¹) von postkapillaren Venolen und Sammelvenolen im netzfernen Kontrollgewebe von Prolene®-(n=7), Ultrapro®-(n=7) und Vicryl®-(n=7) Netzen vor Implantation (= Baseline) sowie 20min, 24h, 3, 7 und 14d nach Implantation. Mittelwert ± SEM

6.4.3 Angiogenese

Bei allen drei Versuchsgruppen führte die Implantation chirurgischer Netze zur Entwicklung neuer Gefäße. Bei der Ultrapro®- und der Vicryl®-Gruppe konnten erste Anzeichen der Gefäßneubildung bereits am dritten Tag nach Netzimplantation beobachtet werden. Charakteristisch hierfür war die Dilatation von Muskelkapillaren des Empfängergewebes sowie die Ausbildung von kapillaren Gefäßknospen in direkter Nähe zu den Netzimplantaten

(Abbildung 18). Im Gegensatz hierzu fanden sich zu diesem frühen Untersuchungszeitpunkt in der Prolene®-Gruppe noch keine Anzeichen der Angiogenese (Abbildung 23 A).

Die funktionelle Kapillardichte der neugebildeten Blutgefäße in der Ultrapro®- und Vicryl®-Gruppe betrug am dritten Tag lediglich 0-4cm/cm² (Abbildung 23 B).

In den darauffolgenden Tagen wuchsen die neugebildeten Gefäßsprossen in Richtung der Netzfasern, wobei sie sich miteinander verbanden. Schließlich bildete sich um und über die Netzfasern der Implantate ein neues mikrovaskuläres Netzwerk aus (Abbildung 24 A-C).

Besonders auffallend war die ausgeprägte Gefäßneubildung in der Vicryl®-Gruppe. Demzufolge fand sich hier im Vergleich zur Prolene®- und Ultrapro®-Gruppe auch eine signifikante Zunahme der funktionellen Kapillardichte am 7. und 14. Tag (Abbildung 23 B).

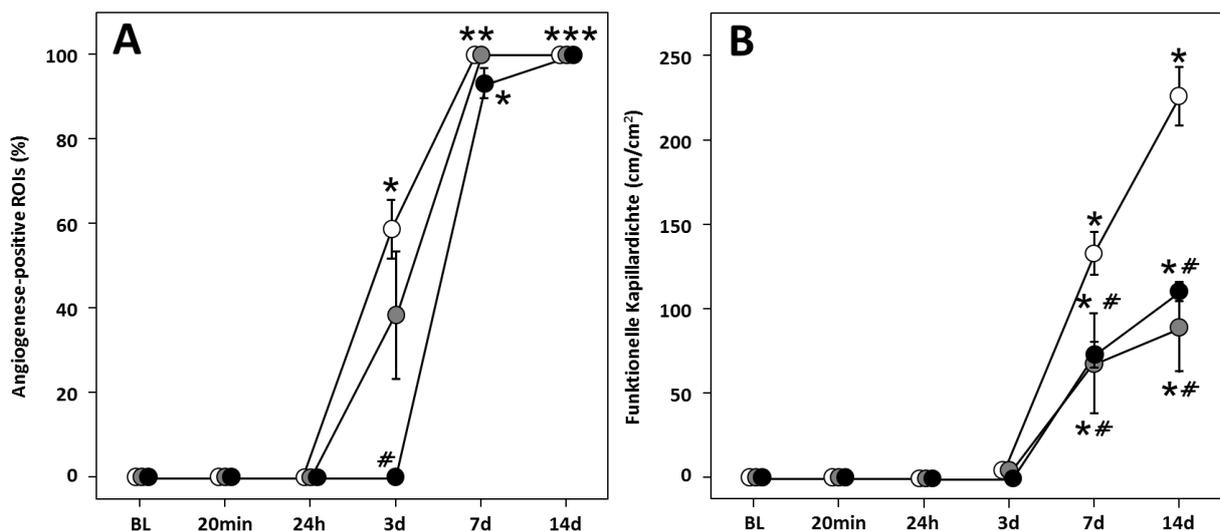


Abbildung 23: Angiogenese-positive ROIs (%) (A) und funktionelle Kapillardichte neugebildeter Gefäße (cm/cm²) (B) vor Implantation (Baseline, BL) sowie 20min, 24h, 3, 7 und 14d nach Implantation von Prolene® (schwarze Punkte), Ultrapro® (graue Punkte) und Vicryl® (weiße Punkte). Als Angiogenese-positive ROIs galten Bereiche, bei denen Zeichen einer Gefäßneubildung identifiziert werden konnten. Mittelwert \pm SEM; # $p < 0,05$ vs. Baseline; * $p < 0,05$ vs. Vicryl®



Abbildung 24: Intra-vitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von neugebildeten Gefäßnetzwerken um die einzelnen Netzfasern (Pfeile) von Prolene® (A), Ultrapro® (B), und Vicryl® (C) am Tag 14 nach Implantation. Skalierung: 90µm

6.4.4 Histologie

Die histologischen Untersuchungen der Netze erfolgten an Schnittpräparaten 14 Tage nach Netzimplantation. Bei allen drei Versuchsgruppen waren die Netze von neugebildeten Gefäßen und Granulationsgewebe umgeben (*Abbildung 25 A-C*). Ein besonders dicht ausgeprägtes Granulationsgewebe zeigte sich in der Vicryl®-Gruppe (*Abbildung 25 C*). Zudem induzierte das Vicryl®-Netz im Gegensatz zu den Prolene®- und Ultrapro®-Netzen eine starke Entzündungsreaktion des Empfängergewebes mit Infiltration von zahlreichen Histozyten, vielkernigen Riesenzellen und Leukozyten. Letztere waren zu mehr als 95% polymorphkernige Granulozyten (*Abbildung 25 I*). Hierbei war zu beobachten, dass diese Leukozyten nicht direkt auf den Netzfäsern, sondern im umgebenden Granulationsgewebe zu finden waren (*Abbildung 25 I*). Überraschenderweise waren in der Vicryl®-Gruppe signifikant weniger Kollagenfasern im Granulationsgewebe zu finden (*Abbildung 25 L*). Diese Beobachtung spiegelt sich auch in den Ergebnissen zur Messung der Netzkorporation wieder (*Abbildung 26*).

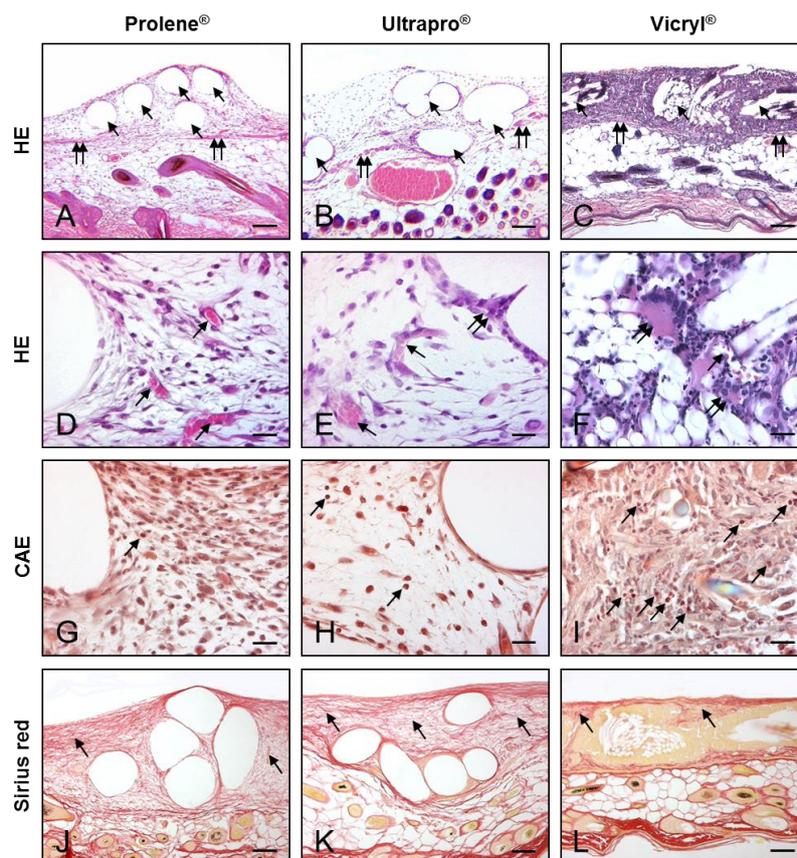


Abbildung 25: Histologische Präparate 14 Tage nach Implantation der verschiedenen Netze. HE-gefärbte Schnitte von Prolene® (A, D), Ultrapro® (B, E) und Vicryl® (C, F). In den Abbildungen A-C zeigen einzelne Pfeile auf die Netzfäser; Doppelpfeile zeigen auf die quergestreifte Hautmuskelschicht. In höherer Vergrößerung (Abbildungen D-F) zeigen Pfeile auf neugebildete Blutgefäße; Doppelpfeile zeigen auf Histozyten und mehrkernige Riesenzellen. G-I: CAE-gefärbte Schnitte von Prolene® (G), Ultrapro® (H) und Vicryl® (I). Pfeile zeigen auf CAE-positive Leukozyten im Granulationsgewebe. J-L: Sirius-red-gefärbte Schnitte von Prolene® (J), Ultrapro® (K) und Vicryl® (L). Pfeile zeigen auf Kollagen-Fasern. Skalierung: A – C = 100µm, D – I = 20µm, J – L = 63µm

6.4.5 Inkorporation der Netze

Die benötigte Zugkraft, um die Netze aus dem umliegenden Gewebe zu lösen, war in der Vicryl®-Gruppe im Vergleich zur Prolene®- und Ultrapro®-Gruppe mit nur 2cN/mm² vierfach verringert (Abbildung 26).

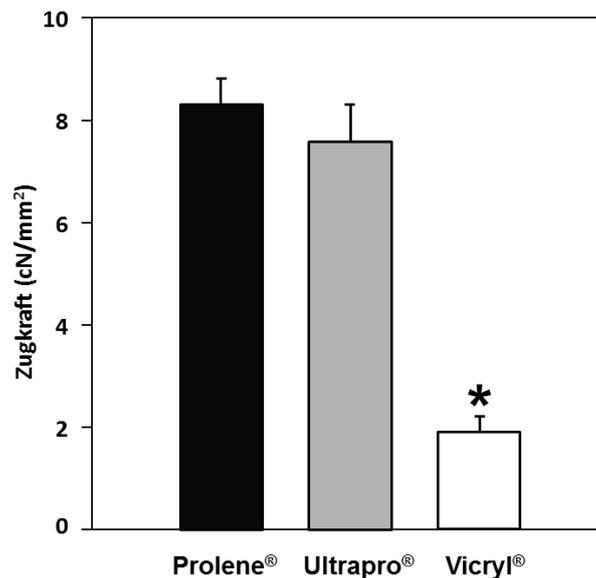


Abbildung 26: Zugkraft (cN/mm²) zum Herauslösen der eingewachsenen Prolene®- (schwarzer Balken), Ultrapro®- (grauer Balken) und Vicryl®- (weißer Balken) Netze 14 Tage nach Implantation. Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Prolene® und Ultrapro®

6.4.6 WST-1-Assay

Zur Messung der *in vitro* Zytotoxizität der Netze wurde zusätzlich ein WST-1 Assay durchgeführt: Hierzu wurden Mausfibroblasten auf die Netze gesiedelt und 24h inkubiert. Dabei zeigte sich, dass in allen drei Untersuchungsgruppen eine vergleichbare Zellvitalität vorhanden war, die keinen Unterschied zur Kontrollgruppe mit Fibroblasten ohne Netzmaterial zeigte. Für die verschiedenen Gruppen ergaben sich folgende Resultate:

- Prolene®: 2,2 \pm 0,2 (OD450nm)
- Ultrapro®: 2,2 \pm 0,1 (OD450nm)
- Vicryl®: 2,3 \pm 0,2 (OD450nm)
- Kontrollgruppe: 2,2 \pm 0,1 (OD450nm)

Dies verdeutlicht, dass alle drei Netze trotz unterschiedlicher Materialzusammensetzung keine Zytotoxizität aufweisen.

6.5 Biokompatibilität und Vaskularisierung von Netzen in immunsupprimierten Tieren

Im dritten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde das Einwachsen chirurgischer Netze unter immunsuppressiven Bedingungen an 23 Hamstern untersucht. Dazu wurden insgesamt 16 Ultrapro®-Netze in die Rückenhautkammer immunsupprimierter Tiere implantiert. Als Immunsuppressiva wurden Rapamycin und Cyclosporin A verwendet. Bei weiteren 7 Hamstern, welche keine immunsuppressiven Medikamente erhielten, erfolgte ebenfalls eine Implantation von Ultrapro®-Netzen. Diese Tiere dienten als Kontrollgruppe.

6.5.1 Konzentration von Rapamycin und Cyclosporin A im Blut

Zu Versuchsbeginn sowie nach 14 Tagen wurde die Konzentration von Rapamycin und Cyclosporin A im Blut der Versuchstiere bestimmt. Hierbei ergaben sich folgende Blutkonzentrationen von Rapamycin und Cyclosporin A in Abhängigkeit der verabreichten Dosis:

	Dosis	Baseline	Nach 14 Tagen
Rapamycin:	0,08mg/kg	5 ± 0µ/l	3 ± 0µ/l
Rapamycin:	1,5mg/kg	120 ± 47µ/l	86 ± 33µ/l
Cyclosporin A:	20mg/kg	212 ± 46µ/l	342 ± 25µ/l

Diese Blutspiegel zeigen, dass während der gesamten Versuchsdauer eine ausreichende Konzentration an Immunsuppressiva vorlag. Entsprechend wurden für die verwendeten Dosierungen bereits in früheren Studien immunsuppressive Effekte detektiert [Vajkoczy et al., 1999; Guba et al., 2002; Stepkowski, 2003; Laschke et al., 2006; Holstein et al., 2008].

6.5.2 Angiogenese und Vaskularisierung

Erste Zeichen der Angiogenese konnten bereits am dritten Tag nach Netzimplantation in der Rückenhautkammer beobachtet werden (*Abbildung 27 A*). Diese waren charakterisiert durch die Bildung von Gefäßsprossen, welche von den Kapillaren und postkapillaren Venolen der Muskulatur der Rückenhautkammer ausgingen. Bei den mit Cyclosporin A-behandelten Tieren sowie bei der Kontrollgruppe war die angiogene Reaktion des Empfängergewebes deutlich stärker ausgeprägt als in den beiden Rapamycin-Gruppen. Während der folgenden Tage bildete sich ein neues Gefäßnetzwerk um die einzelnen Netzmaschen. Bis zum Tag 14 waren die einzelnen Netzmaschen davon vollständig umschlossen (*Abbildung 28 A und B*). Dieses neugebildete Gefäßnetzwerk wies eine funktionelle Kapillardichte von 110-

130cm/cm² in Cyclosporin A-behandelten Tieren und Kontrolltieren auf (Abbildung 27 B). Im Gegensatz dazu führte die immunsuppressive Therapie mit Rapamycin zu einer dosisabhängigen Inhibition der Angiogenese. Die mit Rapamycin immunsupprimierten Tiere wiesen am dritten Tag nach Netzümplantation bei einer Dosis von 0,08mg/kg nur ungefähr 20% Angiogenese-positive ROIs auf (Abbildung 27 A). Bei der höheren Dosis von 1,5mg/kg waren zu diesem Zeitpunkt noch keine der ROIs Angiogenese-positiv (Abbildung 27 A). Obwohl auch in diesen Gruppen zu einem späteren Zeitpunkt die Entstehung neuer Blutgefäße beobachtet werden konnte, war die angiogene Reaktion auf die Netzümplantation sehr gering. Es fand sich eine funktionelle Kapillardichte von nur 12cm/cm² (0,08mg/kg Rapamycin) und 5cm/cm² (1,5mg/kg Rapamycin) am 14. Tag nach Netzümplantation (Abbildung 27 B, 28 C und D).

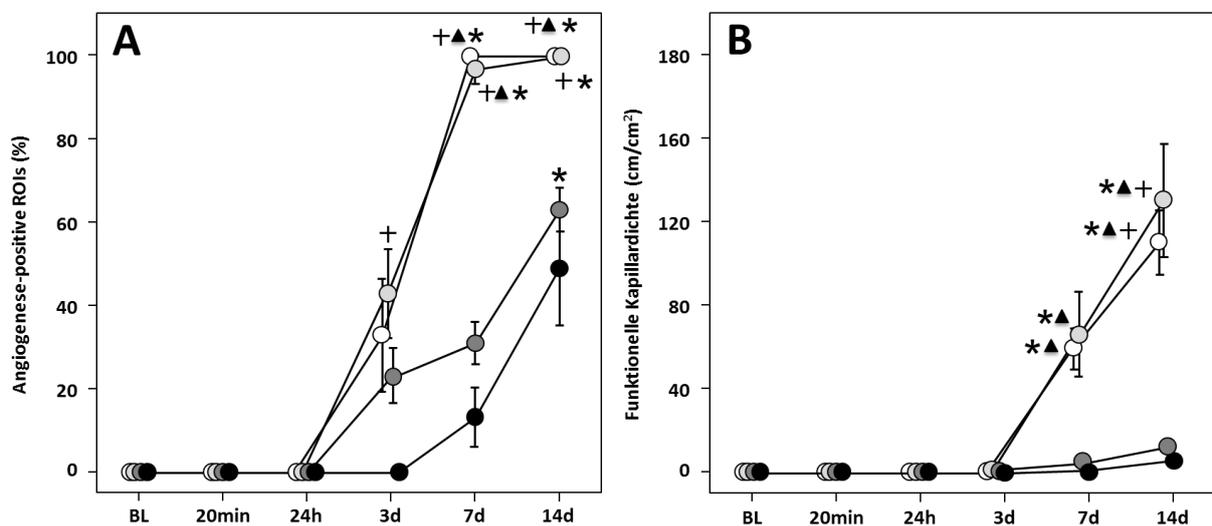


Abbildung 27: Angiogenese-positive ROIs (%) (A) und funktionelle Kapillardichte neu gebildeter Gefäße (cm/cm²) (B) vor Implantation (Baseline, BL) sowie 20min, 24h, 3, 7 und 14d nach Implantation von Ultrapro®-Netzen in Abhängigkeit der verwendeten Immunsuppression. CSA-behandelte Hamster (hellgraue Punkte); Rapamycin-behandelte Tiere mit einer Dosis von 0,08mg/kg (dunkelgraue Punkte) sowie einer Dosis von 1,5mg/kg (schwarze Punkte); unbehandelte Tiere (weiße Punkte) dienten als Kontrollgruppe. Als Angiogenese-positive ROIs galten Bereiche, bei denen Zeichen einer Gefäßneubildung identifiziert werden konnten. Mittelwert ± SEM; * $p < 0,05$ vs. Baseline (BL); ^ $p < 0,05$ vs. Rapamycin in einer Dosis von 0,08mg/kg; * $p < 0,05$ vs. Rapamycin in einer Dosis von 1,5mg/kg

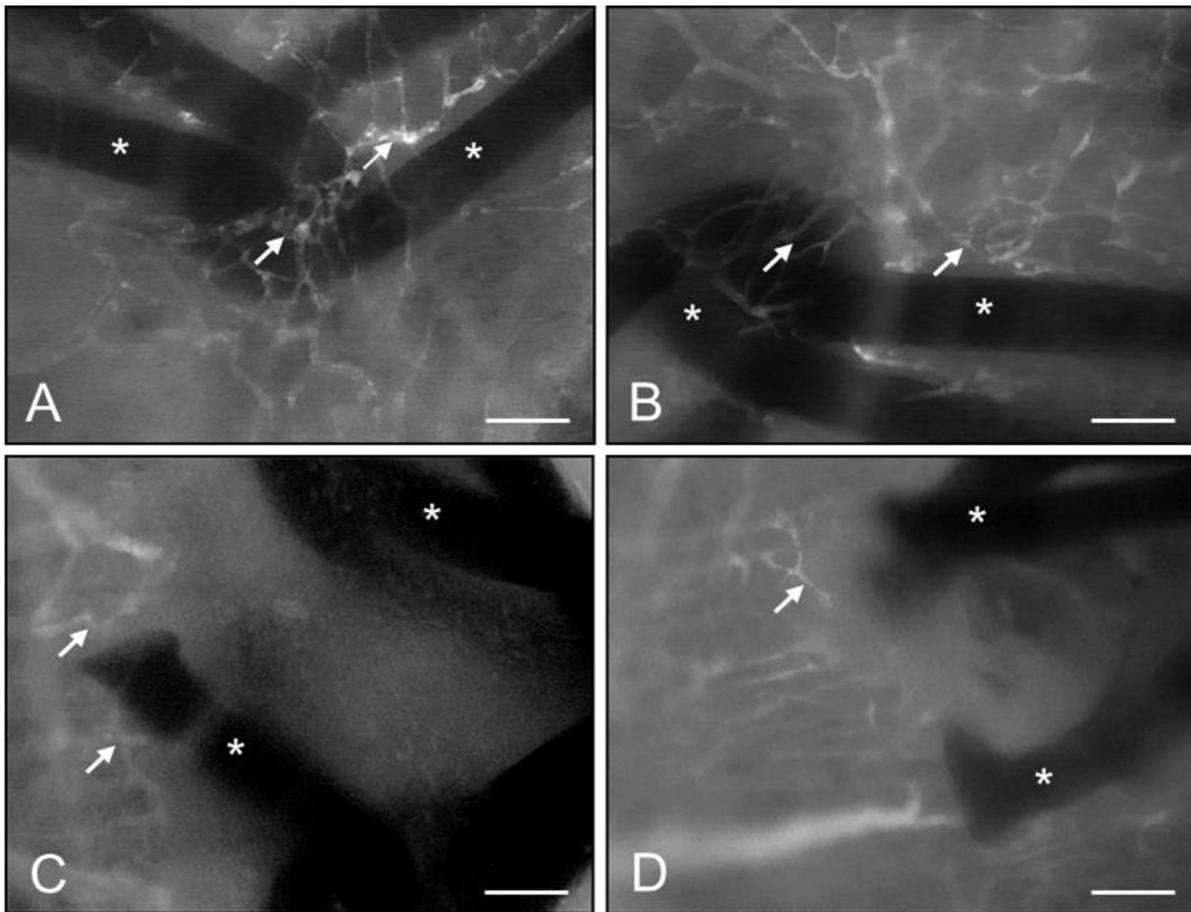


Abbildung 28: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von neugebildeten Gefäßnetzwerken (Pfeile) um die einzelnen Netzfasern (*) von Ultrapro®-Netzen am Tag 14 nach Implantation. A: Unbehandelter Hamster, B: CSA-behandelter Hamster. Skalierung = 90µm, C: Rapamycin- (0,08mg/kg) behandelter Hamster, D: Rapamycin- (1,5mg/kg) behandelter Hamster. Skalierung = 90µm

6.5.3 Fließverhalten der Leukozyten

Vor Netzeinlage (Baseline) betrug die Anzahl rollender Leukozyten bei der Kontrollgruppe 26 pro Minute und die Anzahl adhärenter Leukozyten 120/mm². Kurz nach Netzeinlage wurde eine verstärkte Leukozytenreaktion nachgewiesen. Der Spitzenwert zeigte sich nach 24 Stunden mit einer signifikanten Erhöhung rollender Leukozyten. Diese sanken später wieder auf den Ausgangswert und blieben konstant bis zum Ende des Versuches (Tabelle 5). Im Gegensatz dazu zeigte sich sowohl bei den Cyclosporin A-behandelten als auch bei den Rapamycin-behandelten Hamstern während der ersten 24 Stunden eine Abnahme der rollenden Leukozyten. Am stärksten ausgeprägt war diese Abnahme bei höherer Dosierung von Rapamycin (Tabelle 5).

	Baseline	20min	24h	3d	7d	14d
<u>Rollende Leukozyten (Zellen/min)</u>						
Kontrolle	25,5 ± 2,7* [#]	26,1 ± 3,6*	41,8 ± 4,0* [#]	22,6 ± 1,4	23,7 ± 4,0	16,9 ± 3,1
Cyclosporin A	20,0 ± 1,5 [#]	15,0 ± 1,2	24,5 ± 6,5	27,1 ± 4,2	21,2 ± 4,3	25,2 ± 8,0
Rapamycin 0,08mg/kg	13,5 ± 1,8	16,4 ± 3,8	17,6 ± 4,8	27,2 ± 7,3	34,2 ± 5,0	17,4 ± 2,7
Rapamycin 1,5 mg/kg	6,6 ± 1,0	10,2 ± 1,7	15,3 ± 1,8	19,1 ± 4,1	17,9 ± 3,0	9,9 ± 4,0
<u>Adhärenente Leukozyten (Zellen/mm²)</u>						
Kontrolle	118,4 ± 25,6	240,5 ± 98,1	200,5 ± 46,9	112,2 ± 38,3	72,8 ± 14,6	81,2 ± 30,0
Cyclosporin A	99,5 ± 21,3	224,9 ± 41,4 ⁺	209,0 ± 39,4	98,0 ± 19,5	74,1 ± 24,6	85,0 ± 16,3
Rapamycin 0,08mg/kg	74,9 ± 24,2	211,9 ± 66,4	233,1 ± 45,4 ⁺	58,8 ± 15,3	51,5 ± 23,9	120,8 ± 21,0
Rapamycin 1,5 mg/kg	85,8 ± 31,4	69,2 ± 12,9	171,2 ± 42,9	94,4 ± 22,5	76,7 ± 28,0	56,3 ± 24,2

Tabelle 5: Rollende und adhärenente Leukozyten in postkapillaren Venolen und Sammelvenolen in Nähe von Ultrapro®-Netzen vor Implantation (Baseline, BL) sowie 20min, 24h, 3, 7 und 14d nach Implantation. Mittelwert ± SEM; * $p < 0,05$ vs. Rapamycin (0,08 mg/kg), [#] $p < 0,05$ vs. Rapamycin (1,5mg/kg), ⁺ $p < 0,05$ vs. Baseline (BL)

Zwischen Tag 3 und Tag 14 gab es zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine statistisch relevanten Unterschiede. Zusätzlich wurde die Anzahl systemischer Leukozyten, sowohl vor Netzeinlage als auch am Ende des Versuches an Tag 14 im Blut bestimmt. Die gemessenen Werte waren unter Baseline-Bedingungen vergleichbar zwischen den einzelnen Gruppen und unterschieden sich nicht signifikant von den Werten, die zum Ende des Versuches gemessen wurden. Dies zeigt, dass keine systemische Entzündungsreaktion stattfand (Tabelle 6).

	Baseline	14d
<u>Systemische Leukozyten (10³/μl)</u>		
Kontrolle	10,9 ± 2,5	9,1 ± 1,3
Cyclosporin A	13,8 ± 3,5	11,4 ± 2,8
Rapamycin 0,08mg/kg	6,6 ± 0,6	10,3 ± 3,1
Rapamycin 1,5mg/kg	8,5 ± 5,7	9,8 ± 5,4

Tabelle 6: Anzahl systemischer Leukozyten (10³/μl) vor Netzeinlage (Baseline) sowie 14 Tage nach Implantation. Mittelwert ± SEM

6.5.4 Histologie

Die histologische Untersuchung der Rückenhautkammer-Präparationen am Tag 14 nach Netzümplantation zeigte, dass bei allen Versuchsgruppen die Ultrapro®-Netze von neugebildetem Granulationsgewebe umgeben waren (*Abbildung 29 A und C, Abbildung 30 A und C*). Im Vergleich zu dem gut durchbluteten Granulationsgewebe der Kontrollgruppe und der Cyclosporin A-Gruppe wies das Granulationsgewebe in den Gruppen der Rapamycin-behandelten Tiere sowohl bei der niedrigen Dosis (0,08mg/kg) als auch bei der hohen Dosis (1,5mg/kg) nur eine geringe Anzahl neuer Blutgefäße auf (*Abbildung 29 A und C, Abbildung 30 A und C*). Durch eine Sirius-red-Färbung konnte weiterhin gezeigt werden, dass im Granulationsgewebe in den Rapamycin-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Cyclosporin A-Gruppe deutlich weniger Kollagenfasern vorhanden waren (*Abbildung 29 B und D, Abbildung 30 B und D*).

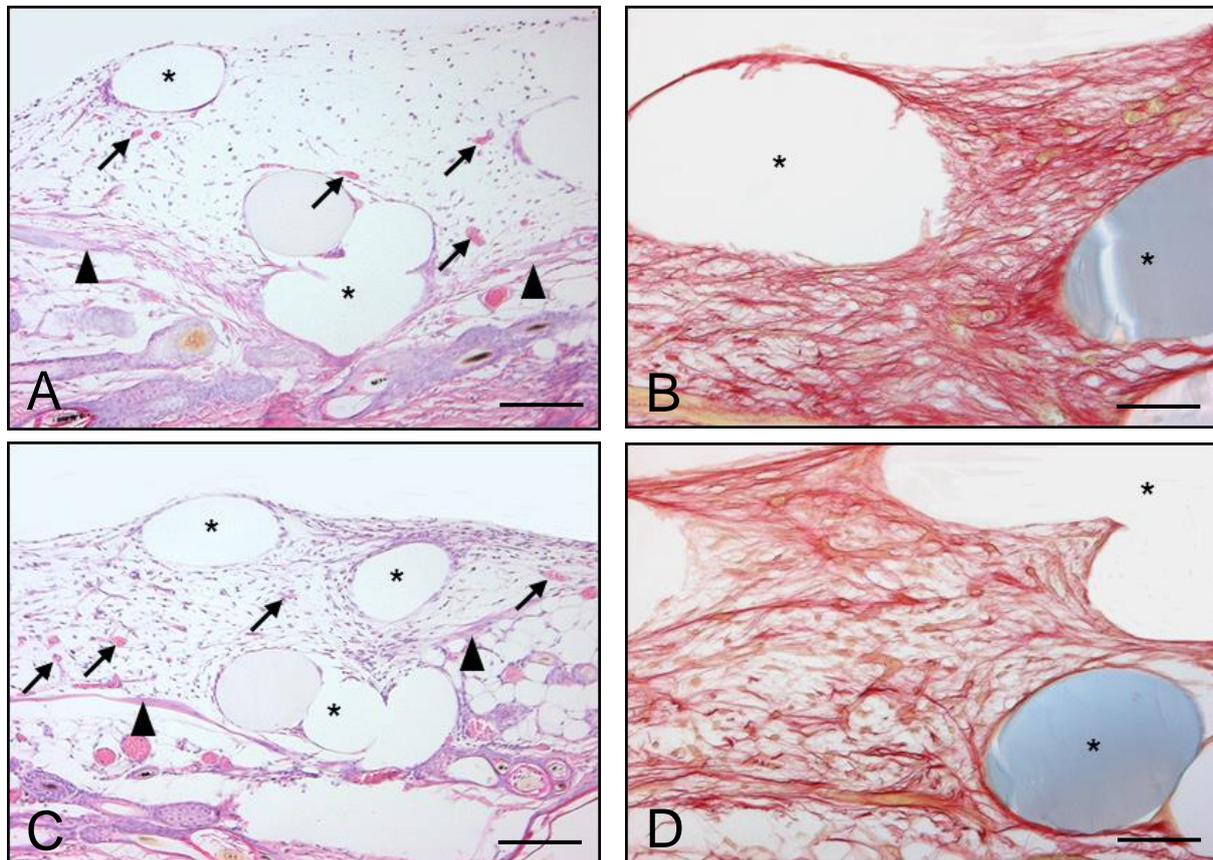


Abbildung 29: A, C: HE-gefärbte histologische Präparate von Ultrapro®-Netzen 14 Tage nach Implantation. B, D: Sirius-red gefärbte histologische Präparate von Ultrapro®-Netzen 14 Tage nach Implantation. Die Netze wurden in unbehandelte Hamstern (Kontrolle A, B) sowie in Cyclosporin A-behandelte Hamster (C, D) implantiert. Sternchen kennzeichnen die Netzfaser, Pfeile zeigen auf neugebildete Blutgefäße und Pfeilspitzen zeigen auf die quergestreifte Hautmuskelschicht. Skalierung: A, C = 200µm, B, D = 100µm

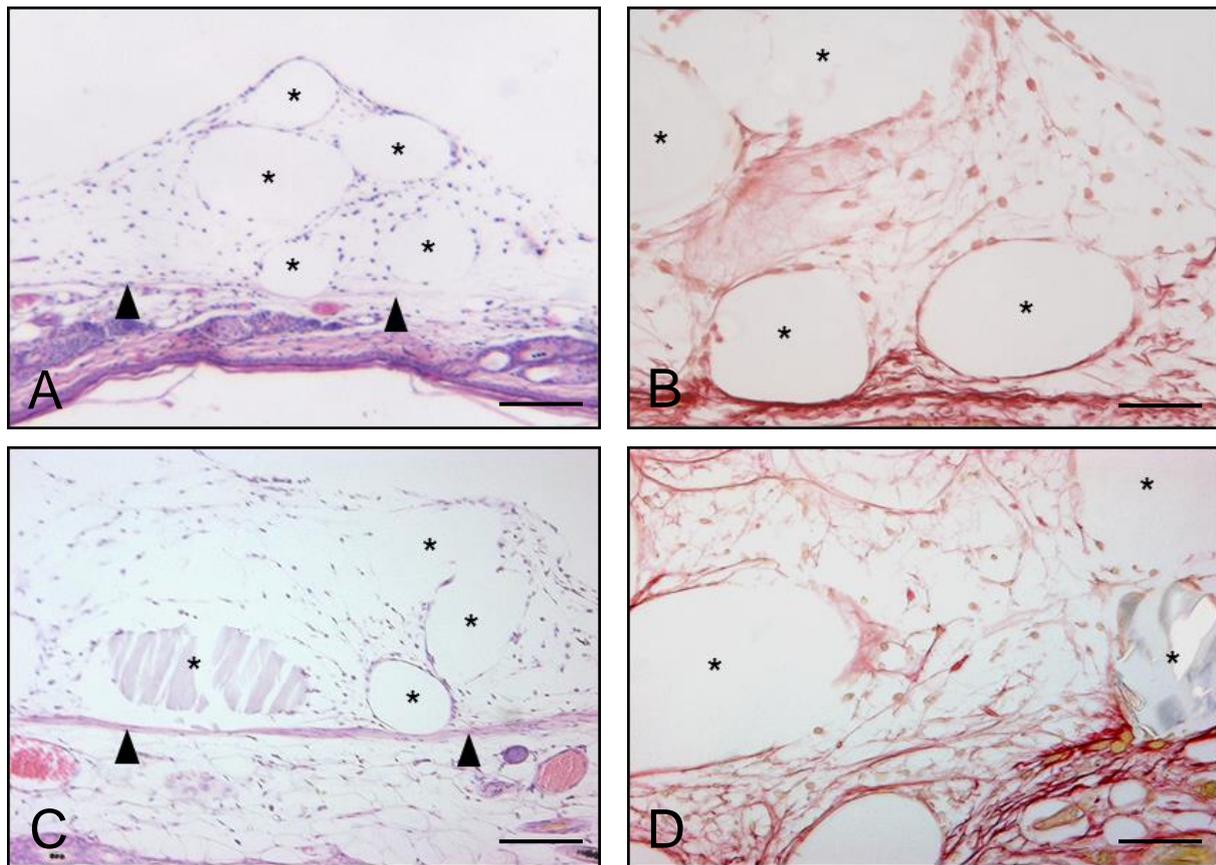


Abbildung 30: A, C: HE-gefärbte histologische Präparate von Ultrapro®-Netzen und B, D: Sirius-red-gefärbte histologische Präparate von Ultrapro®-Netzen 14 Tage nach Implantation. Die Netze wurden in Rapamycin-behandelte Hamster implantiert. Es wurde eine niedrigere Dosis von 0,08mg/kg Rapamycin (A, B) und eine höhere Dosis von 1,5mg/kg Rapamycin (C,D) verwendet. Sternchen kennzeichnen die Netzfasern, Pfeile zeigen auf neugebildete Blutgefäße und Pfeilspitzen zeigen auf die quergestreifte Hautmuskelschicht. Skalierung: A, C = 200µm, B, D = 100µm

6.5.5 Inkorporation der Netze

Entsprechend den histologischen Befunden zeigte die Messung der Ausreißkraft (cN/mm^2), welche notwendig war, um die Ultrapro®-Netze aus dem umliegenden Gewebe zu ziehen, eine dosisabhängige Verschlechterung der Inkorporation bei Rapamycin-behandelten Tieren. Im Vergleich zu Cyclosporin A-behandelten Tieren und zur Kontrollgruppe (Explantationskraft jeweils 7cN/mm^2) war die Explantationskraft bei den mit Rapamycin behandelten Tieren um 50-90% reduziert. Sie betrug $3,1\text{cN/mm}^2$ bei einer Dosis von $0,08\text{mg/kg}$ und lediglich $0,6\text{cN/mm}^2$ bei einer Dosis von $1,5\text{mg/kg}$ (Abbildung 31).

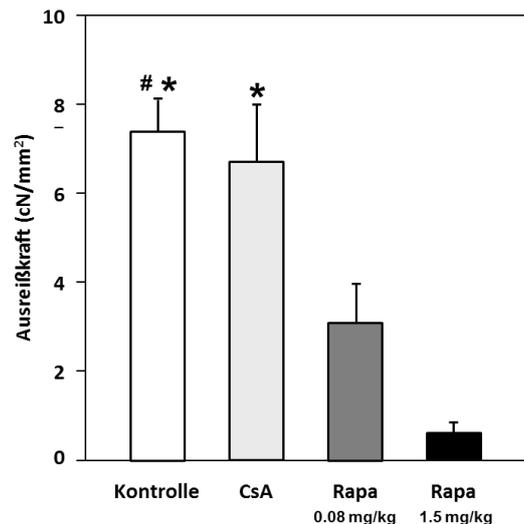


Abbildung 31: Ausreißkraft (cN/mm²) zum Herauslösen der eingewachsenen Ultrapro®-Netze 14 Tage nach Implantation bei der Kontrollgruppe (weißer Balken), bei CSA-behandelten Hamstern (hellgrauer Balken), bei Rapamycin-behandelten Hamstern mit einer Dosis von 0,08mg/kg (dunkelgrauer Balken) und einer Dosis von 1,5mg/kg (schwarzer Balken). Mittelwert ± SEM; # p<0,05 vs. Rapamycin (0,08mg/kg); * p<0,05 vs. Rapamycin (1,5mg/kg)

6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden experimentellen *in vivo* Studie wurde ein neues Modell zur Untersuchung chirurgischer Netze etabliert. Mit Hilfe des verwendeten Modells konnte die Biokompatibilität verschiedener Netze sowie die Angiogenese und Entzündungsreaktion des Empfänger-gewebes analysiert werden. Die gewonnenen Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Die Ausbildung neuer mikrovaskulärer Netzwerke um die implantierten Netze vollzog sich in charakteristischen Schritten. Bereits am dritten Untersuchungstag war eine angiogene Reaktion des umgebenden Empfängergewebes auf die Implantate zu beobachten, welche je nach verwendetem Netzmaterial unterschiedlich stark ausgeprägt war. Neben der Vasodilatation einzelner Gefäße waren die ersten Gefäßwandsprossen im Randbereich der Implantate nachweisbar, die größtenteils von den Hautmuskelkapillaren und zu einem geringeren Anteil von postkapillaren Venolen ausgingen. Ausgehend von diesen Gefäßsprossen entwickelte sich ein Netzwerk aus neugebildeten Gefäßen, welches die Netzfaser mehr oder weniger stark in das Empfängergewebe integrierte.
2. Die Implantation der Ultrapro®-Netze führte zu einer vorübergehenden Aktivierung der Leukozyten in postkapillaren Venolen. Als Folge dieser zellulären Entzündungsreaktion kam es zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität im Bereich der implantierten Netze. In unmittelbarer Umgebung der implantierten Netze zeigten die Blutzellgeschwindigkeit, der

Blutvolumenfluss und die Scherrate geringere Werte. Histologische Untersuchungen von Rückenhautkammer-Präparaten 14 Tage nach Netzümplantation bestätigten die mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie erhobenen Befunde. Die Netzümplantate wiesen keine vermehrte Infiltration von Entzündungszellen auf. Es fanden sich jedoch wenige Fremdkörper-Riesenzellen um die Netzümplantate. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes konnte die Ausbildung eines vaskularisierten Granulationsgewebes nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine adäquate Inkorporation der Netze im Empfängergewebe hin.

3. In die Rückenhautkammer implantierte Prolene[®]-, Ultrapro[®]- und Vicryl[®]-Netze induzierten unterschiedliche Reaktionen im Empfängergewebe. In der Vicryl[®]-Gruppe stieg verglichen mit der Prolene[®]- und Ultrapro[®]-Gruppe die Anzahl der adhärennten Leukozyten signifikant an. Bei allen drei Versuchsgruppen führte die Implantation chirurgischer Netze zur Bildung neuer Gefäße. Besonders auffallend war eine ausgeprägte Gefäßneubildung in der Vicryl[®]-Gruppe mit einer erhöhten funktionellen Kapillardichte im Vergleich zur Prolene[®]- und Ultrapro[®]-Gruppe. Histologische Untersuchungen zeigten ein besonders dicht ausgeprägtes Granulationsgewebe in der Vicryl[®]-Gruppe. Zudem induzierte das Vicryl[®]-Netz im Gegensatz zu den Prolene[®]- und Ultrapro[®]-Netzen eine starke Entzündung des Empfängergewebes. Die Entzündung war gekennzeichnet durch die Infiltration des Granulationsgewebes mit zahlreichen Histozyten, vielkernigen Riesenzellen und Leukozyten. Diese Entzündungsreaktion ging mit einer signifikant reduzierten Anzahl von Kollagenfasern im Granulationsgewebe einher. Entsprechend fand sich eine im Vergleich zur Prolene[®]- und Ultrapro[®]-Gruppe vierfach verminderte Explantationskraft in der Vicryl[®]-Gruppe. Zusätzliche *in vitro* Messungen der Zytotoxizität ergaben, dass alle drei Netze trotz unterschiedlicher Materialzusammensetzung keine Zytotoxizität aufzeigten.
4. Durch Gabe von Rapamycin und Cyclosporin A konnte eine Immunsuppression in den untersuchten Tieren induziert werden. Messungen der Medikamentenspiegel bestätigten, dass während der gesamten Versuchsdauer ausreichende Konzentrationen der Immunsuppressiva vorlagen. Bei den mit Cyclosporin A immunsupprimierten Tieren sowie in der Kontrollgruppe ohne Immunsuppression war die Angiogenese deutlich stärker ausgeprägt als in den Rapamycin-behandelten Tieren, was sich in histologischen Untersuchungen von Rückenhautkammer-Präparaten bestätigte. Bei den Rapamycin-Tieren zeigte sich im Vergleich zur Kontroll- und Cyclosporin A-Gruppe eine deutliche Verringerung der Kollagenfasern im Granulationsgewebe. Parallel hierzu zeigte sich im Ausreißversuch eine dosisabhängige Verschlechterung der Inkorporation der Ultrapro[®]-Netze in das umgebende Empfängergewebe. Verglichen mit der Gruppe der Cyclosporin

A-behandelten Tiere und der Kontrollgruppe war die benötigte Zugkraft, um die Netze aus dem Gewebe zu lösen, bei den mit Rapamycin-behandelten Tieren je nach verwendeter Dosis um 50-90% reduziert.

7. Diskussion

7.1 Modell

Das Modell der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters hat sich seit seiner Erstbeschreibung durch Endrich et al. [1980] in vielen Mikrozirkulationsstudien bewährt. Bei diesem Modell werden der quergestreifte Rückenhautmuskel sowie das darunterliegende Subkutangewebe für verschiedene Analysen genutzt. Seit über 70 Jahren wird diese Technik in unterschiedlicher Modifikation angewandt [Druecke et al., 2004; Laschke et al., 2005]. Im Gegensatz zu histologischen Techniken erlaubt das Modell die repetitive *in vivo* Analyse von dynamischen Prozessen wie Gefäßaussprossung, Gefäßneubildung, Leukozyten-Endothel-Zellinteraktionen und Veränderungen der Gefäßpermeabilität unter Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Sämtliche Mikrozirkulationsparameter können hierbei quantitativ über einen Untersuchungszeitraum von 2-3 Wochen analysiert werden [Lehr et al. 1993]. In vorangehenden Studien hat sich diese Technik auch zur Untersuchung von verschiedenen Implantaten bewährt, wie beispielsweise Gefäßprothesen [Menger et al., 1990; Menger et al., 1992], metallischen Implantaten [Kraft et al., 2000; Kraft et al., 2001; Kraft et al., 2002; Behrendt et al., 2015] sowie Biomaterialien für das Tissue Engineering [Rücker et al., 2006; Laschke et al., 2016]. Dies liegt vor allem daran, dass das Deckglas der Kammer einfach entfernt und anschließend wieder im Kammerrahmen fixiert werden kann. Auf diese Weise können Implantate leicht in die Kammer platziert werden. Ein Nachteil des Modells ist das kleine Beobachtungsfeld, wodurch die Anwendung auf kleine und dünne Präparate beschränkt ist.

Die erhobenen Resultate können nur mit gewissen Einschränkungen auf die klinische Anwendung chirurgischer Netze beim Menschen übertragen werden. Insbesondere lässt sich die Effektivität einer Netzfixation mit dem Rückenhautkammermodell nicht untersuchen, da die implantierten Netze frei in die Rückenhautkammer eingelegt werden. Ebenso wenig ist es mit dem verwendeten Modell möglich, den abdominalen Wanddruck zu messen, welcher einen wichtigen Einfluss auf die mechanische Stabilität eines implantierten Netzes beim Menschen haben kann. Im Unterschied zu histologischen Techniken erlaubt das vorliegende Verfahren jedoch zum ersten Mal detaillierte, reproduzierbare *in vivo* Analysen und eine quantitative Erfassung von angiogenen und entzündungsassoziierten Parametern während des Einwachsens unterschiedlicher Netzmaterialien.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Hamster als Versuchstier gewählt, obwohl er genetisch weniger gut definiert ist und deshalb seltener als Mäuse oder Ratten verwendet wird. Der wesentliche Grund für die Verwendung des Hamsters war die einfachere Präparation des Retraktormuskels in der Kammer, weil die zu präparierenden Muskelschichten ohne wesentliche Beeinträchtigung des darunterliegenden Gewebes leichter voneinander gelöst werden konnten. Zusätzlich sind die verbleibenden Gewebeschichten beim Hamster dünner als bei der Maus und der Ratte, was sich in einer besseren Bildqualität während der mikroskopischen Analyse der Rückenhautkammer widerspiegelt [Menger et al., 2002].

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Reaktionen des Empfängergewebes auf die Implantation chirurgischer Netze

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zunächst geprüft, ob sich die Rückenhautkammer zur Untersuchung von chirurgischen Netzen eignet. Hierzu wurden Ultrapro®-Netze implantiert. Die Biokompatibilität, Vaskularisierung und Inkorporation der Implantate wurde mit Hilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Bereits kurz nach Implantation in die Rückenhautkammer war in den Venolen im Randbereich der Ultrapro®-Netze die Anzahl der adhären und rollenden Leukozyten erhöht. Hingegen kam es zu keiner signifikanten Änderung mikrohämodynamischer Parameter an den einzelnen Untersuchungszeitpunkten. Die Blutzellgeschwindigkeit, der Blutvolumenfluss sowie die Scherrate der Gefäße in Netznähe und im Kammerrandbereich waren vergleichbar. Die gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion muss daher auf eine spezifische Aktivierung des Endothels sowie der Leukozyten durch die Netzipplantation zurückgeführt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vorangegangener Studien [Kraft et al., 2000; Kraft et al., 2002; Klosterhalfen et al., 2003]. Diese zeigten, dass die Implantation von Fremdmaterial eine kurzfristige Entzündungsreaktion mit gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen auslöst. Die Entzündung wird dabei durch eine Proteinschicht verursacht, die das Empfängergewebe sofort um das eingebrachte Fremdmaterial bildet. Makrophagen reagieren mit diesen Proteinen durch Freisetzung von Zytokinen, welche wiederum andere Entzündungszellen wie T-Zellen, Mastzellen, polymorphkernige und eosinophile Granulozyten aktivieren [Tang et al., 1998; Van Luyn et al., 1998; Klosterhalfen et al., 2003; Rosch et al., 2003]. Die Aktivierung der Leukozyten resultiert in einer Schädigung des Endothels, da aktivierte Leukozyten zytotoxische Substanzen wie reaktive Sauerstoffspezies freisetzen [Fantone & Ward, 1982].

Aktiviert Entzündungszellen sind fähig, Angiogenese durch die Produktion verschiedener angiogener Faktoren zu induzieren [Möhle et al., 1997; Shaw et al., 2003]. Die Entwicklung neuer Blutgefäße ist wiederum eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung eines Granulationsgewebes, welches das implantierte Fremdmaterial in den Organismus inkorporiert. Karayiannakis et al. [2003] konnten zeigen, dass vascular endothelial growth factor (VEGF) ein wichtiger angiogener Faktor bei spannungsfreien Operationsverfahren zur Herniansanierung ist. Die beobachtete Zunahme der Gefäßpermeabilität bis zum dritten Tag nach Netzimplantation kann daher sowohl als Resultat einer entzündungsbedingten Gewebeschädigung als auch einer induzierten Gefäßneubildung interpretiert werden.

Zur Messung der Netzkorporation wurde zusätzlich ein Ausreißversuch am Ende des Versuchs durchgeführt. Dabei wurde bereits nach 2 Wochen eine Explantationskraft von $8,13 \pm 0,77 \text{ cN/mm}^2$ gemessen. Dies weist auf eine gute Integration der eingebrachten Netze hin und kann insbesondere bei einer bakteriellen Infektion als vorteilhaft angesehen werden. In diesem Fall ermöglicht die Gefäßneubildung um die eingebrachten Netze einen direkten Zugang für immunkompetente Zellen zum Implantat.

Zusammengefasst konnte im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Rückenhautkammer ein geeignetes *in vivo* Modell zur quantitativen Untersuchung chirurgischer Netzimplantate und deren Wirkung auf das Empfängergewebe darstellt.

7.2.2 Biokompatibilität und Vaskularisierung von Prolene[®], Ultrapro[®] und Vicryl[®]

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden drei verschiedene Netzmaterialien (Prolene[®], Ultrapro[®] und Vicryl[®]), die häufig klinisch eingesetzt werden, miteinander verglichen.

Alle drei Netze wurden während des Untersuchungszeitraumes von neugebildeten Blutgefäßen überwacht. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Implantation von Vicryl[®]-Netzen im Vergleich zu Prolene[®]- und Ultrapro[®]-Netzen eine stärkere angiogene Reaktion des Empfängergewebes auslöst. Diese Reaktion könnte durch die unterschiedliche Netzarchitektur verursacht sein. Vicryl[®] ist im Gegensatz zu Prolene[®] und Ultrapro[®] multifilament aufgebaut. Diese spezielle Struktur bietet eine größere Kontaktfläche für das umgebende Gewebe. Vorangehende Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass bei diesen Materialeigenschaften Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen gehäuft in der Nähe von Fremdmaterialien gefunden werden. Diese Zellen infiltrieren die Netzporen und die Zwischenräume der geflochtenen Filamente. Die hier gezeigten histologischen Ergebnisse bestätigen diese Beobachtungen [Beets et al., 1996; Konstantinovic et al., 2007]. Ebenso

konnten Van Amerongen et al. [2002] in einer histologischen Studie zeigen, dass die Infiltration von Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen von einer starken Gefäßneubildung begleitet wird.

Die chemischen Materialeigenschaften der polymeren Netze sind ein weiterer entscheidender Faktor für die angiogene Reaktion des Empfängergewebes [Foschi et al., 2001]. Das Vicryl®-Netz besteht nur aus bioresorbierbarem Polyglactin 910, welches durch Makrophagen über die Zeit phagozytiert wird. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass diese Phagozytose mit der Freisetzung angiogener Faktoren einher geht, welche die Proliferation von Endothelzellen steigern [Greisler et al., 1989]. Es ist daher davon auszugehen, dass in der vorliegenden Studie beide Faktoren, sowohl die multifilamentäre Struktur als auch die Resorbierbarkeit von Vicryl®, zur Steigerung der Angiogenese beigetragen haben.

14 Tage nach Implantation zeigte sich in der Nähe des implantierten Vicryl®-Netzes neben einer gesteigerten Gefäßneubildung auch ein gesteigerter Blutvolumenfluss und eine erhöhte Blutfließgeschwindigkeit in den Venolen. Histologisch fanden sich zahlreiche Entzündungszellen im Granulationsgewebe um die untersuchten Netze. Diese könnten sowohl für die Gefäßneubildung als auch für die genannten mikrohämodynamischen Effekte ursächlich sein. Tatsächlich werden durch diese Entzündungszellen verschiedene pro-angiogene Faktoren und Entzündungsmediatoren freigesetzt, welche zu einer verbesserten Gefäßdurchblutung führen. So ist z.B. bekannt, dass der pro-angiogene Faktor VEGF ein wichtiger Vasodilatator ist [Brownbill et al., 2007].

Eher überraschend ist die Beobachtung, dass die gesteigerte Gefäßneubildung bei den Vicryl®-Netzen nicht zu einer verbesserten Materialinkorporation ins Empfängergewebe führte. Vielmehr war die gemessene Explantationskraft 14 Tage nach Implantation im Vergleich zu den Prolene®- und zur Ultrapro®-Netzen um den Faktor 4 reduziert. Mit Hilfe eines WST-1-Assays konnte ausgeschlossen werden, dass dieses Ergebnis durch eine gesteigerte Zytotoxizität von Polyglactin verursacht wurde. Langer et al. [2005] zeigten *in vitro*, dass Polyglactin sogar die Ansiedlung von Fibroblasten auf chirurgischen Netzen steigert. Allerdings könnte der schnelle Abbau von Polyglactin *in vivo*, welcher mit einem pH-Wert-Abfall im Bereich des Fremdmaterials einhergeht, zu der hier beobachteten Entzündungsreaktion beigetragen haben. Die schwere Entzündungsreaktion könnte wiederum die Ursache für das lockere Granulationsgewebe mit wenig Kollagenfasern gewesen sein.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine gesteigerte angiogene Antwort auf ein implantiertes Netz nicht zwangsläufig zu einer besseren Inkorporation in das umliegende

Empfängergewebe führt. Wenn auch davon auszugehen ist, dass eine leichte Entzündung zu einer verbesserten Gefäßneubildung beitragen kann, zeigte sich in den Untersuchungen, dass die stärkere Entzündungsantwort in der Vicryl®-Gruppe sich negativ auf die Inkorporation des Materials auswirkte. Dies bestätigen die Ergebnisse anderer Studien, die zeigen konnten, dass die Implantation von Vicryl®-Netzen das Risiko von Narbenhernien steigert. Dies ist vermutlich auf eine verminderte mechanische Stabilität des neugebildeten Gewebes zurückzuführen [Klinge et al., 2001]. Daher muss geschlussfolgert werden, dass verschiedene Netzmaterialien je nach Materialeigenschaften zu unterschiedlichen Komplikationen führen können [Robinson et al., 2005].

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte weiterhin gezeigt werden, dass aktivierte Leukozyten vorzugsweise in Blutgefäßen in Netznähe akkumulieren. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der adhärenenten Leukozyten in den Venolen des Empfängergewebes nur in den ersten 24 Stunden nach Netzimplantation erhöht. Dieser Effekt ist vermutlich durch die Implantation selbst verursacht, welche durch die mechanische Irritation zur Aktivierung der Leukozyten führte. Hieraus ist zu schließen, dass das Auswandern von Leukozyten in das netzumgebende Granulationsgewebe vor allem in den neugebildeten Blutgefäßen stattfand. Das Ausmaß der Gefäßneubildung und der Leukozyteninfiltration in der Nähe von implantierten Netzen hängen demnach eng zusammen.

Endothelzellen neugebildeter Blutgefäße scheinen ein anderes Oberflächenrezeptorprofil im Vergleich zu reifen Venolen aufzuweisen. Hierdurch werden Leukozyten-Endothel-Zellinteraktionen begünstigt. Makrophagen in Nähe der Netzimplantate sind fähig, den Wachstumsfaktor Angiopoietin (Ang-2) zu produzieren [Hubbard et al., 2005]. Ang-2 stimuliert über eine vermehrte Expression von Endothelzell-Adhäsionsmolekülen bei einer Entzündungsreaktion Leukozyten zum Anhaften [Fiedler et al., 2006].

Zusammengefasst ergaben die Ergebnisse in diesem zweiten Teil der Arbeit, dass die Implantation eines Vicryl®-Netzes im Vergleich zu Prolene®- oder Ultrapro®-Netzen mit einer deutlich stärkeren angiogenen und inflammatorischen Reaktion einhergeht. Die vermehrte Gefäßneubildung resultierte jedoch nicht in einer verbesserten Inkorporation der Vicryl®-Netze.

7.2.3 Biokompatibilität und Vaskularisierung von Netzen in immunsupprimierten Tieren

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Biokompatibilität und Vaskularisierung bei immunsupprimierten Hamstern untersucht. Dies ist insbesondere für den klinischen Einsatz

chirurgischer Netze interessant, da es nach orthotoper Lebertransplantation vermehrt zum Auftreten von Narbenhernien kommt [Kahn et al., 2007]. Grundsätzlich kommen hierfür verschiedene Ursachen in Betracht. So kann eine erhöhte mechanische Belastung der Wunde aus einem Größenunterschied des implantierten Organs und dem vorhandenen intraabdominalen Raum resultieren. Möglich ist auch eine gesteigerte Wundbelastung aufgrund von postoperativem Aszites [Piazzese et al., 2004]. Darüber hinaus werden lebertransplantierte Patienten mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt. Der negative Einfluss von immunsuppressiven Medikamenten auf die Wundheilung durch Hemmung der Gefäßneubildung sowie der Kollagensynthese ist bereits bekannt [Kelley et al., 1990; Guilbeau, 2002; Schäffer et al., 2007]. Dies ist insbesondere für Rapamycin der Fall. Gleichwohl werden weiterhin Patienten nach Organtransplantation insbesondere bei einer Unverträglichkeit gegenüber Tacrolimus oder bei schlechter Nierenfunktion mit diesem Medikament behandelt [Mekeel et al., 2007]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Cyclosporin A die Gabe von Rapamycin zu einer dosisabhängigen Beeinträchtigung der Vaskularisierung und Inkorporation von chirurgischen Netzen führt.

Seit 1999 ist Rapamycin als Immunsuppressivum zur Verhinderung einer Transplantatabstoßung von der FDA (United States Food and Drug Administration) zugelassen [Paghdal & Schwartz, 2007]. Im Gegensatz zu den Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus, welche in die Interleukin-2-Gentranskription eingreifen [Quesniaux, 1993; Kang et al., 2007], bildet Rapamycin einen Komplex mit dem Immunophilin FK506 Bindungsprotein 12, was in einer Hemmung der regulierenden Kinase resultiert [Paghdal & Schwartz, 2007]. Dies führt zur Blockade des Zellzyklus zwischen der Phase G1 und S. Folglich ist die T-Lymphozyten-Aktivierung und -Proliferation ebenso wie die Bildung von Antikörpern unterdrückt [Paghdal & Schwartz, 2007]. Damit stellt Rapamycin in Kombination mit anderen Immunsuppressiva, wie beispielsweise Corticosteroiden, eine Alternative zu nephrotoxischen Calcineurin-Inhibitoren bei Nieren-transplantierten Patienten dar [Guerra et al., 2007].

In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Rapamycin neben seinem immunsuppressiven Effekt auch die Bildung von Tumoren hemmt [Guba et al., 2002; Guba et al., 2005]. Dies ist insbesondere interessant für Patienten, bei welchen aufgrund eines hepatozellulären Karzinoms eine neue Leber transplantiert wurde [Toso et al., 2007].

Die Gabe von Rapamycin hat jedoch auch Nachteile. Mehrere Studien zeigten, dass Rapamycin verglichen mit anderen Immunsuppressiva vermehrt zu Wundheilungsstörungen führt [Dean et al., 2007; Kuppahally et al., 2006]. Dies ist dadurch zu erklären, dass

Rapamycin die Angiogenese aufgrund einer verminderten Expression von zellulärem VEGF hemmt [Schäffer et al., 2007]. Die vorliegende Arbeit bestätigt diese anti-angiogene Wirkung von Rapamycin. So konnte gezeigt werden, dass verglichen mit Cyclosporin A-behandelten Tieren oder Kontrolltieren die Vaskularisierung von implantierten Netzen bei Rapamycin-behandelten Hamstern deutlich reduziert ist. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei hoch dosierter als auch bei niedrig dosierter Gabe von Rapamycin.

Die Gefäßneubildung gilt als wichtige Voraussetzung für die schnelle Ausbildung eines stabilen Granulationsgewebes. Hierzu berichteten Dubay et al. [2004] in einer experimentellen Studie an Ratten über eine ausgeprägtere Angiogenese innerhalb der ersten vier Wochen nach abdominaler Inzision durch Implantation eines Polymers, welches Wachstumsfaktoren für Fibroblasten freisetzte. Interessanterweise resultierte dies in einer signifikant reduzierten Anzahl an Narbenhernien. Hinsichtlich der vorliegenden Studie bedeutet dies, dass die frühe angiogene Antwort des Empfängergewebes auf ein chirurgisches Netz von entscheidender Bedeutung für die adäquate Netzkorporation ist. Somit kann die Vaskularisierung als wichtiger prognostischer Faktor zur Beurteilung der Stabilität von abdominalen Hernien, welche mit Netzimplantaten versorgt werden, dienen.

Die Stimulation der Angiogenese durch eine Entzündung ist weithin bekannt [Costa et al., 2007]. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in netznahen Gefäßen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass bereits die Implantation der Netze zu einer kurzfristig erhöhten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion führt. Interessanterweise konnte dieser Effekt bei hochdosierter Gabe von Rapamycin nicht beobachtet werden. Dies kann einem bereits früher beschriebenen Effekt zugeschrieben werden, wonach die Expression von adhäsiven Molekülen wie vascular cell adhesion molecule (VCAM) und P-Selektin durch Rapamycin reduziert wird [Wood et al., 2006]. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass dieser Effekt der Grund für die unterschiedliche Vaskularisierung der chirurgischen Netze war, weil bereits nach drei Tagen die Anzahl der rollenden und adhärenen Leukozyten in allen experimentellen Gruppen keinen Unterschied zeigte.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der anti-angiogene Effekt von Rapamycin sehr wahrscheinlich durch die spezifische Hemmung angiogener Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise VEGF, und nicht durch die Hemmung einer Entzündungsreaktion verursacht. Histologische Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die Gabe von Rapamycin zusätzlich zu einer verminderten Kollageneinlagerung im netzumgebenden Granulationsgewebe führte. Demzufolge war die benötigte Explantationskraft im Vergleich zur Cyclosporin A-Gruppe und zur Kontrollgruppe nach 14 Tagen auch deutlich vermindert. Diese Beobachtungen

bestätigen frühere Studien, welche nach Gabe von Rapamycin eine Hemmung der Produktion wichtiger extrazellulärer Proteine, wie Fibronectin, alpha smooth muscle actin und Kollagen, beobachteten [Shegogue & Trojanowska, 2004; Ong et al., 2007]. Deshalb wird Rapamycin auch als mögliches Medikament zur Behandlung von Narbenkeloiden sowie zur Verhinderung einer Restenosierung koronarer Herzgefäße diskutiert [Ong et al., 2007; Abizaid, 2007]. Andererseits hat Rapamycin in der vorliegenden Studie möglicherweise auch indirekt die Kollagensynthese durch Hemmung von Stickoxid (NO) unterdrückt. Um die implantierten Netze zeigten sich auffallend viele Makrophagen und Fibroblasten. Diese produzieren NO während des Wundheilungsprozesses, was in einer gesteigerten Kollagenbildung und mechanischen Stabilität resultiert [Schäffer et al., 1997; Yamasaki et al., 1998]. Dieser Mechanismus wird durch die Gabe von Rapamycin gehemmt [Schäffer et al., 2007]. Daher ist davon auszugehen, dass der Effekt von Rapamycin auf die extrazelluläre Matrixbildung nicht nur eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, sondern auch bei der Inkorporation von Biomaterialien spielt.

Zusammenfassend zeigt der dritte Teil der vorliegenden Arbeit, dass eine immunsuppressive Therapie mit Rapamycin das Einwachsen chirurgischer Netze durch Hemmung der Angiogenese und der Kollagenbildung innerhalb des neugebildeten Granulationsgewebes wesentlich beeinträchtigt. Deshalb sollten Patienten, bei denen eine Narbenhernienoperation mittels Netzimplantation durchgeführt wird, nicht mit Rapamycin behandelt werden.

7.3 Klinische Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Rückenhautkammer zur systematischen Analyse der inflammatorischen und angiogenen Reaktion des Empfängergewebes auf implantierte chirurgische Netze eignet. So ist es möglich, mit Hilfe der Technik der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie verschiedene mikrohämodynamische Parameter quantitativ zu erfassen sowie die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion unter *in vivo* Bedingungen zu analysieren. Weiterhin kann der Prozess der Angiogenese schrittweise visualisiert und mit grundlegenden Netzeigenschaften korreliert werden.

Bei einer aktuellen Weltbevölkerung von mehr als 7 Milliarden Menschen werden voraussichtlich eine Milliarde Menschen im Laufe Ihres Lebens an einem Leistenbruch erkranken. Die Suche nach dem idealen Netzmaterial muss und wird daher weitergehen. Das in dieser Arbeit vorgestellte Tiermodell kann hierzu vielfach modifiziert werden und so zur Entwicklung verbesserter Netzmaterialien beitragen.

8. Literaturverzeichnis

- Abizaid, A.:** Sirolimus-eluting coronary stents: a review. *Vasc Health Risk Manag* 3: 191-201, 2007
- Adler, R. H., Darby, C.:** Use of a porous synthetic sponge (Ivalon) in surgery: I. Tissue responses after implantation. *US Armed Forces Med J* 11: 1349-1364, 1960
- Adler, R. H.:** An evaluation of surgical mesh in the repair of hernias and tissue defects. *Arch Surg* 85: 836-844, 1962
- Ayvazoglu Soy, E. H., Kirnap, M., Yildirim, S., Moray, G., Haberal, M.:** Incisional Hernia After Liver Transplant. *Exp Clin Transplant.* 15: 185-189, 2017
- Babcock, W. W.:** The range of usefulness of commercial stainless steel cloths in general and special forms of surgical practice. *Ann Western Med Surg* 6: 15-23, 1952
- Baker, M., Wayland, H.:** On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7: 131-143, 1974
- Bassini, E.:** Ueber die Behandlung des Leistenbruches. *Arch Klin Chir* 40: 429-475, 1890
- Bauer, J. J., Salky, B. A., Gelernt, I. M., Kreel, I.:** Repair of large abdominal wall defects with expanded polytetrafluorethylen (PTFE). *Ann Surg* 206: 765-769, 1987
- Beets, G. L., Go, P. M., van Mameren, H.:** Foreign body reactions to monofilament and braided polypropylene mesh used as preperitoneal implants in pigs. *Eur J Surg* 162: 823-825, 1996
- Bellon, J. M., Bujan, J., Contreras, L. A., Carrera San Martin, A., Jurado, F.:** Comparison of a new type of polytetrafluoroethylene patch (Mycro Mesh) and polypropylene prosthesis (Marlex) for repair of abdominal wall defects. *J Am Coll Surg* 183: 11-18, 1996
- Behrendt, A. K., Beythien, M., Huber, J., Zufraß, T., Butschkau, A., Mittlmeier, T., Vollmar, B.:** New TiAg composite coating for bone prosthesis engineering shows promising microvascular compatibility in the murine dorsal skinfold chamber model. *J Mater Sci Mater Med.* 1: 5373, 2015
- Bosanquet, D. C., Ansell, J., Abdelrahman, T., Cornish, J., Harries, R., Stimpson, A., Davies, L., Glasbey, J. C., Frewer, K. A., Frewer, N. C., Russell, D., Russell, I., Torkington, J.:** Systematic Review and Meta-Regression of Factors Affecting Midline Incisional Hernia Rates: Analysis of 14,618 Patients. *PLoS One* 10: 0138745, 2015
- Brownbill, P., McKeeman, G. C., Brockelsby, J. C., Crocker, I. P., Sibley, C. P.:** Vasoactive and permeability effects of vascular endothelial growth factor-165 in the term in vitro dually perfused human placental lobule. *Endocrinology* 148: 4734-4744, 2007

- Bucknall, T. E., Cox, P. J., Ellis, H.:** Burst abdomen and incisional hernia: a prospective study of 1129 major laparotomies. *Br Med J (Clin Res Ed)* 284: 931-933, 1982
- Burton, C. C.:** Fascia lata, cutis and tantalum grafts in repair of massive abdominal incisional hernias. *Surg Gynecol Obstet* 109: 621-628, 1959
- Costa, C., Incio, J., Soares, R.:** Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 10: 149-166, 2007
- Dean, P. G., Lund, W. J., Larson, T. S., Prieto, N., Nyberg S. L., Ishitani M. B., Kremers W. K., Stegall M. D.:** Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. *Transplantation* 77: 1555-1561, 2007
- DeBord, J. R., Wyffels, P. L., Marshall, J. S., Miller, G., Masrshall, W. H.:** Repair of large ventral incisional hernias with expanded polytetrafluorethylene prosthetic patches. *Postgrad Gen Sur* 4: 156-160, 1992
- Doran, F. S., Gibbins, R. E., Whitehead, R.:** A report on 313 inguinal herniae repaired with nylon nets. *Br J Surg* 48: 430-434, 1961
- Druecke, D., Langer, S., Lamme, E., Pieper, J., Ugarkovic, M., Steinau, H. U., Homann, H. H.:** Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res* 68A: 10-18, 2004
- Dubay, D. A., Wang, X., Kuhn, M. A., Robson, M. C., Franz, M. G.:** The prevention of incisional hernia formation using a delayed-release polymer of basic fibroblast growth factor. *Ann Surg* 240: 179-186, 2004
- Endrich, B., Asaishi, K., Götz, A., Messmer, K.:** Technical report-a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med* 117: 125-134, 1980
- Fantone, J. C., Ward, P. A.:** Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107: 395-418, 1982
- Fiedler, U., Reiss, Y., Scharpfenecker, M., Grunow, V., Koidl, S., Thurston, G., Gale, N. W., Witzenrath, M., Rosseau, S., Suttorp, N., Sobke, A., Herrmann, M., Preissner, K. T., Vajkoczy, P., Augustin, H. G.:** Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 12: 235-239, 2006
- Fitzgibbons, R. J., Forse, R. A.:** Clinical practice. Groin hernias in adults. *N Engl J Med*. 372: 756-763, 2015
- Foschi, D., Corsi, F., Cellerino, P., Rizzi, A., Morandi, E., Trabucchi, E.:** Angiogenic effects of suture biomaterials. An experimental study in rats. *Eur Surg Res* 33: 16-20, 2001
- Gastaca, M., Valdivieso, A., Ruiz, P., de Urbina, J. O.:** Reducing the incidence of incisional hernia after liver transplantation. *Transpl Int*. 5: 559-560, 2010

- Gibson, L. D., Stafford, C. E.:** Synthetic mesh repair of abdominal wall defects: follow up and reappraisal. *Am Surg* 30: 481-486, 1964
- Greca, F. H., de Paula, J. B., Biondo-Simões, M. L., da Costa, F. D., da Silva, A. P., Time, S., Mansur, A.:** The influence of differing pore sizes on the biocompatibility of two polypropylene meshes in the repair of abdominal defects. *Experimental study in dogs. Hernia* 5: 59-64, 2001
- Greisler, H. P., Dennis, J. W., Endean, E. D., Ellinger, J., Friesel, R., Burgess, W.:** Macrophage/biomaterial interactions: the stimulation of endothelialization. *J Vasc Surg* 9: 588-593, 1989
- Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C. J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K. W., Geissler, E. K.:** Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 8: 128-135, 2002
- Guba, M., Koehl, G. E., Neppi, E., Doenecke, A., Steinbauer, M., Schlitt, H. J., Jauch, K. W., Geissler, E. K.:** Dose of rapamycin is critical to achieve an optimal antiangiogenic effect against cancer. *Transpl Int* 18: 89-94, 2005
- Guerra, G., Srinivas, T. R., Meier-Kriesche, H. U.:** Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in kidney transplantation. *Transpl Int* 20: 813-827, 2007
- Guilbeau, J. M.:** Delayed wound healing with sirolimus after liver transplant. *Ann Pharmacother* 36: 1391-1395, 2002
- Hamasaki, K., Kogure, K., Ohwada, K.:** A biological method for the quantitative measurement of tetrodotoxin (TTX): tissue culture bioassay in combination with a water-soluble tetrazolium salt. *Toxicon* 34: 490-495, 1996
- Hesselink, V. J., Luijendijk, R. W., de Wilt, J. H., Heide, R., Jeekel, J.:** An evaluation of risk factors in incisional hernia recurrence. *Surg Gynecol Obstet* 176: 228-234, 1993
- Höer, J., Lawong, G., Klinge, U., Schumpelick, V.:** Factors influencing the development of incisional hernia. A retrospective study of 2,983 laparotomy patients over a period of 10 years. *Chirurg* 73: 474-480, 2002
- Hoffmann, J. N., Vollmar, B., Laschke, M. W., Inthorn, D., Schildberg, F. W., Menger, M. D.:** Hydroxyethyl starch (130 kD), but not crystalloid volume support, improves microcirculation during normotensive endotoxemia. *Anesthesiology* 97: 460-470, 2002
- Holstein, J. H., Klein, M., Garcia, P., Histing, T., Culemann, U., Pizanis, A., Laschke, M. W., Scheuer, C., Meier, C., Schorr, H., Pohlemann, T., Menger, M. D.:** Rapamycin affects early fracture healing in mice. *Br J Pharmacol* 154: 1055-1062, 2008
- Holzheimer, R. G.:** First results of Lichtenstein hernia repair with Ultrapro-mesh as cost saving procedure - quality control combined with a modified quality of life questionnaire (SF-36) in a series of ambulatory operated patients. *Eur J Med Res* 9: 323-327, 2004

- Hubbard, N. E., Lim, D., Mukutmoni, M., Cai, A., Erickson, K. L.:** Expression and regulation of murine macrophage angiopoietin-2. *Cell Immunol* 234: 102-109, 2005
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K.:** A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, natural red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19: 1518-1520, 1996
- Israelsson, L. A., Jonsson, T.:** Overweight and healing of midline incisions: the importance of suture technique. *Eur J Surg* 163: 175-180, 1997
- Kahn, J., Müller, H., Iberer, F., Kniepeiss, D., Duller, D., Rehak, P., Tscheliessnigg, K.:** Incisional hernia following liver transplantation: incidence and predisposing factors. *Clin Transplant* 21: 423-426, 2007
- Karayiannakis, A. J., Zbar, A., Polychronidis, A., Simopoulos, C.:** Serum and drainage fluid vascular endothelial growth factor levels in early surgical wounds. *Eur Surg Res* 35: 492-496, 2003
- Kang, H. G., Zhang, D., Degauque, N., Mariat, C., Alexopoulos, S., Zheng, X. X.:** Effects of cyclosporine on transplant tolerance: the role of IL-2. *Am J Transplant* 7: 1907-1916, 2007
- Kelley, S. F., Felix, A. M., Ehrlich, H. P.:** The antagonism of glucocorticoid inhibition of wound healing in rats by growth hormone-releasing factor. *Proc Soc Exp Biol Med* 194: 320-326, 1990
- Kingsnorth, A. N.:** Epidemiology, pathogenesis and natural history. *Inguinal Hernia Repair*. Karger Publishers: 2-7, 1995
- Klinge, U., Klosterhalfen, B., Conze, J., Limberg, W., Obolenski, B., Ottinger, A. P., Schumpelick, V.:** Modified mesh for hernia repair that is adapted to the physiology of the abdominal wall. *Eur J Surg* 164: 951-960, 1998
- Klinge, U., Klosterhalfen, B., Müller, M., Anurov, M., Öttinger, A., Schumpelick, V.:** Influence of polyglactin 910-coating on functional and morphological parameters of polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair. *Biomaterials* 20: 613-623, 1999
- Klinge, U., Schumpelick, V., Klosterhalfen, B.:** Functional assessment and tissue response of short- and long-term absorbable surgical meshes. *Biomaterials* 22: 1415-1424, 2001
- Klinge, U., Junge, K., Stumpf, M., AP, A. P., Klosterhalfen, B.:** Functional and morphological evaluation of a low-weight, monofilament polypropylene mesh for hernia repair. *J Biomed Mater Res* 63: 129-136, 2002
- Klinge, U., Klosterhalfen, B., Birkenhauer, V., Junge, K., Conze, J., Schumpelick, V.:** Impact of polymer pore size on the interface scar formation in a rat model. *J Surg Res* 103: 208-214, 2002
- Klosterhalfen, B., Klinge, U., Schumpelick, V., Tietze, L.:** Polymers in hernia repair - common polyester vs. polypropylene surgical meshes. *J Mater Sci* 35: 4769-4776, 2000

- Klosterhalfen, B., Hermanns, B., Rosch, R., Junge, K.:** Biological response to mesh. *Eur Surg* 35: 16-20, 2003
- Klyscz, T., Junger, M., Jung, F., Zeintl, H.:** Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech* 42: 168-175, 1997
- Konstantinovic, M. L., Pille, E., Malinowska, M., Verbeken, E., De Ridder, D., Deprest, J.:** Tensile strength and host response towards different polypropylene implant materials used for augmentation of fascial repair in a rat model. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 18: 619-626, 2007
- Kraft, C. N., Hansis, M., Arens, S., Menger, M. D., Vollmar, B.:** Striated muscle microvascular response to silver implants: a comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res* 49: 192-199, 2000
- Kraft, C. N., Burian, B., Perlick, L., Wimmer, M. A., Wallny, T., Schmitt, O., Diedrich, O.:** Impact of a nickel-reduced stainless steel implant on striated muscle microcirculation: a comparative in vivo study. *J Biomed Mater Res* 57: 404-412, 2001
- Kraft, C. N., Weber, W., Burian, B., Zander, D., Wallny, T., Schmitt, O., Diedrich, O.:** Striated muscle microvascular response to implants with sol-gel calcium phosphate coating. A comparative in vivo study. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 140: 672-680, 2002
- Krause, H. G., Galloway, S. J., Khoo, S. K., Lourie, R., Goh, J. T.:** Biocompatible properties of surgical mesh using an animal model. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46: 42-45, 2006
- Kuppahally, S., Al-Khalidi, A., Weisshaar, D., Valentine, H. A., Oyer, P., Robbins, R. C., Hunt, S. A.:** Wound healing complications with de novo sirolimus versus mycophenolate mofetil-based regimen in cardiac transplant recipients. *Am J Transplant* 6: 986-992, 2006
- Lange, J. F. M., Meyer, V. M., Voropai, D. A., Keus, E., Wijsmuller, A. R., Ploeg, R. J., Pierie, J. P. E. N.:** The role of surgical expertise with regard to chronic postoperative inguinal pain (CPIP) after Lichtenstein correction of inguinal hernia: a systematic review. *Hernia* 3: 349-56, 2016
- Langer, C., Schwartz, P., Krause, P., Mohammadi, H., Kulle, B., Schaper, A., Füzesi, L., Becker, H.:** In-vitro study of the cellular response of human fibroblasts cultured on alloplastic hernia meshes. Influence of mesh material and structure. *Chirurg* 76: 876-885, 2005
- Laschke, M. W., Kerdudou, S., Herrmann, M., Menger, M. D.:** Intravital fluorescence microscopy: a novel tool for the study of the interaction of *Staphylococcus aureus* with the microvascular endothelium in vivo. *J Infect Dis* 191: 435-443, 2005
- Laschke, M. W., Elitzsch, A., Scheuer, C., Holstein, J. H., Vollmar, B., Menger, M. D.:** Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol* 149: 137-144, 2006

- Laschke, M. W., Witt, K., Pohlemann, T., Menger, M. D.:** Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 82: 494-505, 2007
- Laschke, M. W., Menger, M. D.:** The dorsal skinfold chamber: A versatile tool for preclinical research in tissue engineering and regenerative medicine. *Eur Cell Mater* 32: 202-215, 2016
- Law, N. W., & Ellis, H.:** Adhesion formation and peritoneal healing on prosthetic materials. *Clinical Materials* 3: 95-101, 1988
- Le Huu Nho, R., Mege, D., Ouäissi, M., Sielezneff, I., Sastre, B.:** Incidence and prevention of ventral incisional hernia. *J Visc Surg.* 149: 3-14, 2012
- Lehr, H. A., Leunig, M., Menger, M. D., Nolte, D., & Messmer, K.:** Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055-1062, 1993
- Lichtenstein, I. L.:** Herniorrhaphy. A personal experience with 6321 cases. *Am J Surg* 153: 553-559, 1987
- Luijendijk, R. W., Hop, W. C., van den Tol, M. P., de Lange, D. C., Braaksma, M. M., IJzermans, J. N., Boelhouwer, R. U., de Vries, B. C., Salu, M. K., Wereldsma, J. C., Bruijninx, C.M., Jeekel, J.:** A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia. *N Engl J Med* 343: 392-398, 2000
- Maloney, G. E., Gill, W. G., Barclay, R. C.:** Operations for hernia. Technique of Nylon darn. *Lancet* 2: 45-48, 1948
- Mekeel, K., Mulligan, D., Reddy, K. S., Moss, A., Harold, K.:** Laparoscopic incisional hernia repair after liver transplantation. *Liver Transpl* 13: 1576-1581, 2007
- Menger, M. D., Walter, P., Hammersen, F., Messmer, K.:** Quantitative analysis of neovascularization of different PTFE-implants. *Eur J Cardiothorac Surg* 4: 191-196, 1990
- Menger, M., Hammersen, F., Messmer, K.:** In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg* 40: 19-25, 1992
- Menger, M. D., Pelikan, S., Steiner, D., Messmer, K.:** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 263: H1901-H1906, 1992
- Menger, M. D., Laschke, M. W., Vollmar, B.:** Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34: 83-91, 2002
- Möhle, R., Green, D., Moore, M. A., Nachman, R. L., Rafii, S.:** Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 663-668, 1997
- Montalti, R., Mimmo, A., Rompianesi, G., Serra, V., Cautero, N., Ballarin, R., De Ruvo, N., Cunningham Gerring, R., Enrico Gerunda, G., Di Benedetto, F.:** Early use of

- mammalian target of rapamycin inhibitors is an independent risk factor for incisional hernia development after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2: 188-194, 2012
- Mosmann, T.:** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983
- Mudge, M., Hughes, L. E.:** Incisional hernia: a 10 years prospective study of incidence and attitudes. *Br J Surg* 72: 70-71, 1985
- Nguyen, M. T., Berger, R. L., Hicks, S. C., Davila, J. A., Li, L. T., Kao, L. S., Liang, M. K.:** Comparison of outcomes of synthetic mesh vs suture repair of elective primary ventral herniorrhaphy: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Surg* 149: 415-421, 2014
- O'Dwyer, P. J., Kingsnorth, A. N., Molloy, R. G., Small, P. K., Lammers, B., Horeysek, G.:** Randomized clinical trial assessing impact of a lightweight or heavyweight mesh on chronic pain after inguinal hernia repair. *Br J Surg* 92: 166-170, 2005
- Ong, C. T., Khoo, Y. T., Mukhopadhyay, A., Do, D. V., Lim, I. J., Aalami, O., Phan, T. T.:** mTOR as a potential therapeutic target for treatment of keloids and excessive scars. *Exp Dermatol* 16: 394-404, 2007
- Paghdal, K. V., Schwartz, R. A.:** Sirolimus (rapamycin): from the soil of Easter Island to a bright future. *J Am Acad Dermatol* 57: 1046-1050, 2007
- Peralta, R., Latifi, R.:** Long-term outcomes of abdominal wall reconstruction. what are the real numbers? *World J Surg.* 36: 534-538, 2012
- Piazzese, E., Montalti, R., Beltempo, P., Bertelli, R., Puviani, L., Pacilè, V., Nardo, B., Cavallari, A.:** Incidence, predisposing factors, and results of surgical treatment of incisional hernia after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 36: 3097-3098, 2004
- Piros, L., Máthé, Z., Földes, K., Langer, R. M.:** Incisional hernia after simultaneous pancreas kidney transplantation: a single-center experience from Budapest. *Transplant Proc* 4: 1303-1305, 2011
- Pries, A. R.:** A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc: Clin Exp* 7: 327-345, 1988
- Quesniaux, V. F.:** Immunosuppressants: tools to investigate the physiological role of cytokines. *BioEssays* 15: 731-739, 1993
- Robinson, T. N., Clarke, J. H., Schoen, J., Walsh, M. D.:** Major mesh-related complications following hernia repair: events reported to the Food and drug Administration. *Surg Endosc* 19: 1556-1560, 2005
- Rosch, R., Junge, K., Schachtrupp, A., Klinge, U., Klosterhalfen, B., Schumpelick, V.:** Mesh implants in hernia repair. Inflammatory cell response in a rat model. *Eur Surg Res* 35: 161-166, 2003

- Rücker, M., Laschke, M. W., Junker, D., Carvalho, C., Schramm, A., Mülhaupt, R., Gellrich, N. C., Menger, M. D.:** Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials* 27: 5027-5038, 2006
- Rutkow, I. M.:** Demographic and socioeconomic aspects of hernia repair in the United States in 2003. *Surg Clin North Am* 83: 1045-1051, 2003
- Santora, T. A., Roslyn, J. J.:** Incisional hernia. *Surg Clin North Am* 73: 557-570, 1993
- Schäffer, M. R., Tantry, U., van Wesep, R. A., Barbul, A.:** Nitric oxide metabolism in wounds. *J Surg Res* 71: 25-31, 1997
- Schäffer, M., Schier, R., Napirei, M., Michalski, S., Traska, T., Viebahn, R.:** Sirolimus impairs wound healing. *Langenbecks Arch Surg* 392: 297-303, 2007
- Scott, N. W., McCormack, K., Graham, P., Go, P. M., Ross, S. J., Grant, A. M.:** Open mesh versus non-mesh for repair of femoral and inguinal hernia. *Cochrane Database Syst Rev* 4, S. CD002197, 2002
- Shaw, J. P., Chuang, N., Yee, H., Shamamian, P.:** Polymorphonuclear neutrophils promote rFGF-2-induced angiogenesis in vivo. *J Surg Res* 109: 37-42, 2003
- Shearburn, E. W., Myers, R. N.:** Shouldice repair for inguinal hernia. *Surgery* 66: 450-459, 1969
- Shegogue, D., Trojanowska, M.:** Mammalian target of rapamycin positively regulates collagen type I production via a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. *J Biol Chem* 279: 23166-23175, 2004
- Shouldice, E. E.:** Surgical treatment of hernia. *Ont Med Rev* 12: 43, 1945
- Stepkowski, S. M.:** Preclinical results of sirolimus treatment in transplant models. *Transplant Proc* 35: 219S-226S, 2003
- Tang, L., Jennings, T. A., Eaton, J. W.:** Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8841-8846, 1998
- Toso, C., Meeberg, G. A., Bigam, D. L., Oberholzer, J., Shapiro, A. M., Gutfreund, K., Ma, M. M., Mason, A. L., Wong, W. W., Bain, V. G., Kneteman, N. M.:** De novo sirolimus-based immunosuppression after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: long-term outcomes and side effects. *Transplantation* 83: 1162-1168, 2007
- Usher, F. C., Gannon, J. P.:** Marlex Mesh: A new plastic mesh for replacing tissue defects: I. Experimental studies. *Arch Surg* 78: 131-137, 1959
- Vajkoczy, P., Vollmar, B., Wolf, B., Menger, M. D.:** Effects of cyclosporine A on the process of vascularization of freely transplanted islets of Langerhans. *J Mol Med* 77: 111-114, 1999

- Validire, J., Imbaud, P., Dutet, D., Duron, J. J.:** Large abdominal incisional hernias: Repair by fascial approximation reinforced with stainless steel mesh. *Br J Surg* 73: 8-10, 1986
- Van Amerongen, M. J., Molema, G., Plantinga, J., Moorlag, H., van Luyn, M. J.:** Neovascularization and vascular markers in a foreign body reaction to subcutaneously implanted degradable biomaterial in mice. *Angiogenesis* 5: 173-180, 2002
- Van Luyn, M. J., Khouw, I. M., van Wachem, P. B., Blaauw, E. H., Werkmeister, J. A.:** Modulation of the tissue reaction to biomaterials. II. The function of T cells in the inflammatory reaction to crosslinked collagen implanted in T-cell-deficient rats. *J Biomed Mater Res* 39: 398-406, 1998
- Varga, M., Matia, I., Kucera, M., Oliverius, M., Adamec, M.:** Polypropylene mesh repair of incisional hernia after kidney transplantation: single-center experience and review of the literature. *Ann Transplant* 3: 121-125, 2011
- Weyhe, D., Schmitz, I., Belyaev, O., Grabs, R., Müller, K. M., Uhl, W., Zumtobel, V.:** Experimental comparison of monofile light and heavy polypropylene meshes: less weight does not mean less biological response. *World J Surg* 30: 1586-1591, 2006
- Weyhe, D., Belyaev, O., Müller, C., Meurer, K., Bauer, K. H., Papapostolou, G., Uhl, W.:** Improving outcomes in hernia repair by the use of light meshes - a comparison of different implant constructions based on a critical appraisal of the literature. *World J Surg* 31: 234-244, 2007
- Weyhe, D., Hoffmann, P., Belyaev, O., Mros, K., Müller, C., Uhl, W., Schmitz, F.:** The role of TGF-beta 1 as a determinant of foreign body reaction to alloplastic materials in rat fibroblast cultures: comparison of different commercially available polypropylene meshes for hernia repair. *Regul Pept* 138: 10-14, 2007
- Witzel, O.:** Über den Verschluss von Bauchwunden und Bruchpforten durch versenkte Silberdrahtnetze. *Zentralbl Chir Leipzig* 27: 257-260, 1900
- Wood, S. C., Bushar, G., Tesfamariam, B.:** Inhibition of mammalian target of rapamycin modulates expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Toxicol Lett* 165: 242-249, 2006
- Yamasaki, K., Edington, H. D., McClosky, C., Tzeng, E., Lizonova, A., Kovesdi, I., Steed, D. L., Billiar, T. R.:** Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 101: 967-971, 1998
- Zanghì, A., Di Vita, M., Lomenzo, E., De Luca, A., Cappellani, A.:** Laparoscopic repair vs open surgery for incisional hernias: a comparison study. *Ann Ital Chir* 71: 663-667, 2000
- Zieren, J., Zieren, H. U., Jacobi, C. A., Wenger, F. A., Müller, J. M.:** Prospective randomized study comparing laparoscopic and open tension-free inguinal hernia repair with Shouldice's operation. *Am J Surg* 175: 330-333, 1998

9. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger für die Nutzung sämtlicher verwendeter Materialien sowie der Räumlichkeiten des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke für die Überlassung des interessanten Themas, seine konstruktive Kritik und aufmunternde Unterstützung, sowohl beim experimentellen Teil als auch bei der Erstellung dieser Arbeit. Er war es auch, der mir Schritt für Schritt das wissenschaftliche Arbeiten beibrachte. Hervorheben möchte ich seine stets offene Tür und seine Diskussionsbereitschaft während der gesamten Betreuung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie bedanken. Namentlich erwähnen möchte ich insbesondere Frau Elisabeth Gluding, Frau Janine Becker sowie Frau Dr. rer. med. Claudia Scheuer.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Freunde und meine Familie, die mich immer wieder motivierten, diese Arbeit trotz erheblicher beruflicher Einspannung erfolgreich zu beenden. Ohne ihre Unterstützung wäre die Entstehung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Insbesondere möchte ich auch Herrn Dr. rer. nat. Hansjörg Fricker für seine Zeit und die Unterstützung beim Lösen anfallender Probleme danken.

Meiner geliebten Frau Marlies möchte ich für ihr großes Verständnis, ihre Hilfe beim Editieren sowie ihre beständige Geduld und ihre Hartnäckigkeit danken.

10. Publikationen

10.1 Originalarbeiten

Laschke, M. W., Häufel, J. M., Roller, J., Schorr, H., Menger, M. D.: Rapamycin, but not cyclosporine A, inhibits vascularization and incorporation of implanted surgical meshes. *Transpl Int* 22: 654-662, 2009

Laschke, M. W., Häufel, J. M., Thorlaciuss, H., Menger, M. D.: New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo. *J Biomed Mater Res A* 74: 696-704, 2005

Laschke, M. W., Häufel, J. M., Scheurer, C., Menger, M. D.: Angiogenic and inflammatory host response to the surgical meshes of different mesh architecture and polymer composition. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91: 497-507, 2009

10.2 Übersichtsarbeiten

Laschke, M. W., Harder, Y., Amon, M., Martin, I., Farhadi, J., Ring, A., Torio-Padron, N., Schramm, R., Rücker, M., Junker, D., Häufel, J. M., Carvalho, C., Heberer, M., German, G., Vollmar, B., Menger, M. D.: Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12: 2093-2104, 2006

10.3 Kongressbeiträge

Häufel, J. M., Laschke, M. W., Menger, M. D.: Angiogenic and inflammatory host tissue response to implanted surgical meshes. *Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vasculäre Biologie e. V.* (München, 2006)

Häufel, J. M., Kadner, G., Rohrmann, K., Schultz, C., Bräutigam, R.: Anabolika induzierter High-Flow-Priapismus? Ein Fallbericht. *Jahrestagung der Schweizerischen Gesellschaft für Urologie* (St. Gallen, 2015)

Häufel, J. M., Padevit, C., John, H.: Ileumsegment als Ureterersatz: Eine dankbare Rekonstruktion. *Jahrestagung der Schweizerischen Gesellschaft für Urologie* (Interlaken, 2016)

Häufel, J. M., Förster, B., Brachlow, J., Padevit, C., John, H.: Posteriore Harnröhrenrekonstruktion und Perineostomie bei Fournier-Gangrän. *Jahrestagung der Schweizerischen Gesellschaft für Urologie* (Interlaken, 2016)