**Abstracts der Preisträger DAM Wissenschaftsakademie 2018:**

**Krapf**, Johanna aus Innsbruck:

**Titel: Minimal-invasiver Nachweis von Zytokinen zur**

**Diagnose einer Abstoßungsreaktion**

**Johanna Krapf1**,2, Ravi Starzl3, Kakali Sarkar1, Georg J. Furtmüller1, Saami

Khalifian1, Hubert Hackl4, Derek Barclay,5 Theresa Hautz6, Stefan Schneeberger1,6,

W.P. Andrew Lee1, Yoram Vodovotz5, Gerald Brandacher1

1 Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Vascularized Composite Allotransplantation

(VCA) Laboratory, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD

2 Department für Plastische-, Rekonstruktive und Ästhetische Chirurgie, Medizinische Universität

Innsbruck, Österreich

3 Language Technologies Institute, Carnegie Mellon School of Computer Science, Pittsburgh, PA

4 Sektion für Bioinformatik, Biocenter, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich

5 Department of Surgery and McGowan Institute for Regenerative Medicine, University of Pittsburgh,

Pittsburgh, PA

6 Department für Visceral-, Thorax- und Transplantchirurgie, Medizinische Universität Innsbruck,

Österreich

**Abstract**

**Hintergrund**: Die Transplantation zusammengesetzter Gewebe, wie Hand- oder

Gesichtstransplantation, ist heutzutage ein akzeptiertes Verfahren nach schwerem

Trauma. Immunologische Probleme stehen nach wie vor im Vordergrund: Akute

Abstoßungsreaktionen treten häufig auf, und verlangen nach wiederholten

Gewebebiopsien, welche manchmal schwer von unspezifischen Dermatosen zu

unterscheiden sind.

**Methoden**: In einem experimentellen Hinterbein-Transplantationsmodell der Ratte

entwickelten wir einen nichtinvasiven Tape-Stripping-Assay, um anhand der

epidermalen Zytokine eine Abstoßungsreaktion zu diagnostizieren. Syngene und

allogene Transplantationen (je n = 10) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach

Transplantation mittels Tape-Stripping und Luminex®-Assay analysiert. Hautbiopsien

wurden als Kontrolle herangezogen. Zusätzlich testeten wir die Anwendung an 3

unserer handtransplantierten Patienten.

**Resultate**: In unserem experimentellen Modell waren die Zytokine, welche mittels

Tape-Stripping analysiert worden waren, bereits zu sehr frühen Zeitpunkten (0-24h

nach Reperfusion) in der Lage, zwischen der syngenen Transplantation mit dem

alleinigen Ischämie-Reperfusionsschaden, und der allogenen Transplantation zu

unterscheiden. Mitglieder der IL-1-Familie wurden als zentrale Mediatoren in der

Hautabstoßung identifiziert. Im humanen Setting erwies sich der Assay als

irritationsarm und sicher durchführbar.

**Konklusion**: Mit unserem Tape-Stripping-Modell waren wir erstmals in der Lage,

bereits die anfänglichen Stadien einer Alloimmunantwort zu erfassen, und von einer

unspezifischen Inflammation zu unterscheiden.

Induktion von Wachstumsfaktoren mittels mRNA-Therapie zur Verbesserung der Wundheilung

S. Krauß, M. Denzinger, A. Daigeler, H. P. Wendel, S. Krajewski

Wachstumsfaktoren und Zytokine sind maßgeblich am Ablauf und der Regulation der Wundheilung

beteiligt. Deshalb wird eine Therapie mit Wachstumsfaktoren auch schon seit geraumer Zeit als

vielversprechend zur Verbesserung der Wundheilung angesehen. Die topische Applikation von

Wachstumsfaktoren stellte sich jedoch als wenig zielführend heraus, da die applizierten

Wachstumsfaktoren im Wundmilieu nur eine kurze Halbwertszeit aufweisen und die Bioverfügbarkeit

aus dem verwendeten Trägermaterial meist unbefriedigend ist. Einen anderen Ansatz stellt die

Gentherapie mit Wachstumsfaktoren dar, mit der einige Forschungsgruppen bereits positive Effekte

auf die Wundheilung erzielen konnten. Da die Gentherapie jedoch zu einer dauerhaft erhöhten

Expression von Wachstumsfaktoren und zu einer Deregulation des physiologischen Zellzyklus führen

kann, ist auch das Risiko der Entstehung maligner Entartungen erhöht. mRNA-Therapie kann im

Gegensatz dazu zu einer transienten Erhöhung der Wachstumsfaktorexpression und den damit

einhergehenden positiven Effekten auf die Wundheilung führen, ohne eine Veränderung des

genetischen Codes der behandelten Zellen zur Folge zu haben. Auf diesem Gebiet gibt es jedoch

kaum Vorarbeiten. Zunächst wurde für das Forschungsvorhaben eine Keratinocyte Growth Factor

(KGF) mRNA hergestellt. In ersten Zellkultur-Versuchen mit humanen Keratinozyten der HaCat-

Zelllinie sowie mit humanen HFF Fibroblasten wurden diese mit der hergestellten KGF mRNA

transfiziert. In den untersuchten Zellüberständen konnte gezeigt werden, dass eine Transfektion der

Zellen mit KGF mRNA zu einer erhöhten KGF Produktion *in vitro* führt. Zudem zeigten Scratch Assays,

in denen ein HaCat Zellmonolayer mit dem Überstand der transfizierten Zellen behandelt wurde,

eine bessere Zellmotilität und einen schnelleren Verschluss der durch den Scratch geschaffenen

Lücke im Zellmonolayer als unbehandelte Zellen. Weitere geplante Schritte sind nun die

Verbesserung der Transfektionsvektoren sowie die Herstellung, Optimierung und Validierung

weiterer Wachstumsfaktor-mRNAs. Im Anschluss sollen diese in *ex vivo* Hautmodellen weiter

untersucht und optimiert werden, bevor schließlich eine Untersuchung im Tiermodell geplant ist.

**Will**, Patrick aus Ludwigshafen:

**„Etablierung eines standardisierten und validierten Kleintiermodels zur Untersuchung des**

**mikrochirurgisch induzierten Lymphödems“**

**Patrick Will, Volker Schmidt, Ulrich Kneser BG Unfallklinik Ludwigshafen- Universität Heidelberg**

**Einleitung**

Die Etablierung von innovativen chirurgischen Techniken sowie die damit verbundene Forschung

erfordern eine standardisierte Vorschrift. Diese Standardisierung ist entscheidend für die

Vergleichbarkeit von Studien und chirurgischen Anwendungen. Der Bedarf einer solchen

Standardisierung ist in der Supermikrochirurgie und Zelltherapie bei Lymphödem gegenwärtig nicht

gedeckt. Besonders in der präklinischen Forschung sollten bei Kleintiermodellen standardisierte

Verfahren angewendet werden, um valide und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Unsere

Forschungsarbeit verfolgt unter kontrollierten Bedingungen verschiedene Kleintiermodelle im Detail

zu validieren und zu vergleichen. Darüber hinaus sollen bereits klinisch charakterisierte

supermikrochirurgische Techniken auf Basis der Grundlageforschung analysiert werden.

**Methoden**

Mikrochirurgische Induktion des Lymphödems wurde in einem Kleintiermodell angewendet, um unter

standardisierten Bedingungen verschiedene Parameter zu messen. Folgende Outcomes wurden hierbei

bewertet: Klinisches Bild, *in-vivo* Physiologie, Histologie und Immunologie. Die klinische Bewertung

erfolgte durch standarisierte Messungen und Wasserverdrängungsmethoden des operierten

Hinterbeines und der Gegenseite (Kontrolle). Morphologische Analysen erfolgten durch

Gewebedensität Messungen mittels micro-MRT und histologischen Färbungen. Die Funktion der

Lymphbahnen wurde mittels *in-vivo* Indocyaningrün Fluoreszenz und PET-CT analysiert.

Immunologisch wurden das Zytokin- und Chemokinprofil von immuno-relevanten Proteinen mittels

Multiplex untersucht.

**Ergebnisse und Diskussion**

Die Etablierung eines standardisierten Kleintiermodels stellt ein prädiktives und kontrollierbares

System zur klinischen Untersuchung des Lymphysystems dar. Mittels *in-vivo* Fluoreszenz Analyse

ergab sich ein standarisierter und proportionaler Funktionsverlust des Lymphysystems nach der

mikrochirurgischen Induktion des Lymphödems. Durch PET-CT und Immunohistochemischen

Färbungen sowie Proteinanalysen weisen unsere Ergebnisse auf einen pro-inflammatorischen und profibrotischen

Phänotyp hin, welche sich optimal für ausführliche Untersuchungen der

immunoregulatorischen Mechanismen des Lymphödems eignen.

**Früh**, Florian aus Zürich:

**Analyse des lymphangiogenen Potentials vaskularisierter**

**Lymphknotenlappen in einem axillären Ischämie-Reperfusions-**

**Modell an Ratten**

**Florian S. Frueh1**,2, Bijan Jelvani1, Claudia Scheuer1, Christina Körbel1, Pietro Giovanoli2,

Yves Harder3, Michael D. Menger1, Matthias W. Laschke1

*1Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, 66421*

*Homburg/Saar, Deutschland*

*2Klinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie, Universitätsspital Zürich, 8091 Zürich,*

*Schweiz*

*3Abteilung für Plastische, Rekonstruktive und Ästhetische Chirurgie, Ospedale Regionale di*

*Lugano, Ente Ospedaliero Cantonale, 6900 Lugano, Schweiz*

**Einleitung**

Die vaskularisierte Lymphknoten-Transplantation hat sich in den letzten Jahren zunehmend

als mikrochirurgische Therapieoption für das sekundäre Lymphödem etabliert. Die

vorliegende Studie untersucht den Einfluss der Ischämiezeit auf das lymphangiogene

Potential vaskularisierter Lymphknotenlappen in einem axillären Rattenmodell.

**Material und Methodik**

Präparation eines axillären Lymphknotenlappens an den Vasa thoracica lateralia in Lewis-

Ratten (gemischtes Geschlecht, Gewicht ~350g). Um mikrovaskuläre Komplikationen zu

vermeiden Verwendung eines Ischämie-Reperfusions-Modelles.

- Etablierung Tiermodell mit Photoakustik vor, während und nach Ischämie (n=4)

- 3 Gruppen: A) Kontrollgruppe ohne Ischämie B) 45 Min. Ischämie (IR-45) C) 120 Min.

Ischämie (IR-120)

- Protokoll: Präparation --> Ischämie (45 vs. 120 Min.) --> 24h Reperfusion --> Entnahme

- Histologie/Immunhistochemie (n=8/Gruppe)

- Western Blot mit separater Analyse Lymphknoten und perinodales Fett (n=4/Gruppe)

**Resultate**

Alle Tiere tolerierten den Ischämie-Reperfusions-Versuch gut. Es traten weder Hämatome,

Gangstörungen noch mikrovaskuläre Komplikationen an den temporär abgeklemmten

Gefässen auf. Die Zellularität der axillären Lymphknoten war in der IR-120 Gruppe signifikant

reduziert. Histopathologisch zeigten die Lymphknoten der IR-120 Gruppe zudem eine

Alteration der LYVE-1+ Randsinus und follikulären Strukturierung. Weiter konnten wir

histopathologisch in der IR-120 Gruppe eine signifikant erhöhte Apoptose-Rate zeigen.

Western Blot - Analysen ergaben erhöhte Level an VEGF-D und VEGF-A in der IR-120

Gruppe sowohl für Lymphknoten- als auch Fettgewebe. VEGF-C hingegen war in keiner

Gruppe signifikant erhöht. Die Ratio p-eNOS/eNOS als Ausdruck eines Ischämieschadens

war in der IR-120 Gruppe sowohl in Lymphknoten als auch Fett signifikant erhöht.

**Konklusion**

Ischämie über 45 Minuten führt zu einer geringen strukturellen Alteration der

Lymphknotentransplantate ohne das lymphangiogene Potential wesentlich zu verändern.

Eine 120-minütige Ischämie hingegen schlägt sich in ausgeprägten strukturellen

Veränderungen der Lymphknoten nieder und hat wesentlichen Einfluss auf die Sekretion

lymphangiogener Wachstumsfaktoren.

**Hesseauer**, Maximilian aus Erlangen:

**Etablierung eines intravitalmikroskopischen Modells zur Analyse der leukozytär**

**vermittelten zellulären Mechanismen bei der de novo Gewebsformierung im AV-Loop**

**Modell an der Ratte**

**Maximilian Hessenauer, Andreas Arkudas, Raymund E. Horch Erlangen**

**Klinik für Plastische und Handchirurgie und Labor für Tissue Engineering und Regenerative Medizin**

**Direktor Univ.-Prof.Dr.R.E.Horch**

Ausgedehnte Gewebedefekte stellen trotz der Möglichkeit der mikrochirurgischen

Gewebsverpflanzung eine therapeutische Herausforderung der rekonstruktiven Chirurgie

dar. Im AV-Loop Modell findet ausgehend von einer arteriovenösen Gefäßschleife eine de

novo Formierung von axial vaskularisiertem Gewebe in einer Isolationskammer statt. Somit

kann geeignetes Gewebe für die mikrovaskuläre Transplantation nahezu ohne Hebedefekt

generiert werden. Jedoch sind die physiologischen und pathophysiologischen Prozesse

dieser Gewebsneubildung auf zellulärer und molekularer Ebene in Ermangelung eines

geeigneten Modells zur intravitalmikroskopischen Darstellung eben dieser Vorgänge

weitgehend unverstanden.

Hierfür erfolgte in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Werkstoffkunde und Technologie der

Metalle der FAU die Entwicklung einer Beobachtungskammer, die die repetitive

fluoreszenzgestützte intravitalmikroskopische Evaluation des Gefäßnetzwerkes im neu

formierten Gewebe am lebenden Tier erlaubt und dabei die spezifische Visualisierung von

Zellpopulationen ermöglicht.

Zunächst muss die Versuchskammer im Rahmen von Vorversuchen optimiert werden. Im

nächsten Schritt werden verschiedene Matrizes hinsichtlich ihrer spezifischen Eigenschaften

im AV-Loop Modell insbesondere hinsichtlich Leukozyten-Endothelzellinteraktionen im sich

neu bildenden Gefäßnetzwerk analysiert. Schließlich sollen die Funktion und Bedeutung

verschiedener leukozytärer Subpopulationen in diesem Kontext ermittelt werden. Somit

können im Verlauf Möglichkeiten zur therapeutischen Modulation und Modifikation dieser

Prozesse herausgearbeitet werden.