

Krapf, Johanna aus Innsbruck:

Titel: Minimal-invasiver Nachweis von Zytokinen zur Diagnose einer Abstoßungsreaktion

Johanna Krapf^{1,2}, Ravi Starzl³, Kakali Sarkar¹, Georg J. Furtmüller¹, Saami Khalifian¹, Hubert Hackl⁴, Derek Barclay⁵, Theresa Hautz⁶, Stefan Schneeberger^{1,6}, 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 Kleintiermodells zur Untersuchung des mikrochirurgisch induzierten Lymphödems“

Patrick Will, Ulrich Kneser, Christoph Hirche

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 Grundlagerecherche 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 standardisierte Messungen und Wasserverdrängungsmethoden des operierten Hinterbeines und der Gegenseite (Kontrolle). Morphologische Analysen erfolgten durch Gewebedensitätsmessungen 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 Kleintiermodells stellt ein prädiktives und kontrollierbares System zur klinischen Untersuchung des Lymphsystems dar. Mittels *in-vivo* Fluoreszenz Analyse ergab sich ein standardisierter und proportionaler Funktionsverlust des Lymphsystems 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-Reperfu-sions-Modell an Ratten

Florian S. Frueh^{1,2}, Bijan Jelvani¹, Claudia Scheuer¹, Christina Körbel¹, Pietro Giovanoli²,

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

¹*Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, 66421 Homburg/Saar, Deutschland*

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

³*Abteilung 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-Reperfu-sions-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-Reperfu-sions-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 Lymphknoten-transplante 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 Hesseauer, 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 Matrices 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.