

Abschlussbericht zum Vorhaben

**Funktioneller Gewebeersatz mit *in vivo* gezüchteten vaskularisierten
Bindegewebslappenplastiken im Großtiermodell (FR-270)**

Laufzeit

01.01.2018 – 31.12.2022

Berichtszeitraum

01.01.2018 – 31.12.2022

Bericht vom 10.07.2023

Autoren

Prof. Dr. med. Ulrich Kneser, Dr. med. Florian Falkner

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch

Kurzfassung englisch

1. Problemstellung

2. Forschungszweck/-ziel

3. Methodik

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

8. Anhang/Anhänge

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Kurzfassung deutsch

Ziele: Die arteriovenöse loop (AVL) Technik ermöglicht die *in vivo* Züchtung axial vaskularisierter Bindegewebslappenplastiken als Alternative zu freien Lappenplastiken. AVL-Bindegewebslappenplastiken wurden jedoch noch nie im standardisierten Großtiermodell auf ihre Eignung zur Rekonstruktion kritischer Defekte untersucht.

- Das Hauptziel (1) dieser Studie war es, im Großtiermodell axial vaskularisierte Bindegewebslappenplastiken in klinisch relevanten Dimensionen zu züchten, die autotransplantiert und zur freien Defektrekonstruktion verwendet werden können.
- Das Nebenziel (2A) dieser Studie war es, die Vaskularisationskinetik und den bindegewebigen Reifungsprozess der AVL-Lappenplastiken zu untersuchen.
- Das Nebenziel (2B) dieser Studie war es, Gene und miRNA zu untersuchen, die die AVL assoziierte Angiogenese regulieren.

Aktivitäten/Methoden: In 6 Schafen wurden jeweils zwei AVLs (n=12) angelegt und in ein bovines Kollagen/Elastin Scaffold in einer subkutanen Polytetrafluorethylen-Kammer eingebettet. Das Volumen des Gewebes sowie das Ausmaß der Angiogenese und der Anteil proliferierender Zellen wurden am 28. postoperativen Tagen (POT) mittels Immunhistochemie (ki67, CD31, Factor VIII) und Mikro-Computertomographie (μ CT) untersucht. Zusätzlich wurden mit einer dynamisch mechanischen Analyse die biomechanischen Eigenschaften der AVL-Lappenplastiken untersucht. 4 AVL-Lappenplastiken wurden in einem standardisierten Defektmodell als freie Lappenplastik mikrochirurgisch an die Halsgefäße anastomosiert. Der postoperative Defektverschluss und die Perfusion der Lappenplastik wurden mittels Angiographie und Histologie untersucht. Die Genexpression Angiogenese assoziierter Gene wurde mittels qRT-PCR aus Venentransplantaten der AVL untersucht.

Ergebnisse: Am 28. POT füllten die AVL-Lappenplastiken die Isolationskammer vollständig aus und zeigten histologisch sowie im μ CT homogene mikrovaskuläre Netzwerke. Die mittlere Anzahl an Mikrogefäßen und das Gefäßvolumen sowie der Prozentsatz an proliferierenden Zellen nahmen im zeitlichen Verlauf deutlich zu. Die dynamisch mechanische Analyse zeigte eine deutlichere Steifheit der AVL-Lappenplastiken im Vergleich zur fasziokutanen Lappenplastiken von Patientinnen und Patienten. Die qRT-PCR zeigte eine analoge Regulation Angiogenese assoziierter Genexpression im Vergleich zu vorausgegangenen Studien an Patientinnen und Patienten die eine zweizeitige Defektrekonstruktion mit einem Lappenplastik Anschluss an einen AVL erhielten. Im Defektmodell zeigte sich 10 Tage nach Transplantation bei allen Lappenplastiken klinisch, angiographisch und histologisch ein stabiler Defektverschluss mit homogener Gefäßintegration in das umliegende Gewebe.

Schlussfolgerung und klinische Relevanz: Die AVL-Lappenplastik eignet sich zur freien Transplantation und Defektrekonstruktion unter minimaler Hebedefektmorbidität und kann prinzipiell unter strenger Indikation als OP-Technik am Patienten angewendet werden. Mit der AVL-Technik lassen sich innerhalb von 28 Tage axial vaskularisierte Bindegewebslappenplastiken von klinisch relevanten Gewebevolumina züchten.

- Die AVL-Lappenplastik könnte defektnah angelegt werden und als lokale Lappenplastik zum Beispiel zur Rekonstruktion von Handrücken-Defekten mit freiliegenden Strecksehnen eingesetzt werden.
- Die AVL-Lappenplastik könnte defektfern angelegt werden und als freie Lappenplastik zur Defektrekonstruktion eingesetzt werden.

Kurzfassung (englisch)

Objectives: The arteriovenous loop (AVL) technique enables the *in vivo* generating of axially vascularized connective tissue flaps as an alternative to conventional free flaps. However, AVL soft-tissue flaps have never been investigated in standardized large animal models for their suitability in reconstruction of critical defects as a free flap.

- The main objective (1) of this study was to generate axially vascularized connective tissue flap grafts in clinically relevant dimensions in a large animal model, which can be autotransplanted and used for free defect reconstruction.
- The secondary (2A) objective of this study was to examine the vascularization kinetics and connective tissue maturation process of AVL flap grafts.
- The secondary (2B) objective of this study was to investigate genes and miRNAs that regulate AVL-associated angiogenesis.

Activities/Methods: Two AVLs (n=12) were created in 6 sheep and embedded in a bovine collagen/elastin scaffold within a subcutaneous polytetrafluoroethylene chamber. The tissue volume, extent of angiogenesis, and proportion of proliferating cells were examined on postoperative day (POD) 28 using immunohistochemistry (ki67, CD31, Factor VIII) and micro-computed tomography (μ CT). Additionally, the biomechanical properties of the AVL flaps were examined using dynamic mechanical analysis. Four AVL flaps were microsurgically anastomosed to the neck vessels in a standardized defect model as a free flap. Postoperative defect closure and flap graft perfusion were examined using angiography and histology. The gene expression of angiogenesis-associated genes was examined using qRT-PCR from venous grafts of the AVL.

Results: On POD 28, the AVL flaps completely filled the isolation chamber and showed histologically and in μ CT homogeneous microvascular networks. The mean number of microvessels and vessel volume, as well as the percentage of proliferating cells, increased significantly over time. Dynamic mechanical analysis showed a greater stiffness of the AVL flap compared to fasciocutaneous flaps from patients. QRT-PCR showed analogous regulation of angiogenesis-associated gene expression compared to previous studies on patients who underwent two-stage defect reconstruction with a free flap anastomosed to an AVL. In the defect model, stable defect closure with homogeneous tissue integration into the surrounding tissue was clinically, angiographically, and histologically observed 10 days after transplantation in all flaps.

Conclusion and clinical relevance: The AVL flap graft is suitable for free transplantation and defect reconstruction with minimal donor site morbidity and can potentially be applied as a surgical

technique in patients under strict indications. The AVL technique allows for the cultivation of axially vascularized connective tissue flap grafts of clinically relevant tissue volumes within 28 days.

- The AVL flap graft could be placed near the defect and used as a pedicled flap, for example, for the reconstruction of dorsal hand defects with exposed extensor tendons.
- The AVL flap graft could be placed far from the defect and used as a free flap for defect reconstruction.

1. Problemstellung

Die Rekonstruktion von komplexen Defekten bei schwerbrandverletzten oder polytraumatisierten Patientinnen und Patienten stellt eine enorme klinisch-chirurgische Herausforderung dar und erfordert differenzierte rekonstruktive Konzepte. Weichteildefekte mit freiliegenden Strukturen wie Knochen, Gelenken, Sehnen, Gefäßen oder Nerven machen eine Deckung mit einem freien autologen Gewebetransfer im Sinne einer freien Lappenplastik erforderlich. Freie Lappenplastiken sind jedoch aufwändige operative Eingriffe, die mit einer Hebestellen-Morbidität, langer Krankenhausverweildauer, sowie häufig langem postoperativen Rehabilitationsverlauf behaftet sind. Bei schwerbrandverletzten und polytraumatisierten Patientinnen und Patienten mit einer ausgedehnten Zerstörung der Weichteile in mehreren Körperregionen kommt ferner das Problem limitierter Spenderareale zur Entnahme einer freien Lappenplastik hinzu. Darüber hinaus sind lappenpflichtige Defekte mit einer sehr großen Ausdehnung im Längs- und Querdurchmesser mitunter nicht mit einer einzigen konventionellen Lappenplastik behandelbar und benötigen zum Teil ein sehr belastendes, mehrstufiges Rekonstruktionsverfahren. Die Neuzüchtung von körpereigenem vaskularisiertem Gewebe am oder im Patienten selbst, das zum freien Transfer geeignet ist, stellt ein vielversprechendes Konzept dar, das künftig einen Ausweg aus diesem Dilemma bieten kann. Hierbei ist jedoch eine Grundvoraussetzung der rekonstruktiven Chirurgie, dass das konstruierte Gewebe zur Deckung komplexer Defekte über ein funktionsfähiges Mikrozirkulationssystem mit einer kaliberstarken vaskulären Anschlussmöglichkeit verfügen muss, da eine fehlende Perfusion unmittelbar nach Transplantation zum Absterben und damit ausbleibenden Integration des großvolumigen Gewebekonstrukts führen würde.

2. Forschungszweck/-ziel

Ziel des Projektes ist die *in vivo* Züchtung eines axial vaskularisierten und transplantationsfähigen Bindegewebslappens im Körper des Empfängers, mit dem die Deckung von komplexen, großvolumigen und tiefreichenden Weichteildefekten in der Qualität einer herkömmlichen freien Lappenplastik erreicht werden kann. Nach erfolgreicher Umsetzung im Kleintiermodell (FR266) soll mit dem Verfahren als nächste und bereits vorformulierte translationale Stufe die stabile Deckung einer standardisierten, großflächigen und Knochen-exponierenden Wunde am Großtiermodell erreicht werden. Werden dabei vergleichbare Ergebnisse wie im Kleintiermodell erzielt, soll im nächsten Schritt diese effiziente, schonende und relativ kostengünstige Methode bei Patientinnen und Patienten mit limitierten Spenderregionen als freie Lappenplastik zunächst im Rahmen einer Pilotserie eingesetzt werden. Die mit Hilfe der arteriovenösen AVL-Technik gezüchteten freien Transplantate könnten bei einem großen Indikationsspektrum Anwendung finden. In erster Linie kommen Patientinnen und Patienten in Frage, bei denen Wunden mit freiliegenden Knochen, Sehnen, Gefäßen oder Nerven vorliegen. Darüber hinaus könnte auch die Behandlung von hochgradigen Gelenkkontrakturen oder mentosternalen Kontrakturen nach großflächiger Verbrennung durch das AVL-Verfahren adressiert werden. Durch die *in vivo* Züchtung einer Lappenplastik wird als zentraler Vorteil die großflächige Gewebeentnahme (häufig mit intakter Muskulatur) aus einem gesunden Spenderareal, die mit Funktionseinschränkungen und längerem Krankheits- und Rehabilitationsverlauf verbunden sein kann, umgangen. Darüber hinaus wäre erstmals eine passgenaue Herstellung von Lappenplastiken möglich, bei der 3-dimensionale Datensätze aus MRT- oder CT-Untersuchungen des Patienten für die Generierung der AVL-Kammern genutzt werden könnten. Ein weiteres Anwendungsfeld sind ausgedehnte Komplexwunden mit einem großen Quer- und Längsdurchmesser, die mit einer einzelnen herkömmlichen Lappenplastik häufig nicht allein gedeckt werden können und so zum Teil mit mehreren sehr belastenden Operationen einhergehen. Ein zusätzlicher und erst langfristig auf die therapeutische Umsetzung orientierter Nebenaspekt der Studie ist die Identifikation therapierrelevanter Genexpressionsmuster und miRNAs in den venösen Anteilen der AVLs, die bei ohnehin anfallenden Präparaten durchgeführt werden und daher eine sehr günstige Ratio zwischen Mitteleinsatz und zu erwartendem Ergebniserfolg darstellen. Neben dem Erkenntnisgewinn für die AVL-assoziierte Angiogenese könnte die Applikation spezifischer miRNAs langfristig zu verkürzten Züchtungsintervallen der AVL-Lappenplastiken beitragen und möglicherweise auch neue Therapieansätze zur Verbesserung der Perfusion bei Patientinnen und Patienten mit kritisch hypoperfundierten Extremitäten ermöglichen. Zielgruppe des Forschungsprojektes sind Unfallpatienten, die aufgrund tiefreichender Verbrennungen oder anderer schwerer Traumata einer Versorgung mit durchbluteten Lappenplastiken aus

Eigengewebe bedürfen, und für die aufgrund des Verletzungsmusters bzw. des Gesamtzustandes eine konventionelle Lappentransplantation mit erheblichen Nachteilen behaftet ist oder nicht in Frage kommt.

3. Methodik und Darstellung der durchgeführten Versuche

3.1 Darstellung des Studienverlaufs

Wir haben das Projekt am 01.01.2018 wie geplant gestartet und mit unseren Vorversuchen aus 2017 wurden insgesamt 9 Schweine operiert. Jedoch kam es bei allen Tieren während des Züchtungsintervalls der Lappenplastik am Hinterlauf trotz initialer Durchgängigkeit der Gefäßanastomosen und technisch problemlosem intraoperativem Verlauf postoperativ zu einer Thrombose des AVLS. Es konnte auch nach Optimierung des Gerinnungs-Managements, Wechsel der verwendeten Gefäß-Interponate und AVL-Anschluss auf größere Empfängergefäße keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht werden, so dass wir eine Fortführung am Schweine-Modell für nicht sinnvoll hielten.

Daher erfolgte 2018 eine intensive Evaluation der verschiedenen Optionen zur Fortführung des Projekts, währenddessen die aktiven Forschungsarbeiten am Projekt pausiert wurden.

Schließlich haben wir uns für einen Spezies-Wechsel auf das Schaf-Modell und einen Standortwechsel an das Zentrum für biomedizinische Forschung der Universität Wien entschieden, da dies die größte Einrichtung für Großtierforschung in Europa ist. Die Laufzeit des Vorhabens wurde kostenneutral durch die DGUV bis Ende 2021 verlängert. Von Juli bis Oktober 2019 erfolgten zur Vorbereitung auf die Versuche im Schaf-Modell umfangreiche Kadaverstudien in Wien. Am 18.11.2019 wurde der Tierversuchsantrag vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung in Wien offiziell genehmigt. Am 24.02.2020 und 25.02.2020 konnten zunächst planmäßig zwei Schafe operiert werden. Die AV Loop Operationen gelangen problemlos und der postoperative Verlauf zeigte bei durchgängigen Anastomosen und guter Vaskularisation der Lappenplastiken keine Auffälligkeiten. Jedoch konnten die Versuche seit April 2020 aufgrund der Corona-Pandemie mit Einschränkungen der Einreise nach Österreich aufgrund der aktuellen Corona-Bestimmungen nicht fortgesetzt werden. Von September bis Dezember 2021 haben wir die Versuche in Wien fortgesetzt. Der Zeitplan für die Versuche ergab sich daher wie folgt (Abbildung 1).

Zeitachse	2021			2022												
	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	A	O	N	D
Teilprojekt und Methodik																
Teilprojekt 1																
Tieroperationen inklusive Defektmodell				1.												
Bildgebung				1.												
Teilprojekt 2A																
Histologie / Immunhistochemie								2.								
Mechanische Gewebeanalyse												2.				
Teilprojekt 2B																
miRNA und mRNA Microarrays																
PCR																
Biostatistik																3.
1. - 3.	Erreichen der Forschungsziele															

Abbildung 1: Zeitachse der Versuche und Teilprojekte von Oktober 2021 bis Dezember 2022.

Die ursprünglich geplante Abfolge der Operationen und der Teilprojekte hat sich nicht verändert (Abbildung 2). Anstatt der initial 12 geplanten Schweine wurden 6 Schafen mit insgesamt 12 AVL-Operationen durchgeführt.



Abbildung 2: Zeitachse der Operationsabfolge

Das Studiendesign und der Studienverlauf sahen wie folgt aus (Abbildung 3).

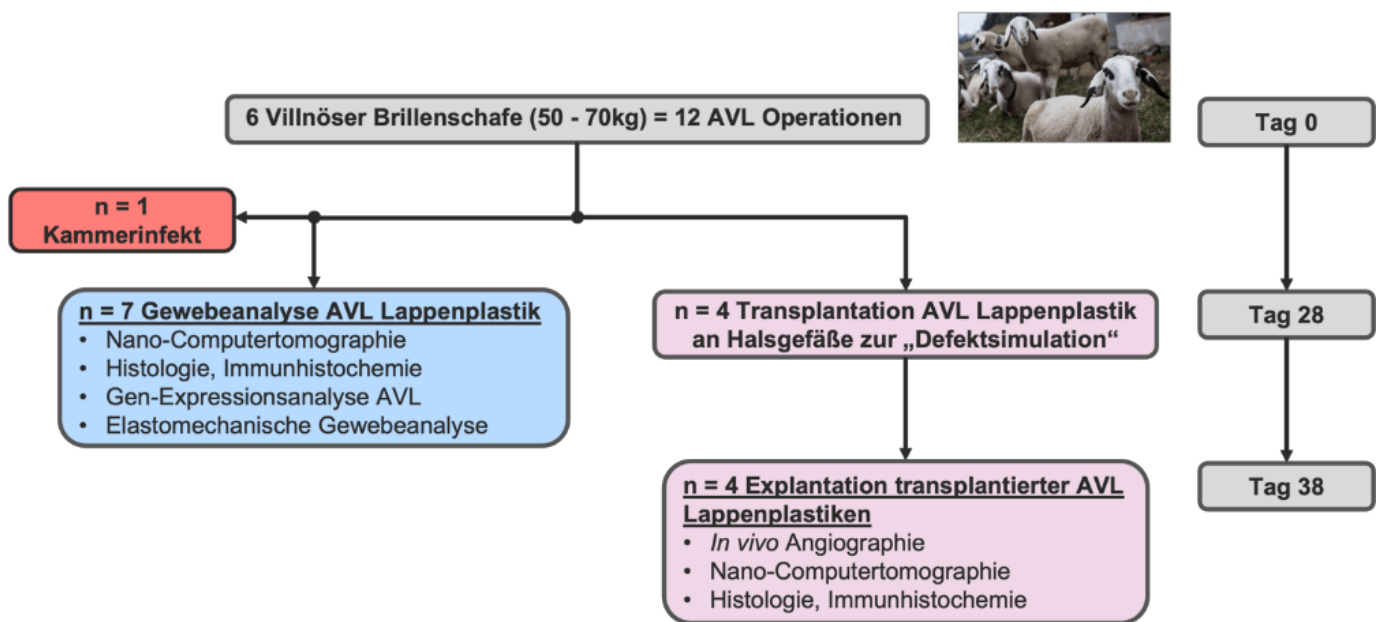


Abbildung 3: Studienverlauf (Ethik - BMBWF 0381-V/3b/2019). Es wurden 6 Schafe (12 AVLs) operiert. 7 AVLs konnten für histologische, molekularbiologische und elastomechanische Messungen explantiert werden. 4 AVLs wurden zur Defektrekonstruktion transplantiert.

Wir haben uns für MatriDem® als Trägermatrix entschieden, da im Rattenmodell ein Züchtungsintervall von 4 Wochen für die Generierung einer transplantationsfähigen Lappenplastik ausreichend war. Daher wurde nach einem Züchtungsintervall von 4 Wochen analog im Schaf am Hals ein kritischer Defekt mit einem Durchmesser von 3 cm angelegt. Der Defekt wurde

anschließend durch die AVL-Lappenplastik gedeckt, die mikrovasculär an Arteria Carotis und Vena Jugularis angeschlossen wurde. Zusätzlich wurde ein Spalthauttransplantat auf die Lappenplastik platziert. Nach erfolgter Transplantation wurden die Wunden bzw. die makroskopisch sichtbare Einheilung über einen Zeitraum von 10 Tagen 2-tägig durch eine standardisierte fotooptische Analyse untersucht werden. 10 Tage nach Defektdeckung wurden die mit AVL-Lappenplastiken versorgten Wunden zusammen mit dem umliegenden Gewebe entnommen und die Qualität der Wundheilung histologisch untersucht.

3.2 Kadaverstudie

In eigenen anatomischen Vorversuchen in Wien konnten wir am Schaf die Arteria und Vena saphena an der Oberschenkelinnenseite als ausreichend kaliberstarke oberflächliche Gefäße darstellen und ihre prinzipielle Eignung zur Generierung eines AVLs nachweisen (Abbildung 4).



Abbildung 4: Präparation der V. und A. Saphena sowie AV Loop Anlage an der Oberschenkelinnenseite am Schaf als Machbarkeitsnachweis. (1) Präparation am Kadaver. (2) In vivo Gefäßpräparation und AVI Anlage an einem Schaf.

Das Kammerdesign wurde den Schafen dementsprechend angepasst (Abbildung 5).



Abbildung 7: Tägliche Visite und Wundkontrollen der Versuchstiere

3.4 Explantation und Perfusion der AVL-Lappenplastiken

Am 28. Tag post OP wurden insgesamt 7 AVL-Bindegewebslappenplastiken explantiert und ihr Mikrozirkulationssystem, die Zellmigration und die bindegewebige Reifung histologisch und mittels μ CT untersucht. Zur Explantation wurde der arterielle Gefäßstiel proximal ligiert, abgesetzt und mit NaCl/Heparin gespült. Anschließend wurden die Vene distal der Kammer ligiert und die Gefäße selektiv mit röntgendichtem Microfil (MV-122; Flowtech, Massachusetts) perfundiert. Die mit Microfil gefüllten Gefäßlumina stellten sich in der feingeweblichen Untersuchung schwarz dar und wurden nach dem μ CT-Scan für die weitere histologische Auswertung verwendet. Die hochauflösende postmortale 3D-Bildgebung wurde an einem μ CT-Scanner (Y.Fox, Yxlon, Garbsen, Deutschland) durchgeführt. Die Quantifizierung der Gefäßanzahl und -fläche innerhalb der AVL Konstrukte erfolgte mittels computergestützter, histomorphometrischer Analyse der 2-dimensionalen Schnittpräparate. Verwendet wurde ein automatisierter Algorithmus, der - basierend auf positiven und negativen Experten - mit Farbstoff gefüllte Gefäße detektiert und von unserer Gruppe entwickelt und bereits publiziert wurde (Weis et al. 2015 – „*Automatic quantification of angiogenesis in 2D sections: A precise and timesaving approach*“). Zur Evaluation des bindegewebigen Umbaus der Matrix wurde der Gehalt und die Anordnung von Kollagenfasern und Elastin durch Elastika-van-Gieson-Färbungen untersucht. Immunhistochemische Färbungen wurden verwendet, um spezifisch Ki67-, CD31- und Willebrand-Faktor (vWF) positive Zellen zu identifizieren. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Die 3D-Verteilung der Zellen und der Population von positiven Zellen auf den Transplantaten wurde unter Verwendung eines konfokalen Laser-

Scanning-Mikroskops (CLSM 700, Zeiss, Deutschland) untersucht. Zur Quantifizierung der positiven Zellen wurden fünf zufällige Positionen jeder Probe mit einer Fläche von 2 mm x 2 mm und eine Dicke von 100µm ausgewählt und gescannt.

3.5 Dynamisch Mechanische Gewebeanalyse (DMA)

Ein DMA 242E ARTEMIS (Netzsch GmbH, Waldkraiburg, Deutschland) wurde verwendet, um an Tag 28 an drei AV Loop Bindegewebslappenplastik eine dynamisch mechanische Gewebeanalyse (DMA) durchzuführen. Gleichzeitig wurde von 3 Patienten überschüssiges Gewebe einer fasziokutanen Lappenplastik entnommen, um eine Vergleichsanalyse durchzuführen. Die menschliche Gewebeentnahme wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt (Mainz IRB 2020-15173). 10 x 10 x 5 mm große Gewebestücke wurden aus jeder Probe entnommen. Die Proben wurden auf einer Stanze mit 0,1 Newton Anfangskraft eingespannt. Anschließend wurden die Gewebeproben um 200 µm eingedrückt und die auf die Stanze einwirkenden Kräfte (Proteus-Software-Labcenter Electronics Ltd, Grassington, UK) aufgezeichnet (Abbildung 8).

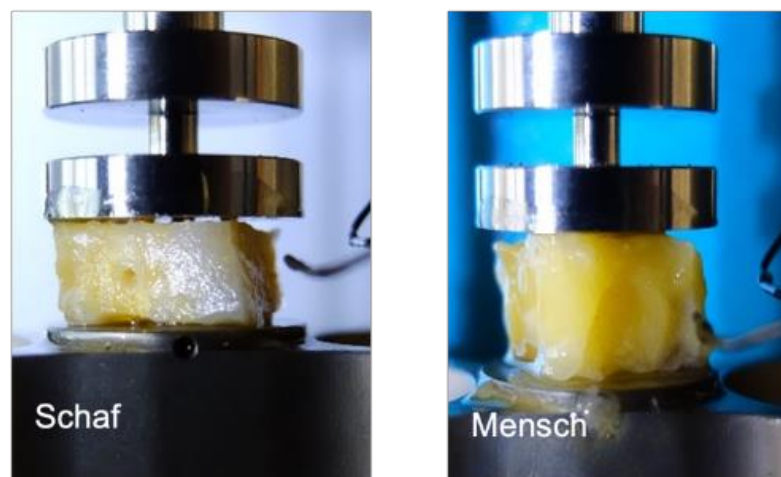


Abbildung 8: Zur DMA wurde das Gewebe in einer Stanz-Vorrichtung eingespannt und die Kraft, um die Gewebeproben einzudrücken abgeleitet.

3.6 Untersuchung der Gen-Expression mittels Polymerase-Chain-Reactions (PCR)

An Tag 0 bei AV Loop Anlage (Kontrolle) und Tag 28 (Experimentalgruppe) bei Explantation wurde ein Stück Vene aus dem AVL (Schaf) entnommen und die Gen-Expression des Gefäßes untersucht. Die RNA-Isolierung wurde mit einem RNeasy Micro Plus Kit (Qiagen, Deutschland) durchgeführt und die RNA-Menge sowie -Qualität wurden mit einem SPARK-Mikroplatten-Lesegerät (Tecan, Deutschland) bewertet. Die reverse Transkription wurde mit einem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Primer wurden in einer

Konzentration von 10µg verwendet und einem SYBR Green PCR-Mastermix (Applied Biosystems, USA) unterzogen. Pro Reaktion wurden 30 ng cDNA verwendet. RT-qPCR wurde auf einem ABI 7500 Thermocycler (Thermo Fisher, USA) mit Standardenzym- und Zyklusbedingungen durchgeführt. Microarrays für microRNA und messengerRNA konnten nicht durchgeführt werden, da es auf dem Markt keine Hersteller gibt, der Microarrays für die Genuntersuchung bei Schafen zur Verfügung stellt.

3.7 Transplantation der AVL-Lappenplastiken zur freien Defektrekonstruktion

Zur freien Transplantation an die Halsgefäße wurden am Tag 28, wie im Studienverlauf beschrieben, insgesamt 4 AV Loop Bindegewebslappenplastiken entnommen. Gleichzeitig wurde parallel zur Trachea ein 5 – 7 cm langer ventraler Schnitt gesetzt. Als Empfängergefäße wurden die rechte obere Schilddrüsenvene, die aus der V. jugularis interna entspringt, und die rechte Halsschlagader präpariert (Abbildung 9).

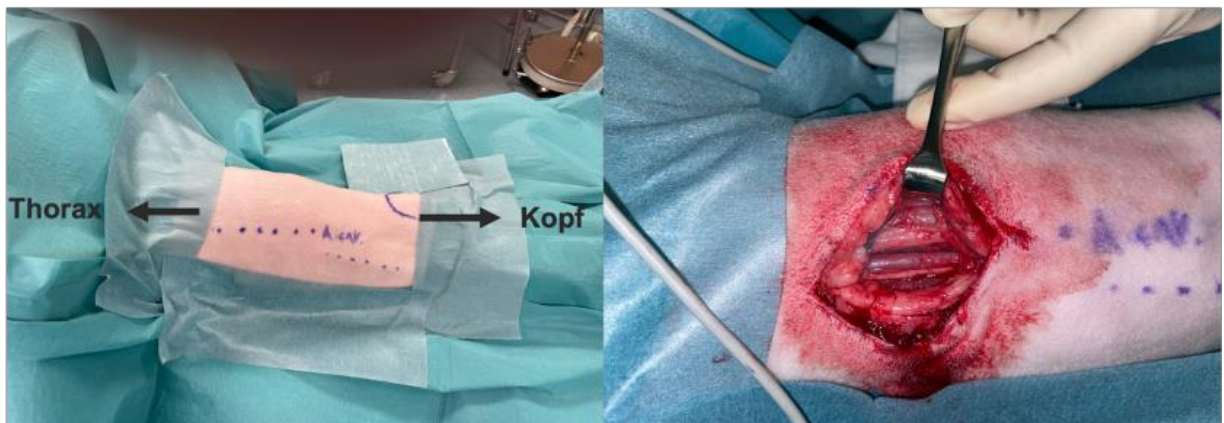


Abbildung 9: Darstellen der A. Carotis interna und V. Jugularis am ventralen Hals als Anschlussgefäße für die AV Loop Lappenplastik.

Zum Defektverschluss wurde eine arterielle End-zu-Seit-Anastomose des AVL-Lappens mit der Halsschlagader unter Verwendung von 9-0 Ethilon-Nähten (Ethicon) und eine venöse End-zu-End-Anastomose mit der oberen Schilddrüsenvene unter Verwendung eines 2-mm-Couplers durchgeführt. Die Durchgängigkeit beider Mikroanastomosen wurde durch Beobachtung der arteriellen Pulsatilität und des Gefäß-Ausstreichtests sichergestellt (Abbildung 10).

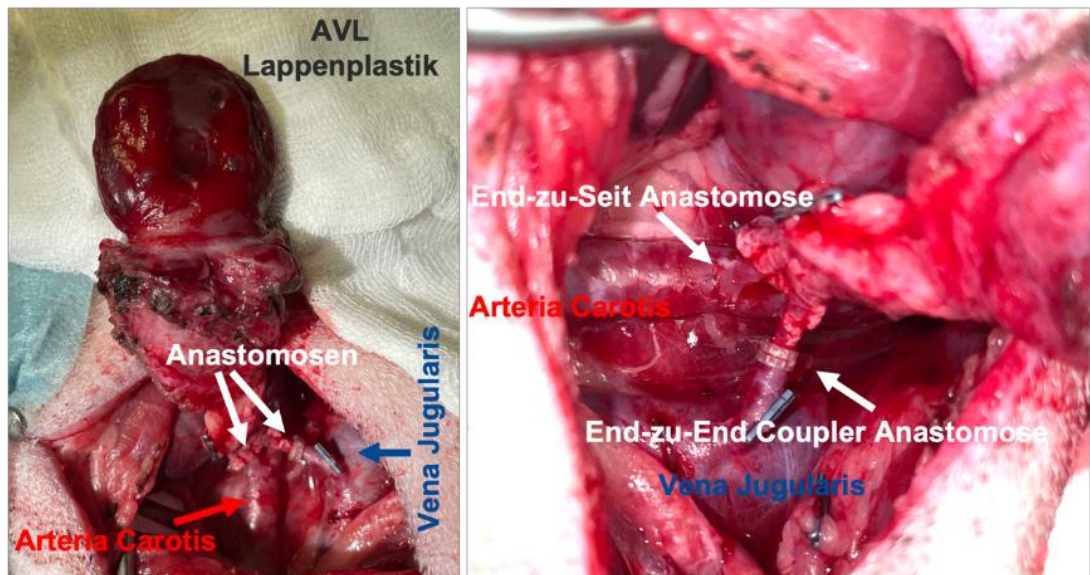


Abbildung 10: Die AV Loop Lappenplastik wurde mit einer End-zu-Seit Anastomose an die A. Carotis angeschlossen. Die venöse End-zu-End Anastomose wurde mit einem 2.0mm Gefäßcoupler durchgeführt.

Die freie AV Loop Lappenplastik wurde mit Fibrinkleber fixiert. Anschließend wurde eine kreisförmige Wunde von 30 mm Durchmesser erzeugt, indem die Haut und die darunter liegende Faszie an der ventralen Seite des Halses entfernt wurden (Abbildung 11). Schließlich wurde ein 0,3 mm Spalthauttransplantat vom Rücken des Schafs entnommen und auf die AV Loop Lappenplastik transplantiert. Das Hauttransplantat wurde unter Verwendung einer 5-0 Prolene-Laufnaht am Defekt befestigt. Die Defekte wurden mit Gaze, und medizinischem Fixomull-Stretchband abgedeckt.



Abbildung 11: Einpassen der AV Loop Lappenplastik in den ventralen Defekt am Hals des Schafes. Zusätzlich wurde Spalthaut auf die Lappenplastik transplantiert.

3.8 Wundkontrollen und Explantation der transplantierten AVL-Lappenplastiken

An den Tagen 2, 4, 7 und 10 nach Transplantation zur Defektrekonstruktion wurden fotografische Wunduntersuchungen durchgeführt. Am 10. Tag (insgesamt Tag 38) wurde durch einen seitlichen Halsschnitt die Karotisarterie und die Jugularvene proximal und distal des Lappenstiels freigelegt. Anschließend wurde die proximale Halsschlagader vor dem Lappenstiel kanüliert und mit Heparinlösung gespült, während die distale Halsschlagader ligiert wurde (Abbildung 12). Die In-vivo-Angiographie wurde mit einem Cios Alpha® High-Definition 2D Mobile C-Bogen durchgeführt, indem 10 ml Jopamiro 300 mg J/ml Kontrastmittel über den Karotiskatheter appliziert wurden. Anschließend wurden 30 ml Microfil MV-122-Lösung mit 5 % MV Curing Agent für Mikro-CT-Scans injiziert. Die Schafe (n = 4) wurden durch eine tödliche Injektion von Phenobarbital eingeschláfert. Die Kadaver wurden mehrere Stunden bei 4°C gekühlt, bis der AV Loop Lappenplastik und das umgebende Gewebe explantiert und in 4% PFA gelegt wurden.

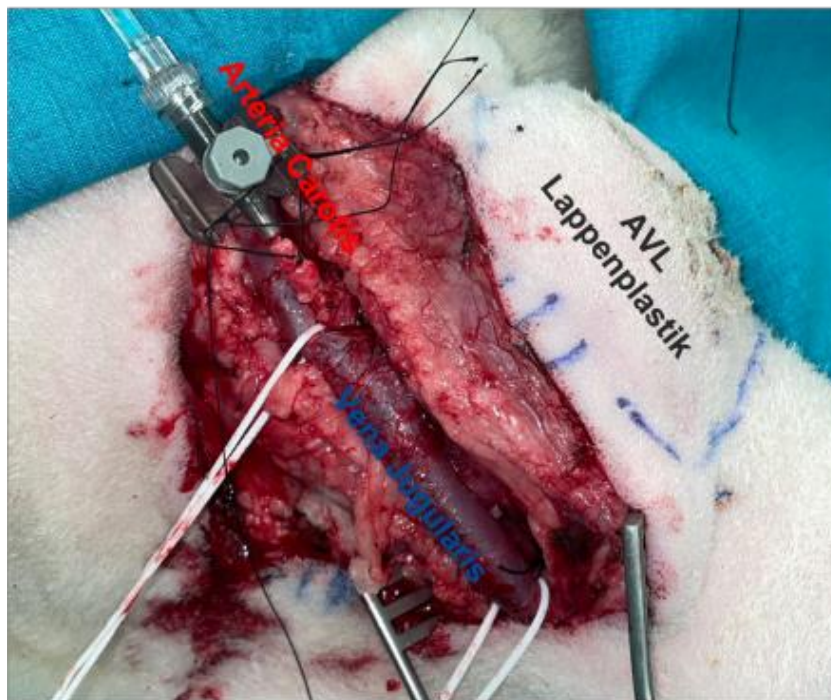


Abbildung 12: Die A. Carotis wurde bei der Explantation der AV Loop Lappenplastik katheterisiert. Über den intravasalen Katheter wurde das Kontrastmittel in die Lappenplastik appliziert.

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

4.1 Transplantation der AVL-Lappenplastiken zur freien Defektrekonstruktion

Alle Schafe haben die Operationen ohne Komplikationen überstanden und zeigten sowohl postoperativ als auch im Verlauf ein gutes Allgemeinbefinden. Die Tiere tolerierten die subkutan an der Oberschenkelinnenseite verpflanzte Teflonkammer problemlos. Ein negativer Einfluss auf das Gangbild der Tiere konnte nicht festgestellt werden. Eine AV Loop Bindegewebslappenplastik musste aufgrund einer Infektion der Isolationskammer am Tag 25 ausgeschlossen werden. Die Operationswunden waren in der Regel nach 7 Tagen abgeheilt, die einliegenden Drainagen konnten bei geringer Fördermenge zügig entfernt werden. Bei Explantation war die Kammer von einer Kapsel aus Bindegewebe überzogen. Die Darstellung des Gefäßstiels verlief bei den Tieren ohne Komplikationen. Bereits 4 Wochen nach Implantation zeigte sich eine *de novo* Gewebebildung innerhalb der Isolationskammer von klinisch relevanter Größe. Die Isolationskammer war vollständig mit Gewebe ausgekleidet (Abbildung 13). Alle AV Loop Konstrukte zeigten eine Gefäßdurchgängigkeit ohne das Auftreten einer Thrombose. Am Tag 28 war die Kammer im Mittel mit $9,1 \pm 0,34 \text{ cm}^3$ Gewebe befüllt (mittleres Gewicht $16,6 \pm 2,6 \text{ g}$). Das Gewebe der AVL-Lappenplastik zeigte damit eine zufriedenstellende Volumen-Retention (Schrumpfungs-Faktor ca. 10%) (Abbildung 13).

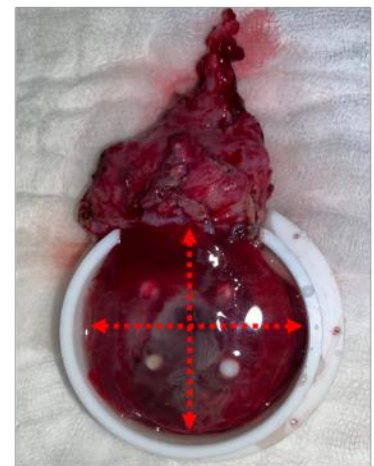
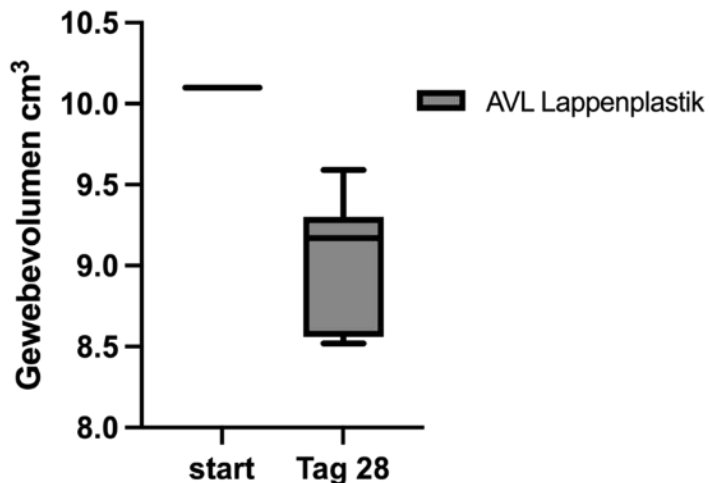


Abbildung 13: Der in vivo gezüchtete Bindegewebslappen kann mitsamt der Isolationskammer explantiert und als axial gestieltes Konstrukt geborgen werden. Das Balkendiagramm veranschaulicht noch einmal den geringen Schrumpfungs-Faktor.

4.2 Durchblutung der AVL-Konstrukte

Bereits 4 Wochen nach Implantation wurde im μ CT-Scan eine starke Neovaskularisation beobachtet, die senkrecht aus dem AVL entstand. Ausgehend, vom AVL war über die gesamte

Gefäßachse ein gleichmäßiges Auswachsen kleiner Gefäße erkennbar. Die mittlere Gefäßanzahl in Bezug auf die Distanz zum Hauptgefäß zeigte in Hämotoxylin-Eosin Schnitt eine homogene Durchblutung der AVL-Lappenplastik bis in die Peripherie (Abbildung 14).

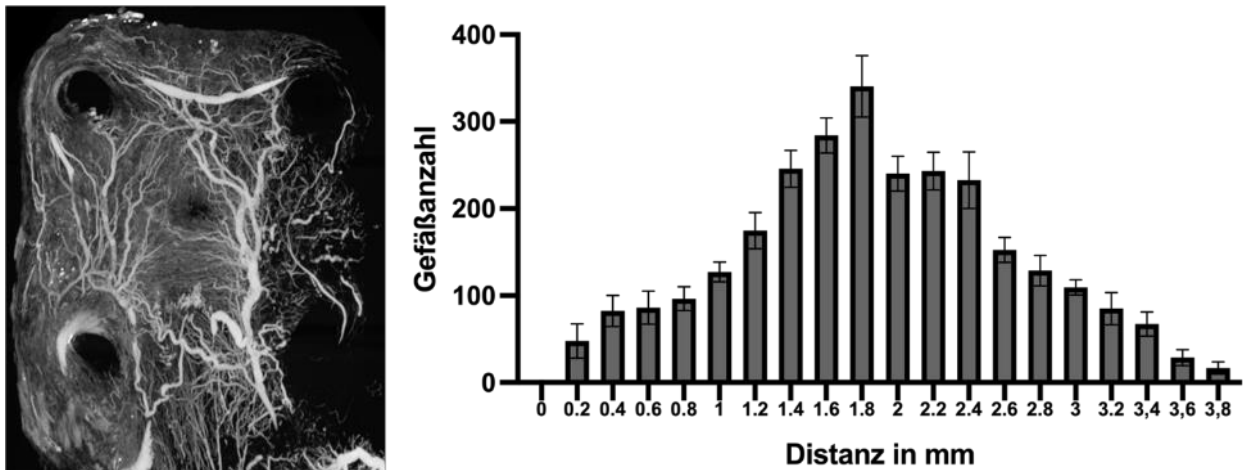


Abbildung 14: 3D-Rekonstruktion der AVL assoziierten Neovaskularisation mittels μ CT. Das Balkendiagramm zeigt die absolute Gefäßanzahl (y-Achse) in Relation zur Distanz vom Hauptgefäß in μ m (x-Achse).

Histomorphologisch war nach 28 Tagen das MatriDerm[®] vollständig degradiert und bis in die Peripherie in kollagenöses Bindegewebe umgebaut und ebenso gleichmäßig vaskularisiert. Es konnten Fibroblasten, Makrophagen und auch Erythrozyten identifiziert werden (Abbildung 15). Ausgehend vom AVL war in allen Konstrukten eine deutliche Bildung von Gefäßen detektierbar.

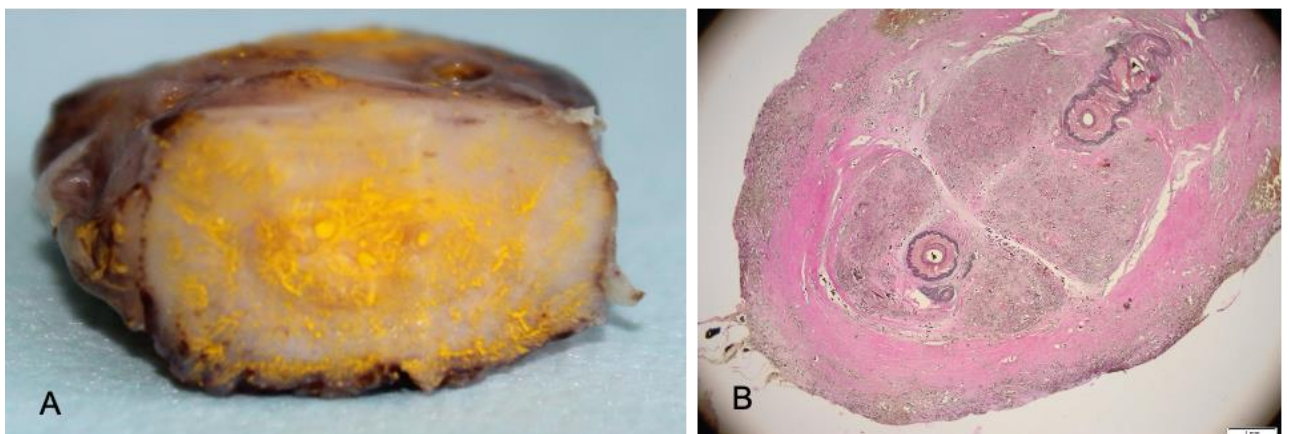


Abbildung 15: Das mit Microfil (gelb) perfundierte Konstrukt (A) zeigt in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung, dass die Neovaskularisation und die Umbauprozesse von der direkten Umgebung des AVLs aus voranschreiten, wobei auch die peripheren Anteile erreicht werden.

Die ki67 Färbung bestätigte als Surrogat-Marker eine ausgeprägte Zell-Proliferation im AV Loop Konstrukt. Anhand 16 „high-power fields“ wurden Ki-67 positive Zellen quantifiziert, jeweils 8 „high-power fields“ im Zentrum und 8 „high-power fields“ in der Peripherie. Es zeigte sich eine etwa gleiche Anzahl proliferierender Zellen im Zentrum und der Peripherie der Konstrukte (Boxplot-Diagramm) (Abbildung 16).

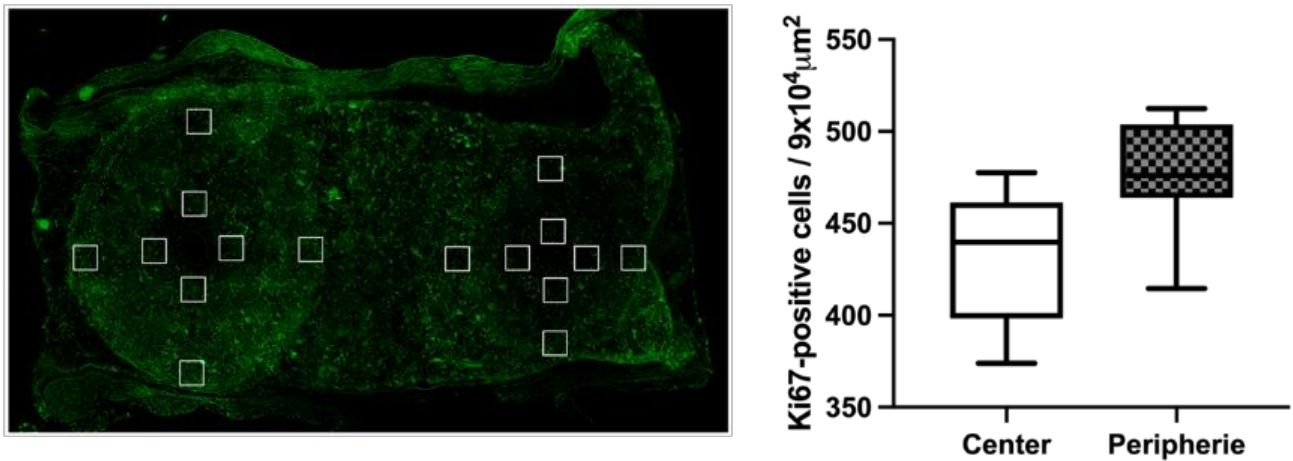


Abbildung 16: Proliferierende Zellen wurde mit ki67 angefärbt. Das Boxplot Diagramm zeigte eine etwa gleiche Verteilung von proliferierenden Zellen im Zentrum und der Peripherie.

Immunhistochemisch zeigte sich an der Oberfläche der Gefäßlumina eine positive Färbung für CD31. Dadurch konnte eindeutig eine suffiziente Endothelauskleidung der neu gebildeten Gefäße nachgewiesen werden (Abbildung 17A). Die Vaskularisation wurde in Konstrukten immunhistochemisch mit dem Endothelzellmarker von Willebrand-Faktor (vWF) (Abbildung 17B) sichtbar gemacht.

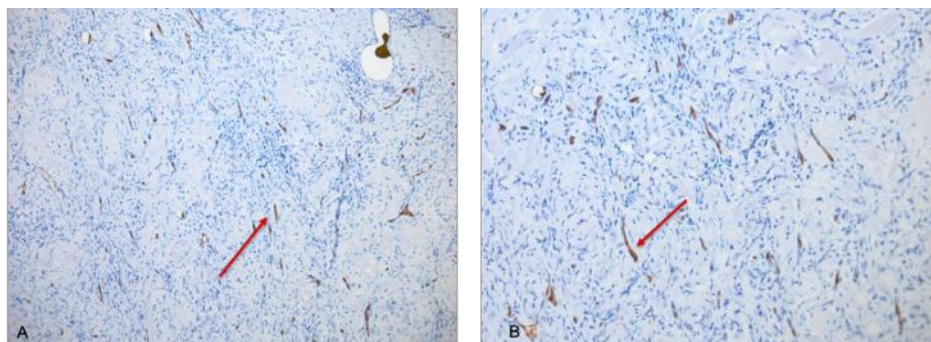


Abbildung 17: Die CD31 Färbung zeigte eine Endothelauskleidung neu gebildeter Gefäße (A), die Anfärbung des vWF dient als Marker für die Vaskularisation (B).

4.3 Ergebnisse der Gen-Expression mittels PCR

Die Ergebnisse der PCRs zeigen eine deutliche Hochregulation pro-angiogener messenger RNAs (IL6, HIF1A, HMOX1, VEGFA, Cx43). Interessanterweise zeigten sich im Vergleich zu AV Loop Proben aus Patienten (Henn D et al. 2018, „Micro-RNA-Regulated Proangiogenic Signaling in Arteriovenous Loops in Patients with Combined Vascular and Soft-Tissue Reconstructions“) fast übereinstimmende mRNA-Expressionsmuster pro-angiogener Gene. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 gegenübergestellt.

mRNA	qRT – PCR AVL <u>Schaf</u>			qRT – PCR AVL <u>Human</u>		
	Fold-Change	p	Regulation	Fold-Change	p	Regulation
IL1B	-20.1	0.07	Down	1.5	0.11	up
IL6	8.2	0.03	Up	1.6	0.06	Up
HIF1A	2.1	0.10	Up	1.3	0.03	Up
HMOX1	38.3	0.01	Up	2.4	0.04	Up
VEGFA	51.8	0.04	Up	1.8	0.01	Up
CX43	1.9	0.08	Up	2.2	0.006	Up
FHL1	-1000	0.01	Down	-2.0	0.01	Down

Abbildung 18: Die Tabelle stellt noch einmal die Ergebnisse der mRNA-Expression gemessen mit der PCR im Schaf den Patientendaten gegenüber.

4.4 Ergebnisse Dynamisch Mechanische Analyse

Das Schafsgewebe benötigt einen deutlich höheren Kompressionsdruck von 6033 ± 844 Pa als das humane Gewebe (1633 ± 177 Pa) und ist damit deutlich fester. Die Werte spiegeln taktilen und optischen Eindruck der Proben wider (Abbildung 19).

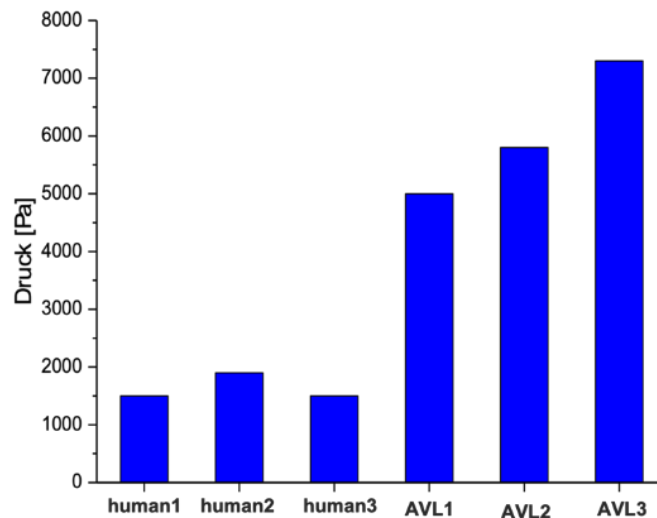


Abbildung 19: Das Balkendiagramm veranschaulicht noch einmal die Unterschiede im Kompressionsdruck zwischen den AVL-Lappenplastiken und den fasziokutanen Lappenplastiken der Patienten.

4.5 Erfolgreiche Transplantation der AVL-Lappenplastik

Die postoperativen Wundkontrollen am Tag 2, 4, 7 und 10 nach Transplantation zeigten einen regelrechten Verlauf (Abbildung 20).



Abbildung 20: Die AVL-Lappenplastiken zeigen klinisch einen regelrechten Einheilungsverlauf.

Die Angiographie 10 Tage nach Transplantation zeigte eine regelrechte Perfusion aller AVL-Lappenplastiken mit arteriellem Zufluss über die A. Carotis interna und venösem Abfluss über die V. Jugularis (Abbildung 21).



Abbildung 21: Die AV Loop Lappenplastik zeigte 10 Tage nach Transplantation *in vivo* eine regelrechte Perfusion nach Kontrastmittelgabe über die A. Carotis interna.

10 Tage nach Transplantation zeigte die AV Loop Lappenplastik sowohl im μ CT als auch im makroskopisch ein Einwachsen bzw. eine Integration in das umliegende Gewebe (Abbildung 22).

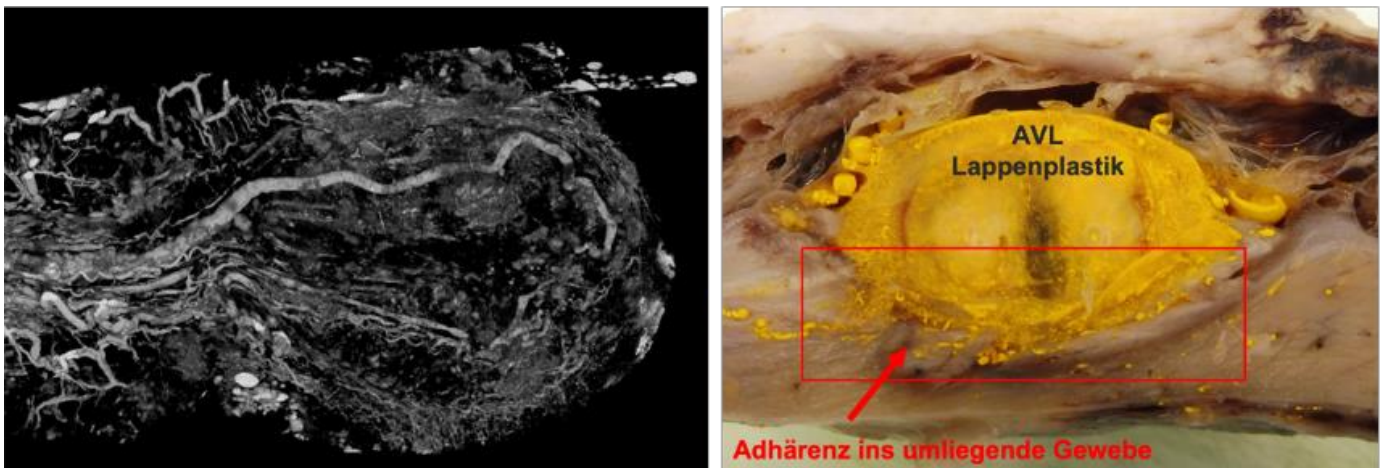


Abbildung 22: Sowohl im μ CT als auch makroskopisch konnte ein eindeutiges Anwachsen der AV Loop Lappenplastik in das umliegende Gewebe am Hals nachgewiesen werden.

Hämotoxylin-Eosin gefärbte histologisch Schnitte zeigten am Tag 10 Tage eindeutiges Einwachsen der AV Loop Lappenplastik in das umliegende Gewebe und damit eine sichere Integration an den Grenzzonen. Die Gefäße stellen sich histologisch schwarz/grau dar (Abbildung 23).

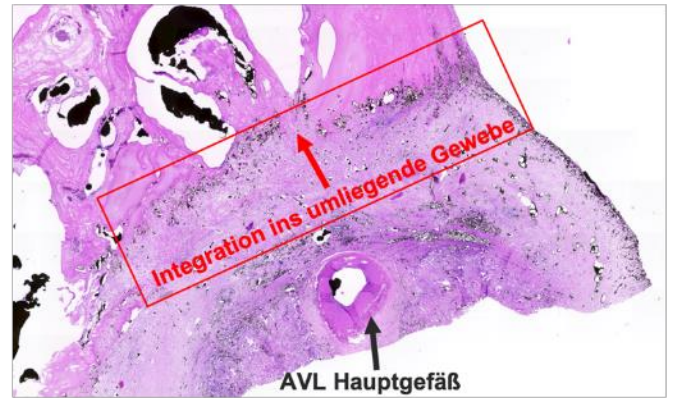
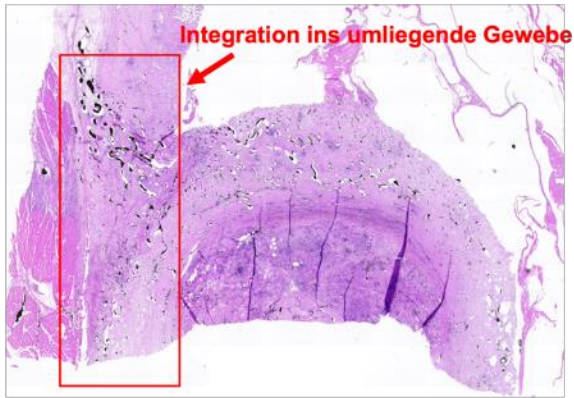
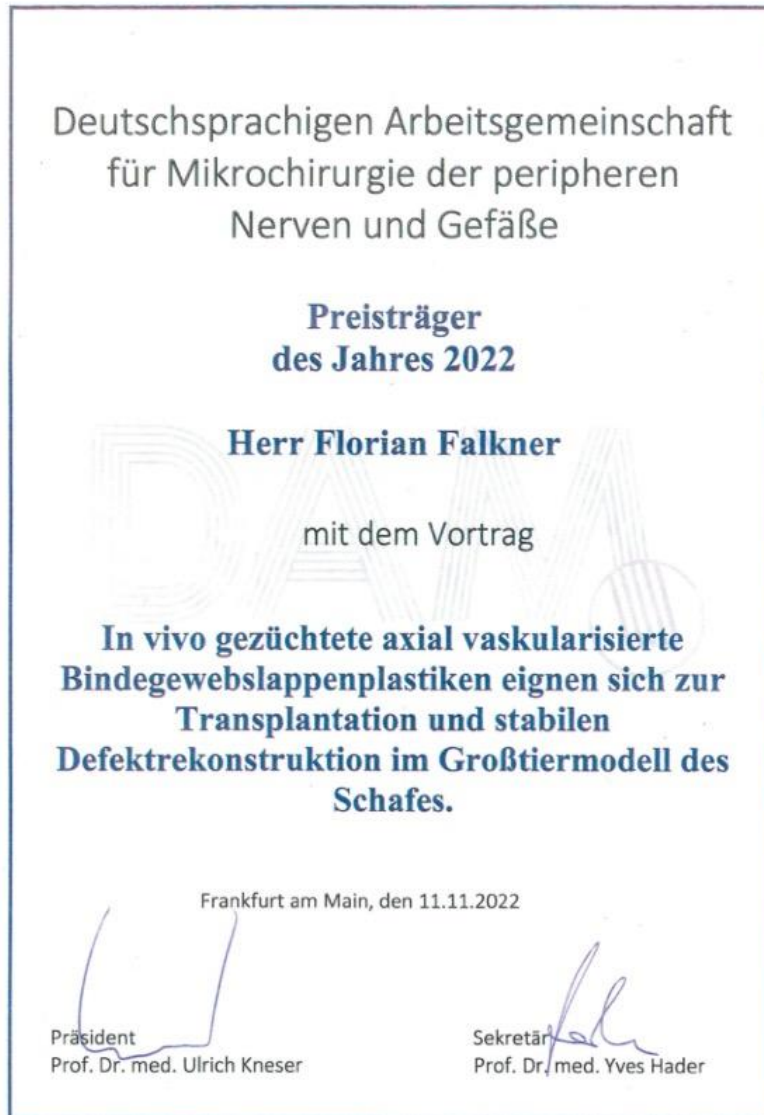


Abbildung 23: Hämotoxylin-Eosin gefärbte histologisch Schnitte bestätigten die Integration der transplantierten AV Loop Lappenplastiken in das umliegende Halsgewebe.

4.6 Kongressbeiträge

- 19.02.2022 DAM (Deutschsprachige Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie) – Wissenschaftsakademie („In vivo gezüchtete axial vaskularisierte Bindegewebslappenplastiken eignen sich zur Transplantation und stabilen Defektrekonstruktion im Großtiermodell des Schafes“)
- 22.10.2022 Chirurgische Forschungstage Freiburg („In vivo gezüchtete axial vaskularisierte Bindegewebslappenplastiken eignen sich zur Transplantation und stabilen Defektrekonstruktion im Großtiermodell des Schafes“)
- 10.11.2022 DAM – Frankfurt („In vivo gezüchtete axial vaskularisierte Bindegewebslappenplastiken eignen sich zur Transplantation und stabilen Defektrekonstruktion im Großtiermodell des Schafes“)

4.7 Vortragspreis



4.8 Publikationen

“*In vivo* generated axially vascularized soft tissue flaps are suitable for transplantation and stable closure of complex defects in a large animal model” – Submission in progress for Journal of Plastic and Reconstructive Surgery (PRS – Impact Factor 5.2)

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

Während der Projektlaufzeiten wurden keine relevanten Publikationen von Dritten zur übergeordneten Forschungsthematik „Züchtung und Transplantation von autologen Gewebetransplantaten im Großtier“ von Dritten veröffentlicht.

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

Mit den Ergebnissen des Forschungsvorhabens konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die AVL-Lappenplastik als Operationsmethode in einem menschenähnlichen Organismus zur freien Transplantation und Defektrekonstruktion eingesetzt werden kann, bei gleichzeitig minimaler Hebedefektmorbidität. Außerdem konnten wertvolle Erkenntnisse über Vaskularisationskinetik und die elastomechanischen Eigenschaften gewonnen werden. Auf molekularbiologischer Ebene konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zum Menschen ähnliche pro-angiogene mRNAs die Vaskularisation der AVL-Lappenplastik regulieren und beeinflussen. Der Forschungszweck bzw. das Forschungsziel konnte somit erreicht werden. Die AVL-Lappenplastik kann damit als Operationstechnik zur Defektrekonstruktion unter strenger Indikation auch bei Patientinnen und Patienten angewendet werden. Aus klinischer Hinsicht bietet uns die Methode der AVL-Lappenplastik die Möglichkeit, innerhalb von 28 Tagen axial vaskularisierte Bindegewebslappenplastiken mit klinisch relevanten Gewebevolumina zu erzeugen. Dies ist von großer Relevanz für die Praxis. Theoretisch könnte die AVL-Lappenplastik defektnah gezüchtet werden und eignet sich beispielsweise für die gestielte Rekonstruktion von Haut-Weichteildefekten am Handrücken. Alternativ könnte die AVL-Lappenplastik auch defektfremd angelegt werden und als freie Lappenplastik zur Defektrekonstruktion eingesetzt werden, sollten keine geeigneten Spenderstellen zur freien Defektrekonstruktion zur Verfügung stehen oder die Hebedefektmorbidität zu groß sein. Es gibt jedoch auch einige Limitationen und Aspekte, die in Zukunft weiter erforscht werden müssen, um die Technik weiter zu optimieren. Diese wäre wie folgt.

- (1) Gibt es Möglichkeiten das Züchtungs- bzw. Vaskularisationsintervall der AVL-Lappenplastik zu verkürzen, um den Prozess zu beschleunigen.

- (2) Es wäre zudem von großer Relevanz zu untersuchen, wie groß eine AVL-Lappenplastik maximal gezüchtet werden kann.
- (3) Die Teflon Isolationskammer sind insgesamt sehr starr. Hier kämen gegebenenfalls flexiblere / gewebeverträglichere Materialien in Frage.
- (4) Verbesserung der elastomechanischen Eigenschaften der AVL-Lappenplastik. Hierzu müsste man verschiedene Matrizen zur Züchtung der AVL-Lappenplastik vergleichen.

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Die Ergebnisse des vorliegenden Forschungsvorhabens haben die Möglichkeit der Züchtung von autologen Lappenplastiken ohne Hebedefektmorbidität einen sehr großen Schritt vorangebracht. Folgende Publikation ist geplant:

“In vivo generated axially vascularized soft tissue flaps are suitable for transplantation and stable closure of complex defects in a large animal model” – Submission in progress for Journal of Plastic and Reconstructive Surgery (PRS – Impact Factor 5.2)

8. Anhang/Anhänge

Bei Forschungsk Kooperationen ist das ausgefüllte und unterschriebene Formblatt „Erklärung für das Berichtswesen in Kooperationsprojekten“ beifügen.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens gab es keine Forschungsk Kooperationen.

9. Unterschriften Projektleiter

Ludwigshafen, 13.07.2023

Ort, Datum



.....

Unterschrift Forschungsleiter Prof. Dr. Kneser

In Vertretung Dr. med. Falkner

Ludwigshafen, 13.07.2023

Ort, Datum



.....

Unterschrift Dr. med. Falkner