

Abschlussbericht zum Projekt

**Technologien zur Herstellung von
cutanen Mikrogewebepartikeln zur Behandlung
großflächiger thermischer Verletzungen**

Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena



1 Allgemeine Angaben

Titel:

Technologien zur Herstellung von cutanen Mikrogewebspartikeln zur Behandlung großflächiger thermischer Verletzungen

Kurztitel:

Cutane Mikrogewebspartikel

Vorhabenskennzeichen:

412.02-FR-0211

Laufzeit des Vorhabens:

17 Monate

Beginn der Förderung: 01.11.2012

Ende der Förderung: 30.04.2014

Berichtszeitraum:

01.11.2012 - 30.04.2014

Vorhabensziele:

Ziel des Projektes ist die Verbesserung der Behandlung von Schwerbrandverletzten durch die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Generierung autologer Transplantate mit maximaler Flächenvergrößerung durch die Anwendung von Mikrogewebspartikeln. Der verfolgte Lösungsansatz soll die Erzielung hoher Expansionsraten von autologer Spalthaut zur Deckung großflächiger Defekte unter Einsatz kleinster unverletzter Hautflächen ermöglichen und gleichzeitig einen schnellen Heilungsprozess mit guten funktionellen und ästhetischen Ergebnissen gewährleisten.

Im Forschungsvorhaben sollen folgende zwei Teilziele erarbeitet werden:

- Untersuchung der die Wundheilung beeinflussenden Parameter der Partikelgröße und Lage in In-vivo-Versuchen
 - Entwicklung eines Technologiekonzeptes zur Herstellung und Transplantation von Mikrogewebspartikeln.
-

2 Problemstellung

Jährlich werden in Deutschland etwa 15.000 Patienten mit thermischen Verletzungen stationär behandelt, davon etwa 1.400 Fälle mit schweren und schwersten Verbrennungen intensivmedizinisch in spezialisierten Verbrennungszentren. Obwohl die Überlebenschancen auch von Patienten mit schwersten thermischen Verletzungen (80-90% verbrannte Körperoberfläche, vKOF) in den letzten Jahrzehnten deutlich erhöht werden konnte, liegt die Sterblichkeitsrate noch immer bei ca. 20%. [Hartmann et al. 2009], [Pallua et al. 2006]

Die chirurgische Standardtherapie zur Behandlung thermischer Verletzungen der Grade IIb und III besteht in der Entfernung der irreversibel geschädigten Haut (Nekrosektomie) und der sofortigen, permanenten Deckung der Wundflächen durch körpereigene (autologe) Haut. Studien haben gezeigt, dass eine frühzeitige Nekrosektomie die Überlebensrate Schwerbrandverletzter signifikant steigert [Burke et al. 1974]. Da bei großflächigen thermischen Verletzungen jedoch keine ausreichend großen Spenderareale zur Gewinnung autologer Transplantate zur Verfügung stehen, kommen andere kostenintensive und weniger effektive Verfahren des Hautersatzes zum Einsatz. Dabei handelt es sich um verschiedene synthetische oder biologische temporäre Hautersatzmaterialien sowie gezüchtete autologe Keratinozytentransplantate. Keines der angewandten Verfahren ist jedoch derzeit in der Lage, eine dauerhafte Wiederherstellung der normalen Funktion der Haut zu ermöglichen. Das Problem der frühestmöglichen, dauerhaften Deckung kann trotz intensiver Forschungen auf dem Gebiet des Tissue Engineering bisher nur durch autologe Spalthaut sicher gelöst werden [Vogt et al. 2007].

Ziel des Projektes ist daher die Verbesserung der Behandlung von Schwerbrandverletzten durch die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Generierung autologer Transplantate mit maximaler Flächenvergrößerung durch die Anwendung von Mikrogewebspartikeln.

3 Forschungszweck/ -ziel

Im mathematischen Ansatz des Meek-Verfahrens zeigt sich, dass eine Erhöhung der Expansionsrate bei gleichbleibenden oder verringerten Partikelabständen nur durch eine Reduzierung der Partikelgröße möglich ist. Beispielsweise kann ausgehend von den bisherigen Transplantatabständen des Meek-Verfahrens bei einer Expansionsrate von 1:4 durch eine Reduzierung der Partikelgröße auf 1 x 1 mm bei annähernd gleichbleibendem Partikelabstand die Expansionsrate theoretisch auf 1:15, bei einer Partikelgröße von 0,5 x 0,5 mm sogar auf 1:50, erhöht werden (Abbildung 1). Umgekehrt reduziert sich unter Beibehaltung der Expansionsrate von 1:4 durch eine Verkleinerung der Partikel auf 1 x 1 mm der bisherige Partikelabstand um ca. 60%.

Abhängigkeit des Transplantatabstandes von der Größe der Partikel sowie deren Expansionsrate

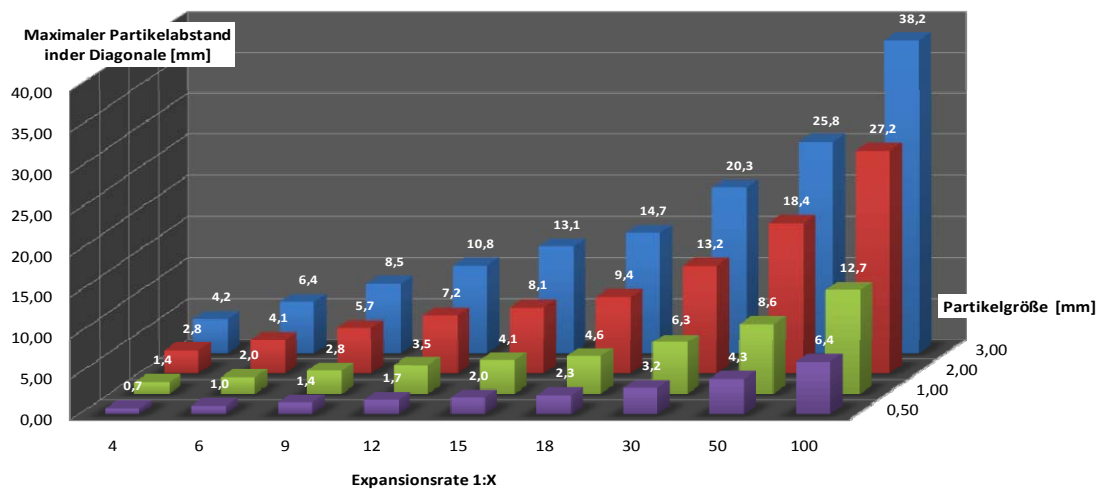


Abbildung 1: Abhängigkeit des Transplantatabstandes von Partikelgröße und Expansionsrate

Ziel des Projektes ist daher die Entwicklung von Technologien zur Herstellung und Transplantation von sogenannten „Mikrogewebspartikeln“ aus autologer Spalthaut zur frühzeitigen, permanenten Wunddeckung von Schwerbrandverletzten. Es wird davon ausgegangen, dass sich mit diesem Szenario des Einsatzes von „Mikrogewebspartikeln“ sehr gute medizinische Ergebnisse mit schnellen Heilungsraten und verringerter Narbenbildung erzielen lassen. Der verfolgte Lösungsansatz soll

- die Erzielung hoher Expansionsraten von autologer Spalthaut zur Deckung großflächiger Defekte unter Einsatz kleinster unverletzter Hautflächen ermöglichen und
- gleichzeitig einen schnellen Heilungsprozess mit guten funktionellen und ästhetischen Ergebnissen gewährleisten.

Ausgehend vom beschriebenen mathematischen Modell (Abbildung 1) beruht der Lösungsansatz auf der Annahme einer schnelleren Wundheilung durch eine Verringerung der zu verwachsenden Partikelabstände. Dies impliziert eine verringerte Narbenbildung. Die klinische Bedeutung besteht in der Verbesserung der Behandlung von Schwerbrandverletzten durch

- die Erhöhung der Überlebenschancen,
- die Verbesserung der Transplantatergebnisse (funktionell und ästhetisch) mit resultierender Erhöhung der Lebensqualität und schnellerer Wiedereingliederung
- die Verringerung der Behandlungskosten u.a. durch Verringerung der Aufenthaltsdauer im Krankenhaus, Reduzierung notwendiger Folgeoperationen und Folgekosten (Renten und Lohnersatzkosten)

Unter sozioökonomischen Gesichtspunkten bietet das Vorhaben ein erhebliches Kostendegressionspotential. Sanchez et al. belegen in ihrer Studie aus dem Jahr 2003, dass der Anteil der indirekten Kosten, d.h. Produktivitätsverluste durch vorübergehende oder dauerhafte

Arbeitsunfähigkeit, Invalidität und vorzeitige Sterblichkeit in Folge von Verbrennungsverletzungen, bis zu 80% der gesamten Kosten betragen, wobei Pflegekosten und Kosten der medizinischen Versorgung mit jeweils rund 10% ausgeglichen sind. Die Behandlungskosten für großflächig thermisch verletzte Patienten sind dabei sehr hoch. Ein 2-jähriger Patient mit 70 % vKOF wurde 115 Tage im Verbrennungszentrum der Klinik für Kinderchirurgie der MLU Halle behandelt und hat der Krankenkasse Kosten in Höhe von 370.550 Euro verursacht. Dabei ist bekannt, dass die Behandlungskosten nur 19 % ausmachen. Bei dem Hauptanteil von 81% handelt es sich um Folgekosten (Renten, Lohnersatz).

Im Forschungsvorhaben sollen folgende zwei Teilziele erarbeitet werden:

- Untersuchung der die Wundheilung beeinflussenden Parameter der Partikelgröße und Lage sowie Expansion in In-vivo-Versuchen
- Entwicklung eines Technologiekonzeptes zur Herstellung und Transplantation von Mikrogewebspartikeln.

4 Methodik mit schematischer Darstellung der geplanten und tatsächlichen Arbeits- und Zeitabläufe

Die Aufgabenstellung erfordert die Durchführung der notwendigen Arbeiten im Rahmen von zwei Arbeitsschwerpunkten, deren Ergebnisse aufeinander aufbauen und parallel sowie iterativ ablaufen:

- Untersuchung der die Wundheilung beeinflussenden Parameter der Partikelgröße und Lage sowie Expansion in In-vivo-Versuchen
- Entwicklung eines Technologiekonzeptes zur Herstellung und Transplantation von Mikrogewebspartikeln.

Die Erarbeitung eines Konzeptes unter der Zielstellung einer bestmöglichen Wundheilung ist abhängig von der geforderten Lage und der herzustellenden, medizinisch minimalen sinnvollen Partikelgröße sowie der daraus erreichbaren Wundheilungsdauer in Abhängigkeit von der Expansion. Zu beiden Parametern gibt es in der Literatur differenzierende Aussagen, so dass keine konkrete Anforderung für die Entwicklung einer Technologie erfasst bzw. aus Vorversuchen gewonnen werden konnte.

Zur Ermittlung dieser grundlegenden Anforderungen wurden entsprechende in-vivo-Versuchsreihen geplant und durchgeführt. Ziel ist die Erfassung des Zusammenhangs bzw. der Abhängigkeit von Partikelgröße, Partikellage, Expansion und Wundheilungsdauer, um das optimale Transplantatszenario und damit wesentliche Eingangsgrößen für eine anforderungsgerechte Konzeption zu definieren. Insbesondere der Einfluss auf die gewünschten funktionellen und ästhetischen Eigenschaften sowie die Dauer der Wundheilung sind zu prüfen.

Parallel zu den Tierversuchen erfolgt eine Untersuchung verschiedener Lösungsansätze zur Herstellung und Expansion von Mikrogewebspartikeln. Auf Basis der in den Tierversuchen ermittelten medizinischen Anforderungen kann eine Bewertung und Auswahl der bestehenden Lösungsideen hinsichtlich der Zielerreichung einer bestmöglichen Wundheilung erfolgen und

zielgerichtet ein technologisches Lösungskonzept erarbeitet werden. Gesamtziel ist die Erarbeitung einer technologisch-medizinischen Grundlage zur Auskonstruktion eines technischen Systems für den klinischen OP-Einsatz.

Im Rahmen der Projektlaufzeit wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Forschungsarbeiten durchgeführt.

Tabelle 1: Tätigkeiten während des Berichtszeitraumes

Nr.	Tätigkeit	geplanter Aufwand	tatsächlicher Aufwand
AS1	Entwicklung und Aufbau eines technischen Systems zur Durchführung von Tierversuchen	2 MM	2,5 MM
AS2	Vorbereitung der Tierversuche Ablauf- und Zeitplanung der Einzelversuche über die Versuchsdauer, Erarbeitung der notwendigen Protokolle, Planung und Beschaffung/ Sterilisation der benötigten Versuchsmaterialien bzw. Aufbereitung für Folgeversuche	1,5 MM	1,5 MM
AS3	Durchführung der Tierversuche im Umfang einer Versuchsreihe von 12 Tieren beinhaltet Zufügen der Verbrennungen, Transplantation, Wundbegutachtung entsprechend Zeitplan	5,5 MM	6,5 MM
AS4	Auswertung der Tierversuche	1 MM	
AS5	Durchführung von technischen Vorversuchen sowie Detailrecherche zu technischen Lösungsmöglichkeiten für die Konzepterarbeitung	4 MM	3,5 MM

5 Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Für die Herstellung der Mikrogewebspartikeltransplantate wurde ein vollautomatisches System (Abbildung 2) entwickelt, welches die automatisierte und reproduzierbare Herstellung von Transplantaten verschiedener Partikelgrößen sowie vollkommen beliebiger Expansionen bzw. Abstandsmuster der Partikel im Labormaßstab im operativen Umfeld erlaubt. Die Herstellung der Partikel erfolgt durch mechanisches Schneiden mittels Stanzwerkzeugen verschiedener Größen. Dies ermöglicht die Herstellung definierter Einzelpartikel. Der Gesamtprozess ist so ausgelegt, dass ein Vergleich zur bisher angewandten Meek-Technik möglich ist.



Abbildung 2: Versuchsaufbau Stanzvorrichtung mit separatem Steuerungskasten und Bedienpanel zur Anwahl der programmierten Versuchsmuster

Die geplante Tierversuchsreihe wurde nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt (Reg.Nr. 15-001/12).

Im Berichtszeitraum wurde eine Versuchsreihe mit 12 Schweinen (Deutsche Landrasse) am Institut für Versuchstierkunde und Tierschutz in Jena durchgeführt. Alle Tiere waren weiblichen Geschlechts. Die Tiere besaßen ein durchschnittliches Alter von 97 Tagen mit einem Anfangsgewicht von ca. 32 kg und einer Rückenlänge von ca. 75 cm. Die gewählte Tiergröße orientierte sich an der benötigten Rückenlänge zur Platzierung aller Versuchsfelder sowie dem Aspekt des Handlings bei geschätztem Wachstum über 4 Wochen Versuchsdauer.

Der Versuchsablauf mit entsprechender Dokumentation kann Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: Versuchsablauf und Dokumentation

Tag	Tätigkeit	Dokumentation
Tag -2	Verbrennungsverletzung	Blutprobe Fotodokumentation
Tag 0	Transplantation der Versuchsfelder entsprechend Belegungsplan	Blutprobe Wundabstrich Biopsie der Nekrosefelder Transplantatproben Fotodokumentation
Tag 7	1. Wundkontrolle (Verbandswechsel)	Blutprobe Wundabstrich Fotodokumentation
Tag 14	2. Wundkontrolle (Verbandswechsel)	Blutprobe Wundabstrich Fotodokumentation
Tag 21	3. Wundkontrolle (Verbandswechsel)	Blutprobe Wundabstrich Fotodokumentation

Tag	Tätigkeit	Dokumentation
Tag 28	4. Wundkontrolle (Verbandswechsel)	Blutprobe Wundabstrich Biopsie der Versuchsfelder Biopsie der ungeschädigten Haut und der Spalthautentnahmestellen Fotodokumentation
Bei Notwendigkeit	Verbandswechsel einschließlich Wundkontrolle	Blutprobe Wundabstrich Fotodokumentation
Bei Notwendigkeit	Versuchsabbruch/ Tötung des Tieres mit abschließender Wundkontrolle	Blutprobe Wundabstrich Biopsie der Versuchsfelder (je vom Randbereich und direkt im Feld, sowie Auffälligkeiten) Biopsie der gesunden Haut und der Spalthautentnahmestellen Fotodokumentation

Die Dauer des Versuches von 4 Wochen postoperativ entspricht der ungefähren Dauer des Wundheilungsprozesses bis zur abgeschlossenen Narbenausbildung.

Das Einzelversuchsfeld wurde mit einer Größe von 50 mm x 50 mm gewählt. Die unbehandelt belassenen Kontrollfelder zeigen, dass ein Wundverschluss durch ausschließliche Epithelisierung vom Wundrand und Wundkontraktion innerhalb der vier Wochen nicht erfolgt.

Insgesamt wurden auf jedem Tier 10 Versuchsfelder einer Größe von 50 mm x 50 mm links und rechts entlang der Wirbelsäule platziert. Zuzüglich der entstehenden Wundflächen durch die Entnahme der zu transplantierenden Spalthaut kann so die Verletzungsfläche ausreichend gering gehalten werden, um systemische Auswirkungen zu vermeiden. Abbildung 4 zeigt ein Versuchstier mit entsprechender Anordnung der Wundfelder auf dem Versuchstier.

Ziel der in-vivo-Versuche war die Erfassung des Zusammenhangs bzw. der Abhängigkeit von Partikelgröße, Partikellage, Expansion und Wundheilungsdauer, um das optimale Transplantatszenario und damit wesentliche Eingangsgrößen für eine anforderungsgerechte Konzeption zu definieren. Insbesondere der Einfluss auf die gewünschten funktionellen und ästhetischen Eigenschaften sowie die Dauer der Wundheilung sind zu prüfen. Daher wurden bei der Belegung der Felder die Einflussgrößen

- Partikelgröße
- Partikellage und
- Expansion

systematisch variiert.

Auf Basis der obigen Fragestellungen wurden folgende, in Tabelle 3 dargestellten Parameterausprägungen zur Belegung gewählt.

Tabelle 3: Belegungsvarianten der expandierten Transplantationsversuchsfelder

Nr.	Expansion	Partikelgröße Drm.	diagonaler Abstand	Wundrandlänge
	1/x	mm	mm	mm
1	3,11	1	1,21	3216,99
2	2,92	3	3,43	1140,40
3	11,70	1	3,29	854,51
4	11,79	3	9,91	282,74

Aus der Kombination von Expansion und Partikelgröße können die in der Literatur als relevant diskutierten Faktoren des Abstandes (max. diagonal) und der Wundrandlänge berechnet werden. Die gewählte Variation der Belegungsparameter soll ermöglichen, den Einfluss einzelner sowie die Kombination mehrerer Parametergrößen wie folgt zu prüfen.

Die Wahl der angewandten Expansionen resultiert aus zwei Überlegungen. Um einen Vergleich zur bisherig angewandten MEEK-Methode zu ermöglichen, wurde zunächst die Expansion 1:3 gewählt. Die weiterhin gewählte Expansionsrate von 1:12 ermöglicht zunächst die Untersuchung der doppelten, heute häufig als Grenze für gute funktionelle und ästhetische Ergebnisse angesehenen Expansionsrate von 1:6. Sie erlaubt weiterhin im Vergleich nicht nur die Betrachtung des Einfluss des Expansionsfaktors an sich, sondern auch des Einflusses der resultierenden transplantierten Zellanzahl in Unabhängigkeit von Wundrandlänge und Abstand, wie im Folgenden erläutert.

Bei den Belegungen 1 zu 2 und 3 zu 4 wird jeweilig in gleicher Expansion jedoch bei unterschiedlicher Partikelgröße transplantiert. Bei den Belegungen 1 zu 3 und 2 zu 4 erfolgt eine Transplantation bei gleicher Partikelgröße und unterschiedlicher Expansion. Mit diesen vier Versuchsgruppen kann der zusammenhängende Einfluss von Partikelabstand und Wundrandlänge sowie die generelle Aussage zum Einfluss der Expansion in Kombination mit der Variation der Lage geprüft werden. Aufgrund des mathematischen Zusammenhanges von Wundrandlänge und Partikelabstand ist es jedoch nicht möglich, den jeweiligen Einfluss dieser beiden Variablen auf Differenzen bei der Wundheilung getrennt zu betrachten und die Effektstärke zu ermitteln.

Eine weitere Betrachtung ergibt sich aus den Belegungen 2 zu 3. Bei unterschiedlicher Partikelgröße und unterschiedlicher Expansion besitzen diese Belegungen ähnliche diagonale Abstände und Wundrandlängen. Ein Vergleich kann also erstmalig einen Rückschluss auf die Aussage erlauben, ob die Anzahl der transplantierten Zellen (Einfluss Expansion) oder die

tatsächlich an der Wundheilung aktiv beteiligten Zellen (Einfluss Wundrandlänge) ausschlaggebend sind.

Alle Belegungsvariationen aus Partikelgröße und Expansion werden sowohl in der Partikella-ge richtig herum (dermale Seite zum Wundgrund) als auch verkehrt herum (epidermale Seite zum Wundgrund, epidermal down) untersucht. Dies ermöglicht die gezielte Untersuchung entsprechender Unterschiede im Epithelisierungsvermögen. Alle bisherigen Arbeiten zur Untersuchung von Mikrogewebspartikeln basieren auf einer zufälligen Lage der Mikrogewebspartikel, wodurch Aussagen zum Verhalten bzw. zum Epithelisierungsvermögen von Partikel in verkehrter Lage nicht getroffen werden können, da diese nur anteilig im Transplantat vorhanden sind und ihr Anteil an der Wundepithelisierung nicht von Partikeln in korrekter Lage differenziert werden kann.

Weiterhin werden zwei Kontrollfelder genutzt. Zur Prüfung des generellen Wundheilungsvermögens des Tieres erfolgt auf einem Feld die Transplantation von Spalthaut. Ein Nekrosefeld dient weiterhin der Kontrolle der wirkenden Wundheilungsmechanismen der Randepithelisierung und Wundkontraktion. Eine unvollständige Heilung bis zum Versuchsende zeigt, dass die zeitige Wundheilung auf die Behandlung durch Transplantation zurückgeführt werden kann.

Damit ergeben sich die in Tabelle 4 dargestellten Belegungsvariationen auf 10 Versuchsfeldern.

Tabelle 4: Übersicht der Belegungsvarianten

Nr.	Transplantatform	Expansion	Lage	Kurzbezeichnung
1	Partikel Ø 3 mm	3:1	dermal down	PG3/E3/r
2	Partikel Ø 3 mm	12:1	dermal down	PG3/E12/r
3	Partikel Ø 1 mm	3:1	dermal down	PG1/E3/r
4	Partikel Ø 1 mm	12:1	dermal down	PG1/E12/r
5	Partikel Ø 3 mm	3:1	epidermal down	PG3/E3/v
6	Partikel Ø 3 mm	12:1	epidermal down	PG3/E12/v
7	Partikel Ø 1 mm	3:1	epidermal down	PG1/E3/v
8	Partikel Ø 1 mm	12:1	epidermal down	PG3/E12/v
9	Spalthaut	1	dermal down	SH
10	Nekrose	-	-	N

Abbildung 3 zeigt beispielhaft zwei Transplantate gleicher Expansion mit verschiedenen Partikelgrößen.

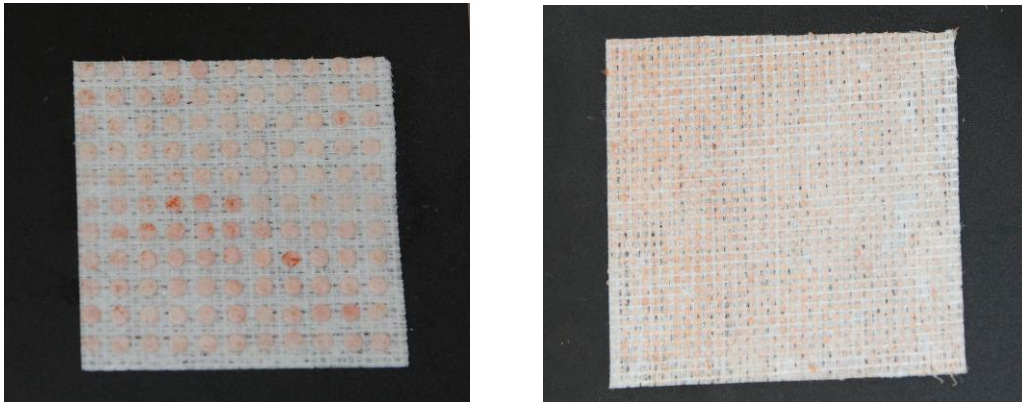


Abbildung 3: Beispielhafte Transplantate kleiner Expansion der Partikelgrößen \varnothing 3 mm und \varnothing 1 mm

Um einen entsprechenden Einfluss durch die Wundfeldlage zu kompensieren, erfolgt die Belegung in rotierender Reihenfolge über die Versuchsfelder, so dass vertikal 5 mögliche Wundfeldlagen zu je zwei Versuchsfeldern entstehen.

Zur Beurteilung des generellen Befindens der Schweine wurden zu jedem Behandlungstag Blutproben entnommen sowie zur Dokumentation des mikrobiellen Befalls ab Beginn des Versuches an jedem Behandlungstag Wundabstriche aller Versuchsfelder durchgeführt.

Der Wundheilungsverlauf wurde für Versuchsfelder und Spalthautentnahmestellen hinsichtlich der Parameter Wundzustand, Wundexsudat (Menge + Aussehen), Zustand von Wundumgebung und Wundrand (Aussehen + Form) protokolliert und makroskopisch fotografisch über die gesamte Versuchsdauer dokumentiert. Insbesondere wurde dabei auf klinische Symptome einer lokalen Infektion (Rötung, Erwärmung, Schwellung) geachtet.

Biopsieproben wurden am Transplantationstag von den Nekrosefeldern zur Bestimmung der Schädigungstiefe der Wunde sowie von der entnommenen Spalthaut und den hergestellten Gewebspartikel genommen. Am Ende der Versuchszeit wurden zur Durchführung histologischer Untersuchungen je 3 Proben von den Versuchsfeldern, den Spenderstellen und der gesunden Haut entnommen. Die Biopsieproben wurden formalinfixiert und zur morphologischen Charakterisierung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Die Beurteilung der Wundheilung erfolgt makroskopisch und durch histologische Untersuchungen, soweit erfassbar, hinsichtlich folgender Parameter

- Wundheilung bzw. Dauer des Wundverschlusses
- Kontraktion der Wunde
- Qualität der Haut (Epitheldicke, Qualität der ausgebildeten Reteleiste, Dermisdicke)
- Anwachsrate
- Auswirkung von Einflussfaktoren

Alle Tiere überlebten die operativen Eingriffe der Defektsetzung und Transplantation. Bei zwei Tieren musste jedoch ein vorzeitiger Versuchsabbruch erfolgen.


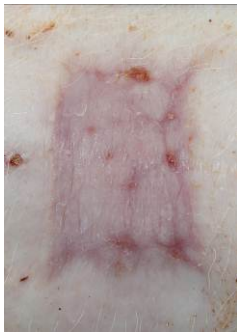

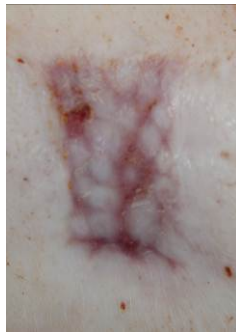

Der allgemeine Gesundheitszustand aller anderen Tiere im Versuchsverlauf kann als gut beschrieben werden. Es zeigten sich keine Anzeichen systemischer Infektion oder anderweitiger Erkrankung.

Abbildung 4 und Tabelle 5 zeigen beispielhaft Ergebnisse eines Versuchstieres in Woche 4.



Abbildung 4: Übersicht Versuchsfelder nach Versuchsabschluss (4. Wo.)

Tabelle 5: Versuchsergebnisse makroskopisch, Auszug

				
Spalthaut	Partikelgröße 1 Expansion 1:12 richtige Lage	Partikelgröße 1 Expansion 1:12 verkehrte Lage	Partikelgröße 3 Expansion 1:12 richtige Lage	Partikelgröße 3 Expansion 1:12 verkehrte Lage

Die Auswertung der durchgeführten Versuche zeigt, dass das Prinzip der Mikrogewebspartikel als Methode zur Defektdeckung bei Vollhautwunden gut geeignet ist.

Abbildung 5 zeigt die prozentuale Wundheilung der verschiedenen Belegungen an den Wundkontrolltagen 14, 21 und 28. Eine Auswertung für Tag 7 wird nicht vorgenommen, da bei einem stark anhaftenden Primärverband dieser in der ersten Woche auf der Wunde belassen wurde, wenn ein Ablösen mit Kochsalzlösung nicht möglich war, um eine Störung der Wundheilung zu vermeiden.

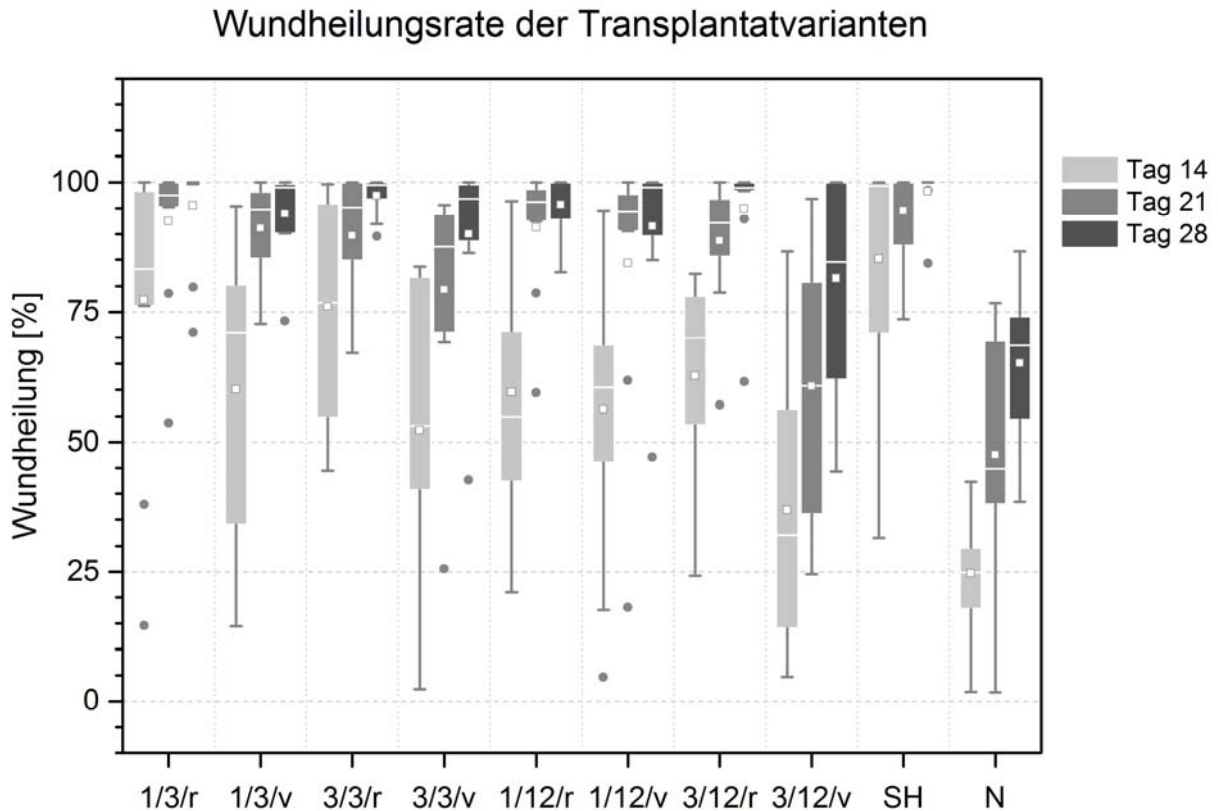


Abbildung 5: Vergleich der Wundheilungsrate in Abhängigkeit der Belegungsvarianten an Tag 14, Tag 21 und Tag 28.

Die Ergebnisse zeigen zu Beginn des Versuches eine sehr hohe Streuung. Dies resultiert zum einen aus der gegebenen biologischen Variabilität der Untersuchungsparameter sowie zum anderen aus den zahlreichen Einflussfaktoren eines in-vivo-Versuches. U.a. kann dies beispielsweise auch auf die Agilität der Tiere und die resultierenden Probleme des Anwachsens zurückgeführt werden, welches insbesondere bei der hohen Streuung der Spalthauttransplantate auffällig ist.

Wesentliches Ergebnis ist, dass eine Transplantation von Gewebspartikeln selbst in unkorrekter Lage eine Epithelisierung der Wundflächen ermöglicht. Es zeigt sich jedoch, dass diese im Vergleich zu Transplantaten korrekter Partikellage geringer ist, sowie im Vergleich der Partikelgrößen untereinander für Transplantate der Partikelgröße 3 mm deutlich abfällt. Dies gilt insbesondere für die Betrachtung der Expansion 1:12.

Im Vergleich der Belegungen 3/3/r und 1/12/r, welche ähnliche Wundrandlängen und Partikelabstände im Transplantat jedoch verschiedene Expansionen und damit an der Wundheilung beteiligte Zellanzahlen aufweisen, zeigen sich deutliche Unterschiede, so dass möglicherweise davon ausgegangen werden kann, dass die Epithelisierungspotenz eines Transplantates neben der Wundrandlänge und dem Partikelabstand auch von der Expansion abhängig ist. Aus Tabelle 5 wird jedoch der wesentliche Vorteil der geringeren Partikelgröße ersichtlich. Das ästhetische Ergebnis zeigt sich gegenüber der Nutzung von größeren Partikeln gleicher

Expansion sowie im Vergleich zur Transplantation in inkorrekt er Lage in weiten Teilen der sich bildenden lividen Narbenstruktur deutlich homogener.

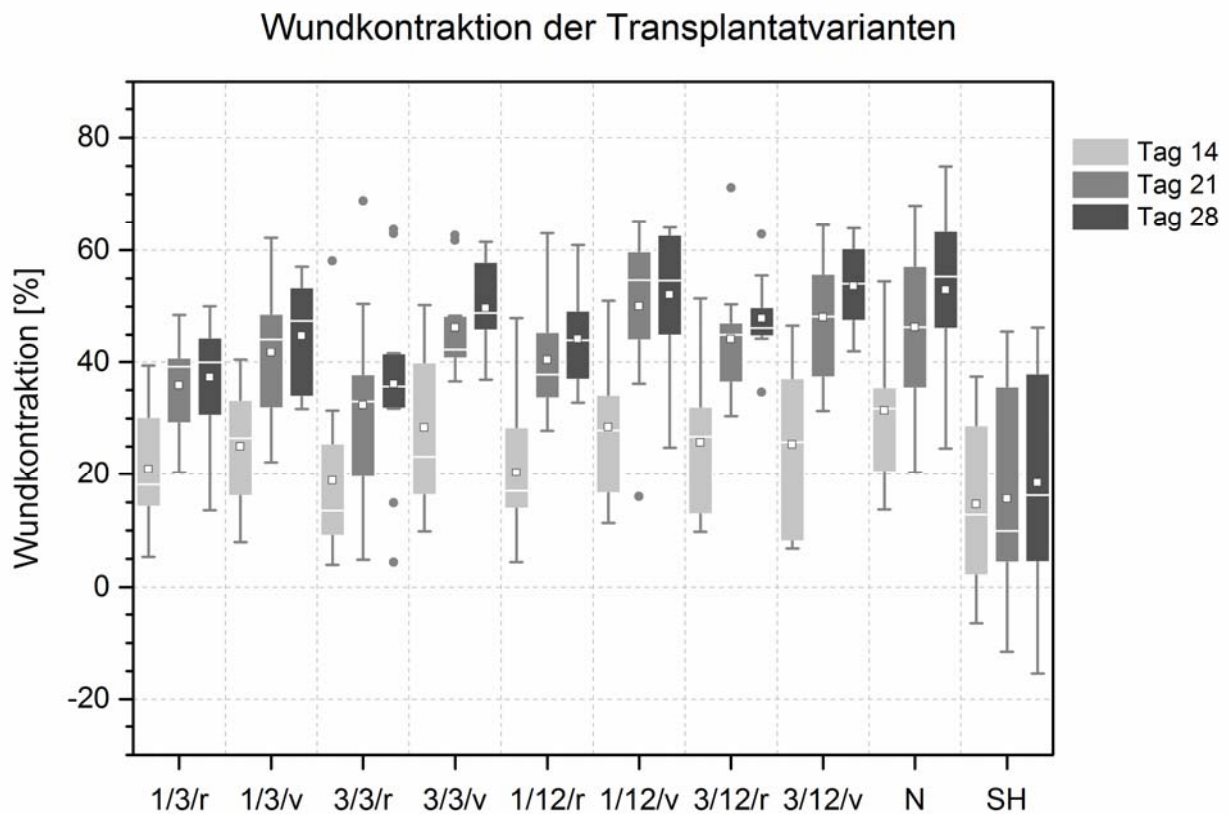


Abbildung 6: Vergleich der Wundkontraktion in Abhängigkeit der Belegungsvarianten an Tag 14, Tag 21 und Tag 28

Abbildung 6: Vergleich der Wundkontraktion in Abhängigkeit der Belegungsvarianten an Tag 14, Tag 21 und Tag 28 stellt die Wundkontraktion in % der ursprünglichen Wunde am Tag der Defekterzeugung für alle Transplantatvarianten über die Messpunkte an Tag 14, Tag 21 und Tag 28 dar. Im Vergleich der Transplantationsvarianten hinsichtlich des Faktors Expansion zeigt sich für Belegungen der Expansion 1:12 eine höhere Kontraktion gegenüber vergleichbarer Belegung einer Expansion von 1:3. Weiterhin sind deutliche Unterschiede der Wundkontraktion hinsichtlich des Belegungs-faktors Lage zu erkennen. Belegungsvarianten mit verkehrter Lage zeigen tendenziell eine höhere Kontraktion. Unterschiede bei gleicher Expansion und Lage jedoch differierender Partikelgröße sind nur geringfügig.

Alle Ergebnisse der expandierten Belegungsvarianten sind deutlich schlechter als die Ergebnisse der nicht expandierten Spalthaut, welche im Zuge des Wachstums des Tieres anteilig sogar eine Flächenvergrößerung erfahren haben.

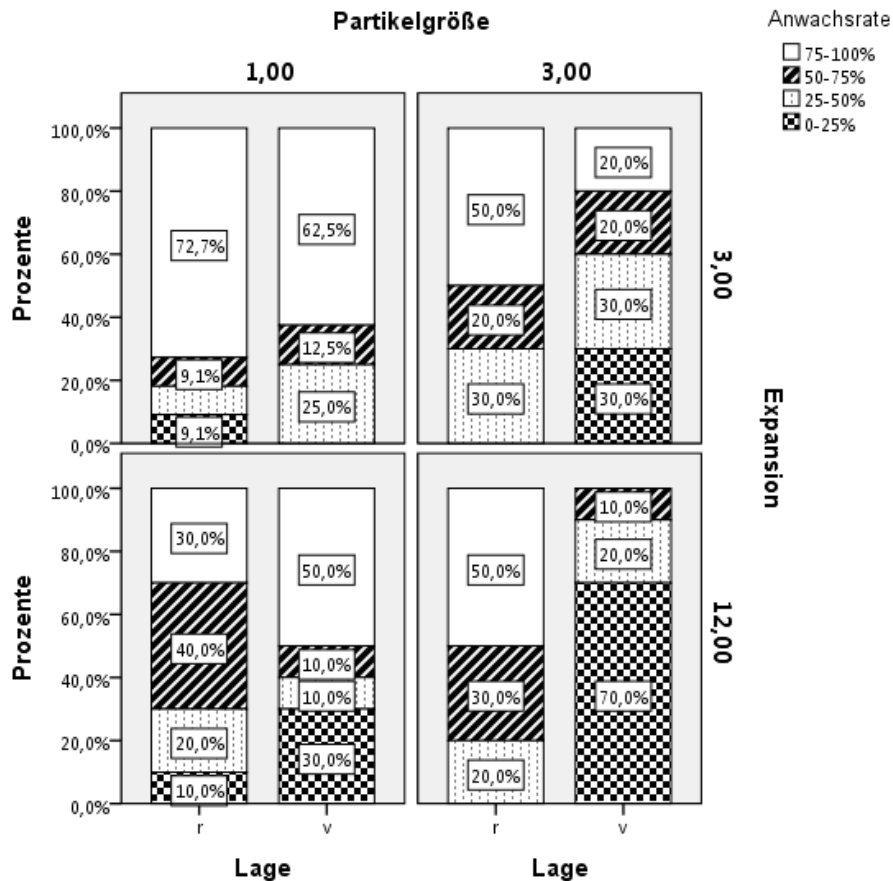


Abbildung 7: Vergleich der Anwachsrate in Abhängigkeit der Belegungsvarianten

Ein weiterer Parameter, welcher als maßgebliches Kriterium einer neuen Technologie anzusehen ist und direkt die Wundheilung beeinflusst, ist die erzielbare Anwachsrate.

Abbildung 7 zeigt deutlich, dass Partikel der Größe 3 mm bei Transplantation in verkehrter Lage eine deutliche geringere Anwachsrate im Vergleich zur Transplantation sowohl gleicher und kleinerer Größe in korrekter Lage als auch kleinerer Größe in verkehrter Lage besitzen. Bei allen Belegungsvarianten mit Ausnahme der Belegung 3/3/r zeigt sich im Vergleich zur Belegung mit höherer Expansion eine Verschlechterung der Anwachsrate. Mögliche Ursache könnten hier verstärkte Exsudat- und Granulationsgewebbildung sein.

Die histologische Auswertung erfolgte für jedes Versuchsfeld durch Vermessung von 3 Biopsieproben zu je 5 Messungen pro Biopsieprobe in einem fest definierten Rastermaß. Es wurden Epidermisdicke, Dermisdicke und Dicke des Stratum Papillare bestimmt sowie weitere Auffälligkeiten dokumentiert. Weiterführende immunhistologische Untersuchungen sind mit Fortführung der Auswertung zur Untersuchung spezifischer Kriterien von Interesse durchzuführen.

Hinsichtlich der in Abbildung 8 dargestellten Epidermisdicke zeigen sich im Vergleich der Belegungsvarianten nur geringfügige Unterschiede. Auffällig sind die deutlich geringeren Dicken sowohl von mit unexpandierter Spalthaut transplantierten Versuchsfeldern als auch insbesondere von umgebender ungeschädigter Haut.

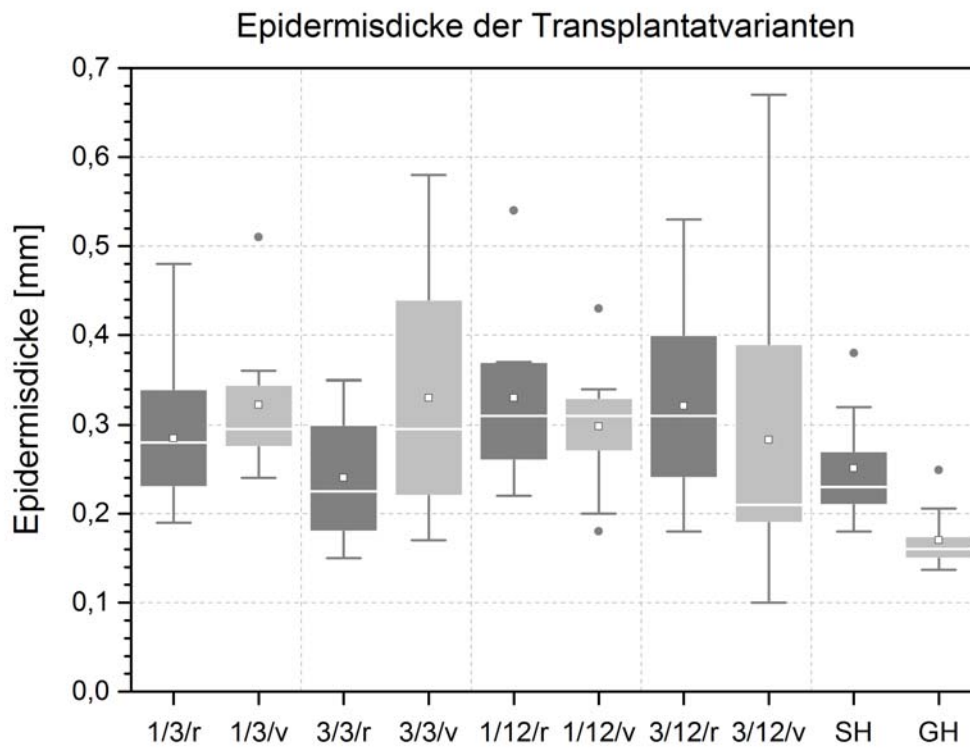


Abbildung 8: Vergleich der Epidermisdicke in Abhängigkeit der Belegungsvarianten

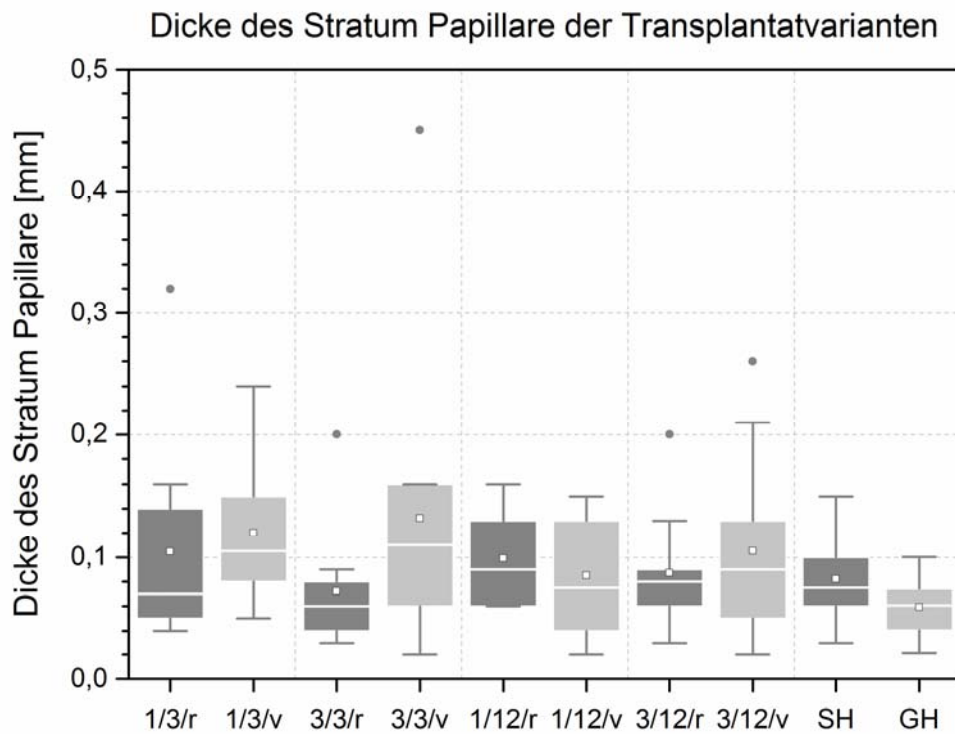


Abbildung 9: Vergleich der Dicke des Stratum Papillare in Abhängigkeit der Belegungsvarianten

Auch im Vergleich der in Abbildung 9 dargestellten Dicke des Stratum papillare zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Das Stratum papillare zeigt sich anteilig in allen Belegungsvarianten bereits gut abgrenzbar.

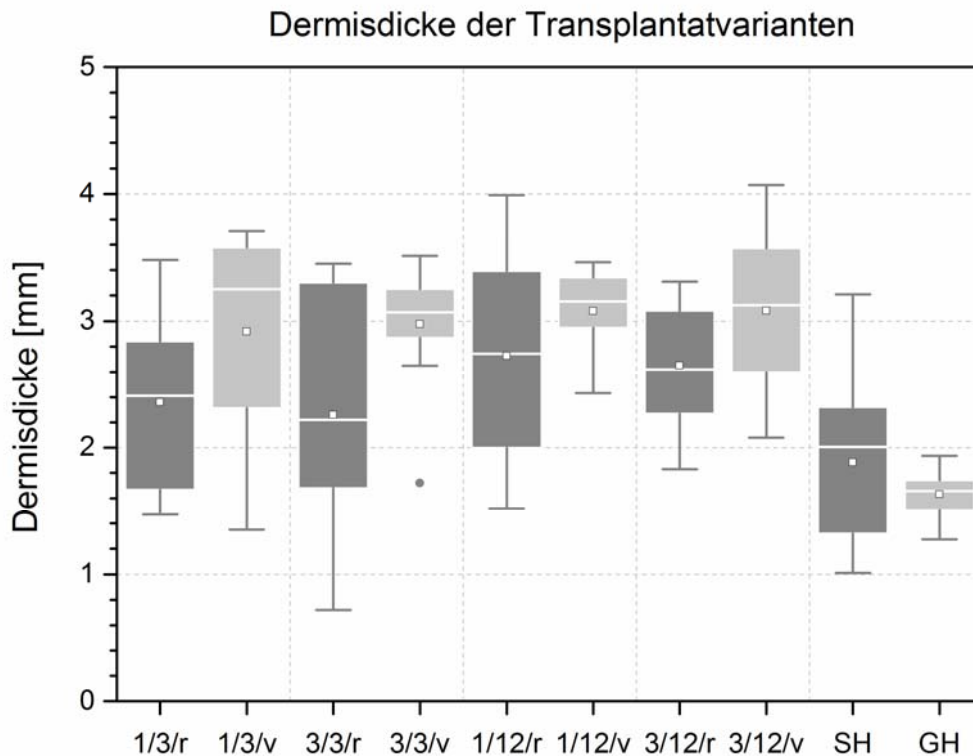


Abbildung 10: Vergleich der Dermisdicke in Abhängigkeit der Belegungsvarianten

In Abbildung 10 sind vergleichend die gemessenen Dermisdicken der verschiedenen Belegungsvarianten dargestellt. Dabei zeigen sich deutliche Unterschiede sowohl hinsichtlich des Vergleiches von richtiger zu verkehrter Lage als auch im Vergleich der Expansionen zueinander. Dies kann auf die vermehrte Bildung von, typischerweise im Rahmen der verzögerten sekundären Wundheilung auftretenden, Granulationsgewebe zurückgeführt werden. Dies konnte bereits makroskopisch im Wundheilungsverlauf beobachtet werden.

Parallel zu den Tierversuchen erfolgte eine Untersuchung verschiedener Lösungsansätze zur technischen Realisierung. Das Vorgehen orientiert sich an der methodischen Vorgehensweise der VDI 2221 und VDI 2222.

Die Umsetzung einer entsprechenden Transplantationstechnologie bedingt dabei die Betrachtung der folgenden drei funktionalen Schwerpunkte:

- Herstellung der Mikrogewebspartikel
- Expansion der Mikrogewebspartikel
- Transplantation der Mikrogewebspartikel

unter Berücksichtigung der vielfältigen Anforderungen aus Betriebs- bzw. Nutzerperspektive und Anwendungsumgebung sowie gesetzlicher und regulatorischer Vorgaben.

Folgende Hauptanforderungen sind dabei zwingend von einer neuen Technologie zur Behandlung Schwerbrandverletzter zu erfüllen:

- Vermeidung einer Gewebeschädigung in allen Schritten der zu realisierenden Prozesskette
- sicherer und genauer bzw. reproduzierbarer Verfahrensablauf/Prozess, insbesondere tatsächliche Erreichung der jeweilig gewählten Expansion
- Variabilität in der Expansion zur Anpassung entsprechend spezifischer Anforderungen
- sichere und leichte Handhabbarkeit der fertigen Transplantate während der Operation
- sichere und einfache Bedienbarkeit der Gerätetechnik
- Integration in den bestehenden Operationsablauf sowie die Operationsumgebung, insbesondere hinsichtlich der zeitlichen Restriktionen
- Sterilisierbarkeit
- Erfüllung der gesetzlichen und normativen Anforderungen
- Reduzierung von Kosten bzw. Rechtfertigung von Mehrkosten durch Verbesserung von Behandlungsergebnissen (Nachweis der medizinischen Leistungsfähigkeit).

Die zu untersuchenden technischen Lösungsansätze resultieren aus einer entsprechenden Vorauswahl nach einer umfassenden systematischen Lösungssuche. Auswahlkriterien bzw. –restriktionen waren dabei insbesondere die technologische Machbarkeit sowie die Schädigung der Haut im Prozess. Hinsichtlich der technologischen Realisierung wurden auch Lösungsansätze in die experimentelle Evaluierung einbezogen, deren Entwicklung der technologischen Reife zukünftig eine Umsetzbarkeit unter der gegebenen Zielstellung erwarten lässt. Die Problematik einer Bewertung der verschiedenen Lösungsansätze zur weiteren Eingrenzung der Vorauswahl besteht insbesondere darin, dass eine theoretische Abschätzung nicht möglich ist. Dies bedingt die technische Realisierung von Funktionsprototypen und die Evaluierung in entsprechenden experimentellen Untersuchungen.

Neben den bereits in eigenen Vorarbeiten untersuchten Lösungsalternativen wurden im Berichtszeitraum folgende weitere Lösungsalternativen betrachtet:

- Trennen mittels ultraschallerregter Schneide
 - Trennen mittels Ultrakurzpuls laser
 - Trennen mittels mechanischer Mehrfachschnitten unter Optimierung der Schneidbewegung und Reduzierung von Adhäsionskräften
 - Expansion in Medien
 - Expansion mittels Trägermaterialien
-

Für die Durchführung der Schneidversuche mit ultraschallerregter Klinge wurde die in Abbildung 11 dargestellte Sonotrode mit Schneidkavitäten der Größe 1mm x 1mm, in einer ersten Prototypenausführung mit der Anzahl von 100 Kavitäten, entwickelt.



Abbildung 11: Ultraschallschneideinheit mit Sonotrode

In den Versuchen konnte ein erfolgreiches Schneiden von Spalthaut, wie in Abbildung 12 dargestellt, bis zu einer Dicke von 0,25 mm in korrekter Lage mit dem aktuellen Stand des Versuchsaufbaus bzw. den technologischen Parametern realisiert werden. Dickere Spalthaut sowie Spalthaut einer unkorrekten Lage konnte nicht vollständig getrennt werden bzw. blieb in der Sonotrode haften. Weiterhin konnte ein Schneiden auf möglichen Expansionsmaterialien nicht realisiert werden.

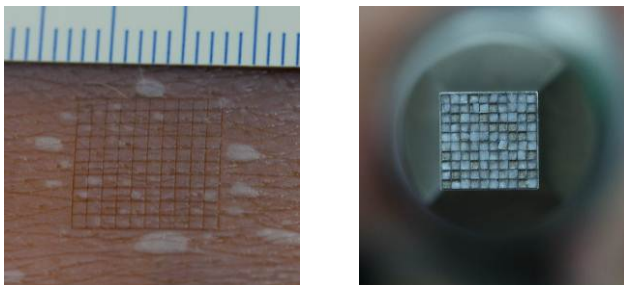


Abbildung 12: Geschnittene Spalthaut und anhaftende Partikel

Versuche, das Anhaften der Partikel durch entsprechende Trennmedien bzw. Beschichtungen zu vermeiden, waren nicht erfolgreich. Ebenso führte ein erhöhter Energieeintrag zur Verbesserung bzw. Realisierung des Schneidens dickerer Haut zur starken thermischen Schädigung der Schnittränder.

Neben dem Schneiden mittels ultraschallerregter Klinge wurde als weiteres nichtmechanisches Schneidverfahren das Schneiden mittels Ultrakurzpuls laser untersucht. Der Einsatz von Ultrakurzpuls lasern zum Schneiden verschiedenster Materialien ohne thermische Schädigung findet zunehmend, auch im medizinischen Bereich, Verbreitung. Eine entsprechende Eignung für gegebenen Anwendungsfall sollte daher experimentell überprüft werden.

Für die Durchführung der Versuche wurden entsprechende Versuchskammern konstruiert, welche ein planparalleles Ausrichten der Haut in der geforderten Genauigkeit sowie eine Befeuchtung der Proben ermöglichen.

Ziel der Versuche war zum einen zunächst die der Untersuchung der grundsätzlichen Machbarkeit sowie fortführend die Ermittlung der notwendigen Parameter für die Erzielung eines Optimums aus Schnittgüte (Schnittbreite), Schneidgeschwindigkeit und Gewebeschädigung unter Berücksichtigung der Einflussfaktoren von Hautdicke, -unregelmäßigkeit und -feuchte.

Abbildung 13 zeigt beispielhaft einen Laserschnitt im Prozess sowie fortführend als histologische Probe aufbereitet. Problematisch erwies sich in den Versuchen wiederum das Schneiden dickerer Haut im Einmalschnitt, so dass sich u.a. mit Erhöhung der Leistung geringfügige Schädigungszonen (wenige μm) am Schnitttrand zeigen.

Durch Reduzierung der Abtragraten und mehrmaliges Überfahren sind Ergebnisse ohne thermische Schädigung mit hoher Schnittgüte erzielbar. Durch den Einsatz moderner Scanner-Technologie können aktuell Schneidgeschwindigkeiten von bis zu 15 m/s erzielt werden, wodurch zeitliche Restriktionen durch mehrmaliges Überfahren eingehalten werden können (Schnittlänge eine Probe analog MEEK-Transplantatgröße $\sim 3,2$ m). Im Forschungsbereich können aktuell mit neuen Polygonscanner bereits Geschwindigkeiten von mehreren 100 m/s erreicht werden.

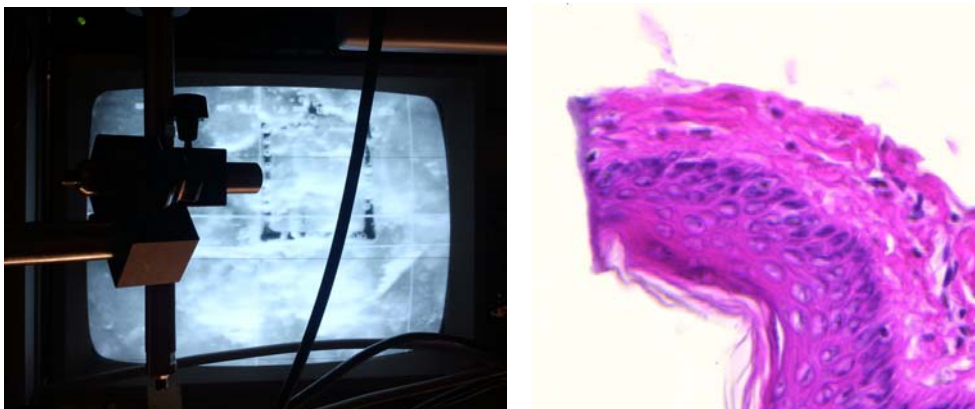


Abbildung 13: Laserschnitt (Mikroskop Laseranlage) und HE-gefärbte Schnittprobe

Eine weitere Problematik ist die starke Ankopplung an das Trägermaterial, wie in Abbildung 14 ersichtlich, wodurch die Gefahr von Ablationsrückständen im Transplantat besteht.

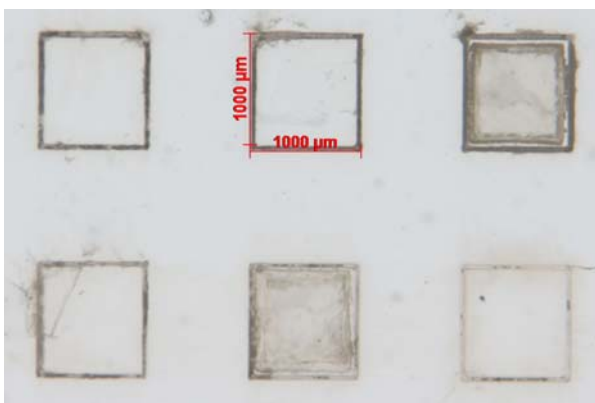


Abbildung 14: Ablationsmuster im Trägereinsatz der Versuchskammer

Neben einer Optimierung der Fokussierung bzw. Rayleigh-Länge werden aktuell verschiedene weitere Optimierungsmöglichkeiten (Nutzung von Trenn- oder Opferschichten) zur Vermeidung bzw. Reduzierung der Ankopplung untersucht.

Der Einsatz der Lasertechnik in einer zukünftigen Konzeption ist aktuell, insbesondere aufgrund der Maschinenkomplexität und dem hohen Invest, stark differenziert zu betrachten. Im Zuge der rasanten technischen Entwicklung sowohl hinsichtlich technologischer Neuentwicklung, insbesondere jedoch aber im Bereich der marktreifen Serienprodukte, ist jedoch in den nächsten Jahren mit einer deutlichen Reduzierung der Anschaffungskosten als auch der Verbesserung zahlreicher weiterer Anforderungen, wie etwa Bauraum, auszugehen.

Unter der Nutzung von herkömmlichen mechanischen Schneidwerkzeugen wurden bereits in den Vorarbeiten verschiedene Lösungskonzepte zur Herstellung von Mikrogewebspartikeln untersucht. Die Lösungsmöglichkeiten differenzieren dabei sowohl hinsichtlich der Schneidform, Schneidenkontur und der Anzahl der Schneiden der verschiedenen Werkzeuge als auch in Bezug auf die angewandte Schnittart. Der wesentliche Vorteil besteht dabei zunächst aus konstruktiver Sicht in dem einfachen Aufbau sowie der einfachen Handhabung und dem relativ günstigen Anschaffungs- und Instandhaltungskosten eines derartigen Systems. Die Problematik beim Trennen kleiner Partikel besteht jedoch in der starken Adhäsionsneigung, so dass eine gerichtete Lage nach dem Schneidprozess nicht erreicht wird, s. Abbildung 15.



Abbildung 15: Anhaften von Mikrogewebspartikeln beim mechanischen Schneiden mittels rotierender Messerwalzen

Um ein Anhaften zu vermeiden, erfolgt aktuell die Untersuchung verschiedener metallischer und nicht-metallischer Beschichtungen der Messer hinsichtlich Ihrer Eignung unter Berücksichtigung der Erhaltung der notwendigen Messerschärfe sowie der Schichtbeständigkeit über die geforderte Lebensdauer. Weiterhin erfolgt die Untersuchung des Einfluss weiterer Schneidparameter.

Hinsichtlich der Funktion des Expandierens werden derzeit zwei unterschiedliche Lösungskonzepte verfolgt. Die erste Lösungsvariante basiert im Hinblick auf die im Tierversuch erziel-

ten besseren Ergebnisse bei korrekter Lage auf der Umsetzung einer gerichteten, geordneten Expansion. Ziel ist die Entwicklung von Materialien, welche durch spezifische geometrische und werkstoffliche Auslegung eine entsprechende Dehnung auf Basis plastischer Verformung ermöglichen. Dabei erfolgt sowohl die Untersuchung von Materialien, welche gleichzeitig als Primärverband dienen, als auch Materialien, welche eine direkte Übertragung auf den Patienten erlauben.

Eine zweite Lösungsvariante basiert auf einer vereinfachten, ungeordneten Expansion durch eine gezielte Sedimentation in einem flüssigen Medium. Derzeit kann jedoch noch keine homogene Verteilung der Partikel sichergestellt werden. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen zur Optimierung des Sedimentationsprozesses geplant. Anwendung könnte dieses vereinfachte Verfahren für kleinere Wundflächen unter Anwendung kleiner Expansion sowie bei Ulzera finden.

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

Nicht vorhanden.

7 Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszweckes/ -ziels, Schlussfolgerungen. Beschreibung der Relevanz der Ergebnisse für die gesetzliche Unfallversicherung insbesondere im Hinblick auf die Praxisverknüpfung

Der Bezug zur gesetzlichen Unfallversicherung hat sich im Zuge der Projektbearbeitung bestätigt. Entsprechend der im Antrag beschriebenen Projektziele wird weiterhin davon ausgegangen, dass durch die Projektergebnisse eine Basis für neue Technologien zur Herstellung von cutanen Mikrogewebspartikeln geschaffen wird, welche eine Versorgung Schwerbrandverletzter zukünftig besser ermöglicht.

8 Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan möglichst mit Angabe der absehbaren Zeithorizonte

Die klinische Anwendung des Prinzips ist mit verschiedenen Einrichtungen im Gespräch. Weiterhin ist eine Aufweitung der Indikation auf Ulcera angedacht. Grundlage diesbezüglich ist die erfolgreiche technologische Umsetzung. Ein Zeithorizont ist derzeit aufgrund der technischen Unsicherheiten noch nicht bestimmbar.

Abschließender Verwendungsnachweis

Forschungsvorhaben: „Cutane Mikrogewebspartikel“, Vorhabenskennzeichen: 412.02-FR-0211, Abrechnungszeitraum: 01.11.2012-30.04.2014

	Betrag
Einnahmen	
DGUV, erste Teilrate	40.000,00 €
DGUV, zweite Teilrate	25.000,00 €
Einnahmen gesamt	65.000,00 €
Ausgaben	
Kostenart Personal	
1 Stelle wissenschaftl. MA E13-TV-L	81.053,87 €
Zwischensumme	81.053,87 €
Kostenart Laufende Kosten	
Zwischensumme	1.010,22 €
Ausgaben gesamt	82.064,09 €
Saldo	-17.064,09 €

Die vorstehenden Ausgaben sind im Rahmen des Vorhabens entstanden und waren zur Durchführung des Vorhabens notwendig.

Ort, Datum, Unterschrift Forschungsleiter

Die Übereinstimmung mit den Büchern und Belegen sowie die Richtigkeit der Eintragungen werden bestätigt. Über ggf. im Rahmen des Vorhabens beschaffte Geräte wird ein Inventarverzeichnis geführt. Sämtliche Unterlagen und Belege werden für die Dauer von 5 Jahren nach Beendigung der Forschungsarbeiten für die DGUV zur Verfügung gehalten. Die Richtigkeit von Belegen über Unteraufträge, die ggf. dritte Stellen für das Vorhaben ausgeführt haben, wird bestätigt. Die Einnahmen sind vollständig angegeben.

Ort, Datum, Unterschrift kassenberechtigte Stelle

Kurzfassung

Forschungsvorhaben: „Cutane Mikrogewebspartikel“, Vorhabenskennzeichen: 412.02-FR-0211, Abrechnungszeitraum: 01.11.2012-30.04.2014

Zielsetzung

Ziel des Projektes ist die Verbesserung der Behandlung von Schwerbrandverletzten durch die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Generierung autologer Transplantate mit maximaler Flächenvergrößerung durch die Anwendung von Mikrogewebspartikeln. Der verfolgte Lösungsansatz soll die Erzielung hoher Expansionsraten von autologer Spalthaut zur Deckung großflächiger Defekte unter Einsatz kleinster unverletzter Hautflächen ermöglichen und gleichzeitig einen schnellen Heilungsprozess mit guten funktionellen und ästhetischen Ergebnissen gewährleisten.

Aktivitäten und Methoden

Es erfolgte die Untersuchung der Wundheilung von drittgradigen Verbrennungswunden nach Behandlung durch Transplantation expandierter, autologer Spalthaut auf Basis von Mikrogewebspartikeln in in-vivo-Versuchen. Ziel war die Ermittlung wesentlicher Gestaltungsanforderungen für die Erarbeitung eines technischen Konzeptes. Parallel wurden mögliche Lösungskonzepte zur technischen Realisierung prototypisch untersucht.

Ergebnisse

Im Rahmen des Projektes konnten durch methodische Untersuchungen verschiedener Einflussfaktoren wesentliche Ergebnisse sowohl hinsichtlich medizinischer Fragestellungen als auch technischer Anforderungen gewonnen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass das Prinzip der Mikrogewebspartikel als Methode zur Defektdeckung bei Verbrennungsverletzungen sehr gut geeignet ist und eine verbesserte Behandlung großflächiger Verbrennungen ermöglicht. Sowohl die Analyse zur optimalen Ausprägung der untersuchten Parameter zur Gestaltung der Mikrogewebspartikel-Transplantate als auch die Erkenntnisse prototypischer Untersuchungen möglicher Lösungsprinzipien bilden die Grundlage für die Erarbeitung und Umsetzung eines technischen Konzeptes in fortführenden Arbeiten.
