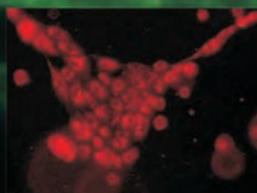
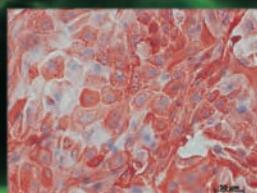
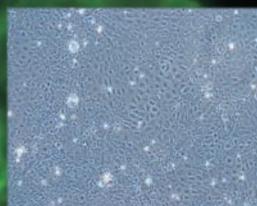
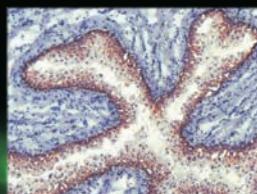


THERAPIE DER HARNRÖHRENSTRIKTUR IN VITRO

JULIA WIEDEMANN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Schweine,
Professur für Schweinekrankheiten
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil med. vet. G. Reiner
und

der Universitätsklinik für Urologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

Betreuer: Prof. Dr. med. A. Stenzl

Therapie der Harnröhrenstriktur in vitro

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Julia Wiedemann

Tierärztin aus Mülheim an der Ruhr

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. med. vet. G. Reiner
Prof. Dr. med. A. Stenzl

Tag der Disputation: 05. März 2009

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	2
2.1 Histologischer Aufbau der harnableitenden Wege.....	2
2.2 Zytoskelettproteine: Zytokeratine (CK).....	4
2.3 Anatomie der männlichen Harnröhre.....	5
2.4 Die Ätiologie der Harnröhrenstriktur.....	7
2.5 Diagnostik der Harnröhrenstriktur.....	8
2.6 Geschichte und Entwicklung der Behandlung von Harnröhrenstrikturen.....	10
2.7 Therapie der Harnröhrenstriktur.....	14
2.7.1 Urethrotomia interna nach Sachse.....	14
2.7.2 Transurethrale Laserurethrotomie.....	15
2.7.3 Bougierung der Harnröhre.....	16
2.7.4 End-zu-End Anastomose.....	17
2.7.5 Offene Harnröhrenplastiken.....	17
2.8 Tissue Engineering eine Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapieansätze.....	19
3. Zielstellung.....	22
4. Material und Methoden.....	24
4.1 Zellkultur von porcinen Urothelzellen.....	24
4.1.1 Gewinnung von Urothelzellen aus Harnleitern und –blasen.....	24
4.1.2 Zellkulturbedingungen.....	25
4.1.3 Passagieren von Urothelzellen.....	25
4.1.4 Bestimmung der Zellkonzentration mittels Trypanblaufärbung (Vitalfärbung).....	25
4.1.5 Kryokonservierung von Zellkulturen.....	26
4.1.6 Auftauen von Zellen.....	26
4.2 Phänotypisierung von in vitro kultivierten porcinen Urothelzellen.....	26
4.2.1 Immunzytochemie von kultivierten Urothelzellen mit dem Dako EnVision™ System.....	26
4.2.2 Phänotypisierung der primären porcinen Urothelzellen auf Proteinebene mittels Westernblotanalyse.....	28
4.2.2.1 Aufarbeitungen der Urothelzellen für den Westernblot.....	28
4.2.2.2 Bestimmungen der Proteinkonzentration nach Bradford.....	29
4.2.2.3 SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	29

4.2.2.4 Western Blot.....	29
4.3 Immunhistologie von Gewebeschnitten mit dem Dako EnVision™ System	31
4.4 Untersuchungen zum Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes PKH26 auf porcine Urothelzellen	32
4.4.1 PKH26 Markierung Zellen.....	32
4.4.2 Proliferationsuntersuchung zum Einfluss von PKH26 auf porcine Urothelzellen mittels BrdU-Test.....	33
4.4.3 WST-1-Test zur Messung der Zellvitalität unter dem Einfluss von PKH26 auf die Urothelzellen	33
4.4.4 Langzeitstudie zur Stabilität der PKH26-Markierung von Urothelzellen in vitro	34
4.5 Untersuchungen zum Einfluss von stabilisierter Hyaluronsäure auf porcine Urothelzellen	34
4.5.1 WST-1-Test zur Messung der Zellvitalität zum Einfluss von verschiedenen Hyaluronsäurekonzentrationen.....	34
4.5.2 Untersuchung zum Adhärenzverhalten porciner Urothelzellen in Abhängigkeit verschiedener Hyaluronsäurekonzentrationen	35
4.6 Untersuchungen zum Einfluss von Hyaluronsäure auf porcine Urothelzellen im Ko-Kultur Modell.....	35
4.6.1 Kultivierung von murinen Fibroblasten (NIH3T3).....	35
4.6.2 Ko-Kultur von murinen Fibroblasten (NIH3T3) mit porcinen Urothelzellen.....	36
4.6.3 Immunhistologische Untersuchung der Ko-Kulturen mittels des Panzytokeratinmarkers AE1/AE3	37
4.6.4 Transmissionselektromikroskopische Untersuchung der Ko-Kulturen.....	37
4.6.5 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Ko-Kulturen	39
5. Ergebnisse	40
5.1 Phänotypisierung von kultivierten porcinen Urothelzellen.....	40
5.1.1 Immunzytochemie von kultivierten porcinen Urothelzellen.....	40
5.1.2 Westernblotanalyse von kultivierten porcinen Urothelzellen	43
5.2 Immunhistologische Untersuchungen an nativer porciner Harnblase und nativen porcinen Harnleiter.....	48
5.2.1 Zytokeratinmuster des Harnblasenepithels	48
5.2.2 Zytokeratinmuster des porcinen Harnleiters	50
5.3 Untersuchungen zum Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes PKH26 auf porcine Urothelzellen	51

5.3.1 Wirkung der PKH26-Markierung auf die Vitalität von porcinen Urothelzellen.....	52
5.3.2 Wirkung der PKH26-Markierung auf die Proliferation porciner Urothelzellen	53
5.3.3 Langzeitstudie zur Stabilität der PKH26 Markierung von Urothelzellen in vitro	54
5.3.4 Verdopplungszeit von PKH26 markierten Urothelzellen	57
5.4 Untersuchungen zum Einfluss von stabilisierter Hyaluronsäure mit Dextranomer auf porcine Urothelzellen	58
5.4.1 Wirkung von stabilisierter Hyaluronsäure auf die Vitalität porciner Urothelzellen	58
5.4.2 Das Adhärenzverhalten porciner Urothelzellen in Abhängigkeit von verschiedenen Hyaluronsäurekonzentrationen.....	59
5.5 Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen mit murinen Fibroblasten mit und ohne Hyaluronsäure	61
5.5.1 Immunhistologie der Ko-Kulturen mit dem Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3.....	61
5.5.2 Nachweis des Einflusses von stabilisierter Hyaluronsäure mit Dextranomeren auf die zelluläre Morphologie in der Ko-Kultur mittels Rasterelektronenmikroskopie	64
5.5.3 Nachweis des Einflusses von stabilisierter Hyaluronsäure mit Dextranomeren auf die zelluläre Morphologie in der Ko-Kultur mittels Transmissionselektronen-mikroskopie (TEM).....	68
6. Diskussion	77
6.1 Phänotypisierung von kultivierten porcinen Urothelzellen.....	78
6.2 PKH26-Markierung porciner Urothelzellen in vitro	81
6.3 Biokompatibilitätsuntersuchungen zum Einfluss von stabilisierter Hyaluronsäure mit Dextranomeren auf porcine Urothelzellen	84
6.4 Untersuchungen zum Einfluss von stabilisierter Hyaluronsäure auf porcine Urothelzellen im Ko-Kulturmodell mit murinen Fibroblasten	88
6.4.1 Immunhistologische Untersuchungen der Ko-Kulturen mittels Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3.....	88
6.4.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Ko-Kulturen.....	89
6.4.3 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der Ko-Kulturen.....	89
7. Ausblick.....	92
8. Zusammenfassung.....	93
9. Summary	95
10. Literaturübersicht.....	97
11. Danksagung.....	105

12. Erklärung..... 106

Abkürzungsverzeichnis

<	Kleiner
°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
Abb.	Abbildung
A. dest	Aqua dest
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	Circa
Charr.	Charrière
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Cy2	Grünfluoreszierendes Carbocyanin
DAB	3,3`Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxirbonucleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Äthylenglykoltetraessigsäure
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FBS	Fetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FGF7	Fibroblasten Growth Factor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horse radish peroxidase
I. U.	Internationale Einheiten (<i>international units</i>)

KH ₂ PO ₄	Kaliunhydrogenphosphat
M	Molar
M.	Musculus
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
n	Anzahl der Proben
N.	Nervus
Na ₃ VO ₄	Trinatriumvanadatetrihydrat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NIH3T3	murine Fibroblasten
nm	Nanometer
P	Passage der Zellkultur
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvenylidenfluorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
RITC	Rhodaminisothiocyanat
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
V	Volt
Vergr.	Mikroskopische Vergrößerung
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Eine Harnröhrenstriktur ist eine Narbe des urethralen Epithels, die in den meisten Fällen auch das darunterliegende Corpus Spongiosum (Spongiofibrose) betrifft [Stack et al., 1998]. Die Vernarbung führt zu einer Einengung des urethralen Lumens. Bei Erwachsenen werden diese Engen symptomatisch, wenn sich das Lumen auf unter 16 Charr. verkleinert [Stack et al., 1998].

Betroffen sind nach einer Studie von Santucci et al. (2007) 0,6% der Bevölkerung. Häufig sind Männer höherer Altersklassen betroffen (≤ 65 Jahre).

Harnröhrenstrikturen können erworben oder angeboren sein. Als angeborene Missbildung tritt sie z. B. bei der Hypospadie auf. Die erworbenen Strikturen können posttraumatisch, iatrogen oder postentzündlich entstehen. Die Lokalisation der Harnröhrenstriktur steht in einem engen Zusammenhang mit der Entstehungsursache.

Die klinischen Symptome einer Harnröhrenstriktur sind obstruktive Miktionsymptome wie schwacher Harnstrahl, Pollakisurie, Nykturie oder Harnwegsinfekte, Prostatitis und Epididymitis.

Entscheidend für die richtige Therapie der Harnröhrenstriktur ist die Diagnostik. Diese muss Auskunft geben über: Lokalisation, Länge, Form (unregelmäßig, konisch zulaufend usw.), urodynamische Veränderungen und Auswirkung auf den übrigen Harn- und Geschlechtstrakt [Seibold et al., 2005].

Abhängig von der jeweiligen Ätiologie der Striktur muss eine der vielen Therapieoptionen (Urethrotomia interna, End-zu-End-Anastomose, Rekonstruktion mit gestieltem Penislappe oder freien Gewebetransplantaten usw.) gewählt werden, um eine optimale Heilung zu erreichen [Stack. et al., 1998]. Es sind mehr als 200 Operationstechniken bekannt. Zur Zeit sind die Rezidivraten der jeweiligen Operationstechniken noch sehr hoch. Deshalb wäre die Entwicklung einer minimal invasiven Operationstechnik mit einer geringen Rezidivrate wünschenswert.

2. Literaturübersicht

2.1 Histologischer Aufbau der harnableitenden Wege

Die harnableitenden Organe werden von einem hochdifferenzierten Gewebe, dem Übergangsepithel, ausgekleidet. Hierbei handelt es sich um ein mehrschichtiges Epithel [Drenckhahn, 1986], das aus Basalzellen, Intermediärzellen und Deckzellen besteht. Die zum Harnblasenlumen weisenden Deckzellen sind die größten Zellen des Epithels und besitzen stielartige basale Ausziehungen. Deshalb werden sie auch als „Umbrellacells“ (Regenschirmzellen) bezeichnet. Diese können bis zur Basallamina herunterreichen. Demnach könnte das Epithel dann als mehrreihig bezeichnet werden. Aufgrund der großen Füllungsunterschiede der Harnblase können die Deckzellen temporär stark gedehnt werden, wobei sie dann abgeflacht werden. Die Deckzellen entwickeln sich aus den Intermediärzellen, die aus der Teilung von Basalzellen hervorgehen. Diese Entwicklung ist nach circa elf Wochen abgeschlossen. Die durchschnittliche Lebensspanne der Deckzellen beträgt etwa 200 Tage [Leonhardt, 1990]. Die apikale Zellmembran der Deckzellen ist permanent aggressiven, zellschädigenden Substanzen aus dem Urin ausgesetzt. Der Schutz tieferliegender Zell- und Gewebsschichten wird durch die zwischen den Deckzellen hochspezifizierte ausgebildeten Zonulae occludentes gewährleistet. Sie sorgt für eine feste Verbindung zwischen den einzelnen Urothelzellen und ist in begrenztem Maße für Wasser und kleine Ionen durchlässig, dadurch wird eine parazelluläre Passage von Urin verhindert.

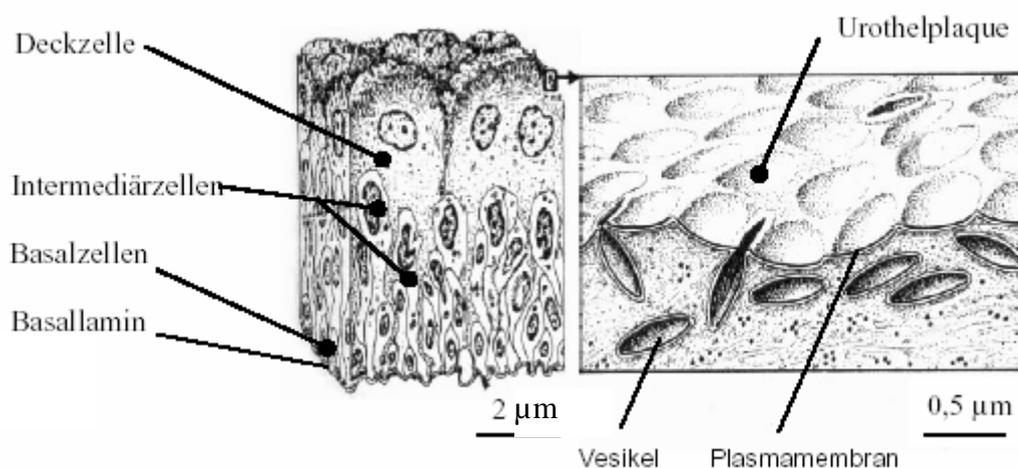


Abb. 1: Histologischer Aufbau des Urothels der Harnblase (modifiziert nach Kristiæ)

Die apikale Plasmamembran wird durch zahlreiche dichtgepackte Urothel-Plaques gebildet (Abb. 1). Diese enthalten in einer sehr hohen Konzentration Uroplakin als integrales Membranprotein. Die Uroplakinmoleküle verleihen der apikalen Membran der Deckzellen eine hohe chemische Resistenz. Das Uroplakin ist in der Membran unterschiedlich verteilt. Es besteht aus einer extrazellulären Domäne und einer intrazellulären Domäne [Liang et al., 2001]. Die Membran bildet zusammen mit den Zonulae occludentes die effektive Blut-Urin-Schranke [Jezernik et al., 1993; Chang et al., 1994]. Zur Zeit sind drei verschiedene Subtypen des Uroplakins bekannt. Beim Uroplakin III handelt es sich um spezifische, nur in Deckzellen des Urothels vorkommende, Membranglykoproteine [Moll et al., 1993].

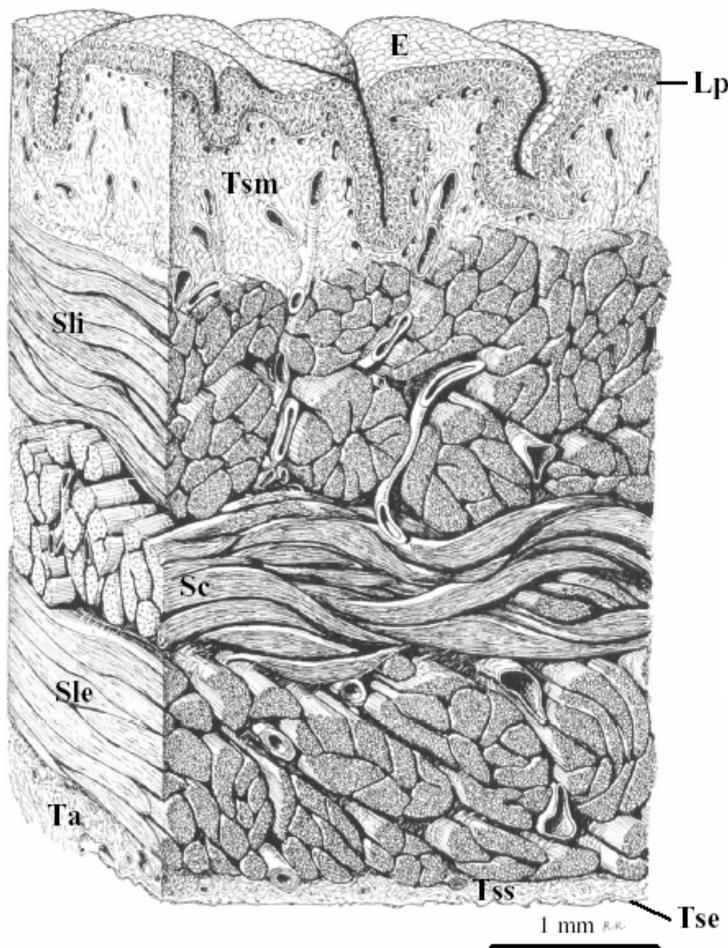


Abb. 2: Histologischer Aufbau der Harnblase – Übersicht (modifiziert nach Kristiæ)

- E Epithel
- Lp Lamina Propria
- Tsm Tela submucosa
- Sli Stratum longitudinale internum
- Sc Stratum circulare
- Sle Stratum longitudinale externum
- Tss Tela subserosa
- Tse Tunica serosa
- Ta Tunica Adventitia

2.2 Zytoskelettproteine: Zytokeratine (CK)

Zytokeratine werden von epithelialen Zellen gebildet und repräsentieren als Intermediärfilamente den wichtigsten Teil des Zytoskeletts. Sie sind zytoplasmatisch lokalisiert und für die Form und Stabilität der Zelle verantwortlich. Zur Zeit sind 20 verschiedene Zytokeratine bekannt. Entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften werden sie in saure (TypA-Zytokeratine 9 bis 20) oder neutral-basische Zytokeratine (TypB-Zytokeratine 1 bis 8), bezüglich ihres Molekulargewichtes in hoch- und niedrigmolekulare Zytokeratine eingeteilt.

Im Zytoskelett bilden jeweils ein TypA-Zytokeratin einen Komplex mit einem TypB-Zytokeratin, so dass in den Epithelien immer mindestens 2 Zytokeratine exprimiert werden.

CK.	Molekulargewicht x 10 ⁻³ in kDa	Isoelektrischer Punkt (pH)
1	68	7,8
2	65,5	7,8
3	63	7,5
4	59	7,3
5	58	7,4
6	56	7,8
7	54	6,0
8	52,5	6,1
9	64	5,4
10	56,5	5,3
11	56	5,3
12	55	4,9
13	54	5,1
14	50	5,3
15	50	4,9
16	48	5,1
17	46	5,1
18	45	5,7
19	40	5,2
20	46	6,1

Tab. 1: Molekulargewicht und Isoelektrischer Punkt der Zytokeratine 1-20

Sie werden in unterschiedlichen Kombinationen, abhängig von Epitheltyp und Differenzierungsgrad der Zellen exprimiert. Dadurch ist es möglich, den Phänotyp einer Zelle zu bestimmen.

Im Urothel weisen Zytokeratine eine charakteristische Verteilung auf [Moll, 1993]. Die zylinderepitheltypischen Zytokeratine 7, 8, 18, 17 und 19 werden in allen Schichten exprimiert. CK14 wird nur in Basalzellen gebildet. Diese exprimieren außerdem CK5 und 17. Während der Differenzierung der Urothelzellen von der Basal- über Intermediär- bis zur

Deckzelle kommt es zu einem Wechsel der Synthese von CK17 zu CK20. Die enddifferenzierte Deckzelle exprimiert kein CK17 mehr [Born, 2002]. Eine starke, aber heterogene Expression von CK20 ist auf die Deckzellen beschränkt. CK20 ist auf gastrointestinale Epithelien, Urothel und Merkelzellen begrenzt [Miettinen, 1995]. Interessanterweise ist dieses deckzelltypische Zytokeratin bei den meisten Urothelkarzinomen nachweisbar.

Die differentielle Expression der Zytokeratine gibt wichtige Informationen bezüglich der Differenzierung und Herkunft von Zellen. Dieses wird in der Medizin bei der pathologischen Diagnostik angewandt, um Tumore zu klassifizieren und die Herkunft von Tumormetastasen zu bestimmen. Die für die differentielle Diagnostik verwendbaren Zytokeratine schließen das CK20 ein, da es hauptsächlich in Karzinomen CK20-positiver Epithelien exprimiert wird. In bestimmten Karzinomtypen kann der Wechsel im Expressionsmuster individueller Zytokeratine während der Tumorprogression von prognostischer Bedeutung sein [Moll, 1994].

2.3 Anatomie der männlichen Harnröhre

Die männliche Harnröhre ist 20 bis 25 cm lang. Sie lässt sich in drei morphologisch und funktionelle Abschnitte einteilen: 1. Pars prostatica, 2. Pars membranacea, 3. Pars spongiosa.

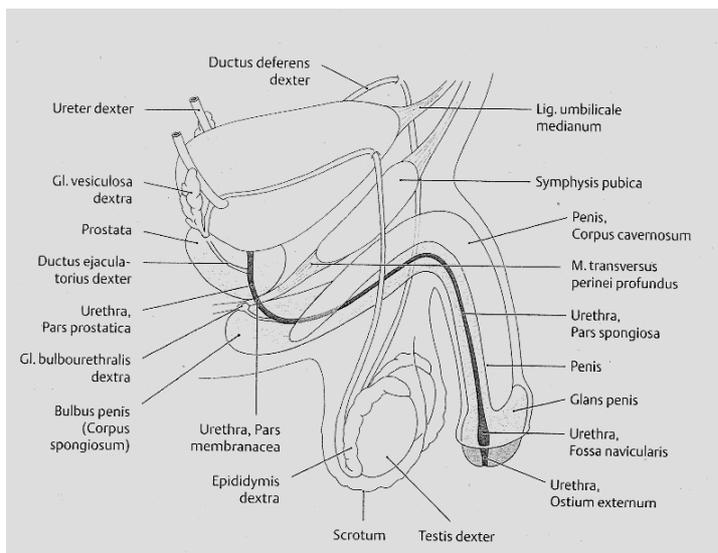


Abb. 3: Anatomie der männlichen Harnröhre, Prometheus
Anatomie der inneren Organe

Die Pars prostatica liegt zwischen Blasenhal und Apex der Prostata.

Die Pars membranacea ist der Abschnitt der Harnröhre der unmittelbar distal der Prostata durch den Beckenboden und den M. spincter externus verläuft.

Die Pars spongiosa führt vom Beckenboden bis zum Meathus urethrae externus auf der Glans penis. Sie wird vom Corpus spongiosum umhüllt und wird von der ischiocavernösen Muskulatur umgeben.

Der spongiöse Teil der Urethra wird zusätzlich von proximal nach distal in den bulbären, den präbulbären und den penilen Abschnitt unterteilt.

Im penilem Abschnitt verläuft die Urethra annähernd zentral im Corpus spongiosum, wogegen sie im bulbären Abschnitt eher dorsal liegt und einen exzentrischen Verlauf aufweist

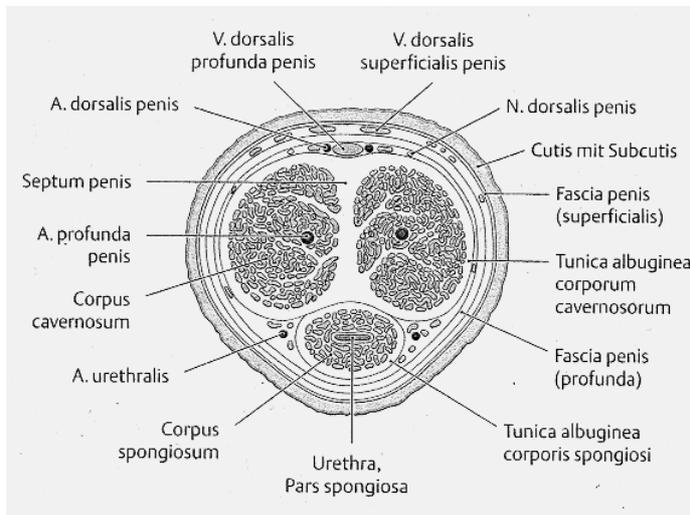


Abb. 4: Querschnitt durch den Penis im Bereich der Pars spongiosa, Prometheus Anatomie der inneren Organe

Der prostatiche und membranöse Teil der Urethra wird von dem Übergangsepithel ausgekleidet, während der spongiöse Teil von einem mehrschichtigen Zylinderepithel ausgekleidet wird [Schünke et al., 2005].

Der Kaliber der männlichen Harnröhre ist abhängig vom Alter und von den unterschiedlichen Abschnitten der Harnröhre.

Alter	Kaliber
1-4 Jahre	10Charr.
5-10 Jahre	12Charr.
11-12 Jahre	14Charr.
Erwachsener	21-36Charr.

Tab. 2 : Durchmesser der männlichen Harnröhre in Abhängigkeit des Alters, Heitz et al., 1998

Lokalisation	Kaliber
Meatus externus	21-27 Charr.
Penile Urethra	27-33 Charr.
Bulbäre Urethra	33-36 Charr.
Membranöse Urethra	27-30 Charr.

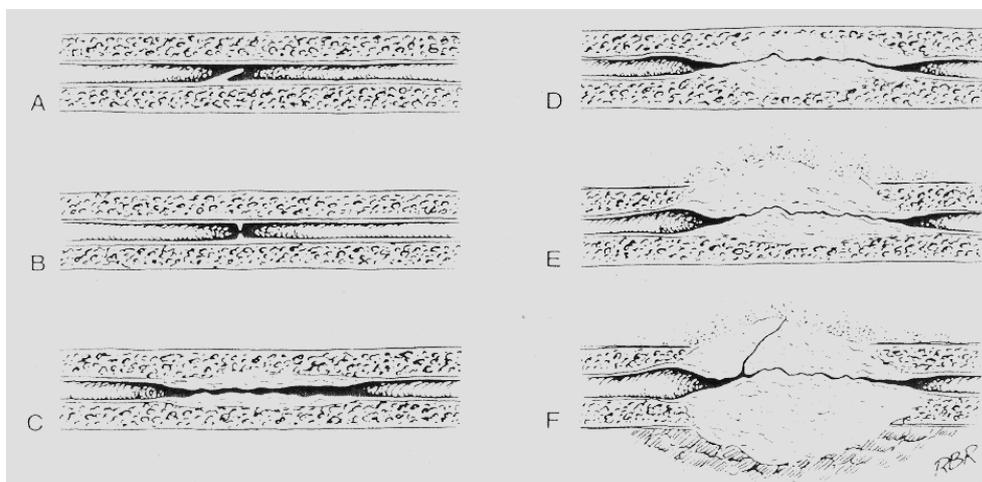
Tab. 3: Normaler Durchmesser der männlichen Harnröhre eines Erwachsenen in Abhängigkeit von der Lokalisation, Heitz et al., 1998

2.4 Die Ätiologie der Harnröhrenstriktur

Als eine Harnröhrenstriktur wird eine Verengung der Harnröhre durch fibrotisches Gewebe bezeichnet. Unabhängig von der auslösenden Ursache für die Striktorentstehung sind zwei Faktoren für die Pathogenese der Strikturen verantwortlich: eine Schleimhautläsion und eine Entzündung [Bandhauer et al., 1991].

Die Kombination eines Defekts der urethralen Schleimhaut mit einer lokalen Infektion kann zu einer auf das Corpus spongiosum übergreifenden Entzündung (Spongiofibrose) führen, die unter Narbenbildung ausheilt [Schreiter et al., 1998]. Je ausgeprägter die Narbenbildung ist, desto ausgedehnter manifestiert sich die Striktur.

Harnröhrenstrikturen können erworben oder angeboren sein. Als angeborene Missbildung tritt sie z. B. bei der Hypospadie auf. Die erworbenen Strikturen können posttraumatisch, iatrogen oder postentzündlich entstehen.



A:Schleimhautfalte, B: Iris Konstriktion, C: Starke Verengung mit minimaler Fibrosierung des Corpus Spongiosum, D: Starke Fibrosierung des Corpus Spongiosum, E: Entzündung und Fibrosierung des umliegenden Gewebes des Corpus Spongiosum, F: Komplexe Striktur mit abgehender Fistel.

Abb. 5: Anatomie der vorderen Harnröhrenstriktur, Bandhauer K., Schreiter F., Operative Therapie der Harnröhrenstriktur, Thieme Verlag 1991 (Legende S. 8)

Die Lokalisation der Harnröhrenstriktur steht in einem engen Zusammenhang mit der Entstehungsursache.

Die posttraumatische Harnröhrenstriktur kann im Rahmen von Beckenfrakturen im membranösen Teil der Harnröhre durch eine Distractionsverletzung oder bei einem direktem Dammtrauma durch eine Kompressionsverletzung der bulbären Harnröhre (Straddle-Verletzung) entstehen [Bandhauer et al., 1991]. Seltener sind posttraumatische Strikturen im Bereich der penilen Harnröhre, da sie nahezu immer mit offenen Verletzungen verbunden sind [Bandhauer et al., 1991].

Iatrogene Strikturen entstehen vorwiegend durch endourethral eingeführte Instrumente, Katheter oder Dauerkatheter. Sie betreffen meist den penilen oder bulbären Teil der Harnröhre. Durch die mechanische Manipulation können Drucknekrosen oder direkte Verletzungen der Schleimhaut entstehen, welche sich durch Sekretstau oder Keimassenzion entzündlich verändern und die Strikturentstehung begünstigen [Bandhauer et al., 1991].

Auch im Bereich des Blasenhalbes können iatrogene Harnröhrenstrikturen nach einer transurethralen Prostataektomie entstehen.

Heutzutage sind Strikturen entzündlicher Genese wesentlich seltener anzutreffen als früher. Sie betreffen vorwiegend den bulbären Teil der Harnröhre. Entstehungsfaktoren sind unspezifische Urethritis durch Bakterien, Mykoplasmen, Protozoen, Viren und Chlamydien. Die gonnorrhische Urethritis und die sehr seltene tuberkulöse Urethritis sind durch rechtzeitige Antibiotikabehandlung seltener geworden [Bandhauer et al., 1991].

Die klinischen Symptome einer Harnröhrenstriktur sind obstruktive Miktionsymptome wie schwacher Harnstrahl, Pollakisurie, Nykturie oder Harnwegsinfekte, Prostatitis, Epididymitis. Infolge des zunehmenden intrarenalen Drucks können Schädigungen des Nierenparenchyms auftreten [Bandhauer et al., 1991].

2.5 Diagnostik der Harnröhrenstriktur

Entscheidend für eine optimale Therapie der Harnröhrenstriktur ist die Diagnostik. Diese muss Auskunft geben über: Lokalisation, Länge, Form (unregelmäßig, konisch zulaufend usw.), urodynamische Auswirkung und Auswirkung auf den übrigen Harn- und Geschlechtstrakt [Seibold et al., 2005].

Die häufigste diagnostische Methode zur Darstellung von Harnröhrenstrikturen ist die retrograde **Urethrographie**, bei der ein Kontrastmittel vom Meatus her in die Harnröhre

injiziert wird. Mit dieser Methode lässt sich die konkrete Lage, die Länge und die Form der Striktur radiologisch darstellen [Bandhauer et al., 1991].

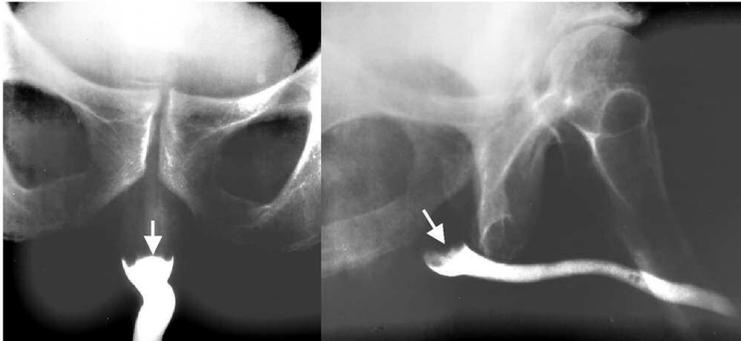


Abb. 6: Retrograde Urethrographie, D.Manski,

Ein weiteres bildgebendes Verfahren zur Darstellung der Striktur ist die **Miktionsurethrographie**, hierbei wird das Kontrastmittel durch Punktion oder mittels Katheter in die Blase appliziert.

Mittels der **Uroflowmetrie** lassen sich die urodynamischen Auswirkungen der subvesikalen Harnabflusshindernisse bestimmen. Die Harnröhrenstriktur erzeugt bei der Uroflowmetrie ein typisches Bild. Das Maximum des Harnflusses wird schnell erreicht und zeigt bei langer Miktionsdauer ein langstreckiges Plateau. Der maximale Flow liegt unter 10 ml/s [Bandhauer et al., 1991].

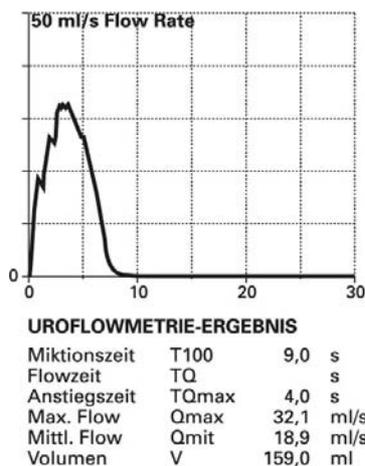


Abb. 7: Normale Uroflowmetrie

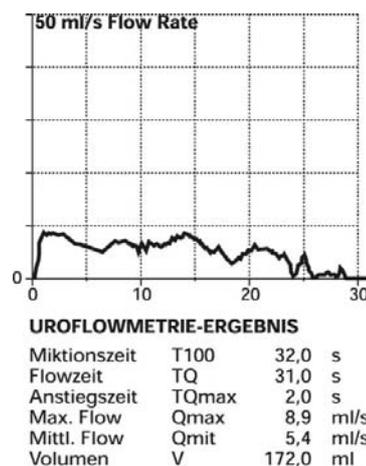


Abb. 8: Uroflowmetrie bei einer Obstruktion

Die Uroflowmetrie kann sowohl präoperativ als auch postoperativ zur Verlaufskontrolle dienen [Seibold et al., 2005].

Die **Sonographie** erlaubt keine exakte Darstellung der Striktur, gibt aber Hinweise über die Länge, Form und das Ausmaß der Spongiofibrose [Seibold et al., 2005].

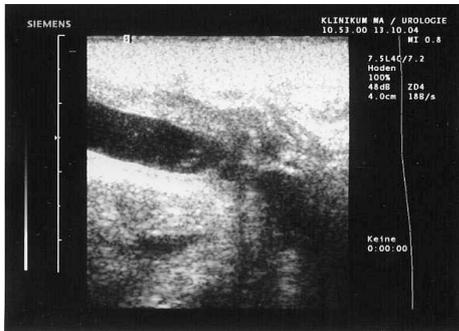


Abb. 9: Sonographische Darstellung einer Harnröhrenstriktur
Mannheimer Konzept Harnröhrenstriktur, PD Dr. T. Knoll, Urologische Universitätsklinik Mannheim

Die **Urethroskopie** gibt im Verhältnis zur Invasivität der Methode nur ungenügend Auskunft über die Länge und Form der Struktur und ist kein primäres diagnostisches Verfahren [Bandhauer et al., 1991].

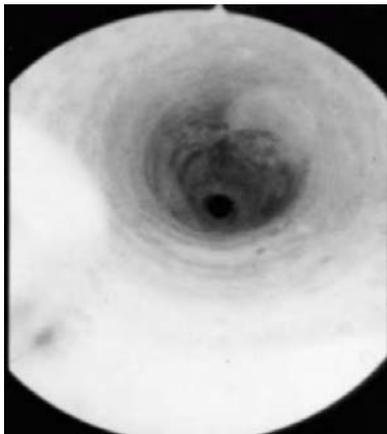


Abb. 10: Endoskopische Darstellung einer Harnröhrenstriktur Fischer M., Journal für Urologie und Urogynäkologie 2004; 11: 11-14

2.6 Geschichte und Entwicklung der Behandlung von Harnröhrenstrikturen

Die Behandlung von Harnröhrenstrikturen ist schon seit Jahrtausenden bekannt. Die ersten Überlieferungen zur Therapie der Harnröhrenverengungen stammen aus dem 6. Jahrhundert v. Christus aus der Hindu Medizin. Dort wurden hauptsächlich Katheter und Dilatatoren aus Holz und Metall beschrieben [Attwater 1943].

Zum ersten Mal an Bedeutung gewann die „Urethrotomia externa“ durch Aretaeus im Jahre 80 n. Christus [Attwater 1943].

Epidemiologisch relevant wurde die Harnröhrenstriktur allerdings erst mit der Entdeckung Nordamerikas im Jahre 1492 und der darauf folgenden Zunahme an venerischen

Erkrankungen insbesondere der Gonorrhoe in West- und Mitteleuropa [Schultze-Seemann, 1982].

1552 war der Neapolitaner Alfonso Ferro der erste, der die anterograde, innere Urethrotomie bei der Harnröhrenstriktur anwandte. 1561 verfeinerte der Franzose Ambroise Pare diese Technik, indem er die Bleikatheter (Bougie) am Ende zu runden Feilen modifizierte, welche in der Harnröhre beweglich waren. Diese Bougies verletzten allerdings auch das gesunde Gewebe und konnten enge Strikturen nicht überwinden. Daraufhin entwickelte Pare die „sonde tranchante“, eine schneidende Kanüle, deren Ende sich mittels eines Mandrins abschieben ließ und die Harnröhre retrograd einschnitt. Er führte als Erster die retrograde, innere Urethrotomie als operative Methode ein [Schultze-Seemann, 1982].

Hunter inzisierte 1765 die Harnröhre perineal und erweiterte die Striktur von proximal nach distal. Er führte als Erster einen Katheter durch die Blase von proximal in die Urethra ein (retrograder Katheterismus) [Schultze-Seemann, 1982].

Im Jahr 1807 erfand der Brite Charles Bell die eigentliche retrograde, innere Urethrotomie mit einem Instrument, welches am Ende mit einer Klinge in Form eines schrägen Vierecks, vorne stumpf und hinten scharf, versehen war. Damit konnte die Striktur bilateral eingeschnitten werden. Charles Bell erkannte, dass Entzündungsprozesse die häufigste Ursache für die Strikturbildung waren, damals meist als Folge der Gonorrhoe [Schultze-Seemann, 1982].

Ein grosser Schritt in der Entwicklung der Instrumentarien in Richtung der heutigen Zeit war die Erfindung des „lateral bladed Stilette“ von dem englischen Chirurgen Stafford. Dieses Urethrotom zeichnete sich daraus aus, dass die Klinge sich nicht an der Spitze der Kanüle, sondern an der Seitenfläche an deren Ende saß. Zusätzlich entwickelte Stafford eine Methode bei der er bei engen aber noch durchgängigen Strikturen einen Führungsdraht durch die Harnröhre bis in die Blase vorschob, um ihn als Coduktor für das Urethrotom zu gebrauchen [Schultze-Seemann, 1982].

1855 entwickelte der Franzose Maisonneuve ein Gerät, das als sicherste Methode zur anterograden Durchschneidung der Striktur galt.

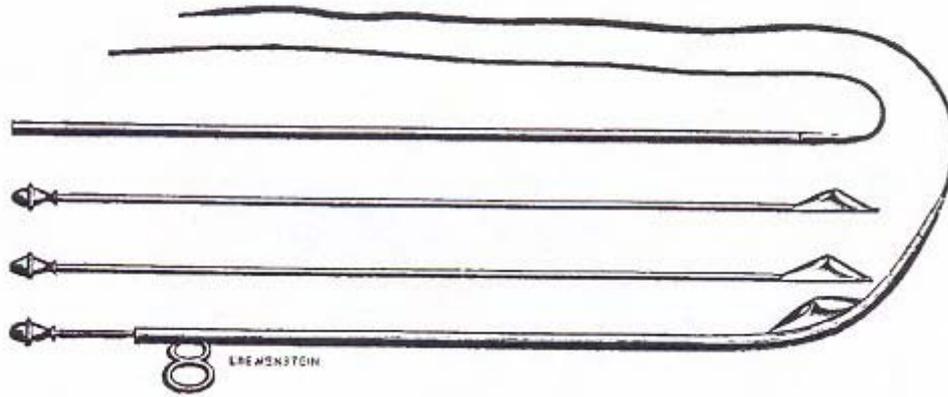


Abb. 11: Urethrotom nach Maisonneuve, Moll et al., 1999

Als erstes platzierte er einen filiformen elastischen Bougie durch die Strikturen in der Harnröhre und verschraubte danach eine gerinnte Metall-Sonde am distalen Ende, die in der Harnröhre bis hinter die Strikturen geführt werden konnte, während sich der elastische Bougie in der Harnröhre aufrollt. Dann wurde die Strikturen längs der Rinne mit einer dreieckigen Klinge gespalten [Schultze-Seemann, 1982].

Ein sehr großer Fortschritt in der Entwicklung der Urethrotomie war die Erfindung der Endoskopie der Harnröhre durch Desormeaux im Jahr 1853 [Schultze-Seemann, 1982].

Allerdings verweigerten das mangelhafte optische System und die schlechten Lichtverhältnisse der Erfindung den Durchbruch.

Als 1871 die Chloroformnarkose eingeführt wurde, etablierte Otis die „Dilatierende Urethrotomie“. Ziel dieser Operation war es die ursprüngliche Weite der Harnröhre wieder herzustellen. Dafür benutzte Otis das von ihm 1872 vorgestellte Urethrotom zur Messung des Harnröhrenkalibers [Schultze-Seemann, 1982].



Abb. 12: Urethrotom nach Otis, Moll et al., 1999

Durch diese Erfindung konnten erstmals die individuellen Unterschiede des Kalibers festgestellt und berücksichtigt werden.

Durch Verbesserungen der optischen Darstellung gelang es Riba (1936), Karl Fischer (1937) und Ravasani (1957), die direkte optische innere Urethrotomie als das Mittel der Wahl bei kurzen und multiplen Strikturen zu etablieren [Schultheiss et al., 1998].

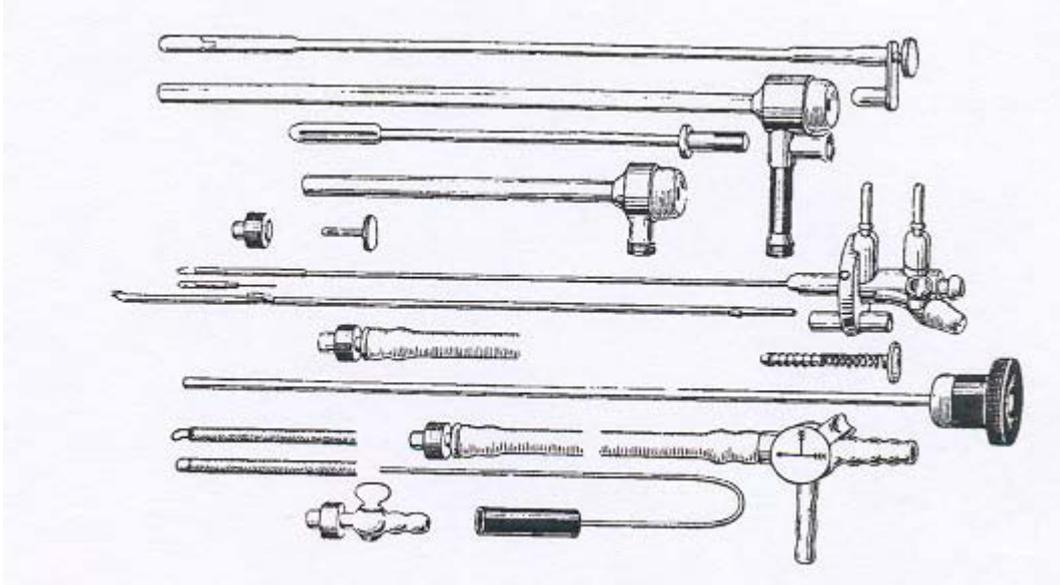


Abb. 13: Urethrotom nach Fischer: Einzelteile des Karl S. Fischer-Operationsurethroskops (Fa. Heynemann), Moll et al., 1999

In den 50er Jahren entwickelten unter anderem Denis Brown (1952) und Bengt-Johanson (1953) Methoden der externen Urethrotomie, welche besonders bei traumatisch bedingten Strikturen in der proximalen bulbären Harnröhre indiziert sind [Schultze-Seemann, 1982].

1971 verändert Hans Sachse das Fischer-Urethrotom indem er die integrierte Elektrokoagulationsschlinge durch ein einfaches scharfes Messer ersetzte, da ihm aufgefallen war, dass bei der Elektrokoagulation sehr häufig eine starke Nekrose- und Narbenbildung auftrat [Sachse, 1980].



Abb. 14: Urethrotom nach Sachse mit starrem Endoskop, Fa. Wolf

Hartwig Bülow wendete 1977 zum ersten Mal einen Neodymium-Laser zur Strikturbehandlung an [Bülow et al., 1979].

Zur Behandlung von Rezidivstrikturen nach innerer Urethrotomie werden heute auch endurale Stents eingesetzt wobei jedoch die Langzeit-Verlaufskontrollen noch abzuwarten sind [Schultheiss et al., 1998].

1984 präsentierte Schreiter zum ersten Mal das Mesh-Graft-Transplantat. Dabei handelt es sich um ein freies Transplantat von gemeschter Vollhaut [Schreiter, 1984]. Dieses ist die Methode der Wahl bei langstreckigen, komplizierten und oft rezidivierenden Harnröhrenstrikturen.

Eine Alternative zur freien Transplantation von genetzter Vollhaut ist die 1998 von Fichtner und Mitarbeitern vorgestellte Transplantation eines freien Mukosatransplantats aus der Mundschleimhaut als Urethraersatz (onlay-Graft) [Fichtner et al., 1998].

2.7 Therapie der Harnröhrenstriktur

Derzeit bestehen bei der Behandlung von Harnröhrenstrikturen zahlreiche unterschiedliche Therapiekonzepte. Diese Tatsache an sich weist darauf hin, dass keines der Behandlungsverfahren zufriedenstellende Ergebnisse liefert. Es tritt ein hoher Prozentsatz an Strikturrezidiven auf, weshalb ständig an neuen Behandlungsmöglichkeiten geforscht wird. Je nach Strikturätiologie ist eine der verschiedenen Therapieformen das Mittel der Wahl.

Ziel ist es, die Rezidivquote möglichst weit zu senken und eine Dauerbehandlung zu vermeiden.

2.7.1 Urethrotomia interna nach Sachse

Die Urethrotomia interna ist das Mittel der Wahl bei kurzstreckigen Harnröhrenstrikturen ohne ausgeprägte fibrotische Reaktion.

Das Prinzip der Urethrotomia interna beruht auf der Beobachtung, dass frische, nichtentzündliche Defekte der Harnröhrenschleimhaut sich relativ schnell mit Urothel überdecken können, wodurch die Rückresorption harnpflichtiger Stoffe vermieden wird und die neuerliche Narbenbildung unterbleibt oder zumindest verringert wird [Bandhauer et al., 1991].

Voraussetzung dafür ist allerdings eine primäre Wundheilung mit möglichst geringen entzündlichen Veränderungen. Die Heilungschancen liegen zwischen 20 – 70%. Ein Rezidiv kann bis zu 3 Jahren nach Schlitzung auftreten. Am besten sind die Ergebnisse bei

kurzstreckigen bulbären Strikturen ohne ausgeprägte Spongiofibrose (Heilung: 74%), am schlechtesten bei langstreckigen penilen Strikturen (Rezidivrate: >80%) [Stack et al., 1998]. Die Urethrotomia interna nach Sachse erfolgt im Gegensatz zu der Urethrotomia interna nach Otis unter Sicht.

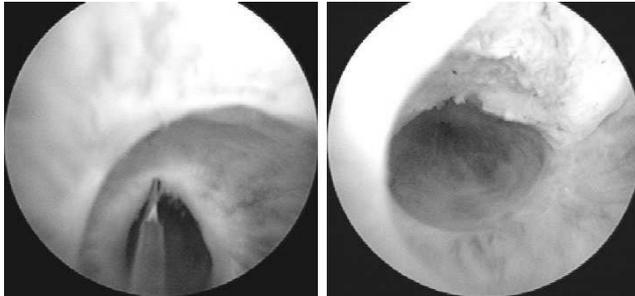


Abb. 15: Urethrotomia interna nach Sachse, D.Manski

Die Striktur wird mit dem Sichturethroskop exakt dargestellt. Die transurethrale Inzision der Striktur erfolgt bei 12 Uhr, da in diesem Bereich Verletzungen der Schwellkörper durch die Hüllfaszien besser vermeidbar und die Blutungsgefahr am geringsten ist. Es werden alle Narbenzüge durchtrennt, bis der Durchmesser der Harnröhre das Kaliber des Instrumentes um ca. 1/3 übersteigt [Bandhauer et al., 1991].

Der Erfolg hängt davon ab, wie die Epithelisierung der Narbenenden abläuft, bevor sie sich annähern und abheilen. Dabei wird eine Narbe hinterlassen, die ein größeres Kaliber hat, als die initiale Striktur [Stack, 1998].

In den ersten Stunden nach der Urethrotomia interna soll durch eine transurethrale Harnableitung mittels Siliconkatheter der Eintritt von Urin in die frische Urothelläsion verhindert werden, um einen lokalen Infekt zu vermeiden [Bandhauer et al., 1991]. Eine Liegezeit von länger als 3 Tagen sollte jedoch vermieden werden [Sperling et al., 1998].

Die Wiederholung der Urethrotomia interna nach einem Rezidiv ist nur 2–3 Mal sinnvoll. Nach dem dritten Rezidiv ist ein plastisch-rekonstruktives Verfahren notwendig [Bandhauer et al., 1991].

2.7.2 Transurethrale Laserurethrotomie

Als alternative zur kalten Urethrotomia interna nach Sachse kann Laserenergie (z.B.: Holmium-YAG-, Excimer-, Argon- und KTP-Laser) angewendet werden. Der theoretische Vorteil der Laseranwendung beruht auf der Annahme, dass hochfokussierte Energie den Gewebeschaden reduziert, fibrotisches Gewebe beseitigt und eine Blutstillung erreicht [Bülow et al., 1979].

Auf Grund der großen Hitzeentwicklung kann ein überschießender Vernarbungsprozess im peristrikturalen Gewebe und dadurch ein Strikturrezidiv entstehen [Smith et al., 1989].

2.7.3 Bougierung der Harnröhre

Die blinde Dilatation der Harnröhrenstriktur ist das älteste Therapieverfahren zur Behandlung der Harnröhrenstriktur. Mit diesem Therapieverfahren können epitheliale, kurze (< 2 cm) Strikturen geheilt werden [Bandhauer et al., 1991].

Die Bougierung der Harnröhre wird nötig, wenn nach mehrfacher Urethrotomia interna wiederholt Strikturrezidive aufgetreten sind oder bei missglückten Harnröhrenplastiken, um die Kontinuität der Harnröhre aufrechtzuerhalten, wenn eine Korrekturoperation nicht möglich ist [Bandhauer et al., 1991].

Urodynamisch wenig wirksame Strikturen können durch Bougierung in größeren Zeitabständen (1-2 Mal im Jahr) stationär gehalten werden [Bandhauer et al., 1991].

Die Durchführung der Harnröhrenbougierung ist nicht einfach, da diese ohne Sicht durchgeführt wird. Die Striktur wird mit einem dünnen Katheter (8-10 Charr.) sondiert und dann mit größeren Kathetern die jeweils 2 Charr. mehr aufweisen, vorsichtig bougiert. Der letzte Katheter sollte einen Durchmesser von 24 Charr. nicht überschreiten und verbleibt für 10 – 15 Minuten in der Harnröhre [Pansadoro et al., 1998].

Als Alternative können auch Ballonkatheter verwendet werden. Diese werden im nicht dilatierten Zustand in die Harnröhre eingeführt und bis wenige Zentimeter proximal über die Striktur vorgeschoben. Wenn der Ballon richtig positioniert ist, wird er von 9 French Leerzustand bis zu 26 French aufgefüllt und einige Minuten so belassen. Dieser Vorgang wird mehrmals in Abständen von Tagen wiederholt [Levine et al., 1997]. Als Vorteil sind die einfache technische Durchführung und der sofortige Therapieerfolg zu nennen. Nachteilig ist jedoch die hohe Rezidivrate und die damit verbundenen Wiederholungsbehandlungen [Levine et al., 1997].

Da die Bougierung der Harnröhrenstriktur zu einer Zerreißung der Narbe im Strikturbereich führt, dort Erreger in das Corpus spongiosum und in die Blutbahn eindringen können, kann es zu Komplikationen kommen [Bandhauer et al., 1991].

Das Auftreten von posttherapeutischen Ödemen im Bereich der dilatierten Striktur kann zu einem vorübergehenden Verschluss der Harnröhre mit Harnretention führen.

2.7.4 End-zu-End Anastomose

Die End-zu-End Anastomose ist das Mittel der Wahl bei kurzstreckigen Strikturen im bulbären bzw. bulbomembranösen Harnröhrenabschnitt (Heilungsrate: 80-95%) oder wenn eine initiale Urethrotomia interna rezidiert [Bandhauer et al., 1991].

Dieses Verfahren ist bei allen Strikturen, die eine Länge von maximal 2 cm nicht überschreiten, unabhängig von ihrer Ätiologie anwendbar [Bandhauer et al., 1991].

Nach Identifikation und Mobilisation der Striktur wird diese exzidiert. Beide verbleibenden Urethraenden müssen frei von narbigen Anteilen sein und locker aneinander approximiert werden können, damit keine Nahtdehiszenzen oder Restrikturen entstehen. Um eine weite Anastomose zu ermöglichen, werden der proximale und der distale Harnröhrenstumpf an ihrer Vorder- und Rückwand auf einer Länge von 5 mm spatuliert [Bandhauer et al., 1991].

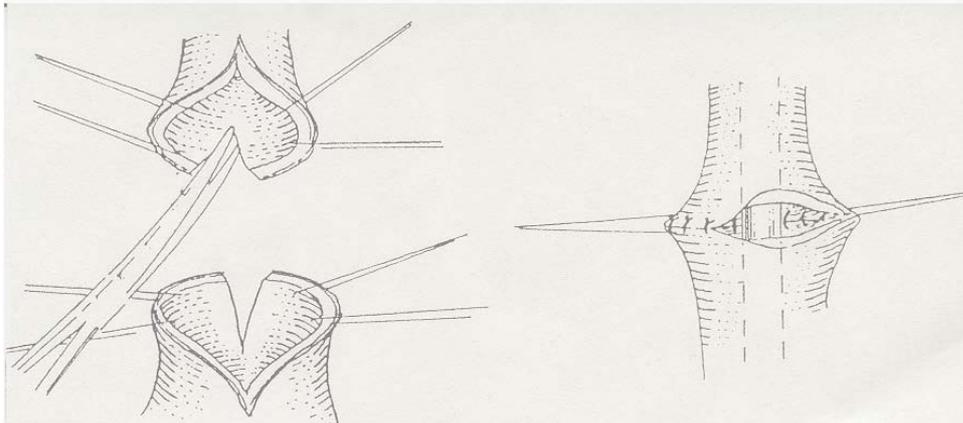


Abb. 16: End-zu-End Anastomose, Bandhauer, K., Schreiter, F., Operative Therapie der Harnröhrenstriktur, Thieme Verlag 1991

2.7.5 Offene Harnröhrenplastiken

Bei längeren Harnröhrenstrikturen oder nach wiederholtem Rezidiv nach mehrmaliger Schlitzungen ist eine Rekonstruktion der Harnröhre mittels einer Harnröhrenplastik notwendig.

Für die Rekonstruktion eignet sich ein gestielter Lappen der distalen Penisschafthaut oder ein freies Implantat, wie z. B. Mundschleimhaut oder Vollhaut. Der Einsatz von gestieltem Vorhautlappen zur vorderen Harnröhrenrekonstruktion bei der Hyospadie hat sich seit den operativen Veränderungen in den 80er Jahren durch Duckett [Ducket, 1995] als Standardmethode durchgesetzt [Baskin et al., 1994].

Freie Transplantate sind notwendig, wenn nicht genügend Penishaut zur Verfügung steht, um das erkrankte Harnröhrensegment vollständig zu überbrücken. Die Mundschleimhaut bietet im Gegensatz zu den traditionell genutzten Transplantaten viele Vorteile. Sie ist haarlos und

besitzt ein elastinreiches Epithel, wodurch es sehr widerstandsfähig ist. Die darunter liegende Lamina propria ist dünn und ausgezeichnet vaskularisiert. Dies fördert die Imbibition des Gewebes [Morey et al., 1998]. Die Entnahme ist technisch einfach und die Entnahmestelle ist äußerlich nicht sichtbar. Allerdings ist die Größe begrenzt und bei der Entnahme ist zu beachten, dass es nicht zur Beeinträchtigung des Buccinatormuskels oder zu einer Läsion des bukkalen Astes des N. facialis kommt [Seibold et al., 2005].

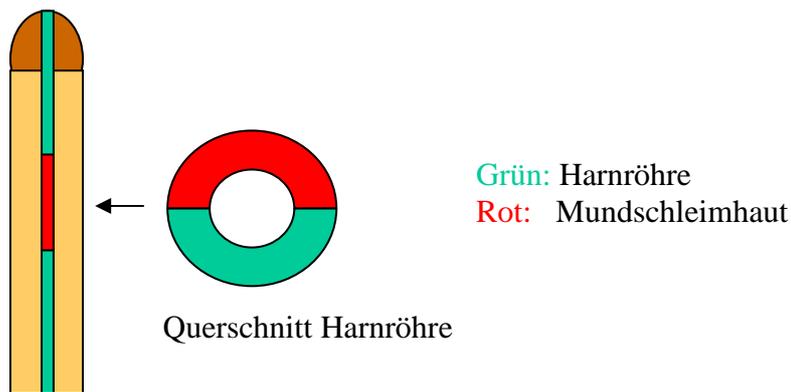


Abb. 17: Harnröhrenplastik mit Mundschleimhaut als freies Transplantat

Diese Harnröhrenplastiken können einzeitig oder zweizeitig durchgeführt werden. Die zweizeitige Operation wird bei komplexen Strikturen als sicheres und effektives Verfahren, z.B. nach multiplen frustranen Rekonstruktionsversuchen, als Möglichkeit in Betracht gezogen, da im narbigen Transplantationsbett das Anwachsen des Transplantats mit Schwierigkeiten behaftet sein kann [Seibold et al., 2005].

Die langfristigen Heilungsraten liegen bei ca. 90% bei der Verwendung freier Transplantate [Seibold et al., 2005, El-Kassaby et al., 1993].

Entscheidend für das Überleben der freien Transplantate ist die Nährstoffversorgung aus einem gut durchbluteten Empfängerbett und das anschließende Einwachsen von Kapillaren [Seibold et al., 2005].

Bei der Verwendung von körpereigenen Ersatzgeweben wie Mundschleimhaut oder freien bzw. gestielten Hauttransplantate können eine Vielzahl von Nebenwirkungen, wie metabolische Störungen, Schleimbildung, Urolithiasis oder Malignomentstehung auftreten [Bartsch et al., 2004, Corvin et al., 2004]. Aufgrund dieser Komplikationen und der begrenzten Verfügbarkeit der erforderlichen Gewebe, ist es notwendig, autologes Ersatzgewebe mit den Methoden des Tissue Engineerings herzustellen. Dieses hat den großen Vorteil der physiologischen und immunologischen Kompatibilität [Maurer et al., 2005].

2.8 Tissue Engineering eine Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapieansätze

Das Tissue Engineering beruht auf der Herstellung von bioartifiziellen Konstrukten oder Geweben, die aus vitalen Zellen bzw. einer Zellmatrix und biokompatiblen Trägermaterialien bestehen. Das Prinzip des Tissue Engineerings beinhaltet zunächst die Entnahme einer kleinen Gewebeprobe, die nur geringe Mengen an Ausgangszellen liefert. Die Zellen werden aus dem Gewebeverband herausgelöst und in vitro vermehrt werden.

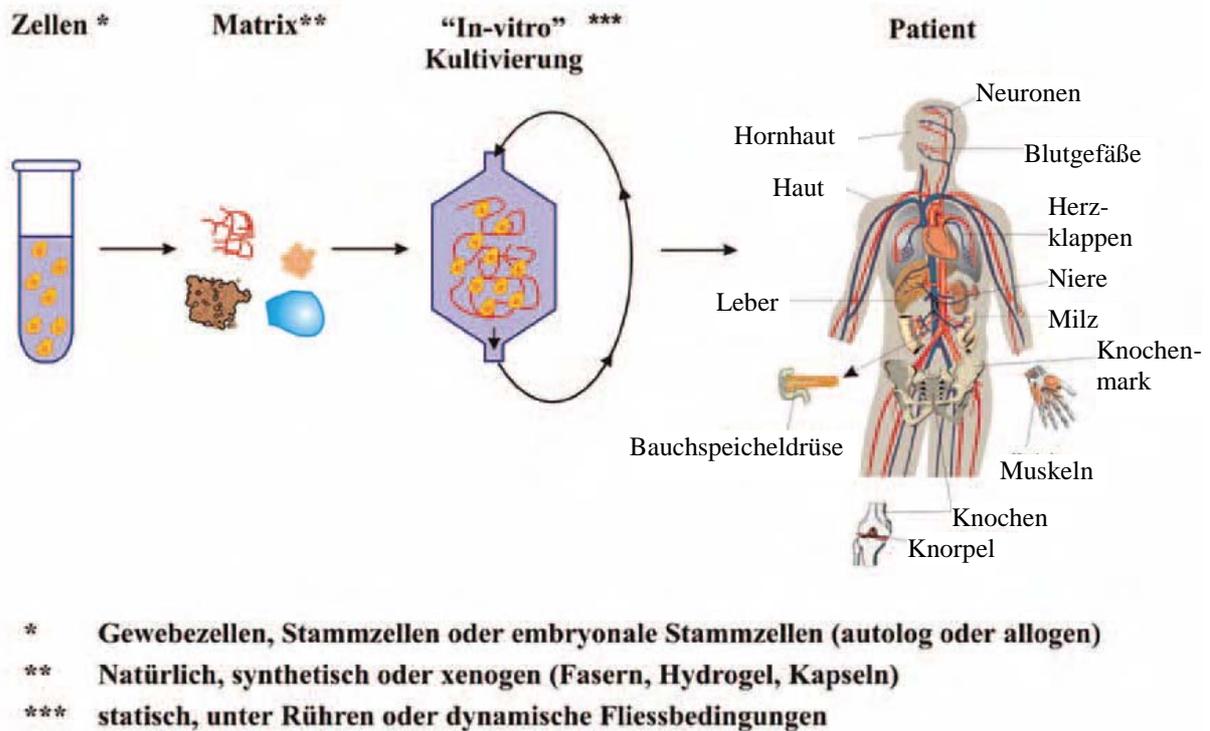


Abb. 18: Das Prinzip des Tissue Engineering, Der Mensch, sein eigenes Ersatzteillager, C. Kasper, F. Stahl. Herstellung von funktionellen Geweben in vitro aus körpereigenen kultivierten Zellen als Ersatzgewebe

Diese Primärzellen können in geeignete Trägermaterialien eingebracht werden, indem sie durch Zugabe einer Gelkomponente im Trägermaterial immobilisiert werden. Als Gelkomponenten kommen folgende Hydrogele in Frage: Agarose, Fibrin, Alginat, Hyaluronsäure sowie Chitosan. Für den Einsatz von Hydrogelen im Tissue Engineering ist in erster Linie die Resorptionszeit von großer Bedeutung. Eine zu schnelle Resorption führt dazu, dass das Hydrogel, welches als temporäre Matrix und zur homogenen Verteilung der Zellen im Trägermaterial dient, seine Funktion nicht über einen ausreichend langen Zeitraum beibehält. Die Folge könnte eine inhomogene Verteilung der Zellen im Trägermaterial sein, da die Schwerkraft die Zellen in den unteren Teil des Trägermaterials zieht. Zudem ist die klinische Zulassung des verwendeten Hydrogels im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung unerlässlich. Eine Vielzahl von resorbierbaren und auch nichtresorbierbaren Biomaterialien bieten sich als Trägermaterialien an.

Mit der Methode des Tissue Engineerings wurde im Laufe der letzten 18 Jahre versucht, eine Vielzahl von menschlichen Geweben zu rekonstruieren. Herausragende Resultate sind im Bereich des Hautersatzes sowie bei der Knochen- und Knorpelrekonstruktion erzielt worden. In diesen Bereichen erfolgt bereits die klinische Anwendung. Autologes Gewebe, erschaffen mittels Tissue Engineerings, bietet den großen Vorteil der physiologischen und immunologischen Kompatibilität [Maurer et al., 2005].

Die Herstellung von Organen, z. B. die der Leber, der Niere, die schon durch ihren diffizilen Aufbau als schwierige Forschungsobjekte anzusehen sind, befindet sich noch in einer experimentellen Phase.

Auch in der Urologie ist das Tissue Engineering eine etablierte, aber noch in weiten Bereichen experimentelle Forschungsrichtung. Es hat das Potenzial, die chirurgisch-rekonstruktiven Möglichkeiten der Urologie zu erweitern [Maurer et al., 2005].

Geforscht wird u. a. im Bereich der Urothelrekonstruktion als Therapie von Harnröhrendefekten, im Bereich der Stammzelltherapie zur Regeneration des Blasenspinkters und im Bereich des kompletten Blasenersatz.

Primärkulturen von Urothelzellen werden durch Biopsiematerial und Blasenspülflüssigkeit gewonnen [Feil et al., 2003, Fossum et al., 2003]. Diese Zellen können direkt nach erfolgreicher Kultivierung in einem Trägermaterial (Zellkulturmedium, Hydrogel, Fibrinkleber) [Wechselberger et al., 1998] in den Empfängerorganismus appliziert oder auf azellulären synthetischen oder natürlichen biodegradierbaren Trägermaterialien (matrices, scaffolds) weiter kultiviert werden. Als synthetische biodegradierbare Trägermaterialien können Polymere wie z. B. Polyglycolsäure (PGA), Polylactidcopolyglycolid (PLGA) und Polylactid (PLA) eingesetzt werden. Für die Verwendung von natürlichen Trägermaterialien können Kollagenmatrizes wie z. B. deepithelialisierte Blasensubmukosa oder porcine SIS (small intestine submucosa) zum Einsatz kommen [Stenzl et al., 2001]. Der Vorteil der azellulären Matrizes ist die gute immunologische Verträglichkeit, die Nachteile sind, wie in Tiermodellen teilweise beschrieben, auftretende Fibrosen und Entzündungsprozesse [Corvin et al., 2004, Yamato, 2004]. Bei einem zu langsamen Aufbau des Neoeithels können die Konstrukte schrumpfen, wodurch deren Funktion nicht mehr gewährleistet ist [Schaefer et al., 1998].

Als Alternative zur Verwendung von urothelialen Zellen in Einzel-Zell-Suspension, können die Zellen nach erfolgreicher Kultivierung stratifizieren werden, um ein flächiges, mehrlagiges Urothelgewebe zu gewinnen [Maurer et al., 2005].

Für den Blasenersatz wird im Bereich der Ko-Kultivierungskonstrukte geforscht. Es wird versucht ein Gewebe in Schichten aus Muskelzellen, Fibroblasten und Urothelzellen, ähnlich der Blasenwand, ohne eine Durchmischung der beteiligten Zelltypen aufzubauen [Fossum et al., 2004].

Alle diese Forschungsrichtungen sind viel versprechend, befinden sich jedoch in der experimentellen Phase und sind noch nicht für den klinischen Einsatz anwendbar.

3. Zielstellung

Harnröhrenstrikturen sind ein häufiges Problem beim urologischen Patienten und deren Behandlung stellt für den Operateur eine große Herausforderung da. Die endoskopische Schlitzung unter Sicht (Urethrotomia interna) ist eine häufig angewandte Operationsmethode in der Harnröhrenstrikturtherapie. Jedoch kann bei 24-68 % der Patienten die Striktur nicht dauerhaft behoben werden und es bedarf erneuter Folgeoperationen. Eine Senkung der Rezidivrate könnte durch den Einsatz von in vitro expandierten autologen Urothelzellen erzielt werden. Dadurch könnten nachfolgende Fibrosierungen und Rezidivstrikturen reduziert bzw. verhindert werden.

Derzeit existieren keine etablierten klinischen Verfahren zur Therapie von Harnröhrendefekten mittels Tissue-Engineering mit autologen Urothelzellen. Im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung soll ein Großtiermodell (Minipig) zur Therapie von Harnröhrenstrikturen mit in vitro gezüchteten autologen Urothelzellen etabliert werden. Im Tierversuch soll untersucht werden, ob sich beim Minipig mittels in vitro gezüchteten autologen Urothelzellen in einer Suspension aus Kulturmedium und stabilisierter Hyaluronsäure zur Versorgung einer zuvor gesetzten Harnröhrenläsion eignen.

Der Einsatz autologer Urothelzellen im Großtiermodell für die Therapie von Harnröhrenstrikturen erfordert die Prüfung der Qualität und Funktionalität der zu transplantierenden Zellen.

Ziel dieser Arbeit war es folgende Sachverhalte zu prüfen:

1. Bleibt der epitheliale Phänotyp über die Kulturdauer von Passage 0-5 erhalten?
Welche Zytokeratine werden von den porcinen Urothelzellen in vitro exprimiert?
Kommt es zu Dedifferenzierung der porcinen Urothelzellen im Kulturverlauf?
2. Welchen Einfluss hat die Zellmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 auf die porcinen Urothelzellen hinsichtlich Biokompatibilität?
3. Welchen Einfluss hat die Trägermatrix stabilisierte Hyaluronsäure auf den epithelialen Phänotyp, die zelluläre Morphologie und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten?

Die Phänotypisierung der porcinen Urothelzellen soll mittels Immunzytochemie und Westernblot-Analysen hinsichtlich der Zytokeratine CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, CK20 und des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 erfolgen.

Der Einfluss der Zellmarkierung hinsichtlich Biokompatibilität und Stabilität soll mittels WST1-Test (Vitalität), BrdU-Test (Proliferation) und Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

Die Biokompatibilität der Hyaluronsäure soll hinsichtlich Vitalität mittels WST1-Test näher charakterisiert werden, um eventuelle zytotoxische Einflüsse durch die Hyaluronsäure auszuschließen.

Des Weiteren soll der Einfluss der Hyaluronsäure auf den epithelialen Phänotyp der Urothelzellen in einem Ko-Kulturmodell mit murinen Fibroblasten mittels Immunzytochemie überprüft werden. Zusätzlich sollen in diesem Ko-Kulturmodell die zelluläre Morphologie mittels Rasterelektronenmikroskopie und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten mittels Transmissionselektronenmikroskopie näher charakterisiert werden.

Nur durch die in vitro Daten kann die Planung und Umsetzung des Tierversuches optimal umgesetzt werden. Sie stellen eine wichtige und essentielle Grundlage für die in vivo Applikation von autologen Urothelzellsuspensionen im Hinblick auf die Etablierung einer endoskopischen Therapie von Harnröhrenstrikturen da.

4. Material und Methoden

4.1 Zellkultur von porcinen Urothelzellen

4.1.1 Gewinnung von Urothelzellen aus Harnleitern und -blasen

Das Gewebe (Harnblase, Harnleiter) wurde unter semisterilen Bedingungen im Schlachthof von getöteten Schweinen entnommen.

Das Gewebe wurde mit 1x Phosphat gepufferten Salinelösung (1 x PBS) gespült und von Fett- und lockerem gefäßführendem Bindegewebe befreit. Danach wurden Blase und Ureter der Länge nach aufgeschnitten und in ca. 2 x 2 cm große Teile seziiert, und dann in einer Stripping Solution (Hanks Salt Solution (Gibco) mit 10 mM Hepes (Gibco), 20KIU/ml Aprotinin (Bayer)) für 2 Stunden inkubiert. Danach wurden die Gewebestücke in ca. 5 ml Komplett-Medium (Keratinozyten serumfreies Medium (Gibco) mit 25 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (BPE) (Gibco), 0,2 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor (rhEGF) (Gibco) und 30 ng/ml Cholera toxin (CT)) aufgenommen und das Urothel mit einem Zellschaber entfernt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Greinerröhrchen aufgenommen und 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in 5 ml Komplett-Medium resuspendiert. Die Kultivierung der primären porcinen Urothelzellen erfolgte in T75 Zellkulturflaschen (Falcon), die zuvor mit Collagen A (Biochrom AG) beschichtet wurden.

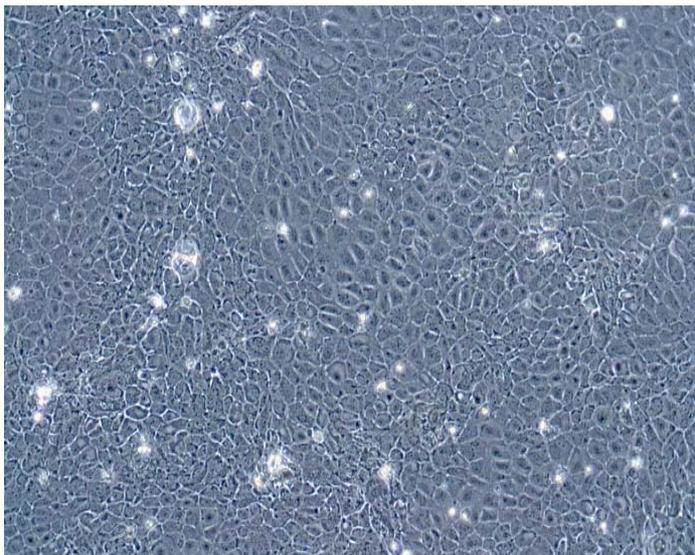


Abb 19: Phasenkontrastaufnahme von primären porcinen Urothelzellen; Passage 3; 100-fache Vergr.

4.1.2 Zellkulturbedingungen

Die Urothelzellen wurden in einem serumfreien Medium (Gibco) kultiviert, das für Keratinozyten optimiert wurde [Southgate et al. 1994]. Dem Medium wurden 25 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (Gibco), 0,2 ng/ml rhEGF (Gibco) und 30 ng/ml Cholera toxin zugesetzt. Das Medium wurde in der Regel alle zwei Tage oder bei Bedarf auch häufiger gewechselt.

Die Zellkulturen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten (Standardbedingungen).

4.1.3 Passagieren von Urothelzellen

Bei einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen mit 10 ml 1 x PBS (Gibco) gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA (0.25%) (Gibco) bei 37 °C vom Boden der Kulturflasche gelöst, mit 7 ml Medium verdünnt und in einem 15 ml Greinerröhrchen 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Zellkulturmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:2 weiterkultiviert.

4.1.4 Bestimmung der Zellkonzentration mittels Trypanblaufärbung (Vitalfärbung)

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann. Die Farbstoffaufnahme der Zellen ist pH-Wert abhängig. Die maximale Aufnahme findet bei einem pH-Wert von 7,5 statt. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell.

Eine Probe der entsprechenden Zellsuspension wurde aus dem jeweiligen Kulturgefäß entnommen und im Verhältnis 1:2 mit gepufferter Trypanblau-Lösung (0,4% Trypanblau; 0,81% NaCl; 0,06% KH₂PO₄) zur Diskriminierung toter von lebenden Zellen gemischt. Die Zelldichte wurde in einer Neubauer-Zählkammer mit einem Invertmikroskop (Zeiss) bei 100-facher Vergrößerung im Phasenkontrast bestimmt. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100$$

4.1.5 Kryokonservierung von Zellkulturen

Die abtrypsinierten Zellen wurden mit 7 ml Medium in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt und bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 1 ml Einfriermedium (50% Medium, 40% fötales Kälberserum (Gibco), 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen (Greiner) überführt. Dieser Vorgang wurde auf Eis durchgeführt und die Zellproben in einem Cryo Freezing Container bei -80 °C eingefroren (Einfrierungskinetik 1 °C/min). Nach 24 Stunden wurden die Zellproben in flüssigen Stickstoff für eine permanente Lagerung überführt.

4.1.6 Auftauen von Zellen

Die tiefgefrorene Zellsuspension wurde in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37 °C aufgetaut, in 40 ml vorgewärmtes Medium aufgenommen und bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und die Zellen anschließend in einer T25 Zellkulturflasche (Falcon) mit 5 ml Kulturmedium ausgesät.

4.2 Phänotypisierung von in vitro kultivierten porcinen Urothelzellen

Für die Phänotypisierung der porcinen Urothelzellen wurde das Zytokeratinmuster (CK) in den verschiedenen Passagen (Passage 0 bis Passage 5) mittels Immunzytochemie und Westernblot untersucht.

4.2.1 Immunzytochemie von kultivierten Urothelzellen mit dem Dako EnVision™

System

Für die immunzytochemischen Analysen von Zellen in verschiedenen Passagen wurden monoklonale Antikörper spezifisch gegen CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, CK20, AE1/AE3 (Konzentration siehe Tabelle 2) verwendet. Die isolierten bzw. enzymatisch abgelösten Urothelzellen wurden mit Komplett-Medium auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 0,5 ml pro Well auf gekammerte Objektträger (Corning Incorporated) aufgetragen und im Zellkulturschrank 3-4 Tage kultiviert, bis die Zellen 90% konfluent waren. Sind die Zellen konfluent gewachsen, wurde

das Medium abgesaugt und die Präparate 10 Minuten mit Aceton bei 4 °C fixiert und danach luftgetrocknet. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Anschließend wurden die Objektträger 5 Minuten mit 1 x PBS gewaschen und dann für 10 Minuten einer Saponinbehandlung (Sigma-Aldrich) (Konzentration 1:50 mit 1 x PBS verdünnt) unterzogen. Zur Entfernung des Detergenz wurden die Proben 3 x mal für 2 Minuten mit 1 x PBS (Biomerieux) gewaschen.

Nach der Saponinbehandlung wurden die freien Bindungsstellen 5 Minuten mit endogenem Enzymhemmer (Dako Cytomation) blockiert und die Präparate mit 1 x PBS (Biomerieux) gewaschen. Der primäre Antikörper (AE1/AE3, CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, CK20) wurde mit 1 x PBS verdünnt, aufgetropft und für 1 Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Bei der Negativ-Kontrolle wurde 1 x PBS ohne Antikörper verwendet.

Primärantikörper	Wirt	Konzentration W.B.	Konzentration I.H.	Firma
Anti-CK8	Maus	1:300	1:50	Acris
Anti-CK14	Maus	1:1000	1:100	Biozol
AntiCK17	Maus	1:500	1:100	Chemicon
Anti-CK18	Maus	1:500	1:100	Acris
Anti-CK19	Maus	1:300	1:10	Acris
Anti-CK20	Maus	1:200	1:10	Acris
AE1/AE3	Maus	1:10000	1:250	Chemicon
Sekundärantikörper				
Anti Maus HRP-konjugiert	Ziege	-----	gebrauchsfertig	Dako
Anti Maus Biotin-konjugiert		1:20000	-----	Cytomation Vector Labartories

Tab. 2: Antikörper für Westernblot und Immunzytochemie

Nach wiederholtem Waschen wurde ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper (Dako Cytomation) für 45 Minuten in die Wells gegeben und anschließend die Präparate erneut gewaschen.

Danach wurde das DAB Chromogen Substrat (Dako Cytomation) für 5 Minuten in die Wells pipettiert und hinterher mit A. dest. gespült.

Zum Abschluss erfolgt die Kernefärbung mit Hämatoxylin und die permanente Versiegelung der Präparate mit Aquatex® (Merck).

Danach wurden die Zellen im Lichtmikroskop (Zeiss) mit der 100-fachen Vergrößerung beurteilt und photographisch dokumentiert.

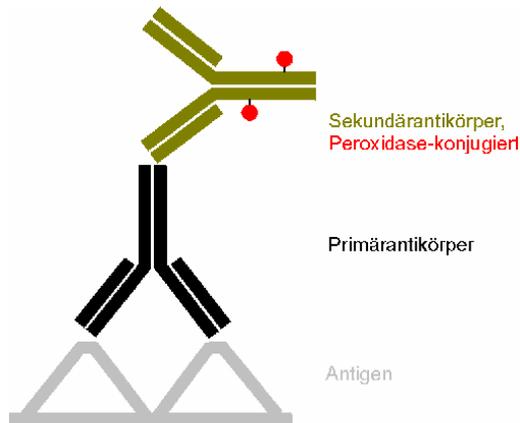


Abb. 20: Immunzytochemie: Indirekte Methode, T. Boenisch et al., 2003, Immunchemische Färbemethoden, Dako Cytomation

4.2.2 Phänotypisierung der primären porcinen Urothelzellen auf Proteinebene mittels Westernblotanalyse

Bei der Phänotypisierung wurden die primären porcinen Urothelzellen auf ihr Zytokeratinmuster in Abhängigkeit der Passage (0-5) und auf Apoptose untersucht.

4.2.2.1 Aufarbeitungen der Urothelzellen für den Westernblot

Die konfluenten Urothelzellen wurden in der Zellkulturflasche mit 1 x PBS (Biomerieux) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Corning Incorporated) vom Kulturflaschenboden abgelöst, in 10 ml 1 x PBS aufgenommen und 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellsediment wieder in 10 ml 1 x PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet in 150 µl Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM Natrium Pyrophosphat, 1 mM β-Glycerophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml Leupeptin) der Firma Cell Signaling mit 1% PMSF (Sigma-Aldrich) für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension für 10 Minuten in einer Eppendorf Zentrifuge bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf Tupe pipettiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.2.2 Bestimmungen der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Zellsuspension wurde mittels Bradford Methode ermittelt. Es wurde eine BSA-Stammlösung von 2 mg/ml BSA mit Lysepuffer von der Firma Cell Signaling angefertigt. Aus dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration hergestellt und die Extinktion bestimmt. Mit diesen Messwerten wurde eine Eichgerade erstellt, mit welcher nach Messung der Extinktion der unbekannt Probe, die Proteinkonzentration ermittelt werden konnte.

Als erstes wurde eine Arbeitslösung hergestellt (10 ml Bradford Reagenz der Firma Roth, 40 ml A. dest., 1,5 ml HCl (0,1 M)).

Von dieser Arbeitslösung wurde 1 ml in jede Plastikkuvette pipettiert. Dann wurden 10 µl der jeweiligen Probe hinzu gegeben und gründlich gemischt.

Die Ansätze wurden 5 Minuten inkubiert und anschließend mit einem Spektrophotometer (Amersham) die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Eichgerade bestimmt.

4.2.2.3 SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese

SDS ist ein anionisches Detergenz mit einer starken Affinität zu Proteinen. Die Proteine werden durch SDS denaturiert und erhalten proportional zu ihrer Molekülmasse negative Ladungen. Im elektrischen Feld wandern sie zur Anode und werden im Gel entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt.

Es wurden 30 µg Protein der Proben mit 1 x SDS Probenpuffer (Fermentas) auf ein Volumen von 20 µl verdünnt und anschließend bei 90 °C für 5 Minuten erhitzt, um die Proteine vollständig zu denaturieren.

Die Proteine wurden in einem 12% Polyacrylamidgel (Fertiggel: Pager Gold Precast Gel der Firma Lonza Rockland) aufgetrennt.

Der Einlauf der Proben erfolgte in einer Elektrophoresekammer (Peqlab Biotechnologie GmbH) mit 75 V für 10 Minuten, die Auftrennung mit 150 V für ca. 1 Stunde. Der verwendete Elektrophoresepuffer enthielt 25 mM Tris (AppliChem), 192 mM Glycin (AppliChem) und 0,1% SDS (AppliChem).

4.2.2.4 Western Blot

Western Blot Analysen dienen der Identifizierung von Antigenen durch spezifische mono- oder polyklonale Antikörper. Nach Trennung der antigenen Proteine mittels SDS-

Gelelektrophorese werden sie unter Einfluss eines vertikal zum Gel angelegten elektrischen Feldes auf eine PVDF Membran transferiert und dort immobilisiert.

Nach der Bindung des spezifischen Antikörpers (Primärantikörper) an das Antigen, erfolgt die Detektion des Komplexes durch einen Primärantikörper spezifischen biotinylierten Immunglobulins (Sekundärantikörper). Nach dem Sekundärantikörper erfolgt die Bindung eines Peroxidaseenzym aus Meerrettich (horse radish peroxidase, HRP) und einem Avidin-Biotin Enzymkomplex. Unter Verwendung von Peroxidase Substraten erfolgt die quantitative Detektion der Antikörper und damit des Antigens.

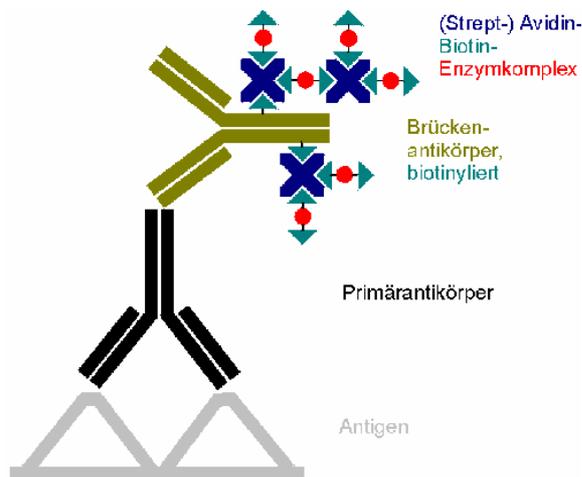


Abb. 21: Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode , T. Boenisch et al., 2003, Immunchemische Färbemethoden, Dako Cytomation

Die elektrophoretisch getrennten Proteine wurden mit einem Semi-Dry Blot (Firma Pequalab) auf eine PVDF Membran (Firma Roth) transferiert. Die Membran wurde vor der Anwendung 5 Minuten mit Methanol rehydriert, 1 Minute in A. dest gewaschen und anschließend in Transferpuffer aufbewahrt. Der Sandwich-Blot wurde so aufgebaut, dass die negativ geladenen Proteine unter Einfluss des angelegten elektrischen Feldes vom Gel in Richtung der Anode auf die Membran wanderten. Der verwendete Transferpuffer enthielt 2% Methanol, 48 mM Tris-HCl (AppliChem), 39 mM Glycin (AppliChem) und 0,1% SDS (AppliChem) (pH: 8,3). Der Transfer erfolgte bei 70 mA für 1 Stunde.

Nach dem Transfer wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in Blockierungspuffer (Roti®-Block) (1:10 in A. dest.) über Nacht blockiert. Die Membran wurde 24 Stunden unter Schütteln mit der Primärantikörperlösung (Konzentration siehe Tab. 3) inkubiert, dreimal mit 1 x PBS gewaschen und mit einem Spezies-spezifischen biotinylierten Sekundärantikörper (Vector Labartories) 30 Minuten inkubiert.

Danach wurde die Membran wieder 3 x mal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran in einer Mischung aus Meerrettichperoxidase (HRP) und Avidin (Vectastain ABC Kit von der Firma Vector Laboratories) für 30 Minuten inkubiert und erneut gewaschen.

Dabei bindet das Avidin an den Sekundärantikörper und es entsteht ein enzymmarkierter Avidin-Biotin-Komplex mit biotinylierten Sekundärantikörper. Die spezifischen antikörpermarkierten Proteine wurden mit dem True Blue Peroxidase Substrat der Firma KPL detektiert.

Primärantikörper	Wirt	Konzentration W.B.	Konzentration I.H.	Firma
Anti-CK8	Maus	1:300	1:50	Acris
Anti-CK14	Maus	1:1000	1:100	Biozol
Anti-CK17	Maus	1:500	1:100	Chemicon
Anti-CK18	Maus	1:500	1:100	Acris
Anti-CK19	Maus	1:300	1:10	Acris
Anti-CK20	Maus	1:200	1:10	Acris
AE1/AE3	Maus	1:10000	1:250	Chemicon
Anti-Caspase-3	Rabbit	1:1000		Acris
Sekundärantikörper				
Anti Maus HRP-konjugiert	Ziege		gebrauchsfertig	Dako
Anti Maus Biotin-konjugiert		1:20000		Cytomation
Anti Rabbit Biotin-konjugiert		1:20000		Vector
				Labartories
				Vector
				Labartories

Tab. 3: Antikörper für Westernblot und Immunhistologie

4.3 Immunhistologie von Gewebeschnitten mit dem Dako EnVision™ System

Immunhistochemische Analysen wurden von nativen porcinen Harnröhren, Harnblasen und Harnleitern durchgeführt. Die nativen Gewebe wurden in Tissue Freezing Medium (Fa. Leica Mikrosystems) unfixiert eingebettet, um die empfindlichen Epitope für die Primärantikörper nicht zu maskieren. Es wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte mit dem Kryotom angefertigt.

Bei der Immunhistologie wurden monoklonale Antikörper spezifisch gegen CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, CK20, AE1/AE3 (Konzentration siehe Tab. 2) verwendet. Bei allen immunhistochemischen Färbungen wurde jeweils eine Negativkontrolle angefertigt. Alle Präparate wurden vor bzw. zwischen den Inkubationsschritten wie bei Phänotypisierung der Zellpräparate mit 1 x PBS (Biomerieux) gespült. Die Primärantikörper wurden mit 1 x PBS verdünnt (Konzentration siehe Tab. 3). Pro Objektträger wurden 150 µl des Primärantikörpers

aufgetragen. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT in einer Feuchtkammer, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern.

Als erstes wurden die Gewebeschnitte mit Aceton 10 Minuten bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation der Präparate für 10 Minuten in Peroxidase Blocking Reagent (Dako Cytomation) reduziert. Nach Auftragen der Primärantikörper wurden die Präparate für 60 Minuten inkubiert. Der weitere Nachweis erfolgte mit einem HRP (horse radish peroxidase) (Dako Cytomation) konjugierten Sekundärantikörper, der anschließend für 45 Minuten auf die Präparate aufgebracht wurde. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Chromogen Substrat AEC (Dako Cytomation) überschichtet und für 8-10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Präparate in A. dest. gespült, mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Aquatex® (Merck) eingedeckelt. Wenn das Eindeckelmedium getrocknet war, wurden die Zellen im Lichtmikroskop (Zeiss) mit der 100-fachen und 200-fachen Vergrößerung beurteilt.

4.4 Untersuchungen zum Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes PKH26 auf porcine Urothelzellen

4.4.1 PKH26 Markierung Zellen

PKH26 ist ein Fluoreszenz-Farbstoff zur eindeutigen Detektion von markierten Zellen *in vivo*. Der Farbstoff bindet an den Lipidanteilen der Zellmembran. Die Markierung der Zellen erfolgte mit einem handelsüblichen PKH26 Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich).

Die Zellen wurden wie oben beschrieben aus der Zellkulturflasche abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 300 µl Diluent C Kit PKH26 resuspendiert. In einem Eppendorf Tupe wurden ebenfalls 300 µl Diluent C Kit Lösung mit 15 µl PKH26 Linker gemischt und der Zellsuspension zugeführt und 8 Minuten bei RT inkubiert.

Anschließend wurde das Markierungsreagenz mit 10 ml Medium mit 20% fetalem Kälberserum (Gibco) abgestoppt und die Zellen mit Medium gewaschen, 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde 2 x mal wiederholt, um die Reste des Markierungsreagenz zu entfernen.

4.4.2 Proliferationsuntersuchung zum Einfluss von PKH26 auf porcine Urothelzellen mittels BrdU-Test

Der BrdU (5-Bromodesoxyuridin) Test (Roche) ist eine nicht radioaktive Methode, die zur Quantifizierung des Zellwachstums im Labor benutzt wird. Das Testprinzip besteht aus der Markierung aller im Testzeitraum neu gebildeter Zellen. Dazu wird ein Marker, das Bromdesoxyuridin dem Zellkulturmedium zugefügt, welches sich als Pyrimidinanalog an Stelle von Thymidin in die DNA neu gebildeten Zellen einbaut.

Die konfluenten Zellen wurden abgelöst und in eine 96 Wellplatte mit $1,3 \times 10^4$ Zellen/Well ausgesät. Der Test wurde 1; 2; 3; 4; 5; 6 und 7 Tage nach Zellaussaat durchgeführt.

Pro Well wurden 10 µl BrdU-Labeling Reagenz zu 100 µl Medium hinzupipettiert und 24 Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 300 µl Fix Denat Lösung für 30 Minuten fixiert und gleichzeitig die DNA der Zellen denaturiert. Dadurch wurde ein Zugang für einen gegen BrdU gerichteten, mit Peroxidase gekoppelten Antikörper (Anti BrdU-Pod) geschaffen. Pro Well wurden 250 µl Antikörper mit einer Konzentration von 1:100 hinzugegeben und 45 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde die Menge des eingebauten BrdU durch eine nach geschaltete Peroxidase Farbreaktion (250 µl Substrat pro Well für 5 Minuten) mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Die Extinktion bildet ein direktes Maß für die Proliferation der Zellen während der Markierungszeit.

4.4.3 WST-1-Test zur Messung der Zellvitalität unter dem Einfluss von PKH26 auf die Urothelzellen

Der WST-1-Test ist ein etabliertes Verfahren zur Messung der Zellvitalität. Die Testmethode basiert auf einer colorimetrischen Methode zur Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität, die ein Maß für vitale metabolisch aktive Zellen ist. Das WST-1-Reagenz ist ein Tetrazoliumsalz, welches durch zelluläre mitochondriale Enzyme in ein lösliches farbiges Formazan umgewandelt wird. In Abhängigkeit von der Menge an vitalen Zellen kommt es zur Zunahme der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität. Dieses führt zu einer verstärkten Bildung des farbigen Formazansalzes. Die Menge des gebildeten Formazansalzes ist direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen in der Kultur. Der Farbumschlag wird mittels ELISA-Readers (Amersham) durch Bestimmen der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm und gegen die Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen.

Die konfluent gewachsenen Urothelzellen wurden abgelöst, nach Herstellerangaben mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert und in eine 24er Wellplatte mit 5×10^4 Zellen/Well ausgesät. Die Platten wurden 1-7 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und 300 μ l frisches Kulturmedium pro Well hinzugegeben. Danach wurden 30 μ l WST-1-Reagenz (Roche) in jedes Well pipettiert und der Test 1 Stunde inkubiert. Danach wurden 100 μ l des Zellkulturüberstandes in eine 96-er Wellplatte pipettiert. Pro Versuchsansatz wurden 2 Proben mit je 100 μ l verwendet und aus den gemessenen Absorptionswerten der Mittelwert bestimmt.

4.4.4 Langzeitstudie zur Stabilität der PKH26-Markierung von Urothelzellen in vitro

Die abgelösten Urothelzellen wurden wie unter Punkt 4.4.1 beschrieben mit PKH26 (Sigma-Aldrich) markiert und in eine T25 Zellkulturflasche (Falcon) ausgesät. Die Dokumentation der Fluoreszenzstabilität erfolgte in regelmäßigen Abständen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M von der Firma Zeiss) und einer Farbkamera (Apotomcam H20 von Zeiss) bei einer 200-fachen Vergrößerung. Waren die Zellen 100% konfluent, wurden sie abgelöst und mit Trypanblau (0,4% Trypanblau; 0,81% NaCl; 0,06% KH_2PO_4) im Verhältnis 1:2 gefärbt. Die Zellzählung wurde in einer Neubauer Zählkammer zuerst lichtmikroskopisch und danach mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Der PKH26 positive Anteil der Zellen wurde prozentual von der Gesamtzahl der Zellen errechnet.

4.5 Untersuchungen zum Einfluss von stabilisierter Hyaluronsäure auf porcine Urothelzellen

4.5.1 WST-1-Test zur Messung der Zellvitalität zum Einfluss von verschiedenen Hyaluronsäurekonzentrationen

In eine 24-er Wellplatte (Greiner) wurden 5×10^4 Zellen/Well ausplattiert. Es wurden Hyaluronsäure-Medium-Gemische im Verhältnis von 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 untersucht. Als Positiv-Kontrolle wurden Zellen in Kulturmedium ohne Hyaluronsäure und als Negativ-Kontrolle Kulturmedium ohne Zellen verwendet. Die Platten wurden 1 Tag bis 7 Tage unter Standardbedingungen inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium und die Hyaluronsäure abgesaugt und 300 μ l frisches Komplett-Medium pro Well hinzugegeben. Danach wurden 30 μ l WST-1-

Reagenz (Roche Diagnostics) in jedes Well pipettiert und der Test 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Zellkulturüberstandes in eine 96-er Wellplatte (Greiner) pipettiert. Pro Versuchsansatz wurden 2 Proben mit je 100 µl genommen und aus den gemessenen Absorptionswerten der Mittelwert errechnet.

4.5.2 Untersuchung zum Adhärenzverhalten porciner Urothelzellen in Abhängigkeit verschiedener Hyaluronsäurekonzentrationen

Die konfluenten Urothelzellen wurden aus der Zellkulturflasche abgelöst und in eine 24-er Wellplatte (Greiner) mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml ausplattiert. Es wurden 3 Ansätze untersucht:

- 1.) Positivkontrolle:Komplett-Medium
- 2.) Komplett-Medium mit Hyaluronsäure im Verhältnis 2:1
- 3.) Komplett-Medium mit Hyaluronsäure im Verhältnis 4:1

Nach 1, 2 und 3 Tagen Inkubation bei Standardbedingungen wurde das Medium und das Hyaluronsäure-Medium-Gemisch abgesaugt und gründlich mit 1 x PBS gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, mit Trypanblau-Lösung (0,4% Trypanblau; 0,81% NaCl; 0,06% KH_2PO_4) im Verhältnis 1:2 gefärbt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die Anzahl der abgesetzten Zellen in der Kontrolle wurden als 100% deklariert und dadurch die Anzahl der adhärennten Zellen im Medium mit Hyaluronsäure prozentual errechnet.

4.6 Untersuchungen zum Einfluss von Hyaluronsäure auf porcine Urothelzellen im Ko-Kultur Modell

4.6.1 Kultivierung von murinen Fibroblasten (NIH3T3)

Die Fibroblasten wurden in DMEM Medium (Lonza) mit 4,5 g/l Glucose und 10% fötalem Kälberserum in T75 Zellkulturflaschen (Falcon) kultiviert. Das Medium wurde routinemäßig alle zwei Tage oder bei Bedarf auch häufiger gewechselt. Die Zellkulturen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Waren die Fibroblasten zu 90% konfluent, wurden diese wie die Urothelzellen passagiert.

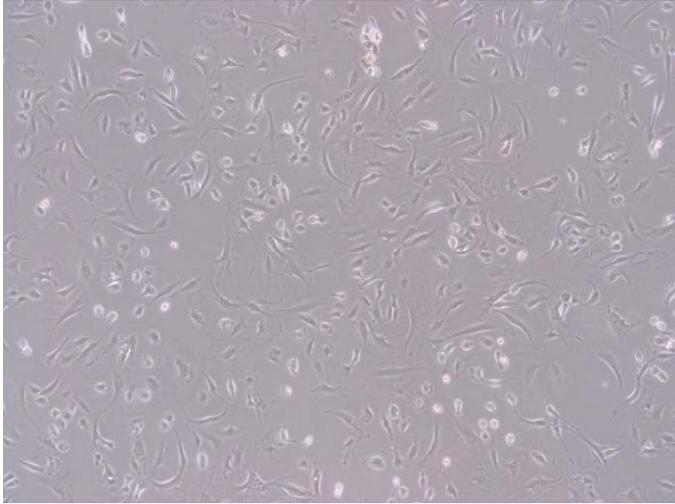


Abb. 22: Phasenkontrastaufnahme von primären murinen Fibroblasten, 50-fache Vergr.

4.6.2 Ko-Kultur von murinen Fibroblasten (NIH3T3) mit porcinen Urothelzellen

Die Ko-Kulturen wurden in einer 12-er Wellplatte (Corning Incorporated) in 12 mm Inserts (Corning Incorporated) mit einer Polyester Membran mit einem Porendurchmesser von 0,4 μm kultiviert. Für die Ko-Kulturen wurde ein Medium aus DMEM (Lonza) und Hams F12 (Lonza) im Verhältnis 3:1 mit folgenden Zusätzen verwendet: 5% fötales Kälberserum (Gibco), 5 mg/ml Insulin (Sigma-Aldrich), 5 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin (Sigma-Aldrich), 2 nM Triiodothyronin (Sigma-Aldrich), 1 nM Choleratoxin, 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Hydrokortison (Sigma-Aldrich), 10 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich), 100 ng/ml FGF7 (Sigma-Aldrich).

Am ersten Tag wurden die Fibroblasten aus der Zellkulturflasche abtrypsiniert, mit PKH26 (Sigma-Aldrich) markiert und in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ cm^2 auf den Inserts ausgesät.

Nach 2 Tagen, wenn die Fibroblasten einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, wurde deren Proliferation durch zweistündige Inkubation mit Mitomycin C (0,01g/ml in 1x PBS) (Sigma-Aldrich) inhibiert und danach mehrmals mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Urothelzellen mit einer Konzentration von $1,2 \times 10^4$ Zellen/ cm^2 auf die murinen Fibroblasten ausgesät.

Als Kontrolle wurde nur das Ko-Kulturmedium für die Dauer der Inkubation verwendet, in einem zweiten Ansatz wurde ein Hyaluronsäure-Medium-Gemisch im Verhältnis 1:4 untersucht.

Das Medium wurde bei Bedarf gewechselt. Die Inkubationszeit betrug 7, 14 und 21 Tage.

4.6.3 Immunhistologische Untersuchung der Ko-Kulturen mittels des Pan-zytokeratinmarkers AE1/AE3

Die Membranen wurde mittels Skalpell aus den Inserts gelöst und unfixiert in Tissue Freezing Medium (Leica Microsystems) eingebettet, um die empfindlichen Epitope für die Primärantikörper nicht zu maskieren. Es wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte mit dem Kryotom angefertigt.

Bei allen immunohistochemischen Färbungen wurde jeweils eine Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) mitgeführt. Die Präparate wurden vor bzw. zwischen den Inkubationsschritten wie bei Phänotypisierung der Zellpräparate mit 1 x PBS (Biomerieux) gewaschen. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT in einer Feuchtkammer, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern. Der Primärantikörper AE1/ AE3 (Chemicon) wurde mit 1 x PBS verdünnt (1:250) und für 1 Stunde inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy2 gekoppelter Antikörper (Dianova) verwendet. Dieser wurde für 45 Minuten mit einer Konzentration von 1:50 auf die Präparate gegeben. Die Präparate wurden über Nacht trocken gelassen und anschließend mit ImmunoSelect Antifading Mounting Medium + Dapi (Dianova) eingedeckt.

4.6.4 Transmissionselektromikroskopische Untersuchung der Ko-Kulturen

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) sollte der Einfluss von Hyaluronsäure auf Zell-Zell-Kontakte (Tight Junctions, Desmosomen) porciner Urothelzellen im Ko-Kulturmodell untersucht werden.

Die Transmissionselektronenmikroskopie ist eine direkte Umsetzung eines klassischen optischen Mikroskopes auf die Elektronenoptik. Im Transmissionselektronenmikroskop wird von einer Kathode unter Hochspannung ein Elektronenstrahl emittiert. Damit der Strahl nicht vor oder hinter dem Objekt von Gasteilchen absorbiert wird, muss im Mikroskop ein Hochvakuum herrschen. Durch leistungsstarke Elektromagnete kann der Strahl verändert werden. Die Elektromagnete wirken dabei wie optische Linsen in einem Lichtmikroskop und werden deshalb auch als elektromagnetische Linsen bezeichnet. Der Elektronenstrahl durchdringt das Objekt (den Ultradünnschnitt) und bildet dieses auf einen speziellen Leuchtschirm ab. Die optimale Schnittdicke der Ultradünnschnitte liegt bei 60-70 Nanometer. Für die Herstellung von Ultradünnschnitten werden besondere Mikrotome benötigt, an denen mit Glas- oder Diamantmessern geschnitten wird. Die Schnitte werden auf kleine Kupferringe (Grids) aufgelegt, die mit einer dünnen Folie bezogen sind. Um die Elektronenbeugung und

damit den Kontrast zu verstärken, können verschiedene Schwermetallionen an die Schnitte gebunden werden (Kontrastierung). Die elektronenmikroskopischen Bilder werden mit einer im Elektronenmikroskop eingebauten CCD-Kamera dokumentiert.

Durchführung:

Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Die Ko-Kulturen wurden mit einer Fixierlösung aus 25% Glutardialdehyd (Merck), Natriumcacodylat (Sigma) (0,2M Stammlösung) und 1xPBS (Gibco) fixiert.

Für die weitere Aufarbeitung wurden die fixierten Ko-Kulturen 3 x mit Kakodylatpuffer (Sigma) (0,1 M) gewaschen. Dann wurde die Probe für 2 Stunden in einer 1%igem Osmiumtetroxid-Lösung in 0,1 M Kakodylatpuffer fixiert und wieder mit Kakodylatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Ko-Kulturen für die „en bloc-Kontrastierung“ in einer Kontrastierungslösung (1% Uranylacetat in 0,05 M Maleatpuffer mit pH 5,2) über Nacht inkubiert. Am Tag darauf wurden die Proben mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 85%, 95%, 100%) entwässert und anschließend mit Propylenoxid 2 x 60 Minuten gespült.

Die Einbettung der Proben in Agar LV wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 1.) Inkubation in Propylenoxid : Agar LV im Verhältnis 1:1 für 60 Minuten
- 2.) Inkubation in Propylenoxid : Agar LV im Verhältnis 1:3 für 60 Minuten
- 3.) Inkubation in Propylenoxid : Agar LV im Verhältnis 1:7 für 60 Minuten
- 4.) Inkubation in reinem Agar LV über Nacht
- 5.) Die Silikonformen zur Einbettung blasenfrei zur Hälfte mit Agar LV ausgegossen und im Wärmeschrank bei 70°C über Nacht inkubieren lassen
- 6.) Am darauf folgenden Tag wurden die Präparate an der Stirnseite der Silikonformen platziert und die Formen mit Agar LV aufgefüllt
- 7.) Die Präparate wurden 24 Stunden im Wärmeschrank bei 70°C ausgehärtet, erst dann konnten diese aus den Formen entnommen werden

Danach wurden von den Proben Semi- und Ultradünnschnitte angefertigt und auf Blenden (Grinds) aufgebracht. Für die Transmissionselektronenmikroskopie war es notwendig die Ultradünnschnitte auf den Blenden zusätzlich mit Bleicitrat zu kontrastieren. Dann wurden die Proben 3 x 10 Minuten mit A. dest. gewaschen.

4.6.5 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Ko-Kulturen

Die Ko-Kulturen wurden wie in Punkt 3.5.4 mit Na-Cacodylat/Glutardialdehydlösung fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben mit 1 x mit Na-Phosphatpuffer gewaschen. Danach wurden sie 1 x mit 30% Etanol gespült. Anschließend wurden sie durch eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert, d. h. 1 x 10 min in 50% Ethanol, 1 x 10 min in 75% Ethanol, 1 x 15 min in 90% Ethanol und 2 x 10 min 100% Ethanol. Danach wurden die Proben Kritisch-Punkt getrocknet und anschließend mit einer ca. 10 nm dünnen Goldschicht besputtert.

Die Transmissionselektronenmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie wurden in Kooperation mit Prof. Betz im zoologischen Institut (Abteilung Evolutionsbiologie der Invertebraten) der Universität Tübingen durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 Phänotypisierung von kultivierten porcinen Urothelzellen

Die kultivierten porcinen Urothelzellen wurden hinsichtlich ihres Zytokeratinmusters näher untersucht. Immunzytochemisch und mittels Westernblot wurden quantitativ und qualitativ die Expression von den Zytokeratinen CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, CK20 und dem Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3 und deren Veränderungen während der Kulturdauer betrachtet.

5.1.1 Immunzytochemie von kultivierten porcinen Urothelzellen

In allen Passagen war die Expression des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 sehr stark (+++) ausgeprägt. Es waren alle kultivierten Zellen in der Immunzytologie positiv (Abb. 28). Die Zytokeratine 8, 17, 18 und 19 wurden in allen Passagen mittel stark (++) exprimiert (Abb. 22, 24-26). Das Zytokeratin 14 wurde nur sehr schwach (+) und vereinzelt ausgebildet (Abb. 23). Die Expression von CK20 konnte unabhängig der Passagenzahl bei den kultivierten porcinen Urothelzellen nicht detektiert werden (Abb. 28).

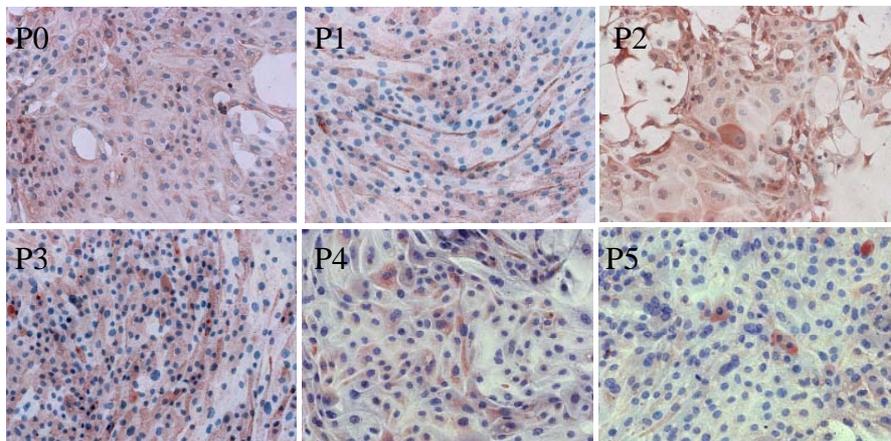


Abb. 22: Immunzytochemie von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 0-5, colorimetrischer Nachweis von Zytokeratin 8 mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100-fache Vergr.

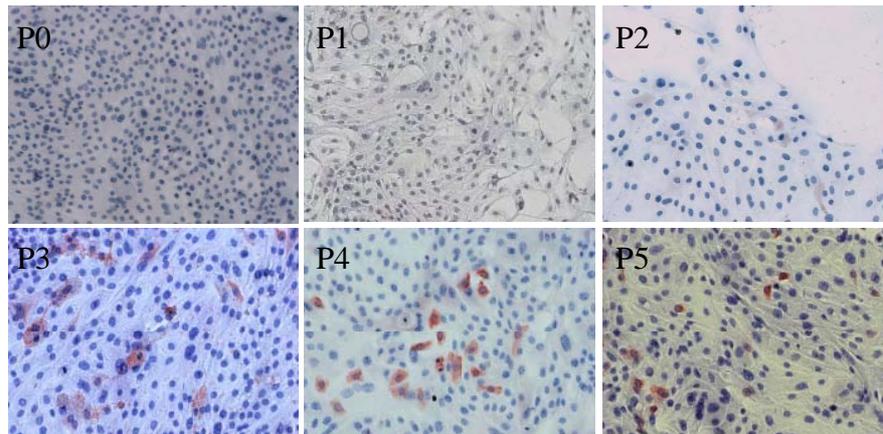


Abb. 23: Immunzytochemie von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 0-5, colorimetrischer Nachweis von Zytokeratin 14 mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100-fache Vergr.

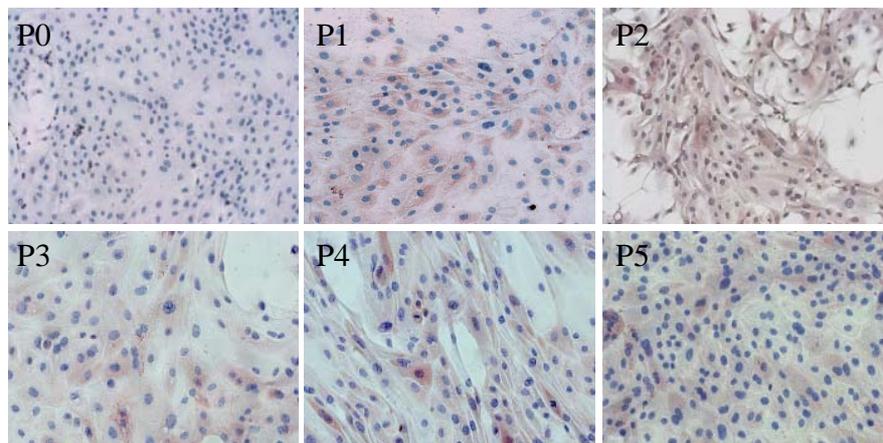


Abb. 24: Immunzytochemie von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 0-5, colorimetrischer Nachweis von Zytokeratin 17 mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100-fache Vergr.

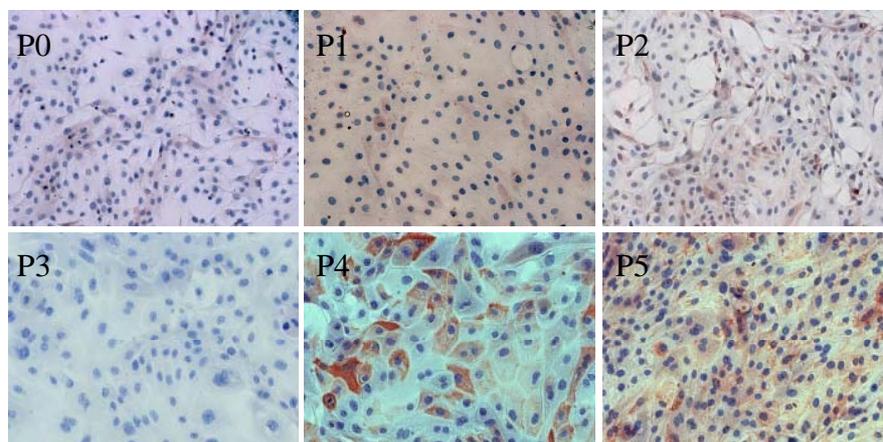


Abb. 25: Immunzytochemie von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 0-5, colorimetrischer Nachweis von Zytokeratin 18 mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100-fache Vergr.

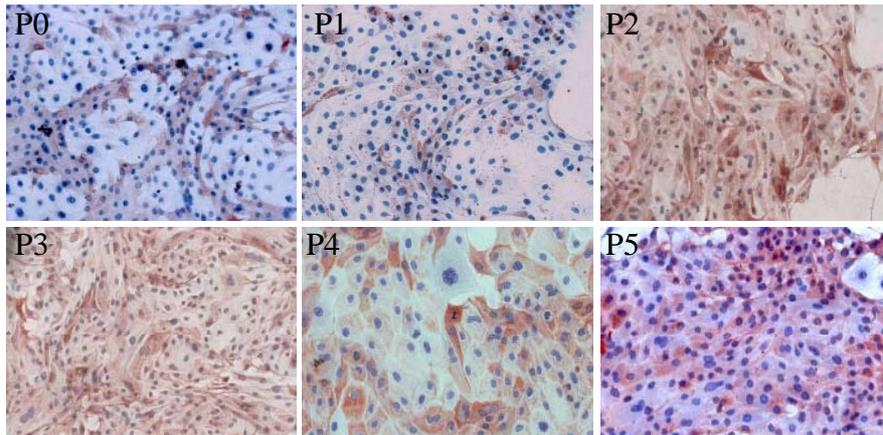


Abb. 26: Immunzytochemie von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 0-5, colorimetrischer Nachweis von Zytokeratin 19 mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100-fache Vergr.

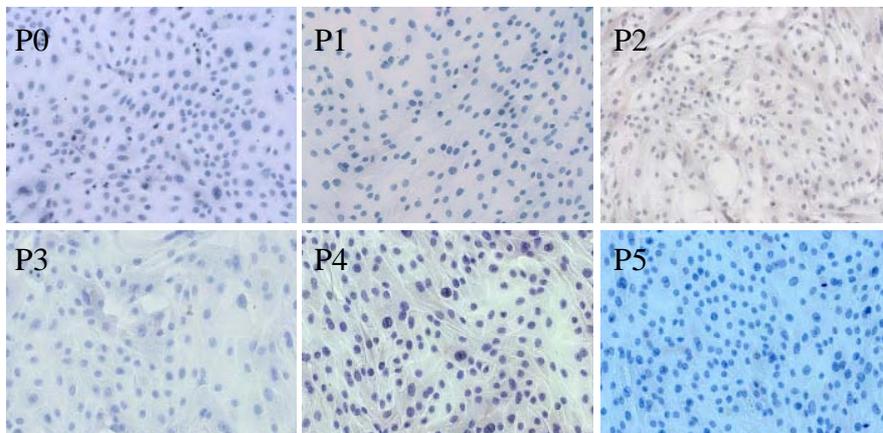


Abb. 27: Immunzytochemie von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 0-5, colorimetrischer Nachweis von Zytokeratin 20 mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100-fache Vergr.

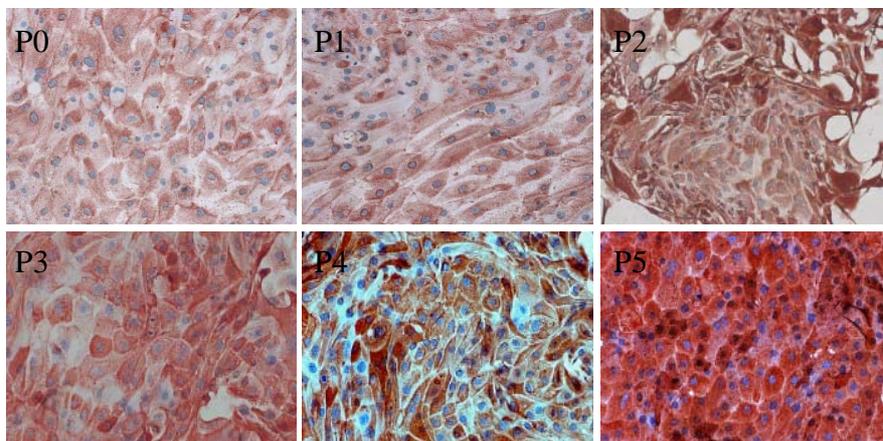


Abb. 28: Immunzytochemie von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 0-5, colorimetrischer Nachweis von Zytokeratin AE1/AE3 mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 100-fache Vergr.

Expressionslevel

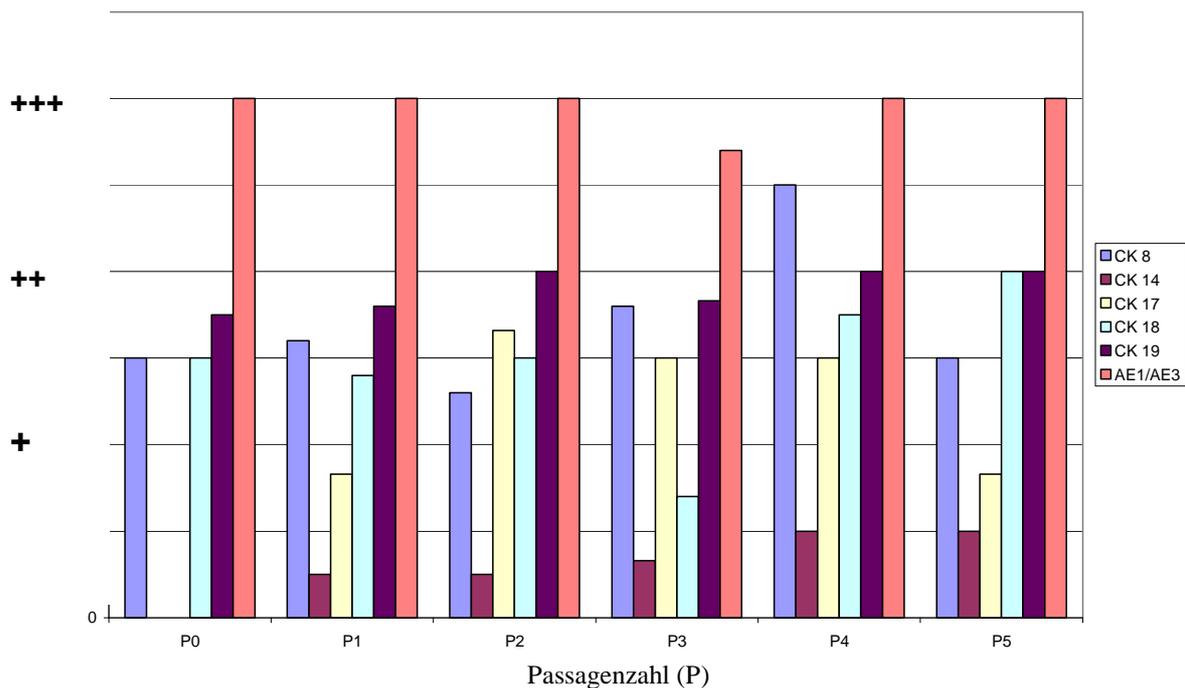


Abb.29: Vergleichende Darstellung der Expressionsintensitäten der Zytokeratinen (CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, AE1/AE3) aus der Immunzytochemie von kultivierten porcinen Urothelzellen in Abhängigkeit der Passagenzahl, + geringe Expression, ++ mittlere Expression, +++ starke Expression, n = 5

5.1.2 Westernblotanalyse von kultivierten porcinen Urothelzellen

Mittels Westernblotanalyse wurden die porcinen Urothelzellen auf die Expression von den Zytokeratinen 8, 14, 17, 18, 19, 20, den Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3 und auf den Apoptosemarker Kaspase-3 in den Passagen 0-5 untersucht. Hiermit sollten die Ergebnisse aus den immunocytochemischen Untersuchungen auf Proteinebene verifiziert werden.

Die Intensitäten der einzelnen Banden in den verschiedenen Passagen wurden mit dem Computerprogramm Alice (Proteomzentrum, Tübingen) ausgewertet. Die frisch isolierten Urothelzellen (P0) wurden als Vergleichskontrolle 100% gesetzt.

Die Expression des Zytokeratins 8 lag in der Passage 1 bei 74% und verringerte sich in Passage 3 bis auf 65%. In der Passage 5 zeigt das Zytokeratin 8 eine Expression von 73% im Vergleich zur Passage 0 (Abb. 31).

Bei dem Zytokeratin 14 war die Intensität der Expression der Urothelzellen in Passage 1 bei 75%, nahm in Passage 2 auf 102% zu und fiel dann bis Passage 5 auf 42% der Intensität der Passage 0 ab (Abb. 32).

Die Expressionsintensität des Zytokeratins 17 zeigte in den in den Passagen 0-5 keine deutlichen Veränderungen. Sie schwankte zwischen 91 und 102% (Abb. 33).

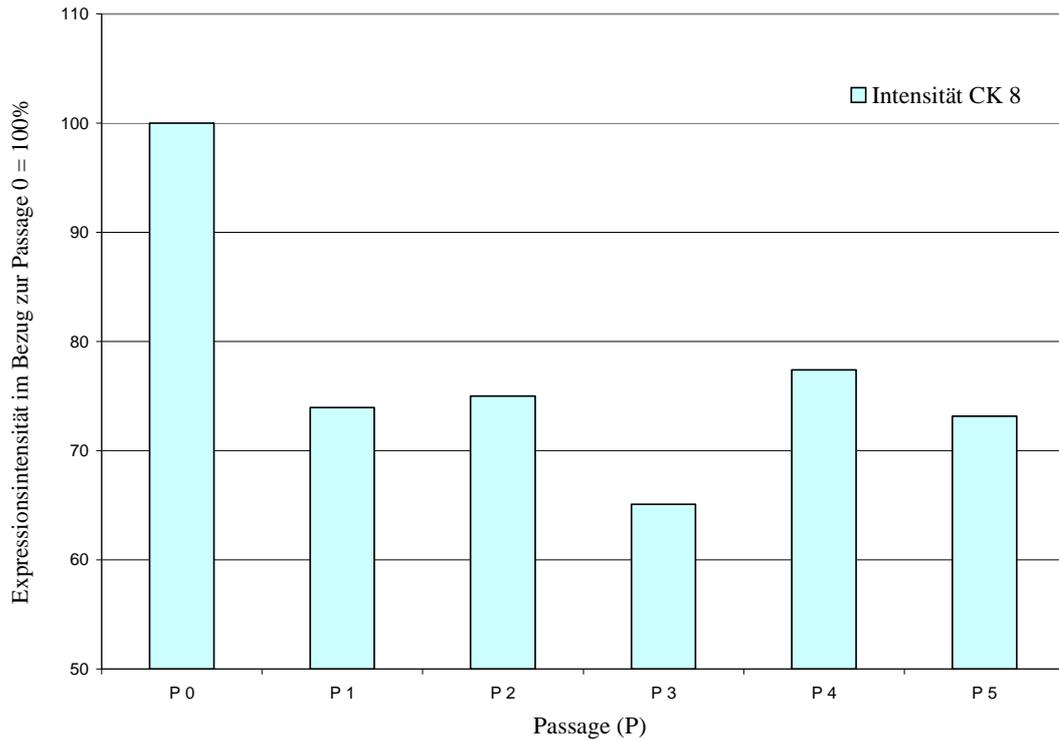


Abb. 30: Expressionsintensität des Zytokeratins 8 im Westernblot von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 1-5 im Bezug zur Kontrolle = frisch isolierte Zellen, Passage 0 = 100%, n = 2,

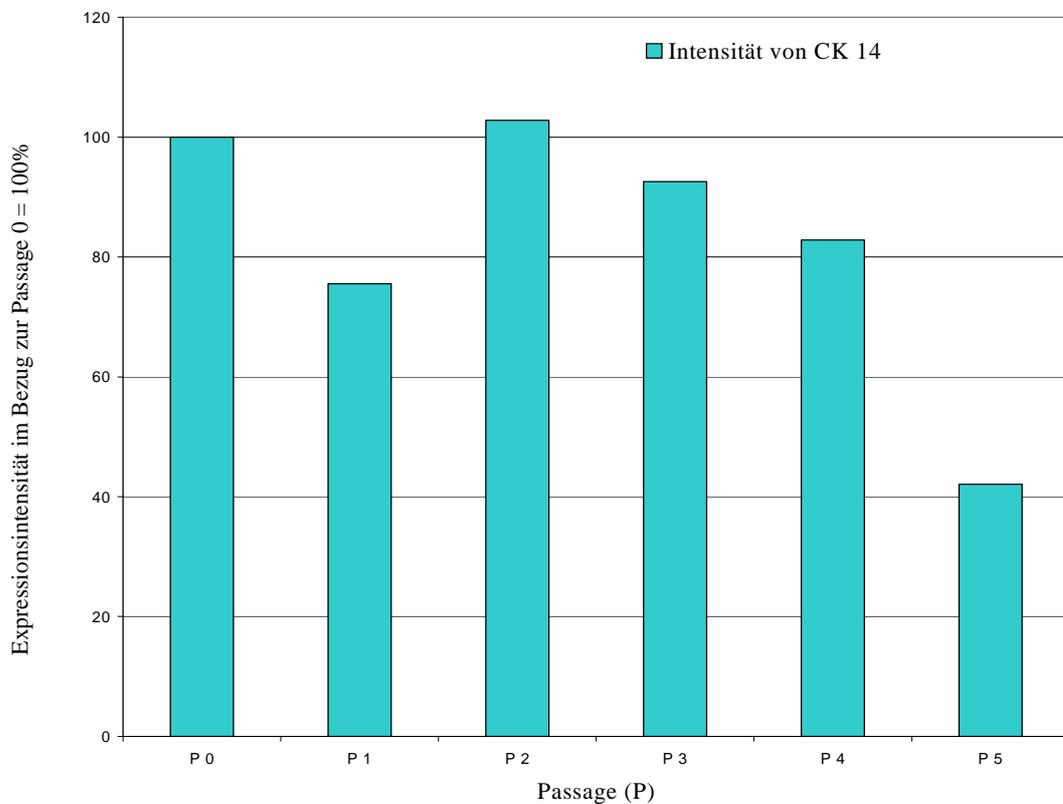


Abb. 31: Expressionsintensität des Zytokeratins 14 im Westernblot von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 1-5 im Bezug zur Kontrolle = frisch isolierte Zellen, Passage 0 = 100%, n = 2,

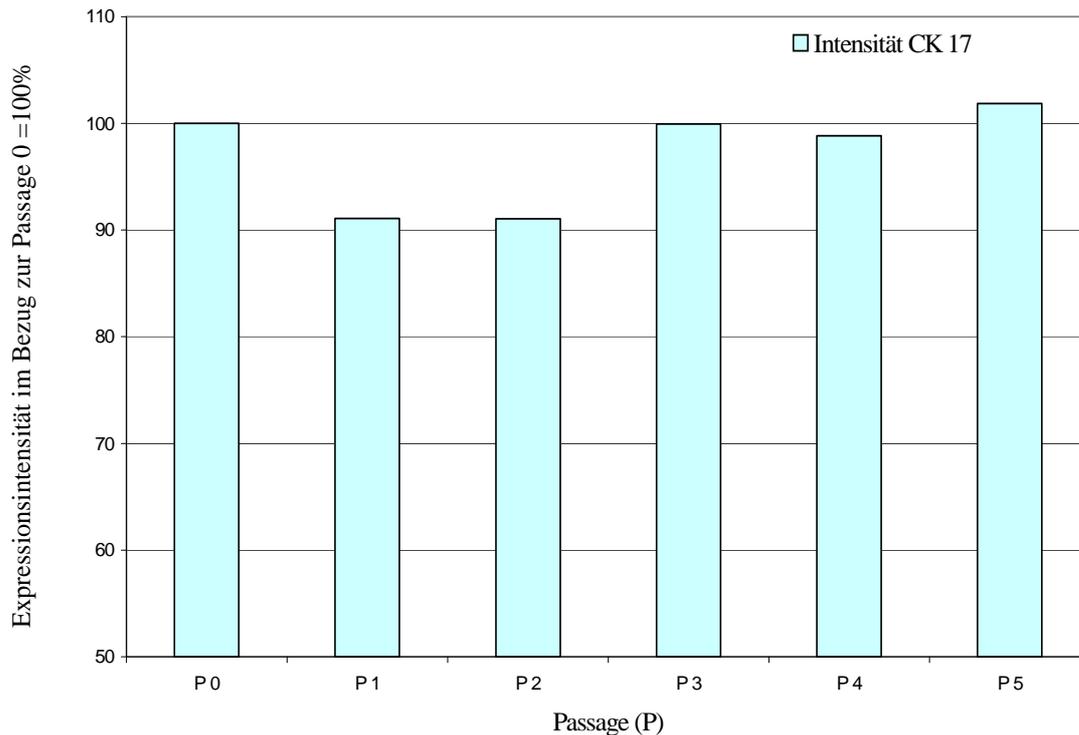


Abb. 32: Expressionsintensität des Zytokeratins 17 im Westernblot von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 1-5 im Bezug zur Kontrolle = frisch isolierte Zellen, Passage 0 = 100%, n = 2,

Die gemessenen Intensitäten der Zytokeratin 18-Expression zeigten nur geringfügige Unterschiede (Abb. 34).

Das Zytokeratin 19 (Abb. 35) zeigte in seiner Expression in den verschiedenen Passagen eine Zunahme bis auf 150% in Passage 3 und unterschritt die 100% erst in Passage 5 (91%).

Der Nachweis des Zytokeratins 20 mittels Westernblot war negativ.

Im Westernblot des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 (Abb. 36) konnten 4 Banden nachgewiesen werden. Anhand ihrer Molekülgröße (kDa) war es möglich, sie den Zytokeratinen CK19 (40 kDa), CK8 (52,5 kDa), CK7 (54 kDa) und CK5 (58 kDa) zu zuordnen. Die Expression des CK19 nahm mit steigender Passagenzahl zu (P 5 = 212%). Auch die Intensität des CK8 stieg auf 140% in Passage 5 und die des CK7 auf 131% in Passage 5 an.

Das Zytokeratin 5 zeigte in den Passagen 1-4 Werte um 90% im Bezug zur Passage 0. In Passage 5 nahm die Expressionsintensität auf 120% zu.

Der Apoptosemarker Kaspase-3 war in allen 5 Zellpassagen negativ.

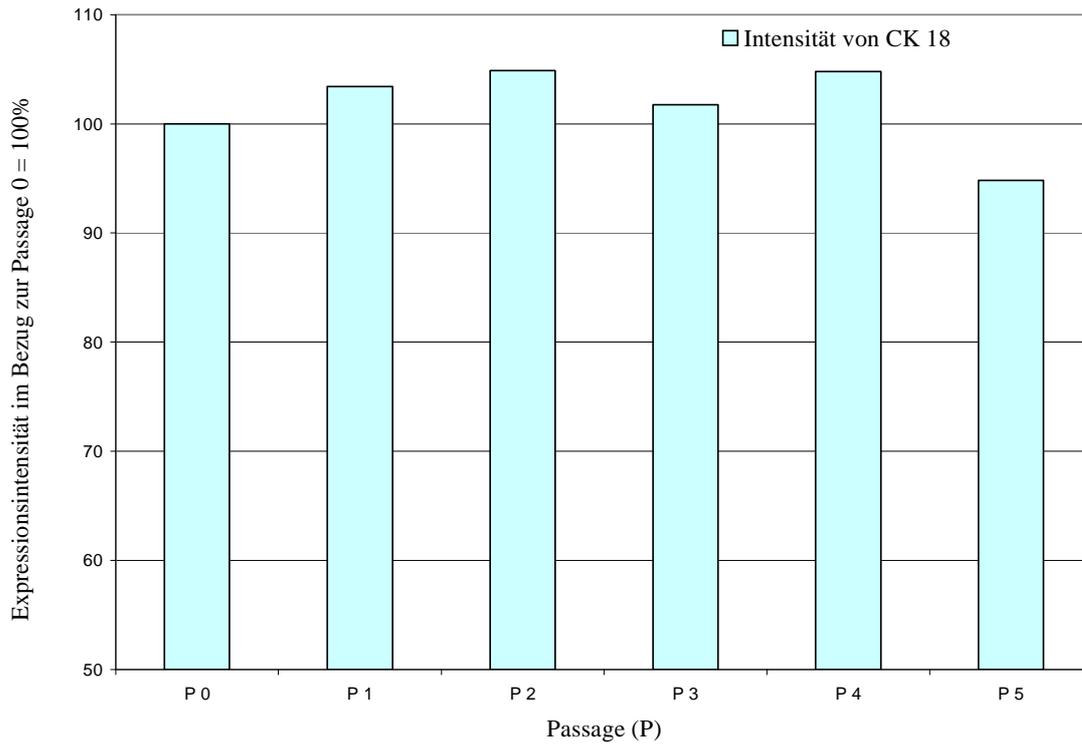


Abb. 33: Expressionsintensität des Zytokeratins 18 im Westernblot von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 1-5 im Bezug zur Kontrolle = frisch isolierte Zellen, Passage 0 = 100%, n = 2,

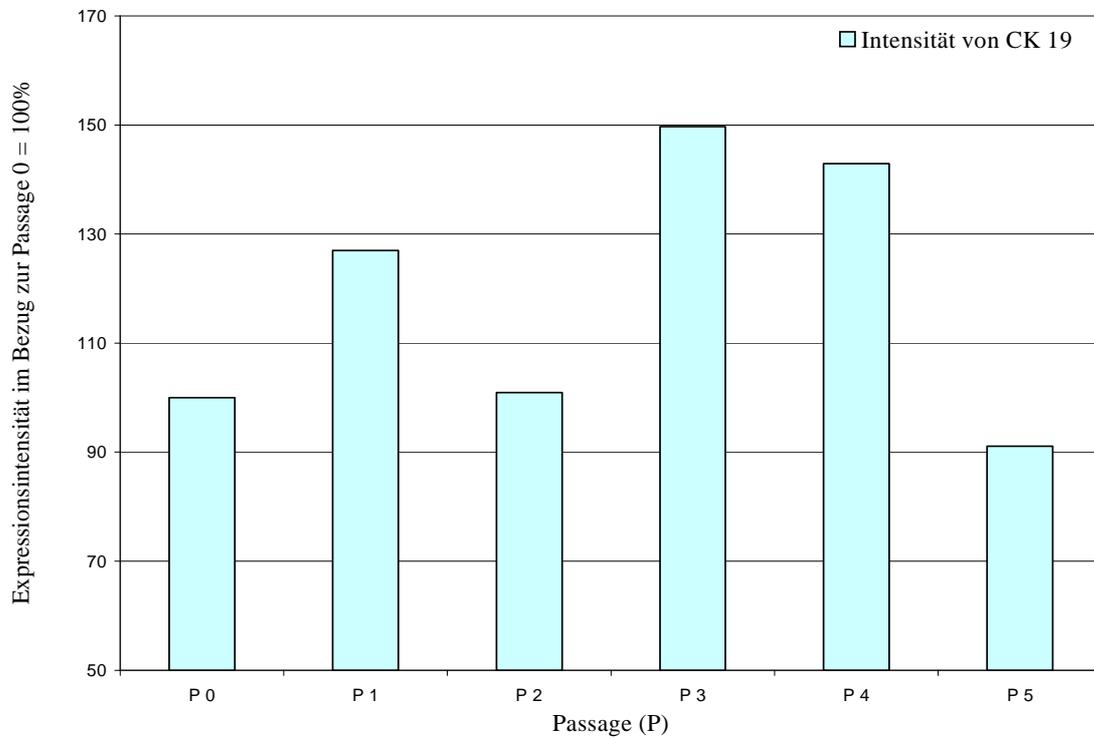


Abb. 34: Expressionsintensität des Zytokeratins 19 im Westernblot von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 1-5 im Bezug zur Kontrolle = frisch isolierte Zellen, Passage 0 = 100%, n = 2,

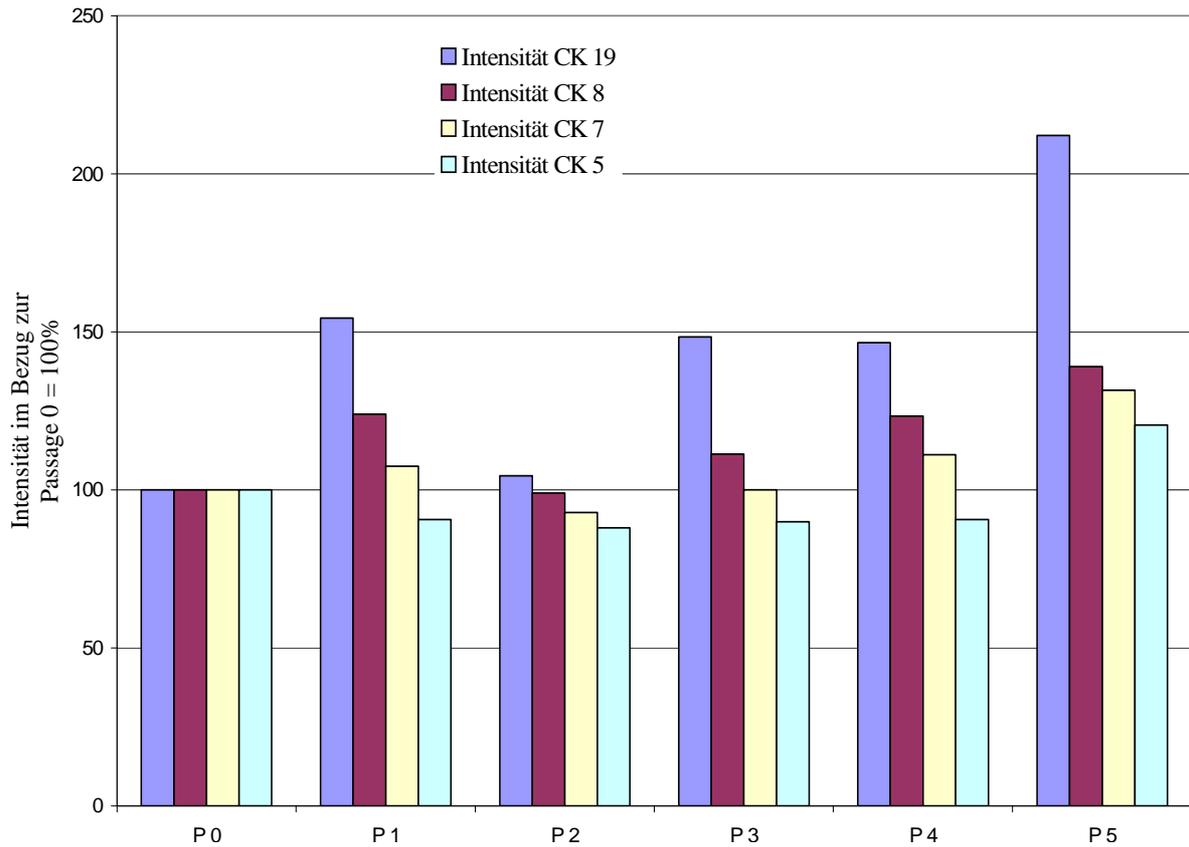


Abb. 35: Expressionsintensität der verschiedenen Zytokeratine (CK19, 8, 7, 5) des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 im Westernblot von kultivierten porcinen Urothelzellen in den Passagen 1-5 im Bezug zur Kontrolle = frisch isolierte Zellen, Passage 0 = 100%, n = 2,

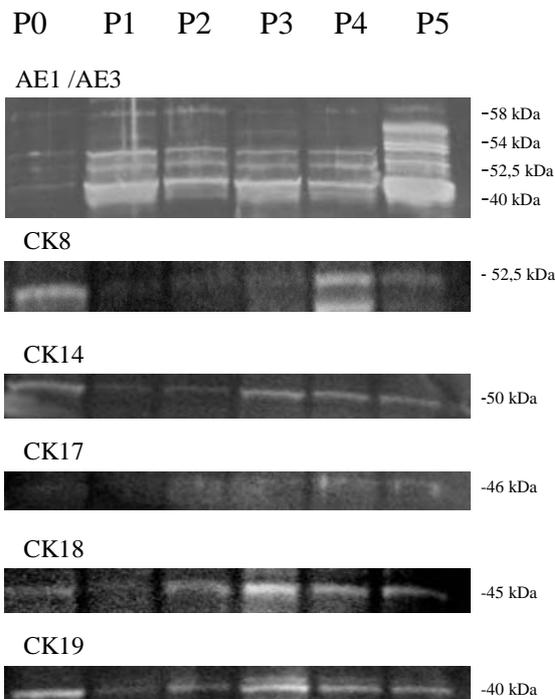


Abb. 36 a: Invertaufnahmen von Westernblotanalysen von porcinen Urothelzellen in den Passagen 0-5, colorimetrischer Nachweis der Zytokeratine 8, 14, 17, 18, 19 und dem Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3 mittels True Blue Peroxidase Reagenz

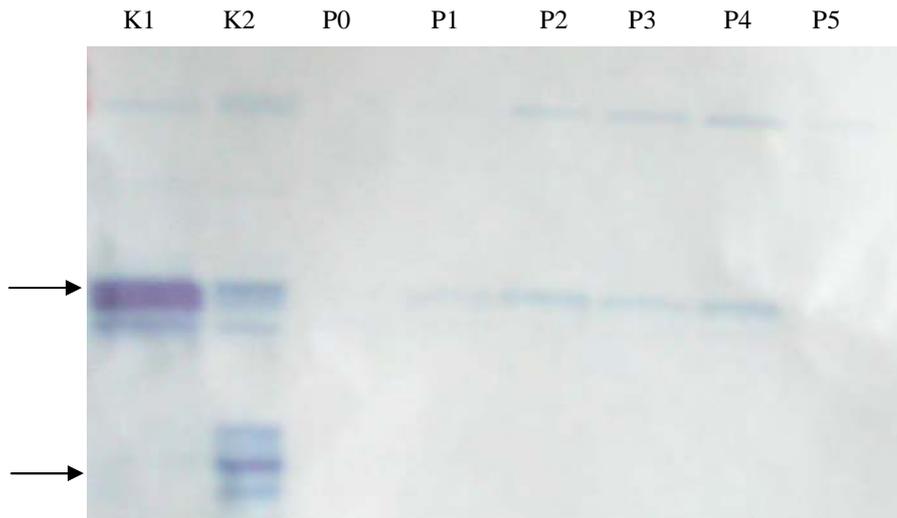


Abb. 36 b: Kaspasenachweis von kultivierten Urothelzellen in den Passagen 0 – 5 mittels Westernblotanalyse, K1= Nachweis von Kaspase 3 ungespalten (keine Apoptose), K2 = Kaspase3 gespalten (Apoptose)

5.2 Immunhistologische Untersuchungen an nativer porciner Harnblase und nativen porcinen Harnleiter

Es wurden Gewebeschnitte von Harnblase und Harnleiter auf ihr Zytokeratinmuster (CK8, CK14, CK17, CK18, CK20 und den Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3) untersucht. Ziel war es die Ergebnisse aus den nativen Geweben mit denen der kultivierten Urothelzellen zu vergleichen.

5.2.1 Zytokeratinmuster des Harnblasenepithels

Die Zytokeratine 8, 17, 19 und der Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3 zeigten in den intermediären Schichten des Urothels der Harnblase eine starke (+++) Expression. Das Zytokeratin 14 war mittelstark (++) im Bereich der Basalzellen und Intermediärzellen exprimiert. Die beiden Zytokeratine 18 (+++) und 20 (++) waren im Bereich der apikalen Zellen in der Immunhistologie positiv.

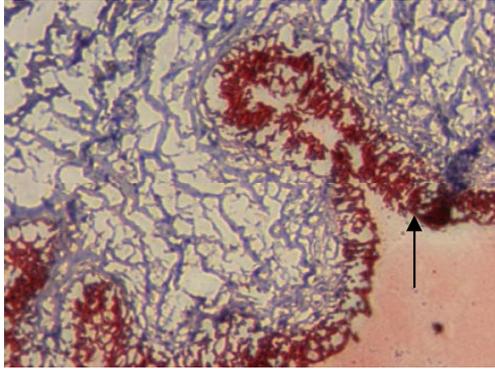


Abb. 37a: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 8 (Pfeilmarkierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen einer porcinen Harnblase im Querschnitt, 100-fache Vergr.

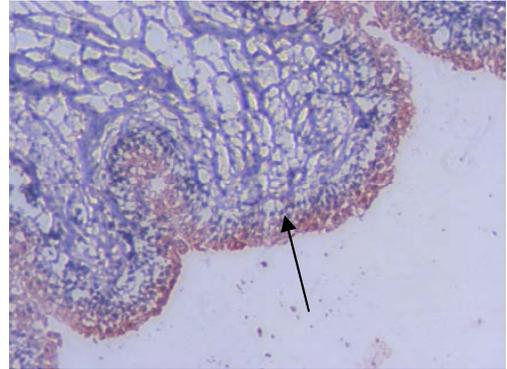


Abb. 37b: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 14 (Pfeilmarkierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen einer porcinen Harnblase im Querschnitt, 100-fache Vergr.

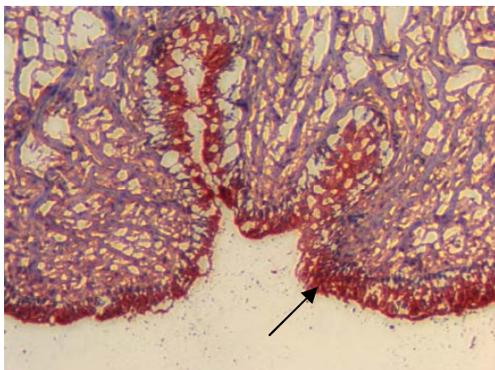


Abb. 37c: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 17 (Pfeilmarkierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen einer porcinen Harnblase im Querschnitt, 100-fache Vergr.

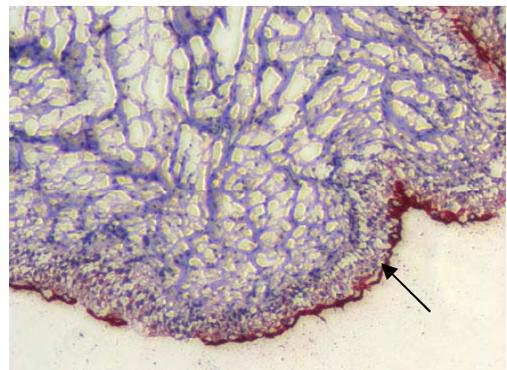


Abb. 37d : Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 18 (Pfeilmarkierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen einer porcinen Harnblase im Querschnitt, 100-fache Vergr.

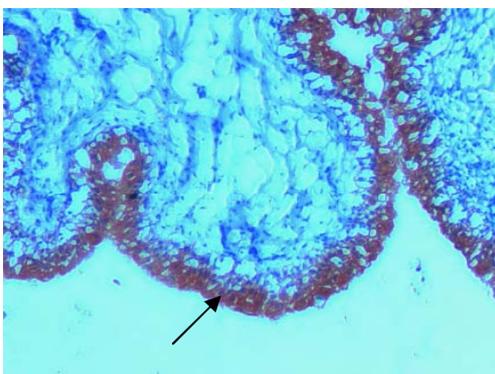


Abb. 37e: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 19 (Pfeilmarkierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen einer porcinen Harnblase im Querschnitt, 100-fache Vergr.

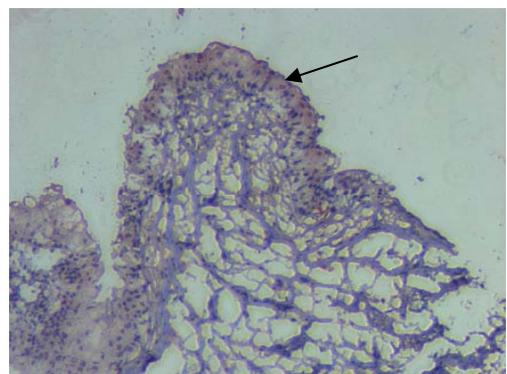


Abb. 37f: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 20 (Pfeilmarkierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen einer porcinen Harnblase im Querschnitt, 100-fache Vergr.

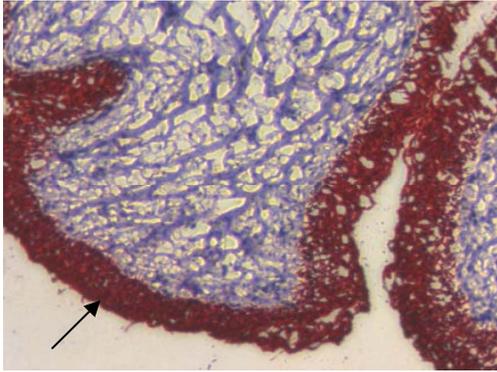


Abb. 37g: Immunhistochemischer Nachweis des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 (Pfeil-Markierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen einer porcinen Harnblase im Querschnitt, 100-fache Vergr.

5.2.2 Zytokeratinmuster des porcinen Harnleiters

Im Urothel des Harnleiters zeigte sich eine starke (+++) Expression der Zytokeratine 8 (Abb. 38a), 17 (Abb. 38c) und 19 (Abb. 38d). Für den Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3 konnte in der Immunhistologie ein stark (+++) positives Ergebnis nachgewiesen werden (Abb.38f).

Das Zytokeratin 14 (Abb. 38b) war in den Basalzellen nur sehr schwach (+) exprimiert und das Zytokeratin 20 (Abb. 38e) konnte nicht detektiert werden.

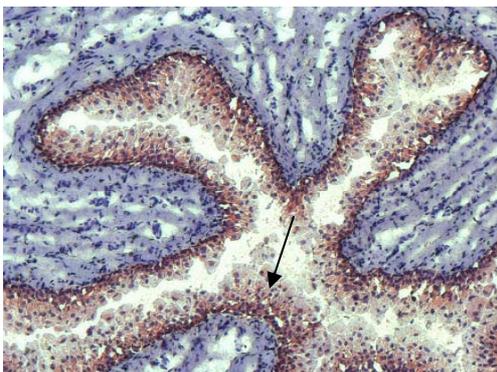


Abb. 38a: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 8 (Pfeilmarkierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen eines porcinen Harnleiters im Querschnitt, 100-fache Vergr.

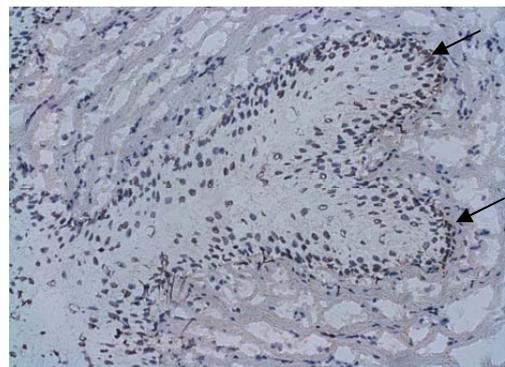


Abb. 38b: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 14 (Pfeilmarkierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen eines porcinen Harnleiters im Querschnitt, 200-fache Vergr.

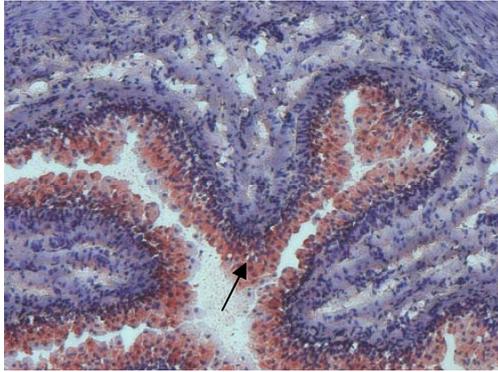


Abb. 38c: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 17 (Pfeilmarkierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen eines porcinen Harnleiters im Querschnitt, 100-fache Vergr.

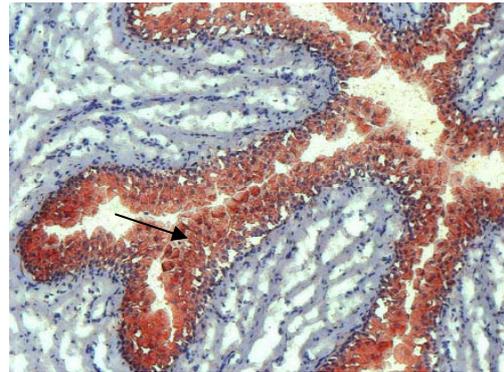


Abb. 38d: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 19 (Pfeilmarkierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen eines porcinen Harnleiters im Querschnitt, 100-fache Vergr.

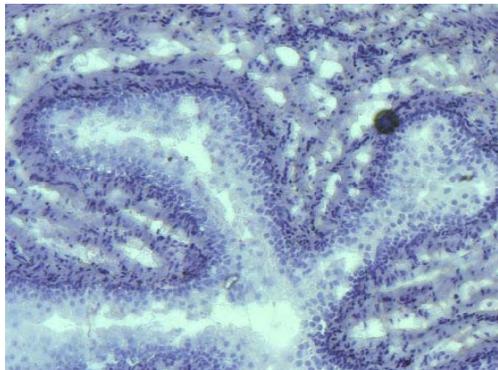


Abb. 38e: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 20 mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen eines porcinen Harnleiters im Querschnitt, 100-fache Vergr.

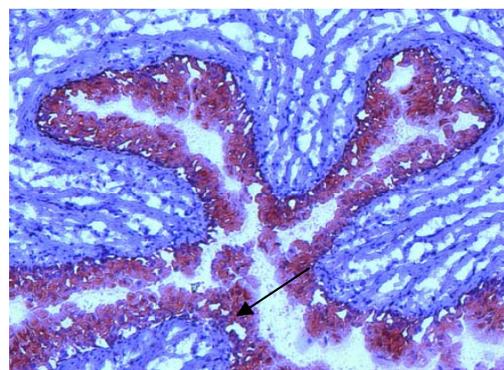


Abb. 38f: Immunhistochemischer Nachweis des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 (Pfeilmarkierung) mittels AEC-Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, dargestellter Ausschnitt: Lumen eines porcinen Harnleiters im Querschnitt, 100-fache Vergr.

5.3 Untersuchungen zum Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes PKH26 auf porcine Urothelzellen

Um die Urothelzellen im Tierversuch eindeutig detektieren und deren Integration in das Urothel der Harnröhre zeigen zu können, müssen die injizierten Zellen vor Implantation markiert werden. Diese Markierung sollte sich weder auf die Vitalität noch auf die Proliferation der Urothelzellen negativ auswirken. Auch sollte diese für die gesamte Dauer der Versuchszeit und Dauer der Auswertung stabil und intensiv bleiben.

Diese Aspekte wurden im Hinblick auf eine Markierung der Urothelzellen mit dem aliphatischen Fluoreszenzfarbstoff PKH26 untersucht. PKH26 ist ein membranständiger

Farbstoff aus lipophilen Kohlenwasserstoffketten, einem Linkermolekül und dem Fluorochrom, der an den Lipidanteilen der Zellmembran bindet.

5.3.1 Wirkung der PKH26-Markierung auf die Vitalität von porcinen Urothelzellen

Mittels WST-1-Test wurde untersucht, ob die PKH26 Markierung einen zytotoxischen Effekt auf die Vitalität der Urothelzellen hat. Die Ergebnisse zeigten, dass die PKH26 Markierung keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen bis zum Tag 4 hatte. Nach 2 bzw. 4 Tagen konnte im Vergleich zur Positivkontrolle eine erhöhte Vitalität bei den markierten Urothelzellen nachgewiesen werden. Ab Tag 5 verringerte sich die Vitalität der markierten Urothelzellen um bis zu 30% im Vergleich zur Positivkontrolle.

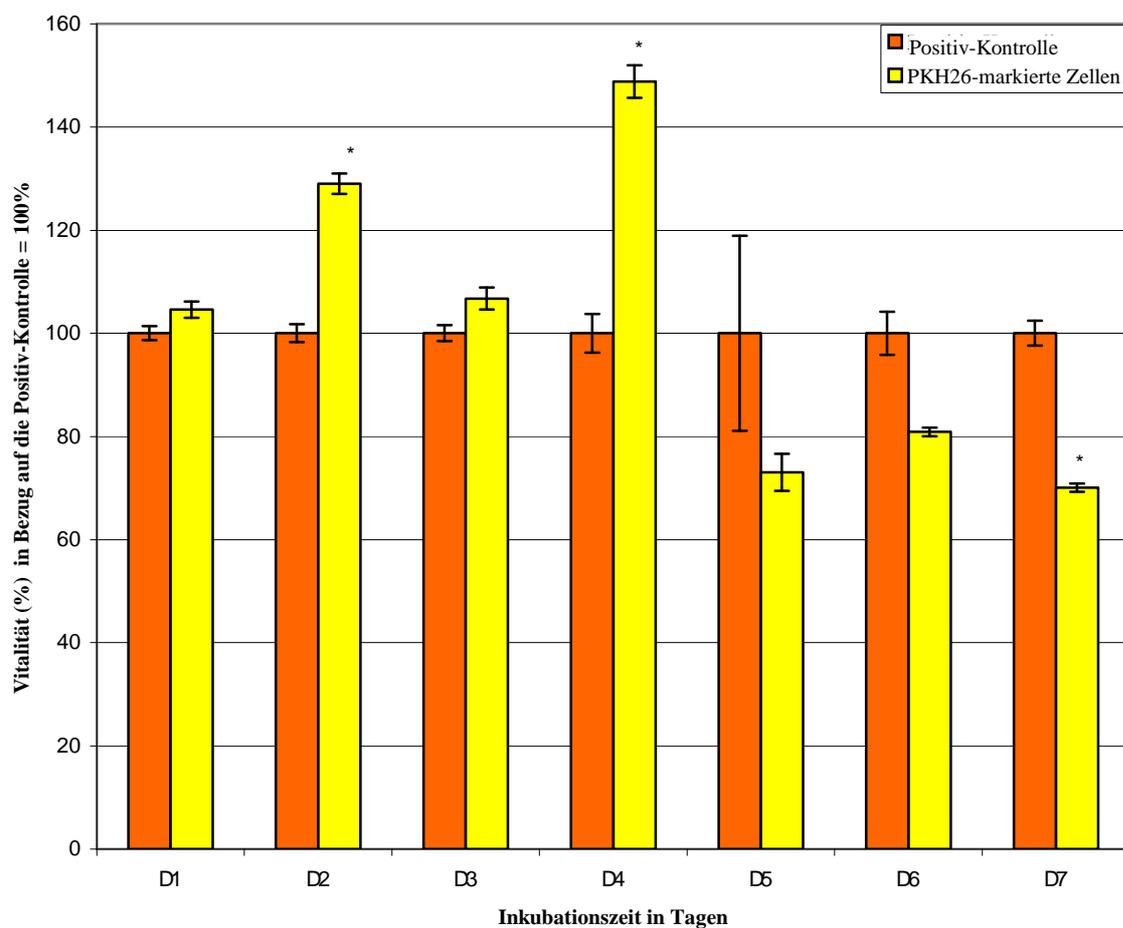


Abb. 39: Untersuchung zum Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes PKH26 auf die Vitalität porciner Urothelzellen mittels WST-1-Test, Inkubationszeit 1-7 Tage, Zellkonzentration 1×10^5 c/ml, Positivkontrolle = nicht markierte Zellen, (*) = ist signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle $p (*) \leq 0,05$

5.3.2 Wirkung der PKH26-Markierung auf die Proliferation porciner Urothelzellen

Um die Wirkung der PKH26 Markierung auf die Proliferation der porcinen Urothelzellen zu testen, wurde ein BrdU-Test durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass der Fluoreszenzfarbstoff keine negative Auswirkung auf die Proliferation der Urothelzellen bis zum Tag 6 hatte. Ab dem 7 Tag war die Proliferation der Zellen um 40% im Vergleich zur Positivkontrolle verringert.

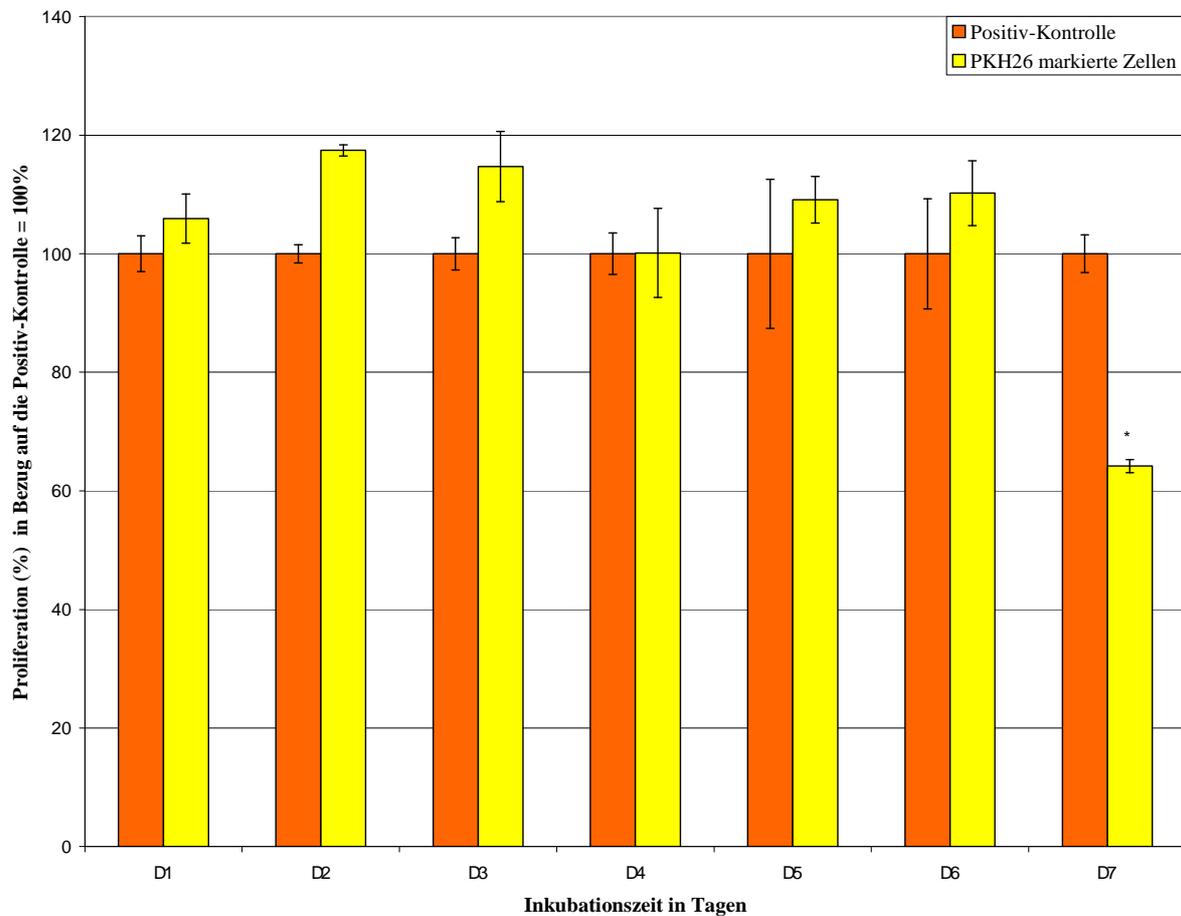


Abb. 40: Untersuchung zum Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes PKH26 auf die Proliferation porciner Urothelzellen mittels BrdU-Test, Inkubationszeit 1-7 Tage, Zellkonzentration 1×10^5 c/ml, Positivkontrolle = nicht markierte Zellen, (*) = ist signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle $p (*) \leq 0,05$

5.3.3 Langzeitstudie zur Stabilität der PKH26 Markierung von Urothelzellen in vitro

Die PKH26 markierten Urothelzellen wurden fotografisch mittels Fluoreszenzmikroskop während der Kulturdauer (5 Wochen) dokumentiert (Abb. 41 a-f). Es zeigte sich eine Abnahme der Intensität der PKH26 Markierung der einzelnen Zellen und eine Verringerung der Anzahl der PKH26 positiven Zellen im Verlauf der Zellkultur.

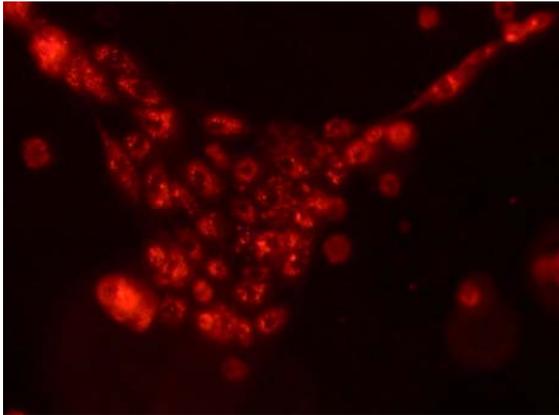


Abb. 41a: PKH26 markierte porcine Urothelzellen in vitro, in Passage 3; 1 Tag nach Markierung, in 200-facher Vergr.

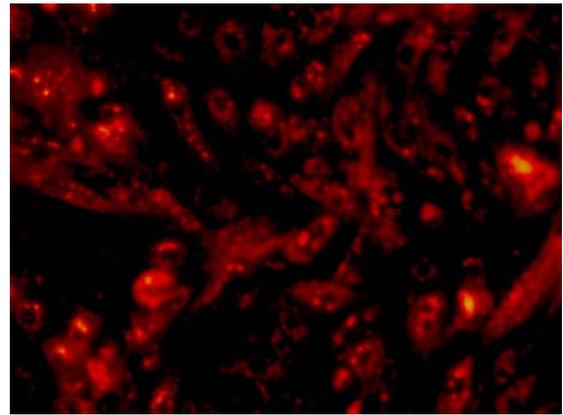


Abb. 41b: PKH26 markierte porcine Urothelzellen in vitro, in Passage 3; 7 Tage nach Markierung, in 200-facher Vergr.

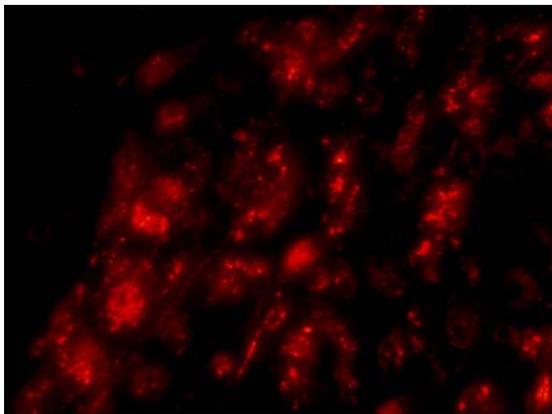


Abb. 41c: PKH26 markierte porcine Urothelzellen in vitro, in Passage 4; 14 Tage nach Markierung, in 200-facher Vergr.

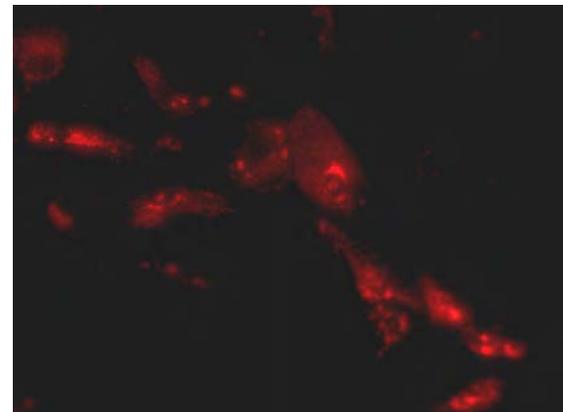


Abb. 41d: PKH26 markierte porcine Urothelzellen in vitro, in Passage 5; 21 Tage nach Markierung, in 200-facher Vergr.

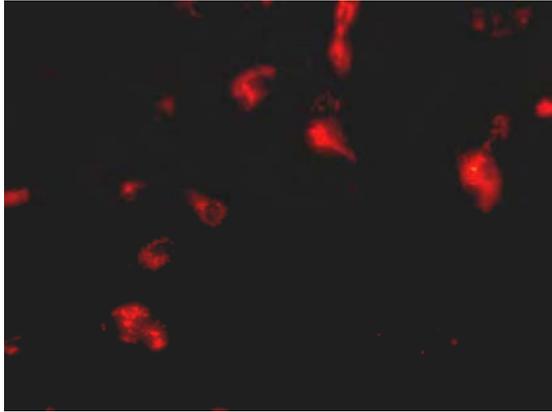


Abb. 41e: PKH26 markierte porcine Urothelzellen in vitro, in Passage 6; 28 Tage nach Markierung, in 200-facher Vergr.

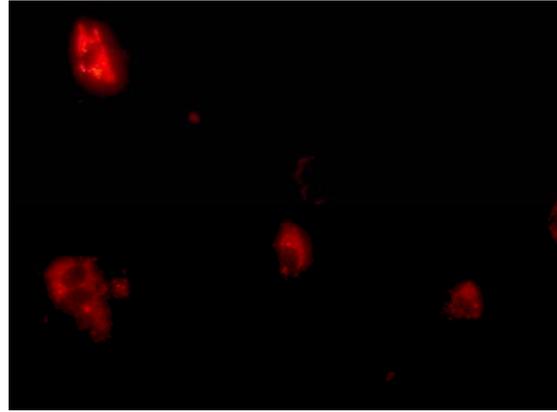


Abb. 41f: PKH26 markierte porcine Urothelzellen in vitro, in Passage 7; 35 Tage nach Markierung, in 200-facher Vergr.

Bei der Auszählung der PKH26 positiven Zellen konnte beobachtet werden, dass mit Zunahme der Kulturdauer und steigender Passagenzahl die Anzahl der PKH26 positiven Urothelzellen abnahm. Die Anzahl der markierten, kultivierten Zellen sank innerhalb einer Woche von 100% auf 76%. Nach einer Passagierung und einer weiteren Woche der Kultivierung waren noch 52% der Zellen PKH26 positiv. Die Stabilität der Markierung verringerte sich nach 2 Passagen und 3 Wochen Kulturdauer auf 43% und nach 3 Passagen und 4 Wochen Kulturdauer auf 10%.

Am Ende der Kultivierung nach 5 Wochen und 4 Passagen ergab die Anzahl der PKH26 positiven Zellen noch 5% im Vergleich zur Gesamtzellzahl.

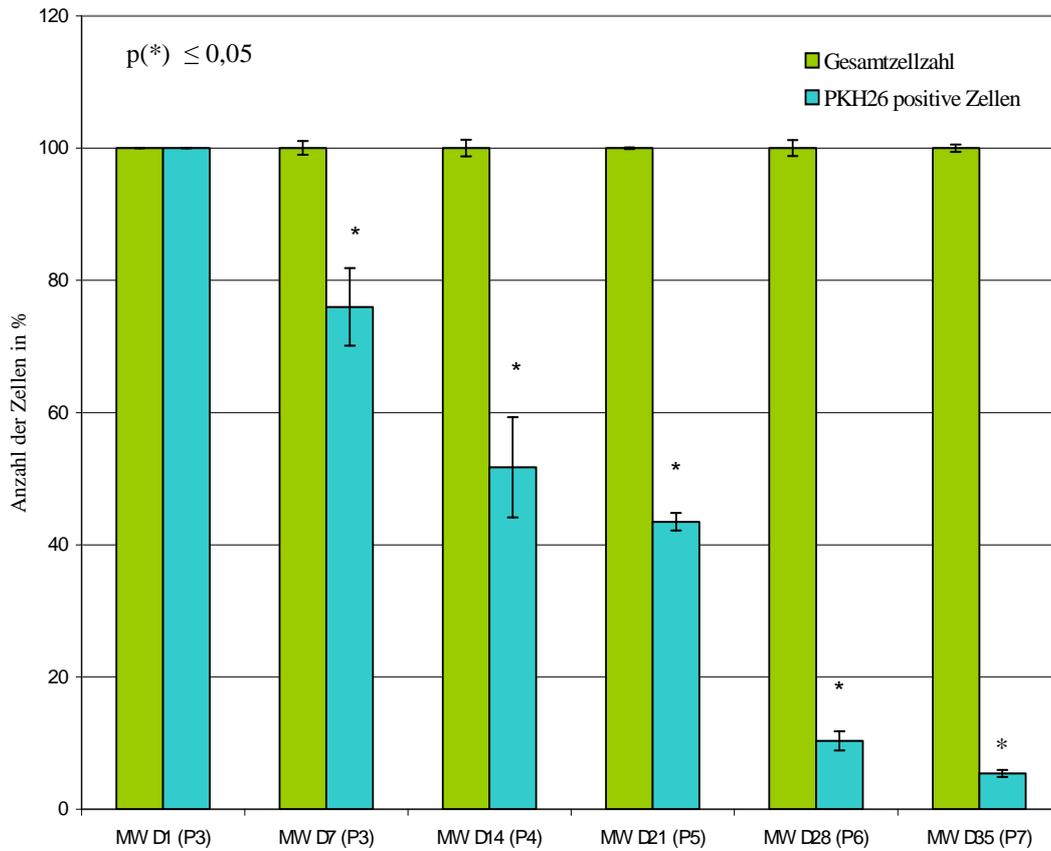


Abb. 42: Untersuchung zur Stabilität der PKH26 Markierung von porcinen Urothelzellen in vitro, in Abhängigkeit der Kulturdauer und Passagenanzahl, Inkubationszeit 1-35 Tage, Positivkontrolle = Gesamtzellzahl, (*) = ist signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle

5.3.4 Verdopplungszeit von PKH26 markierten Urothelzellen

Des Weiteren wurde die Verdopplungszeit der porcinen Urothelzellen über einen Zeitraum von 4 Tagen bestimmt, um die Ergebnisse auf die zu erwartenden Stabilität in vivo zu übertragen. Die Mitoserate in vitro lag bei 25% pro Tag. Dieses entsprach einer 20-fach höheren Rate im Vergleich zu den in vivo Daten.

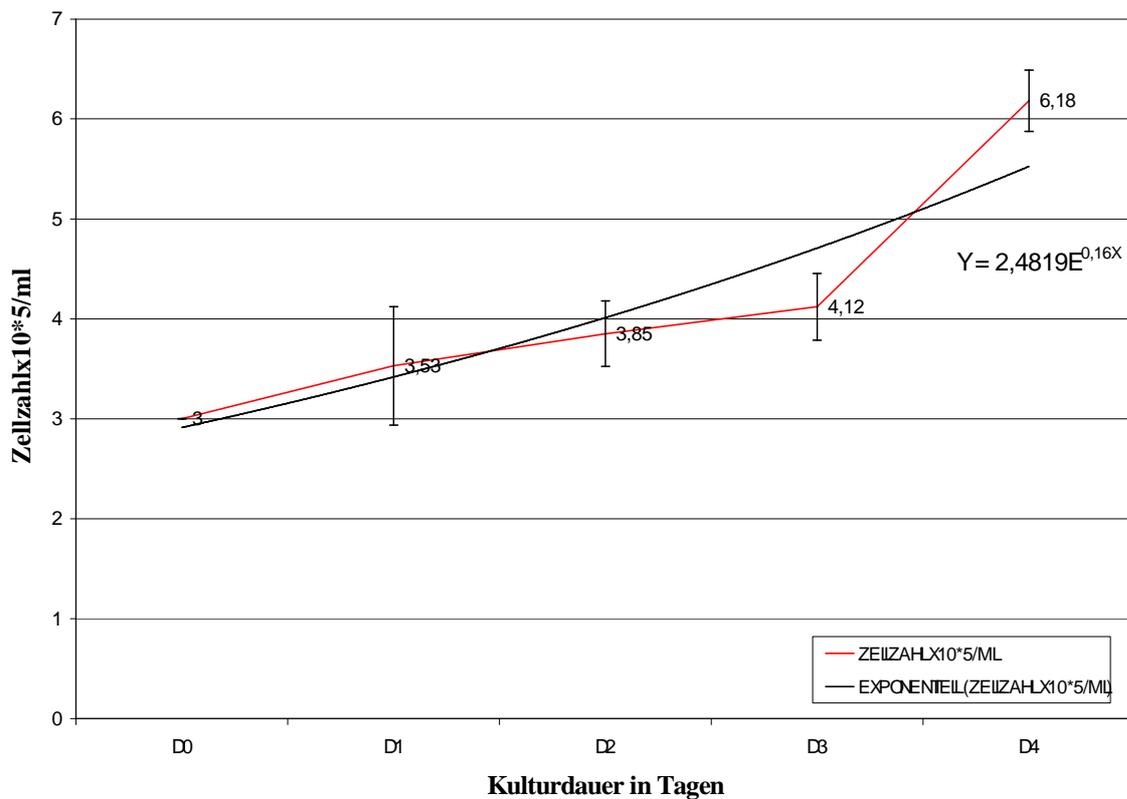


Abb. 43: Untersuchung zur Verdopplungszeit porciner Urothelzellen in vitro, Inkubationszeit 1-4 Tage, Anfangszellkonzentration $3 \times 10^5 \text{ c/ml}$

5.4 Untersuchungen zum Einfluss von stabilisierter Hyaluronsäure mit Dextranomer auf porcine Urothelzellen

Um ein Abschwimmen der injizierten Urothelzellen im Bereich der resezierten Narbe zu verhindern, wird ein geeignetes Trägermaterial benötigt. Es sollte als temporäre Matrix und zur homogenen Verteilung der Zellen dienen. Desweiteren sollte es keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben. Zudem ist die klinische Zulassung des verwendeten Trägermaterials im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung unerlässlich.

In den folgenden Untersuchungen wurde stabilisierte Hyaluronsäure mit Dextranomer hinsichtlich ihrer Eignung als Trägermaterial untersucht.

5.4.1 Wirkung von stabilisierter Hyaluronsäure auf die Vitalität porciner Urothelzellen

Um den Einfluss der stabilisierten Hyaluronsäure auf die Vitalität porcinen Urothelzellen zu testen, wurde ein WST-1-Test über einen Zeitraum von 7 Tage durchgeführt. Es wurden verschiedene Hyaluronsäure-Medium Verhältnisse (1:2, 1:3, 1:4, 1:5) im Hinblick auf die Vitalität der Zellen untersucht.

In dem Medium-Hyaluronsäure-Verhältnis von 1:2 zeigten die Urothelzellen nur eine schwache Vitalität. Nach 5 Tagen konnte eine Vitalität von 50% im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden.

Bei einem Medium-Hyaluronsäure-Verhältnis von 1:3 erreichte die Vitalität an Tag 7 70% im Vergleich zur Positivkontrolle.

Nach 3 Tagen konnte bei einem Medium- Hyaluronsäure-Verhältnis von 1:4 eine Zellvitalität (75%-115%) ähnlich der Kontrolle dokumentiert werden.

Die höchste Vitalitätsrate konnte bei den porcinen Urothelzellen nachgewiesen werden, welche in dem Medium-Hyaluronsäure-Verhältnis von 1:5 inkubiert wurden. Diese Zellen zeigten ab dem 3 Tag eine höhere Vitalität als die Positivkontrolle (>100%-136%). Im Gegensatz zur den anderen Mischverhältnissen war die Viskosität bei der Medium-Hyaluronsäure-Konzentration 1:5 stark reduziert.

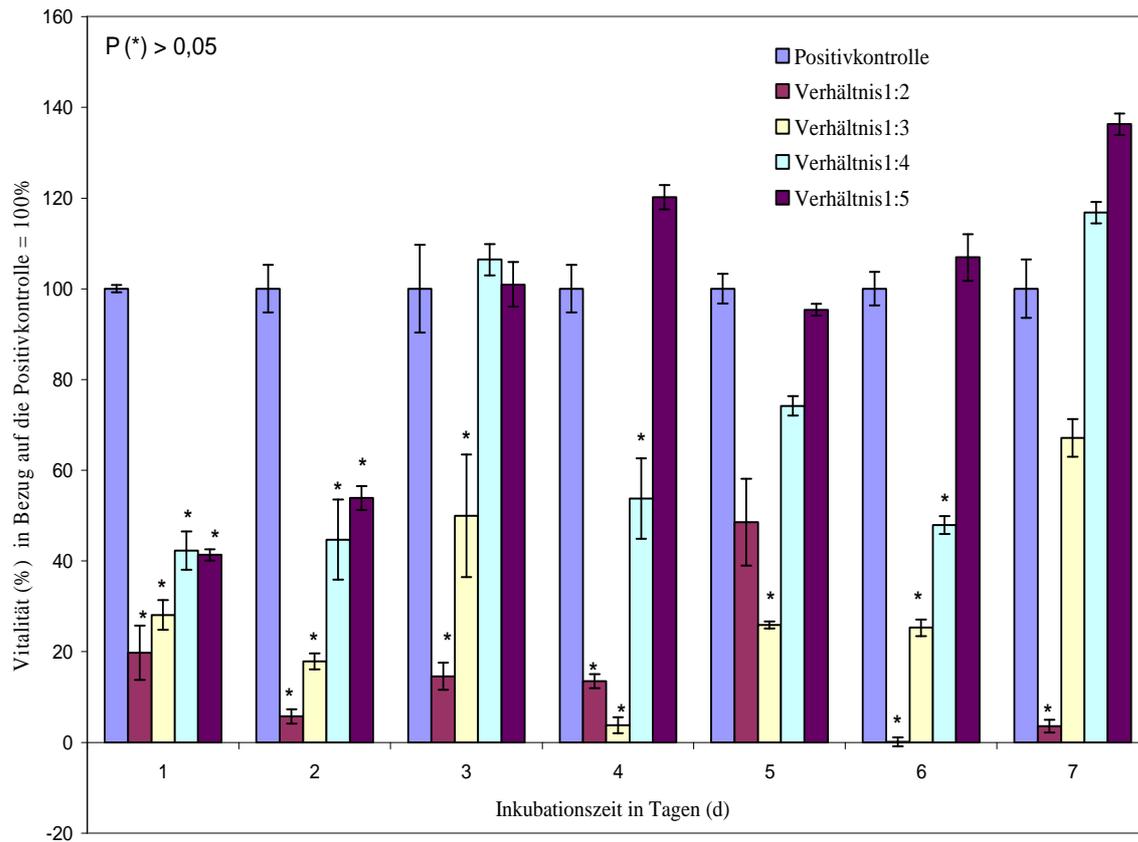


Abb. 44: Untersuchung zum Einfluss von Hyaluronsäure in verschiedenen Konzentrationen (1:2, 1:3, 1:4, 1:5) auf die Vitalität porciner Urothelzellen mittels WST-1-Test, Inkubationszeit 1-7 Tage, Zellkonzentration 1×10^5 c/ml, Positivkontrolle = Zellen nur in Kulturmedium, (*) = ist signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle

5.4.2 Das Adhärenzverhalten porciner Urothelzellen in Abhängigkeit von verschiedenen Hyaluronsäurekonzentrationen

Das Adhärenzverhalten porciner Urothelzellen wurde in verschiedenen Medium-Hyaluronsäure-Verhältnissen (1:2, 1:4) im Vergleich zu einer Positivkontrolle (Zellen nur mit Kulturmedium) in einem Zeitraum von 3 Tagen getestet. Es wurden jeweils die adhärennten Zellen abgelöst und unter dem Mikroskop ausgezählt.

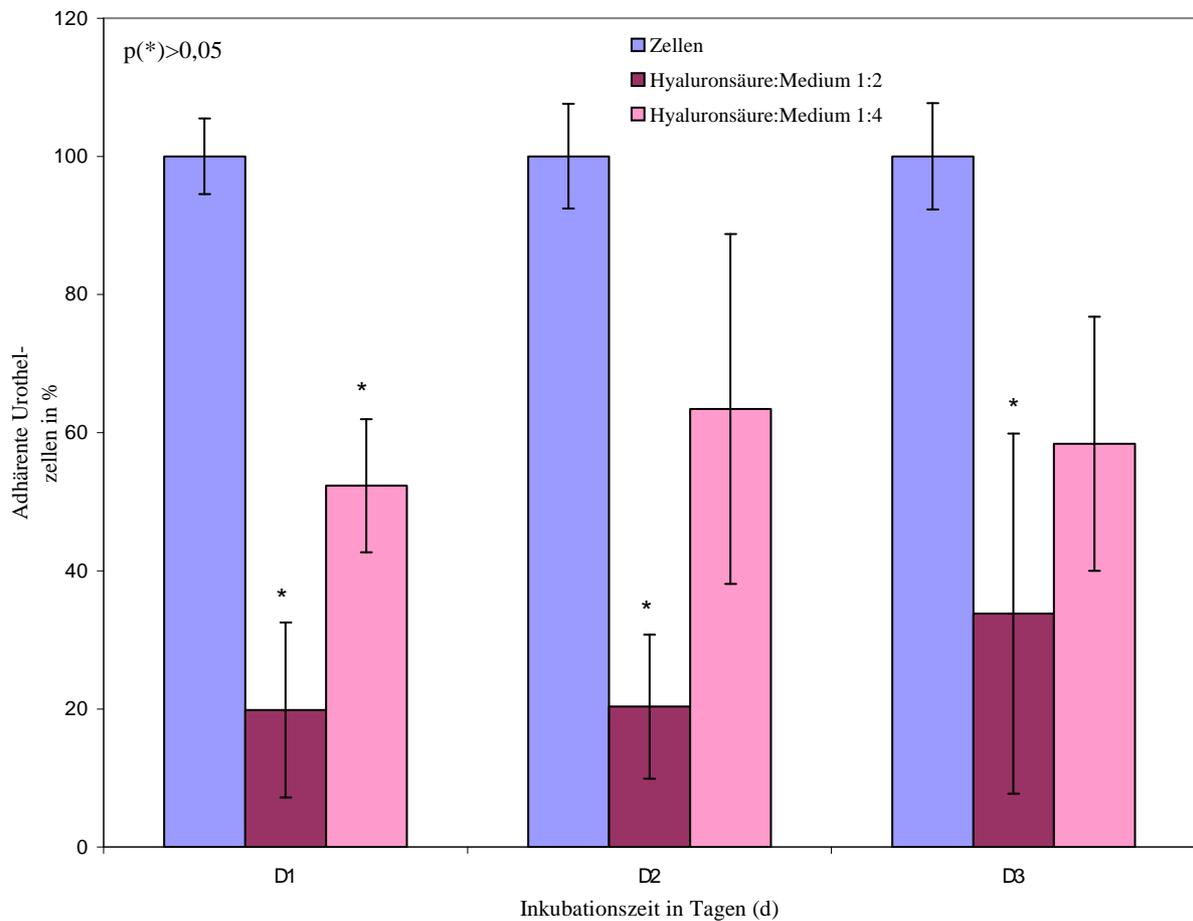


Abb. 45: Untersuchung zum Adhärenzverhalten porciner Urothelzellen unter dem Einfluss verschiedener Hyaluronsäurekonzentrationen (1:2, 1:4), Inkubationszeit 1-3 Tage, Zellkonzentration 1×10^5 c/ml, Positivkontrolle = Zellen nur in Kulturmedium, (*) = ist signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle

Die Urothelzellen in dem Medium-Hyaluronsäure-Verhältnis von 1:4 zeigten eine 2-fach höhere Adhärenz im Vergleich zu den Zellen in dem Medium-Hyaluronsäure-Gemisch von 1:2. Das Medium-Hyaluronsäure-Gemisch von 1:4 erreichte eine Adhärenz von 63% im Vergleich zur Positivkontrolle.

5.5 Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen mit murinen Fibroblasten mit und ohne Hyaluronsäure

Um den Einfluss der stabilisierten Hyaluronsäure auf die Urothelzellen und Fibroblasten *in vivo* besser verstehen zu können, wurde ein *in vitro* Modell entwickelt. In diesem Ko-Kultur-Modell wurden porcine Urothelzellen auf 100% konfluenten murinen Fibroblasten ausgesät. Hierfür wurden Ko-Kulturen mit Zugabe von Hyaluronsäuren und Dextranomeren und ohne Hyaluronsäure (Kontrolle) angesetzt. Während der Kulturdauer konnte beobachtet werden, dass die Urothelzellen mit der Hyaluronsäure im Medium (1:4) eine bessere Stratifizierung zeigten (s. Abb. 46 a-b).

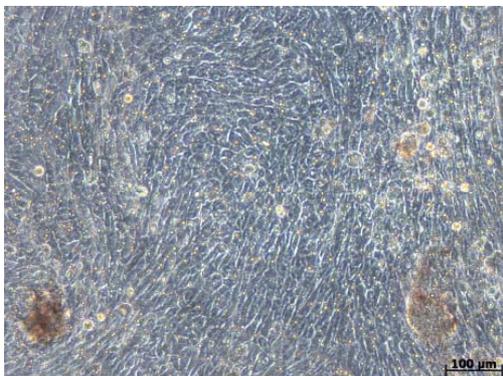


Abb. 46a: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen mit murinen Fibroblasten, während des Kulturverlaufs, 18 Tage nach Aussaat, 100-fache Vergr.

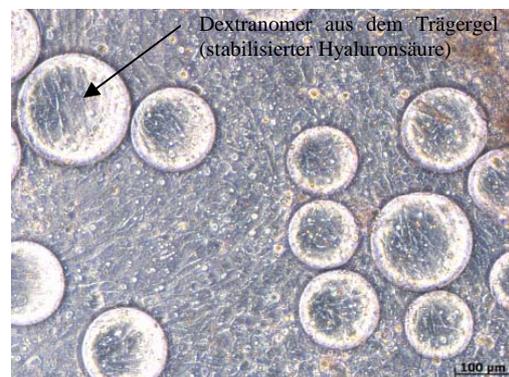


Abb. 46b: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen mit murinen Fibroblasten und Hyaluronsäure, während des Kulturverlaufs, 18 Tage nach Aussaat, 100-fache Vergr.

5.5.1 Immunhistologie der Ko-Kulturen mit dem Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3

Die porcinen Urothelzellen zeigten nach 1 und nach 3 Wochen Kulturdauer in der Ko-Kultur eine positive Expression des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3. Es konnte kein negativer Einfluss der Hyaluronsäure oder der murinen Fibroblasten auf den epithelialen Phänotyp der Urothelzellen in der Ko-Kultur festgestellt werden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Urothelzellen sich nach 3 Wochen in 2-3 Schichten übereinander angeordnet hatten (Abb. 47 a-g). Es kam zu keiner Durchmischung der Urothelzellen mit den Fibroblasten.

In den Ko-Kulturen mit Dextranomeren und Hyaluronsäure konnte in der 400-fachen Vergrößerung eine aufgelockerte weniger kompakte Struktur der Urothelzellen als in der Kontrolle beobachtet werden (Abb. 47h).

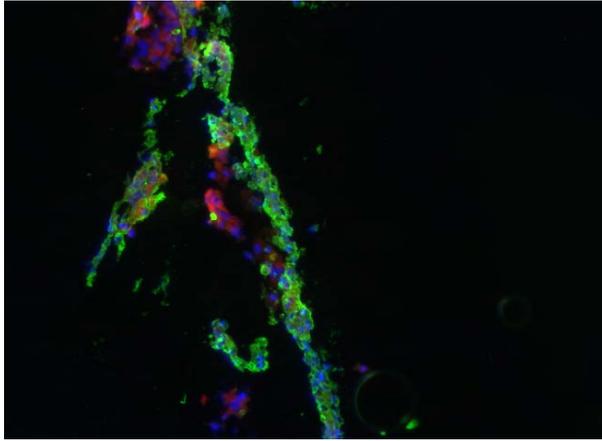


Abb. 47a: Immunfluoreszenz Nachweis des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 mit Cy-2 gekoppelten Ziege anti-Maus IgG, Gegenfärbung mit Dapi (blau), Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen (grün) und PKH26 markierten murinen Fibroblasten (rot) 7 Tage nach Besiedelung mit porcinen Urothelzellen, in 100-facher Vergr.

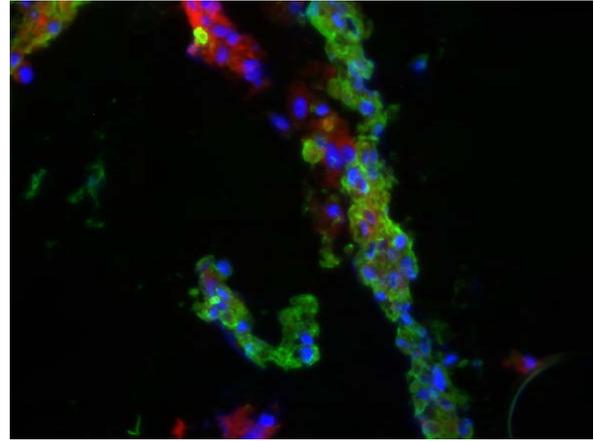


Abb. 47b: Immunfluoreszenz Nachweis des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 mit Cy-2 gekoppelten Ziege anti-Maus IgG (grün), Gegenfärbung mit Dapi (blau), Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen und PKH26 markierten murinen Fibroblasten (rot) 7 Tage nach Besiedelung mit porcinen Urothelzellen, in 200-facher Vergr.

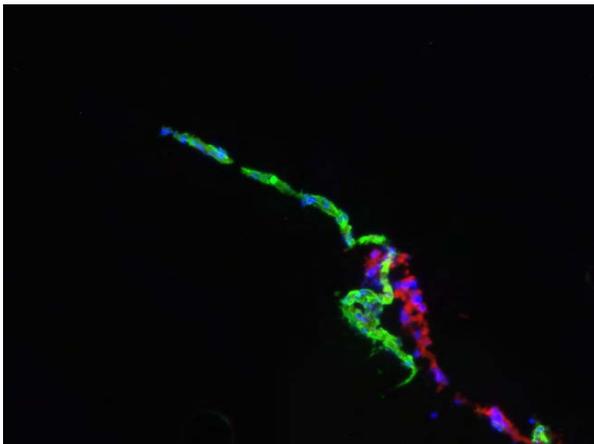


Abb. 47c: Immunfluoreszenz Nachweis des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 mit Cy-2 gekoppelten Ziege anti-Maus IgG (grün), Gegenfärbung mit Dapi (blau), Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen und PKH26 markierten murinen Fibroblasten (rot) 7 Tage nach Besiedelung mit porcinen Urothelzellen und Hyaluronsäure, in 100-facher Vergr.

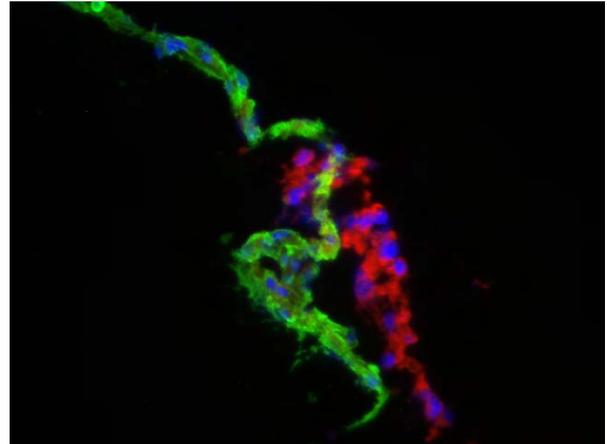


Abb. 47d: Immunfluoreszenz Nachweis des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 mit Cy-2 gekoppelten Ziege anti-Maus IgG (grün), Gegenfärbung mit Dapi (blau), Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen und PKH26 markierten murinen Fibroblasten (rot) 7 Tage nach Besiedelung mit porcinen Urothelzellen und Hyaluronsäure, in 200-facher Vergr.

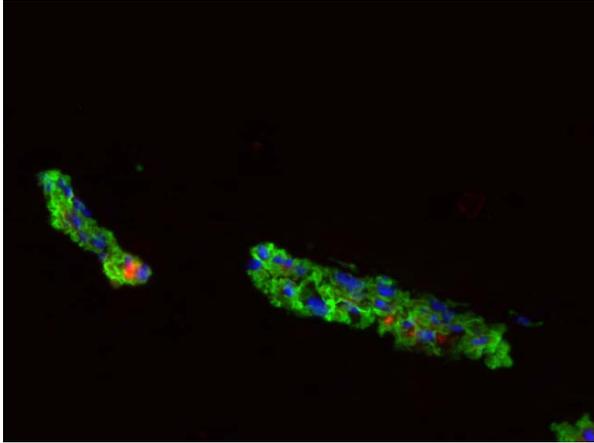


Abb. 47e: Immunfluoreszenz Nachweis des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 mit Cy-2 gekoppelten Ziege anti-Maus IgG (grün), Gegenfärbung mit Dapi (blau), Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen und PKH26 markierten murinen Fibroblasten (rot) 21 Tage nach Besiedelung mit porcinen Urothelzellen, in 200-facher Vergr.

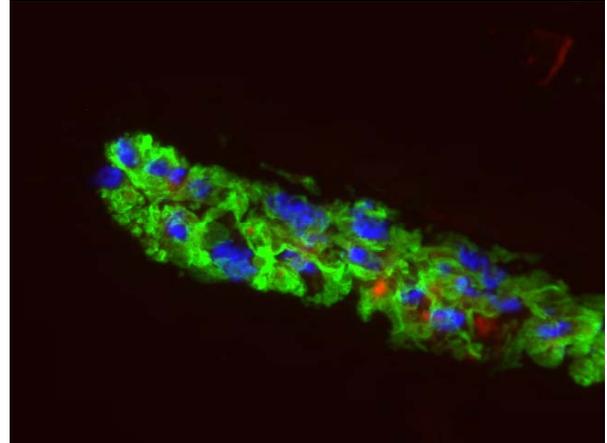


Abb. 47f: Immunfluoreszenz Nachweis des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 mit Cy-2 gekoppelten Ziege anti-Maus IgG (grün), Gegenfärbung mit Dapi (blau), Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen und PKH26 markierten murinen Fibroblasten (rot) 21 Tage nach Besiedelung mit porcinen Urothelzellen, in 400-facher Vergr.

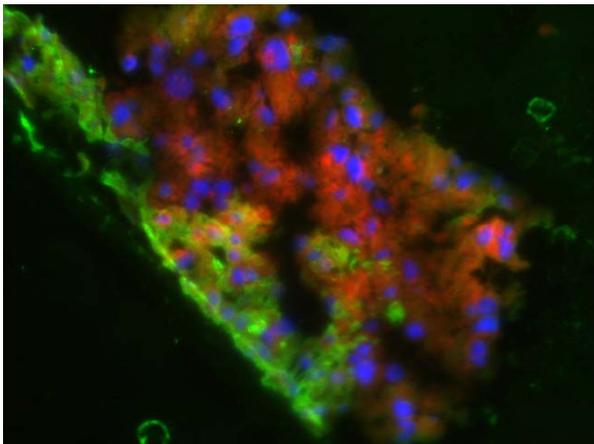


Abb. 47g: Immunfluoreszenz Nachweis des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 mit Cy-2 gekoppelten Ziege anti-Maus IgG (grün), Gegenfärbung mit Dapi (blau), Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen und PKH26 markierten murinen Fibroblasten (rot) 21 Tage nach Besiedelung mit porcinen Urothelzellen mit Hyaluronsäure, in 200-facher Vergr.

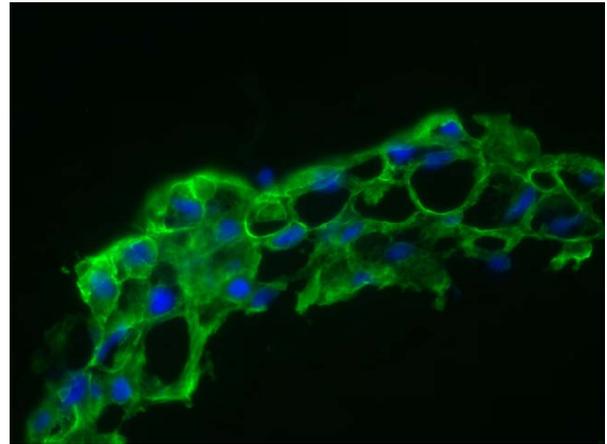


Abb. 47h: Immunfluoreszenz Nachweis des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 mit Cy-2 gekoppelten Ziege anti-Maus IgG (grün), Gegenfärbung mit Dapi (blau), Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen und PKH26 markierten murinen Fibroblasten (rot) 21 Tage nach Besiedelung mit porcinen Urothelzellen mit Hyaluronsäure, in 400-facher Vergr.

5.5.2 Nachweis des Einflusses von stabilisierter Hyaluronsäure mit Dextranomeren auf die zelluläre Morphologie in der Ko-Kultur mittels Rasterelektronenmikroskopie

Die Ko-Kulturen wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie 1 bzw. 3 Wochen nach Besiedlung mit den porcinen Urothelzellen untersucht. Es wurden ebenfalls zwei Ansätze durchgeführt:

1. Urothelzellen nur in Zellkulturmedium
2. Urothelzellen im Hyaluronsäure-Medium-Gemisch von 1:4

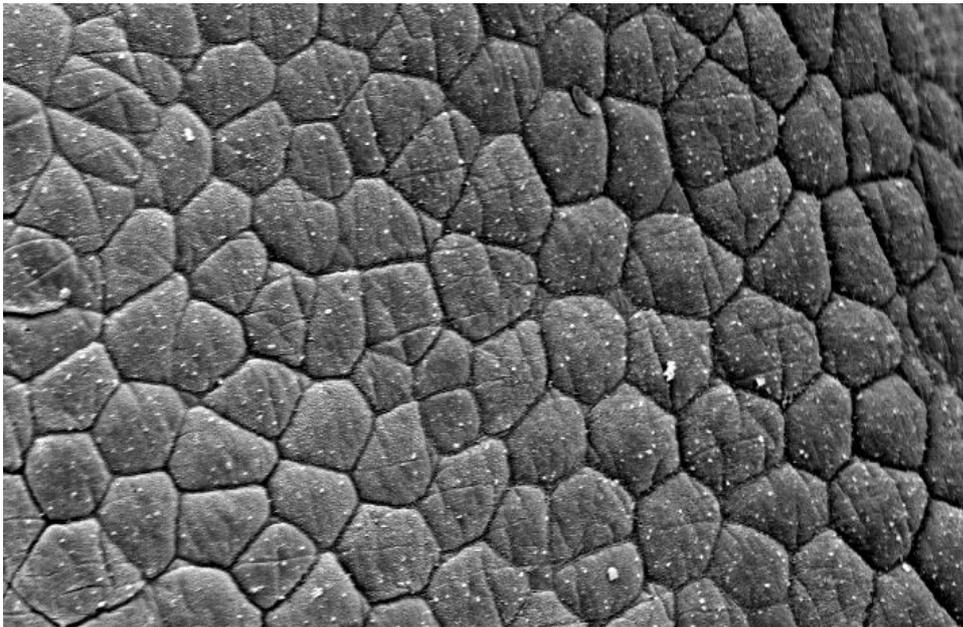


Abb. 48: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines nativen Blasenurothels in 400-facher Vergr.

Es konnte gezeigt werden, dass die Fibroblasten eine geschlossene Fläche gebildet haben, bevor diese mit den Urothelzellen besiedelt wurden (Abb. 49).

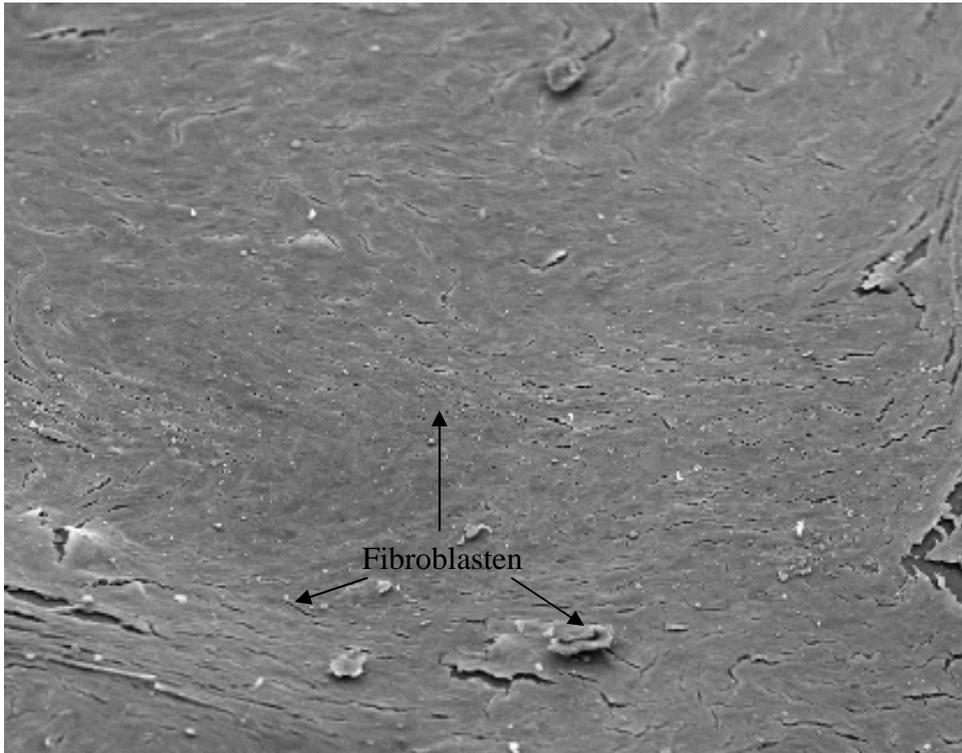


Abb. 49: Elektronenmikroskopische Aufnahme von 100% konfluenten Fibroblasten, 100-fache Vergr.

Des Weiteren konnte, wie bei der Immunfluoreszenz, gezeigt werden, dass die Urothelzellen sich während der Kulturdauer in mehreren Schichten übereinander lagerten. Lokal begrenzt entwickelte sich eine geschlossene Urothelschicht (Abb.50). Zusätzlich bildeten die Zellen untereinander Zell-Zell-Kontakte aus.

Es konnte keine negative Auswirkung der Hyaluronsäure als Trägergel auf die Besiedlung der Fibroblasten mit den Urothelzellen festgestellt werden. Die Abbildungen 52 und 53 zeigen, dass die Urothelzellen an dem Dextranomer aus dem Trägergel anhefteten.

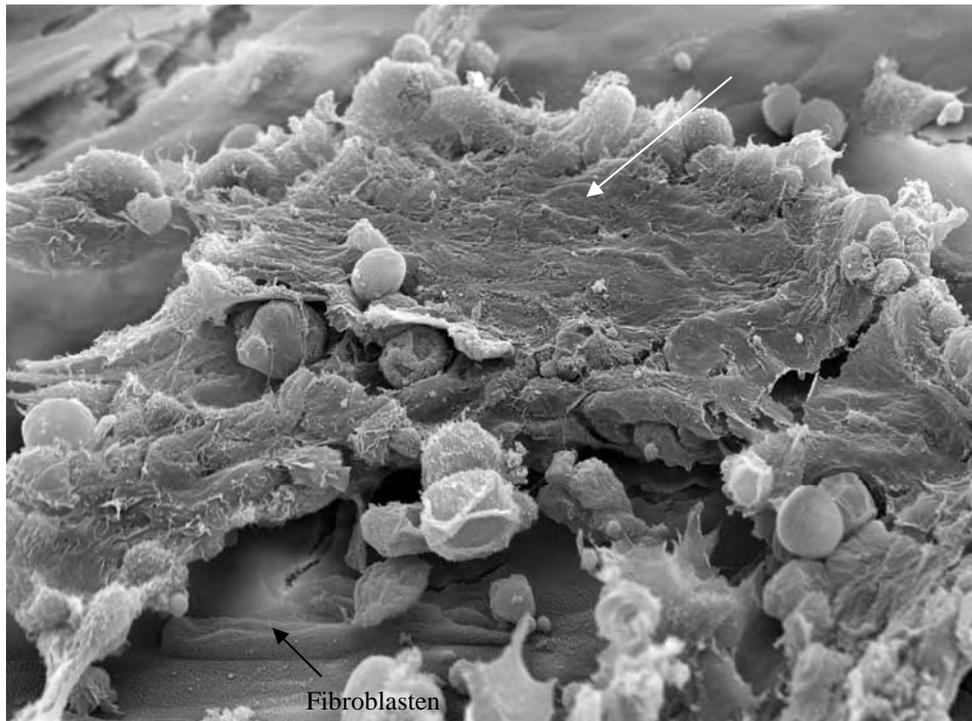


Abb. 50: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen (Pfeilmarkierung) und murinen Fibroblasten, 1 Woche nach Aussaat der Urothelzellen, 200-fache Vergr.

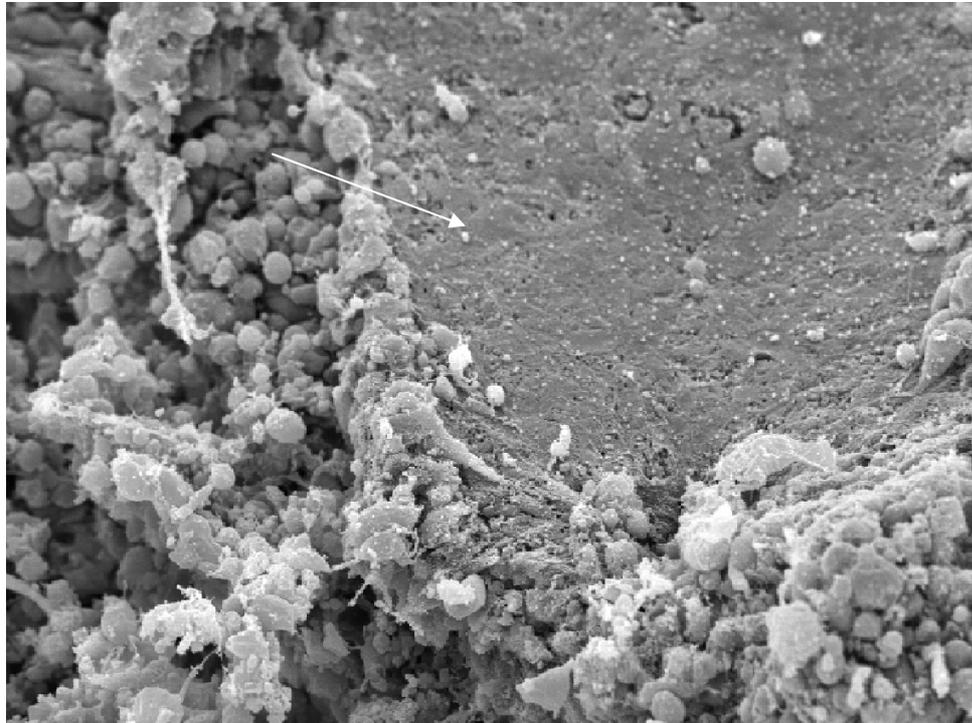


Abb. 51: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen (Pfeilmarkierung) und murinen Fibroblasten (nicht abgebildet), 3 Wochen nach Aussaat der Urothelzellen, 100-fache Vergr.

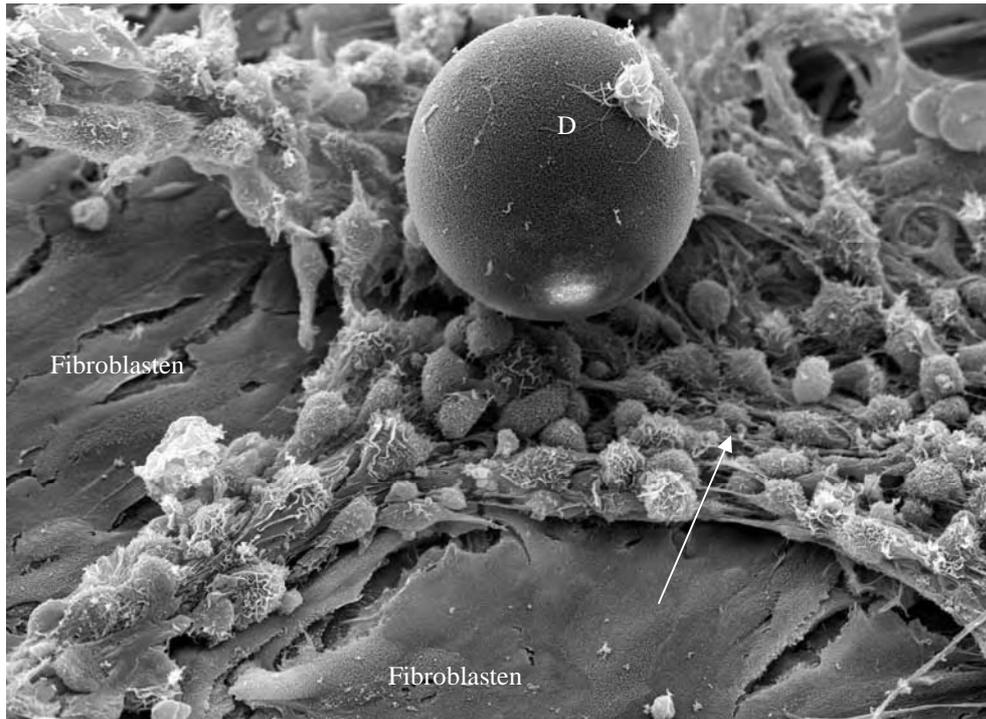


Abb. 52: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen (Pfeilmarkierung) und murinen Fibroblasten, 1 Woche nach Aussaat der Urothelzellen mit Hyaluronsäure (1:4) und Dextranomer (D), 200-fache Vergr.

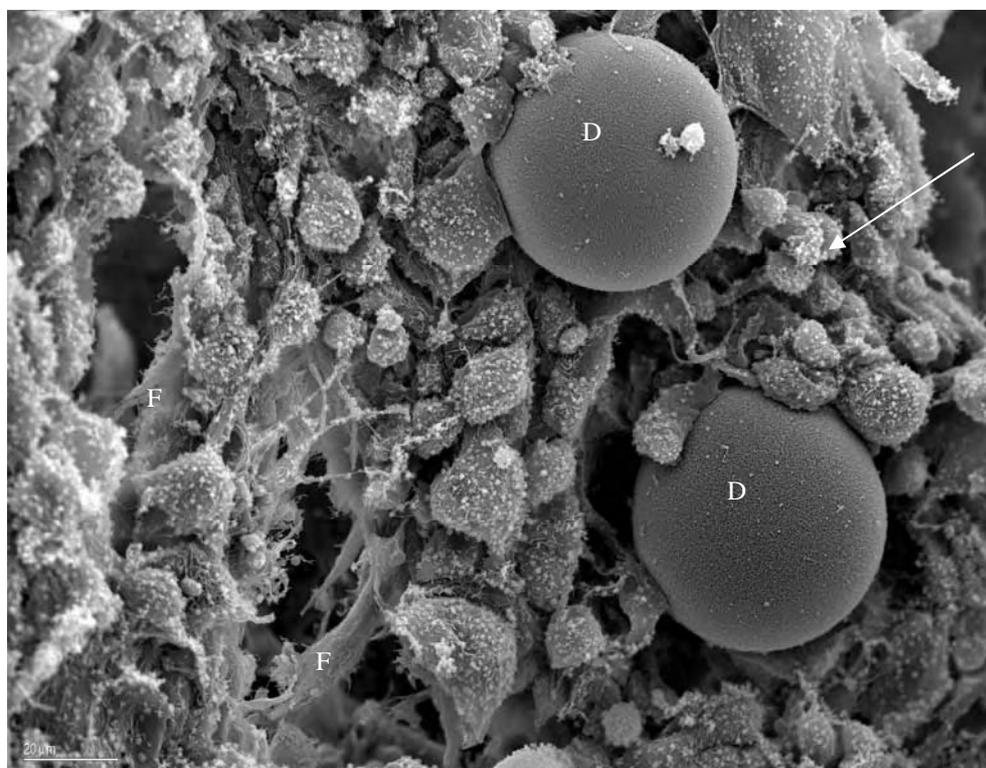


Abb. 53: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen (Pfeilmarkierung) und murinen Fibroblasten (F), 3 Wochen nach Aussaat der Urothelzellen mit Hyaluronsäure (1:4) und Dextranomer (D), 200-fache Vergr.

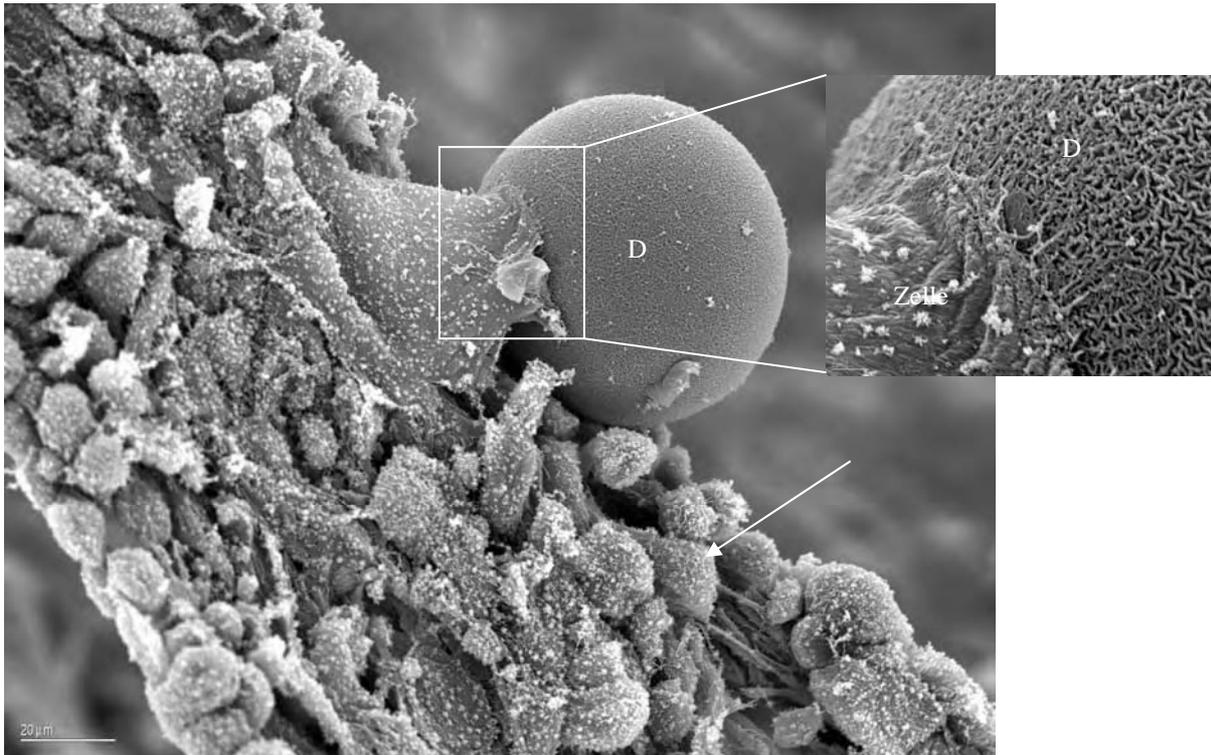


Abb. 54: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von porcinen Urothelzellen (Pfeilmarkierung) und murinen Fibroblasten (nicht abgebildet), 3 Wochen nach Aussaat der Urothelzellen mit Hyaluronsäure (1:4) und Dextranomer (D), 200-fache Vergr., der Ausschnitt zeigt das Anheften der Urothelzellen am Dextranomer, 500-fache Vergr.

5.5.3 Nachweis des Einflusses von stabilisierter Hyaluronsäure mit Dextranomeren auf die zelluläre Morphologie in der Ko-Kultur mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur genaueren Untersuchung der Zell-Zell-Kontakte von porcinen Urothelzellen und den Fibroblasten in der Ko-Kultur wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Die Zell-Zell-Kontakte geben Auskunft über die Stabilität eines Zellverbandes und der zellulären Integrität.

Für die TEM-Untersuchungen wurden zum einem der Einfluss von Hyaluronsäure mit Dextranomeren in der Konzentration 1:4 auf die Kulturen und Ansätze ohne Hyaluronsäure näher untersucht.

Es konnte wie in Abbildung 55 dargestellt eine Schichtung von Fibroblasten und Urothelzellen ohne Durchmischung der Zellen während der Kulturdauer (1 Woche, 3 Wochen) gezeigt werden.

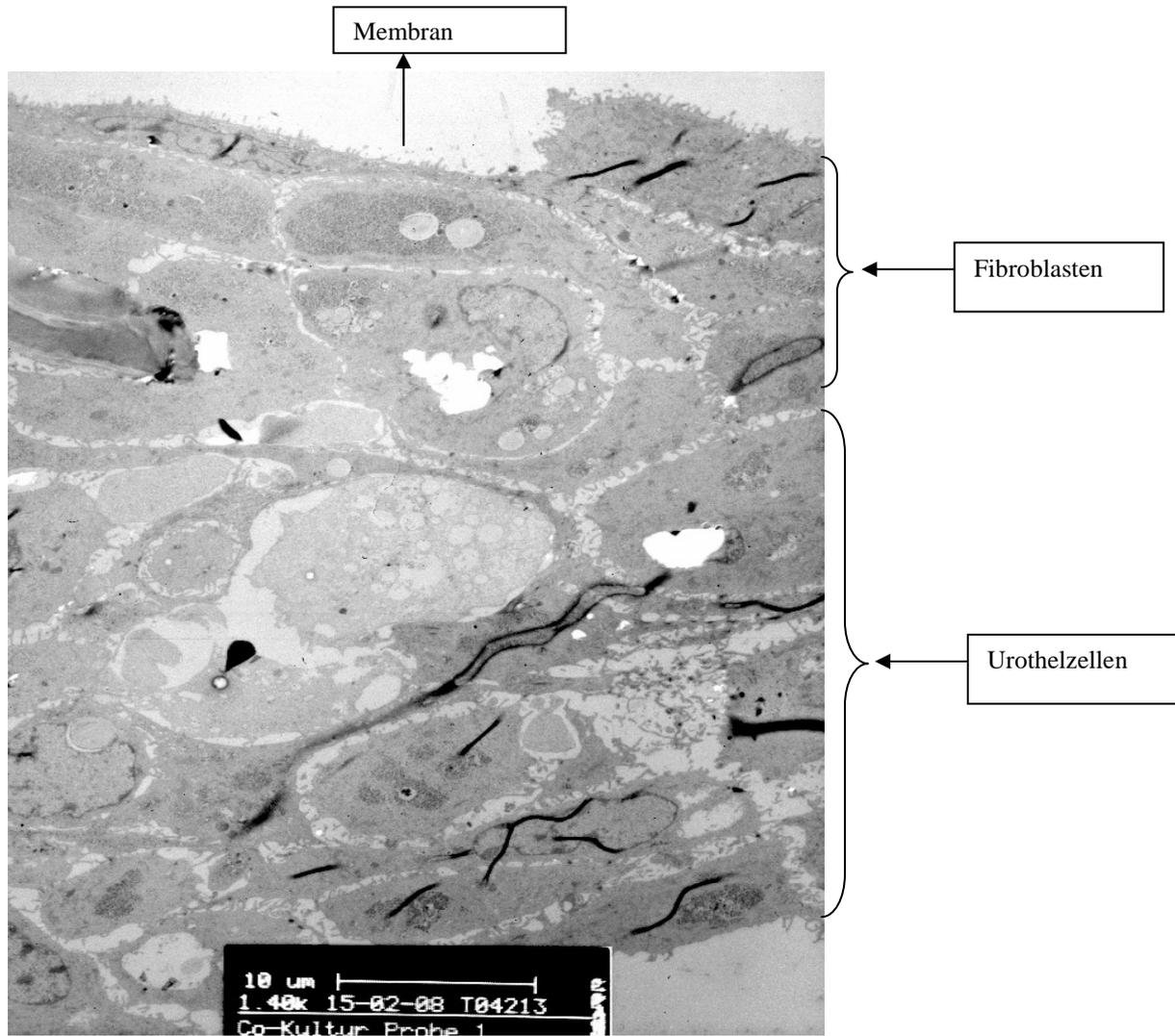


Abb. 55: Transmissionselektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 1 Woche nach Aussaat, 2000-fache Vergr.

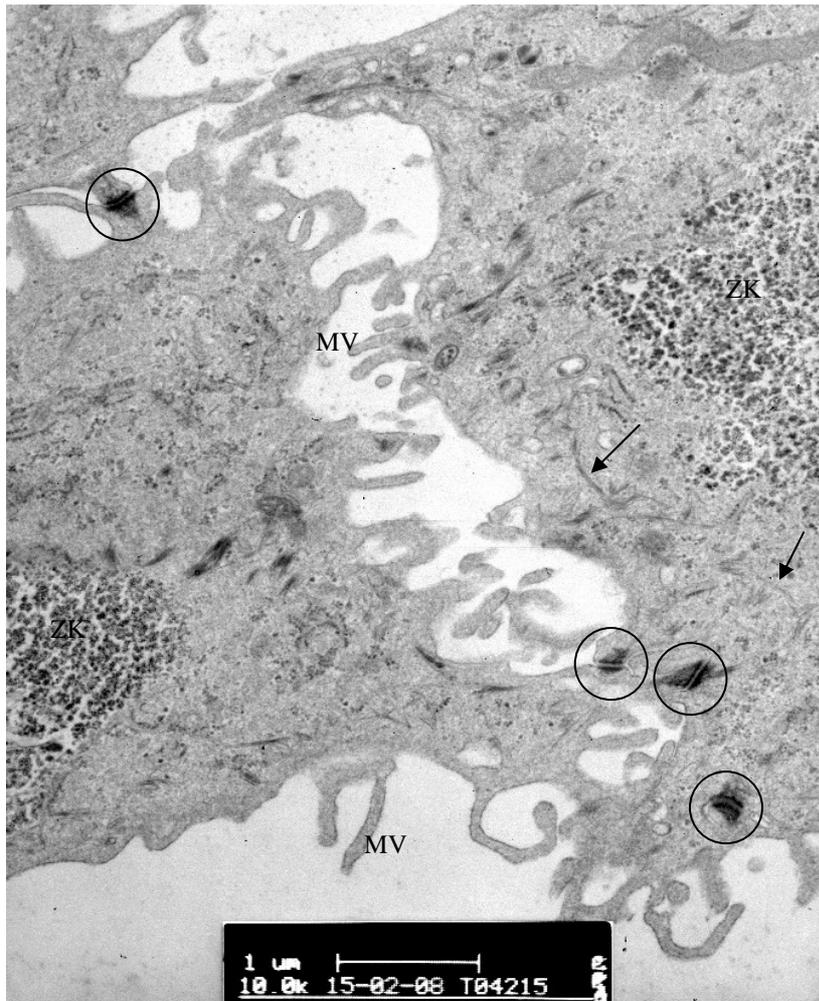


Abb. 56: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 1 Woche nach Aussaat, Kreis= Desmosomen, Pfeil= Intermediär Filamente, MV= Mikrovilli, ZK= Zellkern, 10000-fache Vergr.

Die Urothelzellen in der Negativkontrolle (ohne Hyaluronsäure und Dextranomere) bildeten nach 1 Woche in der Zellkultur Desmosomen als Zell-Zell-Kontakte aus. Nach 3 Wochen Kulturdauer wurde die Zunahme der Desmosomen zwischen den Zellen nachgewiesen. Vereinzelt konnten auch zu beiden Zeitpunkten Tight Junctions gefunden werden, die die benachbarten Zellen miteinander ausbildeten.

Diese Zell-Zell-Kontakte konnten in der Ko-Kultur, die mit Hyaluronsäure und Dextranomeren inkubiert wurde, nur nach einer Woche detektiert werden. In den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen nach einer Inkubationszeit von 3 Wochen konnten weder Desmosomen noch Tight Junctions nachgewiesen werden.

Allerdings zeigten alle Zellen die Ausbildung von Mikrovilli.

Zusätzlich konnten zelluläre Bestandteile wie Mitochondrien, Ribosomen, endoplasmatisches Retikulum, Intermediärfilamente, diskoidale Vesikel, „coated Vesikeln“ und Lipidtropfen gefunden werden, die für die Vitalität, zelluläre Integrität und Aktivität der Zellen sprechen.

An mehreren Stellen konnten in der Probe und Negativkontrolle im Bereich der apikalen Membran microride Plaques und Uroplakine nachgewiesen werden.

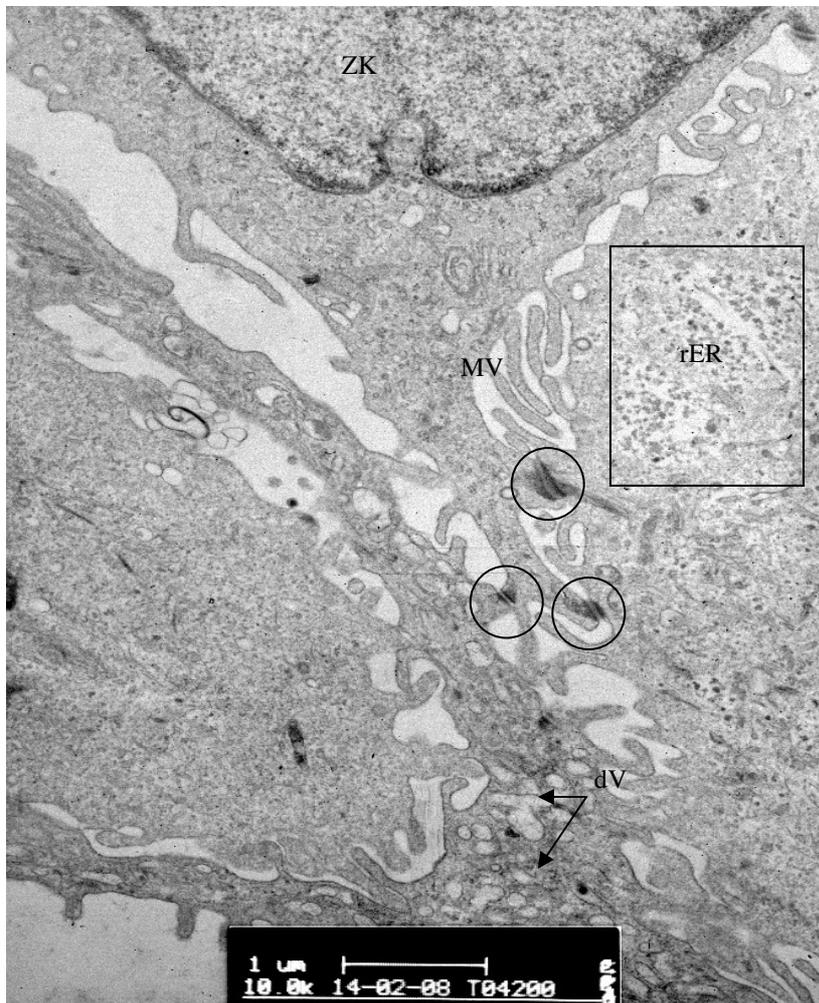


Abb. 57: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 1 Woche nach Aussaat, Kreise= Desmosomen, Pfeil= diskoides Vesikel, MV= Mikrovilli, ZK= Zellkern, rER= raues endoplasmatisches Retikulum, 10000-fache Vergr.

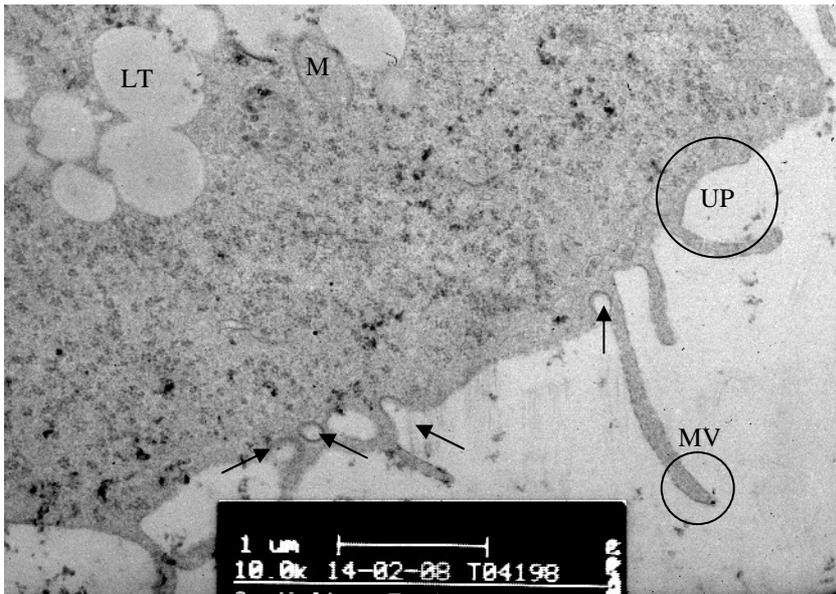


Abb. 58: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 1 Woche nach Aussaat, Kreise= Uroplakin (UP), Pfeil= „coated Vesikel“, MV= Mikrovilli, M= Mitochondrien, LT= Lipidtropfen, 10000-fache Vergr.

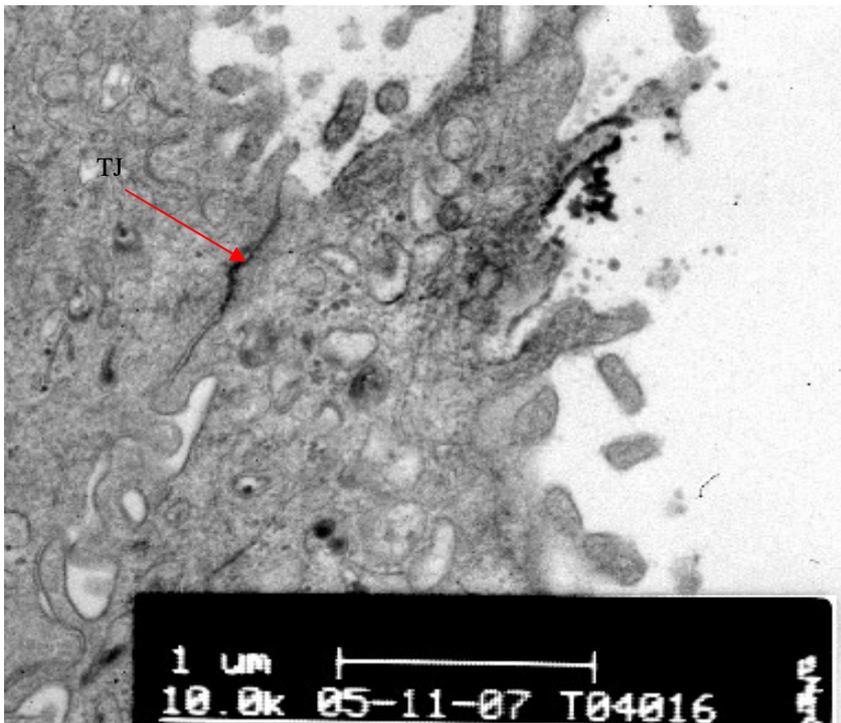


Abb. 59: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 1 Woche nach Aussaat, TJ= Tight Junction, 10000-fache Vergr.

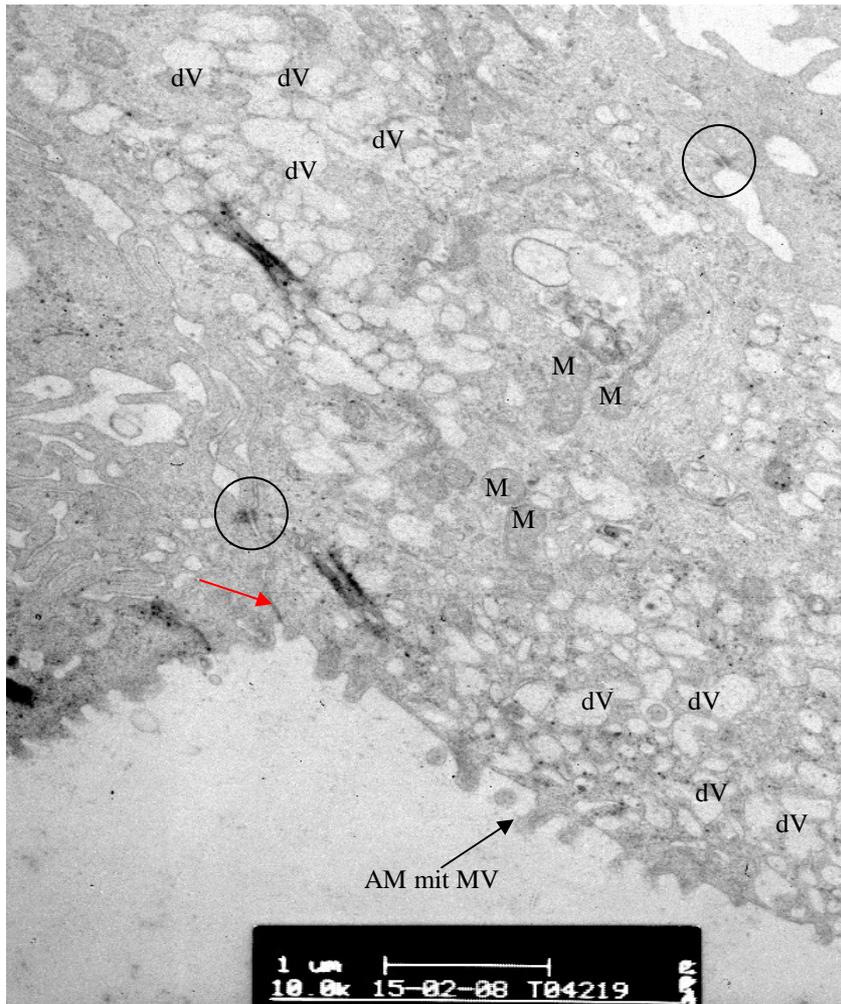


Abb. 60: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 3 Wochen nach Aussaat, Kreise=Desmosomen, dV= coated Vesikel, MV= Microvilli, M= Mitochondrien, AM= apikale Membran, Pfeil (rot)= Tight Junction, 10000-fache Vergr.

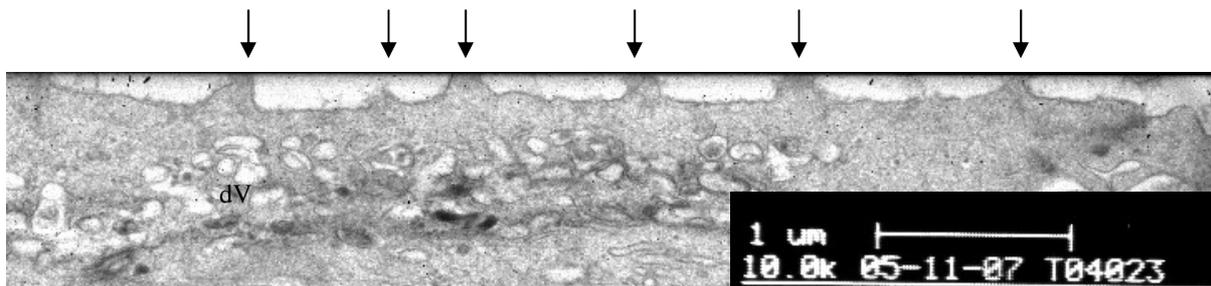


Abb. 61: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 3 Wochen nach Aussaat, Ausschnitt= apikale Membran mit microriden Plaques (Pfeile) mit darunter liegenden diskoiden Vesikeln (dV), 10000-fache Vergr.

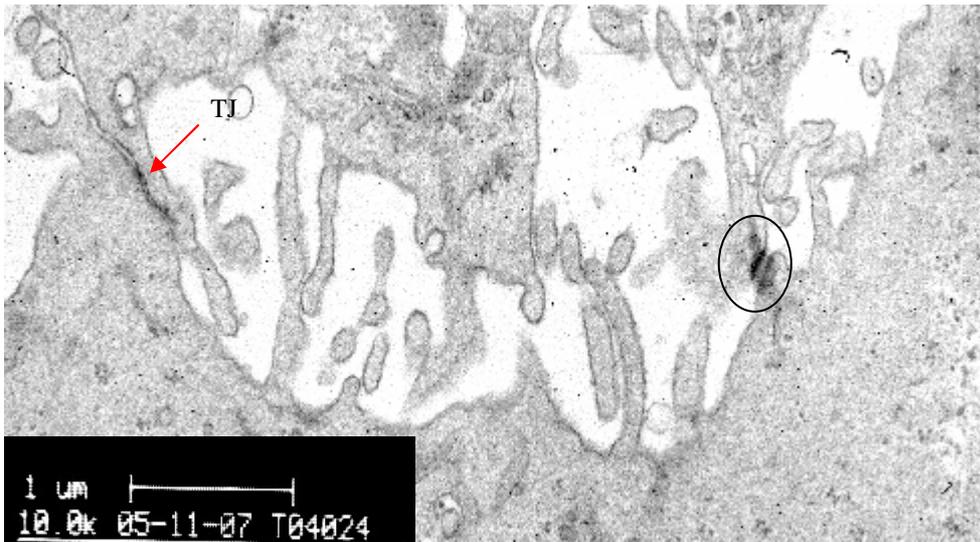


Abb. 62: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 3 Wochen nach Aussaat, mit den Zell-Zell-Kontakten Desmosomen (Kreis) und Tight Junction (Pfeil rot), 10000-fache Vergr.

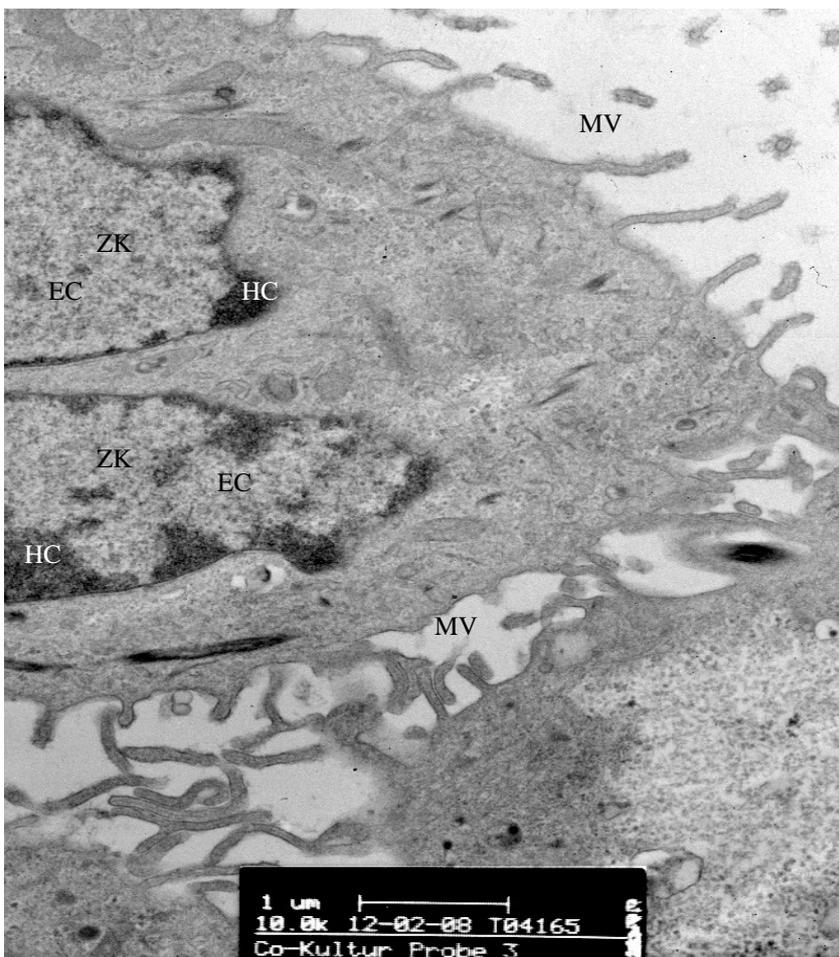


Abb. 63: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 1 Woche nach Aussaat und Zugabe von Hyaluronsäure und Dextranomer, ZK= Zellkern mit Heterochromatin (HC) und Euchromatin (EC), 10000-fache Vergr.

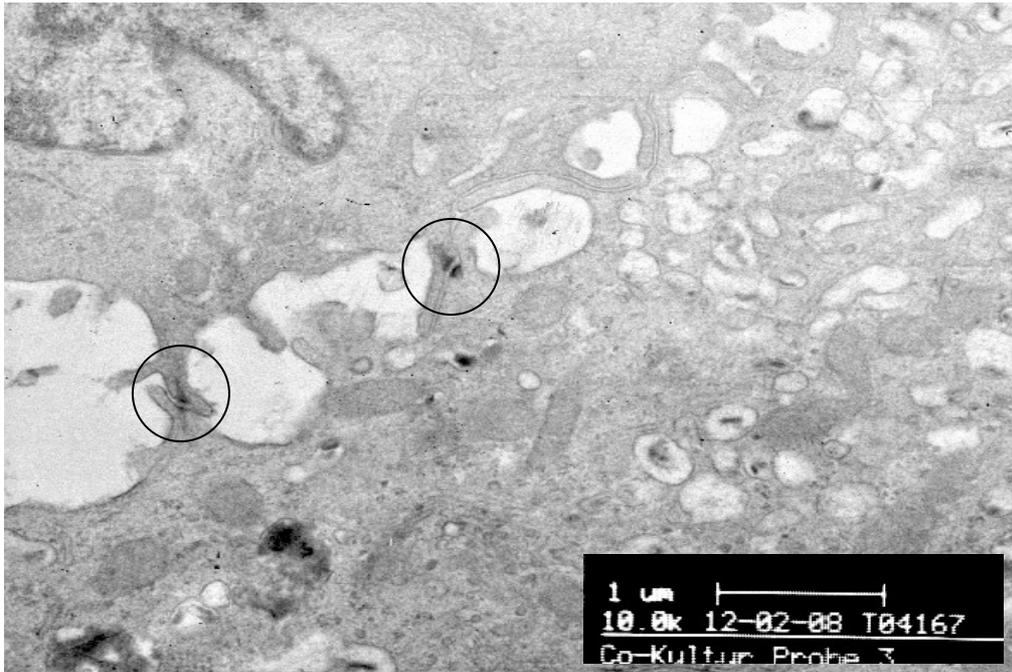


Abb. 64: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 1 Woche nach Aussaat und Zugabe von Hyaluronsäure und Dextranomer, Ausbildung von Desmosomen (Kreis), 10000-fache Vergr.

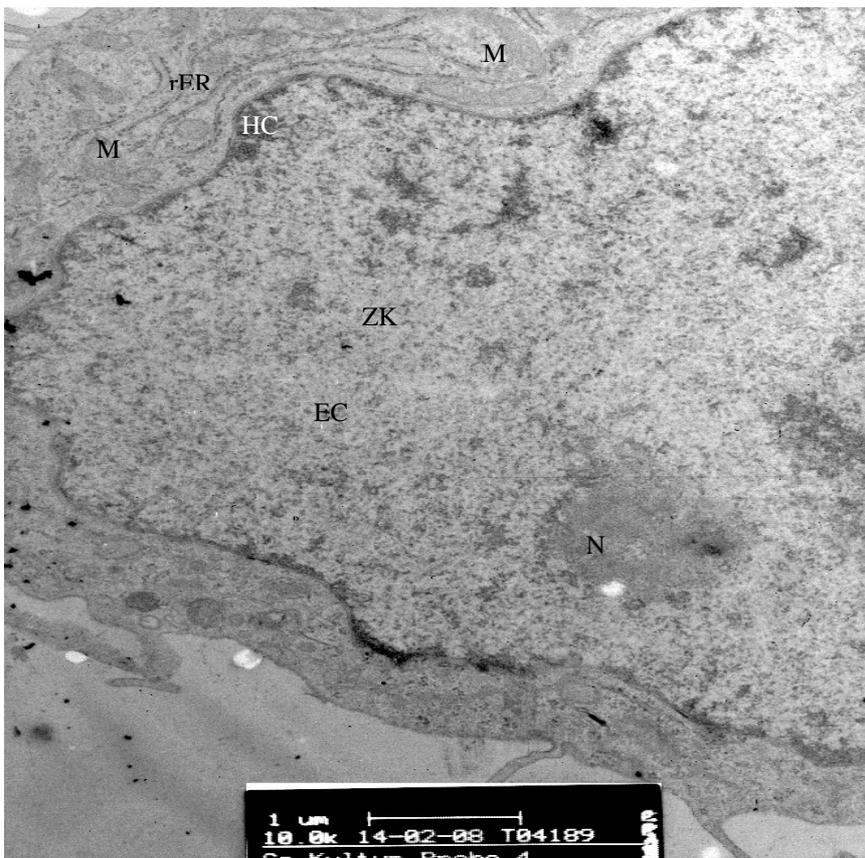


Abb. 65: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 3 Wochen nach Aussaat und Zugabe von Hyaluronsäure und Dextranomer, ZK= Zellkern mit Heterochromatin (HC) und Euchromatin (EC), M= Mitochondrien, N= Nukleus, rER= rauhes endoplasmatisches Retikulum, 10000-fache Vergr.

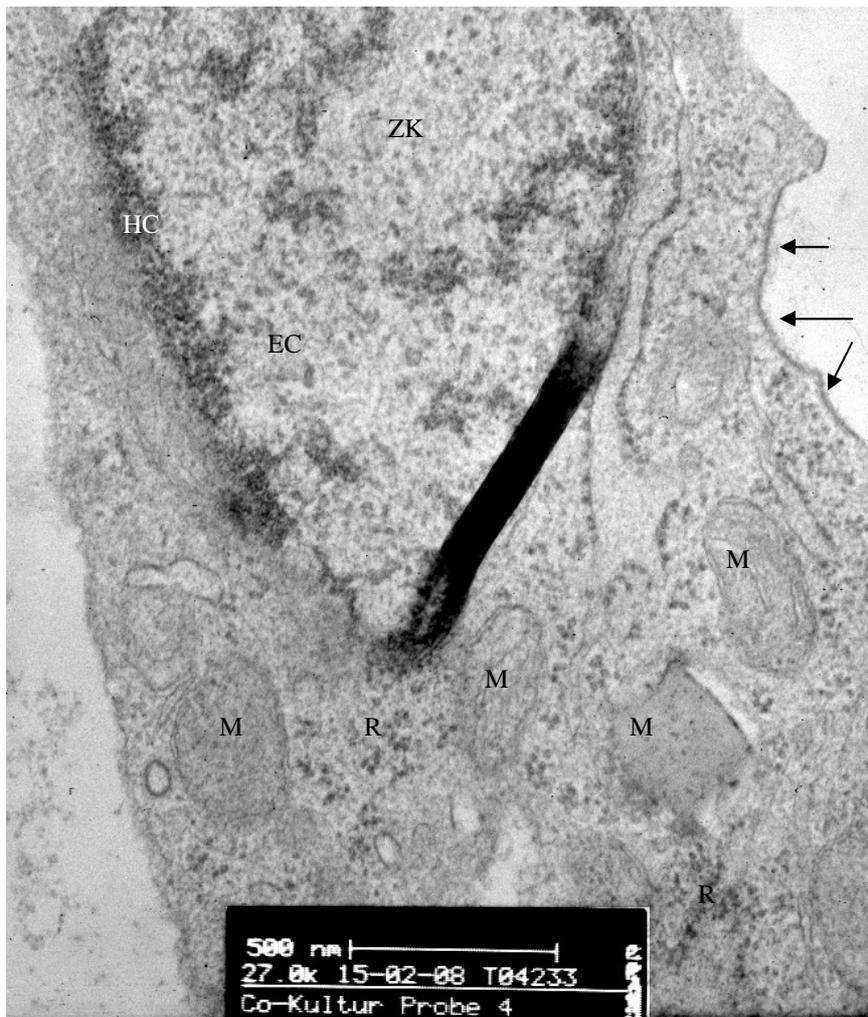


Abb. 66: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur von murinen Fibroblasten und porcinen Urothelzellen 3 Wochen nach Aussaat und Zugabe von Hyaluronsäure und Dextranomer, mit Ausbildung microrider Plaques an der apikalen Zellmembran (Pfeil), ZK= Zellkern mit Heterochromatin (HC) und Euchromatin (EC), M= Mitochondrien, R= Ribosomen, 10000-fache Vergr.

6. Diskussion

Eine Harnröhrenstriktur ist histologisch eine Vernarbung des urethralen Gewebes, wobei meistens auch das Corpus spongiosum betroffen ist (Spongiofibrose). Dieses führt zu einer Verengung des Harnröhrenlumens und folglich zu obstruktiven Miktionssymptomen und Pollakisurie, Nykturie oder Harnwegsinfekte oder Prostatitis.

Abhängig von der Ätiologie der Striktur (Länge, Lokalisation und Rezidiven) sind in der Literatur mehr als 200 unterschiedliche operative Therapieverfahren beschrieben. Dieses verdeutlicht, dass der optimale Therapieansatz noch nicht gefunden wurde.

Im klinischen Alltag wird in der Regel eine Urethrotomia interna nach Sachse durchgeführt, wobei die Rezidivrate bis zu 90% beträgt [Seibold et al., 2005] und deshalb oft mehrfache Eingriffe notwendig sind. Bei längeren Strikturen wird die offene Exzision der Striktur mit anschließender End-zu-End-Reanastomierung oder bei größeren Defekten die Deckung mit freien Transplantaten (z. B. gestielter Vorhautlappen, Mundschleimhaut) für das operative Vorgehen gewählt. In sehr schwierigen Fällen werden zum Teil die zweizeitige Operationsmethoden gewählt. Aber alle diese genannten Optionen haben ihre Beschränkungen. End-zu-End-Anastomosen sind in ihrer Länge begrenzt (max. 1,5 cm). Die gestielten Vorhautlappen sind nur im Bereich der vorderen Harnröhre gut einsetzbar und bei der Verwendung von Wangenschleimhaut entsteht bei deren Entnahme eine Wunde im Mundraum, wobei die Gefahr besteht, dass der Ductus parotideus verletzt wird.

Die optimale weniger invasive operative Therapie der Harnröhrenstriktur mit nur einem Eingriff hat eine große klinische Relevanz. Eine neue endoskopische Operationstechnik mit höherer Rezidivfreiheit wäre wünschenswert. Synthetisch hergestellte Materialien sind für derartige Zwecke jedoch gegenwärtig nicht geeignet. Diese neigen zu Inkrustationen, Rezidivstrikturen, Fistel- und Steinbildung [Shiroyanagi et al., 2004].

Eine effektive und weniger invasive Technik könnte der Einsatz von im Labor expandierten patienteneigenen Urothelzellen sein. Durch eine funktionelle Rekonstruktion der Harnröhrenschleimhaut mit in vitro gezüchteten Urothelzellen könnte die Rückresorption der harnpflichtigen Stoffe vermieden werden, wodurch eine durch Mediatoren ausgelöste Narbenbildung verhindert und das Risiko eines Rezidives verringert wird.

Zurzeit existieren keine etablierten klinischen Verfahren zur Therapie der Harnröhrenstriktur. Bevor eine neue Therapie zum humanen Einsatz kommen kann, muss diese zuerst als „proof

of principle“ in einem Tiermodell evaluiert werden. Hierfür eignet sich vor allem das porcine Grosstiermodell, da es anatomisch dem Menschen am nächsten kommt (Fraser et al., 2004).

6.1 Phänotypisierung von kultivierten porcinen Urothelzellen

Der Einsatz autologer Urothelzellen im Großtiermodell für die Therapie der Harnröhrenstriktur erfordert die Prüfung von Qualität und Funktionalität der transplantierten Zellen. Ein Ziel der Arbeit war es zu überprüfen, ob der epitheliale Phänotyp von porcinen Urothelzellen in vitro erhalten bleibt.

In unseren immunhistochemischen Untersuchungen zur Phänotypisierung von nativen Gewebeproben von porcinen Harnleitern und Blasen als Vergleichskontrolle konnte eine starke Expression der Zytokeratine 8, 17 und 19 in den intermediären und superficialen Schichten des Urothels nachgewiesen werden. Dieses konnte durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden [Fraser et al., 2004, Troyanowsky et al., 1989, Moll et al., 1982]. Das Zytokeratin 18 zeigte eine starke Expression in den apikalen Bereichen des Harnblasenepithels. Das konnte auch von Riedel et al. (2005) gezeigt werden. Ähnlich reagierte der Antikörper, der gegen das deckzellspezifische Zytokeratin 20 gerichtet war. Er zeigte eine Reaktion des CK20 in den Deckzellen. Diese war jedoch nicht so intensiv und gleichmäßig verteilt wie die Expression des CK18 in den Deckzellen. Das konnte durch Riedel et al. (2005) und Moll et al. (1992) bestätigt werden. Das CK20 konnte wie auch schon in einer Studie über den Vergleich der Expressionen der Zytokeratine in Harnleiter und Blase von Riedel et al. (2005) und auch bei Southgate et al. (2007) im Harnleiter nur vereinzelt nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass im Vergleich zur Harnblase, wo eine geschlossene Deckzellschicht angenommen wird, im Harnleiter nur einzelne Deckzellen vorkommen [Riedel et al., 2005]. Ein Grund hierfür könnte die unterschiedliche Beanspruchung durch Dehnung sein, die in der Harnblase deutlich stärker ist.

In den Basalzellen des Harnblasenurothels wurde eine gleichmäßige mittel starke Expression des CK14 nachgewiesen [Moll et al., 1982]. Der Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3 reagierte mit allen Schichten des Urothels bei Harnblase und Harnleiter, da dieser ein polyklonaler Marker für Basal- Intermediär- und Superficialzellen ist.

Die kultivierten porcinen Urothelzellen wurden nach der Analyse des Zytokeratinmusters im nativen Gewebe ebenfalls auf die Zytokeratine 8, 14, 17, 18, 19, 20, und AE1/AE3 untersucht. Bis auf das Zytokeratin 20 konnten alle Zytokeratine des nativen Gewebes in der Zellkultur nachgewiesen werden.

In der Immunzytochemie konnten keine signifikanten Veränderungen in dem Zytokeratinmuster der porcinen Urothelzellen während der Kultivierung detektiert werden. Der Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3 war in allen Passagen der kultivierten Zellen stark positiv.

Vorwiegend wurden CK8, CK17, CK18 und CK19 exprimiert. Diese Zytokeratine werden in den intermediären Schichten des nativen Urothels ausgebildet. Daraus lässt sich schließen, dass die isolierten Urothelzellen während der Kultivierung in den weniger differenzierten Zustand der Intermediärzellen übergehen aber ihren epithelialen Phänotyp beibehalten. Obwohl das CK17 physiologisch in stratifizierten Urothelien vorkommt, konnte es in allen Passagen nachgewiesen werden. Dieses konnte auch Ludwikowski et al. (1999) in einer Studie über den Vergleich der Zytokeratinexpression von humanen und porcinen Urothelzellen nachweisen. Die humanen Urothelzellen zeigten eine schwächere Expression des CK17 als die porcinen Zellen.

Das deckzellspezifische CK20 konnte in der Immunzytochemie nicht nachgewiesen werden. Es konnte auch schon von Feil et al. (2007) und Ludwikowski et al. (1999) in kultivierten Urothelzellen nicht beobachtet werden.

Das basalzellspezifische CK14 konnte immunzytochemisch nur sehr vereinzelt detektiert werden. Da das CK14 nach Chu et al. (2001) auch als ein Marker für epitheliale Tumore heran gezogen werden kann, spricht die geringe Expression von CK14 gegen eine maligne Entartung der Epithelzellen [Moll, 1998]. Dieses zeigt, dass die im nativen Gewebe differenzierten Zellen, unter in vitro Bedingungen in einen intermediären/basalen Zustand übergehen – in dem die Proliferation aber nicht die Differenzierung der Zellen in der Initialphase erwünscht ist.

Bei der Phänotypisierung der Urothelzellen auf Proteinebene mittels Westernblot zeigten sich im Vergleich zur Immunzytochemie Abweichungen bezüglich der Expressionen während der Kulturdauer. Im Hinblick auf das allgemeine Zytokeratinmuster der porcinen Urothelzellen decken sich die Ergebnisse der Westernblotanalyse mit denen der Immunzytochemie. Die Westernblotanalyse zeigte eine Abnahme der CK8 Expression während der Kultivierung, wobei es in der Immunzytochemie konstant blieb und in Passage 4 zunahm. Auch das CK17 zeigte in der Passage 5 in der Immunzytochemie eine Abnahme der Expression, die in der Westernblotanalyse nicht dargestellt werden konnte. Die Expression des CK14 war im Westernblot in allen Passagen ähnlich und zeigte nur in Passage 5 eine Abnahme. Diese Unterschiede in der Expressionsintensität der Zytokeratine erklären sich durch die verschiedenen Methoden. Die Bewertung der Expressionen der Zytokeratine mittels Westernblot ist wesentlich objektiver als die der Immunzytochemie, da diese durch die

Software „Alice“ verifiziert wurden und die Ergebnisse der Immunzytochemie subjektive Eindrücke des Betrachters sind.

Der Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3 ist ein allgemeiner Marker für den epithelialen Phänotyp. Er reagierte bei den porcinen Urothelzellen auf die Zytokeratine 5 (58 kDa), 7 (54 kDa), 8 (52 kDa) und 19 (40 kDa). Das CK5 wird in Basalzellen des Urothels zusammen mit dem CK14 exprimiert. Die Zytokeratine 7, 8 und 19 kommen in den Intermediärschichten vor. Schon Woodcock-Mitchell et al. (1982) konnten mittels Westernblot an humaner Epidermis nachweisen, dass AE1 hauptsächlich mit den Zytokeratinen zwischen 50-56 kDa und AE3 mit den höheren Zytokeratinen mit einem spezifischen Gewicht von 58-67 kDa reagiert. Sie zeigten auch, dass weder AE1 noch AE3 mit den wasserunlöslichen Proteinen der Fibroblasten noch mit Aktin oder dem Intermediärfilamentenprotein Vimemtin der mesenchymalen Stammzellen reagiert. Der Pan-Zytokeratinmarker reagiert folglich nicht auf entdifferenzierte Urothelzellen, die fibroblast- oder stammzellähnlichen Charakter aufweisen. Die Expressionsintensitäten der einzelnen Zytokeratine des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 zeigen im Vergleich zu den beiden monoklonalen Antikörpern gegen CK8 und 19 höhere Werte. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Kreuzreaktivität des Pan-Zytokeratinmarkers wesentlich höher ist als die der anderen monoklonalen Antikörper. Diese Antikörper waren auch nicht spezifisch gegen Schwein ausgerichtet, wobei der AE1/AE3 Antikörper hervorragend mit porcinen Zellen reagierte. Allerdings decken sich die Ergebnisse des AE1/AE3 Westernblots mit denen der Immunzytochemie, denn auch hier nahm die Expressionsintensität von CK8 und 19 mit Anzahl der Passagen zu. Die starke Zunahme der Expressionsintensität des CK19 in Passage 5 (>200%) könnte auch ein erstes Zeichen für eine maligne Veränderung oder Dedifferenzierung der porcinen Urothelzellen durch die Dauer der Kultivierung sein. Das CK19 wird verstärkt in Adenokarzinomen von Leber, Niere, Lunge, Uterus, Mamma und unter anderem auch in Urothelkarzinomen ausgebildet.

Die Qualität der Urothelzellen wurde zusätzlich mit dem Apoptosemarker Kaspase 3 untersucht. Es konnten keine apoptotischen Zellen gefunden werden, was für eine gute Qualität der Urothelzellen und Kulturbedingungen spricht.

Für die Implantation von porcinen Urothelzellen können Zellen in den Passagen 1-4 verwendet werden, da sie bis auf geringe Abweichungen, weder in der Immunzytochemie noch in der Westernblotanalyse, große Unterschiede in ihrem epithelialen Phänotyp aufwiesen. Sie zeigten einen epithelialen intermediären Phänotyp, der u. a. typisch für ein einschichtiges unverhorntes Epithel ist [Moll, 1998], so wie es in der Zellkultur vorliegt.

Aufgrund des starken Anstiegs der CK19 Expression scheinen porcine Urothelzellen in Passage 5 für eine in vivo Applikation nicht geeignet zu sein.

6.2 PKH26-Markierung porciner Urothelzellen in vitro

Die Urothelzellen sollen in die Harnröhre der Schweine an die Stelle der geschlitzten Striktur injiziert werden und dort für eine Versuchsdauer von 2-8 Wochen verweilen. Um die implantierten Urothelzellen nach der Inkubationszeit für die Auswertung eindeutig detektieren zu können, ist es notwendig die Zellen vor Versuchsbeginn zu markieren. Voraussetzung hierfür sind ein optimales Markierungssystem und die bestmögliche Detektionsmethode. Bei den Markierungssystemen stehen radioaktive Markierungen, Fluorochrom-Verbindungen und Fluorochrom konjugierte Antikörper zur Auswahl. Entscheidend für die Auswahl eines Markierungssystems ist die Frage, ob die Kopplung selbst die Funktion der Zelle beeinträchtigt oder gar stört. Des Weiteren sind die Intensität und Stabilität der Zellmarkierung für eine in vivo Applikation von entscheidender Bedeutung.

Zu den Fluoreszenzfarbstoffen, mit denen Zellmarkierungen durchgeführt werden, gehören die Isothiocyanatverbindungen (FITC, RITC). Sie eignen sich vor allem für die Markierung der Oberflächenproteine auf Lymphozyten. Nachteil dieser Farbstoffe ist die zu schnelle Eluierung aus den Zellen und die zusätzliche Markierung von angrenzenden Zellen. Ein weiteres Markierungssystem ist ein Indocarbocyaninfarbstoff, doch auch bei diesem treten Probleme mit unregelmäßigen Markierung und schlechten Reproduzierbarkeit auf.

Zu den radioaktiven Markierungssubstanzen gehören ^{125}J ([^{125}J]-5-jodo-2-desoxyuridin), ^{51}Cr (Natriumchromat) und ^{111}In (Indiumoxin). Nachteile beim Einsatz von radioaktiver Substanzen sind u. a. die „Carrier-Toxizität“, die internen Strahlungseffekte, die schlechte Aufnahme und die schnelle Elution aus den Zellen. Außerdem besteht eine nicht unerhebliche Gefährdung des wissenschaftlichen Personals.

Auf Grund der aufgeführten Probleme mit den verschiedenen Markierungssystemen wurde in dieser Studie die Einsetzbarkeit der Markierung von Urothelzellen mit PKH26 (Sigma-Aldrich) untersucht.

PKH26 ist ein aliphatischer, fluoreszierender Farbstoff. Er besteht aus lipophilen Kohlenwasserstoffketten, einem Linkermolekül und dem Fluorochrom selbst. Die lipophile Kohlenwasserstoffkette löst sich in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran, was zu einer festen Bindung an die Zelle führt. In der Literatur wurden u. a. Neuronen, Gliazellen [Haas et al., 200], Bakterien [Raybourne et al., 1994], Lymphozyten [Ashley et al., 1993; Khalaf et al., 1993; Samlowski et al., 1991], Phagozyten [Horan et al., 1990], Erythrozyten [Horan et al.,

1990] Knochenmarkszellen [Matsunuma et al., 2006], Hepatozyten [Bruns et al., 2005] und Endothelzellen [Messina et al., 1992] mit PKH26 markiert. Laut Herstellerangaben ist eine Halbwertszeit für die Elution des PKH26 Linkers aus Erythrozyten von 100 Tagen in vivo angegeben.

Mittels WST-1-Test wurde in dieser Arbeit der Einfluss der PKH26-Markierung auf die Vitalität der Urothelzellen untersucht. Es konnte kein zytotoxischer Effekt auf die Urothelzellen nachgewiesen werden. Die Vitalität der markierten Urothelzellen war bis Tag 4 höher als die der unmarkierten Zellen (=Positiv-Kontrolle). Ab dem fünften Tag konnte eine Abnahme in der Vitalität der markierten Urothelzellen im Vergleich zur Positiv-Kontrolle verzeichnet werden. Gründe für den Rückgang der Zellvitalität könnten der Nährstoffmangel im Versuchsverlauf durch fehlenden Mediumswechsel und nach Erreichen der Konfluenz, die Kontaktinhibition sein. Ähnliche Ergebnisse zur Vitalitätsmessungen von PKH26 markierten Zellen erzielten Samlowski et al. (1991), indem sie die Vitalität von Lymphozyten mittels Trypanblau-Färbung bestimmten. Sie konnten zeigen, dass eine Langzeitmarkierung von Leukozyten mit PKH26 keine Auswirkungen auf die Zellvitalität hat. Auch Ashley et al. (1993) ermittelten die Vitalität von PKH26 gefärbten Leukozyten, indem sie die Summe der Zellen mit der mittleren Fluoreszenz der Zellen verglichen und dadurch ein Maß für die gesamte Fluoreszenz (100%) am Anfang der Kultur und zu bestimmten Zeitpunkten erhielten, welche sich nur änderte (erniedrigte), wenn durch Zelltod Zellen ausschieden.

Parallel zur Vitalität wurde die Proliferation von PKH26 markierten porcinen Urothelzellen mit dem BrdU-Test (Roche) bestimmt. Es wurden die Proliferation in den Tagen 1-7 gemessen. Die Messwerte für die Proliferation der markierten Urothelzellen waren vom ersten bis zum sechsten Tag größer als die der Positiv-Kontrolle, also ähnlich im Vergleich zur Vitalität der markierten Zellen. Nach einer Woche nahm die Proliferation der Urothelzellen um ca. 40% im Vergleich zur Positiv-Kontrolle ab. Hierbei ist zu bedenken, dass die Urothelzellen innerhalb von 7 Tagen in dem Well der Kulturplatte eine Konfluenz von 100% erreichten. Dadurch kam es zur Kontaktinhibition und zur Proliferationshemmung. Die Wachstumsrate der Zellen blieb von der Markierung unbeeinflusst. Nach Ashley et al. (1993) bleibt die Proliferation der Zellen durch eine PKH26-Markierung von Leukozyten unverändert. Sie ermittelten die Proliferationsrate mittels FACS-Analyse. Auch Boutonnat et al. (1998) konnten im Vergleich verschiedener Proliferationsmeßmethoden (BrdU, FACS) keinen Unterschied in der Proliferationsrate von PKH26 gefärbten oder ungefärbten (Kontrolle) peripheren Blutzellen ermitteln.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Stabilität von PKH26 markierten Zellen im Langzeitversuch bis zu 35 Tagen in der Zellkultur im Hinblick auf den Einsatz im Tierversuch untersucht. Dazu wurden die porcinen Urothelzellen PKH26 gefärbt, kultiviert und im Abstand von 7 Tagen die Gesamtzellzahl und die Anzahl der rot fluoreszenzierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Anschließend wurde der Anteil der PKH26 positiven Zellen von der Gesamtzahl berechnet. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten eine stetige Abnahme der PKH26 positiven Zellen. Nach 14 Tagen waren noch 50% und nach 35 Tagen sogar nur noch 5% der porcinen Urothelzellen positiv. Es ist davon auszugehen, dass bei jeder Zellteilung jede Tochterzelle die Hälfte des Farbstoffes, der in der Membran der Elternzelle vorhanden ist, bekommt. Dadurch nehmen die Stabilität und vor allem auch die Intensität der PKH26 Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Proliferationsrate der verwendeten Zellen ab. Boutonnat et al. (1998) verwendeten nicht proliferierende periphere Blutzellen um die Stabilität der Markierung von PKH26 zu testen. Sie zeigten, dass die PKH26 Fluoreszenz ohne Zellteilung nach 6 Tage Kulturdauer sich nicht signifikant von der Fluoreszenz von Tag 0 unterschied.

Das native Urothel gehört zu den regenerationsstabilen Geweben und hat physiologisch eine sehr niedrige „turn-over“ Rate. Die Lebenserwartung einer Urothelzelle liegt laut Cooper (1972) und Blenkinsopp (1969) zwischen 6 Monaten und einem Jahr.

Strehl et al. (2002) geben eine Mitoserate für das Urothel von 2% am Tag an. Die Mitoserate unserer porcinen Urothelzellen in vitro lag bei 25% pro Tag, dieses entspricht einer 22,5-fach höheren Zellteilung als in vivo. Gründe hierfür sind eine gesteigerte Proliferationsrate in vitro, die durch das Kulturmedium induziert wird. Bei einem Vergleich dieser beiden Werte und der Zeit, die in den in vitro Studien ermittelt wurde (50% positiv für PKH26 nach 14 Tagen), wären 50% der PKH26 markierten Zellen in vivo 315 Tagen nach Implantation bzw. Markierung nachweisbar. Dieses zeigt, dass die PKH26 Markierung sehr gut für Langzeitstudien geeignet ist. Allerdings ist auch zu beachten, dass die „turn-over“ Rate des Urothels durch die Verletzung bei der Schlitzung der Harnröhrenstriktur im Tiermodell ansteigt [Baskin et al., 1997].

Laut Hersteller-Information ist eine Halbwertszeit für die Elution des PKH26-Linkers von 100 Tagen in vivo für die Detektion von Erythrozyten angegeben.

Haas et al. (2000) konnte PKH26 markierte transplantierten Nervenzellen 4 Monate nach Implantation nachweisen. Hierbei ist zu bedenken, dass die Proliferationsrate von Nervenzellen in vivo 0% beträgt. Matsunuma et al. (2006) konnten 14 Tagen nach Implantation PKH26 markierte Knochenmarkszellen detektieren und Bruns et al (2005)

gefärbte Leberzellen nach 7 Tagen. Die Arbeitsgruppe von Dell'Accio (2005) konnten PKH26 markierte Chondrozyten bis zu 14 Wochen (98 Tage) nach Implantation *in vivo* nachweisen. Das ist der längste Zeitraum, der in der Literatur beschrieben wird.

Andere Arbeiten aus unserem Labor, die parallel durchgeführt wurden, konnten mesenchymale Rattenstammzellen 163 Tage nach Implantation nachweisen.

Während der Langzeitstudie zur PKH26 Stabilität konnte beobachtet werden, dass die PKH26-Linker zu Clustern akkumulierten und punktförmig wie Granula in der Membran der Urothelzellen erschienen (Abb. 41 a-f). Ähnliches wurde von Haas et al. (2000) in der Zellkultur von Nervenzellen beobachtet. Eine veränderte Morphologie der Urothelzellen nach PKH26-Markierung konnte nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Markierung mit dem PKH26-Linker eine gute Methode für Langzeitstudien zur Detektion von Zellen *in vivo* ist. Die Dauer der Stabilität des Linkers ist von der Mitoserate des jeweiligen Gewebes abhängig. Die durchschnittliche Halbwertszeit von 100 Tagen *in vivo* kann durch eigene Untersuchungen und durch Literaturangaben bestätigt werden.

Die Stabilität *in vitro* ist auf Grund der hohen Proliferation deutlich verkürzt. Die Vitalität und Proliferation von Urothelzellen wird nicht negativ beeinflusst.

6.3 Biokompatibilitätsuntersuchungen zum Einfluss von stabilisierter Hyaluronsäure mit Dextranomeren auf porcine Urothelzellen

Um ein Abschwimmen der injizierten Urothelzellen im Bereich der resezierten Striktur zu vermeiden, wird eine geeignete Trägersubstanz benötigt. Diese sollte als temporäre Matrix und zur homogenen Verteilung der Zellen dienen, ohne einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen auszuwirken. Zudem ist die klinische Zulassung des verwendeten Trägermaterials im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung unerlässlich.

In der Literatur werden verschiedene Trägersubstanzen zur Implantation von Zellsuspensionen beschrieben. Häufig werden jedoch im Bereich des Tissue Engineering Matrices (azellulär oder synthetisch) verwendet, die *in vitro* mit Zellen besiedelt werden, bevor sie *in vivo* eingesetzt werden.

Moriya et al. (2003) verwendeten für die Besiedlung von Kollagenschwämmen mit porcinen Urothelzellen ein Kollagengel als Trägersubstanz. Sie zeigten, dass die Zellen ähnlich dem nativen Urothel stratifizierten und sich in 4-5 Schichten übereinander anordneten. Wechselberger et al. (1998 und 2001) verwendeten mehrfach erfolgreich Fibrinkleber mit murinen Urothelzellen für die Rekonstruktion des Harntrakts im Rattenmodell. Sie

besiedelten künstlich hergestellte blasenähnliche Kapseln mit murine Urothelzellen als Suspension in Fibrinkleber. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (ohne Fibrinkleber) konnten im Fibrinkleber histologisch mehrlagige, AE1/AE3 positive Zellcluster gefunden werden. In einem zweiten Projekt wurde eine Suspension von Urothelzellen, Fibrinkleber und Medium unter die Faszie des M. rectus abdominis injiziert. Nach 1-4 Wochen konnten vitale mehrlagige Zellcluster nachgewiesen werden. Ähnliches gelang Bach et al. (2001). Sie verwendeten Fibrinkleber als Trägersubstanz zur Besiedlung von, vorher in Ratten unter die Haut implantierte, Silikonröhrchen mit Urothelzellen als Harnröhrenersatz.

In unserer Arbeitsgruppe wurde stabilisierte Hyaluronsäure (HA) mit einem Zusatz von Dextranomeren (Zuidex der Firma QMed) hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und deren Eignung als Trägersubstanz näher untersucht.

Hyaluronsäure ist ein Glykosaminglykan, das einen wichtigen Bestandteil des Bindegewebes darstellt und eine Rolle bei der Zellproliferation und Zellmigration spielt. Hyaluronsäure besteht aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch miteinander verknüpften Glukuronyl- β -(1 \rightarrow 3)-N-Acetylglukosamin- Disaccharideinheiten, wobei bis zu 100.000 aufeinander folgen können. Die Zuckereinheiten sind unsulfatiert. Hyaluronsäure liegt als amphipathische Helix vor und ist als einziges Glykosaminoglykan nicht an ein Proteinzentralfilament gebunden. Ein Hyaluronsäuremolekül kann durch Hydratisierung eine bis zu 10.000-fach größere Raumbeanspruchung besitzen als das Volumen des Moleküls selbst, so dass sich schon bei niedrigen Konzentrationen ein viskoses Gel bildet.

Hyaluronsäure kommt im Knorpel, in der Synovia, in der Nabelschnur sowie im Glaskörper des Auges vor. In den Fibroblasten wird die Hyaluronsäure aus Glucose synthetisiert.

Eine Sonderform ist stabilisierte Hyaluronsäure (z. B. Produkte mit NASHA- Technologie) die je nach Hersteller zwischen weniger als 1% und bis zu ca. 20-30% verändert werden. Für die Haltbarkeit der Produkte spielt der Prozentsatz der Stabilisierung keine große Rolle, wichtig ist die Art der Stabilisierung.

Die Hyaluronsäure wird in der Medizin in vielen verschiedenen Gebieten eingesetzt. Seit etwa 1990 werden Hyaluronsäurepräparate in arthrosegeschädigte Gelenke gespritzt, um die Gleitfähigkeit der veränderten Gelenke zu verbessern.

Einige Nasensprays gegen Schnupfen enthalten Hyaluronsäure um der Austrocknung der Nasenschleimhäute vorzubeugen. Auch in Augentropfen zur Behandlung der Keratokonjunktivitis sicca findet die Hyaluronsäure Verwendung. Die viskoelastische Eigenschaft der Hyaluronsäure sorgt für einen stabilen und langanhaltenden Tränenfilm ohne Beeinträchtigung des Sehens. Seit einigen Jahren sind Produkte auf dem Markt, die

Patientinnen mit Belastungsinkontinenz eine Behandlung mit stabilisierter Hyaluronsäure ermöglicht. Hier werden vier Hyaluronsäure-Depots um die Harnröhre injiziert. Männliche Inkontinenz-Patienten (z.B. nach radikaler Prostatektomie) können ebenfalls behandelt werden.

Erfolgsversprechend sind die Ergebnisse, die bei der Behandlung von vesikorenalem Reflux (VUR) bei Kindern mit stabilisierter Hyaluronsäure erzielt werden konnten [Stenberg et al., 1995].

Hyaluronsäurepräparate werden auch zur Faltenunterspritzung, zum Modellieren der Lippen (Vergrößerung, „aufspritzen“), zur Hautauffrischung oder zum Aufbau von Gesichtskonturen verwendet. Je nach Stabilisierung der Hyaluronsäure bleibt der so gewonnene Effekt 6-12 Monate erhalten.

Durch die vielfältigen Anwendungen der Hyaluronsäure in der Medizin und dem nicht tierischem Ursprung der eingesetzten Hyaluronsäure würde einer medizinischen Zulassung nichts im Weg stehen, wenn die Tierversuche vielversprechende Ergebnisse zeigen.

Die Dextranomere bestehen aus Polysacchariden (Dextran). Diese sind durch Quervernetzung miteinander verbunden und bilden dadurch das nicht anaphilaxierende Dextranomer.

Dextranomer wird seit über 30 Jahren erfolgreich zur Behandlung von exsudativen Wunden und Geschwüren eingesetzt [Parulkar et al., 1985]. Die Dextranomere können das Wundexudat durch den Kapillarfluss aufnehmen. Außerdem können kleinere Moleküle wie Elektrolyte, Prostaglandine und Hormone von den Dextranomeren aufgenommen werden. Größere Moleküle und Mikroorganismen können an der Dextranomeroberfläche anheften [Zühlke et al.]. Alle diese Eigenschaften sind ein großer Vorteil da bei der Schlitzung der Harnröhrenstriktur Wundexudat, eine Entzündung oder eine Infektion entstehen kann, welches sich negativ auf die Vitalität der Zellen auswirken kann.

In dieser Arbeit wurde mittels WST-1-Test der Einfluss von verschiedenen Hyaluronsäurekonzentrationen auf die Vitalität der porcinen Urothelzellen charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass höhere Konzentrationen zu einer verminderten Zellvitalität führten. Die besten Ergebnisse konnten bei einem Hyaluronsäure-Medium-Verhältnis von 1:4 und 1:5 ermittelt werden, wobei das Verhältnis von 1:5 nicht viskös genug war um als Trägermaterial zu fungieren. Gründe für die verminderte Zellvitalität können unter anderem sein, dass die Hyaluronsäurekonzentration zu Ungunsten der Mediummenge anstieg und die Ernährung der Zellen nicht optimal gewährleistet werden konnte.

Unter anderem zeigte sich in den ersten beiden Tagen eine deutlich geringere Vitalität der Zellen in den niedrigen Hyaluronsäure-Medium-Gemischen im Vergleich zur

Positivkontrolle. Da es sich bei den in der Hyaluronsäure beigemischten Dextranomeren um Kugeln (2-3mal größer als Zelle) handelt und die Viskosität im Vergleich zu der Positivkontrolle erhöht ist wurde ein Adhärenztest durchgeführt. Hierbei wurde nachgewiesen, dass die Migration der Zellen mit der Hyaluronsäure erschwert ist. Nach 3 Tagen hatten erst 63% der Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle auf dem Wellboden adhärirt. Die restlichen Zellen wurden vor dem Vitalitätstest mit dem restlichen Überstand abgesaugt und konnten deshalb nicht mitgemessen werden. Dieses würde zusätzlich erklären, warum die Vitalität mit der Hyaluronsäuremenge abnimmt.

Da die Strikturen sich nicht nur am ventralen Harnröhrenlumen befinden, sondern überall im Lumen, bietet diese Trägersubstanz aufgrund ihrer Viskosität den Vorteil, dass die Zellen in allen Teilen des beschädigten Urothels migrieren können und lokal am gewünschten Ort verbleiben.

Die nicht tierische Hyaluronsäure wurde in mehreren in der Literatur beschriebenen Studien vielfältig eingesetzt.

In einer Studie von Ibrahim et al. (2006) wurde der Einfluss von Hyaluronsäure auf die Proliferation von Endothelzellen untersucht. Es konnte keine verminderte Proliferation festgestellt werden.

Bellew et al. (2005) testen die Hyaluronsäure auf ihre Sterilität nach dem Einsatz beim Patienten. Sie inkubierten Spritzen mit Hyaluronsäureresten unter aeroben und anaeroben Bedingungen für einen Zeitraum von 2 bis 9 Monaten. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein Bakterienwachstum nachgewiesen werden. Dieses wäre ein großer Vorteil um eventuell aufsteigenden Harnwegsinfektionen entgegen zuwirken oder diese zu verursachen.

Moon et al. (2003) verwendete die Hyaluronsäure zur Penisvergrößerung in verschiedenen Tiermodellen (Kaninchen, Hund). Nach 3 bis 90 Tagen wurden die Organe entnommen und histologisch untersucht. Bis zu 2 Wochen nach Implantation konnten entzündliche Infiltrate nachgewiesen werden. In den Langzeitversuchen wurden keine Entzündungen oder Abstoßungsreaktionen festgestellt, was auf eine gute Biokompatibilität schließen lässt.

Lupton et al. (2000) beobachteten bei mehreren Patienten allergische Reaktionen, wenn die Hyaluronsäure als Faltenauffüller mehrmals unter die Haut gespritzt wurde.

In unseren Versuchen konnte kein negativer Einfluss bezüglich der Biokompatibilität der Hyaluronsäure oder den Dextranomeren auf die Urothelzellen festgestellt werden. Bei einem Hyaluronsäure-Medium-Gemisch von 1:4 konnte eine gute Zellvitalität, eine relativ hohe Adhärenz der Zellen in den ersten 3 Tagen (63% der Positivkontrolle) und eine gute

Viskosität für die Handhabung und Verteilung der Zellen in der Harnröhre nachgewiesen werden.

6.4 Untersuchungen zum Einfluss von stabilisierter Hyaluronsäure auf porcine Urothelzellen im Ko-Kulturmodell mit murinen Fibroblasten

Es wurde der Einfluss der Hyaluronsäure auf den epithelialen Phänotyp der Urothelzellen in einem Ko-Kulturmodell mit murinen Fibroblasten mittels Immunhistologie überprüft. Zusätzlich wurden in diesem Ko-Kulturmodell die zelluläre Morphologie mittels Rasterelektronenmikroskopie und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten mittels Transmissionselektronenmikroskopie näher charakterisiert.

6.4.1 Immunhistologische Untersuchungen der Ko-Kulturen mittels Pan-Zytokeratinmarker AE1/AE3

Die porcinen Urothelzellen wurden mittels des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 immunhistologisch untersucht. Sie zeigten nach 3 Wochen keine Veränderung in ihrem epithelialen Phänotyp. Es konnte kein Unterschied im Expressionslevel des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 in der Ko-Kultur mit bzw. ohne Hyaluronsäure nach 3 Wochen Inkubationsdauer nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass weder die stabilisierte Hyaluronsäure noch die murinen Fibroblasten eine dedifferenzierende Wirkung auf die Urothelzellen haben. Auch Fossum et al. (2004) gelangten zu ähnlichen Ergebnissen bei humanen Urothelzellen, die 3 Wochen als Ko-Kultur mit Fibroblasten inkubiert worden sind. Diese Zellen zeigten in der Immunhistologie ein positives Ergebnis für die Zytokeratine 5, 6, 8, 17, 19.

Weiterhin wird in der Literatur diskutiert ob die Anwesenheit von Fibroblasten in einer Ko-Kultur eine Auswirkung auf die Urothelzellen hat.

Fujiyama et al. (1995) beobachtet, dass ihre Urothelzellen auf einer Kollagenmatrix nur mit der Anwesenheit von Fibroblasten differenzierten.

Staack et al. (2001) untersuchten das Wachstum von humanen und porcinen Urothelzellen unter dem Einfluss von Fibroblasten und von durch Fibroblasten konditioniertem Medium. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Fibroblasten und auch das konditionierte Medium einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation der Urothelzellen hat. Allerdings ist dieser Effekt speziesabhängig. Es konnte in dieser Studie keine positive Auswirkung von porcinen Fibroblasten auf die Proliferation von humanen Urothelzellen und andersherum festgestellt werden.

Maas-Szabowski et al. (2001) beobachtet einen ähnlichen Effekt bei der Proliferation von Keratinozyten unter dem Einfluss von Fibroblasten. Sie erklärten diesen Effekt dadurch, dass die Keratinozyten Interleukin-1- α , - β produzieren. Die Interleukine bringt die Fibroblasten dazu den Keratinozyten-Growth-Faktor (KGF) zu synthetisieren, der dann wiederum die Keratinozyten veranlasst TGF- β zu produzieren und dadurch zu proliferieren.

Es konnte keine Durchmischung der Urothelzellen und Fibroblasten beobachtet werden.

Die Urothelzellen zeigten ein 3D-Wachstum in 2-3 Schichten in vitro, allerdings konnte keine 5-6 fache Schichtung der Urothelzellen wie in vivo erreicht werden.

Bei denen mit Hyaluronsäure und Dextranomeren inkubierten Ko-Kulturen konnte in der Immunhistologie eine stark aufgelockerte Struktur der Urothelzellen beobachtet werden.

Es ist davon auszugehen, dass die Urothelzellen sich um die Dextranomere herum anlagerten und dadurch keine durchgehend kompakte Urothelschicht entstehen konnte.

6.4.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Ko-Kulturen

Die Ko-Kulturen wurden nach 1 und 3 Wochen Inkubationszeit rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Urothelzellen sich in mehreren Schichten dreidimensional übereinander lagerten und dadurch eine geschlossene Urotheldecke entstand. Die Zellen bildeten untereinander Zell-Zell-Kontakte aus.

Die REM-Untersuchungen unterstützen die immunhistologischen Daten hinsichtlich des Einflusses der Dextranomere auf die Ausbildung von mehrlagigen Zellschichten. Es konnte gezeigt werden, dass die Urothelzellen sich um die Dextranomere anlagerten und diese in den Zellverband integrierten. Dieses ist wahrscheinlich auf die positive Oberflächeneigenschaft der Dextranomere zurückzuführen und würde für eine gute Biokompatibilität sprechen.

6.4.3 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der Ko-Kulturen

In den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten in allen Proben intrazelluläre Bestandteile wie Mitochondrien, Ribosomen, endoplasmatisches Retikulum, und Lipidtropfen sowie Endozytosevorgänge detektiert werden, was für eine gute Vitalität und Aktivität der Zellen sprechen. Zusätzlich konnten in manchen Proben extrazelluläre Strukturen wie Mikrovilli, Desmosomen und Tight Junctions gefunden werden.

Welche Aufgabe den Mikrovilli im Urothel zukommt ist nicht vollständig geklärt. Möglicherweise spielen die Mikrovilli eine resorptive Funktion bei der Harnzusammensetzung. Deng et al. (2001) zeigten, dass das Urothel aktiv an der Zusammensetzung des Harns beteiligt ist. Sie bewiesen, dass das Rinderurothel eine Reihe

verschiedener Proteine wie Plasminogen-Aktivator, Urokinase und Serinproteasen über cAMP- und Calcium-abhängige Mechanismen in den Harn sezernieren.

Die Mikrovilli wurden vor allem an den intermediären Urothelzellen in allen Ko-Kulturen gefunden. Diese Beobachtung machten auch Liebhold et al. (1995) in nativen Schweineurothel. Sie postulierten einen Verlust der Mikrovilli zugunsten der Entwicklung von Deckzellen und ihrer typischen „mikroiden Plaques“ aus nachrückenden Superficialzellen. Die Hyaluronsäure und die Dextranomere hatten keine Auswirkung auf die Ausbildung von Mikrovilli.

Desmosomen kommen in allen Epithelzellen vor und sind entscheidend an der Stabilisierung von Zellen im Verband beteiligt (Borrmann et al., 2000). Das Desmosomen besteht aus 2 Hälften und einem Spaltraum von ca. 30 nm. Der Spaltraum ist im Elektronenmikroskop als eine zentrale Mittellinie zu erkennen. Auf der zytoplasmatischen Seite befindet sich jeweils eine elektronendichte Plaquestruktur die sich der Plasmamembran symmetrisch anfügt. In diese Plaques inserieren Intermediärfilamente und verankern so das Desmosomen im Zytoskelett.

Die am Aufbau beteiligten Proteine lassen sich in 3 Proteinfamilien einteilen: desmosomale Cadherine, armadillo Proteine und Plakine, welche wiederum in verschiedene Isoformen unterteilt werden können. Welche der Isoformen exprimiert wird, ist vom Gewebe abhängig. Es können auch mehrere Isoformen in denselben Geweben auftreten [Schafer et al., 1994].

In den Ko-Kulturen konnten in beiden Proben nach 1 Woche die Ausbildung von Desmosomen beobachtet werden. In der Kontrolle nahm die Anzahl der Desmosomen bis zur 3 Woche zu. Dieses lässt auf eine feste Struktur der Urothelzellen in der Ko-Kultur schließen. In den mit Hyaluronsäure und Dextranomer inkubierten Ko-Kulturen konnten nach 3 Wochen keine Desmosomen nachgewiesen werden. Dieses bestätigt auch wieder den Verdacht aus der Immunhistologie, dass die Zellstruktur nicht so kompakt war im Vergleich zur Kontrolle. Leider konnten aufgrund der Präparation der Proben in den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Dextranomere mehr detektiert werden.

Tight Junctions sind Zell-Zell-Verbindungen, die sowohl in endothelialen als auch in epithelialen Geweben vorkommen [Schneeberger und Lynch, 2004]. Ihre Aufgabe besteht zunächst in der Errichtung einer Barrierefunktion. Sie verhindern einen unkontrollierten Austausch von Wasser und niedermolekularen Stoffen, so dass die Homöostase im Gewebe aufrechtgehalten werden kann. Allerdings stellen sie keine starre Barriere dar. Auch verhindern sie die laterale Diffusion von Proteinen in der Plasmamembran. Sie fungieren als Abgrenzung der basolateralen und der apikalen Membran [Yap et al., 1998].

Elektronenmikroskopisch stellen sich Tight Junctions als ausgedehnter Kontaktbereich zweier benachbarter Zellen dar.

Tight Junctions konnten in den Ko-Kulturen in beiden Kontrollen und in der Probe mit 1 Woche Inkubationszeit gefunden werden.

In dem Ansatz mit Hyaluronsäure und Dextranomeren und einer Inkubationszeit von 3 Wochen konnten keine Tight Junctions gefunden werden was wiederum den Verdacht bestätigt, dass die Urothelzellen sich nicht zu einem kompakten Gewebe zusammenschließen konnten.

An den apikalen Zellen der Ko-Kulturen konnten in allen Proben an manchen Stellen asymmetrische Plasmamembranen mit microiden Plaques beobachtet werden. Diese microiden Plaques enthalten Uroplakine die normal nur in Deckzellen vorkommen. Zusätzlich konnten an den jeweiligen Stellen eine Vielzahl von diskoiden Vesikeln gesehen werden, welche ebenfalls von Uroplakin-haltigen Plaques gebildet werden.

Daneben fanden sich allerdings jedoch auch viele apikale Zellen ohne diese Charakteristika. Diese Zellen verfügten stattdessen über die vorher erwähnten Mikrovilli an ihrer Oberfläche. Ähnliche Beobachtungen machten Veranic et al. (2004) in regenerierender muriner Harnblase nach Cyclophosphamidbehandlung. Die regenerierenden Zellen entwickelten zunächst Mikrovilli und erst in einem späteren Stadium die typischen microiden Plaques mit Uroplakin. Die Mikrovilli-tragenden apikalen Zellen stellen folglich noch unreife Deckzellen dar.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Urothelzellen in der Ko-Kultur in beiden Ansätzen ihren Phänotyp behielten und sich dreidimensional in mehreren Schichten übereinander anordneten und Deckzellen-ähnliche Strukturen an einigen apikalen Zellen ausbildeten. Allerdings führte die Zugabe des Hyaluronsäure-Dextranomere-Gemisches dazu, dass die Urothelzellen sich um die Dextranomere herum lagerten und dadurch Zellkomplexe mit aufgelockerter Struktur mit wenigen Zell-Zell-Kontakten entstanden.

7. Ausblick

Auf der Basis der in-vitro-Vorversuche, soll als nächster Schritt die endoskopische Applikation von autologen Urothelzellen zusammen mit einem Hyaluronsäure-Medium-Gemisch als Trägermatrix für die Therapie von Harnröhrenstrikturen in einem Großtiermodell untersucht werden. Als Modelltier soll das Minipig verwendet werden.

In diesem Tiermodell soll unter anderem die Integration und die Vitalität der implantierten autologen Urothelzellen charakterisiert werden. Des Weiteren soll untersucht werden, ob der epitheliale Phänotyp der implantierten Urothelzellen auch nach erfolgreicher Implantation erhalten bleibt. Zusätzlich soll geprüft werden, ob die Integration der implantierten Zellen in das Urothel zu einer vollständigen Regeneration und Wiederherstellung der Gewebeintegrität führt. Überdies soll analysiert werden, inwieweit die Zellimplantation und die daraus resultierende Regeneration des Urothels einen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung der Spongiofibrose bzw. Harnröhrenstriktur hat. Hierbei würde die Analyse des Kollagen I : III Verhältnis ein hilfreiche Unterstützung für die Bewertung der Striktur-Entwicklung sein.

Zusätzlich wäre die Beimischung von anti-fibrotischen und entzündungshemmenden Wirkstoffstoffen, wie z. B. Paclitaxel oder Mitomycin C, in das Hyaluronsäure-Medium-Gemisch eine weitere Option, um eine überschießende Fibrosierung zu vermeiden.

8. Zusammenfassung

Der Einsatz autologer Urothelzellen im Großtiermodell für die Therapie der Harnröhrenstriktur erfordert die Prüfung von Qualität und Funktionalität der transplantierten Zellen.

Ziel der Studie war es zu prüfen, ob der epitheliale Phänotyp von porcinen Blasen­zellen in vitro erhalten bleibt. Zusätzlich wurde der Einfluss der Zellmarkierung für die Applikation im Großtiermodell und die Biokompatibilität des Trägermaterials stabilisierte Hyaluronsäure auf porcine Blasen­zellen untersucht.

Der epitheliale Phänotyp der porcinen Blasen­zellen wurde hinsichtlich des Zytokeratinmusters immunzytochemisch und mittels Westernblot analysiert. In den in-vitro-Untersuchungen konnten keine signifikanten Veränderungen im Zytokeratinmuster bei den porcinen Blasen­zellen in Passage 0 - 5 detektiert werden. Die porcinen Blasen­zellen exprimierten vorwiegend CK8, CK17, CK18 und CK19. Das Zytokeratin 20, als Marker für die enddifferenzierten Schirmzellen, konnte in den kultivierten Blasen­zellen nicht nachgewiesen werden. Für eine in-vivo-Applikation der autologen Blasen­zellen wären die Passagen 2 und 3 zu empfehlen.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Zellmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 auf die Vitalität und auf die Proliferation von porcinen Blasen­zellen charakterisiert. Parallel dazu wurden Untersuchungen zur Stabilität der PKH26-Markierung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass der Fluoreszenzfarbstoff PKH26 keinen hemmenden Einfluss auf die Vitalität und die Proliferation von porcinen Blasen­zellen hatte. Seine Halbwertszeit unter in-vitro-Bedingungen mit hohen Proliferationsraten lag bei 14 Tagen. Deshalb ist die PKH26-Markierung für eine In-vivo-Applikation im Großtiermodell geeignet.

Überdies wurde die Biokompatibilität von stabilisierter Hyaluronsäure mit Dextranomer bezüglich Vitalität und Migration von porcinen Blasen­zellen getestet. In einem Ko-Kulturmodell mit Fibroblasten wurde der Effekt von stabilisierter Hyaluronsäure und Dextranomer auf porcine Blasen­zellen hinsichtlich des epithelialen Phänotyps (AE1/AE3) und der Morphologie im Rasterelektronenmikroskop (REM) und Transmissions­elektronenmikroskop (TEM) charakterisiert. In den in-vitro-Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass das Verhältnis 1:4 von stabilisierter Hyaluronsäure mit Kulturmedium für eine in-vivo-Applikation am besten geeignet scheint. Positive Immunfärbungen der porcinen Blasen­zellen mit dem Pan-Zytokeratin Marker AE1/AE3 zeigten, dass der epitheliale Phänotyp der porcinen Blasen­zellen nach Kultivierung mit

stabilisierter Hyaluronsäure erhalten blieb. Allerdings zeigte sich eine deutlich aufgelockerte, wenig kompakte Struktur des Gewebes, resultierend aus den großen Dextranomer Molekülen. Diese Beobachtungen wurden in den REM-Aufnahmen morphologisch bestätigt. Die Urothelzellen lagerten sich um die Dextranomere an. In den TEM-Untersuchungen konnten in der Kontrolle (ohne Hyaluronsäure und Dextranomer) nach 1 und 3 Wochen Desmosomen, Tight-Junctions und apikale Membranen mit Uroplakin Einlagerungen nachgewiesen werden. In den mit Hyaluronsäure und Dextranomer inkubierten Ko-Kulturen ließen sich diese Strukturen nur nach 1 Woche Inkubationszeit darstellen.

Die Daten zeigen eine gute Biokompatibilität von stabilisierter Hyaluronsäure als Trägermatrix für porcine Blasen­zellen. Deshalb könnte die Suspension aus stabilisierter Hyaluronsäure und porcinen Blasen­zellen eine neue Anwendung zur Therapie von Harnröhrenstrikturen mit autologen Urothelzellen im Großtiermodell sein.

9. Summary

The use of autologous urothelial cells in a large animal model for the therapy of the urethral strictures requires an examination of quality and functionality of the transplanted cells.

The aim of this study was to monitor changes in epithelial phenotype of porcine bladder cells during cultivation. Furthermore, the influence of the cell labelling with the fluorescence dye PKH26, and the biocompatibility of the carrier material stabilized hyaluronic acid on viability, proliferation and morphology of porcine bladder cells should be investigated.

The epithelial phenotype of the porcine bladder cells was analyzed immunocytochemically regarding to the cytokeratin pattern and also with western blot analysis. In the in vitro experiments no significant changes in the cytokeratin pattern of the porcine bladder cells could be detected in passage 0-5. The porcine bladder cells expressed predominantly CK8, CK17, CK18 and CK19. The cytokeratin 20, as marker for enddifferentiated umbrella cells, couldn't be detected in the cultivated bladder cells. Autologous bladder cells from passage 2 and 3 are suitable for an in vivo application in the large animal model.

Moreover, the effect of the cell labelling using the fluorescence staining with PKH26 was investigated regarding to the viability and proliferation of porcine bladder cells. Additionally, the stability of the PKH26 staining was analyzed. The results demonstrated that the cell labelling with PKH26 had no inhibitory effect on the viability and proliferation of the porcine bladder cells. The half-life period of PKH26 under in vitro conditions with high proliferation rates was 14 days. Therefore the labelling with PKH26 for an in vivo application in a large animal model is suitable.

Furthermore, the biocompatibility of stabilized hyaluronic acid with dextranomer was tested regarding to viability and migration of porcine bladder cells. The effect of stabilized hyaluronic acid and dextranomer on porcine bladder cells concerning to the epithelial phenotype (AE1/AE3) and the morphology in the scanning electron microscopy (REM) and transmission electron microscopy (TEM) was characterized in a co-culture model with fibroblasts. It could be shown, that the ratio 1:4 of stabilized hyaluronic acid with culture medium is the most suitable for an in vivo application. Positive immunohistochemistry of the porcine bladder cells with the pan-cytokeratin marker AE1/AE3 demonstrate that the epithelial phenotype of the porcine bladder cells remains intact after cultivation with stabilized hyaluronic acid. However, the lost of compact tissue structure could be observed as a result of the large dextranomer molecule. This result could be confirmed morphologically in the REM micrographs. The porcine bladder cells were arranged around the dextranomer

molecules. In the TEM examinations cell-cell contacts like desmosoms and tight junctions, and also apikal membranes with uroplakin inclusions could be detected in the control group (without hyaluronic acid) after 1 and 3 weeks. In the co-culture incubated with hyaluronic acid and dextranomer these structures could be shown after 1 week of incubation time only. The data demonstrates a good biocompatibility of stabilized hyaluronic acid as matrix for porcine bladder cells. Therefore the suspension of hyaluronic acid and porcine bladder cells might be a new approach for the therapy of urethral stricture with autologous urothelial cells in a large animal model.

10. Literaturverzeichnis

Ashley, D. M., S. J. Bol, et al. (1993). A novel approach to the measurement of different in vitro leukaemic cell growth parameters: the use of PKH GL fluorescent probes. *Leuk Res* 17(10): 873-82.

Attwater, H. L. (1943). The history of urethral stricture. *Br J Urol*, 15: 39-51

Bach, A. D., H. Bannasch, et al. (2001). Fibrin glue as matrix for cultured autologous urothelial cells in urethral reconstruction. *Tissue Eng* 7(1): 45-53.

Bandhauer, K., F. Schreiter (1991). *Operative Therapie der Harnröhrenstriktur*. Thieme Verlag.

Bartsch, G., Jr. und D. Frimberger (2004). Embryonic and adult stem cells for tissue engineering in urology. *Urologe A* 43(10): 1229-36.

Baskin, L. S., J. W. Duckett, et al. (1994). Changing concepts of hypospadias curvature lead to more onlay island flap procedures. *J Urol* 151(1): 191-6.

Baskin, L. S., R. S. Sutherland, et al. (1997). Growth factors in bladder wound healing. *J Urol* 157(6): 2388-95.

Bellew, S. G., K. C. Carroll, et al. (2005). Sterility of stored nonanimal, stabilized hyaluronic acid gel syringes after patient injection. *J Am Acad Dermatol* 52(6): 988-90.

Blenkinsopp, W. K. (1969). Cell proliferation in the epithelium of the oesophagus, trachea and ureter in mice. *J Cell Sci* 5(2): 393-401.

Born, M., G. Ahnert-Hilger und T. Jöns (1999). Zur Bedeutung von SNARE-Proteinen im Urothel der Ratte. *Anat Anz* 182, 151

Borrmann, C. M., C. Mertens, et al. (2000). Molecular diversity of plaques of epithelial-adhering junctions. *Ann N Y Acad Sci* 915: 144-50.

Boutonnat, J., M. Barbier, et al. (1998). Usefulness of PKHs for studying cell proliferation. *C R Acad Sci III* 321(11): 901-7.

Bruns, H., U. Kneser, et al. (2005). Injectable liver: a novel approach using fibrin gel as a matrix for culture and intrahepatic transplantation of hepatocytes. *Tissue Eng* 11(11-12): 1718-26.

Bülow H. Present status of endoscopic laser techniques in urology. *Endoscopy*. 1979 Nov;11(4):240-3.

Chu, P. G., M. H. Lyda, et al. (2001). Cytokeratin 14 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases with emphasis on its value in differentiating squamous cell carcinomas from other epithelial tumours. *Histopathology* 39(1): 9-16.

Cooper, E. H. (1972). The biology of bladder cancer. *Ann R Coll Surg Engl* 51(1): 1-16.

Corvin, S., G. Feil, et al. (2004). Tissue engineering of the urethra and ureter. *Urologe A* 43(10): 1213-6.

Dell'Accio, F., J. Vanlauwe, et al. (2003). Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res* 21(1): 123-31.

Deng, F. M., M. Ding, et al. (2001). Urothelial function reconsidered: a role in urinary protein secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(1): 154-9.

Drenckhahn, D. and H. Franz (1986). Identification of actin-, alpha-actinin-, and vinculin-containing plaques at the lateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 102(5): 1843-52.

Ducket, J. W. (1995). Current hypospadias techniques. *Can J Urol* 2(Supp1): 30-2.

el-Kasaby, A. W., M. F. Alla, et al. (1996). One-stage anterior urethroplasty. *J Urol* 156(3): 975-8.

Feil, G., S. Maurer, et al. (2007). Immunoreactivity of p63 in Monolayered and In Vitro Stratified Human Urothelial Cell Cultures Compared with Native Urothelial Tissue. *Eur Urol* 53(5):1066-72.

Feil G. et al. (2003). Cell culture technique and characterisation of urothelial cells obtained from urethral specimens. *Tissue Engineering*. (4):839.

Fichtner, J., M. Fisch, et al. (1998). Refinements in buccal mucosal grafts urethroplasty for hypospadias repair. *World J Urol* 16(3): 192-4.

Fossum, M., C. J. Gustafson, et al. (2003). Isolation and in vitro cultivation of human urothelial cells from bladder washings of adult patients and children. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 37(1): 41-5.

Fossum, M., A. Nordenskjold, et al. (2004). Engineering of multilayered urinary tissue in vitro. *Tissue Eng* 10(1-2): 175-80.

Fraser, M., D. F. Thomas, et al. (2004). A surgical model of composite cystoplasty with cultured urothelial cells: a controlled study of gross outcome and urothelial phenotype. *BJU Int* 93(4): 609-16.

Fujiyama, C., Z. Masaki, et al. (1995). Reconstruction of the urinary bladder mucosa in three-dimensional collagen gel culture: fibroblast-extracellular matrix interactions on the differentiation of transitional epithelial cells. *J Urol* 153(6): 2060-7.

Haas, S. J., P. Bauer, et al. (2000). Immunocytochemical characterization of in vitro PKH26-labelled and intracerebrally transplanted neonatal cells. *Acta Histochem* 102(3): 273-80.

Heitz, M., T. Pottek, et al. (1998). Anatomy and blood supply of the penis and urethra. *Urologe A* 37(1): 2-7.

Horan, P. K., M. J. Melnicoff, et al. (1990). Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking. *Methods Cell Biol* 33: 469-90.

Ibrahim, S., B. Joddar, et al. (2007). A surface-tethered model to assess size-specific effects of hyaluronan (HA) on endothelial cells. *Biomaterials* 28(5): 825-35.

Jezernik, K. and M. Sterle (1992). Multivesicular bodies in the transitional epithelium of the neonatal mouse urinary border. *Cell Biol Int Rep* 16(12): 1219-28.

Kasper, C. und F. Stahl (2001). Ersatzteillager Mensch. *Bioforum* (9): 580-1.

Khalaf, A. N., G. Wolff-Vorbeck, et al. (1993). In vivo labelling of the spleen with a red-fluorescent cell dye. *J Immunol Methods* 165(1): 121-5.

Leonhardt, H. (1990). *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (8): 101.

Liang, F. X., I. Riedel, et al. (2001). Organization of uroplakin subunits: transmembrane topology, pair formation and plaque composition. *Biochem J* 355(Pt 1): 13-8.

Liebhold, M., M. Wendt, et al. (1995). Light- and electron-microscopic studies of the structure of normal bladder epithelium in female swine. *Anat Histol Embryol* 24(1): 47-52.

Ludwikowski, B., Y. Y. Zhang, et al. (1999). The long-term culture of porcine urothelial cells and induction of urothelial stratification. *BJU Int* 84(4): 507-14.

Lupton, J. R. and T. S. Alster (2000). Cutaneous hypersensitivity reaction to injectable hyaluronic acid gel. *Dermatol Surg* 26(2): 135-7.

Maas-Szabowski, N., A. Szabowski, et al. (2001). Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *J Invest Dermatol* 116(5): 816-20.

Matsunuma, H., H. Kagami, et al. (2006). Constructing a tissue-engineered ureter using a decellularized matrix with cultured uroepithelial cells and bone marrow-derived mononuclear cells. *Tissue Eng* 12(3): 509-18.

Maurer, S., G. Feil, et al. (2005). In vitro stratified urothelium and its relevance in reconstructive urology. *Urologe A* 44(7): 738-42.

Messina, L. M., R. M. Podrazik, et al. (1992). Adhesion and incorporation of lacZ-transduced endothelial cells into the intact capillary wall in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(24): 12018-22.

Miettinen, M. (1995). Keratin 20: immunohistochemical marker for gastrointestinal, urothelial, and Merkel cell carcinomas. *Mod Pathol* 8(4): 384-8.

Moll, I. (1993). Cytokeratins. Markers of epithelial differentiation. *Hautarzt* 44(7): 491-501; quiz 501.

Moll, R. (1994). Cytokeratins in the histological diagnosis of malignant tumors. *Int J Biol Markers* 9(2): 63-9.

Moll, R. (1998). Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell Biochem* 31: 205-62.

Moll, R., W. W. Franke, et al. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31(1): 11-24.

Moll, R., A. Lowe, et al. (1992). Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 140(2): 427-47.

Moon, D. G., T. I. Kwak, et al. (2003). Augmentation of glans penis using injectable hyaluronic acid gel. *Int J Impot Res* 15(6): 456-60.

Morey, A. F. und J. W. McAninch (1998). Therapy of urethral stricture using free transplants. *Urologe A* 37(1): 38-41.

Moriya, K., H. Kakizaki, et al. (2003). Creation of luminal tissue covered with urothelium by implantation of cultured urothelial cells into the peritoneal cavity. *J Urol* 170(6 Pt 1): 2480-5.

Pansadoro, V. und P. Emiliozzi (1998). Internal urethrotomy. *Urologe A* 37(1): 21-4.

Raybourne, R. B. und V. K. Bunning (1994). Bacterium-host cell interactions at the cellular level: fluorescent labeling of bacteria and analysis of short-term bacterium-phagocyte interaction by flow cytometry. *Infect Immun* 62(2): 665-72.

Riedel, I., F. X. Liang, et al. (2005). Urothelial umbrella cells of human ureter are heterogeneous with respect to their uroplakin composition: different degrees of urothelial maturity in ureter and bladder? *Eur J Cell Biol* 84(2-3): 393-405.

Sachse, H. (1980). Internal urethrotomy. *Z Urol Nephrol* 73(4): 327-9.

Samlowski, W. E., B. A. Robertson, et al. (1991). Effects of supravital fluorochromes used to analyze the in vivo homing of murine lymphocytes on cellular function. *J Immunol Methods* 144(1): 101-15.

Santucci, R. A., G. F. Joyce, et al. (2007). Male urethral stricture disease. *J Urol* 177(5): 1667-74.

Schafer, S., P. J. Koch, et al. (1994). Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* 211(2): 391-9.

Schaefer BM et al. (1998) Autologous transplantation of urothelium into demucosalized gastrointestinal segments, Biological matrices and tissue reconstruction. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 125-134

Schneeberger, E. E. and R. D. Lynch (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(6): C1213-28.

Schreiter, F. (1984). Mesh-graft urethroplasty: our experience with a new procedure. *Eur Urol* 10(5): 338-44.

Schreiter, F. (1998). Two-stage urethra-plasty. *Urologe A* 37(1): 42-50.

Schultheiss, D., M. C. Truss, et al. (1998). History of direct vision internal urethrotomy. *Urology* 52(4): 729-34.

Schultze-Seemann F. (1982) Die historische Entwicklung der Urethrotomia interna beim Manne. *Urologe (B)* 22: 2-11.

Schünke M., E. Schulte, et al. (2005) Prometheus Lernatlas der Anatomie. Hals und Innere Organe Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Seibold, J., U. Nagele, et al. (2005). Complicated urethral reconstruction in the adult and adult and infant males. *Urologe A* 44(7): 768-73.

Shiroyanagi, Y., M. Yamato, et al. (2004). Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps. *BJU Int* 93(7): 1069-75.

Smith, J. A., Jr. and S. Landau (1989). Neodymium: YAG laser specifications for safe intravesical therapy. *J Urol* 141(5): 1238-9.

Southgate, J., C. L. Varley, et al. (2007). Differentiation potential of urothelium from patients with benign bladder dysfunction. *BJU Int* 99(6): 1506-16.

Sperling H. (1998), Harnröhrenstriktur: was ist bei der Behandlung und Nachbehandlung gesichert? *Urologe [B]* 38:14-18.

Staack, A., T. Alexander, et al. (2001). Organ and species specificity in the stimulation of transitional epithelial cell growth by fibroblasts. *Eur Urol* 39(4): 471-7.

Stack, R. S. and S. M. Schlossberg (1998). General principles in treatment of urethral strictures. *Urologe A* 37(1): 10-20.

Stenberg, A. and G. Lackgren (1995). A new bioimplant for the endoscopic treatment of vesicoureteral reflux: experimental and short-term clinical results. *J Urol* 154(2 Pt 2): 800-3.

Stenzl, A., M. Ninkovic, et al. (2001). Reconstruction of the lower urinary tract. Developments at the beginning of a new century. *Urologe A* 40(5): 368-75.

Strehl, R., K. Schumacher, et al. (2002). Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. *Tissue Eng* 8(1): 37-42.

Troyanovsky, S. M., V. I. Guelstein, et al. (1989). Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position. *J Cell Sci* 93 (Pt 3): 419-26.

Veranic, P., R. Romih, et al. (2004). What determines differentiation of urothelial umbrella cells? *Eur J Cell Biol* 83(1): 27-34.

Wechselberger, G., T. Bauer, et al. (2001). Muscle prelamination with urothelial cell cultures via fibrin glue in rats. *Tissue Eng* 7(2): 153-9.

Wechselberger, G., T. Schoeller, et al. (1998). Fibrin glue as a delivery vehicle for autologous urothelial cell transplantation onto a prefabricated pouch. *J Urol* 160(2): 583-6.

Woodcock-Mitchell, J., R. Eichner, et al. (1982). Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 95(2 Pt 1): 580-8.

Yamato M, Okana T (2004) Cell sheet engineering. *Materials today* 2004: 42-47.

Yap, A. S., J. M. Mullin, et al. (1998). Molecular analyses of tight junction physiology: insights and paradoxes. *J Membr Biol* 163(3): 59-67.

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. A. Stenzl danke ich für die Bereitstellung und Betreuung des Themas, sein großes Interesse an den Ergebnissen und der Entwicklung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil med. vet. G. Reiner danke ich sehr für seine Bereitschaft, die extern durchgeführte Arbeit vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität zu vertreten.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. C. Selent-Stier für die freundliche Unterstützung und die hervorragende Betreuung und Beratung bei der Ausarbeitung des Themas sowie bei der Anfertigung und Korrektur dieser Arbeit.

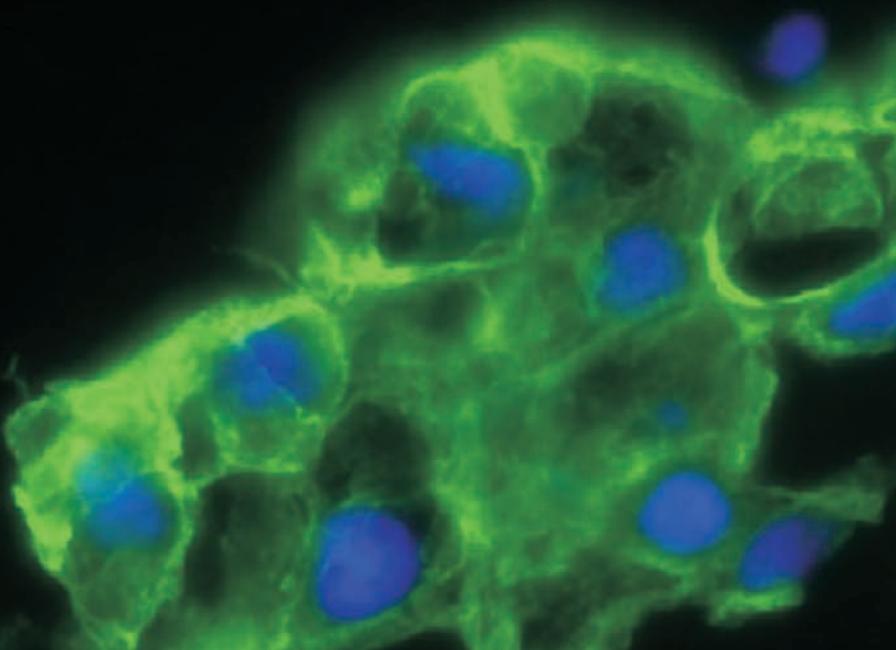
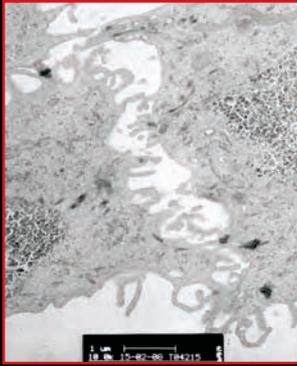
Dem gesamten Labor für Tissue Engineering Herrn Dr. rer. nat. G. Feil, Frau E. Gustafsson, Frau S. Maurer, Frau J. Krug, Frau M. Geiger und Frau C. Bock danke ich für die vielseitigen Hilfestellungen und die großzügige Unterstützung während der gesamten Zeit im Labor.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht haben und ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Ich danke meinem Freund Jochen Schäfer, der mir während der gesamten Zeit hilfreich und mit viel Verständnis zur Seite stand. Besonders danke ich ihm für die vielen geduldigen Stunden in denen er mir mit meinen Computerproblemen geholfen hat.

12. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5443-1

Tel: 0641-5598888 Fax: -5598890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 783835 119544 3 4