

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 775/2003 (51) Int. Cl.⁷: C12N 5/08
(22) Anmeldetag: 2003-05-20
(42) Beginn der Patentdauer: 2005-05-15
(45) Ausgabetag: 2005-12-15

(73) Patentinhaber:
MOSER MEDICAL GROUP
KOSMETISCHE HAARCHIRURGIE
GMBH
A-1130 WIEN (AT).

(54) LAGERUNG VON HAARFOLLIKEL-MIKROTRANSPLANTATEN

- (57) Die Erfindung offenbart ein Verfahren zur Aufbewahrung von Haarfollikel-Mikrotransplantaten, das durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:
- Zur-Verfügung-Stellung von Haarfollikel-Mikrotransplantaten,
 - Zur-Verfügung-Stellung einer Aufbewahrungslösung für Haarfollikel, umfassend einen Inhibitor der Apoptose bei Haarfollikel-Mikrotransplantaten, und
 - In-Kontakt-Bringen der Haarfollikel-Mikrotransplantate mit der Aufbewahrungslösung für Haarfollikel, die den Apoptoseinhibitor enthält, und
 - Aufbewahrung der Haarfollikel-Mikrotransplantate in der Aufbewahrungslösung für Follikel, die den Apoptoseinhibitor enthält.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Aufbewahrung von Haarfollikel-Mikrotransplantaten.

Die Herstellung und Aufbewahrung von menschlichen Haarfollikel-Transplantaten während der Verfahren zur Transplantation der Mikrotransplantate bei Operationen zur Wiederherstellung des Haarbewuchses sind besonders wichtige Schritte für die Aufrechterhaltung des Follikelzellenwachstums und des Längenwachstums des Haarschaftes. Eine hohe Überlebensfähigkeit der Follikeltransplantatzellen während der Transplantation ist für das Überleben des Transplantates von entscheidender Bedeutung und bestimmt daher den klinischen Ausgang des Verfahrens. Es gibt verschiedene Faktoren, die die Überlebensfähigkeit des Transplantats beeinflussen. Die mechanische Irritation der Follikel während der Vorbereitung ist ein Faktor, der die Überlebensfähigkeit des Transplantats vermindert. Weiters ist gezeigt worden, dass während der Aufbewahrung von Mikrotransplantaten in üblicher Weise verwendeten Puffern die Überlebensfähigkeit abnahm, was die Dauer der Transplantationssitzungen einschränkt. Dies könnte auf das Fehlen von Ernährungsfaktoren, Veränderungen in Umgebungs-pH und Osmolarität, Erschöpfung von Energiereserven für den anaeroben Weg in den Follikelzellen oder andere, noch nicht definierte Mechanismen zurückzuführen sein. Jedenfalls sind die üblicher Weise verwendeten Bedingungen für die Aufbewahrung von Transplantaten bei Operationen zur Wiederherstellung des Haarbewuchses heute nicht zufriedenstellend, und das hat auch einen Einfluss auf das Ergebnis der Verfahren zur Transplantation von Mikrotransplantaten.

In der Vergangenheit sind Studien durchgeführt worden, um die Aufbewahrungspuffer für Mikrotransplantate zu optimieren. Diese Studien konzentrierten sich auf Temperaturbedingungen, Salzzusammensetzung oder die Auswirkung von den Aufbewahrungspuffern zugesetzten Nährstoffen (1-4). Obwohl gewisse Auswirkungen der Aufbewahrungstemperatur, Nährstoffe oder Salzzusammensetzung gezeigt werden konnten, wurde in Assaysystemen in vitro keine deutliche Verbesserung der Aufbewahrungsbedingungen gefunden.

Um das Überleben des Transplantats zu verbessern, sind Studien über die Temperaturbedingungen durchgeführt worden, die auf eine positive Wirkung auf das Überleben des Transplantats bei 4°C hindeuten (1, 2). Eine jüngere Studie berichtet jedoch von keinen Unterschieden beim Überleben der Transplantate zwischen 4°C und 26°C in üblicher Weise verwendeter Salzlösung als Aufbewahrungsmedium (3). Studien über die Zusammensetzung von Medien erbrachten nur geringfügige Unterschiede im Überleben der Transplantate bei 4°C und zeigten ähnliche Überlebensraten in Standardmedien (DMEM, RPMI 1640) im Vergleich zu Hank's ausgewogener Salzlösung (1). Jüngste Daten weisen darauf hin, dass das Überleben von Mikrotransplantaten in vitro durch das Auffüllen von intrazellulärem ATP mit exogenem ATP und die Zugabe eines nicht selektiven Fängers von Sauerstoffradikalen verlängert wird (4). Diese Daten untermauern die Ansicht, dass Veränderungen im Stoffwechsel in der Mikroumgebung der Haarfollikelzellen während der Vorbereitung und Aufbewahrung der Mikrotransplantate die Überlebensfähigkeit der Zellen reduziert.

All die durchgeführten Studien konzentrierten sich auf die Verhinderung der Nekrose der Follikelzellen, die durch das Fehlen von Nährstoffen für die aeroben und anaeroben Wege, mechanische Beschädigung der Follikelzellen während der Vorbereitung oder nekrotischen Zelltod auf Grund der Produktion von Sauerstoffradikalen oder anderen toxischen Metaboliten während der Aufbewahrungszeit ausgelöst wird.

Bei derzeitigen Verfahren zur Haartransplantation kommt es bis etwa 3 bis 5 Monate nach der Operation zu einem Wachstumsstopp des transplantierten Haares. Dieser Wachstumsstopp steht üblicher Weise in Verbindung mit Haarausfall und stellt - obwohl der Haarausfall nur vorübergehend ist - ein großes Problem der derzeitigen Technologie dar.

Daher besteht ein Ziel der vorliegenden Erfindung darin, Verfahren und Mittel zur Verfügung zu stellen, um die Überlebensfähigkeit von Haarfollikel-Mikrotransplantaten im Rahmen der Haar-

transplantation zu verbessern. Weiters das Problem des vorübergehenden Haarausfalls nach der Operation, und die Überlebensfähigkeit der Zellen in solchen Follikeln zu verbessern.

Daher stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Aufbewahrung von Haarfollikel-Mikrotransplantaten zu Verfügung, das durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:

- Zur-Verfügung-Stellung von Haarfollikel-Mikrotransplantaten,
- Zur-Verfügung-Stellung einer Aufbewahrungslösung für Haarfollikel, umfassend einen Inhibitor der Apoptose bei Haarfollikel-Mikrotransplantaten, und
- In-Kontakt-Bringen der Haarfollikel-Mikrotransplantate mit der Aufbewahrungslösung für Haarfollikel, die den Apoptoseinhibitor enthält, und
- Aufbewahrung der Haarfollikel-Mikrotransplantate in der Aufbewahrungslösung für Follikel, die den Apoptoseinhibitor enthält.

Es ist interessant, dass ein anderer Weg des Zelltodes, die Apoptose, bisher nicht als mögliche Ursache für das Absterben von Follikelzellen während der Aufbewahrung untersucht wurde, obwohl sie als Teil des Haarfollikelzyklus erkannt wurde (US 6,262,105; US 6,495,174).

Die Apoptose ist eine aktive Form des Absterbens von Zellen, wobei die Fragmentierung von DNA und das Zellsterben durch spezifische, in die Zelle eindringende Signale ausgelöst werden.

In vivo wird die Vermehrung und Differenzierung von Haarfollikelzellen durch ein kompliziertes Muster von fördernden und hemmenden Wachstumsfaktoren, Hormonen und Wechselwirkungen zwischen den Zellen gesteuert. Es ist gezeigt worden, dass Veränderungen in der komplexen, regulierenden Mikroumgebung der Zellen, wie das Abziehen von löslichen Wachstumsfaktoren, Störungen von Wechselwirkungen zwischen den Zellen, die Bildung von Sauerstoffradikalen oder Stickstoffmonoxid (NO), sowie andere Veränderungen zur Auslösung des apoptotischen Zellsterbens (apoptotic cell death, ACD; Überblick in 5) führen. Zu den verschiedenen Cytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren, die an der Stimulierung des Wachstums der Haarfollikelzellen beteiligt sind, sind auch negativ regulierende Moleküle identifiziert worden. Versuche in vitro demonstrierten das Auslösen von ACD durch Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) und transformierenden Wachstumsfaktor-beta (TNF-beta), und es wurde darauf hingewiesen, dass diese Moleküle am Fortschreiten in Catagen in vivo beteiligt sind (6).

Während der Aufbewahrungszeit von Mikrotransplantaten bei Operationen zur Wiederherstellung des Haarbewuchses könnten verschiedene Mechanismen ACD in isolierten Follikeln auslösen. Das Abziehen von Serum, Insulin und/oder Wachstumsfaktoren aus der Familie der insulinartigen Wachstumsfaktoren (insulin-like growth factors, IGF), IGF-1 und IGF-2, die starke Stimulantien des Zellwachstums und Inhibitoren von ACD in verschiedenen Organen und Geweben sind, könnte auch in isolierten Follikeln ACD induzieren. Weiters sind auch freie Sauerstoffradikale, ein Überschuss an Stickstoffmonoxid oder Arachidonsäure häufige Ursachen für ACD. Diese Moleküle scheinen an der Ischämie-Reperfusion-Verletzung bei Herztransplantationen beteiligt zu sein, wo gefunden wurde, dass die Inhibierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (inducible nitric oxide synthase, iNOS) das Zellsterben nach der Reperfusion des Organs durch die Inhibierung der Apoptose verhindern kann. Ein ähnlicher Mechanismus der Organschädigung könnte auch bei transplantierten Mikrotransplantaten wirken, wo üblicher Weise ein vorübergehender Stop des Längenwachstums des Haarschafts und/oder ein vorübergehender Haarausfall nach der Transplantation zu beobachten sind. Weiters kann die mechanische Irritation des Follikels während des Vorbereitungsverfahrens die Produktion von freien Radikalen und Metaboliten des Arachidonsäureweges auslösen, von denen ebenfalls gezeigt worden ist, dass sie in verschiedenen Organen ACD auslösen und daher eine Ursache für den vorübergehenden Haarausfall sein könnten, der bei Operationen zur Wiederherstellung des Haarbewuchses zu beobachten ist.

Es sind zahlreiche Stimuli identifiziert worden, die die Apoptose auslösen können, darunter Todesignale durch lösliche Moleküle, wie Tumornekrosefaktor-alpha, Verlust von Überlebensfaktoren (Fehlen von Insulin oder anderen Hormonen), nach einer Verletzung des Gewebes freigesetzte Radikale (Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO) bzw. Metabolite des Arachidonsäure- (AA-) Weges) oder Verlust der Interaktionen zwischen den Zellen. Alle diese Mechanismen führen zur Aktivierung eines intrazellulären Schlüsselenzyms, Caspase-3, das wiederum den Abbau von nuklearer DNA aktiviert.

Alle beschriebenen Wege sind mögliche Kandidaten als kausative Mechanismen für die Reduktion der Überlebensfähigkeit von Zellen in isolierten, aufbewahrten Mikrotransplantaten, die bei der Transplantation von Mikrotransplantaten beobachtet werden. Der Abzug von Serum und daher von Überlebensfaktoren in aufbewahrten Mikrotransplantaten könnte die Apoptose bei Follikelzellen auslösen, ebenso wie Entzündungsmediatoren, toxische Zellmetabolite (NO, Sauerstoffradikale und AA-Metabolite) oder der Verlust von Zell-Zell-Interaktionen während der Vorbereitung.

Da es sich bei der durch diese Mechanismen ausgelösten Apoptose um eine im Vergleich zum nekrotischen Zelltod rasch ausgelöste Form des Absterbens von Zellen (Minuten bis Stunden) handelt, ist es wahrscheinlicher, dass die Apoptose die Überlebensfähigkeit der Mikrotransplantate beeinflusst, als der nekrotische Zelltod.

Überraschender Weise führte die Inhibierung dieser erwähnten apoptotischen Auswirkungen bei der Aufbewahrung von Haarfollikel-Mikrotransplantaten während der Operation zur Wiederherstellung des Haarbewuchses zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensfähigkeit der transplantierten Zellen. Weiters konnte der vorübergehende Haarausfall reduziert oder sogar völlig verhindert werden. Dies ist im Lauf der vorliegenden Erfindung an Hand einer in vitro- und in vivo-Studie über die Überlebensfähigkeit von Transplantaten bewiesen worden (siehe auch: Abschnitt Beispiele), wobei die positive Wirkung von Aufbewahrungspuffern für Mikrotransplantate, die Inhibitoren verschiedener apoptotischer Wege enthalten, gezeigt wurde.

Daher stellt die vorliegende Erfindung ein effizientes Verfahren zu Verbesserung bereits etablierter Behandlungen für Alopezie zur Verfügung. Diese etablierten Verfahren können leicht für das erfindungsgemäße Verfahren adaptiert werden, indem einfach die verbesserte Aufbewahrungslösung verwendet wird. In der US 5,550,019 ist eine genetische Behandlung von Haarausfall angedeutet, wobei virale Vektoren verwendet werden, um die Zellen der Haarfollikel zu transformieren, um die Expression von Bcl-2 zu erhöhen, z.B. durch topisches Aufbringen solcher Vektoren auf die Kopfhaut.

Komplizierte und riskante Alternativen, wie gentherapeutische Behandlungen, die in der US 5,550,019 erwähnt sind, sind daher für die Erreichung des Ziels der vorliegenden Erfindung nicht notwendig.

Vorzugsweise wird die Haarfollikel-Aufbewahrungslösung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer gepufferten, vorzugsweise Phosphat-, TRIS/HCl- oder HEPES-gepufferten, oder ungepufferten Kochsalzlösung, Ringer-Lösung, aminosäurehaltigen Lösung, lipidhaltigen Lösung, vitaminhaltigen Lösung, DMEM-Medium oder Mischungen davon. Insbesondere Lösungen, die den vollen Bedarf an organischem Material liefern, wie DMEM-Medium, bringen hervorragende Ergebnisse mit der vorliegenden Erfindung. Die Follikel-Aufbewahrungslösung enthält vorzugsweise mindestens ein anorganisches Salz, Aminosäure oder Vitamin. Bevorzugte anorganische Salze beinhalten CaCl_2 , CuSO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, FeSO_4 , MgCl_2 , MgSO_4 , KCl , NaCl , NaH_2PO_4 , ZnSO_4 ; bevorzugte Aminosäuren beinhalten Glyzin, L-Alanin, L-Argininmonohydrochlorid, L-Asparaginmonohydrat, L-Asparaginsäure, L-Cysteinhydrochloridmonohydrat, L-Cystin, L-Glutaminsäure, L-Histidinmonohydrochloridmonohydrat, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysinmonohydrochlorid, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Valin; bevorzugte Vitamine beinhalten (+)-Biotin, Cholinchlorid,

D-Pantothensäure-Kalziumsalz, Folsäure, myo-Inosit, Nikotinamid, Vitamin B1-Hydrochlorid, Vitamin B2, Vitamin B6-Hydrochlorid, Vitamin B12 oder Mischungen solcher Verbindungen. Vorzugsweise sind auch andere Komponenten vorhanden, wie 1,4-Diaminobutandihydrochlorid, D(+)-Glukose, DL-alpha-Liponsäure, HEPES, Hypoxanthin, Linolsäure, Brenztraubensäure-Natriumsalz, Thymidin, stabiles Glutamin, Aminoguanidin oder Mischungen davon. Vorzugsweise sind mindestens zwei, insbesondere mindestens 4 Mitglieder jeder dieser Gruppen (anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, andere Komponenten) im Medium vorhanden.

Der pH der Aufbewahrungslösung sollte so gewählt werden, dass er auf die Zellen keinen zusätzlichen Apoptosestress ausübt. Vorzugsweise ist die Aufbewahrungslösung für Haarfollikel daher eine gepufferte Lösung mit einem pH von 6,0 bis 8,5, insbesondere 7,0 bis 8,0.

Die Zeit der Aufbewahrung sollte so kurz wie möglich sein, hängt jedoch hauptsächlich von den Umständen des Ereignisses der Haartransplantation ab. Üblicher Weise ist die Aufbewahrungszeit die Zeit zwischen dem Herausschneiden des ersten Haarfollikels bis zur Implantation des letzten Haarfollikels während der Behandlungssitzung. Da die Bearbeitung der Haarfollikel, z.B. die mikrochirurgische Trennung der Follikel unter dem Mikroskop, eine sehr genaue und zeitaufwändige Aufgabe ist, muss üblicher Weise mit einer Mindestzeit von 1 bis 4 Stunden gerechnet werden. Auf der anderen Seite hängt der Erfolg der Transplantation der Haarfollikel in hohem Maße von der genauen Durchführung dieser Bearbeitung der Haarfollikel ab. Daher kann die Aufbewahrung z.B. 1 Stunde bis 36 Stunden dauern, vorzugsweise 2 bis 24 Stunden, noch mehr bevorzugt 3 bis 12 Stunden, insbesondere 3 bis 8 Stunden.

Die Art und Weise, wie bei der vorliegenden Erfindung die Apoptose inhibiert wird, ist im Prinzip nicht von so kritischer Bedeutung, obwohl es relative Unterschiede zwischen den verschiedenen getesteten Apoptoseinhibitoren gibt. Im Allgemeinen kann die erfindungsgemäße Verbesserung bei allen bisher getesteten Inhibitoren beobachtet werden, obwohl für die meisten von ihnen noch keine Optimierung der Konzentration für die Aufbewahrung erfolgt ist. Eine derartige Optimierung ist jedoch mit routinemäßigen Verfahren leicht durchführbar, z.B. durch Vergleichen der verschiedenen Konzentrationen eines gegebenen Apoptoseinhibitors nebeneinander in einem Experiment.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Apoptoseinhibitor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Inhibitoren des durch Sauerstoffradikale verursachten apoptotischen Zellsterbens, Inhibitoren des durch Stickstoffmonoxid verursachten apoptotischen Zellsterbens, Inhibitoren des durch Arachidonsäure verursachten apoptotischen Zellsterbens oder Mischungen davon.

Beispiele für solche Inhibitoren beinhalten Stickstoffmonoxid, Inhibitoren oder Neutralisatoren, z.B. synthetisierte Stickstoffmonoxid-Synthase (nitric oxide syntase, NOS) -Inhibitoren, wie Aminoguanidin (Hemisulfat), AET, Dihydrobromid (2-Aminoethylisothiuroniumbromid), AMT (2-Amino-5,6-dihydro-6-methyl-4H-1,3-thiazin), Arginin-analoga (L-ALA, L-NAME, L-NMMA und andere), 1-Amino-2-hydroxyguanidin (p-Toluolsulfonat), S-Methylisothiourea (Sulfat), L-NIL (1-N6-(1-Iminoethyl)lysin), 1,3-PBITU, Dihydrobromid (S,S'-1,3-Phenyl-bis(1,2-ethandiyl)-bis-isothiourea, 2HBr) oder Stickstoffmonoxidfänger, wie Carboxy-PTIO (2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid), PTIO (2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid), MGD (N-Methyl-D-glucamindithiocarbamat, Natrium) oder Cyclooxygenase-Inhibitoren, wie Natriumsalicylat, Resveratrol, Diclofenac, Indomethacin, Piroxicam oder Cytochrom P-450-Inhibitoren, wie 14,15-Eicosatriensäure (14,15 eicosatrienoic acid, 14,15-EET), Eicosapentaensäure (eicosapentaenoic acid), 5,8,11-Eicosatriensäure (5,8,11 eicosatrienoic acid, ETI), 5,8,11,14-Eicosatetraensäure (5,8,11,14 eicosatetraenoic acid, ETYA), Ebselen (2-Phenyl-1,2-benziselenazol-3(2H)-on), oder Mischungen davon.

Spezifisch bevorzugte Inhibitoren zur erfindungsgemäßen Verwendung sind ausgewählt aus

der Gruppe bestehend aus Aminoguanidin (AMG), Hormonen mit Apoptose inhibierender Wirkung für Haarfollikel-Mikrotransplantate, insbesondere Insulin und Hydrocortison, 14,15-Epoxy-icosatriensäure (14,15-EET), oder Mischungen davon.

5 Gemäß einem anderen Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Haarfollikel-Mikrotransplantat, das in einer erfindungsgemäßen Aufbewahrungslösung enthalten ist. Die vorliegende Erfindung wird auch zur Verwendung einer erfindungsgemäßen Aufbewahrungslösung zur Behandlung, insbesondere Aufbewahrung von Haarfollikel-Mikrotransplantaten herangezogen.

10 Die vorliegende Erfindung wird an Hand der folgenden Beispiele und der Zeichnungen weiter beschrieben, jedoch ohne darauf beschränkt zu sein.

Fig. 1:

15 Follikel von 4 verschiedenen Patienten wurden vierfach 5 Stunden lang bei Zimmertemperatur in den angegebenen Puffern aufbewahrt. Die Länge des Haarschaftes wurde an Tag 0 und an Tag 5 gemessen, und das Längenwachstum des Haarschaftes (hair shaft elongation, HSE) wurde als prozentuelle Verlängerung von Tag 0 bis Tag 5 angegeben. a: $p = 0,02$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$.

Fig. 2:

20 Das apoptotische Zellsterben (ACD) wurde durch Nachweis der cytoplasmischen Histon-assoziierten DNA-Fragmente im Lysat von 10 Follikeln, die 5 Stunden lang bei Zimmertemperatur in den angegebenen Puffern (getupft) aufbewahrt wurden, gefolgt von der Kultivierung in serumhaltigem Gewebekulturmedium für 4 Stunden (grau) oder gefolgt von der Kultivierung in serumhaltigem Medium für 36 Stunden (dunkel) gemessen. Die Ergebnisse sind als Absorption bei 405 nm vs. 492 nm Referenzwellenlänge (A_{405nm}/A_{492nm}) ausgedrückt. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung der Absorptionswerte von 4 unabhängigen Experimenten dar, die dreifach aufgebaut wurden. a: $p = 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,0001$.

Fig. 3:

30 Follikel von mindestens 4 verschiedenen Patienten wurden vierfach 5 Stunden lang bei Zimmertemperatur in den angegebenen Puffern aufbewahrt. Die Länge des Haarschaftes wurde an Tag 0 und an Tag 5 gemessen, und das Längenwachstum des Haarschaftes (hair shaft elongation, HSE) wurde als prozentuelle Verlängerung von Tag 0 bis Tag 5 angegeben. a: $p < 0,001$; b: $p < 0,0001$.

Fig. 4:

40 Follikel von mindestens 4 verschiedenen Patienten wurden vierfach 5 Stunden lang bei Zimmertemperatur in Gewebekulturmedium (tissue culture medium, TCM) und TCM, supplementiert mit Inhibitoren der Apoptose, aufbewahrt. Die Länge des Haarschaftes wurde an Tag 0 und an Tag 5 gemessen, und das Längenwachstum des Haarschaftes (hair shaft elongation, HSE) wurde als prozentuelle Veränderung im Vergleich zu Follikeln, die nur in TCM aufbewahrt wurden, angegeben. a: $p = 0,02$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$.

Fig. 5:

45 Mikrofotografische Aufnahme (12,5 x vergrößert) typischer Follikel, wie sie nach 5 Tagen in Kultur, die 10% fötales Kälberserum enthält, zu beobachten sind. a: Aufbewahrung für 5 Stunden in PBS; b: Aufbewahrung für 5 Stunden in TCM; c: Aufbewahrung für 5 Stunden in TCM-3.

Fig. 6:

50 Typischer zeitlicher Verlauf bei einem Patienten, bei dem die Follikel in TCM-3 aufbewahrt wurden. Die Bilder zeigen den Patienten 1 Tag nach der Transplantation sowie 60 Tage und 90 Tage nach der Transplantation. Es wurde kein vorübergehender Haarausfall beobachtet.

55

Beispiel 1:

Material und Verfahren

- 5 Vorbereitung der Probe:
Menschliche Haarfollikel wurden mit standardmäßigen chirurgischen Techniken, die in der Transplantationschirurgie von Mikrotransplantaten verwendet werden, vorbereitet. Die Mikrotransplantate wurden von Patienten genommen, die sich einer therapeutischen Follikeltransplantation unterzogen und ihr informiertes Einverständnis zu der Verwendung von Mikrotransplantaten für diese Studie in vitro gegeben hatten.
- 10
- Aufbewahrungsmedien:
Sowohl Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, PromoCell, Heidelberg, BRD) als auch HEPES-gepuffertes Dulbecco's modifiziertes Eagles-Medium (DMEM; PromoCell) wurden als
- 15 Basismedium ausgewertet. DMEM wurde mit antimykotisch-antibiotischer Lösung (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) und 1 mg/ml Glukose (Sigma-Aldrich Co.) supplementiert. Dem Basismedium wurden verschiedene Inhibitoren in Konzentrationen zugesetzt, die im Abschnitt
- 20 Ergebnisse angegeben sind: Insulin (Humalog; Eli Lilly, Houten, Niederlande), Hydrocortison (Sigma-Aldrich Co.), Aminoguanidin (Sigma-Aldrich Co.), 14,15-Epoxyeicosatriensäure (Sigma-Aldrich Co.). Autologes menschliches Serum wurde von Patienten, die sich einer Transplantation von Mikrotransplantaten unterzogen, durch Zentrifugieren des Vollblutes für 10 min bei 1500 x g erhalten und in einer Konzentration von 10% in den Aufbewahrungslösungen verwendet.
- 25
- Evaluierung des Längenwachstums des Haarschaftes in vitro nach der Aufbewahrung in verschiedenen Medien:
Um die Auswirkungen verschiedener Aufbewahrungsmedien, supplementiert mit ACD-Inhibitoren, zu untersuchen, wurden die Mikrotransplantate 5 Stunden lang bei Zimmertemperatur in den Testmedien unter atmosphärischen Bedingungen aufbewahrt. Nach der Aufbewahrung wurden die Mikrotransplantate 5 Tage lang bei 37°C in einer 5% CO₂-Atmosphäre in standardmäßigen Kulturmedien für menschliche Haarfollikel (2-4) kultiviert, die 10% fötales Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich Co.) enthielten. Das Längenwachstum des Haarschaftes wurde nach 5 Tagen unter Verwendung eines Invertmikroskops gemessen. Die Daten sind als Prozentsatz der Verlängerung von Tag 0 bis Tag 5 angegeben.
- 30
- 35
- Nachweis des apoptotischen Zellsterbens:
Das apoptotische Zellsterben in den aufbewahrten Mikrotransplantaten wurde unter Verwendung eines fotometrischen Enzym-Immunoassays für die Bestimmung von cytoplasmischen Histon-assoziierten DNA-Fragmenten (Cell Death Detection ELISA; Roche, BRD) bestimmt. Für jedes Experiment wurde ACD in 10 Mikrotransplantaten sofort nach der Aufbewahrung in den verschiedenen Aufbewahrungslösungen, nach der Kultivierung der aufbewahrten Mikrotransplantate für 4 Stunden in serumhaltigem Medium und nach 36 Stunden Kultivierung analysiert. Vor dem Assay wurde der Haarschaft entfernt, die zurückbleibenden Follikel wurden in Stücke von etwa 2 mm³ geschnitten und in Zelllysepuffer lysiert. Die gesamten apoptotischen Veränderungen wurden gemäß den Hinweisen des Herstellers ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Absorption bei 405 nm vs. 492 nm Referenzwellenlänge ausgedrückt. Die Daten stellen den Mittelwert ± Standardabweichung der Absorptionswerte von 4 unabhängigen Experimenten dar, die dreifach aufgebaut wurden.
- 40
- 45
- 50
- Statistik:
Mikrotransplantate von mindestens 4 verschiedenen Patienten wurden für die Analyse von HSE und ACD verwendet. Die Daten wurden unter Verwendung standardmäßiger Statistiksoftware und Tests analysiert.
- 55
- Ergebnisse:

Längenwachstum des Haarschaftes in vitro:

Die Verlängerung des Haarschaftes in vitro zeigte einen signifikanten Anstieg des HSE bei Mikrotransplantaten, die in DMEM aufbewahrt wurden, im Vergleich zu PBS ($2,3\% \pm 0,6\%$ vs. $28,4\% \pm 3,9$; $p < 0,0001$; Fig. 1a). In DMEM oder PBS, die 10% Autologe enthielten, aufbewahrte Mikrotransplantate zeigten nur in PBS einen signifikanten Anstieg des HSE ($2,3\% \pm 0,6\%$ vs. $6,2\% \pm 2,2$; $p < 0,001$; Fig. 1a). Die Zugabe von AMG ($10 \mu\text{g/ml}$) oder 14,15-EET (1 ng/ml) zu DMEM erhöhte das HSE in vitro signifikant im Vergleich zu DMEM alleine ($33,9\% \pm 7,1\%$, $p = 0,01$ bzw. $32,8\% \pm 6,1\%$; $p = 0,02$; Fig. 1b). Insulin und andere Hormone hatten keine Auswirkungen auf HSE. Es wurde keine signifikante Verstärkung durch diese Substanzen gefunden, wenn sie PBS zugesetzt wurden. Kombinationen der ACD-Inhibitoren zeigten, dass die von AMG induzierte Erhöhung des HSE im Vergleich zu DMEM signifikanter war, wenn AMG in Kombination mit Insulin verwendet wurde (DMEM: $28,4\% \pm 3,9\%$ vs. DMEM/INS/AMG: $33,8 \pm 4,7$; $p < 0,001$).

Apoptotisches Zellsterben bei aufbewahrten Mikrotransplantaten:

Die Messung von cytoplasmischen Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in Mikrotransplantaten zeigte kein signifikantes ACD direkt nach der Aufbewahrung (frisch isolierte Mikrotransplantate vs. in PBS aufbewahrte Mikrotransplantate: $A_{405\text{nm}}/A_{492\text{nm}}$: $0,14 \pm 0,02$ vs. $0,11 \pm 0,04$; $p = \text{n.s.}$), und nach 4 Stunden Kultur wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet (Fig. 2). Nach 36 Stunden Kultivierung wurde bei den Mikrotransplantaten ein signifikanter ACD-Anstieg beobachtet, der bei Mikrotransplantaten, die in PBS aufbewahrt wurden, höher war als bei Mikrotransplantaten, die in DMEM aufbewahrt wurden ($A_{405\text{nm}}/A_{492\text{nm}}$: $1,63 \pm 0,21$ vs. $1,42 \pm 0,07$, $p < 0,01$). Die Zugabe von AMG oder 14,15-EET zu DMEM konnte das von Serum induzierte ACD noch weiter signifikant inhibieren ($A_{405\text{nm}}/A_{492\text{nm}}$: DMEM: $1,42 \pm 0,07$ vs. AMG: $0,90 \pm 0,11$; $p < 0,0001$; und 14,15-EET: $1,19 \pm 0,17$; $p = 0,05$). Die Kombination von AMG mit Insulin reduzierte ACD im Vergleich zu AMG alleine nicht noch weiter ($A_{405\text{nm}}/A_{492\text{nm}}$: DMEM/AMG: $0,90 \pm 0,11$ vs. DMEM/INS/AMG: $1,08 \pm 0,13$; $p = \text{n.s.}$).

In routinemäßigen Verfahren zur Transplantation von Mikrotransplantaten wird die Aufbewahrung isolierter Mikrotransplantate über Zeiträume von bis zu mehreren Stunden beobachtet. Während der Vorbereitung und Aufbewahrung von Mikrotransplantaten beeinflussen verschiedene Faktoren die Überlebensfähigkeit der Follikelzellen und daher das klinische Ergebnis der Transplantation der Mikrotransplantate.

In verschiedenen Studien in vitro und in vivo ist gezeigt worden, dass ACD in transplantierten Organen ein limitierender Faktor für die Funktion der Transplantate ist und während verschiedener Stadien der Organtransplantation vorkommen kann. Während der Zeit der Transplantate in vitro ist ACD auf Grund des Fehlens von Wachstumsfaktoren berichtet worden. In diesem Stadium können auch toxische Metabolite, wie Sauerstoffradikale, ACD in aufbewahrten Organen induzieren (5). Nach der Transplantation wird ACD im Transplantat nach der Reperfusion des Organs ausgelöst (7-10). Dieses Phänomen, das als Ischämie-Reperfusion-Verletzung bekannt ist, wurde an verschiedenen transplantierten Organen beobachtet und schränkt das Überleben des Transplantats nach der Transplantation ein (7-10). Ein Weg, der an der Ischämie-Reperfusion-Verletzung beteiligt ist, führt über die Induzierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und die übermäßige Produktion von NO (8, 9).

Weiters können Metabolite der Arachidonsäure-Wege (AA pathways) eine Vielzahl von Signalen transduzieren, die mit dem Überleben der Zellen und der Apoptose in Zusammenhang stehen (11). All die Wege, die zu ACD führen, können auch ACD in aufbewahrten Mikrotransplantaten auslösen und beeinträchtigen das Überleben des Transplantats nach der Transplantation.

Im vorliegenden Beispiel wurde ACD in aufbewahrten Mikrotransplantaten demonstriert, das durch die Zugabe von geeigneten Inhibitoren von ACD reduziert werden konnte. Da bekannt ist, dass HSE in einer Mikrotransplantatkultur durch die Zugabe von Serum negativ beeinflusst wird,

wurde ein Modellkultursystem mit fötalem Kälberserum verwendet, um die Auswirkungen der Vorbehandlung der Mikrotransplantate mit verschiedenen Inhibitoren von ACD während eines Aufbewahrungszeitraums von 5 Stunden vor der Zugabe des Serums zu untersuchen. Es wurde eine positive Wirkung von gepuffertem DMEM gegenüber ungepufferten oder gepufferten Kochsalzlösungen gefunden. Die Wirkung wurde im vorliegenden *in vitro*-HSE-Verlängerungsmodell sowie auch im Gesamt-ACD in den isolierten, aufbewahrten Follikeln gefunden, gemessen durch Bestimmung von cytoplasmischem Histon-assoziierten DNA-Fragmenten. Weiters konnte die Zugabe von Inhibitoren der iNOS- und AA-Wege HSE *in vitro* noch weiter verstärken und ACD reduzieren. Bei Verwendung dieser Assays konnte kein signifikanter Einfluss von antiapoptotischen Hormonen, wie Insulin, oder autologem Serum zusammen mit DMEM gefunden werden. Autologes Serum erhöhte jedoch HSE *in vitro* signifikant, wenn es zu gepufferter Kochsalzlösung zugesetzt wurde.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Veränderungen im pH und die Bildung toxischer freier Radikale die Hauptursache für ACD bei isolierten, aufbewahrten Mikrotransplantaten sind. Eine Stimulierung dieser Metabolite könnte während der mechanischen Vorbereitung der Mikrotransplantate, der Aktivierung von Entzündungszellen, die um die Follikel und/oder bei Endothelzellen von der Mikrovaskulatur vorhanden sind, stattfinden. Ein zusätzlicher Mechanismus, der von AMG und 14,15-EET induziert wird, scheint eine vorkonditionierende Wirkung zu sein, die zur Inhibierung der Schlüsselenzyme der iNOS- oder AA-Wege nach der Zugabe von Serum führt und das von Serum induzierte ACD reduziert. Ein ähnlicher Schutzeffekt von AMG bei ACD, ausgelöst von iNOS mediiertem Ischämie-Reperfusion-Verletzungen, ist bei Transplantaten von Testis und Herz gezeigt worden und scheint auch bei Haarfollikel-Mikrotransplantaten vorzuliegen (8-10).

Zusammenfassend zeigt das vorliegende Beispiel die positive Wirkung von Inhibitoren der AA- und iNOS-Wege auf ACD in isolierten Mikrotransplantaten. Aufbewahrungspuffer, die von iNOS oder AA mediiertes ACD verhindern, können daher das Überleben von Mikrotransplantaten nach der Transplantation verlängern und den klinischen Erfolg von Verfahren zur Wiederherstellung des Haarbewuchses erhöhen.

Beispiel 2:

Aufbau der Studie:

Es wurde ein *in vitro*-System etabliert, um das Längenwachstum des Haarschaftes in isolierten Mikrotransplantaten auszuwerten, die 5 Stunden lang bei Zimmertemperatur in verschiedenen Puffern, die Inhibitoren der Apoptose enthielten, aufbewahrt wurden.

Die gesamte Haarfollikelkultivierung erfolgte in Gewebekulturmedium, das Nährstoffe für isolierte Haarfollikel enthielt, wie anderwärts beschrieben (12, 13). Um die positive Wirkung von Aufbewahrungspuffern zu bewerten, die Inhibitoren der Apoptose enthielten, wurden die Bedingungen geringfügig modifiziert, wobei 10% fötales Kälberserum im Kulturmedium verwendet wurde, von dem gezeigt worden ist, dass es in Kultur das Längenwachstum des Haarschaftes inhibiert. Diese Bedingungen ahmen die Situation *in vivo* nach, wo vorher aufbewahrte, transplantierte Follikel nach der Transplantation direkt vom Serum beeinflusst werden. Daher ist das vorliegende *in vitro*-System ideal dafür geeignet, die Auswirkungen von Aufbewahrungspuffern auf das Überleben von Transplantaten zu evaluieren. Kulturen von aufbewahrten Mikrotransplantaten wurden auf Längenwachstum des Haarschaftes während 5 Tagen ausgewertet, und die Daten sind als Prozentsatz des Längenwachstums des Haarschaftes von Tag 0 bis Tag 5 ausgedrückt.

Die in dieser Studie verwendeten Puffer basierten auf gepufferten Salzlösungen (Phosphatgepufferte Salzlösung; PBS) sowie auf gepuffertem Gewebekulturmedium (TCM). Den Basispuffern wurden verschiedene Konzentrationen von Inhibitoren der Apoptose zugesetzt. Die

Wirkung von autologem Serum, Proteinhormonen (Puffer TCM-1, Insulin) und Inhibitoren apoptotischer Wege, ausgelöst von Sauerstoffradikalen (Puffer TCM-2, Deferoxamin), Stickstoffmonoxid (Puffer TCM-3, AMG) oder Metaboliten der Arachidonsäure (Puffer TCM-4; 14,15-EET) wurden evaluiert.

5

Die Studie in vivo wurde mit Patienten durchgeführt, die ihre informierte Zustimmung zur Studie gegeben hatten. Puffer, bei denen sich im in vitro-System eine signifikante Verstärkung des Längenwachstums des Haarschaftes erwiesen hatte, wurden unter routinemäßigen Bedingungen verwendet. In Gruppen von 5 Patienten wurden 50 Mikrotransplantate getrennt in den definierten Puffern gelagert und auf eine definierte Region auf der Kopfhaut der Patienten transplantiert. Das Wachstum der Haare wurde über einen Zeitraum von 6 Monaten alle 14 Tage bewertet und dokumentiert.

10

Ergebnisse:

15

Längenwachstum des Haarschaftes in vitro:

Das Längenwachstum des Haarschaftes in vitro zeigte eine positive Wirkung des Gewebekulturm mediums, das die essentiellen Aminosäuren, Vitamine und Salze für das Überleben der Zellen enthielt. Die Aufbewahrung von Mikrotransplantaten in TCM führt zu einer signifikanten Steigerung des Längenwachstums des Haarschaftes im Vergleich zu Mikrotransplantaten, die in PBS gelagert wurden ($2,3\% \pm 0,6\%$ vs. $28,4 \pm 3,9$; $p < 0,0001$; Fig. 3), was auf eine erhöhte Überlebensfähigkeit der Follikelzellen hinweist.

20

Für Mikrotransplantate, die in der gepufferten Salzlösung PBS gelagert wurden, zeigte die Zugabe von 10% autologem Serum eine signifikante Verstärkung des Längenwachstums des Haarschaftes von $2,3\% \pm 0,6\%$ in PBS alleine, im Vergleich zu $6,2\% \pm 2,2$ in PBS + 10% autologes Serum ($p < 0,001$; Fig. 1).

25

Um die Auswirkung von Inhibitoren der Apoptose zu untersuchen, wurden zu TCM verschiedene Konzentrationen von Überlebensfaktoren (TCM-1), Inaktivatoren von Sauerstoffradikalen (TCM-2), Inhibitoren von Stickstoffmonoxid (TCM-3) oder Inhibitoren von AA-Metaboliten (TCM-4) zugesetzt. Die Aufbewahrung von Follikeln in TCM-3 oder TCM-4 erhöhte die HSE in vitro signifikant gegenüber TCM alleine ($33,9\% \pm 7,1\%$, $p = 0,01$ bzw. $32,8\% \pm 6,1\%$, $p = 0,02$; Fig. 4). Die Zugabe von Proteinhormonen zu TCM zeigte nur in Kombination mit Inhibitoren von Stickstoffmonoxid (TCM-5) ein verstärktes Längenwachstum des Haarschaftes. Steroidhormone hatten keine Auswirkung auf das Längenwachstum des Haarschaftes in vitro. Die typische Morphologie von Follikeln, die in PBS, TCM oder TCM-3 aufbewahrt wurden, ist in Fig. 5 dargestellt.

30

35

Überleben der Transplantate in vivo:

Die in vivo-Studie erfolgte mit PBS, das Serum enthielt, TCM und TCM, das Inhibitoren von Stickstoffmonoxid enthielt (TCM-3), als Aufbewahrungspuffer. 50 Mikrotransplantate von Patienten, die sich einer routinemäßigen chirurgischen Wiederherstellung des Haarbewuchses unterzogen, wurden unter routinemäßigen Bedingungen in diesen Puffern gelagert und auf definierte Regionen auf der Kopfhaut transplantiert.

40

45

In PBS aufbewahrte Mikrotransplantate wiesen etwa 1 Monat nach der Transplantation den typischen vorübergehenden Haarausfall auf, wie er bei der routinemäßig verwendeten Ringer-Lösung zu beobachten ist. Das Haarwachstum begann jedoch früher und mit größeren Wachstumsraten des Haarschaftes als bei der Ringer-Lösung (Tab. 1). Weiters war bei einigen Patienten der Zeitraum vor dem vorübergehenden Haarausfall nach der Aufbewahrung der Mikrotransplantate in PBS verlängert.

50

Im TCM-3-Puffer aufbewahrte Mikrotransplantate wiesen bei allen 6 Patienten, die diese Gruppe beinhaltete, keinen vorübergehenden Haarausfall auf (Tab. 1). Außerdem begann das

55

Wachstum der Haare sofort nach der Transplantation, was zu einer Verlängerung des Haarschaftes führte, die mit nicht transplantiertem Haar vergleichbar ist (Tab. 1).

Tabelle 1

In vivo Auswertung verschiedener Aufbewahrungspuffer:

Tage nach der Transplantation		Ringer-Lösung <i>n</i> = 5	PBS <i>n</i> = 7	TCM <i>n</i> = 4	TCM-3 <i>n</i> = 6
Tag 14	Haarausfall	2/5	2/7	0/4	0/6
	Haarlänge (cm)	-- nb	-- nb	-- nb	0,4 ± 0,1
Tag 30	Haarausfall	5/5	6/7	1/4	0/6
	Haarlänge (cm)	-- nb	-- nb	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,3
Tag 60	Haarausfall	5/5	6/7	1/4	0/6
	Haarlänge (cm)	0,7 ± 0,5	0,8 ± 0,4	2,5 ± 1,0	2,6 ± 0,4
Tag 90	Haarausfall	5/5	6/7	1/4	0/6
	Haarlänge (cm)	1,8 ± 0,7	2,1 ± 0,6	3,4 ± 1,3	3,6 ± 0,4

Die Mikrotransplantate wurden bis zu 3 Stunden in den verschiedenen Aufbewahrungspuffern gelagert. Vorübergehender Haarausfall und/oder Haarwachstum wurde an Tag 14, Tag 30, Tag 60 und Tag 90 nach der Transplantation beobachtet. nb: Die Haarlänge wurde wegen vorübergehenden Haarausfalls oder nicht signifikanten Längenwachstums des Haarschaftes nicht bestimmt. Die Haarlänge ist als Mittelwert ± Standardabweichung der Patienten mit Haarwachstum angegeben.

Der typische Verlauf des Haarwachstums eines Patienten, bei dem die Mikrotransplantate in TCM-3 aufbewahrt wurden, ist in Fig. 4 dargestellt.

Während routinemäßiger Verfahren zur Transplantation von Mikrotransplantaten ist die Aufbewahrung isolierter Mikrotransplantate für Zeiträume von bis zu mehreren Stunden zu beobachten. Während der Vorbereitung und Aufbewahrung der Mikrotransplantate beeinflussen verschiedene Faktoren die Überlebensfähigkeit der Follikelzellen und daher das klinische Ergebnis der Transplantation der Mikrotransplantate. Auf Grund von mechanischen Beschädigungen während der Vorbereitung, fehlender Nährstoffzufuhr und Verlust der in vivo-Mikroumgebung in isolierten Mikrotransplantaten ist bei der chirurgischen Wiederherstellung des Haarbewuchses ein vorübergehender Haarausfall zu beobachten. Dieser vorübergehende Haarausfall und die reduzierten Wachstumsraten am Anfang nach der Transplantation, die den klinischen Erfolg und die Zufriedenheit der Patienten beeinträchtigen, waren bisher ungelöste Probleme. Es sind einige Versuche unternommen worden, um dieses Problem zu lösen, jedoch bisher ohne signifikante Verbesserungen.

Es ist bekannt, dass das apoptotische Zellsterben bei transplantierten Organen ein einschränkender Faktor für die Funktion des Transplantats ist. Während der Zeit der Transplantate in vitro kann das apoptotische Zellsterben durch einen Mangel an Wachstumsfaktoren, toxische Metabolite, wie Sauerstoffradikale, und Metabolite der AA-Wege hervorgerufen werden (5, 11). Nach

der Transplantation wird die Apoptose im Transplantat nach der Reperfusion des Organs ausgelöst. Dieses Phänomen, das als Ischämie-Reperfusion-Verletzung bekannt ist, ist an verschiedenen transplantierten Organen beobachtet worden und wird durch die Induzierung induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und die Produktion von überschüssigem NO mediiert (7-10). All die apoptotischen Wege können auch in aufbewahrten Mikrotransplantaten die Apoptose auslösen und daher die Überlebensfähigkeit und die Überlebenszeit der Transplantate einschränken.

Im vorliegenden Beispiel wurden Aufbewahrungspuffer für isolierte Mikrotransplantate entwickelt, die die Apoptose verhindern, den vorübergehenden Haarausfall überwinden und das klinische Ergebnis der Transplantation der Mikrotransplantate deutlich verbessern. Da bekannt ist, dass das Längenwachstum des Haarschaftes in einer Mikrotransplantatkultur durch die Zugabe von Serum negativ beeinflusst wird, wurde ein Modellkultursystem mit fötalem Kälberserum verwendet, um die Auswirkungen der Vorbehandlung der Mikrotransplantate mit verschiedenen Inhibitoren der Apoptose während eines Aufbewahrungszeitraums von 5 Stunden vor der Zugabe von Serum zu untersuchen.

Es wurde gefunden, dass die Aufbewahrung von Mikrotransplantaten in TCM das Längenwachstums des Haarschaftes *in vitro* signifikant erhöht, was durch den Zusatz von Inhibitoren der Apoptose noch verstärkt wurde. Außerdem zeigten die vorliegenden *in vivo*-Studien, dass Mikrotransplantate, die in diesen anti-apoptotischen Puffern aufbewahrt werden, bei der Mehrzahl der Patienten den vorübergehenden Haarausfall überwinden können. Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass das apoptotische Zellsterben das Hauptereignis ist, das zu einer verringerten Überlebensfähigkeit von Transplantaten führt und wiederum auch die Hauptursache für den vorübergehenden Haarausfall ist. Mit den erfindungsgemäßen Puffern kann das apoptotische Zellsterben in den aufbewahrten Mikrotransplantaten verhindert werden. Die erhöhte Überlebensfähigkeit der Zellen transplantierte Follikel führt zu einem sofortigen Beginn des Haarwachstums nach der Transplantation ohne vorübergehenden Verlust des transplantierten Haarschaftes. Weiters wurde bei den Follikeln, die sich in der Nähe des transplantierten Mikrotransplantats befanden, ein Nachbar-Effekt beobachtet, der zu verstärktem Haarwachstum in den benachbarten Follikeln führte. Dies könnte durch die erhöhte Produktion von Haarwachstumsfaktoren, wie vaskulärem endotheliale Wachstumfaktor, in geeignet aufbewahrten Mikrotransplantaten erklärt werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass Aufbewahrungspuffer, die das apoptotische Zellsterben bei Mikrotransplantaten verhindern, den vorübergehenden Haarausfall überwinden können, der bei der Transplantation von Mikrotransplantaten zu beobachten ist. Diese Puffer führen zu einem sofortigen Beginn des Haarwachstums und daher zu einer eindeutigen Verbesserung des klinischen Ergebnisses bei Verfahren zur Wiederherstellung des Haarwuchses.

Literatur

1. Kurata S., Ezaki T., Itami S. et al., Viability of isolated single hair follicles preserved at 4°C. *Dermatol. Surg.* 25: 26, 1999.
2. Fan J., Wang J., Nordström REA., Standardized technique of transplanting micrografts in hair restoration surgery. *Dermatol. Surg.* 23: 829, 1997.
3. Raposio E., Cella A., Panarese P. et al., Effects of cooling micrografts in hair transplantation surgery. *Dermatol. Surg.* 25: 705, 1999.
4. Raposio E., Cella A., Panarese P et al., Power boosting the grafts in hair transplantation surgery. *Dermatol. Surg.* 24: 1342, 1998.
5. Reed JC., Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157: 1415, 2000.
6. Soma T., Ogo M., Suzuki J., Takahashi T., Hibino T., Analysis of apoptotic cell death in human hair follicles *in vivo* and *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.* 111: 948, 1998.
7. Chen JK., Capdevila J., Harris R., Cytochrome P450 epoxygenase metabolism of arachidonic

acid inhibits apoptosis, Mol. Cell Biol. 21: 6322, 2001.

8. Hattori R., Otani H., Maulik N., Das DK., Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 282: H1988, 2002.

9. Iwai-Kanai E., Hasegawa K., Fujita M., Araki M., Yanazume T., Adachi S., Sasayama S.,
5 Basic fibroblast growth factor protects cardiac myocytes from iNOS-mediated apoptosis. J. Cell Physiol. 190: 54, 2002.

10. Shiraiishi K., Naito K., Yoshida KI., Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion in rat. Biol. Reproduction 65: 514, 2001.

11. Tang DG, Chen YQ, Horn KV., Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 5241, 1996.

12. Philpott MP., Sanders D., Kealey T., Cultured human hair follicles and growth factors. J. Invest. Dermatol. 104: 44S, 1995.

13. Philpott MP, Sanders D., Kealey T., Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro. J. Invest. Dermatol. 102: 857, 1994.

Patentansprüche:

- 20 1. Verfahren zur Aufbewahrung von Haarfollikel-Mikrotransplantaten, *gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:*
- Zur-Verfügung-Stellung von Haarfollikel-Mikrotransplantaten,
 - Zur-Verfügung-Stellung einer Aufbewahrungslösung für Haarfollikel, umfassend einen Inhibitor der Apoptose bei Haarfollikel-Mikrotransplantaten, und
 - 25 - In-Kontakt-Bringen der Haarfollikel-Mikrotransplantate mit der Aufbewahrungslösung für Haarfollikel, die den Apoptoseinhibitor enthält, und
 - Aufbewahrung der Haarfollikel-Mikrotransplantate in der Aufbewahrungslösung für Follikel, die den Apoptoseinhibitor enthält.
- 30 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Aufbewahrungslösung für Haarfollikel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer gepufferten, vorzugsweise Phosphat-, TRIS/HCl- oder HEPES-gepufferten, oder ungepufferten Kochsalzlösung, Ringer-Lösung, aminosäurehaltigen Lösung, lipidhaltigen Lösung, vitaminhaltigen Lösung, DMEM-Medium oder Mischungen davon.
- 35 3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Aufbewahrungslösung für Haarfollikel eine gepufferte Lösung mit einem pH-Wert von 6,0 bis 8,5, insbesondere 7,0 bis 8,0 ist.
- 40 4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Aufbewahrung für 1 bis 36 Stunden, vorzugsweise 2 bis 24 Stunden, noch mehr bevorzugt 3 bis 12 Stunden, insbesondere 3 bis 8 Stunden erfolgt.
- 45 5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, *dadurch gekennzeichnet*, dass der Apoptoseinhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Inhibitoren des durch Sauerstoffradikale verursachten apoptotischen Zellsterbens, Inhibitoren des durch Stickstoffmonoxid verursachten apoptotischen Zellsterbens, Inhibitoren des durch Arachidonsäure verursachten apoptotischen Zellsterbens oder Mischungen davon.
- 50 6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, *dadurch gekennzeichnet*, dass der Apoptoseinhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aminoguanidin (AMG), Hormonen mit Apoptose inhibierender Wirkung für Haarfollikel-Mikrotransplantate, insbesondere Insulin und Hydrocortison, 14,15-Epoxy-eicosatriensäure (14,15-EET) oder Mischungen davon.

7. Haarfollikel-Mikrotransplantat-Präparat, umfassend Haarfollikel-Mikrotransplantate und eine Aufbewahrungslösung, wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert ist.
- 5 8. Verwendung einer Aufbewahrungslösung, wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert ist, zur Behandlung, insbesondere Aufbewahrung von Haarfollikel-Mikrotransplantaten.

Hiezu 6 Blatt Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



Fig. 1

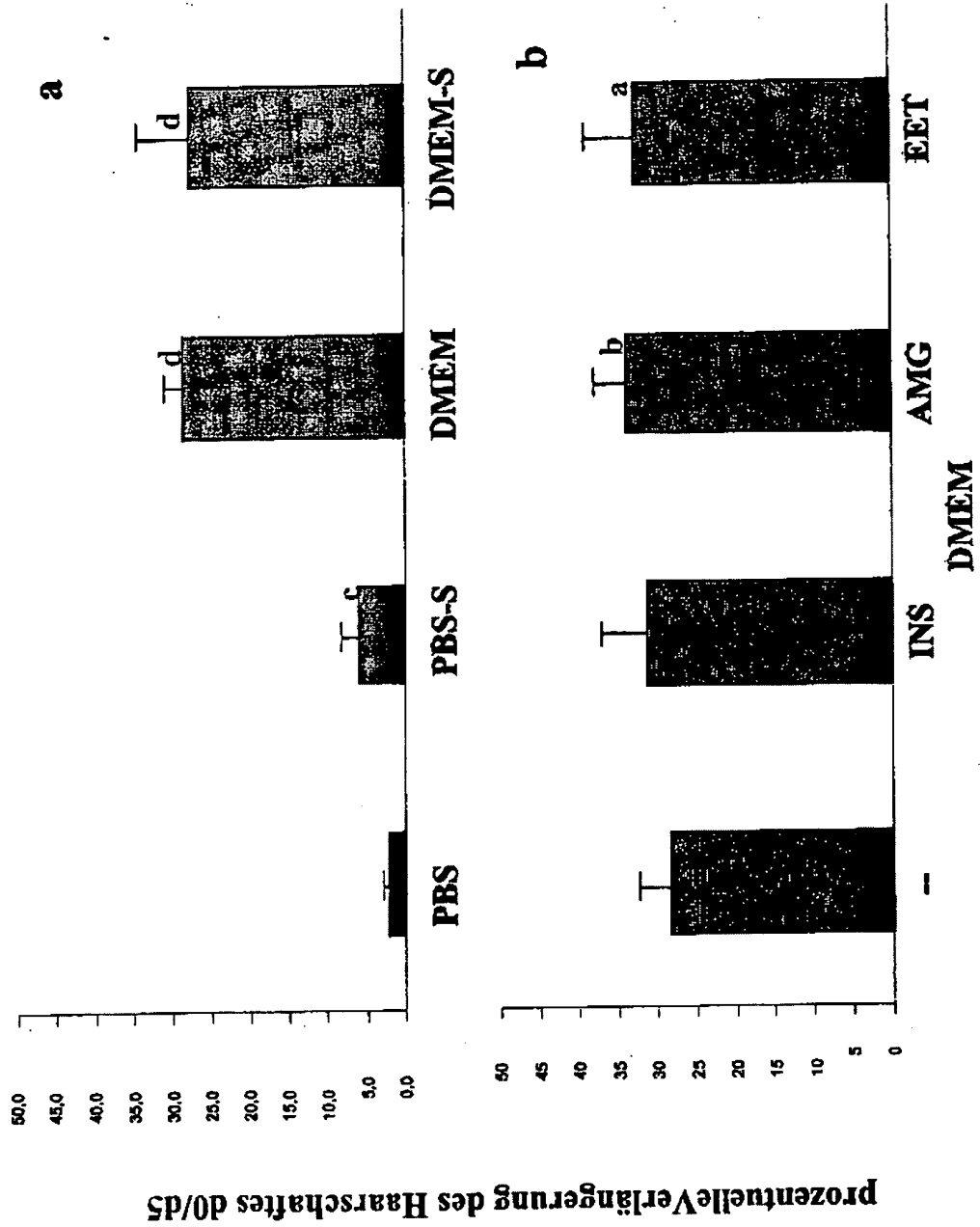




Fig. 2

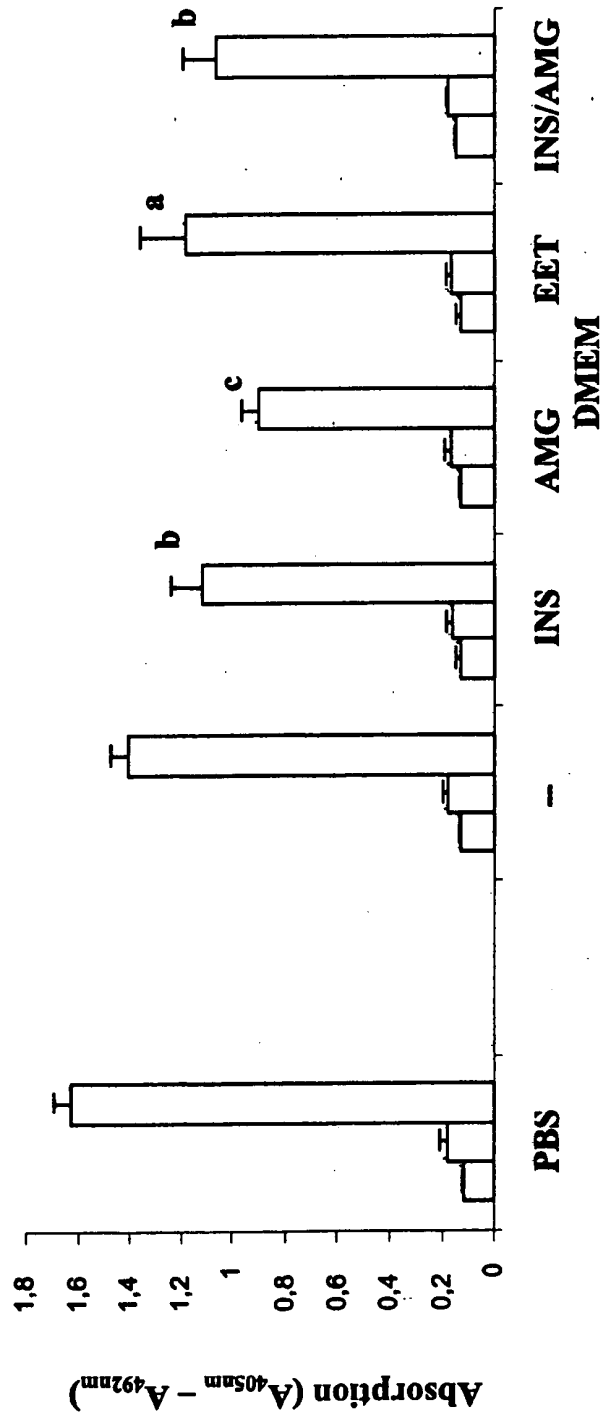




Fig. 3

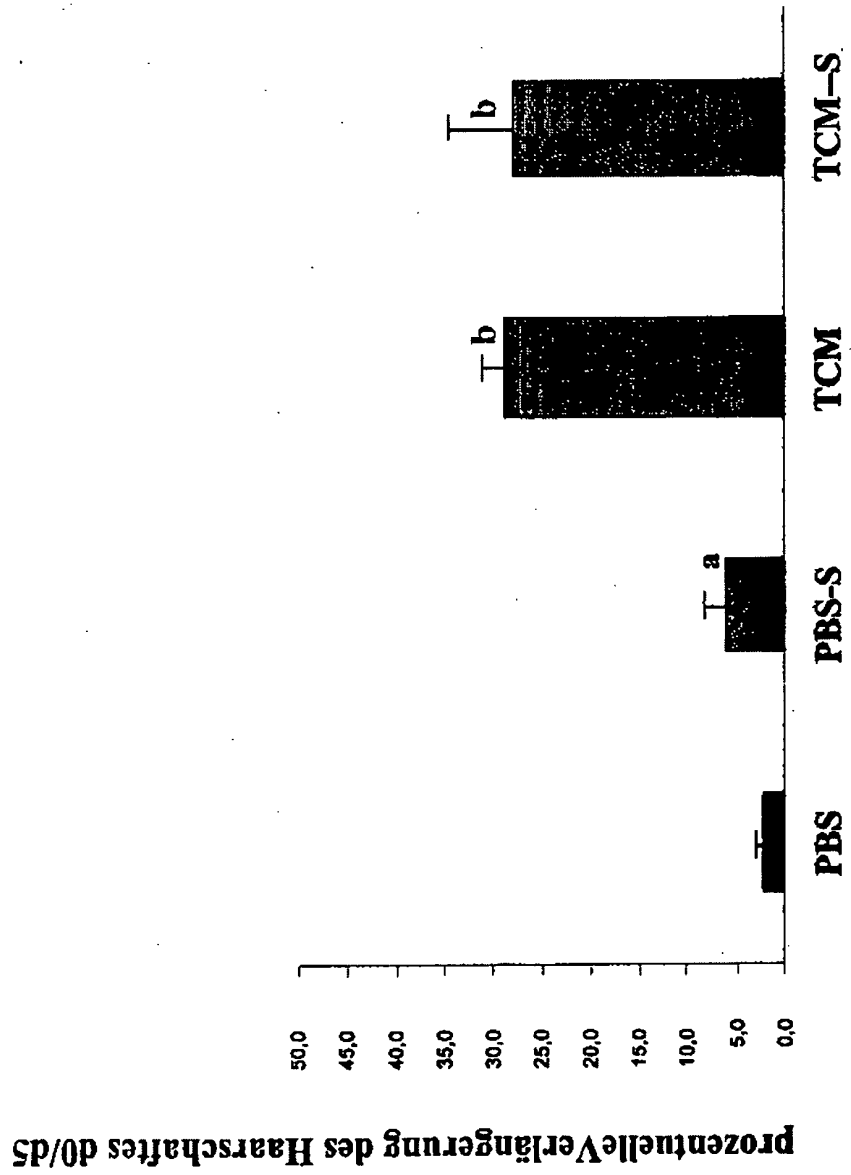
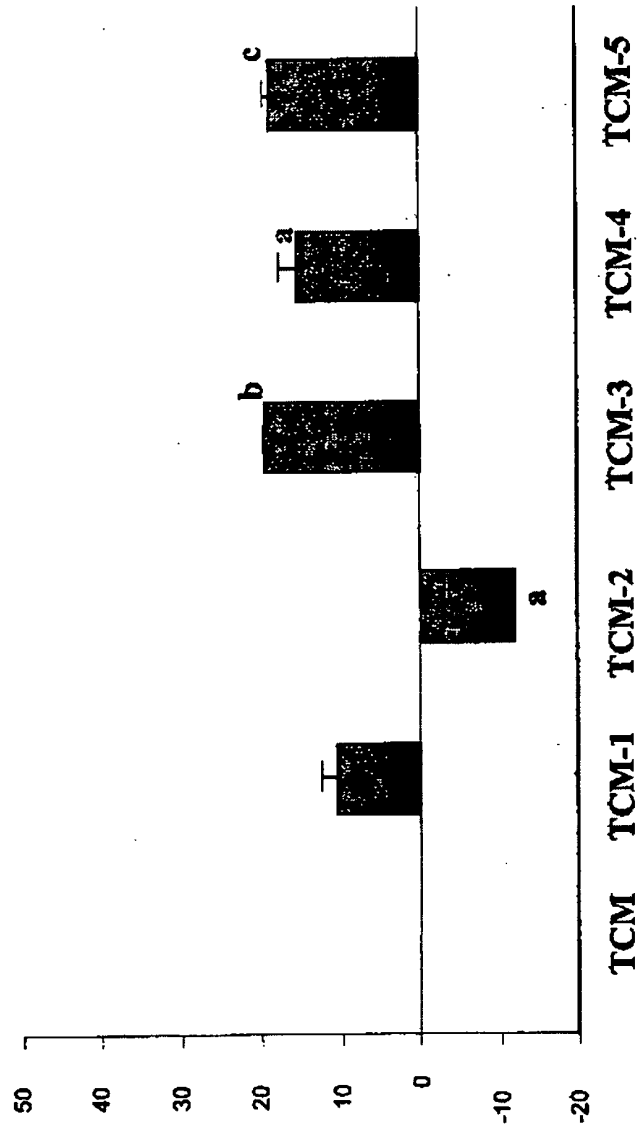




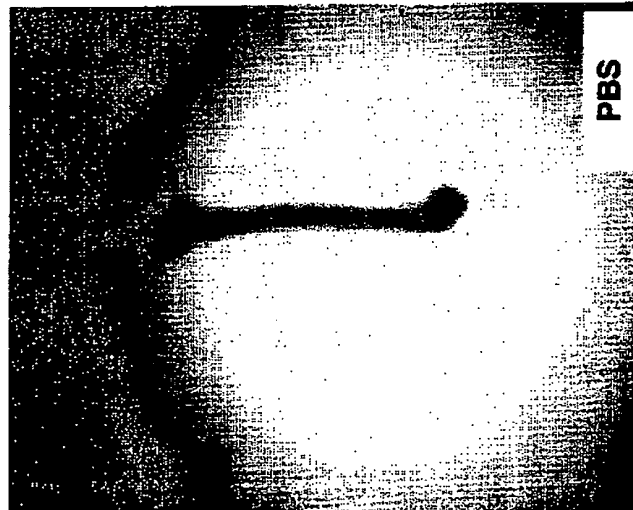
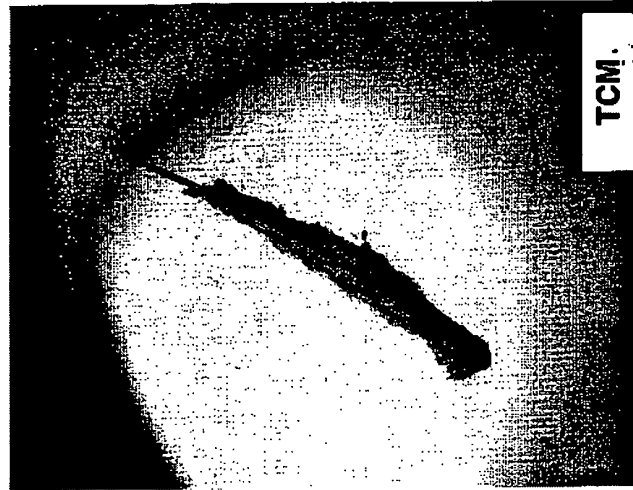
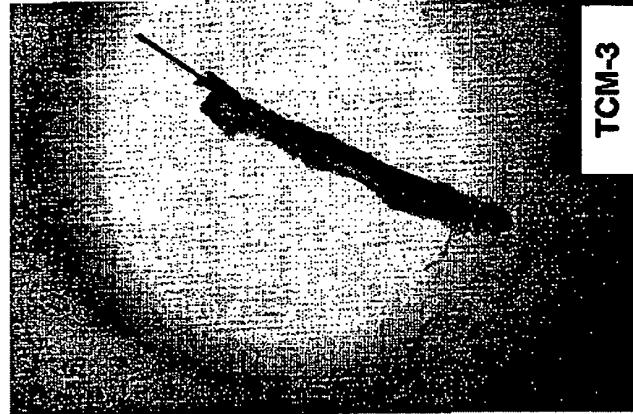
Fig. 4

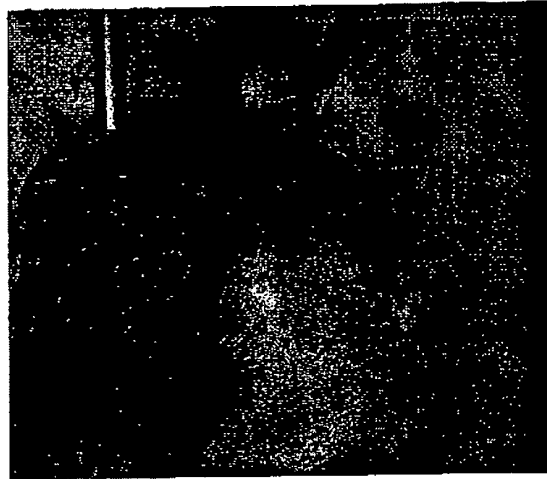


prozentuelle Veränderung der HSE verglichen mit HSE in TCM



Fig. 5





**1 Tag
nach Transplantation**



**60 Tage
nach Transplantation**



**90 Tage
nach Transplantation**

Fig. 6