

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der
Technischen Universität München**

Klinikum rechts der Isar

Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. K.- D. Wolff

**Humane Amnionmembran
zur Deckung von Vollhautwunden
- eine tierexperimentelle Machbarkeitsstudie am
Minischwein**

Claudia Maria Baumann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Dr. M. Kesting
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff

Die Dissertation wurde am 01.03.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.04.2012 angenommen.

Für meine Familie

Teile dieser Dissertationsschrift wurden veröffentlicht:

Loeffelbein D.J., Baumann C.M., Stoeckelhuber M., Hasler R., Mucke T.,
Steinstraesser L., Drecoll E., Wolff K.D., Kesting M.R.

„Amniotic membrane as a part of a skin substitute for fullthickness wounds: an
experimental evaluation in a porcine model.“

J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012 Jul;100(5):1245-56.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	13
2. Einleitung	14
2.1. Problemstellung	16
2.2. Die Wunde	17
2.2.1. Physiologie der Wundheilung	17
2.2.2. Wundheilungsstörungen	22
2.2.3. Die Schweinehaut als biologisches Modell für die Wundheilung des Menschen	22
2.3. Die Hauttransplantation	27
2.3.1. Spalt- und Vollhauttransplantate	27
2.3.2. Pathophysiologie der Hauttransplantate	29
2.4. Die Amnionmembran	31
2.4.1. Aufbau der Amnionmembran	31
2.4.1.1. Anatomischer und histologischer Aufbau	31
2.4.1.2. Zusammensetzung der extrazellulären Matrix	32
2.4.2. Eigenschaften der Amnionmembran	33
2.4.2.1. Mechanische Eigenschaften	33
2.4.2.2. Reepithelisierung	34
2.4.2.3. Analgetischer Effekt	34
2.4.2.4. Einfluss auf die Entzündungsreaktion und die Narbenbildung	35
2.4.2.5. Wirkung auf die Angiogenese	35
2.4.2.6. Immunogenität	35
2.4.2.7. Antimikrobielle Wirkung	36
2.4.2.8. Permeabilität	36
2.4.3. Anwendungen der Amnionmembran in der Medizin	37
3. Material und Methode	38
3.1. Gewinnung und Präparation der humanen Amnionmembran	38
3.1.1. Gewinnung der Plazentae	38

3.1.2. Präparation der humanen Amnionmembran	38
3.1.3. Herstellung des Konservierungsmediums	39
3.2. Kryokonservierung der Amnionmembran	39
3.3. Das Tiermodell	39
3.4. Operationsdurchführung	40
3.4.1. Erstellung der Hautdefekte	40
3.4.2. Versorgung der Hautwunden	42
3.5. Wundkontrolle und Probengewinnung	46
3.6. Finalisierung	46
3.7. Histologische Probenaufarbeitung	46
3.8. Immunhistologie	47
3.9. Vorgehen bei der Auswertung	48
4. Ergebnisse	53
4.1. Klinische Ergebnisse.....	53
4.1.1. Klinische Beurteilung	51
4.1.2. Analyse der Wundkontraktion	58
4.2. Histologische Ergebnisse.	59
4.2.1. Histologische Beurteilung der Biopsate	60
4.2.2. Auswertung der Epitheldicke	67
4.3. Immunhistologische Analyse.....	69
4.3.1. Beurteilung der Zellproliferation mittels anti-Ki-67	69
4.3.2. Beurteilung der Integrität der Basalmembran mittels anti-Laminin	73
4.3.3. Beurteilung der Gefäßproliferation mittels anti-vWF	75
4.3.4. Beurteilung der Narbenbildung mittels anti- α SMA	77
5. Diskussion	80
5.1. Tiermodell	81
5.2. Verwendete Materialien	83
5.3. Klinischer Verlauf	88
5.4. Histologischer Verlauf	92
5.5. Immunhistologische Analyse	94

6.	Zusammenfassung	101
7.	Summary	103
8.	Literaturverzeichnis	104
9.	Anhang	126
	9.1. Protokolle der immunhistologischen Färbungen.....	126
	9.1.1. Ki-67	126
	9.1.2. Laminin	127
	9.1.3. von Willebrand Faktor	129
	9.1.4. alpha-smooth-muscle actin	130
	9.2. Ergebnisse der statistischen Auswertung	132
	9.2.1. Auswertung der Wundkontraktion.....	132
	9.2.2. Auswertung der Epitheldicke.....	132
	9.2.3. Auswertung der Zellproliferation mittels anti-Ki67.....	133
	9.2.4. Auswertung der Gefäßproliferation mittels anti-vWF.....	134
	9.2.5. Auswertung der Narbenbildung mittels anti- α SMA.....	136
10.	Lebenslauf	139
11.	Danksagung	141

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Zusammensetzung der einzelnen Komponenten der Wundmatrix im Verlauf (Witte, M.B., et al., 2002, S. 408).....	S.20
Abb. 2.2: Vergleich der histologischen Gewebearchitektur zwischen menschlicher Haut und der Haut des Schweins. HE-Färbung zweier Biopsien aus vergleichbaren Hautregionen (Sullivan, T.P., et al., 2001, S. 68)	S.23
Abb. 2.3: Schichtartiger Aufbau der Plazenta (Murube, L.R., et al., 2006).....	S.31
Abb. 2.4: HE-Färbung einer humanen Amnionmembran: Aufbau in 5 Schichten (Riau, A.K., et al., 2010, S. 216).....	S.32
Abb. 3.1: Klinische Situation bei Schwein B nach Defektsetzung.....	S.41
Abb. 3.2: Klinische Situation einer VH/Int-Wunde nach deren Deckung mit einem Spalthauttransplantat.....	S.42
Abb. 3.3: Klinische Situation bei der Transplantation eines Amnionmembran-Patches.....	S.43
Abb. 3.4: Klinische Situation bei der Deckung der VH/Int-, der VH/MU- und der VH/MO-Wunde mittels eines Spalthauttransplantates.....	S.43
Abb. 3.5: Die kontrahierte Wundfläche am 60. postoperativen Tag im Vergleich zur ursprünglichen Hautfläche vor der Defektsetzung.....	S.49
Abb. 3.6: Methodik der Epitheldickenmessung.....	S.50
Abb. 3.7: VH/Int-Wunde in der α SMA-Färbung zur Erläuterung des Vorgehens bei der Auswertung.....	S.52

Abb. 4.1: Klinischer Verlauf der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich	S.57
Abb. 4.2: Boxplot-Darstellung der prozentualen Wundkontraktion der Vollhautwunden.....	S.58
Abb. 4.3: Exemplarische Darstellung der Wundkontraktion der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich.....	S.59
Abb. 4.4: Beginnende Reepithelisierung der VH/MU-Wunde am 7. postoperativen Tag. HE-Färbung (50fach).....	S.61
Abb. 4.5: VH/MO- und VH/MU-Wunde am 7. postoperativen Tag im Vergleich. HE-Färbung (50fach).....	S.61
Abb. 4.6: VH/Int-Wunde am 7. postoperativen Tag: Nekrotische oberflächliche Integraschicht. Ausschnitt aus einer tieferen Ebene: Fremdkörperriesenzellen umgeben die Integrareste.....	S.62
Abb. 4.7: VH/NT-Wunde und VH/MU-Wunde am 60. postoperativen Tag. EvG-Färbung (50fach).....	S.64
Abb. 4.8: Histologischer Wundheilungsverlauf der einzelnen Behandlungsgruppen HE-Färbung (50fach).....	S.66
Abb. 4.9: Boxplot der Epitheldicke am 20. postoperativen Tag.....	S.68
Abb. 4.10: Boxplot der Epitheldicke am 60. postoperativen Tag.....	S.68
Abb. 4.11: Boxplot der Proliferationsindizes am 10. postoperativen Tag.....	S.69
Abb. 4.12: Boxplot der Proliferationsindizes am 60. postoperativen Tag.....	S.70
Abb. 4.13: Basale Zellproliferation der VH/Int-Wunde, der VH/MU-Wunde und der VH/SH-Wunde am 10. postoperativen Tag im Vergleich. Anti-Ki67-	

Färbung (300fach).....	S.71
Abb. 4.14: Die verschiedenen Behandlungsgruppen am 60. postoperativen Tag in der Ki67-Färbung im Vergleich (300fach).....	S.72
Abb. 4.15: Die VH/MO-Wunde und VH/MU-Wunde am 10. postoperativen Tag in der Laminin-Färbung im Vergleich zur Beurteilung der Integrität der Basalmembran. Anti-Laminin-Färbung (150fach).....	S.73
Abb. 4.16: Basalmembranbildung der verschiedenen Behandlungsgruppen am 20.Tag. Anti-Laminin-Färbung (300fach).....	S.74
Abb. 4.17: Boxplot der Gefäßanzahl pro HPF am 10. postoperativen Tag.....	S.75
Abb. 4.18: Boxplot der Gefäßanzahl pro HPF am 60. postoperativen Tag.....	S.76
Abb. 4.19: Anti-vWF-Färbung der VH/Int- und der VH/MO-Wunde am 10. post operativen Tag im Vergleich (150fache Vergrößerung).....	S.76
Abb. 4.20: Anti-vWF-Färbung der verschiedenen Behandlungsgruppen am 60. postoperativen Tag im Vergleich (300fach).....	S.77
Abb. 4.21: Boxplot der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 10. postoperativen Tages.....	S.78
Abb. 4.22: Boxplot der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 60. postoperativen Tages.....	S.79
Abb. 4.23: VH/MU-Wunde und VH/SH-Wunde am 60. postoperativen Tag in der α SMA-Färbung im Vergleich (300fach).....	S.81

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Die verschiedenen Hauttransplantate im Vergleich hinsichtlich der Reparaturprozesse der Spenderregion, der Transplantatannahme sowie der Vorgänge bei der Einheilung (Andreassi, A., et al., 2005, S. 333).....	S.28
Tab. 3.1: Verteilung der Wundarten und Deckungsmaterialien auf die einzelnen Tiere.....	S.45
Tab. 3.2: Übersicht über die verwendeten Antikörper, die zu detektierenden Strukturen und die Hersteller.....	S.47
Tab. 4.1: Prozentuale Transplantatannahme bei den einzelnen Behandlungsgruppen.....	S.53
Tab. 4.2: Die verschiedenen Behandlungsgruppen im zeitlichen Verlauf hinsichtlich der Eigenschaften Blutung, Entzündung, Infektion.....	S.55
Tab. 4.3: Klinischer Score für die einzelnen postoperativen Komplikationen unterteilt in die einzelnen Phasen der Wundheilung.....	S.56
Tab. 4.4: Mittelwerte und SEM-Werte der prozentualen Wundkontraktion am 60. postoperativen Tag.....	S.58
Tab. 4.5: Zeitliche Unterschiede im Heilungsverlauf der Vollhautwunden bzgl. der Epithelisierungsprozesse.....	S.65
Tab. 4.6: Mittelwerte und SEM-Werte der Epitheldicke (in μm) am 20. und am 60. postoperativen Tag.....	S.67
Tab. 4.7: Mittelwerte und SEM-Werte der Proliferationsindizes am 10. und am 60. postoperativen Tag.....	S.69

Tab. 4.8: Integrität der Basalmembran über den postoperativen Wundheilungsverlauf.....	S. 73
Tab. 4.9: Mittelwerte und SEM-Werte der Anzahl an Gefäßen pro HPF am 10. und am 60. postoperativen Tag.....	S.75
Tab. 4.10: Mittelwerte und SEM-Werte der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF im zeitlichen Verlauf.....	S.78
Tab. 9.1: p-Werte und Signifikanz der Wundkontraktion der einzelnen Behandlungsgruppen.....	S.132
Tab. 9.2: p-Werte und Signifikanz der Epitheldicke am 20. postoperativen Tag.....	S.132
Tab. 9.3: p-Werte und Signifikanz der Epitheldicke am 60. postoperativen Tag.....	S.133
Tab. 9.4: p-Werte und Signifikanz der Epitheldicke des 20. und 60. postoperativen Tages.....	S.133
Tab. 9.5: p-Werte und Signifikanz der Proliferationsindizes der einzelnen Behandlungsgruppen am 10. postoperativen Tag.....	S.133
Tab. 9.6: p-Werte und Signifikanz der Proliferationsindizes der einzelnen Behandlungsgruppen am 60. postoperativen Tag.....	S.134
Tab. 9.7: p-Werte und Signifikanz der Proliferationsindizes des 10. und 60. postoperativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen.....	S.134
Tab. 9.8: p-Werte und Signifikanz der Gefäßanzahl der einzelnen Behandlungsgruppen am 10. postoperativen Tag.....	S.134
Tab. 9.9: p-Werte und Signifikanz der Gefäßanzahl der einzelnen Behandlun-	

gruppen am 60. postoperativen Tag.....	S.135
Tab. 9.10: p-Werte und Signifikanz der Gefäßanzahl des 10. und 60. postoperativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen.....	S.135
Tab. 9.11: p-Werte und Signifikanz der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 10. postoperativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen.....	S.136
Tab. 9.12: p-Werte und Signifikanz der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 20. postoperativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen.....	S.136
Tab. 9.13: p-Werte und Signifikanz der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 40. postoperativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen.....	S.137
Tab. 9.14: p-Werte und Signifikanz der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 60. postoperativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen.....	S.137
Tab. 9.15: p-Werte und Signifikanz der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF der einzelnen Behandlungsgruppen im zeitlichen Verlauf.....	S.138

1. Abkürzungen

α SMA	=	alpha-smooth-muscle actin
BSA	=	bovine serum albumine
DBA	=	Diamniobenzidin
EGF	=	epidermal growth factor
EvG	=	Elastica van Gieson
FGF	=	fibroblast growth factor
HE	=	Hämatoxylin-Eosin
HGF	=	hepatocyte growth factor
HPF	=	High Power Field
IL-1	=	Interleukin-1
IL-1-RA	=	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
iNOS	=	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase
KGF	=	keratinocyte growth factor
NF- κ B	=	nuclear factor kappa B
NO	=	Stickstoffmonoxid
PBS	=	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PDGF	=	platelet derived growth factor
PF 4	=	Plättchen-Faktor 4
SEM	=	standard error of the mean
TGF- β	=	transforming growth factor beta
TNF- α	=	tumor necrosis factor alpha
TSP-1	=	Thrombospondin-1
VEGF	=	vascular endothelial growth factor
VH/Int	=	Vollhautwunde, gedeckt mit Integra
VH/MO	=	Vollhautwunde, gedeckt mit einlagiger Amnionmembran
VH/MU	=	Vollhautwunde, gedeckt mit mehrlagiger Amnionmembran
VH/NT	=	Vollhautwunde, no treatment
VH/SH	=	Vollhautwunde, gedeckt mit Spalthaut
vWF	=	von Willebrand-Faktor

2. Einleitung

Die Hauttransplantation ist eine unverzichtbare Methode in der plastischen und wiederherstellenden Chirurgie zur Weichgeweberekonstruktion größerer traumatischer, chronischer oder iatrogenen Hautdefekte. Je nach Defekt kommen verschiedene Methoden zur Anwendung. Bei der freien Hauttransplantation werden Spalthaut-, Vollhaut- und Haut-Knorpelplastiken unterschieden (Müller, W., 2000, S. 314). Postoperativ müssen sowohl die transplantierte Stelle als auch die Transplantatentnahmestelle hinsichtlich funktioneller und ästhetischer Gesichtspunkte beurteilt werden.

Trotz der Vielzahl der bereits existierenden Behandlungsmöglichkeiten zur Deckung der Transplantatentnahmestelle, der sog. Donor site, konnte speziell für Wunden, die keiner primären Wundheilung mehr zugeführt werden können, bisher noch keine optimale Lösung gefunden werden (Abraham, D.J., et al., 2000, S. 15220). Biologische Materialien wie die Amnionmembran bieten aufgrund ihrer Verfügbarkeit, der mechanischen und physiologischen Eigenschaften sowie der Vermeidung einer weiteren Donor site Vorteile gegenüber Spalt- und Vollhauttransplantaten oder synthetischen Deckungsmaterialien. Durch die Verwendung synthetischer Hautersatzmaterialien wird zwar ebenfalls die sog. Entnahmemorbidität verhindert, allerdings gestaltet sich ihr Einsatz sehr kostenintensiv. Synthetische Materialien verfügen zudem nur über eine eingeschränkte Biokompatibilität. Als Vollhautersatz eignet sich beispielsweise Integra[®] Artificial Skin, ein zweischichtiges Membransystem aus Chondroitin-6-Phosphat und einer Polysiloxanschicht. Ein weiteres Hautersatzmaterial ist AlloDerm[®], das aus Kollagenen, Elastin, vaskulären Strukturen und Proteinen besteht, welche die Revaskularisierung und das Gewebe-Remodeling unterstützen. Amnionmembran wird regelmäßig in einigen Bereichen der Wundbehandlung eingesetzt, da sie viele Qualitäten eines optimalen biologischen Deckungsmaterials aufweist. Sie zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus: Beschleunigung der Reepithelisierung (Lo, V., et al., 2009, S. 935) analgetische Effekte (Ley-Chavez, E., et al., 2003, S. 46; Martinez-Prado, M., et al., 1999, S. 68), antiinflammatorische Wirkung (Jiang, A., et al., 2006, S. 36), niedrige Immunogenität (Kesting, M.R., et al., 2009, S. 131; Kubo, M., et al., 2001, S. 1539), Hemmung der

Narbenbildung (Wang, X.Q., et al., 2010, S. 680), antimikrobielle Effekte und gute Wundadhärenz (Lo, V., et al., 2009, S. 935).

Die ersten Berichte zur Verwendung von Amnionmembran im Sinne eines Hauttransplantats stammen von Davis aus dem Jahr 1910 (Davis, J., 1910, S. 310). Drei Jahre später berichtet Sabella über die Amnionmembran als permanentes Deckungsmaterial bei Brandwunden (Sabella, N., 1913, S. 478). 1952 führte Douglas eine klinisch experimentelle Studie zur Verwendung von Amnionmembran als temporäres biologisches Verbandsmaterial bei Verbrennungen durch (Douglas, B., 1952, S. 230). Amnionmembran wurde auch zur Behandlung von chronisch venösen Beinulzera erfolgreich eingesetzt (Ward, D.J., 1989, S. 463). Dennoch wurde in den 80er und 90er Jahren des vorigen Jahrhunderts die Anwendung von Amnionmembran aufgrund ihrer potentiellen Infektiosität eingeschränkt. Mitte der 90er Jahre wurden neue Konservierungsverfahren eingeführt, welche eine zweifache serologische Testung des Spenders auf Infektionskrankheiten wie HIV, Hepatitis B und C, CMV und Syphilis einmal direkt nach der Geburt und sechs Monate später zur Kontrolle einer möglichen Serokonversion umfassen (Lo, V., et al., 2009, S. 935). Mittlerweile stehen zur Aufbewahrung der Amnionmembran zwischen der ersten und der zweiten serologischen Testung mehrere verschiedene Konservierungsverfahren zur Verfügung, wobei jedes Vor- und Nachteile aufweist. Glycerol-Konservierung (Maral, T., et al., 1999, S. 275), γ -Strahlung-Sterilisation (Ley-Chavez, E., et al., 2003, S. 46; Singh, R., et al., 2007, S. 505), Lyophilisation (Gajiwala, K., et al., 2004, S. 73) und Kryokonservierung (Ward, D.J., et al., 1989, S. 463) zur Konservierung beeinflussen und verändern die Eigenschaften der Amnionmembran auf verschiedene Art und Weise, was jedoch klinisch nicht relevant zu sein scheint (von Versen-Hoyneck, F., et al., 2004, S. 45). So kam die Amnionmembran zunächst vor allem im Gebiet der rekonstruktiven Ophthalmochirurgie in einem weiten Spektrum zum Einsatz (Gomes, J.A., et al., 2005, S.233; Plummer, C.E., 2009, S.17). Darüber hinaus reichende Berichte über die Anwendung von Amnionmembran zur Behandlung extensiver Verbrennungen (Lo, V., et al., 2009, S. 935), als chirurgisches Verbandsmaterial (Rao, T.V., et al., 1981, S. 891), zur chirurgischen Rekonstruktion im Bereich der Mundhöhle (Lawson, V.G., 1985, S. 230), der Blase (Iijima, K., et al., 2007, S. 513) sowie der Vagina (Dhall, K., 1984, S. 279; Georgy, M., 1996, S. 292), zur Perikardokklusion (Muralidharan, S., et al., 1991, S. 1201) und

zur Prävention chirurgischer Adhäsionen (Young, C.M., et al., 1980, S. 182) zeigen das breite Indikationsspektrum der Amnionmembran.

2.1. Problemstellung

Ziel dieser Studie war es, kryokonservierte Amnionmembran als Transplantatmaterial zur Deckung von Vollhautwunden in der wiederherstellenden Chirurgie zu etablieren. Dazu sollte in einem geeigneten Tiermodell die klinische und histologische Evaluation von Amnionmembran als Vollhautersatzmaterial erfolgen. Als Vergleichsmaterialien wurden autologe Spalthauttransplantate – als klinischer „Goldstandard“ – und ein routinemäßig verwendetes Hautersatzmaterial (Integra® Artificial Skin, Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, New Jersey, USA) herangezogen. Von besonderem Interesse im Rahmen der Studie am porcinen Modell waren folgende Fragestellungen:

- Wie verläuft der Einheilungsprozess klinisch?
- Wie ist die Einheilung der verschiedenen Transplantate histologisch zu beurteilen?

Dabei wurde das Augenmerk der Untersuchungen auf Epithelisierung, Angiogenese, Narbenbildung sowie Bildung der Basalmembran und Zeitpunkt ihrer Integrität gelegt.

Diese Fragen sollen im Folgenden erörtert werden.

2.2. Die Wunde

Die grundlegenden Ziele der Wundbehandlung bestehen darin, eine weitere Schädigung des Gewebes zu verhindern, einen möglichst raschen Wundverschluss zu erzielen, die Funktion des verletzten Gewebes wiederherzustellen und dem Patienten eine zügige Wiederaufnahme seiner täglichen Aktivitäten zu ermöglichen. Durch die Auswahl der am besten geeigneten Behandlungsmethode soll ein in funktioneller und kosmetischer Hinsicht optimales Ergebnis erzielt werden (Ramasastry, S.S., 2005, S. 195).

2.2.1. Physiologie der Wundheilung

Ursprünglich wurde die Wundheilung in drei voneinander getrennte Phasen unterteilt: Die exsudative, die resorptive und die reparative Phase. Da die Wundheilung jedoch ein komplex ablaufender Prozess serieller Reaktionen und Interaktionen zwischen den Zellen und deren Mediatoren ist und die einzelnen Phasen sich zeitlich innerhalb einer Wunde überschneiden, wird in neueren Studien auf die strikte Trennung der Wundheilungsphasen verzichtet.

Exsudative Phase

Die exsudative Phase beginnt sofort nach Eintreten der Verletzung und dauert circa bis zum vierten Tag. Nach einer Verletzung ist zunächst die Kontrolle der Blutung von ausschlaggebender Bedeutung. Die verletzten Endothelzellen konstringieren sich und das Endothel sowie die umliegenden Thrombozyten im Wundgebiet aktivieren die intrinsische Gerinnung. Das dabei entstehende Koagel besteht aus Kollagen, Thrombozyten, Thrombin und Fibronectin (Broughton, G., et al., 2006, S. 12). Unmittelbar nach der Bildung des Koagels werden zelluläre Signale generiert, die in einer neutrophilen Antwort resultieren. Da die inflammatorischen Mediatoren akkumulieren, werden Prostaglandine freigesetzt und die umliegenden Gefäße dilatieren. Die Vasodilatation ermöglicht den erhöhten Zellverkehr, der dadurch entsteht, dass neutrophile Granulozyten durch die Mediatoren IL-1, TNF- α , TGF- β und PF4 ins Verletzungsgebiet gelockt werden. Circa 48 bis 96 Stunden nach der Verletzung wandern Monozyten aus dem umliegenden Gewebe in das Wundgebiet

ein und verwandeln sich in Makrophagen. Aktivierte Makrophagen vermitteln durch die Synthese von VEGF, FGF sowie TNF- α die Angiogenese und durch TGF- β , EGF, PDGF, IL-1 sowie TNF- α die Neubildung von Bindegewebe. Außerdem synthetisieren aktivierte Makrophagen nach Aktivierung der iNOS durch IL-1 und TNF- α Stickstoffmonoxid (Witte, M.B., et al., 2002, S. 406). Die Neutrophilen reinigen das Wundgebiet, indem sie proteolytische Enzyme freisetzen, die Bakterien und Zelldebris verdauen. Die unterschiedlichen Protease-Typen werden anhand ihrer spezifischen Angriffspunkte (Proteine, Aminosäuren oder das Metallion im Inneren eines Enzyms) eingeteilt. Die Matrixmetalloproteinasen, welche außer in Neutrophilen auch in Keratinozyten, Fibroblasten und Monozyten als Antwort auf TNF- α exprimiert werden, dienen dem Abbau der defekten extrazellulären Matrix (Abraham, D.J., et al., 200., S. 15220; Broughton, G., et al., 2006, S. 12; Goldman, R., 2004, S.24). Die Matrix im unverletzten Gewebe wird durch Proteinase-Inhibitoren geschützt. Ist die inflammatorische Reaktion jedoch besonders stark und erfolgt eine massive Freisetzung von Proteinase, so können diese Antiproteinase inaktiviert werden. Neutrophile können außerdem über einen Myeloperoxidase-Pathway Sauerstoffradikale bilden, welche sich mit Chlor-Molekülen verbinden und so zusätzlich die Reinigung der Wunde von Bakterien unterstützen (Yager, D.R., et al., 1999, S. 433). Die Neutrophilen, welche die initiale inflammatorische Reaktion bewirken, unterliegen einem bis jetzt unbekanntem Apoptose-Stimulus und werden im weiteren Verlauf durch Makrophagen, welche die apoptotischen Neutrophilen phagozytieren, ersetzt. Die Makrophagen besitzen zwar keine Myeloperoxidase, töten aber dennoch Pathogene ab, indem sie NO bilden. Die iNOS der Makrophagen wird durch TNF und IL-1 zur Synthese größerer Mengen an NO angeregt (Goldman, R., 2004, S.24).

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Inflammationsreaktion sich selbst limitiert und beendet wird, sobald die anfänglichen exogenen Stimuli verringert würden (Serhan, C.N., et al., 2004, S. 69). Mittlerweile ist jedoch evident, dass die Beendigung der Inflammation ein gut koordinierter Prozess ist, bei dem eine bestimmte Abfolge von Reaktionen die Produktion von Stop-Signalen im Sinne einer so genannten Checkpoint-Kontrolle bewirkt (Nathan, C., 2002, S. 846; Serhan, C.N., et al., 2004, S. 69). Ein wichtiges Stop-Signal sind die Lipoxine. Sie werden in der von der Lipoxygenase katalysierten Reaktion neben Prostaglandin, Prostazyklin, Thromboxan A₂ und Leukotrien aus den Eicosanoiden synthetisiert. Diese erfolgt

entweder in den Neutrophilen oder über transzelluläre Biosynthese in den Thrombozyten. Thrombozyten alleine können keine Lipoxine produzieren. Heften sich jedoch Thrombozyten und Leukozyten aneinander, produziert der Leukozyt über die 5-Lipoxygenase Leukotrien A₄, welches in den Thrombozyt übertragen und dort von dessen 12-Lipoxygenase in Lipoxin A₄ und B₄ umgewandelt wird. Klinische und experimentelle Wundheilungsstudien haben gezeigt, dass ein frühes Auftreten von Prostaglandinen und Leukotrienen mit einer neutrophilen Infiltration einhergeht. Anschließend erfolgt die Lipoxin-Biosynthese, die zu einem Rückgang und schließlich zur Beendigung der Inflammationsreaktion führt (Goetzl, E.J., et al., 1998, S. 1589; Serhan, C.N., et al., 2004, S. 69).

Proliferative Phase

Die proliferative Phase mit den Vorgängen der Epithelisierung, der Angiogenese und der provisorischen Matrixbildung läuft zwischen dem 5. und dem 14. Tag ab (Broughton, G., et al., 2006, S. 12). Die Epithelisierung beginnt bereits kurze Zeit nach der Verletzung mit der Proliferation der epithelialen Zellen am Wundrand, um eine Schutzbarriere gegen Flüssigkeitsverlust und weitere bakterielle Besiedlung zu bilden (Broughton, G., et al., 2006, S. 12). Die Epithelisierung wird zunächst durch die inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α stimuliert, welche die KGF-Genexpression in Fibroblasten hochregulieren. Fibroblasten synthetisieren und sezernieren daraufhin KGF-1, KGF-2 und IL-6, die wiederum benachbarte Keratinozyten dazu anregen, ins Wundgebiet zu migrieren, dort zu proliferieren und sich in epidermale Zellen zu differenzieren (Xia, Y.P., et al., 1999, S. 431). Beim Menschen scheint das KGF-2 die wichtigste Rolle in diesem Prozess zu spielen (Jimenez, P.A., et al., 1999, S. 238).

Die Regulation der Angiogenese erfolgt über die Expression von VEGF in Keratinozyten, die durch IL-1 sowie TNF- α aus Makrophagen und TGF- β 1 und KGF-2 aus Fibroblasten zur VEGF-Expression stimuliert werden. Die Endothelzellen intakter Venolen werden durch VEGF zur Bildung neuer Kapillaren angeregt. Bei Hypoxie im Wundgebiet bilden die Endothelzellen NO, welches zusätzlich die VEGF-Produktion erhöht. Steigende NO-Konzentrationen schützen somit das neu gebildete Gewebe vor toxischen ischämischen Effekten und lösen eine Vasodilatation aus (Witte, M.B., et al., 2002, S. 406).

Die Matrixproduktion wird hauptsächlich von den Fibroblasten übernommen. PDGF und EGF aus Thrombozyten und Makrophagen führen dazu, dass Fibroblasten aus dem umgebenden Gewebe in das Wundgebiet einwandern, aktiviert werden, Kollagen synthetisieren und proliferieren. Das von Makrophagen sezernierte TGF- β regt die bereits im Wundgebiet lokalisierten Fibroblasten zur Umwandlung in Myofibroblasten an, um eine Kontraktion der Wunde zu erreichen. Als Reaktion auf PDGF beginnen Fibroblasten, eine provisorische Matrix aus Typ III Kollagen, Glykosaminoglykanen und Fibronectin zu bilden (Broughton, G., et al., 2006, S. 12). Die Matrixproduktion wird durch TGF- β gesteuert, welches zwischen dem 7. und dem 14. Tag seinen höchsten Spiegel erreicht und zusätzlich den Abbau der extrazellulären Matrix verhindert. TGF- β führt in Fibroblasten zu Typ I Kollagensynthese, herabgesetzter Metalloproteinasen-Expression, verstärkter Bildung von Metalloproteinase-Inhibitoren und gesteigerter Synthese von Zelladhäsionsproteinen (Goldman, R., 2004, S. 24). Abbildung 2.1 zeigt die Zusammensetzung der Wundmatrix im zeitlichen Verlauf.

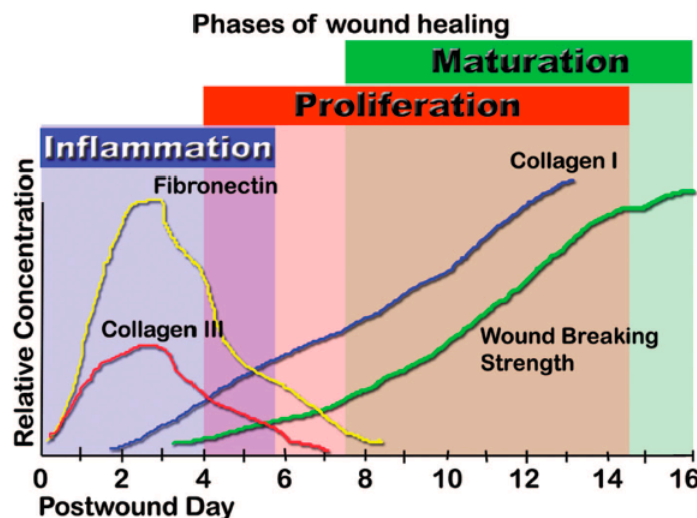


Abb. 2.1: Die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten der Wundmatrix im zeitlichen Verlauf in einer Darstellung nach Witte et al. (Witte, M.B., et al., 2002, S. 408).

Reparative Phase

Reparations- und Remodelingvorgänge finden ab dem siebten Tag nach der Verletzung statt und können bis zu einem Jahr andauern (Broughton, G., et al., 2006, S. 12).

Zu Beginn des Wundheilungsprozesses ist die Matrix hauptsächlich aus Fibrin und Fibronectin aufgebaut, welche einerseits aus den Vorgängen der Hämostase stammen und andererseits von Makrophagen freigesetzt werden (Broughton, G., et al., 2006, S. 12). Diese zufällige Ansammlung von Glykanen bildet ein provisorisches Gerüst für die neue Matrix, wird jedoch im weiteren Verlauf von den Metalloproteinasen, welche durch die sich verändernden Konzentrationen an TGF- β , PDGF, IL-1 und EGF beeinflusst werden, durch eine festere und organisierte Matrix aus Kollagen ersetzt. Ist die Matrix zu Beginn der Wundheilung noch dünn und nachgiebig, was den Fibroblasten, Neutrophilen, Lymphozyten und Makrophagen die mühelose Fortbewegung durch diese hindurch erlaubt, so wird sie mit dem weiteren Fortschreiten des Wundheilungsprozesses aufgrund der Kollagenfibrillen zunehmend fester (Broughton, G., et al., 2006, S. 12). In der frühen Phase hängen die Remodeling-Prozesse von der Migration der Zellen durch die Matrix und der Proteolyse der Matrixproteine ab. Ist jedoch der Zustand der isometrischen Spannung erreicht, das heißt, dass die von extern einwirkenden mechanischen Kräfte mit der Zellkontraktion so im Gleichgewicht stehen, dass es zu keiner Längenänderung der Zelle kommt, veranlasst die Lysophosphatidsäure die dendritischen Äste der Fibroblasten zur Kontraktion. Die Lysophosphatidsäure ist ein im Gewebe und im Serum von Säugetieren häufig vorkommendes Protein, welches wahrscheinlich aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird (Eichholtz, T., et al., 1993, S. 677; Goetzl, E.J., et al., 1998, S. 1589). Um die Kontraktilität weiter zu erhöhen, differenzieren sich die Fibroblasten unter dem Einfluss von TGF- β zu Myofibroblasten. Die Differenzierung wird durch die Zellinteraktion mit einer alternativ gesplitteten Form des Fibronectins ausgelöst, wodurch der Fibroblast die Expression des α -smooth-muscle-actin Isotyps, welcher in engem Zusammenhang mit der Zellkontraktilität steht, erhöht. Mechanische Entlastung führt zu Apoptose der Myofibroblasten sowie zu verminderter Kollagensynthese und letztendlich zur Heilung der Wunde. Persistierende mechanische Beanspruchungen schaffen pathologische Bedingungen im Sinne einer Kontraktur und resultieren in hypertrophen oder verbreiterten Narben, die durch die weiterhin vorhandenen Myofibroblasten und die andauernde Kollagensynthese verursacht werden (Grinnell, F., 2003, S. 264).

Das Kollagennetzwerk in Narbengewebe wird nie dieselbe organisierte Form annehmen, wie dies in der unverletzten Haut der Fall ist. Auch wird die Festigkeit des

ehemaligen Wundgebietes nie wieder die vollen 100 Prozent erreichen. Nach einer Woche besitzt die Wunde nur ein Prozent ihrer endgültigen Widerstandsfähigkeit, nach drei Wochen sind es circa 30 Prozent und nach drei Monaten und später circa 80 Prozent (Broughton, G., et al., 2006, S. 12).

2.2.2. Wundheilungsstörungen

Störungen der Wundheilung sind dadurch gekennzeichnet, dass die einzelnen Phasen aufgrund von Störfaktoren zeitlich verzögert sind und sich die Dauer der Zwischenphasen verlängert. Eine gesteigerte Inflammationsreaktion führt hierbei zu einer verstärkten Bildung eines minderwertigen Granulationsgewebes in der Proliferationsphase, woraus ein überschießendes Remodeling resultiert. Die Folge ist ein funktionell und/oder ästhetisch schlechteres Endergebnis.

Wundheilungsstörungen werden anhand ihrer Ätiologie in lokale, d. h. von den vorherrschenden Wundverhältnissen ausgehende Störungen und systemische Störungen, die aufgrund einer vorbestehenden Grunderkrankung wie beispielsweise einer Koagulopathie entstehen, eingeteilt. Außerdem unterscheidet man septische und aseptische sowie akute und chronische Komplikationen. Hypertrophe Narben und Keloide zählen zu den chronischen Wundheilungsstörungen. Die häufigsten Ursachen für Störungen des Wundheilungsprozesses sind Nachblutungen, Infektionen, Nekrosebildung, Wunddehiszenzen und Fremdkörperreaktionen oder Kombinationen aus mehreren dieser Faktoren (Weise, K., et al., 2000, S. 109).

2.2.3. Die Schweinehaut als biologisches Modell für die Wundheilung des Menschen

Die Frage nach den Möglichkeiten, welche die Haut der Haussäugetiere als experimentelles Modell für die Haut des Menschen bietet, kann nur bedingt beantwortet werden, zumal das Integument der Haussäugetiere bei vergleichender Auswertung spezies-spezifische Eigenschaften aufweist, die bei deren Anwendung berücksichtigt werden müssen (Meyer, W., et al., 1991, S. 16). Außerdem wird eine

einheitliche und biologisch korrekte Bewertung der Funktion sowie der Struktur der Haut durch domestikationsbedingte Veränderungen zusätzlich erschwert (Meyer, W., et al., 1991, S. 16). Probleme ergeben sich im experimentellen Modell mit Labortieren in erster Linie durch das dichte Haarkleid von Hunden, Katzen und Wiederkäuern, welches bestimmte funktionelle und strukturelle Charakteristika aufweist, die eine Übertragung experimenteller Ergebnisse auf den Menschen einschränkt (Meyer, W., et al., 1991, S. 16; Meyer, W., et al., 1978, S. 39; Militzer, K., 1982, S. 193). Ein Vorteil des Schweinemodells besteht darin, dass die Borsten weniger dicht sind als das Haarkleid der anderen Haussäugetierarten und diese somit die Wundauflage in wesentlich geringerem Ausmaß beeinträchtigen.

Abbildung 2.2 zeigt den histologischen Vergleich zwischen menschlicher Haut und der Haut des Schweins (Sullivan, T.P., et al., 2001, S. 66).

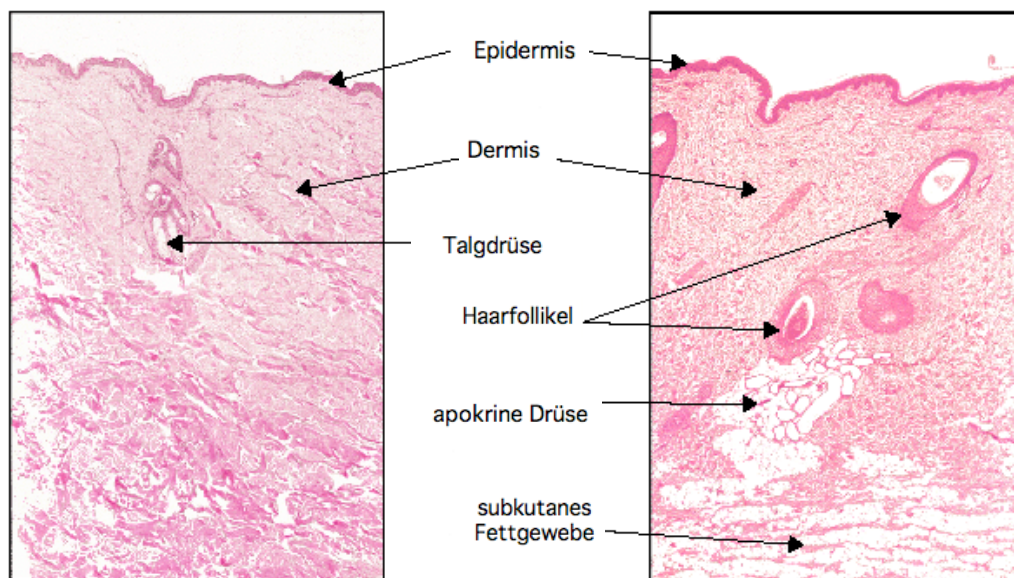


Abb. 2.2: Vergleich der histologischen Gewebeanatomie zwischen menschlicher Haut (links) und der Haut des Schweins (rechts). Hämatoxylin-Eosin-Färbung zweier Biopsien aus vergleichbaren Hautregionen (Sullivan, T.P., et al., 2001, S. 68).

Bezüglich der Epidermis der Schweinehaut zeigen sich in Bau, Biochemismus stoffwechselphysiologischen Aspekten deutliche Ähnlichkeiten zur menschlichen Haut (Archambeau, J.O., et al., 1984, S. 254; Meyer, W., et al., 1991, S.16; Meyer, W., 1996, S.178; Wollina, U., et al., 1991, S. 87). So umfasst beispielsweise die Erneuerungsrate der Epidermis beim Menschen einen Zeitraum von 28 Tagen, beim Schwein 30 Tage, die Passage der vitalen Epidermis beträgt beim Menschen 13

Tage, beim Schwein 10 bis 14 Tage. Die Dicke der menschlichen Epidermis beträgt 50-120 μm , die des Schweins 30-140 μm , wobei diese stark abhängig von der Körperregion ist. Ein geeigneteres Maß ist daher das Verhältnis der dermalen zur epidermalen Schichtstärke (Meyer, W., et al., 1978, S. 39). Vardaxis et al. berichten, dass dieses Verhältnis beim Schwein zwischen 10:1 und 13:1 liegt und damit vergleichbar mit den Messwerten menschlicher Haut ist (Vardaxis, N.J., et al., 1997, S. 601). Weitere Gemeinsamkeiten zeigen sich hinsichtlich der Entwicklung der epidermalen Barriere (Archambeau, J.O., et al., 1984, S. 254; Meyer, W., 1996, S.178; Schwartzendruber, D., et al., 1989, S. 251) und der Permeation verschiedener Substanzen (Downing, D.T., 1992, S. 301; Squier, C.A., et al., 1985, S. 176). Die Unterschiede betreffen vor allem die Langerhans-Zellen. Diese sind beim Schwein in deutlich geringerer Zahl vorhanden und sind abgerundet, das heißt, sie besitzen keine zytoplasmatischen Fortsätze. Außerdem fehlen den Langerhans-Zellen der Schweinehaut die sog. Birbeck-Granula (Meyer, W., et al., 1991, S.16). Die Birbeck-Granula sind Tennisschläger-förmige Cytoplasmaformationen, deren Funktion nicht endgültig geklärt ist. Es wird jedoch angenommen, dass die Birbeck-Granula in die Peripherie der Langerhans-Zellen migrieren, dort die Freisetzung der Mediatoren in die extrazelluläre Matrix bewirken und somit zur Aktivierung von Lymphozyten beitragen (Bonetti, M.I., et al., 2011, S. 3983). Neuere Studien zeigen jedoch das gelegentliche Vorkommen von Langerhans-Zellen, welche keine Birbeck-Granula besitzen, auch beim Menschen und verdeutlichen, dass somit auch ohne Birbeck-Körperchen das Vermögen zur Antigenpräsentation unbeeinträchtigt sein kann (Meyer, W., 1996, S.178).

Auch die Dermis weist zahlreiche strukturelle Gemeinsamkeiten mit dem menschlichen Integument auf. Diese betreffen vor allem die Anordnung von Bindegewebeelementen und zahlreiche biochemische Parameter. Menschliche Haut und Schweinehaut gleichen sich nicht nur in Gehalt, Verteilung und Struktur von Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen (King, I.A., et al., 1980, S. 234; Tsukise, A., et al., 1983, S. 845), sondern auch im Aufbau des Kollagens. Das Kollagen der Schweinehaut ist hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung der α_1 - und der α_2 -Ketten identisch mit dem der menschlichen Dermis (Heinrich, W., et al., 1971, S. 63; Meyer, W., 1996, S.178). Dies wird neben den Unterschieden bezüglich der Langerhanszellen als weiterer Grund für die sehr geringe antigene Wirkung der Schweinehaut gegenüber dem Menschen angesehen. Obwohl die

Schweinehaut einen im Vergleich zu anderen Versuchstieren relativ hohen Anteil an elastischen Fasern zeigt, ist dieser dennoch etwas geringer als in menschlicher Haut (Sullivan, T.P., et al., 2001, S. 66). Auch in funktioneller Hinsicht bestehen Ähnlichkeiten zwischen Mensch und Schwein, zum Beispiel in Bezug auf die Lipidzusammensetzung des Stratum corneum (Gray, G.M., et al., 1982, S. 59; Nicolaidis, N., et al., 1968, S. 83).

Die Blutgefäßversorgung ist ebenfalls ähnlich strukturiert. Das Gefäßnetz ist so aufgebaut, dass schnell Wärme abgegeben werden kann, allerdings besitzt das Schwein zusätzliche vasokonstriktische Mechanismen, welche eine noch effektivere Isolation der Körperschale gewährleisten (Meyer, W., et al., 1991, S.16; Young, C.M., et al., 1980, S. 182). Weiterhin besitzt die Schweinehaut in Bezug auf die Ausdehnung der nozizeptiven Felder der polymodalen Nozizeptoren große Ähnlichkeiten mit der menschlichen Haut (Meyer, W., et al., 1991, S.16). Eine Besonderheit beim Hausschwein stellen die schnell reagierenden Mastzellen dar, welche eine hohe Stresssensitivität besitzen. Die Empfindlichkeit dieses Mastzellsystems ist einerseits rasseabhängig, steht aber auch im Zusammenhang mit der individuellen Stressbelastung bei *in vivo*-Versuchen (Meyer, W., et al., 1991, S.16; Meyer, W., 1996, S. 178; Xu, L.R., et al., 1993, S. 516). Die Haut des Menschen und die des Schweins heilen physiologischerweise auf ähnliche Art und Weise. So werden Spalthautwunden durch Reepithelisierungsprozesse wieder verschlossen, wohingegen Hautwunden kleiner Laborsäugetiere in erster Linie durch Wundkontraktion heilen (Sullivan, T.P., et al., 2001, S. 66).

Deutliche Unterschiede bestehen jedoch in der Struktur der Hypodermis. Aufgrund der starken Fetteinlagerung und der relativen Dicke, sowie der massiven Kompaktheit und ihrer Durchwachsung mit Kollagenfaserbündeln weist die Hypodermis der Schweinehaut keine ausreichende Vergleichbarkeit mit der menschlichen Haut auf (Meyer, W., et al., 1991, S.16). Weitere Differenzen zeigen sich im Haarfollikelkomplex, vor allem bei den apokrinen Schlauchdrüsen. Das glykokonjugatreiche, neutrale Sekret dieser apokrinen Drüsen erzeugt beim Schwein nach der Vermischung mit Sebum auf der Hautoberfläche ein anderes Milieu als beim Menschen, was sich im Haut-pH widerspiegelt. Der pH-Wert menschlicher Haut erreicht einen Wert von circa 5, der pH-Wert der Schweinehaut liegt zwischen 6 und 7 (Meyer, W., et al., 1978, S. 39; Meyer, W., et al., 1991, S.16; Meyer, W., 1996, S. 178; Tsukise, A., et al., 1983, S. 845). Eine wesentliche Schwierigkeit bei

experimentellen Untersuchungen stellt die Tendenz zur Hyper- bzw. Parakeratose dar, die bei Miniaturschweinen besonders ausgeprägt sein kann.

Aus dieser Beschreibung ist ersichtlich, dass sich Möglichkeiten zur erfolgreichen Anwendung der Schweinehaut als Modell für den Menschen ergeben, wenn vorzugsweise die Epidermis berücksichtigt wird (Meyer, W., et al., 1991, S.16; Meyer, W., 1996, S. 178). Demnach wird die Schweinehaut als dermatologisches Modell für die Beobachtung von Wundheilungsprozessen bei Hautdefekten aufgrund von Strahlungseinflüssen (Archambeau, J.O., et al., 1984, S. 254), durch Entzündungsprozesse sowie durch chemische, mechanische (Lawson, V.G., 1985, S. 230; Wang, T.H., et al., 2010, S. 252) und thermische Belastungen (Park, M., et al., 2008, S. 520) herangezogen.

2.3. Die Hauttransplantation

Die Hauttransplantation ist eine unverzichtbare Methode zur Wiederherstellung von traumatischen oder iatrogenen Hautdefekten sowie zur funktionellen und ästhetischen Korrektur ausgedehnter Narben. Es werden die Spalthaut- und die Vollhauttransplantation unterschieden.

2.3.1. Spalt- und Vollhauttransplantate

Die Technik der Spalthauttransplantation ist weltweit eine der am häufigsten angewendeten Methoden zum Verschluss größerer Wundflächen. Als Pionier hatte Reverdin 1869 kleine, dünne Kutisläppchen verpflanzt (Reverdin, J., 1869, S. 511). Ollier erzeugte 1872 erstmals auch größere Epidermistransplantate (Ollier, L., 1872, S. 243). Die von ihm beschriebene Technik wurde durch Thiersch in den Folgejahren standardisiert (Thiersch, C., 1874, S. 318).

Das funktionelle und ästhetische Ergebnis einer Spalthauttransplantation hängt in erster Linie von der Dicke des Transplantates ab. Hierbei sind vier verschiedene Stärken zu unterscheiden (siehe Tabelle 2.1). Spalthauttransplantate, welche die Epidermis und einen Anteil der Dermis umfassen, werden in der Regel gut angenommen, wohingegen Vollhauttransplantate, welche die Epidermis und die gesamte Dermis einschließen, nur dann problemlos einheilen, wenn sie relativ klein sind und so durch Diffusion versorgt werden können (Andreassi, A., et al., 2005, S. 332). Dünne Spalthauttransplantate vom Typ Thiersch-Ollier weisen eine gute Einheilung auf, bieten aber schlechtere Deckungseigenschaften, da die sehr dünne Haut nur wenig widerstandsfähig ist und aufgrund der fehlenden Anteile der Dermis häufig einer Retraktion unterliegt. Mit mittleren und dicken Spalthauttransplantaten ist die Qualität der Defektdeckung sehr gut, die Haut ist resistenter und weniger anfällig für eine Schrumpfung (Stephenson, A.J., et al., 2000, S. 397). Wegen der entstehenden Narben sollte die Spalthauttransplantation lediglich bei tiefen, alle Hautschichten umfassenden Verbrennungen, bei ausgedehnten Hautdefekten außerhalb des Gesichts und bei Verletzungen, bei denen die Empfängerstelle nur

spärlich vaskularisiert ist (zum Beispiel trophische Beinulzera), angewendet werden.

Art des Transplantats	Spenderregion	Transplantatannahme
Thiersch-Ollier (0,15 – 0,3 mm)	Restitutio ad integrum	gut; anschließende Retraktion
Blair-Brown (0,3 – 0,45 mm)	Restitutio ad integrum	ziemlich gut; anschließende Retraktion
Padgett (0,45 – 0,6 mm)	Spontane Heilung mit anschließender Bildung von Narbengewebe	Aseptische und gut vaskularisierte Empfängerregion erforderlich; moderate Retraktion
Wolfe-Krause (> 0,6 mm)	Chirurgische Versorgung notwendig	Erfordert sehr gute Vaskularisierung; fast keine Retraktion

Tab. 2.1: Die verschiedenen Hauttransplantate im Vergleich hinsichtlich der Reparaturprozesse der Spenderregion, der Transplantatannahme sowie der Vorgänge bei der Einheilung nach Andreassi et al. (Andreassi, A., et al., 2005, S. 335).

Vollhauttransplantate beinhalten die Epidermis sowie das Korium inklusive der darin enthaltenen Hautanhangsgebilde. Bei der Entnahme eines Vollhauttransplantates ist darauf zu achten, dass das Hautkolorit und die Hauttextur der donor site in ihren Eigenschaften möglichst weit mit denen der Empfängerregion übereinstimmen. Wird dies gewährleistet, so kann ein funktionell und ästhetisch ansprechender Defektverschluss erreicht werden. Die Vollhauttransplantation wird vor allem in Bereichen eingesetzt, in denen das zur Verfügung stehende Gewebereservoir für eine lokale Lappenplastik nicht ausreichend ist (Petres, J, et al., 2006, S. 216). Sie ist besonders gut für die Wiederherstellung von Hautdefekten im Bereich der Schläfe, der Nase, des äußeren Ohrs und der distalen Extremitäten geeignet (Ratner, D., et al., 1998, S. 75; van Zuijlen, P.P., 2000, S. 615). Diese Empfängerstellen zeichnen sich durch die feste Unterlage aus, welche eine optimale Transplantateinheilung mit adäquater Niveauangleichung und minimaler Schrumpfungstendenz gewährleistet. Ein entscheidender Faktor für die einwandfreie Annahme eines Vollhauttransplanta-

tes ist außerdem eine suffiziente Vaskularisierung der Empfängerstelle. Dementsprechend sollte das Vollhauttransplantat ohne überschüssiges Fettgewebe entnommen werden, um zusätzliche Diffusionshindernisse zu minimieren. Als Donorareale für Vollhauttransplantate im Gesichtsbereich eignen sich besonders die supraclaviculäre und die retroaurikuläre Region, da hier eine weitgehende Übereinstimmung der Hauteigenschaften zwischen Spender- und Empfängerregion besteht. Zur Defektdeckung im Bereich der Extremitäten oder der Phalangen bieten sich die inguinalen oder axillären Hautfalten als Entnahmestellen an (Petres, J, et al., 2006, S. 216).

Der Fokus der folgenden Untersuchungen soll auf der Rekonstruktion von Vollhautdefekten liegen.

2.3.2. Pathophysiologie der Hauttransplantate

Der Vorgang der Vereinigung des Transplantats mit der Empfängerstelle wird als Transplantatannahme bezeichnet. Neben der immunologischen Kompatibilität sind die essentiellen Voraussetzungen für die Transplantatannahme die Fähigkeit der Empfängerregion, eine Gefäßeinsprossung in das Transplantat (Neoangiogenese) sowie eine gute Anheftung des Transplantats an die Empfängerstelle und eine sorgfältige Immobilisierung des Transplantats zu ermöglichen.

Um eine Transplantatannahme zu gewährleisten, darf die Empfängerregion nicht infiziert oder übermäßig exsudativ sein. Jegliche Ansammlung von Exsudat oder Blut unter dem Transplantat gefährdet dessen Einheilung, da es die Haftung an der Empfängerregion und die Penetration neu gebildeter Kapillaren erschwert. Befindet sich die Empfängerregion in der Nähe eines Gelenks, so muss dieses adäquat verbunden und immobilisiert werden, um eine mechanische Ablösung zu verhindern. Daher hat es sich bewährt, nach dem Aufbringen des Transplantates einen Kompressionsverband anzulegen, welcher den engen Kontakt des Transplantates mit dem darunter liegenden Gefäßbett und die komplette Immobilisierung gewährleistet. Je nach Lokalisation und Größe des Transplantates können elastische Bandagen, Schwämme, Baumwolle oder Mullkompressen, welche mit Nähten befestigt werden, angewendet werden. Der Vorgang der Transplantateinheilung ist

identisch mit dem der Wundheilung. Der 24 bis 48 Stunden anhaltenden initialen Imbibitionsphase, die der Inflammationsreaktion entspricht, folgt die Revaskularisationsphase von fünf bis sieben Tagen Dauer, welche der Fibroplasie ähnelt, und schließlich die Adaptationsphase mit den Vorgängen der Retraktion und Dehnung. Die anfängliche Haftung zwischen Transplantat und Empfängerregion ist auf ein Fibrinnetzwerk zurückzuführen, wohingegen die Ernährung des Gewebes durch das Exsudat aufrechterhalten wird. Kapillaren, welche sich auf das Transplantat zu bewegen, schließen an das Gefäßnetz an oder revaskularisieren das Gewebe direkt. Ist die Vaskularisierung vollendet (in der Regel nach fünf bis sieben Tagen), so kann davon ausgegangen werden, dass das Transplantat angenommen wurde und der Kompressionsverband kann entfernt werden (Andreassi, A., et al., 2005, S. 332; Stephenson, A.J., et al., 2000, S. 397).

Anschließend beginnt die Adaptationsphase, in der das Transplantat zunächst einer Retraktion und nach ein bis zwei Monaten einer Dehnung ausgesetzt ist. In dieser Phase erfolgt auch die Reinnervation des Transplantats, außerdem können Veränderungen der Pigmentierung auftreten.

Klinisch ist das Transplantat zunächst blass und weißlich, aber die darauf folgende rötliche Färbung und feste Haftung an der Empfängerregion weisen auf eine Transplantatannahme hin. Die Vorgänge der Transplantateinheilung sind äußerst empfindlich und dementsprechend können Grunderkrankungen wie Diabetes oder Arteriopathien diese erschweren. Zu den lokalen Faktoren, die eine Transplantatannahme behindern können, zählen Infektionen, übermäßige Exsudation, Hämatome und alle Veränderungen der Empfängerregion, welche die Möglichkeit einer Revaskularisierung gefährden, wie zum Beispiel eine Radiodermatitis oder nekrotische Areale (Andreassi, A., et al., 2005, S. 332).

2.4. Die Amnionmembran

2.4.1. Aufbau der Amnionmembran

2.4.1.1. Anatomischer und histologischer Aufbau

Amnion und Chorion werden als fetale Membranen der Plazenta bezeichnet (siehe Abb. 2.3). Die Amnionmembran wird an ihrer Innenseite von Amnionflüssigkeit umspült, die äußere Seite ist mit dem Chorion verbunden. Das Chorion ist aus Bindegewebe und Blutgefäßen aufgebaut, welche den Nährstofftransport aus dem maternalen in das fetale Blut gewährleisten. Außen befindet sich die Dezidua, die aus modifiziertem Endometrium besteht und als einzige der fetalen Membranen mütterlichen Ursprungs ist (Riau, A.K., et al., 2010, S. 216).

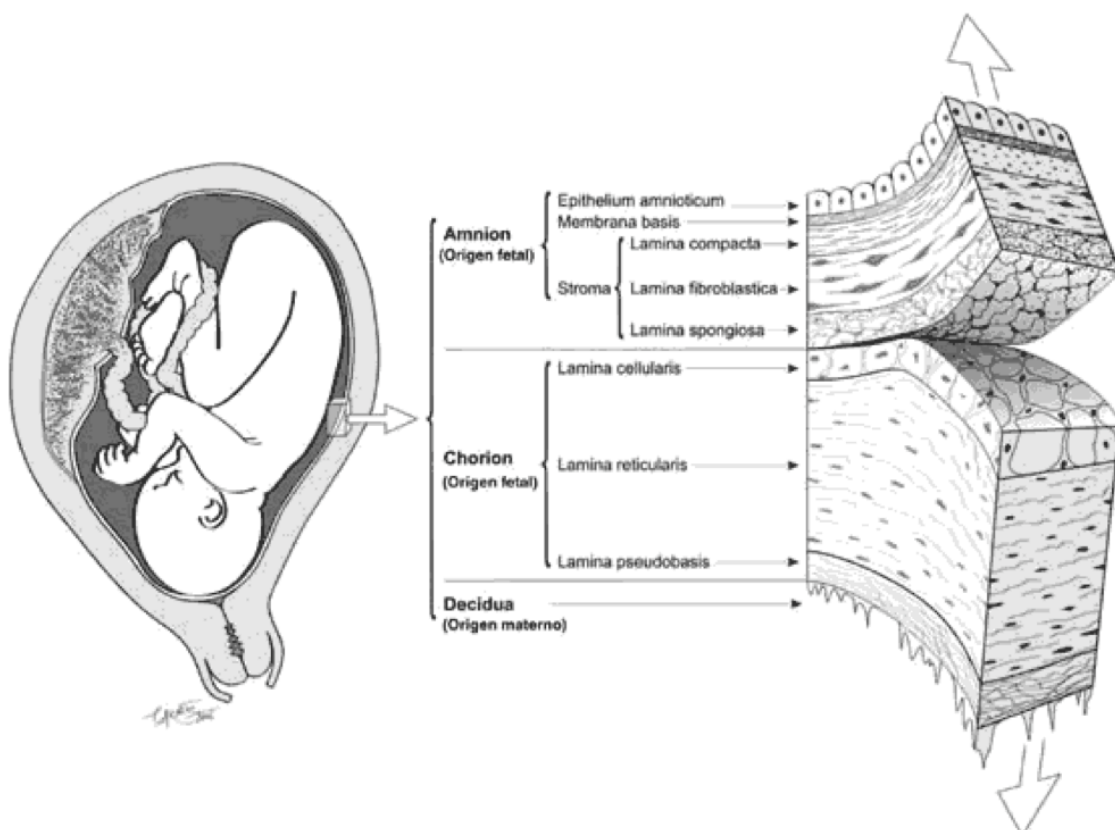


Abb. 2.3: Schichtartiger Aufbau der Plazenta. Die Amnionmembran stellt die innerste der drei Schichten dar (Murube, L.R., et al., 2006).

Histologisch ist die Amnionmembran eine 0,02 bis 0,5 Millimeter dicke, fünfschichtige, nicht vaskularisierte Membran, welche die innere Plazentahöhle auskleidet (Bourne, G.L., 1960, S. 1070). Das einschichtige amniotische Epithel besteht aus kuboidalen bis zylindrischen Epithelzellen mit Mikrovilli an der apikalen Oberfläche und sitzt einer Basalmembran auf, die in ihrem Aufbau stark der konjunktivalen Basalmembran ähnelt (Fukuda, K., et al., 1999, S. 73). Die Substantia propria umfasst eine kompakte Kollagenschicht, welche die Zugfestigkeit der Amnionmembran gewährleistet, und eine Fibroblastenschicht, welche aus in ein lockeres Geflecht aus Retikulum eingebetteten Fibroblasten besteht und die dickste Schicht der Amnionmembran darstellt. Die aus losem Bindegewebe bestehende, so genannte Schwammschicht, ist reich an Muzinen und kann sich durch Wassereinlagerung auf das Doppelte vergrößern. Sie liegt dem Chorion an und ermöglicht es der Amnionmembran, relativ frei über das unterliegende, fixierte Chorion zu gleiten (von Versen-Hoyneck, F., et al., 2004, S. 45). Die äußeren drei Schichten sind in histologischen Untersuchungen an kryokonserviertem Gewebe schwer voneinander abzugrenzen. Abbildung 2.4 zeigt den fünfschichtigen histologischen Aufbau der Amnionmembran.

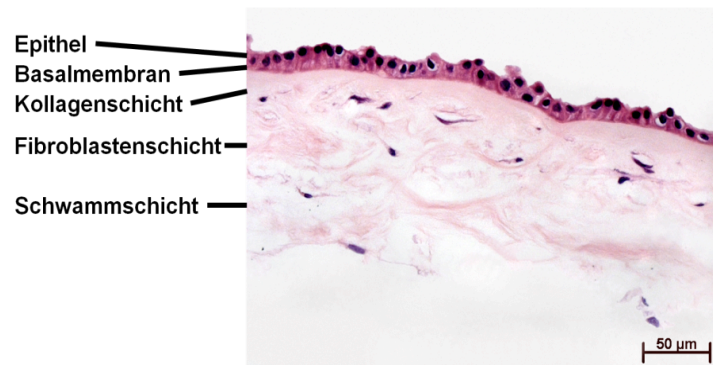


Abb. 2.4: Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer humanen Amnionmembran. Fünf Schichten sind zu erkennen: Das Epithel, die Basalmembran, die kompakte Kollagenschicht, die Fibroblastenschicht und die Schwammschicht.

2.4.1.2. Zusammensetzung der extrazellulären Matrix

Die Struktur der extrazellulären Matrix ist von entscheidender Bedeutung für Vorgänge wie Wachstum, Wundheilung und Fibrosierung. Kollagen der Typen I, III, IV, V, VII, Elastin, Laminin und Fibronectin konnten als Bestandteile der

extrazellulären Matrix humaner Amnionmembran nachgewiesen werden (Malak, T.M., et al., 1993, S. 385; Mehta, D., et al., 2007, S. 138).

Kollagen ist ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix. Kollagen Typ I und Typ III sind die wesentlichen fibrillären Bestandteile der Substantia propria und wurden in immunhistologischen Färbungen vor allem in den bindegewebigen Schichten gefunden. Typ IV Kollagen als ubiquitärer Bestandteil von Basalmembranen zeigt sich auch in der Amnionmembran und erscheint immunhistologisch als 0,2-0,3 µm dickes, dichtes Band (Malak, T.M., et al., 1993, S. 385). Eine für die klinische Anwendung entscheidende strukturelle Eigenschaft der extrazellulären Matrix ist die Gerüstfunktion der Basalmembran, wodurch die epitheliale Morphogenese, Proliferation und Differenzierung gesteuert und Apoptosen verhindert werden (Andriani, F., et al., 2003, S. 923; Grueterich, M., et al., 2003, S. 631). Eine wichtige Komponente der Basalmembran ist das Endostatin. Endostatin ist ein Proteoglykan, welches sich als potenter antiangiogenetischer Faktor erwiesen hat und in der Lage ist, Zellproliferation, Angiogenese und Tumorwachstum zu verhindern (O'Riley, M., et al., 1997, S. 277). Ein weiteres, von den Epithelzellen freigesetztes antiangiogenetisches Matrixprotein ist das TSP-1, welches sich immunhistologisch vor allem in den amniotischen Epithelzellen und in geringerer Ausprägung im Stroma darstellen lässt (Riau, A.K., et al., 2010, S. 216). Eine bisher wenig erforschte Komponente der extrazellulären Matrix der Amnionmembran ist das Elastin. Die Hauptaufgabe des Elastins ist es, die Dehnbarkeit des Gewebes zu gewährleisten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Elastin außerdem in die Rekrutierung inflammatorischer Zellen involviert ist und zur Vasodilatation beiträgt (Robert, L., et al., 1995, S. 286).

2.4.2. Eigenschaften der Amnionmembran

2.4.2.1. Mechanische Eigenschaften

Um dem physiologischen Druck im Mutterleib durch die Amnionflüssigkeit standhalten zu können, muss die Amnionmembran mechanisch sehr stabil sein, was sie zu einem geeigneten Transplantatmaterial macht. Stabilität, Elastizität und andere biomechanische Eigenschaften hängen von der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix aus Kollagen, Proteoglykanen und Elastin ab. Die Stabilität wird durch den Kollagenanteil bestimmt, die Elastizität durch den Elastinanteil. Da

mechanische Reize außerdem wichtige Signale für die Differenzierung von Progenitorzellen sind, muss die Amnionmembran als Transplantat nicht nur eine ausreichende Stabilität gewährleisten, sondern auch ein geeignetes Milieu für die Gewebeneubildung schaffen (Kim, J.S., et al., 2000, S. 329). Die Amnionmembran weist eine hohe Viskoelastizität auf. Eine Möglichkeit die Elastizität zu messen, ist das so genannte Young-Modul, welches als das Verhältnis von aufgewendeter Belastung zu resultierender Dehnung definiert ist. Das Young-Modul menschlicher Haut beträgt in Abhängigkeit von Alter und Entnahmestelle circa 0,3 MPa. Das der Amnionmembran hingegen liegt abhängig vom Schwangerschaftszeitpunkt zwischen 2,29 und 3,6 MPa, wobei es mit zunehmender Schwangerschaftsdauer abnimmt (Benson-Martin, J., et al., 2006, S. 103).

2.4.2.2. Reepithelisierung

Die Amnionmembran begünstigt durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten und beschleunigt so die Reepithelisierung. Yang et al. zeigten, dass Transplantate mit Amnionmembran solche ohne Amnionmembran hinsichtlich der Keratinozytenproliferation und der Keratinozytendifferenzierung übertreffen (Yang, L., et al., 2006, S. 69). In einer Studie von Koizumi et al. wurde die Expression von Wachstumsfaktoren in Epithel und Stroma der Amnionmembran untersucht. In intaktem Amnionepithel wurde im Vergleich zu denudiertem eine höhere Konzentration an Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- β , KGF, HGF und FGF gefunden (Koizumi, N.J., et al., 2000, S. 173). Die Amnionepithelzellen exprimieren Typ III und Typ IV Kollagen und andere nicht-kollagene Glykoproteine wie Laminin und Fibronectin. Diese dienen als Liganden für die Zelladhäsion, beeinflussen durch die Bindung von Oberflächenrezeptoren die Signaltransduktion und wirken somit beschleunigend auf die Epithelisierungsprozesse (Lo, V., et al., 2009, S. 936).

2.4.2.3. Analgetischer Effekt

Amnionmembran als biologisches Deckungsmaterial reduziert merklich die Schmerzstärke. Der genaue Mechanismus ist bis jetzt unbekannt, wahrscheinlich ist aber, dass dies mit dem schwächeren Kontakt zwischen Wundbett und Auflage zusammenhängt (Martinez-Pardo, M., et al., 1999, S. 68). Außerdem sind bei der

Verwendung von Amnionmembran schmerzhaftes Verbandswechsel seltener nötig (Ley-Chavez, E., et al., 2003, S. 46).

2.4.2.4. Einfluss auf die Entzündungsreaktion und die Narbenbildung

Verschiedene Autoren berichten von antiinflammatorischen Effekten der Amnionmembran und einer daraus folgenden Hemmung der Narbenbildung. Als zugrunde liegenden Mechanismus nimmt man eine Downregulation der Expression von TGF- β (Tseng, S.C., et al., 1999, S. 325) sowie von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 an (Hao, Y., et al., 2000, S. 348; Lee, S.H., et al., 1997, S. 303). Zusätzlich produzieren die Amnionepithelzellen Metalloproteinaseinhibitoren, wodurch die polymorphonukleäre Zellinfiltration herabgesetzt wird (Hao, Y., et al., 2000, S. 348).

2.4.2.5. Wirkung auf die Angiogenese

Die Wundheilung hängt unter anderem von dem richtigen Gleichgewicht aus proangiogenetischen Faktoren, welche die Reepithelisierung fördern, und antiangiogenetischen Faktoren, die überschießendes Remodeling verhindern, ab. Zunächst wurde wegen der gefäßfreien Struktur der Amnionmembran von einem antiangiogenetischen Effekt ausgegangen (Burgos, H., 1983, S. 289). Andere Studien hingegen nehmen aufgrund der Expression von VEGF und bFGF proangiogenetische Eigenschaften der Amnionmembran an (Bogic, L.V., et al., 2000, S. 203). Momentan werden nun jedoch die antiangiogenetischen Wirkungen der Amnionmembran in Bezug auf die Wundheilung favorisiert. Hao et al. fanden im Amnionepithel mehrere Substanzen mit antiangiogenetischer Wirkung, wie zum Beispiel TSP-1, IL-1-RA, Kollagen XVIII, IL-10 und Metalloproteinaseinhibitoren (TIMP-1, -2, -3 und -4) (Hao, Y., et al., 2000, S. 348).

2.4.2.6. Immunogenität

Eine immunologische Abstoßungsreaktion konnte im klinischen Gebrauch frischer Amnionmembranen nicht beobachtet werden (Akle, C.A., et al., 1981, S. 1003). Glycerol- und kryokonservierte Amnionmembranen können die Antigenität weiter reduzieren, da die Zellen nicht lebensfähig sind und keine Vaskularisation auftritt

(Maral, T., et al., 1999, S. 625). Die Amnionmembran ist immunologisch privilegiert, da keine der gängigen Major-Histokompatibilitätskomplexe (MHC- Proteine, HLA–A, -B, -DR) gebildet werden. Dennoch bleibt die Immunogenität der Amnionmembran kontrovers diskutiert, da in Tierversuchen lebensfähige Amnionepithelzellen bei allogener Transplantation von sensibilisierten Individuen bei wiederholter Anwendung eine Abstoßungsreaktion auslösen können (Hori, J., et al., 2006, S. 53).

2.4.2.7. Antimikrobielle Wirkung

Antimikrobielle Peptide des angeborenen Immunsystems, wie β -Defensine, Elastase-Inhibitoren, sekretorische Leukozyten-Proteinaseinhibitoren und Elafin werden in der Amnionmembran exprimiert (Splichal, I., et al., 2001, S. 345). Auch Lactoferrin und IL-1-RA, welche beide in Amnionmembranen nachgewiesen werden konnten, haben antimikrobielle und antiinflammatorische Eigenschaften (Kanyshkova, T.G., et al., 2001, S. 1). Dennoch wird davon ausgegangen, dass eine geringere bakterielle Besiedlung eher auf den rascheren Wundverschluss als auf die Freisetzung antibakterieller Substanzen durch die Amnionmembran zurückzuführen ist (Talmi, Y.P., et al., 1991, S. 285). Es wird angenommen, dass der antibakterielle Effekt durch die gute Wundadhärenz unterstützt wird, weil dadurch eine weitere Kontamination verhindert wird und die körpereigenen Abwehrmechanismen die sekundäre Infektion besser kontrollieren können (Lo, V., et al., 2009, S. 935). Außerdem kann aufgrund der Transparenz der Amnionmembran eine Ansammlung von Sekret als Indikator für die Notwendigkeit eines Verbandwechsels frühzeitig erkannt werden (Gajiwala, K., et al., 2004, S. 73).

2.4.2.8. Permeabilität

Die Amnionmembran verhindert den Verlust von Flüssigkeit, Elektrolyten, Proteinen, Wärme sowie Energie und ist permeabel für Sauerstoff (Yoshita, T., et al., 2004, S. 486). Dadurch kann Sauerstoff frei in das Wundbett diffundieren und den Heilungsprozess beschleunigen (Lo, V., et al., 2009, S. 935).

2.4.3. Anwendungen der Amnionmembran in der Medizin

William Thornton, ein Student am Johns Hopkins Hospital war augenscheinlich der erste der den Wert fetaler Membranen für die Wundheilung und chirurgische Maßnahmen erkannte. Die erste wissenschaftliche Beschreibung von Hauttransplantationen mit einer Kombination aus Amnion- und Chorionmembran erfolgte dann 1910 durch Thorntons's Lehrer, Dr. Staige Davis (Davis, J., 1910, S. 310). In der Folge wurden verbrannte und ulzerierte Körperoberflächen mit frischer Amnionmembran als Hautersatz behandelt (Sabella, N., 1913, S. 478; Stern, M., 1913, S. 973). Die ersten aufwändigeren Rekonstruktionen mit frischer HAM wurden etwa zwei Jahrzehnte später durch Brindeau and Burger angegeben, die HAM zur Vaginalplastik bei Scheidenagenesie heranzogen (Brindeau, A., 1934, S. 385; Burger, K., 1937, S. 2437). In den 40er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden erstmalige Versuche unternommen, HAM zu konservieren. Chao und Mitarbeiter modifizierten HAM, nannten es "Amnioplastin" und setzten es als Duraersatz, bei der Neurolyse, bei der Tenolyse und bei der Bauchwandplastik jeweils zur Vermeidung von Adhäsionen ein (Chao, Y., 1940, S. 517; Penfield, W., 1940, S. 668). In der Herzchirurgie wurde Amnionmembran zur Perikardokklusion angewendet (Muralidharan, S., et al., 1991, S. 1201). In einer Studie von Kesting et al. zeigte sich Amnionmembran als geeignetes Material zum Verschluss oronasaler Fisteln am Minischwein (Kesting, M.R., et al., 2009, S. 131).

DeRötth und Sorsby beschrieben den Nutzen von HAM zur Rekonstruktion von Augenoberflächen. Dieser Meilenstein eröffnete nach Etablierung der HAM-Kryokonservierung Mitte der 90er Jahre eines der am meisten expandierenden Felder in der Ophthalmochirurgie (deRötth, A., 1940, S. 552; Sorsby, A., 1946, S. 337). In Kontrast zum rasant ansteigenden Einsatz von konservierter HAM in der Augenheilkunde kommt das konservierte fetale Gewebe in den übrigen plastisch-rekonstruktiven Fächern nur spärlich zur Anwendung. Bislang scheinen dafür Materialunzulänglichkeiten bzw. die falsche Indikationswahl den Ausschlag zu geben. Als Weichgewebsrekonstrukt wies einlagige HAM eine mangelnde mechanische Stabilität zur Rekonstruktion perforierter Rattenblasen auf (Iijima, K., et al., 2007, S. 513). Bei der Verwendung einlagiger HAM als Wundauflage verhinderte die zu rasche Degradation eine vollständige Epithelialisierung der diabetischen Ulzera (Mermet, I., et al., 2007, S. 459).

3. Material und Methode

3.1. Gewinnung und Präparation der humanen Amnionmembran

3.1.1. Gewinnung der Plazentae

Nach Prüfung und Genehmigung des Versuchsprotokolls durch die Ethik-Kommission der Ruhr-Universität Bochum (Registrierungsnummer 2969) wurde allen Müttern, die ihre Plazenta zur Verfügung stellen wollten, ein Aufklärungsbogen vorgelegt. Als Einschlusskriterien galten folgende Parameter:

- geplante Sectio bei einer gesunden Patientin
- Erst- oder Zweitpara.

Nach Einverständniserklärung der Patientin wurde am Vortag der Sectio ein serologisches Screening auf Hepatitis B, Hepatitis C, HIV und Syphilis durchgeführt, da positive Testergebnisse ein Ausschlusskriterium darstellten. Die Plazentae wurden im Zeitraum von Dezember 2007 bis Februar 2008 in der Frauenklinik des Marienhospitals Witten (Leitung: Prof. Dr. Hatzmann) nach erfolgter Sectio steril gewonnen. Nach Abtrennen der Nabelschnur und Abklemmen des Nabelstumpfs mit einer Kornzange wurde die Plazenta unter sterilen Bedingungen mit Ringerlösung gewaschen und mit der Nabelschnur und den fetalen Membranen in eine sterile Organbox verpackt. Anschließend wurde die Plazenta mit 500ml PBS-Lösung, welcher 5ml einer Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt war, gewaschen und direkt zur Präparation ins Labor transportiert.

3.1.2. Präparation der humanen Amnionmembran

Die Präparation der HAM erfolgte unter einer "Laminar flow Hood" (*HS 12[®], Heraeus Herasafe*). Die Arbeitsfläche wurde mit einem saugfähigen Material (*Molinea[®], Hartmann, Heidenheim, Deutschland*) ausgelegt und anschließend steril abgedeckt (*Foliodrape[®], Hartmann, Heidenheim, Deutschland*). Nach einem initialen Einschnitt

wurde die HAM stumpf vom Chorion gelöst. Mit einem sterilen Einmalskalpell wurden aus der Amnionmembran einzelne Membranstücke einer Größe von 5x5 cm zurechtgeschnitten. Diese wurden mit der epithelialen Seite nach oben über Nähte jeweils an den Ecken auf einem Nitrocellulose-Tuch (*Raucocel*[®], *Lohmann-Rauscher, Rengsdorf, Deutschland*) fixiert.

3.1.3. Herstellung des Konservierungsmediums

Zunächst wurden 250 ml DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*[®], *J-R Scientific, Woodland, USA*), 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung und 5ml Amphotericin B gemischt und steril filtriert. Jeweils 20 ml dieser Mixtur wurden in ein Falcon-Tube gefüllt. Anschließend wurde das Falcon-Tube mit steril filtriertem Glycerin (*Rotipuran*[®] 86%, *p.a., Roth, Karlsruhe, Deutschland*) auf 40ml aufpipettiert. Daraus konnte Konservierungslösung für dreizehn Tubes zu jeweils 40ml gewonnen werden.

3.2. Kryokonservierung der Amnionmembran

Die Membran-Patches wurden mit einer sterilen Pinzette in die Tubes gegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass das Amnionepithel in Richtung des Mediums ausgerichtet wurde, um eine Berührung der Wand des Tubes zu verhindern. Die Röhrchen wurden bei -80°C für circa ein bis drei Monate bis zum Versuchsbeginn gelagert. 30 Minuten vor der Operation wurden die tiefgefrorenen Membranen in den Tieroperationssaal gebracht und in einem 28° warmen Wasserbad langsam aufgetaut.

3.3. Das Tiermodell

Vier männliche, kastrierte, sechs Monate alte Berliner Minischweine (*Fa. Schlesier, Großberkmannsdorf, Deutschland*) wurden für die Durchführung der Versuche herangezogen. Das Ausgangsgewicht der Tiere lag zwischen 24 und 31 kg (durchschnittlich 27,6 kg). Die Schweine wurden gemäß den internationalen

Richtlinien für Labortiere gehalten und waren in der Versuchstierhaltung des „Berufsgenossenschaftlichen Forschungsinstitutes für Arbeitsmedizin“ (BGFA) der Ruhr-Universität Bochum untergebracht. Die Fütterung der Tiere (*Sniff®-Tierfutter, Fa. Plunge, Soest, Deutschland*) erfolgte zweimal täglich durch das zuständige Fachpersonal, Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Täglich wurden die Ställe gereinigt und das Stroh erneuert. Vor Versuchsbeginn wurde den Schweinen eine einwöchige Eingewöhnungszeit in ihrer neuen Umgebung gewährt. In den Stallungen wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus mit 12 Stunden Beleuchtung und 12 Stunden Dunkelheit eingehalten, die Luftfeuchtigkeit betrug 65% bei Raumtemperatur. Das Protokoll des Tierexperiments wurde durch das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen/Deutschland überprüft und die Erlaubnis zur Versuchsdurchführung von der zuständigen Behörde erteilt (Aktenzeichen Nr. 9.93.2.10.32.07.152). Das im Folgenden beschriebene Versuchsprotokoll entspricht in vollem Maße den internationalen Richtlinien für Versuchstiere.

3.4. Operationsdurchführung

3.4.1. Erstellung der Hautdefekte

Die Operationen zur Erstellung der Hautdefekte wurden von erfahrenen Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgen im Januar 2008 durchgeführt. An vier aufeinander folgenden Tagen erfolgte die Operation von jeweils einem Tier in Intubationsnarkose. Zur Prämedikation wurden den Tieren 10 mg Ketamin-ratiopharm® (*Ratiopharm, Ulm, Deutschland*), 0,05mg Atropin (*Braun, Melsungen, Deutschland*) und 1mg Midazolam® (*DeltaSelect, München, Deutschland*) intramuskulär verabreicht. Vor jeder Operation wurden die Tiere gewogen und die Körpertemperatur gemessen. Nachdem die Schweine rasiert und abgewaschen sowie steril abgedeckt (*Foliodrape®, Hartmann, Heidenheim, Deutschland*) worden waren, wurden die 5x5 cm großen Defekte in gleichmäßiger Verteilung auf dem Rücken der Tiere eingezeichnet und nummeriert. Um die physiologische Körpertemperatur der Schweine (37,0°C bis 37,5°C) aufrecht zu erhalten, wurden sie auf einem gewärmten OP-Tisch platziert. Über einen peripheren venösen Zugang in einer Ohrvene wurde dem Tier 4cc/kg NaCl pro Stunde zugeführt. Die Anästhesie wurde zunächst mit

einem Isofluran 1,5-3Vol%/Sauerstoff-Gemisch (*Forene*[®] 250ml, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) aufrecht erhalten. Nach Rückenlagerung des Tieres auf dem OP-Tisch erfolgten Intubation und künstliche Beatmung durch einen erfahrenen Anästhesisten. Als Schmerzmedikation erhielten die Tiere 2ml Fentanyl[®] (*Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland*) intravenös, eine antibiotische Prophylaxe wurde nicht verabreicht. In Bauchlage wurde zur späteren Beurteilung der Wundkontraktion eine zusätzliche Umrandung des Defekts in 1 cm Abstand tätowiert. Es wurden Vollhaut- und Spalthautdefekte gesetzt. Bei den Vollhautdefekten wurde mit einem Skalpell die gesamte Haut inklusive des subkutanen Fettgewebes bis auf die Muskelfaszie, d.h. eine Schichtdicke von 1,5 bis 2 cm, präpariert. Anschließend wurden Spalthautdefekte einer Schichtdicke von 0,2 mm Tiefe mittels eines herkömmlichen Dermatoms (*Nouvag GmbH, Konstanz*) gesetzt. Weitere Spalthauttransplantate zur späteren Wunddeckung wurden von der Paraspinalregion der Tiere gewonnen. Bei drei Tieren wurden insgesamt 14 Wunden gesetzt, wobei jeweils 7 Defekte auf jeder der beiden Körperhälften präpariert wurden. Bei dem vierten Schwein wurden aufgrund der geringeren Körpergröße nur zehn Wunden angelegt. Insgesamt wurden 40 Vollhautwunden gesetzt. Abbildung 3.1 zeigt die klinische Situation bei Schwein B, nachdem die Defekte gesetzt worden waren.

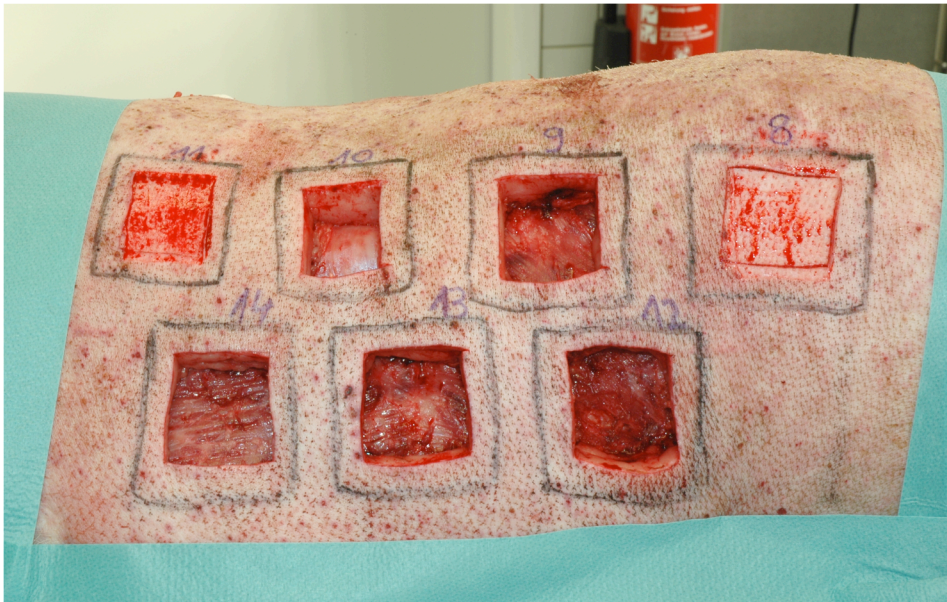


Abb. 3.1: Klinische Situation bei Schwein B nach Defektsetzung. Die hier sichtbaren Spalthautdefekte wurden im Rahmen einer anderen Arbeit evaluiert.

Zur postoperativen Analgesie wurde den Tieren ein Fentanyl®-Pflaster (*Hexal, Holzkirchen, Deutschland*) mit einem Release von 12 Mikrogramm/Stunde auf das rechte Ohr geklebt.

3.4.2. Versorgung der Hautwunden

Bei allen Schweinen wurden von jeder Wundart jeweils zwei gleichartige Wunden gesetzt. Die Verteilung der Wundarten auf dem Rücken des Tieres sowie die Zuordnung der Deckungsmaterialien zu den Wunden erfolgten randomisiert.

Jeweils zwei Vollhautdefekte pro Tier wurden mit dem biologischen Hautersatzmaterial Integra® Artificial Skin, ein zweischichtiges Membransystem, gedeckt. Die dermale Ersatzschicht des Integra® besteht aus einem porösen Fasergerüst aus kreuzvernetztem Rindersehnenkollagen und einem Glykosaminoglykan (Chondroitin-6-Sulfat), dessen in der Herstellung kontrollierte Porengröße eine verlangsamte, definierte Abbaurate erlaubt. Die epidermale Ersatzschicht besteht aus einer dünnen Polysiloxanschicht (Silikon) zur Regulation des Feuchtigkeitsverlustes der Wunde. Integra® wurde entsprechend der Herstelleranweisung auf die Wunde aufgebracht und mit Spalthaut gedeckt (siehe Abbildung 3.2).

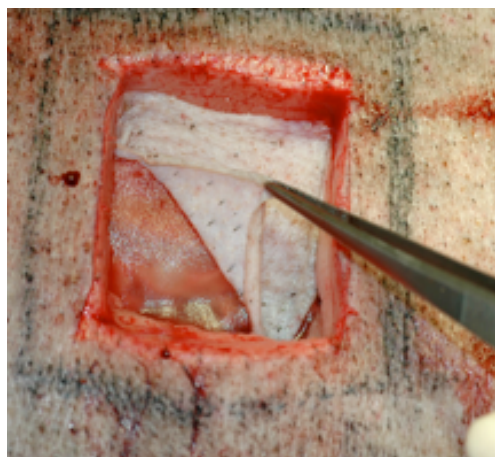


Abb. 3.2: Klinische Situation einer VH/Int-Wunde nach deren Deckung mit einem Spalthauttransplantat.

Zwei weitere Vollhautwunden je Schwein wurden mit einschichtiger kryokonservierter HAM versorgt. Die HAM wurde eine halbe Stunde vor der Operation aufgetaut, steril

mit NaCl gespült und ständig feucht gehalten. Nach Auflegen der HAM auf die Wunde wurde diese mittels 5-0 Naht (Ethilon®, Ethicon, Norderstedt) an den Wundrändern fixiert. Da in Vorversuchen die Stabilität der HAM durch Verwendung von mehreren Lagen verbessert worden war, wurden jeweils zwei Vollhautdefekte pro Tier mit mehrlagiger kryokonservierter HAM gedeckt. Dazu wurden fünf Schichten der HAM zu einem Multilayer-Patch ex vivo übereinander gelegt und mittels 5-0 Naht (Ethilon®, Ethicon, Norderstedt) auf der Wunde an den Rändern fixiert. Abbildung 3.3 zeigt die klinische Vorgehensweise bei Transplantation des Amnionpatches sowie die klinische Situation nach Fixierung des Transplantates an der Vollhautwunde. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu den mit Integra® gedeckten Wunden zu erreichen, wurde auf den mit HAM in MO- und MU-Technik versorgten Vollhautwunden ebenfalls ein Spalthauttransplantat fixiert (siehe Abbildung 3.4).

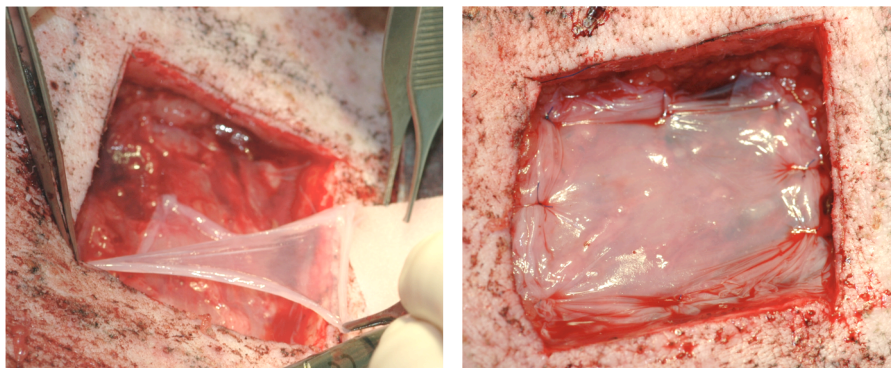


Abb. 3.3: Klinische Situation bei der Transplantation des Amnionpatches (links einlagig, rechts mehrlagig).

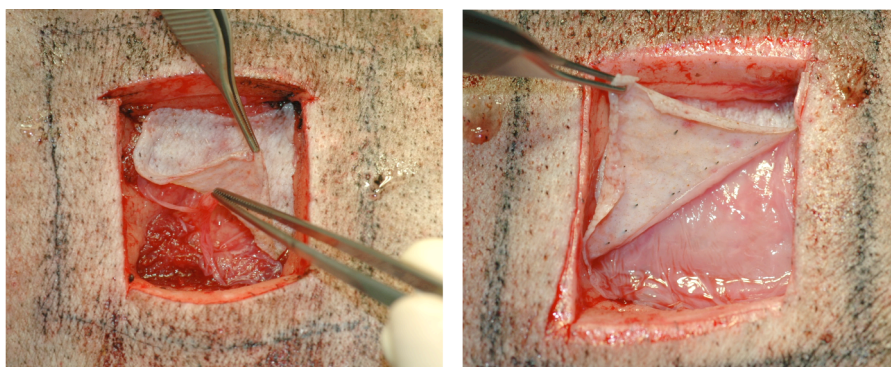


Abb. 3.4: Klinische Situation bei der Deckung der VH/MO- und der VH/MU-Wunde mittels verschiedener Composite-Grafts (von links nach rechts).

Jeweils zwei Vollhautwunden wurden mit der entnommenen Spalthaut allein versorgt. Die Spalthaut wurde auf die Vollhautdefekte aufgebracht und mittels 5-0 Naht (*Vicryl*[®], *Ethicon*, *Norderstedt*) an den Rändern fixiert und dann mittels fest gepackter Jodkompressen ein Druckverband angelegt. Die Schweine erhielten zusätzlich zwei Vollhautwunden (sog. no treatment Defekte), die keine spezielle Wundaufgabe erhielten und als Kontrolle dienten. In die VH/NT-Defekte wurden lediglich sterile Jodkompressen locker eingelegt.

Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die Verteilung der Wunden und der Deckungsmaterialien auf die einzelnen Versuchstiere.

Wunde	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D
1	SE	VH/MO	VH/MO	VH/MO
2	VH/MO	SE	SE	VH/Int
3	VH/MU	VH/MU	SE	VH/MU
4	VH/SH	VH/SH	VH/SH	VH/SH
5	VH/NT	VH/NT	VH/NT	VH/NT
6	SE	VH/Int	VH/Int	VH/MU
7	VH/Int	SE	VH/MU	VH/MO
8	VH/Int	SE	SE	VH/Int
9	VH/SH	VH/Int	VH/SH	VH/SH
10	SE	VH/MO	VH/NT	VH/NT
11	VH/MO	SE	SE	-
12	SE	VH/NT	VH/Int	-
13	VH/NT	VH/SH	VH/MO	-
14	VH/MU	VH/MU	VH/MU	-

Tab. 3.1: Verteilung der Wundarten und Deckungsmaterialien auf die einzelnen Tiere (SE=Spalthautentnahme, VH = Vollhautwunde, SH = Spalthaut, NT = no treatment, Int = Integra, MO = monolayer HAM, MU = multilayer HAM)

3.5. Wundkontrolle und Probengewinnung

Die Wunden wurden regelmäßig kontrolliert und Verbandswechsel mit Paraffingazen (*Jelonet[®], Smith & Nephew, Hull, UK*), welche mit elastischen Tapes und Binden befestigt wurden, je nach Bedarf alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Der Wundverlauf wurde mit einer Digitalkamera (*DMC-FZ4[®], Panasonic, Matsushita Electric Industrial Co., Osaka, Japan*) dokumentiert. Die Probenentnahmen erfolgten am 5., 7., 10., 20., 40. und 60. postoperativen Tag. Die Entnahme der 5 mm tiefen Stanzen (Durchmesser 6 mm) erfolgte mittels einer standardisierten Stanze (*Pfm Pr.F.D. Medizin AG, Carlsbad, USA*) in Sedierung des Tieres. Die Stanzen wurden mittig aus jeweils einem Quadranten der Wunde ausgestanzt. Alle Stanzproben wurden direkt nach Entnahme in einer 4%-igen Formalinlösung eingelegt. Die Gewebeproben wurden histologisch hinsichtlich der Kriterien der Reepithelisierung, der Gewebearchitektur und der Zusammensetzung des Narbengewebes beurteilt. Immunhistologisch wurden die Angiogenese, die Zellproliferation sowie ebenfalls die Narbenbildung untersucht (siehe 6.9.).

3.6. Finalisierung

Alle Tiere wurden am Finaltag des Versuches nach Entnahme der letzten Stanzprobe am 60. Tag nach der Erstoperation euthanasiert. Zunächst wurden sie hierfür in Allgemeinnarkose gelegt und anschließend mit T 61[®] (*Intervet GmbH Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland*) eingeschläfert.

3.7. Histologische Probenaufarbeitung

Die Stanzproben wurden im pathologischen Institut der Technischen Universität München in Paraffin waagrecht eingebettet und 4 µm dick geschnitten. Die HE-Färbung zur Darstellung der Zellinfiltration und Gewebsarchitektur sowie die EvG-Färbung zur Darstellung der elastischen Fasern erfolgten ebenfalls im

pathologischen Institut mittels eines Färbeautomaten (*Micro HMS 740 Robot-Stainer*[®], Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Gewebeschnitte wurden anschließend im Labor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie unter einem Lichtmikroskop (AxioCam HRC[®], Zeiss, Jena, Germany) beurteilt. Zunächst wurden anhand der HE-Färbungen die wundarchitektonisch besten Proben jedes Entnahmetages der jeweiligen Wundart ausgewählt, welche dann histologisch beurteilt und immunhistochemisch gefärbt werden sollten. Die entscheidenden Auswahlkriterien waren hierbei die Gewebearchitektur der Stanze und die Vollständigkeit hinsichtlich der einzelnen Hautschichten. Weitere Stenzen, die nicht zu der für die Auswertungen bestimmten Gruppe zählten, jedoch hinsichtlich der oben genannten Kriterien vergleichbar waren, wurden für die Austestung der Antikörper ausgesucht.

3.8. Immunhistologie

Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper und das jeweils zu detektierende Gewebe.

Primärantikörper	Zu detektierende Strukturen	Hersteller
monoclonal mouse to alpha smooth muscle actin	Myofibroblasten	Firma Abcam, Cambridge, UK
polyclonal rabbit anti-human von Willebrand factor	Endothelzellen	Firma Dako, Glostrup, Dänemark
monoclonal mouse anti-human Ki-67 antigen	proliferierende Zellen	Firma Dako, Glostrup, Dänemark
polyclonal rabbit anti-Laminin	Basalmembran	Firma Dako, Glostrup, Dänemark

Tab. 3.2: Übersicht über die verwendeten Antikörper, die zu detektierenden Strukturen und die Hersteller.

Zur Durchführung der Immunhistologie wurden 3 µm dicke Paraffinschnitte der Stenzen angefertigt, welche anschließend auf *Superfrost Plus*[®] Gläser (*Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland*) aufgebracht wurden. Anhand der Zweitproben erfolgte zunächst die Austestung verschiedener Protokolle mit Modifikationen für den jeweiligen Antikörper bis schließlich das für die Proben optimale Vorgehen gefunden wurde. Für die Negativkontrolle wurde der primäre Antikörper durch PBS-Lösung ersetzt.

Die Protokolle der immunhistochemischen Färbungen finden sich im Anhang (siehe 9.1).

3.9. Vorgehen bei der Auswertung

Die Proben wurden makroskopisch und mikroskopisch analysiert.

Für die makroskopische/klinische Analyse waren die Transplantatannahme und der chronologische Ablauf der Wundheilungsprozesse von Interesse. Klinische Anzeichen, die gegen eine einwandfreie Annahme des Transplantates sprachen, waren das Vorhandensein von nicht von dem Transplantat bedeckten Wundrändern oder Anzeichen von (Teil-) Nekrose des Transplantates. Die Beurteilung der Wundheilung und der Transplantatabstoßung erfolgte am 2., 5., 7., 10. 20., 40. Tag bis zum Endpunkt der Untersuchung am 60. Tag. Der postoperative Status wurde anhand der für die Wundheilung relevanten Kriterien Blutung, Infektion und Entzündung mittels eines subjektiven Scores durch zwei unabhängige Beobachter beurteilt. Dabei wurden jeweils vier Ausprägungsgrade unterschieden (nicht vorhanden [-], leicht vorhanden [+], mäßig vorhanden [++], stark vorhanden [+++]). Zur einfacheren Bewertung und besseren Vergleichbarkeit wurde für die einzelnen Phasen der Wundheilung die Summe aller in diesem Zeitraum vergebenen Punkte errechnet, wobei das klinische Ergebnis umso besser ist, je niedriger die errechnete Punktzahl ist. Die Bewertung des chronologischen Wundheilungsprozesses erfolgte anhand des Zeitpunktes der makroskopischen Reepithelisierung, des Verschlusses der Wundoberfläche und des Erreichens des ehemaligen Hautoberflächenniveaus durch die Wunde.

Darüber hinaus wurde das ästhetische Ergebnis beurteilt. Dazu analysierten wir zunächst das Narbenkolorit am 60. Tag, wobei es in vier Farbkategorien (hautfarben,

rosa, weißlich, dunkelrot-lila) eingeteilt wurde. Hierbei sind hautfarbene Narben im Hautniveau als regelrechte Einheilung, rosafarben als eine verlängerte Wundheilung, weißlich und rötlich-lila verfärbt eine irreguläre Wundheilung, einmal mit verstärkter Verhornung, einmal mit Hautatrophie und verminderter Durchblutung einzuordnen. Außerdem erfolgte eine objektive Bewertung der Wundkontraktion. Dazu wurden ebenfalls am 60. postoperativen Tag sämtliche Wunden fotografiert, wobei eine Schablone, die der ursprünglichen tätowierten Fläche auf der Haut entspricht, auf die Wunden aufgelegt wurde. Die Wundkontraktion wurde mit Hilfe der *ArchiCad*[®] Software (*Graphisoft, Budapest, Ungarn*) vermessen, indem zum einen die kontrahierte Fläche und zum anderen die Fläche der Schablone bestimmt wurden. Anschließend wurden der Quotient aus der kontrahierten Wundfläche und dem ursprünglichen Defektgebiet errechnet und die prozentuale Kontraktion der einzelnen Behandlungsgruppen verglichen. Da die Tiere im Verlauf des Experiments durchschnittlich circa 30% an Gewicht zulegten (Ausgangsgewicht im Durchschnitt 27kg, Endgewicht durchschnittlich 35kg), wurde die prozentuale Kontraktion mit dem Faktor 1,3 multipliziert, um eine Korrektur der Gewichtszunahme mit einhergehender Oberflächenvergrößerung in Bezug zur Kontraktion zu erreichen. Abbildung 3.5 zeigt die zur Vermessung der Kontraktion verwendete Schablone.

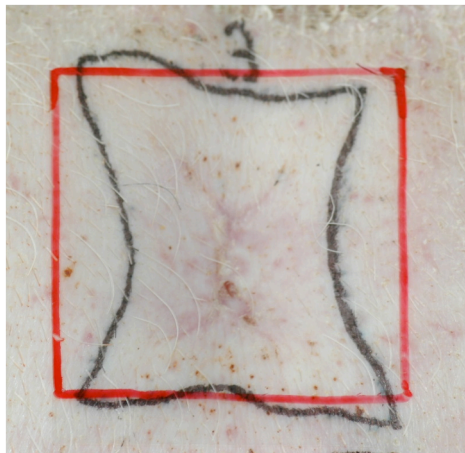


Abb. 3.5: Die kontrahierte Wundfläche (schwarze Tätowierung) am 60. postoperativen Tag im Vergleich zur ursprünglichen Hautfläche (rote Schablone) vor der Defektsetzung.

Die Kriterien der histologischen Beurteilung der HE- und EvG-Färbungen waren Zellinfiltration, Zeitpunkt der vollständigen Reepithelisierung, Zusammensetzung der

extrazellulären Matrix, Gewebearchitektur der Stanze, Zusammensetzung des Narbengewebes mit Beurteilung der Kollagenfibrillen und Anzahl der Haarfollikel. Für die statistische Auswertung der Epitheldicke wurden von jeder Probe drei zusätzliche Schnittebenen angefertigt, wobei der Abstand zwischen den Ebenen 15 µm betrug. Für die Auswertung wurde einerseits der postoperative Tag ausgewählt, an dem die vollständige Reepithelisierung zu erkennen war, andererseits der letzte Beobachtungstag zur Beurteilung einer eventuell vorhandenen narbenbedingten Epithelatrophie. Somit wurden der 20. und der 60. postoperative Tag beurteilt. Die Epithelmessungen erfolgten im pathologischen Institut der Technischen Universität München mittels des *Leica Q Win*[®] Programms (*Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*). In jeder Schnittebene wurden jeweils sechs Messpunkte von der Epitheloberfläche bis zum tiefsten Punkt der Reteleiste und sechs Messpunkte von der Epitheloberfläche und der Basalmembran in Bereichen zwischen den Reteleisten gesetzt (siehe Abbildung 3.6). Somit wurden je Probe insgesamt 48 Punkte vermessen. Zwischen den Messpunkten wurde ein Abstand von 0,05 – 0,1 mm eingehalten.

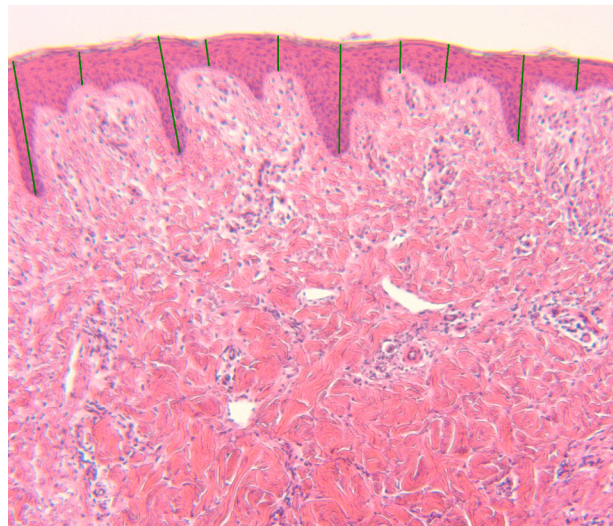


Abb. 3.6: Methodik bei der Epitheldickenmessung. VH/Int-Wunde am 60. postoperativen Tag (HE-Färbung, 50 fache Vergrößerung).

Mittels des Ki67-Antikörpers wurde ein Proliferationsindex erstellt. Dazu wurde in jeder Stanzenhälfte eines jeden Biopsats die Anzahl der proliferierenden Zellen an der Gesamtzahl der Basalzellen pro HPF ermittelt. Pro Stanze wurde der Index in fünf HPFs bestimmt, woraus man zehn Werte pro Biopsat erhielt. Es wurden die

Proliferationsindizes am 10. und 60. postoperativen Tag bestimmt. Der frühere Tag steht repräsentativ für die proliferative Phase der Wundheilung, der spätere Zeitpunkt gibt die Proliferation im Narbenstadium an.

Die Laminin Färbung erfolgte zur Beurteilung der Integrität der Basalmembran. Hierzu wurde über die gesamte Stanzenfläche die Basalmembran unter dem Mikroskop auf ihre Vollständigkeit hin untersucht. Die Bewertung erfolgte mittels drei Kategorien (vollständig ausgebildet, partiell ausgebildet, nicht vorhanden) an den postoperativen Tagen 7, 10, 20 und 40.

Anhand der von Willebrand Färbungen erfolgte eine Auszählung der subepidermalen Gefäße zur Beurteilung der Proliferationsphase. Die Gefäßzählung wurde an den Schnitten des siebten und zehnten postoperativen Tages der Vollhautwunden durchgeführt, da diese jeweils den Zeitraum der proliferativen Phase der Wundheilung, in dem die Gefäßproliferation hauptsächlich stattfindet, umfassen. Dazu wurden unter dem *Leitz Aristoplan Mikroskop*[®] (*Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*) in zehn verschiedenen HPFs pro Stanzenhälfte pro Biopsat die Gefäße gezählt, wodurch man 20 Werte je Biopsat erhielt.

Die Färbung mittels α SMA diente zur Beurteilung der Narbenbildung. α SMA ist eine Isoform des Actins, welche in dem Zytoskelett von Myofibroblasten enthalten und an der Zellmotilität beteiligt ist. Myofibroblasten finden sich sowohl in gesundem Gewebe, dort vor allem in Bereichen wo mechanische Stabilität und Kontraktilität notwendig sind, als auch in pathologisch verändertem Gewebe, wobei eine Assoziation zu hypertrophen Narben, Fibromatosen und fibroproliferativen Erkrankungen wie beispielsweise der Dupuytren-Kontraktur besteht (Desmouliere, A., et al., 2005, S. 7; Kopp, J., et al., 2006, S. 157). Zur Quantifizierung wurden die α SMA-positiven Fibroblasten in jeweils 5 HPFs pro Biopsat gezählt. Da nur das interstitielle α SMA die Vernarbung entscheidend beeinflusst, wurde das in der glatten Muskulatur der Blutgefäße sowie das im Musculus erector pili der Haarfollikel enthaltene α SMA nicht in die Auswertung mit einbezogen. Abbildung 3.7 zeigt beispielhaft den Unterschied zwischen dem interstitiellen α SMA und dem α SMA der glatten Gefäßmuskulatur, welches nicht in die Auswertung mit einbezogen wurde. Zur Beurteilung wurden der 10., der 20., der 40. und der 60. postoperative Tag ausgewertet.

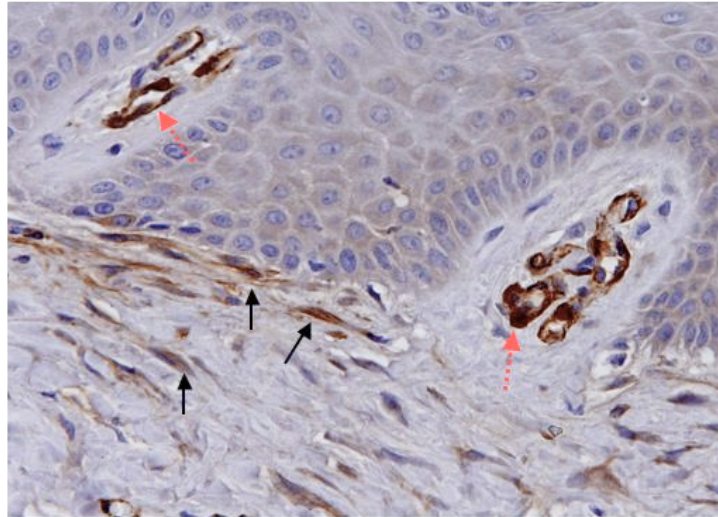


Abb. 3.7: VH/Int-Wunde in der α SMA-Färbung (300fach). Die schwarzen Pfeile deuten beispielhaft auf das interstitielle, die Vernarbung beeinflussende α SMA. Die roten, gestrichelten Pfeile zeigen auf α SMA in der glatten Gefäßmuskulatur, welches nicht in die Auswertung mit einbezogen wurde.

Für sämtliche statistische Auswertungen wurde der t-Test für abhängige Stichproben angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die graphische Darstellung der statistischen Ergebnisse erfolgte im Box-Whisker-Plot, in welchem das Minimum, das Maximum, das untere und das obere Quartil sowie der Median angegeben wurden.

4. Ergebnisse

Alle Tiere überlebten die Versuche und zeigten im Verlauf des Versuchszeitraums keine Anzeichen einer Krankheit oder einer Einschränkung des Wohlbefindens.

4.1. Klinische Ergebnisse

Die Kriterien der klinischen Beurteilung waren:

- Die Transplantatannahme
- Der postoperative Verlauf im Hinblick auf das Auftreten von Blutungen, Infektions- und Entzündungszeichen sowie der zeitliche Verlauf der Wundheilungsprozesse (Zeitpunkt des Wundverschlusses und des Erreichens des ursprünglichen Hautniveaus)
- Das ästhetische Ergebnis, wobei die Wundfarbe und die Wundkontraktion beurteilt wurden.

Diese Bewertungskriterien wurden an den postoperativen Tagen 2, 5, 7, 10, 20, 40 und 60 erhoben.

4.1.1. Klinische Beurteilung

Zunächst wurde die Transplantatannahme bei den einzelnen Behandlungsgruppen analysiert (Tabelle 4.1).

Behandlungsgruppe	Transplantatannahme
VH/MO	81,8 %
VH/MU	87,5 %
VH/SH	83,3 %
VH/Int	75,0 %

Tab. 4.1: Prozentuale Transplantatannahme bei den einzelnen Behandlungsgruppen.

Außerdem wurde der postoperative Verlauf in der Intensität der Entzündungsreaktion, postoperativer Blutungen und Infektionszeichen beurteilt und pro Behandlungsgruppe im Mittel dargestellt (Tabelle 4.2). Anhand der oben genannten Intensitäten der entsprechenden Merkmale wurde ein Score in den jeweiligen Phasen der Wundheilung errechnet, der ein gutes klinisches Ergebnis durch einen niedrigen und ein schlechtes Ergebnis durch einen hohen Zahlenwert widerspiegelt (Tabelle 4.3).

Aus dem Vergleich des postoperativen Wundverlaufs der verschiedenen Vollhautwunden gehen folgende Ergebnisse hervor: Postoperative Einblutungen traten am häufigsten innerhalb der ersten sieben Tage auf, wobei die VH/Int-Wunden am stärksten und die VH/SH-Wunden am wenigsten betroffen waren. Die Blutungstendenz nimmt in der proliferativen Phase ab, in der reparativen Phase wurden schließlich keinerlei Blutungen mehr beobachtet. Hinsichtlich postoperativer Inflammationsreaktionen zeigten sich in der exsudativen Phase bis Tag 5 nur geringfügige Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, alle Wunden waren mäßig entzündet. In der proliferativen Phase hingegen wurden bei den VH/Int- und den VH/NT-Wunden deutlich höhere Scores beobachtet als in der HAM- und der SH-Behandlungsgruppe. In der späten Phase der Wundheilung ist die Int-Wunde die einzige, welche zu diesem Zeitpunkt noch Entzündungszeichen aufweist. Somit erweist sich in unserer Studie die Verwendung von Integra® bezüglich postoperativer Inflammationsreaktionen als nachteilig gegenüber HAM und Spalthaut als Wundauflage. Wundinfektionen traten ausschließlich in der proliferativen Phase von Tag 7 bis Tag 20 auf. Die stärksten Infektionszeichen waren bei den Int-Defekten zu sehen, auch die NT- und MO-Wunden zeigten Anzeichen postoperativer Wundinfektionen. Lediglich die mit Spalthaut und multilayer HAM versorgten Wunden blieben nahezu infektionsfrei. Keine der lokalen Infektionen führte allerdings zu einer Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes der Tiere im Sinne einer infektiös bedingten systemischen Entzündungsreaktion (Sepsis) und musste mittels eines Antibiotikums behandelt werden. Auch musste kein Tier wegen Leidensanzeichen aus dem Versuch genommen werden.

		Blutung	Entzündung	Infektion
VH/MO	2d	-	+	-
	5d	+	++	-
	7d	-	++	+
	10d	-	++	++
	20d	-	-	-
	40d	-	-	-
	60d	-	-	-
VH/MU	2d	+	+	-
	5d	+	+	-
	7d	-	+	-
	10d	++	++	-
	20d	-	-	-
	40d	-	-	-
	60d	-	-	-
VH/Int	2d	+	+	-
	5d	++	++	-
	7d	+	+++	-
	10d	-	+++	++
	20d	-	+++	+++
	40d	-	+	-
	60d	-	-	-
VH/SH	2d	-	+	-
	5d	-	+	-
	7d	-	++	-
	10d	-	++	-
	20d	-	+	-
	40d	-	-	-
	60d	-	-	-
VH/NT	2d	+	+	-
	5d	+	++	-
	7d	+	++	+
	10d	+	+++	++
	20d	-	++	+
	40d	-	-	-
	60d	-	-	-

Tab. 4.2: Die verschiedenen Behandlungsgruppen im zeitlichen Verlauf hinsichtlich der Eigenschaften Blutung, Entzündung und Infektion (- = nicht vorhanden; + = leicht vorhanden; ++ = mäßig vorhanden; +++ = stark vorhanden).

	Blutung	Entzündung	Infektion	Gesamtzahl
Frühe, exsudative Phase (- Tag 5)				
VH/MU	2	2	0	4
VH/MO	1	3	0	4
VH/Int	3	3	0	6
VH/SH	0	2	0	2
VH/NT	2	3	0	5
Mittlere, proliferative Phase (Tag 7 – 20)				
VH/MU	2	3	0	5
VH/MO	0	4	3	7
VH/Int	1	9	5	15
VH/SH	0	5	0	5
VH/NT	2	7	4	13
Späte, reparative Phase (Tag 40 – 60)				
VH/MU	0	0	0	0
VH/MO	0	0	0	0
VH/Int	0	1	0	1
VH/SH	0	0	0	0
VH/NT	0	0	0	0

Tab. 4.3: Klinischer Score für die einzelnen postoperativen Komplikationen unterteilt in die einzelnen Phasen der Wundheilung.

Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Wundheilung zeigte sich, dass bei der VH/MO- und der VH/MU- sowie der VH/SH-Wunde die Wundtiefe bereits am 10. Tag deutlich reduziert war. Auch bei der VH/NT-Wunde war die Wundtiefe am 10. Tag verringert, jedoch in geringerem Ausmaß als bei den mit HAM versorgten Wunden. Die VH/Int-Wunde zeigte am 10. Tag nahezu keine Reduktion der Wundtiefe. Am 20. Tag war bei der VH/MO-, der VH/MU-, der VH/NT- und der VH/SH-Wunde durch Granulation und Wundkontraktion das obere Hautniveau wieder erreicht und die Wunde geschlossen. Die VH/MO-Wunde zeigte zu diesem Zeitpunkt eine reizlose Narbe, wohingegen die Wundfläche bei dem VH/MU- und dem VH/SH- und dem VH/NT-Defekt noch mit Fibrinbelägen und Schorf belegt war. Bei der VH/Int-Wunde wurde am 20. Tag eine infizierte, nässende Wundfläche registriert, der Wundverschluss, definiert durch eine trockene Wundfläche auf äußerem Hautniveau, wurde hier erst am 40. Tag erreicht.

Abbildung 4.1 zeigt den klinischen Verlauf einer exemplarischen Wunde pro Behandlungsgruppe im Überblick.

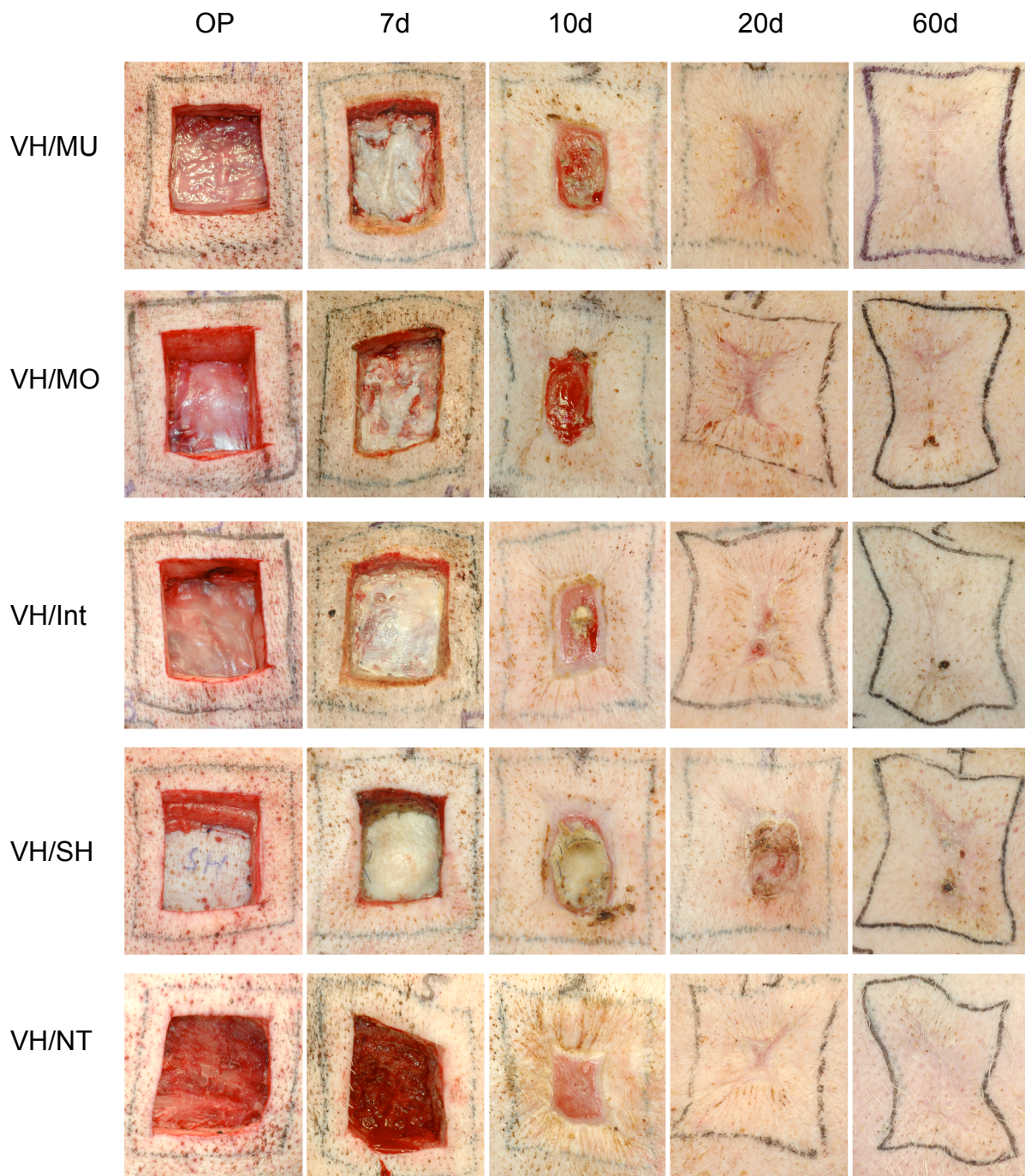


Abb. 4.1: Klinischer Verlauf der einzelnen Behandlungsgruppen im Vergleich.

Anhand der Analyse des Narbenkolorits am 60. postoperativen Tag zeigt sich, dass die VH/MU-Defekte die besten ästhetischen Ergebnisse liefern (1 Defekt hautfarben, 5 Defekte rosa, 2 Defekte dunkelrot-violett). An zweiter Stelle stehen die VH/Int-Wunden (7 Defekte rosa, 1 Defekt dunkelrot-violett), welche gefolgt werden von den VH/MO-Wunden (4 Defekte rosa, 4 Defekte dunkelrot-violett) und den VH/SH-Defekten (2 Defekte rosa, 4 Defekte dunkelrot-violett), die ähnliche Ergebnisse

zeigten. Die ästhetisch am minderwertigsten Narben liefern die VH/NT-Wunden (3 Defekte rosa, 3 Defekte dunkelrot-violett).

4.1.2. Analyse der Wundkontraktion

Die geringste mittlere Wundkontraktion zeigt die VH/MU-Wunde mit einer durchschnittlichen Kontraktion von 19,2%, welche signifikant geringer ist als die mittlere Kontraktion aller anderen Behandlungsgruppen mit Ausnahme der VH/SH-Gruppe (20,9%). Die stärkste Kontraktion zeigt die VH/NT-Wunde mit 46,8%, wobei sich deren Mittelwert von allen anderen statistisch signifikant unterscheidet.

Tabelle 4.4 und Abbildung 4.2 zeigen die prozentuale Wundkontraktion am 60. postoperativen Tag. Auf Abbildung 4.3 ist die klinische Situation zu sehen. Die detaillierten Ergebnisse der statistischen Auswertung der Wundkontraktion mittels des t-tests für abhängige Stichproben sind im Anhang dargestellt.

	Mittelwert ^{+/-} SEM [%]
VH/MU	19,2 ^{+/-} 2,4
VH/MO	27,8 ^{+/-} 1,3
VH/Int	31,3 ^{+/-} 1,0
VH/SH	20,9 ^{+/-} 1,8
VH/NT	46,8 ^{+/-} 1,3

Tab. 4.4: Mittelwerte und SEM der prozentualen Wundkontraktion am 60. postoperativen Tag (n=8).

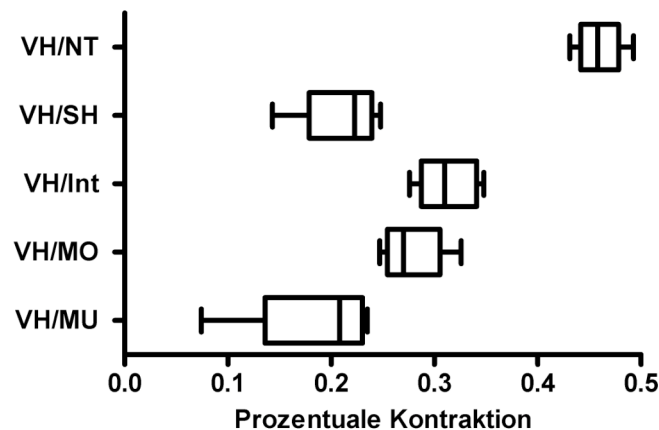


Abb. 4.2: Boxplot-Darstellung der prozentualen Wundkontraktion der Vollhautwunden (n=8).



Abb .4.3: Exemplarische Darstellung der Wundkontraktion anhand eines Beispiels aus den einzelnen Behandlungsgruppen am 60. Tag im Vergleich.

4.2. Histologische Ergebnisse

Die Kriterien der histologischen Beurteilung waren:

- Die Zellinfiltration
- Der Zeitpunkt der Reepithelisierung sowie die Integrität bzw. Degeneration der Epidermis
- Die Dicke der Granulationsgewebeschart
- Die Anordnung der Kollagenfibrillen und die Qualität des Narbengewebes.

Bei der histologischen Beurteilung der Hautstanzen der unterschiedlichen Behandlungsgruppen erfolgte anhand der HE- und EvG-gefärbten Schnitte zunächst eine qualitative Beurteilung der Veränderungen. Hierzu wurde der zeitliche und qualitative Verlauf der Wundheilung entsprechend der in der Einleitung beschriebenen Wundheilungsphasen (exsudative, proliferative und reparative Phase) der Behandlungsgruppen beurteilt und untereinander verglichen. In einem weiteren Schritt erfolgten einzelne quantitative Untersuchungen.

In allen Behandlungsgruppen konnte der phasenhafte Wundheilungsverlauf der exsudativen, proliferativen und reparativen Phasen beobachtet werden, wobei jeweils ein fließender Übergang der Phasen vorlag.

4.2.1. Histologische Beurteilung der Biopsate

Aus jeder Behandlungsgruppe wurde exemplarisch ein Biopsat untersucht.

Zunächst erfolgte die Beurteilung der HE- und EvG-Schnitte am 5. und 7. Tag, in der die Kriterien der exsudativen und proliferativen Phase der Wundheilung mit fließendem Übergang zu beobachten waren.

Am 5. postoperativen Tag ist sowohl in der VH/MO- als auch in der VH/MU-Wunde eine schmale, dichte Schorfschicht an der Oberfläche erkennbar. Anteile der vollständig nekrotischen, einschichtigen und homogen eosinophilen Amnionmembran bedecken die VH/MU-Wunde komplett, die MO-Wunde nur noch in maximal 1/3 der Stanzenoberfläche. In der VH/Int-Wunde zeigen sich Integralamellen mit dazwischen liegendem Fibrin, Granulozyten, Monozyten und Fremdkörperriesenzellen. Das angrenzende Granulationsgewebe nimmt den Großteil der Stanze ein, ist gefäß- und zellreich sowie ungeordnet. Es besteht aus Fibroblasten, segmentkernigen Granulozyten und Makrophagen. In der Integra-Wunde sind außerdem zahlreiche Fremdkörperriesenzellen oberflächlich abgrenzbar. Dazwischen sind überwiegend nekrotische Reste des Fett- und Bindegewebes zu erkennen.

Am 7. Tag ist die MO-Wunde fast vollständig (mindestens zu 2/3) von verbreiterem Plattenepithel bedeckt. Es weist breite Epithelzapfen auf, ist proliferativ und zeigt schon beginnende Differenzierung zur Oberfläche, jedoch ohne erkennbare Verhornung. Die MU-Wunde zeigt keine vollständige Epithelbedeckung, jedoch eine beginnende Reepithelisierung (siehe Abbildung 4.4), oberflächlich sieht man eine schmale Schorfschicht. Abbildung 4.5 zeigt die VH/MO- und die VH/MU-Wunde am 7. postoperativen Tag im Vergleich. Die Integrawunde hat oberflächlich eine breite nekrotische Schicht, begrenzt durch eine granulozytenreiche Demarkationszone. Die Integralamellen sind verbreitert und teilweise resorbiert sowie von Granulationsgewebe durchsetzt, welches viele Fremdkörperriesenzellen enthält (siehe Abbildung 4.6). Die Stanze wird ansonsten von Granulationsgewebe eingenommen, Fett- und Bindegewebe ist fast vollständig resorbiert. Das Granulationsgewebe ist oberflächlich zell- und gefäßreich mit zahlreichen Granulozyten und Makrophagen, in der tieferen Hälfte erscheint das Granulationsgewebe geordnet. Die Fibroblasten sind horizontal angeordnet, die Gefäße überwiegend vertikal. Es tritt homogen eosinophile extrazelluläre Matrix auf.

Vereinzelt sind Fremdkörperriesenzellen sichtbar, die überwiegend um residuelles Fettgewebe und Kollagenfasern herum angeordnet sind.

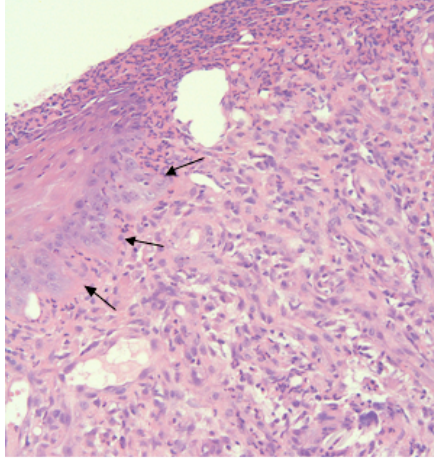


Abb. 4.4: VH/MU-Wunde am 7. postoperativen Tag. Eine beginnende Reepithelisierung der Wunde ist am linken Bildrand zu erkennen (Pfeile). HE-Färbung (50fach).

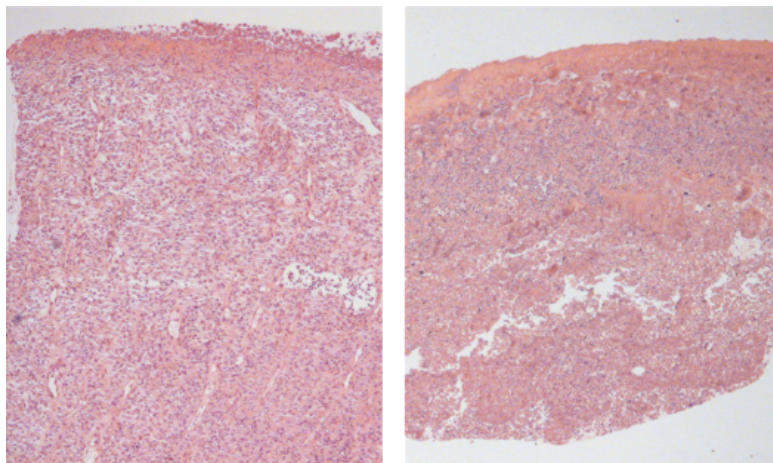


Abb. 4.5: Die VH/MO- (links) und die VH/MU-Wunde (rechts) am 7. postoperativen Tag im Vergleich. HE-Färbung (50fach).

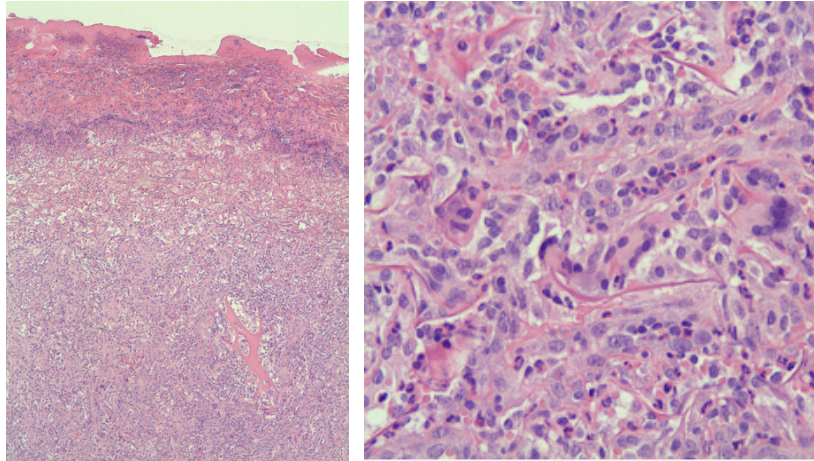


Abb. 4.6: VH/Int-Wunde am 7. postoperativen Tag (HE-Färbung). Übersichtsbild (links, 50fach): Nekrotische oberflächliche Integraschicht. Ausschnitt aus einer tieferen Ebene der Stanze (rechts, 800fach): Fremdkörperriesenzellen umgeben die Integresten.

Neben der VH/MO-Wunde, die bereits am 7. Tag reepithelisiert ist, zeigt sich nun am 10. postoperativen Tag auch die VH/Int-Wunde als vollständig epithelisiert. Das demarkierte nekrotische Gewebe ist abgestoßen und ein verbreitetes, geschichtetes Epithel mit breiter Basal- und Granulosazellschicht sowie zapfenartigen Papillen sind sichtbar. Die VH/MU-Wunde hingegen zeigt Zeichen einer beginnenden Reepithelisierung mit einzelnen Epithelzellen, die zum Teil einschichtig dem Granulationsgewebe aufliegen, zum Teil in mehreren Schichten angeordnet sind, jedoch noch keine Differenzierung aufweisen. Bei allen drei Behandlungsgruppen ist eine beginnende Ausreifung des Granulationsgewebes sichtbar. Das Granulationsgewebe ist oberflächlich locker und gefäßreich mit geringem Anteil an extrazellulärer Matrix. In den unteren 2/3 der Stanze liegen die Zellen in horizontaler Ausrichtung vor, mit Differenzierung zu Myofibroblasten. Die extrazelluläre Matrix ist in der MU-Wunde etwas stärker ausgeprägt als in der MO-Wunde und ist homogen eosinophil. Am unteren Rand der Stanzen finden sich vereinzelt schon Kollagenfibrillen. Fremdkörpergranulome und einzelne Fremdkörperriesenzellen sind in beiden Stanzen in den tieferen Schichten abgrenzbar.

Die Differenzierung des Granulationsgewebes ist in der Integrawunde am weitesten vorangeschritten. Hier ist lediglich das obere Viertel noch zellulär dominiert mit horizontal ausgerichteten Fibro- und Myofibroblasten sowie wenigen perivaskulären Entzündungszellen. Das myofibroblastenreiche Granulationsgewebe, in welchem

sich Fremdkörpergranulome finden, ist horizontal angeordnet. Im Vergleich zum 7. Tag ist eine Zunahme der kollagenen Matrix zu beobachten.

Am 10. postoperativen Tag ist auch der VH/SH-Defekt teilweise reepithelisiert (bis zu 2/3 der Stanzenoberfläche), das Plattenepithel ist überwiegend mehrschichtig mit proliferativ verbreiteter Basalzellschicht und beginnender Differenzierung. Das Granulationsgewebe ist noch sehr zellreich mit beginnender Bildung der extrazellulären Matrix im unteren und mittleren Drittel.

Bei dem VH/NT-Defekt sind am 10. Tag noch keine Zeichen einer beginnenden Epithelisierung sichtbar, die Wundfläche ist von einer Schorfschicht mit granulozytenreicher Demarkation bedeckt. In dem Granulationsgewebe kann nur in der unteren Hälfte der Stanze eine beginnende Ausreifung erkannt werden, die oberen Anteile scheinen gänzlich ungeordnet.

Der Übergang in die Regenerationsphase findet bei den VH/MO-, VH/MU-, VH/SH- und VH/Int-Wunden zwischen dem 10. und dem 20. Tag statt, bei der VH/NT-Wunde tendenziell etwas später, also zwischen dem 20. und dem 40. postoperativen Tag. Am 20. postoperativen Tag sind nun auch die VH/SH- und die VH/MU-Wunde vollständig reepithelisiert, die VH/NT-Wunde hingegen zeigt noch keine Anzeichen einer Epithelisierung. Die Epithelschichten der VH/SH-, der VH/MO- und der VH/MU-Behandlungsgruppe weisen ein breites Stratum spinosum, ein verdicktes Stratum spinosum und eine breite Verhornung auf. Es finden sich lange Papillen, das Stratum reticulare erscheint locker. Das Epithel der VH/Int-Wunde hingegen ist einschließlich des Stratum basale eher flach und die Verhornung ist regelrecht, lediglich das Stratum spinosum erscheint noch leicht verbreitert. Das Granulationsgewebe der VH/Int-Wunde ist jedoch im Vergleich zu dem VH/MO-, VH/MU- und VH/SH-Wunden weniger ausgereift, Faszienbildung ist nicht zu beobachten. Die VH/SH-Wunde zeigt faszienartig angeordnete Kollagenstränge, in den VH/MO- und VH/MU-Wunden sind einzelne vertikal verlaufende Kollagenbündel sichtbar, welche ebenfalls auf eine beginnende Faszienbildung schließen lassen.

Am 40. Tag findet sich bei den VH/SH-, VH/MU- und VH/MO-Wunden ein ausgereiftes Epithel mit einschichtigem Stratum basale und wenig verbreiterem Stratum spinosum. Hinsichtlich des Granulationsgewebes wurden in diesen Proben im Vergleich zum 20. Tag keine wesentlichen Veränderungen festgestellt. Das Epithel des VH/Int-Defektes befindet sich weiterhin in Ausreifung, wohingegen die Granulationsgewebsschicht nun auch Zeichen einer beginnenden Faszienbildung mit

vertikal verlaufenden Kollagenfaserbündeln zeigt und somit nahezu ausgereift erscheint. Die VH/NT-Wunde ist vollständig reepithelisiert, Stratum basale und Stratum spinosum stellen sich jedoch noch verbreitert da, womit das Epithel noch nicht komplett ausgereift ist. Im Granulationsgewebe sind breite Kollagenbündel mit faszienartiger Verschränkung sowie zahlreiche Fremdkörpergranulome zu finden.

Am 60. Tag zeigen sich Unterschiede hinsichtlich der Bindegewebsschicht. Diese ist bei der VH/NT- und der VH/Int-Wunde eher breit mit verwobenen dicken Kollagensträngen und wenigen Fibrozyten. Bei den VH/SH-, VH/MO- und VH/MU-Defekten erscheint diese hingegen eher schmal, außerdem ist in den mit HAM versorgten Wunden noch Granulationsgewebe zu finden. Abbildung 4.7 zeigt die VH/NT- und die VH/MU-Wunde am 60. Tag im Vergleich.

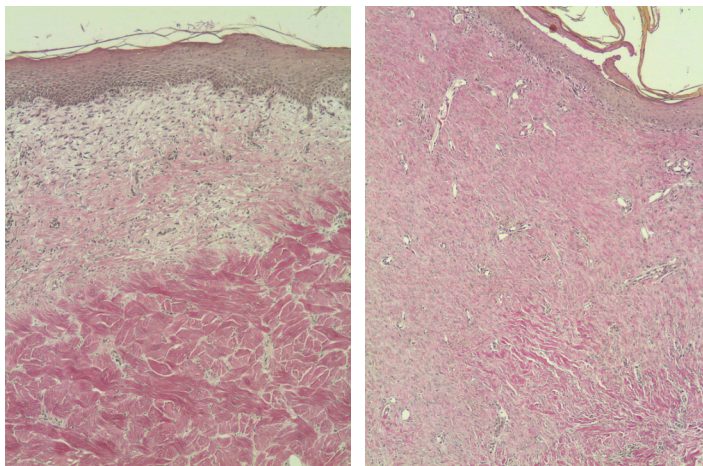


Abb. 4.7: VH/NT-Wunde (links) und VH/MU-Wunde (rechts) am 60. postoperativen Tag im Vergleich. EvG-Färbung (50fach).

Tabelle 4.5 zeigt die zeitlichen Unterschiede im Heilungsverlauf bezüglich der Epithelisierungsprozesse.

	Beginnende Epithelisierung	Vollständige Epithelisierung	Ausgereiftes Epithel
VH/NT	20-40	40	60
VH/SH	10	20	40
VH/Int	7-10	10-20	60
VH/MO	5-7	7	40
VH/MU	7	10	40

Tab. 4.5: Zeitliche Unterschiede im Heilungsverlauf der Vollhautwunden bezüglich der Epithelisierungsprozesse. Es sind die postoperativen Tage aufgeführt, an denen die jeweiligen histologischen Merkmale für die Epithelisierung beobachtet wurden.

Zusammenfassend lassen sich somit folgende Aussagen über den histologischen Verlauf treffen:

Es sind Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Wundheilungsprozesse zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen festzustellen. Die proliferative Phase, welche durch Angiogenese, Bildung von Granulationsgewebe und Wundkontraktion gekennzeichnet ist, tritt zuerst bei der VH/MO-Wunde ein. Diese zeigt eine vollständige Epithelisierung mit einer fast ganzheitlich intakten Basalmembran bereits zwischen dem 5. und 7. Tag, gefolgt von der MU-Gruppe, welche am 10. Tag reepithelisiert ist. Die Bildung des Granulationsgewebes am 5. Tag fiel in den HAM- und SH-Gruppen niedrig aus, war höher in den Int-Wunden und fast doppelt so hoch in den Kontrolldefekten. Die Remodeling-Phase startete in den HAM-, Int- und SH-Gruppen vor dem 20. Tag, im Falle der NT-Defekte setzte diese erst nach dem 20. Tag ein. Am 40. Tag zeigten die SH-, die MO- und die MU-Gruppe ein ausgereiftes Epithel, wohingegen die Int-Defekte noch eine verbreiterte Basalzellschicht aufwiesen. An Tag 60 war das Epithel in allen Behandlungsgruppen ausgereift, wobei bei den HAM-Gruppen eine atrophische Epidermis zu beobachten war.

Abbildung 4.8 stellt den histologischen Verlauf der Wundheilung in den einzelnen Behandlungsgruppen dar.

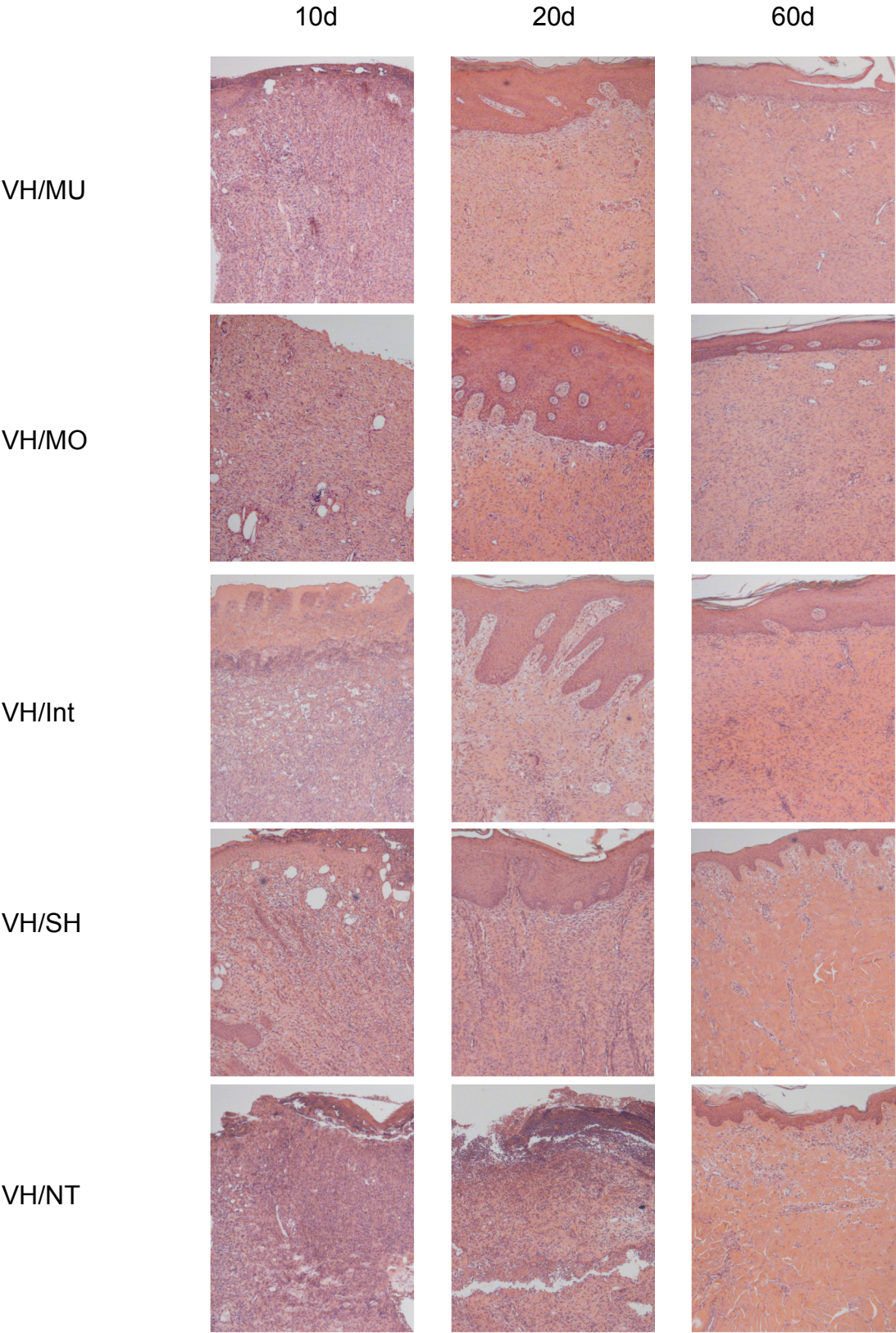


Abb. 4.8: Histologie der einzelnen Behandlungsgruppen im Verlauf (HE-Färbung, 50fach).

Die Anordnung und Ausrichtung der Kollagenfibrillen lässt Aussagen über die Qualität des Narbengewebes zu. Am 20. Tag waren in der SH-Gruppe geordnete Kollagenfasern zu beobachten. Einige vertikal orientierte Kollagenfasern in der MO- und der MU-Gruppe deuten ebenfalls auf eine regelrechte Anordnung hin, wobei die MU-Wunden im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen zu diesem Zeitpunkt einen höheren Kollagenanteil sowie reiferes Granulationsgewebe zeigten. Am 60. Tag wurden in der SH-Gruppe in der EvG-Färbung ungeordnete, spiralförmige Kollagenfasern beschrieben, wohingegen diese in den anderen Gruppen eher eine parallele Orientierung aufwiesen. Diese Befunde sprechen für eine niedrigere funktionelle Qualität des neugebildeten Narbengewebes in allen Gruppen mit Ausnahme der SH-Behandlungsgruppe.

4.2.2. Auswertung der Epitheldicke

Anhand der HE-Färbungen wurde exemplarisch an einer Stanze pro Behandlungsgruppe in vier verschiedenen Schnittebenen die Epitheldicke an insgesamt 48 Punkten vermessen.

Die Tabelle 4.6 sowie die Abbildungen 4.9 und 4.10 zeigen die Ergebnisse der Auswertung der Epitheldicke am 20. und am 60. postoperativen Tag. Die detaillierten Ergebnisse der statistischen Auswertung der Epitheldicke mittels des t-Test für abhängige Stichproben sind im Anhang dargestellt.

	Mittelwert +/- SEM [μm]	
	20d	60d
VH/NT	288,6 +/- 20,8	230,7 +/- 19,9
VH/SH	283,1 +/- 11,3	189,9 +/- 10,2
VH/Int	235,1 +/- 14,4	334,3 +/- 13,2
VH/MO	372,9 +/- 20,9	313,4 +/- 15,6
VH/MU	292,7 +/- 23,1	281,6 +/- 16,6
Kontrolle	168,0 +/- 6,8	168,0 +/- 6,8

Tab. 4.6: Mittelwerte und SEM der Epitheldicke (in μm) am 20. und am 60. postoperativen Tag (n=8 pro Gruppe).

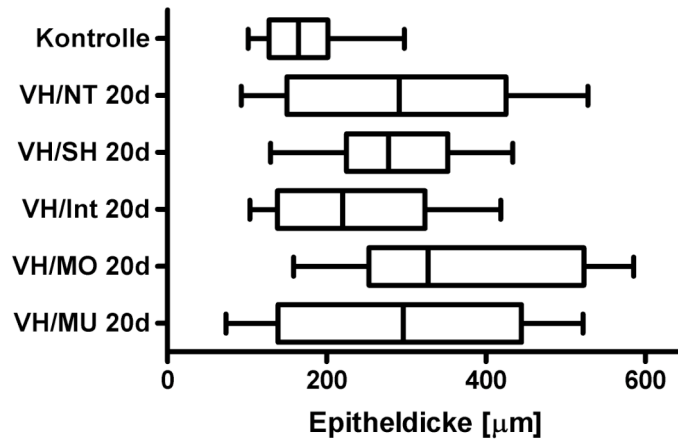


Abb. 4.9: Boxplot der Epitheldicke am 20. postoperativen Tag (n=8 pro Gruppe).

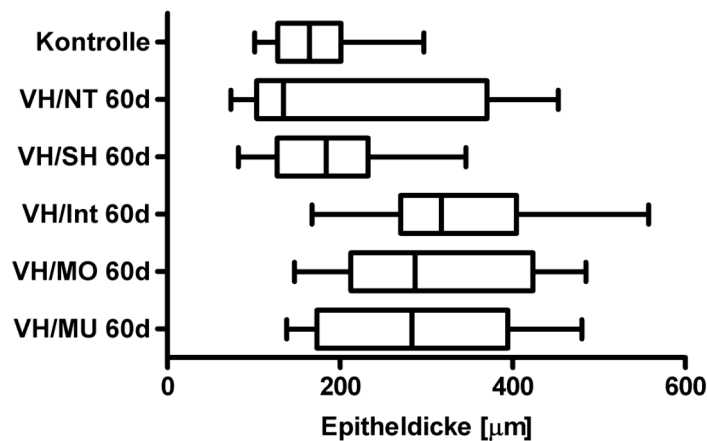


Abb. 4.10: Boxplot der Epitheldicke am 60. postoperativen Tag (n=8 pro Gruppe).

Am 20. postoperativen Tag zeigt die VH/MO-Wunde den höchsten Wert für die Epitheldicke ($372,9 \pm 20,9 \mu\text{m}$) und signifikante Unterschiede zu allen anderen Behandlungsgruppen sowie zu der Kontrollwunde. Die Kontrollwunde weist zu allen Vollhautwunden signifikante Unterschiede im Sinne einer geringeren Epitheldicke auf. Am 60. postoperativen Tag wird der höchste durchschnittliche Wert bei der VH/Int-Wunde beobachtet ($334,3 \pm 13,2 \mu\text{m}$), welcher sich von allen anderen Behandlungsgruppen signifikant unterscheidet. Die Kontrollgruppe zeigt signifikant verringerte Epitheldicke im Vergleich zu allen anderen Wunden.

4.3. Immunhistologische Analyse

4.3.1. Beurteilung der Zellproliferation mittels anti-Ki-67

Zur Beurteilung der Zellproliferation wurde am 10. und am 60. postoperativen Tag der Proliferationsindex bestimmt, welcher sich aus dem Quotienten der Anzahl der proliferierenden, Ki-67-positiven Zellen, und der Gesamtzahl der Basalzellen errechnet.

Die Tabelle 4.7 zeigt die Mittelwerte und die SEM-Werte der Proliferationsindizes am 10. und am 60. postoperativen Tag. Die detaillierten Ergebnisse der statistischen Auswertung der Proliferationsindizes mittels des t-Tests für abhängige Stichproben sind im Anhang dargestellt. Die Abbildungen 4.11 und 4.12 zeigen den Vergleich der Proliferationsindizes am 10. und 60. postoperativen Tag jeweils innerhalb einer Behandlungsgruppe.

	Mittelwert +/- SEM [%]	
	10d	60d
VH/NT	-	1,2 +/- 0,37
VH/SH	27 +/- 2,1	13 +/- 1,1
VH/Int	38 +/- 2,6	16 +/- 1,5
VH/MO	12 +/- 2,1	1,2 +/- 0,49
VH/MU	42 +/- 3,2	9,7 +/- 1,7

Tab. 4.7: Mittelwerte und SEM der Proliferationsindizes am 10. und am 60. postoperativen Tag.

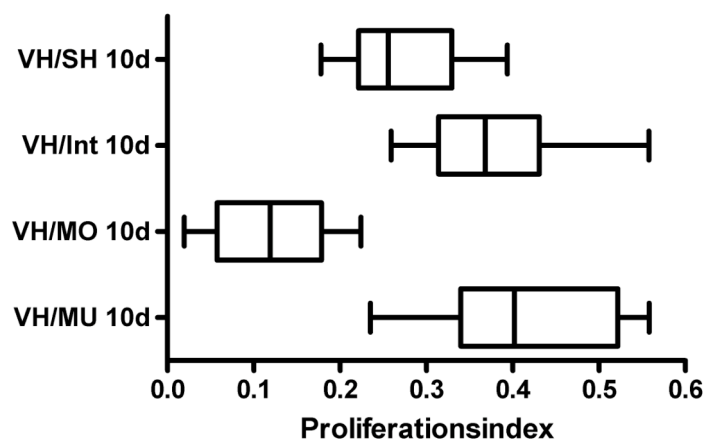


Abb. 4.11: Boxplot der Proliferationsindizes am 10. postoperativen Tag.

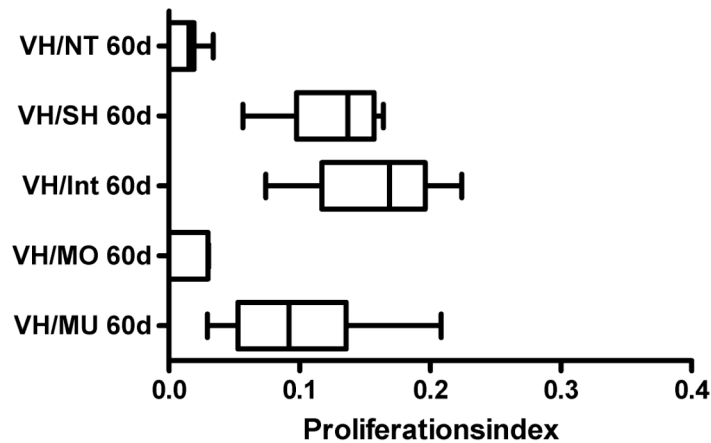


Abb. 4.12: Boxplot der Proliferationsindizes am 60. postoperativen Tag.

Am 10. Tag zeigten die VH/MU- und die VH/Int-Wunden die höchsten, die VH/MO- und die VH/SH-Gruppen hingegen die niedrigsten Proliferationsindizes. Der Proliferationsindex der VH/NT-Wunde konnte aufgrund der fehlenden vollständigen Epithelisierung der Wunde am 10. postoperativen Tag nicht erstellt werden.

In allen Behandlungsgruppen, ausgenommen der MO-Gruppe, war eine signifikante Abnahme der Proliferationsindizes vom 10. bis zum 60. Tag zu verzeichnen. Die VH/Int-Wunden wiesen weiterhin die höchsten Werte auf. Die stärkste Abnahme des Proliferationsindexes war in der VH/MU-Gruppe zu beobachten.

Die Abbildungen 4.13 und 4.14 zeigen die Behandlungsgruppen am 10. bzw. am 60. Tag im Vergleich.

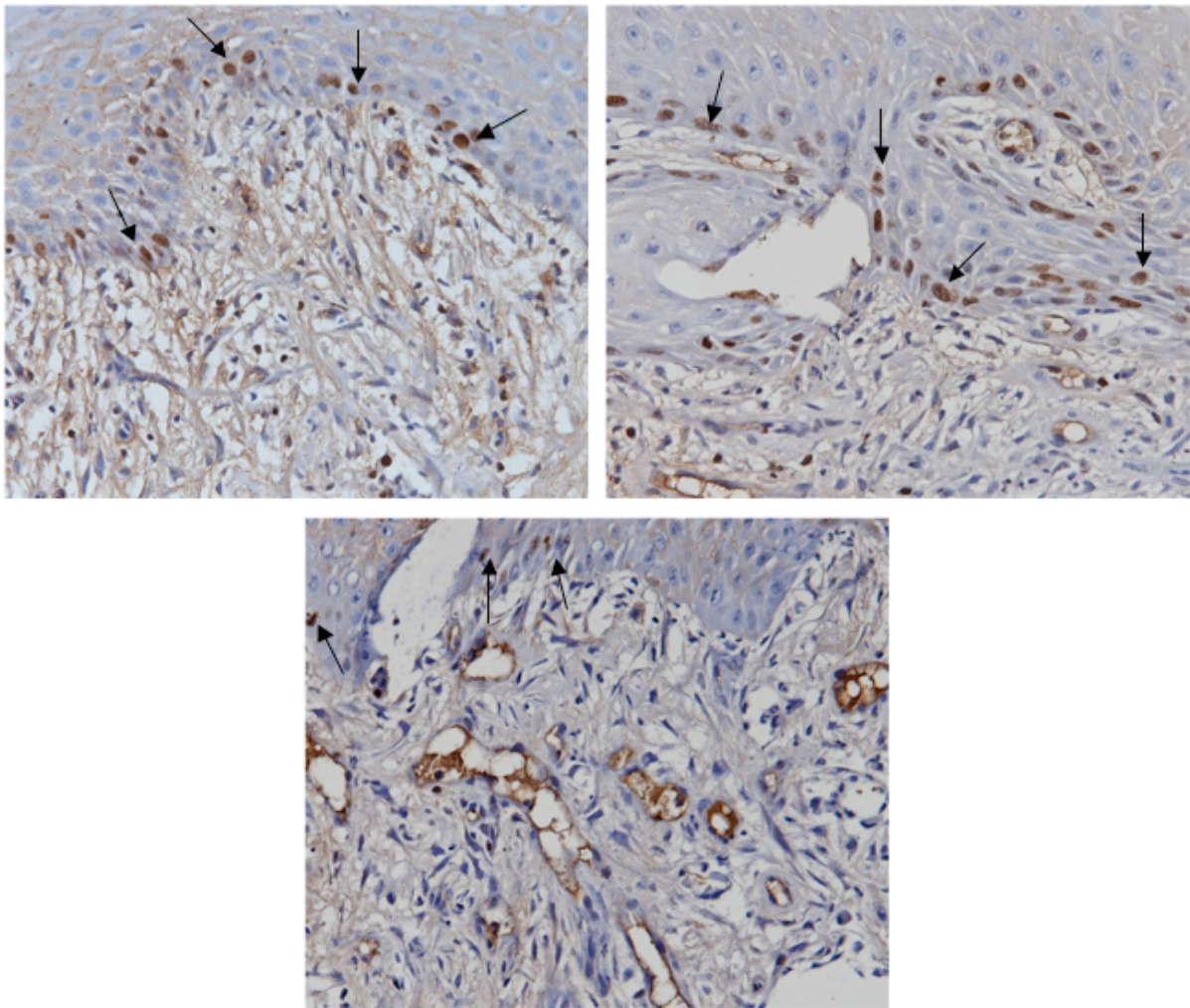


Abb. 4.13: Basale Zellproliferation der VH/Int-Wunde (links), der VH/MU-Wunde (rechts) und der VH/SH-Wunde (unten) am 10. postoperativen Tag im Vergleich. Die Int- und die MU-Gruppe zeigten einen signifikant höheren Proliferationsindex als die SH-Gruppe ($p = 0,0013$) (300 fach).

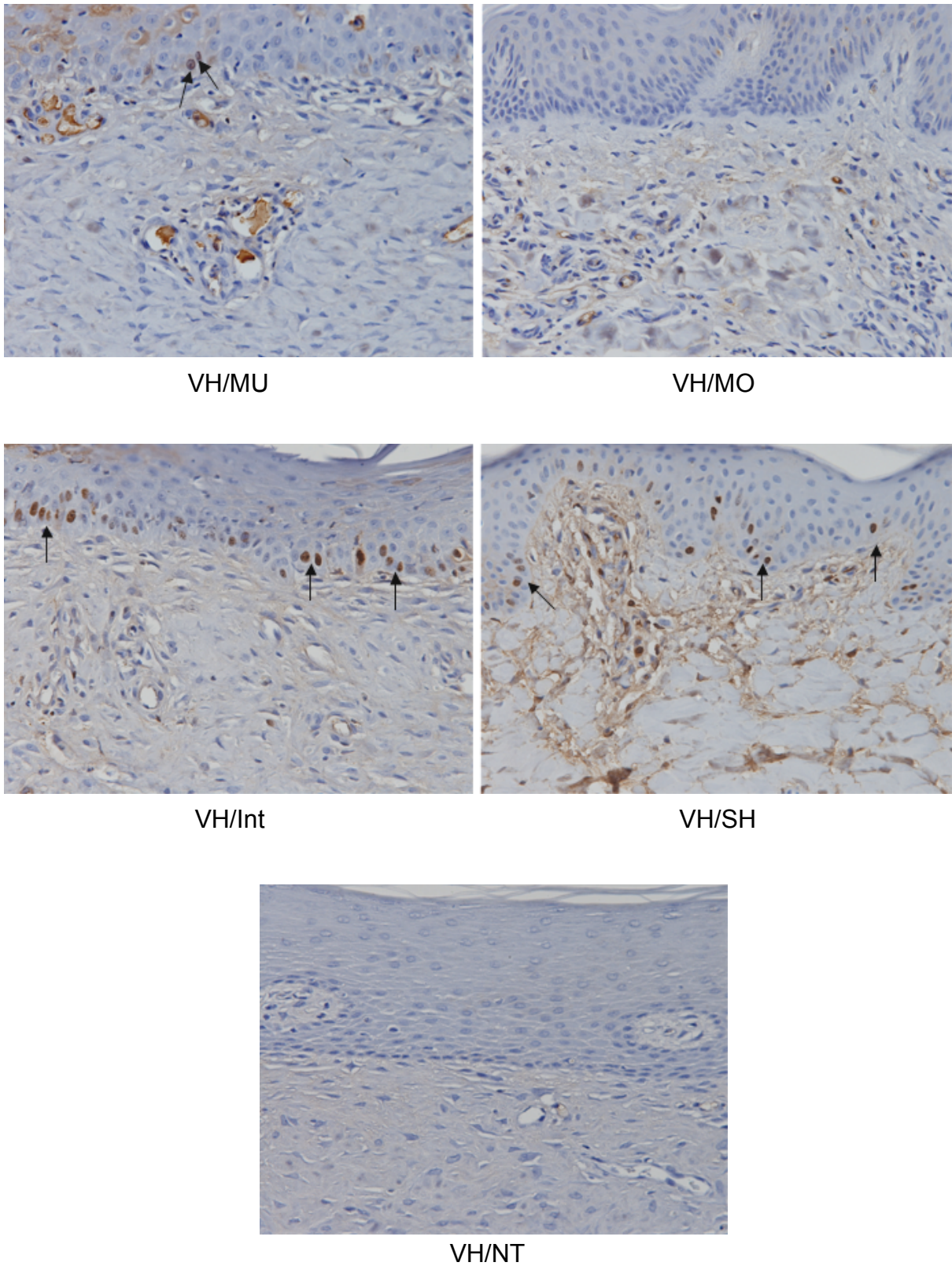


Abb. 4.14: Die verschiedenen Behandlungsgruppen am 60. postoperativen Tag in der Ki67-Färbung im Vergleich (300fach). Die Pfeile markieren beispielhaft proliferierende Basalzellen. Der im Text beschriebene Unterschied bezüglich der Proliferationsindizes ist deutlich zu sehen.

4.3.2. Beurteilung der Integrität der Basalmembran mittels anti-Laminin

Zur Beurteilung der Integrität der Basalmembran erfolgte eine immunhistochemische Färbung mittels anti-Laminin. Bei sämtlichen Defekten wurde die Basalmembran an den postoperativen Tagen 7, 10, 20 und 40 auf ihre Vollständigkeit hin untersucht (Tabelle 4.8).

	VH/NT	VH/SH	VH/Int	VH/MO	VH/MU
7d	-	-	-	-	-
10d	-	+/-	+	-	+/-
20d	-	+/-	+/-	+/-	+
40d	+	+	+	+	+

Tab. 4.8: Integrität der Basalmembran über den postoperativen Wundheilungsverlauf.

+ : Basalmembran vollständig, +/- : Basalmembran partiell intakt, - : keine Basalmembran sichtbar.

Abbildung 4.15 zeigt die Basalmembranbildung der VH/MO- und die VH/MU-Wunde am 10. postoperativen Tag, Abbildung 4.16 vergleicht die anti-Laminin-Färbungen der einzelnen Behandlungsgruppen am 20. postoperativen Tag.

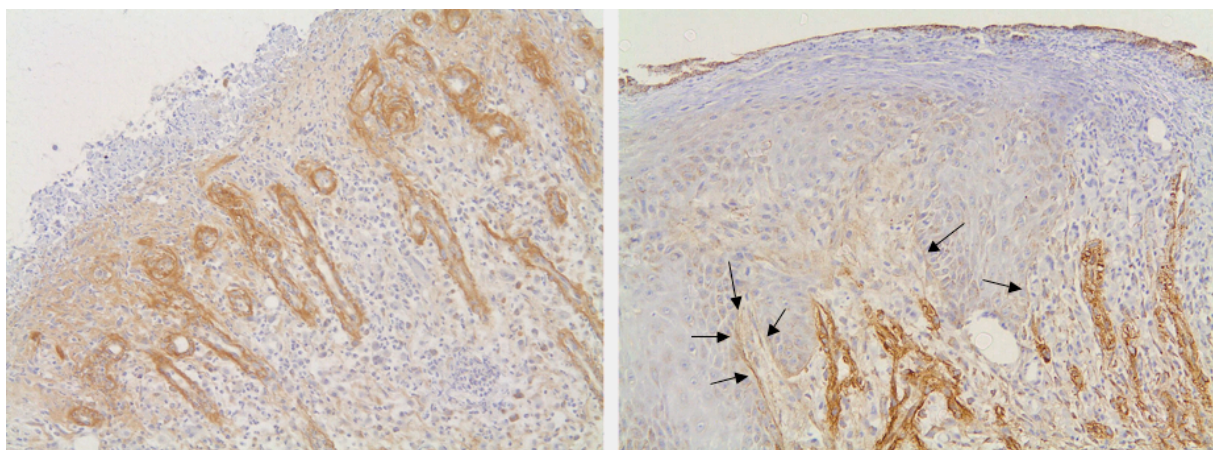
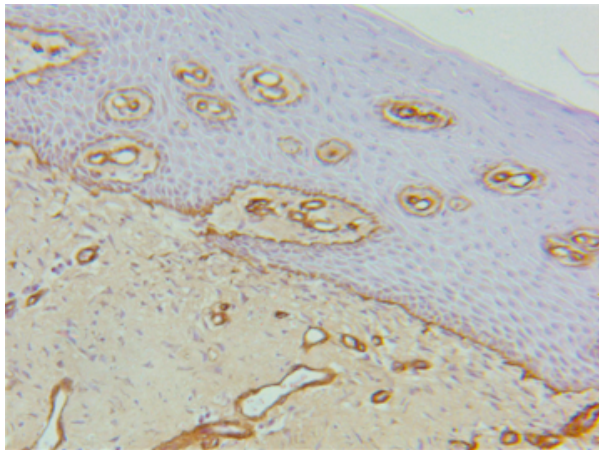
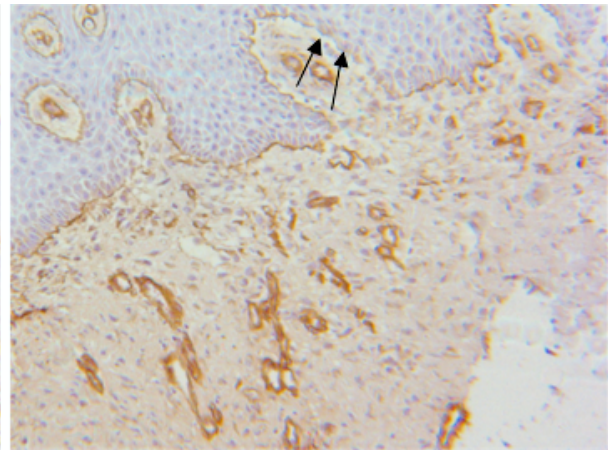


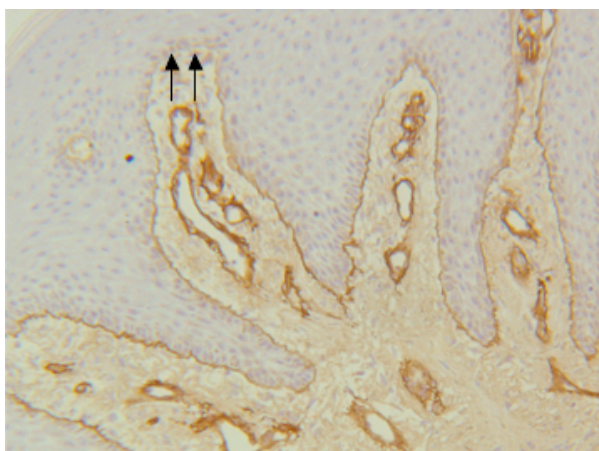
Abb. 4.15: Die VH/MO-Wunde (links) zeigt am 10. postoperativen Tag noch keine Basalmembranbildung, wohingegen diese bei der VH/MU-Wunde (rechts) schon partiell ausgebildet ist (siehe Pfeile) (150fach).



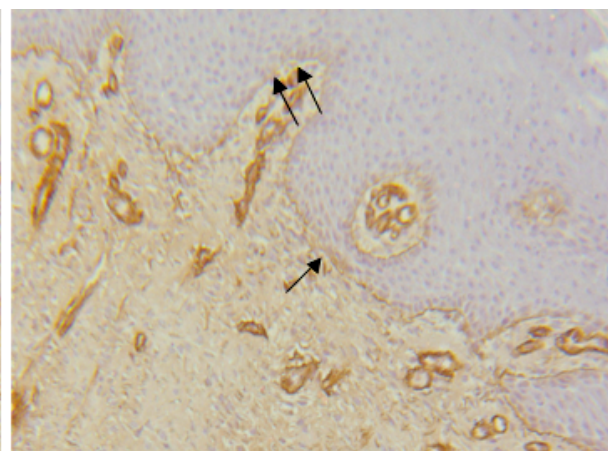
VH/MU



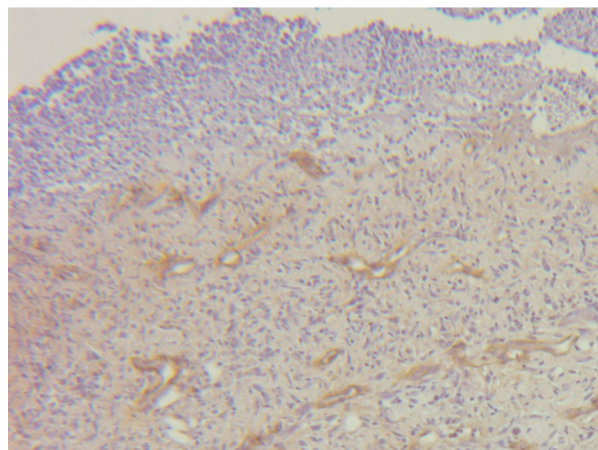
VH/MO



VH/Int



VH/SH



VH/NT

Abb. 4.16: Basalmembranbildung der verschiedenen Behandlungsgruppen am 20.Tag (150fach). Die Pfeile deuten auf Lücken in der Basalmembran. Bei der VH/MU ist eine vollständig ausgebildete Basalmembran zu sehen, in der VH/NT-Wunde hingegen fehlt diese gänzlich.

Die VH/Int-Wunde ist die Behandlungsgruppe, bei der die Basalmembran am frühesten wieder vollständig intakt ist, nämlich bereits am 10. postoperativen Tag. Die MU-Behandlungsgruppe zeigte eine partielle Vollständigkeit der Basalmembran am 10. Tag, wohingegen bei der SH-Gruppe eine Integrität erst ab dem 20. Tag zu sehen war.

4.3.3. Beurteilung der Gefäßproliferation mittels anti-vWF

Die Auszählung der Gefäße erfolgte an den für die Gefäßproliferation relevanten postoperativen Tagen 10 und 60. Die Tabelle 4.9 sowie die Abbildungen 4.17 und 4.18 zeigen die Ergebnisse der Auswertung der Gefäßproliferation mittels anti-vWF. Die detaillierten Ergebnisse der statistischen Auswertung der Gefäßproliferation mittels des t-Tests für abhängige Stichproben sind im Anhang dargestellt.

	Mittelwert +/- SEM	
	10d	60d
VH/NT	3,55 +/- 0,18	2,25 +/- 0,32
VH/SH	3,75 +/- 0,32	8,45 +/- 0,51
VH/Int	7,10 +/- 0,52	5,25 +/- 0,36
VH/MO	3,85 +/- 0,22	1,15 +/- 0,21
VH/MU	4,65 +/- 0,24	7,85 +/- 0,31

Tab. 4.9: Mittelwerte und SEM der Anzahl an Gefäßen pro HPF am 10. und am 60. postoperativen Tag.

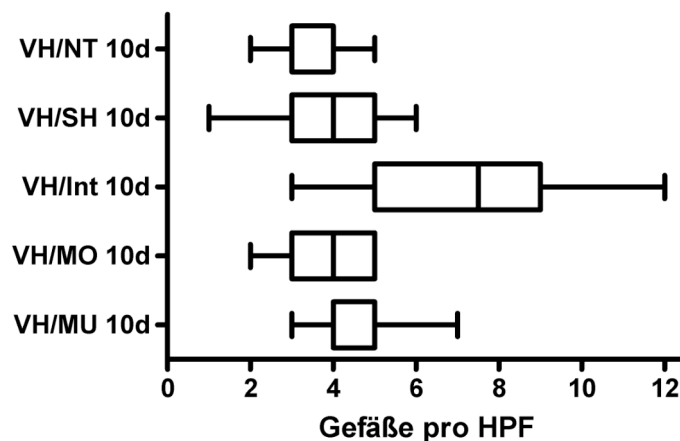


Abb. 4.17: Boxplot der Gefäßanzahl der Vollhautwunden am 10. postoperativen Tag.

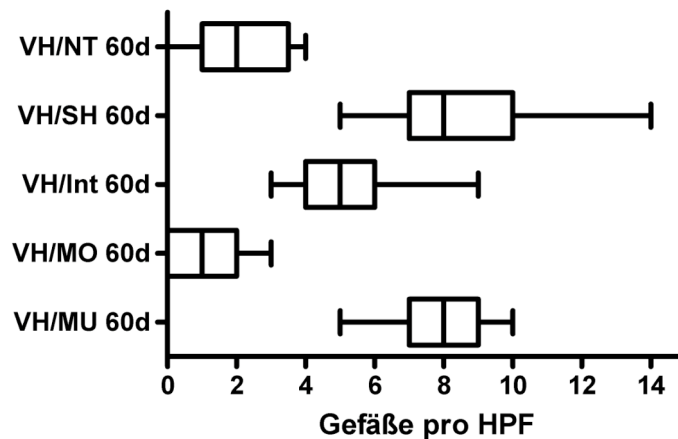


Abb. 4.18: Boxplot der GefäÙanzahl der Vollhautwunden am 60. postoperativen Tag.

Die anti-vWF-Färbung zeigte am 10. postoperativen Tag signifikante Unterschiede bezüglich der GefäÙproliferation in der Integra®- Gruppe ($7,10 \pm 0,52$) im Vergleich zu allen andern Behandlungsgruppen. Im Gegensatz dazu war am 60. Tag in der MU-Gruppe eine hoch signifikant höhere GefäÙeinsprossung im Vergleich zur Integra®- Gruppe zu beobachten ($p < 0,0001$), jedoch kein signifikanter Unterschied zur SH-Behandlungsgruppe ($p = 0,32$).

Die Abbildungen 4.19 und 4.20 zeigen den immunhistologischen Vergleich der Behandlungsgruppen am 10. und am 60. Tag.

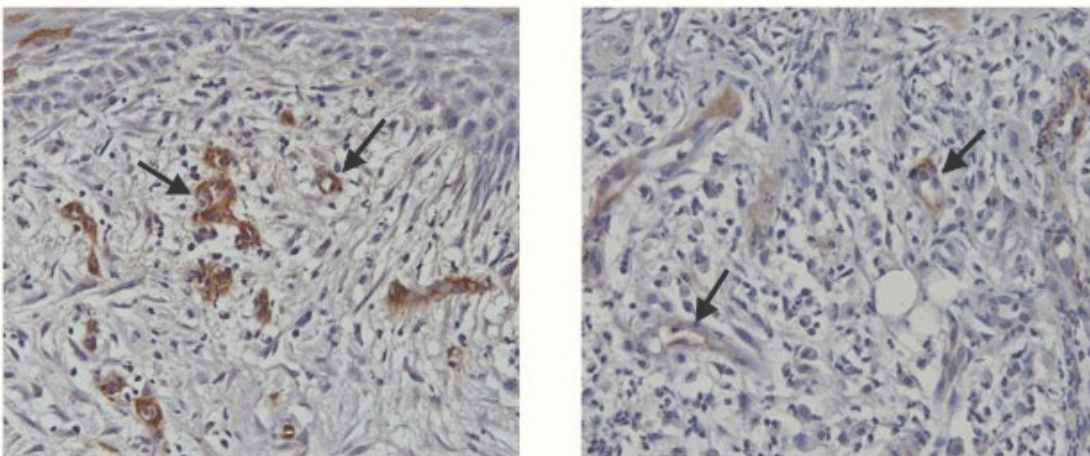


Abb. 4.19: Anti-vWF-Färbung der VH/Int- (links) und der VH/MO-Wunde (rechts) am 10. postoperativen Tag im Vergleich (300fach). Die Pfeile deuten beispielhaft auf eingesprossene GefäÙe.

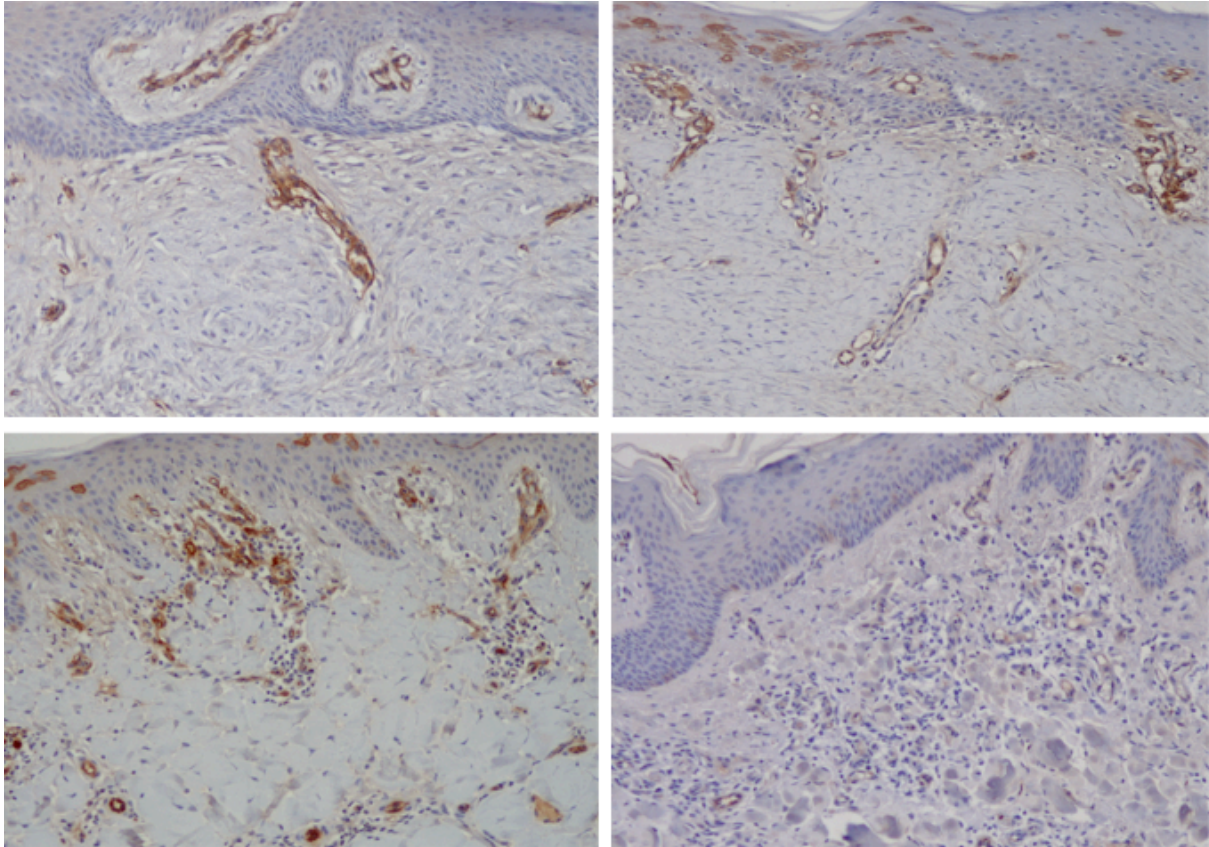


Abb. 4.20: vWF-Färbung der verschiedenen Behandlungsgruppen am 60. postoperativen Tag im Vergleich (150 fach).

4.3.4. Beurteilung der Narbenbildung mittels anti- α SMA

Zur Beurteilung der Narbenbildung der Vollhautwunden wurden der 10., der 20., der 40. und der 60. postoperative Tag ausgewertet. Die Tabelle 4.10 sowie die Abbildungen 4.21 und 4.22 zeigen die Ergebnisse der Auswertung der Narbenbildung mittels anti- α SMA des 10. und 60. postoperativen Tages. Die detaillierten Ergebnisse der statistischen Auswertung der Narbenbildung mittels des t-Tests für abhängige Stichproben sind im Anhang dargestellt.

	Mittelwert +/- SEM			
	10d	20d	40d	60d
VH/NT	21,20 +/- 3,04	35,20 +/- 4,38	25,20 +/- 6,28	1,80 +/- 0,49
VH/SH	24,40 +/- 6,88	30,40 +/- 8,98	3,80 +/- 1,16	1,00 +/- 0,55
VH/Int	38,00 +/- 4,83	34,60 +/- 2,42	19,60 +/- 6,36	9,40 +/- 2,16
VH/MO	10,80 +/- 1,46	22,40 +/- 3,50	16,80 +/- 1,66	13,80 +/- 2,59
VH/MU	15,20 +/- 2,06	11,40 +/- 2,11	15,20 +/- 5,93	13,00 +/- 3,45

Tab. 4.10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF im zeitlichen Verlauf.

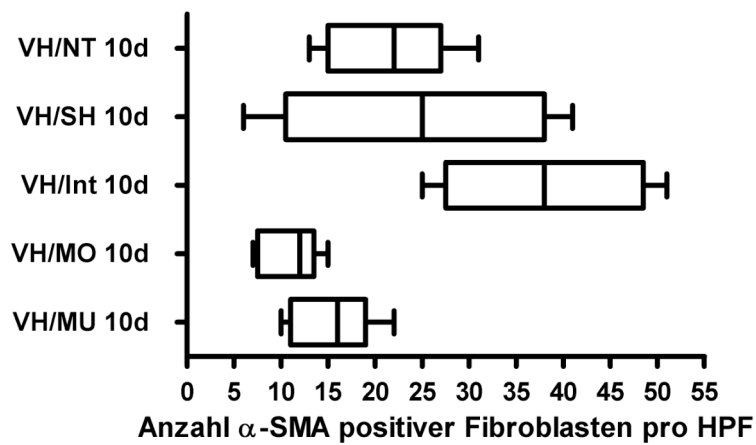


Abb. 4.21: Boxplot der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 10. postoperativen Tages.

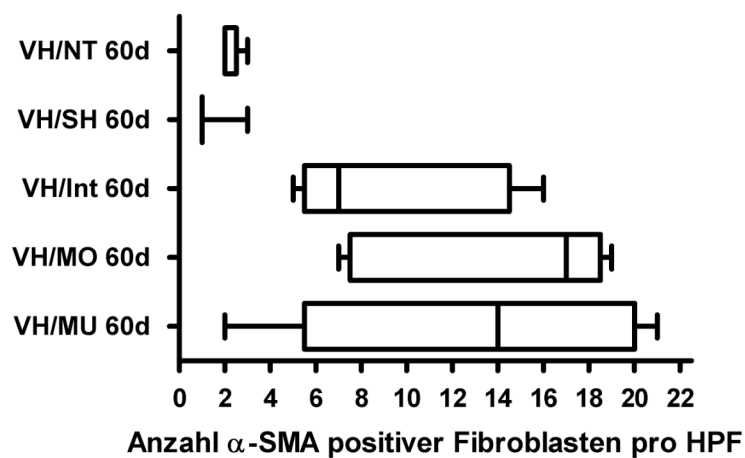


Abb. 4.22: Boxplot der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 60. postoperativen Tages.

An den postoperativen Tagen 10 und 20 zeigten die HAM-Behandlungsgruppen die niedrigste Anzahl an α SMA-positiven Fibroblasten. Eine auffallend niedrige Zahl α SMA-positiver Fibroblasten wurde an Tag 20 in der MU-Gruppe beobachtet, welche sich signifikant von allen anderen Behandlungsgruppen mit Ausnahme der VH/SH-Gruppe unterschied. An Tag 40 war in allen Behandlungsgruppen eine Abnahme an α SMA-positiven Fibroblasten zu sehen, außer in der VH/MU-Gruppe, welche konstante Werte zeigte. Am 60. postoperativen Tag wurden ähnliche Werte für die HAM- und die Int-Gruppen ermittelt, welche keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigten. Die mit Spalthaut allein versorgten Defekte demonstrierten im Vergleich zu allen anderen Behandlungsgruppen signifikant geringere Zahlen an α SMA-positiven Fibroblasten, vergleichbar mit der NT-Wunde.

Die Abbildung 4.23 zeigt die VH/MU- und die VH/SH-Wunde am 60. Tag im Vergleich.

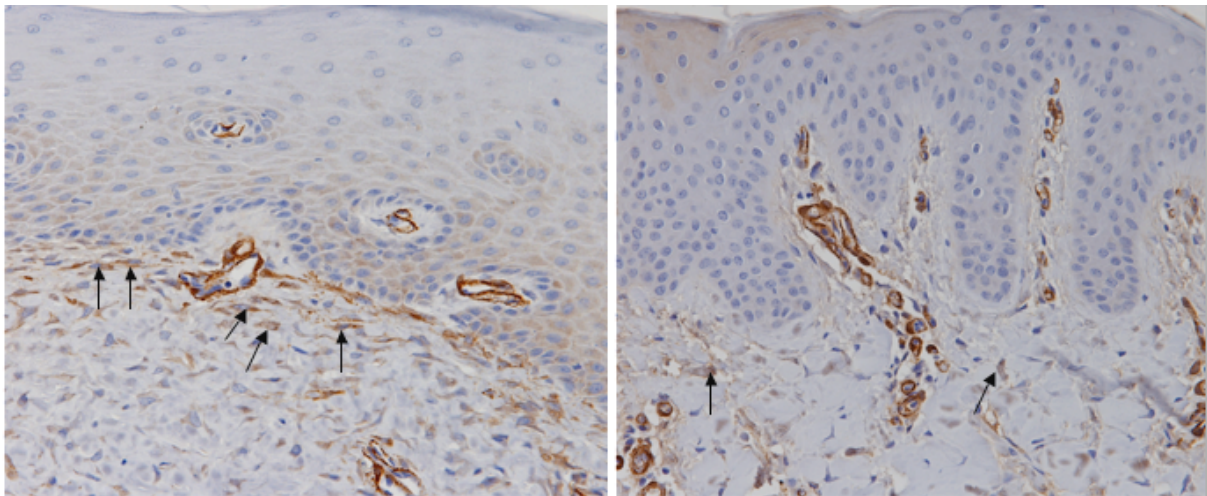


Abb. 4.23: VH/MU-Wunde (links) und VH/SH-Wunde (rechts) am 60. postoperativen Tag in der α SMA-Färbung im Vergleich. Die Pfeile kennzeichnen beispielhaft α SMA-positive, interstitielle Myofibroblasten. Deutlich zu sehen ist die größere Anzahl an α SMA-positiven Fibroblasten in der VH/MU-Biopsie (300fach).

5. Diskussion

Obwohl die Amnionmembran zahlreiche, den Wundheilungsprozess begünstigende Eigenschaften aufweist und somit ein optimales biologisches Transplantatmaterial darstellt (Kesting, M.R., et al., 2008, S. 684; Lo, V., et al., 2009, S. 935; Ravishanker, R., et al., 2003, S. 369), wurde ihr klinischer Einsatz aufgrund von Unsicherheiten bezüglich der potentiellen Infektiosität sowie der Aufbereitung bis in die Neunzigerjahre eingeschränkt. Erst die Einführung einer neuen Methode der Kryokonservierung, welche eine lange Aufbewahrung und wiederholte serologische Tests erlaubt, führte zu einer breiteren klinischen Anwendung (Lee, S.H., et al., 1997, S. 303). Es erfolgten experimentelle Studien zur Verwendung der HAM zunächst hauptsächlich auf dem Gebiet der rekonstruktiven Ophthalmochirurgie (Dua, H.S., et al., 2004, S. 51; John, T., 2003, S. 43).

Ziel der vorliegenden Studie war es, kryokonservierte HAM nun als biologisches Ersatzmaterial für die Haut am Schweinemodell zu etablieren, um durch die Xenotransplantation den Weg für die Allotransplantation bzw. die autofetale Transplantation zu ebnen. In dieser Studie wurden in den HAM-Behandlungsgruppen bessere Ergebnisse gegenüber einem klinisch bewährten alloplastischen Material (Integra®) und gleichwertige gegenüber der alleinigen Spalthautversorgung im postoperativen Verlauf nachgewiesen. Auch immunhistologisch konnte eine verminderte Inflammationsreaktion durch die Amnionmembran gezeigt werden. Zudem wurden in der histologischen Analyse eine Beschleunigung der Reepithelisierung durch die Amnionmembran sowie eine geringere narbige Hypertrophie in den mit HAM versorgten Defekten beobachtet. Außerdem wirkte sich die Verwendung von HAM günstig auf das ästhetische Ergebnis und die Wundkontraktion aus, auch wenn immunhistologisch mit α SMA ein hoher Indikator für eine stärkere Vernarbung nachgewiesen wurde.

Die Ergebnisse der Studie konnten zeigen, dass die Transplantation von HAM zur Deckung iatrogenen Vollhautwunden die Möglichkeit zur Förderung der Epithelisierung bei Minimierung der Entzündungsreaktionen bietet und gleichzeitig ein optimales Gesamtergebnis erzielt werden kann.

5.1. Tiermodell

Experimentelle Wundheilungsstudien im Tiermodell sind in der Literatur zahlreich beschrieben. Die Vielzahl der wundexperimentellen Modelle deutet an, dass kein universelles Tiermodell existiert. Als Versuchstiere wurden zum Beispiel das Schwein (Park, M., et al., 2008, S. 520; Wang, T.H., et al., 2010, S. 252), die Ratte (Kesting, M.R., et al., 2008, S. 684), das Merino Schaf (Fraser, J.F., et al., 2009, S. 998), das Kaninchen (Kim, S.S., et al., 2009, S.59; Ozboluk, S., et al., 2010, S. 26), die Maus (Suzuki, S., et al., 2004, S. 193), das Pferd (Goodrich, L.R., et al., 2000, S. 326), und der Hund (Ramsey, D.T., et al., 1995, S. 941) genannt. Aufgrund zahlreicher Ähnlichkeiten zwischen der Haut des Schweins und der des Menschen erscheint das Schweinmodell jedoch besonders geeignet (siehe 3.3.).

In einer retrospektiven Studie von Wang et al. über verschiedene Deckungsarten von Brandwunden im Schweinmodell, wird eine Beeinflussung der Wundheilungsprozesse durch das Gewicht der Schweine, sowie eine Abhängigkeit der Wundheilung von der Körperstelle, an der sich die Wunde befindet, berichtet (Wang, X.Q., et al., 2010, S. 680). Park et al., die in einer Studie den Wundheilungsverlauf von Verbrennungen nach Deckung mit humaner und boviner Amnionmembran am Schwein untersuchten, berichten von keinerlei Schwierigkeiten in Bezug auf das Schweinmodell (Park, M., et al., 2008, S. 520). In der vorliegenden Studie konnte weder ein Verdrängen der Wundauflage noch eine Beeinflussung der Wundheilungsprozesse durch das Borstenwachstum beobachtet werden. Trotz leicht unterschiedlicher Ausgangsgewichte der Minipigs konnte in unserer Studie kein Zusammenhang zwischen dem Gewicht des Tieres und der Wundheilung gesehen werden. Bei allen vier Schweinen wurden ähnliche Verläufe des jeweiligen Wundtypen beobachtet. Durch die gleichmäßige Positionierung der Wunden auf dem Rücken der Tiere und anschließende Randomisierung wurden bei allen Wunden ähnliche Ausgangsbedingungen für die Wundheilung geschaffen.

Eine Schwierigkeit für die erfolgreiche Untersuchung von Wundheilungsprozessen der Schweinehaut ist deren „Tendenz zur Hyper- und Parakeratose“ (Meyer, W., 1996, S. 178). Eine Möglichkeit zur erfolgreichen Anwendung der Schweinehaut als Modell für den Menschen ergibt sich, wenn die Epidermis beurteilt wird, da diese der menschlichen Epidermis in vieler Hinsicht ähnelt. Weniger günstig ist dagegen der Vergleich der Hypodermis (Meyer, W., et al., 1991, S. 16). In unserer Studie wurden

daher hauptsächlich die in der Epidermis ablaufenden Prozesse interpretiert, allerdings auch einige Abläufe in der Hypodermis beobachtet, wobei bei der Bewertung dieser Ergebnisse die strukturellen Unterschiede zum Menschen berücksichtigt werden müssen.

Ein Nachteil des Schweinemodells besteht in der zeitintensiven Pflege und Haltung der Tiere während des Experiments sowie in dem hohen finanziellen Aufwand (Meyer, W., et al., 1991, S. 16; Sullivan, T.P., et al., 2001, S. 66), der allerdings in der vorliegenden Studie durch die enge Kooperation zu der tiermedizinisch-wissenschaftlichen Fakultät gut kontrollierbar war, da mit den vorliegenden Ressourcen des Instituts gearbeitet werden konnte. Aus praktischer Sicht ist es entscheidend, dass bei der Anwendung der Haut des Schweins für dermatologische Versuchszwecke bestimmte Bedingungen erfüllt sind: Es sollten eine hellhäutige Zuchtrasse und einheitlich subadulte Tiere verwendet werden. Außerdem sollten die Versuchsfelder bei allen Tieren an denselben Stellen lokalisiert sein (Meyer, W., et al., 1991, S. 16). Alle diese Voraussetzungen sind in vorliegender Studie erfüllt. Dennoch ist es im Schweinemodell in Bezug auf die hygienischen Bedingungen sowie den Schutz der Wunde vor mechanischen Traumata durch das Schwein und die daraus resultierende Beeinflussung der Wundheilungsprozesse nicht möglich, identische Versuchsbedingungen wie bei einer klinischen Anwendung am Menschen zu schaffen. Es wurde versucht, den klinischen Ablauf in Bezug auf die Frequenz der Verbandwechsel sowie die Wundkontrolle zur Beurteilung des postoperativen Verlaufs dem einer Anwendung beim Menschen möglichst ähnlich zu gestalten. Zudem wurde auf einen Schutz der Wunden vor mechanischen Traumata mit der Anlage eines wattierten Verbandes geachtet. Trotzdem können auch die bestmöglichen Konditionen hinsichtlich Hygiene und Wundpflege aus der tierischen Natur heraus nicht mit einem postoperativen Verlauf beim Menschen verglichen werden. Diese Faktoren müssen bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Darüber hinaus müssen interindividuelle Unterschiede der Wundheilungsprozesse und der Hautbeschaffenheit zwischen den einzelnen Tieren sowie die relativ kleine Tierkohorte von vier Tieren in die Bewertungen und Interpretation mit einbezogen werden.

5.2. Verwendete Materialien

In vorliegender Studie wurden ein biologisches Hautersatzmaterial, Integra[®], ein- und mehrschichtige HAM, sowie autologe Spalthaut zur Versorgung von Vollhautwunden verwendet.

Das Hautersatzmaterial Integra[®] wird routinemäßig und mit gutem Erfolg zur Abdeckung von Hautwunden und Förderung der Epithelisierung eingesetzt (Campitiello, E., et al., 2005, S. 69; Dantzer, E., et al., 2001, S. 173; Popescu, S., et al., 2007, S. 197; Reid, M.J., et al., 2007, S. 889; Wood, F.M., et al., 2007, S. 693). Campitiello et al. erläutern in einer Studie über die Anwendung von Integra[®] zur Behandlung chronischer Wunden an sieben Patienten die zahlreichen Vorteile des Materials: Integra[®] verhindert durch seine Adhärenz eine weitere Kontamination des Wundbetts, außerdem können durch die Silikonschicht die Vorgänge der Histogenese beobachtet werden, was eine Beurteilung der Wundfarbe und damit eine Einschätzung des Fortschritts der Vaskularisation der Neodermis erlaubt (Campitiello, E., et al., 2005, S. 69). Eine klinische Studie von Dantzer et al. zur Anwendung von Integra[®] analysiert die Vor- und Nachteile des Hautersatzmaterials. Es erfolgte eine Beurteilung von 31 Patienten mit insgesamt 39 Wunden, welche im Rahmen rekonstruktiver Maßnahmen mit Integra[®] versorgt worden waren. Als Vorteile von Integra[®] werden die sofortige Verfügbarkeit, die Verfügbarkeit großer Mengen, die Einfachheit und Verlässlichkeit der Verarbeitungstechnik sowie die kosmetisch ansprechenden Ergebnisse genannt (Dantzer, E., et al., 2001, S. 173). Ngyuen et al. führten eine Studie zur Beurteilung der Langzeitergebnisse und der Vernarbung nach Integra[®]-Transplantation durch. Dabei wurden die Narben von sechs Patienten, die im Rahmen eines rekonstruktiven Eingriffs eine Wundversorgung mittels Integra[®] erhalten hatten, ein Jahr postoperativ mittels eines Cutometers, welches objektiv die Hautelastizität misst, nachuntersucht. Es wurde herausgefunden, dass die elastischen Eigenschaften des ehemaligen Wundgebiets vergleichbar sind mit der Elastizität gesunder Haut (Ngyuen, D.Q., et al., 2009, S. 23). Bezüglich der Anwendungstechnik ergaben sich in der hier vorliegenden Studie ebenfalls keine Schwierigkeiten. Im Hinblick auf die kosmetischen Ergebnisse jedoch widerspricht unsere Studie den oben genannten Vorteilen. Wir beobachteten in unserem Tiermodell ästhetisch schlechtere Ergebnisse in den Integra[®]-

Behandlungsgruppen im Vergleich zu den HAM-Behandlungsgruppen. Es fanden sich hypertrophe Vernarbungen und stärkere Wundkontraktionen im Vergleich zu den HAM-Gruppen, wodurch auch die Hautelastizität beeinflusst wird. Als Nachteile von Integra® werden die Risiken einer Wundinfektion unter der Silikonschicht sowie einer Ablösung derselben aufgeführt, außerdem wird auf das mögliche Auftreten von Wundkontraktionen verwiesen (Dantzer, E., et al., 2001, S. 173). Auch in der hier vorliegenden Studie wurden teilweise starke Wundinfektionen bei Behandlung mit Integra® beobachtet, wohingegen die anderen Materialien wesentlich geringere Infektionszeichen zeigten. Außerdem war die Wundkontraktion in der Integra®-Gruppe von allen Materialien am stärksten. Die Transplantatannahme betrug 75,0%, dementsprechend fanden sich bei 25,0% der Wunden Ablösungen des Hautersatzmaterials, wodurch auch kein optimaler Schutz vor Wundinfektionen gewährleistet werden konnte. Somit bestätigt die hier vorliegende Studie die von Dantzer et al. (Dantzer, E., et al., 2001, S. 173) genannten Nachteile des Hautersatzmaterials Integra®.

Die Spalthauttransplantation ist ein in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie häufig angewendetes Verfahren (Müller, W., 2000, S. 314). Ein Spalthauttransplantat ermöglicht einen raschen Verschluss von Wundflächen und kann in der Messtechnik auch zu Abdeckung größerer Wunden verwendet werden, wobei gleichzeitig die Drainage von Blut und Exsudat unter dem Transplantat gewährleistet wird (Adams, D.C., et al., 2005, S. 1055). Indikationen zur Spalthauttransplantation sind beispielsweise tiefe dermale Verbrennungen, offene Wunden (Johnson, T., et al., 1997, S. 1050; Platt, A., et al., 1997, S. 474; Ratner, D., 1998, S. 75) sowie größere Defekte im Skalpereich (Müller, W., 2000, S. 314) oder auch iatrogen geschaffene Vollhautdefekte an anderen Körperregionen. Ein bedeutender Nachteil der Spalthauttransplantation ist die Tatsache, dass die Gewinnung des Transplantats eine zusätzliche Wunde schafft. Außerdem wird über kosmetische Einschränkungen wie Hypo- und Hyperpigmentierungen oder eine Kombination aus beiden, welche sowohl die donor site als auch die Empfängerstelle betreffen können, berichtet (Cho, C.Y., et al., 1998, S. 25). Eine weitere Schwierigkeit besteht in der nur in seltenen Fällen erreichten Übereinstimmung der Gewebestruktur zwischen Transplantat und Empfängerstelle. Darüberhinaus neigen Spalthauttransplantate zur Kontraktion, weshalb eine Spalthauttransplantation an freien Rändern wie dem Nasenflügel oder den Augenlidern vermieden werden sollte (Adams, D.C., et al., 2005, S. 1055).

Druecke et al. veröffentlichten 2004 eine Studie, in der sie die Beeinflussung der Narbenbildung von Vollhautwunden durch verschiedene Hautersatzmaterialien im Schweinemodell untersuchten. Es wurden Integra[®], 1-Ethyl-3(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) Kollagen, Polyethylenglycol Terephthalat-Polybutylen Terephthalat (PEGT/PBT) und Spalthaut miteinander verglichen. Die Studie zeigte, dass die Wundkontraktion der Spalthaut-Behandlungsgruppe (27,2 \pm 6,1%) geringer war als die übrigen Gruppen (Druecke, D., et al., 2004, S. 518). Diese Ergebnisse werden durch die hier vorliegende Studie bestätigt, zumal die mittlere Wundkontraktion der mittels eines Spalthauttransplantates gedeckten Vollhautdefekte bei 17,3 \pm 2,2% lag und somit signifikant geringer war als die Wundkontraktion der Integra[®]-Behandlungsgruppe und die der Kontrollgruppe, jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den HAM-Gruppen zeigte.

In einer Vielzahl von Studien seit 1910 konnten positive Effekte zur Geweberekonstruktion mit meist frischer HAM erzielt werden, deren Verwendung zahlreiche Vorteile, jedoch auch Einschränkungen aufgrund ihrer begrenzten mechanischen Stabilität mit sich bringt. Die Amnionmembran weist viele Qualitäten eines optimalen biologischen Verbandsmaterials auf. Aufgrund der niedrigen Immunogenität werden Abstoßungsreaktionen im klinischen Gebrauch der Amnionmembran nur selten beobachtet (Maral, T., et al., 1999, S. 625). Sowohl Akle et al. (Akle, A., et al., 1981, S. 1003), als auch Fraser et al. (Fraser, J.F., et al., 2009, S. 998) beobachteten in ihren Studien zur Amnionmembrantransplantation keinerlei Abstoßungsreaktionen, dennoch wurde in der hier vorliegenden Studie bei den Vollhautwunden keine 100%ige Transplantatannahme erreicht. Als mögliche Ursache sei zunächst auf den im Vergleich zum Menschen tieferen Defekt aufgrund der dickeren Fettschicht hingewiesen, was einerseits eine adäquate Kompression des Transplantates auf sein Wundbett schwierig machte, andererseits auch eine bakterielle Besiedlung begünstigte. Weiterhin wirkt sich die eingeschränkte mechanische Stabilität limitierend auf die Transplantatannahme aus.

Die Amnionmembran besitzt antiinflammatorische sowie antimikrobielle Eigenschaften und gewährleistet eine gute Wundadhärenz, sodass sie eine effektive Barriere für eine externe Kontamination darstellt (Lo, V., et al., 2009, S. 935). Des Weiteren reduziert die Amnionmembran den Wärme-, Feuchtigkeits- und Proteinverlust einer Wunde, so dass ein optimales Wundklima erreicht wird und damit optimale Voraussetzungen für die Wundheilungsprozesse und einen idealen

postoperativen Verlauf geschaffen werden (Singh, R., et al., 2007, S. 505). Insofern sind die höhere Transplantatannahmerate und geringere postoperative Inflamationsreaktionen sowie Wundinfektionen gegenüber den anderen Behandlungsgruppen erklärbar. Auch Park et al. berichten in ihrer Studie zur Behandlung von Brandwunden am Schwein mit humaner und boviner Amnionmembran im Vergleich zu Polyurethan-Schaum über reduzierte Inflamationsreaktionen und einen komplikationslosen postoperativen Verlauf in den Amnionmembran-Behandlungsgruppen (Park, M., et al., 2008, S. 520). In der Studie von Fraser et al. zur Behandlung von Verbrennungen mittels Amnionmembran am Merino-Schaf zeigten die mit Amnionmembran behandelten Brandwunden keinerlei Inflammationen oder postoperative Infektionen (Fraser, J.F., et al., 2009, S. 998). Ebenso blieben die von Kesting et al. mit Amnionmembran versorgten oronasalen Fisteln postoperativ infektionsfrei (Kesting, M.R., et al., 2009, S. 131).

Darüberhinaus beschleunigt Amnionmembran die Reepithelisierung (Faulk, W.P., et al., 1980, S. 1156). Mostaque et al. untersuchten die Effekte von Amnionmembran im Vergleich zu Silber-Sulfadiazin auf den Wundheilungsverlauf von Verbrennungswunden bei Kindern und konnten eine signifikante Beschleunigung der Reepithelisierung durch die Anwendung von Amnionmembran beweisen (Mostaque, A.K., et al., 2011, S. 200). Ebenso berichten Insausti et al. von einer akzelerierten Epithelialisierung bei zwei Patienten mit großflächigen Brandwunden, welche mit Amnionmembran gedeckt worden waren. Die Forschergruppe konnte zeigen, dass Amnionmembran unter anderem die Expression von c-jun, ein für die Keratinozytenmigration entscheidendes Gen, induziert. Dadurch wird das Verhalten der Keratinozyten in großflächigen Wunden beeinflusst und letztendlich eine effektive Reepithelisierung ermöglicht (Insausti, C.L., et al., 2010, S. 368). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie bestätigen dies, da die mit Amnionmembran versorgten Defekte früher als die anderen Behandlungsgruppen histologische Zeichen der Reepithelisierung zeigten. In den HAM-Behandlungsgruppen wurde bereits zwischen dem 5. und dem 7. postoperativen Tag eine beginnende Epithelisierung beobachtet, in der Integra®- Gruppe sowie in der mit Spalthaut versorgten Gruppe hingegen erst zwischen dem 7. und dem 10. Tag. Die NT-Gruppe zeigte sogar erst ab dem 20. Tag Anzeichen einer Reepithelisierung. Folglich wird bei der Verwendung von Amnionmembran ein schnellerer Wundverschluss erreicht, was wiederum die

Wahrscheinlichkeit von postoperativen Infektionen senken sowie das Wohlbefinden des Patienten steigern kann.

Ein weiterer Vorteil der Amnionmembran sind ihre antifibrotischen Eigenschaften, wodurch die Narbenbildung reduziert und die Wundheilungsprozesse gefördert werden (Lee, S.H., et al., 1997, S. 303; Tseng, S.C., et al., 1999, S. 325). Fraser et al. behandelten in einer Studie Brandwunden am Merino-Schaf mit Amnionmembran, wobei ein besseres ästhetisches Ergebnis mit immunhistologisch verifizierter, geringerer Narbenbildung als in der Kontrollgruppe nachgewiesen wurde (Fraser, J.F., et al., 2009, S. 998). In einer Studie von Branski et al. über die Behandlung oberflächlicher Verbrennungen im Gesicht bei Kindern mit Amnionmembran im Vergleich zu topisch antimikrobiellen Wundauflagen, zeigten beide Behandlungsgruppen hypertrophe Narbenbildung in ähnlichem Ausmaß (Branski, L.K., et al., 2008, S. 393). In der hier vorliegenden Studie wurden in den HAM-Behandlungsgruppen bessere ästhetische Ergebnisse, schwächere Wundkontraktionen und geringere narbige Hypertrophien nachgewiesen als in den übrigen Gruppen.

Noch nicht ausreichend geklärt sind die Effekte der HAM auf die Angiogenese. Während im okulären Bereich antiangiogenetische Effekte nach Amniontransplantation festgestellt wurden (Hao, Y., et al., 2000, S. 348), zeigten Arbeiten, in denen meist frische HAM in extraokuläre Körperregionen transplantiert wurde, Anzeichen für eine Neoangiogenese (Faulk, W.P., et al., 1980, S. 1156; Rinastiti, M., et al., 2006, S. 247). Auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie sprechen eher für einen proangiogenetischen Effekt der Amnionmembran (siehe 8.5.). Kesting et al. betonen in einem Review, in dem die Verwendung von HAM bei der Behandlung von Brandwunden in der englischsprachigen Literatur der letzten zwanzig Jahre gegenübergestellt wurde, weitere positive Aspekte der Amnionmembran wie seltener notwendige Verbandswechsel und die vielseitige Verwendbarkeit für verschiedene rekonstruktive Verfahren (Kesting, M.R., et al., 2008, S. 907). In der hier vorliegenden Studie wurden die Verbandswechsel in den im klinischen Alltag üblichen Abständen durchgeführt. Aufgrund der natürlichen Verhaltensweisen der Schweine, welche die für eine komplikationslose Wundheilung notwendigen hygienischen Bedingungen erschweren, kann in dieser Studie keine Aussage über die Frequenz von Verbandswechseln getroffen werden. Weitere Vorteile der Amnionmembran sind, dass sie in großen Mengen verfügbar und im

Bezug auf Präparation, Lagerung und Anwendung einfacher zu verarbeiten ist als andere biologische Transplantatmaterialien (Hasegawa, T., et al., 2007, S. 328; Ley-Chavez, E., et al., 2003, S. 46).

Ein Nachteil bei der Verwendung von HAM besteht in der eingeschränkten mechanischen Stabilität, welche in einer verminderten Transplantatannahme und Wunddehiszenzen resultiert und folglich auch mit einem erhöhten Infektionsrisiko einhergeht. Rodríguez-Ares et al. zeigten in einer Studie, in der sie multilayer Amnionmembran zur Deckung kornealer Perforationen verwendeten, dass die Gewährleistung einer stabilen Oberfläche durch das Amniontransplantat mit zunehmendem Perforationsdurchmesser abnimmt. Bei den Perforationen mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 mm zeigten 75% ein stabiles Amniontransplantat in einem Zeitraum von 8 Wochen nach der Transplantation, in der Gruppe der Perforationen mit einem Durchmesser >1,5 mm war dies nur in 40% der Fall (Rodríguez-Ares, M., et al., 2004, S. 577). Auch in unserer Studie zeigte sich eine eingeschränkte Stabilität der Amnionmembran, da bei den Vollhautwunden, welche aufgrund der großen Wundfläche und der ausgeprägten Wundtiefe eine hohe mechanische Festigkeit des Transplantatmaterials erfordern, die Transplantatannahme mit 81,8% in der MO-Gruppe im mittleren Bereich lag. In der MU-Gruppe hingegen konnte durch die erhöhte Stabilität aufgrund mehrerer Lagen auch eine bessere Transplantatannahme (87,5%) erreicht werden.

5.3. Klinischer Verlauf

Die Immunogenität der Amnionmembran wird kontrovers diskutiert. Hori et al. fanden heraus, dass allogenes, humanes Amnionepithel MHC-I-Antigene exprimiert und bei Transplantation in die Cornea den Empfänger sensibilisiert. Außerdem wurden in derselben Studie akute Abstoßungsreaktionen bei spezifisch sensibilisierten Patienten und solchen, die eine wiederholte Transplantation erhielten, beobachtet (Hori, J., et al., 2006, S. 53). Adinolfi et al. konnten jedoch einen Mangel an MHC-1-Antigenen in humaner Amnionmembran nachweisen. Da die MHC-1-Antigene entscheidend zur Differenzierung zwischen körpereigenem und körperfremdem Gewebe beitragen und somit eine mögliche Abstoßung von körperfremdem Gewebe

stimulieren, würde ein MHC-Mangel die Abstoßungsreaktion des Empfängers reduzieren und folglich die antiinflammatorische Antwort minimieren (Adinolfi, M., et al., 1982, S. 325). In einer Studie von Akle et al. wurden bei der Transplantation von Amnionmembran bei 7 Patienten weder klinische Abstoßungsreaktionen beobachtet, noch konnten HLA-Antikörper im Serum der Patienten nachgewiesen werden. Dies wird darauf zurückgeführt, dass humane Amnionepithelzellen weder HLA-Antigene noch β_2 -Mikroglobulin exprimieren (Akle, C.A., et al., 1981, S. 1003). Auch Fraser et al. beobachteten in ihrer Studie zur Amnionmembrantransplantation bei Verbrennungen an Merino-Schafen keinerlei Abstoßungsreaktionen (Fraser, J.F., et al., 2009, S. 998). In einer aktuellen Studie von Li et al. zur Untersuchung immunsupprimierender Faktoren der Amnionmembran wurde eine *in vitro*-Produktion signifikanter Mengen proinflammatorischer Zytokine durch Amnionepithelzellen beobachtet. Der immunsuppressive Effekt der Amnionmembran auf die Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen, eine verminderte B- und T-Zellproliferation sowie die Apoptoseinduktion konnte somit bestätigt werden (Li, H., et al., 2005, S. 900). In vorliegender Studie betrug die Transplantatannahme 81,8% in der VH/MO-Gruppe, 87,5% in der VH/MU-Gruppe, 83,3% bei den mit Spalthaut allein behandelten Defekten und 75,0% in der Integra[®]-Behandlungsgruppe. Bei der Beurteilung der Transplantatannahme müssen die mechanische Stabilität eines Materials, die immunogenen Eigenschaften sowie die Art der Transplantation bedacht werden. Die höhere Stabilität von MU-Patches sowie von autologen Spalthauttransplantaten sind somit für die höhere Transplantatannahme in diesen Gruppen im Vergleich zu MO-Patches und Integra[®] von Bedeutung. Weiterhin spielen die von der Amnionmembran sezernierten immunsupprimierenden Faktoren eine Rolle. Kesting et al. zeigten in einer Studie zur Anwendung von Amnionmembran als chirurgisches Transplantat zur Versorgung von Weichteildefekten, dass durch die multilayer Anwendung der Amnionmembran die Degradation der Amnionmembran im Vergleich zur monolayer Technik signifikant reduziert werden kann, wodurch die den Wundheilungsverlauf positiv beeinflussenden Eigenschaften und die immunsuppressiven Effekte der Amnionmembran eine längere Wirkdauer erreichen (Kesting, M.R., et al., 2009, S. 930). Diese Ergebnisse bestätigen unsere Beobachtungen bezüglich der besseren Transplantatannahme in der MU-Behandlungsgruppe gegenüber der MO-Gruppe. Es sollte in weiterführenden Studien untersucht werden, ob sich die

Transplantatannahme in beiden HAM-Behandlungsgruppen durch autologe Transplantation wie in der Studie von Fraser et al. (Fraser, J.F., et al., 2009, S. 998) steigern ließe. Die Vollhautwunden an den Minischweinen unserer Studie sind ungefähr drei Mal tiefer als klinische Vollhautwunden am Menschen, welche mit Amnionmembran versorgt werden könnten (z.B. donor sites freier Radialis- oder Fibulatransplantate). Diese Faktoren könnten für die limitierte Transplantatannahme und leichte postoperative Infektionen verantwortlich sein.

Die klinischen Beobachtungen des postoperativen Verlaufs zeigten bei den mit HAM versorgten Wunden deutlich bessere Ergebnisse als in den übrigen Behandlungsgruppen. Der postoperative Verlauf eines Wundheilungsprozesses wird maßgeblich von der Inflammationsreaktion sowie von möglichen Wundinfektionen bestimmt. Die HAM zeichnet sich dabei durch ihre antiinflammatorische Wirkung aus (Hao, Y., et al., 2000, S. 348). Die freigesetzten antiinflammatorischen Proteine bewirken eine Downregulation der Expression von TGF- β (Tseng, S.C., et al., 1999, S. 325) sowie von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 (Hao, Y., et al., 2000, S. 348). Rinastiti et al. zeigten in einer Studie, in welcher Gingivawunden von Kaninchen mit Amnionmembran gedeckt wurden, dass die inflammatorische Antwort des Gewebes nach Deckung der Defekte mit HAM geringer ausfiel als bei den unbehandelten Defekten der Kontrollgruppe (Rinastiti, M., et al., 2006, S. 247). Ebenso verneinen Velez et al. in einer Studie zur Versorgung parodontaler Gewebedefekte mittels Amnionmembran merkliche Inflammationsreaktionen im postoperativen Verlauf (Velez, I., et al., 2010, S. 1797). Park et al. berichten in ihrer Studie zur Behandlung von Brandwunden am Schwein ebenfalls über reduzierte Entzündungsreaktionen in den Amnionmembran-Behandlungsgruppen (Park, M., et al., 2008, S. 520). Auch in unserer Studie beobachteten wir bei den mit HAM gedeckten Wunden deutlich geringere Inflammationsreaktionen als bei den übrigen Behandlungsgruppen, die MU-Wunden zeigten sogar noch geringere Inflammationszeichen als die MO-Gruppe.

Ein weiterer Vorteil der HAM ist der antimikrobielle Effekt. Peptide des angeborenen Immunsystems wie β -Defensine, Elastase-Inhibitoren, Elafin (Splichal, I., et al., 2001, S. 345), sowie Lactoferrin und IL-1-RA (Kanyshkova, T.G., et al., 2001, S. 1) werden in den Amnionepithelzellen exprimiert. Darüberhinaus wird der antimikrobielle Effekt durch den rascheren Wundverschluss bei der Verwendung von Amnionmembran (Talmi, Y.P., et al., 1991, S. 285) und durch die gute Wundadhärenz (Lo, V., et al.,

2009, S.935) unterstützt. Eine postoperative Kontamination der Wunde wird damit verhindert. In den bereits vorher erwähnten Studien von Fraser et al., Kesting et al. und Velez et al. (Fraser, J.F., et al., 2009, S. 998; Kesting, M.R., et al., 2009, S. 684; Velez, I., et al., 2010, S. 1797) traten bei den mit Amnionmembran behandelten Gruppen keine Infektionen auf. Unsere Studie bestätigt diese Ergebnisse. Die MU-Wunden blieben gänzlich infektionsfrei, die MO-Defekte zeigten nur leichte Infektionszeichen, wohingegen sich die Wunden der Integra®-Behandlungsgruppe stark infizierten. Die Überlegenheit der multilayer Anwendung bezüglich des postoperativen Verlaufs im Hinblick auf Infektion und Inflammation führen wir auf die längere Wirkdauer an freigesetzten antiinflammatorischen und antimikrobiellen Proteinen zurück, welche sich durch eine langsamere Degradation des multilayer Patches im Vergleich zu dem monolayer Transplantat erklärt. Dies fanden Kesting et al. in ihrer experimentellen Studie an Sprague-Dawley-Ratten zur Transplantation von ein- und mehrschichtiger HAM auf die Bauchwandmuskulatur heraus. Die Deckung mit mehrschichtiger HAM zeigte Vorteile, da sie langsamer degradierte und die Entzündungsreaktion milder ausfiel als bei den mit einschichtiger Amnionmembran versorgten Tieren (Kesting, M.R., et al., 2009, S. 930). Neben einer einwandfreien Wundadhärenz gewährleistet die mehrlagige Anwendung stabilere mechanische Eigenschaften, wodurch ein resistenterer Wundverschluss erreicht wird.

Ein weiterer Vorteil der Amnionmembran ist die Reduktion der Bildung von Narbengewebe. Dieser positive Einfluss auf die Narbenbildung wird auf die Beschleunigung der Reepithelisierung, die antiinflammatorischen Eigenschaften und die Verhinderung von Fibrosierung und Adhäsion zurückgeführt (Kim, J.S., et al., 2000, S. 329). In unserer Studie waren am 60. postoperativen Tag die Narben in Bezug auf das Oberflächenniveau der Haut in allen Behandlungsgruppen vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Bei den mit multilayer HAM versorgten Defekten wurden aber sowohl der unauffälligste Narbenkolorit als auch die geringste Wundkontraktion beobachtet. Die Kontraktion der mit MU-Patches versorgten Wunden war sogar geringer als die der SH-Behandlungsgruppe, wenn auch nicht signifikant ($p = 0,3997$). Die monolayer Anwendung zeigte diesbezüglich ebenfalls bessere Ergebnisse als die Integra®-Behandlungsgruppe, war der MU- und der SH-Gruppe jedoch unterlegen. Druecke et al. beobachteten in ihrer Studie zur Beeinflussung der Narbenbildung von Vollhautwunden durch verschiedene

Deckungsmaterialien am Minischwein bei den Interga[®]-Wunden eine ähnliche Kontraktion (34,6% \pm 6,4%) wie bei der Integra[®]-Behandlungsgruppe in der hier vorliegenden Studie (31,2% \pm 1,0%) (Druecke, D., et al., 2004, S. 518). Trotz der im Vergleich zu anderen Transplantatmaterialien geringeren Wundkontraktion kann diese durch die Anwendung von HAM-Patches nicht vollständig verhindert werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im postoperativen Heilungsverlauf von Vollhautwunden bei der Verwendung von HAM-Transplantaten weniger Komplikationen als in der Kontrollgruppe und bei der Deckung mit Integra[®] auftreten, welches als geeignetes Hautersatzmaterial bei Vollhautwunden gilt (Reid, M.J., et al., 2007, S. 889; Wood, F.M., et al., 2007, S. 693). Darüber hinaus zeigt die Anwendung eines MU-Patches mit anschließender Spalthautdeckung vergleichbare makroskopische Ergebnisse wie die Standardrekonstruktion mit einem Spalthauttransplantat alleine.

5.4. Histologischer Verlauf

HE. Ein Kriterium der histologischen Analyse anhand der HE-Färbungen war die Zellinfiltration der Stanzbiopsate im postoperativen Heilungsverlauf. In sämtlichen Behandlungsgruppen zeigte sich das zu erwartende Zellbild eines Wundheilungsprozesses. In der MO-Behandlungsgruppe fielen als Besonderheit zahlreiche eosinophile Granulozyten auf. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Funktionen der eosinophilen Granulozyten weit über die Freisetzung zytotoxischer Mediatoren im Rahmen parasitärer Infektionen oder bei Manifestationen von Allergien hinausgehen (Driss, V., et al., 2010, S. 621; Wong, C.K., et al., 2007, S. 85). Eosinophile exprimieren Toll-like-Rezeptoren (Wong, C.K., et al., 2007, S. 85) und Mediatoren des angeborenen Immunsystems, z. B. α -Defensine, wodurch sie direkt potentielle Pathogene erkennen können (Driss, V., et al., 2010, S. 621). Die Eosinophilen in der MO-Wunde weisen somit auf eine stärkere Immunreaktion hin. Allerdings wurde die eosinophile Zellinfiltration nur bei einem Tier beobachtet, sodass eine mögliche individuelle Reaktion dieses Tiers bei der Bewertung bedacht werden muss. Denn bei allen anderen Tieren, weder in der MU-, noch in der MO-Gruppe, wurden eosinophile Granulozyten beobachtet. Trotzdem kann eine

Immunogenität der Amnionmembran weiterhin nicht vollends ausgeschlossen werden.

Anhand der HE-Färbungen wurde außerdem die Degradation der Materialien analysiert. Das Integra[®]-Transplantat degradiert langsamer als MO- oder MU-Amnionmembran, was durch die höhere Anzahl an Fremdkörperriesenzellen und phagozytierenden Zellen in den mit Integra[®] behandelten Wunden im Vergleich zu den HAM-Behandlungsgruppen gezeigt werden konnte. Dies führen wir auf die Materialkomponenten, aus welchen sich Integra[®] zusammensetzt, zurück. In Zusammenschau mit den klinischen Ergebnissen bezüglich des postoperativen Verlaufs und der Wundkontraktion sprechen diese Resultate für ein stabiles Gleichgewicht zwischen der Biodegradation und der mechanischen Stabilität der Amnionmembran (Kesting, M.R., et al., 2009, S. 930). Die Gewebeneubildung wird während der inflammatorischen Reaktion auf das Transplantatmaterial dadurch unterstützt (Mikos, A.G., et al., 1998, S. 111).

Weiterhin untersuchten wir die Biopsate auf Nekrosen. Basierend auf unseren Ergebnissen sollte die Anzahl der Amnionmembranschichten bei der MU-Technik von 5 auf 4 oder 3 Schichten reduziert werden, um die oberflächliche Nekrose, welche in den obersten 2 Schichten zu beobachten war, zu vermeiden, ohne Einschränkungen der mechanischen Stabilität zu verursachen.

Darüber hinaus wurde anhand der HE-Färbungen die Epitheldicke vermessen. Anhand der Analyse der Epitheldicke lassen sich Aussagen zu Narbenatrophien oder -hypertrophien treffen. Hypertrophe Narben entwickeln sich charakteristischerweise einige Wochen nach der Verletzung und sind anfangs gerötet und leicht irritierbar (Ladin, D.A., et al., 1995, S. 6). Über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten proliferiert das Narbengewebe weiter und nimmt an Dicke zu, bis eine statische Phase eintritt, bevor sich das Narbengewebe schrittweise hinsichtlich der Kriterien Erythem, Dicke und Grad der Irritierbarkeit circa ein Jahr nach der Verletzung zurückbildet (Muir, I.F., 1990, S. 61). In der vorliegenden Studie wurde bei allen Behandlungsgruppen am 20. Tag eine erhöhte Epitheldicke im Sinne einer Proliferation vermessen. Am 60. Tag wies die Int-Gruppe die höchste Epitheldicke auf, die mit HAM versorgten Defekte lagen im Mittelfeld und die SH-Gruppe zeigte die geringste Epitheldicke. Narbige Atrophien waren nicht zu beobachten. Der Nachteil der HAM-Behandlungsgruppen gegenüber der SH-Gruppe ist durch die geringere mechanische Stabilität der HAM im Vergleich zu einem

Spalthauttransplantat und die daraus resultierende physikalische Irritation des Wundbetts zu erklären. Aufgrund dieser Faktoren fiel die Hypertrophie bei den MU-Wunden geringer aus als bei den MO-Wunden, da die multilayer Anwendung Vorteile gegenüber der monolayer Verwendung im Hinblick auf die mechanischen Eigenschaften aufweist. Die im Vergleich zur Int-Behandlungsgruppe geringere narbige Hypertrophie bei der Behandlung mit HAM ist auf die antiinflammatorischen Wirkungen (Hao, Y., et al., 2000, S. 348; Lee, S.H., et al., 1997, S. 303; Tseng, S.C., et al., 1999, S. 325) und die Beschleunigung der Reepithelisierung durch die Amnionmembran (Lo, V., et al., 2009, S. 935) zurückzuführen, wodurch die Narbenbildung gehemmt wird. Branski et al. führten eine Studie über Verwendung von Amnionmembran zur Behandlung oberflächlicher Verbrennung im Gesicht bei Kindern durch, wobei eine Gruppe mit Amnionmembran behandelt wurde, die andere erhielt topisch antimikrobielle Wundauflagen. Die Entwicklung hypertropher Narben fiel in dieser Studie bei beiden Behandlungsgruppen gleich aus (Branski, L.K., et al., 2008, S. 393). Im Gegensatz zu unserer Studie erfolgte jedoch nur eine klinische Beurteilung und keine histologische Analyse der Hypertrophie, zumal bei der Ergebnisinterpretation die unterschiedlichen Wundmorphologien beachtet werden müssen.

EvG. Hinsichtlich der Anordnung der Kollagenfibrillen, welche wir anhand der EvG-Färbungen untersuchten, ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die verwendeten Materialien in den Auswirkungen auf die Elastizität des entstehenden Narbengewebes nicht unterscheiden.

5.5. Immunhistologische Analyse

Ki-67. Wir untersuchten die Keratinozytenaktivierung bei der Transplantatheilung mittels Ki-67. Ki-67 reagiert mit einem nukleären Antigen, das von Zellen in der G1-, S-, M- und G2-Phase des Zellzyklus exprimiert wird und ist folglich ein Marker für proliferierende Zellen (Knaggs, H.E., et al., 1994, S. 89; Shimizu, T., et al., 1997, S. 224). Die Keratinozytenproliferation spielt im frühen Wundheilungsprozess eine

wichtige Rolle für das epitheliale Remodeling (Usui, M.L., et al., 2005, S. 468) und ist außerdem ein wichtiger Faktor bei der Entstehung hypertropher Narben: Andriessen et al. zeigten in einer Studie zur immunhistochemischen Beurteilung hypertropher Narben, eine erhöhte Proliferationsrate basaler Keratinozyten in drei Monate alten hypertrophen Narben im Vergleich zu nicht hypertrophen Narben (Andriessen, M.P., et al., 1998, S. 192). Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF-alpha, KGF, HGF, bFGF, TGF-beta-1, -beta-2, -beta-3 und die daraus folgende Keratinozytenaktivierung durch die Amnionmembran werden eine Förderung der Reepithelisierung und damit eine Beschleunigung der Wundheilung erreicht (Koizumi, N.J., et al., 2000, S. 173; Lo, V., et al., 2009, S. 935; Young, C.M., et al., 1980, S. 182).

Auch in der hier vorliegenden Studie waren die mit Amnionmembran versorgten Behandlungsgruppen klinisch wie histologisch den übrigen Wunden bezüglich des zeitlichen Verlaufs und dem Zeitpunkt der Reepithelisierung überlegen, was mittels der Ki-67-Färbung zusätzlich bestätigt werden konnte. Der hohe Proliferationsindex der VH/MU-Gruppe an Tag 10 spricht für eine gesteigerte Keratinozytenaktivität und somit für ein effektives epitheliales Remodeling, welches einen wichtigen Faktor in der frühen Phase der Wundheilung darstellt. Dieses war in der MO-Gruppe weniger stark ausgeprägt. Zudem war in der MU-Gruppe ein deutlicher Rückgang des Proliferationsindex bis zum 60. postoperativen Tag zu beobachten, was für eine beschleunigte Wundheilung spricht. Der niedrige Index in beiden Behandlungsgruppen am 60. Tag spricht gegen eine Narbenhypertrophie. Diese Ergebnisse erklären wir sowohl durch die Beschleunigung der Reepithelisierung aufgrund der von der Amnionmembran freigesetzten Wachstumsfaktoren und die Signaltransduktion beeinflussenden Proteine wie z.B. Fibronectin (Lo, V., et al., 2009, S. 937) sowie die antimikrobiellen Proteine (Kanyshkova, T.G., et al., 2001, S. 2; Splichal, I., et al., 2001, S. 345), als auch durch die den postoperativen Verlauf begünstigenden antiinflammatorischen Eigenschaften (Hao, Y., et al., 2000, S. 348; Lee, S.H., et al., 1997, S. 303; Tseng, S.C., et al., 1999, S. 325). Die Ergebnisse unserer Studie stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Mostaque et al., die in ihrer Studie die Effekte von Amnionmembran im Vergleich zu Silber-Sulfadiazin auf den Wundheilungsverlauf von Verbrennungswunden bei Kindern untersuchten. Neben zahlreichen anderen Vorteilen der Amnionmembran wurde anhand klinischer Evaluation der Brandwunden eine signifikante Beschleunigung der Reepithelisierung

durch die Amnionmembran bewiesen (Mostaque, A.K., et al., 2011, S. 200). Integra® hingegen führte zu einer bis zum 60. Tag aufrecht erhaltenen, starken Keratinozytenaktivierung, was eine hypertrophe Vernarbung vermuten lässt und auch die Ergebnisse unserer Untersuchungen der Wundkontraktion bestätigt, welche die höchste Kontraktion bei der Integra®-Behandlungsgruppe zeigten. In einer Studie von Druecke et al. zur Beeinflussung der Wundheilungsprozesse durch verschiedene Deckungsmaterialien an Göttinger Minipigs wurde für die mit Integra® versorgten Defekte ein ähnlich hoher Proliferationsindex (0,2 +/- 0,05) wie in der vorliegenden Studie erfasst (Druecke, D., et al., 2004, S. 520). Die Ergebnisse der Ki-67-Färbungen werden von den Resultaten der hier durchgeführten Epithelmessungen weiter bekräftigt, welche höhere Werte in der Integra®-Gruppe im Vergleich zu den HAM-Behandlungsgruppen zeigten. Dadurch wird eine hypertrophe Narbenbildung bei Anwendung von Integra® weiter bestätigt.

Laminin. Eine regelrechte Reepithelisierung erfordert nicht nur den Verschluss der Wundoberfläche mit einer Keratinozytenschicht, sondern auch die vollständige Wiederherstellung der Basalmembran, welche entscheidend ist für die Integrität und die Funktionsfähigkeit der Haut. Die Basalmembran, welche hauptsächlich aus Kollagen Typ IV und Laminin besteht, gewährleistet eine Demarkation und Kohäsion zwischen den epidermalen und den dermalen Schichten (Yates, C., et al., 2009, S. 34) und durchläuft nach einer Hautverletzung einen Reifungsprozess hinsichtlich ihrer Kontinuität und ihrer Komponenten, die von Fibroblasten und Keratinozyten gebildet werden (El Ghalbzouri, A., et al., 2004, S. 359). Andree et al. führten eine tierexperimentelle Studie am Schwein zur Basalmembranbildung während der Wundheilung durch. Dazu wurden Vollhautwunden mit verschiedenen epidermalen Transplantaten gedeckt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Abhängigkeit zwischen dem Zeitpunkt der vollständigen Regeneration der Basalmembran und der Art des Transplantates besteht (Andree, C., et al., 2001, S. 97). Die vorliegende Studie beweist mittels der anti-Laminin-Immunhistochemie eine Beschleunigung der Basalmembranbildung durch die multilayer Anwendung HAM im Vergleich zu der Deckung mittels eines Spalthauttransplantates. In der MU-Behandlungsgruppe zeigte sich am 20. postoperativen Tag eine durchgängig ausgebildete Basalmembran, wohingegen diese in der SH-Gruppe nur partiell ausgebildet war. Dies führen wir auf die von der Amnionmembran sezernierten Wachstumsfaktoren zurück, welche eine

Keratinozytenaktivierung und somit eine beschleunigte Neubildung der Komponenten der Basalmembran bewirken. Die Integra®-Behandlungsgruppe zeigte bei dieser Analyse jedoch noch bessere Ergebnisse, da die Integrität der Basalmembran bereits am 10. postoperativen Tag erreicht war. Diese Ergebnisse müssen in Zusammenschau mit den Proliferationsindizes der frühen Phase der Wundheilung interpretiert werden, welche Aussagen über die Intensität des epithelialen Remodellings erlauben. VH/MU und VH/Int zeigen ohne signifikanten Unterschied zueinander die höchsten Proliferationsindizes und wirken sich demzufolge positiv auf das epitheliale Remodeling und die Basalmembranbildung aus. Wir nehmen deshalb an, dass die von der HAM sezernierten Wachstumsfaktoren besonders bei der Anwendung von Amnionmembran in der Multilayer-Technik einen positiven Einfluss auf den Wundheilungsprozess haben. Somit wird aufgrund der beschleunigten Wiederherstellung der Basalmembran bei der Verwendung von Multilayer-HAM als Transplantatmaterial auch die Funktionsfähigkeit der Haut schneller wieder gewährleistet.

vWF. Noch nicht ausreichend geklärt sind die Effekte der HAM auf die Angiogenese. Die Angiogenese ist eine entscheidende Determinante für den Erfolg oder das Scheitern zahlreicher chirurgischer Prozeduren und bezeichnet das Aussprossen neuer Kapillaren aus bereits existierenden Blutgefäßen (Eming, S.A., et al., 2007, S. 115). Man geht davon aus, dass eine insuffiziente vaskuläre Versorgung aufgrund von verzögerter Angiogenese der entscheidende Faktor für die Pathogenese einer Transplantatnekrose ist (Akhavani, M.A., et al., 2008, S. 1425). Ungeachtet der zugrunde liegenden Pathologie ist ein typisches Merkmal chronischer, nicht heilender Wunden eine verminderte Bildung von Granulationsgewebe und damit geringeres vaskuläres Wachstum. Die genaue Regulation der Angiogenese nach einer kutanen Verletzung ist noch nicht ausreichend gesichert, da sie ein komplexer Vorgang ist, der durch die Interaktion von Endothelzellen mit angiogenetischen Faktoren wie VEGF und Molekülen der extrazellulären Matrix reguliert wird (Eming, S.A., et al., 2007, S. 115). Hao et al. konnten mittels PCR die Expression von Thrombospondin-1, einem antiangiogenetischen Protein, in allen epithelialen und circa 20% der mesenchymalen Zellen der Amnionmembran nachweisen. Außerdem wurde die mRNA-Expression der Metalloproteinaseinhibitoren TIMP-1, -2, -3 und -4 gezeigt, welche ebenfalls einen starken antiangiogenetischen Effekt besitzen (Hao, Y., et al.,

2000, S. 348). Kim et al. zeigten in einer tierexperimentellen Studie an Kaninchen, dass nach Keratektomie die Revaskularisation einer massiv geschädigten Cornea seltener auftritt, wenn diese mit Amnionmembran gedeckt wurde (Kim, J.C., et al., 1995, S. 32). Andere Arbeiten, in denen meist frische Amnionmembran in extraokuläre Regionen transplantiert wurde, zeigen jedoch Anzeichen für eine Neoangiogenese. Studien von Bennett et al. und Faulk et al. zur Verwendung von Amnionmembran für die Deckung von Beinulzera befürworteten einen proangiogenetischen Effekt der Amnionmembran, da eine frühere Bildung von Granulationsgewebe im Vergleich zu mit Hauttransplantaten gedeckten Ulzera beobachtet wurde (Bennett, J.T., et al., 1980, S. 1153; Faulk, W.P., et al., 1980, S. 1156). Rinastiti et al. führten eine Studie zur Versorgung von Gingivawunden an Kaninchen durch. Die histologische Analyse zeigte, dass die Anzahl der Blutgefäße in der mit Amnionmembran versorgten Behandlungsgruppe höher war als in der Kontrollgruppe (Rinastiti, M., et al., 2006, S. 247). Auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie sprechen eher für einen proangiogenetischen Effekt der Amnionmembran. So zeigten beide HAM-Behandlungsgruppen sowie die Int-Gruppe am 10. postoperativen Tag höhere Gefäßzahlen als die Kontrollgruppe und als die SH-Behandlungsgruppe. Darüber hinaus war die Vaskularisation in der MU-Gruppe signifikant höher als in der MO-Gruppe ($p = 0,0198$). Die Überlegenheit der MU-Technik gegenüber der MO-Anwendung in Bezug auf die proangiogenetischen Eigenschaften führen wir auf die höhere Konzentration freigesetzter Wachstumsfaktoren wie VEGF, welche die Angiogenese fördern, sowie auf die langsamere Degradation des MU-Patches zurück. Jedoch fiel die Gefäßproliferation sowohl in der MO-, als auch in der MU-Behandlungsgruppe signifikant geringer aus als dies in den mit Integra[®] versorgten Defekten der Fall war. Eine Erklärung dafür könnten die bereits erwähnten höheren Entzündungsreaktionen mit reaktiver Hyperämie und Gefäßeinprossung sein. Eine Hypoxie während dieser Entzündungsphase kann zur Produktion des Transkriptionsfaktors HIF (hypoxia inducible factor) in den unterversorgten Zellen führen, welcher die Freisetzung von VEGF und damit die Angiogenese fördert (Lu, X., et al., 2010, S. 5928). Dagegen ist die Amnionmembran sauerstoffpermeabel (Yoshita, T., et al., 2004, S. 486), wodurch freier Sauerstoff in das Wundbett diffundieren kann, was den Heilungsprozess insgesamt beschleunigt. Wir gehen davon aus, dass die Konzentration der aus HAM

freigesetzten proangiogenetischen Wachstumsfaktoren geringer ist als die durch Hypoxie induzierte Freisetzung von VEGF in den mit Integra versorgten Wunden.

α SMA. Ein weiterer Vorteil der Amnionmembran ist die Reduktion der Bildung von Narbengewebe. Dieser positive Einfluss auf die Narbenbildung wird auf die Beschleunigung der Reepithelisierung, die antiinflammatorischen Eigenschaften und die Verhinderung von Fibrosierung und Adhäsion zurückgeführt (Kim, J.S., et al., 2000, S. 329). Zur immunhistologischen Quantifizierung der Vernarbung führten wir eine anti- α SMA-Färbung durch. Darby et al. führten eine Studie zur Beeinflussung der Wundheilung von Vollhautwunden durch Deckung mit Hauttransplantaten durch, in der mittels verschiedener immunhistologischer Marker, unter anderem α SMA, bewiesen wurde, dass die Versorgung von Vollhautwunden mittels eines Hauttransplantates das Geweberemodelling induziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Biospsien nach Deckung mit einem Transplantat eine geringere α SMA-Expression zeigten als zuvor, was auf eine verminderte Expression von Wachstumsfaktoren und einen erhöhten Turnover der extrazellulären Matrix während der Remodelling-Phase zurückgeführt wird (Darby, I.A., et al., 2002, S. 117). Fraser et al. behandelten in einer Studie Brandwunden am Merino-Schaf mit Amnionmembran und konnten sowohl klinisch ein besseres ästhetisches Ergebnis, als auch immunhistologisch mittels α -SMA eine verminderte Narbenbildung im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (Fraser, J.F., et al., 2009, S. 998). In der vorliegenden Studie zeigten die HAM-Behandlungsgruppen bei der immunhistologischen Beurteilung mittels anti- α SMA-Färbung in der frühen Phase der Wundheilung bis zum 20. postoperativen Tag erniedrigte Zahlen α SMA-positiver Myofibroblasten gegenüber den übrigen Behandlungsgruppen. In der fortgeschrittenen Wundheilungsphase bis zum 60. postoperativen Tag konnte jedoch bei den HAM-Behandlungsgruppen nur eine geringe relative Reduktion der α SMA-positiven Myofibroblasten verzeichnet werden, wohingegen in den übrigen Gruppen ein deutlicher Rückgang zu beobachten war. Die Integra[®]-Gruppe zeigte ähnliche Werte wie die HAM-Behandlungsgruppen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der Einfluss der Amnionmembran auf die Remodeling-Prozesse mit anhaltender Expression von Wachstumsfaktoren wie oben bereits diskutiert wurde. Darby et al. nehmen an, dass eine niedrigere Expression von Wachstumsfaktoren nach Hauttransplantation für einen geringeren Gehalt an α SMA verantwortlich sein kann

(Darby, I.A., et al., 2002, S. 117). Allerdings stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu Ergebnissen der Studie von Fraser et al., in der am Ende des Beobachtungszeitraumes in den Amnionmembran-Behandlungsgruppen die signifikant geringsten Werte α SMA-positiver Myofibroblasten und damit die geringste Narbenbildung nachgewiesen werden konnte (Fraser, J.F., et al., 2009, S. 998). Bei der Interpretation unserer Ergebnisse müssen sowohl die autologe im Vergleich zur allogenen Transplantation als auch die unterschiedliche Wundmorphologie zwischen Verbrennungen und Vollhautwunden beachtet werden. Während unseres Beobachtungszeitraumes wurde keine Reduktion der α SMA-Expression in den HAM-Behandlungsgruppen festgestellt, auch die absoluten Werte an α SMA-positiver Myofibroblasten waren am 60. postoperativen Tagen in den HAM-Gruppen am höchsten. Diese Ergebnisse alleine würden dafür sprechen, dass die Vernarbung sowohl in der VH/SH- als auch in der VH/NT-Gruppe geringer ist als bei der Verwendung von HAM und Integra[®], stehen jedoch im Widerspruch zu unseren klinischen Resultaten bezüglich der Wundkontraktion, welche die geringsten Kontraktionen in der VH/MU-Gruppe ergaben. Dies führen wir darauf zurück, dass die 5 mm tiefen Biopsate eher die Fibroblasten aus den oberflächlichen Schichten erfassen, nicht jedoch aus tieferen Bereichen, von welchen angenommen wird, dass diese mehr α SMA exprimieren und für die Entstehung hypertropher Narben und Kontraktionen die dominante Rolle spielen (Wang, J., et al., 2008, S. 1278). In Folgestudien sollten daher in Abhängigkeit von dem Wundtyp und dem Wundmodell tiefere Biopsien entnommen werden, um ein Gesamtbild der Fibroblastenpopulation zu erfassen.

6. Zusammenfassung

Die Hauttransplantation ist eine unverzichtbare Methode in der plastischen und wiederherstellenden Chirurgie zur Weichgeweberekonstruktion größerer traumatischer, chronischer oder iatrogener Hautdefekte. Trotz der Vielzahl der bereits existierenden Behandlungsmöglichkeiten zur Deckung der Transplantatentnahmestelle, der sog. Donor site, konnte speziell für Wunden, die keiner primären Wundheilung mehr zugeführt werden können, bisher noch keine optimale Lösung gefunden werden.

In dieser Studie wurde die Verwendung kryokonservierter, ein- und mehrschichtiger HAM als alternatives Transplantatmaterial zur Versorgung iatrogener Vollhautwunden am Minipigmodell untersucht. Ziel dieser Machbarkeitsstudie war es, die HAM für einen Einsatz am Menschen tierexperimentell zu untersuchen, um sie letztendlich als Ersatz für Hauttransplantate verwenden zu können. Damit könnte nicht nur eine Reduktion der primären Morbidität freier Transplantate an der Empfängerstelle erreicht werden, sondern auch die sekundäre Morbidität der Entnahmestelle gänzlich vermieden werden, da eine Spalthautentnahme für die Abdeckung der Vollhautwunde durch die Amnionmembran nicht mehr von Nöten ist. An vier Minischweinen wurden operativ insgesamt 40 Vollhautwunden am Rücken der Tiere gesetzt und anschließend mit einem Spalthauttransplantat alleine oder in Kombination mit ein- oder mehrlagiger HAM oder mit Integra[®], einem üblichen Hautersatzmaterial, gedeckt. Als Kontrollwunden dienten nicht behandelte Defekte, welche lediglich durch die Einlage steriler Jodkompressen versorgt wurden. Die klinische Evaluierung erfolgte über den gesamten postoperativen Beobachtungszeitraum, die Biopsieentnahmen wurden am 5., 7., 10., 20., 40. und 60. postoperativen Tag durchgeführt.

Mehrlagige HAM führte im Vergleich zu Integra[®] zu einer verringerten Wundkontraktion, zu einer Beschleunigung der Reepithelisierung und zu einer histologisch nachweislich geringeren narbigen Hypertrophie. Im Vergleich zur Deckung mit einem Spalthauttransplantat alleine zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im klinischen Verlauf hinsichtlich Transplantatannahme, Wundkontraktion und makroskopische Narbenbildung. Die multilayer Technik wies

bessere Ergebnisse als Integra® und als die monolayer Anwendung in Bezug auf Wundkontraktion, postoperative Inflammationsreaktionen und Vernarbung auf.

Diese Studie zeigt die erfolgreiche Anwendung von HAM als Teil eines Composite-Grafts zur Deckung von Vollhautentnahmestellen bei Mischweinen. Die Ergebnisse stellen mit der Verwendung von multilayer HAM eine einfache und effektive sowie die Wundheilungsprozesse beschleunigende Technik zur Versorgung iatrogenen Hautdefekte in Aussicht. Aufbauende Studien sind jedoch nötig, um die Frage zu beantworten, ob mehrlagige HAM auch ohne zusätzliche Deckung mittels eines Spalthauttransplantats für die Defektdeckung von Vollhautwunden einsetzbar ist. Wenn dies der Fall wäre, dann würde die HAM die klinischen Anforderungen für die Versorgung iatrogenen Vollhautdefekte wie beispielsweise der donor site des Radialis- oder des Fibulatransplantates erfüllen.

7. Summary

Skin transplantation is an indispensable method in plastic and reconstructive surgery in order to reconstruct traumatic, chronic or iatrogenic skin defects. Despite a multiplicity of already existing supplies for the donor site an ideal solution has not yet been found.

We evaluated the use of monolayer and multilayer human amniotic membrane (HAM) as an alternative graft material for the treatment of iatrogenic full-thickness (FT) skin wounds in a porcine model with a view to reducing donor site morbidity in free flap transfer. Forty experimental FT-wounds were created on the back of four Berlin minipigs and subsequently covered with an autologous split-thickness skin graft (STSG) alone or in combination with a mono- or multilayer HAM or Integra[®], a well-reviewed collagen-based dermal substitute. Untreated wounds in each minipig served as controls. Clinical evaluation and biopsy-sampling for histological and immunohistochemical staining with von Willebrand factor (vWF) antibody, laminin antibody, Ki67 antibody and alpha-smooth muscle actin (α SMA) antibody were performed on days 5, 7, 10, 20, 40 and 60 after surgical intervention.

The multilayered amnion membrane showed better results than the Integra[®] and monolayer technique in terms of contraction rate, inflammation, and clinical scarring and seemed useful as a dermal substitute in FT-wounds giving comparable results to STSG coverage alone.

This study demonstrates the successful application of HAM as a part of a skin substitute in FT wounds in minipigs. The results offer promise as a simple and effective technique for the application of multilayer HAM in iatrogenic human skin defects and the acceleration of wound healing. Further investigations and longer term observations are needed to answer the question of whether multilayered HAM is also useful when used alone without the additional covering with a STSG. If this is the case, then it would meet the clinical requirements for the repair of iatrogenic FT-defects in reconstructive procedures, such as donor sites of the free radial or fibular flap.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Abraham, D.J., Shiwen, X., Black, C.M., Sa, S., Xu, Y., Leask, A.
Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts
J Biol Chem. 275(20) (2000) 15220-15225

- 2 Adams, D.C. and Ramsey, M.L.
Grafts in dermatologic surgery: review and update on full- and split-thickness skin grafts, free cartilage grafts, and composite grafts
Dermatol Surg. 31(8) (2005) 1055-1067

- 3 Adinolfi, M., Akle, C.A., McColl, I., Fensom, A.H., Tansley, L., Connolly, P., Hsi, B.L., Faulk, W.P., Travers, P., Bodmer, W.F.
Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells
Nature 295(5847) (1982) 325-327

- 4 Akhavani, M.A., Sivakumar, B., Paleolog, E.M., Kang, N.
Angiogenesis and plastic surgery
J Plast Reconstr Aesthet Surg. 61(12) (2008) 1425-1437

- 5 Akle, C.A., Adinolfi, M., Welsh, K.I., Leibowitz, S., McColl, I.
Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers
Lancet 2(8254) (1981) 1003-1005

- 6 Andreassi, A., Bilenchi, R., Biagioli, M., D'Aniello, C. "
Classification and pathophysiology of skin grafts
Clin Dermatol. 23(4) (2005) 332-337

- 7 Andree, C., Reimer, C., Page, C.P., Slama, J., Stark, B.G., Eriksson, E.

- Basement membrane formation during wound healing is dependent on epidermal transplants
Plast Reconstr Surg. 107(1) (2001) 97-104
- 8 Andriani, F., Margulis, A., Lin, N., Griffey, S., Garlick, J.A.
Analysis of microenvironmental factors contributing to basement membrane assembly and normalized epidermal phenotype
J Invest Dermatol. 120(6) (2003) 923-931
- 9 Andriessen, M.P., Niessen, F.B., Van de Kerkhof, P.C., Schalkwijk, J.
Hypertrophic scarring is associated with epidermal abnormalities: an immunohistochemical study
J Pathol. 186(2) (1998) 192-200
- 10 Archambeau, J.O., Bennett, G.W.
Quantification of morphologic, cytologic, and kinetic parameters of unirradiated swine skin: a histologic model
Radiat Res. 98(2) (1984) 254-273
- 11 Bennett, J.P., Matthews, R., Faulk, W.P.
Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion
Lancet 1(8179) (1980) 1153-1156
- 12 Benson-Martin, J., Zammaretti, P., Bilic, G., Schweizer, T., Portmann-Lanz, B., Burkhardt, T., Zimmermann, R., Ochsenbein-Kolble, N.
The Young's modulus of fetal preterm and term amniotic membranes
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 128(2) (2006) 103-107
- 13 Bogic, L.V., Brace, R.A., Cheung, C.Y.
Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes
Placenta 21(2) (2000) 203-209

- 14 Bonetti, M.I., Pieri, L., Domenici, L., Urbani, S., Romano, G., Aldinucci, A., Ballerini, C., Monici, M., Saccardi, R., Basile, V., Bosi, A., Romagnoli, P.
Dendritic cells with lymphocyte-stimulating activity differentiate from human CD133 positive precursors
Blood 117(15) (2011) 3983-3995
- 15 Bourne, G.L.
The microscopic anatomy of the human amnion and chorion
Am J Obstet Gynecol. 79(6) (1960) 1070-1073
- 16 Branski, L.K., Herndon, D.N., Celis, M.M., Norbury, W.B., Masters, O.E., Jeschke, M.G.
Amnion in the treatment of pediatric partial-thickness facial burns
Burns 34(3) (2008) 393-399
- 17 Brindeau, A.
Création d'un vagin artificiel à l'aide des membranes ovulaires d'un oeuf à terme
Gynéc et obstétr. 29(1) (1934) 385
- 18 Broughton, G., 2nd, Janis, J.E., Attinger, C.E.
The basic science of wound healing
Plast Reconstr Surg. 117(7) (2006) 12-34
- 19 Burger, K.
Artificial vaginal reconstruction with the help of amnios
Zentralblatt für Gynäkol. (1937) 2437-2440
- 20 Burgos, H.
Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta
Eur J Clin Invest. 13(4) (1983) 289-296
- 21 Campitiello, E., Della Corte, A., Fattopace, A., D'Acunzi, D., Canonico, S.

- The use of artificial dermis in the treatment of chronic and acute wounds: regeneration of dermis and wound healing
Acta Biomed. 76(1) (2005) 69-71
- 22 Chao, Y., Humphreys, S., Penfield, W.
A new method of preventing adhesions. The use of amnioplastin after craniotomy
Br Med J. 1(4134) (1940) 517-538
- 23 Cho, C.Y., Lo, J.S.
Dressing the part
Dermatol Clin. 16(1) (1998) 25-47
- 24 Dantzer, E., Queruel, P., Salinier, L., Palmier, B., Quinot, J.F.
Integra, a new surgical alternative for the treatment of massive burns. Clinical evaluation of acute and reconstructive surgery: 39 cases
Ann Chir Plast Esthet. 46(3) (2001) 173-189
- 25 Darby, I.A., Bisucci, T., Pittet, B., Garbin, S., Gabbiani, G., Desmouliere, A.
Skin flap-induced regression of granulation tissue correlates with reduced growth factor and increased metalloproteinase expression
J Pathol. 197(1) (2002) 117-127
- 26 Davis, J.
Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital
Johns Hopkins Hospital Report 15 (1910) 310
- 27 DeRötth, A.
Plastic repair of conjunctival defects with amniotic membranes
Arch Ophthalmol. 23 (1940) 522
- 28 Desmouliere, A., Chaponnier, C., Gabbiani, G.
Tissue repair, contraction, and the myofibroblast
Wound Repair Regen. 13(1) (2005) 7-12

- 29 Dhall, K.
Amnion graft for treatment of congenital absence of the vagina
Br J Obstet Gynaecol. 91(3) (1984) 279-282
- 30 Douglas, B.
Homografts of fetal membranes as a covering for large wounds, especially those from burns. An experimental and clinical study
J Tn State Med Assoc. 45(6) (1952) 230-235
- 31 Downing, D.T.
Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis
J Lipid Res. 33(3) (1992) 301-313
- 31 Driss, V., Legrand, F., Loiseau, S., Capron, M.
Eosinophil: a new effector of innate immunity?
Med Sci. 26(7) (2010) 621-626
- 32 Druecke, D., Lamme, E.N., Hermann, S., Pieper, J., May, P.S., Steinau, H.U., Steinstraesser, L.
Modulation of scar tissue formation using different dermal regeneration templates in the treatment of experimental full-thickness wounds
Wound Repair Regen. 12(5) (2004) 518-527
- 33 Dua, H.S., Gomes, J.A., King, A.J., Maharajan, V.S.
The amniotic membrane in ophthalmology
Surv Ophthalmol. 49(1) (2004) 51-77
- 34 Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I., Moolenaar, W.H.
The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets
Biochem J. 291(3) (1993) 677-680
- 35 El Ghalbzouri, A., Ponec, M.

- Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components
Wound Repair Regen. 12(3) (2004) 359-367
- 36 Eming, S.A., Brachvogel, B., Odorisio, T., Koch, M.
Regulation of angiogenesis: wound healing as a model
Prog Histochem Cytochem. 42(3) (2007) 115-170
- 37 Faulk, W.P., Matthews, R., Stevens, P.J., Bennett, J.P., Burgos, H., Hsi, B.L.
Human amnion as an adjunct in wound healing
Lancet 1(8179) (1980) 1156-1158
- 38 Fraser, J.F., Cuttle, L., Kempf, M., Phillips, G.E., Hayes, M.T., Kimble, R.M.
A randomised controlled trial of amniotic membrane in the treatment of a standardised burn injury in the merino lamb
Burns 35(7) (2009) 998-1003
- 39 Fukuda, K., Chikama, T., Nakamura, M., Nishida, T.
Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva
Cornea 18(1) (1999) 73-79
- 40 Gajiwala, K., Gajiwala, A.L.
Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing
Cell Tissue Bank 5(2) (2004) 73-80
- 41 Georgy, M.
Vaginoplasty using amnion graft: new surgical technique using the laparoscopic transillumination light
J Obstet Gynaecol. 16(1) (1996) 262-264
- 42 Goetzl, E.J., An, S.

- Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate
FASEB J. 12(15) (1998) 1589-1598
- 43 Goldman, R.
Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future
Adv Skin Wound Care. 17(1) (2004) 24-35
- 44 Gomes, J.A., Romano, A., Santos, M.S., Dua, H.S.
Amniotic membrane use in ophthalmology
Curr Opin Ophthalmol. 16(4) (2005) 233-240
- 45 Goodrich, L.R., Moll, H.D., Crisman, M.V., Lessard, P., Bigbie, R.B.
Comparison of equine amnion and a nonadherent wound dressing material for bandaging pinch-grafted wounds in ponies
Am J Vet Res. 61(3) (2000) 326-329
- 46 Gray, G.M., White, R.J., Williams, R.H., Yardley, H.J.
Lipid composition of the superficial stratum corneum cells of pig epidermis
Br J Dermatol. 106(1) (1982) 59-63
- 47 Grinnell, F.
Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices
Trends Cell Biol. 13(5) (2003) 264-269
- 48 Grueterich, M., Espana, E.M., Tseng, S.C.
Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche
Surv Ophthalmol. 48(6) (2003) 631-646
- 49 Hao, Y., Ma, D.H., Hwang, D.G., Kim, W.S., Zhang, F.
Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane
Cornea 19(3) (2000) 348-352

- 50 Hasegawa, T., Mizoguchi, M., Haruna, K., Mizuno, Y., Muramatsu, S., Suga, Y., Ogawa, H., Ikeda, S.
Amnia for intractable skin ulcers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: report of three cases
J Dermatol. 34(5) (2007) 328-332
- 51 Heinrich, W., Lange, P.M., Stirtz, T., Iancu, C., Heidemann, E.
Isolation and characterization of the large cyanogen bromide peptides from the alpha1- and alpha2-chains of pig skin collagen
FEBS Lett. 16(1) (1971) 63-67
- 52 Hori, J., Wang, M., Kamiya, K., Takahashi, H., Sakuragawa, N.
Immunological characteristics of amniotic epithelium
Cornea 25(10) (2006) 53-58
- 53 Iijima, K., Igawa, Y., Imamura, T., Moriizumi, T., Nikaido, T., Konishi, I., Nishizawa, O.
Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats
Tissue Eng. 13(3) (2007) 513-524
- 54 Insausti, C.L., Alcaraz, A., Garcia-Vizcaino, E.M., Mrowiec, A., Lopez-Martinez, M.C., Blanquer, M., Pinero, A., Majado, M.J., Moraleda, J.M., Castellanos, G., Nicolas, F.J.
Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds
Wound Repair Regen. 18(4) (2010) 368-377
- 55 Jiang, A., Li, C., Gao, Y., Zhang, M., Hu, J., Kuang, W., Hao, S., Yang, W., Xu, C., Gao, G., Wang, Z., Liu, Z.
In vivo and in vitro inhibitory effect of amniotic extraction on neovascularization
Cornea 25(10) (2006) 36-40
- 56 Jimenez, P.A., Rampy, M.A.

- Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds
J Surg Res. 81(2) (1999) 238-242
- 57 John, T.
Human amniotic membrane transplantation: past, present, and future
Ophthalmol Clin North Am. 16(1) (2003) 43-65
- 58 Johnson, T., Zide, M.F.
Freehand full-thickness grafting for facial defects: a review of methods
J Oral Maxillofac Surg. 55(10) (1997) 1050-1056
- 59 Kanyshkova, T.G., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A.
Lactoferrin and its biological functions
Biochemistry 66(1) (2001) 1-7
- 60 Kesting, M.R., Loeffelbein, D.J., Classen, M., Slotta-Huspenina, J., Hasler, R.J., Jacobsen, F., Kreutzer, K., Al-Benna, S., Wolff, K.D., Steinstraesser, L.
Repair of oronasal fistulas with human amniotic membrane in minipigs
Br J Oral Maxillofac Surg. 48(2) (2009) 131-135
- 61 Kesting, M.R., Loeffelbein, D.J., Steinstraesser, L., Muecke, T., Demtroeder, C., Sommerer, F., Hoelzle, F., Wolff, K.D.
Cryopreserved human amniotic membrane for soft tissue repair in rats
Ann Plast Surg. 60(6) (2008) 684-691
- 62 Kesting, M.R., Wolff, K.D., Hohlweg-Majert, B., Steinstraesser, L.
The role of allogenic amniotic membrane in burn treatment
J Burn Care Res. 29(6) (2008) 907-916
- 63 Kesting, M.R., Wolff, K.D., Mucke, T., Demtroeder, C., Kreutzer, K., Schulte, M., Jacobsen, F., Hirsch, T., Loeffelbein, D.J., Steinstraesser, L.
A bioartificial surgical patch from multilayered human amniotic membrane-In vivo investigations in a rat model
J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 90(2) (2009) 930-938

- 64 Kim, J.C., Tseng, S.C.
The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas
Korean J Ophthalmol. 9(1) (1995) 32-46
- 65 Kim, J.S., Kim, J.C., Na, B.K., Jeong, J.M., Song, C.Y.
Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn
Exp Eye Res. 70(3) (2000) 329-337
- 66 Kim, S.S., Song, C.K., Shon, S.K., Lee, K.Y., Kim, C.H., Lee, M.J., Wang, L.
Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits
Cell Tissue Res. 336(1) (2009) 59-66
- 67 King, I.A., Tabiowo, A.
The dermis is required for the synthesis of extracellular glycosaminoglycans in cultured pig epidermis
Biochim Biophys Acta. 632(2) (1980) 234-243
- 68 Knaggs, H.E., Holland, D.B., Morris, C., Wood, E.J., Cunliffe, W.J.
Quantification of cellular proliferation in acne using the monoclonal antibody Ki-67
J Invest Dermatol. 102(1) (1994) 89-92
- 69 Koizumi, N.J., Inatomi, T.J., Sotozono, C.J., Fullwood, N.J., Quantock, A.J., Kinoshita, S.
Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane
Curr Eye Res. 20(3) (2000) 173-177
- 70 Kopp, J., Seyhan, H., Muller, B., Lanczak, J., Pausch, E., Gressner, A.M., Dooley, S., Horch, R.E.
N-acetyl-L-cysteine abrogates fibrogenic properties of fibroblasts isolated from Dupuytren's disease by blunting TGF-beta signalling

- J Cell Mol Med. 10(1) (2006) 157-165
- 71 Kubo, M., Sonoda, Y., Muramatsu, R., Usui, M.
Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental
xenotransplantation
Invest Ophthalmol Vis Sci. 42(7) (2001) 1539-1546
- 72 Ladin, D.A., Garner, W.L., Smith, D.J., Jr.
Excessive scarring as a consequence of healing
Wound Repair Regen. 3(1) (1995) 6-14
- 73 Lawson, V.G.
Oral cavity reconstruction using pectoralis major muscle and amnion
Arch Otolaryngol. 111(4) (1985) 230-233
- 74 Lee, S.H., Tseng, S.C.
Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with
ulceration
Am J Ophthalmol. 123(3) (1997) 303-312
- 75 Ley-Chavez, E., Martinez-Prado, M., Roman, R.
Application of biological dressings from radiosterilized amnios with cobalt 60
and serologic studies on the handling of burns in pediatric patients
Ann Transplant. 8(4) (2003) 46-49
- 76 Li, H., Niederkorn, J.Y., Neelam, S., Mayhew, E., Word, R.A., McCulley, J.P.,
Alizadeh, H.
Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells
Invest Ophthalmol Vis Sci. 46(3) (2005) 900-907
- 77 Lo, V., Pope, E.
Amniotic membrane use in dermatology
Int J Dermatol. 48(9) (2009) 935-940

- 78 Lu, X., Kang, Y.
Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis
Clin Cancer Res. 16(24) (2010) 5928-5935
- 79 Malak, T.M., Ockleford, C.D., Bell, S.C., Dalgleish, R., Bright, N., Macvicar, J.
Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI
and their ultrastructural organization in term human fetal membranes
Placenta 14(4) (1993) 385-406
- 80 Maral, T., Borman, H., Arslan, H., Demirhan, B., Akinbingol, G., Haberal, M.
Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a
temporary biological dressing
Burns 25(7) (1999) 625-635
- 81 Martinez-Pardo, M., Reyes-Frias, M., Ramos-Duron, L.
Clinical application of amniotic membranes in a patient with epidermolysis
bullosa
Ann Transplant. 4(3-4) (1999) 68-73
- 82 Mehta, D., Daudia, A., Birchall, J.P., Banerjee, A.R.
The localization of matrix metalloproteinases-8 and -13 in cholesteatoma,
deep-meatal and post-auricular skin: a comparative analysis
Acta Otolaryngol. 127(2) (2007) 138-142
- 83 Mermet, I., Pottier, N., Sainthillier, J.M., Malugani, C., Cairey-Remonnay, S.,
Maddens, S., Riethmuller, D., Tiberghien, P., Humbert, P., Aubin, F.
Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg
ulcers
Wound Repair Regen. 15(4) (2007) 459-464
- 84 Meyer, W.
Bemerkungen zur Eignung der Schweinehaut als biologisches Modell für die
Haut des Menschen
Der Hautarzt 47(3) (1996) 178-182.

- 85 Meyer, W., Neurand, K.
Comparison of skin pH in domesticated and laboratory mammals
Arch Dermatol Res. 283(1) (1991) 16-18
- 86 Meyer, W., Schwarz, R., Neurand, K.
The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special
reference to the domestic pig
Curr Probl Dermatol. 7 (1978) 39-52
- 87 Mikos, A.G., McIntire, L.V., Anderson, J.M., Babensee, J.E.
Host response to tissue engineered devices
Adv Drug Deliv Rev. 33(1-2) (1998) 111-139
- 88 Militzer, K.
"Haut und Hautanhangsorgane kleiner Laboratoriumstiere Teil 1"
In: "Schriftenreihe Versuchstier Band 9"
Paney-Verlag, Berlin-Hamburg, 1982
- 89 Mostaque, A.K., Rahman, K.B.
Comparisons of the effects of biological membrane (amnion) and silver
sulfadiazine in the management of burn wounds in children
J Burn Care Res. 32(2) (2011) 200-209
- 90 Muir, I.F.
On the nature of keloid and hypertrophic scars
Br J Plast Surg. 43(1) (1990) 61-69
- 91 Müller, W.
Spalt- und Vollhautplastiken
Mund Kiefer Gesichtschir. 4 (2000) 314-321
- 92 Muralidharan, S., Gu, J., Laub, G.W., Cichon, R., Daloisio, C., McGrath, L.B.
A new biological membrane for pericardial closure
J Biomed Mater Res. 25(10) (1991) 1201-1209

- 93 Murube, L.R., Rebolleda, G., Candela, I., Murube, I., Sales-Sanz, M., García Pérez, J., Barroso, E., Chenzhuo, N. (2006)
Placenta, cordón umbilical y membrana amniótica en oftalmología,
(<http://www.oftalmo.com/studium/studium2006/stud06-2/06b-11.htm>)
Stand: 08.02.2012
- 94 Nathan, C.
Points of control in inflammation
Nature 420(6917) (2002) 846-852
- 95 Nguyen, D.Q., Potokar, T.S., Price, P.
An objective long-term evaluation of Integra (a dermal skin substitute) and split thickness skin grafts, in acute burns and reconstructive surgery.
Burns 36(1) (2009) 23-28
- 96 Nicolaidis, N., Fu, H.C., Rice, G.R.
The skin surface lipids of man compared with those of eighteen species of animals
J Invest Dermatol. 51(2) (1968) 83-89
- 97 O'Riley, M., Moehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.
Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth
Cell 88(2) (1997) 277-285
- 98 Ollier, L.
Sur les greffes cutanees ou autoplattiques
Bull Acad Med. 1 (1872) 243-256
- 99 Ozboluk, S., Ozkan, Y., Oztürk, A., Gül, N., Ozdemir, R., Yanik, K.
Human amniotic membrane and periostal autograft on tendon healing:
experimental study in rabbits
J Hand Surg Eur. 35(4) (2010) 26-268
- 100 Park, M., Kim, S., Kim, I.S., Son, D.

- Healing of a porcine burn wound dressed with human and bovine amniotic membranes
Wound Repair Regen. 16(4) (2008) 520-528
- 101 Penfield, W.
Amnioplastin: a warning
Br Med J. 1 (1940) 668
- 102 Petres, J. and Rompel, R.
Operative Dermatologie: Lehrbuch und Atlas
Springer Verlag, Heidelberg, 2006, 2. Auflage
- 103 Platt, A., McKiernan, M., McLean, N.
Free tissue transfer in the management of burns
Burns 22(6) (1996) 474-476
- 104 Plummer, C.E.
The use of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: a review and series of 58 equine clinical cases (2002-2008)
Vet Ophthalmol. 12(1) (2009) 17-24
- 105 Popescu, S., Ghetu, N., Grosu, O., Nastasa, M., Pieptu, D.
Integra--a therapeutic alternative in reconstructive surgery. Our first experience
Chirurgia 102(2) (2007) 197-204
- 106 Ramasastry, S.S.
Acute wounds
Clin Plast Surg. 32(2) (2005) 195-208
- 107 Ramsey, D.T., Pope, E.R., Wagner-Mann, C., Berg, J.N., Swaim, S.F.
Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs
Am J Vet Res. 56(7) (1995) 941-949

- 108 Rao, T.V., Chandrasekharam, V.
Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing
Arch Surg. 116(7) (1981) 891-896
- 109 Ratner, D.
Skin grafting. From here to there
Dermatol Clin. 16(1) (1998) 75-90
- 110 Ravishanker, R., Bath, A.S., Roy, R.
"Amnion Bank"-the use of long term glycerol preserved amniotic membranes
in the management of superficial and superficial partial thickness burns
Burns 29(4) (2003) 369-374
- 111 Reid, M.J., Currie, L.J., James, S.E., Sharpe, J.R.
Effect of artificial dermal substitute, cultured keratinocytes and split thickness
skin graft on wound contraction
Wound Repair Regen. 15(6) (2007) 889-896
- 112 Reverdin, J.
Grefe epidermique
Bull Soc Imp Chir. 10 (1869) 511-514
- 113 Riau, A.K., Beuerman, R.W., Lim, L.S., Mehta, J.S.
Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic
membrane for use in ocular surface reconstruction
Biomaterials 31(2) (2010) 216-225
- 114 Rinastiti, M., Harijadi, Santoso, A.L., Sosroseno, W.
Histological evaluation of rabbit gingival wound healing transplanted with
human amniotic membrane
Int J Oral Maxillofac Surg. 35(3) (2006) 247-251
- 115 Robert, L., Jacob, M.P., Fulop, T.
Elastin in blood vessels

- Ciba Found Symp. 192 (1995) 286-299
- 116 Rodríguez-Ares, M., Tourino, R., López-Valladares, M., Gude, F.
Multilayer amniotic membrane transplantation in the treatment of corneal perforations
Cornea 23(6) (2004) 577-583
- 117 Sabella, N.
Use of fetal membranes in skin grafting
Med Rec NY 83 (1913) 478
- 118 Schwartzendruber, D., Wertz, P., Kitko, D., Madison, K., Downing, D.
Molecular models of the intracellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum
J Invest Dermatol. 92 (1989) 251-257
- 119 Serhan, C.N., Chiang, N.
Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entree for resoleomics
Rheum Dis Clin North Am. 30(1) (2004) 69-95
- 120 Shimizu, T., Muto, M., Murakami, T., Furumoto, H., Mogami, S., Asagami, C.
Overexpression of p53 protein associated with proliferative activity as evaluated by Ki-67 immunostaining in well-differentiated squamous cell carcinoma of the skin
Dermatology 195(3) (1997) 224-227
- 121 Singh, R., Purohit, S., Chacharkar, M.P., Bhandari, P.S., Bath, A.S.
Microbiological safety and clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membranes for treatment of second-degree burns
Burns 33(4) (2007) 505-510

- 122 Solomon, A., Rosenblatt, M., Monroy, D., Ji, Z., Pflugfelder, S.C., Tseng, S.C.
Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix
Br J Ophthalmol. 85(4) (2001) 444-449
- 123 Sorsby, A., Symons, H.M.
Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (Burns of the second degree)
Br J Ophthalmol. 30 (1946) 337-345
- 124 Splichal, I., Trebichavsky, I.
Cytokines and other important inflammatory mediators in gestation and bacterial intraamniotic infections
Folia Microbiol. 46(4) (2001) 345-351
- 125 Squier, C.A., Hall, B.K.
The permeability of skin and oral mucosa to water and horseradish peroxidase as related to the thickness of the permeability barrier
J Invest Dermatol. 84(3) (1985) 176-179
- 126 Stephenson, A.J., Griffiths, R.W., La Hausse-Brown, T.P.
Patterns of contraction in human full thickness skin grafts
Br J Plast Surg. 53(5) (2000) 397-402
- 127 Stern, M.
The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated skin surfaces, substituting skin grafts
JAMA 60 (1913) 973
- 128 Sullivan, T.P., Eaglstein, W.H., Davis, S.C., Mertz, P.
The pig as a model for human wound healing
Wound Repair Regen. 9(2) (2001) 66-76
- 129 Suzuki, S., Itoh, K., Ohyama, K.

- An in-vivo experimental model for studying wound-healing after laser irradiation in the mouse foetus
J Craniomaxillofac Surg. 32(4) (2004) 193-198
- 130 Talmi, Y.P., Sigler, L., Inge, E., Finkelstein, Y., Zohar, Y.
Antibacterial properties of human amniotic membranes
Placenta 12(3) (1991) 285-288
- 131 Thiersch, C.
Ueber die feineren anatomischen Veraenderungen bei Aufheilung von Haut auf Granulation
Langenbecks Arch Klin Chir. 17 (1874) 318-324
- 132 Tseng, S.C., Li, D.Q., Ma, X.
Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix
J Cell Physiol. 179(3) (1999) 325-335
- 133 Tsukise, A., Meyer, W.
Histochemistry of complex carbohydrates in the hairy skin of the domestic pig
Histochem J. 15(9) (1983) 845-860
- 134 Usui, M.L., Underwood, R.A., Mansbridge, J.N., Muffley, L.A., Carter, W.G., Olerud, J.E.
Morphological evidence for the role of suprabasal keratinocytes in wound reepithelialization
Wound Repair Regen. 13(5) (2005) 468-479
- 135 van Zuijlen, P.P., van Trier, A.J., Vloemans, J.F., Groenevelt, F., Kreis, R.W., Middelkoop, E.
Graft survival and effectiveness of dermal substitution in burns and reconstructive surgery in a one-stage grafting model
Plast Reconstr Surg. 106(3) (2000) 615-623

- 136 Vardaxis, N.J., Brans, T.A., Boon, M.E., Kreis, R.W., Marres, L.M.
Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies
J Anat. 190(4) (1997) 601-611
- 137 Velez, I., Parker, W.B., Siegel, M.A., Hernandez, M.
Cryopreserved amniotic membrane for modulation of periodontal soft tissue healing: a pilot study
J Periodontol. 81(12) (2010) 1797-1804
- 138 von Versen-Hoyneck, F., Syring, C., Bachmann, S., Moller, D.E.
The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts-light and scanning electron microscopic studies
Cell Tissue Bank 5(1) (2004) 45-56
- 139 Wang, J., Dodd, C., Shankowsky, H.A., Scott, P.G., Tredget, E.E.
Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring
Lab Invest. 88(12) (2008) 1278-1290
- 140 Wang, T.H., Ma, H., Yeh, F.L., Lin, J.T., Shen, B.H.
The use of "composite dressing" for covering split-thickness skin graft donor sites
Burns 36(2) (2010) 252-255
- 141 Wang, X.Q., Kravchuk, O., Kimble, R.M.
A retrospective review of burn dressings on a porcine burn model
Burns 36(5) (2010) 680-687
- 142 Ward, D.J., Bennett, J.P., Burgos, H., Fabre, J.
The healing of chronic venous leg ulcers with prepared human amnion
Br J Plast Surg. 42(4) (1989) 463-467
- 143 Weise, K., Schäffer, M.

- Behandlungsstrategien bei Wundheilungsstörungen
Unfallchirurg 103(2) (2000) 100-109
- 144 Witte, M.B., Barbul, A.
Role of nitric oxide in wound repair
Am J Surg. 183(4) (2002) 406-412
- 145 Wollina, U., Berger, U., Mahrle, G.
Immunohistochemistry of porcine skin
Acta Histochem. 90(1) (1991) 87-91
- 146 Wong, C.K., Cheung, P.F., Ip, W.K., Lam, C.W.
Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils
Am J Respir Cell Mol Biol. 37(1) (2007) 85-96
- 147 Wood, F.M., Stoner, M.L., Fowler, B.V., Fear, M.W.
The use of a non-cultured autologous cell suspension and Integra dermal regeneration template to repair full-thickness skin wounds in a porcine model: a one-step process
Burns 33(6) (2007) 693-700
- 148 Xia, Y.P., Zhao, Y., Marcus, J., Jimenez, P.A., Ruben, S.M., Moore, P.A., Khan, F., Mustoe, T.A.
Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischaemia-impaired rabbit ear model and on scar formation
J Pathol. 188(4) (1999) 431-438
- 149 Xu, L.R., Carr, M.M., Bland, A.P., Hall, G.A.
Histochemistry and morphology of porcine mast cells
Histochem J. 25(7) (1993) 516-522
- 150 Yager, D.R., Nwomeh, B.C.
The proteolytic environment of chronic wounds

- Wound Repair Regen. 7(6) (1999) 433-441
- 151 Yang, L., Shirakata, Y., Shudou, M., Dai, X., Tokumaru, S., Hirakawa, S., Sayama, K., Hamuro, J., Hashimoto, K.
New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane
Cell Tissue Res. 326(1) (2006) 69-77
- 152 Yates, C., Whaley, D., Hooda, S., Hebda, P., Bodnar, R., Wells, A.
Delayed reepithelialization and basement membrane regeneration after wounding in mice lacking CXCR3
Wound Repair Regen. 17(1) (2009) 34-41
- 153 Yoshita, T., Kobayashi, A., Sugiyama, K., Tseng, S.C.
Oxygen permeability of amniotic membrane and actual tear oxygen tension beneath amniotic membrane patch
Am J Ophthalmol. 138(3) (2004) 486-487
- 154 Young, C.M., Hopewell, J.W.
The evaluation of an isotope clearance technique in the dermis of pig skin: a correlation of functional and morphological parameters
Microvasc Res. 20(2) (1980) 182-194

9. Anhang

9.1. Protokolle der immunhistologischen Färbungen

9.1.1. Ki-67

- Trocknen der Schnitte über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank (*Thermo Scientific Function Line®*, Firma Heraeus, Hanau)
- Entparaffinierung: zweimal Xylol (10 min), Xylol/Ethanol (10 min), absteigende Alkoholreihe (jeweils 2 min), spülen in bidestilliertem Wasser (1min)
- Erhitzung der Schnitte in der *Dako Target Retrieval Solution®* (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) bei 97°C im Wasserbad (Typ 1003, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) (20 min)
- Abkühlen der Proben (20 min)
- Spülen der Slides in PBS-Puffer pH7,4 (1 min)
- Proben in 1%igem Gemisch aus H₂O₂ (Firma Merck KGaA, Darmstadt) und bidestilliertem Wasser dunkel stellen (30 min)
- Spülen der Slides in bidestilliertem Wasser (1 min)
- Spülen der Slides in PBS-Puffer (1min)
- Abtrocknen der Schnitte mit Filterpapier
- Applikation des 5%-igen Blocking-Reagenz bestehend aus in PBS gemischtem Ziegen Serum (*normal goat serum S-1000*, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA) (30 min)
- Abtrocknen des Blocking-Reagenz mit Filterpapier Applikation des 1:50 in PBS verdünnten Primärantikörpers (*monoclonal mouse anti-human Ki67 antigene*, Firma Dako, Glostrup, Dänemark) Einwirkzeit 1 h bei Raumtemperatur
- Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
- Abtrocknen der Slides mit Filterpapier

- Applikation des 1:200 in PBS verdünnten Sekundärantikörpers (*biotinylated anti-mouse IgG, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) (45 min)
- Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
- Applikation der Streptavidin-Lösung (*Vectastain® ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) für 45 min
- Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
- Auftragen der 0,2%igen H₂O₂/DAB-Lösung (8 min)
- Spülen der Proben in bidestilliertem Wasser (2 min)
- Gegenfärben in Hämalaun (*Mayer's hematoxylin, Firma Bio Optica, Mailand, Italien*) (3 sec)
- Bläuen der Slides unter Leitungswasser (10 min)
- Aufsteigende Alkoholreihe (jeweils 2 min), Xylol/Ethanol (5 min), zweimal Xylol (5 min)
- Eindeckeln der Schnitte (*Thermo Scientific®, Firma Menzel Gläser GmbH, Braunschweig*) mit DPX

9.1.2. Laminin

- Trocknen der Schnitte über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank (*Thermo Scientific Function Line®, Firma Heraeus, Hanau*)
- Entparaffinierung: zweimal Xylol (10 min), Xylol/Ethanol (10 min), absteigende Alkoholreihe (jeweils 2 min), spülen in bidestilliertem Wasser (1min)
- Auftragen von Proteinase K (*Proteinase K ready-to-use, Firma Dako, Glostrup, Dänemark*) (5 min)
- Spülen der Slides in PBS-Puffer pH7,4 (1 min)
- Proben in 1%igem Gemisch aus H₂O₂ (*Firma Merck KGaA, Darmstadt*) und bidestilliertem Wasser dunkel stellen (30 min)
- Spülen der Slides in bidestilliertem Wasser (1 min)
- Spülen der Slides in PBS-Puffer (1min)
- Abtrocknen der Schnitte mit Filterpapier

-
- Applikation des 5%-igen Blocking-Reagenz bestehend aus in PBS gemischtem Ziegen Serum (*normal goat serum S-1000, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) (30 min)
 - Abtrocknen des Blocking-Reagenz mit Filterpapier
 - Applikation des 5%igen Blocking-Reagenz bestehend aus in PBS gelöstem Magermilchpulver (*Bio-Magermilchpulver, Firma Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell*) (30 min)
 - Abtrocknen des Blocking-Reagenz mit Filterpapier
 - Applikation des 1:50 in 2%iger BSA-PBS-Pufferlösung (*albumin from bovine serum, Firma Sigma-Aldrich, St.Louis, USA*) verdünnten Primärantikörpers (*polyclonal rabbit anti-laminin, Firma Dako, Glostrup, Dänemark*), Einwirkzeit 15 min bei Raumtemperatur
 - Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
 - Abtrocknen der Slides mit Filterpapier
 - Applikation des 1:200 in 2%iger BSA-PBS-Pufferlösung verdünnten Sekundärantikörpers (*biotinylated anti-rabbit IgG, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) (45 min)
 - Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
 - Applikation der Streptavidin-Lösung (*Vectastain® ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) für 45 min
 - Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
 - Auftragen der 0,2%igen H₂O₂/DAB-Lösung (8 min)
 - Spülen der Proben in bidestilliertem Wasser (2 min)
 - Gegenfärben in Hämalaun (*Mayer's hematoxylin, Firma Bio Optica, Mailand, Italien*) (3 sec)
 - Bläuen der Slides unter Leitungswasser (10 min)
 - Aufsteigende Alkoholreihe (jeweils 2 min), Xylol/Ethanol (5 min), zweimal Xylol (5 min)
 - Eindeckeln der Schnitte (*Thermo Scientific®, Firma Menzel Gläser GmbH, Braunschweig*) mit DPX
 -

9.1.3. von Willebrand-Faktor

- Trocknen der Schnitte über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank (*Thermo Scientific Function Line*[®], Firma Heraeus, Hanau)
- Entparaffinierung: zweimal Xylol (10 min), Xylol/Ethanol (10 min), absteigende Alkoholreihe (jeweils 2 min), spülen in bidestilliertem Wasser (1min)
- Erhitzung der Schnitte in der *Dako Target Retrieval Solution*[®] (Firma Dako, Glostrup, Dänemark) bei 97°C im Wasserbad (Typ 1003, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) (20 min)
- Abkühlen der Proben (20 min)
- Spülen der Slides in PBS-Puffer pH7,4 (1 min)
- Proben in 3%igem Gemisch aus H₂O₂ (Firma Merck KGaA, Darmstadt) und bidestilliertem Wasser dunkel stellen (10 min)
- Spülen der Slides in bidestilliertem Wasser (1 min)
- Spülen der Slides in PBS-Puffer (1min)
- Abtrocknen der Schnitte mit Filterpapier
- Applikation des 3%-igen Blocking-Reagenz bestehend aus in PBS gemischtem Ziegen Serum (*normal goat serum S-1000*, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA) für 30 min
- Abtrocknen des Blocking-Reagenz mit Filterpapier
- Applikation des 1:200 in PBS verdünnten Primärantikörpers (*polyclonal rabbit anti-human von Willebrand factor*, Firma Dako, Glostrup, Dänemark) Einwirkzeit 1 h bei Raumtemperatur
- Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
- Abtrocknen der Slides mit Filterpapier
- Applikation des 1:200 in PBS verdünnten Sekundärantikörpers (*biotinylated anti-rabbit IgG*, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA) (45 min)
- Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
- Applikation der Streptavidin-Lösung (*Vectastain*[®] ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA) für 45 min
- Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
- Auftragen der 0,2%igen H₂O₂/DAB-Lösung (8 min)

- Spülen der Proben in bidestilliertem Wasser (2 min)
- Gegenfärben in Hämalan (Mayer's hematoxylin, Firma Bio Optica, Mailand, Italien) (3 sec)
- Bläuen der Slides unter Leitungswasser (10 min)
- Aufsteigende Alkoholreihe (jeweils 2 min), Xylol/Ethanol (5 min), zweimal Xylol (5 min)
- Eindeckeln der Schnitte (Thermo Scientific®, Firma Menzel Gläser GmbH, Braunschweig) mit DPX

9.1.4. α -smooth-muscle actin (α SMA)

- Trocknen der Schnitte über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank (Thermo Scientific Function Line®, Firma Heraeus, Hanau)
- Entparaffinierung: zweimal Xylol (10 min), Xylol/Ethanol (10 min), absteigende Alkoholreihe (jeweils 2 min), spülen in bidestilliertem Wasser (1min)
- Erhitzung der Schnitte in 0.01mol/L Citratpuffer-Lösung (pH 6.0) im Mikrowellengrill (Intellowave® Firma LG) auf 600W (15 min)
- Abkühlen der Proben (20 min)
- Spülen der Slides in PBS-Puffer pH7,4 (1 min)
- Proben in 3%igem Gemisch aus H₂O₂ (Firma Merck KGaA, Darmstadt) und bidestilliertem Wasser dunkel stellen (10 min)
- Spülen der Slides in bidestilliertem Wasser (1 min)
- Spülen der Slides in PBS-Puffer (1min)
- Abtrocknen der Schnitte mit Filterpapier
- Applikation des 3%-igen Blocking-Reagenz bestehend aus in PBS gemischtem Ziegenserum (normal goat serum S-1000, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA) für 30 min
- Abtrocknen des Blocking-Reagenz mit Filterpapier
- Applikation des 1:80 in PBS verdünnten Primärantikörpers (mouse monoclonal to alpha smooth muscle actin, Firma Abcam, Cambridge, UK), Einwirkzeit 1 h bei Raumtemperatur, Aufbewahrung der Proben über Nacht bei 8°C im Kühlschrank

- Am nächsten Tag Aufwärmung der Proben bei Raumtemperatur (45 min)
- Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
- Abtrocknen der Slides mit Filterpapier
- Applikation des 1:200 in PBS verdünnten Sekundärantikörpers (*biotinylated anti-mouse IgG, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) (45 min)
- Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
- Applikation der Streptavidin-Lösung (*Vectastain® ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Firma Vector Laboratories, Burlingame USA*) für 45 min
- Dreimaliges Spülen der Proben in PBS-Puffer (jeweils 5 min)
- Auftragen der 0,2%igen H₂O₂/DAB-Lösung (10 min)
- Spülen der Proben in bidestilliertem Wasser (2 min)
- Gegenfärben in Hämalaun (*Mayer's hematoxylin, Firma Bio Optica, Mailand, Italien*) (3 sec)
- Bläuen der Slides unter Leitungswasser (10 min)
- Aufsteigende Alkoholreihe (jeweils 2 min), Xylol/Ethanol (5 min), zweimal Xylol (5 min)
- Eindeckeln der Schnitte (*Thermo Scientific®, Firma Menzel Gläser GmbH, Braunschweig*) mit DPX

9.2. Ergebnisse der statistischen Auswertungen

9.2.1. Auswertung der Wundkontraktion

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MO vs VH/MU	0,1046	nein
VH/MO vs VH/Int	0,0410	nein
VH/MO vs VH/SH	0,0307	ja
VH/MO vs VH/NT	<0,0001	ja
VH/MU vs VH/Int	0,0238	ja
VH/MU vs VH/SH	0,5959	nein
VH/MU vs VH/NT	0,0020	ja
VH/Int vs VH/SH	0,0053	ja
VH/Int vs VH/NT	0,0002	ja
VH/SH vs VH/NT	0,0002	ja

Tab. 9.1: p-Werte und Signifikanz der Wundkontraktion der einzelnen Behandlungsgruppen (n=8).

9.2.2. Auswertung der Epitheldicke

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
Kontrolle vs VH/SH 20d	< 0,0001	ja
Kontrolle vs VH/Int 20d	< 0,0001	ja
Kontrolle vs VH/MU 20d	< 0,0001	ja
Kontrolle vs VH/NT 20d	< 0,0001	ja
Kontrolle vs VH/MO 20d	< 0,0001	ja
VH/SH 20d vs VH/Int 20d	< 0,0001	ja
VH/SH 20d vs VH/MU 20d	0,5464	nein
VH/SH 20d vs VH/NT 20d	0,6848	nein
VH/SH 20d vs VH/MO 20d	< 0,0001	ja
VH/Int 20d vs VH/MU 20d	< 0,0001	ja
VH/Int 20d vs VH/NT 20d	< 0,0001	ja
VH/Int 20d vs VH/MO 20d	< 0,0001	ja
VH/MU 20d vs VH/MO 20d	< 0,0001	ja
VH/MU 20d vs VH/NT 20d	0,6776	nein
VH/NT 20d vs VH/MO 20d	< 0,0001	ja

Tab. 9.2: p-Werte und Signifikanz der Epitheldicke am 20. postoperativen Tag (n=8 pro Gruppe).

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
Kontrolle vs VH/SH 60d	0,0025	ja
Kontrolle vs VH/Int 60d	< 0,0001	ja
Kontrolle vs VH/MU 60d	< 0,0001	ja
Kontrolle vs VH/NT 60d	0,0037	ja
Kontrolle vs VH/MO 60d	< 0,0001	ja
VH/SH 60d vs VH/Int 60d	< 0,0001	ja
VH/SH 60d vs VH/MU 60d	< 0,0001	ja
VH/SH 60d vs VH/NT 60d	0,0035	ja
VH/SH 60d vs VH/MO 60d	< 0,0001	ja
VH/Int 60d vs VH/MU 60d	< 0,0001	ja
VH/Int 60d vs VH/NT 60d	< 0,0001	ja
VH/Int 60d vs VH/MO 60d	0,0697	nein
VH/MU 60d vs VH/NT 60d	< 0,0001	ja
VH/MU 60d vs VH/MO 60d	0,0003	ja
VH/NT 60d vs VH/MO 60d	< 0,0001	ja

Tab. 9.3: p-Werte und Signifikanz der Epitheldicke am 60. postoperativen Tag (n=8 pro Gruppe).

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/SH 20d vs VH/SH 60d	< 0,0001	ja
VH/Int 20d vs VH/Int 60d	< 0,0001	ja
VH/MU 20d vs VH/MU 60d	0,3060	nein
VH/NT 20d vs VH/NT 60d	< 0,0001	ja
VH/MO 20d vs VH/MO 60d	< 0,0001	ja

Tab. 9.4: p-Werte und Signifikanz der Epitheldicke des 20. und 60. postoperativen Tages (n=8 pro Gruppe)

9.2.3. Auswertung der Zellproliferation mittels anti-Ki67

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MO 10d vs VH/MU 10d	< 0,0001	ja
VH/MO 10d vs VH/Int 10d	< 0,0001	ja
VH/MO 10d vs VH/SH 10d	0,0012	ja
VH/MU 10d vs VH/SH 10d	0,0054	ja
VH/MU 10d vs VH/Int 10d	0,2548	nein
VH/Int 10d vs VH/SH 10d	0,0096	ja

Tab. 9.5: p-Werte und Signifikanz der Proliferationsindizes der einzelnen Behandlungsgruppen am 10. postoperativen Tag.

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MO 60d vs VH/MU 60d	0,0013	ja
VH/MO 60d vs VH/Int 60d	0,0572	nein
VH/MO 60d vs VH/SH 60d	< 0,0001	ja
VH/MO 60d vs VH/NT 60d	0,0544	nein
VH/MU 60d vs VH/Int 60d	0,4169	nein
VH/MU 60d vs VH/SH 60d	0,1327	nein
VH/MU 60d vs VH/NT 60d	0,0747	nein
VH/Int 60d vs VH/SH 60d	0,5859	nein
VH/Int 60d vs VH/NT 60d	0,0542	nein
VH/SH 60d vs VH/NT 60d	0,0773	nein

Tab. 9.6: p-Werte und Signifikanz der Proliferationsindizes der einzelnen Behandlungsgruppen am 60. postoperativen Tag.

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MO 10d vs VH/MO 60d	0,0010	ja
VH/MU 10d vs VH/MU 60d	< 0,0001	ja
VH/Int 10d vs VH/Int 60d	0,0551	nein
VH/SH 10d vs VH/SH 60d	0,0002	ja

Tab. 9.7: p-Werte und Signifikanz der Proliferationsindizes des 10. und 60. postoperativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen.

9.2.4. Auswertung der Gefäßproliferation mittels anti-vWF

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MU 10d vs VH/NT 10d	0,0016	ja
VH/MU 10d vs VH/Int 10d	0,0005	ja
VH/MU 10d vs VH/MO 10d	0,0317	ja
VH/MU 10d vs VH/SH 10d	0,0699	nein
VH/MO 10d vs VH/Int 10d	< 0,0001	ja
VH/MO 10d vs VH/SH 10d	0,6794	nein
VH/MO 10d vs VH/NT 10d	0,3793	nein
VH/Int 10d vs VH/SH 10d	< 0,0001	ja
VH/Int 10d vs VH/NT 10d	< 0,0001	ja
VH/SH 10d vs VH/NT 10d	0,7386	nein

Tab. 9.8: p-Werte und Signifikanz der Gefäßanzahl der einzelnen Behandlungsgruppen der Vollhautwunden am 10. postoperativen Tag.

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MU 60d vs VH/NT 60d	< 0,0001	ja
VH/MU 60d vs VH/Int 60d	< 0,0001	ja
VH/MU 60d vs VH/MO 60d	< 0,0001	ja
VH/MU 60d vs VH/SH 60d	0,3497	nein
VH/MO 60d vs VH/Int 60d	< 0,0001	ja
VH/MO 60d vs VH/SH 60d	< 0,0001	ja
VH/MO 60d vs VH/NT 60d	0,0068	ja
VH/Int 60d vs VH/SH 60d	< 0,0001	ja
VH/Int 60d vs VH/NT 60d	< 0,0001	ja
VH/SH 60d vs VH/NT 60d	< 0,0001	ja

Tab. 9.9: p-Werte und Signifikanz der Gefäßanzahl der einzelnen Behandlungsgruppen am 60. postoperativen Tag.

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MO 10d vs VH/MO 60d	< 0,0001	ja
VH/MU 10d vs VH/MU 60d	< 0,0001	ja
VH/Int 10d vs VH/Int 60d	0,0047	ja
VH/SH 10d vs VH/SH 60d	< 0,0001	ja
VH/NT 10d vs VH/NT 60d	0,0036	ja

Tab. 9.10: p-Werte und Signifikanz der Gefäßanzahl des 10. und 60. postoperativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen.

9.2.5. Auswertung der Narbenbildung mittels anti- α SMA

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MU 10d vs VH/MO 10d	0,0323	ja
VH/MU 10d vs VH/Int 10d	0,0061	ja
VH/MU 10d vs VH/NT 10d	0,0066	ja
VH/MU 10d vs VH/SH 10d	0,1122	nein
VH/MO 10d vs VH/Int 10d	0,0509	nein
VH/MO 10d vs VH/NT 10d	0,0096	ja
VH/MO 10d vs VH/SH 10d	0,2966	nein
VH/Int 10d vs VH/NT 10d	0,8943	nein
VH/Int 10d vs VH/SH 10d	0,6386	nein
VH/NT 10d vs VH/SH 10d	0,4160	nein

Tab. 9.11: p-Werte und Signifikanz der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 10. post-operativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen.

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MU 20d vs VH/MO 20d	0,0275	ja
VH/MU 20d vs VH/Int 20d	< 0,0001	ja
VH/MU 20d vs VH/NT 20d	0,0012	ja
VH/MU 20d vs VH/SH 20d	0,0734	nein
VH/MO 20d vs VH/Int 20d	0,0210	ja
VH/MO 20d vs VH/NT 20d	0,0517	nein
VH/MO 20d vs VH/SH 20d	0,4307	nein
VH/Int 20d vs VH/NT 20d	0,9074	nein
VH/Int 20d vs VH/SH 20d	0,6636	nein
VH/NT 20d vs VH/SH 20d	0,6437	nein

Tab. 9.12: p-Werte und Signifikanz der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 20. post-operativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MU 40d vs VH/MO 40d	0,8231	nein
VH/MU 40d vs VH/Int 40d	0,7160	nein
VH/MU 40d vs VH/NT 40d	0,3453	nein
VH/MU 40d vs VH/SH 40d	0,1426	nein
VH/MO 40d vs VH/Int 40d	0,6111	nein
VH/MO 40d vs VH/NT 40d	0,3090	nein
VH/MO 40d vs VH/SH 40d	0,0074	ja
VH/Int 40d vs VH/NT 40d	0,6134	nein
VH/Int 40d vs VH/SH 40d	0,0895	nein
VH/NT 40d vs VH/SH 40d	0,0170	ja

Tab. 9.13: p-Werte und Signifikanz der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 40. postoperativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen.

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MU 60d vs VH/MO 60d	0,7825	nein
VH/MU 60d vs VH/Int 60d	0,4387	nein
VH/MU 60d vs VH/NT 60d	0,0308	ja
VH/MU 60d vs VH/SH 60d	0,0214	ja
VH/MO 60d vs VH/Int 60d	0,2705	nein
VH/MO 60d vs VH/NT 60d	0,0069	ja
VH/MO 60d vs VH/SH 60d	0,0069	ja
VH/Int 60d vs VH/NT 60d	0,0143	ja
VH/Int 60d vs VH/SH 60d	0,0077	ja
VH/NT 60d vs VH/SH 60d	0,0993	nein

Tab. 9.14: p-Werte und Signifikanz der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF des 60. postoperativen Tages der einzelnen Behandlungsgruppen.

		p-Wert	signifikant (p<0,05)
VH/MU	10d vs 20d	0,1817	nein
	20d vs 40d	0,6050	nein
	40d vs 60d	0,6637	nein
	10d vs 60d	0,3868	nein
VH/MO	10d vs 20d	0,0072	ja
	20d vs 40d	0,1630	nein
	40d vs 60d	0,4885	nein
	10d vs 60d	0,3539	nein
VH/Int	10d vs 20d	0,5009	nein
	20d vs 40d	0,0710	nein
	40d vs 60d	0,2064	nein
	10d vs 60d	0,0012	ja
VH/NT	10d vs 20d	0,1252	nein
	20d vs 40d	0,3922	nein
	40d vs 60d	0,0219	ja
	10d vs 60d	0,0034	ja
VH/SH	10d vs 20d	0,5774	nein
	20d vs 40d	0,0515	nein
	40d vs 60d	0,1079	nein
	10d vs 60d	0,0240	ja

Tab. 9.15: p-Werte und Signifikanz der Anzahl α SMA-positiver Fibroblasten pro HPF der einzelnen Behandlungsgruppen im zeitlichen Verlauf.

10. Lebenslauf

Persönliches

Name Claudia Maria Baumann
Geburtsdatum 06. Juni 1984
Geburtsort München
Familienstand ledig

Studium

Ludwig-Maximilians-Universität München

Humanmedizin

Vorklinischer Studienabschnitt 2003-2005
Klinischer Studienabschnitt 2008-2011
Ärztliche Prüfung 09. November 2011

Zahnmedizin

Vorklinischer Studienabschnitt 2005-2007
Klinischer Studienabschnitt seit 2007
Zahnärztliche Prüfung voraussichtlich April 2013

Schule

Gymnasium Grafing, Abitur 1994-2003
Grundschule Grafing 1990-1994

Ausbildungsschwerpunkte

PJ Augenheilkunde, Universitätsklinikum der LMU 08/10-12/10
Innere Medizin, Klinikum Dritter Orden München 12/10-01/11
Innere Medizin, Klinikum Bozen, Italien 02/11-04/11
Unfallchirurgie, Kreisklinik Fürstenfeldbruck 04/11-07/11

Famulaturen

Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, TU München	03/08
Orthopädie und Unfallchirurgie	
Policlinico Umberto I, Roma, Università la Sapienza	03/09
Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie	
Azienda Ospedaliera Universitaria di Messina (Sicilia)	
Ospedale G. Martino	08/09
Innere Medizin, Praxis Dr. Udovic, München	09/09
Chirurgische Notaufnahme, Klinikum Harlaching	03/10

Publikationen

Loeffelbein DJ, Baumann CM, Stoeckelhuber M, Hasler R, Mücke, T, Steinsträsser L, Drecoll E, Wolff KD, Kesting MR. Amniotic membrane as part of a skin substitute for fullthickness wounds: an experimental evaluation in a porcine model. Journal of Biomedical Materials Research (Accepted 1/12/2011: Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials).

Kesting MR, Mueller C, Wagenpfeil S, Stoeckelhuber M, Steiner T, Bauer F, Teichmann J, Baumann CM, Barthel LC, Satanovskij RM, Mücke T, Schulte M, Schütz K, Wolff KD, Rohleder NH. Quantitative comparison of the expression of antimicrobial peptides in the oral mucosa and extraoral skin. Br J Oral Maxillofac Surg. 2011 Aug 3.

Loeffelbein DJ, Baumann CM, Mücke T, Wolff KD, Hölzle F, Kesting MR. Sticky platelet syndrome as a possible cause for free flap failure – a case report. Microsurgery. 2010 Sep;30(6):466-8

11. Danksagung

Ich möchte herzlichst Priv.-Doz. Dr. Dr. Denys Loeffelbein und Priv.-Doz. Dr. Dr. Marco Kesting für die hervorragende Betreuung während des gesamten Dissertationsprojektes danken. Sie standen mir stets mit gutem Rat beiseite und führten zudem die Operationen sowie die Probengewinnung für dieses Projekt durch. Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau Priv.-Doz. Dr. Mechthild Stöckelhuber, die mich in die laborexperimentellen Methoden einführte und mit deren Unterstützung die Austestung der Protokolle für die Immunhistologie gelang. Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie für die Bereitstellung der Materialien zur Durchführung dieses Projekts bedanken.

Ein weiterer Dank geht an das Institut für Pathologie der Technischen Universität München. Besonders möchte ich mich bei Frau Enken Drecolll für die Hilfe bei den histologischen Auswertungen und das Fachwissen im Bezug auf die Interpretation der histologischen Ergebnisse bedanken. Außerdem geht mein Dank an Frau Renate Hegenloh, die mir das Anfertigen histologischer Schnitte beibrachte, und an die Mitarbeiter des Routinelabors für die Anfertigung der HE- und EvG-Färbungen im Färbeautomaten.

Herzlichen Dank auch an die Frauenklinik des Marienhospital in Witten unter der Leitung von Prof. Dr. Hatzmann, wo die Plazentae zur Gewinnung der HAM bezogen werden konnten.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, die stets eine große Unterstützung für mich darstellt.