

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 Spalthautentnahmestellen  
- 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 Zahnheilkunde

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

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

Die Dissertation wurde am 12.06.2013 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.10.2013 angenommen.

Für meine Familie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungen</b>	10
<b>2. Einleitung</b>	11
2.1. Problemstellung	13
2.2. Die Amnionmembran	14
2.2.1. Aufbau der Amnionmembran	14
2.2.1.1. Anatomischer und histologischer Aufbau	14
2.2.1.2. Zusammensetzung der extrazellulären Matrix	15
2.2.2. Eigenschaften der Amnionmembran	16
2.2.2.1. Mechanische Eigenschaften	16
2.2.2.2. Permeabilität	17
2.2.2.3. Analgetischer Effekt	17
2.2.2.4. Reepithelisierung	17
2.2.2.5. Einfluss auf die Entzündungsreaktion und die Narbenbildung	18
2.2.2.6. Wirkung auf die Angiogenese	18
2.2.2.7. Immunogenität	19
2.2.2.8. Antimikrobielle Wirkung	19
2.2.3. Anwendungen der Amnionmembran in der Medizin	20
2.3. Die Wunde	21
2.2.1. Physiologische Prozesse der Wundheilung	21
2.2.2. Wundheilungsstörungen	26
2.4. Die Hauttransplantation	27
2.3.1. Spalt- und Vollhauttransplantate	27
2.3.2. Pathophysiologie der Hauttransplantate	30
2.3.3. Versorgung von Spalthautwunden	31
2.5. Die Schweinehaut als biologisches Modell für die Wundheilung des Menschen	35
<b>3. Material und Methode</b>	39
3.1. Gewinnung und Präparation der humanen Amnionmembran	39
3.1.1. Gewinnung der Plazentae	39

3.1.2. Präparation der humanen Amnionmembran .....	39
3.1.3. Herstellung des Konservierungsmediums .....	40
3.2. Kryokonservierung der Amnionmembran .....	40
3.3. Das Tiermodell .....	40
3.4. Operationsdurchführung .....	41
6.4.1. Erstellung der Hautdefekte .....	41
6.4.2. Versorgung der Hautwunden .....	43
3.5. Wundkontrolle und Probengewinnung .....	44
3.6. Finalisierung .....	44
3.7. Histologische Probenaufarbeitung .....	44
3.8. Immunhistologie .....	45
3.9. Vorgehen bei der Auswertung .....	46
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>52</b>
4.1. Klinische Ergebnisse.....	52
4.1.1. Klinische Beurteilung .....	52
4.1.2. Analyse der Wundkontraktion .....	54
4.2. Histologische Ergebnisse. ....	55
4.2.1. Histologische Beurteilung der Biopsate .....	55
4.2.2. Auswertung der Epitheldicke .....	58
4.3. Immunhistologische Analyse.....	60
4.3.1. Beurteilung der Zellproliferation mittels anti-Ki-67 .....	60
4.3.2. Beurteilung der Integrität der Basalmembran mittels anti-Laminin .....	61
4.3.3. Beurteilung der Gefäßproliferation mittels anti-vWF .....	63
4.3.4. Beurteilung der Narbenbildung mittels anti- $\alpha$ SMA .....	64
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>65</b>
5.1. Tiermodell .....	66
5.2. Verwendete Materialien .....	68
5.3. Klinischer Verlauf .....	72
5.4. Histologischer Verlauf .....	75
5.5. Immunhistologische Analyse .....	77

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	82
<b>7.</b>	<b>Summary</b> .....	84
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	85
<b>9.</b>	<b>Anhang: Ergebnisse der statistischen Auswertung</b> .....	109
	9.1. Protokolle der immunhistologischen Färbungen.....	109
	9.1.1. Ki67 .....	109
	9.1.2. Laminin .....	110
	9.1.3. von Willebrand-Faktor .....	111
	9.1.4. $\alpha$ -smooth-muscle-actin .....	113
	9.2. Ergebnisse der statistischen Auswertung	
	9.2.1. Statistische Auswertung der Epitheldicke.....	114
	9.2.2. Auswertung der Zellproliferation mittels anti-Ki67.....	115
	9.2.3. Auswertung der Gefäßproliferation mittels anti-vWF.....	115
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	116
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b> .....	118

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schichtartiger Aufbau der Plazenta (Murube, L.R., et al., 2006).....	14
Abb. 2.2: HE-Färbung einer humanen Amnionmembran: Aufbau in 5 Schichten (Riau, A.K., et al., 2010, S. 216).....	15
Abb. 2.3: Zusammensetzung der einzelnen Komponenten der Wundmatrix im Verlauf (Witte, M.B., et al., 2002, S. 408).....	24
Abb. 2.4: Spalthautentnahmedefekt am rechten Oberschenkel.....	29
Abb. 2.5: Mit Polyurethan-Wundfolie versorte Spalthautentnahmestelle am rechten Oberschenkel.....	32
Abb. 2.6: 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) .....	38
Abb. 3.1: Klinische Situation bei Schwein B nach Defektsetzung.....	42
Abb. 3.2: Auflage von kryokonservierter humaner Amnionmembran auf porcine Spalthautentnahmestelle.....	43
Abb. 3.3: Die Wundfläche (schwarze Tätowierung) am 60. postoperativen Tag im Vergleich zur ursprünglichen Hautfläche (rote Schablone) vor der Defektsetzung.....	48
Abb. 3.4: Methodik der Epitheldickenmessung.....	49
Abb. 3.5: Exemplarische Darstellung einer Vollhautwunde in der $\alpha$ SMA-Färbung (300fach).....	51

Abb. 4.1: Wundheilungsverlauf porciner Spalthautentnahmedefekte unter Anwendung humaner Amnionmembran oder Polyurethan-Wundfolie. Beispiel für eine Fotodokumentation an den postoperativen Tagen 0, 5, 10, 20 und 60.....	54
Abb. 4.2: HE-Färbung des 5. postoperativen Tages der Spalthautwunden im Vergleich.....	56
Abb. 4.3: EvG-Färbung des 20. postoperativen Tags der Spalthautwunden im Vergleich.....	58
Abb. 4.4: Boxplot der Epitheldicke der Spalthautwunden.....	59
Abb. 4.5: Boxplot der Proliferationsindizes der Spalthautwunden.....	60
Abb. 4.6: Markierung von proliferierenden Zellen mit Hilfe der immunhistochemischen Ki67-Färbung. Mit Polyurethan-Folie (PU) und mit humaner Amnionmembran (HAM) behandelte Wunde (300fach) am siebten postoperativen Tag.....	61
Abb. 4.7: Markierung der Basalmembran am siebten postoperativen Tag mit Hilfe der immunhistochemischen anti-Laminin-Färbung (300 fach).....	62
Abb. 4.8: Boxplot der Gefäßanzahl pro HPF der verschiedenen Behandlungsgruppen.....	63
Abb. 4.9: Markierung von Gefäßwänden mit Hilfe der von Willebrand-Faktor-Färbung. Links mit Polyurethan-Folie (PU) und rechts mit humaner Amnionmembran (HAM) behandelte Wunde (300fach) am zehnten postoperativen Tag.....	64

## 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).....	28
Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten Antikörper, die zu detektierenden Strukturen und die Hersteller.....	46
Tab. 4.1: Die verschiedenen Behandlungsgruppen im zeitlichen Verlauf hinsichtlich der Eigenschaften Blutung, Entzündung, Infektion.....	53
Tab. 4.2: Mittelwerte und SEM-Werte der prozentualen Wundkontraktion am 60. postoperativen Tag.....	54
Tab. 4.3: Mittelwerte und SEM-Werte der Epitheldicke (in $\mu\text{m}$ ) der Spalthautwunden und der Kontrolle (gesunde Schweinehaut) am 7. und am 60. postoperativen Tag.....	59
Tab. 4.4: Mittelwerte und SEM-Werte der Proliferationsindizes am 7. und am 60. postoperativen Tag.....	60
Tab. 4.5: Integrität der Basalmembran bei den Spalthautwunden im postoperativen Verlauf.....	62
Tab. 4.6: Mittelwerte und SEM-Werte der Anzahl an Gefäßen pro HPF am 7. und am 10. postoperativen Tag.....	63
Tab. 9.1: p-Werte und Signifikanz der Epitheldicke der einzelnen Behandlungsgruppen und der Kontrollwunde.....	114



Tab. 9.2: p-Werte und Signifikanz der Proliferationsindizes der einzelnen Behandlungsgruppen der Spalthautwunden.....	115
Tab. 9.3: p-Werte und Signifikanz der Gefäßanzahl der einzelnen Behandlungs- gruppen der Spalthautwunden.....	116

## 1. Abkürzungen

$\alpha$ SMA	=	alpha-smooth-muscle actin
BSA	=	bovine serum albumine
DBA	=	Diamniobenzidin
EGF	=	epidermal growth factor
EvG	=	Elastica van Gieson
FGF	=	fibroblast growth factor
HAM	=	humane Amnionmembran
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- $\kappa$ B	=	nuclear factor kappa B
NO	=	Stickstoffmonoxid
PBS	=	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PDGF	=	platelet derived growth factor
PF 4	=	Plättchen-Faktor 4
PU	=	Polyurethan
SEM	=	standard error of the mean
TGF- $\beta$	=	transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$	=	tumor necrosis factor alpha
TSP-1	=	Thrombospondin-1
VEGF	=	vascular endothelial growth factor
SH/MO	=	Spalthautwunde, gedeckt mit einlagiger Amnionmembran
SH/NT	=	Spalthautwunde, no treatment
vWF	=	von Willebrand-Faktor

## 2. Einleitung

Die Hauttransplantation ist eine unverzichtbare Methode in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie zur Weichgeweberekonstruktion größerer traumatischer, chronischer oder iatrogenen Hautdefekte, wobei je nach Defekt verschiedene Methoden wie zum Beispiel Spalthaut-, Vollhaut- oder Haut-Knorpelplastiken angewendet werden (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<sup>®</sup> Artificial Skin, ein zweischichtiges Membransystem aus Chondroitin-6-Phosphat und einer Polysiloxanschicht. Ein weiteres Hautersatzmaterial ist AlloDerm<sup>®</sup>, 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),  $\gamma$ -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 Spalthautwunden in der wiederherstellenden Chirurgie zu etablieren. Dazu sollte in einem geeigneten Tiermodell die klinische und histologische Evaluation der Amnionmembran erfolgen. Als Vergleich dienten mit semipermeabler Polyurethan-Wundfolie (*OpSite<sup>TM</sup>*, *Smith and Nephew, Hull, Großbritannien*) versorgte Spalthautwunden. 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 Amnionmembran

### 2.2.1. Aufbau der Amnionmembran

#### 2.2.1.1. Anatomischer und histologischer Aufbau

Amnion und Chorion werden als fetale Membranen der Plazenta bezeichnet (siehe Abb. 2.1). 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).

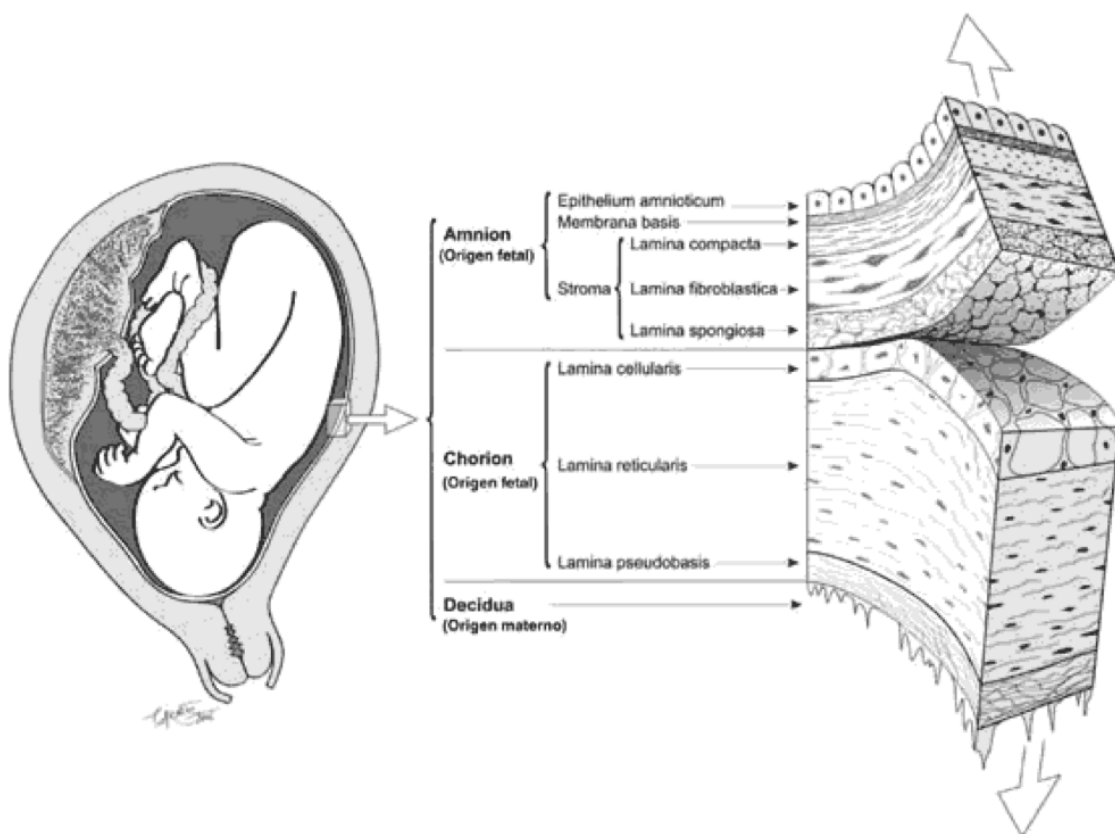


Abb. 2.1: Schichtartiger Aufbau der Plazenta. Die Amnionmembran stellt die innerste der drei Schichten dar (Murube, L.R., et al., 2006).

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 2.2 zeigt den fünfschichtigen histologischen Aufbau der Amnionmembran.

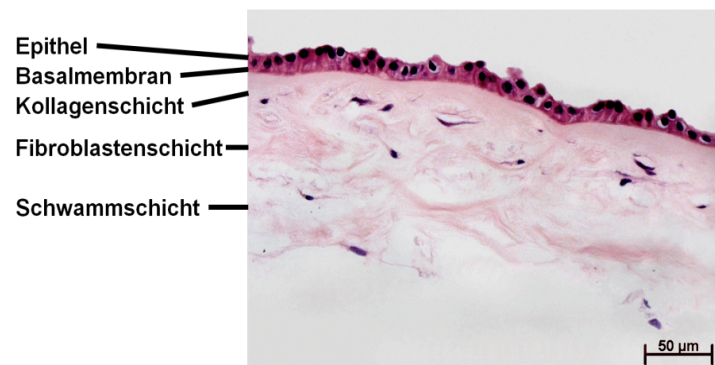


Abb. 2.2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer humanen Amnionmembran. Fünf Schichten sind zu erkennen: Das Epithel, die Basalmembran, die kompakte Kollagenschicht, die Fibroblastenschicht und die Schwammschicht.

### 2.2.1.2. 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).

### **2.2.2. Eigenschaften der Amnionmembran**

#### **2.2.2.1. 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).

### **2.2.2.2. 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).

### **2.2.2.3. 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).

### **2.2.2.4. 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- $\beta$ , 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).

### **2.2.2.5. 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- $\beta$  (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).

### **2.2.2.6. 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).

### **2.2.2.7. 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).

### **2.2.2.8. Antimikrobielle Wirkung**

Antimikrobielle Peptide des angeborenen Immunsystems, wie  $\beta$ -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).

### **2.2.3. Anwendungen der Amnionmembran in der Medizin**

Die erste wissenschaftliche Beschreibung von Hauttransplantationen mit einer Kombination aus Amnion- und Chorionmembran erfolgte 1910 durch 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).

## **2.3. 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).

### **2.3.1. Physiologische Prozesse 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 Fibronektin (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- $\alpha$ , TGF- $\beta$  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- $\alpha$  die Angiogenese und durch TGF- $\beta$ , EGF, PDGF, IL-1 sowie TNF- $\alpha$  die Neubildung von Bindegewebe. Außerdem synthetisieren aktivierte Makrophagen nach Aktivierung der iNOS durch IL-1 und TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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 A<sub>2</sub> 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 A<sub>4</sub>, welches in den Thrombozyt übertragen und dort von dessen 12-Lipoxygenase in Lipoxin A<sub>4</sub> und B<sub>4</sub> 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- $\alpha$  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- $\alpha$  aus Makrophagen und TGF- $\beta$ 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- $\beta$  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- $\beta$  gesteuert, welches zwischen dem 7. und dem 14. Tag seinen höchsten Spiegel erreicht und zusätzlich den Abbau der extrazellulären Matrix verhindert. TGF- $\beta$  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 2.3 zeigt die Zusammensetzung der Wundmatrix im zeitlichen Verlauf.

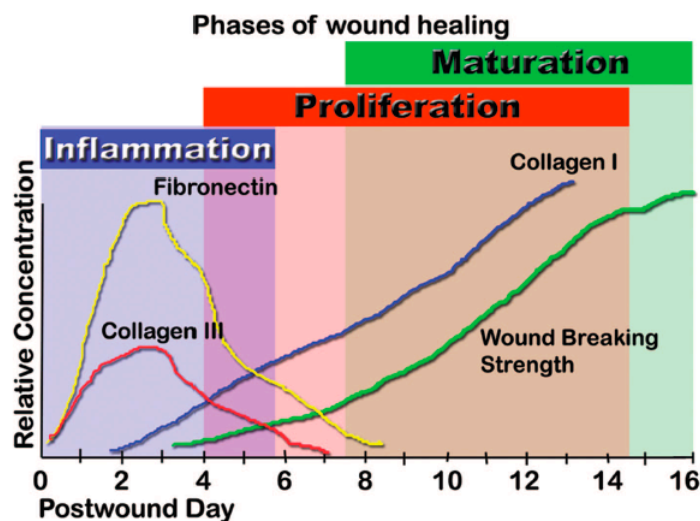


Abb. 2.3: Die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten der Wundmatrix im zeitlichen Verlauf in einer Darstellung nach Witte et al. (Witte, M.B., et al., 2002, S. 408).



### **Reparative Phase**

Reparations- und Remodellingvorgänge 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- $\beta$ , 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 Remodelling-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- $\beta$  zu Myofibroblasten. Die Differenzierung wird durch die Zellinteraktion mit einer alternativ gesplitteten Form des Fibronectins ausgelöst, wodurch der Fibroblast die Expression des  $\alpha$ -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).

### **2.3.2. 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 bzw. 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).

## **2.4. 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.

### **2.4.1. 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). Anhand der Dicke des Transplantates werden vier verschiedene Spalthauttransplantate unterschieden (siehe Tabelle 2.1). Das funktionelle und ästhetische Ergebnis einer Spalthauttransplantation hängt in erster Linie von der Dicke des Transplantates ab. 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).

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).

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. Die Spalthautspendestelle (sog. Donor site, siehe Abb. 2.4) ist postoperativ schmerzhaft, der Wundschmerz kann die Wundheilung und die Lebensqualität beeinträchtigen sowie zu einem zusätzlichen Bedarf an Analgetika führen.

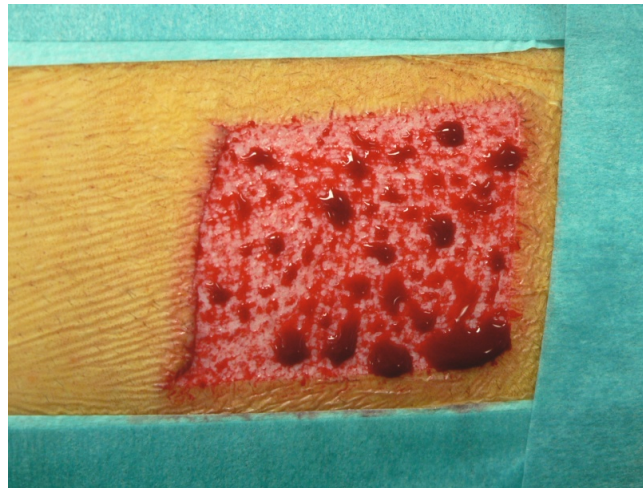


Abb. 2.4: Spalthautentnahmedefekt am rechten Oberschenkel. Die erkennbaren Blutungsstellen leiten sich von eröffneten dermalen Gefäßen ab. Die postoperative Reepithelisierung erfolgt einerseits von den Wundrändern aus, andererseits von in der verbliebenen Dermis enthaltenen Hautanhangsgebilden (in erster Linie Haarfollikeln) und schreitet mit ca. 1 mm pro Tag voran.

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 Vollhauttransplantates 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 Spalthautdefekten liegen.

### **2.4.2. 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).

### **2.4.3. Versorgung von Spalthautentnahmestellen**

Behandlungsstrategien zur Versorgung von Spalthautentnahmestellen beinhalten nach Dornseifer et al. eine möglichst schnelle Abheilung, die Vermeidung von Wundinfektionen, maximalen Tragekomfort für den Patienten, möglichst geringe Schmerzsensationen, geringe Materialkosten sowie möglichst wenig ärztlichen und pflegerischen Arbeitsaufwand (Dornseifer, U., et al., 2011, S. 918).

Derzeit gibt es noch keinen Konsens über das Management von Spalthautentnahmestellen. Systematische Übersichtsarbeiten aus den Jahren 1998

(Rakel, B. A., et al., 1998, S. 174) und 2003 (Wiechula, R., 2003, S. 9) verglichen die gängigsten Wundauflagen hinsichtlich Abheilungszeit, Wundinfektionsrate, Schmerzempfindung, Exsudationsrate und Kosten.

Als häufigste Behandlungsstrategie wird in der Literatur diejenige mit semipermeablen Wundfolien aus Polyurethan, wie beispielsweise *OpSite®* (Smith and Nephew, Hull, Großbritannien) oder *Tegaderm®* (3M, St. Paul, Minnesota, USA) erwähnt. Diese Methode diente daher in der vorliegenden Studie als Vergleichsstandard. Die wasserdichten Folien schützen die Wunde vor Keiminvasion und können überschüssige Flüssigkeit vom Wundgrund in Form von Wasserdampf nach außen abgeben. Sie sind transparent und lassen initial eine gute Wundbeurteilung zu, können jedoch keine Flüssigkeit aufnehmen (Voggenreiter, G., et al., 2009, S. 36). Daher besteht ihr signifikantester Nachteil in der unkontrollierten Exsudatansammlung und möglicher Leckage mit Austritt von Blut und Wundflüssigkeit (Abb. 2.5). Dies führt zu einer erhöhten Infektionsrate, zu Diskomfort seitens des Patienten und einem erhöhten Arbeitsaufwand bei Pflege und Ärzteschaft (Dornseifer, U., et al., 2011, S. 918). Gleichwohl überzeugen Polyurethanfolien (PU-Folien) im Vergleich zu anderen Wundauflagen durch eine schnelle Abheilung, geringen Preis und geringe Schmerzempfindungen beim Patienten. In einer Übersichtsarbeit wird die Rate an Wundinfektionen mit 3% angegeben (Rakel, B. A., et al., 1998, S. 174).



Abb. 2.5: Mit Polyurethan-Wundfolie versorgte Spalthautentnahmestelle am rechten Oberschenkel. Die deutlich erkennbare Ansammlung von Wundexsudat hinter der Folie erschwert eine Beurteilung der Reepithelisierung, es besteht zudem das Risiko einer unkontrollierten Leckage.



Als weitere Wundauflagen für Spalthautentnahmestellen werden Hydropolymerverbände (Schaumstoffe), Alginate sowie Fettgazeverbände beschrieben. Die Materialien werden nachfolgend beschrieben.

Zu den Hydropolymerverbänden zählen beispielsweise *Mepilex®* (*Mölnlycke, Göteborg, Schweden*) und *Allevyn®* (*Smith and Nephew, Hull, Großbritannien*). Hydropolymerverbände bestehen aus zwei Komponenten, einer semipermeablen PU-Folie und einem Polyurethanschaum (PU-Schaum). Die Wirkungsweise der wasserabweisenden Folie erstreckt sich wie im vorhergehenden Abschnitt geschildert auf die Flüssigkeitsabgabe nach außen und auf die Vermeidung der Keiminvasion. Der zusätzliche PU-Schaum ist in der Lage das 150- bis 300-fache seines Eigengewichtes an Wundsekret aufzunehmen. Dies gewährleistet ein feuchtes Wundmilieu, ohne dass Mazerationen entstehen. Dank einer speziellen Silikonbeschichtung kann das Material atraumatisch entfernt werden und steigert den Wundkomfort (Voggenreiter, G., et al., 2009, S. 36). Nur eine geringe Anzahl an Studien zur Verwendung von Schaumverbänden wurde bislang publiziert. In einer vergleichenden Studie mit einer Kalziumalginatauflage zeigte ein Schaumverband tendenziell Vorzüge in der Abheilung und im Patientenkomfort. Allerdings erwiesen sich die Werte als nicht statistisch signifikant (Vaingankar, N. V., et al., 2001, S. 289). Kalziumalginat-Verbände wie beispielsweise *Kaltostat®* (*Convatec, New York, United States*) bilden nach Kontakt mit natriumhaltigen Flüssigkeiten wie Blut und Wundsekret ein Gel. Dieses gewährleistet ein idealflechtes Wundmilieu, Exsudat, Keime und Detritus werden ebenfalls durch die trockenen Fasern absorbiert. Im Rahmen der Gelbildung erfährt die Wunde einen reinigenden Effekt, die Auflage kann atraumatisch entfernt werden. Aufgrund ihrer hämostyptischen Wirkung sind Alginatkompressen besonders für Spalthautentnahmestellen geeignet (Voggenreiter, G., et al., 2009, S. 27). Im Vergleich mit anderen Wundauflagen beschleunigten Kalziumalginat die Abheilung der Spalthautentnahmestelle am wirksamsten. Allerdings zeigten sie mit 11% die zweithöchste Rate an Wundinfektionen und verursachten deutlich höhere Kosten als Wundfolien und Fettgazen. Die Qualität der abgeheilten Wunden erwies sich denjenigen, welche nach einer Gazeverband-Therapie beobachtet wurden, als überlegen (Rakel, B. A., et al., 1998, S. 174).

Zu den Fettgaze-Verbänden zählen unter anderem *Adaptic®* (*Johnson & Johnson, New Brunswick, New Jersey, USA*) und *Jelonet®* (*Smith and Nephew, Hull, Großbritannien*). Die Wundauflagen bestehen aus einem Baumwoll- oder

Kunstfasernetz, welches mit lipoiden Stoffen imprägniert ist. Die Wunde wird rückgefettet, wovon besonders epithelialisierende Wunden profitieren (Voggenreiter, G., et al., 2009, S. 27). Gegenüber anderen Wundauflagen, in erster Linie Wundfolien, ist die Abheilung der Wunde verzögert. Aufgrund häufigerer Verbandwechsel erweist sich die Qualität des entstandenen Epithels als rauher und dünner, auf der Schmerzskala ergaben sich für Fettgazen die ungünstigsten Werte. Allerdings verursachen Fettgazen die geringsten Materialkosten aller analysierten Wundauflagen, die Wundinfektionsrate liegt bei ca. 6% (Rakel, B. A., et al., 1998, S. 175).

Aus diesen Ausführungen wird deutlich, dass bislang keine ideale Wundauflage zur Abdeckung von Spalthautentnahmestellen existiert. Amnionmembran, die bereits vor rund 100 Jahren aufgrund ihrer zugeschriebener epithelisierungsfördernder Eigenschaften als Hautersatz verwandt wurde, scheint in einer inzwischen erhältlichen neuartigen (kryokonservierten) Aufbereitung eine interessante Alternative zu verfügbaren Materialien darzustellen.

## **2.5. 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 spezie-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 Schweinmodells besteht darin, dass die Borsten weniger dicht sind als das Haarkleid der anderen Haussäugetierarten und diese somit die Wundaufgabe in wesentlich geringerem Ausmaß beeinträchtigen.

Bezüglich der Epidermis der Schweinehaut zeigen sich in Bau, Biochemismus und 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  $\mu\text{m}$ , die des Schweins 30-140  $\mu\text{m}$ , 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 tennisschlägerförmige Zytoplasmaformationen, 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  $\alpha_1$ - und der  $\alpha_2$ -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 vasokonstriktorische 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 Mastzellensystems 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.

Abbildung 2.6 zeigt den histologischen Vergleich zwischen menschlicher Haut und der Haut des Schweins (Sullivan, T.P., et al., 2001, S. 66).

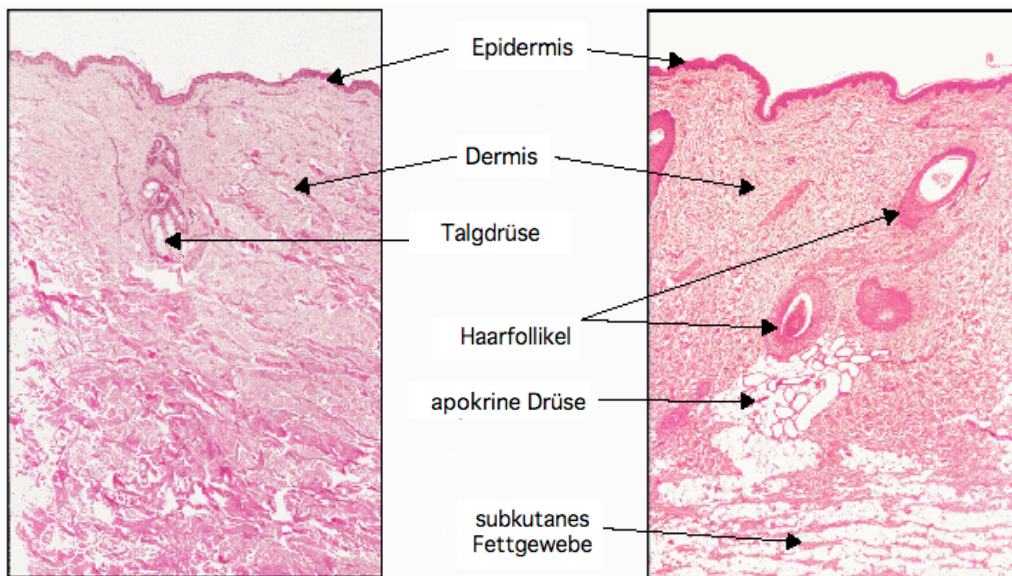


Abb. 2.6: Vergleich der histologischen Gewebearchitektur zwischen menschlicher Haut (links) und der Haut des Schweins (rechts). Hämotoxylin-Eosin-Färbung zweier Biopsien aus vergleichbaren Hautregionen (Sullivan, T.P., et al., 2001, S. 68).

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.

### **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<sup>®</sup>, Heraeus Herasafe*). Die Arbeitsfläche wurde mit einem saugfähigen Material (*Molinea<sup>®</sup>, Hartmann, Heidenheim, Deutschland*) ausgelegt und anschließend steril abgedeckt (*Foliodrape<sup>®</sup>, 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*<sup>®</sup>, *Lohmann-Rauscher, Rengsdorf, Deutschland*) fixiert.

### **3.1.3. Herstellung des Konservierungsmediums**

Zunächst wurden 250 ml DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*<sup>®</sup>, *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*<sup>®</sup> 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 4x4 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 Spalthaut- und Vollhautdefekte 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. Daraufhin wurden innerhalb der eingezeichneten Grenzen jeweils 4 Spalthautdefekte pro Tier mit einer Schichtdicke von 0,7 mm mittels eines portablen, sterilisierten Dermatoms (*Acculan® 3Ti Dermatome; Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland*) 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 10 Wunden angelegt. Insgesamt wurden 40 Vollhautwunden und 12 Spalthautwunden gesetzt. Abbildung 3.1 zeigt die klinische Situation bei Schwein B, nachdem die Defekte gesetzt worden waren.

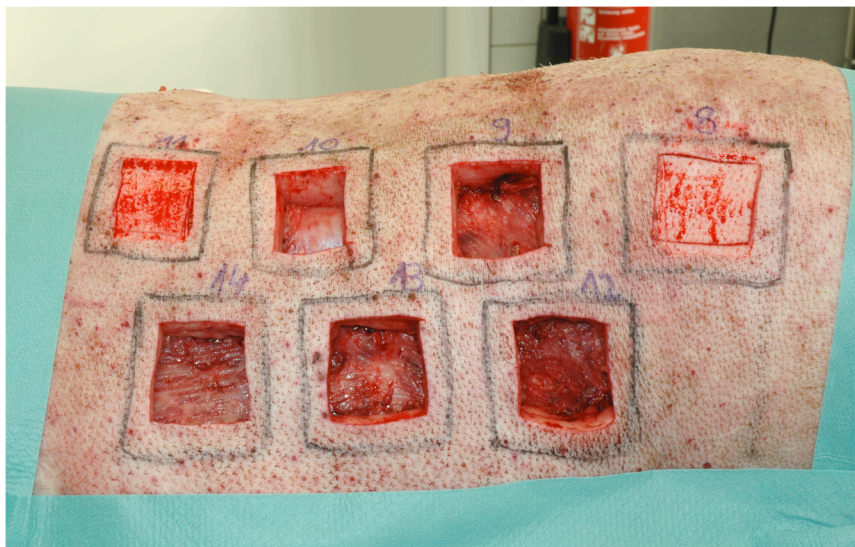


Abb. 3.1: Klinische Situation bei Schwein B nach Defektsetzung. Die hier sichtbaren Vollhautdefekte wurden im Rahmen einer anderen Arbeit evaluiert.

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, also insgesamt 4 Spalthautwunden pro Schwein gesetzt. Die Verteilung der Wundarten auf dem Rücken des Tieres sowie die Zuordnung der Deckungsmaterialien zu den Wunden erfolgten randomisiert. Zwei Spalthautwunden 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. Die anderen beiden Spalthautwunden je Schwein wurden mit einer semipermeablen Polyurethan-Wundfolie (*OpSite™, Smith and Nephew, Hull, Großbritannien*) als Kontrolle versorgt.

Abbildung 3.2 zeigt beispielhaft die klinische Vorgehensweise bei Transplantation des Amnionpatches auf eine Spalthautwunde.



Abb. 3.2: Auflage von kryokonservierter humaner Amnionmembran auf porcine Spalthautentnahmestelle. Die Fixierung der Membran erfolgte nach deren Auflage auf dem Defekt mit Ethilon 5-0 Nahtmaterial (siehe Einzelknopfnah rechts).

### **3.5. Wundkontrolle und Probengewinnung**

Die Wunden wurden regelmäßig kontrolliert und Verbandswechsel mit Paraffingazen (*Jelonet<sup>®</sup>, 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<sup>®</sup>, 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 Stenzen (Durchmesser 6 mm) erfolgte mittels einer standardisierten Stanze (*Pfm Pr.F.D. Medizin AG, Carlsbad, USA*) in Sedierung des Tieres. Die Stenzen 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. Die VH-Defekte wurden in einer anderen Studie evaluiert.

### **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<sup>®</sup> (*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*<sup>®</sup>, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Gewebeschnitte wurden anschließend im Labor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie unter einem Lichtmikroskop (AxioCam HRC<sup>®</sup>, 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**

Zur Durchführung der Immunhistologie wurden 3 µm dicke Paraffinschnitte der Stenzen angefertigt, welche anschließend auf *Superfrost Plus*<sup>®</sup> 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).

Ziel der immunhistologischen Untersuchungen der Stanzbiopsien war eine Beurteilung der

- Gefäßproliferation
- Zellproliferation als Maß für die Epithelisierung
- Narbenbildung
- Integrität der Basalmembran

in den Wunden, wobei Unterschiede innerhalb dieser Parameter zwischen den beiden Gruppen der mit HAM und der mit Polyurethanfolie versorgten Wunden identifiziert werden sollten, um die Qualität der resultierenden Wundheilung für beide

Materialien vergleichen zu können. Für diese Zwecke wurden kommerziell erhältliche Primärantikörper ausgewählt, die die jeweils für die Fragestellung relevanten Proteinstrukturen innerhalb der geschnittenen Proben detektieren konnten. Im Rahmen der immunohistochemischen Analyse wurden diese im nächsten Schritt mit Sekundärantikörpern konjugiert, welche die gesuchten Proteine im digitalisierten Bild sichtbar machen konnten.

Tabelle 3.1 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 NARBENBILDUNG	Firma Abcam, Cambridge, UK
polyclonal rabbit anti-human von Willebrand factor	Endothelzellen GEFÄSSPROLIFERATION	Firma Dako, Glostrup, Dänemark
monoclonal mouse anti-human Ki-67 antigen	proliferierende Zellen ZELLPROLIFERATION	Firma Dako, Glostrup, Dänemark
polyclonal rabbit anti-Laminin	Basalmembran INTERGRITÄT DER BASALMEMBRAN	Firma Dako, Glostrup, Dänemark

Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten Antikörper, die zu detektierenden Strukturen und die Hersteller.

### 3.9. Vorgehen bei der Auswertung

Die Proben wurden makroskopisch und mikroskopisch analysiert.

Für die makroskopische und die 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 [+++]). 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 wurde zunächst das Narbenkolorit am 60. Tag analysiert, 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. Da die Tiere im Verlauf des Experiments durchschnittlich circa 30% an Gewicht zulegten (Ausgangsgewicht im Durchschnitt 27 kg, Endgewicht durchschnittlich 35 kg), wurde die tätowierte Wundfläche an Tag 60 mit dem Faktor 0,7 multipliziert, um eine Korrektur der Gewichtszunahme mit einhergehender Oberflächenvergrößerung zu erreichen. Anschließend wurden der Quotient aus der kontrahierten Wundfläche und dem ursprünglichen Defektgebiet errechnet und die prozentuale Kontraktion der einzelnen Behandlungsgruppen verglichen. Abbildung 3.3 zeigt die zur Vermessung der Kontraktion verwendete Schablone.

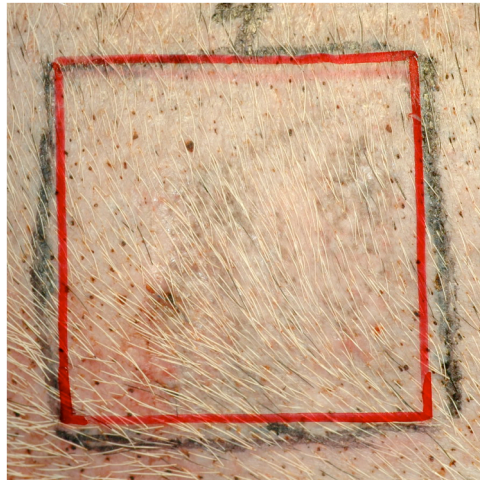


Abb. 3.3: Die Wundfläche (schwarze Tätowierung) am 60. postoperativen Tag im Vergleich zur ursprünglichen Hautfläche (rote Schablone) vor der Defektsetzung.

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  $\mu\text{m}$  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 7. und der 60. postoperative Tag beurteilt. Die Epithelmessungen erfolgten im pathologischen Institut der Technischen Universität München mittels des *Leica Q Win*<sup>®</sup> 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 3.4). Somit wurden je Probe insgesamt 48 Punkte vermessen. Zwischen den Messpunkten wurde ein Abstand von 0,05 – 0,1 mm eingehalten.



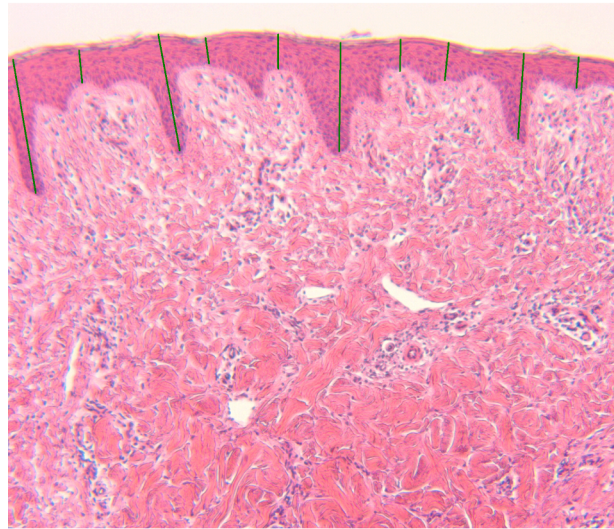


Abb. 3.4: Methodik bei der Epitheldickenmessung. Spalthautwunde am 20. postoperativen Tag (HE-Färbung, 50 fache Vergrößerung).

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 7. 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. Es wurden sowohl die Tage 7 und 60 zwischen beiden Gruppen verglichen, als auch Vergleiche innerhalb jeder Gruppe (Analyse auf Veränderungen im postoperativen Verlauf) durchgeführt.

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, 40 und 60.

Anhand der von Willebrand Färbungen erfolgte eine Auszählung der subepidermalen Gefäße zur Beurteilung der Proliferationsphase. Die Gefäßzählung wurde an den Schnitten des 7. und 10. postoperativen Tages 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*<sup>®</sup> (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) in 5 verschiedenen HPFs pro Stanzenhälfte pro Biopsat die Gefäße gezählt, wodurch man 10 Werte je Biopsat erhielt. Insgesamt wurde die Gefäßanzahl sowohl pro Gruppe an den Tagen 7 und 10 verglichen, als auch in 10 unabhängigen Vergleichen die Tage und Gruppen untereinander (Verlaufsanalyse).

Die Färbung mittels  $\alpha$ SMA diente zur Beurteilung der Narbenbildung.  $\alpha$ 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). Da nur das interstitielle  $\alpha$ SMA die Vernarbung entscheidend beeinflusst, wurde das in der glatten Muskulatur der Blutgefäße sowie das im Musculus erector pili der Haarfollikel enthaltene  $\alpha$ SMA nicht in die Auswertung mit einbezogen. Abbildung 3.5 zeigt beispielhaft den Unterschied zwischen dem interstitiellen  $\alpha$ SMA und dem  $\alpha$ SMA der glatten Gefäßmuskulatur, welches nicht in die Auswertung mit einbezogen wurde. Die Auszählung der  $\alpha$ SMA - positiven Zellen erfolgte an Tag 10 in jeweils 5 HPF pro Färbeschnitt unter dem Leitz Aristoplan Mikroskop. Zu diesem Zeitpunkt war in allen Stanzen eine Differenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten histologisch erkennbar. Es wurden insgesamt 10 Vergleiche zwischen den Gruppen durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Prism Software (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Von den stetig messbaren Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Für Mittelwert-Vergleiche bei abhängigen Stichproben wurde der gepaarte  $t$ -Test angewendet, für Mittelwert-Vergleiche zwischen den Gruppen aus unabhängigen Stichproben der  $t$ -Test für unabhängige Stichproben. Die Resultate wurden als signifikant erachtet, wenn der  $p$ -Wert kleiner gleich 0,05 ( $p \leq 0,05$ ) war. In den Diagrammen wurden für die Abweichung vom Mittelwert die Standardabweichungen dargestellt.

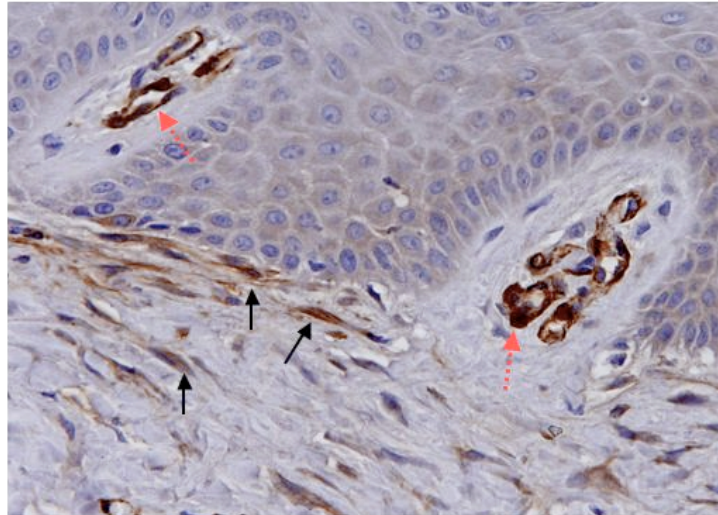


Abb. 3.5: Exemplarische Darstellung einer Vollhautwunde in der  $\alpha$ SMA-Färbung (300fach). Die schwarzen Pfeile deuten beispielhaft auf das interstitielle, die Vernarbung beeinflussende  $\alpha$ SMA. Die roten, gestrichelten Pfeile zeigen auf  $\alpha$ SMA in der glatten Gefäßmuskulatur, welches nicht in die Auswertung mit einbezogen wurde.

## **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**

#### **4.1.1. Klinische Beurteilung**

Die Transplantatannahme der mit HAM versorgten Wunden betrug 100%.

##### *Mit HAM versorgte Wunden:*

Zwei Tage nach Defektsetzung konnten keine wesentlichen Entzündungszeichen beobachtet werden, die HAM war intakt und lag der gesamten Wundfläche regelrecht an. Zwischen dem 5. und dem 7. postoperativen Tag verstärkte sich die Schorfbildung, während die Exsudation deutlich abnahm. Am 10. Tag war bereits die Hälfte des Schorfs abgelöst und auf der gesamten Wundfläche eine beginnende Epithelisierung zu erkennen. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes traten weder Blutungen noch Entzündungen oder eine Infektion auf. Bei keiner der insgesamt acht mit HAM versorgten Wunden waren offene Ränder oder Nekrosen zu beobachten, die Transplantatannahme betrug somit 100%. An den ehemaligen Defekten zeigten bei der Endkontrolle am 60. Tag sieben eine hautfarbene Vernarbung, eine Wunde stellte sich rosa dar.

##### *Mit Polyurethan-Wundfolie versorgte Wunden:*

Ähnlich zu den mit HAM versorgten Wunden konnten sowohl am 2. als auch am 5. postoperativen Tag keine oder lediglich eine leichte Entzündungsreaktion beobachtet werden. Der am 7. Tag am stärksten ausgeprägte Schorf war am 10. Tag fast vollständig abgelöst und es zeigte sich vergleichbar mit den HAM-Wunden bereits in großen Wundanteilen eine regelhafte Epithelisierung. Blutung oder Infektion wurden

während des gesamten Beobachtungszeitraumes nicht beobachtet. Bei der Beurteilung der Wundfarbe zeigten vier PU-Folien-Wunden eine hautfarbene und drei eine rosafarbene ehemalige Wundfläche, bei einem Defekt war die Wundfläche eher weißlich.

*Beurteilung von Unterschieden zwischen den Gruppen hinsichtlich der Wundheilung:*

In beiden Behandlungsgruppen wurden weder Infektionen noch postoperative Blutungen oder Wundkontraktionen beschrieben. Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs des klinischen Wundheilungsprozesses konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Nach 60 Tagen stellten sich die HAM-Wunden größtenteils hautfarben, die mit PU-Folie versorgten Wunden hingegen eher rosafarben dar. Somit fällt das ästhetische Ergebnis der mit HAM behandelten Wunden besser aus als das der mit PU-Folie versorgten Defekte.

Tabelle 4.1 zeigt die erhobenen Kriterien im postoperativen Verlauf im Vergleich, Abbildung 4.1 stellt den klinischen Verlauf einer exemplarischen Wunde pro Behandlungsgruppe dar.

		Blutung	Entzündung	Infektion
HAM	2d	-	+	-
	5d	-	-	-
	7d	-	-	-
	10d	-	-	-
	20d	-	-	-
	40d	-	-	-
	60d	-	-	-
PU-Folie	2d	+	+	-
	5d	-	+	-
	7d	-	-	-
	10d	-	-	-
	20d	-	-	-
	40d	-	-	-
	60d	-	-	-

Tab. 4.1: Die verschiedenen Behandlungsgruppen im zeitlichen Verlauf hinsichtlich der Eigenschaften Blutung, Entzündung und Infektion ( - = nicht vorhanden; + = leicht vorhanden; ++ = mäßig vorhanden; +++ = stark vorhanden).

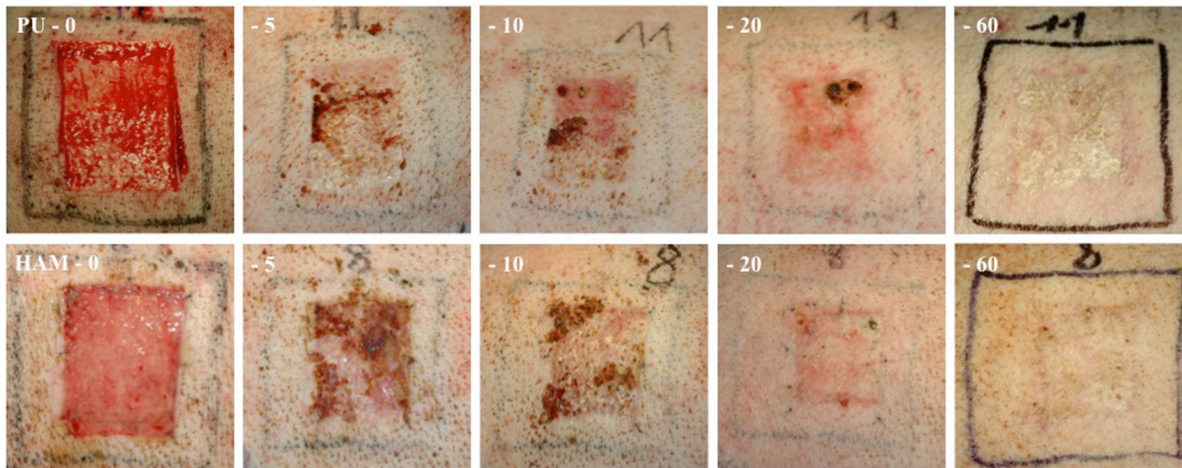


Abb. 4.1.: Wundheilungsverlauf porciner Spalthautentnahmedefekte unter Anwendung humaner Amnionmembran oder Polyurethan-Wundfolie. Beispiel für eine Fotodokumentation an den postoperativen Tagen 0, 5, 10, 20 und 60 (nicht alle dokumentierten Tage abgebildet). Es ist kein wesentlicher Unterschied im Wundheilungsverlauf zwischen den beiden Gruppen erkennbar.

#### 4.1.2. Analyse der Wundkontraktion

Die Wundkontraktion der mit HAM versorgten Wunden ist mit durchschnittlich 3,20% geringer als die der mit PU-Folie versorgten Wunden, deren durchschnittliche Wundkontraktion bei 3,93% liegt. Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied ( $p=0,3542$ ). Tabelle 4.2 zeigt die Werte durchschnittliche Wundkontraktion am 60. postoperativen Tag.

	Mittelwert +/- SEM [%]
<b>HAM</b>	3,20 +/- 0,63
<b>PU</b>	3,93 +/- 0,51

Tab. 4.2: Mittelwerte und SEM der prozentualen Wundkontraktion am 60. postoperativen Tag (n=8).

## **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 Granulationsgewebesicht
- 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**

Anhand der histologischen Auswertung der HE- und der EvG-Schnitte lassen sich folgende Aussagen treffen:

In der exsudativen Phase zeigt sich bei der mit HAM versorgten Wunde an der Oberfläche zum Teil vitales, einschichtiges Amnionepithel mit einer darunter liegenden dichten Granulozytenschicht, Fibrin und ödematösen Veränderungen. Die mit PU-Folie versorgte Wunde erscheint im Gegensatz dazu eher ausgetrocknet und ist von einer dünnen Fibrinschicht mit einzelnen Granulozyten bedeckt. In beiden Behandlungsgruppen sind im angrenzenden Stratum reticulare der erhaltenen Dermis perivaskuläre Infiltrate aus Fibroblasten, Granulozyten und einzelnen Makrophagen zu erkennen, Nekrosen sind nicht zu sehen. Die exsudative Phase ist

bei beiden Wunden nach zwei Tagen nahezu beendet und geht dann in die resorptive Phase über, die an der beginnenden Reepithelisierung zu erkennen ist.

Die Epithelisierung ist in beiden Behandlungsgruppen bereits am **5. postoperativen Tag** weitgehend abgeschlossen. Das Stratum basale und das Stratum spinosum des Epithels stellen sich verbreitert dar. Eine Differenzierung der epithelialen Schichten ist zu erkennen, jedoch liegt noch keine Verhornung vor (siehe Abbildung 4.2). Die Basalmembran ist bei beiden Gruppen weder am 5. noch am 7. Tag intakt. Unterhalb des Epithels hat sich am 5. Tag eine schmale, lockere Granulationsgewebsschicht gebildet, welche sich am 5. Tag ungeordnet darstellt und überwiegend aus Fibroblasten mit großem Zellkern und spindelzelligem oder unregelmäßig geformtem basophilen Zytoplasma besteht. Das Granulationsgewebe der HAM-Wunde ist im Gegensatz zur PU-Folien-Wunde zellreicher und etwas breiter. Neben den Fibroblasten treten auch mehr segmentkernige Granulozyten und Makrophagen auf. Extrazelluläre Matrix ist kaum vorhanden. Die residuelle Dermis ist aufgelockert und ödematös mit perivaskulären entzündlichen Infiltraten.

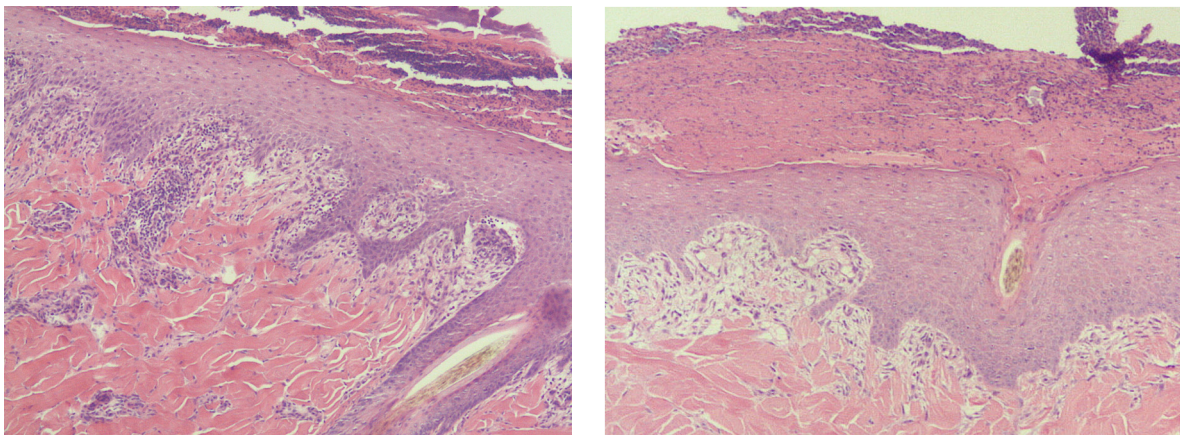


Abb. 4.2: HE-Färbung des 5. postoperativen Tags der Spalthautwunden im Vergleich. Sowohl bei der HAM-Wunde (links) als auch bei der PU-Wunde (rechts) zeigt sich zu diesem Zeitpunkt bereits eine vollständige Reepithelisierung.

Am **7. postoperativen Tag** ist das Granulationsgewebe in beiden Gruppen immer noch zellreich, vereinzelt kommen spindelförmige Zellen vor, die einer Differenzierung zu Myofibroblasten entsprechen können. Eine horizontale



Ausrichtung der Zellen ist noch nicht feststellbar. Der Anteil der extrazellulären Matrix, welche sich überwiegend homogen eosinophil darstellt, nimmt zu. Der Übergang zur residuellen Dermis ist fließend, wobei hier auch schon beginnende Kollagenfaserbildung zu beobachten ist.

Am **10. postoperativen Tag** überwiegt bei der HAM-Wunde bereits der Anteil der extrazellulären Matrix innerhalb des etwas breiteren Granulationsgewebes und es zeigen sich zarte kollagene Fasern. Die Zellen sind überwiegend horizontal und spindelzellig angeordnet, eine Differenzierung in Myofibroblasten und vereinzelt ausgereifte Fibrozyten ist festzustellen. Das Epithel zeigt alle Epidermisschichten, erscheint zum Teil aber noch verbreitert und proliferativ mit breiten Epithelzapfen. Die Granulationsgewebsschicht bei der mit PU-Folie versorgten Wunde ist insgesamt etwas breiter und ungeordneter. Die Zellen sind ebenfalls spindelzellig angeordnet mit Differenzierung in Myofibroblasten und Fibrozyten. Das Epithel der PU-Folien-Wunde ist teilweise abgeflacht und eher atrophiert.

In beiden Defekten stellt sich am **20. postoperativen Tag** ein ausgereiftes, abgeflachtes Epithel mit einschichtigem Stratum basale und Verhornung dar. Während das Epithel der HAM-Wunde flache Papillen der Epidermis aufweist, zeigt sich bei der mit PU-Folie versorgten Wunde keinerlei Verzahnung zwischen Dermis und Epidermis. Die darunterliegende Bindegewebsschicht ist in der HAM-Wunde etwas breiter und stellt sich ansonsten bei beiden Gruppen kollagenreich mit deutlich reduziertem zellulären Anteil dar. Die Kollagenfasern verlaufen überwiegend horizontal (siehe Abbildung 4.3).

Am **60. postoperativen Tag (Finaltermin)** zeigen sich in beiden Defekten vitale Zellen, das subkutane Fettgewebe ist ebenfalls vital. Im Vergleich zum 20. postoperativen Tag sind nur geringe Unterschiede festzustellen. Die ehemalige Granulationsgewebsschicht wird in beiden Wundarten schmaler und kollagenreicher, die Kollagenbänder breiter. Sie weisen aber auch am Finaltag nicht die scherengitterartige Struktur des normalen Stratum reticulare auf. Das Epithel ist am 60. postoperativen Tag bei beiden Stanzen regelrecht differenziert mit breiter Verhornung.

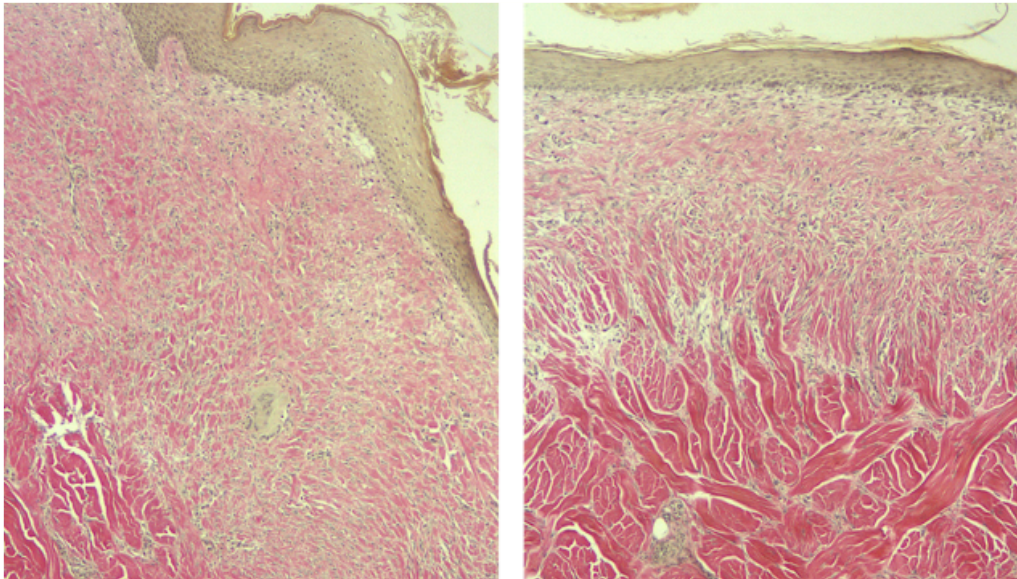


Abb. 4.3: EvG-Färbung des 20. postoperativen Tags der Spalthautwunden im Vergleich. Die HAM-Wunde (links) zeigt eine überwiegend horizontale Ausrichtung der Kollagenfasern, wohingegen der PU-Defekt (rechts) zum Teil eine ungeordnete Anordnung der Kollagenfasern aufweist.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass sich sowohl im Hinblick auf die Zellinfiltration, als auch hinsichtlich des zeitlichen Aspektes der Wundheilung in Bezug auf Reepithelisierung und Ausreifung der Epidermis keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen ergeben.

#### **4.2.2. Statistische 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 4.3 sowie die Abbildung 4.4 zeigen die Ergebnisse der Auswertung der Epitheldicke am 7. und am 60. postoperativen Tag. Die detaillierten Ergebnisse der statistischen Auswertung der Epitheldicke mittels des t-Tests für abhängige Stichproben sind im Anhang dargestellt (siehe Tab 9.1).

	Mittelwert $\pm$ SEM [ $\mu\text{m}$ ]	
	7d	60d
<b>Kontrolle</b>	168,0 $\pm$ 6,83	168,0 $\pm$ 6,83
<b>HAM</b>	653,3 $\pm$ 53,83	190,5 $\pm$ 12,24
<b>PU-Wundfolie</b>	381,3 $\pm$ 23,45	324,8 $\pm$ 20,88

Tab. 4.3: Mittelwerte und SEM der Epitheldicke (in  $\mu\text{m}$ ) der Spalthautwunden und der Kontrolle (gesunde Schweinehaut) am 7. und am 60. postoperativen Tag.

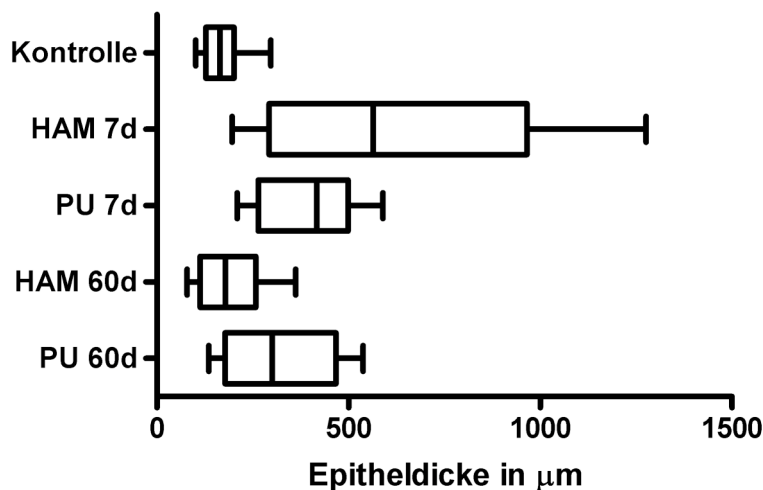


Abb. 4.4: Boxplot der Epitheldicke der Spalthautwunden.

Die Auswertung der Epitheldicken ergab, dass die HAM-Wunden am 7. postoperativen Tag eine signifikant höhere Epitheldicke aufwiesen als die der PU-Folien-Behandlungsgruppe ( $p < 0,001$ ). Diese zeigten hingegen am 60. Tag signifikant höhere Werte als diejenigen in der HAM-Gruppe ( $p < 0,001$ ). Die HAM-Wunde wies am 60. Tag eine signifikant geringere Epitheldicke auf als am 7. Tag ( $p < 0,001$ ), wohingegen bei der PU-Folien-Gruppe kein Unterschied zwischen diesen Tagen bestand ( $p = 0,084$ ). Eine Auflistung der entsprechenden Messwerte findet sich in Tab. 9.2.

### 4.3. Immunhistologische Analyse

#### 4.3.1. Beurteilung der Zellproliferation mittels anti-Ki-67

Zur Beurteilung der Zellproliferation wurde am 7. und am 60. postoperativen Tag der Proliferationsindex bestimmt, welcher sich durch den Quotienten aus der Anzahl der proliferierenden Zellen und der Gesamtzahl der Basalzellen errechnet.

Tabelle 4.4 und Abbildung 4.5 zeigen die Ergebnisse der Auswertung der Proliferationsindizes der Spalthautwunden. Die detaillierten Ergebnisse der statistischen Auswertung sind im Anhang dargestellt (siehe Tab. 9.2)

Wundauflage	Mittelwert $\pm$ SEM	
	7d	60d
<b>HAM</b>	0,13 $\pm$ 0,0023	0,20 $\pm$ 0,0051
<b>PU-Folie</b>	0,15 $\pm$ 0,014	0,29 $\pm$ 0,0069

Tab. 4.4: Mittelwerte und SEM der Proliferationsindizes der Spalthautwunden am 7. und am 60. postoperativen Tag (n=8).

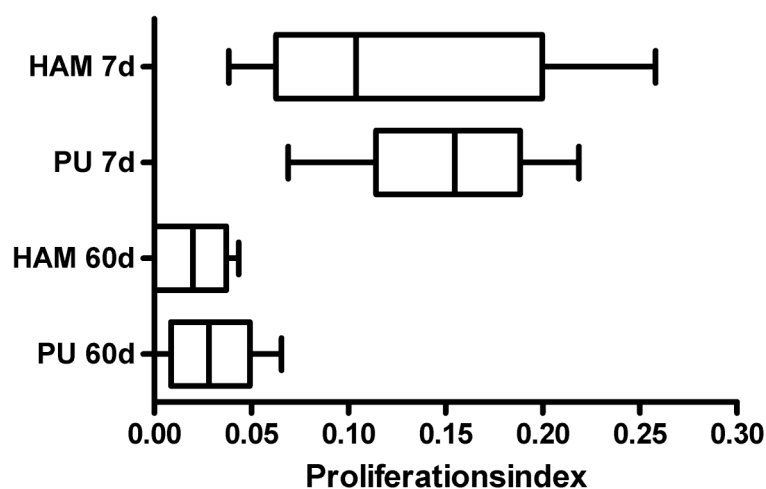


Abb. 4.5: Boxplot der Proliferationsindizes der Spalthautwunden.

Sowohl am 7. als auch am 60. postoperativen Tag unterschieden sich die Werte der beiden Behandlungsgruppen nicht signifikant voneinander. Die Vergleiche innerhalb der Behandlungsgruppe zwischen dem 7. und dem 60. postoperativen Tag ergaben hingegen in beiden Behandlungsgruppen statistisch signifikante Unterschiede (jeweils  $p < 0,001$ ; Messwerte siehe Tab. 9.3)

Eine exemplarische Darstellung der Ki-67-Färbungen von Schnitten aus beiden Gruppen wird in Abb. 4.6 präsentiert.

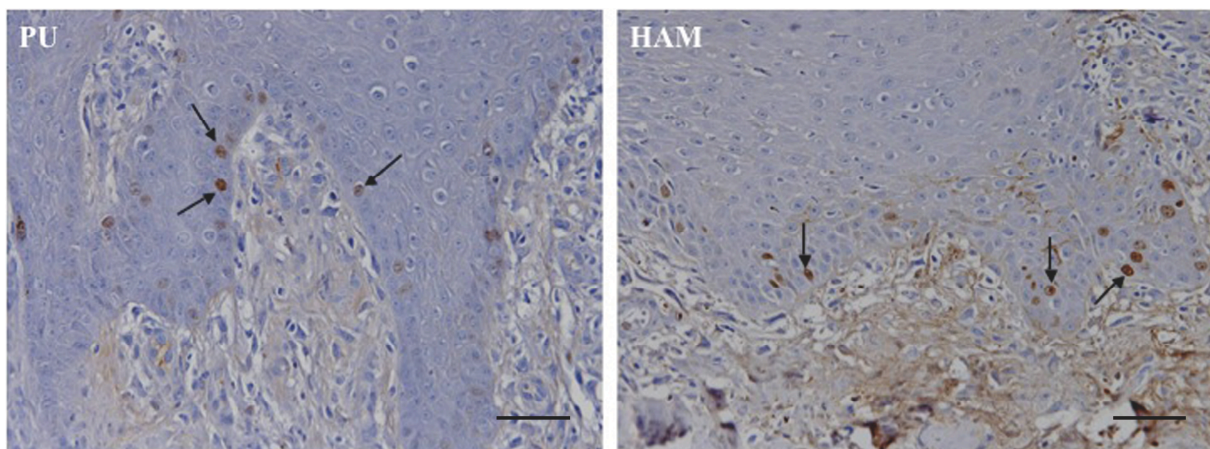


Abb. 4.6: Markierung von proliferierenden Zellen mit Hilfe der immunhistochemischen Ki-67-Färbung. Mit Polyurethan-Folie (PU) und mit humaner Amnionmembran (HAM) behandelte Wunde (300-fach) am siebten postoperativen Tag. Die Pfeile deuten beispielhaft auf angeschnittene proliferierende Zellen, welche sich aufgrund der Anfärbung mit Primär- und Sekundärantikörpern bräunlich darstellen.

#### **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 über den gesamten postoperativen Verlauf die Basalmembran auf ihre Vollständigkeit hin untersucht.

In den Proben aus der Gruppe der mit HAM behandelten Wunden waren am 10. postoperativen Tag intakte, vollständige Basalmembranen nachweisbar. In den Proben aus der Gruppe der mit Polyurethanfolie versorgten Wunden war eine

vergleichbare Qualität der Basalmembranen nicht vor dem 20. postoperativen Tag aufzufinden (Tab. 4.5). Abb. 4.7 zeigt beispielhaft die Anfärbung einer Basalmembran mittels Laminin-Antikörper.

	PU-Folie	HAM
<b>5d</b>	+/-	+/-
<b>7d</b>	+/-	+/-
<b>10d</b>	+/-	+
<b>20d</b>	+	+
<b>40d</b>	+	+
<b>60d</b>	+	+

Tab. 4.5: Integrität der Basalmembran bei den Spalthautwunden im postoperativen Verlauf.

+ : Basalmembran vollständig intakt

+/- : Basalmembran teilweise intakt

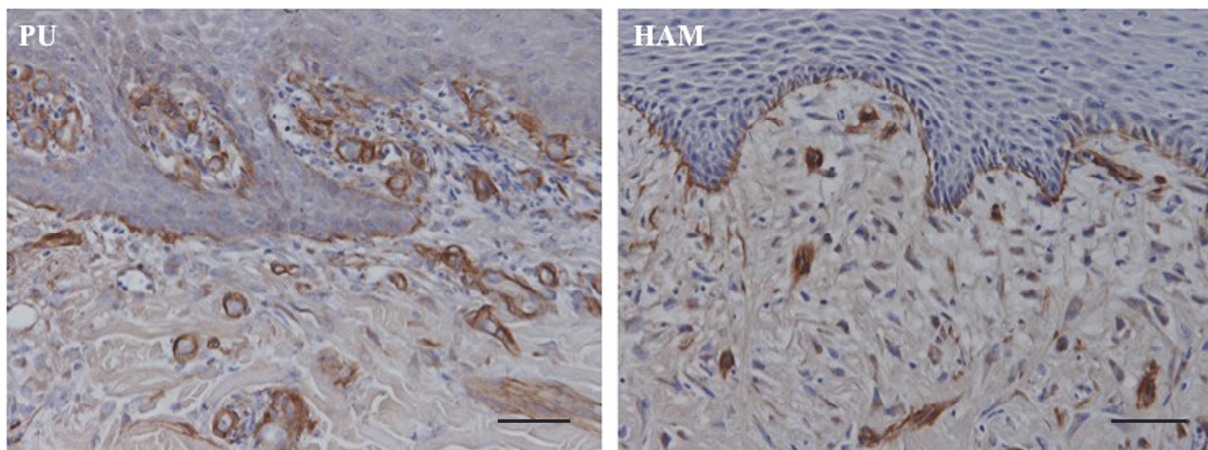


Abb. 4.7: Markierung der Basalmembran am 10. postoperativen Tag mit Hilfe der immunhistochemischen Anti-Laminin-Färbung (300fach). In der mit PU-Folie versorgten Wunde stellt sich die Basalmembran lückenhaft dar, wohingegen sie in dem mit HAM gedeckten Defekt bereits vollständig intakt ist.

### 4.3.3. Beurteilung der Gefäßproliferation mittels anti-vWF

Die Auszählung der Gefäße erfolgte an den für die Gefäßproliferation relevantesten postoperativen Tagen 7 und 10.

Sowohl am 7. als auch am 10. postoperativen Tag zeigten die Gewebeproben der mit PU-Folien versorgten Wunden eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßen als die mit HAM behandelten Wunden (jeweils  $p < 0,001$ ; Messwerte siehe Tab. 9.3). Die Anzahl an Gefäßen stieg in beiden Gruppen zwischen dem 7. und dem 10. postoperativen Tag an, wobei die Zunahme innerhalb der Polyurethanfolien-Gruppe signifikant war ( $p < 0,001$ ), bei der HAM-Gruppe hingegen nicht.

Die Tabelle 4.6 sowie die Abbildung 4.8 zeigen die Ergebnisse Auswertung der Gefäßproliferation. Die detaillierte Auflistung der Ergebnisse der statistischen Auswertung findet sich im Anhang (siehe Tabelle 9.4). Eine exemplarische Darstellung der vWF-Färbungen von Schnitten aus beiden Gruppen wird in Abb. 4.9 präsentiert.

Wundauflage	Mittelwert +/- Standardabweichung	
	7d	10d
HAM	0,90 +/- 0,18	1,05 +/- 0,14
PU-Folie	1,80 +/- 0,16	4,70 +/- 0,47

Tab. 4.6: Mittelwerte und SEM der Anzahl der Gefäße am 7. und am 10. postoperativen Tag.

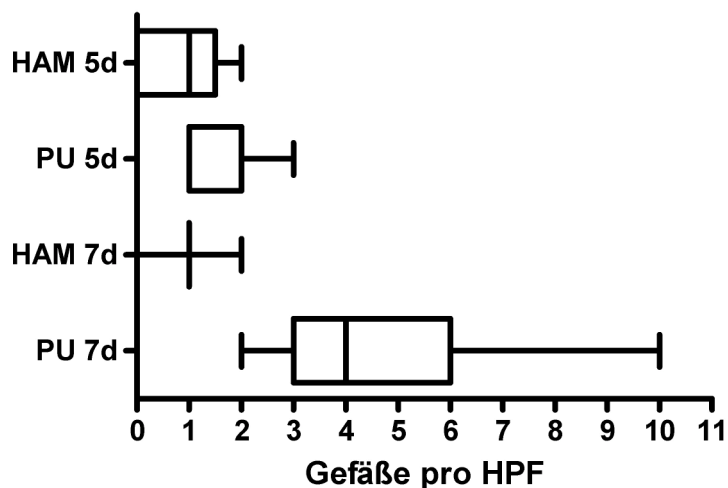


Abb. 4.8: Boxplot der Gefäßanzahl pro HPF der verschiedenen Behandlungsgruppen.

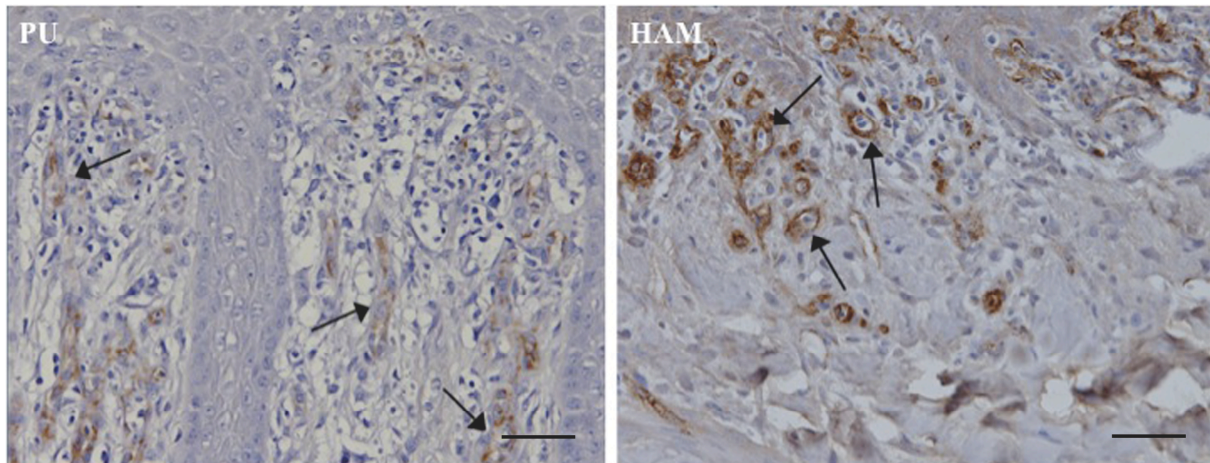


Abb. 4.9: Markierung von Gefäßwänden mit Hilfe der von Willebrand-Faktor-Färbung. Links mit Polyurethan-Folie (PU) und rechts mit humaner Amnionmembran (HAM) behandelte Wunde (300fach) am zehnten postoperativen Tag. Die Pfeile deuten beispielhaft auf angeschnittene Gefäße, deren Wände sich aufgrund der Anfärbung mit Primär- und Sekundärantikörpern als bräunliche, kreisförmige Strukturen darstellen.

#### 4.3.4. Beurteilung der Narbenbildung mittels anti- $\alpha$ SMA

Zur Beurteilung der Narbenbildung wurden Schnitte aus Stanzbiopsien von allen Untersuchungstagen immunhistochemisch mit Antikörpern gegen den in Narben enthaltenen Bestandteil  $\alpha$ SMA angefärbt und ausgewertet. In allen Proben sowohl aus den mit HAM, als auch in den mit PU-Folie versorgten Spalthautwunden zeigten sich keine oder nur wenige gefärbte ( $\alpha$ SMA-positive) Fibroblasten. Somit resultierte in beiden Gruppen der konstante Wert "0", womit eine statistische Auswertung entfiel.



## 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 ein 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 Wundaufgabe 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 Polyurethanfolie sowie humane Amnionmembran zur Versorgung von Spalthautwunden verwendet.

Semipermeable Wundfolien aus Polyurethan zählen zu den am häufigsten verwendeten Materialien zur Versorgung von Spalthautentnahmedefekten. Ein Vorteil dieser Folien ist der Schutz der Wunde vor bakterieller Kontamination (Higgins, L., et al., 2012, S. 127). In einer Übersichtsarbeit wird die Rate an Wundinfektionen mit 3% angegeben (Rakel, B.A., et al., 1998, S. 174). Durch die Transparenz der Wundfolien ist außerdem eine gute Beurteilung der Wunde möglich (Voggenreiter, G., et al., 2009, S. 36). Ein weiterer Vorteil von Polyurethan-Wundfolien wird in der Studie von Dornseifer et al. aufgezeigt, in welcher die Eigenschaften von PU-Folie im Vergleich zu Aquacel<sup>®</sup>, einem Faserverband aus Natriumcarboxymethylzellulose, zur Versorgung von Spalthautentnahmedefekten untersucht wurden. Es zeigte sich, dass PU-Folie die Reepithelisierungsprozesse beschleunigt: 10 Tage postoperativ waren 86,4% der mit PU-Folie versorgten Wunden reepithelisiert, wohingegen nur 54,5% der mit Aquacel<sup>®</sup> behandelten Defekte eine vollständige Epithelisierung aufwiesen (Dornseifer, U., et al., 2011, S.918). Weiterhin zeichnen sich Polyurethanfolien durch die geringen Anschaffungskosten aus (Demirtas, Y., et al., 2010, S. 999).

In Bezug auf die Schmerzen der Patienten bei der Anwendung verschiedener Materialien liegt Polyurethan-Folie im Mittelfeld. Eine Studie von Demirtas et al., welche fünf verschiedene Materialien zur Versorgung von Spalthautentnahmestellen vergleicht, zeigte, dass bei der Anwendung von Comfeel<sup>®</sup>, welches aus einer selbsthaftenden Hydrokolloidmatrix besteht, am wenigsten Schmerzen auftraten, bei Bactigras<sup>®</sup>, einem Paraffingazeverband mit Chlorhexidin, hingegen die meisten Schmerzen angegeben wurden. Die Schmerzintensität bei der Anwendung von Opsite<sup>®</sup> lag in dieser Studie zwischen denen der oben genannten Materialien (Demirtas, Y., et al., 2010, S. 999). Akita et al. berichten von einer höheren Schmerzintensität bei PU-Folie im Vergleich zu einem Hydrogel-Verband (Akita, S., et al., 2006, S. 447). Da die Schmerzen vor allem während des Verbandswechsels auftreten, ist die Intensität der Haftung des Materials am Wundbett und an der die Wunde umgebenden intakten Haut von entscheidender Bedeutung. Matsumura et al. führten eine Studie durch, in der die Menge an Stratum corneum, welche im Rahmen

eines Verbandswechsels von gesunder Haut abgezogen wird, quantifiziert und für acht verschiedene Materialien verglichen wurde. Es zeigte sich, dass vor allem das verwendete Adhäsivsystem von Bedeutung ist: Wundverbände mit Silikonadhäsiv (Hydrosite® AD Gentle, Mepilex® Transfer) oder selbstadhäsiver Polyurethan-Schaum (Hydrosite® Ultrathin) verhielten sich in Bezug auf die Ablösung des Stratum corneum schonender als Polyurethan-Schaum mit Acryladhäsiv (Hydrosite® AD Plus) und Hydrokolloidverbände (Replicare®) (Matsumura, H., et al., 2012, S. 1742). Die in der hier vorliegenden Studie benützte PU-Folie Opsite® Felxigrid verwendet Polyacrylatkleber.

Ein Nachteil der Polyurethan-Wundfolien besteht in der unkontrollierten Ansammlung von Exsudat und möglicher Leckage mit Austritt von Blut und Wundflüssigkeit. Dies führt zu Diskomfort seitens des Patienten und einem erhöhten Arbeitsaufwand in Bezug auf Verbandswechsel und Wundversorgung (Dornseifer, U., et al., 2011, S. 918). Higgins et al. führten eine Studie durch, in der eine Polyurethanfolie mit einem Kalziumalginat-Verband zur Versorgung von Spalthautentnahmestellen verglichen wurden. In dieser Studie wird berichtet, dass bei beiden Materialien eine Leckage von Exsudat auftrat, wodurch ein frühzeitiger Verbandswechsel bereits nach 10 Tagen nötig war. Dies wiederum führte zu einer Austrocknung des Wundbettes, was einen erneuten Verbandswechsel durch die Adhärenz des Materials an der Wundfläche erschwerte (Higgins, L., et al., 2012, S. 130).

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. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie bestätigen dies, da die Transplantatannahme in der HAM-Behandlungsgruppe 100% betrug.

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). 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 Inflammationsreaktionen 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). In der hier vorliegenden Studie lagen postoperativ ebenfalls keine Anzeichen einer Entzündung oder Infektion der mit HAM versorgten Defekte vor.

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 beide Behandlungsgruppen am 5. Tag nahezu komplett reepithelisiert waren, bei der HAM-Wunde jedoch die Basalmembran als entscheidender Bestandteil des Epithels bereits am 10. Tag wieder vollständig intakt, bei der mit PU-Folie hingegen nur partiell vorhanden war. 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 zeigte die HAM-Behandlungsgruppe bessere ästhetische Ergebnisse hinsichtlich des Narbenkolorits sowie geringere narbige Hypertrophien im Vergleich zu den mit PU-Folie versorgten Wunden.

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). In der vorliegenden Studie wiesen die mit HAM versorgten Spalthautwunden an beiden Beobachtungszeitpunkten eine signifikant geringere Gefäßdichte auf als die Kontrollgruppe. Dieses Resultat steht im Kontrast zu den bisherigen Beobachtungen an extraokulären Geweben.

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 Verbandswechslern 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). In unserer Studie waren keinerlei Probleme im Hinblick auf die mechanische Stabilität der Amnionmembran zu beobachten. Die Transplantatannahme betrug in beiden Behandlungsgruppen 100%, es waren weder Dehiszenzen am Wundrand noch Risse im Transplantatmaterial zu beobachten.

### **5.3. Klinischer Verlauf**

Die Immunogenität der Amnionmembran wird noch kontrovers diskutiert. Hori et al. fanden heraus, dass frisches allogenes 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. 55). Adinolfi et al. jedoch konnten einen relativen Mangel an MHC-1-Antigenen in der 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.326). In einer Studie von Akle et al. wurde bei der Transplantation von Amnionmembran bei keinem der 7 Patienten Abstoßungsreaktionen beobachtet, was darauf zurückgeführt wird, dass humane Amnionepithelzellen weder HLA-Antigene noch  $\beta_2$ -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). Obwohl in einer aktuellen Studie von Li et al. zur Untersuchung immunsupprimierender Faktoren der Amnionmembran eine *in vitro*-Produktion signifikanter Mengen proinflammatorischer Zytokine durch Amnionepithelzellen beobachtet wurde, konnte der immunsuppressive Effekt der Amnionmembran auf die Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen, eine verminderte B- und T-Zellproliferation sowie die Apoptoseinduktion bestätigt werden (Li, H., et al., 2005, S. 900). Bezüglich der kontrovers diskutierten Immunogenität der Amnionmembran zeigte sich in dem vorliegenden Experiment bei den Spalthautwunden eine Transplantatannahme von 100%. Bei der Beurteilung der Transplantatannahme müssen die mechanische Stabilität eines Materials, die immunogenen Eigenschaften, die Wundmorphologie sowie die Art der Transplantation bedacht werden. 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). Da die Wundmorphologie von Spalthautwunden der von Verbrennungswunden sehr ähnelt, bestätigt unsere Studie somit die Ergebnisse von Fraser et al., auch wenn unterschiedliche Transplantationsverfahren (allogen vs autolog) zum Einsatz kamen. 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 somit auch die immunsuppressiven Effekte der Amnionmembran eine längere Wirkdauer erreichen (Kesting, M.R., et al., 2009, S. 930). Da jedoch in unserer Studie bereits eine Transplantatannahme von 100%

beobachtet wurde, kann auf die technisch anspruchsvollere MU-Anwendung zur Versorgung von Spalthautwunden verzichtet werden.

Weiterhin wurde der postoperative Verlauf bewertet. Der postoperative Verlauf eines Wundheilungsprozesse wird maßgeblich von der Inflammationsreaktion sowie von möglichen Wundinfektionen bestimmt. Die HAM zeichnet sich durch ihre antiinflammatorische Wirkung aus (Hao, Y., et al., 2000, S. 348). Die freigesetzten antiinflammatorischen Proteine bewirken eine Downregulation der Expression von TGF- $\beta$  (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 verlief als bei den unbehandelten Defekten der Kontrollgruppe (Rinastiti, M., et al., 2006, S. 247). Ebenso verneinen Velez et al. in einer Studie zur Versorgung peridontaler 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 Inflammationsreaktionen in den Amnionmembran-Behandlungsgruppen (Park, M., et al., 2008, S. 520). Auch Insausti et al., die Amnionmembran als Deckungsmaterial für großflächige, posttraumatische Wunden verwendeten, berichten von antiinflammatorischen und antimikrobiellen Effekten der Amnionmembran (Insausti, C.L., et al., 2010, S. 368). In der hier vorliegenden Studie gestaltete sich der postoperative Verlauf in Bezug auf die Inflammationsreaktionen bei den beiden Behandlungsgruppen nahezu identisch, weder in der PU- noch in der HAM-Gruppe wurden Entzündungsreaktionen beobachtet.

Ein weiterer Vorteil der HAM ist der antimikrobielle Effekt. Peptide des angeborenen Immunsystems wie  $\beta$ -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. Darüber hinaus 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, da dadurch eine postoperative Kontamination der Wunde verhindert wird. 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. Auch in unserer Studie traten bei der Verwendung von Amnionmembran keine postoperativen Wundinfektionen auf. Somit werden die antiinflammatorischen und antimikrobiellen Eigenschaften der Amnionmembran durch die Ergebnisse unserer Studie bestätigt.

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). Hinsichtlich der ästhetischen Ergebnisse zeigten sich bei den mit Amnionmembran versorgten Wunden leichte Vorteile im Narbenkolorit, auch war die durchschnittliche Wundkontraktion geringer als in der PU-Gruppe.

### **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 HAM-Behandlungsgruppe zeigten sich histologisch keine Hinweise auf ausgeprägte Fremdkörperreaktionen im Sinne einer Transplantatabstoßung, was auf die niedrige Immunogenität der Amnionmembran zurückzuführen ist (Adinolfi, M., et al., 1982, S.326). Somit werden in der hier vorliegenden Studie die Ergebnisse der Studien von Akle et al., Fraser et al. und Maral et al., die ebenfalls keinerlei Abstoßungsreaktionen bei der Transplantation von Amnionmembran beobachteten, bestätigt (Akle, A., et al., 1981, S. 1003; Fraser, J.F., et al., 2009, S. 998; Maral, T., et al., 1999, S. 625).

Ein weiteres Kriterium bei der histologischen Beurteilung der Stanzbiopsate war die Epitheldickenmessung. 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). Die Messung der Epitheldicke zeigte am 60. postoperativen Tag eine signifikant höhere durchschnittliche Epitheldicke und damit eine stärkere narbige Hypertrophie in der PU-Gruppe als bei den mit Amnionmembran behandelten Wunden. Die im Vergleich zur PU-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 folglich 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

**Ki67.** 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).

In der hier vorliegenden Studie ergaben sich bezüglich des Zeitpunktes der Reepithelisierung keine Vorteile in der HAM-Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Die beiden Behandlungsgruppen zeigten sowohl klinisch als auch histologisch einen in Bezug auf den zeitlichen Verlauf nahezu identischen Ablauf der Wundheilungsprozesse. Auch die Proliferationsindizes am 7. postoperativen Tag und damit die Keratinozytenaktivierung der beiden Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Somit führt die Amnionmembran bei Spalthautwunden nicht zu einer Beschleunigung der Reepithelisierungsvorgänge. Dies führen wir darauf zurück, dass das regeneratorsche Potential der Haut selbst bei nur oberflächlicher Wundtiefe ausreicht, um bei idealem Immunstatus einen zügigen Wundverschluss zu gewährleisten, und dass somit die antiinflammatorischen Wirkungen sowie die Beschleunigung der Reepithelialisierung durch die Amnionmembran weniger stark zum Tragen kommen. Zur vergleichenden Interpretation stehen nur wenige Studien zur Verfügung. In einer Studie von Mostaque et al. wurden die Effekte von Amnionmembran im Vergleich zu Silber-Sulfadiazin auf den Wundheilungsverlauf von Verbrennungswunden bei Kindern untersucht. Neben zahlreichen anderen

Vorteilen der Amnionmembran wurde auch eine signifikante Beschleunigung der Reepithelialisierung durch die Amnionmembran bewiesen (Mostaque, A.K., et al., 2011, S. 200). Auch Park et al. bestätigen in ihrer Studie zur Behandlung von Verbrennungswunden mittels Amnionmembran am Schwein derartige Effekte (Park, M., et al., 2008, S. 520). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie stehen somit in Widerspruch zu den beiden oben genannten Studien, wobei jedoch bei der Ergebnisinterpretation die unterschiedlichen Wundmorphologien von Spalthautdefekten im Vergleich zu Brandwunden beachtet werden müssen. Eine Studie von Maral *et al.* zur Versorgung von Spalthautdefekten an Ratten mit Amnionmembran im Vergleich zu autologen Hauttransplantaten zeigte, dass die vollständige Epithelisierung bei beiden Behandlungsgruppen gleichzeitig erreicht war. Dies bestätigen wiederum die Beobachtungen der hier vorliegenden Studie.

**Laminin.** Eine regelrechte Reepithelialisierung 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 besteht zwischen dem Zeitpunkt der vollständigen Regeneration der Basalmembran und der Art des Transplantates (Andree, C., et al., 2001, S. 97).

In der hier vorliegenden Studie konnte mittels der Anti-Laminin-Immunhistochemie eine Beschleunigung der Basalmembranbildung durch HAM gezeigt werden, zumal in der mit HAM versorgten Wunde bereits am 10. Tag eine intakte Basalmembran zu sehen war, wohingegen zu diesem Zeitpunkt in der PU-Gruppe nur Fragmente zu erkennen waren. Dies führen wir auf die von der Amnionmembran sezernierten Wachstumsfaktoren zurück, welche eine Keratinozytenaktivierung und somit eine

beschleunigte Neubildung der Komponenten der Basalmembran bewirken, zurück. Auch wenn zwischen der HAM- und der PU-Gruppe mittels des Proliferationsindex, welcher Aussagen über die Intensität des epithelialen Remodelings zulässt, kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Beeinflussung der Keratinozytenaktivität nachgewiesen werden konnte, wird anhand der Anti-Laminin-Färbung gezeigt, dass die Amnionmembran dennoch einen positiven Effekt auf die Neubildung der Basalmembran hat. Somit wird aufgrund der beschleunigten Wiederherstellung der Basalmembran bei der Verwendung von HAM als Transplantatmaterial auch die Funktionsfähigkeit der Haut schneller wieder gewährleistet. Weitere Studien zur detaillierten Erforschung dieser Effekte sind von wissenschaftlichem und klinischem Interesse.

**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 transplantierte 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). Eine Studie von Loeffelbein et al. zur Versorgung von Vollhautwunden mit Amnionmembran beschreibt einen proangiogenetischen Effekt der HAM im Vergleich zu dem synthetischen Hautersatzmaterial Integra® (Loeffelbein et al., 2012, S. 1246).

In der hier vorliegenden Studie wiesen die HAM-Wunden sowohl am 5. als auch am 7. postoperativen Tag eine signifikant geringere Gefäßdichte auf als die Kontrollgruppe, was die Annahme der antiangiogenetischen Eigenschaften der HAM bekräftigt. Dies führen wir auf die von Hao et al. beschriebene Expression antiangiogenetischer Proteine in der Amnionmembran zurück (Hao, Y., et al., 2000, S. 248).

**$\alpha$ 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- $\alpha$ SMA-Färbung durch.

In der hier vorliegenden Studie konnten keine bzw. nur extrem wenige  $\alpha$ SMA-positiven Zellen in den Epithelschichten der beiden Behandlungsgruppen identifiziert werden, so dass auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der minimalen klinischen Wundkontraktion sowohl bei der Verwendung von HAM, als auch bei PU-Folie. Dementsprechend kann, basierend auf den Ergebnissen dieser Studie, kein inhibitorischer Effekt der Amnionmembran auf die Wundkontraktion im Vergleich zur PU-Folie postuliert



werden. 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  $\alpha$ SMA eine verminderte Narbenbildung im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (Fraser, J.F., et al., 2009, S. 998). Dies steht somit im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie. Anhand der kontroversen Ergebnisse von Fraser et al. und der hier vorliegenden Studie werden die Unterschiede zwischen den einzelnen Tiermodellen, welche die Rolle von  $\alpha$ SMA im Wundheilungsprozess untersuchen, deutlich gemacht. Außerdem ist auf die verschiedenen Transplantationsweisen zu achten, zumal Fraser et al. eine autologe Transplantation durchführten, hier hingegen xenogene Transplantate verwendet wurden. Die genannten Aspekte müssen neben den unterschiedlichen Wundmorphologien und den kleinen Tierkohorten sowohl bei der Interpretation der Ergebnisse, als auch bei der zukünftigen Durchführung wissenschaftlicher Studien zur Untersuchung des Einflusses von  $\alpha$ SMA auf die Wundheilungsprozesse beachtet werden.

## 6. Zusammenfassung

Die Hauttransplantation ist eine unverzichtbare Methode in der plastischen und wiederherstellenden Chirurgie zur Weichgewebsrekonstruktion größerer traumatischer, chronischer oder iatrogenen Hautdefekte. Trotz der Vielzahl der bereits existierenden Behandlungsmöglichkeiten zur Deckung der Transplantatentnahmestelle, der sog. Donor site, konnte bisher noch keine optimale Lösung gefunden werden.

In dieser Studie wurde die Verwendung kryokonservierter, ein- und mehrschichtiger HAM als alternatives Transplantatmaterial zur Versorgung iatrogenen Spalthautwunden am Minipigmodell untersucht. Ziel dieser Machbarkeitsstudie war es, die HAM für einen Einsatz am Menschen tierexperimentell zu untersuchen, um die Morbidität der Entnahmestelle zu senken.

An vier Minischweinen wurden operativ insgesamt 16 Vollhautwunden am Rücken der Tiere gesetzt und anschließend mit HAM oder mit Opsite<sup>®</sup>, einem Wundverband aus Polyurethanfolie, welcher standardmäßig zur Versorgung von Spalthautentnahmestellen verwendet wird, gedeckt. Die klinische Evaluierung erfolgte über den gesamten postoperativen Beobachtungszeitraum, die Biopsieentnahmen wurden am 5., 7., 10., 20., 40. und 60. postoperativen Tag durchgeführt.

Die Verwendung von HAM zur Versorgung von Spalthautentnahmedefekten führte zu besseren ästhetischen Ergebnissen und zu einer geringeren narbigen Hypertrophie im Vergleich zu PU-Wundfolie. Eine Beschleunigung der Reepithelisierung durch die Amnionmembran konnte nicht nachgewiesen werden. Dennoch kann die akzelerierte Basalmembranbildung bei den mit HAM versorgten Wunden zu einer verminderten Anfälligkeit der Defekte für sekundäre Wundinfektionen führen, da eine intakte Basalmembran eine Art Barriere bildet, auch wenn das darüber liegende Epithel noch nicht vollständig intakt ist. Bezüglich des Einflusses der HAM auf die Angiogenese waren antiangiogenetische Effekte zu beobachten.

Diese Studie zeigt die erfolgreiche Anwendung von HAM zur Deckung von Spalthautentnahmestellen bei Minischweinen. Die Ergebnisse stellen mit der Verwendung von HAM eine einfache und effektive Technik zur Versorgung iatrogenen Hautdefekte in Aussicht. Aufbauende Studien sind jedoch nötig, um den

klinischen Einsatz von HAM zur Versorgung von Spalthautdefekten zu verifizieren und weiter zu erproben.

## 7. Summary

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

We evaluated the use of human amniotic membrane (HAM) as an alternative graft material for the treatment of iatrogenic split-thickness (ST) skin wounds in a porcine model with a view to reducing donor site morbidity in free flap transfer. Sixteen experimental ST-wounds were created on the back of four Berlin minipigs and subsequently covered with HAM or Opsite<sup>®</sup>, a well-reviewed polyurethane wound foil. 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 ( $\alpha$ SMA) antibody were performed on days 5, 7, 10, 20, 40 and 60 after surgical intervention.

In conclusion, treatment with HAM as a wound dressing for split-thickness wounds results in improved esthetic results and in less hypertrophic scarring when compared with treatment with PU foils in our animal study. Although no difference in the overall speed of re-epithelialization is evident in this investigation, the accelerated re-formation of the basement membrane might result in the improved defensive capacities of the wound against microbial infections, since the basement membrane forms a line of resistance, even if the overlaying epithelial layer is not complete.

This study demonstrates the successful application of HAM in ST wounds in minipigs. The results offer promise as a simple and effective technique for the application of HAM in iatrogenic human skin defects and the acceleration of wound healing. Further investigations and longer term observations are needed to clear the clinical effects of HAM. Considering the results of the present study, we have performed a prospective clinical trial evaluating the use of HAM as a wound dressing for STSG donor sites compared with PU foil. The results of that study will be published shortly.

## 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 Akita, S., Akino, K., Imaizumi, T., Tanaka, K., Anraku, K., Yano, H., Hirano, A.  
A polyurethane dressing is beneficial for split-thickness skin-graft donor wound healing.  
Burns 32(4) (2006) 447-451
- 6 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

- 7 Andreassi, A., Bilenchi, R., Biagioli, M., D'Aniello, C. "  
Classification and pathophysiology of skin grafts  
Clin Dermatol. 23(4) (2005) 332-337
- 8 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
- 9 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
- 10 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
- 11 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
- 12 Bennett, J.P., Matthews, R., Faulk, W.P.  
Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion  
Lancet 1(8179) (1980) 1153-1156
- 13 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

- 14 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
- 15 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
- 16 Bourne, G.L.  
The microscopic anatomy of the human amnion and chorion  
Am J Obstet Gynecol. 79(6) (1960) 1070-1073
- 17 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
- 18 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
- 19 Broughton, G., 2nd, Janis, J.E., Attinger, C.E.  
The basic science of wound healing  
Plast Reconstr Surg. 117(7) (2006) 12-34
- 20 Burger, K.  
Artificial vaginal reconstruction with the help of amnios  
Zentralblatt für Gynäkol. (1937) 2437-2440

- 21 Burgos, H.  
Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta  
Eur J Clin Invest. 13(4) (1983) 289-296
- 22 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
- 23 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
- 24 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 Demirtas, Y., Yagmur, C., Soylemez, F., Ozturk, N., Demir, A.  
Management of split-thickness skin graft donor site: a prospective clinical trial  
for comparison of five different dressing materials.  
Burns 36(7) (2010) 999-1005
- 28 DeRötth, A.  
Plastic repair of conjunctival defects with amniotic membranes  
Arch Ophthalmol. 23 (1940) 522
- 29 Desmouliere, A., Chaponnier, C., Gabbiani, G.  
Tissue repair, contraction, and the myofibroblast  
Wound Repair Regen. 13(1) (2005) 7-12
- 30 Dhall, K.  
Amnion graft for treatment of congenital absence of the vagina  
Br J Obstet Gynaecol. 91(3) (1984) 279-282
- 31 Dornseifer U, Lonic D, Ivo Gerstung T, Herter F, Max Fichter A, Holm C, et al.  
The ideal split-thickness skin graft donor site dressing: a clinical comparative  
trial of a modified polyurethane dressing and Aquacel.  
Plast Reconstr Surg. 128(4) (2011) 918-24
- 32 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
- 33 Downing, D.T.  
Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis  
J Lipid Res. 33(3) (1992) 301-313
- 34 Driss, V., Legrand, F., Loiseau, S., Capron, M.  
Eosinophil: a new effector of innate immunity?  
Med Sci. 26(7) (2010) 621-626

- 35 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
- 36 Dua, H.S., Gomes, J.A., King, A.J., Maharajan, V.S.  
The amniotic membrane in ophthalmology  
Surv Ophthalmol. 49(1) (2004) 51-77
- 37 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
- 38 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
- 39 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
- 40 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
- 41 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

- 42 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
- 43 Gajiwala, K., Gajiwala, A.L.  
Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing  
Cell Tissue Bank 5(2) (2004) 73-80
- 44 Georgy, M.  
Vaginoplasty using amnion graft: new surgical technique using the laparoscopic transillumination light  
J Obstet Gynaecol. 16(1) (1996) 262-264
- 45 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
- 46 Goldman, R.  
Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future  
Adv Skin Wound Care. 17(1) (2004) 24-35
- 47 Gomes, J.A., Romano, A., Santos, M.S., Dua, H.S.  
Amniotic membrane use in ophthalmology  
Curr Opin Ophthalmol. 16(4) (2005) 233-240
- 48 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

- 49 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
- 50 Grinnell, F.  
Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices  
Trends Cell Biol. 13(5) (2003) 264-269
- 51 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
- 52 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
- 53 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
- 54 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
- 55 Higgins, L., Wasiak, J., Spinks, A., Cleland H. Split-thickness skin graft donor  
site management: a randomized controlled  
trial comparing polyurethane with calcium alginate dressings.  
Int Wound J 2012; 9:126–131

- 56 Hori, J., Wang, M., Kamiya, K., Takahashi, H., Sakuragawa, N.  
Immunological characteristics of amniotic epithelium  
*Cornea* 25(10) (2006) 53-58
- 57 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
- 58 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
- 59 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
- 60 Jimenez, P.A., Rampy, M.A.  
Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds  
*J Surg Res.* 81(2) (1999) 238-242
- 61 John, T.  
Human amniotic membrane transplantation: past, present, and future  
*Ophthalmol Clin North Am.* 16(1) (2003) 43-65
- 62 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

- 63 Kanyshkova, T.G., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A.  
Lactoferrin and its biological functions  
*Biochemistry* 66(1) (2001) 1-7
- 64 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
- 65 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
- 66 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
- 67 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
- 68 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
- 69 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

- 70 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
- 71 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
- 72 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
- 73 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
- 74 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
- 75 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
- 76 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

- 77 Lawson, V.G.  
Oral cavity reconstruction using pectoralis major muscle and amnion  
Arch Otolaryngol. 111(4) (1985) 230-233
- 78 Lee, S.H., Tseng, S.C.  
Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration  
Am J Ophthalmol. 123(3) (1997) 303-312
- 79 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
- 80 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
- 81 Lo, V., Pope, E.  
Amniotic membrane use in dermatology  
Int J Dermatol. 48(9) (2009) 935-940
- 82 Loeffelbein, D.J., Baumann, C., Stoeckelhuber, M., Hasler, R., Mücke, T., Steinsträßer, L., Drecoll, E., Wolff, K.D., Kesting, M.R.  
Amniotic membrane as part of a skin substitute for full-thickness wounds: an experimental evaluation in a porcine model.  
J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 100(5) (2012) 1245-56
- 83 Lu, X., Kang, Y.  
Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis  
Clin Cancer Res. 16(24) (2010) 5928-5935



- 84 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
- 85 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
- 86 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
- 87 Matsumura H, Imai R, Ahmatjan N, Ida Y, Gondo M, Shibata D, Wanatabe K.  
Removal of adhesive wound dressing  
and its effects on the stratum corneum of the skin: comparison of eight  
different adhesive wound dressings.  
*Int Wound J.* (2012) 1742-1748
- 88 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
- 89 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

- 90 Meyer, W.  
Bemerkungen zur Eignung der Schweinehaut als biologisches Modell für die Haut des Menschen  
Der Hautarzt 47(3) (1996) 178-182.
- 91 Meyer, W., Neurand, K.  
Comparison of skin pH in domesticated and laboratory mammals  
Arch Dermatol Res. 283(1) (1991) 16-18
- 92 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
- 93 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
- 94 Militzer, K.  
"Haut und Hautanhangsorgane kleiner Laboratoriumstiere Teil 1"  
In: "Schriftenreihe Versuchstier Band 9"  
Paney-Verlag, Berlin-Hamburg, 1982
- 95 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
- 96 Muir, I.F.  
On the nature of keloid and hypertrophic scars  
Br J Plast Surg. 43(1) (1990) 61-69

- 97 Müller, W.  
Spalt- und Vollhautplastiken  
Mund Kiefer Gesichtschir. 4 (2000) 314-321
- 98 Muralidharan, S., Gu, J., Laub, G.W., Cichon, R., Dalosio, C., McGrath, L.B.  
A new biological membrane for pericardial closure  
J Biomed Mater Res. 25(10) (1991) 1201-1209
- 99 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
- 100 Nathan, C.  
Points of control in inflammation  
Nature 420(6917) (2002) 846-852
- 101 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
- 102 Nicolaides, 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
- 103 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

- 104 Ollier, L.  
Sur les greffes cutanees ou autoplatiques  
Bull Acad Med. 1 (1872) 243-256
- 105 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
- 106 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
- 107 Penfield, W.  
Amnioplastin: a warning  
Br Med J. 1 (1940) 668
- 108 Petres, J. and Rompel, R.  
Operative Dermatologie: Lehrbuch und Atlas  
Springer Verlag, Heidelberg, 2006, 2. Auflage
- 109 Platt, A., McKiernan, M., McLean, N.  
Free tissue transfer in the management of burns  
Burns 22(6) (1996) 474-476
- 110 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

- 111 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
- 112 Rakel BA, Bermel MA, Abbott LI, Baumler SK, Burger MR, Dawson CJ, et al.  
Split-thickness skin graft donor site care: a quantitative synthesis of the  
research  
Appl Nurs Res. 11(4) (1998) 174-82
- 113 Ramasastry, S.S.  
Acute wounds  
Clin Plast Surg. 32(2) (2005) 195-208
- 114 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
- 115 Rao, T.V., Chandrasekharam, V.  
Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing  
Arch Surg. 116(7) (1981) 891-896
- 116 Ratner, D.  
Skin grafting. From here to there  
Dermatol Clin. 16(1) (1998) 75-90
- 117 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

- 118 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
- 119 Reverdin, J.  
Grefe epidermique  
Bull Soc Imp Chir. 10 (1869) 511-514
- 120 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
- 121 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
- 122 Robert, L., Jacob, M.P., Fulop, T.  
Elastin in blood vessels  
Ciba Found Symp. 192 (1995) 286-299
- 123 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
- 124 Sabella, N.  
Use of fetal membranes in skin grafting  
Med Rec NY 83 (1913) 478

- 125 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
- 126 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
- 127 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
- 128 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
- 129 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
- 130 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
- 131 Splichal, I., Trebichavsky, I.  
Cytokines and other important inflammatory mediators in gestation and  
bacterial intraamniotic infections

- Folia Microbiol. 46(4) (2001) 345-351
- 132 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
- 133 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
- 134 Stern, M.  
The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated skin  
surfaces, substituting skin grafts  
JAMA 60 (1913) 973
- 135 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
- 136 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
- 137 Talmi, Y.P., Sigler, L., Inge, E., Finkelstein, Y., Zohar, Y.  
Antibacterial properties of human amniotic membranes  
Placenta 12(3) (1991) 285-288
- 138 Thiersch, C.  
Ueber die feineren anatomischen Veraenderungen bei Aufheilung von Haut  
auf Granulation  
Langenbecks Arch Klin Chir. 17 (1874) 318-324



- 139 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
- 140 Tsukise, A., Meyer, W.  
Histochemistry of complex carbohydrates in the hairy skin of the domestic pig  
Histochem J. 15(9) (1983) 845-860
- 141 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
- 142 Vaingankar NV, Sylaidis P, Eagling V, King C, Elender F.  
Comparison of hydrocellular foam and calcium alginate in the healing and comfort of split-thickness skin-graft donor sites.  
J Wound Care. 10(7) (2001) 289-91
- 143 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
- 144 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

- 145 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
- 146 Voggenreiter G, Dold C, editors.  
Wundtherapie  
Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (2009)
- 147 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
- 148 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
- 149 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
- 150 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
- 151 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

- 152 Weise, K., Schäffer, M.  
Behandlungsstrategien bei Wundheilungsstörungen  
Unfallchirurg 103(2) (2000) 100-109
- 153 Wiechula R.  
The use of moist wound-healing dressings in the management of split-thickness skin graft donor sites: a systematic review.  
Int J Nurs Pract. 9(2) (2003) 9-17
- 154 Witte, M.B., Barbul, A.  
Role of nitric oxide in wound repair  
Am J Surg. 183(4) (2002) 406-412
- 155 Wollina, U., Berger, U., Mahrle, G.  
Immunohistochemistry of porcine skin  
Acta Histochem. 90(1) (1991) 87-91
- 156 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
- 157 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
- 158 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

- 159 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
- 160 Yager, D.R., Nwomeh, B.C.  
The proteolytic environment of chronic wounds  
Wound Repair Regen. 7(6) (1999) 433-441
- 161 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
- 162 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
- 163 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
- 164 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. Ki67

- 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DAB-Lösung (8 min)
- Spülen der Proben in bidestilliertem Wasser (2 min)
- Gegenfärben in Hämalun (*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*<sup>®</sup> (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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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*<sup>®</sup> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/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<sup>®</sup>, Firma Menzel Gläser GmbH, Braunschweig) mit DPX

#### 9.1.4. $\alpha$ -smooth-muscle actin ( $\alpha$ SMA)

- Trocknen der Schnitte über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank (*Thermo Scientific Function Line<sup>®</sup>*, 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<sup>®</sup>* 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*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 1:80 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/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 Auswertung

### 9.2.1. Statistische Auswertung der Epitheldicke

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
<b>HAM 7d vs PU-Folie 7d</b>	0,0002	ja
<b>HAM 60d vs PU-Folie 60d</b>	< 0,0001	ja
<b>HAM 7d vs HAM 60d</b>	< 0,0001	ja
<b>PU-Folie 7d vs PU-Folie 60d</b>	0,0843	nein
<b>Kontrolle vs HAM 7d</b>	< 0,0001	ja
<b>Kontrolle vs PU-Folie 7d</b>	0,1131	nein
<b>Kontrolle vs HAM 60d</b>	< 0,0001	ja
<b>Kontrolle vs PU-Folie 60d</b>	< 0,0001	ja

Tab. 9.1.: p-Werte und Signifikanz der Epitheldicke der einzelnen Behandlungsgruppen der Spalthautwunden und der Kontrollwunde.

### 9.2.2. Statistische Auswertung der Zellproliferation mittels Ki67

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
<b>HAM 7d vs PU-Folie 7d</b>	0,4331	nein
<b>HAM 60d vs PU-Folie 60d</b>	0,2815	nein
<b>HAM 7d vs HAM 60d</b>	0,0002	ja
<b>PU-Folie 7d vs PU-Folie 60d</b>	< 0,0001	ja

Tab. 9.2.: p-Werte und Signifikanz der Proliferationsindizes der einzelnen Behandlungsgruppen der Spalthautwunden.

### 9.2.3. Statistische Auswertung der Gefäßproliferation mittels anti-vWF

	p-Wert	signifikant (p<0,05)
<b>HAM 7d vs PU-Folie 7d</b>	0,0005	ja
<b>HAM 10d vs PU-Folie10d</b>	< 0,0001	ja
<b>HAM 7d vs HAM 10d</b>	0,5036	nein
<b>PU-Folie 7d vs PU-Folie 10d</b>	< 0,0001	ja

Tab. 9.3: p-Werte und Signifikanz der Anzahl der Gefäße der einzelnen Behandlungsgruppen der Spalthautwunden.

## 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  
Promotion zum Dr. med. 25. Juni 2012

##### Zahnmedizin

Vorklinischer Studienabschnitt 2005-2007  
Klinischer Studienabschnitt 2007-2013  
Zahnärztliche Prüfung 22. 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

<b>Famulaturen</b>	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	

<b><u>Beruf</u></b>	Wissenschaftlicher Mitarbeiterin der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar	seit 01/12
---------------------	---	------------

**Publikationen** Loeffelbein D, Baumann CM, Stoeckelhuber M, Hasler R, Mücke, T, Steinsträsser L, Drecolle 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. Marco Kesting für die Überlassung des Themas danken. Außerdem bedanke ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Dr. Marco Kesting und Priv.-Doz. Dr. Dr. Denys Loeffelbein für die hervorragende Betreuung während des gesamten Dissertationsprojektes, 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 Prof. 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 Drecoll 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.