

Fakultät für Medizin, TU München

Dissertation

In-vitro- und in-vivo-Untersuchungen mit dezellularisierten Amnionmembranen

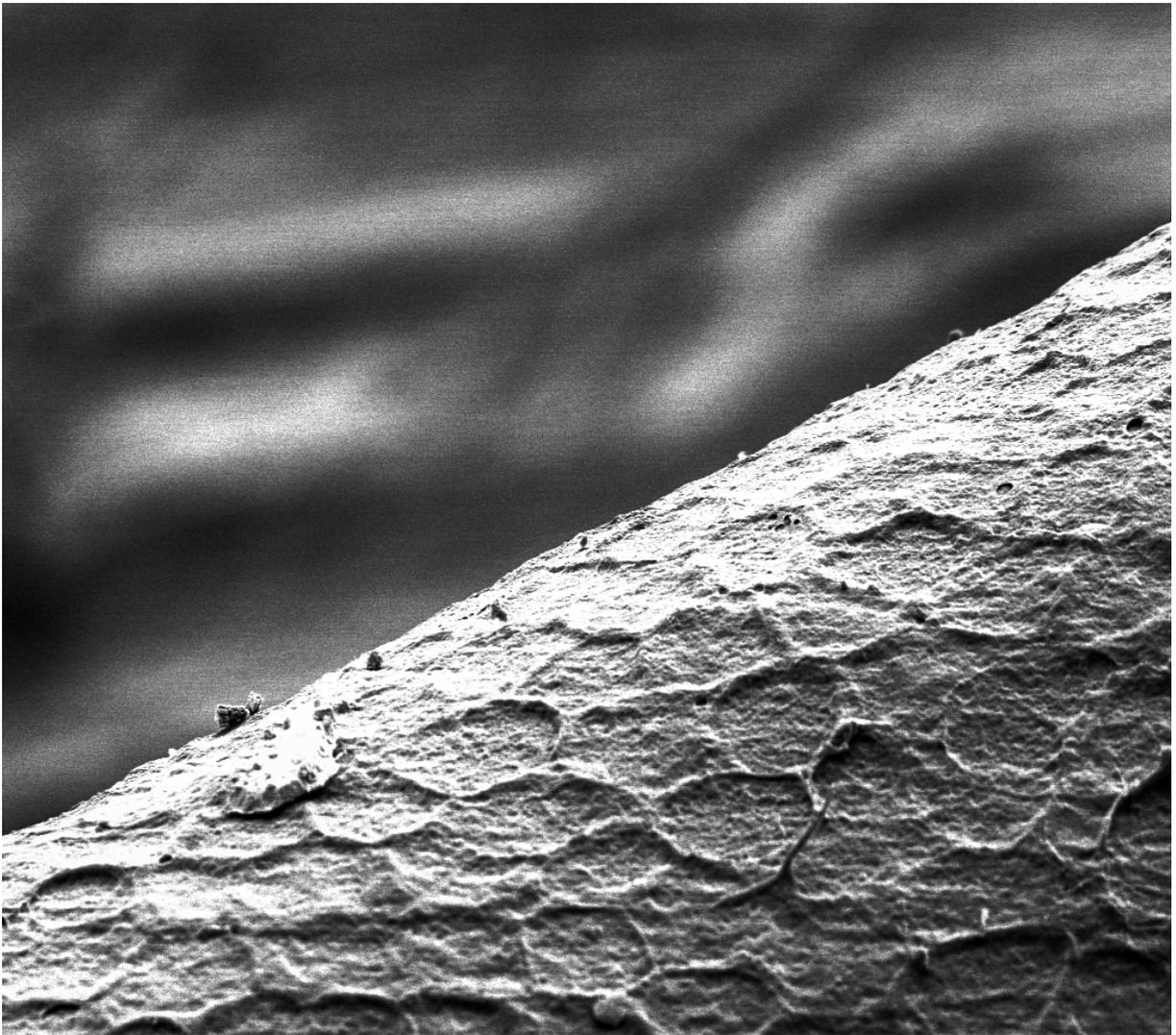
Ben Samuel John

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff
2. apl. Prof. Dr. Dr. Andreas Kolk

Die Dissertation wurde am 13.07.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2019 angenommen.



Epithelseite einer nativen Amnionmembran. Rasterelektronenmikroskopie. 1000x.

Widmung

Gewidmet meiner Familie und meinen Freunden, die die Umsetzung dieser Arbeit erst möglich machten.

Zusammenfassung

Im Rahmen der Gewebezüchtung werden zunehmend allogene Materialien als Hautersatz erprobt, um bessere funktionelle wie ästhetische Ergebnisse in der Behandlung von ausgedehnten Hautdefekten zu erzielen. In der folgenden Studie wurden humane Amnionmembranen (hAM) als Trägermaterial für isolierte Keratinozyten und Fibroblasten verwendet, die am Rattenmodell zur Vollhautdefekt-Deckung eingesetzt wurden. Verschiedene Deepithelialisierungsmethoden von nativen hAM wurden miteinander verglichen, wobei Trypsin in Kombination mit einem Zellschaber die besten Deepithelialisierungsergebnisse erbrachte. Über die Anwendung einer Air-Liquid-Zellkultur konnte eine Keratinisierung der Amnionmembran erreicht werden, welche jedoch nicht lückenlos ausgebildet war. An vier Versuchsgruppen à sechs Ratten wurden anschließend autolog rebesiedelte hAM, deepithelialisierte hAM, native hAM und Negativ-Kontrollen bezüglich Wundkontraktion, makroskopischem Narbenergebnis nach der Vancouver Scar Scale (VSS) und histologischem Erscheinungsbild nach Setzung eines Vollhautdefekts miteinander verglichen. Während die deepithelialisierten hAM eine stärkere Wundkontraktion zeigten als die anderen drei Versuchsgruppen, unterschieden sich diese nicht signifikant voneinander. Ebenso ergaben die Narbenmorphologien nach der VSS keine statistisch signifikanten Unterschiede. In der histologischen Auswertung zeigten sich neben durchgehend regelrechten Narbenstrukturen in den mit hAM versorgten Ratten nach 50 Tagen durchgängige Basalmembranen, welche in den Negativ-Kontrollen nicht nachgewiesen werden konnten. Zusammenfassend wiesen mit hAM versorgte Ratten keine verbesserte Wundheilung auf, die nachgewiesene Basalmembran könnte aber die Ausbildung von pathologischen Narben verhindern.

Schlagwörter:

Gewebezüchtung, Hautersatz, Narbe, Basalmembran, Rattenmodell, humane Amnionmembran, Deepithelialisierung, Air-Liquid-Zellkultur, Optische Kohärenztomographie, Elektronenmikroskopie, Immunhistochemie, Wundkontraktion, Vancouver Scar Scale

Abstract

To improve aesthetic just as functional outcome in the treatment of large skin defects, allogenic graft material and tissue engineering showed promising results in recent research. In our study we chose human amniotic membranes (hAM) as scaffold for autologous cells to treat full-thickness skin defects in rats. Different methods of deepithelialization of the hAM were evaluated, with trypsin and mechanical cell removal showing the best results. In an air-liquid cell culture we cultivated autologous keratinocytes and fibroblasts on the hAM until finally achieving a mostly keratinized surface. These hAM, deepithelialized hAM, native hAM and negative controls were then compared to each other to treat full-thickness skin defects in four groups à six rats evaluating the wound contraction, the macroscopic scar appearance with the Vancouver Scar Scale (VSS) and the histological properties of the scar. The rats treated with deepithelialized hAM showed a stronger wound contraction than the other three groups, which didn't differ among each other. The VSS showed no significant statistical differences between the four groups. The scar structure of all included rats showed similar morphologies with the only difference consisting in the absence of a basement membrane in the negative controls compared with the groups treated with hAM. Summarizing, the rats treated with hAM showed no improved wound healing, but the existing basement membrane could inhibit the formation of pathologic scars.

Keywords:

Tissue engineering, skingraft, scar, basement membrane, rat model, human amniotic membrane, deepithelialization, air liquid cell culture, optical coherence tomography, electron microscopy, immunohistochemistry, wound contraction, Vancouver Scar Scale

Vorwort und Dank

Zur Hilfe bei Planung, Durchführung, Dokumentation, Publikation, Ablenkung, Hinlenkung und vielen weiteren Schritten und Stadien, welche sich im Rahmen einer solchen wissenschaftlichen Arbeit ergeben, danke ich Euch. Denn hinter dieser Dissertationsschrift steckt bei weitem nicht nur die federführende Hand des Verfassers, sondern die Hilfe Vieler.

Zunächst dankt der Verfasser seiner Familie und seinen Freunden, die ihn stets mit Interesse und Anteilnahme bei der Anfertigung begleitet haben, die stets für Leid, wenn es mal nicht so lief, und Freud, wenn es lief, zugänglich waren.

Ein großer Dank geht außerdem an die Studienstiftung des Deutschen Volkes, die die notwendige zeitliche Ausweitung der Experimente durch ihre großzügige finanzielle Unterstützung erst möglich gemacht hat.

Seinem Betreuer Dr. Achim von Bomhard dankt der Verfasser für die freundschaftlich-konstruktive Zusammenarbeit, genauer die tatkräftige Unterstützung in Labor und OP, Anregungen, Überlegungen, Ratschläge, Ermutigung, Vertrauen und trotz vieler weiterer Verpflichtungen die ständige Präsenz für die Beendigung dieses Forschungsvorhabens.

Auch den weiteren Mitarbeitern des Institutes für Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie des Klinikums Rechts der Isar dankt der Verfasser für Ihre Unterstützung, darunter Prof. Dr. Dr. Marco Rainer Kesting und Prof. Dr. Dr. Klaus Dietrich Wolff als Doktorväter und Gutachter dieser Arbeit, welche außerdem die notwendigen finanziellen Mittel für die Experimente zur Verfügung stellten, Prof. Dr. Mechthild Stöckelhuber und Amela Klaus für fach- und tatkräftige Unterstützung bei allgemeinen Arbeiten im Labor und den histologischen Untersuchungen der Proben.

Ein Dank geht ebenfalls an das Labor der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Klinikums Rechts der Isar, in dem eine Vielzahl der Zellkulturexperimente durchgeführt wurden, genauer an Dr. Anja Pickert, Guido und Dr. Silke Regn, für das entgegengebrachte Vertrauen und die unkomplizierte Zusammenarbeit im Labor.

Ohne exakte diagnostische Auswertung der Proben wären die erreichten Ergebnisse bei weitem nicht so valide geworden, deswegen dankt der Verfasser auch den weiteren Kooperationen, darunter dem physikalischen Institut der LMU für die Verwendung des Rasterelektronenmikroskops, dort genauer der Arbeitsgruppe um Dr. Philipp Paulitschke und Ester Porcellato, sowie der Augenheilkunde des Klinikums Rechts der Isar, genauer Roman Miedl für die Anfertigung von OCT-Bildern der Membranen.

Da ein großer Teil der Versuche an Ratten stattfand, dankt der Verfasser außerdem den Tierpflegern und Anästhesieschwestern sowie der Tierschutzbeauftragten des Zentrums für präklinische Forschung des Klinikums Rechts der Isar, welche sich unentwegt um das Wohl der Ratten gekümmert haben und zudem den organisatorischen Rahmen für die operativen Eingriffe gewährleisteten.

Inhaltsverzeichnis

Widmung	5
Zusammenfassung	6
Abstract	7
Vorwort und Dank	8
Abkürzungsverzeichnis	12
Abbildungsverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis	14
1 Einleitung	15
1.1 Haut und Schleimhäute	16
1.2 Wundheilung.....	16
1.3 Hautersatz	17
1.4 Die Amnionmembran.....	18
1.5 Forschungsvorhaben	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Studienaufbau	21
2.2 In-vitro-Analysen der hAM.....	24
2.2.1 Allgemeine Vor- und Nachbereitung der hAM.....	25
2.2.2 Deepithelialisierung mit Trypsin.....	26
2.2.3 Dezellularisierung mit SDS/SDC	26
2.2.4 Deepithelialisierung mit NaOH.....	27
2.2.5 Dezellularisierung mit Triton/SDC.....	27
2.3 Zellisolation und -kultur.....	28
2.3.1 Keratinozytenisolation	29
2.3.2 Fibroblastenisolation.....	29
2.3.3 Medienwechsel und Zellpassagen	30
2.3.4 Eignungsvergleich verschiedener Air-Liquid-Medien	31
2.3.5 Rebesiedelung einer hAM und Anhebung zur Air-Liquid-Kultur.....	31
2.4 Gewebeuntersuchung	32
2.4.1 Lichtmikroskopische Probenaufbereitung und H/E-Färbung	33
2.4.2 Immunhistochemische Analysen.....	34
2.4.3 Elektronenmikroskopie (REM)	34
2.4.4 Optische Kohärenztomographie (OCT).....	35
2.5 In-vivo-Wundheilungsversuche am Rattenmodell	35
2.5.1 Allgemeine Operationsvorbereitungen	36

2.5.2	Biopsieentnahme und hAM-Transplantation	37
2.5.3	Postoperative Kontrollen	37
3	Ergebnisse	40
3.1	In-vitro-Analysen der hAM.....	40
3.1.1	Deepithelialisierungsversuche.....	40
3.1.2	Eignungsvergleich verschiedener Air-Liquid-Medien	43
3.1.3	Besiedelungsversuche und AL-Kultur.....	45
3.1.4	Elektronenmikroskopie.....	47
3.1.5	OCT	49
3.2	In-vivo-Experimente am Rattenmodell.....	52
3.2.1	Wundkontrollen.....	52
3.2.2	Wundkontraktion.....	54
3.2.3	Vancouver Scar Scale	55
3.2.4	Histologische Auswertungen der Wundfläche.....	56
4	Diskussion	58
4.1	In-vitro-Analysen der hAM.....	58
4.2	In-vivo-Untersuchungen am Rattenmodell	61
5	Fazit.....	65
	Literaturverzeichnis.....	67
	Eidesstattliche Erklärung	73

Abkürzungsverzeichnis

AL	Air-Liquid
EM	Elektronenmikroskop(ie)
hAM	humane Amnionmembran(en)
H/E	Hämatoxylin-Eosin
i.p.	intraperitoneal
KGW	Körpergewicht
LM	Lichtmikroskop(ie)
PKM	Phasenkontrastmikroskop(ie)
OCT	Optische Kohärenztomographie
VSS	Vancouver Scar Scale

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erster Teilversuch. Vergleich verschiedener Deepithelialisierungsmethoden und Entwicklung eines AL-Modells mit anschließender Gewebeuntersuchung.	25
Abbildung 2: Dezellularisierung der hAM.	28
Abbildung 3: Von der Zellisolation zur Air-Liquid-Kultur.....	33
Abbildung 4: Zweiter Teilversuch. Klinischer und histologischer Vergleich verschiedener hAM-Konstrukte zur Defektdeckung.	36
Abbildung 5: Operative Versorgung der Ratten und postoperative Kontrollen.....	39
Abbildung 6: Deepithelialisierungsergebnisse. PKM. 100x.....	41
Abbildung 7: Deepithelialisierungsergebnisse in H/E- und Laminin-Färbung. LM. 20-40x.	42
Abbildung 8: Vergleich verschiedener Kulturmedien an Fibroblasten und Keratinozyten. PKM. 100x.	44
Abbildung 9: Fibroblastenbesiedelte hAM. PKM. 200x.	45
Abbildung 10: Rebesiedelte hAM. PKM. 200x.....	46
Abbildung 11: Aufnahmen verschiedener hAM-Präparate. REM. 100-5000x.....	48
Abbildung 12: OCT-Bilder verschiedener hAM.....	51
Abbildung 13: Beispielhaft ausgewählte Wundkontrollen der einzelnen Versuchsgruppen.	53
Abbildung 14: Prozentuale Wundgrößen der einzelnen Testgruppen im zeitlichen Verlauf.	55
Abbildung 15: Wundbiopsien in H/E-Färbung. Übergang von gesundem zu Narbengewebe. LM. 25x vergrößert.....	57
Abbildung 16: Wundbiopsien in Lamininfärbung. LM. 100x vergrößert.	57
Abbildung 17: Verbandabnahme mit Wundöffnung.	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Gerätschaften.....	21
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien	22
Tabelle 3: Inhalt und Zubereitung verwendeter Reagenzienmischungen.....	23
Tabelle 4: t-Test der unterschiedlichen Schrumpfungsmaße.	54
Tabelle 5: Vancouver Scar Scale für die einzelnen Gruppen mit einfaktorieller ANOVA.	56

1 Einleitung

Haut und Schleimhäute spielen eine tragende Rolle als Barriere gegen exogene Noxen und zur Stabilisierung des Wasserhaushaltes (Presland & Jurevic, 2002). Verschiedene Pathologien wie ausgedehnte Brandverletzungen, Tumorresektionen und chronische Wunden wie der diabetische Fuß führen nicht selten zu großflächigen und langanhaltenden Hautdefekten. Eine angemessene und schnellstmögliche Deckung, um die natürlichen Barriereeigenschaften der Haut wiederherzustellen, ist von essenzieller Bedeutung für die Prognose der Wundheilung (Prasanna, Mishra, & Thomas, 2004; Rhee, Friedman, Ridge, & Kusiak, 1998; Xiao-Wu, Herndon, Spies, Sanford, & Wolf, 2002; Zelen, Serena, Denoziere, & Fetterolf, 2013). Aktuell werden dafür verschiedene autogene und zur temporären Deckung auch allogene Transplantate verwendet. Dabei sind limitierende Faktoren besonders die begrenzte Verfügbarkeit von autogenem Hautmaterial sowie entstehende Sekundärdefekte, Abstoßungsreaktionen von allogenen Transplantaten und allgemein funktionelle und ästhetische Probleme des aus Sekundärheilung entstehenden Narbengewebe (Moore et al., 1996; Rosenberg, Munitz, Maniero, & Singer, 1991; Tanaka, Hatoko, Tada, & Kuwahara, 2003; Tomasek, Gabbiani, Hinz, Chaponnier, & Brown, 2002). Um den Problemen der geringen Verfügbarkeit autologer Haut und Schleimhaut sowie der Narbenbildung in der Rekonstruktiven Chirurgie entgegenzuwirken, wurden über die letzten Jahrzehnte verschiedene Materialien zur Gewebesubstitution entwickelt. Dabei wurden unter anderem verschiedene Hautgerüste für die Besiedelung mit autologen Keratinozyten erforscht. Die humane Amnionmembran (hAM) stellt dabei theoretisch aufgrund einer für die Proliferation von Keratinozyten förderlichen Basalmembran und weiteren Eigenschaften wie geringer Immunogenität und einer entzündungshemmenden Komponente ein vielversprechendes Trägermaterial dar (Jiang, Liang, & Noble, 2007; MacNeil, 2007). Dabei stellt - wie in anderen Bereichen der Gewebezüchtung auch - die konsequente und zugleich für die extrazelluläre Matrix schonende Entfernung allogenen Zellmaterials aus dem Hautgerüst eine besondere Herausforderung dar (Gilbert, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde in-vitro nach Vergleich verschiedener Deepithelialisierungsmethoden der hAM ein Air-Liquid-Modell mit autologen Keratinozyten und Fibroblasten auf Basis einer deepithelialisierten hAM entwickelt und dieses in-vivo am Rattenmodell mit nativer und deepithelialisierter hAM ohne Rebesiedelung hinsichtlich klinischem und histologischem Outcome verglichen.

1.1 Haut und Schleimhäute

Die Grundstruktur von Haut und Schleimhäuten ist zweischichtig: Das Epithel wird durch die Basalmembran vom tiefer liegenden Bindegewebe getrennt (Fritsch, 2004; Rassner, 2009). Das Epithel stellt dabei eine Barriere für exogene Substanzen und Pathogene sowie gegen Dehydration dar. Die wesentliche, zelluläre Basis dafür sind die Keratinozyten, die über Desmosomen dicht aneinander liegend verbunden und in mehreren Lagen mit zunehmender Differenzierung bis hin zu kernlosen Korneozyten aufgeschichtet sind. Die dermoepidermale Junctionszone bildet den Übergang von der Epidermis zur Dermis. Ein wesentlicher Bestandteil hier ist die Basalmembran, die über Hemidesmosomen zur epidermalen Seite und Ankerfibrillen zum Kollagengeflecht der Dermis eine mechanische Verbindung gewährleistet. Strukturelle Bestandteile der Basalmembran sind beispielsweise Kollagen IV und Laminin. Die anliegende Dermis sorgt über den oberflächlichen und den tiefen horizontalen Gefäßplexus für die Ernährung des Epithels. Die hohe Reißfestigkeit und Elastizität der Haut sind weitere wesentliche Eigenschaften der Dermis, die sich entsprechend durch eine kollagen- und elastinreiche extrazelluläre Matrix auszeichnet. Verschiedene Hautanhangsgebilde wie Haare, Talg- und Schweißdrüsen prägen des Weiteren die Morphologie der Cutis. Der Aufbau der Mundschleimhaut weicht je nach Lage ein wenig von der orthokeratinisierten Haut ab: Während das Epithel am harten Gaumen ähnlich der Haut ortho- oder parakeratinisiert ist weist beispielsweise der Mundboden nicht-keratinisiertes Epithel auf. Unter dem Epithel liegt wiederum Bindegewebe, die sog. Lamina propria, und darunter die Submukosa, welche im Wesentlichen aus lockerem Fett- und Drüsengewebe besteht.

1.2 Wundheilung

Die Wundheilung gliedert sich in verschiedene Phasen (Fritsch, 2004): Sie beginnt mit einem temporären Wundverschluss durch Fibrinkoagel, welche Zytokine und Wachstumsfaktoren freisetzen und so zur Rekrutierung von Entzündungszellen führen. Diese wiederum aktivieren durch Zytokine Fibroblasten und Keratinozyten und phagozytieren eingedrungene Erreger und Gewebedebris. Die aktivierten Fibroblasten beginnen als bald unter der Wirkung von Wachstumsfaktoren mit der Bildung des Granulationsgewebes und nach Umwandlung in Myofibroblasten mit der

Wundkontraktion. Zudem wird die ausgebildete Dermis sehr bald von Gefäßsprossen durchwandert. Während dieser Vorgänge kommt es schon wenige Stunden nach Verwundung zur Migration und Mitose der Epidermalzellen vom Wundrand aus. Diese einwachsende Epithelzunge wird über die vom Entzündungsgeschehen freigesetzten Zytokine zur Bildung einer neuen Basalmembran und lytischer Enzyme zur Auflösung der sporadischen Matrix stimuliert. Die Basalmembran spielt dabei nicht nur im Rahmen der Reepithelialisierung, sondern auch bei der zunehmenden Organisation und Vaskularisierung der Dermis eine begünstigende Rolle, wobei genaue Einflüsse noch Gegenstand der Forschung sind (Kubota, Kleinman, Martin, & Lawley, 1988; LeBleu, Macdonald, & Kalluri, 2007; Wood & Stoner, 1996). Mit Beendigung der Reepithelialisierung läuft wieder das normale Differenzierungsprogramm der Epidermis an. Bei einer Schädigung bis in die Tiefe des Stratum reticulare der Dermis kommt es letztlich zur Narbenbildung: Hautanhangsgebilde werden nicht mehr nachgebildet, das ursprünglich komplex verflochtene Kollagen wird durch simple dichte Parallelbündel substituiert, was in fehlender Dehnbarkeit und zugleich mangelnder mechanischer Belastbarkeit resultiert.

1.3 Hautersatz

Aktuell werden zum Hautersatz z.B. nach Verbrennungen vorzugsweise autogene Spalthauttransplantate verwendet, welche jedoch insbesondere bei größeren Defekten nur limitiert verwendet werden können: Neben der benötigten Hautmenge ist dabei auch der Sekundärdefekt an der Entnahmestelle ein limitierender Faktor. Auch für Schleimhautdefekte wie nach einer Tumorresektion oder im Rahmen einer Spalterkrankung werden Möglichkeiten der allogenen Defektdeckung klinisch gefordert (Rhee et al., 1998). Allogene Hauttransplantate werden nach aktuellen Leitlinien nur zur temporären Defektdeckung verwendet. Dies ist zurückzuführen auf die Hauptproblematiken dieser Materialien, nämlich einer Abstoßungsreaktion und einem Risiko der Erregerübertragung (Rosenberg et al., 1991). In Vollhautdefekten sind sowohl epitheliale als auch dermale Schichten betroffen, was im Rahmen einer Wundheilungsreaktion unter Wundkontraktion und Bildung von Granulationsgewebe zu einem sekundären Verschluss führt. Dieses Narbengewebe kann an exponierten Körperstellen ästhetische und funktionelle Probleme und bei Kindern sogar Wachstumsstörungen hervorrufen (Moore et al., 1996; Tanaka et al., 2003). In der

Therapie von Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten werden autologe Transplantate aufgrund von limitierter Verfügbarkeit oraler Schleimhaut nicht verwendet, wodurch postoperativ häufig große Defekte verbleiben. Diese schließen sich ebenfalls per sekundärer Wundheilung und verursachen Wundkontraktion und Narbenbildung mit funktionellen Einschränkungen (Molsted, 1999; Ross, 1995; Wijdeveld, Maltha, Gruppig, De Jonge, & Kuijpers-Jagtman, 1991).

1.4 Die Amnionmembran

Die Amnionmembran ist die innerste der fetalen Membranen, welche den Embryo in der Gebärmutter umgeben. Gemeinsam mit den anderen fetalen Membranen schafft sie einen mit Amnionflüssigkeit gefüllten Raum für den Fötus, welcher optimale nutritionale und metabolische Bedingungen gewährleistet (Bryant-Greenwood, 1998). Histologisch besteht sie aus einem einschichtigen, kubischen Epithel, welches über eine Basalmembran mit mesenchymalem Bindegewebe verbunden ist (Abb. 7). Das Epithel steht dabei in direktem Kontakt mit der Fruchthöhle und dem Fruchtwasser und sezerniert unter anderem diverse Wachstumsfaktoren und Zytokine (Litwiniuk & Grzela, 2014). In der Membran findet sich des Weiteren Hyaluronsäure, welche besonders häufig zum Ende der Schwangerschaft nachgewiesen werden kann und bekannt dafür ist, dass sie Zellmigration erleichtert und verschiedene antiinflammatorische und immunsuppressive Eigenschaften besitzt (Jiang et al., 2007; Meinert et al., 2001). Die mesenchymale Gewebeschicht wiederum besteht aus einem azellulären Teil, der direkt an die Basalmembran angrenzt und durch ein dichtes Kollagenfasergebilde besonders zur mechanischen Integrität der Membran beiträgt, und der locker organisierten Fibroblastenschicht, die den größten Anteil der Amnionmembran ausmacht und im Wesentlichen aus Stützgewebe mit vereinzelt Fibroblasten besteht. Die mechanischen Eigenschaften der Amnionmembran sind angepasst an das Wachstumsverhalten des umschlossenen Embryos, plötzliche Druckveränderungen und interne wie externe Traumata: Die Membran ist sehr stabil und zugleich elastisch. Dabei sollte beachtet werden, dass es deutliche interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Membrandicke geben kann, was einen direkten Einfluss auf die Stabilität der Membran hat (Bourne, 1966).

Da die Amnionmembran bei der Geburt einfach und ethisch unbedenklich gewonnen werden kann, wurden aufgrund der bekannten positiven Eigenschaften der Amnionmembran wie der antiinflammatorischen und analgetischen sowie immunsuppressiven Wirkung über die vergangenen Jahrzehnte verschiedene experimentelle Anwendungsmöglichkeiten erprobt: So wird die Amnionmembran klinisch beispielsweise zur Substitution von Kornea oder Konjunktiva im Rahmen der Augenheilkunde verwendet (Fetterolf & Snyder, 2012; Plummer et al., 2009). Zudem kommt sie als Gerüst im Rahmen der Gewebezüchtung aufgrund ihrer antiinflammatorischen, antimikrobiellen und zellproliferativen sowie wenig immunogenen Eigenschaften zum Einsatz, z.B. zur Behandlung von Knorpel-Läsionen und in der Deckung von Schleimhautdefekten (Ahn et al., 2006; Niknejad et al., 2008; Z. J. Wang et al., 2014). Als einfache Wundauflage hat sie allein und in Kombination mit anderen dressierenden Verbänden ebenfalls Einzug in den chirurgischen Alltag gefunden (Loeffelbein et al., 2012). Außerdem wird an der Isolierung und Verwendung der mesenchymalen Stammzellen der Amnionmembran geforscht, woraus sich im Rahmen von Stammzelltherapien weitere vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten ergeben könnten (Marcus, Coyne, Rauch, Woodbury, & Black, 2008). Zuletzt gab es noch erfolgsversprechende Versuche, in denen die antiinflammatorischen Eigenschaften der Membran über eine Homogenisierung und Verwendung als Lösung z.B. zur Regeneration von Defekten von Haut und Schleimhaut genutzt wurden (Bonci, Bonci, & Lia, 2005; Murphy et al., 2017).

1.5 Forschungsvorhaben

Mit dem Hintergrund der für die Gewebezüchtung günstigen Eigenschaften der Amnionmembran sollte diese im Forschungsvorhaben als Trägermaterial für einen Hautersatz getestet werden. Da dieses Trägermaterial möglichst wenig immunogene Eigenschaften aufweisen sollte, wurden im ersten Forschungsteil in-vitro verschiedene Dezellularisierungs-/ bzw. Deepithelialisierungsmaßnahmen verglichen und eine anschließende Rebesiedelung mit autologen Zellen durchgeführt. Über einen qualitativen Vergleich des Dezellularisierungserfolges wurde nachfolgend die am besten geeignete Maßnahme für den zweiten Forschungsteil ausgewählt. Dieser bestand in einem in-vivo-Vergleich am Rattenmodell mit Wunddefekt. Dabei wurden entsprechend präparierte Membranen mit einer Kontrollgruppe anhand klinischer und histologischer Kriterien auf

mögliche Vorteile in der Wundheilung getestet. Verschiedene kausale Ansätze könnten dabei die Wundheilung unterstützen: Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Amnionmembran, insbesondere die Rebesiedelte, in den eigenen Hautverbund übernommen wird. Dies könnte einen positiven Einfluss auf die Synthese einer funktionellen Dermis sowie eine verminderte Wundkontraktion dank weniger zur Bildung stimulierter Myofibroblasten haben. Ebenfalls möglich wäre, vermutlich eher bei den nur deepithelialisierten hAM, die Verwendung besonders der Basalmembran im Rahmen der Reepithelialisierung als begünstigender und beschleunigender Faktor, da diese nicht neu von der einwachsenden Epithelzunge synthetisiert werden muss. Zuletzt kann auch die antiinflammatorische Wirkung der Membran eine Rolle in der Wundheilung spielen: Da Entzündungszellen einen wesentlichen Anteil an der Bildung vom Granulationsgewebe und der Angiogenese sowie auch an der Erregerbekämpfung besitzen, könnte die Wundheilung merklich moduliert werden (Fritsch, 2004).

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Die vorliegende Arbeit war Teil eines Projekts, in dem dreidimensionale, vaskularisierte, osteokutane Composite-Lappen unter Verwendung einer mit autologen Zellen besiedelten Amnionmembran generiert und am Tiermodell evaluiert werden sollen. Diese Studie konzentrierte sich dabei auf Maßnahmen zur Deepithelialisierung der hAM und der Entwicklung eines Air-Liquid-Modells mit der hAM als Trägermaterial im ersten Teilversuch sowie folgender Anwendung am Rattenmodell mit anschließender klinischer und histologischer Auswertung im zweiten Teilversuch.

Tabelle 1: Verwendete Gerätschaften

Abzugshaube	Köttermann, Uetze
Forschungsmikroskop DMI 6000 B mit Kamera DFC425 C	Leica, Wetzlar
Gewebeeinbettungsautomat TES-1 EVO II	Histocom AG, Wiener Neudorf
Inkubator Heracell™ 150i	Thermo Fisher, Waltham
Insert ThinCert™ für 6-Well-Platten	Greiner Bio-One, K.-Nr. 657638, Kremsmünster
Jelonet, 10x10cm	Smith & Nephew, K.-Nr. 7404, London
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio-One, K.-Nr. 10686321, Kremsmünster
Mikropinzetten steril	Aesculap, Tuttlingen
Neubauer Zählkammer	Sigma-Aldrich, St. Louis
OCT SPECTRALIS®	Heidelberg Engineering, Heidelberg
Pipetten CELLSTAR® 5ml/ 10ml/ 25ml	Greiner Bio-One, K.-Nr. 606180/ 607180/ 760180, Kremsmünster
Pipettierer Research® plus, 1ml	Eppendorf, Hamburg
PTFE O-Ring, weiß	Alwin Höfert, K.-Nr. 1236274, Ammersbek
Scanning Electron Microscop LEO982	Zeiss, Oberkochen
Schüttler VXR basic Vibrax® mit Schalenaufsatz VX7	IKA, K.-Nr. 0002819000, Staufen
Sicherheitswerkbank Herasafe™	Thermo Fisher, Waltham
Einweg-Skalpell Figur 10	Aesculap, Tuttlingen
Sputter Coater S150B	Edwards, Crawley
Zellkultureinsatz Thincert™ für 6 Well	Greiner Bio-One, K.-Nr. 657638, Kremsmünster
Zellkulturflaschen CELLCOAT® Collagen Type 1 Coated, T25/ T75/ T175	Greiner Bio-One, K.-Nr. 690950/ 658950/ 661950, Kremsmünster

Zellkulturplatte CELLSTAR®, 6-Well	Greiner Bio-One, K.-Nr. 657185, Krefeld
Zellkulturschale CELLCOAT® Collagen Type 1 Coated, 60x15mm	Greiner Bio-One, K.-Nr. 628950, Krefeld
Zellschaber, 13mm Klingenlänge	Sarstedt, K.-Nr. 83.1832, Nümbrecht
Zellsieb Falcon® 100µm	Corning, K.-Nr. 352360, Corning
Zentrifugenröhrchen CELLSTAR®, 15ml/ 50ml	Greiner Bio-One, K.-Nr. 188271/ 227261, Krefeld

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

Antibiotic-Antimycotic (100X), flüssig	Gibco, K.-Nr. 15240062, Waltham
Anti-Rabbit-AK	Linaris, K.-Nr. BA-1000, Dossenheim
Aprotinin from bovine lung, Pulver	Sigma-Aldrich, K.-Nr. A3428, St. Louis
Calciumchlorid (CaCl), Pulver	Sigma-Aldrich, K.-Nr. C5670, St. Louis
Dermalife K Complete Serum, flüssig	Cellsystems, K.-Nr. LM-0027, Troisdorf
DMEM, high glucose, GlutaMAX™ supplement, flüssig	Gibco, K.-Nr. 61965059, Waltham
DMSO, >99,5%, flüssig	Roth, K.-Nr. A994.2, Karlsruhe
DPBS ⁻ , no calcium, no magnesium, flüssig	Gibco, K.-Nr. 14190169, Waltham
DPBS ⁺ , calcium, magnesium, flüssig	Gibco, K.-Nr. 14040133, Waltham
DPX, flüssig	Merck, K.-Nr. 100579, Darmstadt
Ethanol, flüssig	Sigma-Aldrich, K.-Nr. 793213, St. Louis
FCS, qualified, heat inactivated, flüssig	Gibco, K.-Nr. 10500064, Waltham
Formaldehyd 3,5-3,7%, neutral gepuffert, mit Methanol stabilisiert	Fischar, K.-Nr. 27243, Saarbrücken
Glutaraldehyd, flüssig	Sigma-Aldrich, K.-Nr. G5882, St. Louis
Humane Amnionmembran	Austrian Cluster for Tissue Regeneration, Linz, Austria
Hämalaun/Eosin (H/E), flüssig	Bio Optica, Mailand
HEPES (1M), flüssig	Gibco, K.-Nr. 15630056, Waltham
HMDS, >99%, flüssig	Sigma-Aldrich, K.-Nr. 440191, St. Louis
Kaliumchlorid (KCl), Pulver	Sigma-Aldrich, K.-Nr. P5405, St. Louis
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄), Pulver	Roth, K.-Nr. 3904.2, Karlsruhe
Monoklonaler Rabbit-AK gegen Laminin	Sigma-Aldrich, K.-Nr. L8271, St. Louis
Natriumchlorid (NaCl), Pulver	Sigma-Aldrich, K.-Nr. S5886, St. Louis
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, K.-Nr. 106580, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS), Pulver	Sigma-Aldrich, K.-Nr. L6026, St. Louis
Natriumdeoxycholat (SDC), Pulver	Sigma-Aldrich, K.-Nr. 30970, St. Louis
Natriumhydroxid (NaOH), flüssig	Roth, K.-Nr. 6771.3, Karlsruhe
Thermolysin, Pulver	Sigma-Aldrich, K.-Nr. T-7902, St. Louis
Triton X 100, flüssig	Roth, K.-Nr. 3051.3, Karlsruhe

Trypanblau, flüssig	Sigma-Aldrich, K.-Nr. T8154, St. Louis
TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red, flüssig	Gibco, K.-Nr. 12604013, Waltham
Trypsin-EDTA solution, 0,25%, flüssig	Sigma-Aldrich, K.-Nr. T4049, St. Louis
Xylol, flüssig	Hedinger, K.-Nr. GH07701, Stuttgart

Tabelle 3: Inhalt und Zubereitung verwendeter Reagenzienmischungen

Einfriermedium	Bei Bedarf wurde unter sterilen Bedingungen <i>DMSO</i> mit dem <i>FCS</i> und zellhaltigem <i>DMEM</i> -Medium vermischt, sodass eine Lösung mit 20% <i>DMSO</i> -, 20% <i>FCS</i> - und 60% zellhaltigem <i>DMEM</i> -Anteil entstand.
Fibroblastenmedium	Zu 500ml <i>DMEM</i> -Medium wurden unter sterilen Bedingungen 55,5ml <i>FCS</i> -Lösung und 5,5ml <i>Antibiotics-Antimycotics</i> -Lösung gegeben und durch mehrmaliges, leichtes Schwenken der Flasche vermischt. Das Fibroblastenmedium wurde bei 4°C gelagert und maximal sechs Wochen verwendet.
HEPES-Puffer	Unter sterilen Bedingungen wurden zu 196ml <i>Aqua injectabile</i> 2ml <i>HEPES</i> , 2ml <i>Antibiotics-Antimycotics</i> sowie 0,5g KCl, 0,58g NaCl und 0,147g CaCl ₂ hinzugegeben und unter stetigem auf- und abpipettieren vermischt bis kein Ausfall mehr erkennbar war. Die Lösung wurde anschließend bei 4°C für maximal einen Monat gelagert und verwendet.
Isolutionslösung	Zu 20ml des <i>HEPES-Puffers</i> wurde bei Bedarf unter sterilen Bedingungen <i>Thermolysin-Pulver</i> zugegeben bis dieses eine Wirkdosis von 50IU/ml erreicht hatte.
Keratinocytenmedium	Zu 500ml <i>Dermalife K</i> -Medium wurden unter sterilen Bedingungen 5,05ml <i>Antibiotics-Antimycotics</i> -Lösung pipettiert und durch mehrmaliges, leichtes Schwenken der Flasche vermischt. Das Keratinocytenmedium wurde dann in 50ml-Tubes aliquotiert und bei -8°C gelagert. Zur Verwendung wurde es schonend bei 4°C aufgetaut und dann maximal einen Monat verwendet.
Air-Liquid-Medium	Zu 50ml <i>Dermalife K</i> -Medium wurden unter sterilen Bedingungen 0,55ml <i>Antibiotics-Antimycotics</i> -Lösung pipettiert sowie 5,5ml <i>FCS</i> -Lösung und durch mehrmaliges, leichtes Schwenken der Flasche vermischt. Das Air-Liquid-Medium wurde bei 4°C gelagert und maximal sechs Wochen verwendet.

2.2 In-vitro-Analysen der hAM

Im ersten Teilversuch sollten verschiedene Deepithelialisierungsmethoden hinsichtlich ihres Deepithelialisierungserfolges sowie möglicher Gewebeschädigung untersucht werden (Abb. 1). Dafür wurde ein Ansatz mit Trypsin und anschließender mechanischer Entfernung des Epithels durch einen Zellschaber mit einer Verwendung einer SDS/SDC- bzw. einer Triton/SDC-Waschsuspension und anschließender sanfter Epithelentfernung durch einen Schüttler mit einer mechanischen Entfernung durch ein mit NaOH getränktes Wattestäbchen verglichen. Der Vergleich erfolgte makroskopisch, per Phasenkontrastmikroskop (PKM) und per einfacher Hämatoxylin-Eosin(H/E) -Färbung unter dem Lichtmikroskop, wobei der vielversprechendste Ansatz weiterer immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Analysen zugeführt wurde. Im Rahmen eines Machbarkeitsversuches wurden hAM-Proben zudem einer kohärenztomographischen (OCT-) Untersuchung unterzogen, um dessen Tauglichkeit zur nicht-invasiven Qualitätskontrolle der Membranen zu testen. Anschließend erfolgten erste Besiedelungsversuche der hAM mit isolierten Keratinozyten und Fibroblasten und die Etablierung eines Besiedelungsprotokolls mit anschließender Air-Liquid-Kultur in einem Insertmodell, dessen Ergebnisse ebenfalls per H/E-Färbung, Phasenkontrastmikroskopie (PKM), Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie (REM) und Kohärenztomographie (OCT) analysiert wurden.

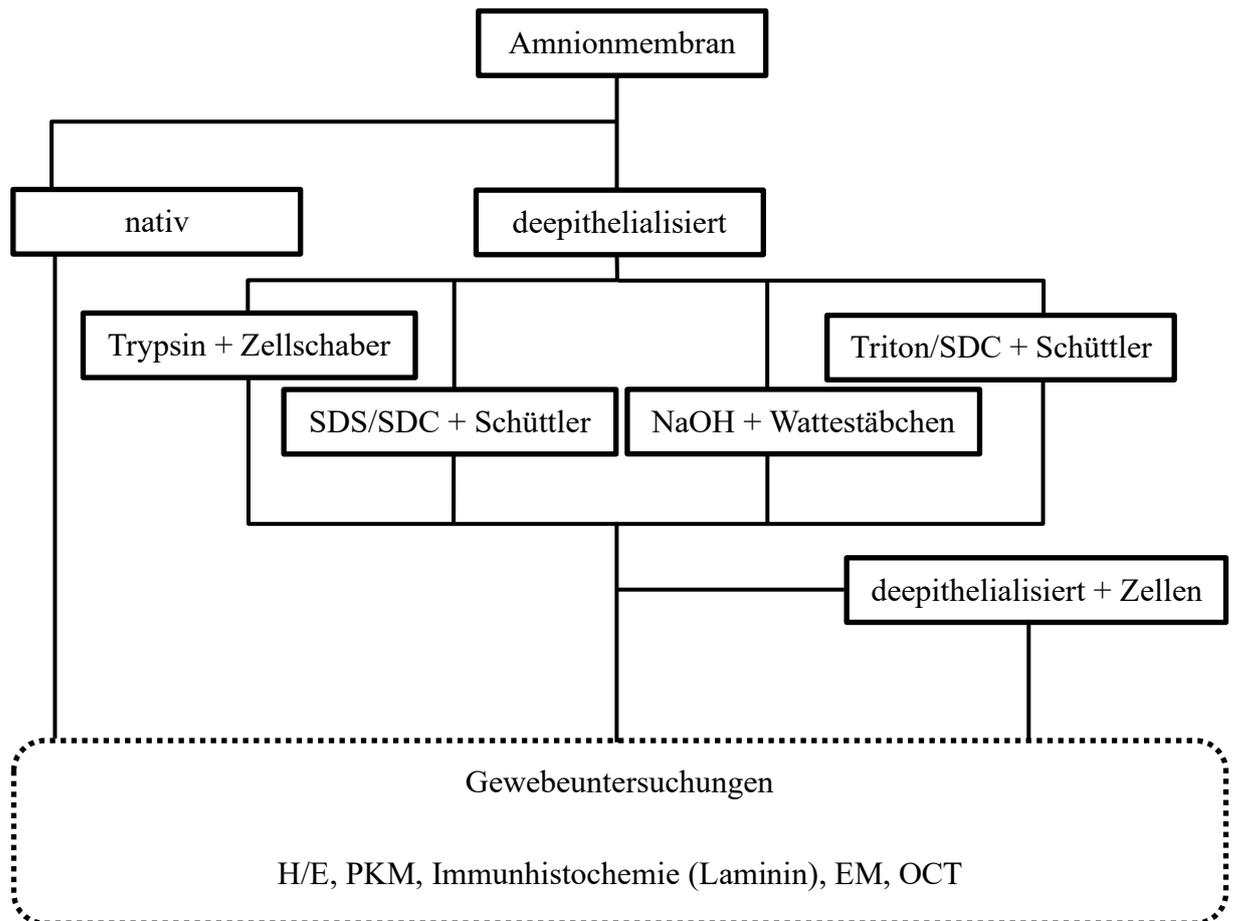


Abbildung 1: Erster Teilversuch. Vergleich verschiedener Deepithelialisierungsmethoden und Entwicklung eines AL-Modells mit anschließender Gewebeuntersuchung.

2.2.1 Allgemeine Vor- und Nachbereitung der hAM

Verwendet wurden kryokonservierte hAM (Austrian Cluster for Tissue Regeneration, Linz), die für den Klinikgebrauch zugelassen waren. Nach einem schonenden Auftauen bei Zimmertemperatur wurde die hAM unter der Sicherheitswerkbank (Thermo Fisher, Waltham) in eine große Petrischale mit DPBS⁻ ohne Kalzium und Magnesium (Gibco, Waltham) mit 1%-igem antibiotischen, antimykotischen Zusatz (Gibco, Waltham) überführt. Zur kompletten Entfernung des Kryokonservierungsmittels erfolgte eine mehrfache Spülung mit dieser Lösung mit jeweils anschließendem Absaugen. Die zehn mal zehn Zentimeter große Membran wurde dann, noch auf dem Trägermaterial befindlich, in vier gleich große, annähernd quadratische Anteile zerkleinert und den einzelnen Deepithelialisierungsvorhaben zugeführt (Abb. 2). Im Anschluss an diese erfolgte, zur Erfassung des Restepithels und makroskopisch nicht sichtbarer Defekte, eine phasenkontrastmikroskopische Kontrolle der Membran im Insert (Greiner Bio-One, Kremsmünster), welches wiederum in einer Wellplatte (Greiner Bio-One, Kremsmünster)

hing. Nach weiteren Spülvorgängen mit der DPBS⁺-Lösung (Gibco, Waltham) wurde das Insert auf einem Schüttler (200/min) (IKA, Staufen) über 48 Stunden mit DPBS⁺ mit 1%-igem antibiotischen, antimykotischen und Aprotinin-Zusatz (10KIU/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis) zur Entfernung von weiterem losen Epithel und Enzymresten gewaschen. Dabei erfolgte alle zwölf Stunden eine Membrankontrolle mit anschließendem Lösungswechsel. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran dann höchstens sieben Tage bei 4°C in einer DPBS⁺-Lösung mit 1%-igem antibiotischem, antimykotischen Zusatz gelagert.

2.2.2 Deepithelialisierung mit Trypsin

Bei der Deepithelialisierung mit Trypsin, welche in Anlehnung an ein ähnliches Studienvorhaben durchgeführt wurde, erfolgte die enzymatische und mechanische Abspaltung des Epithels (Ahn et al., 2006). Dabei wurden die zurechtgeschnittenen Membranen, welche sich noch auf dem Trägermaterial befanden, in vorgewärmtes, 37°C warmes 0,25%-iges Trypsin mit einem 0,02%-igen EDTA-Zusatz (Sigma-Aldrich, St. Louis) in eine Petrischale überführt und 15 Minuten bei dieser Temperatur belassen. Danach wurden die Membranen zur Inhibierung des Trypsins über eine kalte DPBS⁺-Waschreihe vom Enzym befreit. Nun wurde das Epithel mechanisch mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht) unter makroskopischer Kontrolle mit jeweils einmaligen, langsamen Schubbewegungen aus zwei Seiten entfernt (Abb. 2). Im Anschluss wurde die Membran vom Trägermaterial entfernt, über ein Insert gezogen und dort mit einem PTFE-Ring (Alwin Höfert, Ammersbek) fixiert, sodass sich die ehemalige Epithelseite der hAM der Innenseite des Inserts zugewandt befand.

2.2.3 Dezellularisierung mit SDS/SDC

In Anlehnung an eine Dezellularisierung von Herzklappen wurde die zurechtgeschnittene hAM direkt auf ein Insert gegeben und mit einem PTFE-Ring fixiert (Baraki et al., 2009). In einer 6-Well-Platte hängend wurde die hAM mit 0,5%-iger Natriumdodecylsulfat (SDS)/Natriumdeoxycholatlösung (SDC)-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis) versetzt auf einem Schüttler (200/min) bei Raumtemperatur für 48 Stunden belassen. Dabei erfolgte alle 12 Stunden ein Wechsel der Waschsuspension.

2.2.4 Deepithelialisierung mit NaOH

Nachdem andere Forschungsgruppen eine Dezellularisierung mit Hilfe von NaOH und einem Wattestäbchen als erfolgreich postulierten, wurde in Anlehnung an diese Methode auch ein Deepithelialisierungsversuch in dieser Form durchgeführt (Saghizadeh et al., 2013). Dafür wurde die schon zurechtgeschnittene und noch auf dem Trägermaterial befindliche hAM mit einem in 0,5M NaOH-Lösung (Roth, Karlsruhe) getränkten Wattestäbchen über etwa eine Minute über sanftes Reiben vom Epithel befreit (Abb. 2). Folgend wurde die Membran mehrfach in DPBS⁺-Lösung gewaschen und mit einem Teflonring über ein Insert fixiert und den weiteren allgemeinen Waschschrritten zugeführt.

2.2.5 Dezellularisierung mit Triton/SDC

Ähnlich wie bei den Versuchen mit Herzklappen bei Wang und Kollegen (2005) wurde als weitere Waschsuspension 0,25% Triton (Roth, Karlsruhe) in Kombination mit SDC (Sigma-Aldrich, St. Louis) verwendet (K. X. Wang, Zhang, Zhan, & Jian, 2005). Hierbei wurde ebenfalls die zurechtgeschnittene hAM auf ein Insert fixiert und für 48 Stunden in einem Well hängend auf einem Schüttler (200/min) bei Raumtemperatur mit der Waschlösung behandelt. Alle zwölf Stunden wurde die Waschsuspension gewechselt.

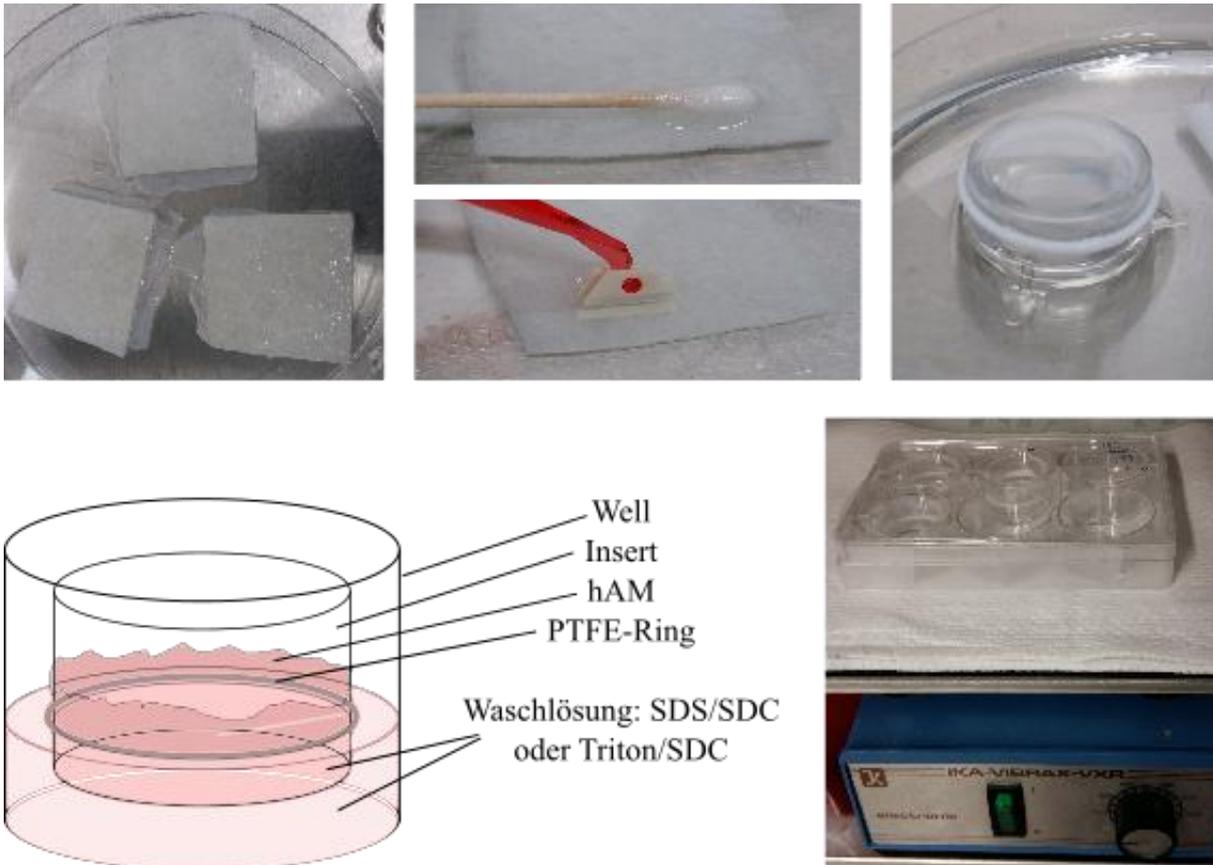


Abbildung 2: Dezellularisierung der hAM. Oben-Links: Die aufgetaute hAM wurde auf dem Trägermaterial in annähernd quadratische Stücke geschnitten. Oben-Mitte: Im Rahmen von mechanischer Loslösung wurden die abgebildeten Wattestäbchen bzw. Zellschaber verwendet, die über vorsichtige, gleichmäßige und geradlinige Schübe über die hAM bewegt wurden. Oben-Rechts: Je nach Methodik wurden die hAM früher oder später mithilfe eines PTFE-Ringes auf ein Insert gespannt. Unten-Links: Die hAM wurden mit den Waschlösungen SDS/SDC bzw. Triton/SDC sowohl von der Unter- als auch von der Oberseite versetzt. Unten-Rechts: Bei einer Frequenz von 200/min wurde das verschlossene Well mit den enthaltenen Inserts mechanisch gespült.

2.3 Zellisolation und -kultur

Zur Protokolltablierung wurde Rattengewebe verwendet; Es erfolgten daraus Isolationen von Keratinozyten und Fibroblasten, die anschließend sukzessiv auf eine hAM gesiedelt wurden und dort nach wenigen Tagen Kulturzeit zur Air-Liquid(AL)-Kultur angehoben und so bis zur endgültigen Keratinisierung belassen wurden. Unter einer Air-Liquid-Kultur versteht man die Kultivierung einer konfluenten Zellpopulation an der Grenze von flüssigem Medium und umgebender Luft, ein Umstand der die in-vivo der Luft ausgesetzten Epithelzellen zu einer physiologischen Differenzierung stimulieren soll (Muller, Brighton, Carson, Fischer, & Jaspers, 2013).

2.3.1 Keratinozytenisolation

Sowohl die Keratinozyten- als auch die Fibroblastenisolation erfolgten in Anlehnung an eine ähnliche Forschungsarbeit, welche die Isolation verschiedener Zelllinien aus Hornhautgewebe protokollierte (Mariappan et al., 2010). Die während der Biopsieentnahme gewonnene Probe wurde dafür direkt nach der Entnahme für vier Stunden in Keratinozytenmedium (Cellsystems, Troisdorf; Herstellung s. Tab. 3) bei Raumtemperatur gelagert. Dann wurde sie in eine Petrischale in neues Keratinozytenmedium überführt, wo sie mithilfe von sterilen Mikro-Pinzetten (Aesculap, Tuttlingen) und einem 10er Skalpell (Aesculap, Tuttlingen) von der Subkutis befreit wurde. Per Wiegebewegung wurde dann die Biopsie mit dem Skalpell in kleine Stücke à fünf bis acht Millimeter zerschnitten. Die kleinen Stücke wurden dann in ein 6-Well überführt und in 20ml der Isolationslösung (Sigma-Aldrich, St. Louis; Herstellung s. Tab. 3) bei 4°C für 15 Stunden enzymatisch behandelt. Nach den 15 Stunden Inkubationszeit wurden die Proben zur Unterbrechung der enzymatischen Aktivität erneut in Keratinozytenmedium überführt. Mithilfe steriler Mikro-Pinzetten wurden dann die Epidermisschichten der kleinen Biopsiestücke als Ganzes von der Dermis gelöst und weiter zerkleinert (Abb. 3). Die entstandenen kleinen Epidermis-Stücke wurden in ein Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster) mit vorgewärmtem TrypLE (Gibco, Waltham) gebracht und bei 37°C für 30min unter Zuhilfenahme von gelegentlichem leichten, mechanischen Stoßen dissoziiert. Dann wurde durch Zugabe von mindestens dreifacher Menge kaltem Keratinozytenmedium die enzymatische Dissoziation durch wiederholtes hoch und runter pipettieren gestoppt. Die erhaltene Zellsuspension wurde nun durch ein Zellsieb (Corning, Corning) in ein Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend 5min bei 200g abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend entfernt und das Zellpellet in vorgewärmtem Keratinozytenmedium gelöst. Die entstandene Zelllösung wurde zunächst mithilfe von Trypanblau (Sigma-Aldrich, St. Louis) und einer Neubauer-Zählkammer (Sigma-Aldrich, St. Louis) bezüglich Vitalität untersucht und schließlich in mit Kollagen beschichtete Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Kremsmünster) mit einer Konzentration von etwa $20 \cdot 10^3$ vitalen Zellen pro cm^2 ausgesiedelt.

2.3.2 Fibroblastenisolation

Die bei der Entnahme nach Trennung der Epidermis erhaltenen Dermisstücke wurden zuerst in Fibroblastenmedium (Gibco, Waltham; Herstellung s. Tab. 3) überführt und dort

in kleinere Stücke zerteilt. Diese wurden dann kurz in Fibroblastenmedium getränkt und anschließend auf einer mit Kollagen beschichteten Zellkulturschale (Greiner Bio-One, Kremsmünster) mit der ehemals dem Epithel zugewandten Seite Richtung Schalenboden verteilt (Abb. 3). Nach vierstündiger Inkubationszeit bei 37°C wurde die Zellkulturschale dann mit Fibroblastenmedium aufgefüllt wobei die Biopsiestücke zu diesem Zeitpunkt adhärent bleiben sollten. Nach mehrtägiger Inkubation mit Medienwechsel wurden die selbständig abgelösten Dermisstücke entfernt, nach etwa fünf bis sieben Tagen waren die ersten Fibroblastenkolonien erkennbar.

2.3.3 Medienwechsel und Zellpassagen

Zur Gewinnung einer ausreichenden Anzahl an Keratinozyten und Fibroblasten für die Besiedelung der hAM wurden regelmäßig Medienwechsel und bei hoher Konfluenz Zellpassagen mit Anfertigung von Subkulturen durchgeführt. Dazu wurde an der Sicherheitswerkbank das vorhandene Medium aus den Zellkulturflaschen/-schalen mit sterilen Pipetten entfernt und die Zellkulturflasche/-schale mit DPBS⁻ gespült. Erfolgte ein Medienwechsel wurde nun einfach wieder vorgewärmtes Keratinozyten- bzw. Fibroblastenmedium hinzugefügt, dies wurde bei Fibroblasten etwa alle vier Tage, bei Keratinozyten alle zwei Tage durchgeführt. Eine Zellpassage wurde bei einer Konfluenz von etwa 80% durchgeführt. Dafür wurde nach Entnahme des Mediums und einmaligem Spülen mit DPBS⁻ vorgewärmtes TrypLE in geringer Menge den Zellkulturflaschen/-schalen hinzugegeben und diese zwischen 15 und 40min bei 37°C inkubiert. Je nach Passage und Zelllinie wurde dabei alle paar Minuten im PKM die Dissoziation der Zellen verfolgt und mit leichtem Stoßen an der Flaschen-/Schalenkante zusätzlicher mechanischer Druck ausgeübt. Wenn sich annähernd alle Zellen abgelöst haben wurde die Enzymaktivität durch Zugabe der dreifachen Menge kalten Keratinozyten- (bei Keratinozyten) bzw. Fibroblastenmediums (bei Fibroblasten) durch mehrmaliges hoch und runter pipettieren gestoppt und die Zelllösung in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Lösung wurde anschließend für 5min bei 200g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und neues vorgewärmtes Keratinozyten- bzw. Fibroblastenmedium hinzugegeben und durch mehrmaliges hoch- und runterpipettieren eine homogene Zelllösung gebildet. Mithilfe von Trypanblau (Sigma-Aldrich, St. Louis) und einer Neubauer-Zählkammer (Sigma-Aldrich, St. Louis) wurde nun die Zellanzahl sowie der Anteil vitaler Zellen bestimmt und die Zelllösung auf neue Zellkulturflaschen in den Konzentrationen 4.000/cm² (Fibroblasten) bzw. 10.000/cm² (Keratinozyten) verteilt.

Überschüssige Zellen wurden für spätere Versuche nach der Passage in Einfriermedium (Roth, Karlsruhe; Herstellung s. Tab. 3) überführt und dann schnellstmöglich in Kryoröhrchen (Greiner Bio-One, Waltham) in einer Gefriereinheit bei -80°C und nach einem Tag in flüssigen Stickstoff gelagert. Zur Wiederverwendung wurden diese Zelllösungen bei 37°C aufgetaut und mit Keratinozyten- bzw. Fibroblastenmedium verdünnt und anschließend wie bei der Zellpassage zentrifugiert und auf Zellkulturflaschen verteilt.

2.3.4 Eignungsvergleich verschiedener Air-Liquid-Medien

Im Rahmen des folgenden Air-Liquid-Modells kam nach beidseitiger Besiedelung der Membran nach einigen Tagen nur noch ein Medium auf der basolateralen Seite des Inserts zum Einsatz. Dieses Medium musste sowohl den Wachstums-Anforderungen der Fibroblasten als auch der Keratinozyten gerecht werden. Dafür wurden verschiedene Kombinationen aus Fibroblasten-, Keratinozytenmedium und FCS anhand von Fibroblasten- und Keratinozyten-Kulturen auf ihre Zellverträglichkeit hin untersucht und über regelmäßige phasenkontrastmikroskopische Kontrollen anhand ihrer Zellmorphologien und ihres Wachstumsverhaltens evaluiert. Während serumhaltige Medien in der Kultur von Fibroblasten standardmäßig zum Einsatz kommen, sind diese für das Wachstum von Keratinozyten als hinderlich beschrieben (Boyce & Ham, 1983; Rittie & Fisher, 2005). Folglich wurde versucht einen für möglichst beide Zelllinien geeigneten Serumgehalt zu verwenden: Zum Einsatz kamen dabei Fibroblastenmedium, Keratinozytenmedium, Keratinozytenmedium mit 5% und 10% FCS-Zusatz. Des Weiteren wurde ein Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt und der Anteil an vitalen, nicht-angefärbten Zellen verglichen (Strober, 2015).

2.3.5 Rebesiedelung einer hAM und Anhebung zur Air-Liquid-Kultur

In Anlehnung an ein vorheriges Modell wurde mithilfe der auf ein Insert gespannten hAM eine Air-Liquid-Kultur erstellt (Lin et al., 2007). Dafür wurden zuerst sukzessiv die Keratinozyten sowie die Fibroblasten auf jeweils eine Seite einer deepithelialisierten hAM gesiedelt, um anschließend nach Erreichen einer vollen Konfluenz auf der Epithelseite die hAM zur Air-Liquid-Kultur anzuheben, um eine Orthokeratinisierung des Epithels zu provozieren. Das Ausgangsmaterial waren hier die deepithelialisierten, über Inserts gespannten hAM in der 6-Well-Platte. Unter der Sicherheitswerkbank wurden die Inserts nun in einem sterilen, verschließbaren Gefäß auf den Kopf gestellt, sodass die Chorionseite nach oben zeigte. Auf diese Membranseite wurden nun vorsichtig 1ml

Fibroblastenmedium mit etwa 100.000 kurz vorher passagierten Fibroblasten pipettiert, sodass aufgrund der Oberflächenspannung ein stehender Tropfen entstand (Abb. 3). Dieses Konstrukt wurde anschließend für 6 Stunden bei 37°C inkubiert, damit die Fibroblasten auf der Chorionseite adhärent werden konnten. Nach der Inkubationszeit wurde das Insert umgedreht und wieder in die 6-Well-Platte gehängt, sodass sich nun die Chorionseite der hAM mit den adhärennten Fibroblasten Richtung Boden befand und die deepithelialisierte Epithelseite nach oben zeigte (Abb. 3). Nun wurden in das Innere des Inserts auf die Epithelseite etwa 0,5ml Keratinozytenmedium mit etwa 500.000 kurz zuvor passagierten Keratinozyten gegeben. Außerdem wurde die basolaterale Seite des Inserts mit 1,5ml Fibroblastenmedium versetzt. Täglich erfolgten Medienwechsel von Keratinozyten- und Fibroblastenmedium und Kontrollen des Wachstumsverhaltens im PKM bis zur vollständigen Konfluenz beider Seiten mit den jeweiligen Zelllinien. Wurde diese erreicht wurde die Kultur zur Air-Liquid-Kultur angehoben: Dafür wurde im Folgenden nur noch auf der basolateralen Seite des Inserts das vorher als geeignet ermittelte Air-Liquid-Medium (Herstellung s. Tab. 3) hinzugegeben mit täglichem Mediumwechsel und PKM-Kontrollen der Orthokeratinisierung auf der der Luft zugewandten, mit Keratinozyten besiedelten hAM-Seite. Bei entsprechendem Erreichen einer maximalen Keratinisierung auf der Epithelseite nach etwa zehn Tagen wurde die rebesiedelte hAM entweder den Gewebeuntersuchungen oder den in-vivo-Wundheilungsversuchen am Rattenmodell zugeführt.

2.4 Gewebeuntersuchung

Zur Gewebeuntersuchung wurden einfache histologische, phasenkontrastmikroskopische, rasterelektronenmikroskopische, immunhistochemische und kohärenztomographische Verfahren verwendet. Dabei wurde die hAM unter den verschiedenen Testgruppen untersucht sowie die Hautbiopsien der Ratten nach Beendigung der in-vivo-Experimente.

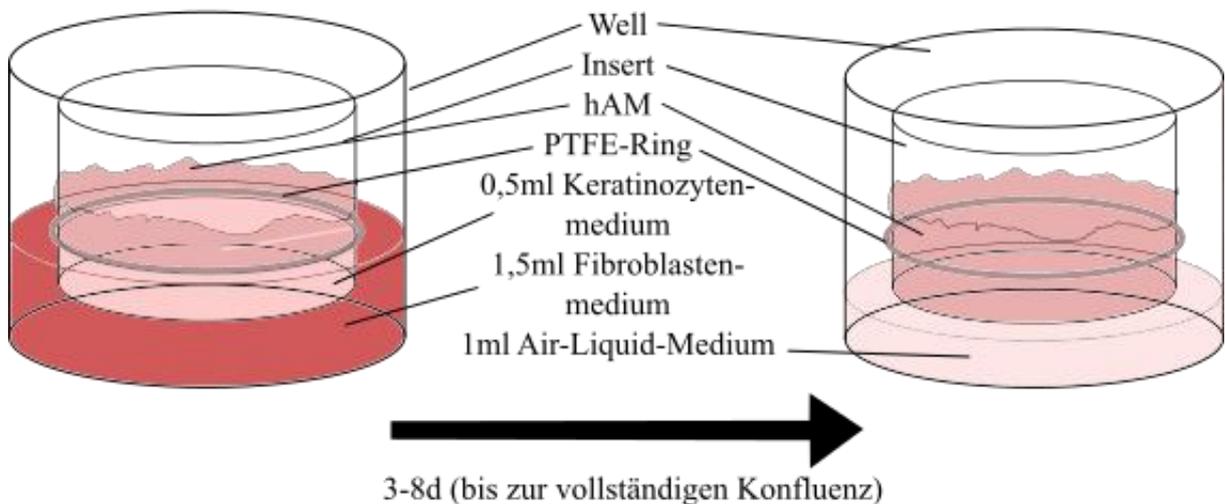


Abbildung 3: Von der Zellisolation zur Air-Liquid-Kultur. Oben-Links: Auf der linken Seite wurden die zerkleinerten Hautbiopsien in der Isolationslösung gelagert, im rechten Well erfolgte die mechanische Loslösung des Epithels mithilfe einer mikrochirurgischen Pinzette. Oben-Mitte: Die vom Epithel befreiten Biopsiestücke wurden nach kurzem Eintauchen im Fibroblastenmedium auf einer Zellkulturschale verteilt. Sobald diese adhären waren, erfolgte eine Auffüllung mit Fibroblastenmedium. Oben-Rechts: Etwa 1ml Fibroblastenmedium mit etwa 100.000 frisch passagierten Fibroblasten wurde auf die Chorionseite einer hAM pipettiert. Nach einigen Stunden wurde das Insert umgedreht und die Epithelseite mit Keratinozyten besiedelt. Unten: Links wurde das Insert mit eingespannter hAM mit beidseitiger Zellbesiedelung schematisch dargestellt. Über mehrere Tage wurde die Insertinnenseite mit Keratinozyten- und die basolaterale hAM-Seite mit Fibroblastenmedium versetzt. Rechts ist die Anhebung zur Air-Liquid-Kultur dargestellt. Lediglich die basale Seite der hAM wurde in diesem Zeitraum mit Air-Liquid-Medium versetzt.

2.4.1 Lichtmikroskopische Probenaufbereitung und H/E-Färbung

Die zu untersuchenden Gewebeproben wie die hAM wurden nach ihrer Gewinnung über Nacht in 4%-igem Formalin (Fischar, Saarbrücken) bei Raumtemperatur gelagert. Über einen Zeitraum von 48 Stunden wurden die Proben dann in einem Einbettautomaten (TES-1 EVO II, Histocom AG, Wiener Neudorf) in Paraffin überführt und daraufhin manuell in Blöcken fixiert. Per Mikrotom wurde eine Reihe von 5µm dicken

Gewebeschnitten angefertigt. Im weiteren Verlauf erfolgte die routinemäßige Färbung der Schnitte mit einer Hämatoxylin/Eosin-Färbung (Bio Optica, Mailand) zur besseren Darstellung der einzelnen Strukturen (Cardiff, Miller, & Munn, 2014).

2.4.2 Immunhistochemische Analysen

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung sollte die Basalmembran der hAM dargestellt werden, um deren Unversehrtheit im Rahmen der in-vitro-Untersuchungen zu zeigen und deren Bestandteile nach Beendigung der in-vivo-Versuche nachzuweisen. Dafür wurde als immunhistochemischer Marker Laminin herangezogen, welches im Epithel ein typischer Bestandteil dieser Membran darstellt (Shruthy, Sharada, Swaminathan, & Nagamalani, 2013). Die 5µm dicken Gewebeschnitte wurden nach einer absteigenden Xylol- (Hedinger, Stuttgart) und Ethanolreihe (Sigma-Aldrich, St. Louis) 5 Minuten mit Proteinase K enzymatisch behandelt und dann für zehn Minuten mit einem 3% Goat-Serum-Blocking-Reagenz versetzt, um die Hintergrundfärbung zu minimieren. Als erster Antikörper diente daraufhin ein monoklonaler Rabbit-AK gegen Laminin (Sigma-Aldrich, St. Louis) mit der Verdünnung 1:50, welcher über den Zeitraum von 30 Minuten appliziert wurde. Als zweiter Antikörper kam folglich ein anti-rabbit-AK (Linaris, Dossenheim) (mit der Verdünnung 1:200 zum Einsatz, welcher für 45 Minuten belassen wurde. Dann wurde die Probe weitere 45 Minuten mit einer Streptavidin-Lösung versetzt. Schließlich wurde die Probe daraufhin für etwa 8 Minuten mit DAB versetzt. Dieses wurde vorsichtig mit Wasser abgespült und die gesamte Probe wurde anschließend einige Sekunden lang mit Hämalaun gegengefärbt, bevor sie wieder eine aufsteigende Ethanol- und Xylol-Reihe durchlief und schließlich mit DPX (Merck, Darmstadt) eingeschlossen wurde.

2.4.3 Elektronenmikroskopie (REM)

Die untersuchten hAM-Proben wurden zur Analyse in der REM nach Waschen mit Sörensen-Puffer in 2,5%-iger Glutaraldehyd-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis) fixiert und nach diversen weiteren Waschvorgängen in Wasser und einer aufsteigenden Ethanolreihe mit Hexamethyldisilazan (Sigma-Aldrich, St. Louis) getrocknet. Im weiteren Verlauf wurde die Probe nach einer Sputterdeposition (Edwards, Crawley) dem REM (Zeiss, Oberkochen) zugeführt, wobei zum einen der Deepithelialisierungserfolg der entsprechenden Testgruppen überprüft wurde wie auch das Restgewebe auf Schädigungen durch die Trypsin- bzw. Suspensionsbehandlung sowie mechanischer

Irritation: Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Intaktheit der Kollagenfasern der Basalmembran sowie auf Veränderungen der Chorionseite als Folge der Deepithelialisierung gelegt. Auch die rebesiedelten Membranen wurden der REM zugeführt mit der Fragestellung der Epithel- und Zellmorphologie zur Abschätzung des Besiedlungserfolges.

2.4.4 Optische Kohärenztomographie (OCT)

Als Pilotvorhaben wurde zudem die Evaluierung der hAM durch kohärenztomographische Verfahren durchgeführt. Die OCT ist eine nicht-invasive Untersuchungsmethode, die in einer Penetrationstiefe von wenigen Millimetern hochauflösende Bilder auf Zellebene darstellen kann (Fujimoto, 2003). Dabei lag der Fokus auf der Evaluierung der Membrandicke und der Suche nach makroskopisch und phasenmikroskopisch nicht erkennbaren Membrandefekten. Dafür wurde die hAM, welche schon auf das Insert gespannt war, vertikal vor das OCT-Gerät (Heidelberg Engineering, Heidelberg) positioniert und abgefahren.

2.5 In-vivo-Wundheilungsversuche am Rattenmodell

Im zweiten Teilversuch (Abb. 4) wurden am Rattenmodell drei verschieden präparierte hAM-Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe ohne hAM hinsichtlich der Wundheilung verglichen. Die Ratten (Wistar-Ratten, Charles River Laboratories, Deutschland) wurden gemäß Tierschutzantrag (AZ 211-2531-103/13 Regierung von Oberbayern) bei freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Unter den Testgruppen waren native, trypsinierte und mechanisch deepithelialisierte hAM sowie trypsinierte und mechanisch deepithelialisierte hAM mit autologer Keratinozyten- und Fibroblasten-Besiedelung nach dem etablierten Besiedelungs- und Air-Liquid-Protokoll. Der Vergleich erfolgte dabei anhand regelmäßiger klinischer Wundkontrollen sowie nach Euthanasie der Ratten histologisch per Lichtmikroskopie (LM) von H/E- und immunhistochemisch eingefärbten Proben.

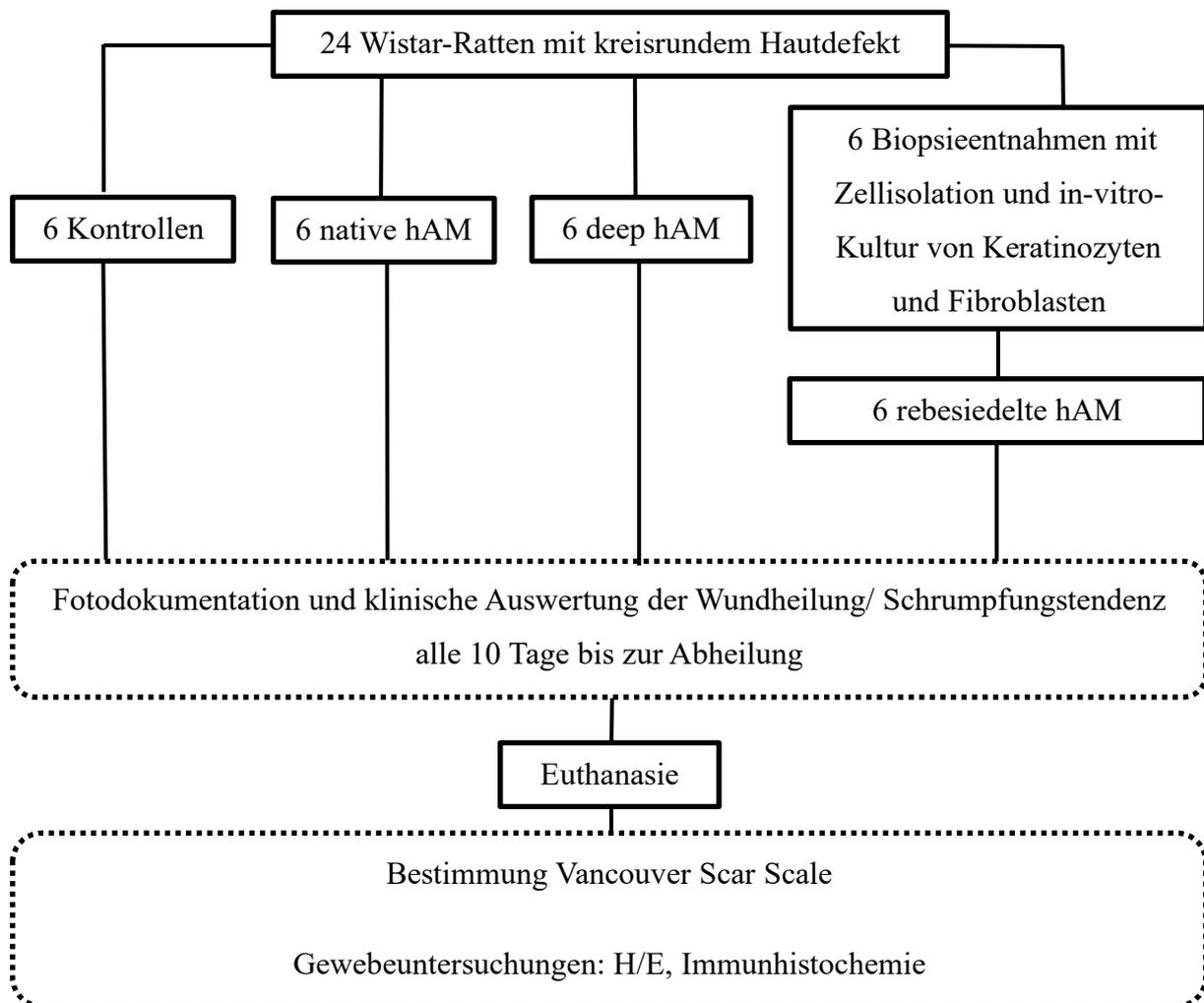


Abbildung 4: Zweiter Teilversuch. Klinischer und histologischer Vergleich verschiedener hAM-Konstrukte zur Defektdeckung.

2.5.1 Allgemeine Operationsvorbereitungen

Es wurde bei allen Ratten mindestens ein Eingriff durchgeführt; die Wunddefektsetzung, ggf. mit Membrantransplantation. Bei sechs weiteren Ratten wurde zudem noch eine vorherige Biopsieentnahme zur Zellisolation durchgeführt. Präoperativ erhielten die Ratten zur Schmerzlinderung oral Meloxicam (1 mg/kg KGW). Alle Eingriffe erfolgten unter Narkose mittels Medetomidin (0,15 mg/kg KGW), Midazolam (2 mg/kg KGW) und Fentanyl (0,005 mg/kg KGW) i.p. an der spontan atmenden Ratte. Zusätzlich wurde über eine Nasenmaske mit zwei Liter O₂/min der Sauerstoffgehalt der Spontanatemluft angehoben. Die Narkose wurde postoperativ mit Flumazenil (0,2 mg/kg KGW), Aipamezol (0,75 mg/kg KGW) und Naloxon (0,12 mg/kg KGW) antagonisiert. Postoperativ erhielten die Tiere zudem Meloxicam (0,5 mg/kg KGW) für drei Tage und

Baytril (10 mg/kg KGW) oral zur antibiotischen Prophylaxe. Alle Eingriffe erfolgten im Kleintier-OP unter sterilen Kautelen. Die Tiere wurden nach Narkotisierung im OP-Gebiet zunächst rasiert und auf einer Wärmematte mit 37°C gelagert. Anschließend wurde der OP-Bereich steril abgewaschen und mit OP-Tüchern in üblicher Weise abgedeckt.

2.5.2 Biopsieentnahme und hAM-Transplantation

Im ersten Eingriff wurde sechs Ratten eine kleine Hautspindel von 10x20 mm aus der Leiste entnommen und der Hebedefekt primär subcutan und intracutan mit resorbierbarem Faden der Stärke 4-0 verschlossen (Abb. 5). Anschließend erfolgte mit dieser Probe die Zellisolierung und Amplifikation der gewonnenen Keratinozyten und Fibroblasten mit anschließender Rebesiedelung einer deepithelialisierten hAM im Zelllabor. Allen 24 Ratten wurde des Weiteren in einem operativen Eingriff median im Nacken ein kreisrunder Hautdefekt der Größe 30 x 30 mm gesetzt - Die Wahl der Lokalisation erfolgte dabei unter Berücksichtigung einer möglichst geringen Erreichbarkeit durch Gebiss und Klauen der Ratte und folglich einem verringerten Risiko zur Eigenmanipulation. Außerdem wurden vier 40 mm lange Linien mit nach deutscher Tätowierverordnung für den Menschen zugelassener Farbe quadratförmig um den Hautdefekt tätowiert, die zur Beurteilung der Wundkontraktion diente. Anschließend wurde der Hautdefekt je nach Versuchsgruppe mit nativer, deepithelialisierter oder zusätzlich rebesiedelter hAM verschlossen. Als Negativkontrolle erfolgte bei sechs Ratten keine Defektdeckung. Zum Schutz vor äußeren Einflüssen und vor Austrocknung wurde ein Überknüpfverband aus Paladur mit einem einpolymerisierten Kugeltupfer mit Jelonet (Smith and Nephew, London) auf der Wunde fixiert.

2.5.3 Postoperative Kontrollen

Postoperativ wurden die Tiere täglich im Rahmen einer Belastungstabelle bis zur vollständigen Abheilung evaluiert (Abb. 5). Nach zehn Tagen erfolgte die Entfernung des Wundverbandes mit anschließender regelmäßiger klinischer Beurteilung des Wundheilungsverlaufes. Dabei wurde die Schrumpfung des umliegenden Gewebes vermessen und auffällige morphologische Charakteristika der Wunde festgehalten. Die Schrumpfung wurde anhand von Quer- und Längsmessung sowie der Messung der beiden Diagonalen im durch Tattoo-Farbe markierten Viereck dokumentiert. Die erhaltenen Messungen wurden addiert, gemittelt und per Sichtprüfung mit Erstellung eines

Histogramms sowie eines Q-Q-Diagramms auf Normalität untersucht. Deskriptiv wurden die Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Intergruppenvergleiche zur Kontrollgruppe wurden mit einem t-Test erstellt. Die Analyse erfolgte mit der Software SPSS 16.0, das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Nach vollständiger Wundheilung erfolgte schließlich die Euthanasie. Hier wurde unmittelbar vor der Euthanasie der Vancouver Scar Scale Score dokumentiert und mit einer ANOVA-Untersuchung (Signifikanzniveau 0,05) Intergruppenunterschiede ermittelt (Tyack, Simons, Spinks, & Wasiak, 2012). Das verheilte Wundbett wurde anschließend entnommen und weiteren histologischen Untersuchungen zugeführt. Dazu gehörte unter anderem eine immunhistochemische Laminin-Färbung mit Beurteilung der Durchgängigkeit der Basalmembranen.

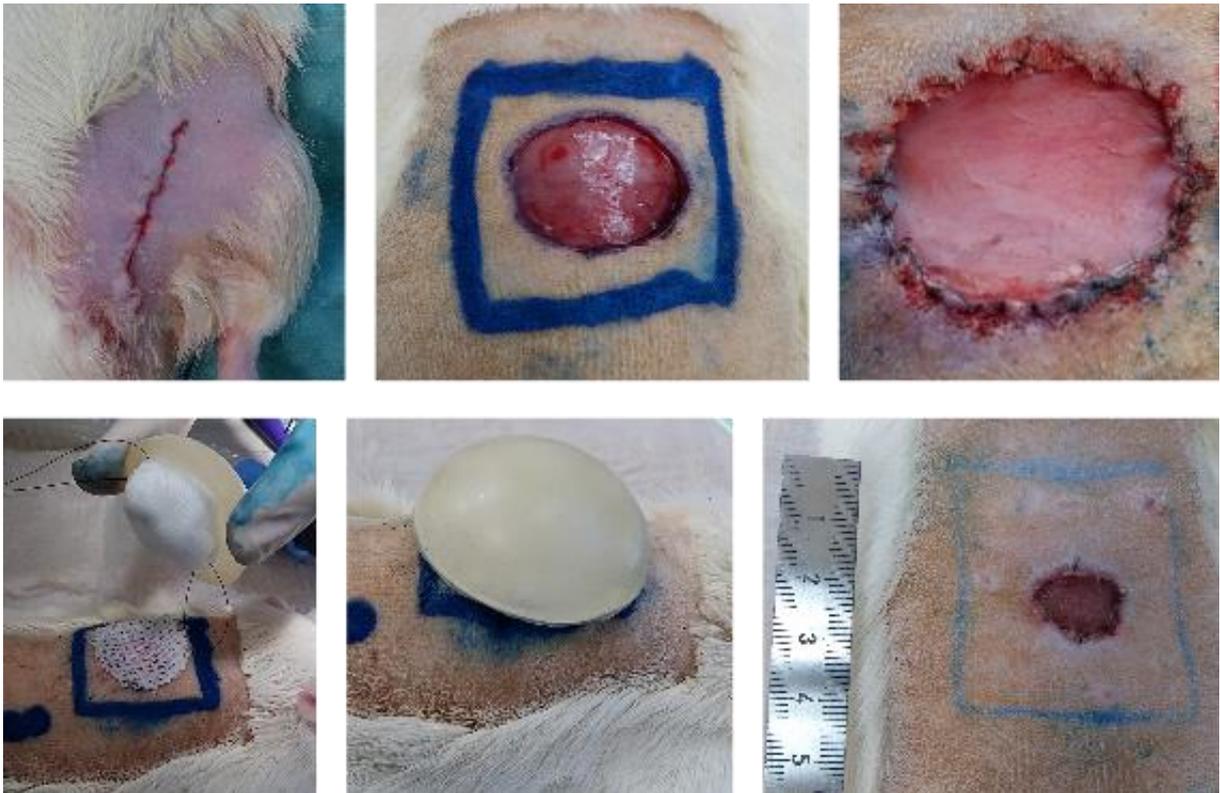


Abbildung 5: Operative Versorgung der Ratten und postoperative Kontrollen. Oben-Links: OP-Situs im Leistenbereich nach Biopsieentnahme. Der entstandene Defekt wurde per Intrakutannaht geschlossen. Oben-Mitte: Median auf dem Rücken wurde nach Tätowierung eines 4x4cm-Quadrates ein kreisrunder Vollhautdefekt mit den Abmessungen des verwendeten Inserts gesetzt. Oben-Rechts: OP-Situs nach Deckung des Hautdefektes mit einer hAM. Diese wurde mit Einzelknopfnähten ins umliegende Gewebe fixiert. Unten-Links/-Mitte: Um den Wundbereich vor mechanischer Einwirkung zu schützen, wurde über einigen Schichten Gaze ein Überknüpfverband genäht, welcher nach zehn Tagen entfernt wurde. Unten-Rechts: Typisches Bild einer postoperativen Kontrolle mit Vermessen des Wundbereichs und Dokumentation der Schrumpfung sowie klinischer Begutachtung der Wundheilung.

3 Ergebnisse

3.1 In-vitro-Analysen der hAM

3.1.1 Deepithelialisierungsversuche

Der Vergleich der Deepithelialisierungsprotokolle der hAM ergab heterogene Ergebnisse (Abb. 6 und 7). Die mit Trypsin versetzte Gruppe zeigte nach mechanischer Abscherung mit dem Zellschaber sowohl in der PKM wie auch in der LM gute Ergebnisse. Das Amnionepithel zeigte sich bis auf vereinzelte Zellfragmente stets voll entfernt. Die Basalmembran stellte sich in der immunhistochemischen Untersuchung mit Laminin prominent und durchgängig dar. Lediglich das mesenchymale Bindegewebe zeigte sich in der LM im Vergleich zur nativen hAM deutlich aufgelockert und umstrukturiert. In der PKM waren zudem viele verschattete Linien über die hAM verteilt sichtbar, wobei die Schichttiefe nicht sicher zugeordnet werden konnte. Es könnte sich dabei sowohl um Folgen der mechanischen Einwirkung auf die lichtmikroskopisch intakte Basalmembran, das mesenchymale Bindegewebe oder den normalen Aspekt einer hAM handeln, der durch die dichte Epithelialisierung der Kontrollmembran nicht sichtbar ist. Die Testgruppe mit Verwendung von NaOH und nachfolgender Verwendung eines Wattestäbchens zeigte im Wesentlichen eine lückenhafte Deepithelialisierung, die besonders deutlich in der PKM zu erkennen war. In der LM präsentierte sich ebenfalls, wenn auch geringer wie in der Trypsin-Gruppe, ein aufgelockertes Stroma. Außerdem zeigte sich eine immunhistochemisch nicht ganz so prominente und etwas verwaschene Basalmembran. Die beiden tensidhaltigen Dezellularisierungsansätze zeigten eine inkomplette Deepithelialisierung. In der PKM demonstrierten sie eine deutliche Aufhebung der epithelialen Zellgrenzen, gaben jedoch keine Sicht auf das mesenchymale Bindegewebe frei. Lichtmikroskopisch zeigte sich bei beiden ein flaches, einschichtiges und größtenteils durchgängiges Epithel mit immunhistochemisch nicht nachweisbarer Basalmembran und etwas aufgelockertem mesenchymalen Bindegewebe.

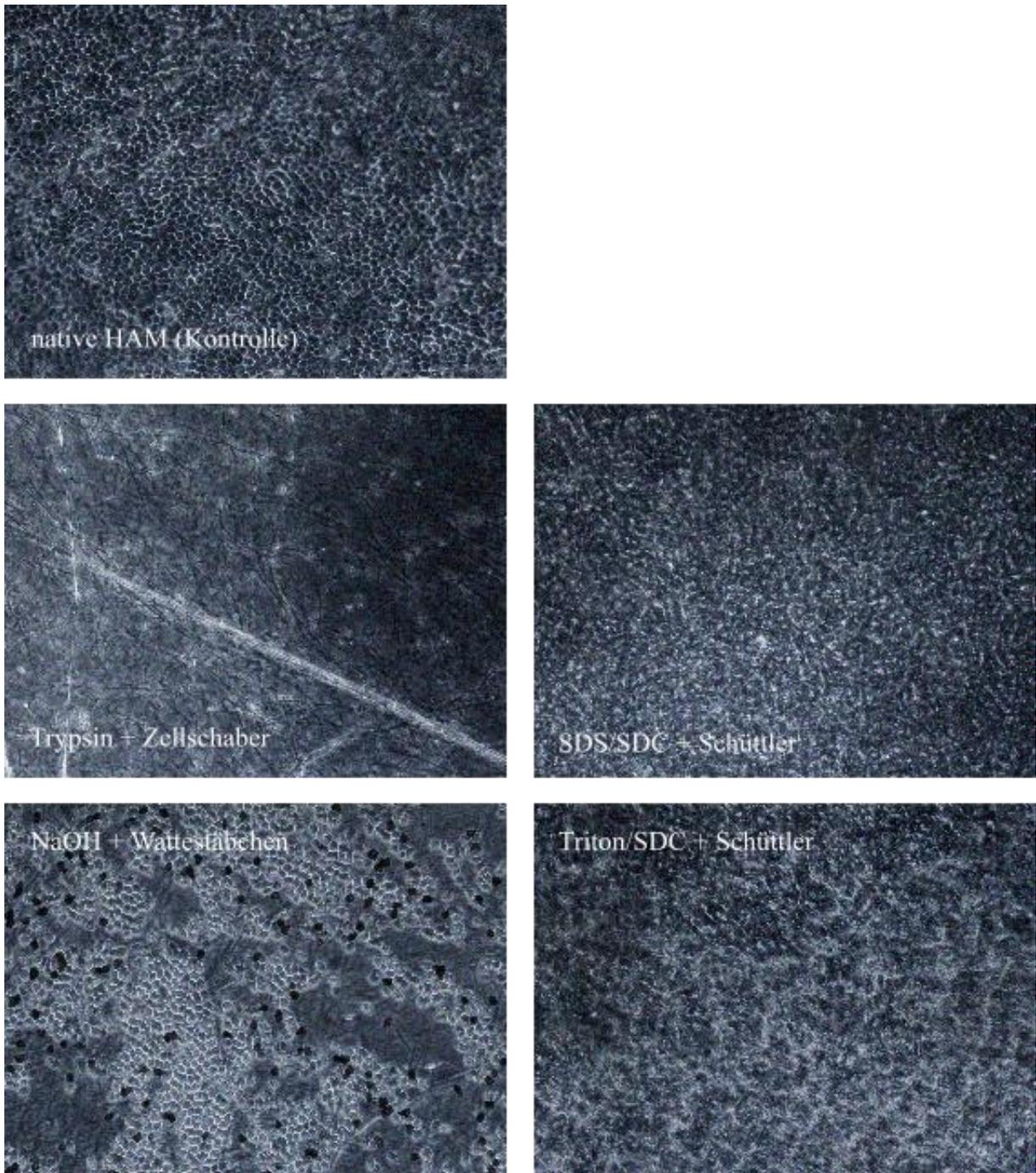


Abbildung 6: Deepithelialisierungsergebnisse. PKM. 100x. Oben-links: Native hAM mit geschlossenem, typisch wabenförmigem Epithel. Mitte-links: hAM nach Behandlung mit Trypsin und Zellschaber. Es war kein Epithel mehr sichtbar, die Matrix war durchzogen von länglichen Strichen auf der hAM als Zeichen potenzieller Gewebedestruktion. Mitte-rechts: hAM nach Behandlung mit SDS/SDC und anschließendem Verbleib auf dem Schüttler. Das typische wabenförmige Epithelmuster war nicht mehr zu erkennen, dafür eine verwaschene Erscheinung ohne klar zuzuordnende Zellgrenzen. Die unterliegende Matrix war nicht sichtbar. Unten-links: hAM nach Behandlung mit NaOH und Wattestäbchen. Das Epithel zeigte sich lückenhaft mit vereinzelt dunkel Zellen. Die lückenhaft sichtbare Matrix war weitestgehend homogen. Unten-rechts: hAM nach Behandlung mit Triton/SDC und Schüttler: Das Epithel zeigte sich sehr verschwommen ohne klare Zellbegrenzungen, die unterliegende Matrix war nicht sichtbar.

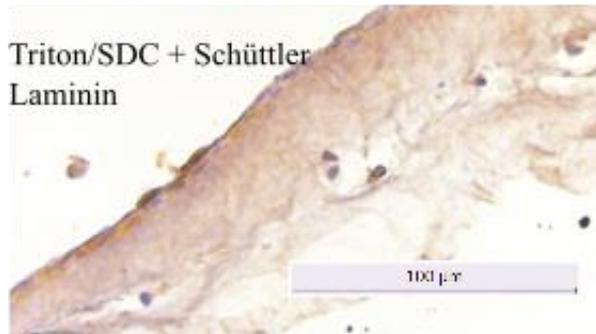
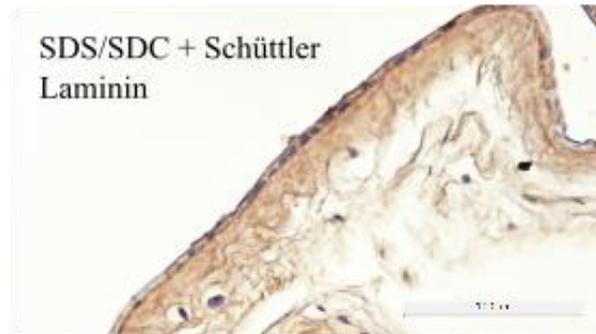
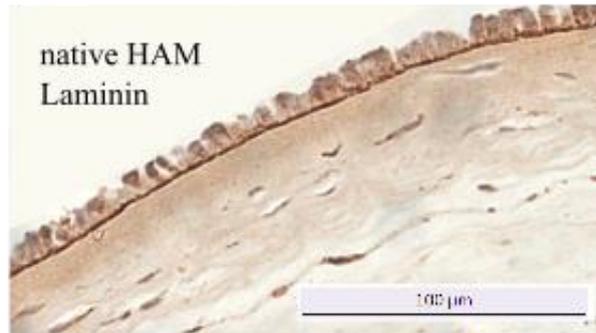
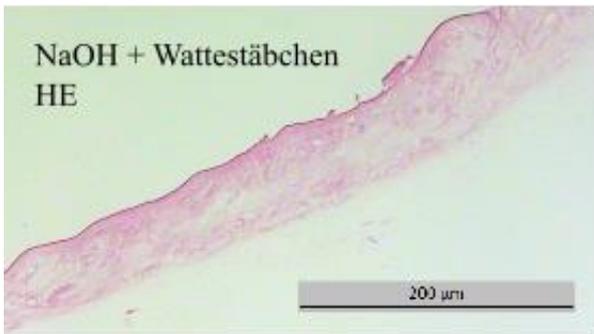
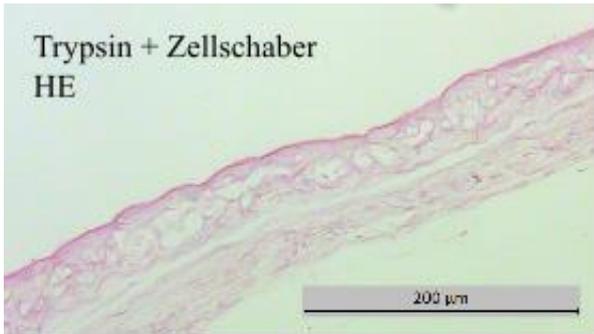


Abbildung 7: Deepithelialisierungsergebnisse in H/E- und Laminin-Färbung. LM. 20-40x. Obere vier Bilder: 20-40x vergrößerte H/E-Färbungen verschieden deepithelialisierter hAM. Während die Trypsin und NaOH-Gruppen eine überwiegende Deepithelialisierung aufwiesen, war bei den beiden Dezellularisierungsmethoden mit Triton/SDC bzw. SDS/SDC jeweils noch eine überwiegend durchgängige, einschichtige Epithelschicht zu erkennen. 2 Bilder Mitte: 20x vergrößerte native hAM unter H/E- und Laminin-Färbung. Es zeigte sich ein deutlich mehrreihiges Epithel sowie eine durchgängige Basalmembran. Untere vier Bilder: 20-40x vergrößerte Laminin-Färbungen verschieden deepithelialisierter hAM. In der Trypsin- und der NaOH-Gruppe zeigten sich durchgängig angefärbte Basalmembranen, in den anderen beiden Gruppen waren diese nur dezent unter dem Epithel zu erahnen.

3.1.2 Eignungsvergleich verschiedener Air-Liquid-Medien

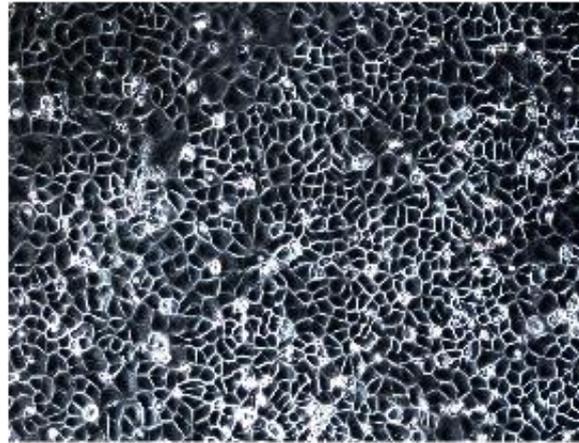
Die verwendeten Air-Liquid-Medien zeigten nach fünf Tagen Inkubation von Fibroblasten- und Keratinozytenzellkulturen zytomorphologisch unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 8). Das Fibroblastenwachstum zeigte sich nach fünf Tagen Inkubation mit Dermalife K komplett inhibiert. Bei Zugabe von FCS in 5%-iger und 10%-iger Konzentration zeigte sich bereits ein ausgeprägtes, vitales Fibroblastenwachstum, wobei eine höhere FCS-Konzentration einem leicht vorteilhafterem Wachstumsverhalten entsprach. Unter dem üblichen und in der Literatur häufig verwendeten DMEM mit 10%-igem FCS Zusatz zeigte sich nochmals ein gering besseres Wachstumsverhalten mit einer Vielzahl vitaler Zellen. Das Keratinozytenwachstum zeigte sich nach fünf Tagen Inkubation in Dermalife K sehr vital und im typischen konfluenten Mosaikmuster. Bei einem Zusatz von 5% FCS zeigten sich die Zellen ähnlich vital, wohingegen bei 10%-igem FCS-Zusatz bereits ein deutlicher Strukturverlust mit Abrundung der immer noch zahlreich proliferierten Zellen erkennbar war. Unter DMEM-Kulturmedium zeigten sich die Keratinozyten schließlich komplett avital. Der Trypanblau-Ausschlusstest bestätigte nochmals die qualitativ bereits beschriebenen Verhältnisse: Während sich bei den Fibroblasten bei den drei Medien mit FCS-Zusatz immerhin >85% nicht anfärbten und damit als vital gelten erwies die Viabilität in der einzigen Gruppe ohne FCS-Zusatz 0-5%. Bei den Keratinozyten verlief es annähernd gegenläufig: Während sich in den Dermalife-Medien ohne bzw. mit 5% FCS-Zusatz weniger als 5-10% der Zellen anfärbten, waren es in der Gruppe mit 10% FCS-Zusatz schon 20% avitale Zellen und in der DMEM-Gruppe annähernd 100% avitale Zellen. In Anbetracht der Tatsache, dass Keratinozyten wie Fibroblasten über einen mehrtägigen Zeitraum mit demselben Kulturmedium versorgt werden müssen, zeigte Dermalife K mit 5%-igem FCS-Zusatz die besten Ergebnisse und wurde daher für die Folgeversuche weiterverwendet.

Fibroblasten (Tag 5)

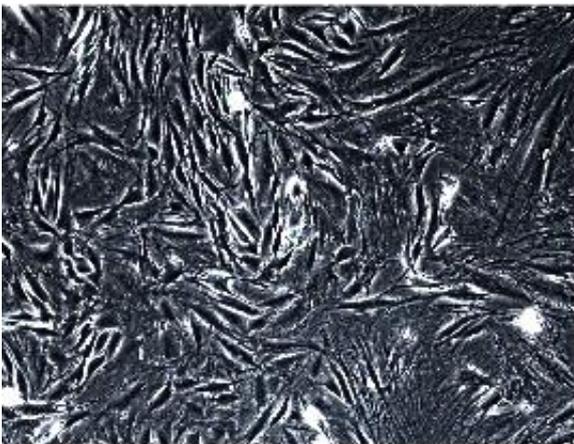
Keratinocyten (Tag 5)



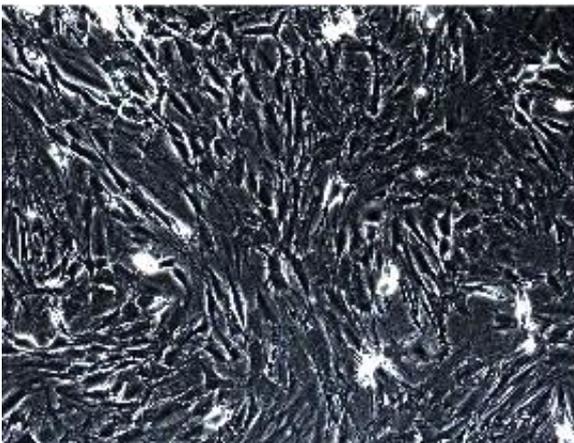
Dermalife K



Dermalife K + 5% FCS



Dermalife K + 10% FCS



DMEM + 10% FCS

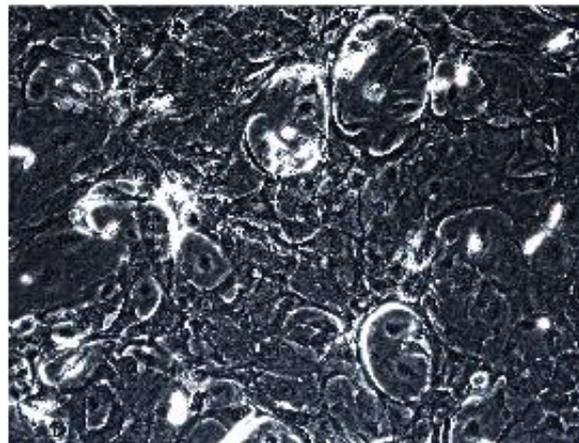


Abbildung 8: Vergleich verschiedener Kulturmedien an Fibroblasten und Keratinozyten. PKM. 100x. Linke Spalte: Von oben nach unten wurden Fibroblastenkulturen nach fünftägiger Inkubation mit Dermalife K mit verschiedenen FCS-Konzentrationen und DMEM festgehalten. Die Zellkulturen nahmen an Vitalität mit zunehmendem FCS-Anteil zu. Rechte Spalte: Von oben nach wurden Keratinozytenkulturen nach fünftägiger Inkubation mit Dermalife K mit verschiedenen FCS-Konzentrationen und DMEM dokumentiert. Die Zellkulturen nahmen an Vitalität mit zunehmendem FCS-Anteil ab.

3.1.3 Besiedelungsversuche und AL-Kultur

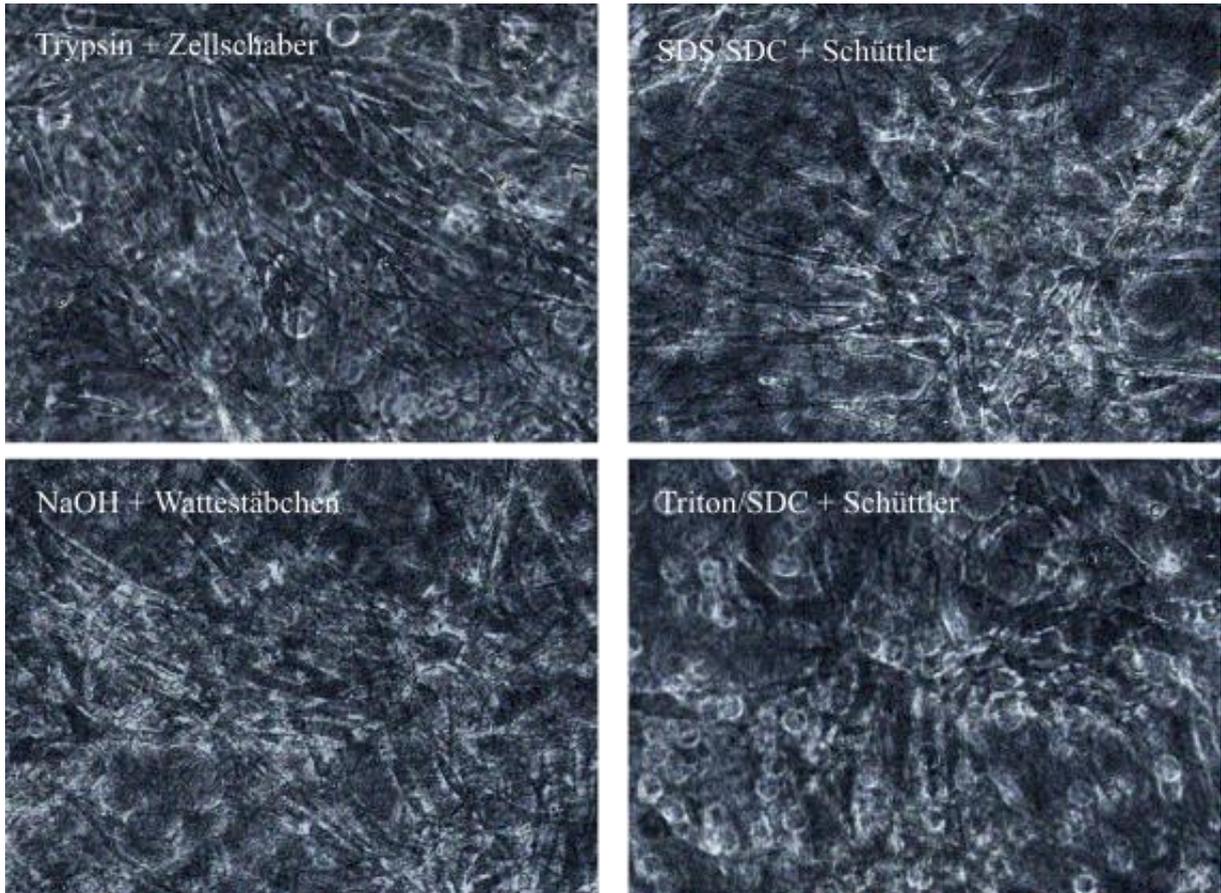


Abbildung 9: Fibroblastenbesiedelte hAM. PKM. 200x. Oben-links: mit Trypsin und Zellschaber behandelte hAM nach Fibroblastenbesiedelung. Oben-rechts: mit SDS/SDC und Schüttler behandelte hAM nach Fibroblastenbesiedelung. Unten links: mit NaOH und Wattestäbchen behandelte hAM nach Fibroblastenbesiedelung. Unten rechts: mit Triton/SDC und Schüttler behandelte hAM nach Fibroblastenbesiedelung. Es zeigten sich bei allen behandelten hAM auf der ehemaligen Chorionseite differenzierte Fibroblastennetze.

Die Besiedelung der (je nach gewählter Methodik mehr oder weniger erfolgreichen deepithelialisierten) hAM nach Protokoll erfolgte primär mit Fibroblasten. Die Besiedelung zeigte bei allen verwendeten Membranen die rasche und konfluente Bildung von differenzierten Fibroblastennetzen auf der Chorionseite (Abb. 9).

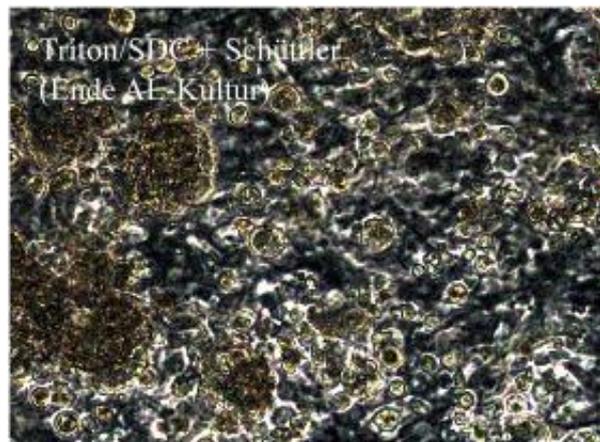
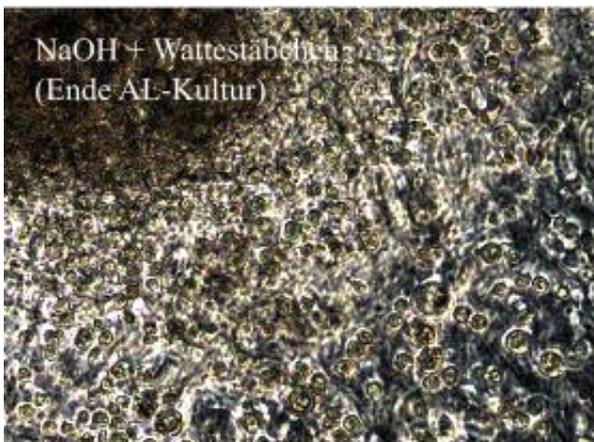
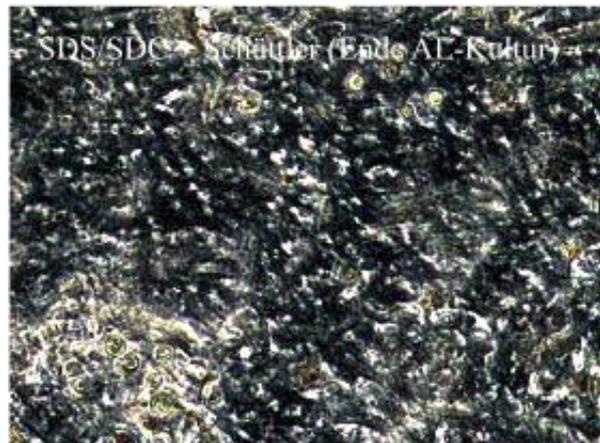
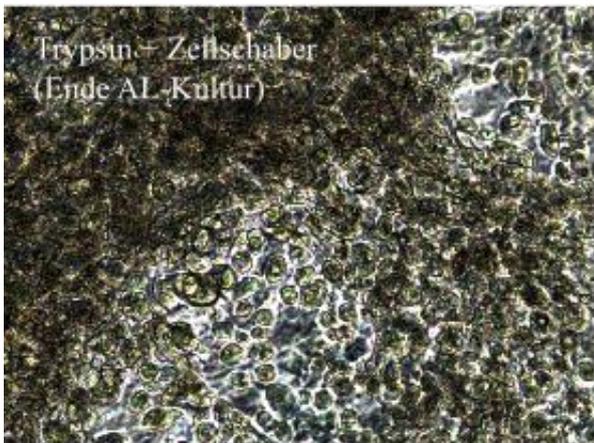
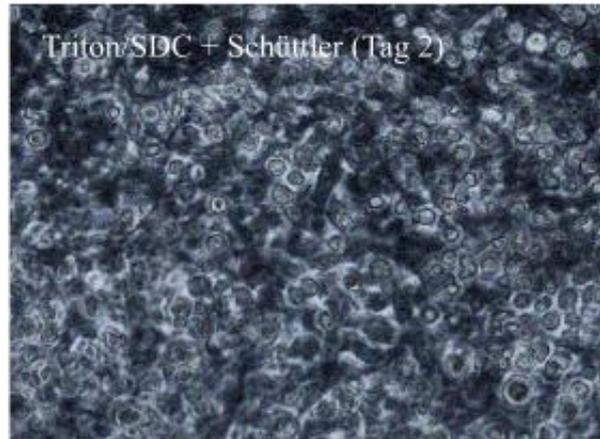
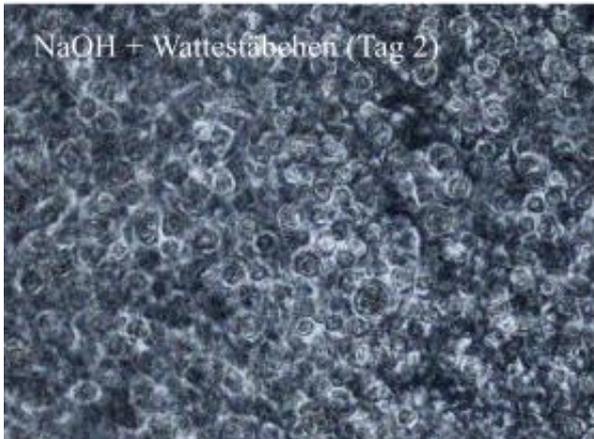
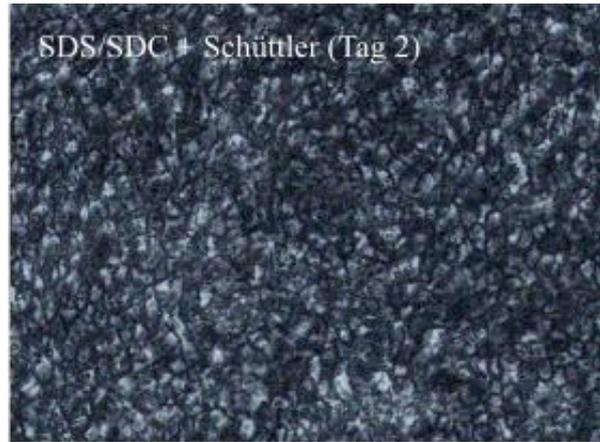
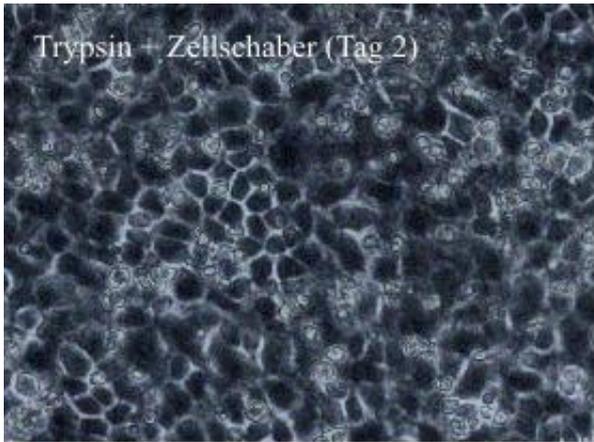


Abbildung 10: Rebesiedelte hAM. PKM. 200x. In den vier oberen Bildern wurde eine reepithelialisierte hAM nach unterschiedlichen Deepithelialisierungsmaßnahmen jeweils nach zwei Tagen festgehalten. Nach zwei Tagen zeigte sich lediglich die hAM, welche mit Trypsin und Zellschaber behandelt wurde, lückenlos mit dem typischen Epithelmuster rebesiedelt. Die NaOH- und die mit Triton/SDC behandelten Membranen zeigten keine differenzierten epithelialen Zellverbände, die Zellen waren abgerundet. In der SDS/SDC behandelten hAM waren keine rebesiedelten Epithelzellen zu erkennen. In den unteren vier Bildern wurde das Ende der AL-Kultur derselben Proben dokumentiert. Zum Ende der AL-Kultur zeigten die mit Trypsin und NaOH behandelten hAM einen mehrschichtigen, größtenteils durchgängigen und mit Keratin überzogenen Epithelverband. In der mit Triton/SDC behandelten Gruppe waren die Epithelverbände deutlich lückenhafter, in der SDS/SDC-Gruppe ließen sich nur vereinzelt Epithelzellen erkennen.

Die Besiedelung der Amnionseite brachte je nach Deepithelialisierungsmethodik unterschiedliche Ergebnisse. Erfasst wurden die Kulturen am zweiten Tag in Kultur und am Ende der Air-Liquid (AL)-Kulturzeit (Abb. 10). Die trypsinierten Membranen zeigten rasch eine dichte, mosaikförmige vollständige Konfluenz der Keratinozyten. Nach Anhebung zur Air-Liquid-Kultur erfolgte eine regelrechte Verhornung und eine Art Gipfelbildung über verschiedene Punkte der Membran. Während manche Stellen so sehr dicht und hoch besiedelt waren zeigten sich andere komplett ohne Epithel bedeckt. In den mit NaOH behandelten hAM bildeten die Keratinozyten am zweiten Tag kein mosaikförmiges, konfluentes Epithel. Die Zellen erschienen rundlich und eher aufliegend, was für eine niedrige Adhärenz oder Vitalität dieser Zellen spricht. Gegen Ende der AL-Kultur präsentierten sich diese Membranen dann aber ähnlich wie die trypsinierten hAM, jedoch insgesamt mit mehr epithelfreien Bereichen. In den mit SDS/SDC gespülten Membranen präsentierte sich das Epithel nach zwei Tagen Kultur insgesamt konfluent und bienenwabenartig, jedoch mit deutlich kleineren Zellgrößen und am Ende der AL-Kultur ohne Zeichen der Verhornung. Dies spricht am ehesten für eine fehlende Adhärenz der besiedelten Keratinozyten mit nachfolgender Entfernung in den Medienwechseln und dem Verbleiben des schon in der Deepithelialisierungs-Phase nicht losgelösten Amnionepithels. In der Test-Gruppe mit Triton/SDC zeigten sich nach zwei Tagen vereinzelt rundliche Keratinozyten adhärent, die auch am Ende der AL-Kultur ein Verhornungsmuster aufwiesen. Insgesamt füllte diese Keratinozytenschicht jedoch nur einzelne, punktuelle Bereiche der Membran.

3.1.4 Elektronenmikroskopie

Die Gewebe zeigten sowohl von epithelialer als auch von stromaler Seite verschiedene Veränderungen als Folge der Deepithelialisierung (Abb. 11).

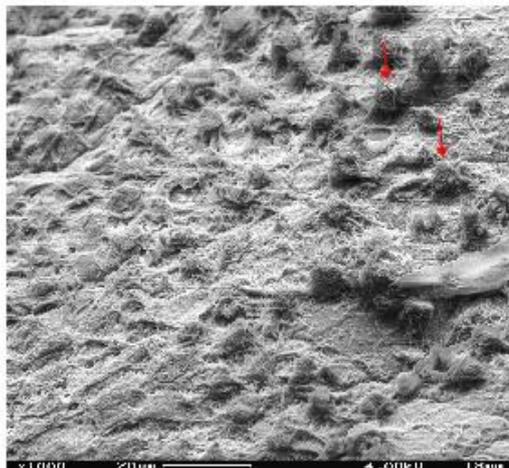
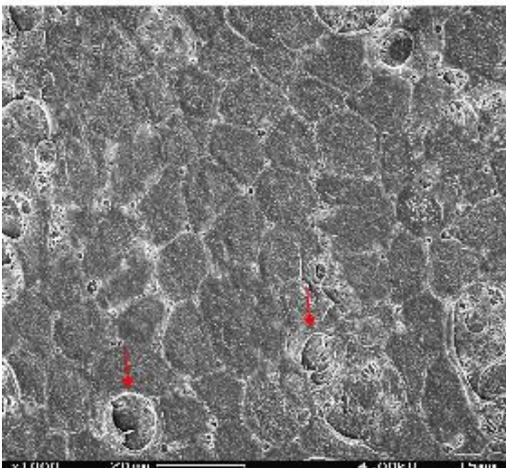
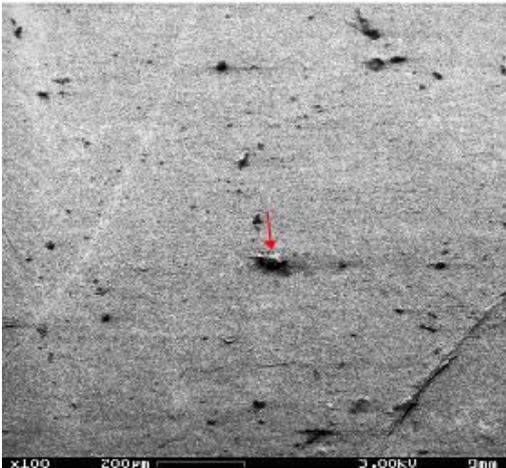
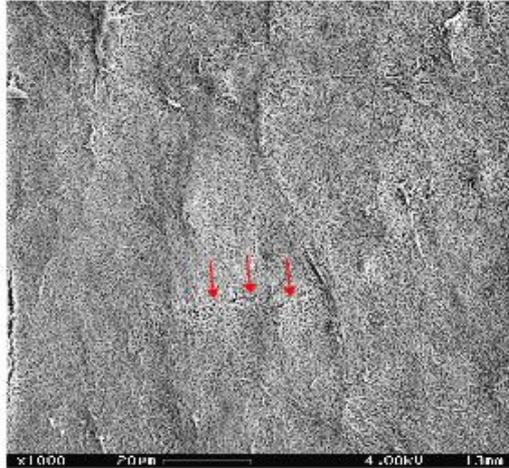
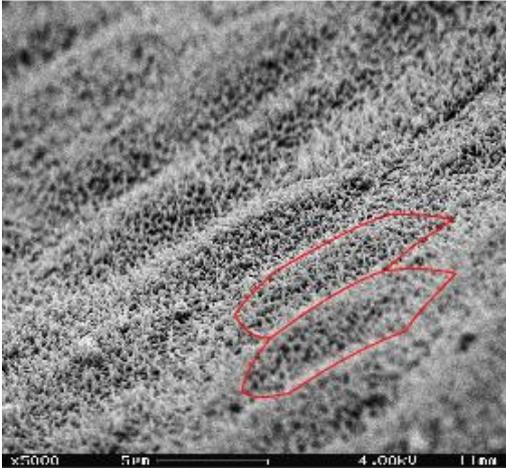
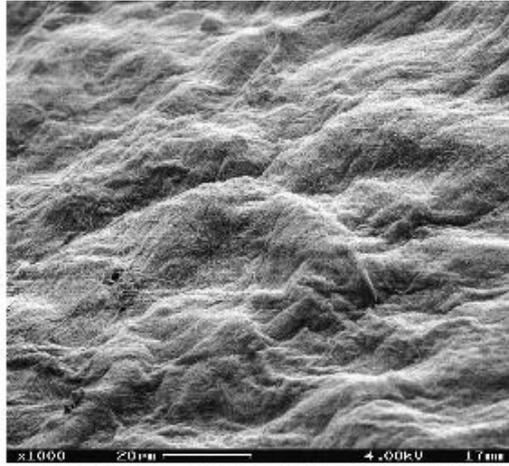
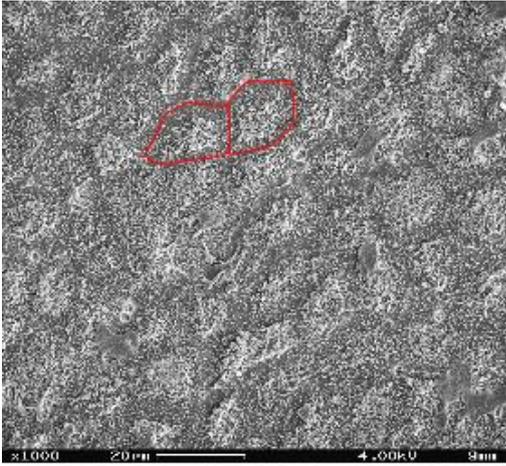


Abbildung 11: Aufnahmen verschiedener hAM-Präparate. REM. 100-5000x. Oben-links und links darunter: Epithelseite einer nativen hAM in planer (1000x) und schräger (5000x) Aufnahme. Es war das durchgängige Wabenmuster als typische Architektur der Epithelzellen erkennbar, **mit Rot umrandet** sind beispielhaft die Abgrenzungen einzelner Zellkörper. Links, zweites Bild von unten: Epithelseite einer deepithelialisierten hAM in planer (100x) Aufnahme. Das typische Wabenmuster war als Zeichen einer beinahe vollständigen Deepithelialisierung verschwunden, es zeigte sich vereinzelt Zelldetritus (**Pfeil**). Unten-links und Unten-rechts: Epithelseite einer rebesiedelten hAM in planer (1000x) und schräger (1000x) Aufnahme. Neben dem typischen Wabenmuster der Epithelzellen zeigten sich rundliche Zellen, die in Form einer Mehrreihig- bzw. Mehrschichtigkeit des Epithels aufliegen (**Pfeile**). Oben-rechts und darunter: Stromaseite einer nativen hAM in schräger Aufnahme (1000x), einer deepithelialisierten hAM (1000x) und einer rebesiedelten hAM (1000x) in planer Aufnahme. Sowohl bei der nativen als auch bei deepithelialisierten hAM zeigten sich keine Zellen, bei letzterer allerdings vereinzelt Gewebssrisse (**Pfeile**). Bei der rebesiedelten Membran zeigte sich das fibroblastentypische, geflechtartige Wachstumsmuster mit Aussparungen.

Ähnlich wie bei Zhang et al. (2016) wies die native hAM auf der epithelialen Seite einen hexagonalen Epithelverband mit dichten desmosomalen Zellverbindungen und Mikrovilli auf der Oberfläche als Zeichen eines einschichtigen Epithels und auf der stromalen Seite unregelmäßig angeordnete, aufgelockerte Kollagenfasern auf (Zhang et al., 2016). Bei der deepithelialisierten hAM präsentierte sich die epitheliale Seite bis auf wenig Zelldetritus komplett deepithelialisiert und als glatte fibrinöse Struktur. Auffällig waren vereinzelte Gewebseinrisse auf der stromalen Seite, die sich in unregelmäßiger Anordnung zeigten. Nach Rebesiedelung konnten auf der epithelialen Seite teils einschichtige, teils mehrschichtig bis mehrreihige Zellverbände erkannt werden. Ähnlich wie in der PKM erkennbar gab es hier eine große Varianz zwischen teils erhabenen Zellverbänden und teils komplett unbedeckter Matrix ohne Epithelverschluss. Die stromale Seite zeigte einen Teppich über viele Ausläufer miteinander verflochtener Fibroblasten mit ausdifferenzierter und markanter Morphologie.

3.1.5 OCT

Im Rahmen des Pilotversuchs wurden verschiedene native, mit Trypsin deepithelialisierte und rebesiedelte hAM den OCT-Untersuchungen zugeführt. Dabei gestaltete sich die richtige Positionierung der hAM vor dem Tomographen teils schwierig und nur unter unsterilen Bedingungen, sodass die Membranen anschließend verworfen wurden. Bei entsprechender Fixierung der hAM konnte eine Übersichtsaufnahme angefertigt werden. Anhand voreingestellter Programme konnte dann eine dünnschichtige Reihenaufnahme der Membranen erfolgen, aus der in Abbildung 12 beispielhaft Bilder präsentiert werden.

Während die nativen und wiederbesiedelten hAM deutlich dicker – meist $>1\text{mm}$ – waren, zeigten sich die deepithelialisierten hAM wesentlich dünner. Aufgrund verschiedener Lichtbrechungsartefakte sind dabei genaue Abmessungen mit Vorsicht zu betrachten. Die Epithelschichten zeigten sich dabei grob abgrenzbar zum unterliegenden Stroma und zwischen den nativen mit dem ein- bis zweireihigen Epithel und der deepithelialisierten sowie der mehrschichtigen, rebesiedelten hAM präsentierten sich deutliche Dicke-Unterschiede des Epithels und der Membran. An verschiedenen Bereichen konnten Membrandefekte erkannt werden, die in der PKM noch nicht auffällig geworden waren.

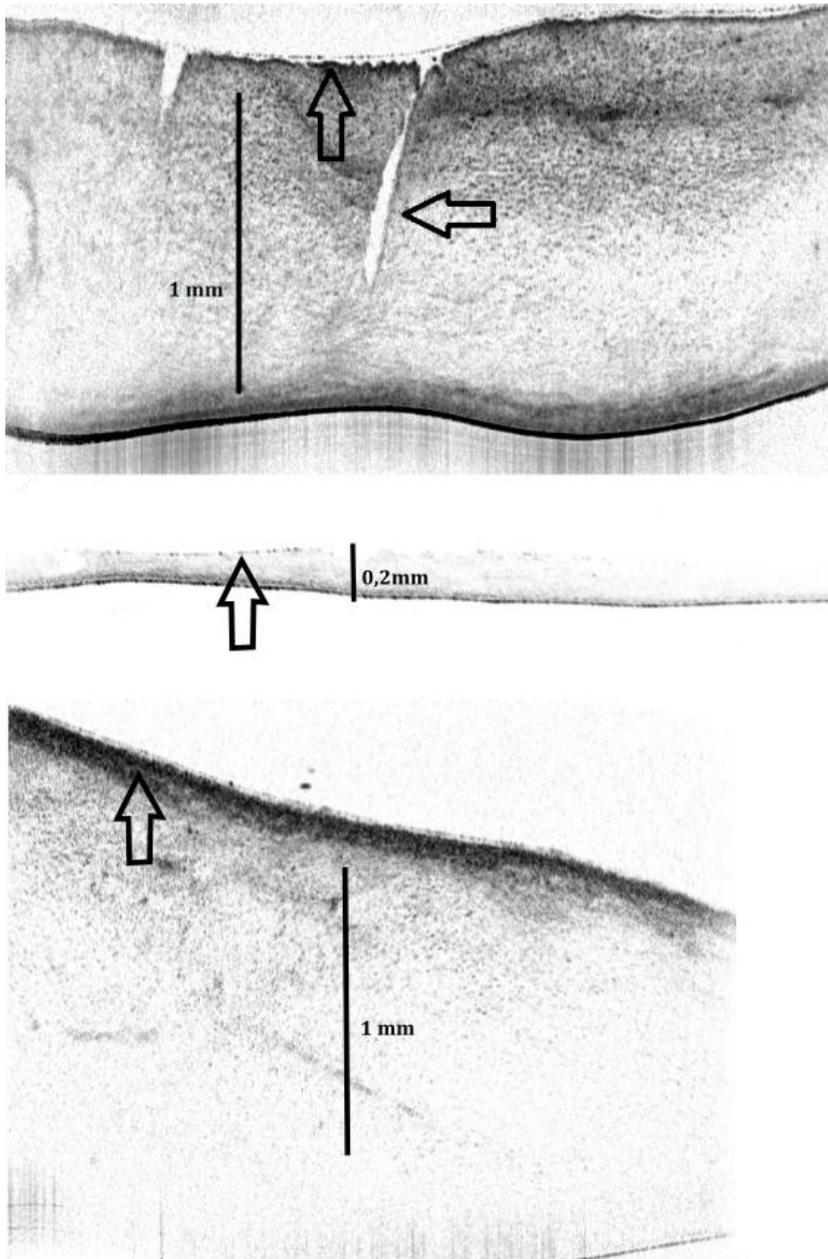


Abbildung 12: OCT-Bilder verschiedener hAM. Oben: native hAM. Es ließ sich ein tiefgreifender Defekt darstellen(waagerechter Pfeil). Außerdem zeigte sich dünnes Epithel (**senkrechter Pfeil**) auf der dem OCT zugewandten Seite. Mitte: Deepithelialisierte hAM, welche deutlich dünner war und quasi kein Epithel (**senkrechter Pfeil**) aufwies. Unten: Deepithelialisierte und wieder besiedelte hAM. Diese war wieder deutlich dicker und zeigte auf der Epithelseite einen deutlichen Zellwall (**senkrechter Pfeil**).

3.2 In-vivo-Experimente am Rattenmodell

3.2.1 Wundkontrollen

Die verwendeten Ratten zeigten Gewichte zwischen 420g und 650g (Mittelwert 525g). Es musste im Verlauf der Versuche keine Ratte ausgeschlossen oder vorzeitig euthanisiert werden. Auffällig war, dass viele Ratten in den postoperativen Kontrollen noch an Gewicht zunahmten, entsprechend wird angenommen, dass diese Ratten trotz mehrmonatiger Lebenszeit noch nicht vollständig ausgewachsen waren. Die Implantation der Membranen erfolgte problemlos, die hAM zeigte sich stets gut adhären. Auch die Wundkontrollen liefen meist problemlos ab, es fiel jedoch auf, dass gelegentlich mit Abnahme des Verbands am zehnten postoperativen Tag eine bereits geschlossene Wundfläche wieder traumatisch eröffnet wurde. Insgesamt schien der Überknüpfverband der Eigenmanipulation der Ratten gut widerstanden zu haben, gelegentlich zeigten sich einzelne Nähte gelöst, der Verband an sich wurde jedoch stets untersucherseits entfernt. Der Fadenzug und die Verbandabnahme sowie die weitere Begutachtung der Wunden konnten zeitgerecht erfolgen. Die entstandenen Wunden und später Narben zeigten gruppenübergreifend sehr heterogene Formen, u.a. rundliche, linien- oder auch eckige Muster (Abb.13). Am häufigsten, jedoch unregelmäßig über die Gruppen verteilt, war eine kranial-kaudale Wundkontraktion mit letztlich etwa orthogonal zur Längsachse liegender Narbe.



Abbildung 13: Beispielhaft ausgewählte Wundkontrollen der einzelnen Versuchsgruppen. Links von oben nach unten: Wundkontrollen alle zehn Tage bei Defektsetzung ohne hAM-Deckung. Mitte-links von oben nach unten: Wundkontrollen alle zehn Tage bei Wunddeckung mit nativer hAM. Mitte-rechts von oben nach unten: Wundkontrollen alle zehn Tage bei Wunddeckung mit deepithelialisierter hAM. Rechts von oben nach unten: Wundkontrollen alle zehn Tage bei Wunddeckung mit besiedelter hAM.

3.2.2 Wundkontraktion

Die in Relation zur Anfangsgröße vermessenen Wundgrößen und damit auch -kontraktionen präsentierten sich vor allem innerhalb der einzelnen Gruppen sehr heterogen, was eine hohe statistische Varianz zur Folge hatte (Tab. 4 und Abb. 14). Während die Kontrollgruppe sowie die Ratten, welche mit besiedelter und nativer Membran versorgt wurden anhand der Mittelwerte sehr ähnliche Wundgrößen über die verschiedenen Messungen zeigten, präsentierten sich die mit deepithelialisierten Membranen gedeckten Wunddefekte mit einer deutlich stärkeren Wundkontraktion, die an Tag 10 und 40 signifikant ($p < 0,05$) und an Tag 30 knapp subsignifikant ($p = 0,06$) größer war als die Wundkontraktion der Kontrollgruppe. Dies waren ebenfalls die einzigen signifikanten Unterschiede von der Kontrollgruppe, alle anderen Gruppen und Zeitpunkte erbrachten aufgrund der hohen Standardabweichung keine signifikante Abweichung zu der Kontrollgruppe.

Tabelle 4: t-Test der unterschiedlichen Schrumpfungsmaße. Mit * markierte Werte sind signifikant ($p < 0,05$). Lediglich die deepithelialisierten Membrane zeigen zu den Zeitpunkten d10 und d40 signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe, wobei die Wundkontraktion in der deepithelialisierten Gruppe stets tendenziell ausgeprägter war.

	Kontrolle	besiedelt	nativ	deepithelialisiert
d10	0,967±0,032	0,935±0,068	0,996±0,049	0,855±0,064
		p=0,34	p=0,25	p<0,001*
d20	0,905±0,050	0,930±0,066	0,913±0,048	0,857±0,048
		p=0,47	p=0,78	p=0,12
d30	0,911±0,061	0,936±0,037	0,935±0,040	0,835±0,063
		p=0,41	p=0,44	p=0,06
d40	0,943±0,039	0,932±0,041	0,959±0,049	0,843±0,060
		p=0,64	p=0,54	P<0,01*

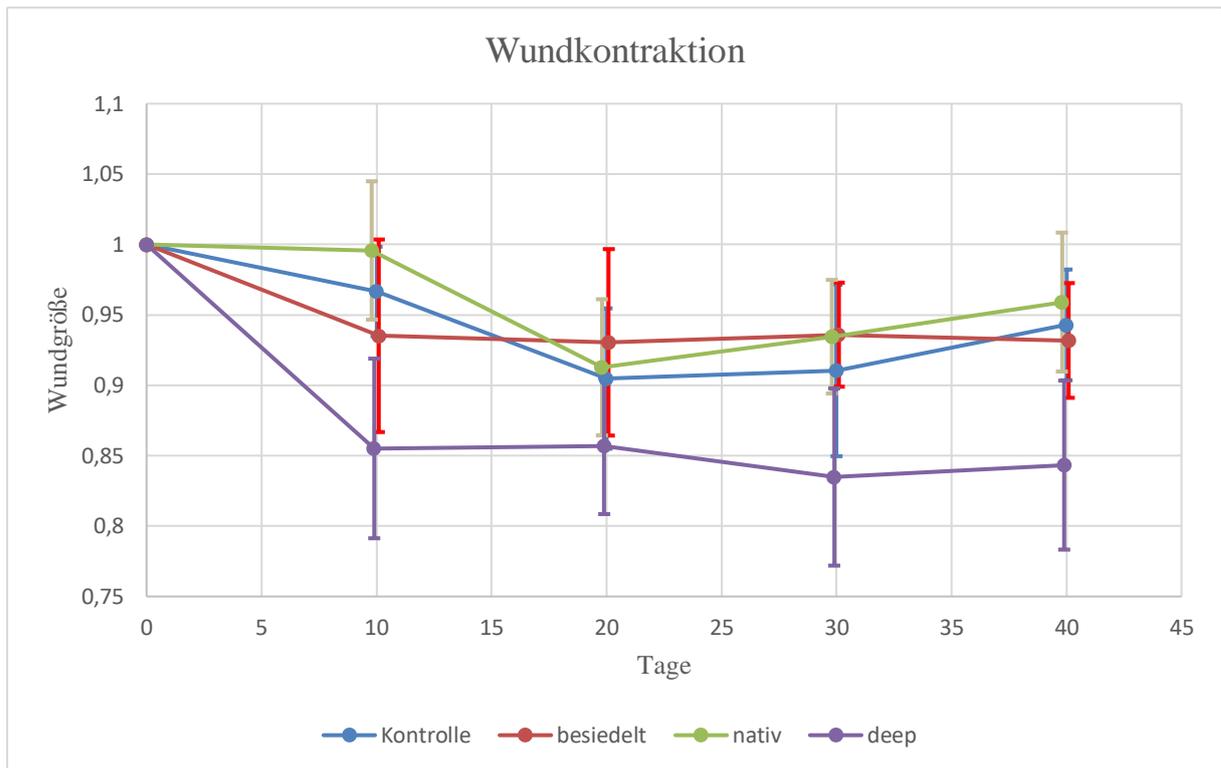


Abbildung 14: Prozentuale Wundgrößen der einzelnen Testgruppen im zeitlichen Verlauf. Startend bei Tag 0 (Defektsetzung) und der dazugehörigen Wundgröße (1) zeigten die Gruppen unterschiedliche Verläufe hinsichtlich der Wundkontraktion. Kontrollen erfolgten alle zehn Tage bis Tag 40, die Mittelwerte sind mit Standardabweichungen eingezeichnet. Eine deutlich geringere Wundgröße und damit stärkere Wundkontraktion wiesen die rein deepithelialisierten Membranen auf.

3.2.3 Vancouver Scar Scale

Mit Abschluss des Wundverschlusses und vor bzw. mit der Euthanasie erfolgte die Einordnung der Narbe in den Vancouver Scar Scale. Da bereits orientierend zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen nur leicht unterschiedliche Scores entstanden, wurde initial eine einfaktorische ANOVA (Varianzanalyse) durchgeführt, um mögliche signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auszumachen (Tab. 5). Dabei zeigte sich bereits eine mit $p=0,46$ höchstwahrscheinlich niedrige Abweichung der einzelnen Gruppen voneinander, weswegen keine weiteren t-Tests erfolgten. Auch in den einzelnen Subkategorien der Vancouver Scar Scale konnten keine auffälligen Unterschiede ausgemacht werden.

Tabelle 5: Vancouver Scar Scale für die einzelnen Gruppen mit einfaktorieller ANOVA. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Scores in der VSS nicht signifikant voneinander ($p=0,46$).

	Arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung	p-Wert der einfaktoriellen ANOVA
Kontrolle	5,33 \pm 1,03	p=0,46
besiedelt	4,83 \pm 0,75	
nativ	5,33 \pm 1,37	
deepithelialisiert	5,83 \pm 0,98	

3.2.4 Histologische Auswertungen der Wundfläche

Die histologische Auswertung erfolgte anhand von H/E-Färbungen und immunhistochemischer Laminin-Färbungen. In den H/E-Färbungen zeigte die Narbenstruktur qualitativ in der histologischen Untersuchung zwischen den einzelnen Gruppen keine Unterschiede. Weder zeigte sich eine deutlich verstärkte Vaskularisation, noch vermehrte Einwanderung von Entzündungszellen. Auch waren keine in einzelnen Gruppen hervorstechende Unterschiede hinsichtlich der kollagenreichen Matrix der Dermis und der Ausdehnung und Morphologie der Epidermis erkennbar. In den Übergangsbereichen zeigte sich eine durchgängige Epidermis, in den Narbenbereichen im Vergleich zum gesunden angrenzenden Gewebe regelhaft keine Hautanhangsgebilde und eine verdichtete Bindegewebsstruktur (Abb. 15). Des Weiteren wurden die Biopsien hinsichtlich der Struktur der Basalmembran untersucht. Hierbei fiel auf, dass in den gesammelten Proben in den mit Amnionmembranen versorgten Ratten stets eine Basalmembran nachzuweisen war, die sich mikroskopisch verfolgen ließ und nur vereinzelt Lücken aufwies (Abb. 16). Besonders in der deepithelialisierten Gruppe zeigte sich die Membran zudem besonders prominent und stark ausgeprägt. In der Kontrollgruppe ohne Amnionmembranversorgung konnte demgegenüber keine Membran regelrecht nachgewiesen werden.

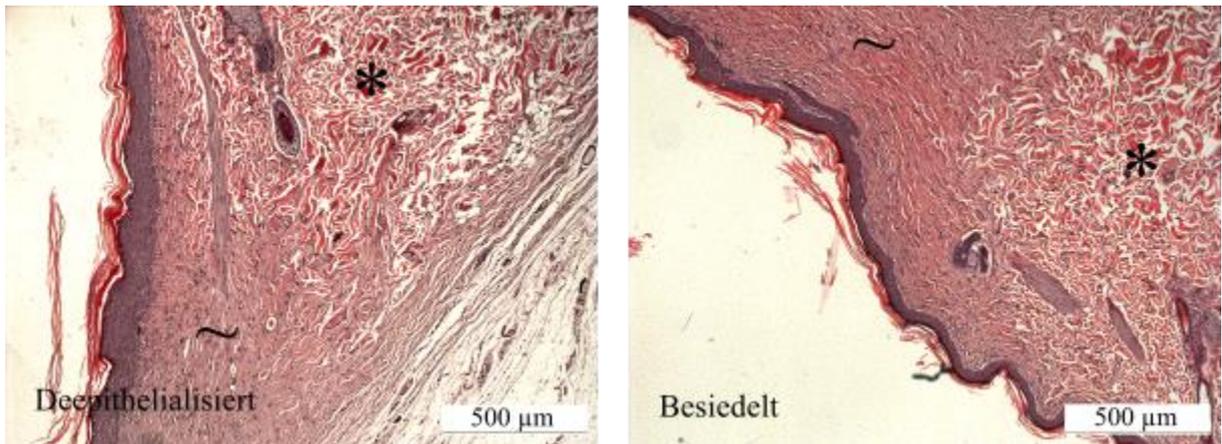


Abbildung 15: Wundbiopsien in H/E-Färbung. Übergang von gesundem zu Narbengewebe. LM. 25x vergrößert. Beispielhaft sind zwei Proben abgebildet; Es zeigen sich deutlich sichtbare Strukturunterschiede vom gesunden (*) zum Narbengewebe (~): Im Narbengewebe fehlen Hautanhangsgebilde und die Bindegewebsfasern zeigen sich verdichtet, die Epidermis ist allseits durchgängig und regelhaft.

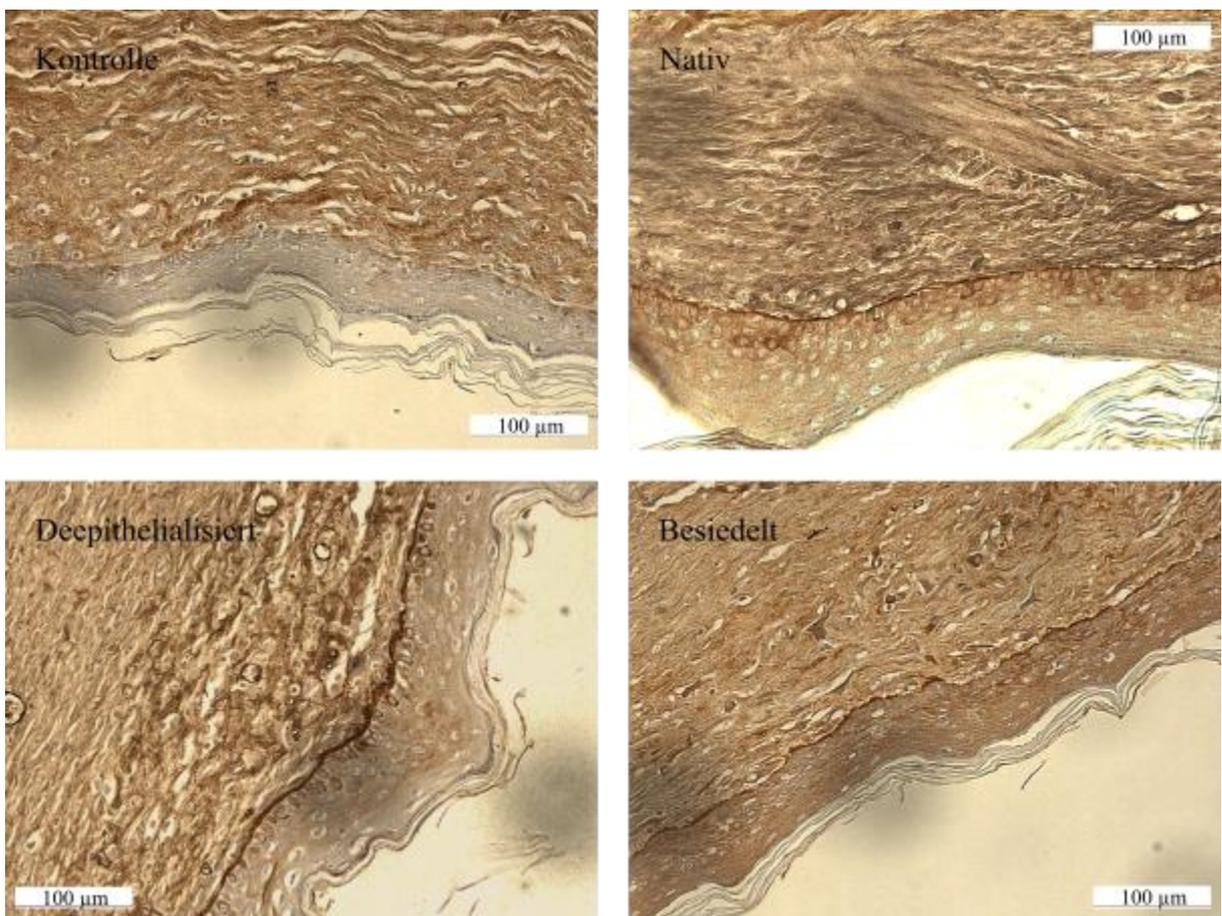


Abbildung 16: Wundbiopsien in Lamininfärbung. LM. 100x vergrößert. Die Lamininfärbung erfolgte zur Identifikation der Basalmembran. Während diese sich in den nativen und rebesiedelten Gruppen (rechts-oben und rechts-unten) als annähernd durchgängig mit schwacher Stärke nachweisen lässt, zeigt sie in der deepithelialisierten Gruppe ein sehr prominentes Auftreten (links-unten). In der Kontrollgruppe lässt sich keine durchgängige Struktur nachweisen (links-oben).

4 Diskussion

4.1 In-vitro-Analysen der hAM

Im Rahmen der in-vitro-Analysen zeigten sich anhand der durchgeführten Licht- und Phasenkontrastmikroskopie Vorteile hinsichtlich Deepithelialisierungserfolg und Struktur der Basalmembran bei der Trypsin-Methodik. Dieses Verfahren ist schon viele Jahre bekannt und recht etabliert und zeigte auch bei uns die besten Ergebnisse, sodass es in den weiterführenden Experimenten verwendet wurde. Ein annähernd ähnlich gutes Ergebnis brachte die Verwendung der NaOH-Methode, welche jedoch in der Literatur bis auf die Verwendung von nur einer Forschungsgruppe noch nicht etabliert ist, in Folgeversuchen jedoch genauer evaluiert werden sollte (Saghizadeh et al., 2013). Die beiden tensidhaltigen Dezellularisierungsverfahren zeigten sich ungenügend für die Entfernung des Amnionepithels. Die verwendeten Protokolle bezogen sich auf die Dezellularisierung von Herzklappen, das dort zu findende Endothel ist üblicherweise bei repetitiver mechanischer Belastung stark verankert und wäre somit denkbar ähnlich zum Amnionepithel, welches ebenfalls mechanischen Druckänderungen im Uterus standhalten muss (Bourne, 1966). Andere Autoren beschreiben unter der Verwendung von SDS gute Ergebnisse, was im Gegensatz zu unseren Eindrücken steht (Figueiredo et al., 2017). Zusammenfassend gibt es also noch keine einheitlich favorisierte Deepithelialisierungsmethode von Amnionmembranen, ähnliche Erkenntnisse schlussfolgerten auch andere Arbeitsgruppen (Shortt et al., 2009).

Häufig gehen bessere Deepithelialisierungsergebnisse auch mit stärkerer Schädigung der extrazellulären Matrix einher; Trypsin ist bekannt für seine starke Collagenase-Wirkung, welche mechanische Instabilität des Stromas zur Folge haben kann (Gilbert, 2012). In den weiterführenden Gewebeuntersuchungen konnten folgend bei diesen Membranen beispielsweise in der EM Gewebeeinrisse beobachtet werden, die kausal auf die Verwendung von Trypsin zurückgeführt werden könnten (Abb. 11). Auch die weitere Handhabung der deepithelialisierten Membran zeigte sich mitunter schwierig, da einige Membranen bei bereits leichten Zugspannungen – häufig durchs Einspannen auf das Insert verursacht - makroskopisch sichtbare Einrisse zeigten und aussortiert werden mussten. Auch der spätere Transfer auf die Ratte zeigte sich bei dieser Versuchsgruppe erschwert: Um Einrisse und Nahtinsuffizienzen zu vermeiden musste mehr Gewebe

gegriffen werden. Alternative Deepithelialisierungs-Verfahren wie spezielle zellverträglichere Enzymlösungen, die nur epithelseitig aufgetragen werden und somit wenig Einfluss auf die extrazelluläre Matrix haben sollten, versprechen unter kontinuierlicher PKM-Kontrolle und Beachtung einer möglichst geringen Einwirkzeit gute Ergebnisse, und sollten in Folgeexperimenten auf ihre Deepithelialisierungsergebnisse evaluiert werden (Mariappan et al., 2010).

Die Isolation und Kultivierung der Keratinozyten und Fibroblasten gelang überwiegend regelhaft. Auch die Kultivierung der Zellen auf der trypsinisierten Membran zeigte konfluente Ergebnisse (Abb. 10). In der Zellviabilitätsuntersuchung zeigte sich dann als Air-Liquid-Medium, welches sowohl für Fibroblasten als auch Keratinozyten geeignet sein musste, eine Mischung aus Dermalife-K und 10% FCS als günstig. Auffällig trat auf, dass nach Anheben der Membran zur Air-Liquid-Kultur die Zellkonfluenz teils verloren ging mit nichtepithelialisierten Höfen und teils Zellberge mit deutlicher Mehrschichtung des Epithels entstanden (Abb. 11). Andere Autoren, welche die hAM mit nicht-keratinisierenden Epithelzellen besiedelten, haben nicht von diesem Phänomen berichtet (Ahn et al., 2006; Nakamura et al., 2003). Da keine Zellviabilitätsuntersuchung auf den Membranen erfolgte, bleibt die Ursache dieses Umstandes unklar: Zum einen könnten nach den Waschschritten residente Trypsin-Moleküle stellenweise zytotoxisch wirksam gewesen sein, zum anderen könnte auch die sehr heterogene Membranbeschaffenheit eine Nutrition von der Chorionseite – wie sie im Rahmen der Air-Liquid-Kultur erfolgte – an einzelnen Stellen begünstigt und an anderen inhibiert haben. Untersuchungen der Filter-Eigenschaften zur deepithelialisierten hAM fehlen, sodass letztlich unklar bleibt, ob das Nährmedium die Membran überhaupt ausreichend penetrieren konnte, um eine flächige Orthokeratinisierung zu erreichen; Dieser Perfusion wird von einigen Autoren viel Relevanz in der Ausbildung eines mehrschichtig verhornten Plattenepithels zugeschrieben, mehr noch als dem differenzierungsstimulierenden Kontakt mit der Luft (Prunieras, Regnier, & Woodley, 1983). Weitere Untersuchungen wie Viabilitätsassays der hAM nach Deepithelialisierung sollten in Folgeexperimenten Klärung bezüglich der Ursache für diese Auffälligkeit schaffen. Auch weitere Air-Liquid-Medien sollten hinsichtlich Vorteile auf die Proliferation und Differenzierung beider Zelllinien getestet werden: serumfreie, synthetische Medien für Fibroblasten sind beispielsweise derzeit Gegenstand der Forschung und könnten nach Zugabe spezieller Wachstumsfaktoren für Keratinozyten an die Anforderungen einer AL-Kultur angepasst werden (Ejiri et al., 2015; Lin et al., 2007).

Die OCT-Untersuchung stellte sich in der Umsetzung als möglich dar, besonders das Betrachten im steril verschlossenen Well zeigte aber aufgrund mehrerer Brechungslinien verschiedene Artefakte, ein Umstand der eine Zuordnung der Membranstrukturen erschwerte. Hinzu kam, dass in der Literatur bisher keine vergleichbaren Bilder publiziert wurden. Das direkte Vorhalten der hAM erzielte gute Bilderergebnisse, ging aber mit einer unsterilen Handhabung einher, sodass die Membranen nicht mehr für in-vivo-Untersuchungen weiterverwendet werden konnten. Der Vorteil einer OCT-Untersuchung stellt die nicht-invasive, schnelle Charakterisierung der Membran hinsichtlich in der PKM nicht erkennbarer Membranläsionen und einer groben Bestimmung der Membrandicke dar, beides indirekt Qualitätsmerkmale einer mechanisch stabilen hAM (Abb. 12) (Schmidt & Klima, 1989). Da die hAM in ihren verschiedenen, bereits etablierten Anwendungsbereichen, insbesondere mechanisch stabil sein sollte, könnte die OCT in Zukunft bei standardisierter Anwendung schnell nicht-geeignete Membranen vom weiteren Gebrauch ausschließen, was die klinischen Ergebnisse unter Umständen wesentlich verbessern könnte. Insbesondere die Augenheilkunde könnte ohne große finanzielle Neubeschaffungen durch ubiquitär vorhandene OCT-Geräte profitieren. Eine Standardisierung dieser OCT-Messungen sollte entsprechend in weiteren Forschungsvorhaben angegangen werden.

Bei der Verwendung von hAM gilt es für den allgemeinen Gebrauch zu bedenken, dass es eine hohe inter- und intraindividuelle Schwankung der Eigenschaften der hAM gibt. Verschiedene Autoren beschrieben die Schwankungen zwischen Amnionmembranen unterschiedlicher Individuen hinsichtlich Zytokine, Hyaluronsäure und anderer biologisch aktiver Faktoren (Litwiniuk & Grzela, 2014). Als Gründe dafür werden Alter, Allgemeinzustand, Schwangerschaftsalter und Geschlecht des Fetus angenommen. Zudem kommt eine hohe intraindividuelle Schwankung, z.B. je nach Entnahmeort der hAM: Im Wesentlichen werden dabei die zervikale, die Mittel- und die Plazenta-Zone unterschieden. Die hAM der zervikalen Zone beispielsweise ist deutlich dünner und mit weniger Epithel ausgestattet als die anderen beiden, und auch hinsichtlich der exprimierten Zytokine zeigen sie differente Eigenschaften (Litwiniuk & Grzela, 2014). Die Kollagenfaserausrichtung zeigt sich zudem mit unregelmäßig verteilten schwachen Membranstellen (Schmidt & Klima, 1989). Entsprechend viele Störfaktoren stellen sich bei in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen mit der hAM ein. Die grundsätzliche hohe Varianz der Qualität biologischen Materials im Rahmen der Gewebezüchtung relativiert stets und auch hier die Aussagen der ermittelten Ergebnisse.

Zudem zeigt die Membranprozessierung – in unserem Fall Kryokonservierung – je nach Studienergebnis unterschiedliche Einflüsse auf die Membran. Während Wolbank und Kollegen (2009) z.B. deutlich vermindertes Angiogenin, IL-6 und MCP-1 in kryokonservierten Membranen im Gegensatz zu frischen hAM feststellten, konnten Litwiniuk und Grzela (2014) diese Unterschiede nicht festhalten (Litwiniuk & Grzela, 2014; Wolbank et al., 2009). Da die Prozessierung also unklar schädliche Auswirkungen auf die Membranqualität hat, sollte in klinischen Untersuchungen - wenn logistisch möglich - auf frische Amnionmembran zurückgegriffen werden. Dies könnte im besten Fall auch einen einheitlichen Entnahmeort, beispielsweise keine hAM aus der zervikalen Zone, gewährleisten (s.o.).

4.2 In-vivo-Untersuchungen am Rattenmodell

Die experimentelle Arbeit am Rattenmodell gelang im wesentlichen regelhaft. Die Operationen konnten ohne Verwerfen von Membranen oder Revisionen durchgeführt werden. Ebenso kam es zu keinen klinisch sichtbaren Wundinfektionen. Dies bekräftigt nochmal die mögliche chirurgische Umsetzung und Handhabbarkeit der hAM wie sie bereits von verschiedenen Autoren postuliert wird (Loeffelbein et al., 2012). Ein möglicher Störfaktor war aber die Verbandabnahme: Die angesetzten zehn Tage stellten hinsichtlich der weiteren Dokumentationen eine regelmäßige und auch für die Ratten nicht zu häufige, da belastende, Wundkontrolle sicher. In Hinblick auf die Verbandabnahme war dieser Zeitraum jedoch vermutlich zu lang. Gelegentlich zeigten sich trotz der verwendeten Fettgaze Adhäsionen zwischen Wundbereich und Überknüpfverband, welche trotz vorsichtigem Vorgehen regelmäßig zu traumatischen Wundverletzungen führte. Selten zeigte sich dabei auch eine fragliche Struktur am Überknüpfverband, die Teile der Amnionmembran darstellen könnte (Abb. 15). Andere Forschungsgruppen beschreiben die Möglichkeit der Abnahme des Überknüpfverbands nach bereits sieben Tagen (Hoffmann et al., 2012). Dies könnte Vorteile bringen, da durch die fehlende optische Kontrolle ebenfalls der in der sekundären Wundheilung wichtige Zeitraum der ersten zehn Tage nicht dokumentiert werden konnte. Es bleibt somit fraglich wie sich die mechanisch insgesamt nur bedingt stabile Membran unter dem Verband verhalten hat; Auch sollte bedacht werden, dass die Hautspannung bei Ratten insgesamt geringer ist als beim Menschen und damit die Membran weniger mechanischem Zug ausgesetzt war (Corps, 1969). Dies ist mit Berücksichtigung des Einwandes

verschiedener Autoren zur Unbrauchbarkeit der hAM in der Wunddeckung bei fehlender mechanischer Stabilität besonders wichtig (Murphy et al., 2017). Dieser Einwand ist aus unserer Sicht nicht für die gesamte hAM gültig, sondern stark von interindividuellen Abweichungen, vom Ort der hAM-Entnahme und der Art der Aufbereitung abhängig.



Abbildung 17: Verbandabnahme mit Wundöffnung. Dargestellt ist beispielhaft eine Verbandabnahme, aus welcher die Freilegung der offenen Wundfläche folgte (**Sternchen**). Fraglich war am Überknüpfverband haftend die Membran zu sehen (**Pfeil**), welche folglich nicht mehr flächig der Wunde auflag.

Verschiedene Ansätze könnten den Störfaktor der traumatischen Verbandentfernung vermindern: Bei Verwendung des Überknüpfverbandes könnte die Tragezeit verkürzt werden und es könnten weitere antiadhäsive Mittel zusätzlich zur Fettgaze zum Einsatz kommen. Ein Verzicht des Verbandes sollte nicht erfolgen, da der kontinuierlich ausgeübte Druck wichtig zur Verhinderung eines submembranösen Hämatoms mit Abhebung der hAM vom Wundgrund ist. Eine mögliche Aufhebung der Adhärenz zwischen Membranen und Wundgrund, z.B. durch ein submembranöses Hämatom, wird von anderen Autoren als Ursache für fehlende Vorteile der Membran gegenüber Negativkontrollen herangezogen (Maral et al., 1999). Auch die Verhinderung von Wundinfekten konnte vermutlich durch den Verband begünstigt werden.

Im Rahmen der Wundkontraktion hätte eine durch die hAM begünstigte sekundäre Wundheilung mit geringerer Kontraktion als in der Kontrollgruppe erwartet werden können. Dies stellte sich letztlich in den Daten nicht dar (Tab. 4). Im Gegenteil zeigten die deepithelialisierten und nicht rebesiedelten hAM die stärkste Wundkontraktion. Die Ursache für diese statistische Abweichung bleibt insgesamt unklar. Da die Wundkontraktion durch aktivierte Myofibroblasten ausgelöst wird und diese durch einerseits mechanische Faktoren und andererseits eine vermehrte Freisetzung von TGF-beta stimuliert werden, sind vermutlich komplexe interzelluläre Interaktionen dafür verantwortlich (Fritsch, 2004). Auch mögliche Störfaktoren könnten eine Rolle gespielt haben: Dazu gehört zum einen der bereits angesprochene Überknüpfverband, der die Membranen beschädigt und den Wundheilungserfolg der ersten Tage durch eine traumatische Entfernung wieder neutralisiert haben könnte. Es ist insbesondere bei Ratten bekannt, dass Verbände dieser Art die Narbenmorphologie verändern können und damit auch das Kontraktionsausmaß (Corps, 1969). Zum anderen nahmen einige Ratten noch deutlich (>100g) an Gewicht zu, ein Umstand der die vorhandenen Hautspannungen und damit die Kontraktion beeinflusst haben könnte. Zuletzt muss auch die Messung der Kontraktion anhand der vier ermittelten Werte hinterfragt werden. Einfacher und genauer wäre vermutlich die Ausmessung der Fläche per Bildverarbeitungsprogramm.

Der zeitliche Verlauf der Kontraktion zeigte ebenfalls keine Auffälligkeiten. Abgesehen von der ohnehin stärker kontrahierenden deepithelialisierten hAM-Gruppe konnte weder eine anfänglich schnellere noch langsamere Kontraktion zwischen den übrigen Gruppen festgestellt werden (Tab. 4 und Abb. 14). Dies hätte dafür gesprochen, dass die während der Proliferations- und Granulationsphase gebildeten Myofibroblasten vermehrt oder vermindert aktiv waren, beispielsweise im Rahmen einer verminderten Entzündungsreaktion in der Exsudationsphase durch die antiinflammatorisch wirksamen Bestandteile der hAM (Hoffmann et al., 2012). Eine beschleunigte Reepithelialisierung wurde in unserem Versuchsaufbau methodisch nicht erfasst. Diese hätte sich weniger durch eine veränderte Kontraktionsgeschwindigkeit oder ein abweichendes Kontraktionsausmaß manifestiert als vielmehr durch einen früheren Wundverschluss. In Folgeversuchen sollte man die Wundkontrollen wie oben erwähnt per Bildbearbeitungsprogramm ausmessen und weiterhin die Wundflächen bei jeder Wundkontrolle mitbestimmen. Außerdem können verwendete Materialien wie die Zellkulturen und auch die hAM bioorthogonal markiert werden, um in den endgültigen Biopsien zu erfassen, ob diese Strukturen inkludiert oder degradiert und substituiert

wurden (Wei et al., 2016). So könnten neue Kausalketten in der Wundheilung mit hAM-Hautersatz erschlossen und passende Modifikationen der hAM in Folgeversuchen angegangen werden.

Die Vancouver Scar Scale stellt eine klinisch etablierte Skala dar, die ohne Mitarbeit vom Probanden – hier Ratten – erhoben werden kann. Andere, teils mit höherer Evidenz ausgestattete Skalen wie der Patient and Observer Scar Assessment Scale (POSAS), welche auf Patientenbefragung ausgelegt sind, kamen nicht in Frage. In unseren Messungen zeigten sich bzgl. der Vancouver Scar Scale zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Tab. 5). Dies würde gegen die Vermutung sprechen, dass die wundheilungsfördernden Faktoren der hAM einen signifikanten Effekt auf die Narbenmorphologie haben (Jiang et al., 2007; Meinert et al., 2001). Es muss jedoch erwähnt werden, dass aufgrund geringer Testgüte die Einordnung in vorhandene Scores von verschiedenen Autoren insgesamt als kritisch angesehen wird (Tyack et al., 2012).

Die histologischen Auswertungen ergaben in den H/E-Färbungen keine sichtbaren Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen: Es konnten qualitativ keine zunehmende Vaskularisierung der Dermis, eine andersartige Matrixstruktur oder morphologische Unterschiede in der Epidermis erhoben werden. Dies weist trotz der postulierten Eigenschaften eher auf einen geringen Einfluss der Amnionmembran auf die endgültige Histologie der Narbe hin. In der immunhistochemischen Laminin-Färbung zeigten sich in der Kontrollgruppe wie auch durch Yang beschrieben durchgängig fehlende Basalmembranen bzw. alterierende Strukturen ohne Laminin (Yang et al., 2016). Andere Forschungsgruppen konnten Laminin in Vollhautdefekten ohne Hautersatz nachweisen, jedoch im Wundheilungsverlauf später als in mit hAM versorgten Wunden (Loeffelbein et al., 2012). Entsprechend lässt sich eine spätere, zum Biopsiezeitpunkt noch nicht stattgefundenene, Lamininbildung in der Kontrollgruppe nicht ausschließen. In den Versuchsgruppen, welche mit Amnionmembranen versorgt wurden, konnte in jedem Fall durchgängig Laminin als Zeichen der Basalmembran nachgewiesen werden (Abb. 16). Dies spricht am ehesten für eine Inkorporierung der Basalmembran aus der implantierten hAM in die Narbenstruktur oder für eine Stimulation der Synthese einer Basalmembran im Rahmen einer akzelerierten Wundheilung. Dies deckt sich ebenfalls mit den Beobachtungen anderer Autoren (Loeffelbein et al., 2012). Die Forschungsgruppe um Yang (2016) vermutet alterierende Strukturen in Basalmembranen oder gar ein Fehlen dieser mit Folge überschießender Wachstumssignale an Fibroblasten und Keratinozyten

in der Cutis als Ursache für pathologische Narben wie beispielsweise Keloide (Yang et al., 2016). Auch wenn die Struktur der bei uns nachgewiesenen Basalmembran durch unsere Methodik nicht weiter differenziert wurde, ist es gut denkbar, dass die vorhandenen Basalmembranen somit einen inhibitorischen Effekt auf die Ausbildung pathologischer Narben haben; Kausal am ehesten durch regelhafte Expression von Wachstumsfaktoren und folglich regelrechte Stimulation angrenzender Zellen. Eine geringere Ausbildung hypertropher Narben wurde in der Verwendung von hAM als Wundauflage bei Spalthautdefekten von anderen Autoren bereits beobachtet, was einen entsprechenden Effekt wahrscheinlich macht (Loeffelbein et al., 2014). Folgeuntersuchungen in für pathologische Narben prädestinierten Risikogruppen sollten durchgeführt werden, um einen möglichen Effekt durch die Verwendung einer hAM als Wunddeckung zu quantifizieren.

5 Fazit

Die Vorteile der Verwendung von einlagiger humaner Amnionmembranen – auch rebesiedelt mit autologen Zellen - als Hautersatz bleiben fraglich: Günstige Charakteristika wie entzündungshemmende und wenig immunogene Eigenschaften stehen im Gegensatz zu geringer mechanischer Stabilität und hohen strukturellen Schwankungen. Besonders letzterer Punkt macht auch eine klinische Anwendung im Moment schwierig. Verschiedene standardisierte nicht-invasive Maßnahmen wie die OCT könnten in Zukunft aber helfen ungeeignete Membranen oder Membranabschnitte vor weiterer Verwendung auszuschließen.

Grundsätzlich zeigte sich die Herstellung eines Hautersatzes aus Amnionmembran im Air-Liquid-Modell machbar, auch wenn keine flächige Orthokeratinisierung erreicht werden konnte. Im Rattenmodell zeigten sich hinsichtlich Wundkontraktion und Narbenqualität keine signifikanten Vorteile von verschiedenen präparierten Membranen gegenüber einer einfachen Kontrolle. Dabei stellte sich jedoch besonders die Adhärenz der Wundauflage als wichtiger Störfaktor dar, eine abschließende Aussage hinsichtlich Wundheilungsverlauf kann somit nur unter Vorbehalt gestellt werden. In der Histologie zeigte sich in der Narbe der mit hAM versorgten Ratten als Auffälligkeit eine ausgeprägte Basalmembran, die sich in den Negativ-Kontrollen erwartungsgemäß nicht finden ließ.

Wenngleich sich hieraus keine Vorteile für den Wundverschluss oder das Narbenergebnis ergaben, liefert dieses Ergebnis einen interessanten Ansatz für Folgeuntersuchungen in Hinblick auf Verhinderung von pathologischen Narben, bei denen aberrante oder fehlende Basalmembranen als Ursache vermutet werden.

Literaturverzeichnis

- Ahn, K. M., Lee, J. H., Hwang, S. J., Choung, P. H., Kim, M. J., Park, H. J., Park, J. K., Jahng, J., Yang, E. K. (2006). Fabrication of myomucosal flap using tissue-engineered bioartificial mucosa constructed with oral keratinocytes cultured on amniotic membrane. *Artif Organs*, 30(6), 411-423. doi:10.1111/j.1525-1594.2006.00236.x
- Baraki, H., Tudorache, I., Braun, M., Hoffler, K., Gorler, A., Lichtenberg, A., Bara, C., Calistru, A., Brandes, G., Hewicker-Trautwein, M., Hilfiker, A., Haverich, A., Cebotari, S. (2009). Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model. *Biomaterials*, 30(31), 6240-6246. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.068
- Bonci, P. O., Bonci, P. A., & Lia, A. (2005). Suspension made with amniotic membrane: Clinical trial. *Eur J Ophthalmol*, 15(4), 441-445. doi:10.5301/EJO.2008.2218
- Bourne, G. L. (1966). The anatomy of the human amnion and chorion. *Proc R Soc Med*, 59(11 Part 1), 1127-1128.
- Boyce, S. T., & Ham, R. G. (1983). Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol*, 81(1 Suppl), 33s-40s.
- Bryant-Greenwood, G. D. (1998). The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta*, 19(1), 1-11.
- Cardiff, R. D., Miller, C. H., & Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014(6), 655-658. doi:10.1101/pdb.prot073411
- Corps, B. V. (1969). Wound contracture in the hooded rat in relation to skin tension lines and depth of injury. *Br J Plast Surg*, 22(1), 44-47.
- Ejiri, H., Nomura, T., Hasegawa, M., Tatsumi, C., Imai, M., Sakakibara, S., & Terashi, H. (2015). Use of synthetic serum-free medium for culture of human dermal fibroblasts to establish an experimental system similar to living dermis. *Cytotechnology*, 67(3), 507-514. doi:10.1007/s10616-014-9709-0
- Fetterolf, D. E., & Snyder, R. J. (2012). Scientific and clinical support for the use of dehydrated amniotic membrane in wound management. *Wounds*, 24(10), 299-307.
- Figueiredo, G. S., Bojic, S., Rooney, P., Wilshaw, S. P., Connon, C. J., Gouveia, R. M., Figueiredo, F., Lako, M. (2017). Gamma-irradiated human amniotic membrane decellularised with sodium dodecyl sulfate is a more efficient substrate for the ex vivo expansion of limbal stem cells. *Acta Biomater*, 61, 124-133. doi:10.1016/j.actbio.2017.07.041
- Fritsch, P. O. (2004). *Dermatologie Venerologie* (2 ed.). Heidelberg: Springer-Verlag.

- Fujimoto, J. G. (2003). Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging. *Nat Biotechnol*, 21(11), 1361-1367. doi:10.1038/nbt892
- Gilbert, T. W. (2012). Strategies for tissue and organ decellularization. *J Cell Biochem*, 113(7), 2217-2222. doi:10.1002/jcb.24130
- Hoffmann, T. K., Arnolds, J., Schuler, P. J., Kultas, E., Greve, J., Mansour, N., Bas, M., Lang, S., Hilpert, A. (2012). [Secondary wound healing. Effective treatment concept after basal cell carcinoma resection in the central midface]. *HNO*, 60(7), 605-610. doi:10.1007/s00106-011-2473-y
- Jiang, D., Liang, J., & Noble, P. W. (2007). Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 435-461. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337
- Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., & Lawley, T. J. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol*, 107(4), 1589-1598.
- LeBleu, V. S., Macdonald, B., & Kalluri, R. (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)*, 232(9), 1121-1129. doi:10.3181/0703-MR-72
- Lin, H., Li, H., Cho, H. J., Bian, S., Roh, H. J., Lee, M. K., Kim, J. S., Chung, S. J., Shim, C. K., Kim, D. D. (2007). Air-liquid interface (ALI) culture of human bronchial epithelial cell monolayers as an in vitro model for airway drug transport studies. *J Pharm Sci*, 96(2), 341-350. doi:10.1002/jps.20803
- Litwiniuk, M., & Grzela, T. (2014). Amniotic membrane: new concepts for an old dressing. *Wound Repair Regen*, 22(4), 451-456. doi:10.1111/wrr.12188
- Loeffelbein, D. J., Baumann, C., Stoeckelhuber, M., Hasler, R., Mucke, T., Steinstrasser, L., Drecolle, E., Wolff, K. D., Kesting, M. R. (2012). 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), 1245-1256. doi:10.1002/jbm.b.32689
- Loeffelbein, D. J., Rohleder, N. H., Eddicks, M., Baumann, C. M., Stoeckelhuber, M., Wolff, K. D., Drecolle, E., Steinstraesser, L., Hennerbichler, S., Kesting, M. R. (2014). Evaluation of human amniotic membrane as a wound dressing for split-thickness skin-graft donor sites. *Biomed Res Int*, 2014, 572183. doi:10.1155/2014/572183
- MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445(7130), 874-880. doi:10.1038/nature05664
- Maral, T., Borman, H., Arslan, H., Demirhan, B., Akinbingol, G., & Haberal, M. (1999). Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns*, 25(7), 625-635.
- Marcus, A. J., Coyne, T. M., Rauch, J., Woodbury, D., & Black, I. B. (2008). Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic

membrane. *Differentiation*, 76(2), 130-144. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00194.x

- Mariappan, I., Maddileti, S., Savy, S., Tiwari, S., Gaddipati, S., Fatima, A., Sangwan, V. S., Balasubramanian, D., Vemuganti, G. K. (2010). In vitro culture and expansion of human limbal epithelial cells. *Nat Protoc*, 5(8), 1470-1479. doi:10.1038/nprot.2010.115
- Meinert, M., Eriksen, G. V., Petersen, A. C., Helmig, R. B., Laurent, C., Uldbjerg, N., & Malmstrom, A. (2001). Proteoglycans and hyaluronan in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 184(4), 679-685. doi:10.1067/mob.2001.110294
- Molsted, K. (1999). Treatment outcome in cleft lip and palate: issues and perspectives. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10(2), 225-239.
- Moore, P., Moore, M., Blakeney, P., Meyer, W., Murphy, L., & Herndon, D. (1996). Competence and physical impairment of pediatric survivors of burns of more than 80% total body surface area. *J Burn Care Rehabil*, 17(6 Pt 1), 547-551.
- Muller, L., Brighton, L. E., Carson, J. L., Fischer, W. A., 2nd, & Jaspers, I. (2013). Culturing of human nasal epithelial cells at the air liquid interface. *J Vis Exp*(80). doi:10.3791/50646
- Murphy, S. V., Skardal, A., Song, L., Sutton, K., Haug, R., Mack, D. L., Jackson, J., Soker, S., Atala, A. (2017). Solubilized Amnion Membrane Hyaluronic Acid Hydrogel Accelerates Full-Thickness Wound Healing. *Stem Cells Transl Med*. doi:10.1002/sctm.17-0053
- Nakamura, T., Endo, K., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Tanifuji, N., Tsuzuki, M., Koizumi, N., Inatomi, T., Sano, Y., Kinoshita, S. (2003). The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(1), 106-116.
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., & Seifalian, A. M. (2008). Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 15, 88-99.
- Plummer, C. E., Ollivier, F., Kallberg, M., Brooks, D., Barrie, K., Utter, M., & Gelatt, K. (2009). The use of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: a review and series of 58 equine clinical cases (2002-2008). *Vet Ophthalmol*, 12 Suppl 1, 17-24. doi:10.1111/j.1463-5224.2009.00741.x
- Prasanna, M., Mishra, P., & Thomas, C. (2004). Delayed primary closure of the burn wounds. *Burns*, 30(2), 169-175. doi:10.1016/j.burns.2003.09.028
- Presland, R. B., & Jurevic, R. J. (2002). Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J Dent Educ*, 66(4), 564-574.

- Prunieras, M., Regnier, M., & Woodley, D. (1983). Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol*, 81(1 Suppl), 28s-33s.
- Rassner, G. (2009). *Dermatologie: Lehrbuch und Atlas* (9 ed.). München, Jena: Urban & Fischer.
- Rhee, P. H., Friedman, C. D., Ridge, J. A., & Kusiak, J. (1998). The use of processed allograft dermal matrix for intraoral resurfacing: an alternative to split-thickness skin grafts. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 124(11), 1201-1204.
- Rittie, L., & Fisher, G. J. (2005). Isolation and culture of skin fibroblasts. *Methods Mol Med*, 117, 83-98. doi:10.1385/1-59259-940-0:083
- Rosenberg, A. S., Munitz, T. I., Maniero, T. G., & Singer, A. (1991). Cellular basis of skin allograft rejection across a class I major histocompatibility barrier in mice depleted of CD8+ T cells in vivo. *J Exp Med*, 173(6), 1463-1471.
- Ross, R. B. (1995). Growth of the facial skeleton following the Malek repair for unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*, 32(3), 194-198. doi:10.1597/1545-1569(1995)032<0194:GOTFSF>2.3.CO;2
- Saghizadeh, M., Winkler, M. A., Kramerov, A. A., Hemmati, D. M., Ghiam, C. A., Dimitrijevic, S. D., Sareen, D., Ornelas, L., Ghiasi, H., Brunken, W. J., Maguen, E., Rabinowitz, Y. S., Svendsen, C. N., Jirsova, K., Ljubimov, A. V. (2013). A simple alkaline method for decellularizing human amniotic membrane for cell culture. *PLoS One*, 8(11), e79632. doi:10.1371/journal.pone.0079632
- Schmidt, W., & Klima, G. (1989). [Experimental and histologic studies on fetal membrane tensility and membrane rupture]. *Zentralbl Gynakol*, 111(3), 129-141.
- Shortt, A. J., Secker, G. A., Lomas, R. J., Wilshaw, S. P., Kearney, J. N., Tuft, S. J., & Daniels, J. T. (2009). The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials*, 30(6), 1056-1065. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.048
- Shruthy, R., Sharada, P., Swaminathan, U., & Nagamalini, B. (2013). Immunohistochemical expression of basement membrane laminin in histological grades of oral squamous cell carcinoma: A semiquantitative analysis. *J Oral Maxillofac Pathol*, 17(2), 185-189. doi:10.4103/0973-029X.119755
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, 111, A3 B 1-3. doi:10.1002/0471142735.ima03bs111
- Tanaka, A., Hatoko, M., Tada, H., & Kuwahara, M. (2003). An evaluation of functional improvement following surgical corrections of severe burn scar contracture in the axilla. *Burns*, 29(2), 153-157.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(5), 349-363. doi:10.1038/nrm809

- Tyack, Z., Simons, M., Spinks, A., & Wasiaik, J. (2012). A systematic review of the quality of burn scar rating scales for clinical and research use. *Burns*, 38(1), 6-18. doi:10.1016/j.burns.2011.09.021
- Wang, K. X., Zhang, J. F., Zhan, Q. P., & Jian, X. H. (2005). [Effect of trypsin and Triton-X 100 for decellularization of porcine aortic heart valves]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 25(1), 22-25.
- Wang, Z. J., An, R. Z., Zhao, J. Y., Zhang, Q., Yang, J., Wang, J. B., Wen, G. Y., Yuan, X. H., Qi, X. W., Li, S. J., Ye, X. C. (2014). Repair of articular cartilage defects by tissue-engineered cartilage constructed with adipose-derived stem cells and acellular cartilaginous matrix in rabbits. *Genet Mol Res*, 13(2), 4599-4606. doi:10.4238/2014.June.18.2
- Wei, L., Hu, F., Chen, Z., Shen, Y., Zhang, L., & Min, W. (2016). Live-Cell Bioorthogonal Chemical Imaging: Stimulated Raman Scattering Microscopy of Vibrational Probes. *Acc Chem Res*, 49(8), 1494-1502. doi:10.1021/acs.accounts.6b00210
- Wijdeveld, M. G., Maltha, J. C., Gruppig, E. M., De Jonge, J., & Kuijpers-Jagtman, A. M. (1991). A histological study of tissue response to simulated cleft palate surgery at different ages in beagle dogs. *Arch Oral Biol*, 36(11), 837-843.
- Wolbank, S., Hildner, F., Redl, H., van Griensven, M., Gabriel, C., & Hennerbichler, S. (2009). Impact of human amniotic membrane preparation on release of angiogenic factors. *J Tissue Eng Regen Med*, 3(8), 651-654. doi:10.1002/term.207
- Wood, F. M., & Stoner, M. (1996). Implication of basement membrane development on the underlying scar in partial-thickness burn injury. *Burns*, 22(6), 459-462.
- Xiao-Wu, W., Herndon, D. N., Spies, M., Sanford, A. P., & Wolf, S. E. (2002). Effects of delayed wound excision and grafting in severely burned children. *Arch Surg*, 137(9), 1049-1054.
- Yang, S., Sun, Y., Geng, Z., Ma, K., Sun, X., & Fu, X. (2016). Abnormalities in the basement membrane structure promote basal keratinocytes in the epidermis of hypertrophic scars to adopt a proliferative phenotype. *Int J Mol Med*, 37(5), 1263-1273. doi:10.3892/ijmm.2016.2519
- Zelen, C. M., Serena, T. E., Denoziere, G., & Fetterolf, D. E. (2013). A prospective randomised comparative parallel study of amniotic membrane wound graft in the management of diabetic foot ulcers. *Int Wound J*, 10(5), 502-507. doi:10.1111/iwj.12097
- Zhang, L., Zou, D., Li, S., Wang, J., Qu, Y., Ou, S., Jia, C., Li, J., He, H., Liu, T., Yang, J., Chen, Y., Liu, Z., Li, W. (2016). An Ultra-thin Amniotic Membrane as Carrier in Corneal Epithelium Tissue-Engineering. *Sci Rep*, 6, 21021. doi:10.1038/srep21021

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung
Fakultät für Medizin

der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

In-vitro- und in-vivo-Untersuchungen mit dezellularisierten Amnionmembranen

in der Fakultät für Medizin, Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Klinikum Rechts der Isar

unter der Anleitung und Betreuung durch: Dr. Achim von Bomhard und Prof. Dr. Dr. Wolff ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Ab. 6 und 7 Satz 2 angebotenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Die vollständige Dissertation wurde in _____ veröffentlicht. Die promotionsführende Einrichtung

hat der Veröffentlichung zugestimmt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe bereits am _____ bei der Fakultät für _____
_____ der
Hochschule _____ unter
Vorlage einer Dissertation mit dem Thema _____
_____ die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis: _____

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich

einverstanden, nicht einverstanden.

München, 4.11.19, Samuel John

Ort, Datum, Unterschrift