

**Technische Universität München**  
**Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der**  
**Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar**  
**(Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. K.- D. Wolff)**

Humane Amnionmembran zur Rekonstruktion von oronasalen Fisteln  
- eine tierexperimentelle Machbarkeitsstudie am Minischwein

Mariella Christina Dietzel

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

**Doktors der Zahnheilkunde**

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv-Doz. Dr. M. R. Kesting
2. Univ-Prof. Dr. H.A. Bier

Die Dissertation wurde am 29.04.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin  
am 11.5.2011 angenommen.

Diese Arbeit widme ich  
Alexander Dietzel,  
meiner Schwester Marie-Charlotte und meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>4</b>
2.1 Zielsetzung .....	5
<b>3. Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.....</b>	<b>7</b>
3.1 Ätiologie-Pathogenese .....	7
3.2 Klassifikation von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten .....	8
3.3 Sekundärbehandlung .....	10
3.4 Epidemiologische Daten zum Restlochverschluss .....	11
3.5 Verschluss von oronasalen Fisteln.....	13
3.5.1 Nahlappenplastik.....	14
3.5.2 Gestielte Lappen .....	14
3.5.3 Mikrochirurgischer Gewebetransfer.....	15
3.5.4 Freier Transfer.....	15
3.5.5 Gewebeexpansion und biologische Transplantate .....	15
<b>4. Die Amnionmembran.....</b>	<b>17</b>
4.1 Anatomische und histologische Einordnung .....	17
4.2 Struktur und besondere physiologische Eigenschaften der HAM.....	19
4.2.1 Struktur und Aufbau .....	19
4.2.2 Immunologie .....	20
4.2.3 Antiinflammatorische Eigenschaften.....	20
4.2.4 Beschleunigung der Epithelialisierung .....	21
4.2.5 Wirkung auf die Angiogenese .....	21
4.2.6 Hemmung der Narbenbildung.....	22
4.3 Verwendung von HAM in Medizin und Zahnmedizin.....	22
<b>5. Material und Methode.....</b>	<b>24</b>
5.1 Gewinnung und Präparation der Plazenta .....	24
5.1.1 Gewinnung der Plazenta .....	24
5.1.2 Präparation der humanen Amnionmembran.....	24
5.1.3 Herstellung des Konservierungsmediums .....	26

5.2 Kryokonservierung der Amnionmembran .....	26
5.3 Tiermodell.....	26
5.4 Operationsdurchführung .....	27
5.4.1 Erstellen eines künstlichen Gaumendefekts .....	27
5.4.2 Deckung des Gaumendefekts .....	30
5.4.3 Zuordnung der Deckungsmaterialien.....	33
5.4.4 Klinische Wundkontrollen .....	33
5.5 Finalisierung und histologische Probeentnahmen .....	33
5.6 Immunhistologie .....	34
5.7 Statistische Auswertung .....	35
<b>6. Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
6.1 Klinische Analyse .....	37
6.1.1 Critical-Size Defects .....	37
6.1.2 Klinische Beurteilung der mit HAM gedeckten Defekte.....	38
6.1.3 Klinische Beurteilung der mit Integra® gedeckten Defekte.....	41
6.1.4 Statistische Beurteilung.....	42
6.2 Histologische Beurteilung .....	43
6.3 Immunhistologische Beurteilung.....	44
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>45</b>
7.1 Diskussion des Tiermodells.....	46
7.2 Diskussion des sekundären Gaumenspaltverschluss .....	57
7.3 Diskussion der verwendeten Biomaterialien.....	51
<b>8. Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>9. Summary.....</b>	<b>56</b>
<b>10. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>57</b>
<b>11. Lebenslauf.....</b>	<b>77</b>
<b>12. Danksagung.....</b>	<b>79</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

1. *HAM* = humane Amnionmembran
2. *Staph. Aureus* = Staphylococcus aureus
3. *M. buccinator* = Musculus buccinator
4. *p.m.* = postmenstruell
5. *p.o.* = postoperativ
6. *POD* = postoperative day
7. *HLA-G* = human leucocyte Antigen-G
8. *PMN* = polymorphic neutrophils = neutrophile Granulozyten
9. *RT-PCR* = Realtime - Polymerase Chain Reaction
10. *m-RNA* = messenger RNA
11. *TNF-alpha* = Tumor necrosis factor-alpha
12. *EGF* = Epidermal growth factor
13. *TGF-alpha* = Transforming growth factor-alpha
14. *KGF* = Keratinocyte growth factor
15. *HGF* = Hepatocyte growth factor
16. *bFGF* = Basic fibroblast growth factor
17. *PEDF* = Pigment epithelium-derived factor
18. *FGF* = Fibroblast growth factor
19. *M.-Pectoralis-Lappen* = Musculus-Pectoralis-Lappen
20. *DMEM* = Dulbeccos modified Eagle medium
21. *PBS* = Phosphate Buffered Saline - Lösung
22. *HE-Färbung* = Haematoxylin-Eosin
23. *EvG-Färbung* = Elastica-van Gieson-Färbung
24. *SD* = standard deviation = Standardabweichung
25. *β-HCG* = beta human chorionic gonadotropin

## 2. Einleitung

Die Entstehung einer oronasalen Fistel („Restloch“) stellt eine weitverbreitete Komplikation beim operativen Verschluss von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten dar. „Restlöcher“ treten in 8,7 bis 34 Prozent aller Fälle auf (*Abyholm et al., 1979, S.296; Schultz et al., 1986, S.739; Posnik und Getz, 1987, S.907; Amaratunga et al., 1988, S.835; Cohen et al., 1991, S.1043; Emory et al., 1997, S.1536; Muzzafar et al., 2001, S.1516*). Dies beruht vor allem auf dem vorliegenden Gewebedefizit und der unvermeidlichen postoperativen Narbenbildung (*Kirschner et al., 2006, S.1439*). Die Patienten werden durch die Verbindung von Mund- und Nasenhöhle meist funktionell beeinträchtigt. Symptome wie Hypernasalität, Einpressen von Speiseresten in den Fistelgang sowie Flüssigkeitsfluss in die Nase (*Abyholm et al., 1979, S.296; Schultz et al., 1986, S.741; Amaratunga et al., 1988, S.836; Diah et al., 2000, S.531*), Entzündung der Schleimhäute sowie Sprachprobleme (*Abyholm et al., 1979, S.296*) und Hörverlust (*Schultz, 1986, S.741*) wurden berichtet. Daraus ergibt sich eine notwendige Indikation zum vollständigen oronasalen Fistelverschluss (*Schultz, 1989, S.65*). Trotz einer Fülle an Behandlungsvarianten, die im Weiteren näher beschrieben werden sollen, kommt es zu einer hohen Rate von persistierenden Fisteln, die erneute rekonstruktive Eingriffe erfordern. Der operative Verschluss ist schwierig, da das umgebende Gewebe nach Erstverschluss meist stark vernarbt ist (*Honnerbier et al., 2000, S.128*). Mit jedem weiteren Versuch einer Gaumenplastik verschlechtert sich die Prognose eines erfolgreichen Fistelverschlusses (*Cole et al., 2006; S.636*). Viele Techniken zum Verschluss von oronasalen Fisteln führen außerdem zu einer erheblichen Morbidität der Entnahmestelle (*Kirschner et al., 2006, S.1439*). Auf der Suche nach idealem Transplantatgewebe gewinnt die Verwendung von biologischen Ersatzmaterialien und gezüchtetem Gewebe immer mehr an Bedeutung. Bisher sind nur wenige Arbeiten, die derartige Materialien einsetzen, publiziert worden (*Kirschner et al., 2006, S.1439*).

Humane HAM wird als Gewebe zur Unterstützung der Wundheilung eingesetzt, da sie sich durch folgende Eigenschaften auszeichnet:

- eine geringe Immunogenität (*Kubo et al., 2000, S.1539; Kesting et al., 2007, S.357*)
- eine entzündungshemmende Wirkung (*Shimmura et al., 2001, S.412*)
- eine Hemmung der Narbenbildung (*Wang et al., 2001, S.310*) und

- die Beschleunigung der Wundepithelialisierung (*Koizumi et al., 2000, S.173*). Aufgrund der potentiellen Infektionsgefahr frischer Amnionmembran, schränkte sich jedoch der Einsatz von HAM Ende des vergangenen Jahrhunderts stark ein. Erst nach Etablierung eines Konservierungsverfahrens für HAM und der damit verbundenen wiederholten Spenderkontrolle fand HAM vor allem in der Augenheilkunde seit 1995 ein weites Anwendungsspektrum (*John et al., 2002, S.44; Sangwan et al., 2007, S.251*). Die ersten Erfahrungen zur intraoralen Anwendung von HAM wurden von *Kothary et al.* im Jahre 1969 publiziert. Diese Arbeitsgruppe nutzte HAM zur Rekonstruktion der Mundhöhle nach Glossektomie (*Kothary et al., 1969, S.87*). *Lawson* versuchte 1985 (S.166) zur Wiederherstellung der orofazialen Textur M.-Pectoralis-Lappen zu verwenden, die mit HAM beschichtet worden waren. Die ermutigenden Ergebnisse führten zu einer fortgesetzten, wenn auch seltenen, Verwendung von HAM in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. In einem Fall von Epidermolysis bullosa im Gesichtsbereich wurde die Auflage von HAM auf die ulzerierten Oberflächen beschrieben (*Kaluza et al., 1985, S.599*). Bei fünf Patienten mit wiederkehrender Epistaxis aufgrund einer Rendu-Osler-Weber-Erkrankung wurden HAM -Transplantate in die Nasenhöhle zur Blutstillung eingebracht (*Zohar et al., 1987, S.979*). Weitere Erfahrungen mit der orofazialen Anwendung von HAM wurden durch *Güler et al., 1997 (S.283)* und *Samandari et al., 2004 (S.577)* veröffentlicht. Beide Gruppen nutzten HAM als Transplantat für die Vestibulumplastik. *Gomes et al.* untersuchten HAM als Membran für die "guided bone regeneration" (*Gomes et al., 2001, S.563*). Des Weiteren wurden präfabrizierte HAM-Faszienlappen zur Rekonstruktion intraoraler Defekte der Ratte beschrieben (*Kesting et al., 2007, S.359*) und die Heilung iatrogenen gingivaler Defekte bei Kaninchen nach Transplantation von HAM untersucht (*Rinastiti et al., 2006, S.247*).

## 2.1. Zielsetzung

Ziel dieser Studie war es, kryokonservierte HAM als Transplantatmaterial für den Verschluss von oronasalen Fisteln im Minipigmodell zu etablieren. Dazu wurde zunächst eine prospektive Pilotstudie an Minischweinen durchgeführt. An den Tieren wurde dabei zunächst eine iatrogene oronasale Fistel kreiert, die in der Folge mit HAM und Kontrollmaterialien rekonstruiert wurde.

Dabei sind folgende Fragen von Interesse:

- Persistieren die Fisteln nach Verschluss mit kryokonservierter, mehrschichtiger humaner Amnionmembran?
- Führt die Transplantation von HAM zu Entzündungsreaktionen und /oder Wundheilungsstörungen?
- Kann nach Verschluss der oronasalen Verbindung mit HAM histologisch und immunhistochemisch eine vollständige Reepithelialisierung und Revaskularisation des Gewebes nachgewiesen werden?

### 3. Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

#### 3.1. Ätiologie und Pathogenese

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten gehören zu den kraniofazialen Dysplasien (Horch, 1998, S.3). Sie gehören zu den häufigsten Fehlbildungen im Kiefer-Gesichtsbereich (Lenzen und Bull, 2003, S. 399). Weltweit bestehen offensichtlich Unterschiede in der Inzidenz (Ehrenfeld, 2002, S.195). Nonsyndromatische Lippen-Kiefer-Gaumenspalten treten in 1 von 500 Fällen auf (Lenzen und Bull, 2003, S.399). Im Vergleich zur weißen Population zeigen sich Spalten am häufigsten bei Indianern. Die geringste Inzidenz ist bei Afroamerikanern nachzuweisen (Croen et al., 1998, S.43). Die Entwicklung der Mundhöhle und des Gaumens vollzieht sich von der 5.-12. Embryonalwoche (Ehrenfeld, 2002, S.195). Das Zwischenkiefersegment, Philtrum und primärer Gaumen, entstehen aus beiden medialen Nasenwülsten. Störungen der normalen Entwicklung zu diesem Zeitpunkt resultieren in Spalten des primären Gaumens und der Lippen (Bajaj et al., 2003, S.840). Der größere Anteil des Gaumens entwickelt sich aus den paarigen Oberkieferwülsten, die in der siebten embryonalen Woche miteinander verschmelzen. Dieser Prozess beginnt am Foramen incisivum und schreitet nach dorsal fort (Horch, 1998, S.5). Auch der weiche Gaumen entsteht in dieser Entwicklungsphase (Bajaj et al., 2003, S.840). Das Nasenseptum vereinigt sich kranial mit dem neugebildeten Gaumendach. Bei Störung dieses Ablaufes bilden sich Gaumenspalten. Diese sind immer nach dorsal offen (Horch, 1998, S.5). Die Lippen-Kieferspalten entstehen in der fünften bis sechsten Embryonalwoche, Gaumenspalten in der zehnten bis zwölften Embryonalwoche (Lenzen und Bull, 2003, S.399). Frequenz und Variantenreichtum sind morphogenetisch auf Unstimmigkeiten der Kopforganisation zurückzuführen. Alle Typen von der Mikrospalte bis zur Totalspalte entstehen lateral an der Grenze der Wirkungsbereiche von Vorderkopf- und Hinterkopforganisator. Dies ist einer Zone, die entwicklungsmechanisch durch eine erhöhte Störanfälligkeit charakterisiert ist (Pfeifer, 1966, S.248). Man unterscheidet die primäre und die sekundäre Spalte. Die primäre Spalte ist dadurch gekennzeichnet, dass die Epithelien der Gesichtshälften nicht miteinander verschmelzen, so dass eine größere Spalte daraus resultiert (Lenzen und Bull, 2003, S.399). Bei der sekundären Spalte verschmelzen zwar zunächst die Epithelien, diese werden aber nicht aufgelöst und bindegewebig durchbaut. Im Rahmen der weiteren Gesichtsentwicklung reißt die Epithelbrücke

wieder ein, so dass eine sekundäre Spaltbildung entsteht. Diese ist durch eine geringere Spaltbreite gekennzeichnet (*Lenzen und Bull, 2003, S.399*). Die Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten ist uneinheitlich und nach wie vor nicht geklärt (*Neumann, 1989, S.155*). Heutzutage nimmt man an, dass Lippen-Kiefer-Gaumenspalten multifaktoriell durch Zusammenwirken von endogenen und exogenen Faktoren entstehen (*Ehrenfeld, 2002, S.197*). Am wahrscheinlichsten ist, dass eine polygene Vererbung mit Schwellenwertfaktor vorliegt (*Neumann, 1989, S.155*). Hierbei muss eine genetische Information vorhanden sein auf die sich ein Schwellenwert aufpfropft, der dann die phänotypische nachweisbare Missbildung auslöst (*Gabka, 1988, S.50*). Verschiedene Noxen werden in der Literatur als mögliche Schwellenwerte besprochen:

- innere Faktoren, zum Beispiel hohes Entbindungsalter, Zwillingsschwangerschaften, hormonelle Störungen mit gewohnheitsmäßigen Fehlgeburten, Eierstockveränderungen und pathologische Zustände des Uterus
- äußere Faktoren, zum Beispiel Sauerstoffmangel, Infektionskrankheiten, Mangelernährung und psychische Traumata (*Gabka, 1988, S.53*).

Sowohl die Einnahme von Medikamenten, Kontaktaufnahme mit chemischen Agenzien und auch der Einfluss von ionisierenden Strahlen gehören zu den möglichen exogenen Ursachen (*Lenzen und Bull, 2003, S.399*). All diese Faktoren vermindern vermutlich die Sauerstoffversorgung (*Lenzen und Bull, 2003, S.399*). Präventionsmaßnahmen zielen darauf ab, das Sauerstoffangebot zu verbessern und den Stoffwechsel zu optimieren. Des Weiteren wurden bestimmte Medikamente wie Vitamine und Folsäure als Präventionsmaßnahme vorgeschlagen (*Neumann, 1989, S.157*).

### 3.2. Klassifikationen von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

Eine der ersten Klassifikationen der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten wurde von *Davis und Ritchie* 1922 genannt (*Koch et al., 2003, S.339*). Sie orientierte sich an den morphologischen Aspekten und wurde deshalb auch später als die „anatomische“ Nomenklatur bekannt. Lippen-Kiefer-Gaumenspalten wurden in präalveoläre, postalveoläre und alveoläre Spalten eingeteilt, wobei der Processus alveolaris die anatomische Trennmarke zwischen Lippen- und Gaumenspalten bildete (*Koch et al., 2003, S.339*).

Ein Jahrzehnt später wurde eine neue Gliederung vorgestellt. *Koch et al.* beschreiben in einer Übersichtsarbeit diese Einteilung, die auf *Veau 1931* zurückgeht. Dieser nahm eine Unterteilung der LKG-Spalten in 4 Formen vor:

- I) Spalten des weichen Gaumens
- II) Spalten des harten Gaumens
- III) durchgehende Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, einseitig
- IV) durchgehende Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, beidseitig (*Koch et al., 2003, S.340*).

Auf dem 4. Kongress der Internationalen Gesellschaft für Plastische- und Wiederherstellungschirurgie in Rom im Jahr 1967 wurde ein Einteilungsprinzip festgelegt, das noch heute Gültigkeit besitzt:

#### Gruppe 1

Spaltformen des vorderen (primären) embryonalen Gaumens

- Lippe rechts und/oder links
- Kiefer rechts und/oder links

#### Gruppe 2

Spaltformen des vorderen und hinteren (primären und sekundären) embryonalen Gaumens

- Lippe rechts und/oder links
- Kiefer rechts und/oder links
- harter Gaumen rechts und/oder links
- weicher Gaumen median

#### Gruppe 3

Spaltformen des hinteren (sekundären) embryonalen Gaumens

- harter Gaumen rechts und/oder links
- weicher Gaumen median

#### Gruppe 4

Seltene Gesichtsspalten

- mediane Spalten mit oder ohne Hypoplasie (Aplasie) der Praemaxilla
- schräge Gesichtsspalte (oroorbital)
- quere Gesichtsspalte (oroaurikulär)
- Spalten der Unterlippe, der Nase oder andere seltene Spalten (*Horch, 1998, S.18*)

Diese Klassifikation ist heute Grundlage der meisten wissenschaftlichen Vergleiche und der Auswertung großer Patientenkollektive.

Ein weiteres Dokumentationsverfahren ist das **LAHSHAL**-System. Die Buchstaben stehen für die einzelnen betroffenen Regionen. L bedeutet „lip“, A entspricht „alveolus“, H steht für „hard palate“ und S für „soft palate“. Abhängig von der Seitenverteilung der Spalte werden die Buchstaben rechts oder links von der Mittellinie, dem medianen S, geschrieben. Auf diese Weise können unilaterale und bilaterale Formen festgehalten werden. Die Abkürzung wird wie ein Röntgenbild gelesen; die rechte Seite des Patienten ist auf der linken Seite der Formel und die linke auf der rechten Seite. Durch die Kombination der Buchstaben an den für sie festgelegten Lokalisationen ist es auch möglich, mit geringem Aufwand sehr seltene Spaltkonfigurationen eindeutig zu beschreiben (*Koch et al., 2003, S.341*). Das Verfahren wird häufig für statistische Erhebungen eingesetzt.

### 3.3. Sekundärtherapie-Restlochproblematik

Nach Abschluss der Primärbehandlung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten können in funktioneller und ästhetischer Hinsicht Defekte verbleiben. Diese werden durch Sekundäroperationen korrigiert. Die Folgezustände können wie folgt zusammengefasst werden:

- Funktionelle Beeinträchtigungen im Bereich des Gaumens
- Ästhetische und funktionelle Beeinträchtigungen im Bereich der Lippe
- Ästhetische und funktionelle Beeinträchtigungen im Bereich der Nase
- Funktionelle Beeinträchtigung im Bereich des Kiefers
- Störungen der Kieferlagebeziehungen
- Funktionelle Störungen im Bereich des Mittelohrs (*Ehrenfeld, 2002, S.221-228*).

Im Bereich des Gaumens führt das Verbleiben von oronasalen Fisteln zu funktionellen Störungen. Derartige „Restlöcher“ entstehen nach primärer chirurgischer Rekonstruktion von Gaumenspalten. Sie stellen sich als persistierende, mit Epithel ausgekleidete Verbindungen zwischen Mund- und Nasenhöhle dar. Das Ausmaß einer oronasalen Fistel kann unterschiedlich sein. In der Literatur wurden verschiedene Ursachen für die Entstehung beschrieben. So werden Wundspannungen, Wundinfektion, mechanisches Trauma (*Posnik et al., 1987,*

S.908) oder die Bildung eines Hämatoms (*Honnerbier et al., 2000, S.127; Posnik et al., 1987, S.908*) genannt. Nach Bildung einer Gaumenfistel wurden verschiedene Symptome beobachtet. Eine Flüssigkeitspassage vom Mund in die Nase ist möglich (*Schultz, 1986, S.741; Amaratunga, 1988, S.836*), Nahrungsbestandteile können in die Nasenhaupthöhle gepresst werden (*Amaratunga, 1988, S.836*), eine Schwerhörigkeit kann entstehen (*Schultz, 1986, S.741*). Zusätzlich kann eine oronasale Verbindung zu Sprechstörungen führen, da Luft aus der Mundhöhle in die Nase entweicht oder eine unphysiologische Zungenlage eingenommen wird (*Schultz, 1986, S.741*). Während die Nasalität eines der häufigsten Symptome bei Patienten mit oronasalen Fisteln (*Amaratunga, 1988, S.837*) am Übergang vom harten zum weichen Gaumen darstellt, ist der Flüssigkeitsausstrom eine verbreitete Symptomatik bei Restlöchern des harten Gaumens (*Amaratunga, 1988, S.836*). Nur sehr kleine Restlöcher werden ohne funktionelle Einschränkung vom Patienten toleriert, grundsätzlich sollten alle oronasalen Fisteln verschlossen werden (*Ehrenfeld, 2002*). Verursachen Fisteln Symptome benötigen diese eine operative Behandlung (*Schultz, 1989, S.65*). Dabei richtet sich der Zeitpunkt der Operation nach dem Beschwerdebild des Patienten. Bestehen Sprachschwierigkeiten, ist eine frühe Behandlung notwendig (*Amaratunga, 1988, S.835*). Bestehen keine erkennbaren funktionellen Einschränkungen, kann die Operation aufgeschoben und mit einem weiteren Eingriff zum Beispiel der Kieferosteoplastik kombiniert werden (*Ehrenfeld, 2002*). Eine statistisch signifikante Kolonisation der oralen aeroben und anaeroben Bakterienflora in der Nasenhöhle bei Patienten mit oronasaler Verbindung konnte nicht nachgewiesen werden (*Brennan et al., 2001, S.400*). Allerdings gibt es eine positive Korrelation zwischen der Größe der Fistel und der Staph. aureus - Transmission zur Mundhöhle durch die Fistel (*Tuna et al., 2008, S.477*).

#### 3.4. Epidemiologische Daten zur Bildung von oronasalen Fisteln

Die Ausbildung einer oronasalen Verbindung nach primärem Gaumenverschluss ist weit verbreitet und stellt ein bleibendes Problem in der chirurgischen Therapie von Lippen-Kiefer und Gaumenspalten dar (*Diah et al., 2007, S.529*). Die Inzidenz variiert in den zahlreichen Studien zu diesem Thema.

1988 berichteten *Amaratunga et al.* (S.835) nach der Untersuchung eines Patientenkollektivs von 346 Personen über 73 Fälle mit Fistelbildung (21%). Diese

waren zu 42% an der Verbindungsstelle zwischen weichem und hartem Gaumen lokalisiert. Nach der Korrektur bilateraler Spalten kam es häufiger zur Fistelbildung als bei unilateralen Spalten. Auch die Verschlussmethode spielte seiner Ansicht nach eine Rolle. So ergab seine Studie eine höhere Inzidenz für die Entstehung einer Gaumenfistel an der Verbindungsstelle zwischen hartem und weichem Gaumen nach Verschluss mit der Methode nach *Langenbeck* als mit der Methode nach *Wardill*. Eine oronasale Fistel im harten Gaumen entsteht in diesen Untersuchungen eher bei Anwendung der Verschlussmethode nach *Wardill*.

*Cohen et al.* gaben 1991 eine „Restloch“-Inzidenz von 23% an, wobei die Hälfte der Fisteln nur 1-2mm Durchmesser hatten. Auch in dieser Studie wurde ein Zusammenhang zwischen Operationsmethode und Auftreten eines Restloches im Gaumen festgestellt. Am häufigsten wurde diese Komplikation auch hier nach Anwendung eines *Wardill*-Lappens mit 46% beobachtet, es folgte mit 22% die Methode nach *Langenbeck* und mit 10% die *Furlow*-Technik. Das Alter beim Erstverschluss und die Erfahrung des Operateurs beeinflussten eine Fistelbildung nicht. Dafür berichten *Cohen et al.* über einen Zusammenhang zwischen Größe der Spalte und Entstehung einer oronasalen Fistel. Nach dem initialen Verschluss der Fistel kam es in 37 % zu einem erneuten Auftreten einer oronasalen Verbindung (*Cohen et al.*, 1991, S.1043-1044).

Eine Studie an der Mayo Clinic in Minnesota, USA, ergab eine Inzidenz von Restlöchern in 11,5 % (*Emory et al.*, 1997, S.1536). Dabei wurde das Ergebnis weder von der Größe der Spalte noch vom Geschlecht der Patienten beeinflusst. Kinder, die bei der Primäroperation jünger als 1 Jahr waren, entwickelten mit 7,8% weniger Fisteln als Kinder, die bei der Primäroperation zwischen 12-25 Monate alt waren. Die Erfahrung des Operateurs wird als der stärkste Faktor in der Entstehung eines Gaumenrestlochs hervorgehoben. In 91 % der Fälle konnte eine oronasale Fistel mit einer einmaligen Operation gedeckt werden (*Emory et al.*, 1997, S.1536).

Von 103 Patienten, die zwischen 1982 und 1995 von fünf verschiedenen Operateuren behandelt wurden, konnten *Muzzafar et al.*, 2001 in nur 8,7% die Ausbildung einer oronasalen Fistel feststellen, wobei weder Alter, Geschlecht, Operateur, Art der Palatoplastik noch die Verwendung von kieferorthopädischen Geräten vor Gaumenverschluss eine signifikante Rolle dabei spielten. In 33% war die Fistel auch nach sekundärem Gaumenverschluss persistent (*Muzzafar et al.*, 2001,

S.1516). *Diah et al.* erstellten 2007 eine Übersichtsarbeit zu diesem Thema. Diese ergab, dass bei 25% der Patienten nach einem versuchten Fistelverschluss ein „Restloch“ auftrat, welches eine erneute Operation erforderte. 53,1% der Fisteln traten im harten Gaumen auf, wobei 31,2% von starkem Narbengewebe umgeben war (*Diah et al., 2007, S.532*).

### 3.5. Verschluss von oronasalen Fisteln

Der Verschluss von oronasalen Fisteln gestaltet sich schwierig. Durch die schon vorher durchgeführte primäre Palatoplastik kommt es zu einer unvermeidbaren Vernarbung der Schleimhaut. Die geringe Durchblutung und schlechte Compliance des lokalen Gewebes führt zu einer hohen Rezidivrate (*Kirschner et al., 2006, S.1440*). Die Mobilität des Gewebes des harten Gaumens ist limitiert, so dass es nach Verschluss eines Defektes mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer gesteigerten Spannung im Gewebe kommt (*Cole, 2006, S.638*). Besonders der Verschluss von Defekten nahe der Verbindung von hartem und weichem Gaumen zeigt laut *Cole* eine hohe Prävalenz zur Restloch-Persistenz nach operativem Verschluss. Die hohe Misserfolgsrate des Fistelverschlusses spricht für die schwer lösbare Problematik (*Abyholm et al., 1979, S.296; Schultz et al., 1986, S.1739; Amaratunga, 1988, S.835; Cohen et al., 1991, S.1043; Emory et al., 1997, S.1536; Muzzafar et al., 2001, S.1516*). Mit jedem gescheiterten Versuch verschlechtert sich die Prognose, einen guten Fistelverschluss zu erreichen, da das umgebende Gewebe immer stärker vernarbt (*Cole, 2006, S.638*).

In der Literatur sind dementsprechend zahlreiche Rekonstruktionsmöglichkeiten vorgeschlagen worden. Unterschieden werden operative und nicht operative Verschlussmethoden, wobei der operative Verschluss meist Mittel der Wahl ist (*Berkman, 1978, S.537*). Werden Fisteln unmittelbar nach der Entstehung erkannt, kann durch die Abdeckung mit einer Vinylprothese ein Verschluss erreicht werden (*Berkman, 1978, S.537*). Eine weitere Methode ist die Verwendung eines Obturators. Gewöhnlich erfordern aber größere, symptomatische Fisteln einen operativen Verschluss (*Schultz, 1986, S.742*). Bei den operativen Verschlussmethoden werden gestielte Nahlappenplastiken, gestielte regionale Lappen, mikrochirurgisch anastomosierte freie Lappen oder autogene freie Transplantate sowie seit einigen Jahren auch die Verwendung allogener Transplantate beschrieben.

### 3.5.1. Nahlappenplastiken

Lokale Mucoperiostlappen wie Stiel- und Brückenlappen werden häufig zum Verschluss von kleineren Fisteln verwendet (*Ehrenfeld, 2002, S.221*). Dabei wird häufig versucht, durch Relevation und Optimierung des ersten operativen Lappens einen guten Verschluss zu erreichen. Die Voraussetzungen sind allerdings durch die mangelnde Elastizität der Gaumenschleimhaut sowie durch die postoperative Vernarbung limitiert. Ferner führt die eingeschränkte Durchblutung des Lappens, hervorgerufen durch die Vernarbungsprozesse, zu signifikanten Misserfolgsraten (*Cole, 2006, S.637*). Um einen zweischichtigen Verschluss zu erreichen wird die zusätzliche Mobilisation der Nasenschleimhaut, die Beschichtung des Lappens mit buccaler Schleimhaut (*Honnebier et al., 2000, S.128-129*) oder die zusätzliche Mobilisation eines Vomerlappens (*Cohen et al., 1991, S.1046; Schultz, 1986, S.742*) beschrieben.

### 3.5.2. Gestielte regionale Lappen

Bei größeren Fisteln, bei denen die ausreichende Mobilisation von lokalem Gewebe nicht möglich ist, kann ein Zungenlappen eingesetzt werden (*Diah et al., 2007, S.533*). Über die Verwendung des Zungenlappens wurde erstmals von *Guerro-Santos und Altamarino* 1966 (S.123) berichtet. Dieser wird seitdem häufig zum Verschluss von oronasalen Fisteln eingesetzt (*Argamoso, 1990, S.402*). Problematisch ist, dass der Zungenlappen in der Phase vor der Stieldurchtrennung mit einem erheblichen Diskomfort für den Patienten einhergeht (*Cole, 2003, S.639*).

Ein an der A. fazialis gestielter Muskel-Schleimhautlappen (*Nakakita et al., 1990, S.452*) kann ebenfalls zur Fistelplastik herangezogen werden. Darüber hinaus kann ein buccal gestielter Muskel-Schleimhautlappen (*Jackson et al., 2003, S.144*), basierend auf den Gefäßen des M. buccinator, zum Verschluss von Fisteln am Übergang vom harten zum weichen Gaumen angewendet werden (*Robertson et al., 2008, S.912*).

Eine Verschlussmethode, die von verschiedenen Autoren empfohlen wurde, ist die Mobilisation des *Bichat'schen* Wangenfettpfropfes in die Defektregion. Dieser wurde gestielt in Kombination mit einem Gaumenrotationslappen in einer Studie von *El Hakim et al.* untersucht (*El Hakim et al., 1999, S.835*).

Als extraoral gestielte Lappen ist zum Beispiel der Stirnlappen bekannt (*Contreras et al., 1989, S.39*).

### 3.5.3. Mikrochirurgischer Gewebetransfer

Bei größeren Fisteln ist die Verwendung von mikrochirurgisch-anastomosierten freien Lappen aus verschiedenen Regionen wie der Dorsalis-pedis-Lappen (*Correa Chem, 1983, S.35*) oder der freie Unterarmlappen (*Chen, 1992, S.757*) untersucht worden. Dabei wurde der Radialislappen aus der Unterarmregion als mikrochirurgisches Transplantat für die Verwendung in der Mundhöhle hervorgehoben, da er dünn, haarlos und gut vaskularisiert ist (*Chen, 1992, S.757*).

### 3.5.4. Freie Transplantate

Autogene Transplantate wie Knorpeltransplantate (*Ohsumi et al., 1993, S.433*) oder Knochentransplantate (*Schultz, 1989, S.67; Ishii et al., 2002, S.364*) werden häufig zum Verschluss von Restlöchern des Gaumens verwendet. *Schultz* empfiehlt die Verwendung von freien Knochentransplantaten vom Hüftknochen oder Periosttransplantaten von der Tibia, um den Defekt zu füllen (*Schultz, 1989, S.364*). Die Arbeitsgruppe um *Murrell* präsentierte 2001 (S.143) eine Operationsmethode mit einem dreilagigen Verschluss der oronasalen Fistel. Dabei bestehen die drei Lagen aus einem Schleimhautlappen des Septums, Knochen oder Knorpelgewebe des Nasenseptums und einem Transpositions-lappen der Gaumenschleimhaut. Wesentlich bei dieser Technik ist die allseitige Umschneidung des Knochen-Knorpeltransplantates durch die beiden Schleimhautlagen (*Murrell et al., 2001, S.144*).

### 3.5.5. Gewebeexpansion und biologische Transplantatmaterialien

Da zum vollständigen Verschluss eines Gaumenrestlochs mit funktionell zufriedenstellendem Ergebnis meist mehr Gewebe benötigt wird als vorhanden ist (*Cole, 2006, S.638*) und ein spannungsfreier Verschluss der Fistel für einen erfolgreichen Verlauf wichtig ist, beschäftigte sich die Forschung intensiv mit diesem Problem. Sowohl die Anwendung von Gewebeexpandern (*Van Damme et al., 1996, S.255*) als auch die Distractionsosteogenese (*Alkan et al., 2007, S.112*) wurden zur Anwendung beim Verschluss von oronasalen Fisteln untersucht. Auf der Suche nach

dem idealen Transplantat gewinnt die Verwendung von biologischen Ersatzmaterialien und gezüchtetem Gewebe immer mehr an Bedeutung. Besonders zu erwähnen sind hierbei die Arbeiten von *Clark et al., 2003*; *Kirschner et al., 2006* und *Ophof et al., 2004* und *2007*.

2003 publizierten *Clark et al.* (S.40) die Verwendung des dezellularisierten Hauttransplantat AlloDerm® (LifeCell Corporation, Branchburg, New Jersey, USA) als Hilfsmittel zum Erstverschluss großer Gaumenspalten. Auch *Kirschner et al.* (S. 1431) untersuchten 2006 zuerst im Tierversuch und darauf in einer klinischen Studie eine Technik zur operativen Behandlung von oronasalen Fisteln mittels AlloDerm®. Eine weitere retrospektive Studie von *Cole et al.* 2006 (S.636) untersuchte den Verschluss von persistierenden oronasalen Fisteln mittels AlloDerm®.

*Ophof et al.* stellten in mehreren Studien die Implantation verschiedener Dermissubstrate in den Gaumen von Beaglehunden dar. Außerdem beschrieb er 2007 die *in vivo*-Reaktion nach Implantation von IntegraArtificial Skin® (Integra Lifescience Corporation, Plainsboro, New Jersey, USA), einem Kollagen-Glykosaminoglykan-basierten Hautersatzmaterial, am Hundegaumen.

## 4. Die Amnionmembran

### 4.1. Die anatomische und histologische Einordnung

Die Eihäute entstehen in der menschlichen Entwicklungsphase, der Fetalperiode. In der 10. Woche p.m. beginnt die Abgrenzung der Plazenta. Die Zotten am embryonalen Pol wachsen weiter zum Chorion frondosum. Am abembryonalen Pol, der zum Uteruslumen hin gerichtet ist, verschwinden die Zotten. Diese Chorionseite wird als Chorion laeve (Chorionglatte) bezeichnet. Im Laufe der Entwicklung entsteht die Dezidualplatte über dem Chorion frondosum, welche mit der Dezidua capsularis, die sich am abembryonalen Pol gebildet hat, verschmilzt. Das Uteruslumen obliteriert und die Amnionhöhle vergrößert sich. Amnion und Chorion verschmelzen miteinander. Die Plazenta entsteht aus dem verbleibenden Chorion frondosum und der Dezidualplatte. Amnion und Chorion werden als Eihäute bezeichnet (Sadler, 2003, S.107).

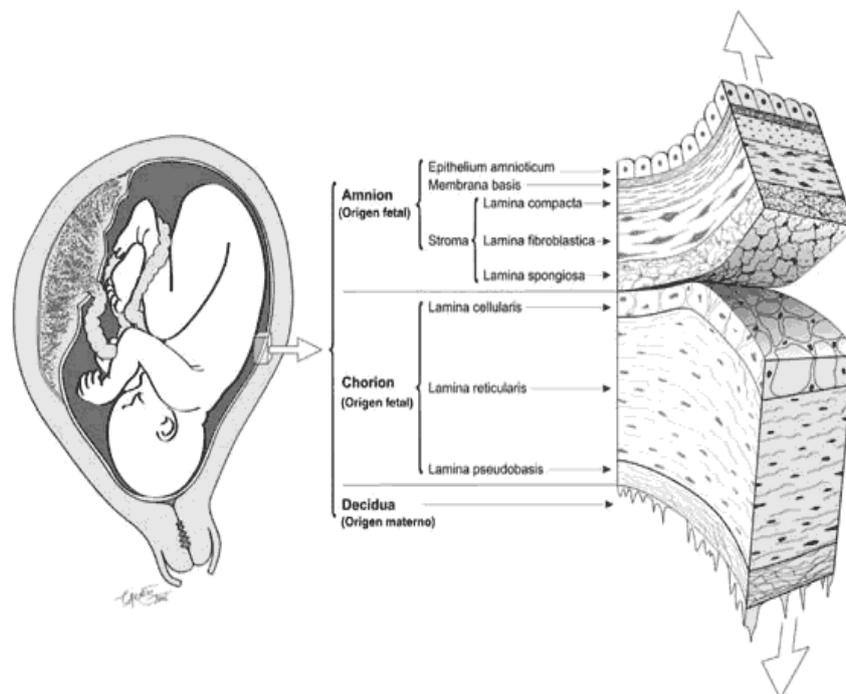


Abb. 1: Aufbau der Plazenta: HAM, Chorion und Decidua - histologischer Aufbau und anatomische Einordnung (Murube 2006)

Die Plazenta besteht schließlich aus einem fetalen, vom Chorion frondosum gebildetem, Anteil und einem mütterlichen Anteil, der Dezidua basalis (Sadler, 2003, S.109). Sie enthält die Chorionplatte, die Basalplatte und die Zottenbäumchen, die als fetaler Anteil aus dem Trophoblast hervorgehen. Die Chorionplatte entsteht aus

extraembryonalem Bindegewebe, in welchem die Choriongefäße verlaufen (*Schuhmacher, 1997, S.38*). Sie und die Nabelschnur, die in diese inseriert, werden vom Amnionepithel bedeckt. Mit der Vergrößerung der Amnionhöhle verkleben Amnion- und Chorionmesenchym zur gemeinsamen Amnion-Chorion-Haut. Die gesamte Hülle wird jetzt auch Fruchtsack genannt und die darin befindliche Flüssigkeit als Fruchtwasser bezeichnet (*Schuhmacher, 1997, S.36*). Die Plazenta vergrößert sich proportional zum Wachstum des Fetus während der weiteren Schwangerschaft durch Verzweigung und Vermehrung der Zotten (*Sadler, 2003, S.110*). Nach der Geburt wird die Plazenta abgelöst und ausgestoßen. Die geburtsreife Plazenta hat einen Durchmesser von 15-20cm und ein Gewicht von ca. 500g (*Schuhmacher, 1997, S.38*). Die reife Plazenta erscheint nach der Abstoßung lilarot. Sie besteht aus einer mütterlichen und einer kindlichen Seite. Auf der mütterlichen Seite ist sie von Dezidua, auf der kindlichen Seite von Amnionepithel bedeckt. Die Gefäße ziehen auf der Chorionplatte zur Insertionsstelle der Nabelschnur (*Sadler, 2003*). HAM ist 20-50 Mikrometer dick und hat histologisch einen fünfschichtigen Aufbau (*Bourne, 1960, S.1127*). Die innerste Schicht besteht aus einer einzelnen Schicht kuboidaler Epithelzellen. Diese wird von vielen Mikrovilli bedeckt (epithelial layer) (*Bourne, 1960, S.1127; van Herendaël et al., 1978, S.872*). Darunter ordnet sich eine Basalmembran an. Als dritte Schicht folgt nach *Bourne* eine kompakte Schicht, die aus einem retikulären Netzwerk besteht und für die Festigkeit der HAM verantwortlich ist (compact layer). Eine Häufung von Fibroblasten bildet die vierte Schicht (fibroblast layer) und eine aus losem Bindegewebe bestehende fünfte Schicht, die „Schwammschicht“, ermöglicht es der HAM relativ frei über das unterliegende, fixierte Chorion zu gleiten (spongy layer). Diese Schicht ist reich an Mucin und kann sich durch Wassereinlagerung auf das Doppelte vergrößern (*von Versen-Höynck et al., 2004, S.47*). Die Oberfläche der Epithelzellen ist von Microvilli bedeckt, diese sind irregulär verteilt oder liegen konfluierend vor und bilden interzelluläre Kanäle in Form eines Labyrinths an der lateralen Grenze (*van Herendaël et al., 1978, S.873*). Von der Basis der Epithelzellen ziehen Zellfortsätze in die Basalmembran. Die Zellkerne sitzen zentral und unterscheiden sich nicht in der Größe (*van Herendaël et al., 1978, S.873*). Desmosomen zwischen den Zellen sichern einen festen Zell-zu-Zellverbund. Gap junctions sind in den laterobasalen Regionen zwischen den Zellen zu finden. Tight junctions können nicht entdeckt werden (*King, 1982, S.73*). So sind Hemidesmosomen für die Verbindung der

Epithelzellen zur Basalmembran (*van Herendael et al., 1978, S.878*) und Desmosomen für die Zell-zu-Zellverbindung der Epithelzellen untereinander verantwortlich (*van Herendael et al., 1978, S.876*). *Malak et al.* studierten die Verteilung von Kollagenen in den fetalen Membranen und wies die Existenz von Typ I- und Typ III-Kollagen in der Kompakt-, Fibroblasten- und Schwammschicht nach (*Malak et al., 1991, S.390*).

Typ V- und Typ VI-Kollagen sind waren hauptsächlich in der Kompakt und Fibroblastenschicht erkennbar (*Malak et al., 1993, S.392*). Die Kollagene der fetalen Membranen sind in einem gut organisierten Netzwerk angeordnet und sind für die mechanische Integrität dieser verantwortlich (*Malak et al., 1993, S.404*). Die Basalmembran des Amnionepithels ähnelt der, der Haut und enthält Laminin-5, Kollagen vom Typ VII (*Oyama et al. 2003*) und Typ IV, Laminin-1 sowie Fibronectin (*Fukuda et al., 1999, S.76*). Das Zytoplasma enthält Zellorganellen, die endoplasmatisches Retikulum und den Golgi-Apparat enthalten (*van Herendael et al., 1978, S.873*).

In einer immunhistologischen Untersuchung konnten *Wolf, Schmidt und Drenckhahn* 1991 zeigen, dass einige Hauptkomponenten des Zytoskeletts, wie Actin,  $\alpha$ -Actinin, Spectrin und Ezrin bevorzugt mit den apikalen und lateralen Zelloberflächen des Amnionepithels verbunden sind. Keratin ist im gesamten Zytoplasma verteilt. Die verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts spielen eine wichtige Rolle für die strukturelle Integrität und kontrollieren die Permeabilität des Amnionepithels (*Wolf et al., 1991, S.385*).

## 4.2. Struktur und besondere physiologische Eigenschaften der HAM

### 4.2.1. Struktur und Aufbau

Durch den komplexen Aufbau des Amnionepithels ist dieses zu besonderen physiologischen Leistungen in der Lage. *Van Herendael et al.* konnten drei Hauptaufgaben aufzeigen: die Funktion als Deckepithel, als aktiv sekretorisches Epithel und die Fähigkeit zu intensivem interzellulären und transzellulärem Transport (*Van Herendael et al., 1978, S.879*). Da die HAM als biologisches Transplantat besonders in der Augenheilkunde verwendet wird, wurden ihre biologischen Eigenschaften in diesem Fachbereich am ausführlichsten erforscht. Eine strukturelle Ähnlichkeit der Basalmembran von Amnionmembran, Cornea und Konjunktiva

besteht. Allerdings stellten *Fukuda et al.* in einer Analyse der Subketten des Kollagen vom Typ IV und des Laminin von HAM, aus welchen deren Basalmembran hauptsächlich aufgebaut ist, fest, dass die Zusammenstellung ihrer Basalmembran der Konjunktiva ähnlicher als der Cornea ist. Somit ist humane Amnionmembran zum Ersatz der Basalmembran der Konjunktiva in der operativen Rekonstruktion bestens geeignet (*Fukuda et al., 1999, S.73*).

#### 4.2.2 Immunologie

Immunologisch stellt die HAM privilegiertes Gewebe dar und enthält immunmodulierende Faktoren wie HLA-G Moleküle (*Kubo et al., 2000, S.1539*). In ausführlichen Xenotransplantationsversuchen untersuchte *Kubo* kryokonservierte HAM, welche unter die Nierenkapsel von Ratten, in deren Cornea sowie in Hirnareale transplantiert wurde. Immunhistologische Untersuchungen evaluierten keine (Cornea = immunologisch privilegiert; Nierenkapsel = extraokular und immunologisch nicht privilegiert) bis milde (Hirnregion = immunologisch nicht privilegiert) Immunreaktionen. In der Kontrollgruppe wurden kryokonservierte, menschliche Hautgrafts transplantiert, welche in allen Bereichen eine weitaus stärkere Immunreaktion hervorriefen (*Kubo et al., 2000, S.1539*). Auch bei der Xenotransplantation humaner HAM auf die Bauchmuskelfaszie von Sprague-Dawley-Ratten wurde keine Abstoßungsreaktion und nur eine milde lymphozytäre Reaktion beobachtet (*Kesting et al., 2007, S.356*).

#### 4.2.3 Antiinflammatorische/Antimikrobielle Eigenschaften

Verschiedene Autoren berichten von antiinflammatorischen Fähigkeiten der HAM. Dabei scheint die Sequestrierung von infiltrierenden Lymphozyten eine Rolle zu spielen, welches die HAM zu einem nützlichen „graft“ bei einer Reihe von Augenkrankheiten macht (*Shimmura et al., 2001, S.408*). Auch *Park et al.* beschrieben eine rasche Apoptose der neutrophilen Granulozyten als Grundlage der antiinflammatorischen Wirkung von Amnionepithel. Die Amnionmembran senkt die PMN-Infiltration und somit die entzündungsbedingte Keratinozytennekrose (*Park et al., 2000, S.2906*). Des Weiteren werden antiinflammatorische Proteine freigesetzt (*Hao et al., 2000, S.352*). Interleukin-1ra und Interleukin 10 konnten in den epithelialen Zellen nachgewiesen werden. Diese hemmen die Expression von

proinflammatorischen Faktoren wie Interleukin-1 oder TNF-alpha. Hao et al. vermuten einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Interleukin-1ra und Interleukin-10 in der HAM und ihren antiinflammatorischen Fähigkeiten (*Hao et al., 2000, S.350*). Solomon et al. bestätigen die Hemmung der Expression von proinflammatorischen Interleukinen (*Solomon et al., 2001, S.444*). Durch die Transplantation von HAM in eine mit Herpes-Simplex-Virus-1 infizierte Mäusecornea konnte eine Verminderung der stromalen Entzündungsreaktion erreicht werden (*Heiligenhaus et al., 2001, S.59*). *Buhimshi et al.* konnten 2004 (S.1678) die Expression des antimikrobiellen Peptides Human- $\beta$ -Defensin-3 in Amnionepithelzellen nachweisen. Die Gruppe um *Robson et al.* unternahm 1972 (S.145) mehrere Versuche, bei denen sie Brandwunden von Ratten zunächst mit Keimen inokulierten und danach mit fetalen Membranen vs. Haut abdeckten. Im Ergebnis konnte ein antibakterieller Effekt der fetalen Membranen mit Reduktion der Wundkeimzahl im Vergleich zu den anderen Wundauflagen nachgewiesen werden. Als Grund für die antibakterielle Wirkung wurden antibakterielle Substanzen wie Lysozym, welches in der HAM vorkommt, diskutiert (*Robson et al., 1972, S.148*).

#### 4.2.4 Beschleunigung der Epithelialisierung

Eine wichtige Funktion des Amnionepithels stellt seine proliferationsfördernde Eigenschaft dar, welche zu einer Beschleunigung der Epithelialisierung führt. So enthält die HAM eine hohe Anzahl von Wachstumsfaktoren, wie durch RT-PCR gezeigt werden konnte. Bei  $-80^{\circ}$  konservierte HAM zeigte mRNA-Expression für eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- $\alpha$ , KGF, HGF, bFGF, TGF- $\beta$ -1, TGF- $\beta$ -2, TGF- $\beta$ -3 und andere (*Koizumi et al., 2000, S.173*).

#### 4.2.5. Wirkung auf die Angiogenese

Die Datenlage zur Angiogenese von HAM stellt sich kontrovers dar. In der Ophthalmologie, wo die HAM zur Rekonstruktion der avaskulären Cornea verwendet wird, wurden ihre antiangiogenetischen Eigenschaften beschrieben. In einer Studie von *Hao et al.* wurde mittels RT-PCR und immunhistochemischen Untersuchungen dargestellt, dass die HAM verschiedene antiangiogenetisch wirksame Proteine exprimiert. Einige dieser Proteine konnten im Stroma der HAM gefunden werden (*Hao et al., 2000, S.350*). *Shao et al.* wiesen nach, dass HAM das Wachstum von

Endothelzellen verhindert und so die Neovaskularisation der Cornea unterdrückt. Außerdem konnte mit PEDF ein dafür verantwortlicher Faktor aus dem Epithel der HAM isoliert werden (*Shao et al., 2004, S.1758*).

Im Gegensatz zur antiangiogenetischen Wirkung der HAM im okulären Bereich, konnte nach extraokulärer Anwendung von HAM ein angiogenetischer Effekt beobachtet werden. *Faulk et al.* (S.1156) bestätigten im Jahr 1980 die Neoangiogenese nach Abdeckung von Beinulzera mit HAM. *Güler et al.* (S. 283) beschrieben 1997 nach intraoraler Vestibulumplastik mit HAM eine Zunahme des Blutflusses.

#### 4.2.6. Hemmung der Narbenbildung

Amnionepithel ist in der Lage, die Bildung von Narbengewebe zu verringern. Es konnte eine Suppression des TGF- $\beta$ -Signalwegs und der Differenzierung narbenbildender Zellen nach Transplantation von HAM nachgewiesen werden (*Tseng et al. 1999, S.325*). *Wang et al.* (S. 317) begründeten den Effekt 2001 mit einer geringen Apoptose von Keratinozyten im Stroma nach Amnionmembrantransplantation.

#### 4.3. Verwendung der HAM in Medizin und Zahnmedizin

Fetale Membranen werden seit Beginn des 20. Jahrhunderts in der Literatur der wiederherstellenden Chirurgie als Ersatzmaterial und Wundauflage bei verbrannter oder ulzerierter Haut beschrieben (*Gruss et al., 1978, S.1237*). Jahre später wurde HAM erfolgreich als biologischer und temporärer Wundverband verwendet und erforscht (*Colocho et al., 1974, S.370, S.; Trelford et al., 1975, S.383*). In den 60er bis 80er Jahren des 20. Jhs. fand die Verwendung von HAM hauptsächlich in der Behandlung von chronischen Wunden (*Gruss et al., 1978, S.1237; Faulk, 1980, S.1156; Bennett, 1980, S.1153; Sommerville, 1982, S.223*) und Brandwunden (*Gruss et al., 1978, S.1237*) ihren Einsatz. Nach einer Phase, in der die Anwendung vor allem von frischer HAM aus Gründen der Infektionstransmission zurückging, erlebte deren Verwendung in den 1990er Jahren eine Renaissance in der Augenheilkunde. Seither hat die Verwendung von HAM in der Augenheilkunde zahlreiche Indikationen (*John et al., 2002, S.44, Sangwan et al., 2007, S.251*). Das von *Lee und Tseng* 1997

(S.303) entwickelte Kryokonservierungsverfahren erweiterte die Einsatzmöglichkeiten für HAM erheblich. Es ermöglichte die langfristige Aufbewahrung von HAM, ebenso wie die wiederholte Testung von Spendern nach dem sog. "infection window". Außerhalb der Augenheilkunde sind Studien zum Einsatz von HAM rar. Die Behandlung von venösen Beinulzera mit kryokonservierter HAM als Wundauflage wurde jüngst veröffentlicht (*Mermet et al., 2006, S.459*). Hierbei wurde die HAM als sicheres Substrat beschrieben, welches die Epithelialisierung fördert. In einer anderen Studie wurde im Tierversuch bei Glycerin-konservierter HAM eine vergleichbare Akzeleration der Wundheilung wie bei frischer HAM festgestellt und das Material wurde für die Anwendung als biologischer, temporärer Wundverband empfohlen (*Maral et al., 1999, S.625*). *Iijima et al.* stellten HAM 2007 (S.513) als eine mögliche Biomembran zur Blasenrekonstruktion vor. Allerdings hat sich die Anwendung von HAM in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie noch nicht durchsetzen können (*Kesting et al., 2007, S.354*). Im intraoralen Bereich wurden erste Erfahrungen zur Anwendung von HAM Ende der 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts gemacht. *Kothary et al.* (S.87) nutzten 1969 HAM zur Rekonstruktion der Mundhöhle nach Glossektomie. In den 80er Jahren beschichteten *Lawson et al.* M.-Pectoralis-Lappen zur intraoralen Rekonstruktion mit HAM. Dabei erzielten sie positive Ergebnisse durch Reduktion der Schmerzen und Beschleunigung der intraoralen Epithelialisierung (*Lawson, 1985 S.163*). Weitere Versuche, HAM intraoral zu nutzen, wurden v.a. für die Vestibulumplastik publiziert (*Güler et al., 1997, S.280; Samandari et al., 2004, S.574*). *Gomes et al.* untersuchten HAM als Membran für die „guided bone regeneration“ im mund-kiefer-gesichtschirurgischen Bereich (*Gomes et al., 2001, S.563*). Ferner wurde die Anwendung von prälaminierten Amnion-Faszienlappen zur intraoralen Defektrekonstruktion beschrieben (*Kesting et al., 2007, S.359*). In einer weiteren Studie wurde HAM zur Abdeckung iatrogenen Gingivadefekte beim Kaninchen untersucht (*Rinastiti et al., 2006, S.247*).

## **5. Material und Methode**

### **5.1 Gewinnung und Präparation der Humanen Amnionmembran**

#### **5.1.1 Gewinnung der Plazenta**

Nach Überprüfung des Entnahmeprotokolls durch die Ethik-Kommission der Ruhr-Universität Bochum wurde ein Aufklärungsbogen entwickelt, der allen Müttern, die ihre Plazenta zur Verfügung stellen wollten, vorgelegt wurde. Als Einschlusskriterien galten folgende Parameter:

- geplante Sectio bei einer gesunden Patientin
- Erst- oder Zweitpara
- Patientin mit maximal einer Sectio in der Anamnese.

Nach Zustimmung der Patientin wurden am Vortag der Sectio die Infektionsparameter der Patientin (Hepatitis B und C, HIV, Syphilis) bestimmt. Im Dezember 2007 wurden nach erfolgter Sectio in der Frauenklinik des Marienhospitals Witten (Leitung: Prof. Dr. Hatzmann) die Plazentae steril gewonnen. Die Nabelschnur wurde vorher abgetrennt und der Nabelstumpf mit einer sterilen Kornzange abgeklemmt. Danach wurde die Plazenta unter sterilen Bedingungen mit Ringerlösung von Blut reingewaschen und mit der Nabelschnur und den fetalen Membranen nach oben in einer sterilen Organbox verpackt. Anschließend wurde sie mit 500ml PBS-Lösung, die mit einer 5ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung versetzt war, gewaschen. Im Sterilbehälter wurde die Plazenta in einem Zeitrahmen von höchstens drei Stunden post partum bis zur Präparation der Membranen gelagert und zum Labor transportiert.

#### **5.1.2. Präparation der humanen Amnionmembran**

Die Präparation der HAM fand unter sterilen Bedingungen unter einer "Laminar flow Hood" (*HS 12®*, *Heraeus Herasafe*) statt.

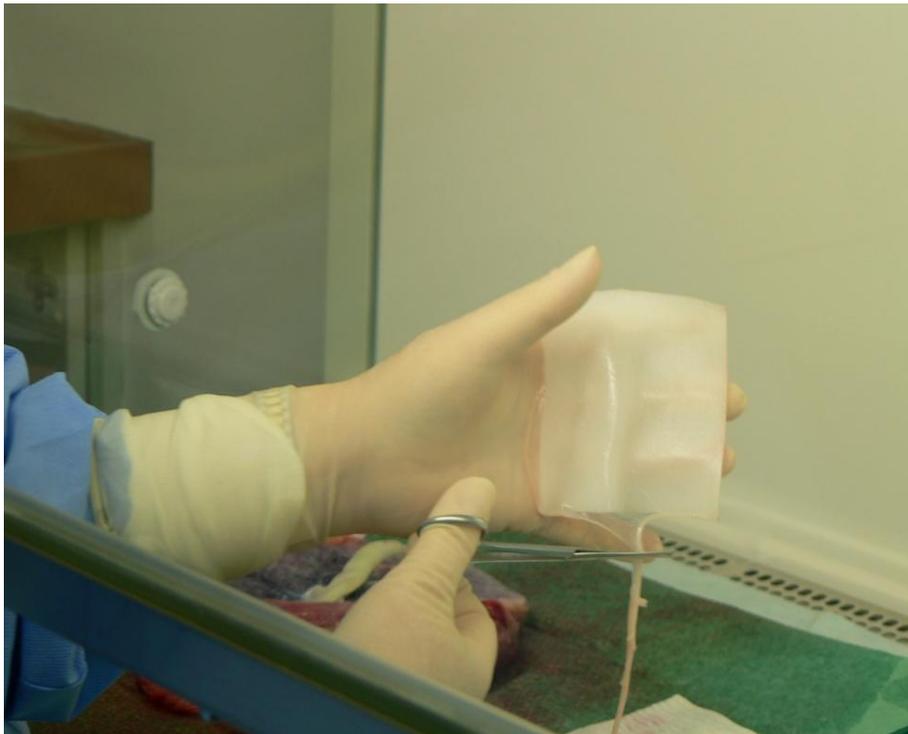


Abb. 2-3: Präparation der HAM (Kesting et al. 2007)

Die Arbeitsfläche wurde zuerst mit einem saugfähigen Material (*Molinea*<sup>®</sup>, *Hartmann, Heidenheim, Deutschland*) ausgelegt, darüber wurde ein steriles Abdecktuch gelegt (*Foliodrape*<sup>®</sup>, *Hartmann, Heidenheim, Deutschland*). Nach einem initialen Einschnitt wurde die HAM stumpf vom Chorion gelöst. Membranstücke wurden mit einem sterilen Einmalskalpell auf eine Größe von 4x4 cm zurechtgeschnitten und mit der

epithelialen Seite nach oben auf ein Nitrocellulose-Tuch (*RaucoceI<sup>®</sup>*, *Lohmann-Rauscher, Rengsdorf, Deutschland*) mittels Naht an allen vier Ecken fixiert.

### 5.1.3. Herstellung des Konservierungsmediums

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

### 5.2. Kryokonservierung des Amnionmembran

Die Membran-Patches wurden mit einer sterilen Pinzette in die gefüllten Tubes gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Amnionepithel nicht die Wand des Tubes berührte, sondern in Richtung des Mediums ausgerichtet wurde. Die Röhrchen wurden bei -80°C für zwei Monate gelagert. Eine halbe Stunde vor den jeweiligen Operationen wurden die tiefgefrorenen Membranen in den Tieroperationssaal gebracht und aufgetaut.

### 5.3. Das Tiermodell

Sieben männliche sechs Monate alte Berliner Minischweine (*Fa. Schlesier, Großberkmannsdorf, Deutschland*) im Alter von einem halben Jahr und einem Ausgangsgewicht von 22-32kg wurden für die Durchführung der Versuche herangezogen. Während der Versuche waren die Tiere in der Versuchstierhaltung des „Berufsgenossenschaftlichen Forschungsinstitutes für Arbeitsmedizin“ (BGFA) der Ruhr-Universität Bochum untergebracht. Sie wurden gemäß den internationalen Richtlinien für Labortiere gehalten. Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Zweimal täglich erfolgte eine Fütterung (*Sniff<sup>®</sup>-Tierfutter, Fa. Plunge, Soest, Deutschland*) durch das zuständige Fachpersonal. Die Ställe wurden täglich gereinigt und das Stroh erneuert. Vor Beginn der Versuche erhielten die Tiere eine Woche Eingewöhnungszeit in ihrer neuen Umgebung. Bei Raumtemperatur wurde eine Luftfeuchtigkeit von 65% und ein Tag-Nacht-Rhythmus mit 12 Stunden Beleuchtung und 12 Stunden Dunkelheit eingehalten. Das Protokoll des

Tierexperimente wurden von der Bezirksregierung in Recklinghausen/ Nordrhein-Westfalen, Deutschland überprüft und die Erlaubnis zur Versuchsdurchführung wurde erteilt (Nr. 9.93.2.10.32.07.152). Das im Folgenden beschriebene Versuchsprotokoll entspricht in vollem Maße den internationalen Richtlinien für Versuchstiere.

#### 5.4. Operationsdurchführung

##### 5.4.1 Erstellung des künstlichen Gaumendefekts

Die Operationen, bei denen der iatrogene Gaumendefekt gesetzt wurde, fanden im Januar 2008 statt und wurden von erfahrenen Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgen und Studenten der Zahnmedizin in erster Assistenz durchgeführt. An vier aufeinander folgenden Tagen wurden je zwei Tiere, bzw. ein Tier am letzten Tag, in Intubationsnarkose operiert. Dabei erhielten die Tiere zur Prämedikation intramuskulär 10mg Ketamin-ratiopharm<sup>®</sup> (*Ratiopharm, Ulm, Deutschland*), 0.05mg Atropin (*Braun, Melsungen, Deutschland*) und 1mg Midazolam (*DeltaSelect, München, Deutschland*). Danach wurden die Tiere auf einem gewärmten OP-Tisch platziert, um ihre Körpertemperatur (physiologisch zwischen 37,0°C bis 37,5°C) aufrecht zu erhalten. Es wurde ein peripherer intravenöser Zugang in eine Ohrvene gelegt. Über diesen wurde dem Tier NaCl 4cc/kg pro Stunde verabreicht. Die Anästhesie wurde zunächst mit einem Isofluran 1,5-3Vol% /Sauerstoff-Gemisch (*Forene<sup>®</sup> 250ml, Abbott, Wiesbaden, Deutschland*) aufrechterhalten. Nach Rückenlagerung des Tieres auf dem OP-Tisch erfolgte die Intubation durch einen erfahrenen Anästhesisten. Die Tiere wurden künstlich beatmet. Zur Schmerzmedikation wurde 2ml Fentanyl (*Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland*) intravenös verabreicht. Es wurde keine antibiotische Prophylaxe verabreicht. Vor jeder Operation wurden die Tiere gewogen und die Körpertemperatur gemessen. Nach Narkoseeintritt wurde das Maul des Tieres geöffnet und mit einem Mundsperrer in der geöffneten Haltung fixiert. Zunächst erfolgte eine Abformung des Gaumenreliefs jedes Tieres mit einem Doppelmischabdruck. Dieser wurde zur Erstellung eines Gipsmodells im Dentallabor des Knappschaftskrankenhauses Bochum-Langendreer benötigt. Im Tiefziehverfahren erfolgte anhand dieser Modelle die Herstellung individueller Schutzplatten aus Polymethacrylmethacrylat. Nach der Abformung erfolgte die

Infiltration von 1,7ml einer 4%-igen Articain-Lösung mit 1:200.000 verdünntem Adrenalin (*Ultracain forte*<sup>®</sup>, *Sanofis-Aventis, Frankfurt, Deutschland*) zur intraoperativen Blutstillung am harten Gaumen. Mit einer 6mm-Biopsie-Stanze (*Stiefel, Offenbach, Deutschland*) wurde darauf in der Mitte des harten Gaumens ein Schleimhautdefekt bis auf den Knochen gesetzt, welcher anschließend auf 15mm erweitert wurde. Zur knöchernen Perforation des Gaumens erfolgte mittels einer Knochenfräse unter ständiger Kühlung die Osteotomie des Gaumenknochens ebenfalls auf einen Durchmesser von 15mm. Die Ränder des entstandenen Defektes wurden mit der Luer-Knochenzange unterminierend präpariert. Für die Heilungsphase wurde so die Voraussetzung für eine Epithelialisierung der Defektränder geschaffen. Die Blutstillung erfolgte mit einer sterilen Kompresse, die zuvor in Oxymetazolin (*Otriven, Ratiopharm, Ulm, Deutschland*) getränkt wurde. Zur postoperativen Analgesie wurde den Tieren ein Fentanyl-Pflaster mit einem Release von 12 Mikrogramm/Stunde (*Hexal, Holzkirchen, Deutschland*) auf das rechte Ohr geklebt. Die Tiere wurden nach der Operation mit normaler Kost weitergefüttert und erhielten weiter Wasser ad libitum. Die Gaumendefekte wurden am 3. Tag, 6. Tag und am 9. Tag unter Sedierung kontrolliert und der Wundverlauf mit einer Digitalkamera (*DMC-FZ4, Panasonic, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., Osaka, Japan*) dokumentiert.

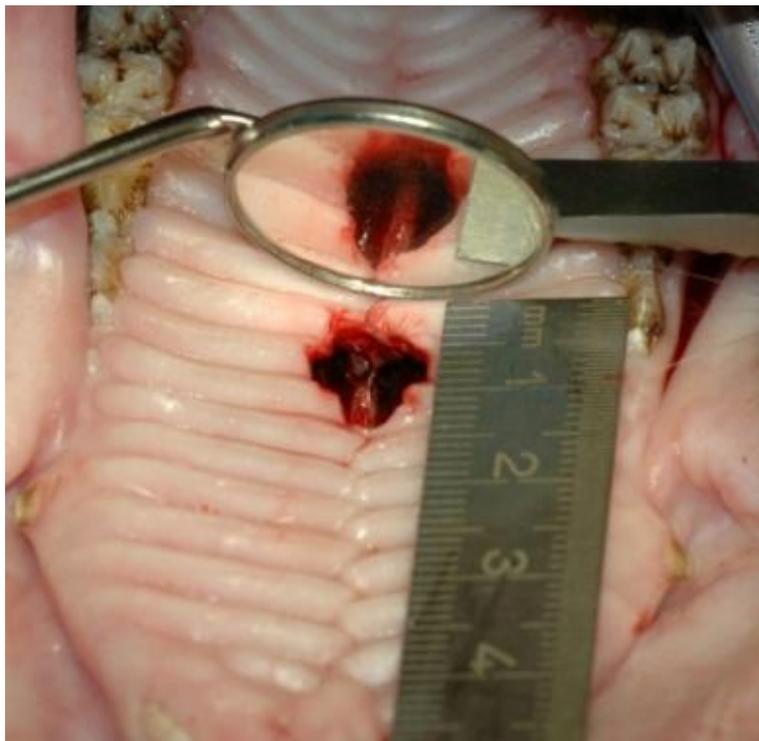
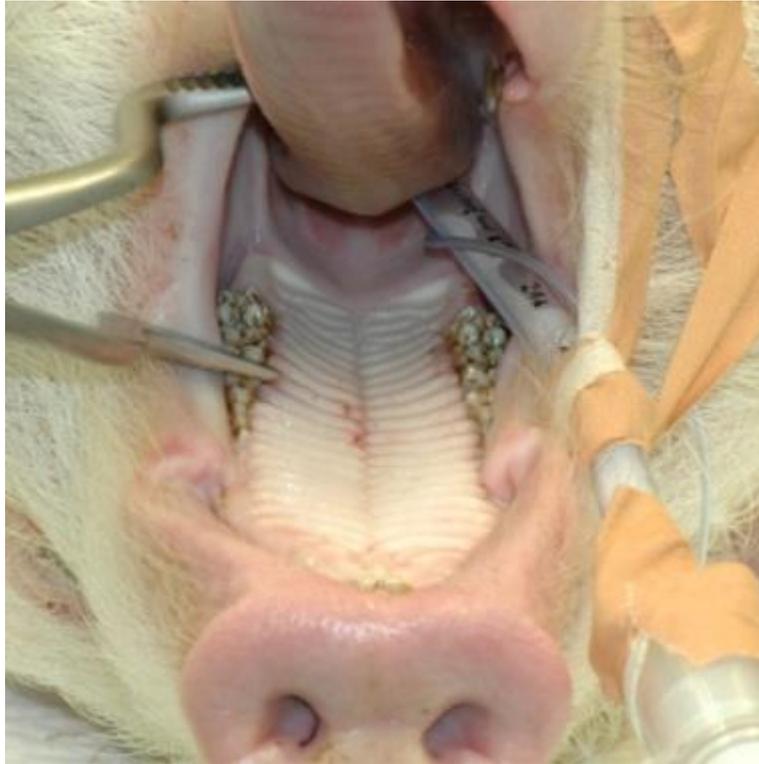
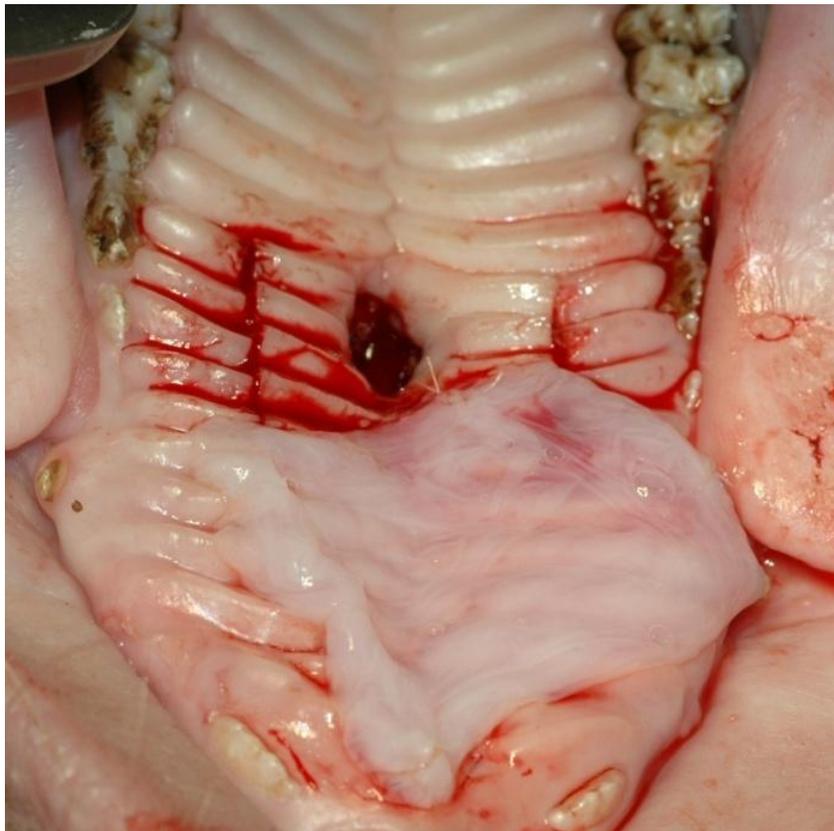
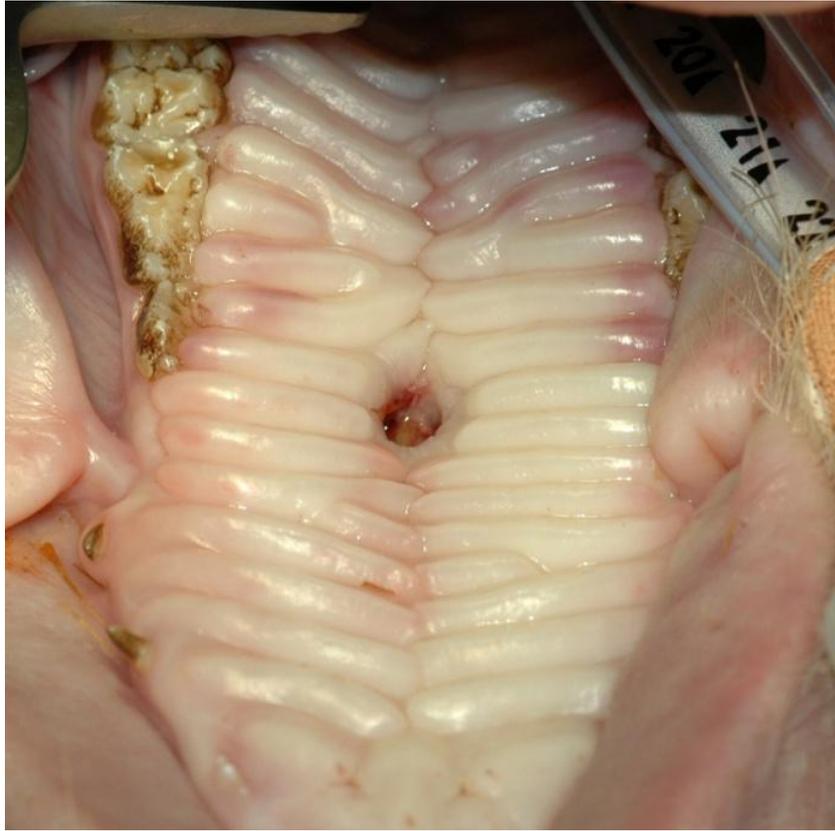


Abb. 4: Der harte Gaumen des Schweins vor dem Setzen des Gaumendefektes. Das Tier ist bereits intubiert.

Abb. 5: Intraoperative Darstellung der frisch gesetzten oronasalen Fistel im harten Gaumen. Das Nasenseptum ist in der Mitte der Fistel zu erkennen. Unter den Wundrändern wurde unterminierend Knochen abgetragen, um eine Epithelialisierung zu erreichen.

#### 5.4.2. Deckung der Gaumendefekte

Die Deckung der Gaumendefekte erfolgte 2 Wochen nach der Erstoperation. Nach Narkoseeintritt wurde das Tier auf dem Rücken gelagert. Die Intubation erfolgte wie oben beschrieben. Nachdem der Mundsperrler eingebracht worden war, erfolgte eine Lokalanästhesie mittels Ultracain forte<sup>®</sup>. Die Schnitfführung erfolgte im Sinne der Brückenlappentechnik nach *Langenbeck*. Bei je drei zufällig ausgewählten Tieren wurde der Defekt mit Integra<sup>®</sup>, bei den anderen drei mit mehrlagiger, kryokonservierter, humaner HAM gedeckt. Bei dem biologischen Hautersatz Integra<sup>®</sup> Artificial Skin handelt es sich um ein zweischichtiges Membransystem. Die dermale Ersatzschicht besteht hierbei aus einem porösen Fasergerüst aus kreuzvernetztem Rindersehnenkollagen und einem Glykosaminoglykan (Chondroitin-6-Sulfat), dessen in der Herstellung kontrollierte Porengröße eine verlangsamte, definierte Abbaurate erlaubt. Die epidermale Ersatzschicht besteht aus einer dünnen Polysiloxanschicht (Silikon) zur Regulation des Feuchtigkeitsverlustes der Wunde. Die HAM wurde ½ Stunde vor der Operation aufgetaut, steril mit NaCl gespült und ständig feucht gehalten. In Vorversuchen war die Stabilität der HAM durch Verwendung eines mehrlagigen Patches verbessert worden. Daher wurden fünf Schichten der HAM übereinander gelegt und mittels 6-0 Naht (*Ethilon, Ethicon, Norderstedt*) zu einem Multilayer-Patch fixiert. Integra<sup>®</sup> wurde nach Herstelleranweisung behandelt. Beide Materialien wurden unter den beiden Brückenlappen eingebracht und über den Defekt sowie auf den denaturierten Knochen gelegt. Eine Fixierung mittels 4-0 Naht (*Vicryl, Ethicon, Norderstedt*) erfolgte an den Rändern des Brückenlappens. Anschließend wurde bei jedem Tier die oben genannte individuell mittels Tiefziehschiene gefertigte Verbandplatte zum Schutz des Defektes eingeschraubt. Dies geschah mittels rotierendem Instrumentarium und 13mm langen sog. Sinuslift-Schrauben. Während der Operation traten bei keinem der Tiere Komplikationen auf. Nach erfolgreicher Operation wurden die Tiere extubiert und die Narkose ausgeleitet. Die Tiere erhielten Normalkost und Wasser ad libitum.



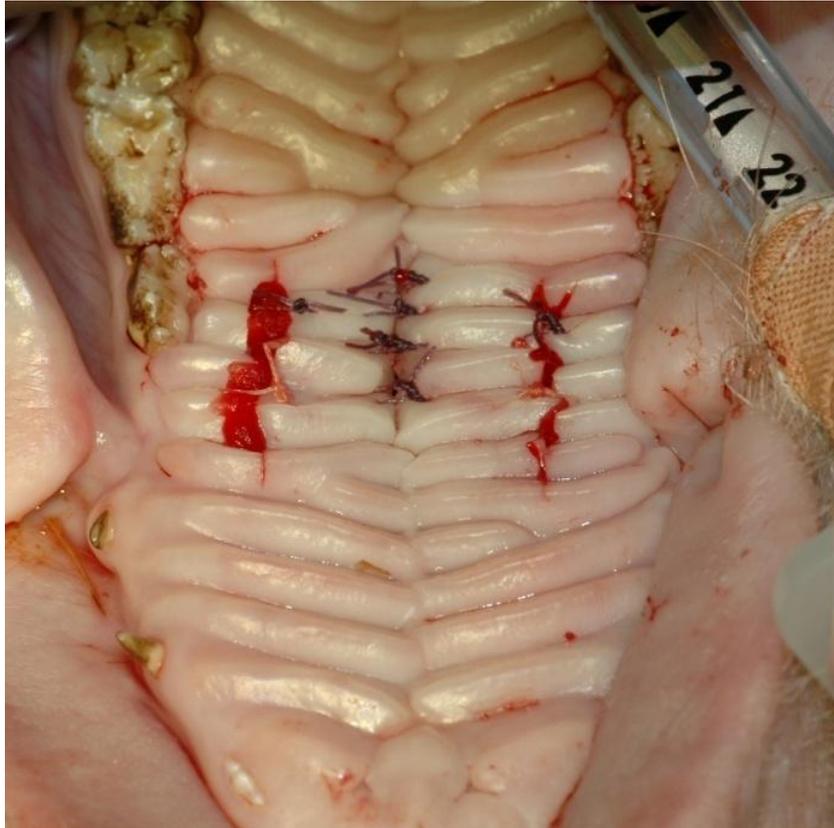


Abb.6-8: Deckung des Gaumendefekts mit fünflagiger kryokonservierter humaner Amnionmembran



Abb.9: individuell gefertigte Verbandsplatte

### 5.4.3 Zuordnung der Deckungsmaterialien

Tabelle 1: Verteilung der Deckungsmaterialien

<b>Tier</b>	<b>Deckungsmaterial</b>
Schwein 1	Integra
Schwein 2	Amnion
Schwein 3	Integra
Schwein 4	Amnion
Schwein 5	Amnion
Schwein 6	Integra
Schwein 7	Kontrolltier

Die sechs Tiere wurden nach Computer-gesteuerter Randomisierung in zwei Gruppen aufgeteilt, wovon eine Gruppe (n=3) als Deckungsmaterial Integra® und die andere (n=3) fünflagige HAM erhielt. Ein weiteres siebtes Tier diente als Kontrolle und erhielt keine Deckung des Gaumendefektes.

### 5.4.4. Klinische Wundkontrolle

Es erfolgten regelmäßige Wundkontrollen und -reinigungen von evtl. Speiseresten während der Säuberung der Verbandsplatten. Dies geschah am dritten und am sechsten Tag nach Gaumenverschluss während einer Kurznarkose. Am neunten postoperativen Tag wurde die Gaumenplatte vollständig entfernt. Die Wundkontrollen umfassten zusätzlich die Vermessung der verbliebenen Fisteldurchmesser und die Dokumentation von Entzündungsreaktionen. Vom neunten Tag bis zum Finale am 40. Tag nach Defektrekonstruktion, respektive dem 54. Tag nach Erstoperation, fanden keine weiteren Wundkontrollen statt. Die Wunddokumentation erfolgte mit der oben genannten Digitalkamera, deren Fotos anschließend auf einen Computer übertragen und archiviert wurden.

### 5.5. Finalisierung und histologische Probenaufarbeitung

Alle Tiere wurden am Finaltag des Versuches, das heißt wie oben beschrieben am 40.Tag nach Defektrekonstruktion, respektive dem 54. Tag nach Erstoperation, geopfert. Zunächst wurden sie hierfür in Allgemeinnarkose gelegt und anschließend mit T 61 (*Intervet GmbH Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland*) eingeschläfert. Nach Eintritt des Todes wurden Resektate des Oberkiefers gewonnen und in 4%-iger Formalinlösung eingelegt.

Daraufhin wurden die Resektate im pathologischen Institut der Ruhr-Universität Bochum in Paraffin eingebettet und 4µm dick geschnitten. Es erfolgte eine HE-Färbung zur Darstellung der Zellinfiltration und Gewebsarchitektur sowie eine EvG-Färbung zur Darstellung der elastischen Fasern. Die Gewebeschnitte wurden anschließend im Labor der Klinik für Plastische Chirurgie der Ruhr-Universität Bochum unter einem Lichtmikroskop AxioCam HRC® (Zeiss, Jena, Germany) beurteilt. Es wurde die Axiovision Software (Axioskop 2 Plus, Zeiss, Jena, Deutschland) zur Speicherung und Analyse verwendet.

### 5.6. Immunhistologie

Die immunhistologischen Färbungen wurden durch Fr. Dr. Julia Slotta-Huspenina vom Institut für Pathologie der Technischen Universität München durchgeführt. Dazu wurde ein automatisierter Immunostainer genutzt, in dem die Färbungen nach Protokoll des Herstellers (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) angefertigt wurden (Quintanilla-Martinez et al., 2003) Die Paraffinschnitte der Gaumendefektproben wurden zunächst auf Superfrost® Plus Gläser (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht, bevor die Deparaffinisierung und Rehydrierung stattfand. Die Slides wurden danach in 0.01mol/L Citratpuffer-Lösung mit einem pH-Wert von 6.0, welche zusätzlich 0.1% Tween 20 enthielt, eingetaucht. Darauf wurden die Slides in den Behältern für 30 Minuten in einem Mikrowellengrill bei maximaler Leistung erhitzt. Das Antikörper-Spektrum umfasste:

Tab.2: Verwendete Antikörper und zu detektierende Gewebe

<u>Verwendeter</u> <u>Antikörper</u>	<u>Firma</u>	<u>Zu detektierendes</u> <u>Gewebe</u>
<b>Von Willebrand-Faktor-Antikörper</b>	Dako, Glostrup, Dänemark	Endothelzellen
<b>Pancytokeratin</b>	Dako, Glostrup, Dänemark	Epithel
<b>β-HCG</b>	Dako, Glostrup, Dänemark	Amnionmembran

Für die Negativkontrolle wurde der primäre Antikörper durch PBS-Lösung ersetzt. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte unabhängig von den klinischen Daten durch

zwei unabhängige verblindete Untersucher. Die Präparate wurden hinsichtlich Zellart, Verteilung der Zellen und Ausprägung der Färbung unter Berücksichtigung der jeweiligen Färbung beurteilt.

### 5.7. Statistische Analyse

Eine statistische Analyse des Fisteldurchmessers zwischen den Behandlungsgruppen wurde mit dem doppelseitigen t-test für gepaarte Stichproben durchgeführt, wobei  $p < 0.05$  als signifikant gewertet wurde.

## 6. Ergebnisse

Alle Tiere überlebten die Versuche und zeigten keine Einschränkungen bei der Nahrungsaufnahme. Mit Ausnahme eines Tieres konnten alle ihr Körpergewicht bis zum Finaltag deutlich steigern (Abb. 7). Weder dieses Tier noch die anderen zeigten im Verlauf des Versuchszeitraumes Anzeichen von Krankheiten oder eines eingeschränkten Wohlbefindens.

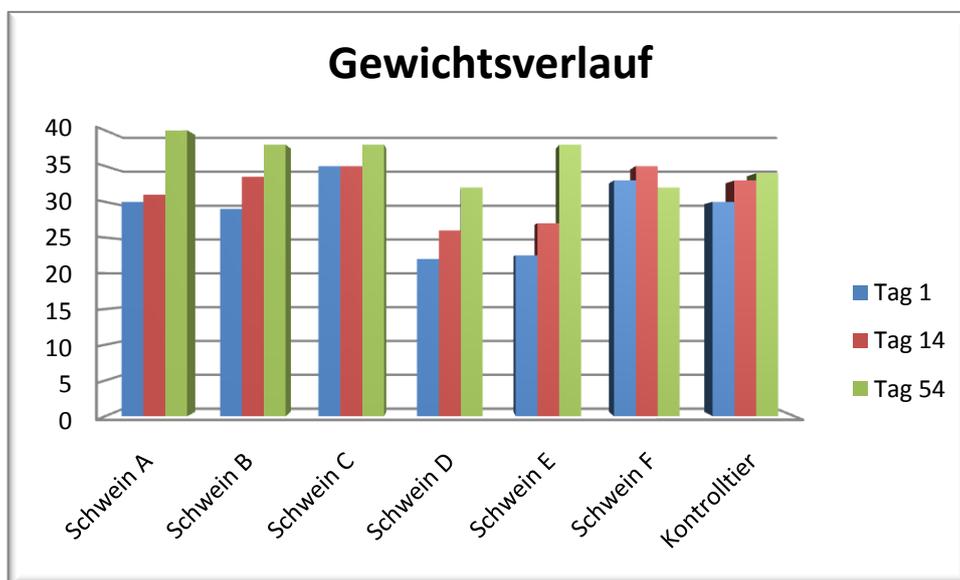


Abb.10: Die Graphik zeigt den Gewichtsverlauf der Versuchstiere; außer bei Schwein F ist eine deutliche Zunahme an Körpergewicht erkennbar

## 6.1. Klinische Analyse

### 6.1.1. Critical-Size-Defekte

Bei allen Tieren entstanden epithelialisierte Restlöcher mit oronasaler Verbindung. Die Wundheilung verlief komplikationslos. Nach einer zweiwöchigen Heilungsphase waren die Gaumendefekte bei allen Tieren auf eine Größe zwischen 13mm und 15mm geheilt und zeigten keine weitere Schrumpfungstendenz.

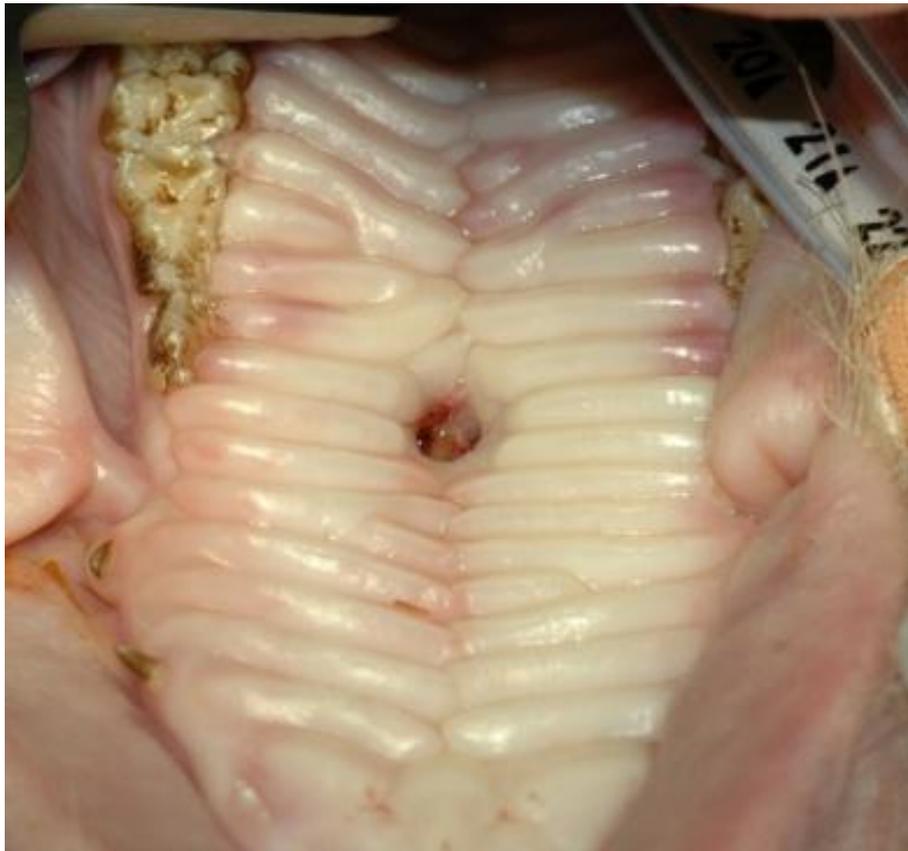


Abb. 11: Zustand zwei Wochen p.o.: eine Epithelialisierung der Wundränder hat sich ausgebildet. Die Fistel zeigt keine entzündliche Veränderung.

### 6.1.2. Klinische Beurteilung der mit HAM gedeckten Gaumendefekte

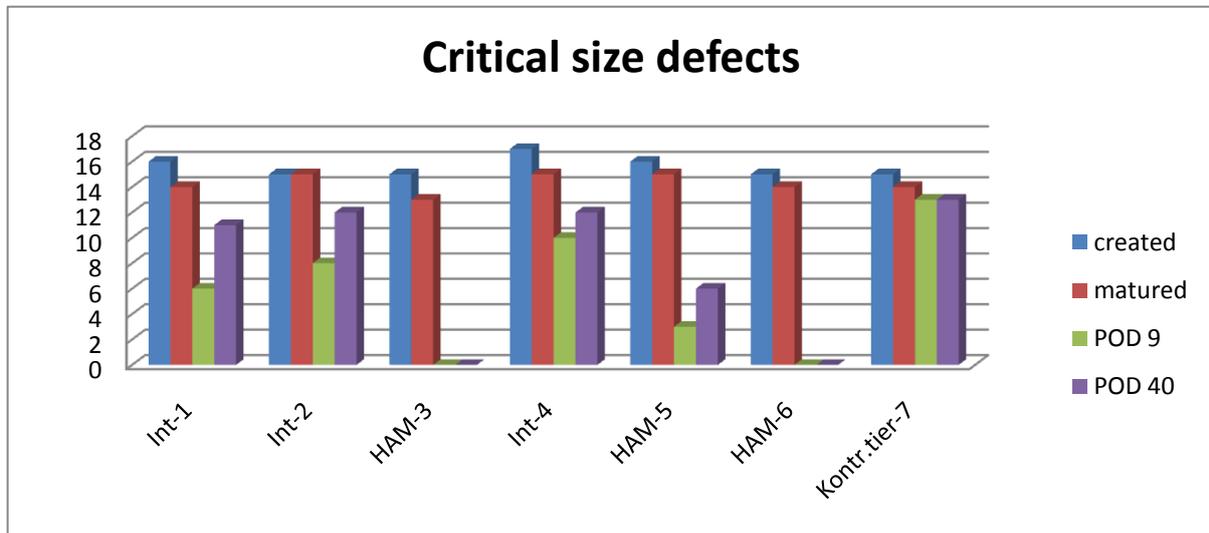


Abb. 12: Defektdurchmesser der einzelnen Tiere vor Defektdeckung Tag 1 (created), nach 14 Tagen (matured fistulae) und nach Defektdeckung mit Integra® (Int) oder HAM an Tag 9 nach der Defektdeckung (POD 9) und Tag 40 nach dem Fistelverschluss (POD 40). Das Kontrolltier erhielt keine Defektdeckung. Deutlich ist die verringerte Defektgröße am Finaltag für die mit HAM gedeckten Defekte zu erkennen (HAM-3, HAM-5, HAM-6). Die Defektgröße ist in Millimetern angegeben.

Drei Tage nach der Deckung mit humaner Amnionmembran erschienen alle Defekte verschlossen. Es zeigten sich keine Entzündungszeichen. Speisereste und Blutkrusten hatten sich unter den Verbandplatten angesammelt und wurden entfernt. Die Wundheilung evaluierte an den Beobachtungszeitpunkten keine Auffälligkeiten und wies keine Entzündungszeichen auf. An Tag 9 nach Gaumenverschluss hatten sich alle drei Gaumendefekte verkleinert. Zwei Fisteln waren vollständig verschlossen. Am Finaltag zeigten zwei der drei ehemaligen Fisteln nach klinischer Überprüfung mit der Myrthenblattsonde immer noch einen suffizienten Verschluss. Die dritte Fistel zeigte an Tag 9 p.o. einen Durchmesser von 3mm und an Tag 40 p.o. einen Durchmesser von 6mm. Der durchschnittliche Fisteldurchmesser lag an Tag 9 p.o. bei 1mm und an Tag 40 p.o. bei 2mm. Im Vergleich zu den mit Integra® gedeckten Gaumendefekten hatte sich der Fisteldurchmesser nach Deckung mit HAM am 40. Tag p.o. signifikant verkleinert ( $p=0,04$ ). Die frei granulierenden lateralen Wundränder, die durch die von Langenbeck-Technik entstanden waren, epithelialisierten bei allen Tieren.



Abb.13: Deckung mit HAM; Gaumenverschluss am 40 Tag p.o. Es ist kein verbliebener Fistelgang erkennbar.

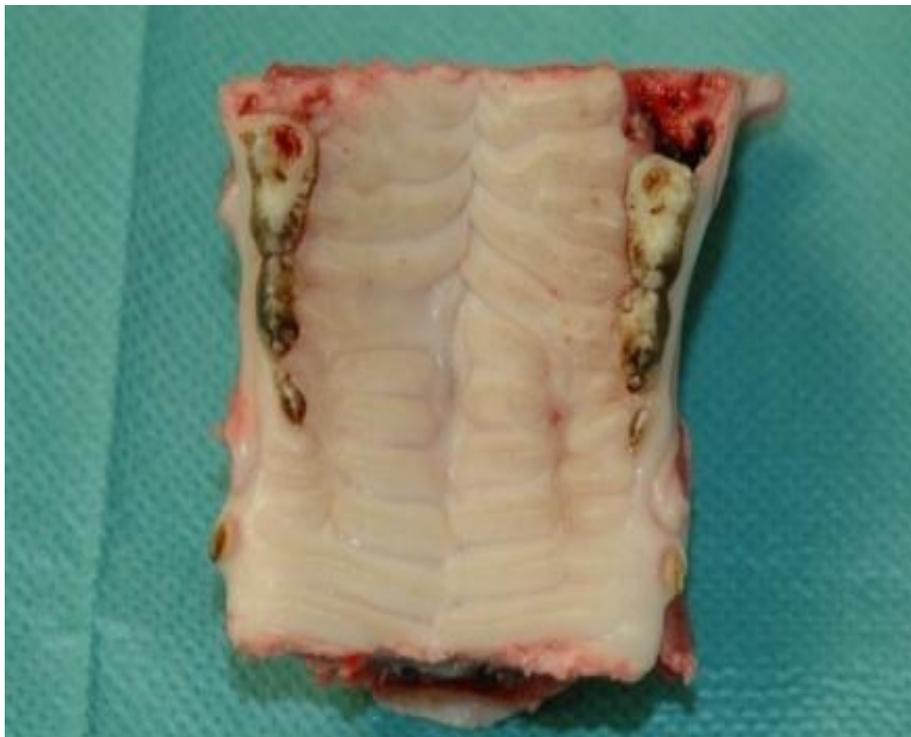


Abb.14: Deckung mit HAM; Oberkieferresektatdesharten Gaumens ohne erkennbare oronasale Verbindung. Die Wundränder erscheinen geschlossen und reepithelialisiert.

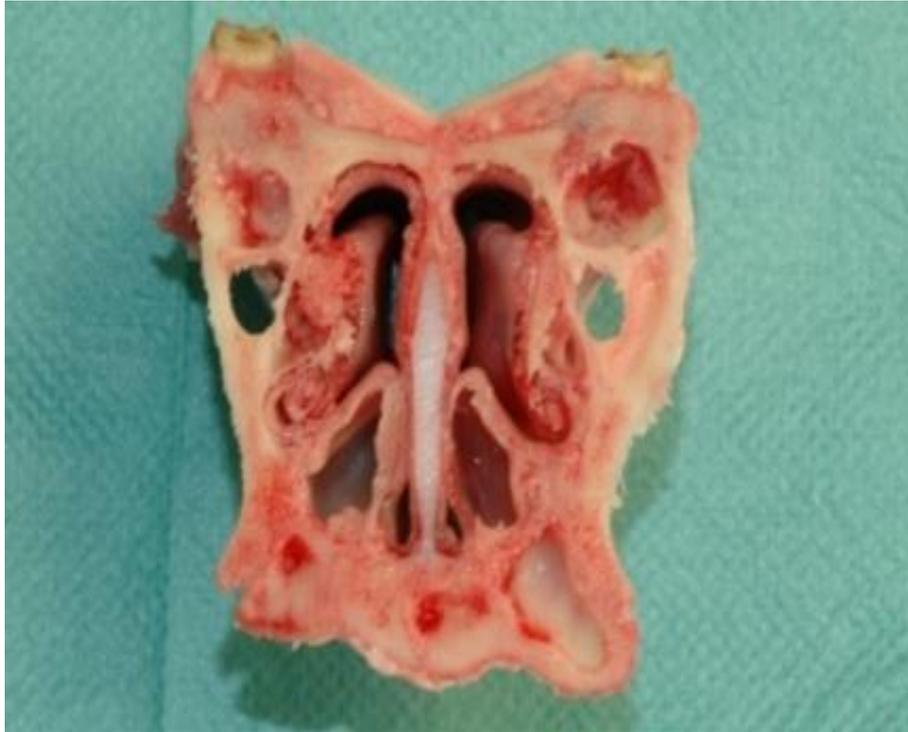


Abb.15: Deckung mit HAM; Oberkieferresektat des harten Gaumens; vollständiger Verschluss der oronasalen Fistel erkennbar.

Nach Resektion des harten Gaumens konnte der Fistelverschluss aus allen Ebenen begutachtet werden. In Abbildung 13-15 zeigt sich deutlich, dass keine Verbindung zwischen Mundhöhle und Nase mehr bestand und der Defekt mit Mucosa aufgefüllt ist. Mundhöhle und Nasenhaupthöhle sind vollständig voneinander getrennt. Die Nasenhaupthöhle besteht aus zwei getrennten Kammern. Es sind keine Zeichen einer Entzündung erkennbar. Die Schleimhaut der Conchae nasalis ist rosig und ohne fötide Beläge oder Eiterablagerungen.

### 6.1.3. Klinische Beurteilung der mit dem Hautersatzmaterial (Integra®) gedeckten Gaumendefekte

Drei Tage nach Gaumenverschluss erschienen die Wunden infiziert und die Wundränder gerötet. Blutreste waren erkennbar. Dieses Bild wurde nach 9 Tagen bestätigt. Hier konnte bei allen drei Tieren eine initiale Dehiszenz mit Ausbildung einer erneuten Fistel wahrgenommen werden. Der Durchmesser der Fisteln an Tag 9 p.o. lag zwischen 6mm und 10mm (Tier 1= 6mm; Tier 2= 8mm und Tier 4=10mm; siehe Abb.12). Am Finaltag lag ein Gaumendefekt im Sinne einer oronasalen Fistel bei allen drei Versuchstieren vor. Die Fisteldurchmesser lagen für Tier 1 bei 11mm, für Tier 2 bei 12mm und für Tier 4 bei 12mm. Die Defekte zeigten sich infiziert und der umgebende Knochen war denudiert. In den Fistelgängen waren Speisereste impaktiert. Die Entlastungsschnitte wiesen ebenfalls eine starke Entzündungsreaktion und freiliegenden Knochen auf. Die Transplantate waren klinisch nicht mehr nachweisbar.

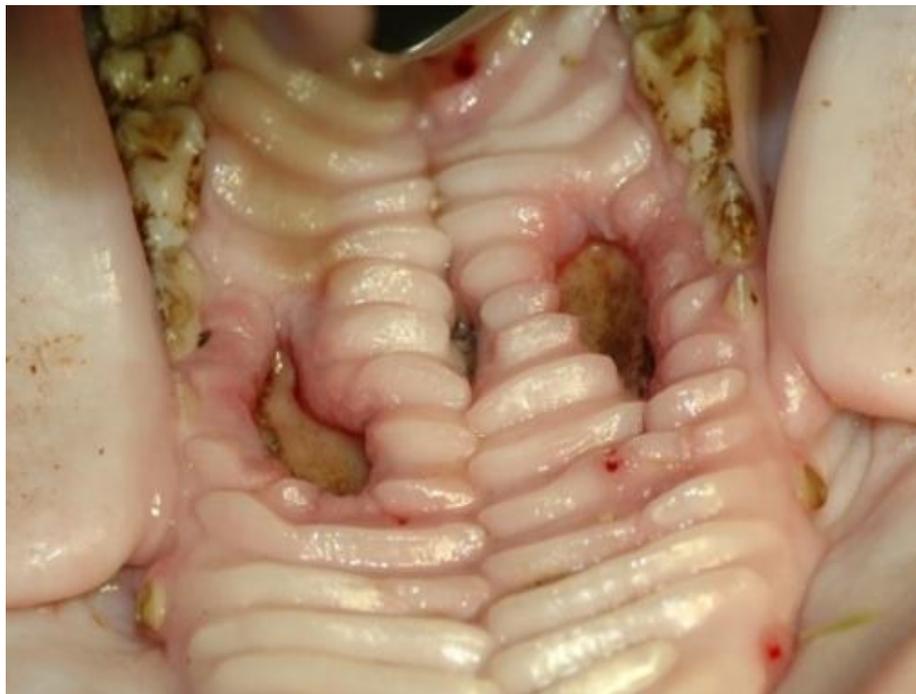


Abb. 16: Deckung mit Integra®; deutliche Entzündungsreaktion der Wundränder und Dehiszenz des Fistelverschlusses, sowie freiliegender Knochen erkennbar, es konnte kein Fistelverschluss erreicht werden.

### 6.1.4 Statistische Auswertung

Tab.3: Tabelle 3 zeigt die Durchschnittswerte und Standardabweichungen (SD) des Fisteldurchmessers an entsprechendem Kontrolltermin (POD) für die einzelnen Gruppen an.

Eine statistische Analyse des Fisteldurchmessers zwischen den Behandlungsgruppen wurde mit dem doppelseitigen t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt, wobei  $p < 0.05$  als signifikant gewertet wurde.

	<b>Durchmesser bei Erst-OP</b>	<b>Fistulae matured</b>	<b>POD9</b>	<b>POD40</b>
<b>Insgesamt</b>	15,57	14,29	5,71	7,71
<b>SD</b>	0,79	0,76	4,99	5,74
<b>HAM</b>	15,33	14,00	1,00	2,00
<b>SD</b>	0,58	1,00	1,73	3,48
<b>Int</b>	16	14,67	8,00	11,67
<b>SD</b>	1,00	6,58	2,00	0,57
<b><u>Statistische Auswertung</u></b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>			
<b>HAM-POD9/HAM-POD40</b>	P=0,068			
<b>INT-POD9/INT-POD40</b>	P=0,11			
<b>HAM-POD9/INT-POD9</b>	P=0,82			
<b>HAM-POD40/INT-POD40</b>	P=0,04			

Bei der ersten Operation wurden Fisteln mit einer durchschnittlichen Größe von 15,57mm geschaffen. Diese heilten nach zwei Wochen auf einen Durchschnittswert von 14,29mm ab. Nimmt man die mit HAM und Integra gedeckten Defekte zusammen erhielt man 9 Tage nach Fistelverschluss eine durchschnittliche Fistelgröße von 5,71mm und an Tag 40 p.o von 7,71mm.

Die mit HAM gedeckten Fisteln hatten im Durchschnitt eine Ursprungsgröße von 14 mm vor der Deckung und konnten auf durchschnittlich 2mm an Tag 40 p.o. reduziert werden. Die mit Integra gedeckten Fisteln erreichten an Tag 40 p.o. einen durchschnittlichen Durchmesser von 11,67mm.

In der statistischen Auswertung dieser Werte mit dem doppelseitigen t-test für gepaarte Stichproben wird deutlich, dass eine signifikante Verkleinerung des

Defektdurchmessers an Tag 54 nach Erstoperation, bzw. Tag 40 nach Defektdeckung, der mit HAM gedeckten Defekte gegenüber den mit Integra® gedeckten Defekten stattgefunden hat ( $p=0,04$ ).

## 6.2. Histologische Beurteilung der Defekte

In der HE-Färbung eines mit HAM rekonstruierten Oberkiefers zeigt sich, wie in Abb. 14a demonstriert, die vollständige Reepithelialisierung des Fistelgangs zwischen Mund- und Nasenhaupthöhle. Der Fisteleingang ist ebenfalls vollständig verschlossen. In der Defektregion kam es zur Ausbildung von kollagen- und fibroblastenreichem Narbengewebe, wie in der HE und EvG-Färbung demonstriert werden konnte.

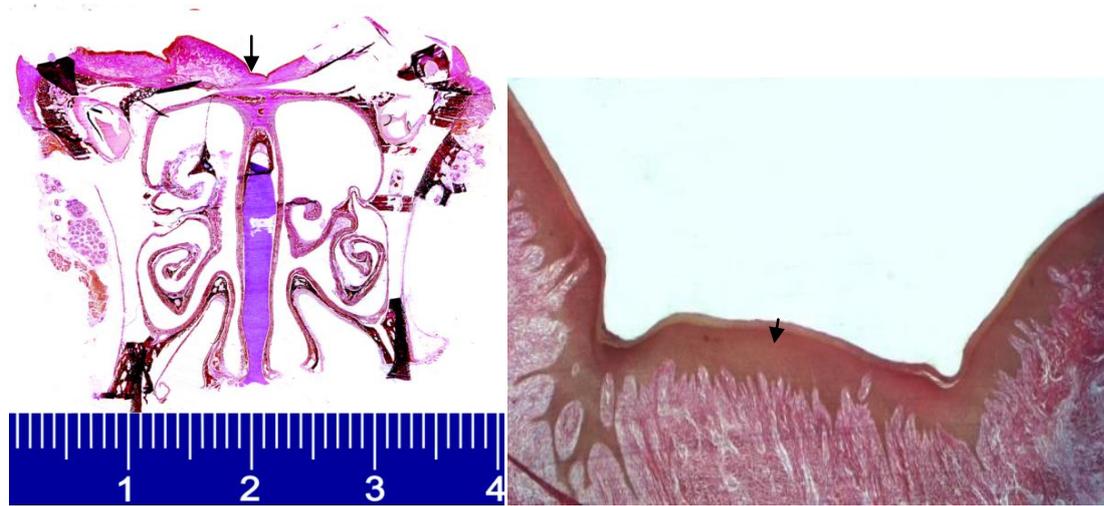


Abb.17a: HE-Färbung; geschlossene Fistel nach Deckung mit humaner Amnionmembran; die vollständige Reepithelialisierung des Fistelgangs ist erkennbar

Abb.17b: EvG-Färbung des Gaumenresektates: Orale Seite der vormaligen Fistel mit vollständig verschlossenem Fistelgangs. Es zeigt sich ein mehrschichtiges Plattenepithel, darunter im Bindegewebe reichlich elastische Fasern

### 6.3. Immunhistologische Analyse der Gaumendefekte

Die Neubildung bzw. Einsprossung von Gefäßen in die rekonstruierten Defekte konnte mit der Faktor VIII-Färbung demonstriert werden. Zahlreiche Endothelzellen lassen sich mit der o.g. Färbung nachweisen.

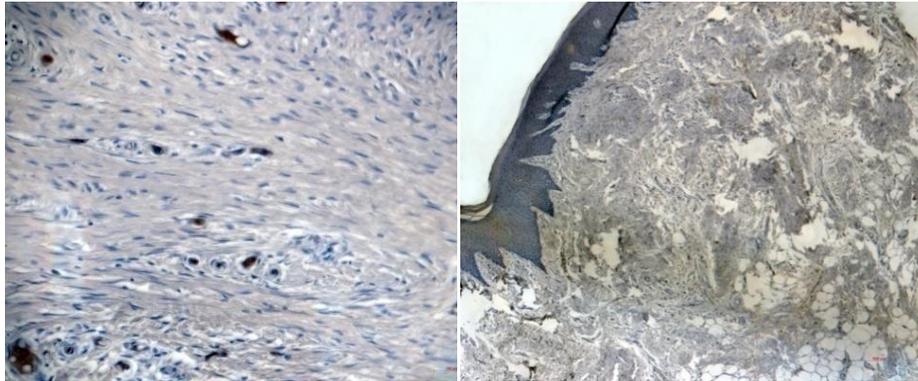


Abb.18a: von-Willebrand-(Faktor-VIII)-Färbung: Nachweis zahlreicher Endothelzellen als Indiz für die Vaskularisierung des Gewebes

Abb.18b:  $\beta$ -HCG-Färbung der nach Amnionmembrandeckung verschlossenen oronasalen Fistel; kein Nachweis von verbliebenem Amniongewebe, vollständige Remodellation des Transplantats

Die Färbung der rekonstruierten Region mit dem  $\beta$ -HCG-Antikörper gibt keinen Hinweis auf verbliebenes fetales Gewebe. Es ist also von einer vollständigen Resorption und Remodellation des Transplantatmaterials zum Finalzeitpunkt des Versuches auszugehen.

## 7. Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es, kryokonservierte HAM als Transplantatmaterial für den Verschluss von oronasalen Fisteln im Minischweinmodell zu etablieren. In der vorliegenden prospektiven Machbarkeitsstudie wurde eine deutliche Verkleinerung bzw. ein Komplettverschluss iatrogenor oronasaler Fisteln bei der Verwendung von mehrlagiger kryokonservierter HAM nachgewiesen. Klinisch und histologisch zeigten sich im Vergleich zu einem Dermisersatzmaterial, welches als Kontrollgewebe eingesetzt wurde, keine wesentlichen Entzündungsreaktionen und/oder Wundheilungsstörungen. Sowohl klinisch als auch histologisch konnte 40 Tage post operationem bei zwei von drei Tieren eine komplette epitheliale Überwachsung der Defektregion erzielt werden. Diese neu entstandenen Gewebebrücken wiesen in der immunhistochemischen Darstellung Anzeichen einer Einsprossung von Blutgefäßen und Entwicklung von elastischen Fasern auf. Ferner konnte durch immunhistochemische Methoden nach 40 Tagen eine vollständige Degradation der HAM-Transplantate nachgewiesen werden. Damit kann nach Gaumenplastik mit HAM von einer kompletten Remodellation bei zwei von drei Defekten ausgegangen werden. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die Transplantation von HAM zur Deckung oronasaler Fisteln die Möglichkeit zur Förderung der Epithelialisierung bei Minimierung der Entzündungsreaktionen bietet.

Der Verschluss einer Gaumenspalte soll zu einem intakten Gaumen und der Trennung von Mund- und Nasenhöhle führen (*Cohen et al., 1990, S.1041*). Eine normale Aussprache und ungestörtes Gesichtswachstum sollen erreicht, Hörverlust und Mittelohrentzündungen vermieden werden (*Muzzafar et al., 2001, S.1515*). Dies gelingt nicht immer. Die Entstehung einer oronasalen Fistel nach primärem Gaumenverschluss ist eine weitverbreitete Komplikation (*Amaratunga, 1988, S.834*). Die Fisteln können im postalveolären Bereich, in der labialen und nasalen Region, im harten Gaumen, im weichen Gaumen und an der Grenze zwischen hartem und weichem Gaumen lokalisiert sein (*Schultz, 1986, S.739*). In den meisten Fällen führt dies zu Beschwerden wie Flüssigkeitsfluss in die Nase oder Impaktion von Speiseresten. Ebenso können Sprachprobleme und Hörverlust den Patienten beeinträchtigen (*Schultz, 1986, S.741*). Obwohl nicht alle Fisteln eine operative Behandlung erfordern, ist es vorteilhaft, symptomatische Fisteln operativ zu behandeln (*Schultz, 1989, S.65*).

## 7.1. Diskussion des Tiermodells

Experimentelle Spaltuntersuchungen im Tiermodell wurden in der Literatur seit den 50er Jahren zahlreich beschrieben (*Jänicke et al., 1996, S.149*). Im Schrifttum genannten Modellen wurden neben verschiedenen Tiergruppen auch unterschiedlichen Typen, (chirurgisch/teratogenetisch/genetisch) zugeordnet.

Die Vielzahl der spaltexperimentellen Modelle deutet an, dass kein universelles Tiermodell existiert (*Jänicke et al., 1996, S.149*). Als Versuchstiere wurden zum Beispiel die Maus (*Gibson et al., 1981, S.475*), die Ratte (*Härle et al., 1974, S.612*), das Kaninchen (*Jänicke et al., 1995, S.196; el-Bokle et al., 1993, S.542*), die Katze (*Freng A. et al., 1979, S.401*), der Hund (*Bardach et al., 1988, S.103*), das Schaf (*Canady et al., 1997, S.37; Stern et al., 1993, S.371*), das Schwein (*Kirschner et al., 2006, S.1431*) und der Affe (*El-Deeb et al., 1985, S.523*) genannt. Aufgrund der phylogenetisch größeren Nähe sind bei chirurgisch-experimentellen Modellen Spaltbildungen beim Primaten, beim Schaf, beim Schwein oder beim Hund wünschenswert. Durch die große phylogenetische Nähe des Affen zum Menschen und der Ähnlichkeit bezüglich Gesichtswachstums, Anatomie und Dentition erscheinen Primaten besonders geeignet für Spaltuntersuchungen (*El-Deeb et al., 1985, S.523*). Im Vergleich zu Kleintieren sind Großtierversuche jedoch mit einem deutlich erhöhten Zeit- und Materialaufwand verknüpft. Die Bedingungen für die Tierversuchsgenehmigung bei Großtieren und vor allem Primaten in entsprechender Fallzahl sind ungleich schwerer. Dementsprechend ist bei Großtieren die statistische Ausbeute gering (*Jänicke et al., 1996, S.151*). Zahlreiche Studien zur operativen Spaltbildung beim Hund sind verfügbar. Hierbei wird der vor allem der Beagle-Hund für Untersuchungen zum Einfluss des Spaltverschlusses auf das Oberkieferwachstum eingesetzt (*Bardach et al., 1988, S.103*).

Hingegen wird das Schafmodell für Untersuchungen bezüglich fetaler Spaltverschlüsse genutzt (*Canady et al., 1997, S.37; Stern et al., 1993, S.371*). In der vorliegenden Pilotstudie wurde das Minischwein als Versuchsmodell zum Verschluss iatrogener oronasaler Fisteln ausgewählt. Literaturnennungen dazu sind selten. *Rosenquist et al.* verwendeten 1982 (S.566) das heranwachsende Schwein als Versuchstier, um die Effekte von Knochentransplantaten auf die Heilung des Oberkiefers zu untersuchen. Für Wundheilungsexperimente an der äußeren Haut ist das Schwein aufgrund der Analogien zum Menschen als ideales Versuchstier bekannt (*Steintraesser et al., 2006, S.279*). Die Nutzung des Schweines als

intraorales Versuchstiermodell ist verbreitet. Es existieren zahlreiche Studien (*Rosenquist et al. 1982, S.566; Craig et al., 2006, S.228; Kirschner et al., 2006, S.1431*). *Kirschner et al.* gelang es eine experimentelle Spalte im Schweineoberkiefer mit vollständiger oronasaler Fistel zu bilden (*Kirschner et al., 2006, S.1433*). Dieses Modell wurde 1984 erstmals von *Marx et al. (S.9)* beim Hund beschrieben. *El-Deeb et al. (S. 523)* untersuchte 1985 erfolgreich ein Verfahren zur Bildung einer oronasalen Verbindung beim Primaten. Beide Gruppen benutzten allerdings Acrylröhrchen als Stents, um einen spontanen Verschluss der Fisteln zu verhindern. Der Gaumen des Schweines ist lang gezogen und somit atypisch konfiguriert, bietet aber ausreichend Platz zur Bildung von Gaumenspalten und oronasalen Fisteln. Da in vorliegendem Versuch ebenfalls die Bildung einer oronasalen Verbindung und der Verschluss mit einem Biomaterial angestrebt werden sollte, erschien die Nutzung eines Schweinemodells analog zu *Kirschners* Versuchsanordnung sinnvoll. Um den Schutz des Operationsgebietes optimal zu gewährleisten, wurde den Tieren als Modifikation zu *Kirschners* Modell zusätzlich eine individuell gefertigte Verbandsplatte eingesetzt. Dies erlaubte in den ersten neun postoperativen Tagen nach Palatoplastik, die Tiere mit normaler Kost weiterzufüttern und die Vermeidung mechanischer, ernährungsbedingter Irritationen im Wundgebiet.

## 7.2. Diskussion des sekundären Gaumenspaltverschlusses

Der sekundäre Verschluss einer oronasalen Fistel ist nicht unproblematisch. Der erste chirurgische Eingriff hat zu einer Vernarbung des Gaumengewebes geführt. Dies erschwert einen Fistelverschluss (*Kirschner et al., 2006, S.1439*). Schlechte Durchblutung und geringe Compliance des umgebenden Gewebes erschweren die Behandlung und führen zu hohen Rezidivquoten nach versuchtem Fistelverschluss. Obwohl viele verschiedene Verschlussmethoden bekannt sind, erscheint keine davon ideal (*Kirschner et al., 2006, S.1439*). Über Nahlappentechniken, wie Stiel- und Brückenlappen (*Ehrenfeld, 2002, S.221*), über regional gestielte Lappen wie dem Zungenlappen (*Argamoso et al., 1990, S.402; Guerra-Santos und Altamarino, 1966, S.123*), mikrochirurgischen Gewebetransfer durch den freien Unterarmlappen (*Chen et al., 1992, S.757*) und freie Transplantate wie Knorpel oder Knochentransplantate (*Ohzumi et al., 1993, S.433; Schultz, 1986, S.285*) wurde umfassend berichtet. Darüber hinaus wurde der Einsatz von Gewebeexpandern und

die Distractionsosteogenese zum Fistelverschluss vorgeschlagen (*Alkan et al., 2007, S.112; Van Damme et al., 1996, S.255*).

Zahlreiche Vor- und Nachteile dieser Methoden wie auch das Auftreten von Rezidiven wurden dokumentiert. Einige Autoren betonen, dass ein zweilagiger Verschluss anzustreben ist (*Honnerbier et al., 2000, S.129*), wie es bei einem lokalen Mukoperiostlappen in Kombination mit einem Transplantat aus der Wangenmukosa erreicht wird. Allerdings sind diese Verfahren kompliziert und sichern keinen vollständigen und sicheren Fistelverschluss (*Ohzumi et al., 1993, S.438*). Starke Vernarbung des Gaumengewebes limitiert die Anwendung von lokalen Mukoperiostlappen (*Guerro-Santos et al., 1966, S.125*).

Die Anwendung des Zungenlappens zum Verschluss von Restlöchern ist praktikabel und zeigt eine hohe Erfolgsrate (*Posnik et al., 1987, S.911*), ist für den Patienten aber mit größerem Diskomfort verbunden, da zwei Operationen nötig sind und es zur Einschränkung der Mundöffnung kommen kann (*Ohzumi et al., 1993, S.438*). Auch andere intraorale gestielte Lappen wie der bukkale Muskulomukosalappen sind nicht ideal, da sie weit anterior liegende Fisteln kaum erreichen (*Chen et al., 1992, S.760*). Daher wird die Gewinnung komplexerer Lappenplastiken empfohlen, die jedoch zu einer höheren Entnahmemorbidity führen (*Chen et al., 1992, S.760*). Eine Alternative stellt der freie Gewebettransfer, zum Beispiel der radiale Unterarm lappen, dar. Hierbei wird gut durchblutetes Gewebe aus anderen Körperregionen in die schlecht vaskularisierte Region des voroperierten Gaumens transplantiert. Große Defekte können durch Inkaufnahme des erwähnten Entnahmedefekts damit gedeckt werden (*Chen et al., 1992, S.757*).

Andere Autoren nutzen Knorpel oder Knochentransplantate zum Gewebeersatz. 1993 untersuchten *Ohsumi et al.* den Verschluss von oronasalen Fisteln mittels Knorpeltransplantat erst im Tierversuch und dann in einer klinischen Studie. Dabei konnte bei 22 von 24 Patienten ein suffizienter Fistelverschluss erreicht werden. Eine Fistelgröße von 10 mm als limitierender Faktor für die Anwendbarkeit dieses Verfahrens wurde angegeben (*Ohsumi et al., 1993, S.433*).

*Van Damme et al.* stellten 1996 Untersuchungen zur mukoperiostalen Gewebeexpansion des Gaumens an. Es waren allerdings zwei Operationen nötig, da der Expander eingesetzt und wieder entfernt werden musste. Die Ergebnisse der

Studie stellten sich jedoch als unzureichend für einen vollständigen Fistelverschluss dar (*Van Damme et al., 1996, S.257*).

Aus den beschriebenen Techniken wird der Ruf nach einem idealen Transplantatgewebe deutlich. Ideal hieße, ein stets verfügbares Gewebe zu verwenden, welches gleichzeitig Narbenbildung und Wundkontraktion verhindert und dabei eine geringe Komplikationsrate aufweist (*Clark et al., 2003, S.41*). Auf der Suche nach solch einem Transplantat gewinnt die Verwendung von biologischen Ersatzmaterialien und gezüchtetem Gewebe immer mehr an Bedeutung. Bisher sind nur wenige Arbeiten, die derartige Materialien einsetzen, publiziert worden (*Kirschner et al., 2006, S.1439*). Diese Materialien bieten die Chance einer unbegrenzten Verfügbarkeit bei Vermeidung von Schmerzen in der Entnahmeregion. Besonders zu erwähnen sind hierbei die Arbeiten von *Clark et al., Kirschner et al.* und *Ophof et al.*

Das Hautersatzmaterial Alloderm<sup>®</sup> aus dezellularisierter Leichenhaut wurde von mehreren Arbeitsgruppen zum Verschluss von oronasalen Fisteln verwendet (*Clark et al., 2030, S.40; Kirschner et al., 2006, S.1431; Cole et al. 2006, S.636*). Im Jahr 2003 führten *Clark et al. (S.40)* als erste eine Studie über die Verwendung von Alloderm<sup>®</sup> als Gewebeersatz beim Erstverschluss großer Gaumenspalten durch. Sie untersuchten sieben Patienten mit Gaumenspalten von einer Größe über 15mm. Die Spalten wurden mittels zweilagiger Palatoplastik verschlossen. Alloderm<sup>®</sup> wurde dabei tief auf die orale Mukosa aufgelegt. Alle Transplantate wurden in die Wunde inkorporiert und es traten keine Entzündungsreaktionen auf. Alle Fisteln konnten geschlossen werden. *Clark et al.* stellten den Gebrauch von Alloderm<sup>®</sup> beim Verschluss von Gaumenspalten als sicher und effektiv dar. Dezellularisierte Haut wurde daher von dieser Gruppe auch für den Verschluss von bestehenden oronasalen Fisteln nach Erstopoperation vorgeschlagen (*Clark et al., 2003, S.44*). *Kirschner et al.* untersuchten 2006 eine Technik zur operativen Behandlung von oronasalen Fisteln unter Verwendung von Alloderm<sup>®</sup>. Zuerst wurde ein Tierversuch an Schweinen, dann in einer klinischen Studie durchgeführt. Im ersten Teil wurden bei sechs Yorkshire-Schweinen iatrogene oronasale Fisteln gesetzt. Nach zwei Wochen wurde bei drei Tieren zwischen oraler und nasaler Mucosa quer über die oronasale Fistel das azelluläre Hauttransplantat interponiert. Die anderen drei Tiere erhielten keine weitere Behandlung. Bei allen Tieren konnte klinisch und histologisch

ein erfolgreicher Verschluss der Fisteln demonstriert werden. Im zweiten Teil dieser Studie untersuchten sie dieses Verfahren bei neun Spaltpatienten mit Gaumenrestloch und konnten auch dort bei allen Patienten einen kompletten Verschluss erreichen. In zwei Fällen folgte auf eine Schleimhautdehiszenz mit Exposition des Hauttransplantats eine vollständige Wundheilung. Auch diese Arbeitsgruppe konnte erfolgreich den Verschluss von Gaumenfisteln mittels azellulären Hauttransplantaten zeigen und verspricht dies als eine einfache und effektive Technik für den spannungsfreien Verschluss von oronasalen Fisteln (*Kirschner et al., 2006, S.1431*). In einer weiteren retrospektiven Studie wurde von *Cole et al.* der Verschluss von persistierenden oronasalen Fisteln mittels Alloderm® an fünf Patienten untersucht. Die Patienten wurden drei Monate lang nach der Operation untersucht. Es wurde weder eine Abstoßung noch die Entwicklung von Dehiszenzen bei Verwendung dieser Transplantate beobachtet. Es zeigten sich weder persistierende Fisteln noch fisteltypische Symptome wie nasaler Reflux (*Cole et al., 2006, S.636*). Eine holländische Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit weiteren Dermisersatzstoffen zur Regeneration von Gaumendefekten. Dabei wurde zum einen ein Konstrukt aus unbehandelter Dermis und oralen Keratinozyten sowie Alloderm® in Kombination mit oralen Keratinozyten (*Ophof et al., 2007, S.1*) und zum anderen das Hautersatzmaterial Integra® (*Ophof et al., 2007, S.2689*) und deren Einfluss auf die Wundheilung von Gaumendefekten im Tierversuch erforscht. In der erstgenannten Studie beobachteten *Ophof et al.* allerdings ernsthafte Komplikationen. Das Transplantat wurde nach einer Woche abgestoßen, der dermale Anteil degradierte. Außerdem induzierte das Transplantat entzündliche Reaktionen. Diese negativen Effekte wurden anschließend mit einer zu langsamen Einsprossung von Blutgefäßen ins Transplantat begründet (*Ophof et al., 2007, S.1*). Die gleiche Forschungsgruppe untersuchte die *in vivo* Reaktion nach Implantation des Hautersatzmaterials Integra® am Hundegaumen. Dabei verwendeten sie Integra®-Implantate mit einer Silikonschicht und ohne Silikonschicht. Bessere Ergebnisse wurden bei Implantaten ohne Silikonschicht erzielt. Es zeigte sich eine schnellere Epithelialisierung und eine geringere Wundkontraktion (*Ophof et al., 2007, S.2689*).

Aus den bisher publizierten Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass ein ideales Transplantationsmaterial noch nicht gefunden wurde. Daher wird in vorliegender Arbeit die Möglichkeit der oronasalen Defektdeckung mit biologischen

Transplantatmaterialien wie HAM gesehen. Die Verwendung von HAM als ein mögliches allogenes Transplantatmaterial zum Verschluss von oronasalen Fisteln verspricht einige Vorteile. Amnionmembrantransplantate sind preiswert und einfach in der Anwendung (*Iijima et al., 2007, S.513, Kesting et al., 2007, S.354*). HAM kann anspruchlos gelagert werden und ist sofort verfügbar (*Güler et al., 1997, S.280*). Der Einsatz kryokonservierter HAM in der Augenheilkunde ist bereits weit verbreitet (*John et al., 2002, S.44*), ihre positiven physiologischen Eigenschaften wurden hinlänglich beschrieben. HAM stellt immunologisch privilegiertes Gewebe dar, und ruft keine Abstoßungsreaktionen hervor (*Kubo et al., 2001, S.1539*). Die Epithelialisierung (*Koizumi et al., 2000, S.173*) als auch die Neoangiogenese wird gefördert (*Faulk, 1980, S.1156*). Ferner besitzt HAM antiinflammatorische Eigenschaften (*Shimmura et al., 2001, S.408*) und hemmt die Narbenbildung (*Tseng et al., 1999, S.325*). Die Transplantation mehrschichtiger HAM als Xenotransplantat in immunologisch nichtprivilegiertem Gewebe wurde von *Kesting et al. 2007* erfolgreich untersucht. Daraus wurde die Nutzung in der rekonstruktiven Chirurgie vorgeschlagen (*Kesting et al., 2007, S.354*). Studien zur Anwendung humaner HAM in der Mundhöhle existieren

(*Kaluza et al., 1985, S.599; Lawson et al., 1986, S.163; Zohar et al., 1987, S.979; Güler et al., 1997, S.280, Rinastiti et al., 2006, S.247*). Auch hier konnten größtenteils positive Ergebnisse erreicht werden.

### 7.3. Diskussion der verwendeten Biomaterialien

In vorliegender Studie wurden mehrschichtige HAM sowie ein biologisches Hautersatzmaterial, Integra<sup>®</sup>, verwendet, um oronasale Fisteln im Schweinegaumen zu verschließen.

Das Hautersatzmaterial Integra<sup>®</sup> wird zur Abdeckung von Hautwunden und Förderung der Epithelbildung routinemäßig und mit gutem Erfolg verwendet (*Dantzer et al., 2001, S.173; Campitiello et al., 2005, S.69; Popescu et al., 2007, S.197; Reid et al., 2007, S889; Wood et al., 2007, S.693*). Für die Verwendung in der Mundhöhle fanden sich bislang kaum Anwendungsbeschreibungen, bis *Ophof et al. 2007* die Anwendung von Integra<sup>®</sup> in der Mundhöhle am Beagle untersuchten. Dabei wurden mehrere standardisierte Defekte des Mucoperiosts im harten Gaumen, jedoch keine oronasale Fistel, mit dem Dermisersatzmaterial verschlossen. Bei Verwendung von Integra<sup>®</sup> ohne Silikonschicht konnte eine rasche Wundheilung der Gaumendefekte

erreicht werden und die Wundkontraktion fiel geringer aus als in der nicht rekonstruierten Kontrollgruppe (*Ophof et al., 2007, S.2689*). Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie, wo die intraorale Anwendung von Integra<sup>®</sup> unbefriedigende Ergebnisse mit ausgedehnten entzündlichen Reaktionen, Entwicklung von Wundheilungsstörungen und letztlich persistierenden „Restlöchern“ erbrachte.

In einer Vielzahl von Studien seit 1910 konnten positive Effekte zur Geweberekonstruktion mit meist frischer HAM erzielt werden. Die HAM zeichnet sich aus durch Immuntoleranz (*Kubo et al., 2001, S.1539*) und antiinflammatorische Eigenschaften (*Hao et al., 2000, S.348*). *Kesting et al.* betonen in einem Review, in dem die Verwendung von HAM bei der Behandlung von Brandwunden in der englischsprachigen Literatur der letzten zwanzig Jahre gegenübergestellt wurde, weitere positive Eigenschaften. HAM fördert die Wundheilung und verringert die Narbenbildung. Bei der Behandlung von Brandwunden mittels HAM müssen Verbandswechsel seltener durchgeführt werden und Schmerzen werden reduziert (*Kesting et al., 2008, S.907*). Durch HAM wird eine Förderung der Reepithelialisierung erreicht (*Somerville PG, 1982, S.226; Colocho et al., 1974, S.371*). Aktuelle Studien zur Verwendung der seit den 1990er Jahren erhältlichen *kryokonservierten HAM* zeigten gleichermaßen ermutigende Ergebnisse bei der Förderung der Wundheilung. Jedoch wurde auch von Einschränkungen der mechanischen als auch zeitlichen Stabilität berichtet. *Mermet et al.* (S.459) behandelten in einem klinischen Versuch venöse Beinulzera mit Auflage einer einlagigen HAM. In den ersten 14 Tagen nach HAM-Auflage wurde eine Förderung der Reepithelialisierung verzeichnet. Nach diesem Intervall kam die Reepithelialisierung allerdings zum Erliegen, was mit der Degradation der HAM nach 14 Tagen korrelierte (*Mermet et al., 2006, S.461*). 2006 konnten *Rinastiti et al.* positive Ergebnisse bei der Transplantation von HAM in gingivale Stanzbiopsie-Wunden beim Kaninchen erreichen. Nach histologischer Untersuchung der Proben und deren statistischer Auswertung konnte ebenfalls eine rasche Reepithelialisierung und die Bildung von Granulationsgewebe mit zahlreichen Blutgefäßen und Fibroblasten festgestellt werden (*Rinastiti et al., 2006, S.247*). Als Grund für die Beschleunigung der Epithelialisierung nach Transplantation des Amnionepithels wird in der Literatur deren hohe Anzahl von Wachstumsfaktoren genannt. Bei -80° konservierte HAM exprimiert mRNA für eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie

EGF, TGF-alpha, KGF, HGF, bFGF, TGF-beta-1, -beta-2, -beta-3 und andere (Koizumi et al., 2000, S.173).

Die antiinflammatorische Wirkung wird durch die Freisetzung von antiinflammatorischen Proteinen, welche die Expression von Interleukinen hemmen erklärt (Hao et al., 2000, S.350; Solomon et al., 2001, S.444). Es konnte festgestellt werden, dass eine entzündliche Reaktion des Gewebes nach Deckung der Defekte mit HAM geringer verlief als bei den unbehandelten Defekten der Kontrollgruppe (Rinastiti et al., 2006, S.247). Nach Rekonstruktion der „Restlöcher“ mit HAM in vorliegender Arbeit traten während des gesamten Wundheilungsprozess keine klinisch und histologisch relevanten Entzündungsreaktionen auf.

Während im okulären Bereich antiangiogenetische Effekte nach Amniontransplantation festgestellt wurden (Hao et al., 2000, S.349), zeigten Arbeiten, in denen meist frische HAM in extraokuläre Körperregionen transplantiert wurde, Anzeichen für eine Neoangiogenese (Faulk et al., 1980, S.1156; Rinastiti et al., 2006, S.249). Bei der Transplantation von HAM zur intraoralen Vestibulumplastik wurde ein erhöhter postoperativer Blutfluss gemessen (Güler et al., 1997, S.282). 2007 führten Iijima et al. eine Studie durch, bei der die Transplantation von HAM zur Blasenrekonstruktion an Ratten erforscht wurde. Histologisch und in vitro wurde die Transplantation von HAM zur Blasenrekonstruktion verglichen mit der Transplantation von Intestinalmucosa. Im Verlauf der Studie starben 42% der operierten Tiere. Als Grund für die hohe Mortalitätsrate wird eine Urinextravasation in die Bauchhöhle angegeben. Histologisch konnte bei den restlichen Tieren die Regeneration von Nervenfasern in allen drei Lagen der Blasenwand festgestellt werden. In vitro beobachtete die Forschungsgruppe gute funktionelle Ergebnisse des regenerierten Blasengewebes. HAM kann als Ersatzgewebe bei der Blasenrekonstruktion verwendet werden. Die Präparation stellt sich einfacher dar als die von herkömmlich gebrauchter Intestinalmucosa. Außerdem ruft ihre Verwendung weniger ethische Fragen auf (Iijima et al., 2007, S.513). Kesting et al. untersuchten 2008 zum die Transplantation von ein- und mehrschichtiger HAM auf die Bauchwandmuskulatur von Sprague-Dawley-Ratten. Dabei zeigte die Deckung mit mehrschichtiger HAM Vorteile. Sie degradierte später und die Entzündungsreaktion fiel milder aus (Kesting et al., 2008, S.684).

Außerdem wurde an zwanzig weiteren Ratten der Bauchwandverschluss mit HAM im Vergleich zu einem polypropylenhaltigen Material untersucht. Bei der Verwendung von HAM konnte bei allen Ratten ein Verschluss erreicht werden und es zeigten sich weniger Adhäsionen (*Kesting et al., 2008, S.684*). In einem weiteren Versuch wurde ein mehrlagiger HAM-Patch den epigastrischen Faszien-Fettlappenaufgenäht. Es zeigten sich keine Abstoßungsreaktionen nach Xenotransplantation. Die neue, präfabrizierte Lappenoberfläche zeigte sich von ihrer mechanischen Beschaffenheit der Mundhöhle sehr ähnlich. Gestielt an den epigastrischen Gefäßen konnte der Amnion-Faszienlappen gehoben und nach Anschluss an die A. carotis und die Jugularvene zur Deckung intraoraler Defekte in die Mundhöhle eingebracht werden (*Kesting et al., 2007, S.356*).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Neovaskularisation der neu entstandenen Gewebebrücke nach HAM-Transplantation festgestellt werden. Unterhalb des Epithels bildete sich fibrovaskuläre Gewebe bestehend aus Fibroblasten und Blutgefäßen. Zahlreiche Endothelzellen konnten immunhistochemisch mittels der Faktor VIII-Färbung nachgewiesen werden. Eine Revaskularisation des Gewebes fand statt und Abstoßungsreaktionen oder Entzündungszeichen blieben aus. Die Studie zeigt die erfolgreiche Xenotransplantation von kryokonservierter, humaner HAM in operativ-künstlich gestalteten Gaumenspalten mit oronasaler Verbindung im Minischweinmodell.

## **8. Zusammenfassung**

In dieser Pilotstudie wurde die Verwendung kryokonservierter, mehrschichtiger, HAM als Transplantatmaterial für den Verschluss von oronasalen Fisteln im Minipigmodell untersucht. An sieben Minischweinen wurden operativ Gaumenfisteln in der Mitte des harten Gaumens gesetzt. Nach zwei Wochen waren Fistelgänge von 13-15mm Durchmesser mit oronasaler Verbindung bei allen sechs Tieren entstanden. In einer weiteren Operation wurden die Gaumendefekte geschlossen und bei je drei zufällig ausgewählten Tieren mit mehrlagiger, humaner HAM und bei drei Tieren mit Integra<sup>®</sup> gedeckt. Ein Tier diente als Kontrolltier. Wundkontrollen erfolgten an Tag 3, 6, 9 und 40 nach Gaumenverschluss. Nach Tötung der Tiere an Tag 40 erfolgte die histologische und immunhistologische Auswertung der gewonnenen Präparate des harten Gaumens. Zur histologischen Auswertung wurde die HE-Färbung zur Darstellung der Zellinfiltration und Gewebsarchitektur sowie die EvG-Färbung zur Darstellung der elastischen Fasern genutzt. Die immunhistologische Untersuchung der Präparate erfolgte mit einem von-Willebrand-Faktor-Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark) zur Detektierung der Endothelzellen neugebildeter Gefäßkapillaren, einem Pancytokeratin-Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark) zur Darstellung von Cytokeratin und einem  $\beta$ -HCG-Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark) zur Detektion verbliebenen Amniongewebes. In zwei von drei Fällen der mit humaner HAM gedeckten Gaumenspalten konnte ein vollständiger Verschluss erreicht werden. Eine durchschnittliche Fistelgröße von 2mm an Tag 40 p.o. wurde erreicht. Der durchschnittliche Fisteldurchmesser der mit Integra<sup>®</sup> gedeckten Gaumenfisteln lag bei 11,67mm an Tag 40 nach Gaumenverschluss. Es konnte eine signifikante Verkleinerung des Fisteldurchmessers der mit HAM gedeckten Gaumendefekte gegenüber den mit Integra<sup>®</sup> gedeckten Defekten erreicht werden ( $p=0,04$ ). Die Wundheilung verlief bei den mit HAM gedeckten Defekten unauffällig und Entzündungsreaktionen blieben aus. Histologisch und immunhistologisch konnte eine vollständige Reepithelialisierung bei den zwei geschlossenen Fisteln gezeigt werden. Eine Revaskularisation des Gewebes fand statt und Abstoßungsreaktionen oder Entzündungszeichen blieben aus. Die Studie zeigt die erfolgreiche Xenotransplantation von kryokonservierter, humaner HAM in operativ-künstlich gestalteten Gaumenspalten mit oronasaler Verbindung im Minischweinmodell.

## **9. Summary**

We investigated the use of cryopreserved, multilayered human amnion membrane as a grafting material for the closure of oronasal fistula in a minipig model. With seven Minipigs respectively a mid-palate oronasal fistulae was created. After two weeks oronasal relations with a diameter between 13mm and 15mm in all seven animals had developed. In a second operation the palatal defects were repaired. Each three randomly selected animals received human amnion membrane as a grafting material and the other three animals were provided with Integra®. One animal served as control object. The wounds were inspected on days 3, 6, 9 and 40. After sacrifice of the animals on day 40 p.o. the surgical sites, which had been harvested, were evaluated. We used the H&E staining to demonstrate cell infiltration and tissue construction and applied Elastica von Gieson staining to show the elastic fibers. The immunohistochemical investigation of the biopsies was conducted after staining by help of the von-Willebrand-Faktor (Dako, Glostrup, Denmark) to detect the endothelial cells, Pancytokeratin (Dako, Glostrup, Denmark) to detect cytokeratin and beta-hcg (Dako, Glostrup, Denmark) to detect the amnion cells. In two of three cases of the palatal clefts transplanted with human amnion membrane, a complete closure had been achieved. The average diameter of the fistulae covered with HAM was 2mm on day 40 p.o. and the average diameter of the fistulae closed with Integra was 11,76mm on day 40 after operation. There was a significant reduction of fistulae diameter covered with HAM compared to fistulae covered with Integra. The wound healing was uncomplicated and there was no infection to be detected. We were able to identify a complete reepitheliasation of the two closed fistulae by histological and immunohistochemical methods. The tissue had revascularized and again, there was no rejection or infection. The results of the study show that the transplantation of amnion membrane in order to heal oronasal fistulae promotes a rapid epitheliasation at the same time suppressing infection. Moreover it promotes vascularisation and the development of elastic fibers with the consequence of a thick fibrovascular tissue developing below the epithel. The study demonstrates a successful xenotransplantation of cryoconserved human amnion membrane in surgically created palatal clefts with oronasal fistula by help of a minipig model.

## **10. Literaturverzeichnis**

1. Abyholm FE, Borchgrevink HH, Eskeland G.  
Palatal fistulae following cleft palate surgery.  
Scand J Plast Reconstr Surg 13 (1979) 295
  
2. Alkan A, Bas B, Özer M, Bayram M.  
Closure of large palatal fistula with maxillary segmental distraction osteogenesis  
in a cleft palate patient.  
Cleft Palate Craniofacial J 44 (2007) 112-115
  
3. Amaratunga NA.  
Occurrence of oronasal fistulas in operated cleft palate patients.  
J Oral Maxillofac Surg 46 (1988) 834-8
  
4. Argamoso RV.  
The tongue flap: placement and fixation for closure of postpalatoplasty fistulae.  
Cleft Palate J 27 (1990) 402-10
  
5. Bajaj AK, Wonworawatn AA, Punjabi A.  
Management of alveolar clefts.  
J Craniofac Surg 14 (2003) 840-6

6. Bardach J, Kelly KM.  
Role of animal models in experimental studies of craniofacial growth following cleft lip and palate repair.  
Cleft Palate J 25 (1988) 103-13
  
7. Bahar Tuna E, Topcuoglu N, Ilhan B, Gencay K, Kulekci G.  
Staphylococcus aureus transmission through oronasal fistula in children with cleft lip and palate.  
Cleft Palate Craniofac J 45 (2008) 477-80
  
8. Bennett JP, Matthews R, Faulk WP.  
Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion.  
Lancet 31(1980) 1153-6
  
9. Bergman MD.  
Early non-surgical closure of postoperative palatal fistulae.  
Plast Reconstr Surg 4 (1978) 537-41
  
10. Brennan PA, Markus AF, Flood TR, Downie IP, Uppal R.  
Do oral flora colonize the nasal floor of patients with oronasal fistulae?  
Cleft Palate Craniofac J 38 (2001) 399-400

11. Brennan PA, Willy P, Anand R, Markus AF.  
Colonization of the cleft nasal floor by anaerobic oral flora in patients with oronasal fistulae.  
Cleft Palate Craniofac J 40 (2003) 431-2
  
12. Bull H, Lenzen C.  
Differentialdiagnostik und Therapie der Lippen- Kiefer- Gaumen- Spalten.  
Zentralbl Gynakol 125 (2003) 398-403
  
13. Bourne GL.  
The Anatomy of the Human Amnion and Chorion.  
J R Soc Med 59 (1966) 1127-1128
  
14. Campitiello E, della Corte A, Fattopace A, D Acunzi D, Canonica S.  
The use of artificial dermis in the treatment of chronic and acute wounds:  
Regeneration of dermis and wound healing.  
Acta Biomed 76 (2005) 69-71
  
15. Canady JW, Ladas SK, Morris H, Thompson SA.  
In utero cleft palate repair in the ovine model.  
Cleft Palate J 31 (1994) 37-44

16. Chen HC, Ganos DL, Coessens BC, Kyutoku S, Noordhoff MS.  
Free forearm flap for closure of difficult oronasal fistulas in the cleft palate patients.  
Plast Reconstr Surg 90 (1992) 757-62
  
17. Clark JM, Saffold SH, Jeffery M, Israel MD.  
Decellularized dermal grafting in cleft palate repair.  
Arch Facial Plast Surg 5 (2003) 40-44
  
18. Cohen SR, Kalinowski J, LaRossa D, Randall P.  
Cleft palate fistulas: A multivariate statistical analysis of prevalence, etiology, and surgical management.  
Plast Reconstr Surg 87 (1991) 1041-7
  
19. Cole P, Horn TW, Thaller S.  
The use of decellurized dermal grafting (AlloDerm) in persistent oro-nasal fistulas after tertiary cleft palate repair.  
J Craniofac Surg 17 (2006) 636-41
  
20. Colucho G, Graham WP, Green AE, Dale MW, Dennis L.  
Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing.  
Arch Surg 109 (1974) 370-3

21. Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarova M.  
Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California.  
Am J Med Gen 79 (1998) 42-47
  
22. Craig RG, Kamer AR, Kallur SP, Inoue M, Tarnow DP.  
Effects of periodontal cell grafts and enamel matrix proteins on the  
implantconnective tissue interface: a pilot study in the minipig.  
J Oral Implantol 32 (2006) 228-36
  
23. Correa Chem R, Franciosi LF.  
Dorsalis pedis free flap to close extensive palate fistulae.  
Microsurgery 4 (1983) 35-39
  
24. Contreras O, Gonzales M, Villalobos RA.  
The tongue and forehead flap in the closure of residual oronasal fistulae.  
J Craniomaxfac Surg 17 (1989) 39-41
  
25. Dantzer E, Queruel P, Salinier L, Palmier B, Quinot JF.  
Integra, a new surgical alternative for the treatment of massive burns. Clinical  
evaluation of acute and reconstructive surgery: 39 cases.  
Ann Chir Plast Esthet 46 (2001) 173-89

26. Diah E, Lo LJ, Yun C, Wang R, Wahyuni LK, Chen YR.  
Cleft oronasal fistula: a review of treatment results and a surgical management algorithm proposal.  
Chang Gung Med J 30 (2007) 529-37
27. Ehrenfeld M, Schwenger N, Bacher M.  
Lippen- Kiefer- Gaumen- Spalten und Gesichtsspalten  
In: „Zahn- Mund- Kiefer- Heilkunde“  
Schwenger, N., Ehrenfeld, M. (Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart - New York  
3.Auflage, Band 2 (2002) 195-233
28. El-Deeb M, Horswell B, Waite DE.  
A primate model for producing alveolar cleft defects.  
J Oral Maxillofac Surg 43 (1993) 523-7
29. Emory RE Jr, Clay RP, Bite U, Jackson I.  
Fistula formation and repair after palatal closure: an institutional perspective.  
Plast Reconstr Surg 99 (1997) 1535-1538
30. El-Hakim IE, El-Fakharany AM.  
The use of the pedicled buccal fat pad (BFP) and palatal rotating flaps in closure of oroantral communications and palatal defects.  
J Laryngol Otol 113 (1999) 834-8

31. Freng A.

Single layered perioplasty in experimental midpalate clefts. A postoperative histological study on the cat.

Scand J Plast Reconstr Surg 13 (1979) 401

32. Faulk WP, Matthews R, Stevens PJ, Bennet JP, Burgos H, His BL.

Human amnion as an adjunct in wound healing.

Lancet 31 (1980) 1156-8

33. Fukada K , Chikama TI, Nakamura M, Nishida T.

Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva.

Cornea 18 (1999) 73-79

34. Furnas DW.

Temporal osteocutaneous island flap for complete reconstruction of cleft palate defects.

Scand J Reconstr Surg 21 (1987) 119-128

35. Gabka J.

Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.

Öster Zahnärztl Ztg 37 (1986) 48-53

36. Gibson JE, Becker BA.  
The teratogenicity of cyclophosphamide in mice.  
Cancer Res 28 (1981) 475
  
37. Guerro-Santos J, Altamarino JT.  
The use of lingual flaps in repair of fistulas of the hard palate.  
Plast Reconstr Surg 38 (1966) 123-128
  
38. Gruss JS, Jirsch DW.  
Human amniotic membrane: a versatile wound dressing.  
CMA Journal (1978) 1237-1245
  
39. Härle F.  
Primary, early secondary or late secondary osteoplasty in cleft surgery.  
Clinical and animal experimental study.  
Dtsch Zahnärztl Z 28(1973) 612-7, 612
  
40. Hao Y, Mao DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F.  
Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane.  
Cornea 19 (2000) 348-52

41. Heiligenhaus A, Bauer D, Meller D, Steuhl KP, Tseng SCG.  
Improvement of HSV-1 necrotizing keratitis with amniotic membrane transplantation.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (2001) 1969-74
  
42. Honnerbier MB, Johnson DS, Parsa AA, Dorian A, Parsa FD.  
Closure of palatal fistula with a local mucoperiosteal flap lined with buccal mucosal graft.  
*Cleft Palate Craniofac J* 37 (2000) 127-9
  
43. Horch HH.  
Kraniofaziale Fehlbildungen: Lippen- Kiefer- Gaumenspalten  
In: „Praxis der Zahnheilkunde, Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie II“,  
Horch, H.-H. (Hrsg.), Urban und Schwarzenberg, München- Wien- Baltimore  
3. Auflage (1998) 29
  
44. Iijima K, Igawa Y, Imamura T, Moriizumi T, Nikaido T, Konishi I.  
Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats  
*Tissue Eng* 13 (2007) 513-524
  
45. Ishii M, Ishii Y, Moriyama T, Gunji A, Morita K, Imaizumi F, Enamoto S.  
Simultaneous Cortex bone plate graft with particulate marrow and cancellous bone for reliable closure of palatal fistulae associated with cleft deformities.  
*Cleft Palate Craniofac. J* 39 (2002) 364-369

46. Jackson IT, Moreira-Gonzalez AA, Rogers A, Beal JB.  
The buccal flap - a useful technique in cleft palate repair?  
Cleft Palate J 41 (2004) 144-51
47. Jänicke S, Huber A.  
Tierexperimentelle Spaltmodelle im Vergleich.  
Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir 20 (1996) 149-153
48. Jänicke S, Huber HJ, Kivits A.  
Experimentelle Oberkieferspaltbildung beim wachsenden Chinchillakaninchen.  
Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir 19 (1995) 196-200
49. Kesting MR, Mücke T, Demtroeder C, Wolff KD, Steinsträsser L.  
Kryokonservierte humane Amnionmembran in der rekonstruktiven Chirurgie.  
Zeitschr f Wundheilung 6 (2007) 354-359
50. Kesting MR, Loeffelbein DJ, Steinsträsser L, Mücke T, Demtroeder C,  
Sommerer F, Hoelzle F, Wolff KD.  
Cryopreserved human amniotic membrane for soft tissue repair in rats.  
Ann Plast Surg 60(2008) 684-691

51. Kesting MR, Wolff KD, Hohlweg-Majert B, Steinsträsser L.  
The Role of Allogenic Amniotic Membrane in Burn Treatment.  
J Burn Care Res 29 (2008) 907-916
52. Kirschner RE, Cabiling DS.  
Repair of Oronasal Fistulae with Acellular Dermal Matrices.  
Plast Reconstr Surg 118 (2006) 1431-1440
53. King FB.  
Cell surface and intercellular junctions in human amniotic epithelium: An  
electron microscopic and freeze-fracture study.  
Anat Rec 203 (1982) 73-82
54. Koch J, Koch H, Grzonka M, Gundlach KKH.  
Die LKGS (N)-Spalten und ihre Kodierung mit der LHS-Nomenklatur.  
Mund Kiefer Gesichts Chir 7 (2003) 339-344
55. Kubo M, Sonoda YM, Usui M.  
Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental  
xenotransplantation.  
Invest Ophthalmol Vis Sci 42 (2001) 1539-46

56. Lawson VG.  
Pectoralis major muscle flap with amnion in oral cavity reconstruction.  
Aust N Z J Surg 56 (1986) 163-6
57. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Bright N and Macvicar J.  
Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V, VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes.  
Plazenta 14 (1993) 385-406
58. Marx RE, Miller RJ, Ehler WJ, Hubbard G, Malinin TJ.  
A comparison of particulate allogenic and particulate autogenous bone grafts into maxillary alveolar clefts in dogs.  
J oral Maxillofac Surg 42 (1984) 3-9
59. Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, cairey-Remonnay S, Maddens ST, Riehtmüller D, Tiberghien P, Humbert Ph, Aubin F.  
Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers.  
Wound Rep Reg 15 (2007) 459-464
60. Murube J.  
Early clinical use of amniotic membrane in medicine and ophthalmology.  
Ocul Surf 4 (2006) 115

61. Murrell GL, Requena R, Karakla DW.  
Oronasal fistula repair with three layers.  
Plast Reconstr Surg 107 (2001) 147-7
62. Muzaffar A, Byrd HS, Rohrich RJ  
Incidence of cleft palate fistula: an institutional experience with two –stage palatal repair.  
Plast Reconstr Surg 108 (2001) 1515-8
63. Nakakita N, Maeda K, Ando S, Ojimi H, Usurgi R.  
Use of buccal myomucosal flap to close palatal fistula after cleft palatal repair.  
Br J Plast surg 43 (1990) 452-459
64. Neumann HJ.  
Untersuchung und Ergebnisse zur Ätiologie und Prävention von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.  
Z ärztl Fortbild 83 (1989) 155-158
65. Ohsumi N, Onizuka T, Ito Y.  
Use of a free conchal cartilage graft for closure of a palatal fistula: an experimental study and clinical application.  
Plast Reconstr Surg 91 (1993) 433-40

66. Ophof R, Maltha JC, von den Hoff J, Kuijpers-Jagtman AM.  
Histologic evaluation of skin-derived and collagen-based substrates implanted in palatal wounds.  
Wounds Rep Reg 12 (2004) 528-532
67. Ophof R, Maltha JC, von den Hoff J, Kuijpers-Jagtman AM  
Implantation of tissue-engineered mucoasal substitutes in the dog palate.  
Eur J Orthod 10 (2007) 1-9
68. Ophof R, Maltha JC, von den Hoff J, Kuijpers-Jagtman AM  
Evaluation of a Collagen-Glycosaminoglycan Dermal Substitute in the Dog palate.  
Tissue Eng 13 (2007) 2689-2697
69. Oyama N, Bhogal BS, Carrington PG, Black MM  
Human placental amnion is a novel substrate for detecting autoantibodies in autoimmune bullous diseases by immunoblotting.  
Br J dermatol 148 (2003) 939-944
70. Park WC, Tseng SCG.  
Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood and amniotic membrane in PRK.  
Invest Ophthalmol Vis Sci 41 (2000) 2906-14

71. Pfeifer G.

Die Entwicklungsgeschichte der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten als Leitspur für die Behandlung.

Monatsschr Kinderheilkd 114 (1966) 244-9

72. Popescu S, Ghetu N, Grosu O, Nastasa M, Pieptu D.

Integra-a therapeutic alternative in reconstructive surgery. Our first experience.

Chirurgica ( Bucur) 102 (2007) 197-204

73. Posnick JC, Getz SB Jr.

Surgical closure of end-stage palatal fistula using anteriorly-based dorsal tongue-flaps.

J Oral Maxillofac Surg 45 (1987) 907

74. Quintanilla-Martinez L, Kremer M , Specht K , Calzada-Wack J, Nathrath M, Schaich R, Hofler H and Fend F.

Analysis of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat 3) Pathway in Multiple Myeloma: Stat 3 activation and cyclin D1 dysregulation are mutually exclusive events.

Am J Pathol 162 (2003) 1449-61

75. Reid MJ, Currie MD, James MD, Sharpe JR.

Effect of artificial dermal substitute, cultured keratinocytes and split thickness skin graft on wound contraction.

Wound Rep Reg 15 (2007) 889-896

76. Rinastiti M, Harijadi, Santoso AL, Sosroseno W.  
Histological evaluation of rabbit gingival wound healing with human amniotic membrane.  
Int J oral and maxillofacial Surgery 35 (2006) 247-251
77. Robertson AG, Mc Keown DJ, Bello-Rojas G.  
Use of the buccal myomucosal flap in the secondary cleft palate repair.  
Plast Reconstr Surg 122 (2008) 910-7
78. Rosenquist JB, Rosenquist K, Sund G.  
Effects of bone grafting on maxillary bone healing in the growing pig.  
J Oral Maxillofac Surg 40 (1982) 566-9
79. Robson MC, Krizek TJ.  
The effects of human amniotic membrane on the bacterial population of infected rat burns.  
Ann Surg 177 (1973) 144-9
80. Sadler TW.  
Medizinische Embryologie  
Thieme-Verlag, Stuttgart, 10. Auflage, 104-125

81. Samandari MH, Yaghmaei M, Ejlali M, Moshref M, Saffar AS.  
Use of amnion as a graft material in vestibuloplasty: a preliminary report.  
OralSurg, OralMed, OralPat, OralRad and Endo 97 (2004) 574-578
82. Sangwan VS, Burman S, Tejwani S, Mahesh SP, Murthy R.  
Amniotic membrane transplantation: A review of current indications in the  
management of ophthalmic disorders.  
Indian J Ophtalmol 55 (2007) 251-260
83. Schultz RC.  
Managment and timing of cleft palate fistula repair.  
Plast Reconstr Surg 78 (1986) 285-747
84. Schultz RC.  
Cleft palate fistula repair, improved results by the addition of bone.  
J Craniomaxillofac Surg 17 (1989) 34-6
85. Solomon A.  
Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal  
epithelial cell cultured on the amniotic membrane stromal matrix.  
Br J Ophtalmol 85 (2001) 444-9

86. Schuhmacher GH.  
Anatomie für Zahnmediziner: Lehrbuch und Atlas  
3. Auflage, Heidelberg: Hüthig-Verlag (1997) 37-38
87. Shao C, Sima J, Zhang SX, Jin J, Reinach P, Wang Z, Ma JX.  
Suppression of cornea neovaskularation by PEDF release from human  
amniotic membranes.  
Invest Ophtalmol Vis Sci 45 (2004) 1758-62
88. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K.  
Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface  
disorders.  
Cornea 20 (2001) 408-13
89. Somerville PG.  
The possible use of amniotic membrane in chronic leg ulcers.  
Phlebologie 35 (1982) 223-9
90. Stern M, Dodson TB, Longaker MT, Lorenz HP, Harrison MR, Kaban LB.  
Fetal cleft lip repair in lambs: histologic characteristics of the healing wound.  
Int J Oral Maxillofac Surg 22 (1993) 371-4

91. Steinsträsser L, Vranckx JJ, Mohammadi-Tabrisi A, Jacobsen F, Mittler D, Lehnhardt M, Langer S, Kuhnen C, Gatermann S, Steinau HU, Eriksson E.  
A novel titanium wound chamber for the study of the infection in pigs.  
Comp Med 56 (2006) 279-85
92. Trelford JD, Hanson FW, Anderson DG.  
Wound healing and the amniotic membrane.  
J Med 6 (1975) 383-388
93. Tseng SCG, Li D-Q, Ma X,  
Suppression of transforming growth factor isoforms, TGF- $\beta$  receptor II and myofibroblasts differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix.  
J Cell Physiol 179 (1999) 325-35
94. Tuna BE, Topuoglu N, Ilhan B, Kulekci G.  
Staphylococcus aureus transmission through oronasal fistula in children with cleft lip and palate.  
Cleft Palate Craniofac J 45 (2008) 477-80
95. Van Damme PA, Freihofer HP.  
Palatal mucoperiosteal expansion as an adjunct to palatal fistula repair  
Case report and review of the literature.  
Cleft Palate Craniofac J 33 (1996) 255-257

96. Van Herendael BJ, Oberti C, Brosens I.

Microanatomy of the human amniotic membrane: a light microscopic, transmission and scanning microscopic study.

Obstet Gynecol 131 (1978) 872-880

97. Van Versen-Höynck F, Syring C, Bachmann S, Möller DE.

The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts- light and scanning electron microscopic studies.

Cell Tissue Bank 5 (2004) 45-56

98. Wang MX.

Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits.

J Cataract Refract Surg 27 (2001) 310-9

99. Wood FM, Stoner ML, Fowler V, Fear MW.

The use of a non-cultured autologous cell suspension and Integra® dermal regeneration template to repair full-thickness skin wounds in a porcine model: A one-step process.

Burns 33 (2007) 693-700

## **11. Lebenslauf**

### **Mariella Christina Claßen**

---

Geburt 15.10.1982 in Krefeld

Nationalität deutsch

Familienstand ledig

Konfession römisch-katholisch

### **Schulbildung**

---

1989 – 1993 Grundschule Sollbrüggenstraße,  
Krefeld

1993-2002 Gymnasium am Moltkeplatz, Krefeld

Abschluss

Allgemeine Hochschulreife

## Universitäre Ausbildung

---

2002	Beginn d. Studiums der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde an der Universität Witten/Herdecke
2004	Erfolgreicher Abschluss der Naturwissenschaftlichen Vorprüfung
2005	Erfolgreicher Abschluss der Zahnärztlichen Vorprüfung
2007	Abschluss Staatsexamen
Dez.2007-Mai 2008	Tätigkeit als Doktorandin, der Arbeitsgruppe für molekulare Wundheilung und Gentherapie der Universitätsklinik für plastische Chirurgie und Schwerbrandverletzte des berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikum Bergmannsheil in Bochum
Seit Mai 2008	Tätigkeit als Assistenz Zahnärztin in Essen

## **12. Danksagung**

Ich möchte herzlich Priv.-Doz. Dr. Dr. Marco Kesting und Dr. Dr. Denys Loeffelbein für die gute Betreuung während des gesamten Dissertationsprojektes danken. Sie standen mir stets mit gutem Rat beiseite. Außerdem führten sie die intraoralen Operationen durch, wobei ich assistieren durfte.

Auch bei Prof. Dr. Lars Steinsträsser und dem Team der Arbeitsgruppe für molekulare Wundheilung und Gentherapie der Universitätsklinik für plastische Chirurgie und Schwerbrandverletzte des berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikum Bergmannsheil in Bochum, im besonderen bei Andrea Rittig, Frank Jacobsen und Rafael Hasler, möchte ich mich für die fortwährende Unterstützung während der praktischen Versuchsdurchführung bedanken. Außerdem bedanke ich mich für die Überlassung der entsprechenden Räumlichkeiten und Gerätschaften zur Präparation und Lagerung der HAM.

Ein weiterer Dank geht an die Frauenklinik des Marienhospital in Witten unter der Leitung von Prof. Dr. Hatzmann, wo wir die Plazentae zur Hebung der HAM gewonnen haben.

Dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Bergmannsheils in Bochum danke ich für die Erstellung der histologischen Schnitte und Färbungen der Präparate.

Frau Dr. Julia Slotta-Huspenina vom Institut für Pathologie der Technischen Universität München danke ich herzlich für die Durchführung der immunhistologischen Färbungen.

Außerdem möchte ich Dr. Alexander Dietzel für die Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit danken und meinen Eltern, die eine große Unterstützung darstellten.