

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie

Klinikum rechts der Isar

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

Xenogene Transplantation humaner Amnionepithelmembran

**Experimentelle Untersuchungen zur Immunogenität xenogen
transplantierter kryopreservierter humaner Amnionmembran auf
Bauchwandmuskulatur von Sprague-Dawley Ratten in Mono- und
Multilayer- Technik**

Cédric Rémi Dieter Demtröder

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. M. R. Kesting

2. Univ.-Prof. Dr. H.-G. Machens

Die Dissertation wurde am 10.12.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2011 angenommen.

„Alles Tun des Menschen ist gerichtet in die Zukunft, gleich einem Schiff auf dem Meer, das von einem Schiffsführer geführt wird, nach dem was ihm begegnet, nicht nach dem gestrigen Wind, sondern nach dem heutigen“

Theophrast von Hohenheim

Paracelsus (1493 - 1541)



Segelschiff, Öl, um 1815 von Caspar David Friedrich

Meiner Liebsten

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	S. 1
2.	Einleitung	S. 4
2.1	Amnion	S. 4
2.2	Phylogenese der Amnionmembran	S. 5
2.3	Anatomie und Morphologie	S. 12
2.4	Historische Entwicklung der Amnionmembrantransplantation	S. 14
2.5	Besondere Eigenschaften	S. 20
2.5.1	Immuntoleranz	S. 20
2.5.2	Antiinflammatorische Eigenschaft und Immunprivileg	S. 23
2.5.3	Anitfibroblastische Eigenschaft	S. 24
2.5.4	Antiangiogenetische Eigenschaft	S. 26
2.5.5	Antimikrobielle Eigenschaft	S. 27
2.5.6	Epithelialisierung	S. 29
2.6	Konservierung und Utilisierung der Amnionmembran	S. 33
2.7	Zielsetzung	S. 34
3.	Methodik	S. 36
3.1	Vorbereitung	S. 36
3.1.1	Aufbereitung der Amnionmembran	S. 36
3.1.2	Versuchstiere	S. 40
3.1.3	Immunsuppression mit Ciclosporin A	S. 40
3.2	Transplantation	S. 46
3.2.1	Transplantation der humanen Amnionepithelmembran in Monolayer Technik	S. 47

3.2.2	Transplantation der humanen Amnionepithelmembran in Multilayer Technik	S. 47
3.2.3	Makroskopische Untersuchungen bis zur Entnahme des Transplantates	S. 50
3.2.4	Transplantatentnahme	S. 50
3.2.5	Histologie und Immunhistochemie	S. 54
3.3	Untersuchungen	S. 54
3.4	Statistische Analyse und grafische Auswertung	S. 57
4.	Ergebnisse	S. 58
4.1	Makroskopische Ergebnisse	S. 58
4.2	Histologische und immunhistochemische Ergebnisse	S. 64
4.3	Auswertung der Messergebnisse	S. 74
5.	Diskussion	S. 87
5.1	Untersuchungen am Tiermodell Ratte	S. 89
5.2	Kryokonservierung	S. 91
5.3	Mono- und Multilayer Technik	S. 92
5.4	Immunsuppression	S. 96
5.5	Schlussfolgerung	S. 98
6.	Zusammenfassung	S. 99
7.	Literaturverzeichnis	S. 102
8.	Anhang	S. 118
9.	Danksagung	S. 120
10.	Lebenslauf	S. 121

1. Abkürzungsverzeichnis

APO-1	=	apoptosis antigen-1, Fas oder CD95, Apoptose Antigen-1, ein Transmembranprotein mit einem Gewicht von 48kDa der TNF Rezeptor Familie
CD	=	Cluster of differentiation; Einteilung zur Unterscheidung von Proteinen
Cytochrom P450	=	Superfamilie von Hämproteinen mit enzymatischer Aktivität Pigment 450 absorbiert als Komplex mit Kohlenmonoxid Licht der Wellenlänge von 450nm
CYP 3A4	=	Untertyp von Cytochrom P450, verstoffwechselt bevorzugt lipophile Substanzen
Da	=	Dalton; Nicht SI-konforme Einheit für Molekularmasse, 1 Da entspricht in etwa der Masse eines Wasserstoffatoms
Fas	=	Rezeptor der TNF-Familie, induziert in Interaktion mit FasL die Apoptose
FasL	=	oder CD95L Typ II Transmembran Protein. Interagiert mit Fas und gehört zu der Tumor-Nekrose-Faktor Familie
H2A/H2B	=	Histonprotein der Histonfamilie mit antimikrobieller und LPS-Endotoxin neutralisierender Wirkung
HAM	=	Human amniotic membrane oder humane Amnionmembran
HBD	=	Human-beta-Defensin, ein endogens Peptidantibiotikum
HE	=	Hämatoxylin-Eosin, Färbemittelkombination zur Darstellung morphologischer Strukturen feingeweblicher Schnitte
HLA-System	=	Human Leukocyte Antigene; humane Leukozytenantigene sind in der Zellmembran verankerte Glykoproteine, die die

		individuelle Signatur der Zellen bilden und damit dem Immunsystem erlauben, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden
i.p.	=	Intraperitoneal
IL-1 β	=	Interleukin 1 β , ein hochwirksames Zytokin
LPS	=	Lipopolysaccharid, Endotoxin an der äußeren Membran gramnegativer Bakterien
MHC	=	Major Histocompatibility Complex; Haupthistokompatibilitätskomplex; die das HLA-System codierende und damit das Immunsystem steuernde Gengruppe des Chromosoms 6
PBS	=	Phosphate buffered saline
PBS-T	=	Phosphate buffered saline Tween 20
PEDF	=	Pigment epithelium-derived factor, neurotrophes/ neuroprotektives und antiangiogenetisches Protein der Serin Proteinase-Inhibitor Familie
mRNA	=	messenger Ribonucleic acid, Boten Ribonukleinsäure
RT-PCR	=	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction, „umgekehrte“ Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion, eine etablierte Methode, um mRNA nachzuweisen
SI	=	Système international d'unités; internationales Einheitensystem für physikalische Einheiten
SLPI	=	secretory leucocyte protease inhibitor, protektives antinfammatorisches Protein mit antimikrobieller Wirkung
TGF- β	=	Transforming growth factor- by caplain
TIMP	=	Tissue inhibitor of metalloproteinases

- TNF = Tumor-Nekrose-Faktor, ist ein von Zellen des Makrophagen-/ Monozyten-Systems gebildeter Faktor, der selektiv zur Auflösung maligner Zellen führt, aber auch Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zytokinsekretion induzieren kann
- TSP-1 = Thrombospondin-1, ein Thrombin-sensitives Protein, welches die Angiogenese hemmt

2. Einleitung

2.1 Amnion

Der Begriff Amnion wurde erstmals 1866 von dem deutschen Zoologen *Ernst Haeckel* („Amnionthiere“) für die höheren Wirbeltierklassen implementiert (*Haeckel, 1866, S.131*).

Das Amnion (griech.: Wasserhaut o. Schafshaut) ist die innerste vom Embryo selbst gebildete Keimhülle. Die Tiere, die sich durch eine Amnionmembran auszeichnen bezeichnet man als Amnioten.

Es ist wahrscheinlich, dass sich die Hauptklasse der Amnioten am Ende des Oberkarbons, im Paläozoikum (Erdaltertum) vor ungefähr 310 Millionen Jahren entwickelte (*Laurin, 2000, S.311*). Dies geht aus einem archäologischen Fund eines *Hylonomus* (dt.: Waldmaus), einer ausgestorbenen Reptilienart, im Jahr 1851 im Bundesstaat Nova Scotia in Kanada hervor (*Dawson, 1851*). Die Bildung der Fruchthaut oder des Amnion unterscheidet die Reptilien, Vögel und Säugetiere von allen anderen Wirbeltieren, den Lurchen, Lurchfischen und Fischen. Sie ist offenbar ein höchst wichtiger Vorgang in der Ontogenie und der entsprechenden Phylogenie der Wirbeltiere. Sie geht mit dem gänzlichen Verlust der Kiemen einher, einschließlich in der Embryonalentwicklung. Aus den angelegten Kiemenbögen gestalten sich im Laufe der Ontogenie Teile des Kieferapparates und des Gehörganges (Schnecke und rundes Fenster). Es entwickeln sich erstmals die Tränenorgane und eine eigene embryonale Harnblase (Allantois) (*Haeckel E, 1866, S.131*). Das Amnion macht die Ontogenese unabhängig vom Wasser (*Oschmann, 2006, S.117*) und ermöglicht damit die Eroberung des terrestrischen Lebensraumes. Die Larvalentwicklung der Amnioten ist dadurch bei Bedarf verlängerbar und bietet somit mehr Möglichkeiten zur höheren Differenzierung der Organe.

Alle Amnioten zeichnen sich durch die internale Fertilisation aus. Zusammen mit der außergewöhnlichen Struktur der extraembryonalen Membran war nunmehr erstmals eine maternal-embryonale Interaktion möglich (*Laurin und Reisz, 1997, S.9*).

2.2 Phylogenese der Amnionmembran

Am Beginn menschlichen Lebens steht die innere Befruchtung, die Verschmelzung von weiblichen und männlichen haploiden Gameten im Körper der Frau. Sie bilden zusammen einen diploiden Chromosomensatz, der die Voraussetzung für die weitere Zellteilung und Zellvermehrung bildet. Schon einige Tage nach der Befruchtung entwickelt sich aus der anfänglichen Oozyte eine Blastozyste aus über 30 Zellen.

Durch Dehiszenz trennen sich die Zellen zu inneren und äußeren Blastomeren, die eine entstandene Blastozystenhöhle auskleiden. Der innere Anteil bildet das Embryoblast und der äußere Anteil das Trophoblast. Während dieses Prozesses wandert die Blastozyste durch die Tuba uterina und heftet sich zwischen dem 5. und 6. Tag an die Schleimhaut der Gebärmutter an, wobei der trophoblastische Anteil am embryonalen Pol in die Zona compacta der Uterusschleimhaut einwächst. Hier bilden sich die Synzytiotrophoblasten, die mit dem mütterlichen Anteil im Laufe der Entwicklung einen Teil der Plazentaschranke bilden. Ein anderer Teil des Trophoblasten gestaltet einen Ring, der den Embryoblasten umschließt und so eine im Schnitt siegelringförmige Struktur ausbildet.

Die zentralen Zellen des Embryoblasten ordnen sich aus hochzylindrischem, mehrreihigem Epithel zum Ektoderm an. Gegen die Blastozystenhöhle formiert sich eine Schicht aus kleinen polyedrischen Zellen, dem Entoderm. Beide bilden während der zweiten Entwicklungswoche die zweiblättrige Keimscheide.

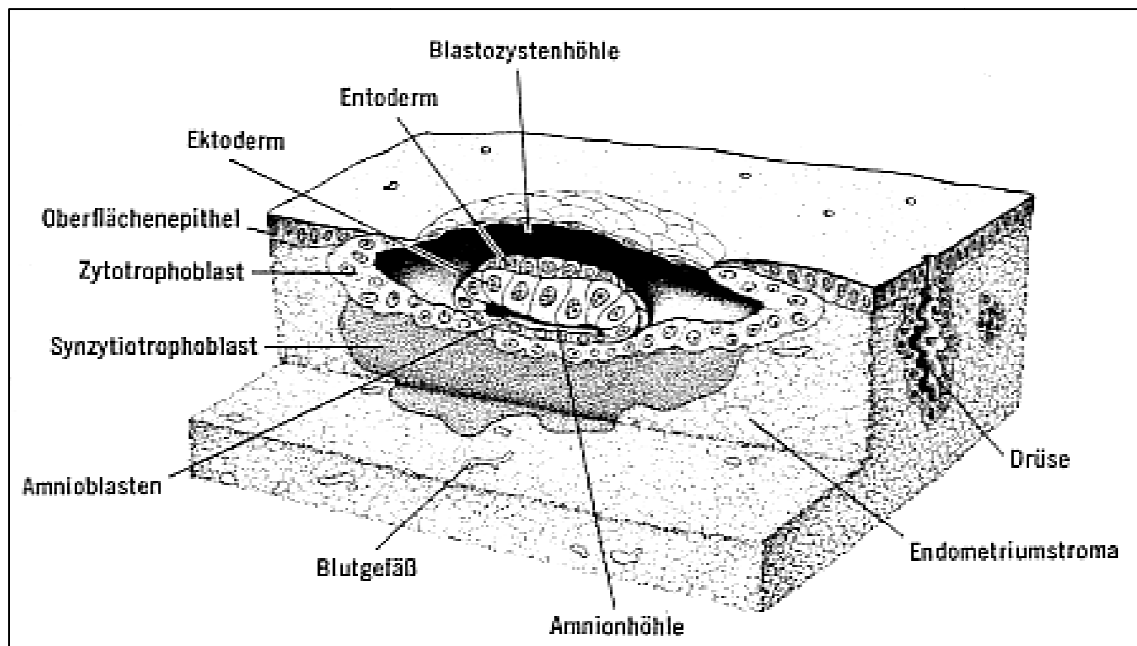


Abb. 1: Etwa 8. - 14.Tag. Die Blastozyste ist teilweise in das endometriale Stroma eingebettet. Der Trophoblast besteht aus einer äußeren Schicht ohne klare Zellgrenzen, dem Synzytiotrophoblast und aus einer Reihe einkerniger Zellen dem Zytotrophoblast. Das Embryoblast besteht aus einer Entoderm- und Ektodermis, wobei sich die Amnionhöhle als schmaler Spaltraum, der von Amnioblasten ausgekleidet wird, abgrenzt. (*Embryologie, K. L. Moore und T. V. N. Persaud, Schattauer Verlag, 2007*)

Beim Wachstum des Ektoderms entstehen auf der dem Trophoblast bzw. Uterusschleimhaut zugewandten Seite Spalträume, die ineinander überfließen und so eine sogenannte Amnionhöhle bilden. Flache Zellen, die Amnioblasten, kleiden die Amnionhöhle aus, gehen an den Rändern in das Ektoderm über und grenzen somit den Embryoblasten vom Trophoblasten ab.

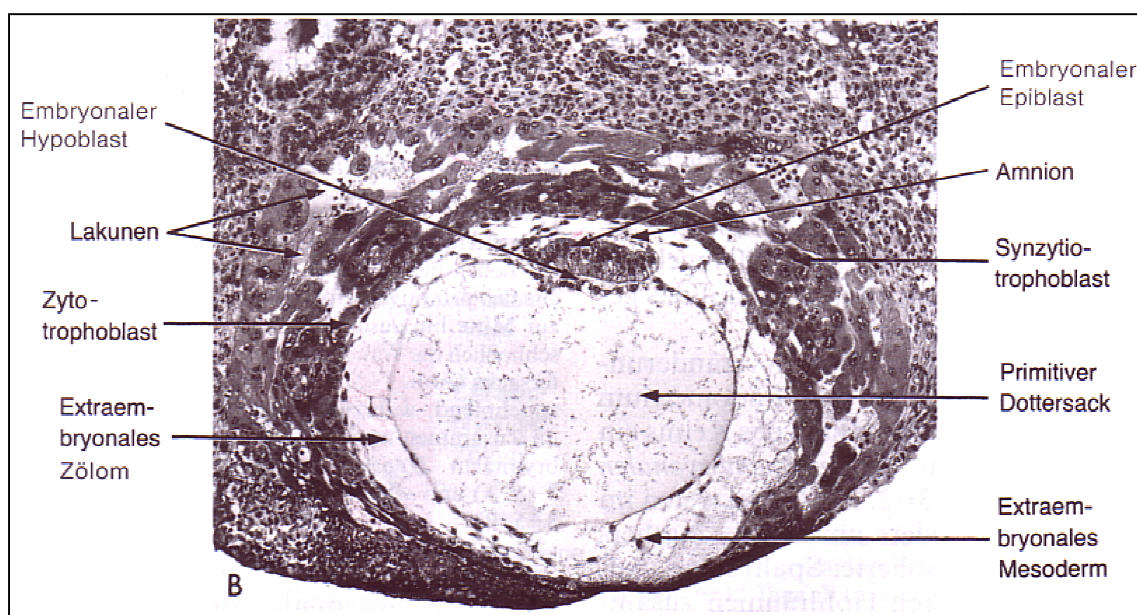


Abb. 2a

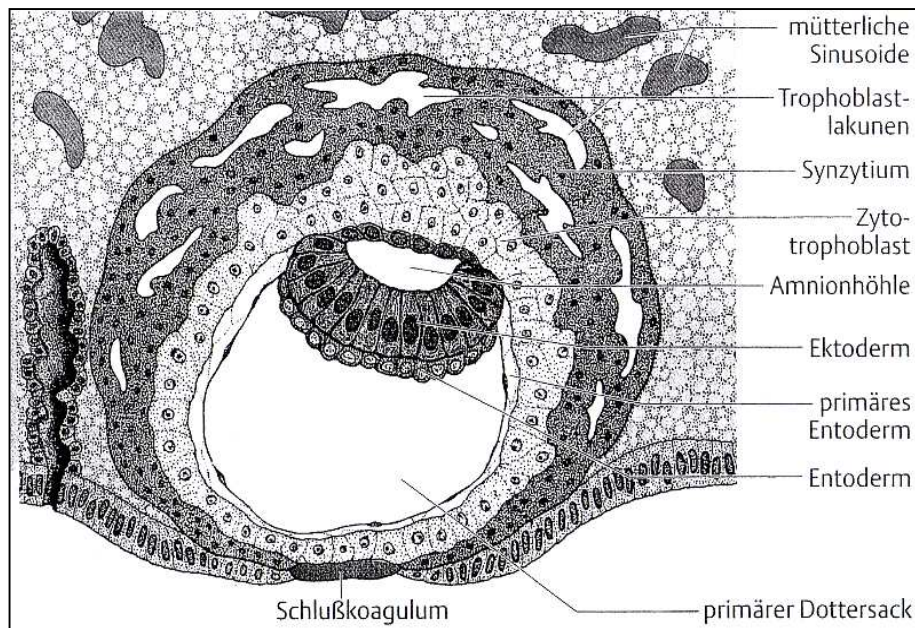


Abb. 2b: etwa 14.Tag (2a) Histologischer Schnitt (100x); (2b) Schematische Darstellung. Die Blastozyste ist vollständig in das Endometrium eingebettet. Die Trophoblastlakunen füllen sich mit maternalem Blut. (*Embryologie, K. L. Moore und T. V. N. Persaud, Schattauer Verlag, 2007*) und (*Medizinische Embryologie, T. W. Sadler, Thieme Verlag, 2008*)

Der Trophoblast dringt weiter in das Endometrium ein, während die Entodermzellen auf die Innenseite der Blastozystenhöhle wandern, um den primären Dottersack zu bilden. Zwischen Ektoderm und Entoderm entstehen, vom Ektoderm ausgehend, Mesodermzellen, die sich zunächst auf der Oberfläche der Trophoblasten, auf dem Amniondach und dem primären Dottersack ausbreiten. Es bildet sich die dreiblättrige Keimscheide.

Am 13. Entwicklungstag reißt der primäre Dottersack. Seine freien Ränder wachsen zum viel kleineren sekundären Dottersack zusammen. Das extraembryonale Mesoderm bedeckt nunmehr den neu entstandenen Raum und formt mit dem Trophoblast das Chorion, welches die Chorionhöhle und in folgenden Stadien Zotten und die Choriongefäße ausbildet. Die Zotten am embryonalen Pol wachsen weiterhin zum Chorion frondosum, die Zotten am aembryonalem Pol gehen zugrunde, bis die Oberfläche ganz glatt ist und als Chorion laeve bezeichnet wird.

Mit der Entwicklung und dem Wachstum der Neuralanlage in der vierten bis achten Woche wölbt sich die Embryonalanlage immer mehr in die Amnionhöhle vor bis die Amnionhöhle den Embryo komplett einschließt. An dem amnionektodermalen Übergang entsteht die Umschlagfalte, die ein ovales Fenster für die Verbindung

zwischen Embryo und Chorion, später Plazenta offen lässt. Durch dieses Fenster oder Nabelring treten die Nabelgefäße und der Stiel des Dottersackes.

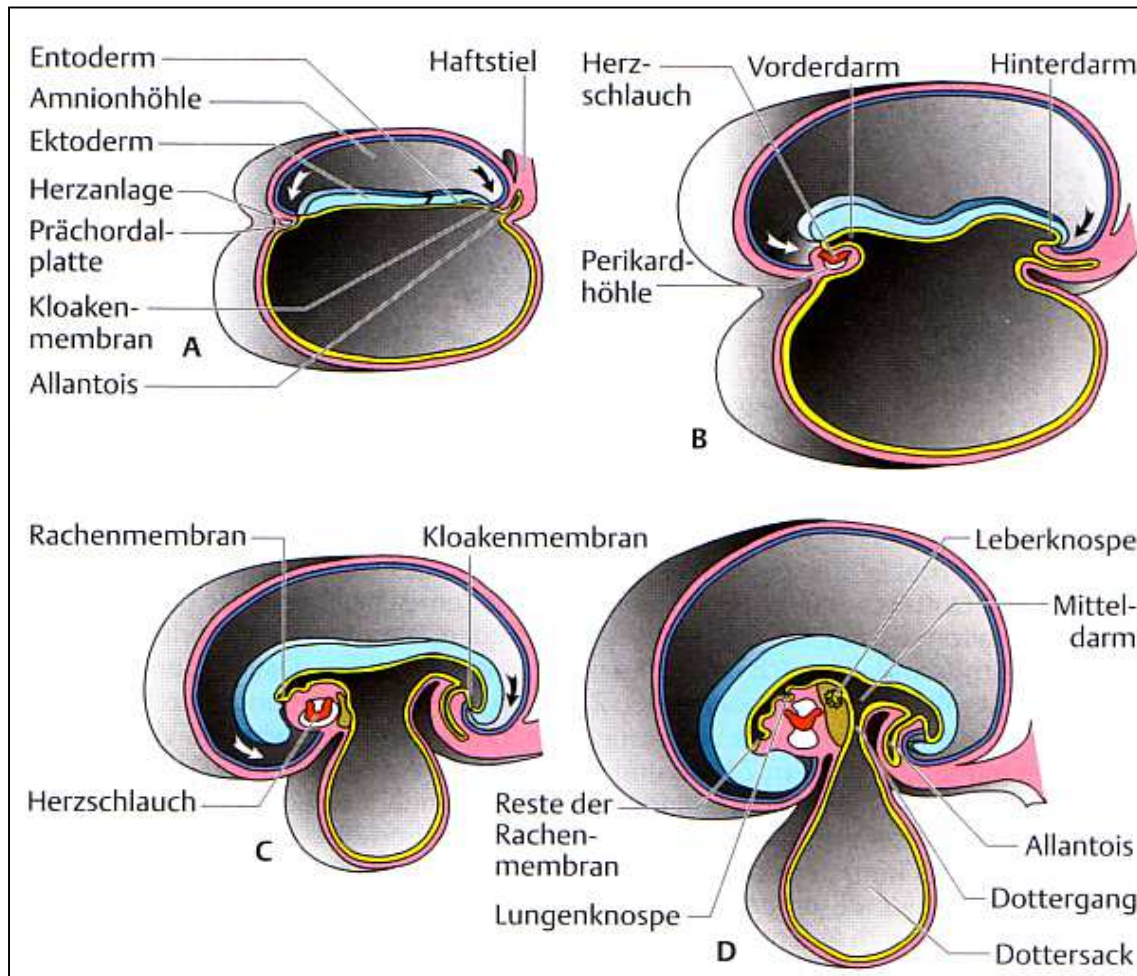


Abb. 3: **A** Embryo 18 Tage, **B** Embryo 20 Tage, **C** Embryo 21 Tage, **D** Embryo am Ende des 1. Monats Entwicklung und Rückbildung des Dottersackes. Die blaue Linie zeigt die Amnionmembran, die sich als Amnionhöhle zunehmend um den Embryo legt. (Medizinische Embryologie, T. W. Sadler, Thieme Verlag, 2008)

Am Ende des zweiten Monats findet man folgende Höhlen: die Amnionhöhle, in der das Embryo eingebettet ist, die Chorionhöhle, die die Amnionhöhle einschließt und das Lumen des Uterus, das beide Höhlen beinhaltet.

Am Ende des dritten Monats verwachsen Amnion und Chorion miteinander. Die Chorionhöhle legt sich dem Uterus an, so dass das Chorion laeve und Decidua parietalis an der aembryonalen Seite des Uterus verschmelzen. Das Uteruslumen obliteriert, die Amnionhöhle vergrößert sich.

Das Amnion und das aufliegende Chorion bezeichnet man als „amniochorionic membrane“ oder Eihaut.

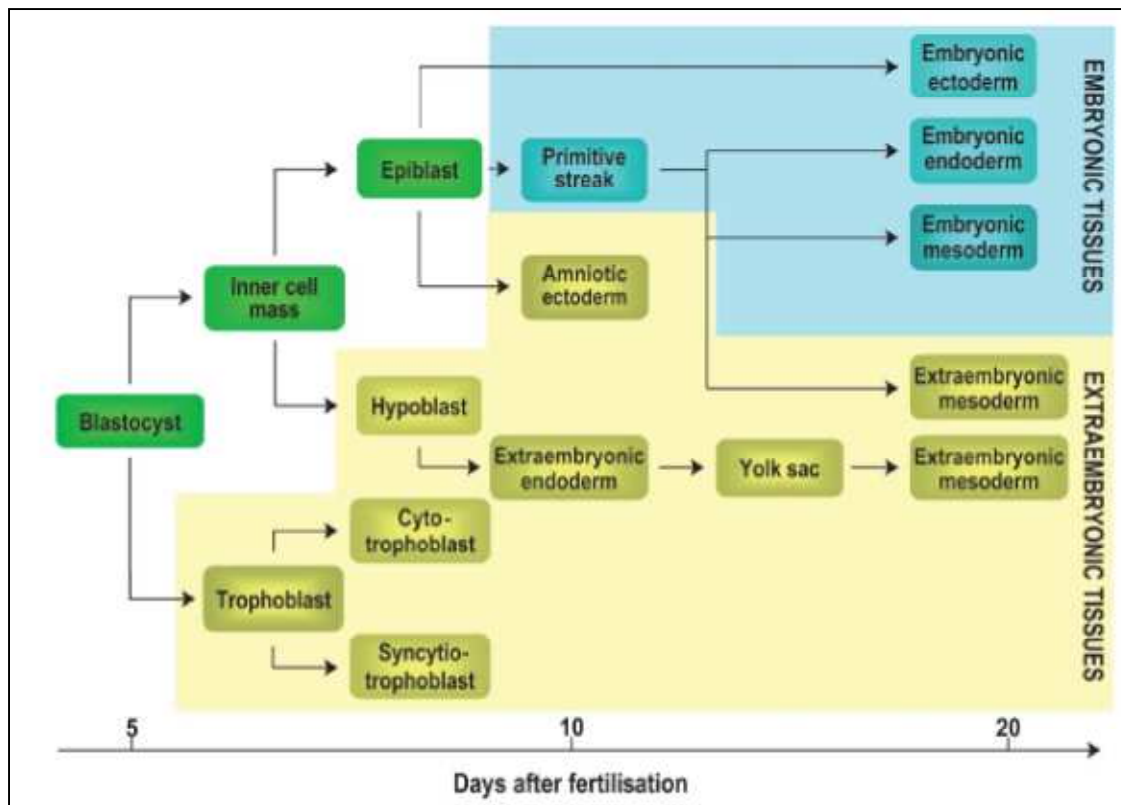


Abb. 4: Schematische Darstellung des embryonalen Gewebes. Die Blastozyste teilt sich in einen trophoblastischen Anteil und einen inneren Zellmasseanteil, aus dem sich der Epiblast und der Hypoblast entwickeln. Aus dem Epiblast bildet sich um dem 7.-8.Tag das Amnion Ektoderm. (O. Parolini, *J Repr. Endokr. 2006*)

Es kann festgehalten werden. Das Amnionepithel entsteht schon wenige Tage nach der Befruchtung der mütterlichen Eizelle aus primärem embryonalem Gewebe, dem Embryoblasten. Das Amnion, das aus Amnionepithel, Basalmembran und Amnionbindegewebe aufgebaut ist, überzieht den ehemaligen Haftstiel, der zur Nabelschnur wird und die gesamte innere Oberfläche der Amnionhöhle. Es umgibt vollständig den Embryo und verschmilzt im 3. Monat mit dem Chorion zur Fruchthöhle.

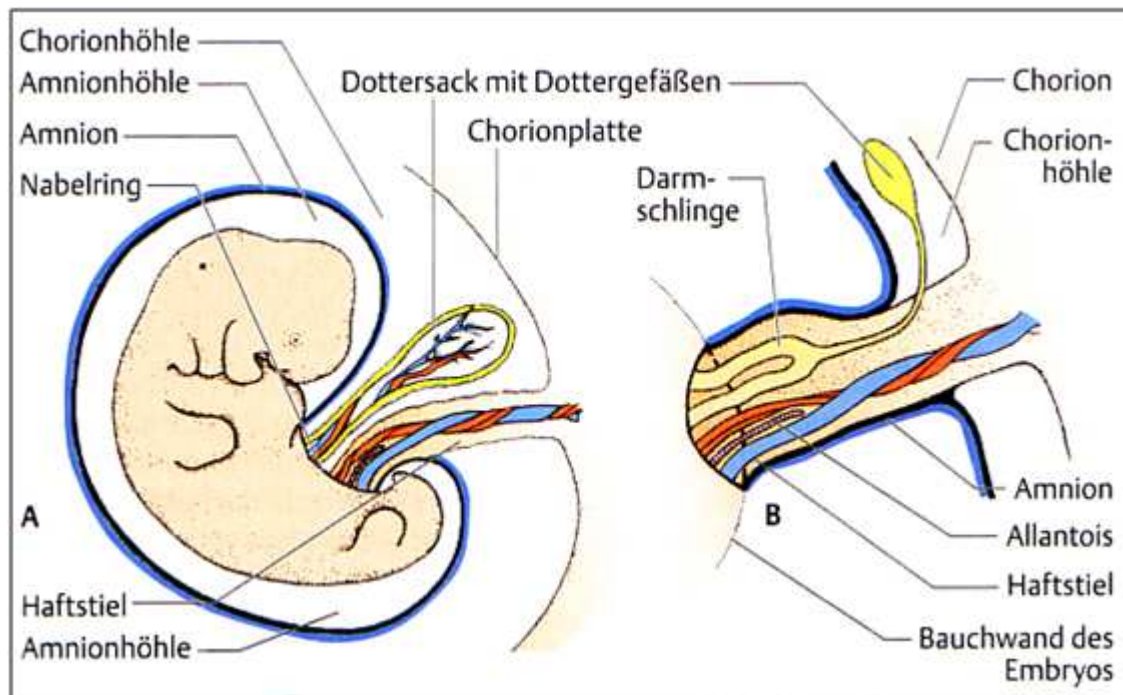


Abb. 5: **A** 5 Wochen alter Embryo mit Gebilden, die durch den primitiven Nabelring treten. **B** 10 Wochen alter Embryo. Der Haftstiel wird vom Amnion eingefasst. (Medizinische Embryologie, T. W. Sadler, Thieme Verlag, 2008)

Die dünne Wand des Amnion sezerniert die Amnionflüssigkeit. Die Menge an Fruchtwasser beträgt am Ende der Schwangerschaft, in der 30. - 40. Schwangerschaftswoche, etwa 1000 ml. Amnion und Amnionflüssigkeit erfüllen folgende Funktionen.

Erstens übernehmen sie, relativ offensichtlich, eine Schutzfunktion des Embryos. Als abgegrenzter Raum schafft die Amnionhöhle konstante Umweltbedingungen. Sie gewährleistet eine ständige Hydratation des embryonalen Gewebes, einen konstanten pH-Wert und Temperatur. Der wachsende Fetus ist in der Lage, sich im Uterus frei zu bewegen. Die fragilen Innenstrukturen können sich frei von Masse entwickeln. Mechanische Einflüsse wie Stöße oder Erschütterungen werden durch Wellenbewegungen ausgeglichen und damit gedämpft. Desweiteren hält die Amnionflüssigkeit den Embryo auf Distanz zum Amniongewebe und schützt so vor Verwachsungen (*Romanoff, 1960, S. 1305*).

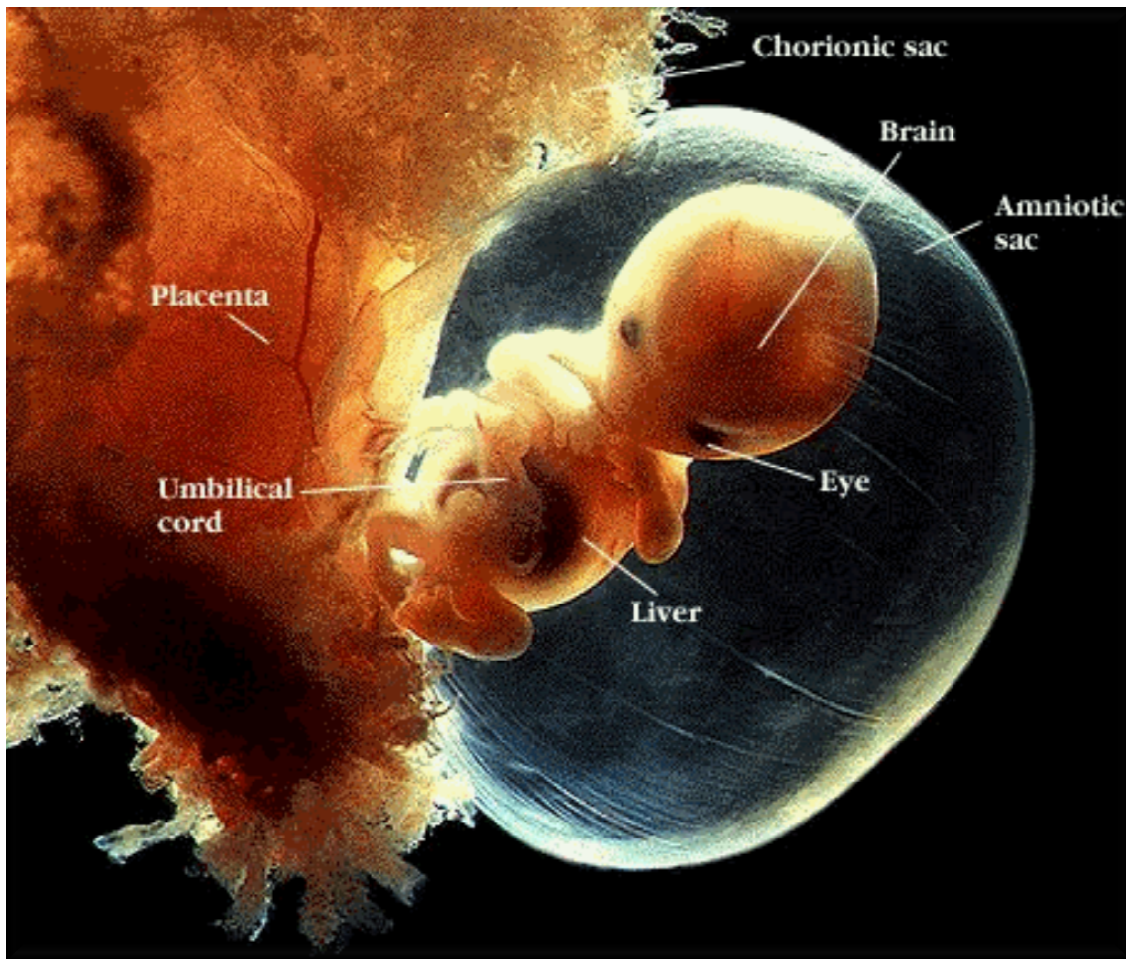


Abb. 6: Acht Wochen alter Embryo (*Westside Pregnancy Resource Center*)

Eine weitere Funktion der Amnionflüssigkeit ist die Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes. Zum Ende der Schwangerschaft wird die Amnionflüssigkeit alle drei Stunden komplett erneuert. Der Fetus schluckt ab dem 5. Monat seine eigene Amnionflüssigkeit. Er trinkt pro Tag 400ml, welches in etwa die Hälfte der Gesamtmenge (1000 ml) entspricht (*Langmann, 1970*). Bei intakter Fruchtblase dient diese Menge gleichzeitig als hydrostatischer Keil zur Weitung des Zervixkanals.

Desweiteren wirkt die Amnionmembran nicht nur als mechanische Barriere sondern auch als biologische, immunologische Barriere mit antibakteriellen Eigenschaften (*Mahgoub et al., 2004, S.1194; Laurema et al., 2004, S.264; Kjaergaard, 1999, S.165*). Mikroanatomische und biologische Analysen verdeutlichen diese Eigenschaften.

2.3 Anatomie und Morphologie

Mikroanatomische Untersuchungen der humanen Amnionmembran gehen bis auf 1971 zurück (*Bergström, 1971, S.513; Ludwig, 1971, S.328; Sheppard, 1974, S.20*). Aber erst 1976 und 1978 wurde die Amnionmembran raster- und elektronenmikroskopisch von *Stella Pollard* und *B. J. Herendael* so zerlegt, dass sie nach diesen Erkenntnissen in ihren Funktionen näher beschrieben werden konnte. (*Pollard, 1976, S.470; Herendael van BJ, 1978, S.872*).

Das Epithel der Amnionmembran besteht aus einer Lage von einschichtigen kubischen Zellen, die an ihrer Oberfläche einen feinen Saum aus Mikrovilli aufweisen. Palisadenförmig angeordnete Pedikel, ähnlich der Podozyten des glomerulären Epithels, verankern die Epithelzellen an der Basalmembran und ermöglichen, wie in der cochleären Mukosa und renalem glomerulärem Epithel, den transzellulären aktiven Transport.

Desmosomen, eine hohe Zahl interzellulärer Kanäle und ineinander ragende Mikrovilli sichern den Halt und erlauben den interzellulären Kontakt benachbarter Zellen. Das Zytoplasma enthält reichlich Organellen, vor allem einen ausgeprägten Golgi-Apparat und endoplasmatische Reticulum. Mikrofilamente und kleinste sekretorische Granula sind überall im Zytoplasma zu finden. Viele perinukleäre Vakuolen weisen auf einen hohen sekretorischen Umsatz der Zelle hin. Apikal erkennt man feine Bläschenformationen für die apokrinen Sekretion und reichlich Vesikel, die aktiv über Pinozytose aufgenommen wurden.

Die breite Basalmembran grenzt die Reihe aus cuboidalen Zellen von der avaskulären, zellarmen stromalen Matrix ab. Mit einem Durchmesser von etwa 150 bis 200 nm gehört sie zu den dicksten Membranen des menschlichen Körpers (*Resch et al., 2006, S.1853*). Sie zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Kollagen Typ IV, V und VII Fasern, Laminin-1 und Laminin-5 und Fibronectin (*Modesti et al., 1989, S.459; Fukuda et al., 1999, S.73*) und Heparan Sulfat Proteoglykanen (*Davis, 1987, S.1106*) aus. Aktuelle immunhistochemische Untersuchungen können noch weitere Isoformen von Laminin nachweisen. Es finden sich Laminin -2, -4, -5, -6, -7, -10, -11 (*Takashima et al., 2008, S.75*). Aufgrund der mikroanatomischen Struktur lassen sich zwei Schichten abgrenzen, die Lamina rara (lucida) und die Lamina densa. Sie bestehen aus einem Netzwerk aus feinen kollagenösen Fibrillen (4-12

nm), die sowohl parallel oder quer verlaufen, als auch teilweise in die basale Oberfläche der Epithelzellen eindringen (*Aplin und Campbell, 1985, S.119*). Die Basalmembran erscheint makroskopisch transparent und ist äußerst elastisch.

Das der Basalmembran unterliegende avaskuläre hypozelluläre Stroma bildet mit etwa 40 µm Dicke, die Grenze zur Chorionmembran (*Resch et al., 2006, S.1853*). Sie unterteilt sich in drei kennzeichnenden Schichten, der Lamina densa, Lamina fibroretikularis und Lamina propria (*von Versen-Hoyneck, 2004, S.45*). Die stromale Matrix ist reich an fetaler Hyaluronsäure und kollagenöser Typ I und IV- Fibrillen mit einem Durchmesser von bis zu 50 nm. Fibrillen mit einem Durchmesser von 18 nm machen den Hauptanteil aus. Diese durchdringen auch direkt die Basalmembran und treten in die basale Plasmamembran der Epithelzellen ein und bilden so mit vielen langen und undulierenden 9-12 nm dicken Oxytalan Mikrofibrillen ein Netzwerk, das Epithel, Basalmembran und Stroma verbindet (*Bachmeier, 1999, S.81*). Makroskopisch erscheint diese Seite der Amnionmembran trüber und fühlt sich im Gegensatz zur glatten Epithelseite rauher an.

Die Struktur der Amnionmembran erklärt die hohe mechanische Belastbarkeit und Strapazierfähigkeit. So ist sie bei einem durchschnittlichen Durchmesser von 44 µm mit bis zu 0,32 N belastbar und dehnbar (*Oxlund, 1990, S.247*), welches die Gewichtskraft von 32,64 g entspricht. (Ein Newton entspricht etwa der Gewichtskraft eines Körpers der Masse 102 g am Äquator auf Meereshöhe bei einer mittleren Erdbeschleunigung von etwa 9,8 m/s², (*Newton, 1687*)).

Die mikroanatomische Struktur erlaubt zwar einen Rückschluss auf die biomechanischen Eigenschaften, doch erst biologische und biochemische Untersuchungen verdeutlichen die Komplexität und Eigenschaften der Amnionmembran, die bis heute nicht vollständig verstanden sind.

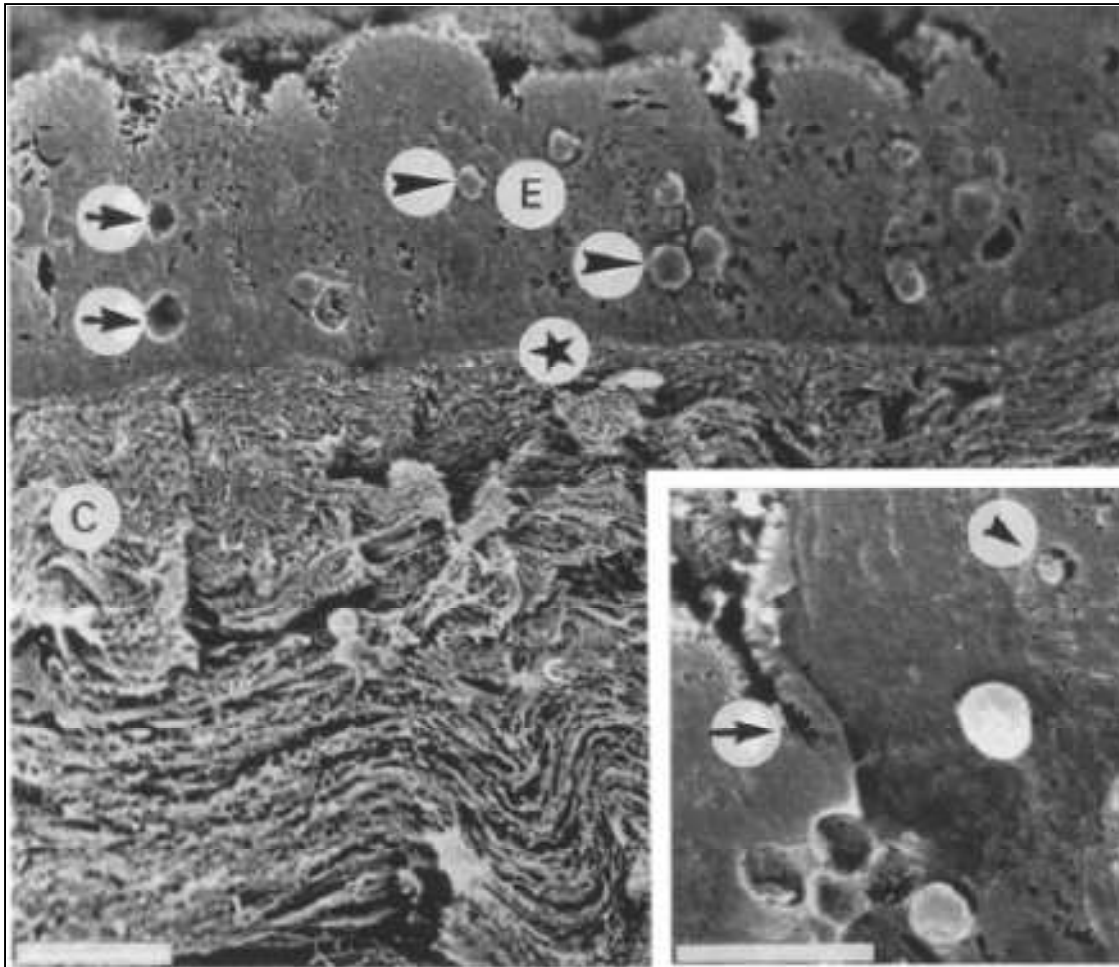


Abb. 7: Kubische Amnion Epithelschicht (E) und Stroma (C) ist durch die Basalmembran (*) getrennt. Die einfachen Epithelzellen tragen apikale Mikrovilli, und beinhalten zahlreiche Vesikel (Pfeile). Das Stroma ist azellulär und besteht aus dicht verpackten welligen Bündeln. (3000x, Messbalken 6µm) Kasten: Amnionepithelzelle mit Darstellung der lateralen interzellulären Kanäle (Pfeil) und zellulärer Einschlüsse (Kopfpfeil), (3800x Vergrößerung, Messbalken 5µm). (R.K. Fawthrop, *Cell & Tissue Research* 1994)

2.4 Historische Entwicklung der humanen Amnionepitheltransplantation

Lange bevor die Amnionmembran in der Humanmedizin therapeutisch genutzt wurde, bewertete man sie in verschiedenen Kulturen und Legenden als gutes Omen. Neugeborene, die mit Teilen der Amnion oder Eihaut, meist am Kopf haftend geboren wurden, galten im Mittelalter als mit Glück, Geistesgröße und Großmütigkeit gesegnet. Ihnen stand ein gutes und erfülltes Leben bevor. Das Caput galeatum (lat. für „Glückshaube“) oder Pileus (lat. für „Haube“) wurde bisweilen zu hohen Preisen verkauft, denn neben Glück sollte sie auch Seeleute vor dem Ertrinken bewahren können und zu überzeugender Beredsamkeit verhelfen (Kerschbaumer, 1999, S.1).

So schrieb *Charles Dickens* über seinen Protagonisten David Copperfield in seinem gleichnamigen Roman, dass er mit der Glückshaube geboren wurde. Aber ob nun die Amnion David Copperfield durch allerhand Abenteuer und letztenendes zu einem Happy End verhalf oder Copperfield's Jugendliebe Agnes bleibt dahingestellt (vielleicht war es auch einfach die Feder des Autors, der diesen Roman als seinen liebsten bezeichnete).

In der Mythologie des alten Ägypten galten diese Kinder als Menschen von tiefem Glauben beseelt, der sich in einer starken Bindung an die Gottesmutter Isis äußerte.

Die Eihaut galt aber nicht nur als gutes Omen und Glückshaube. In manchen europäischen Ländern (Rumänien und Ukraine) befürchtete man, dass die mit Amnion geborenen Kinder zu Vampiren (sog. Strigoi) werden, falls die Fruchtblase nicht sofort beseitigt würde (Kluckhuhn, 2007, S.32).

Folgende berühmte Leute, sowohl reale als auch fiktionale, sind mit der Amnion geboren worden: Alexander der Große, Shakespeare's Hamlet, die Mutter von den Dionne quintuplets (Fünflingen), Danny in Stephen King's „Shinning“.



Abb. 8: Dymelie aufgrund amniofötaler Verwachsungen. (Medizinische Embryologie, T. W. Sadler, Thieme Verlag)

Eine Tatsache ist, dass Entzündungen oder Fehlentwicklungen der Frucht zu nach der Geburt sichtbare amniofötalen Verwachsungen (Simonart'sche Bänder) führen können. Dieses sogenannte Amniotische-Band-Syndrom führt zu Dymelien, die häufig die Extremitäten betreffen (Walter et al., 1998, S.325).

In der Literatur wurde die therapeutische Nutzung der Amnionmembran erstmals Anfang des 20. Jahrhunderts erwähnt.

1910 berichtete *JW Davis* in 550 Fällen von Transplantation humaner fetaler Membranen auf menschlicher Haut (Davis, 1910, S.307). Drei Jahre später nutzte *Stern* die Amnionmembran als Deckmaterial auf verbrannten Oberflächen. *Sabella*, der mit Stern arbeitete, wendete in 5 Fällen das Amnion als Deckung von Ulzerationen der Extremitäten an, wobei beide weniger Infektionen, geringeres

Schmerzempfinden und eine höhere Reepithelialisierungsrate auf der traumatisierten Hautoberfläche beobachteten (Stern, 1913, S.973; Sabella, 1913, S.478).

Der Franzose *Auguste Brindeau* 1934 und der Ungar *Karl Johann Burger* 1937 verwendeten die Amnionmembran zur Auskleidung künstlich gebildeter Scheiden (Brindeau, 1934, S.385; Burger, 1937, S.2437). *Burger*, der in Budapest tätig und später den Lehrstuhl für Geburtshilfe und Gynäkologie in Würzburg 1947 übernahm, vermutete nach histologischen Untersuchungen von Probeexzisionen aus dem transplantierten Bereich einige Monate post transplantationem, dass das Amnionepithel in der Lage sei, sich dem Scheidenepithel entsprechend, in ein mehrschichtiges, nicht verhornende Plattenepithel umzuwandeln. Dieser Umstand war zwar bei vielen Forschern umstritten, konnte aber damals nicht endgültig beantwortet werden.

Für die heutige Augenheilkunde maßgebend, aber lange Zeit bis Mitte der 90er vergessen, stellte der Ungar *Andrew de Rötth* 1940 in seinem Artikel „Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane“ die Nutzung der Amnionmembran als Defektdeckung in der Augenchirurgie vor. In sechs Fällen von Symblepharose nach Verbrennung des Auges, Verätzungen mit Phenol und Calciumcarbid und Pemphigus transplantierte er das embryonale Gewebe auf die geschädigte Konjunktiva (de Rötth A, 1940, S.522). Auch Sorsby und Symmons therapierten zu dieser Zeit Verbrennungen des Auges zweiten Grades mit Amnionmembran (Sorsby und Symmons, 1946, S.337).

Während damals noch die Notwendigkeit bestand operativ, Kaiserschnitt und Transplantation der Amnionmembran zeitlich miteinander zu verknüpfen, konservierte *de Rötth* die Membran in lauwarmer Locke Lösung für bis zu 15 Stunden. Es ist nicht ganz klar ob *de Rötth* in seinen Studien vor der Transplantation die Amnionmembran von der Chorionmembran trennte, so dass unklar bleibt, warum in drei Fällen das Ergebnis der Heilung unbefriedigend war.

Neben der Neigung zur Schrumpfung und Ausbildung von Blutgefäßen konnte *de Rötth* histologisch eine Ähnlichkeit des Amnionepithels zum Epithel der Konjunktiva zwei und vier Monate nach Transplantation feststellen und sprach dem embryonalen Gewebe die Eigenschaft zu, sich in konjunktivales Gewebe zu transformieren.

Ähnliches konnte *Endre Kubányi* berichten. Der, wie *Burger*, ebenfalls in Budapest tätige Chirurg erweiterte die Indikation zur Amnionmembrantransplantation auf traumatisch bedingte große Hautdefekte (1941) und später (1943) auf den Ersatz von Darmserosa nach operativer Adhäsiolyse, um die zum Ileus führenden Verwachsungen zu verhüten sowie Perforationen und eventuelle Fistelbildungen zu

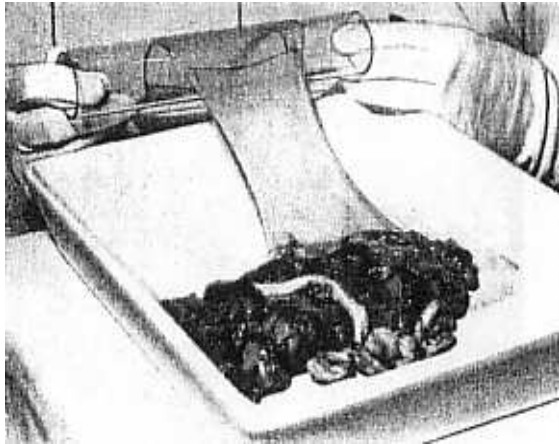


Abb. 9 Die Amnionmembran wird auf einen Glaszylinder gezogen und zur Tiefkühlung bereitgestellt. (E. Kubányi, Theoretische Grundlagen zur Tiefkühlung, 1958, Zentralblatt für Chirurgie)

vermeiden. Erstmals konservierte *Kubányi* die auf Glaszylinder gezogene Amnion durch Tiefkühlung bei -2°C .

Dies entband den Chirurgen von der zeitlichen und räumlichen Abhängigkeit von *Sectiones caesariae* und gewährte ausreichend Zeitraum für die infektiologische Untersuchungen des Spenders.

In histologischen Untersuchungen zeigte sich einige Wochen nach Hautdefektdeckung eine Überlagerung aus

mehrschichtigen Plattenepithel und eine enge histologische Beziehung zum menschlichen Peritoneum bei Probeexzisionen nach Transplantationen auf die Darmserosa und Peritoneum (Kubányi, 1955, S.189 und Kubányi 1959, S.223).

1992 gebrauchte *Barlas* in tierexperimentellen Studien die Amnionmembran als intestinalen Patch für 5 cm langen Defekte des Ileums. Ab der 2. Woche entwickelte sich eine Neomukosa, die nach 20 Wochen den kompletten Patch bedeckte. Nach erfolgreichem Abschluss der Studie sollte die Amnionmembran bei angeborenem Kurzdarm-Syndrom bei Neugeborenen eingesetzt werden (Barlas et al., 1992, S.597). Als 1985 in Taiwan ein Mangel an Fremdhaut auftrat, nutzte man die Amnionmembran als Deckungsmaterial bei Verbrennungen, die später mit Spalthaut versorgt wurden. Die Chirurgen hielten sie für einen adäquaten Ersatz, zumal die Membran Vorteile in Bezug auf Schmerzlinderung, Hämorrhagie, bakterieller Kontamination, Wundverhältnisse, Sauberkeit, Verlust von Flüssigkeit und Proteinen, Reepithelisierung und Kosten für Beschaffung und Lagerung zeigte (Lin et al., 1985, S.374). 1986 veröffentlichte *Vishwakarma* eine Studie über eine amniotische Arthroplastik. 28 Patienten, die an tuberkulöser Arthritis des Hüftgelenkes litten,

wurden durch eine Arthroplastik (Debridement des betroffenen Gelenkes) und Interposition einer mehrschichtigen (multi-layered) Amnion-Kappe (50-60 Membranen) versorgt. Das Follow-up war 30 bis 48 Monate. Es zeigte sich eine fast vollständige Regeneration des Gelenkes, sowie das Erreichen eines schmerzfreien ausreichenden Bewegungsumfanges (Vishwakarma et al., 1986, S.68).

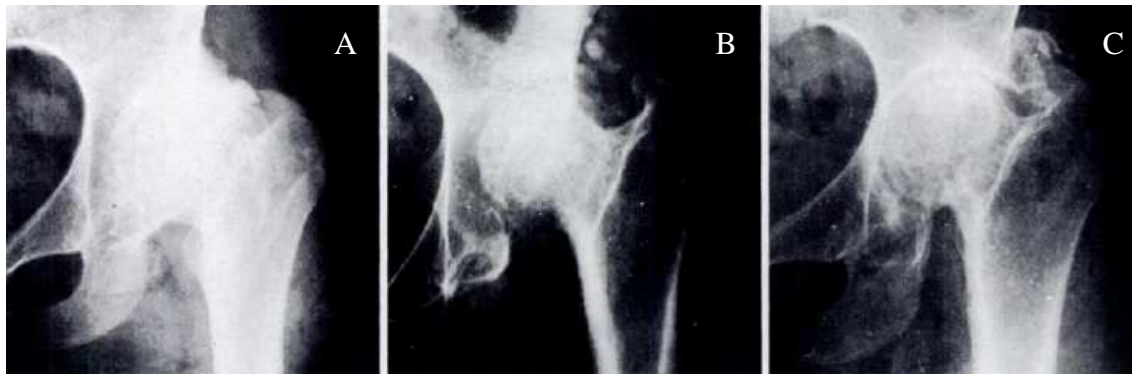


Abb. 10 Röntgenbild der linken Hüfte. **A-** Praeoperativ. **B-** 20 Monate Postoperativ. **C-** 38 Monate postoperativ. Darstellung einer radiologisch nachweisbaren deutlichen Regeneration des Hüftgelenkes (G. K. Vishwakarma 1986 J Bone Joint Surg Br)

Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften der Basalmembran geriet die Amnionmembran zunehmend in den Blickpunkt der Gewebe-Forscher. Es wurden unter anderem neue Methoden zur Transplantation cornealer Endothelzellen auf geschädigte Augen mit der Amnionmembran als zelluläres Trägermaterial entwickelt (Wencan et al., 2007, S.32). Durch dieses sogenannte „tissue engineering“ konnten die Endothelzellen ihre Vitalität und funktionellen Eigenschaften nach Transplantation erhalten. Azinöse lacrimale Drüsenzellen konnten ebenfalls erfolgreich auf der Amnionmembran kultiviert werden (Schrader et al., 2007, S.1699). Vielversprechend sind ebenfalls Untersuchungen von *Jin*, der zunächst Knorpelzellen auf der Epithelzellenfreien („denuded“) Amnionmembran kultiviert hat, um dann später osteochondrale Defekte bei Kanninchen zu decken. So bildete sich nach einigen Wochen intakter hyaliner Knorpel auf der Defektzone (Jin et al., 2007, S.693).

Desweiteren wurde berichtet, dass die extrazelluläre Matrix der humanen Amnionmembran ein effektives Konduit für die Regeneration peripherer Nerven, in Form eines biologisch abbaubaren Gerüsts mit einzigartigen biochemischen und

mechanischen Eigenschaften darstellt. Das Ergebnis war durchaus mit dem von autologen nervalen Interponaten vergleichbar (Mohammad et al., 2000, S.660).

K.S. Bankiewicz implantierte Amnion in den Nucleus caudatus von Primaten. Er konnte nachweisen, dass das Amnion einen Faktor produziert und sezerniert, das den Auswuchs von Neuriten induziert und fördert (Bankiewicz, 1994, S.869). Diese Beobachtung konnte in immunologischen und molekularen Studien durch *Sakuragawa et al.* weiter aufgeschlüsselt werden. *Sakuragawa* postulierte, dass die Amnionmembran eine besondere Bedeutung in der frühen Phase der embryonalen neuronalen Entwicklung einnimmt. Er konnte die Synthese und Freisetzung vom neurotrophen Faktor Neurotrophin 3, nerve growth Faktor (Uchida et al., 2000, S.585), Activin, Acetylcholin und Katecholaminen, hier u.a Dopamin und seinen primären Metabolit 3,4-Dihydroxyphenylsäure (Elwan MA und Sakuragawa N, 1997, S.3435), wie auch die Expression von mRNA, die Dopamin-Rezeptoren und Dopamin-transporter kodieren, immunologisch nachweisen (Sakuragawa et al., 2001, S.20). In kultivierten humanen Amnionepithelzellen zeigte er eine positive Immunreaktivität in Bezug auf Vimentin, einem intermediären Filament, neurofilamentäre Proteine, mikrotubulär-assoziierte Proteine 2 (MAP2), die hauptsächlich in Dendriten und Axonen vorkommen (Shafit-Zagardo et al., 1999, S.149), gliale fibrillöse azinöse Proteine, die vor allem in Gliazellen und Astrozyten vorkommen (Bongcam-Rudloff et al., 1991, S. 1553), Myelin Proteine und Galactocerebroside. Diese Daten sind Indikatoren für eine mögliche Pluripotenz der humanen Amnionepithelzellen, die sich damit mit Eigenschaften von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten auszeichnen (Sakuragawa et al., 1996, S.9). In vivo Studien an Ratten konnten die neurotrophe Wirkung der Amnionepithelzellen bestätigen. Hierzu wurden unilaterale nigrostriatale Läsionen im Rattengehirn durch intrastriatale Infusionen mit 6-Hydroxydopamin produziert. Die Tiere, die zuvor humane Amnionepithelzellen implantiert bekommen hatten, zeigten eine deutlich bessere Überlebensrate nigraler dopaminergener Neuronen als nicht transplantierte Tiere (Kakishita et al., 2003, S.48). Weitere Untersuchungen konnten darstellen, dass die Amnionepithelzellen Enzyme sezernierten, die bei Patienten mit lysosomaler Speicherkrankheit fehlten (Adinolfi M und Ake CA, 1982, S.325). In Hinblick auf diese Erkenntnisse therapierte *Bruna Scaggiante* 1983 erfolgreich einen Patienten mit der Niemann-Pick Krankheit (Sphingomyelinlipidose, autosomal rezessiv vererbter Enzymdefekt, der zu Speicherung von Sphingomyelin in Organen führt), indem sie die humane

Amnionmembran wiederholt in einem subkutanen Thoraxpouch implantierte (Scaggiante et al., 1987, S.59).

Betrachtet man diese Ergebnisse auf der molekularen biochemischen Ebene ergeben sich folgende besondere Eigenschaften.

2.5 Besondere Eigenschaften

Immuntoleranz, Förderung der Epithelialisierung, antiinflammatorische, antiangiogenetische, antifibroblastische und antimikrobielle Eigenschaften zeichnen die Amnionmembran aus.

2.5.1 Immuntoleranz

Während der Schwangerschaft kann der Fetus immunologisch als „semiallogenes Transplantat“ betrachtet werden. Zwar besteht kein direkter Kontakt zwischen mütterlichen und kindlichen Gewebe, wohl aber eine maternale-fetale Schnittstelle, die Plazenta. Hier dringen vom fetalen Gewebe stammende extravillöse Zytotrophoblasten in die Decidua basalis ein und treffen auf maternale Immunzellen, wie die natürlichen Killerzellen, T-Zellen und Makrophagen (Le Bouteiller, 1999, S.223). Dennoch wird der Fetus von der Mutter toleriert und eine Toleranz für die teilweise vom Vater abgeleiteten Antigene entwickelt. Die Mechanismen, die diese Immuntoleranz erklären, sind bis heute nicht vollständig entschlüsselt, aber spielen HLA-G, HLA-E und der Fas Ligand eine gewichtige Rolle für den erfolgreichen Ausgang der Schwangerschaft.

In einer im Lancet 1981 veröffentlichten Studie untersuchten *Akle C. A.* und *Adinolfi M.* die Immunogenität humaner Amnionmembran. Es zeigte sich, dass humanes Amnionepithel keine HLA- A, B, C und DR Antigene oder β 2- Mikroglobuline exprimiert. Daraufhin implantierten sie die Amnionmembran in das subkutane Fettgewebe des Oberarms von sieben Probanden. Als Ausdruck der Entzündungsreaktion wurde nach Entnahme des transplantierten Bereiches (16, 30, 33 und 54 Tage post implantationem) histologisch das Vorkommen von Lymphozyten

und Plasmazellen untersucht, die hier ein unterschiedlich starkes Auftreten bei den verschiedenen Probanden unabhängig vom Zeitraum zeigten. Auch eosinophile Zellen, Makrophagen, Fremdkörperzellen und einige Epitheloid- Zellen waren zu sehen. Auffallend war und damit als Zeichen für eine fehlende akute Abstoßungsreaktion, dass *Akle* und *Adolfini* keine Nekrose, Vaskulitis oder polymorphkernige Zellen und im Serum keine HLA-Antikörper fanden (Akle, 1981, S.1003; Adinolfi und Akle, 1982, S.325).

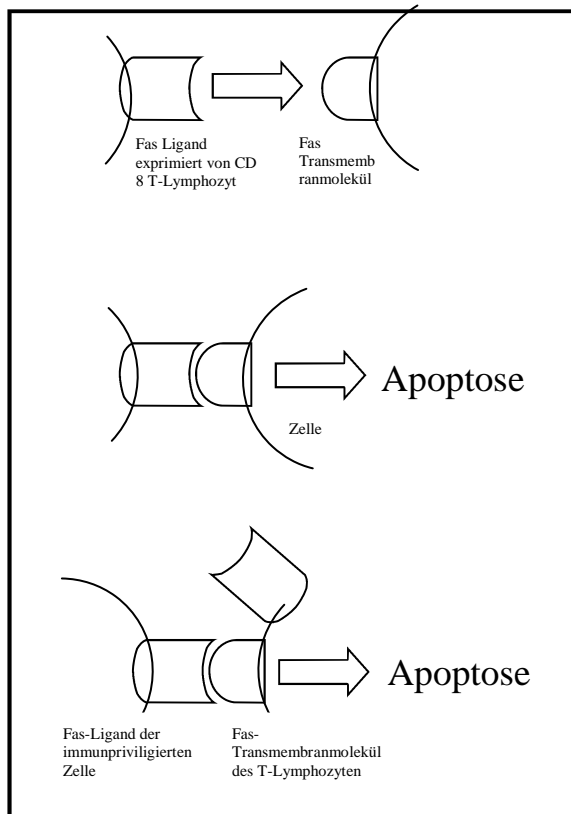


Abb. 11 Der Fas Ligand, der vom T-Lymphozyten exprimiert wird, löst bei Interaktion mit dem Fas Transmembranmolekül, das von allen Zellen exprimiert wird, die Apoptose der Fas exprimierenden Zelle aus. Da die Amnionmembranepithelzelle ebenfalls Fas-Liganden exprimiert kann diese bei Interaktion mit einem Fas exprimierenden T-Lymphozyt, die Apoptose des T-Lymphozyten induzieren. (Demtröder CRD 2010)

In immunhistochemischen Untersuchungen konnte *Kubo et al.* in der Amnionmembran Fas Ligand (FasL) positive Zellen nachweisen (Kubo et al., 2001, S.1539). Als Typ II Membranprotein gehört FasL zur TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) - Familie (Suda, 1993, S.1169), welches mit Fas oder APO-1 oder CD95, ein Typ I Membranprotein mit struktureller Zugehörigkeit zu der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptorfamilie interagiert (Yonehara, 1989, S.1747). Das Fas-Transmembranmolekül induziert über Vernetzung mit dem Fas-Liganden, der von CD8⁺ - zytotoxischen T- Zellen exprimiert

wird, den Zelltod über Apoptose, so dass durch die Interaktion Fas- FasL das Signal für die Apoptose in der Fas exprimierenden Zelle gegeben wird. Interessanterweise wird Fas auch von den T-Zellen selbst exprimiert. Und da immunprivilegierte Gewebe wie die Cornea, Testis, Uterus,

Plazenta und wie oben erwähnt selbst die Amnionmembran den Fas-Liganden exprimieren können, werden die Lymphozyten selbst für die FasL vermittelte Apoptose empfänglich (Griffith, 1995, S.1189).

Auch die Klasse Ib Antigene HLA-G und HLA-E konnten in der Amnionmembran nachgewiesen werden (Houlihan, 1995, S.5665). T-Lymphozyten erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) Antigene in prozessierter Form. Die unterschiedlich langen Antigene, meist Peptide aus 8-25 Aminosäuren, werden von Oberflächenmolekülen, den humanen Leukozytenantigenen (HLA) auf allen kernhaltigen Zellen dargeboten. Der Genort, der für diese Proteine kodiert, wird als „major histocompatibility complex“ (MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex) bezeichnet. Die kodierten Proteine werden als MHC-Moleküle oder HLA bezeichnet. Man unterscheidet MHC-Klasse Ia, (HLA-A, -B, -C), MHC-Klasse Ib (HLA-G, -E, -H, -CD1) und MHC- Klasse II (HLA-DR, -DP und DQ), die sich hinsichtlich ihrer Struktur, Funktion und Verteilung auf den Zellen unterscheiden (Engelhard, 1994, S.181). HLA-Klasse Ia Strukturen bilden mit Peptiden endogenen Ursprungs einen Komplex und werden von den Zellen (ausgenommen der Epithelzellen der Amnionmembran, s.o.) in hoher Dichte exprimiert. T- Lymphozyten binden an die HLA- Ia Moleküle und induzieren, falls virale, fremde oder veränderte Peptide erkannt werden, eine Immunreaktion (Shimonkevitz, 1984, S.2067).

Während für HLA- Ia- Moleküle der große Polymorphismus charakteristisch ist, sind von HLA- Ib Molekülen bisher nur wenige Allele beschrieben worden (Marsh, 2004, S.301 und Marsh, 2006, S.537). Die oligomorphen Moleküle werden auf der Zelloberfläche in nur geringer Dichte exprimiert und gelangen nur in bestimmten Geweben zu einer Expression. Das Klasse Ib Antigen HLA-G und HLA-E werden neben der Amnionmembran unter anderem auch in großer Zahl auf Zytotrophoblasten der Plazenta exprimiert. Eine Funktion besteht darin maternale immunologische Reaktionen auf die vererbten väterlichen MHC- Moleküle des Feten zu unterdrücken oder zu verhindern (Le Bouteiller, 1999, S.223). HLA-G induziert über Bindung an CD8 die Apoptose aktivierter CD8⁺- T-Zellen (Fournel, 2000, S.6100). Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass HLA-G die Antwort Antigen-spezifischer Lymphozyten inhibiert, die Funktion natürlicher Killerzellen (NK) vermindert und einen Einfluß auf die Proliferation von Lymphozyten zu haben scheint (Le Gal, 1999, S.1351; Riteau, 1999, S.203). Die biologische Funktion von HLA-E ist bis dato wenig erforscht. Einige Studien berichten, dass HLA-E die Aktivität natürlicher Killerzellen (NK) und T- Zellen inhibiert, indem es an einen „Killer inhibitor receptor“ (KIR) bindet. Zu dieser Rezeptorfamilie gehört der inhibitorische humane NK Zellrezeptor (NKR) CD94-NKG2A, der sowohl von NK- Zellen als auch von CD8-

T-Zellen exprimiert wird (Borrego, 1998, S.813; Braud, 2003, S.162). Die Bindung dieses Rezeptors an eine HLA-E exprimierende Zelle induziert eine Inhibition der Lyse und unterdrückt die Sekretion von Zytokinen aus den CD94-NKG2A exprimierenden Zellen (Le Drian, 1998, S.264).

2.5.2 Antiinflammatorische Eigenschaft und Immunprivileg

Immunreaktionen spielen an der Fruchtblase ebenso wie im Gesamtorganismus eine wichtige Rolle. Humorale und zelluläre Immunreaktionen finden analog zu anderen Organsystemen auch hier statt. Doch gewährleisten funktionelle und anatomische Besonderheiten der Amnionmembran einen ausreichenden Schutz des Fetus bei gleichzeitiger Minimierung inflammatorischen Begleitschadens. Dieses Phänomen des Immunprivilegs ermöglicht ein verlängertes Überleben von histoinkompatiblem Gewebe in gewissen Orten des Organismus. Zu diesen immunprivilegierten Organen zählen das Auge, das Cerebrum, die Haarfollikel, endokrine Organe (Schilddrüse, Ovarien, Testes, Nebenniere), Leber, das Knorpelgewebe und die fetoplazentare Einheit (Grisanti, 1998, S.124).

Der antiinflammatorische Effekt wird durch Suppression verschiedenster Populationen inflammatorischer Zellen, wie CD3⁺ T-Zellen, CD11b⁺ Neutrophile Granulozyten und F4/80⁺ Makrophagen erreicht (Heiligenhaus et al., 2001, S.1969).

So finden sich Inhibitoren von Matrixmetalloenzymen, die „tissue inhibitor of metalloproteinases“ (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3), eine reduzierte Expression von den Matrixmetalloproteasen MMP-2, -8 und -9, Interleukin-10, welches die Immunantwort reduziert und die Entzündungsreaktion unterdrückt (D'Andrea et al., 1993, S.1041; Borish, 1998, S.293; Heiligenhaus, 2005, S.4079), Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (IL-1RA), als natürlich vorkommende Inhibitoren der Interleukin-1- Wirkung und damit hemmende Faktoren auf die Immunantwort und septische Geschehen (Dinarello, 1992, S.119) und die physiologischen Inhibitoren Endostatin, welche über direkte Hemmung der Endothelzellproliferation die Angiogenese und das Tumorstadium inhibieren (Ferrara et al., 1999, S.1359), in der fetalen Membran (Hao et al., 2000, S.348). Die hochpotenten

proinflammatorischen Proteine Interleukin-1 α und Interleukin- 1 β werden vor allem von der stromalen Matrix auf mRNA- und Proteinebene supprimiert, während das Zytokin IL-1RA hochreguliert wird (Solomon et al., 2001, S.444). Ein anderer antiinflammatorischer Effekt wird über die Downregulation antiapoptotischer Signalwege erreicht. Hierdurch werden in der stromalen Matrix aktivierte Makrophagen zur Apoptose bewegt (Li et al., 2006, S.657).

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil zur Reduktion der Inflammationsreaktion bildet Hyaluronsäure. Sie ist ein Glycosaminoglycan mit hohem Molekulargewicht, welche in hohen Mengen in der Amnionmembran zu finden ist. Hyaluronsäure wirkt als Ligand für CD44, welches auf inflammatorischen Zellen, insbesondere auf Lymphozyten, exprimiert wird und damit einen wichtigen Einfluss auf die Adhäsion der inflammatorischen Zellen an das Stroma der Amnionmembran hat (Higa et al., 2005, S.715).

Und noch ein weiteres Molekül limitiert die zelluläre Abwehrreaktion, das SLPI (secretory leucocyte protease inhibitor). Dieses Protein konnte ebenfalls in der Amnionmembran, aber auch in inflammatorischen Zellen selbst nachgewiesen werden, welches in diesem Zusammenhang als selbstlimitierender Faktor, im Sinne einer intrinsischen Feedback Inhibition, die Aktivität von Mastzellen, Leukozyten und Makrophagen runterreguliert (Williams, 2006, S.21). Über die weiteren Eigenschaften des Proteins werde ich später eingehen.

Es liegt nahe, dass diese biomolekularen Eigenschaften zum Schutze des ungeborenen Lebens bis zur Geburt von großer Bedeutung sind, denn die Erhaltung der Integrität der Amnionhöhle, damit die Hemmung endogener Proteasen oder Proteasen, die bei Entzündungen von infiltrierenden Leukozyten freigesetzt werden, verhindert eine vorzeitige Ruptur der fetalen Membran bzw. der Fruchtblase und schützt den Embryo vor einer überschiessenden Immunantwort.

2.5.3 Antifibroblastische Eigenschaft

Die Narbenbildung stellt den regelhaften Endpunkt der postnatalen Wundheilung dar. Sie lässt sich in zwei Kompartimente unterteilen. Zum einem das Knochenmark, welches über zahlreiche Signalwege, Zytokine und Wachstumsfaktoren angeregt

wird, woraufhin es BMD EPCs (bone marrow-derived endothelial progenitor cells) und andere Progenitor- und Stammzellen, die in der Heilungskaskade involviert sind, freilässt (Asahara et al., 1997, S.964).

Und zum anderen die Wunde selber, welche über lokale Faktoren angrenzende Zellen zur Angiogenese, Epithelialisierung und Fibrosierung und rekrutierte BMD EPCs zur Vaskulogenese stimuliert. Viele weitere Stufen des Wundheilungsprozess ergeben einen komplexen Vorgang, der die Kontrolle über Kontamination und Infektion, Regeneration der Gewebematrix, Angiogenese, Wundkonstriktion und Reepithelialisierung mit einschliesst.

Es stellt sich die Frage wie dieses empfindliche System während der Schwangerschaft verändert wird, denn es kommt zu keiner Narbenbildung bei Verletzungen des Kindes im Mutterleib. Eine Antwort auf diese Frage ist noch nicht vollständig gefunden, doch weisen vor allem die Arbeiten von *Scheffer Tseng* und vieler anderer folgenden Arbeitsgruppen der Amnionmembran eine wichtige Rolle im praenatalen Wundheilungsprozess und damit der günstigen Eigenschaften der Amnionmembrantransplantation zu.

Tseng konnte 1999 in in vitro Studien mit cornealem Gewebe und Fibroblasten eine reduzierte Narbenbildung durch eine effektive Suppression von TGF- β (Transforming growth factor- β) nachweisen (Tseng, 1999, S.325). Von dieser Proteinfamilie sind bisher drei Isoformen auf genetischer Ebene identifiziert worden, das TGF- β 1, TGF- β 2 und das TGF- β 3 (Khalil, 1999, S.1255). Sie regulieren die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen, die Entzündung, Wundheilung, Narbenbildung, Angiogenese und Bildung extrazellulärer Matrixproteine (Letterio, 1998, S.137; Rahimi, 2007, S.593). Je nach Zielzelle und TGF- β Rezeptor werden unterschiedliche Reaktionen ausgelöst. Sie können bei Epithelzellen ein Wachstumstopp hervorrufen und deren Apoptose induzieren (Kim, 2004, S.2356). Oder aber sie leiten die Transdifferenzierung epithelialer Zellen in mesenchymale Zellen, die sogenannte epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ein, welche für den Wundheilungsprozess nötig ist (Saika, 2004, S.651). Ebenso regt TGF- β die Proliferation der Fibroblasten und deren Differenzierung in Myofibroblasten an (Kay, 1998, S.286; Khalil, 2005, S.43000). Die Myofibroblasten wiederum gelten als Schlüsselmediator für die Produktion der extrazellulären Matrix (Phan, 2002, S.286). *Lee et al.* konnte zeigen, dass die Amnionmembran die TGF- β Signalkaskade

unterbricht, indem sie die Transkription von TGF- β und deren TGF- β Rezeptoren in den Fibroblasten unterdrückt (Lee, 2000, S.325). Vor allem die stromale Matrix der Amnionmembran besitzt hier einen wesentlichen Einfluß auf diesen antifibrotischen Effekt (Solomon, 2005, S.941). Weitere Studien konnten sogar zeigen, dass das Stroma lösliche Faktoren beinhaltet, die bereits differenzierte Myofibroblasten wieder in Fibroblasten differenzieren lässt (Li et al., 2008, S.657).

2.5.4 Antiangiogenetische Eigenschaft

Während der Embryogenese beginnen Hämangioblasten zu proliferieren und in avaskuläre Regionen zu migrieren. Sie bilden ein primitives Netzwerk aus großen und kleineren Gefäßen. Diese de novo Synthese oder Vaskulogenese wird im Laufe der Entwicklung durch den Anschluss eines zweiten Netzwerkes erweitert und bis ins kapilläre System ausdifferenziert. Dieser Prozeß wird als Angiogenese bezeichnet. Die Angiogenese unterliegt einem strikt kontrollierten ausbalancierten System. Zahlreiche lösliche Wachstumsfaktoren, Inhibitoren, Zytokine und Proteasen, sowie extrazelluläre Matrixproteine und Adhäsionsmoleküle bestimmen den Ablauf (Distler, 2003, S.149). Sie lösen eine Vasodilatation aus, erhöhen die Gefäßpermeabilität für Endothelzellen und initiieren die Angiogenese. Angiogenetische Stimulatoren, wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF, fördern die Proliferation und Migration endothelialer Zellen, andere angiostatische Faktoren, wie der Pigment epithelium-derived factor (PEDF) oder Angiostatin inhibieren hingegen die Proliferation des Gefäßendothels und verhindern die Ausbildung neuer Blutgefäße aus dem bereits bestehendem Blutgefäßsystem (Dvorak, 1995, S.1029; Cornelius, 1998, S.6845). Dieses empfindliche Gleichgewicht wird physiologisch während der Schwangerschaft, dem Wachstum, oder im Zuge pathologischer Ereignisse wie Entzündung, Wundheilung oder Tumorwachstum zugunsten der Angiogenese verschoben. Die Amnionmembran hingegen zeigt bereits makroskopisch im Falle der Transplantation auf das Auge bereits antiangiogenetische Eigenschaften, was auf molekularer Ebene in immunhistochemischen und RT-PCR-Methode bestätigt werden konnte.

Yanxia Hao wies mittels RT-PCR in epithelialen und mesenchymalen Zellen der Amnionmembran die codierende mRNA für das an der Basalmembran lokalisierte

Proteoglykan Endostatin und für das multifunktionale Matrixprotein Thrombospondin-1 nach (Hao et al., 2000, S.348). Endostatin gilt als potenter physiologischer antiangiogenetischer Faktor, der sowohl die endotheliale Zellproliferation, die Angiogenese als auch Matrixmetalloproteinasen inhibiert (O'Reilly, 1997, S.277). Thrombospondin-1 hemmt in vivo die Proliferation, Migration und die kapilläre Morphogenese endothelialer Zellen und inhibiert auf diesem Wege unter anderem das Tumorwachstum (DiPietro, 1994, S.178). Auch der entscheidende supprimierende Faktor der Neovaskularisation am Auge PEDF konnte in der fetalen Membran sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene identifiziert werden (Shao, 2004, S.1758). Bevor die Endothelzellen aus den preformierten Gefäßen auswachsen können, müssen die Basalmembranen degradiert, murale Zellen entfernt und das perivaskuläre Stroma verändert werden. Hier wirken unter anderem die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Gegenspieler, die TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase).

TIMPs repräsentieren eine Familie von multifunktionalen Proteinen im menschlichen Gewebe und spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Metabolismus der extrazellulären bzw. extravasalen Matrix. Sie haben Einfluß auf die Inhibition der Angiogenese, Gefäßeinsprossung und des Tumorwachstums, der Tumorzellinvasion und der Tumormetastasenbildung. Eine wesentliche Funktion ist die Inhibition und reduzierte Expression der Matrixmetalloproteasen MMP-2,-8,-9 (Hao et al., 2000, S.348). TIMPs werden in grossen Mengen von der Amnionmembran exprimiert und sezerniert (Ma, 2005, S.56; Heiligenhaus, 2005, S.4079).

2.5.5 Antimikrobielle Eigenschaft

Das Immunsystem besteht aus einem unspezifischen, natürlichen und einem adaptiven, spezifischen Teil. Beide ergänzen, verstärken und regulieren sich gegenseitig.

Die angeborene natürliche Immunität ist in der Lage, Mikroorganismen vor oder nach deren Eintritt in das Gewebe zu eliminieren. Dies geschieht noch bevor genügend Antigene vorhanden sind, um eine adaptive Immunantwort mit hoher inflammatorischer Potenz hervorzurufen. Im Bezug auf den Schutz der Frucht im Mutterleib durch die fetale Amnionmembran sind besonders drei Proteingruppen des

archaischen unspezifischen Immunsystems hervorzuheben: die β -Defensine, SLPI (secretory leucocyte protease inhibitor) und die Histone.

β -Defensine sind antimikrobielle Peptide, die sowohl von der Haut, der Mukosa als auch von der Amnionmembran sezerniert werden. Man unterscheidet drei epitheliale β -Defensine, humanes β -Defensin-1 (hBD-1), hBD-2 und hBD-3. hBD-1 und hBD-2 zeichnen sich durch eine bakterizide Wirkung gegen gramnegative, hBD-3 vor allem gegen grampositive Bakterien aus (Scott, 2000, S.407; Harder, 2001, S.5707). Insbesondere das β 3-Defensin konnte in der Amnionmembran nachgewiesen werden (Buhimschi, 2004, S.1678), aber auch die mRNA der humanen β -Defensine hBD-1 und hBD-2 nach Stimulation mit dem hochwirksamen Entzündungsmediator Interleukin-1 β (IL-1 β) wird in den Amnionmembranepithelzellen vermehrt exprimiert (Stock, 2007, S.255).

Das bereits o.g. Protein SLPI wird von der Mukosa und Epithelzelle des Respirationstraktes, Gastrointestinaltraktes und des Amnionepithels exprimiert. Eine wichtige Funktion des Proteins ist der Schutz des Gewebes vor einer schädlichen Entzündungsreaktion. Es inhibiert die Proteasen Kathepsin G, Elastase und Trypsin neutrophiler Granulozyten, die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen und die Makrophagen-Antwort auf bakterielle Lipopolysaccharide (Doumas, 2005, S.1271). SLPI zeigt in *in vitro* und *in vivo* Studien eine breite antibiotische Wirkung, unter anderem gegen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und Gruppe A Streptokokken (Fahey, 2002, S.1606; Hiemstra, 1996, S.4250). Eine weitere Studie von *Tomee et al.* bescheinigte SLPI eine antifungale Aktivität gegen die pathogenen Pilze *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans* (Tomee, 1997, S.740). SLPI scheint ebenso ein wichtiger Faktor für die Blockierung einer HIV-1 Transmission über orale Sekrete zu sein (Shugars, 1999, S.70). Der genaue antivirale Mechanismus und ob SLPI auch eine entscheidende Rolle spielt, die HIV-Infektion des Fetus durch die Mutter während der Schwangerschaft zu verhindern, sind bis dato nicht geklärt.

Eine weitere Proteinfamilie des natürlichen Abwehrsystems stellen die Histone dar. Sie zeichnen sich durch eine antimikrobielle und Endotoxin-neutralisierende Aktivität aus (Kim, 2000, S.3268). Die Histone H2A und H2B werden im Zytoplasma von Synzytiotrophoblasten und Amnionzellen exprimiert und das Protein H2B von den Amnionepithelzellen sezerniert (Kim, 2002, S.2356). Sie stellen eine wirksame

Barriere gegen eine plazentare Penetration durch Bakterien dar und schützen den Fetus vor Endotoxin- bzw. Lipopolysaccharid-positiven gramnegativen Bakterien.

In weiteren Studien konnte die Wirksamkeit gegen *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* und *Lactobacillus* Spezien nachgewiesen werden (Kjaergaard, 2001, S.224). *Mencucci* nahm eine Idee von *Kim et al.* auf, die Amnionmembran als Träger für antiinfektiöse Medikamente zu nutzen. Er erweiterte die natürliche antimikrobielle Eigenschaft und das Wirkspektrum der Amnionmembran, indem er die Membran mit Antibiotika behandelte. Es stellte sich heraus, dass die Struktur der Membran erlaubt, das Antibiotikum aufzunehmen und bei bakterieller Exposition freizulassen. Der antibakterielle Effekt konnte *in vitro* über mehrere Tage beobachtet werden (Mencucci, 2006, S.428).

Es wird deutlich, dass die Amnionmembran bzw. die erhöhte Konzentration amnionaler β -Defensine, SLPI und Histone ein wichtiger Faktor des natürlichen Immunsystems darstellt, invasive Mikroorganismen abzuwehren und eine überschießende Reaktion der spezifischen Immunantwort zu verhindern.

2.5.6 Epithelialisierung

Neben der Unterdrückung der Narbenbildung fördert die Amnionmembran gleichzeitig die Epithelialisierung, was die humane Amnionmembran zu einem idealen Gewebe zur Deckung cornealer Defekte macht. In zahlreichen Studien sowohl tierexperimentell als auch am menschlichen Auge konnte eine gute und rasche Epithelialisierung der Defekte durch die Transplantation humaner Amnionmembran erreicht werden (Gris et al., 1999, S.82; Ivekovic et al., 2005, S.297; Jain und Rastogi, 2004, S.1251; Siennicka et al., 2003, S.41).

Ein wesentlicher Bestandteil ist das Lumican. Dieses Glycoprotein moduliert die epithelialen Zellen während der Wundheilung und dient als Komponent der extrazellulärer Matrix (Yeh et al., 2005, S.479). Es fördert die corneale epitheliale Zellmigration und Zellproliferation (Seomun und Joo, 2008, S.221).

Desweiteren sezerniert die Amnionmembran einen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), einen Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) und einen Keratinozyten

Wachstumsfaktor (KGF), die das Epithelzellwachstum stimulieren (Casey und MacDonald, 1997, S.3319; Sato et al., 1998, S.428; Koizumi et al., 2000, S.173).

Junge Frauen mit cervikaler und vaginaler Agenesie wurden durch eine Zervicoplastik und Vaginoplastik mit Amnionmembran behandelt. Es zeigte sich eine exzellente Epithelialisierung und Durchgängigkeit der Zervix und Vagina (Mhaskar, 2005, S.123). Auch konnte durch die Anwendung der Amnionmembran eine schnelle Re-Epithelialisierung von Ektropien der Portio erreicht werden (Balbi und Balbi, 1989, S.145). Appliziert man die Amnionmembran auf Verbrennungen II-III° der Haut konnte man nach Entfernung der Membran eine epithelialisierte Oberfläche beobachten (Branski et al., 2007, S.393).

Das Amnion agiert gleichsam einer Basalmembran und erleichtert damit die Migration und verstärkte Adhäsion der Epithelzellen (Sonnenberg et al., 1991, S.907; Khodadoust et al., 1968, S.339). Es fördert die epitheliale Differenzierung (Meller und Tseng, 1999, S.878) und unterdrückt die epitheliale Zellapoptose (Boudreau et al., 1991, S.1383 und Boudreau et al., 1996, S.3509).

Tab.: Effekte der HAM auf Zytokine, Wachstumsfaktoren, Entzündungsreaktion, Neovaskularisierung und Fibrosierung

Effekt/Aussage	Methode	Autor
Suppression von TGF- β 1,- β 2,-3 und TGF- β Typ II Rezeptor mRNA Transkripte und TGF- β 1 und - β 2 Proteinlevel	Kultivierung cornealer und limbalen Fibroblasten auf der stromalen Seite der Amnionmembran	Tseng SCG et al. 1999
Suppression der Fibroblasten-zu-Myofibroblasten Differenzierung	Kultivierung cornealer und limbalen Fibroblasten auf der stromalen Seite der Amnionmembran	Tseng SCG et al. 1999
Expression von HLA-G und Fas ligand, humane Amnionmembran ist ein immun-privilegiertes Organ	Monoklonale Antikörper gegen HLA der Klasse I und II und Fas Ligand + histologische und immunhistologische Untersuchung der Immunreaktion bei cornealer, limbalen und unter der Nierenkapsel gelegener Transplantation	Kubo M et al. 2001
Anti-inflammatorischer Effekt durch Suppression von CD3+ T-Zellen, CD11b+ Neutrophile und F4/80+ Makrophagen	Immunhistochemische Analyse inflammatorischer Zellen auf der Cornea mit nekrotisierender Keratitis nach AMT	Heiligenhaus et al. 2001
Reduzierte Expression von MMP-2, -8, -9 und gesteigerte Expression von TIMP-1 und TIMP-2	Immunhistochemischer und Western-Blot Nachweis von MMPs und TIMPs in cornealen Proben	Heiligenhaus et al. 2005
Expression antiangiogenetischer und antiinflammatorischer Proteine IL-1RA,IL-10, TIMP 1-4, KollagenXVIII,Thrombospondin-1, Endostatin	Immunhistochemische und RT-PCR RNA Analysen an der Amnionmembran	Hao Y et al. 2000
Stabilisierende Wirkung auf humane corneale Keratinozyten in Kultur	Nachweis von Keratokanen humaner cornealer Keratinozyten in einem Serum-Kulturmedium	Espana EM et al. 2003

Inhibition der Neovaskularisierung durch Expression von PEDF auf mRNA und Proteinebene in der Cornea	Kultivierung von humanen umbilikalvenen Endothelzellen auf HAM mit folgender Western Blot und immunhistochemischer Analyse der PEDF Konzentration und RT-PCR für die mRNA- und DNA-Bestimmung	Shao C et al. 2004
Antiangiogenetischer Effekt auf humanen Endothelzellen der Umbilikalvenen v.a. durch Endostatin	Quantifizierung von TIMP-1, TSP-1, PEDF und Endostatin mittels ELISA-Assay	Ma DHK et al. 2004
Beschleunigung der Wundheilung cornealer Defekte durch einen hohen Anteil an löslichem Lumikan Glykoprotein in der HAM	Zwei-dimensionale und SDS Gelelektrophorese, und Western Blot Analyse mit Anti-Lumikan AK	Yeh LK et al. 2005
Wachstumsfaktoren EGF, TGF- α , KGF, HGF, bFGF, TGF- β 1, - β 2 fordern die Epithelialisierung	RT-PCR und ELISA deepithelialisierte und native HAM	Koizumi NJ et al. 2000
Adhesion und Apoptose-Induktion polymorpher mononukleärer Leukozyten	Elektronenmikroskopie und HE-Färbung	Park WC und Tseng SCG 2000
Suppression der Myofibroblastischen Differenzierung und Expression MMP-2, MMP-9	Immunhistochemische Beobachtungen mittels Antikörper gegen α -SMA, Vimentin, MMP-1, MMP-2 und Membran-Typ I-MMP	Takahashi et al. 2007

2.6 Konservierung und Utilisarisierung der Amnionmembran

Für den klinischen Gebrauch sollte die Amnionmembran leicht verfügbar, über eine gewisse Zeit lagerbar, frei von Kontaminationen und biologischen Degenerationen sein.

Von *Adds* 2001 durchgeführte bakteriologische Untersuchungen zeigten, dass die Amnionmembran bereits bei Entnahme nicht steril ist, gleich ob sie von vaginalen Geburten oder von Kaiserschnittgeburten gewonnen wurde. Dabei ist das Kontaminationsrisiko mit pathogenen bakteriellen Keimen bei vaginalen Entbindungen größer als bei elektiven Sectiones caesareae (*Adds et al.*, 2001, S.228). Dennoch geht man von einem geringen Infektionsrisiko für den Empfänger aus, so dass bestimmte Sterilisationsverfahren, wie die für die Amnionmembran in ihrer biologischen Funktion vertretbaren Bestrahlung mit 25 kGy, nicht notwendig sind (*Singh et al.*, 2006, S.505).

Änderungen in der biologischen Funktion bilden den limitierenden Faktor der Haltbarkeit und hängen unmittelbar mit der Konservierungsmethode zusammen. Studien zeigen, dass die Amnionmembran aseptisch bei 4°C in 0,5% Silbernitrat Lösung, in 20%iger Glycerin Lösung oder in steriler Salzlösung bis zu 6 Wochen lagerbar ist (*Haberal et al.*, 1987, S.159; *Colocho et al.*, 1974, S.370; *Robson und Krizek*, 1973, S.144). Gefrorenes Amnion kann bei -70 bis -90°C bis zu 6 Monaten gelagert werden (*Ramakrishnan und Jayaraman*, 1997, S.33). Konserviert man die Amnionmembran in 85%iger Glycerin Lösung bei 4°C zeigt sie auch nach über einem Jahr keine biologischen Veränderungen gegenüber frischer Amnion (*Maral et al.*, 1999, S.625).

Heute wird meist frische Amnionmembran und kryokonservierte Amnionmembran genutzt, aber auch gefrorene (*Colocho, et al.*, 1974, S.370), getrocknete, bestrahlte (*Rao und Chandrasekharam*, 1981, S.891; *Singh et al.*, 2006, S.505) gefriergetrocknete (*Nakamura et al.*, 2004, S.93) und lyophilisierte (*Burgos und Sergeant*, 1983, S.433) Membranen wurden in Studien angewandt.

In unserer Studie nutzten wir ein nach *Tseng* 1997 entwickeltes Verfahren, das die Amnionmembran in einer auf Glycerin basierenden Lösung bei -80°C konserviert. Dies ermöglicht den serologischen Status der Spenderin vor der Transplantation zu untersuchen. Es gibt ebenso Hinweise in der Literatur, dass Glycerin antivirale und

antibakterielle Eigenschaften besitzt, so dass das Übertragungsrisiko von Erregern erheblich minimiert werden kann (Marshall et al., 1995, S.356; Maral et al., 1999, S.625). Neueste Untersuchungen zeigen, dass die Immunogenität von cryopreservierter Amnionmembran weniger ausgeprägt ist als bei frischem Gewebe und somit ein geringeres Risiko von Immunreaktionen des Empfängers zeigt (Wang et al., 2006, S.1522).

2.7 Zielsetzung

Die humane Amnionmembrantransplantation stellt eine in Bezug auf ihre Immunogenität bisher nur teilweise erforschte Form der Defektdeckung dar. Ziel des Projektes ist es deshalb, wesentliche noch offene Fragen zur Immunologie bei der Integration in nicht immuntolerantes, gut vaskularisiertes und mechanisch belastetes Empfängergewebe zu beantworten.

Die geplanten tierexperimentellen Untersuchungen sollen klären, ob diese Form der Defektdeckung als klinische Routinemethode zum Ersatz der Mundschleimhaut geeignet ist.

Zentraler Gegenstand der geplanten Arbeiten soll die Bestimmung immunologischer/immunmodulierender und Angiogenese - assoziierter Parameter sein, die nach verschiedenen Einheilungszeiten getestet werden.

Darüber hinaus soll durch quantitative mikroskopische und immunhistochemische Verfahren analysiert werden, inwieweit eine Interaktion der Amnionmembran mit dem Umgebungsgewebe stattfindet.

Die Untersuchungen sollen unter Anwendung eines bereits etablierten Muskeltransplantationsmodells an der Ratte erfolgen. Zusammenfassend soll zunächst kryokonservierte humane Amnionmembran xenogen auf die Bauchwandmuskulatur von Sprague-Dawley-Ratten transplantiert und die Einheilung mit und ohne Immunsuppression beobachtet werden. Um die Eignung der eingeheilten, nun vaskularisierten und dem Muskel fest aufliegenden Membran zum Ersatz der Mundschleimhaut zu testen, wird diese in einem zweiten Schritt

zusammen mit der Muskulatur, die lediglich als Träger dient, unter Anlegen mikrovaskulärer Anastomosen auf weitere Sprague-Dawley-Ratten syngen transplantiert. Die auf diese Weise durchblutete Membran wird hierbei zur Abdeckung eines an der Mundschleimhaut geschaffenen umschriebenen Defektes verwendet. Mit diesem zweiten Schritt kann somit auch die mechanische Belastbarkeit der Membranen überprüft und die Frage beantwortet werden, ob HAM als eigenständiges Gewebe in der Mundhöhle erhalten bleibt, ob sie einer Granulation unterworfen wird oder ob sie als Leitstruktur für neu einsprossendes Mundschleimhautepithel dient. Weiterhin wird geklärt, ob bei nun fehlender Immunsuppression Abstoßungsreaktionen an den fetalen Membranen zu beobachten sind oder ob es zur Immuntoleranz kommt.

Meine Arbeit beruht auf einem Teilgebiet dieser Arbeit und beschäftigt sich mit dem ersten Schritt. Es werden die unterschiedlichen Veränderungen nach Transplantation in Mono- und Multilayertechnik und Immunsuppression auf die Muskulatur der Sprague-Dawley Ratten untersucht und in Hinblick auf Immuntoleranz und Immunreaktion gewertet.

3. Methodik

3.1 Vorbereitung

Die im Folgenden vorgestellten tierexperimentellen Versuche wurden bei der damals zuständigen Behörde der Regierung des Landes Nordrhein-Westfalen angezeigt.

Das experimentelle Protokoll wurde bewertet und vom lokalen Regierungsbezirk Arnsberg/Westfalen autorisiert (50.8735.1 Nr. 103/1). Das chirurgische Vorgehen wurde vom Komitee für Tierschutz der Ruhr-Universität Bochum überprüft und freigegeben. Die Experimente wurden an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Knappschaftskrankenhaus Langendreer und in den Räumen des KAFFZ (Klinisch-Anatomische Forschungs- und Fortbildungszentrum der Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten am Institut für Pathologie der Ruhr-Universität Bochum an den BG-Kliniken Bergmannsheil und im plastisch-chirurgischen Labor der BG-Kliniken Bergmannsheil Bochum.

Die Plazenten wurden mit Einverständnis der Spenderinnen aus Sectiones caesareae gewonnen, die am akademischen Lehrkrankenhaus Augusta-Krankenanstalt Bochum und an der Universitätsklinik Knappschafts-Krankenhaus Langendreer durchgeführt wurden.

3.1.1 Aufbereitung der Amnionmembran

Die auf dieser Arbeit beruhende Methode zur Gewinnung und Aufarbeitung der Amnionmembran wurde an der Universität Heidelberg 1998 von *Kruse et al* entwickelt (Kruse et al., 1998, S.114).

Die Entnahme der Plazenta erfolgt aus Sectiones caesareae, welches momentan die einzige praktikable Möglichkeit zur Gewinnung der Amnion darstellt. Die Gewinnung der Amnionmembran sollte möglichst steril, atraumatisch und blutfrei erfolgen, um ihre biologischen Eigenschaften zu erhalten und um eine Kontamination des Empfängers mit Spenderkeimen zu vermeiden. Die Spenderinnen sind vorzugsweise

Erstpara, da die Qualität besser und die Ablösung der Amnionmembran vom Chorion einfacher ist. Sie sollten frei sein von infektiösen Krankheiten, insbesondere seronegativ für Hepatitis B, Hepatitis C und HIV. Die immunologischen Untersuchungen der Spenderinnen erfolgten an der jeweiligen Klinik, in denen die Sectiones stattfanden. Die Spenderinnen wurden über die Verwendung der Plazenta gemäß den Richtlinien des Transplantationsgesetzes aufgeklärt. Im gynäkologischen OP erfolgte die Durchtrennung der Nabelschnur und Kontrolle der Plazenta durch den Gynäkologen. Nach entsprechender Freigabe durch den Operateur wurde der Mutterkuchen grob mit Ringer-Lactatlösung von Blut gereinigt und von der OP-Schwester in einen für den Transport sterilen Behälter mit der Membranseite bzw. Nabelschnurseite nach oben gelegt. Dann erfolgte die sofortige Bearbeitung der Plazenta in einem geeigneten Labor. Die Plazenta kann aber auch für einige Stunden in einem Kühlschrank gelagert werden, wobei darauf geachtet werden muss, dass die Membran nicht austrocknet. Die Präparation erfolgte unter sterilen Kautelen und unter Abzug (Laminar flow hood) in den Forschungsräumen der ophthalmologischen Fakultät des Uniklinikums Essen und im plastisch- chirurgischen Labor der BG-Kliniken Bergmannsheil Bochum. Vorsichtig wurde die kindliche Seite bzw. die Nabelschnurseite mit Kochsalzlösung gespült und von Restblut befreit. Von der Nabelschnur entfernten Seite aus wurde die Amnionmembran stumpf vom Chorion abgelöst. Unter dem Lichtmikroskop erkennbare kleine Spalten zwischen diesen Schichten erleichtern die digitale Präparation (Rejzek et al., 2001, S.95).

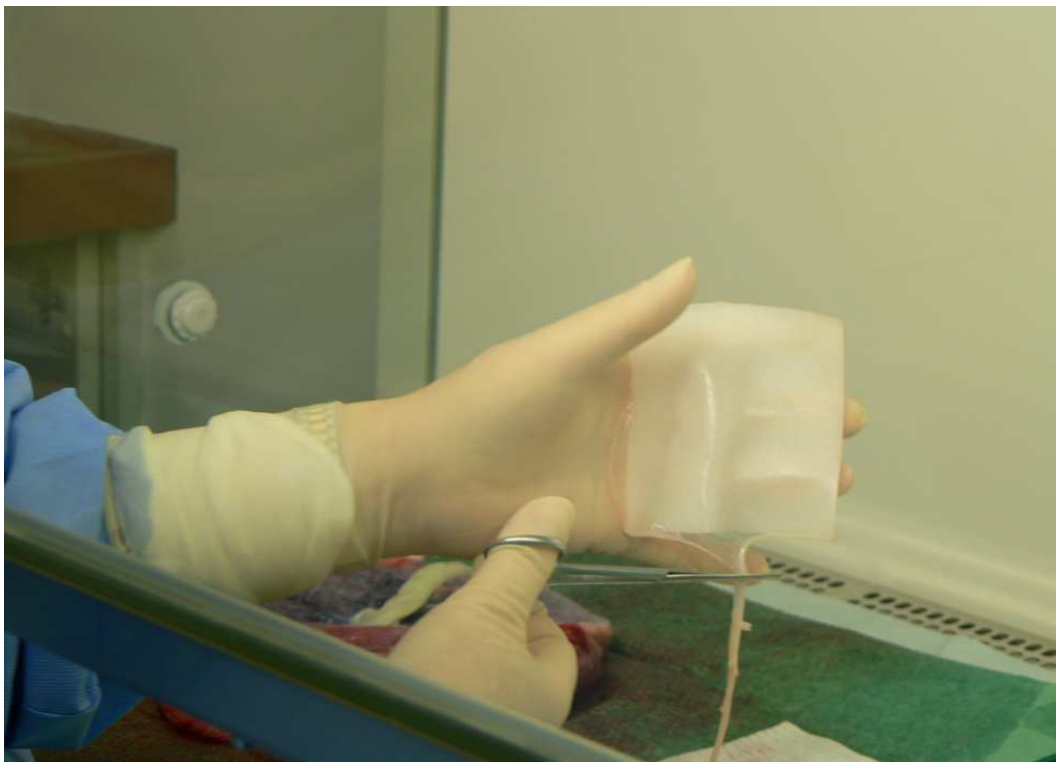


Abb. 12a+b: Abpräparation der Amnionmembran. Entscheidend ist, die Orientierung der Amnionmembran beizubehalten. Das Amnion wird stumpf vom Chorion abpräpariert und aufgespreizt. Dem Betrachter zugewandte Seite ist die stromale Seite. Die abgewendete Seite zur Nabelschnur hin ist die Epithelseite, dem Kind zugewandte Seite.

Abbildung 12. zeigt die Ablösung der Amnionmembran von der Plazenta, wobei streng auf die Orientierung der Amnionmembran geachtet werden muß. Die dem Kind bzw. der Nabelschnur zugewandte Seite bildet das Amnionmembranepithel, der Plazenta bzw. dem Chorion aufliegende, zugewandte Seite wird vom azellulären Stroma der Amnionmembran gebildet. Die aufgespreizte Membran wurde mit der stromalen tastbar rauhen, fast klebrigen Seite auf Rauocel® (Fa. Lohmann-Rauscher, Neuwied, Deutschland) aufgespannt. Je nach späterem Anwendungsgebiet konnte das Rauocel auf die jeweilige Größe zugeschnitten werden. Die Amnionmembran wurde mit 7.0 Perma-Hand-Seide (Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) an den jeweiligen Ecken angenäht.

Die Konservierung der Präparate erfolgte nach einem von *Tseng* 1997 entwickeltem Verfahren, das auf der Konservierungsmethode von *Basile* basiert, der Glycerin als einfaches, effizientes und kostengünstiges Konservierungsmittel implimentiert hat (*Basile*, 1982, S.969) und der Niederländer *Hermans* adaptierte (*Hermans*, 1989, S.57). Es wurde eine Gefrierlösung aus 250 ml Nährmedium DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium der Fa. Gibco-Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 5 ml Lösung mit 50000 U Penicillin und 50 mg Streptomycin (Fa. Bio-Whitaker, Verviers, Belgium), 5 ml Lösung mit 1250 µg Amphotericin B (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland) und 250 ml Glycerin (Rotipuran®, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) steril hergestellt und in Plastikröhrchen zu 25 - 30 ml gefüllt. Die zugeschnittenen Amnionpräparate wurden so in die Röhrchen eingebracht, dass die Membran keinen Kontakt mit der Röhrchenwand hatte, sondern zur Konservierungslösung ausgerichtet war und von dieser vollständig bedeckt wurde. Die Röhrchen wurden bei - 80°C eingefroren. Die kryokonservierte Amnionmembran ist in diesem Zustand über ein Jahr (*Maral et al.*, 1999, S.625) und länger (*Ravishanker et al.*, 2003, S.369) ohne Einbuße ihrer wichtigen biologischen Eigenschaften haltbar. Nach Entnahme der Amnion aus der Kühlung ist diese innerhalb weniger Minuten und verwendungsfähig.

3.1.2 Versuchstiere

Für die tierexperimentellen Studien wurden 120 männliche etwa 12-14 Wochen alte Sprague- Dawley Ratten (Charles River Laboratorien, Sulzdorf, Deutschland) benötigt. Das Gewicht der Tiere zu Beginn der Experimente lag zwischen 280 und 330 g. Alle Ratten wurden im Tierversuchslabor der Ruhr-Universität Bochum unter standardisierten Bedingungen gehalten, die sich nach dem europäischen Übereinkommen in Anhang A der Richtlinien für Tierversuchshaltung richten. Die Tiere hatten eine mindestens einwöchige Eingewöhnungsphase und wurden nach der Operation einzeln in Typ IV Macrolon Käfigen mit einer Grundfläche von 1800 cm² und einer Höhe von 18 cm plus einer Gitterdeckelhöhe von 4,5 cm gehalten. Der Raum war belüftet mit einem 12 bis 15 fachen Luftwechsel pro Stunde, die Raumtemperatur betrug im Schnitt $21 \pm 1^\circ\text{C}$, die Luftfeuchte lag bei etwa 46%. Tag- und Nachtphasen wechselten in einem 12 Stunden Rhythmus mit Dämmerungsphasen. Die Laborratten kamen jederzeit ad libitum an Nahrung (standardisierte Mäuse- und Ratten-Futter Altromin 1324 der Fa. Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und sauberen Trinkwasser.

3.1.3 Immunsuppression mit Ciclosporin A

Ciclosporin A ist ein Metabolit aus dem norwegischen Schlauchpilz *Tolypocladium inflatum*, bestehend aus 11 Aminosäuren (sechs N- methyliert und eine D- Aminosäure), die ein zyklisches Peptid ergeben. Die Substanz ist hydrophob, welches sich daraus erklärt, dass sieben Amidstoffatome der Peptidbindungen methyliert sind, während die anderen drei innerhalb des Moleküls Wasserstoffbrücken bilden. Das Molekulargewicht beträgt 1202,63 Da.

Anwendung

Die immunsuppressive Wirkung von Ciclosporin A wurde im Januar 1972 von einer Laborantin der Firma Sandoz (heute Novartis) in Basel, Schweiz, Sibylle Stutz

bemerkt und vom Laborleiter *H.F. Stähelin* implementiert (Stähelin, 1996, S.5). *Hartmann F. Stähelin* und *Jean Francois Borel* wiesen in langjährigen tierexperimentellen Studien die immunsuppressive, antiphlogistische und antiproliferative Wirkung auf das Immunsystem nach (Borel et al., 1976, S.468). Seit der Einführung und Zulassung durch die US Food and Drug Administration im November 1983 ist Ciclosporin A maßgeblich an den Erfolgen der Transplantation beteiligt. Neben der Transplantationmedizin wird Cyclosporin A auch bei rheumatoiden Arthritis, kindlichem systemischen Lupus erythematodes, entzündlichen Kollagenose (Sklerodermie, Polymyositis), Vaskulitiden (Takayasu Arteriitis, Pyoderma gangränosum), M. Still, Felty-Syndrom, Psoriasis und nephrotischem Syndrom eingesetzt (Manger et al., 1996, S.669). Versuchsweise wird Ciclosporin auch bei Autoimmunerkrankungen wie der Minimal change Glomerulonephritis, Myasthenia gravis und in schweren Fällen von Colitis ulcerosa angewendet (Futami et al., 1998, S.408).

Pharmakodynamik

Ciclosporin A zählt zu der Gruppe der Calcineurininhibitoren. Es bindet an das zytosolische Immunophilin Cyclophilin der T-Zellen, welches eine Rolle bei der Proteinbiosynthese spielt. Der gebildete Ciclosporin-Cyclophilin Komplex hemmt die Phosphataseaktivität von Calcineurin und verhindert so die Transkription von Interleukin 2. Bei Abwesenheit von Interleukin 2 können die T-Zellen, vor allem die CD4-T-Zellen, nicht aktiviert werden und aktivierte T-Zellen nicht proliferieren (Emmel et al., 1989, S. 1617; Eckstein et al., 2005, S. 782).

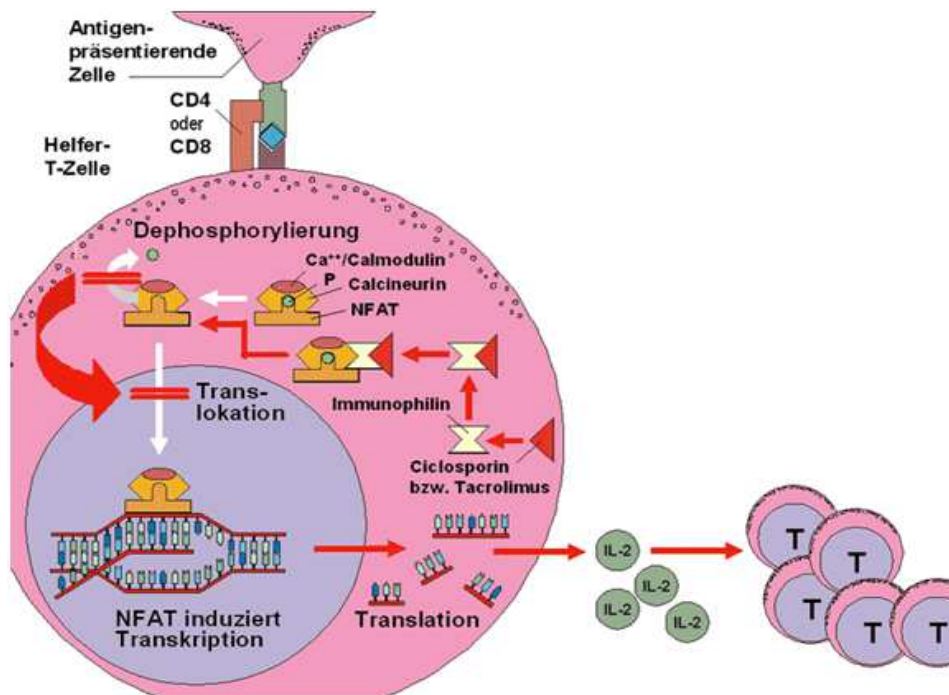


Abb. 123: Die Calcineurininhibitoren Cyclosporin und Tacrolimus binden an Immunophilin. Der Komplex Immunophilin und Immunsuppressivum hemmt die Phosphataseaktivität von Calcineurin und verhindert so die Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT („nuclear factor of activated T-cells“) in den Zellkern. Hierdurch wird in der T-Zelle die Produktion von Interleukin-2 gehemmt. (© Novartis Pharma)

Die Immunreaktion der T-Zellen auf fremde HLA-Peptidkomplexe, die sogenannte Alloreaktivität (Abbas und Lichtman, 1998), wird somit supprimiert. Dies führt zu einer reversiblen Hemmung des Immunsystems.

Desweiteren inhibiert Cyclosporin A die Transkription von IL-3, IL-4, CD40 Ligand und IFN- γ und scheint einen Einfluß auf die positive und negative Selektion unreifer Thymozyten zu haben (Hayden-Martinez et al., 2000, S.3713).

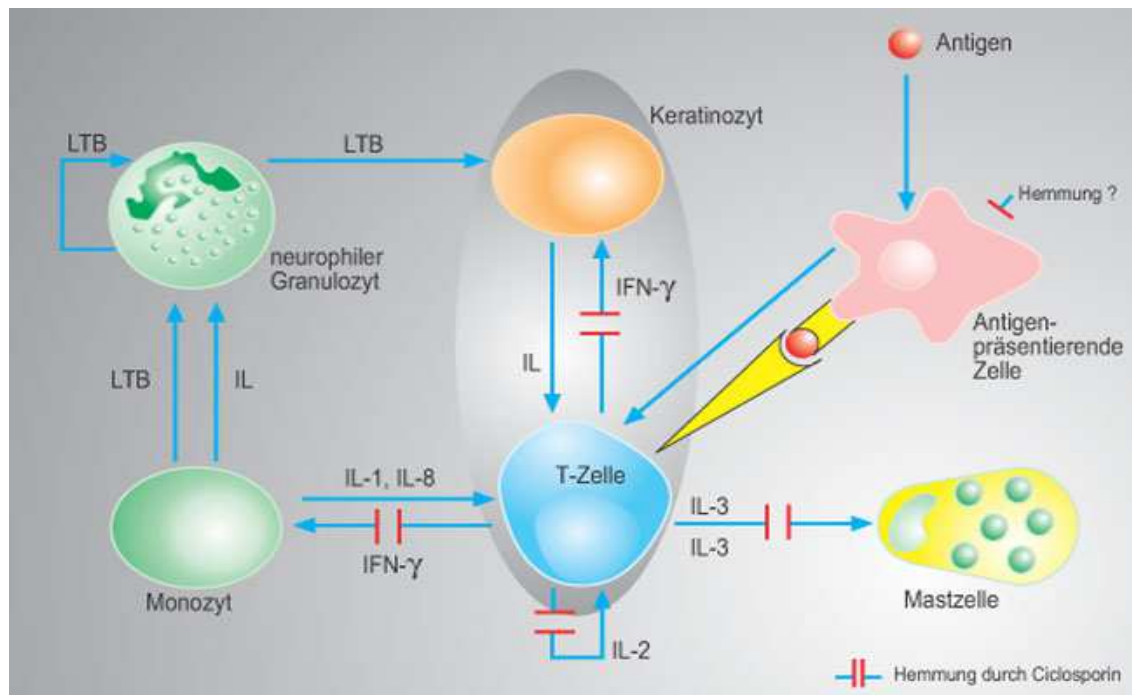


Abb. 14: Wirkungsweise von Ciclosporin. Die roten Balken zeigen die Signalwege, die durch Ciclosporin gehemmt werden. (<http://www.rheuma-online.de>)

Bei parenteraler Aufnahme bindet Ciclosporin A zu 50-70% zellulär an Erythrozyten und zu einem geringeren Anteil an Lymphozyten. Der restliche Anteil ist im Plasma an Lipoproteine gebunden. Hauptsächlich wird die Substanz über das hepatische mikrosomale Cytochrom P450 Enzym CYP3A4 abgebaut und mit der Galle ausgeschieden (Kelly und Kahan, 2002, S.275).

Nebenwirkungen

Obwohl die Verabreichung von Ciclosporin A das langfristige Überleben von Transplantaten begünstigt, ist seine Anwendung wegen vielfältiger Nebenwirkungen eingeschränkt. Im Vordergrund stehen die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie und die Nephrotoxizität.

Die Ciclosporin induzierte Nephrotoxizität ist durch eine Einschränkung der renalen Perfusion, der glomerulären Filtration und einer erhöhten Inzidenz von Hyperkaliämien, die der Tubulotoxizität zugeschrieben wird, gekennzeichnet. Es wird von einer ciclosporininduzierten chronisch irreversiblen Toxizität ausgegangen, so

dass Nierenschäden auch bei niedrig- dosierter Therapie nicht ausgeschlossen werden können (Heering et al., 1991, S.880; Porayko et al., 1994, S.105).

Auf welchen Mechanismen die arterielle Hypertonie beruht, wird zurzeit diskutiert. So wird ein Einfluss auf das vaskuläre und kardiovaskuläre System (Baroreflex), das vegetative und neurovegetative Nervensystem vermutet (Olivari et al., 1989, S.34; Scherrer et al., 1990, S.693; Lucini et al., 1997, S.615; Lucini et al., 2000, S.1258; Bouhaddi et al., 2004, S.325).

Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Gastritis oder Gastroenteritis sind häufige gastrointestinale Beschwerden. Bemerkenswerterweise kommt es häufig zu Gingivitis hypertrophicans. Ein Anstieg von Bilirubin und Leberenzymen bis zu Gefahr der Leberinsuffizienz ist zu beobachten, die aber dosisabhängig und reversibel zu sein scheint. Desweiteren wird eine erhöhte Inzidenz eines postoperativen insulinpflichtigen Diabetes mellitus beschrieben.

Neurologische Nebenwirkungen äußern sich in Form von Tremor, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Parästhesien, insbesondere ein Brennen in Händen und Füßen, Sehstörungen, Lethargie, Konvulsionen, Ataxie und bis hin zum Koma (Webster et al., 2005, S.1; Rosendal et al., 2005, S.3305; Guennoc et al., 2005, S.221).

Wechselwirkung

Verschiedene Substanzen erhöhen oder senken die Vollblutkonzentrationen von Ciclosporin entweder durch kompetitive Hemmung oder durch Induktion der Leberenzyme, die am Abbau und an der Ausscheidung von Ciclosporin beteiligt sind. Zu den Inhibitoren gehören antivirale HIV Medikamente, Grapefruitsaft, Erythromycin, Ketoconazol, Chloramphenicol, Amiodaron, Fluconazol, Diltiazem, Norfloxacin, Verapamil, Clarithromycin, Cimetidin und viele andere Induktoren. Substanzen, die die Produktion des Enzyms und/oder die Stoffwechselaktivität steigern sind unter anderem Barbiturate, Carbamazepine, Phenytoine, Glukokortikoide, Modafinil, Rifampicin und Troglitazone. Desweiteren werden auch über CYP3A4 diverse andere Stoffe verstoffwechselt wie Fentanyl, Haloperidol, Methadon, Sildenafil, Tamoxifen, Codein und Kokain (Watkins, 1990, S.1301; Caraco et al., 1996, S.761; Gorski et al., 1994, S.173). Während der Durchführung der tierexperimentellen Versuche fiel auf,

dass die Ratten, die mit Ciclosporin A behandelt wurden, weniger Ketamin zur Sedierung und Narkose sowie zur Aufrechterhaltung der Narkose gebraucht haben, als die Versuchstiere, die nicht das Immunsuppressivum erhielten. Dieses Phänomen konnte bei allen immunsupprimierten Ratten festgestellt werden.

Ketamin wird in der Leber von Cytochrom P-450 zu Norketamine N- demethyliert und weiter zu seinem zweiten Metaboliten Dehydronorketamine oxidiert (Bolze und Boulieu, 1998, S.560). In der Literatur findet sich bisher kein Nachweis, ob die beiden Substrate Ciclosporin und Ketamin um das Enzym Cytochrom P450 konkurrieren. Die tierexperimentelle Erfahrung zeigt, dass zumindest die Dosierung von Ketamin zunächst möglichst niedrig zu halten ist, um eine plötzliche Atemdepression der immunsupprimierten Tiere zu vermeiden.

Aufarbeitung und Dosierung für den Tierversuch

Das Immunsuppressivum wurde intraperitoneal verabreicht. Dazu wurden die Tiere mit dem Bauch nach oben kopftief gehalten und die Nadel in die mittlere Bauchregion eingeführt, um eine Verletzung der abdominalen Organe und der Transplantate zu vermeiden.

Unter persönlicher Absprache mit Novartis Pharma wurde folgende Dosierung und Zusammensetzung gewählt.

Die einmal täglich applizierte gewichtsadaptierte Dosis lag bei 20 mg/kg/Tag Ciclosporin A (CsA, Sandoz AG, Nürnberg, Deutschland). Eine für den Organismus resorbierbare Emulsion aus 100 mg CsA in 40 mg Ethanol und 810 mg Miglyol (Neutralöl aus mittelkettigen Triglyceriden) wurde in der Klinikapotheke des Knappschafts-Krankenhauses Langendreer steril vermengt und filtriert. Die Applikation erfolgte mit einer entsprechend skalierten Spritze und Nadel (0,3x8mm).

3.2 Transplantation

Die Eingriffe wurden im Labor des Klinisch- Anatomischen Forschungs- und Fortbildungszentrum am Institut für Anatomie der Ruhr-Universität Bochum von März 2006 bis Juli 2007 durchgeführt. 120 Ratten wurden von einem Computer erstellten randomisierten Liste in drei Gruppen unterteilt. Zwei Gruppen mit 36 Ratten und eine Gruppe mit 48 Versuchstieren. Der ersten Gruppe [A (Amnion) MO (Monolayer); n=36] wurde eine einlagige Schicht Amnionmembran transplantiert. Nach jeweils 3, 14 und 28 Tagen erfolgte bei jeweils 12 der 36 Ratten die Explantation des Transplantats [A MO 3 (Tage); n=12, A MO 14 (Tage); n=12, A MO 28 (Tage); n=12]. Der zweiten Gruppe [AC (Amnion mit Ciclosporin) MO; n=36] wurde ebenfalls eine einlagige Schicht Amnionmembran aufgenäht. Zusätzlich erfolgte eine immunsuppressive Behandlung mit Ciclosporin in einer Dosierung von 20mg/kgKG pro Tag. Die Entnahme erfolgte analog am 3., 14. und 28. Tag post transplantationem (AC MO 3; n=12, AC MO 14; n=12, AC MO 28; n=12). Bei der dritten Gruppe [AC ML (Multilayer); n=48] erfolgte die Platzierung und Fixierung einer mehrlagigen Amnionmembranschicht auf die Bauchwandmuskulatur. Auch diese Gruppe wurde mit Ciclosporin in gleicher Dosierung immunsupprimiert. Am 3., 14. und 28. postoperativen Tag erfolgte bei jeweils 12 Tieren die Explantation und Euthanisierung und am 60. Tag wurden 12 Ratten wieder eröffnet und der transplantierte Bereich entnommen (AC ML 3; n=12, AC ML 14; n=12, AC ML 28; n=12, AC ML 60; n=12).

Tabelle 2: Aufteilung der Versuchsgruppen

Transplantat	Gruppe	Entnahme am 3. Post-OP Tag	Entnahme am 14. Post-OP- Tag	Entnahme am 28. Post-OP- Tag	Entnahme am 60. Post-OP- Tag	
Amnion Monolayer	A MO	12	12	12		
Amnion Monolayer + Cs	AC MO	12	12	12		
Amnion Multilayer + Cs	AC ML	12	12	12	12	
Gesamt		36	36	36	12	<u>120</u>

3.2.1 Transplantation humaner Amnionepithelmembran in Monolayer Technik

Das Amnion wurde aus dem – 80°C Gefrierschrank entnommen. Sobald die Membran durch das Auftauen etwas mobilisiert war, wurde sie in eine flache sterile Petrischale mit der Nährlösung gegeben. Das Rauocel konnte sich ausbreiten und die Membran lag dem Nitrozelluloseträger fest auf, fixiert an den jeweiligen Ecken.

Die Versuchstiere wurden aus dem Käfig entnommen und kopftief mit dem Bauch nach oben gehalten, dass das Darmkonvolut nach kranial entweicht. Danach erfolgte intraperitoneal etwa 3 cm oberhalb des Geschlechts die gewichtsadaptierte Misch-Injektion aus Ketamin 10% (10mg/100g KG Ratte, Bela-Pharm GmbH & Co.KG, Vechta, Deutschland) und Xylazin 2% (0,3ml/100g KG Ratte, Fa. Riemser AG, Greifswald-Insel Riems, Deutschland). Nach einigen Minuten verfielen die Ratten in eine tiefe Narkose, eine Aussetzung des „pedal withdrawal reflex“ konnte nach zehn Minuten beobachtet werden. Die intraoperative Nachdosierung erfolgte mit Ketamin mit der $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ fachen der Initialdosis bei positiven „pedal withdrawal reflex“ oder „pinch toe test“. Dieser war positiv wenn bei Reizung der Pfote mit einer chirurgischen Pinzette eine Muskelkontraktion erkennbar war. Die Tiere atmeten spontan, waren aton und „schmerzfrei“. War nur ein Operateur anwesend, wurden die Tiere vor der Narkoseinjektion unter einer Glasglocke mit Ether betäubt. Der Boden der Glasglocke wurde mit mehreren Tupfern (Tupfer, Zelletten, Fa. Lohmann) ausgelegt und mit einigen Tropfen Diethylether (Fa. Merck, Darmstadt) benetzt. Das Tier wurde in das Gefäß gesetzt, wobei ein Lochsieb den direkten Kontakt mit den benetzten Tupfern verhinderte. Nach wenigen Sekunden setzte die sedierende Wirkung des Ethers ein. Das Tier konnte entnommen werden. Die Injektion des Narkosemittels erfolgte analog der oben genannten Weise.

Die Versuchstiere wurden atraumatisch auf dem Bauch einschließlich der ventralen Oberschenkel rasiert. Dann erfolgte die Lagerung und Fixierung auf dem Operationstisch. Die Ratte wurde so auf dem Rücken gelagert und fixiert, dass die Bauchhaut vollständig aufgespannt war. Mit einem Hautskalpell (Cutfix Fig. 15, Fa. B. Braun Melsungen AG) erfolgte die mediane Inzision unterhalb des Xyphoids. Der Schnitt wurde nach kaudal etwa 1cm oberhalb des Genitals erweitert und dann zur linken Leistenregion hin verlängert. Haut und subkutanes Fettgewebe wurden soweit abpräpariert, dass der linke M. obliquus abdominis externus und V. epigastrica

inferior zur Darstellung kamen. Die Präparation erfolgte nach einer von *Klaus-Dietrich Wolff* 1995 entwickelten Methode, um einen gefäßversorgten Bauchwandlappen von Ratten zu gewinnen (Wolff et al., 1995, S.680). Nun wurde die auf dem Raucocel aufgenähte Amnionmembran vorsichtig auf etwa 1,5 cm x 1,5 cm grosse Stücke zurechtgeschnitten. Unter dem Mikroskop wurden die Knoten mit einer Mikroschere gelöst und die Amnionmembran unter ständiger Sichtkontrolle von dem Nitrozellulose Papier (Raucocel) abgehoben. Bei der Umlagerung musste kontinuierlich auf die Orientierung der Epithelseite geachtet werden. Die Amnionmembran wurde mit der epithelialen Seite nach oben und stromaler Seite nach unten auf die Muskulatur des Versuchstieres aufgelegt und unter dem Mikroskop so aufgespannt, dass sie keine Blasen und Falten aufwarf. Die Fixierung erfolgte mit 7-0 Perma-Hand Seide (Perma-Hand Seide®, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Der Verschluss der Bauchhaut erfolgte in Einzelknopfnah-Technik mit 3-0 monofiler Wundnaht. (Ethilon®, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland).

Nach der Operation wurden die Tiere unter eine wärmende Lampe gelegt, bis sie wieder aus der Narkose erwachten. Die Gesamtdauer der Amnionmembrantransplantation betrug im Mittel 40 Minuten.

Eine fortlaufende Naht erwies sich nicht als günstig, da die Tiere gerne an den Fäden knabberten und so die Wunde langstreckig über einige Millimeter eröffneten. In diesen Fällen wurden die eröffneten Wunden gesäubert, desinfiziert und falls erforderlich unter Kurznarkose mit Ether wieder mit einer Einzelknopfnah verschlossen.

3.2.2 Transplantation humaner Amnionepithelmembran in Multilayer- Technik

Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgte in analoger Weise zu der Monolayer Transplantation. Der Schnitt wurde ebenfalls median vom Xyphoid ausgeführt und die Transplantationsstelle freipräpariert. Unter ständiger Sicht wurde die aufgetaute Amnionmembran vorsichtig mit zwei stumpfen Pinzetten vom Raucocel gelöst und auf die abdominelle Muskulatur gelegt. Durch vorsichtiges Bestreichen der Amnionmembran an den Rändern konnte ein Umschlagen der Epithelseite nach

unten vermieden werden. Unter dem Mikroskop wurde die Membran mit 6-0 Fäden an den jeweiligen Ecken an die Bauchwand fixiert (basale Amnionmembran). Eine zweite Lage Amnionmembran wurde mit der epithelialen Seite nach oben aufgelegt, die Ränder geglättet und mit 6-0 Faden an den jeweiligen Ecken fixiert (2. Amnionmembran). Auch die dritte Lage wurde aufgelegt und fixiert (apikale Amnionmembran).

Nach der Operation wurden die Tiere unter eine Wärmelampe gelegt, bis sie wieder aus der Narkose erwachten. Die Gesamtdauer der Multilayer-Amnionmembrantransplantation betrug im Mittel 1½ Stunden.

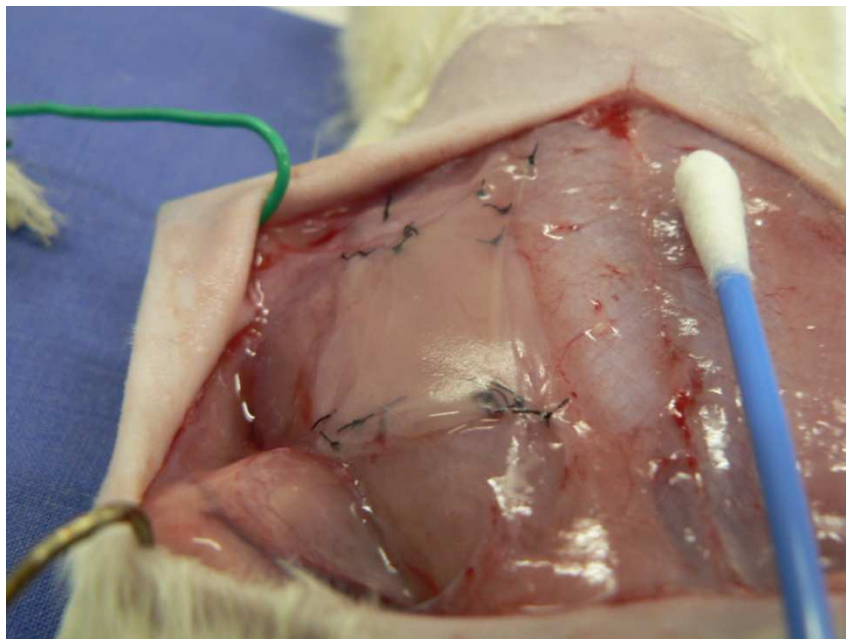


Abb. 15: zeigt den Operationssitus. Die einzelnen Amnionmembranen wurden auf die Bauchwandmuskulatur aufgelegt und durch Einzelknopfnähte an die Muskulatur fixiert. Multilayer Amnion.

3.2.3 Makroskopische Untersuchungen bis zur Entnahme

Die transplantierten Amnionmembranen wurden intraoperativ bei Transplantation und bei Entnahme fotodokumentiert. Postoperativ erfolgte mehrmals, je nach Versuchsseriendauer, bis zum Entnahmezeitpunkt eine regelmäßige Untersuchung der Ratten. Die immunsupprimierten Ratten wurden im Zuge der täglichen Gabe von Ciclosporin jeden Tag untersucht. Die Ratten wurden vor allem auf Rastlosigkeit, ungewöhnlich somnolentes Verhalten, reduziertem Pflegeverhalten, Automutilation, Reaktion des Tieres bei Palpation des transplantierten Bereiches hin beobachtet. Eventuelle Unterschiede im Trink- oder Fressverhalten konnten gemeinsam mit den Tierpflegern beobachtet werden. Die beigebrachte Wunde wurde auf Wundheilungsfortschritt und Entzündungszeichen hin inspiziert.

Da die Tiere keine Schmerzen und Unwohlsein verbal äußern konnten, war die klinische Beurteilung der Verfassung der Tiere nur über subjektive Erfahrung der Tierpfleger und Operateure möglich. Trotz der teilweise ein bis eineinhalbständigen Operation konnte postoperativ keine Blässe oder relevante Veränderungen der obengenannten Beobachtungen zum normalen Verhalten der Tiere festgestellt werden. Kein Tier verstarb postoperativ oder zeigte Zeichen einer systemischen Infektion, Sepsis oder anderer Erkrankung.

3.2.4 Amniontransplantatentnahme

Versuchsserie: A MO 3: Amnion Monolayer/ 3 Tage (n = 12 Tiere)

Am 3. postoperativen Tag erfolgte die Entnahme des einlagigen Amniontransplantates. Die Ratte wurde analog wie oben genannt in eine tiefe Narkose versetzt. Der Hautschnitt wurde soweit wieder eröffnet, dass das Transplantat vollständig dargestellt werden konnte. Das Transplantat sowie das angrenzende Gewebe wurde mit der darunter liegenden Bauchwandmuskulatur und epigastrischen Gefäßen en bloc reseziert und in ein Gefäß mit 5%ger Formaldehyd-Lösung für die histologischen und immunohistochemischen Untersuchungen gegeben.

Der Defekt wurde zur rechten Leistenregion und zum Xyphoid erweitert, so dass der Bauchraum freilag. Mit einer Kompresse wurden die Dün- und Dickdarmschlingen zur Seite gehalten, dass man einen freien Zugang zur V. cava bekam. Mit einer Klemme wurde die V. cava unterhalb der Leberlappen abgeklemmt. Mit einer Hohlnadel und einer mit etwas Heparin gefüllten 2 ml Spritze wurde die V. cava unterhalb der Klemme punktiert und etwa 1,5 ml venöses Blut für spätere Untersuchungen entnommen. Die Punktionsstelle wurde mit Tupfern komprimiert. Dann erfolgte die Entnahme des linken Femurs für spätere Knochenmarksuntersuchungen. Dazu wurde der Knochen stumpf und scharf von der Oberschenkelmuskulatur freipräpariert und mit einer Knochenschere proximal der Femurkondylen und distal des Trochanter major durchtrennt. Die Knochenendiaphyse wurde in ein Gefäß mit 5%iger Lösung aufbewahrt. Für die Euthanasierung der Ratte wurde eine möglichst schnelle und sichere Tötungsmethode gewählt. Die Darmschlingen wurden nach lateral verschoben und die Aorta auf Höhe der Nierenarterien dargestellt und möglichst proximal durchtrennt, so dass das Tier nicht mehr mit Blut versorgt wurde. Die Ratte verstarb nach wenigen Sekunden.

Versuchsserie A MO 14: Amnion Monolayer / 14 Tage (12 = Tiere)

Die Entnahme des Amniontransplantats erfolgte am 14. postoperativen Tag. Gewichtsadaptierte Narkose, Entnahme und Euthanasie der Tiere entsprach dem Vorgehen in der Versuchsserie A MO3.

Versuchsserie A MO 28: Amnion Monolayer / 28 Tage (12 = Tiere)

Der Entnahmezeitpunkt des Amniontransplantats verlängerte sich auf 28 Tage. Die gewichtsadaptierte Narkose und Euthanasie der Tiere erfolgte analog der Versuchsserie A MO 3. Die Entnahme des Präparates orientierte sich an den Fäden, da das Amnion nicht mehr eindeutig sichtbar war.

Versuchsserie AC MO 3: Amnion Monolayer / 3 Tage (12 = Tiere)

Die Entnahme des einlagigen Amniontransplantats erfolgte am 3. postoperativen Tag. Gewichtsadaptierte Narkose, Entnahme und Euthanasie der Tiere entsprach dem Vorgehen in der Versuchsserie A MO 3.

Versuchsserie AC MO 14: Amnion Monolayer / 14 Tage (12 = Tiere)

Die Entnahme des Amniontransplantats erfolgte am 14. postoperativen Tag. Gewichtsadaptierte Narkose, Entnahme und Euthanasie der Tiere entsprach dem Vorgehen in der Versuchserie A MO 3.

Versuchsserie AC MO 28: Amnion Monolayer / 28 Tage (12 = Tiere)

Die Entnahme des Amniontransplantats erfolgte am 28. postoperativen Tag. Gewichtsadaptierte Narkose, Entnahme und Euthanasie der Tiere entsprach dem Vorgehen in der Versuchserie A MO 3.

Versuchsserie AC ML 3: Amnion Multilayer / 3 Tage (12 = Tiere)

Die Entnahme des mehrlagigen Amniontransplantats erfolgte am 3. postoperativen Tag. Gewichtsadaptierte Narkose, Entnahme und Euthanasie der Tiere entsprach dem Vorgehen in der Versuchserie A MO3.

Versuchsserie AC ML 14: Amnion Multilayer / 14 Tage (12 = Tiere)

Die Entnahme des mehrlagigen Amniontransplantats erfolgte am 14. postoperativen Tag. Gewichtsadaptierte Narkose, Entnahme und Euthanasie der Tiere entsprach dem Vorgehen in der Versuchserie A MO 3.

Versuchsserie AC ML 28: Amnion Multilayer / 28 Tage (12 = Tiere)

Die Entnahme des mehrlagigen Amniontransplantats erfolgte am 28. postoperativen Tag. Gewichtsadaptierte Narkose, Entnahme und Euthanasie der Tiere entsprach dem Vorgehen in der Versuchserie A MO 3.

Versuchsserie AC ML 60: Amnion Monolayer / 60 Tage (12 = Tiere)

Der Entnahmepunkt des Amniontransplantats verlängerte sich auf 60 Tage. Die gewichtsadaptierte Narkose und Euthanasie der Tiere erfolgte analog der

Versuchserie A MO 3. Die Entnahme des Präparates orientierte sich an den Fäden, da die Amnionmembran nicht mehr eindeutig sichtbar war.

3.2.5 Histologie und Immunhistochemie

Alle Muskellappen wurden am jeweiligen Entnahmezeitpunkt 3, 14, 28 und 60 Tage post transplantationem explantiert und in 5,0 %ger Formaldehyd-Lösung für die histologische Aufbereitung fixiert.

Die Proben wurden im Institut für Pathologie der BG-Kliniken Bergmannsheil Bochum sagittal zugeschnitten, orientiert und in einer Paraffin-Kassette aufgestellt.

HE-Färbung

Nach Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Transplantat-Scheiben für eine komplette Querschnitt-Ansicht in Paraffin eingebettet.

Die Blöcke wurden im Kryostat (Leica CM3050, Bensheim, Deutschland) bei – 20°C geschnitten und auf gut haftenden Objektträgern aufgefangen. Die Schnittstärke betrug ca. 6 µm. Im Durchschnitt wurden zwei bis drei Schnitte auf dem Objektträger angeordnet. Die Objektträger wurden nummeriert.

Danach wurden die histologischen Schnitte entparaffiniert und einer Standardfärbung mit Hämatoxylin-Eosin unterzogen.

Immunhistochemie

Um eine vergleichbare Übereinstimmung mit den Präparaten der HE Färbung zu erreichen, wurden gleichzeitig für die immunhistochemischen Untersuchungen 4 µm Paraffinschnitte von den jeweiligen Paraffin Blöcken angefertigt. Nach Wärmefixation im Ofen bei 70°C, Entparaffinierung in Xylol und in absteigender alkoholischer Reihe erfolgte die Demaskierung der Antigene in einer Citrat-Pufferlösung unter hoher

Temperatur. Zur Antigen – Blockierung wurden auf die Objekträger eine Lösung mit normalem Ziegenserum (normal goat serum, Fa. Vector Laboratories Inc, USA) für 30 Minuten aufgetragen. Zwischen jedem der nun folgenden Schritte wurden die Objektträger zweimal für jeweils 1 und 4 Minuten in PBS –Puffer (Phosphate buffered saline, Herstellung siehe Tabelle für ICH-Reagenzien im Anhang) gespült.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C mit antihumanem Laminin-Antikörper aus Kanninchen in einer Verdünnung mit PBS-T (Herstellung siehe Anhang) von 1:30 (rabbit anti-human laminin antibody, Fa. Sigma, St. Louis, USA).

Der korrespondierende biotinylierte Zweitantikörper (Biotinyl Anti-rabbit) wurde für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach dem Waschen wurden die Schnitte in Streptavidin Alexa Fluor®488 Konjugat (1:250, Fa. Molecular Probes, Eugene Oregon) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gegenfärbung nach erneuter Waschung wurde mit DAPI (4', 6-diaminidino-2-phenylindole, dihydrochloride, 5µg/ml, Molecular probes, Eugene Oregon) durchgeführt. Abschließend wurden auf die Präparate 1 bis 2 Tropfen Fluoreszenz Mounting Medium (Fa. Dako, Hamburg, Deutschland) zum Eindecken gegeben und mit einem Deckgläschen blasenfrei abgedeckt.

3.3 Untersuchungen

Besonderer Aufmerksamkeit bei den Biopsien galt der Übergangszone zwischen normaler Muskelfaszie und humaner Amnionmembran und der Proben aus dem mittleren Bereich des Transplantates.

Grössenmessung bzw. Degradation

Die Messungen erfolgten je nach Ausschnittgrösse und Sinnhaftigkeit unter Carl Zeiss Mikroskop (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss Vision GmbH in München-

Hallbergmoos, Deutschland) in 50, 100, 200 und 400 facher Vergrößerung (20x / 0,75 ∞ /0,17 FLUAR; 10x/0,25 Ph1 ∞ /- A-Plan; 5x/0,12 ∞ /- A-Plan). Das Gesichtsfeld wurde mit einer Kamera (AxioCam HRc, Fa. Carl Zeiss Vision GmbH, München-Hallbergmoos, Deutschland) abfotografiert und entsprechend skaliert. Von jedem Transplantat wurden jeweils 2 Schnitte angefertigt.

Für die Monolayer Amnion und für die Multilayer Amnion wurden aufgrund der Sinnhaftigkeit unterschiedliche Messmethoden angewandt. Bei der Monolayer Amnionmembran wurde im histologischen Schnitt an jeweils 3 zufälligen Stellen des Schnittes der sagitale Querschnitt der Amnionmembran von basalem Stroma bis apikale Basalmembran gemessen.

Bei der Multilayer Amnion wurde vom basalen Stroma der untersten Amnionmembran bis zur Basalmembran der obersten Amnionmembranschicht gemessen. Dann erfolgte analog der Monolayer Amnionmembranmessung die individuelle Bestimmung der jeweiligen Größe der Amnionmembranen aller Amnionmembranschichten. Gemessen wurde in μm .

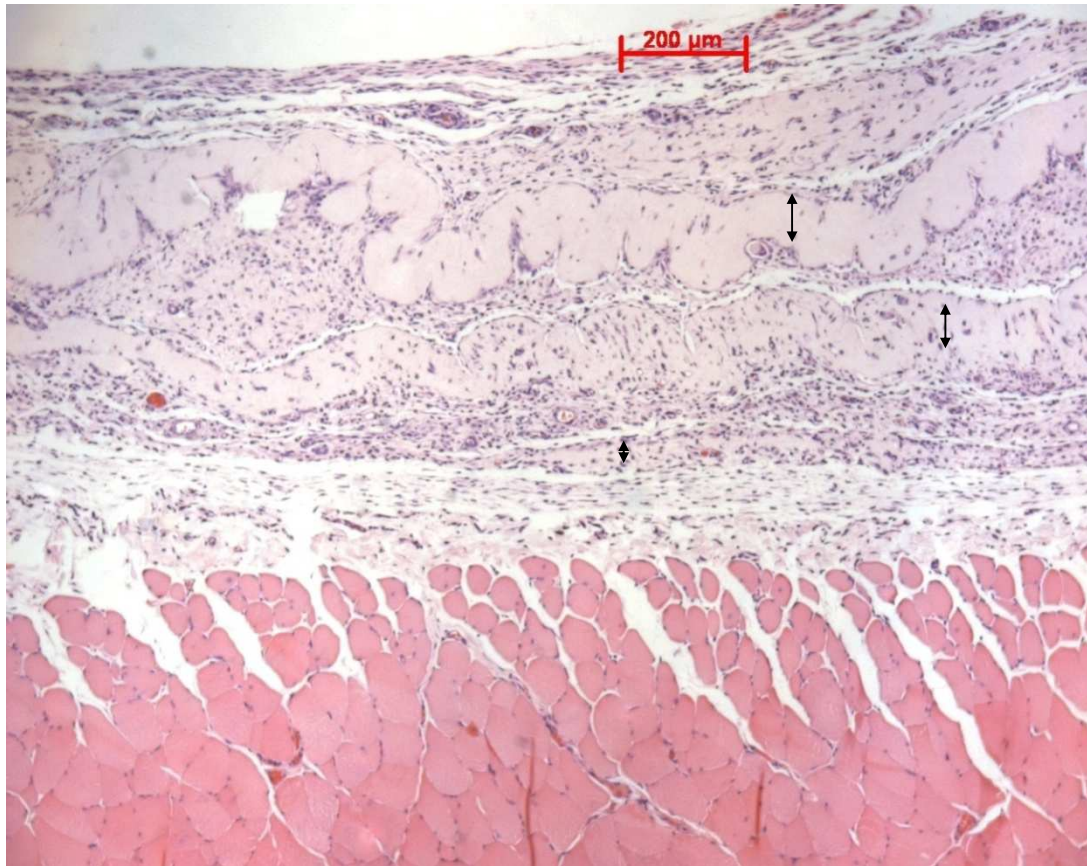


Abb. 16: Messmethode Multilayer Amnionmembran 28 Tage post transplantationem 50x Vergrößerung. Die Pfeile beschreiben die Ausdehnung der Amnionmembran.

Entzündungsreaktion und Vaskularisierung

Das Ausmaß der Entzündungsreaktion wurde mittels der Zählung der Lymphozyten im HE- Schnitt und Fluoreszenz Mikroskopie DAPI gefärbter Zellen ermittelt und bewertet.

DAPI (4',6-Diamino-2'-phenylindol-dihydrochlorid) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung von DNA genutzt wird. Der Farbstoff lagert sich bevorzugt an AT- reiche Regionen des DNA Stranges an. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht Licht fluoresziert DAPI mit blauer bis cyaner Farbe. Er stellt damit einen hervorragenden Marker DNA- reicher Zellkerne dar.

Die Vaskularisierungsrate konnte durch immunhistochemische Anfärbung von Laminin der endothelialen Basalmembran dargestellt werden.

Von jedem Schnitt wurden drei vom Untersucher unwillkürlich gewählte Felder mit einer Fläche von 0,25 mm² in jedem Präparat für die Entzündungsreaktion und 3 Felder von 1 mm² bei 200x Vergrößerung untersucht. Es wurde ein semiquantitativer Score von 0 - 3 für das Ausmaß der Entzündungsreaktion und ein Score von 0 - 2 für die Ermittlung der Vaskularisationsrate vergeben. Die ermittelten Daten konnten mittels Mann-Whitney U Test und Kruskal-Wallis mit verschiedenen Gruppen verglichen werden. Eine statistische Relevanz von $p < 0,05$ wurde vorausgesetzt.

3.4 Statistische Analyse und grafische Auswertung

Die Datenaquirierung und statistische Analyse erfolgte mit dem Statistik Programm SPSS 11.5 (SPSS Inc., USA). Die Messdaten und Ergebnisse wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2007 (Microsoft Excel, USA) übertragen und als Histogramm dargestellt. T-Test, Fehlerindikatoren und Levene Test wurden in einem paarweise durchgeführten Vergleich ausgewertet. Werte mit einem $p < 0,05$ wurden als signifikant festgelegt. Alle Auswertungen sind als Medianwerte und als Maximal- bzw. Minimalbereich angeben.

4. Ergebnisse

Kein Tier verstarb im Laufe des Experiments. Es zeigten sich weder Zeichen einer Infektion noch einer Transplantatabstoßung.

Da zwei Tiere das Nahtmaterial durchgebissen hatten, konnte in den ersten zwei Tagen bei diesen eine Wunddehiszenz mit einer Fläche von bis zu 45mm² beobachtet werden. Diese Wunden wurden sekundär verschlossen.

Aufgrund der Anästhesie bei Transplantatentnahme verstarben zwei Ratten der Gruppe AC MO 14 Tage und eine Ratte der Gruppe AC MO 28 Tage. Auf diese Problematik der Anästhesie mit Ketamin bei den mit Ciclosporin immunsupprimierten Ratten soll in der Diskussion eingegangen werden.

4.1 Makroskopische Ergebnisse

3 Tage post transplantationem

Die Mono- und Multilayer Amnionmembran zeigte sich drei Tage nach der Transplantation als feine, geschmeidige, glänzende Schicht eindeutig identifizierbar. Bei einigen Transplantaten konnte eine Tendenz zur Schrumpfung erkannt werden. Desweiteren war die Amnionmembran nicht vollständig mit der unterliegenden Faszie verbunden.

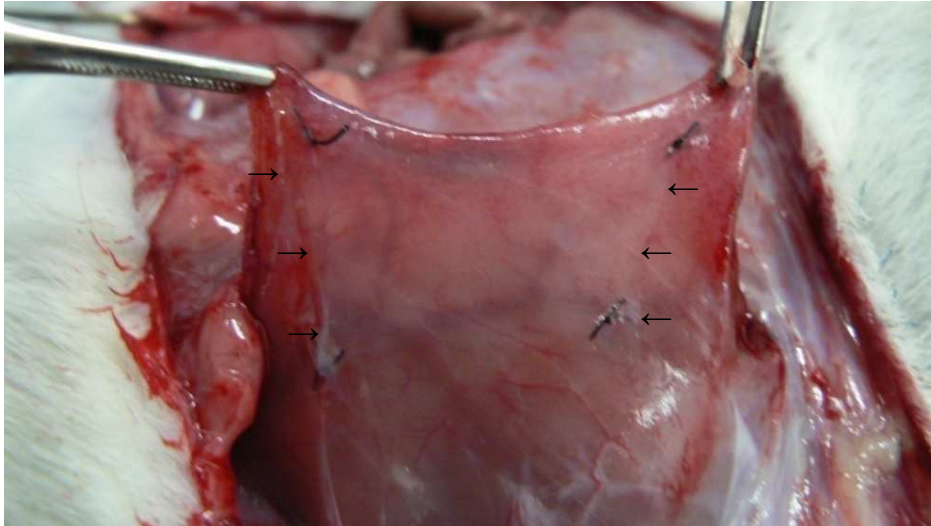


Abb. 17: Monolayer Amnion 3 Tage + CsA. Der Lappen ist teilweise gehoben, deutlich sichtbar die trüber erscheinende Amnion und die Nähte. Die V. epigastrica inferior scheint durch das Präparat. Die Pfeile markieren den Übergang zur Amnionepithelmembran.



Abb. 18: Multilayer Amnion + CsA 3 Tage. Deutlich sind die geschichteten Amnionmembranen zu sehen. Die Fäden markieren den Übergang von der Amnionmembran zum Muskel.

14 Tage post transplantationem

Die einschichtige Monolayer Amnionmembran konnte 14 Tage nach der Operation makroskopisch nicht mehr eindeutig identifiziert werden. Während die Übergangszone zwischen der mehrlagigen Amnionmembran und unbedecktem

Muskel weiterhin erkannt werden konnte. Das Amniongewebe erschien milchiger, trüber und zeigte die Tendenz vom Rand her zum Zentrum hin zu schrumpfen. Das Transplantat hier sowohl Monolayer als auch Multilayer Amnion war regelrecht an die Muskulatur fixiert.

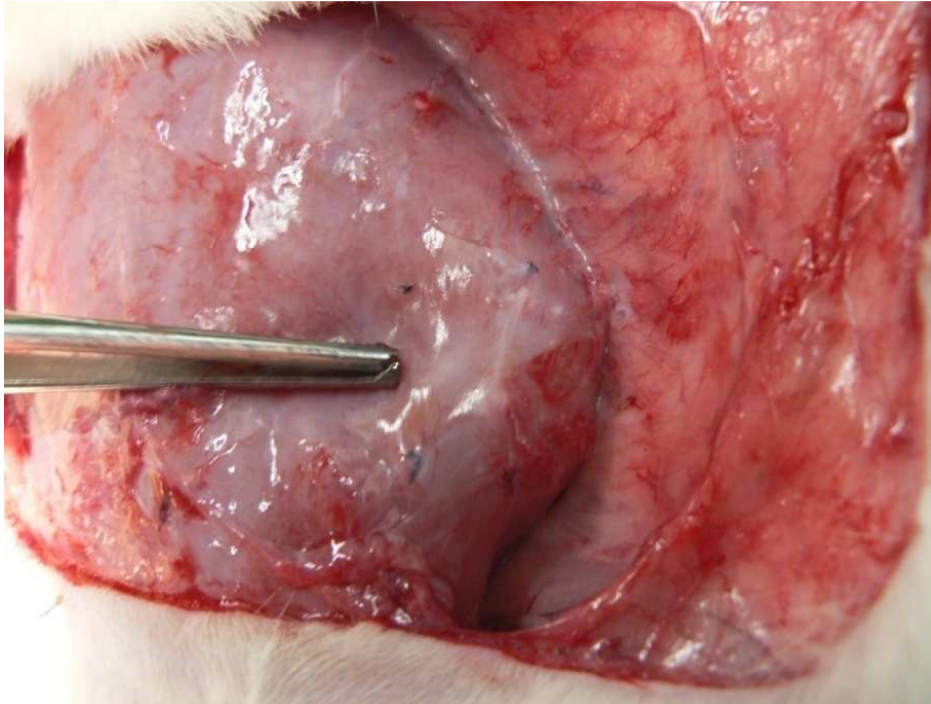


Abb. 18: Monolayer Amnion 14 Tage + CsA. Die Pinzette weist auf die einlagige Amnionmembran hin.



Abb. 19: Multilayer Amnion 14 Tage + CsA. Die mehrlagige Amnionmembran hebt sich vom Muskel ab. Teilweise haben sich Gefäßen und Gewebe über das Transplantat gelegt.

28 Tage post transplantationem

Bei der Versuchsgruppe mit einschichtiger Amnionmembran orientiert sich die makroskopische Inspektion nunmehr an den nicht resorbierbaren Nähten, da sich keine erhaltene Amnionmembran zeigte. Vielmehr hatte sich eine undurchsichtige Gewebsschicht über den Abdominalmuskel gelegt.

Der Muskel, der mit mehrschichtiger Amnionepithelmembran bedeckt wurde, wies eine dicke, resistente und nicht-transparente Schicht auf. Das Amniongewebe zeigte eine geringe Retraktion nach zentral und wurde teilweise von neugebildeten Gefäßen überwachsen.

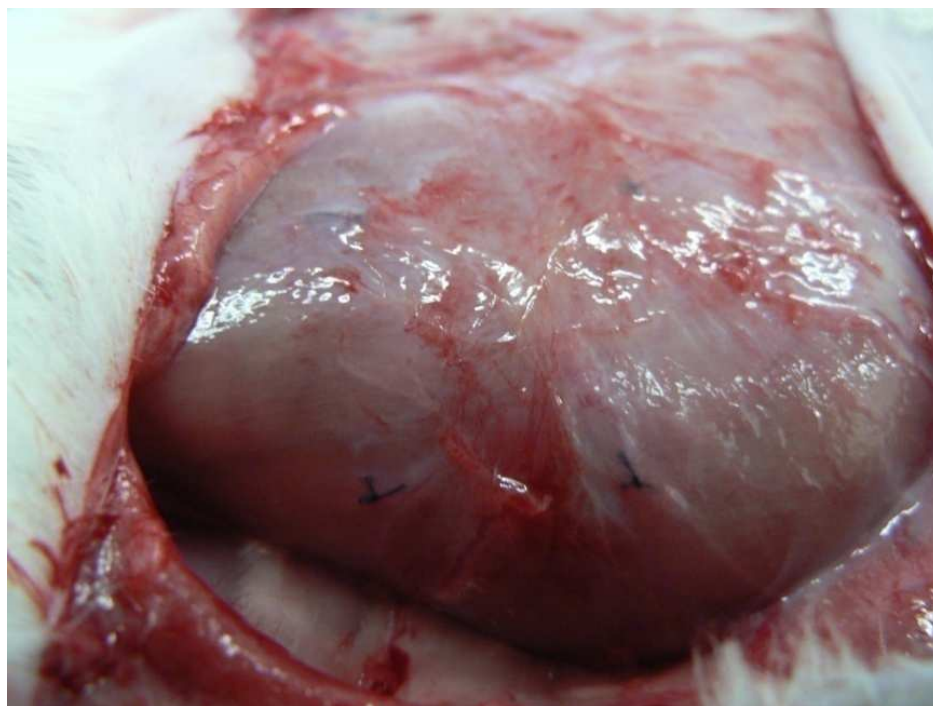


Abb. 20: Monolayer Amnion 28 Tage + CsA. Die Amnionmembran ist kaum noch zu erkennen. Es liegt bereits eine gut vaskularisierte Gewebeschicht auf dem Transplantat.



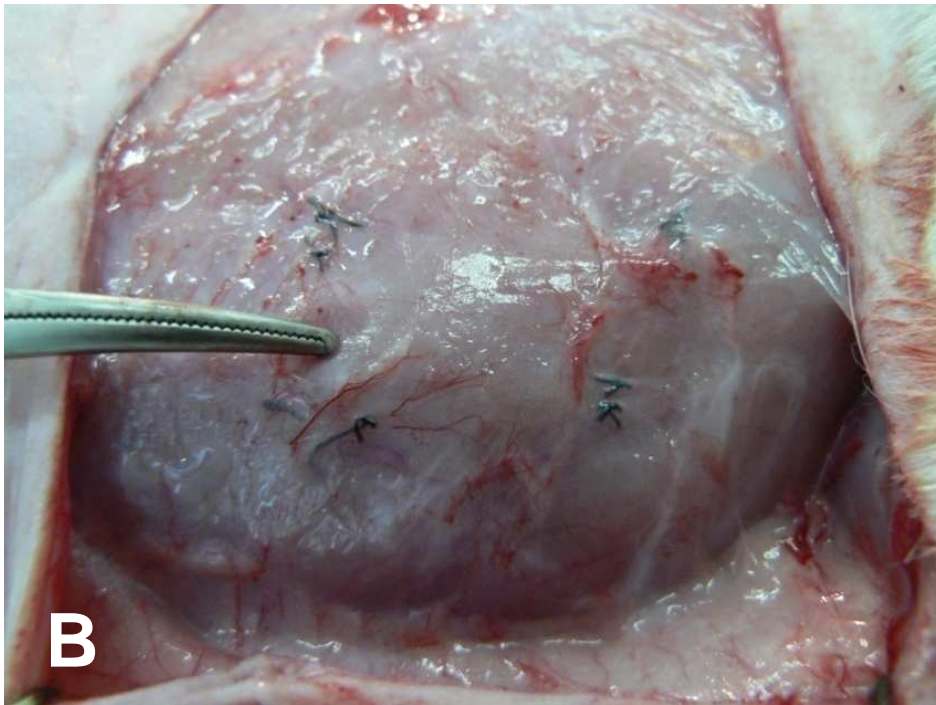


Abb. 21 A+B: Multilayer Amnion 28 Tage + CsA. Die Klemme weist auf den Übergang Multilayer Amnion und Muskulatur. Deutlich zeigt sich die Einsprossung und Überlagerung der Amnion mit Gefäßen und Gewebe.

60 Tage

Die Multilayer Amnion ist nicht mehr eindeutig sichtbar. Die Fäden helfen bei der Orientierung. Einige Gefäße und eine kräftige, nicht transparente Gewebsschicht haben sich über die Transplantationstelle gelegt.

4.2 Histologische und immunhistologische Untersuchungsergebnisse

Zur Darstellung der Gewebestruktur, Zellinfiltration und Degradation der Amnionmembran wurden Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen angefertigt. Der positiv geladene Farbstoff Hämatoxylin und der zur Gegenfärbung angewandte negativ geladene Farbstoff Eosin färben die Zellkerne blau, das Zytoplasma blassrosa, kollagene Bindegewebsfasern rot und elastische Bindegewebsfasern blassrosa bis rot. Das Muskelgewebe erscheint rot, Erythrozyten rot bis orange. Die histologische Auswertung erfolgte unter Zeiss Axioskop 2 plus® Mikroskop (Fa. Zeiss, Jena), welches über eine Kamera AxioCam HRC® (Fa. Zeiss, Jena) verbunden war, in 50, 100 und 200 -facher Vergrößerung.

Amnionmembran

Die Amnionepithelmembran zeichnet sich durch das einschichtige in Abbildung 11 deutlich zu erkennende kubische Epithel aus. Durch die HE Färbung hebt sich die anliegende Basalmembran intensiver gefärbt hervor. Das sich anschließende zellarme Stroma lässt sich histologisch in zwei Zonen unterteilen. Eine dichte schmale Schicht die Zona compacta und eine helle lockere Schicht der Zona lucida (rara). Aufgrund der Färbetechnik und Aufarbeitung des Materials kommt es zu einer zusätzlichen Aufweitung der Spalträume der größtenteils quer verlaufenden Faserbündel der Zona lucida, so dass sich die stromale Matrix vergrößert darstellt.

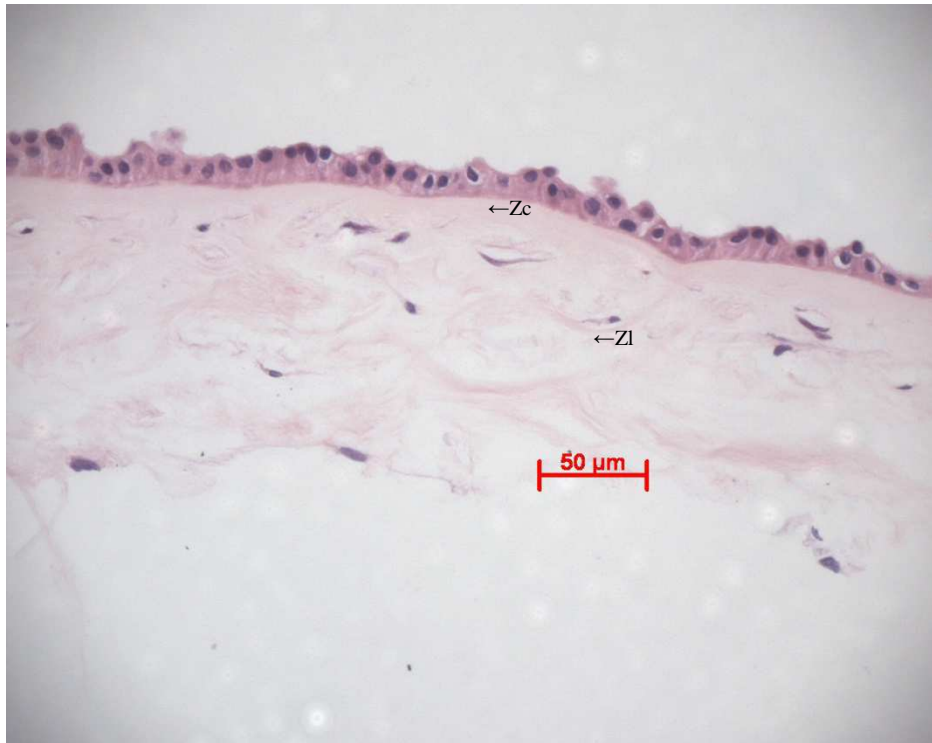


Abb. 22: HE Färbung Amnionmembran 200x, Balken 50µm. Man erkennt deutlich das einschichtige kubische Epithel und die sich anschließende stromale zellarme Matrix. Das Stroma läßt sich in eine „←Zc“ Zona compacta (densa) und eine „←Zl“ Zona lucida (rara) einteilen. Aufgrund der Technik der Färbemethode kommt es zu einer zusätzlichen Auflockerung der Zona lucida, da die Faserbündel reichlich Platz zur Ausdehnung haben, so daß die stromale Matrix stark vergrößert dargestellt wird.

Monolayer Amnionmembran

3 Tage post transplantationem

In der lichtmikroskopischen Darstellung 3 Tage nach Transplantation ist die natürliche Struktur der Amnionmembran größtenteils erhalten. Eine Infiltration durch Zellen des Empfängers sowohl bei der behandelten als auch unbehandelten HAM hat kaum stattgefunden. Die Amnionmembran liegt der Muskelfaszie locker auf. Eine Gefäßinfiltration lässt sich nicht erkennen. Der einschichtigen Epithelschicht lagert sich eine schmale Zellschicht auf. Die Zona compacta (densa) grenzt sich durch eine stärkere Anfärbung von der Zona lucida der stromalen Matrix ab.

Histologisch unterscheidet sich die nicht Behandelte von der mit Ciclosporin A Behandelten nicht.

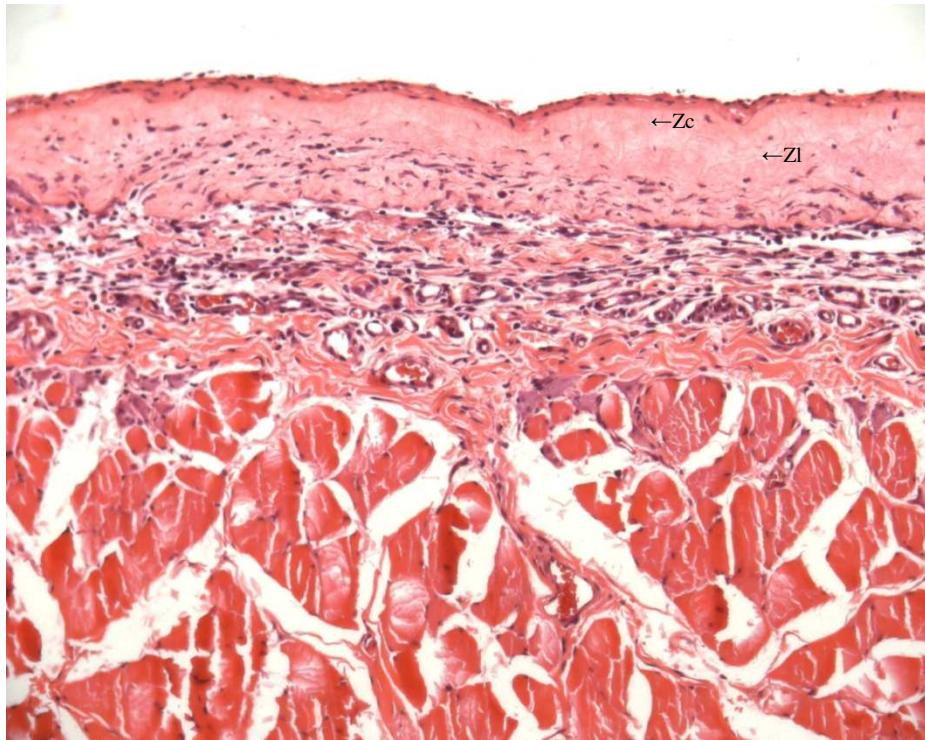


Abb. 23: HE Färbung Monolayer HAM oCsA 100x. 3 Tage. Die Amnionmembran liegt der Muskelfaszie auf, deutlich sind „← Zc“ Zona compacta (densa) und „←Zl“ Zona lucida Zl (rara) zu erkennen.

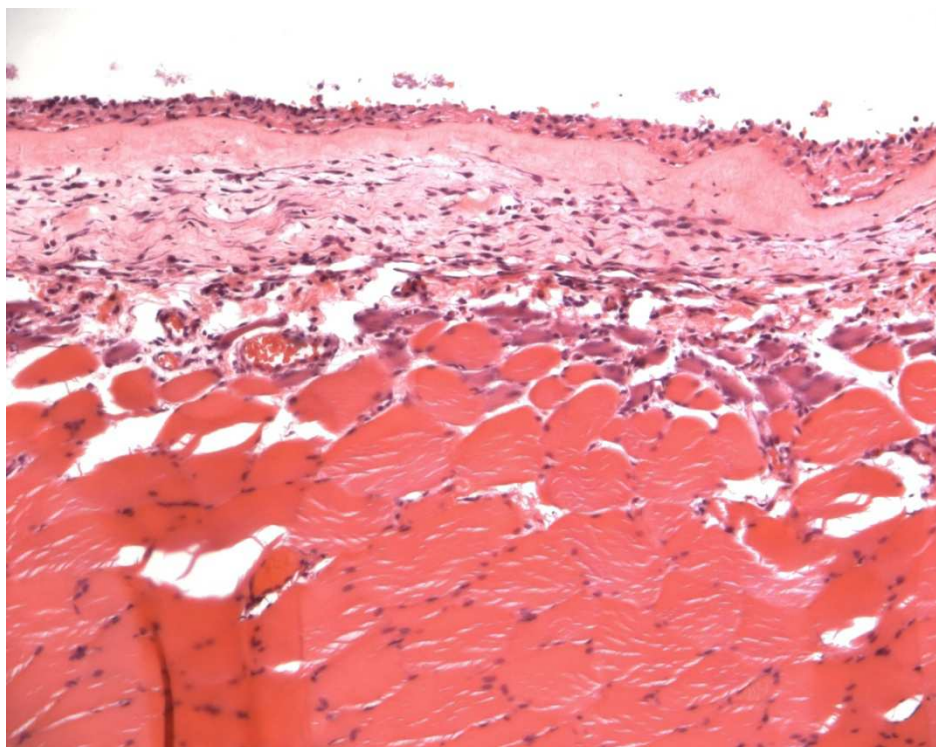


Abb. 24: HE Färbung Monolayer CsA 100x. 3 Tage. Die Amnionmembran liegt der Faszie locker auf. Es finden weder eine Migration von Zellen noch Gefäßinfiltrationen in die HAM statt.

14 Tage post transplantationem

Nach 14 Tagen bedeckt eine breite neugebildete Gewebeschicht die muskuläre Oberfläche. Das autologe Bindegewebe um das Transplantat besteht hauptsächlich aus Fibroblasten und Myofibroblasten. Neugebildete Kapillaren und Gefäßformationen sprossen in das umgebende Gewebe ein, aber nicht in das Transplantat. Es zeigt sich eine zunehmende Infiltration inflammatorischer Zellen aus Lymphozyten und einigen Eosinophilen in das Gewebe der Amnionmembran der immunkompetenten Ratten. Die Architektur der stromalen Matrix hat sich dadurch signifikant geändert, während das Transplantat der immunsupprimierten Tiere eine reduzierte Zellinvasion aufweist und die Architektur weitgehend erhalten bleibt.

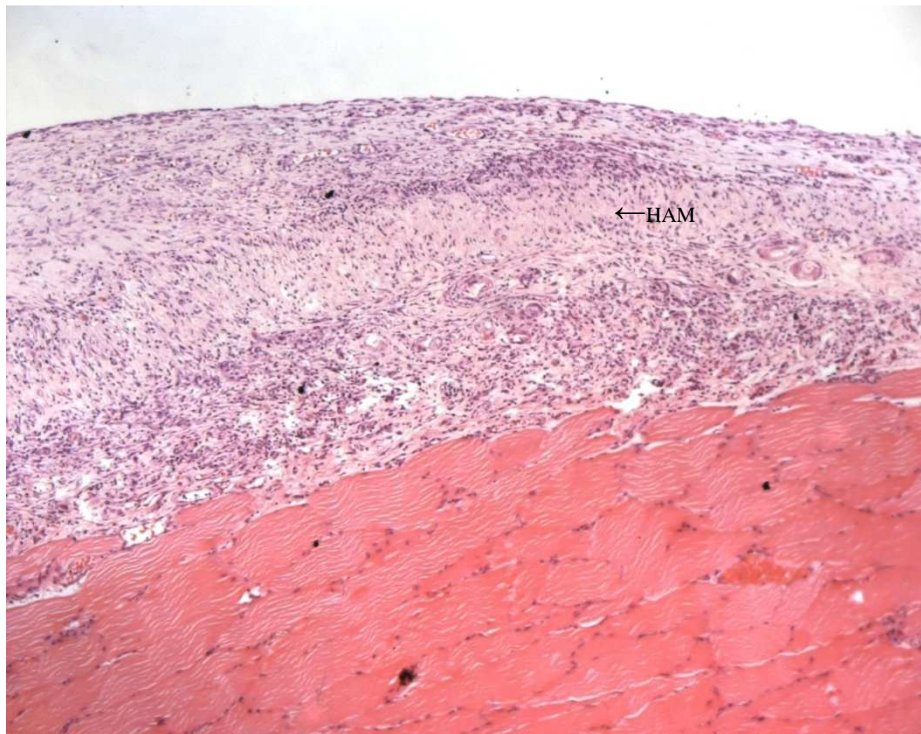


Abb. 25: HE Färbung Monolayer oCsA 50x. 14 Tage. Die Amnionmembran „←HAM“ ist in einer Zellschicht aus Fibroblasten und Gefäßformationen eingebettet. Zellen wandern in die stromale Matrix ein und lockern diese auf. Es findet eine Degradation statt.

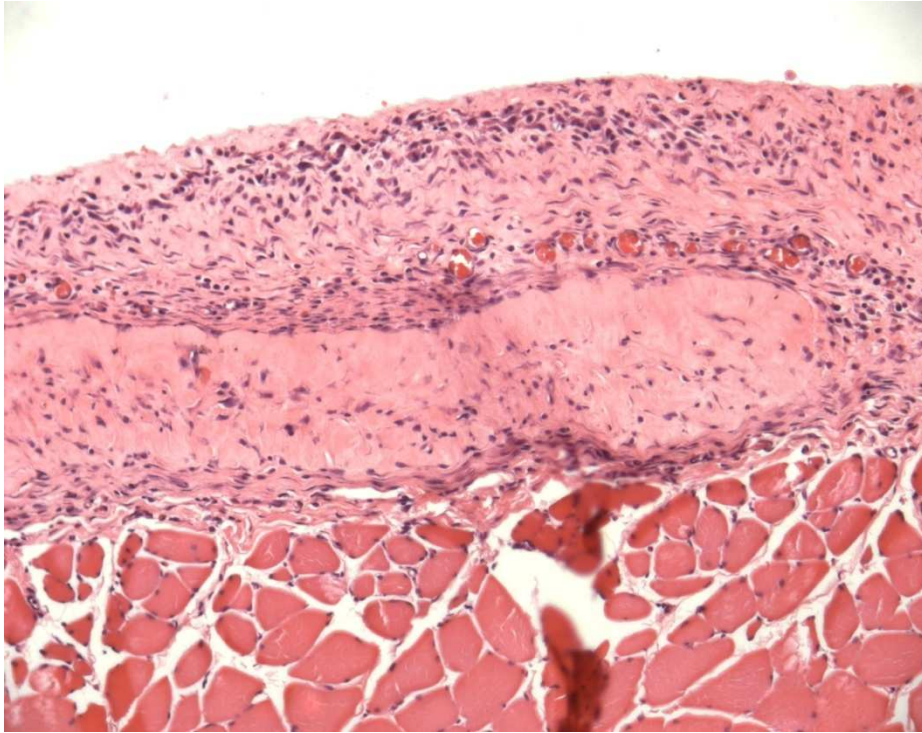


Abb. 26: HE Färbung Monolayer CsA 100x. 14 Tage. Die Amnionmembran ist in eine Zellschicht aus Fibroblasten und Gefäßformationen eingebettet. Eine Degradation und Zellinfiltration hat kaum stattgefunden.

28 Tage post transplantationem

Nach 28 Tagen ist die spezifische Struktur der stromalen Matrix der Amnionmembran bei den immunkompetenten Ratten nicht mehr zu erkennen. Imigrierte inflammatorische Zellen, horizontal orientierte neugebildete Kollagenbündel und einige Gefäße verdrängen die Reste der Amnionmembran. Das umgebende Gewebe besteht größtenteils aus Fibrozyten. Die stromale Matrix ist fast vollständig degradiert. Die Zahl der inflammatorischen Zellen hat sich im Vergleich zu den Proben nach 14 Tagen merklich reduziert.

In den Schnitten der immunsupprimierten Tiere lässt sich die Struktur der Amnionmembran gut vom umliegenden Gewebe differenzieren. Es hat eine Zellinfiltration begonnen und das Kollagennetz des amnionalen Stromas, in das einzelne Gefäße einsprossen, lockert sich auf.

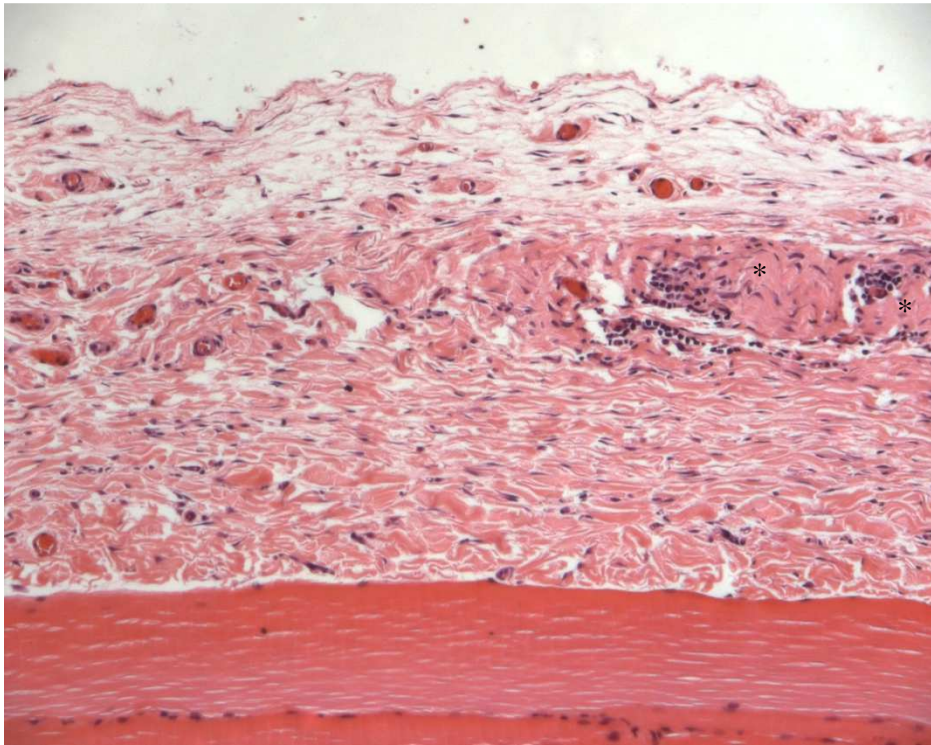


Abb. 27: HE Färbung Monolayer oCsA 100x. 28 Tage. Die Reste der Amnionmembran sind durch eingewanderte Zellen, Gefäßbündel und horizontal orientierte Kollagenbündel kaum noch erkennbar. Es hat ein fast vollständige Degradation der Amnionmembran stattgefunden.

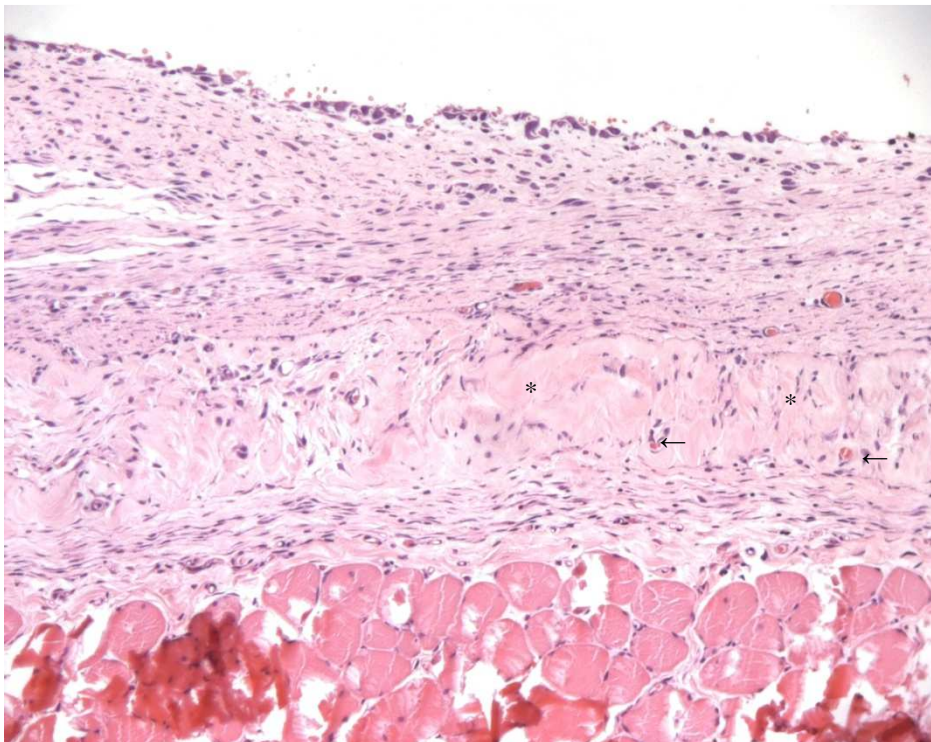


Abb. 28: HE Färbung Monolayer CsA 100x. 28 Tage. Das Stroma der Amnionmembran (*) lockert sich auf. Einzelne Gefäße sprossen in die Kollagenmatrix ein (←).

Degradation der Basalmembran/ Lamininfärbung

Immunhistochemische Färbungen werden zur Lokalisation und Identifikation von Zell- und Gewebekomponenten verwendet. Die Immunreaktion basiert auf einer Antigen-Antikörperreaktion. Es sind vier verschiedene Methoden zur Markierung des zu untersuchenden Antigens bekannt. Die direkte (Antigen + Antikörper mit Enzym + Substrat oder Chromogen), indirekte (Antigen + Primärantikörper + Sekundärantikörper mit Enzym + Substrat o. Chromogen), PAP Methode (nach Sekundärantikörpergabe Auftragung von einem Peroxidase - Anti - Peroxidase Komplex) und Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode. Letztere Färbemethode, die in dieser Studie genutzt wird, beruht auf einer hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin. Der Primärantikörper in dieser Studie ist gegen das Laminin der humanen Basalmembran gerichtet. (Unkonjugierter Primärantikörper + biotinylierter Sekundärantikörper + Streptavidin - Biotin Enzymkonjugat + Chromogen).

Das Glykoprotein Laminin ist ein nicht kollagener Bestandteil der humanen Basalmembran. Er stellt damit einen hervorragenden Marker zur Beurteilung der Degradation der humanen Amnionmembran und Neubildung von Gefäßen dar.

In der immunhistochemischen Laminin Färbung zeigen die Transplantate der immunkompetenten Ratten eine intakte Basalmembran der Amnionmembran bis zum 3. Tag. Die Transplantate der behandelten immunsupprimierten Tiere weisen noch bis zum 28. Tag postoperativ eine intakte durchgehende Basalmembran auf.

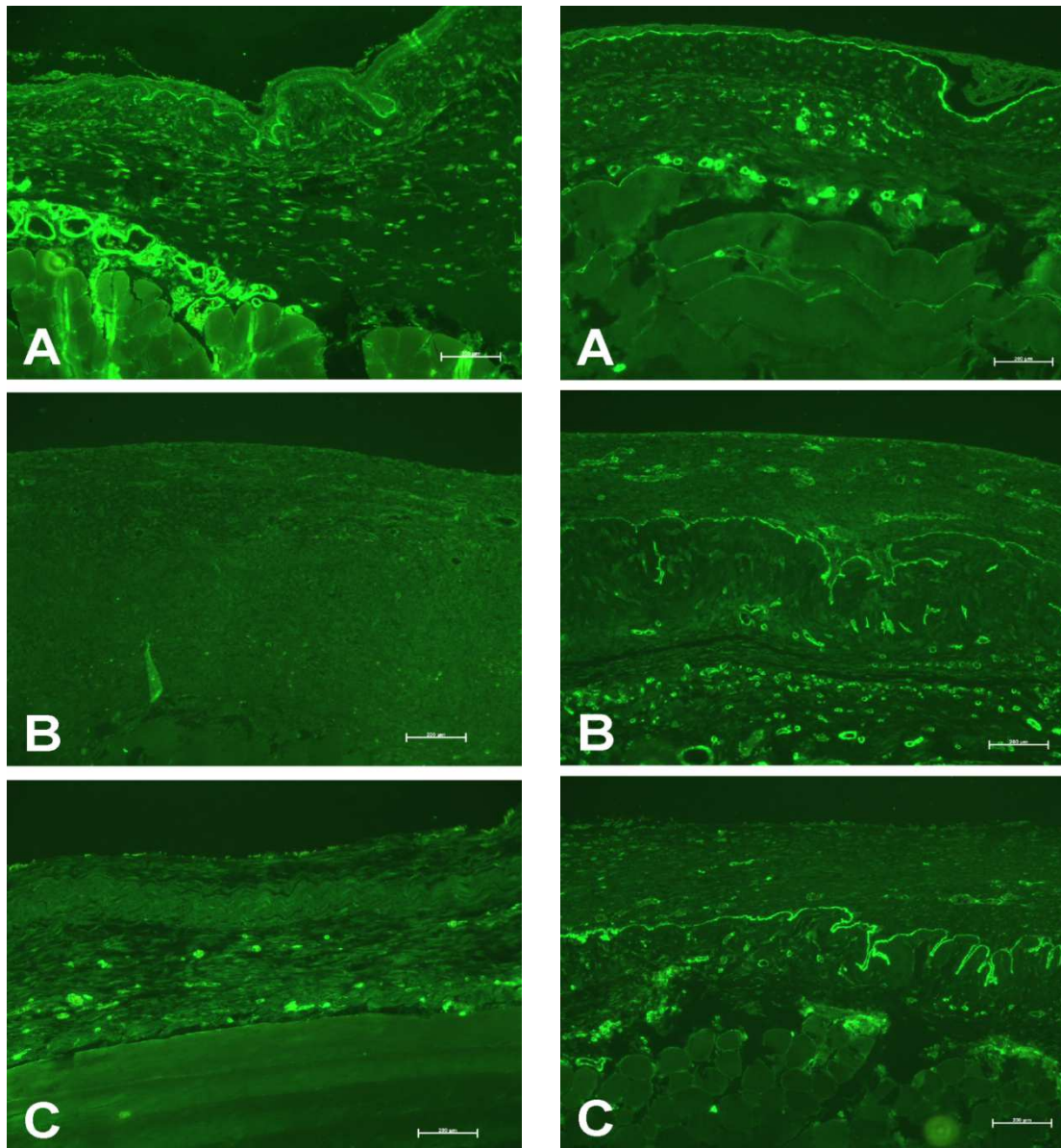


Abb. 29: Laminin Färbung Monolayer oCsA 100x, Messbalken 100 μ m. A 3 Tage, B 14 Tage, C 28 Tage. Die immunkompetenten Proben zeigen eine intakte Basalmembran bis 3 Tage postoperativ.

Abb. 30: Laminin Färbung Monolayer CsA 100x, Messbalken 100 μ m. A 3 Tage, B 14 Tage, C 28 Tage. Die immunsupprimierten Proben zeigen eine intakte Basalmembran bis 28 Tage postoperativ.

Multilayered Amnionmembran

Bis zum 28. Tag ist das amnionale Gewebe größtenteils frei von Empfängerzellen. Die Struktur der Amnionmembran ist erhalten. Zwischen und um die Transplantatschichten hat sich eine Schicht aus Fibroblasten und einigen einsprossenen Gefäßen gelagert.

Nach 60 Tagen ist eine deutliche Degradation zu erkennen. Eine Kontinuität der Basalmembran der Amnionmembran ist nicht mehr vorhanden. Die Integrität des stromalen Gewebes ist aufgehoben. Einige Zellen sind in die Kollagenbündel eingewandert. Eine gefäß- und fibroblastenreiche Schicht liegt zwischen den Amnionschichten und umgibt das Transplantat vollständig.

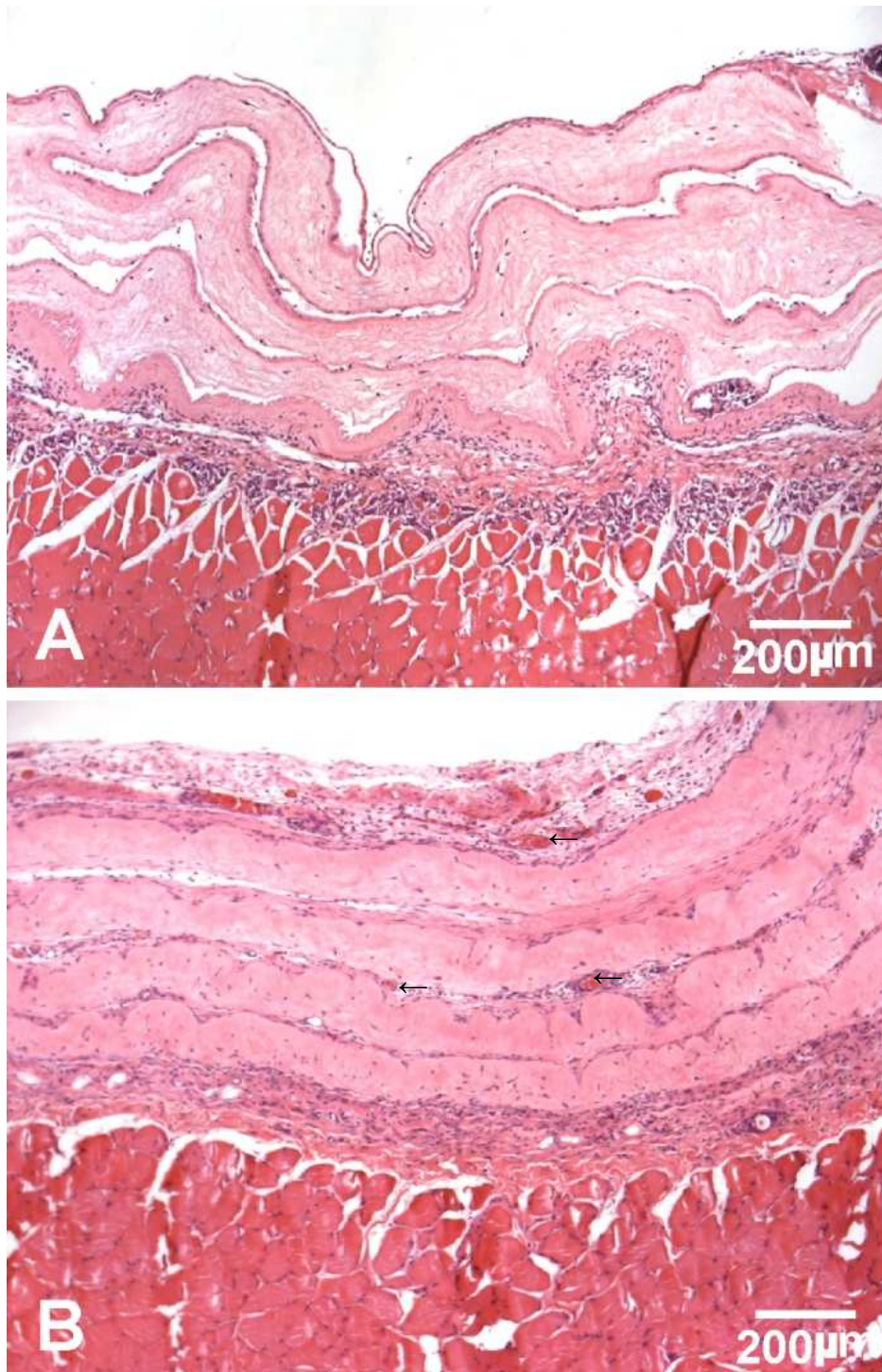


Abb. 31 A+B: HE Färbung Multilayer Amnion CsA, 100x. A 3 Tage, B 28 Tage. Das Amniongewebe ist größtenteils frei von Empfängerzellen, die Integrität der Membran ist erhalten. Zwischen und über den Schichten sind Fibroblasten eingelagert und wenige Gefäße (←) eingewachsen.

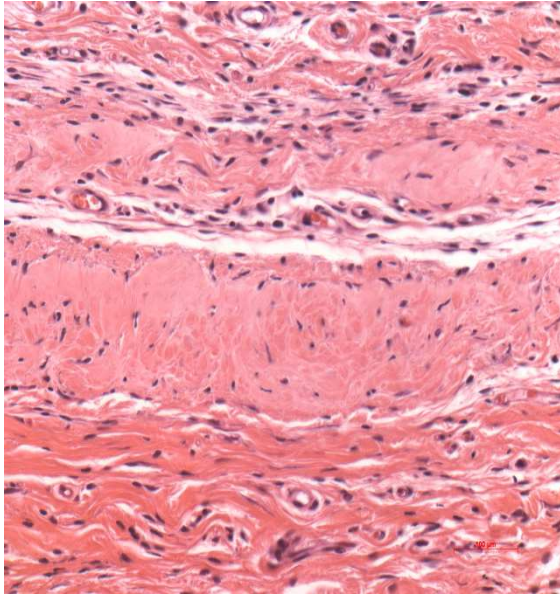


Abb. 32: HE Färbung Multilayer Amnion CsA, 200x, 60 Tage. Die stromale Matrix ist aufgelockert, einzelne Empfängerzellen sind zwischen den Faserbündel eingewandert. Eine gefäß- und fibroblastenreiche Zellschicht hat sich zwischen und um die Transplantate gelegt.

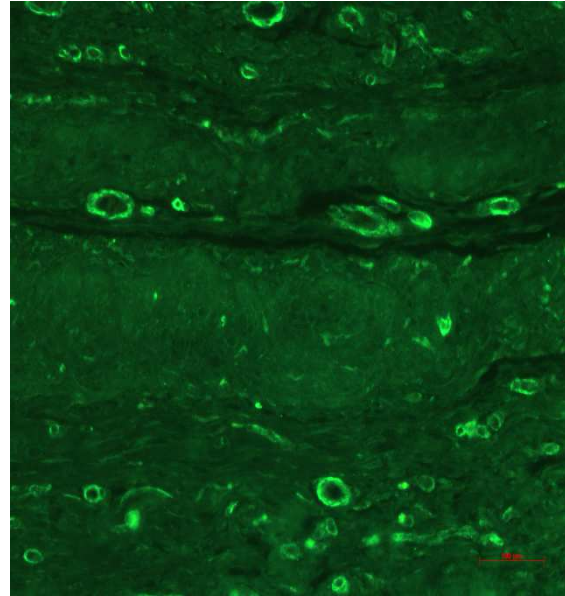


Abb. 33: Laminin Färbung Multilayer Amnion CsA, 60 Tage. Eine Kontinuität der Basalmembran der HAM ist nicht mehr vorhanden. Prominenter erscheinen jetzt die Basalmembranen zahlreicher Gefäße.

4.3 Auswertungen der Messergebnisse

Über die Bestimmung der Dicke der Amnionmembran wurde die Degradation nach 3, 14, 28 und bei der Multilayer Amnion zusätzlich nach 60 Tagen ermittelt. Fehlende Messwerte entstehen aufgrund der zufällig gewählten Messpunkte. Hier kam die Amnionmembran nicht zur Darstellung. Entweder wurde die Amnionmembran nicht im Präparat vollständig getroffen oder die Membran war vollständig degradiert. Ein Signifikanzniveau von 5% wird vorausgesetzt. Es gilt damit ein p kleiner ($<$) 0,05 als statistisch signifikant.

Degradation der Monolayer Versuchsreihe

Die Dicke der Monolayer 3 Tage post transplantationem lag bei $133,51\mu\text{m} \pm 34,88\mu\text{m}$ (Standardfehler 11,03) bei den Immunkompetenten und bei $109,38\mu\text{m} \pm 45,76\mu\text{m}$ (Standardfehler 14,47) bei den Immunsupprimierten. Gegenübergestellt ergab sich kein signifikanter Unterschied.

14 Tage postoperativ lag der Größendurchschnitt der Nichtbehandelten bei $214\mu\text{m} \pm 127,08\mu\text{m}$ (Standardfehler 44,93) und der Behandelten bei $166,88\mu\text{m} \pm 60,76\mu\text{m}$ (Standardfehler 20,25). Es besteht auch hier kein signifikanter Größenunterschied $p=0,121$ und $p=0,36$ nach 14 Tagen. Es kann aber angedeutet werden, dass die Amnionmembran im Zuge der Degradation an Größe zunimmt. Beachtet man die histologischen Schnitte, wird deutlich, dass es zu einer Zellinfiltration und Auflockerung mit Destruktion der tangential angeordneten Kollagenbündel kommt. Das Stroma wirkt aufgedunsen und nimmt einen größeren Raum ein.

28 Tage postoperativ ergibt sich ein Mittelwert von $8,7\mu\text{m} \pm 10,25$ (Standardfehler 3,24) bei den immunkompetenten Tieren. Es zeigt sich sowohl im Vergleich 3 Tage ($p < 0,001$) und 14 Tage ($p = 0,001$) als auch im Vergleich mit den Immunsupprimierten ($p = 0,012$) mit einem Mittelwert von $61,71\mu\text{m} \pm 39,51$ (Standardfehler 14,93) ein signifikanter Unterschied. Setzt man einen Wert mit $p < 0,05$ als signifikant voraus.

Das T-Zell vermittelte Immunsystem scheint damit einen wesentlichen Einfluss auf die Degradation der Amnionmembran zu haben. (vgl. Abbildung 37 treated vs. non-treated HAM). Die immunkompetente Ratte ist in der Lage bis 28 Tage nach Transplantation die Amnionmembran fast vollständig aufzulösen und durch autologes Bindegewebe zu ersetzen. Die Degradation der HAM bei der immunsupprimierten Ratte erfolgt bis zum 28. postoperativen Tag nicht signifikant ($p = 0,38$).

Tabelle 1 Messergebnisse der histologischen Auswertung der HAM oCSA 3, 14, 28 Tage postoperativ in μm

Probe	3 Tage	14 Tage	28 Tage
1	132		
2	113,67		10,67
3			0
4	99		0
5	92,5	220,33	12,5
6	111,83	352,33	13
7	131	200,33	9,17
8	181	264,67	8,33
9	183,33	341,67	0
10	178,5	0	33,33
11		277	0
12	112,33	55,67	
Mittelwert	133,51	214	8,7
Standardabweichung	34,89	127,09	10,25
Standardfehler	11,03	44,93	3,24

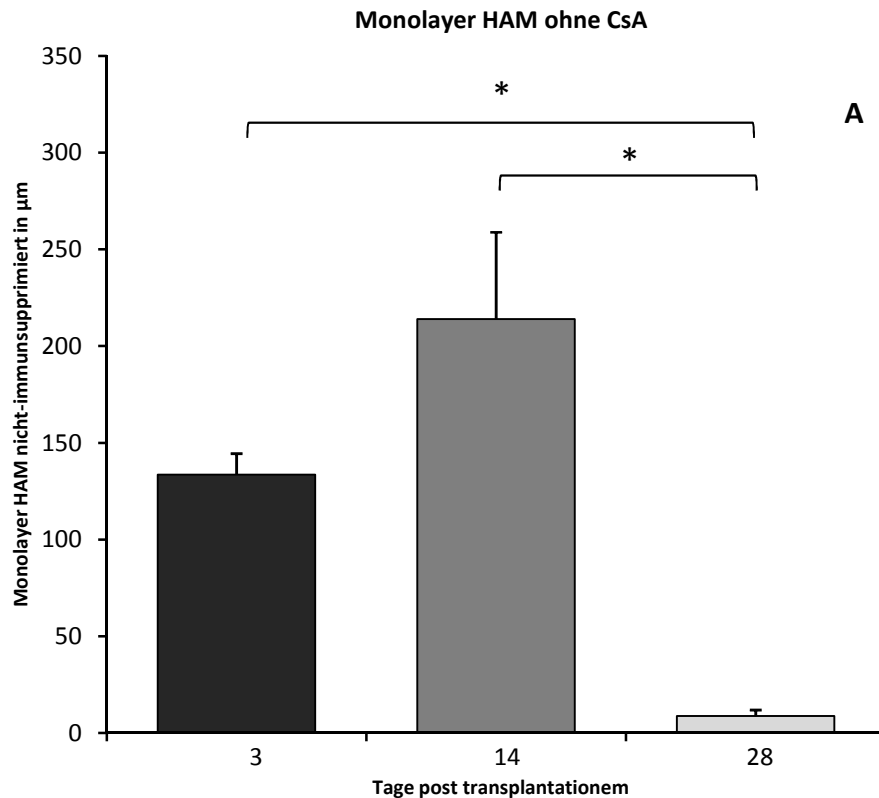


Abb. 34: Grafische Auswertung der Messergebnisse 3, 14, 28 Tage postoperativ. Die Balken markieren die Mittelwerte, über den Balken ist der Standardfehler angegeben. Die mit dem „*“ markierten Klammern kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Tabelle 2: Messergebnisse der histologischen Auswertung der HAM CsA 3, 14, 28 Tage postoperativ in µm

Probe	3 Tage	14 Tage	28 Tage
1	88		
2	91,33		93,67
3	100,33	107,67	59
4	139	94,33	121
5	125,33	118,33	58
6	224,33	171,33	
7	94,67		31
8	74,5	141,67	0
9	89,5	182	69,33
10	66,83	242,33	
11		168,67	
12		275,67	
Mittelwert	109,38	166,88	61,71
Standardabweichung	45,76	60,76	39,58
Standardfehler	14,47	20,25	14,93

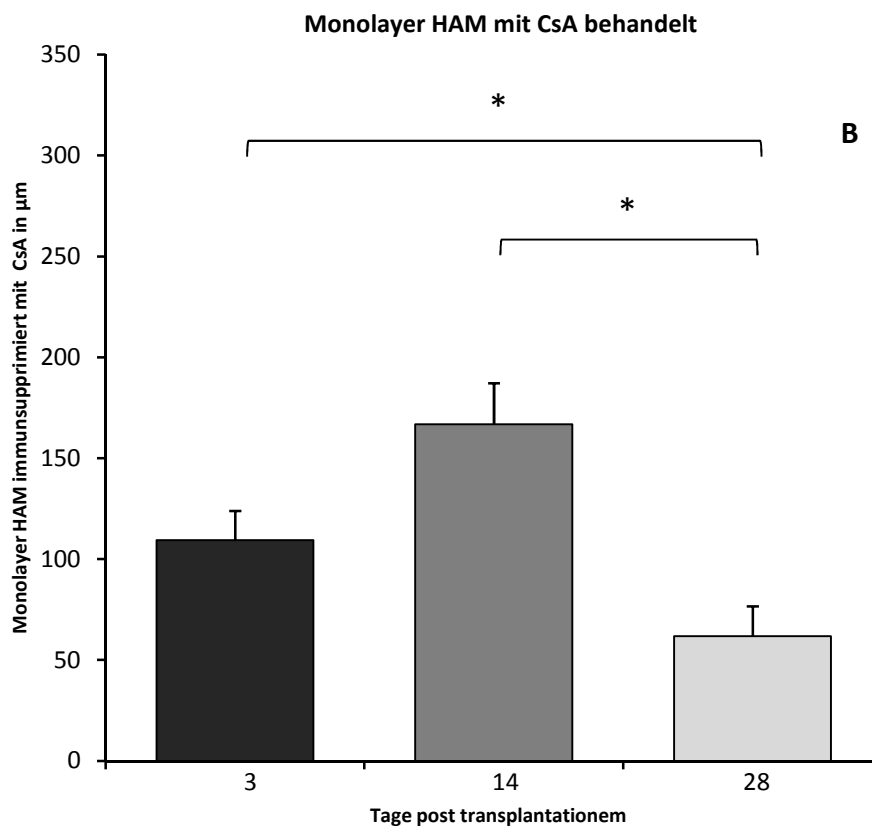


Abb. 35: grafische Auswertung der Messergebnisse 3, 14, 28 Tage postoperativ. Die Balken markieren die Mittelwerte, über den Balken ist der Standardfehler angegeben. Die mit dem „*“ markierten Klammern kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$).

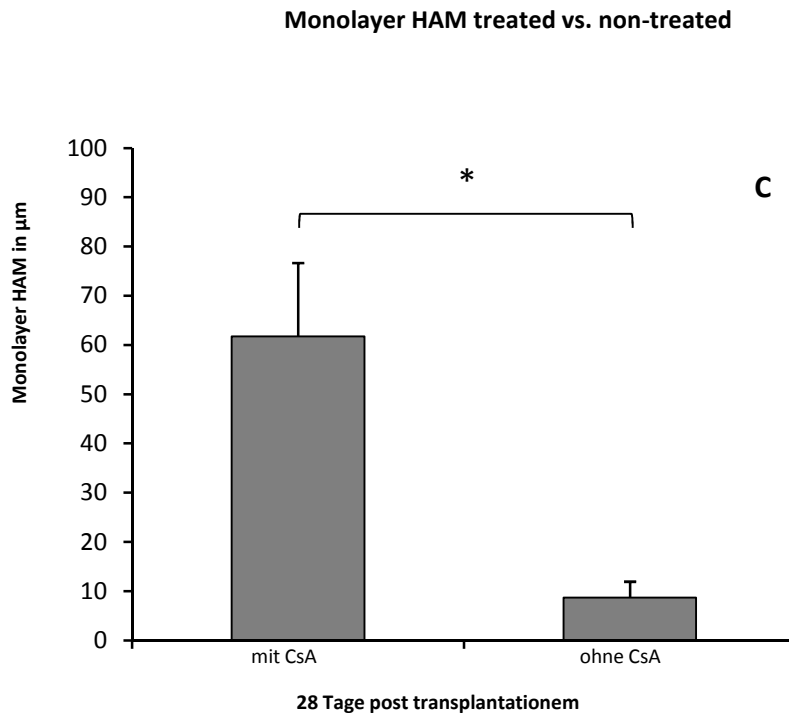


Abb. 36: Vergleicht man den Degradationsfortschritt immunsupprimierter mit immunkompetenten Amnionmembrantransplantaten stellt sich ein signifikanter Unterschied heraus. „*“ entspricht $p < 0,05$.

Degradation der Multilayer Versuchsreihe

Die Multilayer Amnionmembran wurde 3, 14, 28 und 60 Tage posttransplantationem untersucht.

Bis zum 28. Tag postoperativ sind die einzelnen Schichten des multilayered Amniontransplantates erhalten. Nach 60 Tagen hat sowohl die Gesamtdicke der gestapelten Schichten von $725,33\mu\text{m} \pm 259,26\mu\text{m}$ (Standardfehler 115,94) der 28 Tage Probe auf $219,06\mu\text{m} \pm 103,18\mu\text{m}$ (Standardfehler 46,14) der 60 Tage Probe ($p=0,009$) als auch die Dicke der einzelnen Membranen vor allem der apikalen Membran von $150,33\mu\text{m} \pm 9,42\mu\text{m}$ (Standardfehler 6,66) der 28 Tage Probe auf $26,67 \pm 3,60\mu\text{m}$ (Standardfehler 2,08) der 60 Tage Probe ($p=0,021$) signifikant abgenommen.

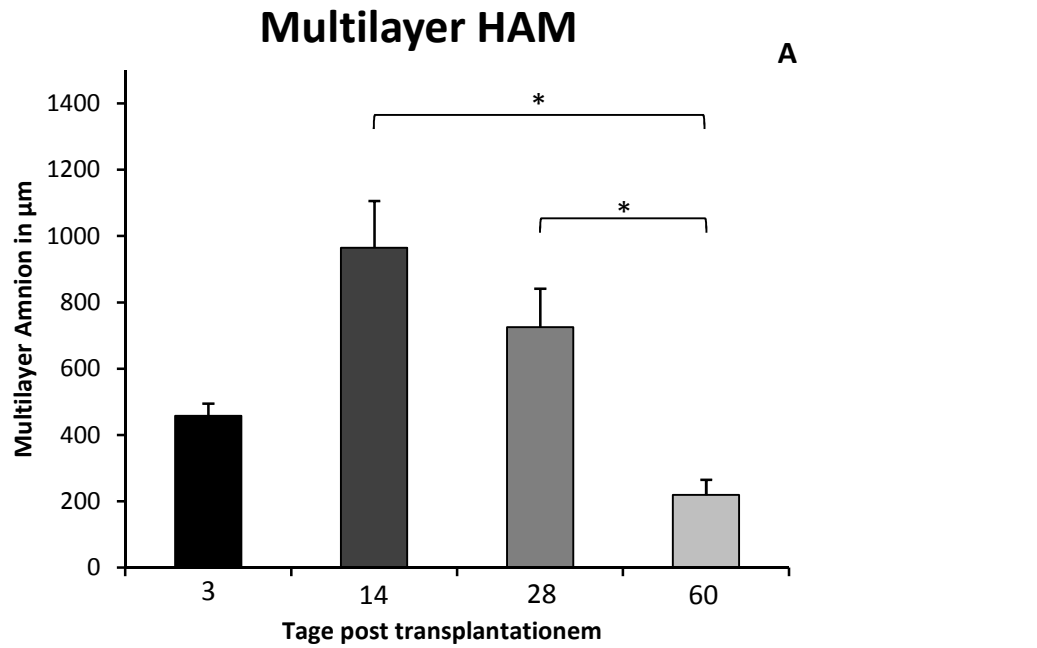


Abb. 37: Grafische Auswertung der Messergebnisse 3, 14, 28, 60 Tage postoperativ. Die Balken markieren die Mittelwerte, über den Balken ist der Standardfehler angegeben. Die mit dem „*“ markierten Klammern kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$).

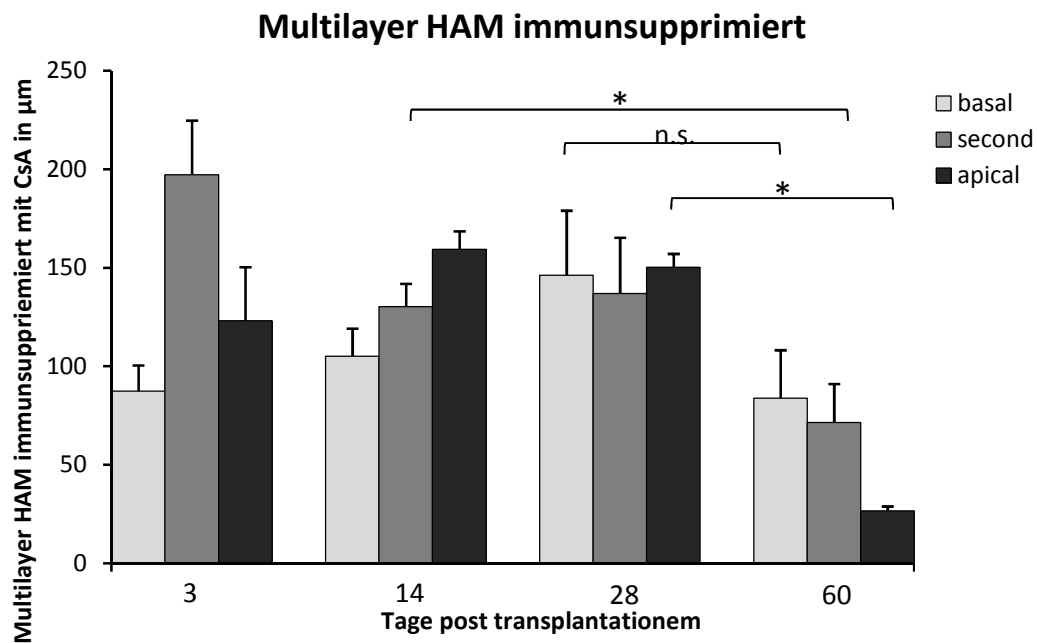


Abb. 38: Grafische Auswertung der Messergebnisse 3, 14, 28, 60 Tage postoperativ. Die Balken markieren die Mittelwerte, über den Balken ist der Standardfehler angegeben. Die mit dem „*“ markierten Klammern kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$). „n.s.“ bedeutet nicht signifikant.

Tabelle 3: Humane Amnionmembran multilayered mit Ciclosporin A

	3 Tage			14 Tage			28 Tage			60		
	Basal	zweite	apical	basal	Zweite	apical	basal	zweite	apikal	Tage	zweite	apical
										basal		
1	99	281,83		62,83	85	138,83				41,75	33,33	25,67
2	77,67	166,33	74,67	43,33	118	126,33	225	213,33		42,5	56,83	30,67
3	101,33	180,33	138,3	65,17	137	179,17	149,67	155		133		
4	54	111,33	79,33	63,67	124	163	172,33	47,67		118	71,17	23,67
5	54,83	169	222	89	95		26	104,67	143,6		124,67	
6	137,33	274,67	101	136,67	197,67		157,67	164	157			
7				88,33	135,67	196,67						
8				158,33	136,33	160,67						
9				179	190,33	151,33						
10				118	77,33							
11				152,33	136,67							
12												
Mittelwert	87,36	197,24	123,07	105,1	130,3	159,43	146,13	136,93	150,3	83,81	71,5	26,67
Standard- abweichung	31,91	67,18	60,75	45,98	38,19	23,72	73,29	63,06	9,42	48,52	38,73	3,60
Standard- fehler	13,03	27,43	27,17	13,86	11,51	8,96	32,77	28,19	6,66	24,26	19,36	2,08

Vaskularisierung und Infiltration inflammatorischer Zellen

Zusätzlich zu der HE Färbung wurde eine immunhistochemische Färbung mit Laminin zur Identifizierung der Basalmembran vaskulärer Formationen und eine Fluoreszenz DAPI Färbung zur Identifizierung in das Transplantat immigrierter Zellen angefertigt.

In der DAPI Färbung werden kernhaltige DNA - reiche Zellen dargestellt. Bereits am 14. Tag post transplantationem erscheint das Bild der unbehandeltem Monolayer Versuchsreihe durch die Fluoreszenzdarstellung einem Leuchtrasen. Zahlreiche Zellen umgeben und infiltrieren das Transplantat. 3 Tage und 28 Tage post transplantationem kommen nur wenige DNA – reiche Zellen zur Darstellung. Ein anderes Bild bietet sich bei der behandelten Multilayer Versuchsreihe. Nur wenige Zellen legen sich auf und zwischen den einzelnen Schichten des Transplantates. In der stromalen Matrix kommen DNA – reiche Zellen kaum zur Darstellung.

Betrachtet man die Aufnahmen der immunhistochemisch behandelten Präparate erkennt man bei der nicht behandelten Monolayer Versuchsreihe eine Zunahme Laminin markierter Gefäßformationen zum 28. Tag hin. Die behandelte Multilayer Versuchsreihe zeichnet sich durch kaum nachweisbare Gefäßformationen zwischen den Membranschichten aus. Am 28. Tag hat sich eine gut vaskularisierte autologe Gewebeschicht auf das Transplantat gelegt.

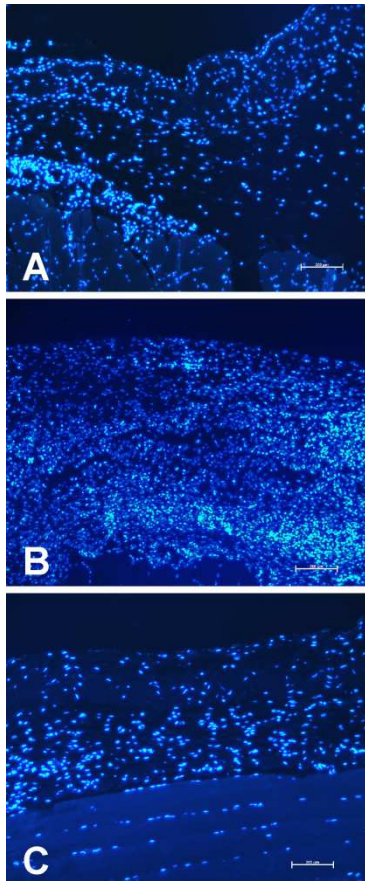


Abb. 41: Fluoreszenz DAPI Färbung 100x, Balken 100 μ m. A 3., B 14., C 28. postOP Tag oCsA. Einige Zellen haben das Stroma der Monolayer HAM infiltriert. Ein Maximum kernhaltiger DNA reicher Zellen ist am 14. postOP Tag nachweisbar.

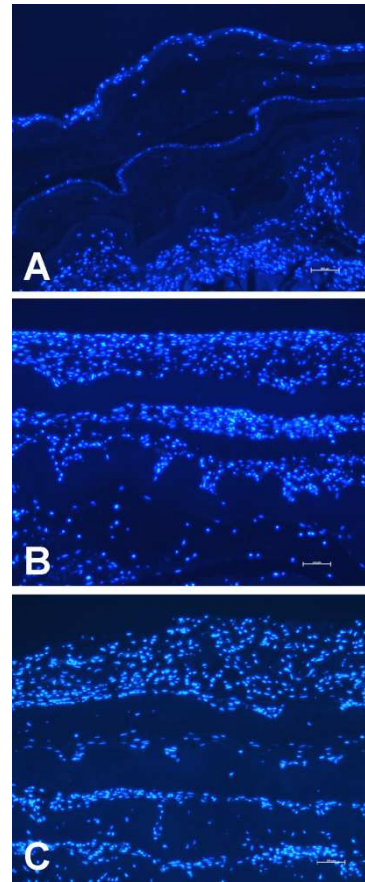


Abb. 42: Fluoreszenz DAPI Färbung 100x, Balken 100 μ m. A 3., B 14., C 28. postOP Tag. Im Bereich der einzelnen Schichten der Multilayer HAM marginale Darstellung von Zellen. Kaum Zellen haben nachweisbar das Stroma der HAM infiltriert.

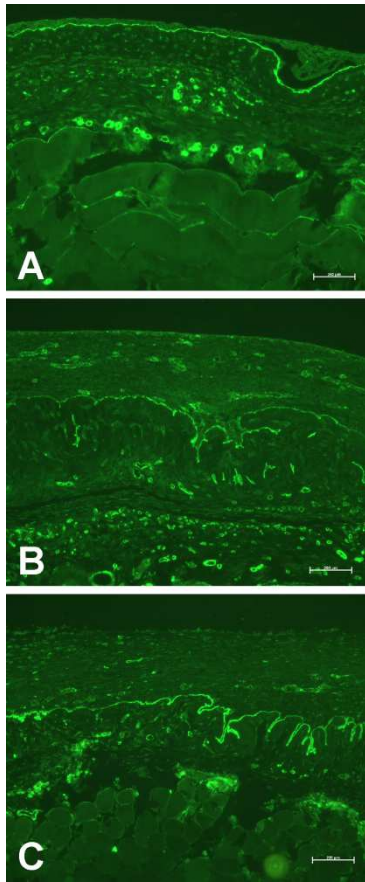


Abb. 13: Laminin Färbung 100x, Balken 100 μ m. A 3., B 14., C 28. postOP Tag CsA. Zunahme Laminin markierter Gefäßformationen bis zum 28. postOP Tag.

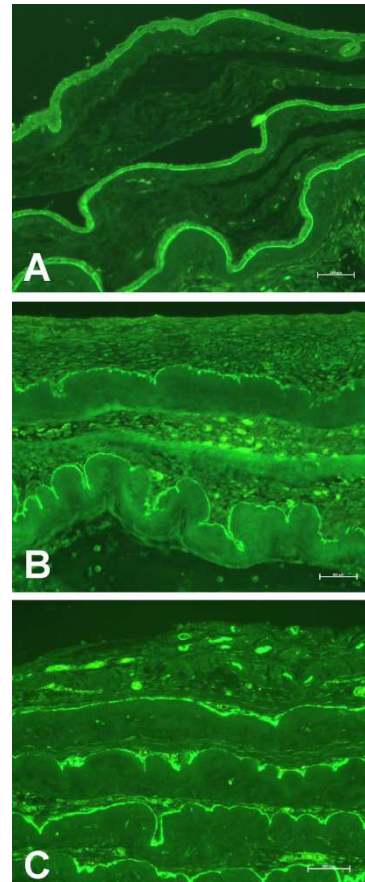


Abb. 14: Laminin Färbung 100x, Balken 100 μ m. A 3., B 14., C 28. Post OP Tag. Es sind kaum Gefäßformationen zwischen den Membranschichten nachzuweisen. 28 Tage postOP zeigt sich eine obenaufliegende gut vaskularisierte autologe Gewebeschicht.

Zur statistischen Analyse der Vaskularisierung und zellulären Entzündungsreaktion sind alle Versuchsserien in Streudiagramme dargestellt (Abbildung 44 und 45).

Die Vaskularisierung war signifikant ($p < 0,05$) von 3. Tag zum 28. Tag in den Monolayer Proben angestiegen. Dieses Phänomen konnte bei den Multilayer Proben nicht festgestellt werden ($p > 0,05$).

Die Anzahl inflammatorischer Zellen stieg signifikant an ($p < 0,05$) und zeigte seinen Höhepunkt in beiden Proben der Multi- und Monolayer HAM am 14. postoperativen Tag. Bis zum 28. Tag kam es zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Rückgang der Anzahl inflammatorischer Zellen in beiden Versuchslinien.

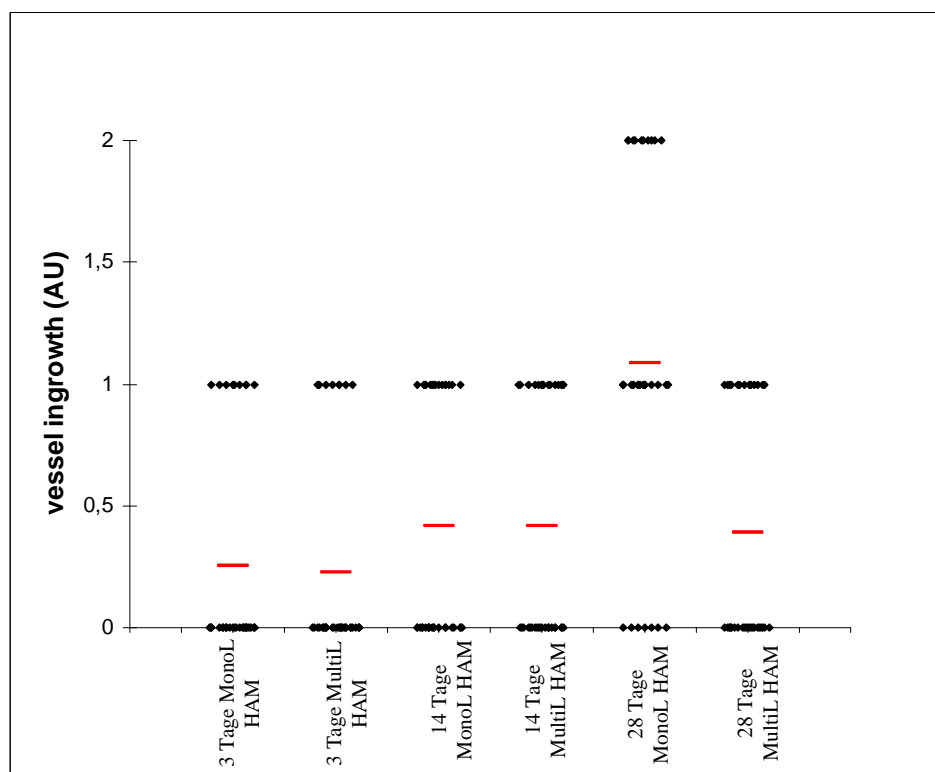


Abb. 15: Streudiagramm (jeder Punkt repräsentiert ein Tier) und Durchschnittswert (rote Linie) neugebildeter Gefäße, die in die Region des HAM Transplantates einsprossen. Die Kapillaren wurden wie folgt skaliert: 0= 0 vessels/mm² (v/mm²), 1= 1-3 v/mm², 2= >3v/mm².

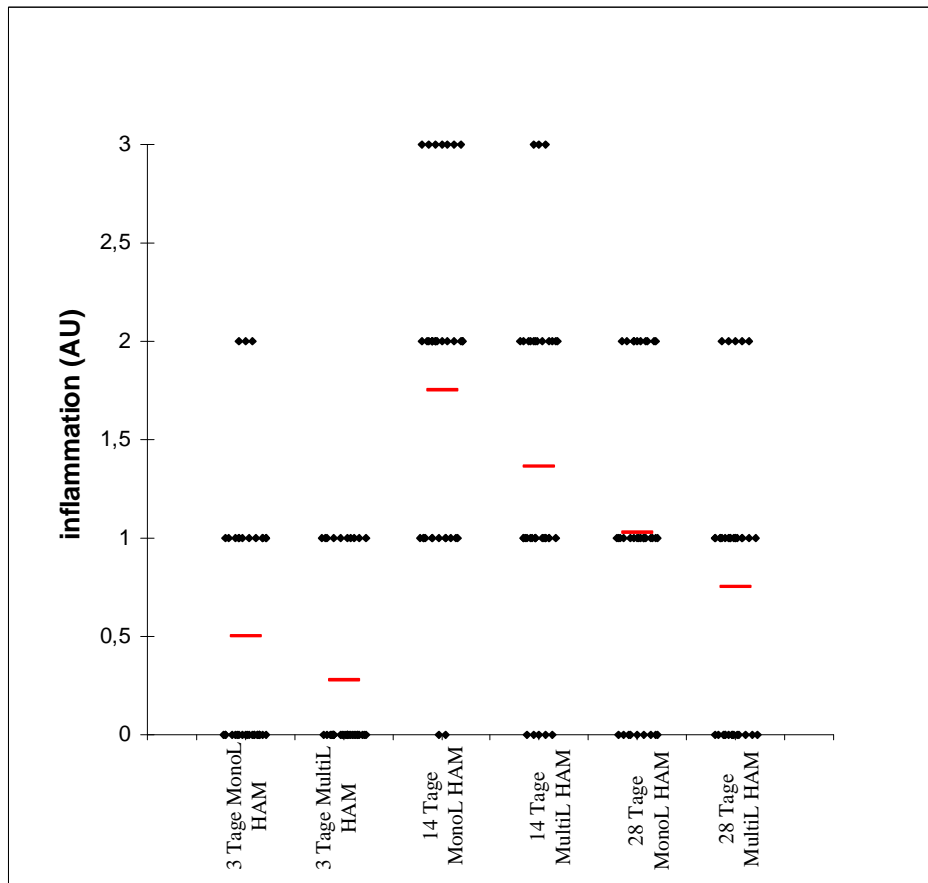


Abb. 16: Streudiagramm (jeder Punkt repräsentiert ein Tier) und Durchschnittswert (rote Linie) der Entzündungsreaktion. Inflammatorische Zellen wurden pro Feld gezählt und wie folgt skaliert: 0= <5% inflammatorische Zellrate pro Feld (icr/f), 1= 5-25% icr/f, 2= 25-50% icr/f, 3= >50% icr/f.

5. Diskussion

Unbehandelte frische Amnionmembran wurde bereits häufig als adäquates Material zur Rekonstruktion von Schädigungen aus dem Bereich der Verbrennung (Quinby et al., 1982, S.711; Ramakrishnan und Jayaraman, 1997, S.33), Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Güler et al., 1997, S.280; Samandari et al., 2004, S.574), Gynäkologie (Tolhurst et al., 1991, S.407; Mhaskar, 2005, S.123), Urologie (Fishman et al., 1987, S.1291) und Neuropädiatrie (Hasegawa et al., 2004, S.408) eingesetzt. Ein erhöhtes Risiko einer Übertragung von Keimen und Erkrankungen bleibt dabei erhalten. Das Ziel der Studie war die Anwendung cryokonservierter Amnionmembran als alternatives sicheres Material zur Rekonstruktion von Weichteilgewebdefekten zu etablieren. Obwohl die cryokonservierte humane Amnionmembran seit den 90er Jahren (Dua et al., 2004, S.51) einen festen Platz in der Rekonstruktion okulärer Defekte einnimmt, ist bisher eine Applikation auf extraokulären, nicht immunprivilegierten Oberflächen kaum beschrieben worden (Kubo et al., 2001, S.1539).

Im Hauptteil der Arbeit wurde die Immunogenität der humanen Amnionmembran in einem Rattenmodell untersucht. Dabei wurde die humane Amnionmembran auf die Bauchmuskulatur von Sprague-Dawley Ratten transplantiert. Der Schwerpunkt des Interesses lag dabei auf der Untersuchung der zellulären und vaskulären Reaktion auf die Amnionmembran und die Degradation der humanen Membran bei nicht bradytrophem, immunprivilegiertem Gewebe. Dabei wurden ein einschichtiges und ein mehrschichtiges Modell entwickelt und einzelne Gruppen mit der immunsupprimierenden Substanz Ciclosporin A behandelt.

5.1 Untersuchungen am Tiermodell Ratte

Das bevorzugte Tiermodell solcher Untersuchungen ist die Ratte, die sich aufgrund rascher Generationsfolge, unkomplizierter Haltungsbedingungen, sowie schneller Ausprägung physiologisch und morphologisch relevanter Organveränderungen besonders eignet.

Eine vergleichbare Übertragung der Daten konnte durch die Verwendung nahezu im genetischen Code identischer Tiere gewährleistet werden.

Eine Übertragung der Ergebnisse auf die menschliche Physiologie ist nur bedingt möglich. Die Ratte unterscheidet sich in Habitus, Organphysiologie und genetischem Aufbau signifikant vom humanen Organismus.

In zahlreichen Studien ist die Immunogenität der Amnionmembran beschrieben worden. Diese Arbeiten bezogen sich allerdings auf das bradytrophe Gewebe des humanen Auges. Tseng implementierte ein Transplantationsverfahren humaner Amnionmembran auf das Auge, welches zahlreiche Vorteile gegenüber anderen Therapieverfahren für verschiedenste Erkrankungen am Auge zeigte. Nachfolgende Untersuchungen auch am Tiermodell sollten die Vorteile der HAMT (human amniotic membrane transplantation) näher beleuchten. Doch eine Studie die histologische und immunhistologische Erkenntnisse über die Immunogenität der HAMT auf nicht bradytrophem Gewebe beschrieb, existierte bisher nicht.

Aufgrund der Überlegung einen geeigneten gefäßversorgten Lappen für die Deckung oraler Defekte zu nutzen, wurde in dieser Studie die Amnionmembran auf die Bauchwandmuskulatur von Ratten genäht. Die gewählte Stelle ermöglichte die spätere Hebung eines gestielten Lappens und die einfache Entnahme des Transplantates samt darunterliegender Muskulatur (Wolff et al., 1995, S.680).

Ein einfacher und etablierter Zugang wird durch die mediane Durchtrennung der Haut erreicht. Die Präparation des Unterhautgewebes von der Muskulatur ist einfach und nahezu atraumatisch. Eine Darstellung des Operationsitus ist mit wenigen Mitteln erreicht. Die Membran lässt sich einfach auflegen und die Muskulatur bietet ein gutes Widerlager für die Nähte. Ist die Haut wieder verschlossen legt sie sich der Amnionmembran an. Eine postoperative Wundheilungsstörung war bei wenigen Tieren zu sehen. Diese waren auf einen insuffizienten Wundverschluss

zurückzuführen, da die Tiere am Nahtmaterial knabberten und die Wunde dadurch eröffneten. Die Defekte wurden gesäubert und bei zwei Tieren mit einigen Nähten primär verschlossen. Bei einem Tier wurde eine sekundär Wundheilung gewählt, da die Haut an die Muskulatur gewachsen und der Defekt verschorft war. Intra- und postoperativ verstarb kein Tier aufgrund operativer Komplikationen. Die Anästhesie der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion eines Ketamin - Xylazin Gemisches. Die Aufrechterhaltung der Narkose wurde mit Ketamin gewährleistet. Drei Tiere aus der Gruppe der Immunsupprimierten Tiere verstarben während der Narkose zur Transplantatentnahme.

„Zwischenbemerkung: Eine nähere Beleuchtung des Metabolismus von Ketamin soll dies erklären.

Ketamin ist ein N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor Antagonist, das seit 1970 in der klinischen Praxis aufgrund seiner anästhesierenden, sedierenden und analgetischen Eigenschaft angewendet wird. Es findet seine Anwendung sowohl bei kurzen chirurgischen Eingriffen als auch im postoperativen Schmerzmanagement oder bei polytraumatisierten Patienten (White, 1982, S.119). Ketamin wird von mikrosomalen Cytochrom P450 der Leber zum metabolisch aktiven Norketamin demethyliert (Hijazi, 2002, S.853). Inwieweit die Cytochrom P450 Isoformen CYP3A4, CYP2B6 und CYP2C9 inhibierend oder induzierend auf den Ketamin-Metabolismus wirken, ist bisher nicht geklärt. Sie scheinen aber einen Einfluss auf die pharmakokinetische Interaktionen mit zahlreichen Medikamenten zu besitzen. So gehört neben den antifugalen Azolen, antibakteriellen Makroliden auch das Immunsuppressivum Ciclosporin zu den Inhibitoren der CYP3A4 Inhibitoren (Koppel, 1990, S.259). Ob ein Zusammenhang zwischen einer Wechselwirkung des Ketamin- und Ciclosporin A-Metabolismus und dem Tod der immunsupprimierten Ratten während der Narkose bestand, ist nicht eindeutig zu verifizieren. Auffällig aber war, dass die immunsupprimierten Tiere eine ungewöhnlich niedrige Ketamindosis zur Narkoseinduktion und -aufrechterhaltung benötigten. Folgende Werte konnten nach Auswertung des Anästhesieprotokolls erhoben werden. Die Gruppen, die mit Ciclosporin 3 bzw. 28 Tage lang behandelt wurden, benötigten signifikant weniger Ketamin zur Anästhesie ($62,3 \text{ mg/kg} \pm 22,1$ vs. $125,5 \text{ mg/kg} \pm 40,1$ und $70,2 \text{ mg/kg} \pm 39,0$ vs. $137,8 \text{ mg/kg} \pm 38,4$; $p < 0,01$) in der zweiten Operation zur Transplantatentnahme als in der immunkompetenten Gruppe.“

Zur Fixierung der Amnionmembran standen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Fixierung der Amnionmembran mit resorbierbarem, nicht resorbierbarem Nahtmaterial und Fibrinkleber. Die heutzutage gängigsten resorbierbaren Nahtmaterialien bilden Polymere der Glykolsäure (Dexon®=PGS), Copolymere aus Glykolyd und Lactid (Polyglaktin=Vicryl®=PGS), Polymere aus Dioxanon (Polydioxanon=PDS).

Der Fibrinkleber (Beriplast® oder Tissucol®) besteht aus zwei Komponenten Fibrinogen (Faktor I der Gerinnungskaskade) und Thrombin (Faktor IIa der Gerinnungskaskade). Werden die Komponenten vermischt, spaltet Thrombin Fibrinogen in Fibrin und aktiviert den Faktor XIII zu XIIIa. Faktor XIIIa führt zu einer Quervernetzung des Fibrins, was ein stabiles, reißfestes und gleichzeitig elastisches Fibrinnetz ergibt. Dieser Vorgang entspricht dem letzten Abschnitt der natürlichen Blutgerinnungskaskade. Die Zugabe von Aprotinin ein Protease Inhibitor verzögert die physiologische Fibrinolyse. Die Möglichkeit die Amnionmembran mit Fibrinkleber zu fixieren ist bereits bekannt, hat sich aber bisher nur im Bereich der Augenchirurgie etabliert (Kheirkhah et al., 2008, S.1059).

In unserer Arbeit entschlossen wir uns auf nicht resorbierbares Nahtmaterial zurückzugreifen. Die silikonisierte geflochtene Perma-Hand Seide weist eine geringe Elastizität, eine ausgeprägte Geschmeidigkeit und sehr gute Knüpfeigenschaften auf, die den Umgang mit mikrochirurgischem Instrumentarium optimieren. Die Seide wird weder absorbiert noch resorbiert, so daß sie zum einen Hilfe zur Orientierung vor allem zur Transplantatentnahme bietet, zum anderen weniger Artefakte aufgrund biologischer Abbaumechanismen und immunologischen Reaktionen als resorbierbares Nahtmaterial oder Fibrinkleber bewirkt. Gleichzeitig bildet die Naht mit nicht resorbierbarem Material eine höhere Fixierungssicherheit bei nicht zu vermeidenden Bewegungen der Versuchstiere als beim Fibrinkleber.

5.2 Kryokonservierung

Spezielle Aufbereitungsverfahren und Sterilisationsmethoden müssen eine gleichbleibende Qualität und Konservierung der humanen Amnionmembran sicher stellen.

Die Transplantation frischer Amnionmembran auf Menschen ist bereits beschrieben worden, eine Gefahr bakterieller oder virologischer Übertragungen vom Spender auf den Empfänger bleibt dabei bestehen. Ein Verbrauch sollte innerhalb von 24 Stunden erfolgen (Mejía et al., 2000, S.288). Es wurden verschiedene Methoden zur Konservierung der HAM genutzt. Hypothermische Aufbewahrung (bei 4°C), Dehydrierung (Chuck et al., 2004, S.341), Gefriertrocknung (Nakamura et al., 2004, S.93), Glycerol-Konservierung und Kryokonservierung. Entscheidend ist der Einfluss auf die Morphologie, Überlebensfähigkeit der Zellen und Funktionalität biologischer Faktoren der Amnionepithelmembran.

Die meiste klinische Erfahrung der Applikation humaner Amnionmembran beruht auf der Nutzung kryokonservierter Amnionmembran in 50%iger Glycerin Lösung bei -80°C, entwickelt von *Tseng* und *Kruse* (Tseng SC, 1998, S.431; Kruse et al., 1998, S.114). Bisher ist unklar ob und inwieweit Amnionepithel, stromale Fibroblasten und Wachstumsfaktoren die Kryokonservierung überleben. Kruse et al. postuliert nach Auswertung von Färbetechniken zur Darstellung vitalen Gewebes und die Unfähigkeit zur Proliferation der HAM Zellen in Zellkultur nach Kryokonservierung, daß die Epithelzellen nicht mehr lebensfähig sind (Kruse et al., 1998, S.114). Die morphologischen, immunologischen und physikalischen Eigenschaften bleiben erhalten. Dies gilt auch für gefriergetrocknete HAM (Nakamura et al., 2004, S.93). Diese bietet den Vorteil einer längeren Haltbarkeit bei Raumtemperatur und benötigt nicht den Transport in Niedrig - Temperatur Gefrierkammern. Im klinischen Alltag allerdings ist ihre Präparation aufgrund einer geringeren Elastizität und Spannbarkeit weniger anwenderfreundlich als bei aufgetauter kryokonservierter Membran.

Eine Aufbewahrung der HAM in Glycerin bei 4°C hat einen sofortigen Zelltod zur Folge (Hennerbichler et al., 2007, S.1), die Effektivität einer Amnionmembrantransplantation im Vergleich mit frischer Amnionmembran, bleibt aber dennoch, auch nach einem Jahr, erhalten (Maral et al., 1999, S.625).

Eine Kryokonservierung in 1.5 M Dimethylsulfoxid Lösung (DMSO) bei -80°C ermöglicht das Überleben von 50% der Amnionepithelzellen über mehrere Monate (Kubo et al., 2001, S.1539). Eine Kultivierung der Epithelzellen ist dann noch möglich. Nutzt man die Amnionmembran als Trägermaterial für bestimmte Zellen z.B. Stammzellen oder Chondrozyten im Rahmen des „tissue engineering“ ist diese Möglichkeit nicht erwünscht.

Mittlerweile ist die Amnionmembran entweder kryokonserviert als AmnioGraft® (Bio-Tissue, Inc., USA) oder dehydriert als AmbioDry® (IOP Inc., USA) gewerblich erhältlich.

5.3 Mono- und Multilayer Technik

Ein entscheidender Bestandteil dieser Arbeit ist die Gegenüberstellung des zeitlichen Ablaufs der Degradation und die immunologische Reaktion des Organismus auf ein einschichtiges und mehrschichtiges Amnionmembranmodell. Dabei wurden drei Kriterien histologisch und immunhistologisch erfasst. Die Vaskularisierungs- und Infiltrationsrate invaginierender Zellen und die Degradation der Membran in Form von Dickenminderung und Verlust der Integrität.

Es wurden drei verschiedene Applikationsformen am in vivo Modell verglichen. Erstens das einschichtige (Monolayer) Amnionmembranmodell ohne Immunsuppression, zweitens einschichtig mit Immunsuppression und drittens das mehrschichtige (Multilayer) Modell bei immunsupprimierten Tieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant verlängerte Überlebenszeit des Transplantates bei Multilayer Technik und bei Immunsuppression nachgewiesen werden. *Resch et al.* untersuchten elektronenmikroskopisch und lichtmikroskopisch die histologischen und mikrostrukturellen Veränderungen der Kornea nach Amnionmembrantransplantation. Sie beobachteten, dass ein einschichtiges Transplantat schon nach 1 bis zwei Wochen nicht mehr nachweisbar in die Kornea

integriert ist, während das mehrschichtige Transplantat (hier sog. „Sandwich-Technik“), wie in unserer Studie dargestellt, noch viele Monate verbleibt (Resch et al., 2006, S.1853). *Kruse* konnte noch nach mehr als einem Jahr nach Rekonstruktionen okulärer Defekte mit humaner Amnionmembrantransplantation in Sandwich Technik Fragmente der Amnionmembran nachweisen (Kruse et al., 1998, S.114). *Rinastiti et al.* nutzten als einzige mehrschichtige gefriergetrocknete HAM auf extraokulären, immunologisch nicht privilegierten Organen. Über einen Zeitraum von 10 Tagen konnte histologisch eine beschleunigte Wundheilung gingivaler Defekte bei Kaninchen unter Einfluss der Amnionmembran beobachtet werden (Rinastiti et al., 2006, S.247). Über die Degradation der Amnionmembran findet sich allerdings kein Hinweis, obgleich des kurzen Untersuchungszeitraums eine Aussage nicht valide erscheint.

Der Verlauf der Degradation des mehrschichtigen Modells aus unserer Studie ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus Beobachtungen nach mehrschichtiger Rekonstruktion cornealer Defekte. So ist die apikale Amnionmembran einem frühen Verlust der Integrität unterworfen, während die unteren Schichten zunächst stabil verbleiben. *Resch et al.* beschreiben ein Verschwinden der apikalen Membran nach 1 bis 2 Wochen (Resch et al., 2006, S.1853). Eine signifikante Degradation dieser Membran konnte in unseren Beobachtungen vor allem zwischen dem 28 und 60 Tag festgestellt werden.

Eine hier auftretende Diversivität der dargestellten Messergebnisse in unserer Arbeit geht mit der erfolgten Methodik bzw. Technik der Applikation einher und bleibt dennoch durch die Menge der Messungen aussagekräftig.

Eine lockere Auflage der einzelnen Membranschichten ermöglicht eine einfachere Infiltration des intermembranösen Raumes. Kleinste strukturelle Veränderung durch die Präparation und Applikation der Membran bieten einen guten Angriffspunkt zur Lösung der Integrität der Membran durch die Empfängerzellen wie Fibroblasten, Lymphozyten, Fremdkörperzellen und Epithelzellen. Somit gilt eine entsprechende Fixierung der Membranen vorzunehmen, um den jeweiligen gewünschten Effekt zu erzielen. Sind nicht die einzelnen Membranschichten fixiert, kommt es zu einer Retraktion mit Faltenbildung der losen Membran und damit zu einer erhöhten Konzentration etwaiger sezernierter Faktoren auf engem Raum mit entsprechender

Retardierung der Degradation und Multiplikation biologischer Eigenschaften der Amnionmembran.

Eine 2007 veröffentlichte Studie verdeutlicht dies. Sie berichtet über den positiven Kurzeiteffekt der kryokonservierten Monolayer Amnionmembran auf die Epithelialisierung von Wunden bei venösen Ulzerationen der Extremitäten (Mermet et al., 2007, S.459). Der Kurzeiteffekt stand im Zusammenhang mit der limitierten Lebensdauer des AM Transplantats von 2-4 Wochen und der damit einhergehende Mangel an Wachstumsfaktoren und Progenitorzellen, welche von der stromalen AM zur Induktion, Forcierung und Unterstützung der Wundheilung sezerniert wurden. Der positive Effekt stellte sich nach Untergang der Membran also ein.

Ein erster Schritt eine Erhöhung der Lebens- und Effektdauer zu erreichen, wäre die simple Multiplikation der Faktoren.

Ein zweiter Schritt ist die Degradation der Amnionmembran zu verlangsamen. Hierzu wurde die HAM in Multilayer-Technik appliziert und zusätzlich durch eine immunsuppressive Behandlung des Empfängers (wenn möglich und sinnvoll) eine verlängerte Lebensdauer des Transplantates erreicht. Dies konnte durch eine Studie allerdings am immunprivilegiertem Organ, der Cornea von *Prabhasawat* bestätigt werden. Er verglich den Heilungsprozess epithelialer Defekte nach Monolayer AMT mit Multilayer AMT. Es zeigte sich eine signifikant schnellere Heilung des cornealen Schadens nach Multilayer AMT (*Prabhasawat et al.*, 2001, S.1455). Er vermutet daher je mehr von der stromalen Matrix der Amnionmembran vorhanden ist, desto höher die Konzentration von Wachstumsfaktoren, die die Epithelialisierung fördern.

Die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen des einschichtigen Modells unserer Arbeit nach 3, 14 und 28 Tagen zeigt eine fast vollständige Degradation der Transplantate nach 28 Tagen.

Dies konnte auch in einer Studie mit einem soft tissue Modell für intraorale Rekonstruktionen und Herstellung einer myomukösen Lappenplastik beschrieben werden (*Samandari et al.*, 2004, S. 574; *Ahn et al.*, 2006, S.411). Im Gegensatz dazu lassen sich in einer Studie von *Gomes et al.* Fragmente lyophilisierter und durch Ethylenoxid sterilisierter Amnionmembran noch 90 Tage nach Amnionmembrantransplantation zur Knochenregeneration und in einer Studie von *Lijima et al.* noch 6 Monate nach Transplantation zur Augmentation von

Rattenharnblasen nachweisen (Gomes et al., 2001, S.563; Iijima et al., 2007, S.513). Erfolgt die Transplantation auf ein immunprivilegiertes Organ wie in der Studie von Tosi et al. fanden sich keine Überbleibsel der Amnionmembran nach zwei Monaten. Hierbei wurde die Amnionmembran einschichtig auf die Kornea transplantiert und in Folge Proben histologisch und immunhistologisch bis 20 Monate nach Transplantation untersucht (Tosi et al., 2005, S.852). Gris berichtet bei gleicher Methodik Monolayer Fragmente noch nach 3 Monaten (nach 7 Monaten nicht mehr) lichtmikroskopisch nachweisen zu können (Gris et al., 2002, S.508).

Ein wesentlicher Bestandteil der Degradation und Organisation der Membran ist die Bereitstellung von Empfängerzellen und Faktoren, die den Abbau der Membran forcieren, durch eine Vaskularisierung des perimembranösen Raumes. Unsere Studie ermittelte einen signifikanten Anstieg der Vaskularisierungsrate ($p < 0,05$) von 3. Tag zum 28. Tag in den Monolayer Proben. Dieses Phänomen konnte bei den Multilayer Proben nicht festgestellt werden ($p > 0,05$) und beruht vermutlich auf einer erhöhten Konzentration antiangiogenetischer Faktoren (Hao et al., 2000, S.348).

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil bildet vor allem die Infiltration von immunaktiven Empfängerzellen in das Stroma. Welche durch immunmodulatorische Fähigkeit der Amnionmembran beeinflusst und supprimiert werden.

Die Immunogenität der humanen Amnionmembran beruht auf einer verminderten Expression von HLA- A, B, C und DR Antigenen (Akle, 1981, S.1003), vermehrten Expression des Komplement Inhibitor Proteins CD59 (Rooney und Morgan, 1992, S.541) und Klasse Ib Antigene HLA-G und HLA-E und Fas Ligand (Houlihan et al., 1995, S.5665). Kubo et al. legten kryokonservierte Amnionmembran unter die Nierenkapsel von Ratten. Eine Abstoßungsreaktion konnten sie nicht beobachten, vielmehr ein Abwehrmechanismus gegen die zelluläre Infiltration von Empfängerzellen ähnlich einer Barrierschicht (Kubo et al., 2001, S.1539). Die Amnionmembran scheint ein immun-privilegiertes Organ zu sein, mit der Fähigkeit immunmodulatorische Faktoren zu bilden und zu exprimieren. Die Infiltration von Empfängerzellen in das amniotische Stroma war gering und konnte durch die Substitution von Immunsuppressiva noch weiter reduziert werden. Eine der wichtigsten Beobachtungen war eine fast vollständige Abwesenheit von Empfängerzellen im Stroma des mehrschichtigen Modells. Hier scheinen die

einzelnen Membranen die zelluläre Infiltration zu blockieren und somit die Degradation um ein Vielfaches zu verlangsamen.

5.4 Immunsuppression

Der Nutzen von systemischen CsA als potentes Medikament zur Reduktion der Immunreaktion nach Organtransplantation ist eindeutig erwiesen (Land, 1986). Die Effektivität von Ciclosporin A in der Immunprophylaxe nach Organ-Transplantationen wurde in mehreren experimentellen und klinischen Studien überprüft und nachgewiesen (Kruse, 1991, S.1119; Loertscher et al., 1992, S.368; Cohen, 1984, S.667).

Die erfolgreiche Therapie bzw. Immunsuppression mit Ciclosporin wird durch zwei wichtige Punkte limitiert. Zum einen durch die relativ hohe Inzidenz unerwünschter Nebenwirkungen und zum anderen die Notwendigkeit der Blutspiegel adaptierten Dosierung. So ist die Bioverfügbarkeit von Ciclosporin aufgrund der variablen Absorption und unbestimmbaren Pharmakokinetik unsicher und erfordert die regelmäßige CsA – Blutspiegelkontrolle (Jorga, 2004, S.396).

Die in unserer Studie festgelegte Dosierung erfolgte in Zusammenarbeit mit Novartis Pharma, die auf ein grosses Repertoire an tierexperimentellen Arbeiten gerade auch mit dem Rattenmodell zurückgreifen können. Dieser Umstand ermöglichte uns auf ein Drug Monitoring zu verzichten.

Sich klinisch manifestierende Nebenwirkungen konnten gemeinsam mit den Tierpflegern nicht beobachtet werden.

Eine Behandlung mit Ciclosporin bei Amnionmembrantransplantation wurde bisher nur an bradytrophem Gewebe, dem Auge untersucht. In einer Studie von Tseng et al. 1998 in der Amnionmembran auf geschädigte menschliche Augen transplantiert wurde, konnte kein Vorteil der immunsuppressiven Behandlung mit Ciclosporin festgestellt werden (Tseng, 1998, S.431). In einer Studie von Rhee et al. 2004 wurde

eine systemische und topische Gabe von Ciclosporin bei ausgeprägter Schädigung des Auges bei Lichen Planus induzierter Keratokonjunktivitis und Amnionmembrantransplantation empfohlen (Rhee, 2004, S.100). Eine standardisierte Anwendung erfolgte bei Amnion-Limbus-Transplantation zur Oberflächenrekonstruktion nach schwerer Verätzung und Verbrennung am Auge in der Studie von Stoiber et al. 2002 (Stoiber et al., 2002, S.839).

In unserer Studie konnte durch histologische und immunhistologische Untersuchungen der Einfluß von Ciclosporin bei Amnionmembrantransplantation auf nicht bradytrophem Gewebe (Muskel) untersucht werden. In den ermittelten Daten konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der Degradation der Amnionmembran bei Behandlung mit Ciclosporin und ohne Ciclosporin festgestellt werden. Nach 28 Tagen war die Amnionmembran der nicht behandelten Tiere sowohl histologisch als auch in der immunhistochemischen Laminin Färbung kaum noch nachzuweisen ($8,7\mu\text{m} \pm 10,25\mu\text{m}$) während die Amnionmembran behandelter Tiere teilweise noch makroskopisch nachweisbar war ($61,71\mu\text{m} \pm 39,58\mu\text{m}$).

Die Immunsuppression mit Ciclosporin A scheint damit eine Verlangsamung der Degradation der Amnionmembran zu bewirken. Die immunologische Antwort des Organismus auf das Transplantat wird reduziert und Umbauprozesse zur Wiederherstellung des natürlichen Zustandes werden supprimiert.

Ob damit eine Behandlung mit Ciclosporin notwendig erscheint, ist abhängig von der Indikationsstellung der Amnionmembrantransplantation. Ist ein Gewebersatz, zum Beispiel bei Behandlung abdomineller Hernien oder als Deckmaterial deepithelialisierter Wunden beabsichtigt, ist eine langsame Degradation der Amnionmembran sinnvoll. Als limitierender Faktor der immunsuppressiven Behandlung gilt die Entwicklung von Nebenwirkungen.

5.5 Schlussfolgerung

Diese Arbeit demonstriert erfolgreich ein xenogenes Modell zur Untersuchung des immunologischen Verhaltens der Amnionmembran transplantiert auf nicht bradytrophem, nicht immunprivilegiertem Gewebe.

Die angewandte Kryokonservierung und Multilayer-Applikation ermöglicht eine für den Menschen sichere und langwierige Nutzung exprimierter und sezernerter Faktoren der Amnionmembran.

Teilergebnisse der Dissertation sind bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht worden:

1. Kesting MR, Loeffelbein DJ, Steinstraesser L, Mueke T, Demtroeder C, Sommerer F, Hoelzle F, Wolff KD: Crypreserved human amniotic membrane for soft tissue repair in rats. *Ann Plast Surg.* 2008; 60 (6): 684-691
2. Kesting MR, Wolff KD, Mücke T, Demtroeder C, Kreuzer K, Schulte M, Jacobsen F, Hirsch T, Loeffelbein DJ, Steinstraesser L: A bioartificial surgical patch from multilayered human amniotic membrane-In vivo investigations in a rat model. *J Biomed Mater res B Appl Biomater.* 2009; 90 (2) 930-938

6. Zusammenfassung

In dieser tierexperimentellen Studie wurde die immunologische Reaktion xenogen transplantiertes kryokonserviertes humanes Amnionmembran auf die Bauchmuskulatur von Sprague-Dawley Ratten untersucht.

Zentraler Gegenstand der Arbeit war die Bestimmung immunologischer, immunmodulierender und Angiogenese - assoziierter Parameter, die nach verschiedenen Einheilungszeiten und unter immunsuppressiver Therapie mit Ciclosporin A getestet wurden.

Darüber hinaus wurde durch quantitative mikroskopische und immunhistochemische Verfahren analysiert, inwieweit eine Interaktion der Amnionmembran mit dem Umgebungsgewebe stattfindet.

120 Ratten wurden von einem Computer erstellten randomisierten Liste in drei Gruppen unterteilt. Zwei Gruppen mit 36 Ratten und eine Gruppe mit 48 Versuchstieren. Der ersten Gruppe wurde eine einlagige Schicht Amnionmembran transplantiert. Nach jeweils 3, 14 und 28 Tagen erfolgte bei jeweils 12 der 36 Ratten die Explantation des Transplantats samt anliegender Muskulatur. Der zweiten Gruppe wurde ebenfalls eine einlagige Schicht Amnionmembran aufgenäht. Zusätzlich erfolgte eine immunsuppressive Behandlung mit Ciclosporin. Die Entnahme erfolgte analog am 3., 14. und 28. Tag post OP. Bei der dritten Gruppe erfolgte die Platzierung und Fixierung einer mehrlagigen Amnionmembranschicht auf die Bauchwandmuskulatur. Auch diese Gruppe wurde mit Ciclosporin in gleicher Dosierung immunsupprimiert. Am 3., 14., 28. und zusätzlich am 60. postoperativen Tag erfolgte analog bei jeweils 12 Tieren die Explantation des transplantierten Bereiches und Euthanisierung der Ratten. Es erfolgten sowohl mikroskopische als auch immunhistochemische Untersuchungen der Präparate. In den ermittelten Daten konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der Degradation der Amnionmembran bei Behandlung mit Ciclosporin und ohne Ciclosporin festgestellt werden. Nach 28 Tagen war die Amnionmembran der nicht behandelten Tiere sowohl histologisch als auch in der immunhistochemischen Laminin Färbung kaum noch nachzuweisen während die Amnionmembran behandelte Tiere teilweise noch makroskopisch nachweisbar war. Desweiteren konnte eine signifikant verlängerte Überlebenszeit des Transplantates bei Multilayer Technik und bei Immunsuppression nachgewiesen

werden. Vaskularisierung und Invagination von Empfängerzellen waren signifikant geringer bei der immunsuppressiv behandelten Gruppe und der Multilayer Gruppe. Weder eine Transplantatabstoßung noch Entzündungszeichen konnten beobachtet werden.

Diese Studie zeigt eine erfolgreiche xenogene Transplantation humaner Amnionmembran auf nicht bradytrophem, nicht immunprivilegiertem Gewebe, wobei eine zusätzliche immunsuppressive Behandlung eine Verzögerung der Degradation und Immunreaktion bedeutet.

Summary

In this study we investigated the immunological response of immunological unprivileged anatomical tissue, using cryopreserved human amniotic membrane as a surgical patch on abdominal wall muscles of 120 Sprague-Dawley rats.

The determination of immunological, immunomodulating and angiogenetic factors, observed after different healing sequences, represented the main part of the dissertation. Quantitative macro- and microscopically and immunohistologically examinations were used.

The rats were divided in three groups (36, 36, 48 rats). The first group were transplanted with monolayer amniotic membrane, the second were transplanted with a monolayer membrane as well, but additionally treated with the immunsuppressivum Ciclosporin A. The third group was transplanted with a multilayered amniotic membrane and as well treated with ciclosporin. The transplanted region was removed 3, 14, 28 and in the third group additionally 60 days post transplantation to undergo a macro- and microscopically evaluation.

We determine a significant difference related to degradation, invagination of host cells, host vessels and survival of the amniotic patch between treated and non-treated rats and using monolayer and multilayered amnion grafts.

Maintaining its architecture the first days, 28 days after the human amniotic membrane transplantation a thick tissue layer was formed coating the grafted region.

Inflammatory cells were distinctly reduced in contrast to the specimen obtained after 14 days, especially in the treated group. Original amnion architecture was not detectable anymore in the monolayer samples. Amnion remnants were accompanied by fibrocytes and new vessels ingrowing to the former graft region. By contrast, the individual layers of the multilayered samples were still detectable. Fibrocytes and myofibrocytes penetrated by neo-vessels were evident in the interface region, between the layers and above the uppermost HAM layer. Vascularization increased significantly from day three to day 28 in the monolayer samples, but not significantly in the multilayer samples. Inflammation increased significantly and shows its peak on day 14 in both samples and had significantly dropped off on day 28 in mono- and multilayer samples. A significant difference between treated and non treated monolayer group could be detected with less inflammation response and vessels invagination of the immunosuppressive treated rats.

The study demonstrate a successful xenotransplantation of cryopreserved amniotic membrane on unprivileged tissue. Its shows absenced graft rejection and a less immunological response to human amniotic membrane additionally reduced by a multilayered patch and using cyclosporin as an immunosuppressive.

7. Literaturverzeichnis

1. **Abbas AK und Lichtman AH Pober JS:** Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Co, 1998; 3rd ed.
2. **Adds PJ und Hunt C Hartley S:** Bacterial contamination of amniotic membrane. Br J Ophthalmol. 2001; 85: 228- 230.
3. **Adinolfi M und Akle CA McColl I:** Expression of HLA antigen, β 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. Nature 1982; 295: 325-327.
4. **Ahn KM, Lee JH, Hwang SJ, Choung PH, Kim MJ, Park JK, Jahng J, Yang EK:** Fabrication of myomucosal flap using tissue-engineered bioartificial mucosa constructed with oral keratinocytes cultured on amniotic membrane. Artif Organs. 2006; 30(6): 411-423.
5. **Akle CA und Adinolfi M:** Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. Lancet 1981;7: 1003-1005.
6. **Aplin JD und Campbell S:** The extracellular matrix of human amniotic epithelium: Ultrastructure, composition and deposition. J Cell Science 1985; 79: 119-36.
7. **Asahara T, T Murohara, A Sullivan, M Silver, R van der Zee, T Li, Witztenbichler B, Schattemann G Ismer JM:** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275: 964–967.
8. **Bachmeier N, Graf R:** The anchoring zone in the human placental amnion: bunches of oxytalan and collagen connect mesoderm and epithelium. Anat Embryol. 1999; 200: 81-90.
9. **Balbi C und Balbi GC:** Re-epithelialization of ectropion by topical application of an amniotic membrane after long preservation. Minerva Ginecol. 1989; 41 (3): 145-148.
10. **Bankiewicz KS, Palmatier M, Plunkett RJ, Cummins A, Oldfield EH:** Reversal of hemiparkinsonian syndrome in nonhuman primates by amnion implantation into caudate nucleus. J Neurosurg. 1994; 81(6): 869-76.
11. **Barlas M, Gokcora H, Erekul S, Dindar H, Yucesan S:** Human amniotic membrane as an intestinal patch for neomucosal growth in the rabbit model. J Pediatr Surg. 1992; 27(5): 597-601.
12. **Basile A:** A comparative study of glycerinized and lyophilized porcine skin in dressing for third- degree burns. Plast Reconstr Surg. 1982; 69: 969-974.
13. **Bergström S:** Surface ultrastructure of human amnion and chorion in early pregnancy: a scanning electron microscope study. Obstet Gynecol. 1971; 38(4):513-524.

- 14. Bolze S und Boulieu R:** HPLC determination of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in plasma with a high-purity reversed-phase sorbent. Clin Chem. 1998; 44(3): 560-66
- 15. Bongcam-Rudloff E, Nister M, Betsholtz C, Wang JL, Stenman G, Huebner K, Croce CM, Westermark B:** Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. Cancer Res. 1991; 51: 1553-1560.
- 16. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H:** Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. Agents Actions. 1976; 6(4): 468-475.
- 17. Borish L:** Updates on cells and cytokines. IL-10: Evolving concepts. J Allergy Clin Immunol. 1998; 101(3): 293-297.
- 18. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG:** Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. J Exp Med. 1998; 187: 813-818.
- 19. Boudreau N, Simpson CJ, Werb Z, Bissell MJ:** Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. Science 1991; 115: 1383-95.
- 21. Boudreau N, Werb Z, Bissell MJ:** Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. Proc Natl Acad Sci. 1996; 93: 3509-3513.
- 22. Bouhaddi M, Delbosc B, Fortrat JO, Henriet MT, Capelle S, Ducloux D, Chalopin JM, Regnard J:** Six-month cardiovascular changes in cyclosporine-treated recipients of corneal grafts: Serial baroreflex responses. Transpl Int. 2004; 17(6): 325-333.
- 23. Branski LK, Herndon DN, Celis MM, Norbury WB, Masters OE, Jeschke MG:** Amnion in the treatment of pediatric partial-thickness facial burns. Burns 2007; 34(3): 393 - 399.
- 24. Braud VM, Aldemir H, Breart B, Ferlin WG:** Expression of CD94-NKG2A inhibitory receptor is restricted to a subset of CD8+ T cells . Trends Immunol. 2003; 24: 162-164.
- 25. Brindeau A:** Creation d'un vagin artificiel a l'aide des membranes ovulaires d'un oeuf a terme. Gynecol Obstet. 1934; 29: 385.
- 26. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM:** The novel antimicrobial peptide β 3-defensin is produced by the amnion: A possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. Am J Obstet Gynecol. 2004; 191(5): 1678-1687.
- 27. Burger K:** Künstliche Scheidenbildung mittels Eihäuten. Zentralblatt für Gynäkologie 1937; 42: 2437-2440.

- 28. Burgos H und Sergeant RJ:** Lyophilized human amniotic membranes used in reconstruction of the ear. *J R Soc Med.* 1983; 76: 433.
- 29. Caraco Y, Tateishi T Guengerich FP, Wood AJ:** Microsomal codeine N-demethylation: cosegregation with cytochrome P4503A4 activity. *Drug Metab Dispos.* 1996; 24 (7): 761-764.
- 30. Casey ML und MacDonald PC:** Keratinocyte growth factor expression in the mesenchymal cells of human amnion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82 (10): 3319-3323.
- 31. Chuck RS, Graff JM, Bryant MR, Sweet PM:** Biochemical characterization of human amniotic membrane preparations for ocular surface reconstruction. *Ophthalmic Res.* 2004; 341-348.
- 32. Cohen DJ, Loertscher R, Rubin MF:** Cyclosporine: A new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann Intern Med.* 1984; 101: 667-682.
- 33. Colocho G, Graham WP, Greene AE, Matheson DW, Lynch D:** Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing. *Arch Surg.* 1974; 109: 370-403.
- 34. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD:** Matrix Metalloproteinases Generate Angiostatin: Effects on Neovascularization. *J Immunol.* 1998; 161: 6845-6852.
- 35. D'Andrea AD, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G:** Interleukin-10 inhibits lymphocyte IFN- γ production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/Interleukin-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.* 1993; 178(3): 1041-1048.
- 36. Davis GE, Blaker SN, Engvall E, Varon S, Manthorpe M, Gage FH:** Human amnion membrane serves as a substratum for growing axons in vitro and in vivo. *Science* 1987; 236: 1106-1109.
- 37. Davis JW:** Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J. Hosp Rep.* 1910; 15: 307-396.
- 38. Dawson Sir William:** Fundstätte Joggins, Nova Scotia in Kanada: [s.n.], 1851.
- 39. de Rötth A:** Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol.* 1940; 119: 522-525.
- 40. Dinarello CA:** Role of Interleukin-1 in infectious diseases. *Immunological Reviews* 1992; 127: 119-146.
- 41. DiPietro LA, Nebgen DR, Polverini PJ:** Downregulation of endothelial cell thrombospondin 1 enhances in vitro angiogenesis. *J Vasc Res.* 1994; 31(3): 178-185.

- 42. Distler JW, Hirth A, Kurowska M, Gay RE, Gay S, Distler O:** Angiogenic and Angistatic Factors in the Molecular Control of Angiogenesis. *QJ Nucl Med.* 2003; 47: 149-161.
- 43. Dumas S, Kolokotronis A, Stefanopoulos P:** Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. *Infect Immun.* 2005; 73(3): 1271-1274.
- 44. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM:** Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis. *AM J Pathol.* 1995; 146: 1029-1039.
- 45. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS:** The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 2004; 49(1): 51-77
- 46. Eckstein LA, van Quill KR, Bui SK, Uustalo MS, O'Brien JM:** Cyclosporin A inhibits Calcineurin/Nuclear factor of activated T-cells signaling and induces apoptosis in Retinoblastoma cells. *IVOS* 2005; 46(3): 782-790.
- 47. Elwan MA und Sakuragawa N:** Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *Neuroreport* 1997; 8(16): 3435-3438.
- 48. Emmel EA, Verweij CL, Durand DB, Higgins KM, Lacy E, Crabtree GR:** Cyclosporin A specifically inhibits functions of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science* 1989; 246(4937): 1617-1620.
- 49. Engelhard V:** Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Ann Rev Immunol.* 1994; 12: 181-207.
- 50. Fahey JV und Wira CR:** Effect of menstrual status on antibacterial activity and secretory leukocyte protease inhibitor production by human uterine epithelial cells in culture. *J Infect Dis.* 2002; 185(11):1606-1613.
- 51. Ferrara N und K Alitalo:** Clinical applications of angiogenetic growth factors and their inhibitors. *Nature Medicine* 1999; 5:1359-1364.
- 52. Fishman IJ, Flores FN, Scott FB, Spjut HJ, Morrow B:** Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *J Urol.* 1987; 138(5): 1291-1294
- 53. Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, Bensussan A, Le Bouteiller P:** Cutting edge: Soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol.* 2000; 164: 6100-6104.
- 54. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T:** Differential Distribution of Subchains of the Basement Membrane Components Type IV Collagen and Laminin among the Amniotic Membrane, Cornea, and Conjunctiva. *Cornea* 1999; 18(1): 73.

- 55. Futami H, Kodaira M, Furuta T, Hanai H, Kaneko E:** Pyoderma gangrenosum complicating ulcerative colitis: Successful treatment with methylprednisolone pulse therapy and cyclosporine. *J Gastroenterol.* 1998; 33 (3):408-411.
- 56. Gomes MF, dos Anjos MJ, Nogueira TO, Guimarães SA:** Histologic evaluation of the osteoinductive property of autogenous demineralized dentin matrix on surgical bone defects in rabbit skulls using human amniotic membrane for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001; 16(4): 563-571
- 57. Gorski JC, Jones DR, Wrighton SA, Hall SD:** Characterization of dextromethorphan N-demethylation by human liver microsomes. Contribution of the cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol.* 1994; 48(1): 173-182.
- 58. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA:** Fas Ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995; 270: 1189-1192.
- 59. Gris O, Güell JL, Lopez-Navidad A, Caballero F, Del Campo Z:** Application of the amniotic membrane in ocular surface pathology. *Ann Transplant.* 1999; 4(3-4): 82-84.
- 59. Gris O, Wolley-Dod C, GüellJL, Tresserra F, Lerma E, Corcostegui B, Adán A:** Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. *Ophthalmology* 2002; 109(3): 505-512.
- 60. Grisanti S:** Das Immunprivileg des Auges. *Ophthalmologe* 1998; 95: 124-135.
- 61. Güler R, Ercan MT, Ulutunçel N, Devrim H, Uran N:** Measurement of blood flow by ¹³³Xe clearance technique to grafts of amnion used in vestibuloplasty. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 35(4): 280-283
- 62. Guennoc AM, Corcia P Al-Najjar A, Bergemer-Fouquet AM, Lebranchu Y, de Toffol B, Autret A:** Cyclosporin-induced toxic neuromyopathy. *Rev Neurol.* 2005; 161(2): 221-223.
- 63. Haberal M, Oner Z, Bayraktar U, Bilgin N:** The use of silver nitrate-incorporated amniotic membrane as a temporary dressing. *Burns* 1987; 13: 159-163.
- 64. Haekel E:** *Generelle Morphologie der Organismen* 1866: 131.
- 65. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F:** Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19: 348-352.
- 66. Hasegawa M, Fujisawa H, Hayashi Y, Yamashita J:** Autologous amnion graft for repair of myelomeningocele: technical note and clinical implication. *J Clin Neurosci.* 2004; 11(4):408-411.
- 67. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM:** Isolation and characterization of human -Defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* 2001; 276(8): 5707-5713.

- 68. Hayden-Martinez K, Kane LP, Hedrick SM:** Effects of a constitutively active form of calcineurin on T-cell activation and thymic selection. *J Immunol.* 2000; 165:3713-3721.
- 69. Heering P, Kutkuhn B, Kreuzpaintner G, Reinhard T, Sundmacher R, Grabensee B:** Untersuchungen zur Nierenfunktion nierengesunder Patienten unter Ciclosporin. *Klin Wochenschr.* 1991; 69: 880-886.
- 70. Heiligenhaus A, Bauer D, Meller D, Steuhl KP, Tseng SCG:** Improvement of HSV-1 Necrotizing Heratitis with Amniotic Membrane Transplantation. *Invest Ophthal Vis Sci.* 2001; 1969-1974.
- 71. Heiligenhaus A, Li FH, Yang Y, Wasmuth S, Steuhl KP, Bauer D:** Transplantation of amniotic membrane in murine herpes stromal keratitis modulates matrix metalloproteinases in the cornea. *IVOS* 2005; 46: 4079-4085.
- 72. Hennebichler S, Reichl B, Gabriel C, Eibl J, Redl H:** The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank.* 2007; 8: 1-8.
- 73. Herendael van BJ, Oberti C, Brosens I:** Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynaecol.* 1978; 15;131(8):872-880.
- 74. Hermans MHE:** Clinical experience with glycerol-preserved donor skin treatment in partial thickness burns. *Burns* 1989; 15(1): 57-59
- 75. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH:** Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect. Immun.* 1996; 64: 4250–4254.
- 76. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K:** Hyaluronic acid-CD4 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea* 2005; 25: 715-721.
- 77. Hijazi Y, Boulieu R:** Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 isoforms to N-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug metab dispos.* 2002; 30(7): 853-858.
- 78. Houlihan JM, Biro PA, Harper HM, Jenkinson HJ, Holmes CH:** The human amnion is a site of MHC class Ib expression: Evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. *J Immunol.* 1995; 154: 5665-5674.
- 79. Iijima K, Igawa Y, Imamura T, Moriizumi T, Nikaido T, Konishi I, Nishizawa O:** Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats. *Tissue Eng.* 2007; 13(3): 513-524.
- 80. Ivekovic R, Tedeschi-Reiner E, Novak-Laus K, Andrijevic-Derk B, Cima I, Mandic Z:** Limbal graft and/or amniotic membrane transplantation in the treatment of ocular burns. *Ophthalmologica* 2005; 219(5): 297-302.

- 81. Jain S und Rastogi A:** Evaluation of the outcome of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in symblepharon. *Eye* 2004; 18(12): 1251-1257.
- 82. Jin CZ, Park SR, Choi BH, Lee KY, Kang CK, Min BH:** Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng.* 2007; 13(4): 693-702.
- 83. Jorga A, Holt DW, Johnston A:** Therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplantation Proceedings* 2004; 36(2): 396-403.
- 84. Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, Itakura T:** Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res.* 2003; 980(1): 48-56.
- 85. Kay EP, Lee MS, Seong GJ, Lee YG:** TGF-betas stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts. *Curr Eye Res.* 1998; 17: 286-293.
- 86. Kelly P und Kahan BD:** Review: Metabolism of Immunspressant Drugs. *Curr Drug Metabolism* 2002; 3: 275-287.
- 87. Kerschbaumer A:** Es war einmal ... rund 100 Jahre nach der Kreuzigung des Jesus von Nazareth in Rom. *Österreichische Hebammenzeitung* . 1999; 5;2/99.
- 88. Khalil N:** TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect.* 1999; 1: 1255–1263.
- 89. Khalil N, Xu YD, O'Connor R, Duronio V:** Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK. *J Biol Chem.* 2005; 280: 43000-43009.
- 90. Kheirkhah A, Johnson DA, Paranjpe DR, Raju VK, Casas V, Tseng SC:** Temporary sutureless amniotic membrane patch for acute alkaline burns. *Arch Ophthalmol.* 2008; 126(8): 1059-1066.
- 91. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon DR, Dowling JE:** Adhesion of regenerating corneal epithelium. The role of basement membrane. *Am J Ophthalmol.* 1968; 65: 339-348.
- 92. Kim HS, Cho JH, Park HW, Yoon H, Kim MS, Kim SC:** Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta. *J Immunol.* 2002; 168: 2356-2364.
- 93. Kim HS, Yoon H, Minn I, Park CB, Lee WT, Zasloff M, Kim SC:** Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic Histone H2A to strong antimicrobial peptide Buforin. *J Immunol.* 2000; 165: 3268-3274.
- 94. Kim SG, Jong HS, Kim TY, Lee JW, Kim NK, Hong SH, Bang YJ:** Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Mol Biol Cell.* 2004; 15: 420-434.

- 95. Kjaergaard N, Heind M, Hyttelb L, Helmigc RB, Schönheyderb HC, Uldbjergd N, Madsen H:** Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001; 94(2): 224-229.
- 96. Kjaergaard N, Helmig RB, Schönheyder HC, Uldbjerg N, Hansen ES, Madsen H:** Chorioamniotic membranes constitute a competent barrier to group b streptococcus in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999; 83(2): 165-169.
- 97. Kluckhuhn C:** Die Eier nach Blut. *zm.* 2007; 97; 7: 32-39 .
- 98. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S:** Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000; 20(3): 173-177.
- 99. Koppel C, Arndt I, Ibe K:** Effects of enzyme induction, renal and cardiac function on ketamine plasma kinetics in patients with ketamine long-term analgosedation. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1990; 15: 259-263.
- 100. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE:** Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Der Ophthalmologe* 1998; 95 (2): 114-9.
- 101. Kruse HA, Bechrakis NE, Heimann H, Diamantstein T, Hoffmann F:** Specific immunosuppressive therapy by monoclonal antibodies on rejection of orthoptic corneal allogenic grafts in rats. *IVOS* 1991; 32: 1119.
- 102. Kubányi E:** Anzeigen der Amnionmembran. *Zentralblatt für Chirurgie* 1959; 6: 223-27.
- 103. Kubányi E:** Verhinderung von neuerlichen, zu Ileus führenden Adhäsionen durch Transplantation von sterilem und durch Tiefkühlung aufbewahrtem Amnion. *Zentralblatt für Chirurgie* 1955; 5: 189-94.
- 104. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M:** Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *IVOS* 2001; 42: 1539-1546.
- 105. Land W:** Optimal use of Sandimmun in organ transplantation. Springer Berlin, Heidelberg, New York 1986; Vols. 7-24.
- 106. Langmann J:** *Medical Embryology* 1970.
- 107. Laurema A, Vanamo K, Heikkilä A, Riekkinen M, Heinonen S, Ylä-Herttuala S:** Fetal membranes act as a barrier for adenoviruses: gene transfer into exocoelomic cavity of rat fetuses does not affect cells in the fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190(1): 264-7.
- 108. Laurin M und RR Reisz:** A new perspective on tetrapod phylogeny. London: Academic press. 1997; 9-59.
- 109. Laurin M, RR Reisz, M Girondot:** Caecilian viviparity and amniote origins: a reply to Wilkinson and Nussbaum. *Journal of Natural History* 2000; 34: 311-315.

- 110. Le Bouteiller P, Solier C, Pröll J, Aguerre-Girr M, Fournel S, Lenfant F:** Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update* 1999; 5(3):223-233.
- 111. Le Drean E, Vely F, Olcese L, Cambiaggi A, Guia S, Krystal G, Gervois N, Moretta A, Jotereau F, Vivier E:** Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 264-276.
- 112. Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED, Rouas-Freiss N:** HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol.* 1999; 11(8): 1351-1356.
- 113. Lee SB, Li DQ, Tan DT, Meller DC, Tseng SC:** Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000; 20(4): 325-334.
- 114. Letterio JJ, Roberts AB:** TGF- β regulation of immune responses. *Ann Rev Immunol.* 1998; 16:137- 161.
- 114. Li W, He H, Chen YT, Hayashida Y, Tseng SC:** Reversal of myofibroblasts by amniotic membrane stromal extract. *J Cell Physiol.* 2008; 215 (3): 657 - 664.
- 115. Li W, He H, Kawakita T, Espana EM, Tseng SC:** Amniotic membrane induces apoptosis of interferon-gamma activated macrophages in vitro. *Exp Eye Res.* 2006; 82(2): 282-292.
- 116. Lin SD, Lai CS, Hou MF, Yang CC:** Amnion overlay meshed skin autograft. *Burns* 1985; 11: 374-78.
- 117. Loertscher R, Blier L, Steinmetz O, Nohr C:** The utility of cyclosporine weaning in renal transplantation. *Ann Surg.* 1992; 215(4): 368–376.
- 118. Lucini D, Milani RV, Ventura HO, Mehra MR, , Messerli FH, Murgio JP, Regenstein F, Copley B, Malliani A, Pagani M:** Cyclosporine-induced hypertension: Evidence for maintained baroreflex circulatory control. *J Heart Lung Transplant.* 1997; 16(6): 615-20.
- 119. Lucini D, Milani RV, Ventura HO, Mehra MR, Messerli FH, Pagani M:** Study of arterial and autonomic effects of cyclosporine in humans. *Hypertension.* 2000; 35(6): 1258-63.
- 120. Ludwig H:** Surface structure of the human term placenta and of the uterine wall post partum in the screen scan electron microscope. *Am J Obstet Gynecol.* 1971; 1;111(3):328-44.
- 121. Ma X und Li J:** Corneal neovascularization suppressed by TIMP2 released from human amniotic membranes. *Eye Science* 2005; 21(1): 56-61.

- 122. Mahgoub MA, Ammar A, Fayez M, Edris A, Hazem A, Akl M, Hammam O:** Neovascularization of the amniotic membrane as a biological immune barrier. *Transplant Proc.* 2004; 36(4): 1194-98.
- 123. Manger K, Kalden JR, Manger B:** Cyclosporin A in the treatment of systemic lupus erythematosus: results of an open clinical study. *Br J Rheumatol.* 1996; 35(7): 669-75.
- 124. Maral T, Borman H, Arslan H, Demirhan B, Akinbingol G, Haberal M:** Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns* 1999; 25(7): 625-35.
- 125. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Ehrlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Hurley CK, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Trowsdale J:** Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 2004; 65(4): 301-369.
- 126. Marsh SGE:** Nomenclature for factors of the HLA system, update. *Tissue Antigens* 2006; 68(6):537-539.
- 127. Marshall L, Ghosh MM, Boyce SG, MacNeil S, Freeland E, Kudesia G:** Effects of glycerol on intracellular virus survival: implications for the clinical use of glycerol- preserved cadaver skin. *Burns* 1995; 21:356-361.
- 128. Mejía LF, Acosta C, Santamaría JP:** Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of ocular surface. *Cornea* 2000; 19(3): 288-291.
- 129. Meller D und Tseng SC:** Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *IVOS* 1999; 40: 878-886.
- 130. Mencucci R, Menchini U, Dei R:** Antimicrobial activity of antibiotic-treated amniotic membrane: An in vitro study. *Cornea* 2006; 25(4): 428-431.
- 131. Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, Cairey-Remonnay S, Maddens S, Riethmuller D, Tiberghien P, Humbert P, Aubin F:** Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2007; 15(4): 459-464
- 132. Mhaskar R:** Amniotic membrane for cervical reconstruction. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005; 90(2): 123-7.
- 133. Modesti A, Scarpa S, D'Orazi G, Simonelli L, Caramia FG:** Localization of Type IV and V Collagens in the Stroma of Human Amnion. *Prog Clin Biol Res.* 1989; 296: 459-463.
- 134. Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, Shenaq S:** Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 105(2): 660-66.

- 135. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono C, Nakamura T, Shimizu Y, Kinoshita S:** Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: A useful substrate for ocular surface reconstruction. *IVOS* 2004; 45: 93-99.
- 136. Newton I:** *Philosophiae naturalis principia mathematica* 1687.
- 137. Olivari MT, Antolick A, Ring WS:** Arterial hypertension in heart transplant recipients treated with triple-drug immunosuppressive therapy. *J Heart Transplant.* 1989; 8(1): 34-39.
- 138. O'Reilly MS Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J:** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-285.
- 139. Oschmann W:** Evolution und Sterben der Dinosaurier. *Nova acta Leopoldina.* 2006; 93; 345: 117-143.
- 140. Oxlund H und Helmrig R:** Biochemical analysis of human chorioamniotic membranes. *Eur j obstet gynecol Reprod Biol.* 1990; 34(3): 247-55.
- 141. Park WC und Tseng SCG:** Modulation of Acute Inflammation and Keratocyte Death by Suturing, Blood, and Amniotic Membrane in PRK. *IVOS* 2000; 41:2906-2914.
- 142. Phan SH:** The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 2002; 122: 286-289.
- 143. Pollard SM, NN Aye, EM Symonds:** Scanning electron microscope appearance of normal human amnion and umbilical cord at term. *Br J Obstet Gynaecol.* 1976; 83(6): 470-477.
- 144. Porayko MK, Textor SC, Krom RA, Hay JE, Gores GJ, Richards TM, Crotty PH, Beaver SJ, Steers JL, Wiesner RH:** Nephrotoxic effects of primary immunosuppression with FK-506 and cyclosporine regimens after liver transplantation. *Mayo Clin Pro.* 1994; 69(2): 105-111.
- 145. Prabhasawat P, Tesavibul N, Komolsuradej W:** Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *Br. J. Ophthalmol.* 2001; 85: 1455-1463
- 146. Quinby WC, Hoover HC, Scheflan M, Walters PT, Slavin SA, Bondoc CC:** Clinical trials of amniotic membranes in burn wound care. *Plast Reconstr Surg.* 1982; 70(6): 711-717
- 147. Rahimi RA und Leof EB:** TGF- signaling: A tale of two responses. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007; 102(3): 593-608.
- 148. Ramakrishnan KM und Jayaraman V:** Management of partial-thickness burn wounds by amniotic membrane: a cost-effective treatment in developing countries. *Burns* 1997; 23: 33-36 .

- 149. Rao TV und Chandrasekharam V:** Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing. Arch surg. 1981; 116: 891-906.
- 150. Ravishanker R, Bath AS, Roy R:** "Amnion Bank"- the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial partial thickness burns. Burns 2003; 29(4): 369-74.
- 151. Rejzek A, Weyer F, Eichberger R, Gebhart W:** Physical changes of amniotic membranes through glycerolization for the use as an epidermal substitute. Light and electron microscopic studies. Cell and Tissue Banking 2001; 2: 95-102.
- 152. Resch MD, Schloetzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, Sauer R:** Adhesion structures of amniotic membranes integrated into human corneas. IVOS 2006; 47;5: 1853-1861.
- 153. Rhee MK und Mootha VV:** Bilateral keratoconjunctivitis associated with lichen planus. Cornea 2004; 23(1): 100-5.
- 154. Rinastiti M, Harijadi, Santoso AL, Sosroseno W:** Histological evaluation of rabbit gingival wound healing transplanted with human amniotic membrane. Int J Oral Maxillofac Surg. 2006; 35(3): 247-251
- 155. Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, Sedlik C, Dausset J, Rouas-Freiss N, Carosella ED:** HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. J Reprod Immunol. 1999; 43(2): 203-211.
- 156. Robson MC und Krizek TJ:** The effect of human amniotic membranes on bacteria population of infected rat burn. Ann Surg. 1973; 177: 144-149.
- 157. Romanoff AL:** The avian embryo: structural and functional development. – Macmillian New York 1960; 16: 1305
- 158. Rooney IA, Morgan BP:** Characterization of the membrane attack complex inhibitory protein CD59 antigen on human amniotic cells and in amniotic fluid. Immunology 1992; 76(4): 541-547.
- 159. Rosendal F, Bjarkam CR, Larsen M, Hansen HE, Madsen M, Sørensen JC, Mortensen J:** Does chronic low-dose treatment with cyclosporine influence the brain? A histopathological study in pigs. Transplant Proc. 2005; 37(8): 3305-3308.
- 160. Sabella N:** Use of the fetal membrane in skin grafting. Med Rec N Y. – 1913; 83: 478-480.
- 161. Saika S, Kono-Saika S, Ohnishi Y, Sato M, Muragaki Y, Ooshima A, Flanders KC, Yoo J, Anzano M, Liu CY, Kao WW, Roberts AB:** Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. Am J Pathol. 2004; 164: 651-663.
- 162. Sakuragawa N, Elwan MA, Uchida S, Fujii T, Kawashima K:** Non-neuronal neurotransmitters and neurotrophic factors in amniotic epithelial cells: expression and function in humans and monkey. Jpn J Pharmacol. 2001; 85(1): 20-23.

- 163. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I:** Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett.* 1996; 209(1): 9-12.
- 164. Samandari MH, Yaghmaei M, Ejlali M, Moshref M, Saffar AS:** Use of amnion graft material in vestibuloplasty: a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(5): 574-578
- 165. Sato H, Shimazaki J, Shinozaki N:** Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. *IVOS* 1998; 39: 428.
- 166. Scaggiante B und Pineschi A:** Successful therapy of Niemann-Pick disease by implantation of human amniotic membrane. *Transplantation.* 1987; 44(1): 59-61.
- 167. Scherrer U, Vissing SF, Morgan BJ, Rollins JA, Tindall RS, Ring S, Hanson P, Mohanty PK, Victor RG:** Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J Med.* 1990; 323(11): 693-9.
- 168. Schrader S, Wedel T, Kremling C, Laqua H, Geerling G:** Amniotic membrane as a carrier for lacrimal gland acinar cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007; 245(11): 1699-1704.
- 169. Scott MG und Hancock RE:** Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol.* 2000; 20: 407.
- 170. Seomun Y und CK Joo:** Lumican induces human corneal epithelial cell migration and integrin expression via ERK 1/2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 372(1): 221-225.
- 171. Shafit-Zagardo B und N Kalcheva:** Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron. *Mol Neurobiol.* 1999; 16(2): 149–62.
- 172. Shao C, Sima J, Zhang SX, Jin J, Reinach P, Wang Z, and Ma JX:** Suppression of Corneal Neovascularization by PEDF Release from Human Amniotic Membranes. *IVOS* 2004; 45: 1758-1762.
- 173. Sheppard BL und J Bonnar:** Scanning electron microscopy of the human placenta and decidual spiral arteries in normal pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1974; 81(1): 20-29.
- 174. Shimonkevitz R, Colon S, Kappler JW, Marrack P, Grey HM:** Antigen recognition by H-2-restricted T cells. II. A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen. *J Immunol.* 1984; 133(4): 2067-2074.
- 175. Shugars DC, Alexander AL, Fu K, Freel SA:** Endogenous salivary inhibitors of human immunodeficiency virus. *Oral Biol.* 1999; 3: 70-72.
- 176. Siennicka A, Pecold-Stepniewska H, Czajka M:** Transplantation of amniotic membrane for patients with bullous keratopathy and chemical and thermal burns. *Klin Oczna.* 2003; 105(1-2): 41-45.

- 177. Singh R, Purohit S, Chacharkar M, Bhandari P, Bath A:** Microbiological safety and clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membranes for treatment of second-degree burns. *Burns* 2006; 33(4): 505-510.
- 178. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SCG:** Suppression of interleukin 1 and interleukin 1 in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85: 444-449.
- 179. Solomon A, Wajngarten M, Alviano F, Anteby I, Elchalal U, Pe'er J, Levi-Schaffer F:** Suppression of inflammatory and fibrotic responses in allergic inflammation by the amniotic membrane stromal matrix. *Clinical & Experimental Allergy* 2005; 35(7): 941–948.
- 180. Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H, et al.:** Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol.* 1991; 113: 907-917.
- 181. Sorsby A und Symmons HM:** Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns second degree). *Br J Ophthalmol.* 1946; 30: 337-345.
- 182. Stähelin HF:** The history of cyclosporin A (Sandimmune®) revisited: Another point of view. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1996; 52(1): 5-13.
- 183. Stern M:** The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated surfaces, substituting skin grafts. *JAMA* 1913; 60: 973-974.
- 184. Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA:** Natural antimicrobial production by the amnion. 2007; 196(3): 255-256.
- 185. Stoiber J, Ruckhofer J, Muss W, Grabner G:** Amniotic membrane transplantation with limbal stem cell transplantation as a combined procedure for corneal surface reconstruction after severe thermal or chemical burns. *Ophthalmologie* 2002; 99(11): 839-848.
- 186. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S:** Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cel* 1993; 75: 1169-1178.
- 187. Takahashi H, Igarashi T, Fujimoto C, Ozaki N, Ishizaki M:** Immunohistochemical observation of amniotic membrane patching on corneal alkali burn in vivo. *Jpn J Ophthalmol.* 2007; 51(1): 3-9
- 188. Takashima S, Yasuo M, Sanzen N, Sekiguchi K, Okabe M, Yoshida T, Toda A, Nikaido T:** Characterization of laminin isoforms in human amnion. *Tissue Cell* 2008; 40(2): 75-81.
- 189. Tolhurst DE, van der Helm TW:** The treatment of vaginal atresia. *Surg Gynecol Obstet.* 1991; 172(5): 407-414.

- 190. Tomee JFC, Hiemstra PS, Heinzl-Wieland R, Kauffman HF:** Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *J Infect Dis.* 1997; 176: 740-747.
- 191. Tosi GM, Traversi C, Schuerfeld K, Mittica V, Massaro-Giordano M, Tilanus MA, Caporossi A, Toti P:** Amniotic membrane graft: histopathological findings in five cases. *J Cell Physiol.* 2005; 202(3): 852-857.
- 192. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D:** Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol.* 1998; 116(4): 431-441.
- 193. Tseng SCG, Li DQ, Ma X:** Suppression of Transforming Growth Factor-Beta Isoforms, TGF- β Receptor Type II, and Myofibroblast Differentiation in Cultured Human Corneal and Limbal Fibroblasts by Amniotic Membrane Matrix. *J Cell Physiol.* 1999; 179: 325-335.
- 194. Uchida S, Inanga Y, Kobayashi M, Hurukuwa S, Araie M, Sakuragawa N:** Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithel cells. *J Neurosci Res.* 2000; 62: 585-92.
- 195. Vishwakarma GK und AK Khare:** Amniotic arthroplasty for tuberculosis of the hip. A preliminary clinical study. *J Bone Joint Surg Br.* 1986; 68(1): 68-74.
- 196. von Versen-Hoyneck F, Syring C, Bachmann S, Moller DE:** The influence of different preservation and sterilization Steps on the histological properties of amnion allografts-light and scanning electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank* 2004; 5: 45-56.
- 197. Walter JH, Goss LR, Lazzara AT:** Amniotic band syndrome. *J Foot Ankle Surg.* 1998; 37(4):325-33.
- 198. Wang M, Yoshida A, Kawashima H, Ishizaki M, Takahashi H, Hori J:** Immunogenicity and anigenicity of allogenic amniotic epithelial transplants grafted to the cornea, conjunctiva and anterior chamber. *IVOS* 2006; 47: 1522-1532.
- 199. Watkins PB:** The role of cytochromes P-450 in cyclosporine metabolism. *J Am Acad Dermatol.* 1990; 23: 1301-1311.
- 200. Webster A, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC:** Tacrolimus versus cyclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipient. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; 4: CD003961.
- 201. Wencan W, Mao Y, Wentao Y, Fan L, Jia Q, Qinmei W, Xiangtian Z:** Using basement membrane of human amniotic membrane as a cell carrier for cultivated cat corneal endothelial cell transplantation. *Curr Eye Res.* 2007; 32 (3): 199-215.
- 202. White PF, Way WL, Trevor AJ:** Ketamine-its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology* 1982; 56: 119-136.

203. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM: SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clinical Science* 2006; 110: 21–35.

204. Wolff KD, Dienemann D, Hoffmeister B: Intraoral defect coverage with muscle flaps. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995; 53(6): 680-686.

205. Yeh LK, Chen WL, Li W, Espana EM, Ouyang J, Kawakita T, Kao WW, Tseng SC, Liu CY: Soluble lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46(2): 479-86.

206. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M: A cell-killing monoclonal antibody (Anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med,* 1989: 169:1747-1756

6. Anhang

1. PBS Lösung:

NaCl 8g

KCl 0,2g

Na₂HPO₄ 1,44 g

KH₂PO₄ 0,24 g

H₂O 1l

2. PBS-T Lösung:

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na₂HPO₄ 1,44 g

KH₂PO₄ 0,24g

H₂O 1l

0,1 % Tween® 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)

3. Narkosetabelle

Chloralhydrat-Narkose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD) in einer Dosierung von 370 mg/kg Körpergewicht

Narkose: Ketamin (100 mg / kg KG i.p.) und Xylazin (8 mg / kg KG i.p.)

Narkoseverlängerung: 25 mg / kg KG Ketamin i.p.

Um das Injektionsvolumen zu erhalten wurden näherungsweise zwei I.U. Rompun® (Xylazin 0,2 %, Bayer, Lerverkusen, BRD) mit dem errechneten Ketamin 500- (Ratiopharm, BRD) Volumen in der o.g. angegebenen Dosierung in einer Insulinspritze aufgezogen und i.p. appliziert.

Die Narkoseverlängerung erfolgte mit 0,24 ml Ketamin 500.

Körpergewicht [g]	Ketamin [mg]	Ketamin [ml]	Ketamin-ratio [Einheiten/Units]
200	20	0,4	16
220	22	0,44	18
240	24	0,48	19
260	26	0,52	21
280	28	0,56	22
300	30	0,6	24
320	32	0,64	25
340	34	0,68	27
360	36	0,72	29
380	38	0,76	30
400	40	0,8	31
420	42	0,84	33
440	44	0,88	34
460	46	0,92	36
480	48	0,96	37
500	50	1	40

7. Danksagung

Eine tierexperimentelle Arbeit zu verfassen, setzt ein hohes Maß an Verantwortung voraus. Denn Lebewesen für den Erhalt des menschlichen Lebens zu töten, ist nicht immer notwendig. Die Grenze schwimmt zu leicht zwischen Erforderlichen und durch Entwicklung adäquater Alternativen Vermeidbaren. Gerade wir als Mediziner haben uns dem Erhalt des Lebens gewidmet und verschrieben. Umso mehr möchte ich mich bei der Ethikkommission bedanken, die mir die Entscheidung und die Verantwortung ein Lebewesen zu töten abgenommen hat und damit aber gleichzeitig die Wichtigkeit dieser tierexperimentellen Arbeit vor Augen geführt und mich damit in die Verantwortung genommen hat, diese gewissenhaft und erfolgreich zu beenden.

Ich möchte mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Klaus-Dietrich Wolff für die Themenstellung und Hilfsbereitschaft bei Abschluss dieser Arbeit herzlich bedanken.

Mein großer Dank gilt vor allem Dr. med. Dr. dent. Marco Kesting, der mich über die ganze! Zeit betreut und immer hilfsbereit zur Seite stand.

Desweiteren möchte ich mich bei Junior Prof. Dr. med. Steinsträsser für die Bereitstellung seines Labors und die Aufnahme in sein Team bedanken.

Frau Gerhards möchte ich für die Unterstützung in der Laborarbeit danken und

Frau Rummelt für die Einführung in die Präparation und Konservierung der Amnionmembran.

Meiner Freundin Nuran danke ich für ihre Liebe und Geduld meine körperliche als auch geistige Abwesenheit in der Dissertationsendphase toleriert zu haben.

Schließlich möchte ich meiner Familie für ihre Liebe und Unterstützung Dank sagen.

10. Lebenslauf

Name	Cédric Rémi Dieter Demtröder
Geburtstagdatum	26.11.1979
Geburtsort	Witten
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

August 1986 – Juli 1989	Hüllbergschule Witten
August 1990 – Juni 1998	Schiller Gymnasium Witten

Zivildienst

Oktober 1998 – Nov. 1999	Marien - Hospital Witten, Pflegedienst
--------------------------	--

Beruf/ Praktikum

Dezember 1999 – Jan. 2000	Evangelische Krankenhaus Witten, Praktikum
April 2000 – Sept. 2000	Ambulante Krankenpflege Bochum, Intensivpflege
Oktober 2007 – März 2011	Assistenzarzt in der viszeralchirurgischen Ausbildung am akademischen Lehrkrankenhaus EVK-Herne der Universität Duisburg-Essen, Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Referenzzentrum für Koloproktologie und minimal - invasive Chirurgie
Seit April 2011	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Studium

Oktober 2000 – Juni 2007	Medizinische Fakultät der Ruhr - Universität Bochum
August 2002	Physikum (Note: gut)
August 2003	1. Staatsexamen (Note: befriedigend)
September 2005	2. Staatsexamen (Note: gut)
Juni 2007	3. Staatsexamen (Note: sehr gut)

Nebentätigkeiten/ Famulaturen

August 2001 – Juli 2002	Intensivstation St. Elisabeth - Hospital Bochum, Pflege
Oktober 2002 – Aug. 2004	Pathologisches Institut Dr. Lawerenz Witten, Assistenz
April 2005 – Aug. 2005	Betreuung behinderter Studenten an der Ruhr- Universität Bochum
Februar 2003	Seminar Innere Medizin Herz - Kreislauf – Zentrum, Gernsbach
März 2003 – April 2003	Marien - Hospital Witten, Innere/ Kardiologie
Februar 2004 – März 2004	Marien - Hospital Witten, Chirurgie
März 2004 – April 2004	Klinikum Dortmund, Klinik für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie, Ambulanz
August 2004 – Sept. 2004	University of Santo Tomas Hospital, Manila Philippinen, Surgery
September 2004 – Okt. 2004	University of Santo Tomas Hospital, Family/ Community Medicine

Praktisches Jahr

April 2006 – Aug. 2006	Augusta Krankenanstalt Bochum, Innere Medizin
Juli 2006 – Dez. 2006	Augusta Krankenanstalt Bochum, Chirurgie

Dezember 2006 – März 2007 Bergmannsheil Bochum, Universitätsklinik für
Plastische Chirurgie und
Schwerbrandverletzte, Handchirurgiezentrum,
operatives Referenzzentrum für
Gliedermaßentumore

Dissertation/ Qualifikationen

Seit November 2006 “Experimentelle Untersuchungen zur
Immunogenität xenogen transplantierte
kryopreservierter humaner Amnionmembran
auf Bauchwandmuskulatur von
Sprague - Dawley Ratten in Mono- und
Multilayer- Technik” an der Klinik und
Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der
Isar der technischen Universität München

SS 2004 Kursus “Einführung in mikrochirurgische
Techniken für Interessierte mit praktischen
Übungen” an der Neurochirurgischen
Universitätsklinik Knappschafts-
krankenhaus Langendreer

Juli 2007 Aktive Hilfe beim First European Course of
microsurgical Creation and Clipping of
Aneurysms, Betreuung der tierexperimentellen
Versuchsdurchführung und Anästhesie der
Labortiere, Prof. Dr. M. Scholz,
Neurochirurgische Klinik der
Universitätsklinik Knappschaftskrankenhaus
Bochum-Langendreer

Sprachen Englisch und Französisch

Interessen/ Hobbies Segeln, Schwimmen, Pfadfinderleiter