

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Arbeit angefertigt unter Leitung von Univ.-Prof. Dr. Dr. Karl Heinritzi

---

**Deckung porciner Spalthautentnahme-Defekte  
mit verschiedenen Biomaterialien**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ute Maria Berta Halfmann  
aus Riedlingen

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. K. Heinritzi  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. R. Müller

Tag der Promotion:  
30.07.2011

Meinen Eltern

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Die Haut</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Aufbau der Haut.....	3
2.1.1.1	Epidermis .....	3
2.1.1.2	Korium .....	4
2.1.2	Funktionen der Haut .....	4
2.1.3	Das Schwein als Wundheilungs-Modell in der Humanmedizin .....	5
<b>2.2</b>	<b>Wundheilung</b> .....	<b>7</b>
2.2.1	Formen der Wundheilung .....	7
2.2.1.1	Primärheilung - Sanatio per primam intentionem .....	7
2.2.1.2	Sekundärheilung - Sanatio per secundam intentionem .....	8
2.2.1.3	Heilung unter Schorf .....	8
2.2.2	Physiologie und Phasen der Wundheilung .....	8
2.2.2.1	Exsudationsphase .....	9
2.2.2.2	Demarkation .....	10
2.2.2.3	Reparationsphase.....	11
2.2.2.3.1	Kollagenbildung .....	11
2.2.2.3.2	Angiogenese .....	12
2.2.2.3.3	Epithelisierung .....	13
2.2.2.3.4	Wundkontraktion.....	14
2.2.2.4	Reifungsphase .....	14
2.2.3	Wundheilungsstörungen .....	15
<b>2.3</b>	<b>Allgemeines zur Hauttransplantation</b> .....	<b>16</b>
2.3.1	Klassifikation .....	16
2.3.1.1	Flap (Gewebelappen) .....	16
2.3.1.2	Graft (Transplantat).....	17
2.3.2	Physiologie und Voraussetzungen für die Hauttransplantation.....	18
<b>2.4</b>	<b>Einsatz verschiedener Gewebe zur Wundheilungsförderung</b> .....	<b>19</b>
2.4.1	Die Amnionmembran.....	19
2.4.1.1	Struktur und Aufbau .....	19
2.4.1.1.1	Anatomisch.....	19
2.4.1.1.2	Histologisch.....	19
2.4.1.2	Zusammensetzung der extrazellulären Matrix .....	20
2.4.1.3	Eigenschaften der Amnionmembran .....	21
2.4.1.3.1	Mechanische Eigenschaften .....	21
2.4.1.3.2	Reepithelialisierung.....	21
2.4.1.3.3	Einfluss auf die Analgesie.....	21
2.4.1.3.4	Einfluss auf die Entzündungsreaktion.....	22
2.4.1.3.5	(Anti-)Angiogenese .....	22

---

2.4.1.3.6	Permeabilität.....	22
2.4.1.3.7	Immunogenität .....	23
2.4.1.3.8	Antimikrobielle Wirkung .....	23
2.4.1.4	Anwendung der Amnionmembran in der Medizin .....	23
2.4.2	Porcine „Small Intestine Submucosa“ .....	24
2.4.2.1	Struktur und Aufbau .....	24
2.4.2.2	Eigenschaften der „Small Intestine Submucosa“ .....	24
2.4.2.2.1	Mechanische Eigenschaften .....	24
2.4.2.2.2	Immunogenität .....	24
2.4.2.2.3	Antimikrobielle Wirkung .....	25
2.4.2.2.4	Angiogenese .....	25
2.4.2.3	Anwendung der SIS in der Medizin .....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Gruppeneinteilung .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>Kaiserschnitt (Sectio caesarea) .....</b>	<b>28</b>
3.3.1	Anästhesie, Analgesie und Antibiose .....	28
3.3.2	Reinigung und Desinfektion des Muttertieres .....	28
3.3.3	Durchführung der Sectio caesarea und Gewinnung des Amnions.....	29
<b>3.4</b>	<b>Aufbereitung des Amnions.....</b>	<b>30</b>
3.4.1	Herstellung des Konservierungsmediums.....	30
3.4.2	Kryokonservierung der Amnionmembran .....	30
<b>3.5</b>	<b>Setzung des Hautdefektes.....</b>	<b>31</b>
3.5.1	Durchführung.....	31
3.5.2	Nachsorge .....	33
<b>3.6</b>	<b>Photodokumentation und Probengewinnung.....</b>	<b>33</b>
<b>3.7</b>	<b>Finalisierung.....</b>	<b>34</b>
<b>3.8</b>	<b>Histologische Aufarbeitung.....</b>	<b>34</b>
<b>3.9</b>	<b>Histologische Auswertung .....</b>	<b>34</b>
<b>3.10</b>	<b>Immunhistologie.....</b>	<b>35</b>
3.10.1	$\alpha$ -Smooth-Muscle Actin .....	36
3.10.2	von Willebrand Faktor .....	38
3.10.3	Ki-67 .....	40
3.10.4	Laminin .....	42
<b>3.11</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>Histologische Beurteilung.....</b>	<b>45</b>
4.1.1	Qualitative Analyse.....	45

---

4.1.1.1	Gruppe I: Kontrollgruppe.....	45
4.1.1.2	Gruppe II: „Small Intestine Submucosa“ .....	47
4.1.1.3	Gruppe III: „Autologe Spalthaut“ .....	50
4.1.1.4	Gruppe IV: „Autofetales“ Amnion .....	53
4.1.1.5	Gruppe V: „Allogenes“ Amnion .....	55
4.1.2	Quantitative Analyse.....	58
4.1.2.1	Granulationsgewebsdicke.....	58
4.1.2.1.1	Vergleich innerhalb jeder Gruppe .....	58
4.1.2.1.2	Vergleich zwischen den Gruppen .....	59
4.1.2.2	Hautanhangsgebilde an Tag 90 .....	61
<b>4.2</b>	<b>Immunhistologie.....</b>	<b>62</b>
4.2.1	von Willebrand Faktor: Gefäßproliferation .....	62
4.2.1.1	Vergleich innerhalb jeder Gruppe .....	62
4.2.1.2	Vergleich zwischen den Gruppen .....	63
4.2.2	Ki-67: proliferative Zellen .....	65
4.2.2.1	Vergleich innerhalb jeder Gruppe .....	65
4.2.2.2	Vergleich zwischen den Gruppen .....	65
4.2.3	Aktin: Myofibroblasten.....	68
4.2.4	Laminin: Darstellung der Basalmembran .....	69
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>71</b>
<b>5.1</b>	<b>Histologische Beurteilung.....</b>	<b>71</b>
5.1.1	Qualitative Analyse.....	71
5.1.1.1	Gruppe I: Kontrollgruppe.....	73
5.1.1.2	Gruppe II: „Small Intestine Submucosa“ .....	73
5.1.1.3	Gruppe III: „Autologe Spalthaut“ .....	74
5.1.1.4	Gruppe IV: „Autofetales“ Amnion .....	75
5.1.1.5	Gruppe V: „Allogenes“ Amnion .....	76
5.1.2	Quantitative Analyse.....	78
5.1.2.1	Granulationsgewebsdicke.....	78
5.1.2.2	Hautanhangsgebilde an Tag 90 .....	79
<b>5.2</b>	<b>Immunhistologie.....</b>	<b>80</b>
5.2.1	von Willebrand Faktor: Gefäßproliferation .....	80
5.2.2	Ki-67: proliferative Zellen .....	81
5.2.3	Aktin: Myofibroblasten.....	82
5.2.4	Laminin: Darstellung der Basalmembran .....	83
<b>6</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG.....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>91</b>
<b>11</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>92</b>

---

**DANKSAGUNG ..... 109**

---

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb</b>	<b>Abbildung</b>
<b>Abs.</b>	<b>Absatz</b>
<b>AGF</b>	<b>angioblast growth factor</b>
<b>b-FGF</b>	<b>basic-fibroblast growth factor</b>
<b>cm</b>	<b>Zentimeter</b>
<b>ca.</b>	<b>circa</b>
<b>DAB</b>	<b>Diaminobenzidin</b>
<b>E.coli</b>	<b>Escherichia coli</b>
<b>EGF</b>	<b>epidermal growth factor</b>
<b>EvG</b>	<b>Elastica van Gieson</b>
<b>Fa.</b>	<b>Firma</b>
<b>HAG</b>	<b>Hautanhangsgebilde</b>
<b>HE</b>	<b>Hämatoxylin/Eosin</b>
<b>HGF</b>	<b>hepatocytic growth factor</b>
<b>HPF</b>	<b>High Power Fields</b>
<b>h</b>	<b>Stunde</b>
<b>IL-1</b>	<b>Interleukin-1</b>
<b>i.m.</b>	<b>intramuskulär</b>
<b>kg</b>	<b>Kilogramm</b>
<b>KGW</b>	<b>Körpergewicht</b>
<b>l</b>	<b>Liter</b>
<b>min</b>	<b>Minute</b>
<b>m</b>	<b>Meter</b>
<b>mg</b>	<b>Milligramm</b>
<b>mm</b>	<b>Millimeter</b>
<b>mmHg</b>	<b>Millimeter Quecksilber</b>
<b>NaCl</b>	<b>Natrium-Chlorid</b>
<b>PDGF</b>	<b>platelet derived growth factor</b>
<b>PBS</b>	<b>phosphate buffered saline</b>
<b>POT</b>	<b>postoperativer Tag</b>
<b>PRRS</b>	<b>porcine reproductive and respiratoric syndrome</b>



---

<b>SIS</b>	<b>Small Intestine Submucosa</b>
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	<b>transforming growth factor-<math>\alpha</math></b>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>transforming growth factor-<math>\beta</math></b>
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Mikrometer</b>
<b>unbeh.</b>	<b>unbehandelt</b>
<b>USP</b>	<b>Unique selling proposition</b>
<b>VEGF</b>	<b>vascular endothelial growth factor</b>
<b>VO</b>	<b>Verordnung</b>
<b>vWF</b>	<b>von Willebrand-Faktor</b>

---

## 1 Einleitung

Bei Kindern und Erwachsenen auftretende Gewebedefekte haben ihren Ursprung meist in angeborenen Fehlbildungen oder Brandverletzungen, welche einer möglichst schnellen und frühzeitigen operativen Versorgung bedürfen. In der plastischen und wiederherstellenden Chirurgie gilt die Hauttransplantation als unverzichtbare Methode, um größere chronische, posttraumatische oder iatrogene Hautdefekte zu schließen. Dennoch ist die Verwendung von regionärem autologem Gewebe zur Schließung des Defektes durch die begrenzte Mobilisation körpereigenen Gewebes limitiert. Derzeit werden vor allem alloplastische synthetische Materialien wie allogene und xenogene Membranen eingesetzt, welche allerdings kostenintensiv und sich als nur eingeschränkt biokompatibel erweisen.

1910 publizierte DAVIS erstmalig die Anwendung fetaler Membranen zur Unterstützung der Wundheilung bei einer Serie von 550 Patienten (DAVIS 1910). In den darauf folgenden Jahren wurden zunächst vor allem Brandwunden und ulzerierte Hautoberflächen mit nicht separiertem Amnion und Chorion als Hautersatz versorgt (SABELLA 1913; STERN 1913). Später fand dieses Material Anwendung bei der Auskleidung neu geschaffener Vaginen (BRINDEAU 1934). 1940 verwendete man erstmals chemisch aufbereitete humane Amnionmembran als so genanntes Amnioplastin zum Ersatz der Dura mater (CHAO et al. 1940; PENFIELD 1940). Des Weiteren wurde gekochtes Amnion als Wundauflage auf Ulzera verbracht (TROENSEGAARD-HANSEN 1950; TROENSEGAARD-HANSEN 1963). Heutzutage erstreckt sich die klinische Anwendung des Amnions vor allem bei der Rekonstruktion von Augenoberflächen. Diese Methode wurde bereits seit den 40er Jahren praktiziert (SORSBY und SYMONS 1946). Da zwischenzeitlich für dieses Verfahren infektiologische Bedenken gehegt wurden, kam es bis zu den 90er Jahren zu einer Art Ruhepause bei der Anwendung von Amnion, bis amerikanische Ophthalmologen ein Verfahren der Kryokonservierung entwickelten (LEE und TSENG 1997). Dadurch konnte eine längerfristige Aufbewahrung und Überprüfung der Membranen gesichert werden, was zu einer rasanten Entwicklung der Transplantation von Amnionmembranen zur Rekonstruktion okulärer Oberflächen führte (JOHN 2003; DUA et al. 2004). Mittlerweile wurden diverse Möglichkeiten der Konservierung von Amnionmembran entwickelt, wie etwa die Form der Glycerol-Konservierung (MARAL et al. 1999), die Sterilisation mittels  $\gamma$ -Strahlung (LEY-CHAVEZ et al. 2003) oder Lyophilisation (GAJIWALA und GAJIWALA 2004). Weiterhin

---

zeigen neuere Studien, dass die humane Amnionmembran auch zur chirurgischen Rekonstruktion in der Mundhöhle benutzt werden kann (LAWSON 1985; KESTING et al. 2010), was die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten des Amnions noch unterstreicht.

Bei der hier durchgeführten Untersuchung muss erwähnt werden, dass es sich hierbei um einen Abschnitt eines über 3 Jahre laufenden Gesamtprojektes handelt, das mittels ultrastruktureller, immunologischer und tierexperimenteller Untersuchungen die Anwendung „autofetaler“ und „allogener“ Amnionmembran in der rekonstruktiven Fehlbildungschirurgie erörtern will. Den innerhalb dieses Teilprojektes verwendeten 30 Tieren wurden neben dem in dieser Arbeit beleuchteten Hautdefekt unter anderem Defekte an Bauchwand und Gaumen gesetzt, um die jeweiligen wundheilungsfördernden Eigenschaften verschiedener Biomaterialien, mitunter von kryokonservierter „autofetaler“ und „allogener“ Amnionmembran zu beleuchten. Bei den Defekten handelt es sich um paravertebrale Spalthautentnahmedefekte, um abdominelle Defekte im Sinne iatrogenen Hernien und perforierende Gaumendefekte im Sinne oronasaler Fisteln. Bezüglich des Gaumendefektes sei auf die noch nicht abgeschlossene Dissertation von Frau Anne Nuber, Doktorandin an der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Technischen Universität München mit voraussichtlicher Promotion 2012 verwiesen.

Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung ist es, selbst gewonnene und im Anschluss kryokonservierte „autofetale“ sowie „allogene“ Amnionmembran, porcine „Small Intestine Submucosa“ und autologe Spalthaut bezüglich ihrer Wundheilung bei Auflage auf einen Spalthautdefekt untereinander, als auch mit einem nicht behandelten Spalthautdefekt zu vergleichen. Hierfür sollen im Speziellen sowohl qualitative, als auch quantitative Messungen durchgeführt und eruiert werden. Folgende Fragen stehen hierbei im Mittelpunkt des Interesses:

- Lassen sich qualitative Unterschiede hinsichtlich des generellen Wundheilungsverlaufs erkennen und wenn ja, worin bestehen diese?
- Lassen sich immunhistologisch Unterschiede bezüglich der Reepithelialisierung, der Zellproliferation, Neovaskularisation und Wundkontraktion und Vernarbung erkennen?

---

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Die Haut

Das größte Organ des Körpers bildet die Haut (POMAHAC et al. 1998; KANITAKIS 2002; HEWICKER-TRAUTWEIN 2007). Zusammen mit Haaren und Hautanhangsgebilden bildet sie eine funktionelle Gemeinschaft und dient als Barriere zwischen dem jeweiligen Individuum und seiner Umwelt (HABERMEHL 2005; BECKER und COERPER 2007; HEWICKER-TRAUTWEIN 2007; KIETZMANN 2007).

#### 2.1.1 Aufbau der Haut

Die Haut wird aus drei Schichten, der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis bzw. Korium) und der Unterhaut (Subkutis oder auch Tela subcutanea) gebildet (HEWICKER-TRAUTWEIN 2007; KIETZMANN 2007; YUAN et al. 2010). Die Epidermis kann grundsätzlich in zwei weitere Schichten unterteilt werden, das Stratum profundum und das Stratum superficiale (WEISS und TEIFKE 2007). Zum Stratum profundum gehören zwei weitere Schichten, das Stratum basale und das Stratum intermedium, wobei sich bei letzterem wiederum das Stratum spinosum und das Stratum granulosum differenzieren lassen. Das dem Stratum profundum folgende Stratum superficiale, zusammengesetzt aus dem Stratum lucidum und dem Stratum corneum, bildet die Grenze des Individuums zu seiner Umwelt (HEWICKER-TRAUTWEIN 2007).

##### 2.1.1.1 Epidermis

Hauptbestandteil der Epidermis sind so genannte Keratinozyten. Sie bilden ein verhornendes, mehrschichtiges Plattenepithel. Durch Bündel von Intermediärfilamenten (Keratinfilamente und Tonofibrillen), die in Desmosomen inserieren werden die einzelnen Keratinozyten zusammengehalten. Iso- bis hochprismatische Basalzellen bilden die tiefste Zellschicht der Oberhaut, das Stratum basale und sind über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden. Dort finden sich die pigmenthaltigen Melanozyten. Die darüberliegende Schicht, das Stratum spinosum setzt sich aus Stachelzellen (Akanthozyten) zusammen. Dieser Schicht folgen das Stratum granulosum (Körnerschicht), das Stratum lucidum (Glanzschicht) und das Stratum corneum (Hornschicht). In allen Schichten der Epidermis finden sich

---

antigenpräsentierende Langerhans'sche Zellen mit ovalen oder nierenförmigen Kernen (HEWICKER-TRAUTWEIN 2007; WEISS und TEIFKE 2007).

#### 2.1.1.2 Korium

Der Epidermis folgt das Korium, bestehend aus Stratum papillare und Stratum reticulare. Es führt Gefäße und Nerven, setzt sich aus Bindegewebszellen, kollagenen und elastischen Fasern sowie extrazellulärer Matrix zusammen und ist Ausgangspunkt für Haarwurzeln, Talg- und Schweißdrüsen. Komplimentiert wird der Aufbau der Haut durch die Subkutis, welche zur Stabilisierung der Haut auf ihrer Unterlage dient und aus Binde- und Fettgewebe besteht (HEWICKER-TRAUTWEIN 2007).

### 2.1.2 Funktionen der Haut

Als Grenzfläche zwischen Individuum und Umwelt schützt die Kutis den Organismus vor diversen mechanischen, physikalischen und chemischen Einflüssen sowie vor Parasiten, Bakterien und Viren (HABERMEHL 2005; BECKER und COERPER 2007; HEWICKER-TRAUTWEIN 2007; WEISS und TEIFKE 2007; BREITKREUTZ et al. 2009). Sie ist an der Konstanterhaltung des Serum- und Elektrolythaushaltes und somit auch an der Blutdruckregulation beteiligt. Sowohl die Ausstattung mit Haaren, Talg- und Schweißdrüsen, als auch die dichte Ansammlung von Blutgefäßen unterstreichen ihre maßgebliche Beteiligung an der Wärmeregulation des gesamten Organismus (HABERMEHL 2005; HEWICKER-TRAUTWEIN 2007; WEISS und TEIFKE 2007). Durch ihre Ausstattung mit verschiedensten Rezeptoren für Temperatur, Druck, Spannung und Schmerz ist sie auch in gewisser Weise den Sinnesorganen zuzuordnen (HABERMEHL 2005).

### **2.1.3 Das Schwein als Wundheilungs-Modell in der Humanmedizin**

Zur Erforschung der Haut des Menschen kann als Struktur- und Funktionsmodell nur das Integument hellhäutiger Hausschweine, wie das deutsche Edelschwein oder das Göttinger Miniaturschwein dienen (ROMANO und BALAGUER 1991; MEYER 1996; HOM et al. 2005; NETZLAFF et al. 2006).

Die Epidermis des Schweines verhält sich in Bau, Biochemismus und stoffwechselphysiologischen Bereichen sehr ähnlich zu der des Menschen (ARCHAMBEAU und BENNETT 1984; MEYER 1996; BARBERO und FRASCH 2009). Dies zeigt sich zum Beispiel in Hinblick auf die Erneuerungsrate, die beim Mensch 28, beim Schwein 30 Tage umfasst, oder die Passage der vitalen Epidermis, welche beim Menschen 13, beim Schwein 10-14 Tage beträgt. Weitere Übereinstimmungen zeigen sich auch in der Entwicklung der epidermalen Barriere sowie der Durchlässigkeit für viele Substanzen unter Ausschluss von Ionen (MEYER 1996).

Unterschiede zwischen der Epidermis des Menschen im Vergleich zu der des Schweins betreffen hauptsächlich die Langerhans-Zellen. Sie unterscheiden sich in Form und Anzahl, treten beim Schwein abgerundet, ohne zytoplasmatische Fortsätze auf und besitzen im Gegensatz zum Menschen auch keine Birbeck-Körperchen (MEYER 1996). Dabei handelt es sich um Tennisschläger-ähnliche Cytoplasmaformationen mit zum Teil pentalaminärem Aufbau im Bereich des Stiels (PAILLOT et al. 2001). Anderen Studien zufolge kommen solch konstruierte Langerhans-Zellen allerdings auch beim Menschen vor, wodurch deutlich wird, dass auch ohne das Vorhandensein von Birbeck-Körperchen das Vermögen zur Antigenpräsentation normal entwickelt sein kann (MOMMAAS et al. 1994). Laut ROMANO und BALAGUER wurde 1991 das Vorhandensein von Birbeck-Granula in porcinen Langerhans-Zellen beschrieben (ROMANO und BALAGUER 1991).

Strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen porcinem und menschlichem Integument finden sich auch in der Dermis. Gemeint sind damit vor allem die Anordnung von Bindegewebelementen und zahlreiche biochemische Parameter. Nicht nur in Gehalt, Struktur und Verteilung von Glykosaminoglykanen, Glykoproteinen und Proteoglykanen gleicht die Dermis des Schweines der des Menschen enorm, sondern auch im Bezug auf das vorkommende Kollagen (KING und TABIOWO 1980; TSUKISE und MEYER 1983). Die

---

Aminosäurezusammensetzung der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Ketten sind weitgehend identisch (HEINRICH et al. 1971; ALLAM und HEIDEMANN 1974), was als weiterer Grund, neben den Unterschieden in Zahl, Struktur und Reaktion von Langerhans-Zellen, für die sehr geringe antigene Wirkung der Schweinehaut gegenüber dem Menschen anzusehen ist. Auch die Blutgefäßversorgung ist ähnlich konstruiert (MEYER 1996). Wärme kann sowohl beim Mensch, als auch beim Schwein relativ schnell abgegeben werden (YOUNG und HOPEWELL 1980; GODYNICKI et al. 1985). Allerdings verfügt das Schwein zusätzlich über besondere vasokonstriktorische Mechanismen in der Dermis, womit es einem übermäßigen Wärmeverlust entgegenwirken kann. Betrachtet man die Nervenversorgung, zeigen sich auch große Ähnlichkeiten in Hinblick auf die Ausdehnung der nozizeptiven Felder der polymodalen Nozizeptoren. Als Besonderheit finden sich in der Dermis des Hausschweins schnell reagierende Mastzellen, welche eine hohe Sensitivität für Stress besitzen. Dies ist zum Einen rasseabhängig, steht allerdings auch in Zusammenhang mit individueller Stressbelastung (RANG 1973; XU et al. 1993; MEYER 1996).

Deutliche Unterschiede zwischen Mensch und Schwein zeigen sich allerdings beim Vergleich der Subkutis. Durch starke Fetteinlagerungen, ihrer relativen Dicke sowie ihrer massiven Kompaktheit und Durchsetzung mit kräftigen Kollagenfaserbündeln, ist hier von keiner akzeptablen Vergleichbarkeit zwischen der Subkutis des Schweins mit der des Menschen zu reden. Weitere Differenzen ergeben sich bezüglich der Haarfollikelkomplexe und vor allem bezüglich des Auftretens und Art der Drüsen. Schweine besitzen vorwiegend apokrine Schlauchdrüsen, wohingegen im Integument des Menschen nur ekkrine Schlauchdrüsen vorkommen (MEYER 1996; LIU et al. 2010). Ihr neutrales, glykokonjugatreiches Sekret vermischt sich mit Hauttalg und erzeugt beim Schwein ein anderes Milieu auf der Hautoberfläche als beim Menschen, was sich bei näherer Betrachtung des Haut-pHs beispielhaft aufzeigen lässt. Dieser beträgt beim Mensch 5, beim Schwein liegt er bei 6-7 (TSUKISE und MEYER 1983; MEYER und NEURAND 1991). Das Sekret trägt beim Schwein auch nicht zur Thermoregulation bei. Zudem unterscheiden sich auch Innervation und Steuerungsmechanismen der Drüsen (MEYER et al. 1994).

---

## 2.2 Wundheilung

Unter Wundheilung ist das Zusammenwirken physikalischer, chemischer und zellulärer Mechanismen zu verstehen, welche einen wichtigen Prozess zur Wiederherstellung der Integrität der Haut nach Verletzungen darstellen. Diese geschieht entweder durch Regeneration des geschädigten Gewebes, oder durch Reparation, womit der Ersatz des destruierten Gewebes durch anderes, minderwertiges Gewebe gemeint ist. Wundheilung beginnt unmittelbar nach Eintritt des Traumas, dauert mehrere Monate und ist als dynamisches Geschehen zu verstehen (KRAMER 2004; RYTZ 2004; HEDLUND 2009).

So bestehen die Ziele der Wundbehandlung darin, einen möglichst raschen Wundverschluss zu erzielen, eine weitere Schädigung des Gewebes zu verhindern, die Funktion des verletzten Gewebes wiederherzustellen und so dem Individuum eine Wiederaufnahme seiner täglichen Aktivitäten zu ermöglichen (RAMASASTRY 2005).

### 2.2.1 Formen der Wundheilung

Eine straffe bindegewebige Narbe bildet das Endresultat jedes Wundheilungsprozesses, ein nur unzureichender Ersatz des ursprünglichen Gewebes. Gemessen an der Menge des gebildeten Granulationsgewebes, unterscheidet man eine primäre (*sanatio per primam intentionem*) und eine sekundäre Wundheilung (*sanatio per secundam intentionem*). Abzugrenzen hiervon ist eine weitere Form- die Heilung unter Schorf (KRAMER 2004).

#### 2.2.1.1 Primärheilung - *Sanatio per primam intentionem*

Liegen die Wundränder eng beieinander, können diese schnell miteinander verkleben bzw. anschließend verwachsen. Dies wird als Primärheilung verstanden. Ebenso sind die Wundränder glatt und im Wundgebiet sind keine größeren Wundhöhlen erkennbar. Wunden wie beispielsweise Schnittwunden oder genähte Operationswunden weisen eben diese Charakteristika der primären Wundheilung auf. Diese Form der Heilung dauert ca. 5-10 Tage und weist im Endresultat eine funktional günstige Strichnarbe auf. Sind die beiden Wundränder optimal aneinander adaptiert, setzt die Epithelisierung innerhalb von 24-48 h ein (KRAMER 2004; ACKERMANN 2009).



### 2.2.1.2 Sekundärheilung - Sanatio per secundam intentionem

Charakteristisch für diese Form der Heilung ist ein Substanzverlust im traumatisierten Gebiet, der ohne Manipulation von Außen spontan abheilt. Des Weiteren spricht man von sekundärer Wundheilung, wenn durch traumatische, chemische oder bakterielle Noxen eine Sanatio per primam intentionem verhindert wird. Verunreinigte Bereiche müssen zunächst beseitigt werden, erst dann wird Bindegewebe synthetisiert und zufällig angeordnet und füllt den entstandenen Defekt auf. Fibröses Bindegewebe wird in manchen Fällen in Granulationsgewebe umgebaut. Dieses weist eine verminderte Dehnbarkeit auf, was dazu führen kann, dass die Wunde erneut aufreißt und somit bleibende Ulzerationen, Haarverluste oder Proliferationen von Bindegewebe die Folge sein können. Ausgehend vom Wundrand bildet sich neues Epithel über der Wunde. Bei dieser Form der Heilung laufen sämtliche Phasen der Wundheilung ab. Es ist davon auszugehen, dass bis zur vollständigen Heilung mehrere Wochen vergehen können (KRAMER 2004; ACKERMANN 2009).

### 2.2.1.3 Heilung unter Schorf

Heilung unter Schorf kommt vor allem bei Schürfwunden oder sonstigen oberflächlichen Hautwunden vor. Hier bildet sich Granulationsgewebe unter dem Schorf, während zeitgleich von den Wundrändern ausgehend die Epithelialisierung einsetzt. Das neu entstandene Epithel schiebt sich zwischen Schorf und Granulationsgewebe hindurch, hebt den Schorf an den Rändern allmählich ab, bis dieser sich vollständig ablöst und darunter eine völlig epithelialisierte Wunde zum Vorschein kommt. Die Heilung findet hier unter Ausschluss der Außenwelt statt und bietet somit keine große Möglichkeit für Infektionen. Wird der Schorf allerdings frühzeitig entfernt, kann hier nur noch von sekundärer Wundheilung ausgegangen werden (KRAMER 2004; HEDLUND 2009).

## 2.2.2 Physiologie und Phasen der Wundheilung

Grundsätzlich werden bei der Wundheilung drei voneinander getrennte Phasen unterschieden, die so genannte Exsudationsphase (Entzündungsphase), die Demarkation/Débridementphase (Abräumphase) und die Reparationsphase (KRAMER 2004; GURTNER et al. 2008; OZTURK und ERMERTCAN 2010). Diesen drei Phasen schließt sich noch eine weitere vierte Phase an, die so genannte Reifungsphase (KRAMER 2004; HEDLUND 2009). Aufgrund der Tatsache, dass die Wundheilung jedoch ein komplex ablaufender Prozess serieller Reaktionen und Interaktionen zwischen den Zellen und deren Mediatoren darstellt

---

und die einzelnen Phasen aufgrund ihrer Überschneidungen (HEDLUND 2009) schwer voneinander differenzierbar sind, wird in neueren Studien auf die strikte Trennung der Wundheilungsphasen verzichtet.

#### 2.2.2.1 Exsudationsphase

Tritt eine Verletzung auf, reagiert der Körper an dieser Stelle sofort mit einer Entzündung, was als Schutzreaktion zu verstehen ist. Die Exsudationsphase beginnt sofort nach Auftreten der Verletzung und dauert, je nach Ausmaß des Gewebeschadens und Reaktionsfähigkeit des Individuums, zwischen 3-5 Tagen an (RYTZ 2004; HEDLUND 2009). Erhöhte vaskuläre Permeabilität, Chemotaxis zirkulierender Zellen, Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und Aktivierung verschiedener Entzündungszellen wie Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Fibroblasten charakterisieren die Entzündungsphase (HEDLUND 2009). Ausgeschüttet werden Wachstumsfaktoren und Zytokine von Mastzellen, Makrophagen und Thrombozyten. Wachstumsfaktoren erzeugen mit anderen Entzündungsmediatoren wie Histamin, Serotonin, proteolytischen Enzymen, Komplement, Kininen, Prostaglandinen, Thromboxan oder lysosomalen Enzymen eine Inflammation, die direkt nach Eintritt der Verletzung auftritt und ca. 5 Tage anhält.

Zunächst wird die Wunde jedoch durch die auftretende Blutung aufgefüllt und gereinigt. Innerhalb der ersten 5-10 Minuten nach Eintritt der Verletzung kommt es zu einer Vasokonstriktion, induziert durch Katecholamine, Bradykinin, Serotonin und Histamin, um den Blutverlust für den Körper so gering wie möglich zu halten (KRAMER 2004; BROUGHTON et al. 2006; HEDLUND 2009). Die Mediatoren der Prostaglandin (PG)-Reihe, Histamin, Serotonin und Bradykinin (DIRK G. MEURER 2007), laut ACKERMANN (2009) auch Stickoxid, bewirken, dass sich die umliegenden Gefäße dilatieren (BROUGHTON et al. 2006; DIRK G. MEURER 2007). Durch die Vasodilatation ist es zum Einen möglich, dass Fibrinogen und die Gerinnungsfaktoren in den Bereich des Gewebedefekts gelangen können (HEDLUND 2009), zum Anderen entsteht ein erhöhter Zellverkehr, der dadurch bedingt ist, dass neutrophile Granulozyten durch Interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , transforming growth factor (TGF)- $\beta$  und Komplement in das verletzte Gebiet gelockt werden (BEVILACQUA et al. 1985; POHLMAN et al. 1986; RYZT 2004). Aus den verletzten Endothelzellen tritt Thromboplastin aus und aktiviert den extrinsischen Teil der Gerinnungskaskade (KRAMER 2004; HEDLUND 2009). Durch Koagulation und Aggregation der Thrombozyten entsteht ein Blutkoagulum, welches das

---

Grundgerüst für nun einwandernde Zellen, wie neutrophile Granulozyten, Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen bildet (GURTNER et al. 2008; ACKERMANN 2009; RODERO und KHOSROTEHRANI 2010) und die Hämostase garantiert. Bestandteile des entstandenen Blutgerinnsels sind vor allem Kollagen, Thrombozyten, Thrombin und Fibronektin (BROUGHTON et al. 2006). Zeitgleich werden von den Thrombozyten auch so genannte chemoattraktive Verbindungen und unterschiedliche Wachstumsfaktoren freigesetzt. Hierzu gehören der epidermal growth factor (EGF), platelet derived growth factor (PDGF) und der transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) und  $\beta$  (TGF $\beta$ ), welche für spätere Prozesse der Wundheilung von Nöten sind. Plasmatransudat und Fibrin füllen die Wunde und versiegeln die umliegenden Lymphgefäße, wodurch die Entzündung lokal begrenzt bleibt (KRAMER 2004; HEDLUND 2009). Die Fibronektin-Dimere innerhalb des Koagulums werden durch den aktivierten Faktor XIII sowohl kovalent an Fibrin, als auch aneinander gebunden, wodurch eine provisorische extrazelluläre Matrix entsteht. Somit werden die Wundränder einerseits stabilisiert, andererseits ist der Körper weitgehend vor Infektionen und Flüssigkeitsverlust geschützt (GURTNER et al. 2008; HEDLUND 2009). Trocknet das Gerinnsel aus, kommt es zur Bildung von Schorf, wodurch die Wunde geschützt wird. Erneut auftretende Blutungen werden verhindert und die Heilung unter der Oberfläche gefördert. Der Übertritt von Leukozyten aus den Blutgefäßen in das Wundgebiet wird als Überleitung in die Demarkationsphase interpretiert (KRAMER 2004; HEDLUND 2009).

#### 2.2.2.2 Demarkation

Leukozyten bilden zusammen mit Wundsekret, abgestorbenen Zellen und Gewebetümmern ein Exsudat auf der Wunde (ACKERMANN 2009; HEDLUND 2009). Bereits 6 bis 12 h nach der Verwundung, treten Monozyten und neutrophile Granulozyten- angelockt durch chemotaktische Substanzen- im Bereich des destruierten Gebiets auf und beginnen mit dem Débridement (KRAMER 2004; HEDLUND 2009). Durch den Anstieg der Konzentration der neutrophilen Granulozyten innerhalb der folgenden 2-3 Tage werden abgestorbene Gewebeanteile und Mikroorganismen wie Bakterien phagozytiert und somit einer Wundinfektion in gewisser Weise entgegengewirkt. Sterben die neutrophilen Granulozyten ab, setzen sie zeitgleich Enzyme und Sauerstoffverbindungen frei, die einerseits den Abbau des zu beseitigenden Materials erleichtern, andererseits auch die Fähigkeit besitzen, im Blut zirkulierende Monozyten zu aktivieren (RYTZ 2004; HEDLUND 2009). Monozyten stellen für die Wundheilung die wichtigsten sekretorischen Zellen dar. Sie synthetisieren jene

---

Wachstumsfaktoren, wie den platelet derived growth factor (PDGF), den transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) und  $\beta$  (TGF $\beta$ ), den fibroblast growth factor (FGF), Interleukin-1 (IL-1) und weitere dieser Wachstumsfaktoren, die für die Neubildung frischen Gewebes essentiell sind. Zudem organisieren sie sich innerhalb von 1-2 Tagen zu Makrophagen um, welche Kollagenasen sezernieren und abgestorbenes Gewebe, Fremdmaterial sowie Bakterien beseitigen (KRAMER 2004; HEDLUND 2009). Zusätzlich besitzen sie die Fähigkeit durch Agglomeration so genannte multinukleäre Riesenzellen zu bilden und sich dadurch an der Phagozytose zu beteiligen. Makrophagen werden durch chemotaktisches Material wie Komplement, bakterielle Endotoxine, Kollagenfragmente oder Entzündungszellprodukte in das Wundgebiet gelockt (RYTZ 2004; HEDLUND 2009). Sie sind wiederum Auslöser für das Einwandern mesenchymaler Zellen, treiben die Angiogenese voran und modulieren die Grundsubstanz (KRAMER 2004; HEDLUND 2009). Später als Makrophagen und neutrophile Granulozyten treten Lymphozyten in dieser Phase der Wundheilung auf. Durch Ausschüttung löslicher Elemente stimulieren bzw. inhibieren sie die Zellwanderung und Proteinsynthese im Wundgebiet. Laut HEDLUND (2009) hat weder eine Neutropenie, noch eine Lymphopenie großen Einfluss auf den Heilungsprozess, eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit von Makrophagen allerdings schon (HEDLUND 2009).

### 2.2.2.3 Reparationsphase

Reparation im geschädigten Gebiet findet innerhalb von 3-5 Tagen nach der Verletzung statt. Vier parallel zueinander verlaufende Vorgänge kommen hier zum Tragen, die Kollagenbildung, die Angiogenese, die Epithelisierung und die Wundkontraktion. Im Allgemeinen ist für diese Phase eine Dauer von 2-4 Wochen zu veranschlagen (HEDLUND 2009).

#### 2.2.2.3.1 Kollagenbildung

Durch Zytokine der Makrophagen wird in Zusammenarbeit mit extrazellulären Matrixmolekülen die Fibroblastenproliferation vorangetrieben. Zusätzlich werden durch sie auch Integrinrezeptoren exprimiert. Fibroblasten spielen eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung, da sie maßgeblich an der Bindegewebsbildung und damit an der Reparatur destrukturierter Gebiete beteiligt sind (MEDINA und GHAHARY 2010). TGF- $\beta$ , PDGF und b-FGF (basic-fibroblast growth factor) regen Fibroblasten dazu an, Fibronectin zu bilden. Des Weiteren wird der Vorgang der Fibroblastenproliferation und der Kollagenbildung durch einen Sauerstoffgehalt von 20 mmHg und einen leicht sauren pH positiv beeinflusst. Das

---

Einwandern von Fibroblasten findet gegen Ende der Inflammationsphase statt. Neue Kapillareinsprossen folgen diesem Prozess. Durch Einlagerung von Proteoglykanen, Kollagen und Elastin entsteht das neue Bindegewebe. Nach ca. 5 Tagen findet eine kontrollierte Ausrichtung der Fasern, Fibroblasten und Kapillaren parallel zum Wundrand statt. Durch den Ersatz von Fibrin durch Kollagen ergibt sich eine immer größere Stabilität im Wundgebiet (BROUGHTON et al. 2006; HEDLUND 2009). Dies wird durch die Verschiebung der Kollagenkonzentrationen deutlich: die Konzentration des unreifen Typ-III-Kollagens fällt zugunsten des reifen Typ-I-Kollagens. Je weiter der Kollagengehalt steigt, desto mehr nimmt die Konzentration der Fibroblasten und die damit verbundene Kollagensynthese ab.

#### *2.2.2.3.2 Angiogenese*

Makrophagen produzieren chemotaktische und mitogene Substanzen für Endothelzellen. Dies regt die Gefäßbildung an. Positiv beeinflussend sind auch erhöhte Milchsäureanteile und eine geringe Sauerstoffspannung. Vascular endothelial growth factor (VEGF) und basic-fibroblast growth factor (b-FGF) sind Faktoren, die spezifisch die Angiogenese beeinflussen (HEDLUND 2009). Die 4-5 verschiedenen Typen des angioblast growth factor (AGF) wirken regulierend auf die Angiogenese (DIRK G. MEURER 2007). Aus vorhandenen Gefäßen im Umkreis des destruierten Gebiets sprossen neue Kapillaren in das Wundgebiet ein. Dies geschieht durch Proteolyse der extrazellulären Matrix und der Basalmembran der Ursprungsgefäße. Unreife Endothelzellen wandern ein, proliferieren und lassen Endothelröhrchen entstehen, die sich zu neuen Kapillaren differenzieren. Reparationsvorgänge im geschädigten Gebiet finden innerhalb von 3-5 Tagen nach der Verletzung statt. Unterschiedliche zur Leukozytenadhäsion notwendige Liganden und Rezeptoren werden ausgebildet (ACKERMANN 2009). Zum Einen steigt der Sauerstoffgehalt innerhalb der Wunde, was die Gewebeneubildung verbessert (ACKERMANN 2009; HEDLUND 2009), zum Anderen werden Kohlendioxid und andere Abfallprodukte entfernt (ACKERMANN 2009). Der Blutfluss innerhalb dieser Kapillaren setzt ein und steigert die mitotische Teilung der im Wundgebiet vorhandenen mesenchymalen Zellen. Die Entstehung der Lymphgefäße ist ähnlich, sie sprießen aber erst später ins Wundgebiet ein (HEDLUND 2009).

### 2.2.2.3.3 Epithelisierung

3-5 Tage nach dem Trauma bildet sich hellrotes, fleischiges Granulationsgewebe. Die tägliche Wachstumszunahme wird mit 0,4-1,0 mm beschrieben. Es bildet die Grundlage für die Epithelisierung und ist zusätzlich Ausgangspunkt von Myofibroblasten. Diese sind aufgebaut aus zwei unterschiedlichen kontraktilen Proteinen, Aktin und Myosin. Sie sind später für die Wundkontraktion verantwortlich (HEDLUND 2009).

Bei Wunden, deren Ränder direkt aufeinandertreffen, findet die Epithelisierung in einem zeitlichen Rahmen von 1-2 Tagen statt. Wunden, die mit einem Substanzverlust einhergehen epithelisieren innerhalb von 4-5 Tagen (HEDLUND 2009), laut ACKERMANN (2009) beginnt dieser Prozess schon ab dem 3. Tag nach der Verletzung. Erstreckt sich eine Wunde nicht über die gesamte Hautdicke, so migrieren die Epithelzellen schon direkt nach der Traumasetzung. An den Wundrändern verändern die Epithelzellen ihren Phänotyp. Bedingt ist dies durch Retraktion von intrazellulären Monofilamenten, der Bildung von peripheren zytoplasmatischen Aktinfilamenten und einer temporären Auflösung der Verbindungen durch Hemidesmosomen und Desmosomen. Keratinozyten wandern unter den Schorf an den Übergang zwischen noch geschädigtem Gewebe und frischem Bindegewebe. Glykoproteine (Chalone) der Epidermis kommen in Wunden nur reduziert vor, dadurch kann die Proliferation der Epithelzellen ungehindert fortschreiten und über das Granulationsgewebe wachsen. Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten, Fibroblasten und Makrophagen unterstützen diesen Prozess. Laut HEDLUND (2009) ist eine erhöhte Mitoseaktivität der Basalmembran bereits 1-2 Tage nach der Verletzung zu beobachten. Die Epithelisierung orientiert sich entlang der Kollagenfasern. Epithelzellen lösen sich von der Basalmembran und anderen Epithelzellen. An den Wundrändern werden von Basalzellen aus Mikrovilli gebildet und strecken ihre Pseudopodien über dem gesamten Kollagennetz aus. Intrazytoplasmatische Mikrofilamente werden gebildet und selektive Antikörper gegen Aktin und Myosin gebunden. Es erfolgt eine Einwanderung von Epithelzellen, bis der komplette Defekt geschlossen ist, was rückwirkend eine Kontakthemmung der Epithelzell-Migration zur Folge hat. Dem einschichtigen fragilen Epithel folgen weitere Epithelschichten und es entsteht ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel. Zu sehen ist neues Epithel ca. 4-5 Tage nach der Verletzung (HEDLUND 2009).

#### 2.2.2.3.4 Wundkontraktion

Im Granulationsgewebe vorhandene Myofibroblasten kontrahieren sich und führen dadurch zur Wundkontraktion. An diesem komplexen Vorgang sind mitunter extrazelluläre Matrix, Zytokine und Zellen beteiligt. Durch eine massive Fibroblasteninvasion im Wundbereich kommt es zur zentripetalen Kontraktion. Nach 5-9 Tagen ist eine deutliche Verkleinerung der Wunde sichtbar. Bei der Wundkontraktion ist von einer täglichen Geschwindigkeit von 0,6-0,7 mm auszugehen (HEDLUND 2009). Berührung der Wundränder, mangelhafte Myofibroblastenfunktion oder zu große Spannung auf der Wunde bringen den Vorgang der Wundkontraktion zum Stillstand. Antiinflammatorisch wirksame Kortikosteroide, Mitosehemmer oder lokal angewandte Muskelrelaxantien haben laut HEDLUND (2009) und KRAMER (2004) denselben Effekt. Hypertrophe oder verbreiterte Narben sind das Ergebnis pathologischer Bedingungen im Sinne einer Kontraktur. Dies geschieht durch persistierende mechanische Beanspruchung der weiterhin vorkommenden Myofibroblasten und der andauernden Kollagensynthese (GRINNELL 2003; KRAMER 2004).

#### 2.2.2.4 Reifungsphase

Der Beginn dieser Phase wird auf 17-20 Tage nach der Verletzung festgesetzt. Durch ausreichende Einlagerung von Kollagen, hat die Wunde zu diesem Zeitpunkt ihre maximale Belastbarkeit erreicht. Der Anteil an Granulationsgewebe verringert sich zunehmend, bedingt durch das Absterben von Zellen und die fortschreitende Verschiebung von Typ-III-Kollagen zu Typ-I-Kollagen. Die Ausrichtung des Kollagens verläuft entlang von Spannungslinien. Kollagenfasern, die sich nicht ausrichten, werden von Matrix-Metalloproteinasen entfernt. Ausgeschüttet werden diese von Fibroblasten, Makrophagen und Epithelzellen. Der Zeitraum, in dem die massivste Zunahme an Festigkeit innerhalb des Wundgewebes zu beobachten ist, wird von HEDLUND (2009) auf die Tage 7-14 post traumata festgesetzt. Narbengewebe erreicht nur noch 80 % der ursprünglichen Gewebefestigkeit (BROUGHTON et al. 2006; HEDLUND 2009).



### 2.2.3 Wundheilungsstörungen

Störungen der Wundheilung können jede einzelne der zuvor beschriebenen Phasen betreffen. Man unterscheidet lokale, d.h. von den im Wundgebiet vorherrschenden Verhältnissen ausgehende Störungen und solche, die durch eine bestehende Grunderkrankung hervorgerufen werden (WEISE und SCHÄFFER 2000). Die Phasen werden wie beim physiologischen Heilungsprozess durchlaufen, werden aber von Störfaktoren zeitlich verzögert, weisen verlängerte Zwischenstadien auf und führen zu schlechteren funktionellen und ästhetischen Ergebnissen (WEISE 2000). Hauptsächliche Ursachen für Wundheilungsstörungen werden durch Wunddehiszenzen, Nachblutungen, Fremdkörperreaktionen, Nekrosebildung oder Infektion hervorgerufen. Eine verstärkte Exsudation bzw. Inflammation und Proliferation führen zu einer verstärkten Ausbildung von minderwertigem Granulationsgewebe und daraus resultierender überzogener Reparatur (SCHÄFFER und BECKER 1999; WEISE und SCHÄFFER 2000). Fremdkörper jeglicher Art können überschießende Inflammationsreaktionen auslösen. Durch sezernierte Enzyme im Wundgebiet wird dabei die Wundmatrix zerstört, die Exsudationsphase verlängert und die Bildung von Granulationsgewebe verzögert. Systemische Erkrankungen wie Lebererkrankungen, Hyperadrenokortizismus (KRAMER 2004; HEDLUND 2009), Diabetes mellitus (DEVLIN et al. 1996; ZYKOVA et al. 2000) oder Urämien, verzögern bzw. verhindern den Heilungsprozess. Feuchtigkeit und Wärme haben einen positiven Einfluss auf die Heilung. Eine verminderte Blutzufuhr hat durch mangelnde Sauerstoffzufuhr und anderer metabolischer Substrate eine Verlangsamung bzw. Stagnation der Wundheilung zur Folge. Ebenso haben manche Medikamente wie Kortikosteroide oder Chemotherapeutika einen inhibierenden Effekt und erhöhen das Risiko der Wundinfektion. Abhängig von der Strahlendosis und Bestrahlungszeit in Relation zur Entstehung des Traumas, beeinflusst eine Strahlentherapie alle Phasen der Wundheilung negativ (KRAMER 2004; HEDLUND 2009). Studien aus dem Jahre 1988 zufolge inhibiert ionisierte Strahlung die Fibroblastenproliferation (GORODETSKY et al. 1988; RUDOLPH et al. 1988).



---

## **2.3 Allgemeines zur Hauttransplantation**

Bei Wunden, die nicht durch direkte Adaption der Wundränder versorgt werden können, bietet die Hauttransplantation eine Möglichkeit des Wundverschlusses (HEDLUND 2009). Ihr gegenüber steht als zweite Möglichkeit die so genannte Lappenplastik. In gewissen anatomischen Regionen gestaltet sich die Präparation eines lokalen Lappens aufgrund ungenügender Mobilisierung und Verfügbarkeit von Haut als äußerst schwierig (ANDREASSI et al. 2005). Hier kann je nach Ausdehnung des Defektes auch auf so genannte Fernlappenplastiken oder freie Lappenplastiken ausgewichen werden (EHRENFELD 2002).

### **2.3.1 Klassifikation**

Laut ANDREASSI (2005) und BOYD (2010) wird im Allgemeinen zwischen so genannten Flaps (Hautlappen) und Grafts (Transplantaten) unterschieden.

#### **2.3.1.1 Flap (Gewebelappen)**

Unter einem Gewebelappen ist ein in der Regel rechteckiges Stück Haut zu verstehen, welches die gesamte Kutis und Subkutis der Haut, inklusive des subkutanen Fettgewebes umfasst. Es wird peripher und in die Tiefe präpariert, behält aber an einer Seite durch einen so genannten Stiel Kontakt zur umliegenden Haut (KUNERT 1991). Dadurch trägt er seine eigene intrinsische Blutversorgung (BOYD 2010). Die Hautlappenplastik wird häufig verwendet, um in der Nähe des präparierten Hautlappens liegende Defekte der Haut abzudecken. Die Vaskularisation des Hautlappens muss durch den Stiel gewährleistet sein, um eine adäquate Haftung und Einheilung des Hautlappens zu garantieren (BELOUSOV et al. 1993). Des Weiteren kann neben der beschriebenen Nahlappenplastik auch eine so genannte Fernlappenplastik angewendet werden. Hierbei stammt der Lappen von einer anderen Stelle des Körpers, der durch Verpflanzung an den Defekt herangeführt und vor Ort eingenäht wird (EHRENFELD 2002).

### 2.3.1.2 Graft (Transplantat)

Als Graft wird ein Gewebestück bezeichnet, das keine eigene Blutversorgung beinhaltet (BOYD 2010). Zur Transplantation wird ein Teil der Haut (Epidermis und Dermis) herangezogen, welches komplett von der Spenderregion gelöst wird und in die Empfängerstelle integriert wird (ANDREASSI et al. 2005). Anhand der Dicke des Transplantats werden ein so genanntes Vollhauttransplantat, welches beide Schichten komplett beinhaltet und ein Spalthauttransplantat voneinander unterschieden. Letzteres setzt sich aus der Epidermis und unterschiedlichen Anteilen des unterliegenden Koriums zusammen (ADAMS und RAMSEY 2005; ANDREASSI et al. 2005). Spalthaut-Transplantate können anhand ihrer Dicke unterteilt werden. Die Unterteilung erfolgt in dünne (0,15-0,3 mm), mittlere (0,3-0,45 mm) und dicke (0,45-0,6 mm) Transplantate (HAUBEN et al. 1982; NAKAYAMA und CHUANG 1983; CHICK 1988). Sie besitzen keine eigenen Blutgefäße oder Hautanhangsgebilde (LITZKE 2004; ADAMS und RAMSEY 2005). Des Weiteren können Transplantate anhand ihres Ursprungs unterschieden werden. Tabelle 1 bietet einen Überblick:

**Tabelle 1: Klassifizierung von Transplantaten anhand ihres Ursprungs (ANDREASSI et al. 2005; HEDLUND 2009)**

Bezeichnung	Ursprung
<b>Autologes</b> Transplantat	Spender und Empfänger sind dasselbe Individuum
<b>Homologes</b> bzw. <b>allogenes</b> Transplantat	Spender und Empfänger sind dieselbe Art, aber unterschiedliche Individuen
<b>Heterologes</b> bzw. <b>xenogenes</b> Transplantat	Spender und Empfänger sind unterschiedlichen Spezies angehörig

---

### 2.3.2 Physiologie und Voraussetzungen für die Hauttransplantation

Eine arterielle Anbindung und ausreichende Drainage sind Grundvoraussetzungen für die erfolgreiche Einheilung eines Transplantats. Laut HEDLUND (2009) sollte eine Einsprossung nutritiver Gefäße zwischen dem 7.-8. Tag (post transplantationem) erfolgt sein, ANDREASSI (2005) zufolge bereits 5-7 Tage nach der Transplantation. Die Empfängerstelle muss fähig sein gesundes Granulationsgewebe zu bilden (ANDREASSI et al. 2005). Bei einer sofortigen Transplantation nach Wundsetzung muss die Empfängerstelle sauber sein, darf keinerlei Hinweis auf Infektion liefern (HEDLUND 2009; BOYD 2010) oder viel Exsudat bilden (ANDREASSI et al. 2005). Soll eine zweizeitige Versorgung der Wundfläche erfolgen, muss zunächst die Bildung von Granulationsgewebe abgewartet werden. Andauernde Blutungen innerhalb des Empfängerbetts müssen vor Auflage des Transplantats mittels Druck oder Elektrokoagulation zum Stillstand gebracht werden, um eventuellen Flüssigkeitsansammlungen vorzubeugen. Direkter Kontakt zwischen Transplantat und Empfängerbett ist für eine optimale Adhäsion, Einheilung und Einsprossung neuer Kapillaren wichtig. Zur Optimierung ist für mindestens 72 h das Anlegen eines nicht adhäsiven, hydrophilen Kompressionsverbandes direkt im Anschluss an die Transplantation in Betracht zu ziehen (ANDREASSI et al. 2005; HEDLUND 2009). Erst ca. 10 Tage nach der Transplantation besteht anhand eines Fibrinnetzes eine feste Verbindung zwischen Transplantat und Empfängerstelle. Ausschlaggebend für die Reinnervation des Transplantats sind mitunter Typ und Dicke der Haut. Des Weiteren wird sie vom Ausmaß des Narbengewebes und der Innervation des umliegenden Gewebes beeinflusst (HEDLUND 2009).

---

## 2.4 Einsatz verschiedener Gewebe zur Wundheilungsförderung

### 2.4.1 Die Amnionmembran

#### 2.4.1.1 Struktur und Aufbau

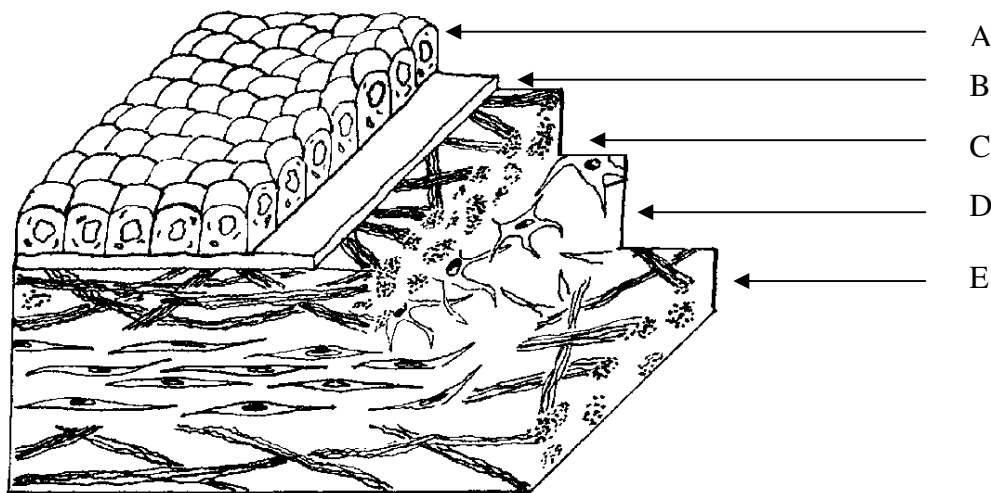
##### 2.4.1.1.1 Anatomisch

Die Amnionmembran bildet zusammen mit dem Dottersack, dem Chorion und der Allantois die so genannten Fetalmembranen (AUGHEY und FRYE 2001; SCHNORR und KRESSIN 2006). Durch sie wird der Embryo vor Austrocknung und mechanischen Einwirkungen geschützt. Das Amnion bildet die innerste Schicht der Eihäute. Bei den Haussäugetieren entwickelt es sich als so genanntes Faltamnion, wohingegen es beim Menschen als Spaltamnion aus der Embryozyste hervorgeht (RÜSSE 1998; SCHNORR und KRESSIN 2006). Die Zellen des Amnions sezernieren Fruchtwasser in die Amnionhöhle. Die äußere Seite des Amnions ist mit dem Chorion verbunden, welches sich aus Bindegewebe und Blutgefäßen zusammensetzt. Dadurch wird der Transport von Nährstoffen zum Fetus garantiert (RÜSSE 1998). Die Allantois verbindet sich mit dem Chorion zum Allantochorion und bildet damit den Abschluss der fetalen Membranen nach außen (SCHNORR und KRESSIN 2006).

##### 2.4.1.1.2 Histologisch

Das Amnion-Epithel des Schweines wird in der begrenzt vorhandenen Literatur als aus dünnen Epithel-ähnlichen Zellen bestehende Schicht beschrieben (TIEDEMANN 1979). Laut Studien aus den 70iger Jahren ähnelt es dem des Menschen (BERGSTROM 1971; LUDWIG et al. 1974). In der Humanmedizin wurde die Histologie des Amnions genauer untersucht. Grundsätzlich besteht das humane Amnion aus einem einlagigem Epithel, einer dicken Basalmembran und einem avaskulärem Stroma (NIKNEJAD et al. 2008). In der Literatur wird es mit einer Dicke von 0,02 bis 0,5 mm beschrieben (BOURNE 1960; REJZEK et al. 2001). Kuboidale bis zylindrische Epithelzellen bilden das einschichtige amniotische Epithel, welche an ihrer apikalen Oberfläche Mikrovilli tragen und direkt der Basalmembran aufliegen. Das darauffolgende Stroma kann in drei weitere Schichten unterteilt werden. Eine kompakte Kollagenschicht (Compact layer) bildet die erste der drei Schichten. Sie garantiert dem Amnion seine Zugfestigkeit. Als mittlere Schicht folgt eine aus Fibroblasten bestehende Schicht (Fibroblast layer). Dieser liegt nach außen hin noch die so genannte Schwammschicht (Spongy layer) auf. Sie ermöglicht es der Amnionmembran relativ frei über das fixierte

Chorion zu gleiten (BOURNE 1966; VON VERSEN-HÖYNCK et al. 2004). Abbildung 1 bietet einen schematischen Überblick über den Schichtaufbau des Amnions.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des humanen Amnions, modifiziert nach von-Versen-Höynck, 2004. (A) Epithel, (B) Basalmembran, (C) compact layer, (D) fibroblast layer, (E) spongy layer.**

#### 2.4.1.2 Zusammensetzung der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix des Amnions beinhaltet Komponenten, die für Prozesse wie Wundheilung, Fibrosierung und Wachstum eine entscheidende Rolle spielen. Typ- I und Typ- III Kollagen konnten sowohl in der Kompaktschicht, als auch in der aus Fibroblasten bestehenden Schicht nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden Kollagen der Typen V und VII, Fibronectin und Laminin als Bestandteile der extrazellulären Matrix detektiert (MALAK et al. 1993). Hauptbestandteil der Basalmembran sind Laminin-1, Laminin-5, Typ-IV Kollagen, Fibronectin und Kollagen vom Typ VII (FUKUDA et al. 1999; WILSHAW et al. 2006). Laminin und Kollagen vom Typ IV spielen eine entscheidende Rolle für die Anhaftung epithelialer Zellen an der Basalmembran, sowie bei zellulärer Migration, Proliferation und Differenzierung des Epithels (MARTINEZ-HERNANDEZ und AMENTA 1983; MARTIN und TIMPL 1987; KLEINMAN et al. 1993; ANDRIANI et al. 2003). Eine weitere Komponente der extrazellulären Matrix des Amnions stellt das Elastin dar (HIEBER et al. 1997; WILSHAW et al. 2006).

### 2.4.1.3 Eigenschaften der Amnionmembran

#### 2.4.1.3.1 Mechanische Eigenschaften

Der Amnionmembran wird eine hohe Elastizität zugesprochen. Dadurch eignet sie sich hervorragend, um sie mechanischen Belastungen auszusetzen, wie sie an Wundaufgaben gestellt sind. Aufgrund ihrer geringen Dicke und Dehnbarkeit lässt sie sich ideal an die Gegebenheiten eines Körpers anpassen (GAJIWALA und GAJIWALA 2004).

#### 2.4.1.3.2 Reepithelialisierung

Der Amnionmembran wird durch das Freisetzen von Wachstumsfaktoren die Fähigkeit zugesprochen, Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten und letztendlich die Reepithelialisierung zu beschleunigen. Transplantate mit denudierter Amnionmembran übertreffen jene ohne Amnionmembran hinsichtlich der Keratinozytenproliferation und –differenzierung (YANG et al. 2006). Eine Untersuchung über die Expression von Wachstumsfaktoren in Epithel und Stroma der Amnionmembran ergab, dass in intaktem Amnionepithel im Vergleich zu denudierter Amnionmembran eine höhere Konzentration an Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- $\beta$ , HGF und FGF vorzufinden ist (KOIZUMI et al. 2000). Typ-III und Typ-IV Kollagen, des Weiteren auch andere nicht-kollagene Glykoproteine wie Laminin und Fibronectin sind wichtige Liganden bei der Zelladhäsion. Durch sie werden Oberflächenrezeptoren für die Transduktion von Signalen gebunden, wodurch die bei der Epithelialisierung ablaufenden Prozesse beschleunigt werden (LO und POPE 2009).

#### 2.4.1.3.3 Einfluss auf die Analgesie

Die Stärke des Schmerzes wird bei Anwendung der Amnionmembran als Wundaufgabe reduziert. Welcher Mechanismus dem Ganzen zugrunde liegt, ist bis jetzt jedoch ungeklärt. Es wird allerdings angenommen, dass es mit dem schwächeren Kontakt zwischen Wundbett und Auflage zusammenhängt, da sensible Nervenendigungen bedeckt sind (DINO et al. 1966; SUBRAHMANYAM 1994; MARTINEZ PARDO et al. 1999; LEY-CHAVEZ et al. 2003). LEY-CHAVEZ (2003) weist zusätzlich darauf hin, dass bei Verwendung von Amnionmembran schmerzhaftes Verbandswechsel reduziert werden können.

#### *2.4.1.3.4 Einfluss auf die Entzündungsreaktion*

In verschiedensten Studien wurden Mechanismen beschrieben, auf welche Art und Weise die Amnionmembran Entzündungsreaktionen reduziert. Zum Einen wurde beschrieben, dass das Amnion die Expression des transforming growth factors- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und der entsprechenden Rezeptoren von Fibroblasten nach unten reguliert (TSENG et al. 1999; LEE et al. 2000) und damit das Risiko einer Fibrose stark reduziert. Zum Anderen wird davon berichtet, dass epitheliale sowie mesenchymale Zellen des Amnions die Expression proinflammatorischer Substanzen wie Zytokine oder Interleukin-10 supprimieren (HAO et al. 2000; SOLOMON et al. 2001). Des Weiteren wurde bewiesen, dass Amnionepithelzellen Metalloproteinase-Inhibitoren bilden (HAO et al. 2000; KIM et al. 2000), welche dazu führen, dass die polymorphkernige Zellinfiltration vermindert wird (HAO et al. 2000) und schließlich auch den Untergang der Keratinozyten herabsetzt (PARK und TSENG 2000). In einer Studie aus dem Jahre 2005 wurde ersichtlich, dass Hyaluronsäure Bestandteil des Amnions ist, als Ligand für CD44 agiert und somit die Adhäsion von Entzündungszellen an das amniotische Stroma induziert (HIGA et al. 2005).

#### *2.4.1.3.5 (Anti-)Angiogenese*

Laut einer Studie aus dem Jahre 1986 wird der Amnionmembran aufgrund ihres avaskulären Aufbaus ein anti-angiogenetischer Effekt zugeschrieben (BURGOS 1986). Sowohl im Amnionepithel, als auch in mesenchymalen Zellen wurden Substanzen wie z.B. Interleukin-10 ausfindig gemacht, welche anti-angiogenetische Effekte erzielen (HAO et al. 2000). Darauf folgende Studien hingegen deklarieren, dass die Amnionmembran durch Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) eher proangiogenetische Eigenschaften besitzt (MIGNATTI et al. 1989; BOGIC et al. 2000).

#### *2.4.1.3.6 Permeabilität*

In der Literatur wird darüber berichtet, dass Amnion den Verlust von Flüssigkeit, Elektrolyten, Proteinen, Wärme sowie Energie verhindert (REJZEK et al. 2001). Zudem wurde nachgewiesen, dass die Amnionmembran durchlässig für Sauerstoff ist (YOSHITA et al. 2004), was bei Nutzung der Amnionmembran als Wundauflage einen positiven Effekt beinhaltet, da der Heilungsprozess beschleunigt wird (LO und POPE 2009).

#### 2.4.1.3.7 Immunogenität

Die Immunogenität der Amnionmembran ist bis heute ein kontrovers diskutiertes Thema. Im Allgemeinen wird jedoch davon ausgegangen, dass die Amnionmembran wenig Immunogenität aufweist. Dennoch zeigte sich in einem Tierversuch, dass lebensfähige Amnionepithelzellen bei wiederholter Anwendung eine Immunreaktion auslösen (HORI et al. 2006). Im Jahre 1981 wurde nach Transplantation humaner Amnionepithelzellen keinerlei Abstoßungsreaktionen beobachtet (AKLE et al. 1981). Amnionmembranen, welche Glycerol- oder kryokonserviert wurden, weisen eine reduzierte Antigenität auf, da die Zellen nicht lebensfähig sind und keine Vaskularisation auftritt (MARAL et al. 1999).

#### 2.4.1.3.8 Antimikrobielle Wirkung

Die Amnionmembran exprimiert antimikrobiell wirksame Peptide des angeborenen Immunsystems. Dazu zählen unter anderem  $\beta$ -Defensine, Elafin oder Elastase-Inhibitoren (SPLICHAL und TREBICHAUSKY 2001). Des Weiteren werden weitere antimikrobiell und antientzündliche Substanzen, wie z.B. Lactoferrin in der Amnionmembran beschrieben (KANYSHKOVA et al. 2001). In einer Studie von 1973 wird davon berichtet, dass bei Auflage von Amnionmembran auf kontaminierte Wunden, sich die Keimzahl deutlich schneller verringert, als in den anderen Gruppen (ROBSON und KRIZEK 1973). Trotz der beschriebenen Faktoren wird davon ausgegangen, dass die geringer auftretende Besiedelung mit Keimen bei Anwendung von Amnion den durch die Amnionmembran induzierten schnelleren Wundverschluss zuzuschreiben ist (TALMI et al. 1991).

#### 2.4.1.4 Anwendung der Amnionmembran in der Medizin

Amnionmembran wird mittlerweile in verschiedensten Bereichen der Medizin eingesetzt. So wird sie z.B. im Bereich der Ophthalmologie benutzt, um okulare Oberflächen, z.B. nach Ulzera der Kornea, zu rekonstruieren (KIM und TSENG 1995; KIM et al. 2000; KRUSE und MELLER 2001; LIBERA et al. 2008). Des Weiteren kommt es zum immer weiterführenden Einsatz der Amnionmembran im dermatologischen und rekonstruktiven Bereich. Bereits 1952 wird davon berichtet, dass die Amnionmembran als temporäre biologische Wundaufgabe zur Abdeckung von Brandwunden in Frage kommt (DOUGLAS 1952). Ähnliches wird auch in neueren Studien ersichtlich (LO und POPE 2009). Weiterhin zeigen Studien, dass die humane Amnionmembran auch zur chirurgischen Rekonstruktion in der Mundhöhle benutzt werden kann (LAWSON 1985; KESTING et al. 2010). Laut einer Studie aus dem Jahre 2007, wurde



---

erfolgreich ein Blasenrekonstruktion unter Einsatz von Amnion durchgeführt (IIJIMA et al. 2007).

## **2.4.2 Porcine „Small Intestine Submucosa“**

### 2.4.2.1 Struktur und Aufbau

Die SIS wird aus dem Dünndarm von Schweinen gewonnen (HOEPPNER et al. 2009). Sie weist einen dreischichtigen Aufbau auf, der sich aus dem Stratum compactum der Tunica mucosa, der Tunica muscularis mucosae und der Tunica submucosa zusammensetzt (MACLEOD et al. 2004). Mittels aufwendiger Verfahren werden Schleimhaut, ausgewählte Anteile der Serosa, die äußeren Muskelschichten und übrig gebliebene Zellen entfernt (VOYTIK-HARBIN et al. 1997; COOK 2011). Die dadurch extrahierte extrazelluläre Matrix setzt sich aus Kollagen, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Glykoproteinen und anderen nicht zu den Kollagenen gehörenden Proteinen zusammen (HODDE et al. 1996; MCPHERSON et al. 1997).

### 2.4.2.2 Eigenschaften der „Small Intestine Submucosa“

#### *2.4.2.2.1 Mechanische Eigenschaften*

Der Small Intestine Submucosa werden äußerst positive Eigenschaften beim Gewebeaufbau zugesprochen. Sie bietet ein gutes Grundgerüst für Zellen, welche zum Gewebeaufbau benötigt werden. Während des Wiederherstellungsprozesses der Wundheilung wird ihr aufgrund ihrer extrazellulären Zusammensetzung ausreichende mechanische Stabilität zugesprochen (FRANKLIN und RUSSEK 2010).

#### *2.4.2.2.2 Immunogenität*

In einer Studie aus dem Jahre 2001 wurde durch subkutane Transplantation verschiedener Gewebe unter anderem auch die Immunogenität der SIS untersucht. Hierbei kam man zu der Schlussfolgerung, dass SIS eine geringe Immunantwort zur Folge hat (ALLMAN et al. 2001). Auch ANSALONI et al konnten in einer Studie an einer kleinen Menge an Probanden aus dem Jahre 2007 nachweisen, dass es bei der Anwendung von SIS zwar zu einer Antikörper-Reaktion kam, allerdings keinerlei klinisch sichtbare Abstoßungsreaktionen des Gewebes beobachtet werden konnte (ANSALONI et al. 2007) .

#### 2.4.2.2.3 Antimikrobielle Wirkung

Im Jahre 2002 wurde in einer Studie darüber berichtet, dass der porcinen SIS ein möglicher antibakterieller Effekt zuzusprechen ist. So zeigte sich in den Ergebnissen, dass Extrakte der SIS das Wachstum von *Staphylococcus aureus* für 13 h inhibieren konnten. (SARIKAYA et al. 2002).

#### 2.4.2.2.4 Angiogenese

Aufgrund ihrer Bestandteile wie Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen wie Heparin, Fibronectin und verschiedenen Typen von Kollagen, ist von einem proangiogenetischen Effekt auszugehen (LINHARDT und HILEMAN 1995; HODDE et al. 1996). Des Weiteren wurde gezeigt, dass in SIS basic fibroblast growth factor-2 (b-FGF-2), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und vascular endothelial growth factor (VEGF) zu finden sind (VOYTIKHARBIN et al. 1997; HODDE et al. 2001)

#### 2.4.2.3 Anwendung der SIS in der Medizin

Schon seit 1989 dokumentieren verschiedenste Studien den Einsatz von SIS als biologisches Ersatzmaterial. Die Bereiche ihrer Anwendung sind äußerst vielseitig. So wird in mehreren Publikationen von erfolgreichen Rekonstruktionen bei Hernien unter Einsatz von SIS berichtet (HELTON et al. 2005; OELSCHLAGER et al. 2006; FRANKLIN und RUSSEK 2010). Des Weiteren finden sich Verwendungen der SIS im Bereich der dermalen Wundheilung, sowohl im humanen, als auch im veterinärmedizinischen Bereich (MOSTOW et al. 2005; SCHALLBERGER et al. 2008), im Bereich der Dura-Rekonstruktion (BEJJANI und ZABRAMSKI 2007) und beim Verschluss von Analfisteln (CHAMPAGNE et al. 2006).

### 3 Material und Methoden

Die Durchführung des folgenden Versuches erfolgte in der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim in Zusammenarbeit mit der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Technischen Universität München.

Das Vorhaben wurde nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes bei der Regierung von Oberbayern genehmigt und ist dort unter dem Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531-183-09 abgelegt.

#### 3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienten insgesamt 35 Hybrid-Schweine (Schwäbisch Hällische x Pietrain). Dabei handelte es sich um 5 Muttersauen für die Kaiserschnitte zur Gewinnung der Ferkel und des Amnions. Von jedem Muttertier wurden jeweils 6 Ferkel verwendet.

Die Muttertiere waren gegen PRRS (*Porcilis PRRS*, Fa. Intervet Deutschland GmbH) geimpft und wurden in der 5. und 3. Woche ante partum gegen E.coli/Clostridien (*Enterisol Coli-Clost*, Fa. Boehringer Ingelheim, Deutschland) geimpft und gegen Ekto- und Endoparasiten behandelt (*Ivomec-S*, Fa. Merial GmbH, Deutschland). Die Tiere wurden alle gemäß der Schweinehaltungshygiene-VO gehalten und standen täglich unter tierärztlicher Aufsicht.

Während der Säugezeit wurden die Ferkel zusammen mit den Muttertieren in der Abferkelbucht auf Stroh gehalten. Zusätzlich zur Muttermilch hatten die Ferkel freien Zugang zu Milchaustauscher (*Bovifix Ferkel*, Fa. Zimmererwerke, Landshut, Deutschland). Ab dem 7. Lebenstag wurde ihnen zusätzlich Ferkelstarter (*Ferkelstarter UNI*, Fa. Zimmererwerke, Landshut, Deutschland) verabreicht, der ad libitum zur Verfügung stand. Am 14. Lebenstag erhielten alle Ferkel eine Impfung gegen *Mycoplasma hyopneumonie* (*Stellamune One-Shot*, Fa. Boehringer Ingelheim, Deutschland).

Nach 4 Wochen Säugezeit wurden die Versuchstiere abgesetzt. Zu diesem Zeitpunkt bekamen die Tiere betriebseigene Ohrmarken eingezogen, wurden gegen *porcines Circovirus 2* (*Ingelvac CircoFlex*, Fa. Boehringer Ingelheim, Deutschland) geimpft und in Buchten mit Nippeltränken sowie Längstrogfütterung eingestallt. Die Fütterung erfolgte mittels Fertigfuttermittel (*Ferkelstarter UNI*, *ZILA-Zuchtschwein Getreidemischung UNI*, Fa. Zimmererwerke, Landshut, Deutschland).

Die Einnistung erfolgte in ein gereinigtes und desinfiziertes, leer stehendes Stallabteil auf plan befestigtem Boden mit Stroheinstreu. Dort erhielten alle Ferkel für 14 Tage Enteroxid (*aniMedica-Enteroxid N, Fa. aniMedica GmbH, Deutschland*) zur Durchfall-Prophylaxe gegen Enterotoxämie, welches über das Futter oral verabreicht wird.

In der 8. Lebenswoche erfolgte der chirurgische Eingriff. Die Versuchstiere wurden ab diesem Zeitpunkt bis zur Abheilung der Wunden in mit Stroh eingestreuten Einzelboxen mit Sichtkontakt zu ihren Artgenossen aufgestellt, in welcher sich jeweils eine separate Nippeltränke zur freien Wasserversorgung und ein Futtertrog befanden.

### 3.2 Gruppeneinteilung

Den insgesamt 5 Gruppen wurden jeweils 6 Tiere zugeordnet. Es wurde darauf geachtet, dass eine gleiche Verteilung der Tiere bezüglich Geschlecht und Körpergewicht stattfand. In Tabelle 2 findet sich eine Übersicht über die Aufteilung der Gruppen.

**Tabelle 2: Übersicht über Gruppeneinteilung und der zur Abdeckung des Wunddefekts verwendeten Materialien**

Gruppe	Material	Tier-Nr.
I	keine Rekonstruktion „Kontrolle“	1-6
II	Small Intestine Submucosa (SIS- Surgisis Soft Tissue Graft-einlagig 7x10cm, Cook Medical)	7-12
III	autologe Spalthaut	13-18
IV	autofetales Amnion	19-24
V	allogenes Amnion	25-30

### 3.3 Kaiserschnitt (Sectio caesarea)

Der Kaiserschnitt wurde - wie im Lehrbuch „Schweinekrankheiten“ (SCHNURBUSCH 2006) beschrieben - zwischen dem 113. und 115. Trächtigkeitstag durchgeführt.

#### 3.3.1 Anästhesie, Analgesie und Antibiose

Die trächtigen Muttersauen wurden unter einer Prämedikation mit 10mg/kg KGW Ketamin i.m. (*Ursotamin®*, Fa. Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und 2mg/kg KGW Azaperon i.m. (*Stresnil®*, Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und anschließender Narkoseeinleitung mit 5% Isofluran (*Isoba®*, Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und Sauerstoff (3-5l/min) unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran operiert.

Zur intra- sowie postoperativen Analgesie erhielten die Tiere präoperativ 20-50mg/kg KGW Metamizol (*Vetalgin®*, Fa. Intervet Deutschland, GmbH, Unterschleissheim, Deutschland) und 0,4mg/kg KGW Meloxicam (*Metacam® 20mg/ml*, Fa. Boehringer Vetmedica, Ingelheim, Deutschland). Über einen Venenverweilkatheter in einer Ohrvene erhielten die Sauen während des Kaiserschnitts eine Dauertropfinfusion (*Isotone Kochsalzlösung 0,9%®*, Fa. B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Als antibiotische Therapie wurde den Tieren zusätzlich perioperativ 2mg/kg KGW Cobactan (*Cobactan® 2,5%*, Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und 2mg/kg KGW Marbocyl (*Marbocyl® 10%*, Fa. Vetoquinol GmbH, Ravensburg, Deutschland) intramuskulär appliziert und diese Behandlung für weitere vier Tage postoperativ weitergeführt.

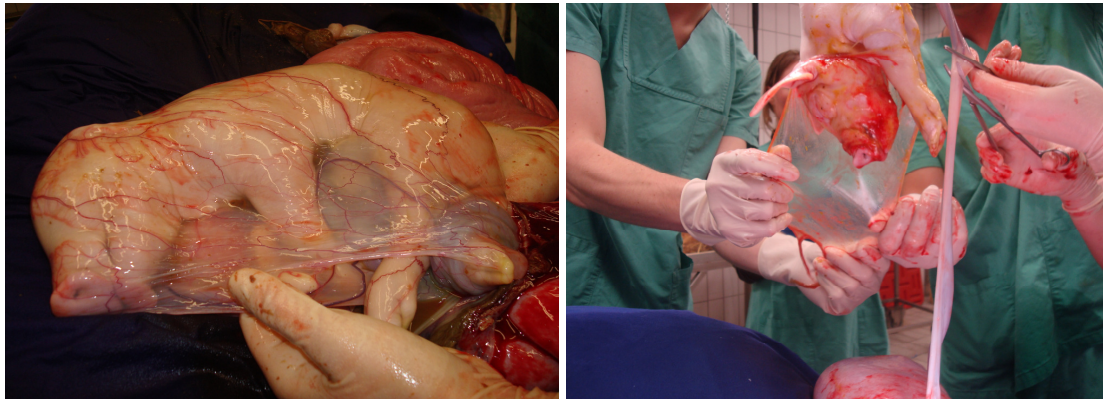
#### 3.3.2 Reinigung und Desinfektion des Muttertieres

Zur Reinigung und Desinfektion der Körperoberfläche wurde das Muttertier an ein transportables Isoflurangerät angeschlossen und mit Wasser und Jodseife (*Jodosept®*, Fa. Vetoquinol GmbH, Ravensburg, Deutschland) von grobem Schmutz befreit, rasiert und in diesem Zustand auf einen gepolsterten Operationstisch verbracht. Der gesamte Schnittbereich wurde großzügig mit Alkohol eingesprüht und nach entsprechender Trocknungsphase mit Jodspray (*Vetsept®*, Fa. Albrecht, Aulendorf, Deutschland) desinfiziert.

### 3.3.3 Durchführung der Sectio caesarea und Gewinnung des Amnions

Die Schnittführung erfolgte von kranial nach kaudal ca. 10 cm ventral der Dornfortsätze der Lendenwirbelsäule und 10 cm kranial des Hüfthöckers.

Nach Durchtrennung der Haut, des subkutanen Bindegewebes und des Musculus obliquus externus abdominis, des Musculus obliquus internus abdominis und des Musculus transversus abdominis wurde das retroperitoneale Fettgewebe sorgfältig mit einer anatomischen Pinzette abpräpariert und das darunterliegende Peritoneum mit einem Scherenschlag eröffnet und auf die volle Länge des Hautschnitts erweitert. Der gravide Uterus wurde vollständig vorverlagert, aufgrund der Gewinnung des Amnions an zwei Stellen eröffnet und die Früchte vorsichtig unter Beachtung der Amnionhülle entwickelt (Abb.2).



**Abbildung 2: Gewinnung des Amnions**

Die porcine Amnionmembran der trächtigen Sauen wurde mit einer sterilen Metzenbaumschere sorgfältig abpräpariert, mit Kochsalzlösung (*NaCl-Spüllösung 0,9%, Fa. Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland*) von Blut reingewaschen und zur weiteren Bearbeitung in einem mit steriler Kochsalzlösung gefüllten Behälter ins Labor verbracht.

Nach vollständiger Entleerung des Uterus erfolgte der Wundverschluss. Der Uterus, das Peritoneum und die Muskulatur wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial der Stärke USP 6 (*Surgicryl PGA®, Fa. SMI, St.Vith, Belgium*) verschlossen. Der abschließende Hautverschluss erfolgte durch einen nichtresorbierbaren Faden der Stärke USP 3 (*Dagrofil green®, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland*).

### 3.4 Aufbereitung des Amnions

Die porcine Amnionmembran wurde unter einer so genannten "Laminar flow Hood" (*Herasafe HS 12/2*<sup>®</sup>, Fa. Heraeus, Darmstadt, Deutschland) präpariert. Hierfür wurde der komplette Arbeitsbereich mit einem saugfähigen Material (*Molinea*<sup>®</sup>, Fa. Hartmann, Heidenheim, Deutschland) abgedeckt. Zusätzlich erfolgte eine Abdeckung mittels steriler Folie (*Foliodrape*<sup>®</sup>, Fa. Hartmann, Heidenheim, Deutschland). Die porcine Amnionmembran wurde sorgfältig von Resten des Chorions befreit und mittels sterilem Einmalskalpell in einzelne Membranstücke mit einer Größe von 5 x 5 cm geschnitten. Jedes Membranstück wurde mit der epithelialen Seite nach oben auf ein Nitrocellulose-Tuch (*Raucocel*<sup>®</sup>, Fa. Lohmann-Rauscher, Rengsdorf, Deutschland) gelegt (Abb.3) und jeweils an den Ecken mit 7-0 Seidenfaden (*Perma Hand-Seide*<sup>®</sup>, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) mittels Einzelknopfheften fixiert.

#### 3.4.1 Herstellung des Konservierungsmediums

Zur Herstellung des Konservierungsmediums wurden insgesamt 250ml DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*, Fa. J-R Scientific, Woodland, USA), 5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung und 5ml Amphotericin B miteinander versetzt und steril filtriert. Hiervon wurden jeweils 20ml in einen Falcon-Tube gefüllt. Des Weiteren wurde in jeden Falcon-Tube zusätzlich 20ml steril filtriertes Glycerin (*Rotipurán*>86%, p.a., Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) pipettiert, wodurch sich insgesamt Konservierungslösung für 10 Tubes á 40ml ergaben.

#### 3.4.2 Kryokonservierung der Amnionmembran

Die mit Amnion bespannten Patches wurden mit einer sterilen Pinzette in die Tubes gegeben. Es wurde dabei darauf geachtet, dass das Amnionepithel in Richtung des Mediums ausgerichtet wurde und auf diese Weise eine Berührung des Membran-Patches mit der Wand des Tubes verhindert werden konnte. Die Tubes wurden bei -80°C gelagert und konserviert. Eine Stunde vor Beginn der Operation wurden die tiefgefrorenen Membranen in einem 28°C warmen Wasserbad aufgetaut.



### 3.5 Setzung des Hautdefektes

30 Ferkel wurden im Alter von 8 Wochen und einem durchschnittlichen Gewicht von 16kg dem chirurgischen Eingriff unterzogen. Dabei kam es bei einem für die Kontrollgruppe vorgesehenes Tier zu einem Narkosezwischenfall, worauf dieses verstarb.

#### 3.5.1 Durchführung

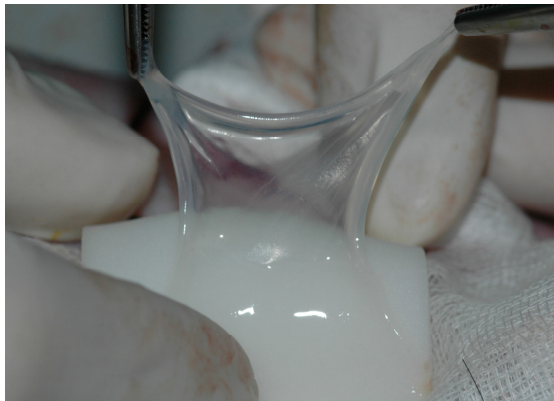
Die Erzeugung der Hautwunden erfolgte unter Inhalationsnarkose. Die Ferkel erhielten als Prämedikation 10mg/kg KGW Ketamin i.m. (*Ursotamin®*, Fa. Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg, Deutschland), 2mg/kg KGW Azaperon i.m. (*Stresnil®*, Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und 0,05mg/kg KGW Atropin i.m. (*Atropinsulfat®*, Fa. B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Anschließend erfolgte die Narkoseeinleitung mit 5% Isofluran (*Isoba®*, Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und Sauerstoff (3-5l/min). Zur Aufrechterhaltung der Narkose dienten 1-2% Isofluran.

Zur intra- sowie postoperativen Analgesie wurde den Tieren perioperativ 20-50mg/kg KGW Metamizol (*Vetalgin®*, Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und 0,4mg/kg KGW Meloxicam (*Metacam® 20mg/ml*, Fa. Boehringer Vetmedica, Ingelheim, Deutschland) i.m. verabreicht. Über einen venösen Zugang wurde dem Tier zur Kreislaufstabilisierung NaCl-Lösung (*Isotone Kochsalzlösung-0,9%®*, Fa. B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Deutschland) zugeführt.

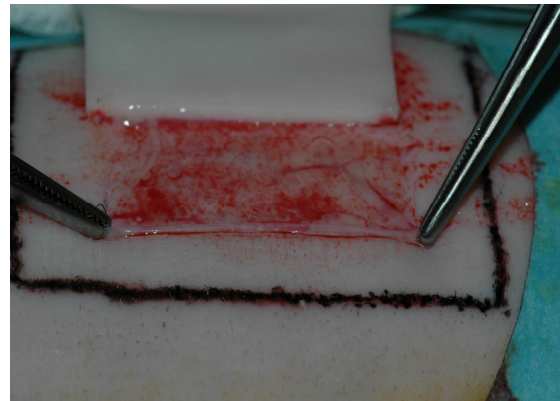
Um die physiologische Körpertemperatur der Tiere konstant zu halten, wurden sie auf dem OP-Tisch auf einer Isoliermatte in rechter Seitenlage platziert. Die gesamte Rückenhaut wurde gereinigt, enthaart und mit 7,5%iger Polyvidon-Jod-Lösung (*Jodosept®*, Fa. Vétoquinol GmbH, Ravensburg, Deutschland) und 70%iger Isopropanol-Lösung desinfiziert. Nach Entfettung der Haut wurde mit einer Schablone ein 6 x 6 cm großes Areal auf dem Rücken der Tiere markiert und bis in den subepidermalen Bereich tätowiert, um den Verlauf der natürlichen Wundkontraktion fotodokumentarisch besser festhalten zu können und das Areal zur Probiopsieentnahme deutlich zu kennzeichnen. Innerhalb dieser Areale wurde mit einem Dermatom (*Acculan®3Ti Dermatom*, Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) auf einer Fläche von 5 x 5 cm 1,5 mm-dicke Spalthaut abgetragen (Abb.5). Die Spalthautareale wurden randomisiert und die Tiere, wie in Tabelle 2 aufgeführt, der entsprechenden Gruppe zugeordnet.



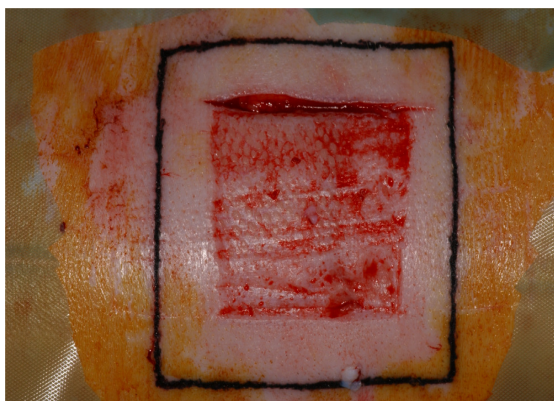
Das jeweilige Gewebe wurde über den frisch geschaffenen Hautdefekt aufgespannt (Abb.4) und mit einem nicht resorbierbaren Faden der Stärke 4-0 (*Ethicon Ethilon®*, Fa. Johnson u. Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgium), mit insgesamt 8 Einzelknopfheften an den Wundrändern adaptiert (Abb.6). Dabei wurde darauf geachtet, dass die jeweilige Wundauflage so plan wie möglich auf der Wunde aufliegt, um Luftkammern und damit verbundene Adaptionsfehler des Gewebes zu vermeiden. Bei den sechs Tieren, die autologe Spalthaut als Wundauflage erhielten, wurde für die Gewinnung dieser 1,5mm-dicken Spalthaut mittels Dermatom (*Acculan®3Ti Dermatom*, Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) ein zweiter 5 x 5 cm großer Defekt auf der kontralateralen Rückenseite gesetzt.



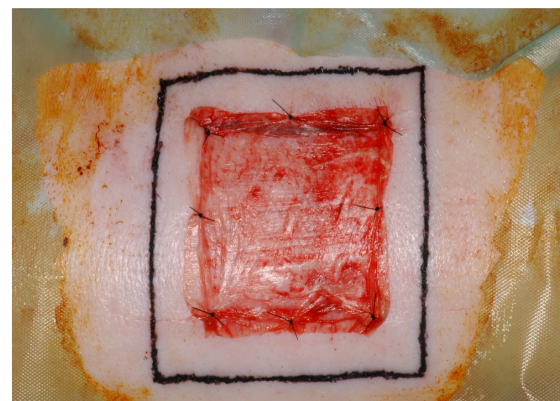
**Abbildung 3: Gereinigtes Amnion**



**Abbildung 4: Auflegung gereinigter Amnionmembran auf die Wundfläche**



**Abbildung 5: Hautwunden-Defekt vor Abdeckung**



**Abbildung 6: Hautwunden-Defekt nach Abdeckung**

### 3.5.2 Nachsorge

Die Wundflächen wurden mit einem weichen, silikonbeschichteten Schaumverband abgedeckt (*Mepilex®*, Fa. Mölnlycke Health Care AB, Göteborg, Schweden) und zusätzlich mit einem Bauchverband, bestehend aus einer saugfähigen Polstergrundlage (*Rolta® Wattebinde 10cm x 3 m*, Fa. Henry Schein Vet GmbH, Hamburg, Deutschland) und einer elastischen selbsthaftenden und atmungsaktiven Binde (*CoFlex® Binden 10cm x 4,5m*, Fa. Henry Schein Vet GmbH, Hamburg, Deutschland) vor etwaigen Verunreinigungen geschützt. Der Verbandswechsel erfolgte alle 3 Tage. Die 6 Tiere, deren Hautwundendefekt mit autologer Spalthaut versorgt wurde, erhielten an der Entnahmestelle ebenfalls eine sterile nicht klebende Wundabdeckung (*Jelonet® 10cm x 10cm*, Fa. Smith & Nephew GmbH, Schenefeld, Deutschland).

### 3.6 Photodokumentation und Probengewinnung

Wie in Abbildung 7 dargestellt fanden die Probiopsien am 3., 7., 10., 30. und 90. postoperativen Tag (POT) statt. Die Entnahme erfolgte unter Inhalationsnarkose, wobei die Tiere als Prämedikation 10mg/kg KGW Ketamin i.m. (*Ursotamin®*, Fa. Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg, Deutschland), 2mg/kg KGW Azaperon i.m. (*Stresnil®*, Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und 0,05mg/kg KGW Atropin i.m. (*Atropinsulfat®*, Fa. B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Deutschland) erhielten. Die anschließende Narkoseeinleitung wurde mit 5% Isofluran (*Isoba®*, Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und Sauerstoff (3-5l/min) durchgeführt. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit 1-2% Isofluran.

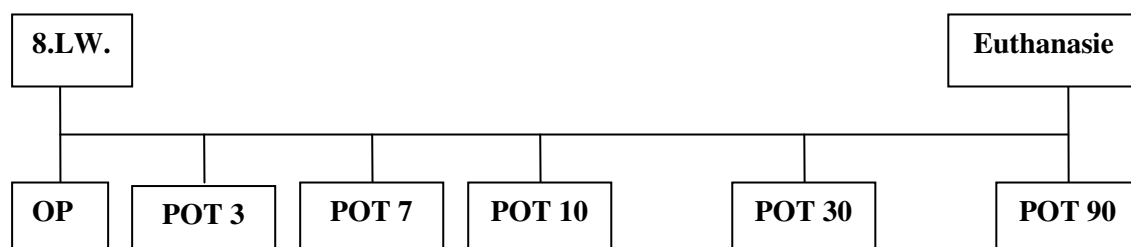


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Probiopsien (POT= postoperativer Tag)

Die Proben wurden mittels einer 6,0mm tiefen Hautstanze (*Biopsy Punch Ø 6mm sterile®*, Fa. Kruuse, Henry Schein Vet GmbH, Deutschland) unter sterilen Bedingungen entnommen und direkt nach Entnahme in eine 4%ige Formalinlösung eingelegt. Der Wundheilungsverlauf sowie die Wundkontraktion wurden mit einer Digitalkamera (*DMC-FZ4, Panasonic, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., Osaka, Japan*) dokumentiert. Nach der Biopsieentnahme erhielten alle Schweine ein Pflaster auf den Hautwundendefekt (*Cutiplast® sterile 10cm x 8 cm*, Fa. Smith & Nephew GmbH, Schenefeld, Deutschland).

### 3.7 Finalisierung

Am Finaltag (POT 90) wurden alle Tiere des Versuches nach Entnahme der letzten Stanzprobe euthanasiert. Hierfür wurden sie zunächst mit 10mg/kg KGW Ketamin i.m. (*Ursotamin®*, Fa. Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und 2mg/kg KGW Azaperon i.m. (*Stresnil®*, Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) in Narkose gelegt und anschließend mit 45mg/kg KGW Pentobarbital intravenös (*Release®*, Fa. WdT-Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland) eingeschlüfert.

### 3.8 Histologische Aufarbeitung

Die Biopate wurden im Labor der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Technischen Universität München in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom (*Hyrax M 55, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland*) 5µm dick geschnitten. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht bei 48°C im Wärmeschrank (*Thermo Scientific Function Line®*, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland). Die angefertigten Schnitte wurden anschließend mittels einer Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE) und Elastica-van-Gieson-Färbung (EvG) gefärbt. Beide Färbungen wurden mittels eines Färbeautomaten (*Micro HMS 740 Robot-Stainer, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*) durchgeführt. Die gefärbten Präparate wurden anschließend lichtmikroskopisch (*Leitz Aristoplan, Fa. Leitz, Wetzlar, Deutschland*) beurteilt.

### 3.9 Histologische Auswertung

Die histologische Beurteilung der Hautbiopate erfolgte anhand der HE- und EvG-gefärbten Schnitte zunächst anhand einer qualitativen Beurteilung der Veränderungen. Hierzu wurde der zeitliche und qualitative Verlauf der Wundheilung entsprechend der beschriebenen Wundheilungsphasen (exsudative, resorptive und reparative Phase) der Behandlungsgruppen

---

beurteilt und untereinander verglichen. Der Zustand der Hautstanzen am Ende des Untersuchungszeitraumes wurde zusätzlich mit einer Kontrollstanze der Haut eines nicht behandelten Tieres derselben Altersgruppe und Größe verglichen. In einem weiteren Schritt erfolgten einzelne quantitative Untersuchungen zum Vergleich der Gruppen. An den HE-gefärbten Schnittpräparaten wurde zur Beurteilung der resorptiven und reparativen Phase an jeweils 5 Tieren pro Gruppe die Dicke der Granulationsgewebsschicht gemessen. Hierfür wurden insgesamt 5 Messungen pro Stanze durchgeführt. Zur Beurteilung der Narbenbildung wurde bei allen Tieren der Gruppen an Tag 90 die Anzahl der vorhandenen Hautanhangsgebilde (apokrine Drüsen und Haarfollikel) ermittelt. Es muss hierbei darauf hingewiesen werden, dass innerhalb der Kontrollgruppe nur 5 statt 6 Tiere zur Verfügung standen, da ein Tier anhand eines Narkosezwischenfalls verstarb.

### **3.10 Immunhistologie**

Für die Durchführung der Immunhistologie wurden anhand der Hämatoxylin/Eosin-Präparate die jeweils wundarchitektonisch schönste und repräsentativste Entnahmereihe pro Gruppe ausgewählt. Als entscheidende Auswahlkriterien dienten hierbei die Gewebsarchitektur der Stanze und die Vollständigkeit hinsichtlich der einzelnen Hautschichten. Basierend auf dieser Auswahl, wurden weitere 5 µm dicke Paraffinschnitte der Stanzen erstellt und entsprechend auf *Superfrost Plus*<sup>®</sup> Gläser (Fa. Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht bei 48°C im Wärmeschrank (*Thermo Scientific Function Line*<sup>®</sup>, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland).

### 3.10.1 $\alpha$ -Smooth-Muscle Actin

Zur Beurteilung der Wundkontraktion und Vernarbung wurde eine Immunhistologie mittels Actin-Antikörper durchgeführt. Zur Detektion der  $\alpha$ -Aktin-positiven Myofibroblasten, wurde „monoclonal mouse [1A4] to alpha smooth muscle actin (Fa. Abcam, Cambridge, United Kingdom) verwendet. Die Auszählung der Aktin-positiven Zellen erfolgte an Tag 10 in jeweils 5 High Power Fields (HPF) pro Stanzenhälfte unter dem *Leitz Aristoplan Mikroskop* (Fa. Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Zu diesem Zeitpunkt war in allen Stanzen eine Differenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten histologisch erkennbar. Es wurden insgesamt 10 Vergleiche zwischen den Gruppen durchgeführt. In Tabelle 3 findet sich das zur immunhistologischen Färbung verwendete Protokoll:

**Tabelle 3: Durchführung der Immunhistologie auf  $\alpha$  -Smooth-Muscle Actin**

<b>Entparaffinierung</b>	2x Xylol (je 10min) 1x Xylol/Ethanol (10min)
<b>Rehydrierung</b>	Absteigende Alkoholreihe (Ethanol): 2x 100%; 1x 96%; 1x 80%; 1x 70%; 1x 50% (je 2min) Spülung in bi- destilliertem Wasser (1min)
<b>Antigen-Demaskierung</b>	Erhitzung in 0.01mol/L Citratpuffer-Lösung (pH 6.0) in der Mikrowelle ( <i>Intellowave<sup>®</sup></i> Fa. LG Electronics Deutschland GmbH, Willich, Deutschland) auf 600W (15min); anschließend Abkühlung für 20min
<b>Spülschritt</b>	1x in PBS- Puffer pH 7,4 (1min)
<b>Endogene Peroxidase-Blockierung</b>	Inkubation der Proben mit 3%igem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in bi- destilliertem Wasser, dunkel stellen (10min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (1min) Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (1min)
<b>Abtrocknung</b>	Abtrocknung der Schnitte mittels Filterpapier
<b>Blockierung</b>	Applikation des 3%igen Blocking-Reagenz, bestehend aus in PBS gemischtem Ziegen Serum ( <i>normal goat serum S-1000</i> , Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 30min
<b>Abtrocknung</b>	Abnahme des Blocking-Reagenz mit Filterpapier

<b>Applikation des 1. Antikörpers</b>	Applikation des 1:80 in PBS verdünnten Primärantikörpers ( <i>mouse monoclonal [IA4] to alpha smooth muscle actin [Ab7817], Fa. Abcam, Cambridge, United Kingdom</i> ); Einwirkzeit 1 h bei Raumtemperatur
<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 3min)
<b>Abtrocknung</b>	Abtrocknung der Schnitte mittels Filterpapier
<b>Applikation des 2. Antikörpers</b>	Applikation des 1:200 in PBS verdünnten Sekundärantikörpers ( <i>biotinylated anti-mouse IgG, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) für 45min
<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 3min)
<b>Avidin- Biotin-Komplex</b>	Applikation der Streptavidin-Peroxidase-Lösung ( <i>Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) für 45min
<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 3min)
<b>Applikation des chromogenen DAB</b>	Auftragen der 0,2%ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /DAB-Lösung (3min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (2min)
<b>Gegenfärbung</b>	Gegenfärben in Hämalau ( <i>Mayer's hematoxylin, Fa. Bio Optica, Mailand, Italien</i> ) für 3 sec Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser (10min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (1min)
<b>Dehydrierung</b>	Aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol): 1x 50%; 1x 70%; 1x 80%; 1x 96%; 2x 100% (je 2min)  1x Xylol/Ethanol (5min) 2x Xylol (je 5min)
<b>Eindeckeln</b>	Eindeckeln der Schnitte ( <i>Thermo Scientific<sup>®</sup>, Fa. Menzel Gläser GmbH, Braunschweig, Deutschland</i> ) mit DPX ( <i>Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland</i> )



### 3.10.2 von Willebrand Faktor

Zur Beurteilung der Neovaskularisation wurde eine Immunhistologie mittels Antikörper gegen den von Willebrand-Faktor (vWF) durchgeführt. Zur Detektion des Gefäßendothels wurde „polyclonal rabbit anti-human von Willebrand factor“ (Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Hierfür wurden repräsentativ die Tage 7 und 10 herangezogen und beurteilt, da sich zu diesem Zeitpunkt in allen Gruppen die resorptive Wundheilungsphase mit maximaler Bildung neuer Gefäße histologisch nachweisen ließ. Die Auszählung der Gefäße erfolgte an der Grenze des oberen Drittels des Granulationsgewebes. Unter dem *Leitz Aristoplan Mikroskop* (Fa. Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) wurden in je 5 verschiedenen High Power Fields (HPF) pro Stanzenhälfte die Gefäße gezählt. Die Gefäßanzahl wurde sowohl pro Gruppe an den Tagen 7 und 10 verglichen, als auch in 10 unabhängigen Vergleichen die verschiedenen Tage und Gruppen untereinander. In Tabelle 4 findet sich das zur immunhistologischen Färbung verwendete Protokoll:

**Tabelle 4: Durchführung der Immunhistologie auf von Willebrand**

<b>Entparaffinierung</b>	2x Xylol (je 10min) 1x Xylol/Ethanol (10min)
<b>Rehydrierung</b>	Absteigende Alkoholreihe (Ethanol): 2x 100%; 1x 96%; 1x 80%; 1x 70%; 1x 50% (je 2min) Spülung in bi-destilliertem Wasser (1min)
<b>Antigen-Demaskierung</b>	Erhitzung der Schnitte in der <i>Dako Target Retrieval Solution</i> <sup>®</sup> (Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) bei 97°C im Wasserbad ( <i>Typ 1003, Fa. Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland</i> ) (20min); anschließend Abkühlung für 20min
<b>Spülschritt</b>	1x in PBS- Puffer pH 7,4 (1min)
<b>Endogene Peroxidase-Blockierung</b>	Inkubation der Proben mit 3%igem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in bi- destilliertem Wasser, dunkel stellen (10min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (1min) Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (1min)
<b>Abtrocknung</b>	Abtrocknung der Schnitte mittels Filterpapier
<b>Blockierung</b>	Applikation des 3%igen Blocking-Reagenz, bestehend aus in PBS gemischtem Ziegen Serum ( <i>normal goat serum S-1000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) für 30min

<b>Abtrocknung</b>	Abnahme des Blocking-Reagenz mit Filterpapier
<b>Applikation des 1. Antikörpers</b>	Applikation des 1:200 in PBS verdünnten Primärantikörpers ( <i>polyclonal rabbit anti-human von Willebrand factor, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark</i> ) Einwirkzeit 1h bei Raumtemperatur
<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 5min)
<b>Abtrocknung</b>	Abtrocknung der Schnitte mittels Filterpapier
<b>Applikation des 2. Antikörpers</b>	Applikation des 1:200 in PBS verdünnten Sekundärantikörpers ( <i>biotinylated anti-rabbit IgG, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) für 45min
<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 5min)
<b>Avidin- Biotin-Komplex</b>	Applikation der Streptavidin-Peroxidase-Lösung ( <i>Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) für 45min
<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 3min)
<b>Applikation des chromogenen DAB</b>	Auftragen der 0,2%ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /DAB-Lösung (2min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (2min)
<b>Gegenfärbung</b>	Gegenfärben in Hämalaun ( <i>Mayer's hematoxylin, Fa. Bio Optica, Mailand, Italien</i> ) für 3 sec Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser (10min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (1min)
<b>Dehydrierung</b>	Aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol): 1x 50%; 1x 70%; 1x 80%; 1x 96%; 2x 100% (je 2min)  1x Xylol/Ethanol (5min) 2x Xylol (je 5min)
<b>Eindeckeln</b>	Eindeckeln der Schnitte ( <i>Thermo Scientific<sup>®</sup>, Fa. Menzel Gläser GmbH, Braunschweig, Deutschland</i> ) mit DPX ( <i>Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland</i> )



### 3.10.3 Ki-67

Zur Bestimmung der verbleibenden Proliferationsaktivität des Epithels in der regenerativen Phase am Ende des Untersuchungszeitraumes wurde eine Immunhistologie mithilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 durchgeführt. Hierfür wurde der Antikörper „monoclonal mouse anti-human Ki-67 antigen“ (Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Repräsentativ für die Proliferationsaktivität wurden die Tage 30 und 90 herangezogen und beurteilt. Hierfür wurden zum Einen die Tage 30 und 90 für jede Gruppe untereinander verglichen, zum Anderen 10 Vergleiche zwischen den Gruppen und Tagen aufgestellt. Insgesamt wurden 10 High Power Fields (HPF) unter dem *Leitz Aristoplan Mikroskop* (Fa. Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) ausgezählt. In Tabelle 5 findet sich das zur immunhistologischen Färbung verwendete Protokoll:

**Tabelle 5: Durchführung der Immunhistologie mit Ki-67**

<b>Entparaffinierung</b>	2x Xylol (je 10min) 1x Xylol/Ethanol (10min)
<b>Rehydrierung</b>	Absteigende Alkoholreihe (Ethanol): 2x 100%; 1x 96%; 1x 80%; 1x 70%; 1x 50% (je 2min) Spülung in bi-distilliertem Wasser (1min)
<b>Antigen-Demaskierung</b>	Erhitzung der Schnitte in der <i>Dako Target Retrieval Solution®</i> (Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) bei 97°C im Wasserbad ( <i>Typ 1003, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel</i> ) (20min); anschließend Abkühlung für 20min
<b>Spülschritt</b>	1x in PBS- Puffer pH 7,4 (1min)
<b>Endogene Peroxidase-Blockierung</b>	Inkubation der Proben mit 1%igem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) in bi-distilliertem Wasser, dunkel stellen (30min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (1min) Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (1min)
<b>Abtrocknung</b>	Abtrocknung der Schnitte mittels Filterpapier
<b>Blockierung</b>	Applikation des 5%igen Blocking-Reagenz bestehend aus in PBS gemischtem Ziegen Serum ( <i>normal goat serum S-1000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) (30min)
<b>Abtrocknung</b>	Abnahme des Blocking-Reagenz mit Filterpapier

<b>Applikation des 1. Antikörpers</b>	Applikation des 1:50 in PBS verdünnten Primärantikörpers ( <i>monoclonal mouse anti-human Ki67-antigen, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark</i> ) Einwirkzeit 1h bei Raumtemperatur
<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 3min)
<b>Abtrocknung</b>	Abtrocknung der Schnitte mittels Filterpapier
<b>Applikation des 2. Antikörpers</b>	Applikation des 1:200 in PBS verdünnten Sekundärantikörpers ( <i>biotinylated anti-mouse IgG, Fa. Vector Laboratories, Burlingame USA</i> ) für 45min
<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 3min)
<b>Avidin- Biotin-Komplex</b>	Applikation der Streptavidin-Peroxidase-Lösung ( <i>Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame USA</i> ) für 45min
<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 3min)
<b>Applikation des chromogenen DAB</b>	Auftragen der 0,2%ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /DAB-Lösung (8min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (2min)
<b>Gegenfärbung</b>	Gegenfärben in Hämalau ( <i>Mayer's hematoxylin, Fa. Bio Optica, Mailand, Italien</i> ) für 3 sec Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser (10min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (1min)
<b>Dehydrierung</b>	Aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol): 1x 50%; 1x 70%; 1x 80%; 1x 96%; 2x 100% (je 2min)  1x Xylol/Ethanol (5min) 2x Xylol (je 5min)
<b>Eindeckeln</b>	Eindeckeln der Schnitte ( <i>Thermo Scientific<sup>®</sup>, Fa. Menzel Gläser GmbH, Braunschweig</i> ) mit DPX ( <i>Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland</i> )

### 3.10.4 Laminin

Um die Epithelialisierung und Neubildung einer Basalmembran darzustellen, wurde eine Immunhistologie basierend auf einem Antikörper gegen Laminin eingesetzt. Hierzu wurde „polyclonal rabbit anti-Laminin“ (Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Die Beurteilung erfolgte entlang der gesamten Entnahmereihe von Tag 3 bis Tag 90 unter dem *Leitz Aristoplan Mikroskop* (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Entsprechend des Vorhandenseins wurde mit vollständig vorhanden (+), teilweise vorhanden ( $\pm$ ) und nicht vorhanden (-) kategorisiert. In Tabelle 6 findet sich das zur immunhistologischen Färbung verwendete Protokoll:

**Tabelle 6: Durchführung der Immunhistologie auf Laminin**

<b>Entparaffinierung</b>	2x Xylol (je 10min) 1x Xylol/Ethanol (10min)
<b>Rehydrierung</b>	Absteigende Alkoholreihe (Ethanol): 2x 100%; 1x 96%; 1x 80%; 1x 70%; 1x 50% (je 2min) Spülung in bi-distilliertem Wasser (1min)
<b>Antigen-Demaskierung</b>	Auftragen von Proteinase K ( <i>Proteinase K ready-to-use</i> , Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) (5min)
<b>Spülschritt</b>	1x in PBS- Puffer pH 7,4 (1min)
<b>Endogene Peroxidase-Blockierung</b>	Inkubation der Proben in 1%igem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) in bi-distilliertem Wasser, dunkel stellen (30min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (1min) Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (1min)
<b>Abtrocknung</b>	Abtrocknung der Schnitte mittels Filterpapier
<b>Blockierung</b>	Applikation des 5%igen Blocking-Reagenz bestehend aus in PBS gelösten Magermilchpulver ( <i>Bio-Magermilchpulver</i> , Fa. Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell, Deutschland) (30min)
<b>Abtrocknung</b>	Abnahme des Blocking-Reagenz mit Filterpapier
<b>Applikation des 1. Antikörpers</b>	Applikation des 1:50 in 2%iger BSA-PBS-Pufferlösung ( <i>albumin from bovine serum</i> , Fa. Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) verdünnten Primärantikörpers ( <i>polyclonal rabbit anti-laminin</i> , Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) Einwirkzeit 30min bei Raumtemperatur

<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 3min)
<b>Abtrocknung</b>	Abtrocknung der Schnitte mittels Filterpapier
<b>Applikation des 2. Antikörpers</b>	Applikation des 1:200 in 2%iger BSA-PBS-Pufferlösung verdünnten Sekundärantikörpers ( <i>biotinylated anti-rabbit IgG, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) für 45min
<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 3min)
<b>Avidin- Biotin-Komplex</b>	Applikation der Streptavidin-Peroxidase-Lösung ( <i>Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) für 45min
<b>Spülschritt</b>	3x Spülen der Proben in PBS-Puffer pH 7,4 (jeweils 5min)
<b>Applikation des chromogenen DAB</b>	Auftragen der 0,2%ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /DAB-Lösung (3min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (2min)
<b>Gegenfärbung</b>	Gegenfärben in Hämalun ( <i>Mayer's hematoxylin, Fa. Bio Optica, Mailand, Italien</i> ) für 3 sec Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser (10min)
<b>Spülschritt</b>	Spülung in bi- destilliertem Wasser (1min)
<b>Dehydrierung</b>	Aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol): 1x 50%; 1x 70%; 1x 80%; 1x 96%; 2x 100% (je 2min)  1x Xylol/Ethanol (5min) 2x Xylol (je 5min)
<b>Eindeckeln</b>	Eindeckeln der Schnitte ( <i>Thermo Scientific<sup>®</sup>, Fa. Menzel Gläser GmbH, Braunschweig</i> ) mit DPX ( <i>Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland</i> )

---

### 3.11 Statistik

Die statistischen Erhebungen erfolgten anhand des Programms SPSS 17.0 und Microsoft Office Excel 2003 für Windows XP an der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München. Von den stetig messbaren Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Für Mittelwert-Vergleiche bei abhängigen Stichproben wurde der gepaarte t-Test angewendet, für Mittelwert-Vergleiche zwischen den Gruppen aus unabhängigen Stichproben der t-Test für unabhängige Stichproben. Die Resultate wurden als signifikant erachtet, wenn der p-Wert kleiner gleich 0,05 ( $p \leq 0,05$ ) war. In den Diagrammen wurden für die Abweichung vom Mittelwert die Standardabweichungen dargestellt. Die Korrektur der Signifikanzen bei 10 Vergleichswerten auf  $p \leq 0,005$  bzw. bei 5 Vergleichen auf  $p \leq 0,01$  erfolgte anhand der Bonferroni-Korrektur.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Histologische Beurteilung**

Die histologische Beurteilung der Hautbiopsate erfolgte anhand der HE- und EvG-gefärbten Schnitte zunächst anhand einer qualitativen Beurteilung der Veränderungen.

#### **4.1.1 Qualitative Analyse**

##### **4.1.1.1 Gruppe I: Kontrollgruppe**

###### **Tag 3**

In den Stanzungen der Kontrollgruppe vom dritten Tag post operationem zeigt sich oberflächlich zum Teil breiter Schorf, bestehend aus Granulozyten, Fibrin, Erythrozyten und Zelldebris. Teilweise lässt sich proliferierendes Epithel aus erhaltenen Hautanhangsgebilden darstellen, wobei die Basalmembran nicht überall eindeutig abzugrenzen (weniger als 1/2 der Stanze) ist. Die Dermis betreffend sind nur residuelle, schmale Anteile des Stratum reticulare mit dilatierten Gefäßen, perivaskulären Entzündungsinfiltraten (Granulozyten und Makrophagen), Fibroblasten und ödematisierten Bereichen vorhanden, teilweise fehlt die Dermis sogar vollständig. Oberflächlich und perivaskulär kann ungeordnetes zellreiches Granulationsgewebe beschrieben werden. Das an die Dermis angrenzende Fettgewebe wirkt ödematös und beinhaltet Schaumzellen.

###### **Tag 7**

Die Oberflächen der Stanzungen sind teils vollständig, teils noch unvollständig von Epithel bedeckt. Das Epithel zeigt eine hohe proliferative Aktivität, wirkt im Gegensatz zu Tag 3 verbreitert, mit beginnender Differenzierung der Epithelschichten. Die Basalmembran ist in Teilen vorhanden. Das vorhandene unreife Granulationsgewebe ist breiter ausgebildet als an Tag 3 post operationem. In den oberflächlichen Abschnitten sind noch zahlreiche Granulozyten vorhanden, ansonsten sind vorwiegend Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen und Schaumzellen zu differenzieren. Im unteren Achtel bis maximal zur Hälfte lässt sich eine Ausreifung des Granulationsgewebes mit horizontaler Ausrichtung der Zellen und Bildung von homogener eosinophiler extrazellulärer Matrix detektieren. Die Dermis erscheint nahezu vollständig resorbiert, nur in einzelnen Abschnitten ist noch residuelle Dermis erkennbar. Das

---

Fettgewebe lässt sich in unregelmäßiger Form abgrenzen, weist ödematöse Bereiche und eine Zunahme von Schaumzellen auf.

### **Tag 10**

Es sind Teile intakten Epithels abgrenzbar. Dazwischen sind freiliegendes Granulationsgewebe und Schorf erkennbar. Das proliferative Epithel ist verbreitert, lässt aber aufgrund fehlender Verhornung noch keine vollständige Ausreifung erkennen. Die Dicke der Granulationsgewebsschicht nimmt im Vergleich zu Tag 7 weiterhin zu, zeigt sich oberflächlich unregelmäßig, ist zell- und gefäßreich und von lockerer Struktur. Die Anzahl an Granulozyten und vor allem an Makrophagen wirkt reduziert. Des Weiteren sind Fremdkörperriesenzellen, einzelne Fremdkörpergranulome und Lymphozyten zu detektieren. Die Hautanhangsgebilde werden teilweise durch Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen resorbiert. Ungefähr die Hälfte des vorhandenen Granulationsgewebes ist ausgereift mit Ausbildung erster schmaler kollagener Fasern. Das Fettgewebe ist weiterhin ödematös.

### **Tag 30**

Das Epithel ist intakt, aber unregelmäßig strukturiert. Es stellt sich zum Einen in manchen Bereichen verbreitert und proliferativ dar, zum Anderen wirkt es stellenweise flach und beinhaltet keine Papillen. Die Schichtung des Epithels erfolgt regelrecht (inklusive Verhornung) und die Basalmembran lässt sich im gesamten Verlauf der Stanze abgrenzen. Im Bereich des Granulationsgewebes zeigt sich eine fortschreitende Ausreifung mit horizontaler Ausrichtung von Fibroblasten bzw. Myofibroblasten und zunehmender extrazellulärer Matrix. Im unteren Anteil bis ca. der Hälfte des Granulationsgewebes ist die Ausbildung von kollagenen Fasern mit fließendem Übergang in Anteile der residuellen Dermis erkennbar. Insgesamt kann das Granulationsgewebe hier als zellärmer beschrieben werden. Die Anzahl der Entzündungszellen wirkt reduziert mit perivaskulärer Konzentration. Vereinzelt sind Fremdkörpergranulome sichtbar. Das Fettgewebe beinhaltet Schaumzellen, allerdings keine Anzeichen von entzündlichen Veränderungen.

**Tag 90**

Das Epithel stellt sich als ausdifferenziertes Plattenepithel dar, wirkt in der Breite überwiegend schmal und ist regelgerecht ausgereift. Teilweise sind schmale Papillen erkennbar, teilweise wirkt es komplett plan. Die Dermis ist breitflächig und überwiegend wiederhergestellt, beinhaltet in einem Abschnitt noch Reste von Granulationsgewebe und vereinzelt auftretende Fremdkörpergranulome. Das Stratum reticulare lässt sich schlecht abgrenzen. Hier sind teilweise perivaskuläre Infiltrate zu entdecken, welche größtenteils als Lymphozyten charakterisiert werden können. Breite meist horizontal verlaufende kollagene Fasern treten hervor, weisen allerdings im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine gitternetzartige Struktur auf.

**4.1.1.2 Gruppe II: „Small Intestine Submucosa“****Tag 3**

Die Stenzen der SIS-Gruppe zeigen am 3. Tag ein heterogenes Bild. Oberflächlich finden sich wechselnd große Anteile einer zum Teil durchgehenden homogen hyalinen Membran mit Spaltbildungen. Bei zwei Stenzen lassen sich innerhalb dieser Membran bakterielle Einschlüsse erkennen. Des Weiteren kann bei zwei Stenzen neugebildetes, mehrschichtiges und proliferativ aktives Epithel dargestellt werden, welches sich über maximal 2/3 der Stenzen erstreckt. Die darunterliegende zellreiche Granulationsgewebsschicht stellt sich unterschiedlich dick dar. Teilweise wirkt sie sehr schmal, teilweise sehr breit. An den Spaltbildungen der Membran zeigt sich ebenfalls eine Schicht aus dicht gelagerten Granulozyten und Schorf. Im weiteren Verlauf stellt sich das Granulationsgewebe zell- und gefäßreich dar, wirkt größtenteils ödematös. Extrazelluläre Matrix ist noch nicht abzugrenzen. Fibroblasten, Granulozyten, Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen, einzelne Schaumzellen und frische Hämorrhagien sind innerhalb dieses Abschnitts zu differenzieren. Die Dermisreste sind schmal und zeigen etwas vermehrte Zellularität. Um die erhaltenen apokrinen Drüsen herum findet sich vermehrt Granulationsgewebe, Dermis und Fettgewebe wirken ödematös mit erweiterten Gefäßen und einigen vorwiegend perivaskulär angeordneten Fibroblasten und Makrophagen.



**Tag 7**

In 5 Stenzen ist am 7. postoperativen Tag teilweise kein Epithel, teilweise eine beginnende Epithelialisierung erkennbar. An einer Stanze kann ein komplettes Epithel, jedoch ohne durchgängige Basalmembran beschrieben werden. Das Epithel ist mehrschichtig, zeigt eine beginnende Differenzierung, aber noch keine Verhornung. Über dem Epithel findet sich Schorf. An den freiliegenden Bereichen der 5 Stenzen weisen diese gefäß- und zellreiches Granulationsgewebe auf, das zum Teil ödematös ist. Zudem sind frische Hämorrhagien und dicht aneinanderliegende Fibroblasten erkennbar. Entzündungsinfiltrate aus Granulozyten und Makrophagen sind vorwiegend perivaskulär zu sehen. Daneben finden sich auch Lymphozyten und Plasmazellen. Im oberen Abschnitt des Granulationsgewebes sind fokal noch Reste der hyalinen Membran vorzufinden, um die sich eine Fremdkörperreaktion beobachten lässt. In die tieferen Abschnitte folgend kann zunehmend homogene eosinophile extrazelluläre Matrix dargestellt werden. Im unteren 1/3 der Granulationsgewebsschicht lagern sich die Fibroblasten bzw. Myofibroblasten horizontal, die Gefäße verlaufen hierzu vertikal. Manche Gefäße sind dilatiert. Am Übergang zur Dermis finden sich vermehrt Fremdkörperriesenzellen und Fremdkörpergranulome. Die Dermis selbst ist überwiegend schmal, teilweise sogar vollständig resorbiert. Sie scheint etwas zellreicher und weist perivaskuläre Infiltrate (v.a. Makrophagen) auf. Das Fettgewebe ist geringgradig ödematös mit einigen teils dilatierten Drüsen.

**Tag 10**

Das Epithel ist überwiegend intakt, zeigt aber auch noch unvollständige Bereiche. In 2 Stenzen ist noch kein Epithel vorhanden. Stattdessen ist hier zellreiches, ödematös aufgelockertes Granulationsgewebe mit oberflächlich aufliegendem Schorf bzw. dichtem granulozytärem Infiltrat vorzufinden. Das intakte Epithel ist mehrschichtig mit Differenzierung der unterschiedlichen Schichten und Verhornung. Manche Abschnitte sind verbreitert mit breiten tiefgehenden Epithelzapfen, andere Abschnitte wiederum sehr schmal und ohne Papillen. Die Schicht des Granulationsgewebes ist ebenfalls sehr breit, wirkt überwiegend homogen und zellreich. Fibroblasten, Myofibroblasten und Fibrozyten sind horizontal ausgerichtet und von homogener eosinophiler dichter Matrix umgeben. Subepithelial finden sich einzelne Granulozyten und Lymphozyten. In nahezu allen Stenzen können dichte perivaskuläre Infiltrate aus Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen, vereinzelt auch Granulozyten und Fremdkörperriesenzellen beschrieben werden. Des

Weiteren zeigt sich in den tieferen Schichten des Granulationsgewebes eine zunehmende Ausreifung mit beginnender Faserbildung. Auch die Anteile der extrazellulären Matrix nehmen zur Tiefe hin zu. Sowohl am Übergang zur Dermis, als auch um die Drüsenausführungsgänge und Drüsen herum sind Fremdkörpergranulome zu erkennen. Die Dermisreste des Stratum reticulare sind schmal und weisen dilatierte Drüsen auf. Das Fettgewebe ist unauffällig mit äußerst geringgradigem Ödem.

### **Tag 30**

An Tag 30 ist das Epithel intakt, verläuft überwiegend sehr flach und besitzt keine Papillen. Eine Stanze weist eine überschießende Verhornung auf. Das Granulationsgewebe zeigt sich im Vergleich zu Tag 7 schmaler und zellärmer mit überwiegend kleinen, horizontal ausgerichteten Fibrozyten. Die Fibrozyten umgebende Matrix wirkt homogen. Teilweise ist eine bis nahezu subepithelial reichende Verbreiterung der kollagenen Fasern erkennbar. Der Übergang zum residuellen Stratum reticulare der Dermis gestaltet sich fließend. Es sind kleinere Hämorrhagien und überwiegend perivaskulär angeordnete Entzündungszellen wie Lymphozyten, wenige teilweise Eisen-speichernde Makrophagen und vereinzelte Granulozyten vorhanden. Die Drüsen sind überwiegend stark dilatiert, das auskleidende Epithel abgeflacht und teilweise nicht erkennbar. Manche Drüsenausführungsgänge befinden sich bereits in Resorption, um die sich Fremdkörperreaktionen abzeichnen. Der Übergang zum Fettgewebe gestaltet sich unregelmäßig mit verbreiterten Bindegewebssepten, das Fettgewebe selbst ist unauffällig.

### **Tag 90**

Das Epithel ist intakt und ausgereift mit flachen bzw. fehlenden Papillen. Subepithelial können zum Teil perivaskuläre Infiltrate aus wenigen Lymphozyten beschrieben werden. Das Stratum papillare der Dermis ist kollagenreich und lässt sich nicht eindeutig abgrenzen. Der untere Teil der Dermis, das Stratum reticulare zeigt sich etwas zellreicher. Die hier vorhandenen kollagenen Fasern wirken hinsichtlich ihrer Dicke und ihres Verlaufs etwas unregelmäßig, sind aber überwiegend horizontal angeordnet. Manche Drüsen zeigen sich zystisch erweitert, fokal befinden sie sich in Resorption. Das Fettgewebe ist unauffällig.

#### 4.1.1.3 Gruppe III: „Autologe Spalthaut“

##### **Tag 3**

Die Spalthaut-Auflage macht einen überwiegend vitalen Eindruck. Die Epidermis ist teilweise abgelöst mit Spaltbildung auf Höhe der Basalmembran und weist Granulozyteninfiltrate und nekrotische Anteile auf. Fibrin, Erythrozyten und Granulozyten füllen Abschnitte des Spalts aus, sind teilweise bereits abgeräumt und durch unreifes zell- und gefäßreiches Granulationsgewebe ersetzt. Auch in der Dermis lassen sich Granulozyteninfiltrate nachweisen. Die Gefäße wirken dilatiert mit aktiviertem, knopfförmig ins Lumen ragendem Endothel und sind teilweise thrombosiert. Perivaskulär ist die Bildung von Granulationsgewebe mit Einlagerungen von Fremdkörperriesenzellen, einzelnen Schaumzellen und die Resorption der tiefer liegenden Hautanhangsgebilde zu beobachten. Das Fettgewebe ist ödematös und mit Makrophagen und Schaumzellen durchsetzt.

##### **Tag 7**

Das Epithel der Transplantate ist intakt, überwiegend flach und ohne Papillen. Innerhalb der Dermis sind Hautanhangsgebilde, aber keinerlei pathologische Veränderungen zu erkennen. Der Übergang zur Wundauflage zeichnet sich durch ein schmales Band aus Granulationsgewebe aus. Die darin enthaltenen Bindegewebszellen sind horizontal ausgerichtet und langgestreckt, das Gesamtbild wirkt allerdings noch etwas unregelmäßig. Das Granulationsgewebe wird von einzelnen Granulozyten und Makrophagen durchsetzt. Daneben finden sich sowohl Schaumzellen, als auch Fremdkörperriesenzellen. Teilweise treten bereits Lymphozyten in Erscheinung. Die extrazelluläre Matrix ist größtenteils homogen, eosinophil durchsetzt und von lockerer Struktur. Im Randbereich zur Tiefe hin sind beginnende Faserbildungen erkennbar. Perivaskuläre Infiltrate (Makrophagen und Granulozyten) und einzelne dilatierte Gefäße kommen mitunter in der Dermis vor. Daneben sind einzelne apokrine Drüsen erkennbar, die teilweise dilatiert erscheinen. Das Fettgewebe zeigt sich ödematös mit Schaumzellen.

Bei einer Stanze kann keine Spalthaut-Auflage nachgewiesen werden. Hier zeigt sich oberflächlich ein proliferativ verbreitertes, nicht vollständiges, unreifes Epithel mit Auflagerungen aus Schorf. Ihm folgt eine breite Granulationsgewebsschicht, das sich zellreich präsentiert. Die Zellen sind horizontal ausgerichtet und sind umgeben von eosinophiler extrazellulärer Matrix. Des Weiteren können hier Makrophagen,

---

Fremdkörperriesenzellen und Schaumzellen abgegrenzt werden. Die Dermis ist äußerst schmal angelegt und weist perivaskuläre Infiltrate auf. Das Fettgewebe stellt sich unauffällig dar.

### **Tag 10**

Am 10. postoperativen Tag ist das Epithel intakt und auch die Dermis stellt sich, wie bereits an Tag 7 ohne pathologische Veränderungen dar. Haarfollikel und apokrine Drüsen sind erkennbar. Ein schmales Band aus Granulationsgewebe ist als Zwischenschicht zwischen Wundaufgabe und residueller Dermis erkennbar. Das Granulationsgewebe ist überwiegend durch horizontal ausgerichtete langgestreckte Myofibroblasten als zelluläre Komponente gekennzeichnet. Teilweise sind Fibrozyten sowie einzelne Lymphozyten und Makrophagen abzugrenzen. Im Vergleich zu Tag 7 wirkt die extrazelluläre Matrix vermehrt. Sie kann weiterhin als homogen eosinophil beschrieben werden und beinhaltet im Randbereich feine kollagene Fasern. Des Weiteren sind einzelne Fettgewebsläppchen und Hautanhangsgebilde mit vermehrter Resorption im Randbereich und Fremdkörperriesenzellen innerhalb der Granulationsgewebsschicht zu finden. Die Dermis weist einzelne zum Teil dilatierte apokrine Drüsen auf. Innerhalb des Fettgewebes lassen sich einzelne Schaumzellen abgrenzen.

Bei einer Stanze kann keine Spalthaut abgegrenzt werden. Das Epithel ist intakt und zeigt einen flachen Verlauf ohne deutliche Papillen. Unter dem Epithel zeigt sich eine schmale Granulationsgewebsschicht. Die hier zu beschreibenden Fibro- bzw. Myofibroblasten verlaufen horizontal. Weiterhin können innerhalb dieser Schicht Lymphozyten, Makrophagen und Schaumzellen voneinander unterschieden werden. Die extrazelluläre Matrix ist homogen eosinophil. Sowohl Dermis, als auch Fettgewebe zeigen keinerlei Auffälligkeiten.

**Tag 30**

Sowohl Epidermis, als auch Dermis können als weitgehend physiologisch beschrieben werden. Das Epithel wirkt überwiegend schmal und zeigt keine Papillen. Das Granulationsgewebe ist überwiegend ausgereift und lässt sich kaum von dem umgebenden Stratum reticulare abgrenzen. Das Granulationsgewebe ist lediglich etwas zellreicher mit überwiegend kleinen reifen Fibrozyten als zellulärer Komponente. Daneben lassen sich perivaskulär vermehrt Lymphozyten, Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen beschreiben. Zu sehen sind auch etwas zartere Kollagenfasern als in der Dermis. Hier sind einzelne sich in Resorption befindende Hautanhangsgebilde zu finden, die von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen umsiedelt sind. Am Übergang zur Fettgewebsschicht wirken die Drüsen dilatiert und sind teils mit proteinreicher Flüssigkeit gefüllt. Das Fettgewebe weist keinerlei Veränderung auf.

**Tag 90**

An Tag 90 ist das Epithel flach und es sind Papillen vorhanden. Das Stratum papillare weist einen Reichtum an kollagenen Fasern auf und ist schlecht von der Umgebung abzugrenzen. Insgesamt wirkt die Dermis verbreitert und sehr kollagenreich, perivaskulär treten Lymphozyten und Makrophagen auf. Die Anordnung der Kollagenfaserbündel kann als unregelmäßig, teilweise jedoch auch als scherengitterartig beschrieben werden. Des Weiteren treten einzelne Fettgewebsreste innerhalb der Dermis auf, die den ehemaligen Verlauf der Wundauflage anzeigen. Sowohl Haarfollikel, als auch apokrine Drüsen kommen vor, wobei einzelne Drüsen dilatiert erscheinen. Manche Haare und Drüsen befinden sich in Resorption. Das Fettgewebe ist unauffällig.

#### 4.1.1.4 Gruppe IV: „Autofetales“ Amnion

##### **Tag 3**

In der autofetalen Gruppe kann eine oberflächlich aufliegende membranartige dünne Schicht beschrieben werden, welche überwiegend homogen eosinophil imponiert, vereinzelt aber auch kubisch geformte kernhaltige Zellen aufweist. Zum Teil wird diese Schicht durch Schorf ersetzt. Der Schorf setzt sich aus Granulozyten, Erythrozyten und Fibrin zusammen. Ausgehend von Haarfollikeln und Ausführungsgängen der vorhandenen Drüsen zeichnet sich eine nahezu vollständige Epithelialisierung ab (ca. 2/3). Das Epithel scheint in manchen Bereichen von seiner Unterlage abgelöst, weist sowohl einschichtige, als auch mehrschichtige Abschnitte auf und macht im Gesamtbild einen ungleichmäßigen Eindruck. Die Basalmembran des Epithels ist noch unvollständig. Zwischen dem Epithel und den erhaltenen Dermisresten befindet sich kaum Granulationsgewebe. Perivaskulär lassen sich vereinzelt Makrophagen, Fibroblasten und Granulozyten darstellen. Von hier beginnend, lässt sich ein schmales Band unreifen und ungeordneten Granulationsgewebes beschreiben. Vereinzelt treten Fremdkörperriesenzellen auf. Die Dermis stellt sich als schmale Schicht dar, ist von lockerer ödematöser Struktur und beinhaltet dilatierte Gefäße mit aktiviertem Endothel. Auch das Fettgewebe wirkt ödematös und wird von Schaumzellen durchsetzt.

##### **Tag 7**

Die Epidermis ist nahezu vollständig ausgebildet. Das Epithel weist proliferative Aktivität und verbreiterte Epithelzapfen auf. Eine beginnende Verhornung ist an einzelnen Stellen ersichtlich, die Basalmembran jedoch nicht durchgängig abgrenzbar. An der Oberfläche zeichnet sich eine breite Schorfschicht ab, welche zum Teil Reste hyaliner Membranen aufweist. Die eher schmale Schicht des Granulationsgewebes setzt sich aus zahlreichen horizontal ausgerichteten Fibro- bzw. Myofibroblasten und Fibrozyten zusammen. Die Struktur der extrazellulären Matrix wirkt homogen, dicht und eosinophil. Des Weiteren können zart ausgebildete kollagene Stränge abgegrenzt werden. Makrophagen, einzelne Fremdkörperriesenzellen und perivaskuläre Entzündungsinfiltrate bestehend aus Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen durchsetzen das Bild. Die sich anschließende Dermis stellt sich als schmale gut abgrenzbare Schicht dar. Das Fettgewebe lässt sich als geringgradig ödematös beschreiben und beinhaltet einzelne Schaumzellen.

**Tag 10**

Am 10. postoperativen Tag ist das Epithel überwiegend intakt. Zum Einen lassen sich durch proliferativ verbreiterte Abschnitte mit tiefen Epithelzapfen und beginnender Differenzierung der einzelnen Schichten erkennen, zum Anderen flache ausgereifte Abschnitte. Im Epithel sind vereinzelte Granulozyten vorzufinden. Auf Höhe der Basalmembran ist teilweise eine Spaltbildung zu erkennen. An der Oberfläche kann Schorf abgegrenzt werden, papillenförmige Wölbungen sind nicht zu erkennen. Die Granulationsgewebsschicht gestaltet sich homogen mit horizontaler Ausrichtung der Zellen, welche überwiegend kleine Zellkerne aufweisen. Im Allgemeinen erscheint die Schicht des Granulationsgewebes schmal. Die extrazelluläre Matrix ist stark ausgeprägt und erscheint größtenteils homogen, von einzelnen Fasern durchsetzt. Zellen in Form von Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen treten nur noch vereinzelt auf. Die eher schmale Dermis ist reich an Kollagen, beinhaltet perivaskuläre Infiltrate und weist dilatierte apokrine Drüsen auf. Hierauf folgt ein unregelmäßiger Übergang zum Fettgewebe, das Schaumzellen beinhaltet.

**Tag 30**

Das Epithel ist vollständig intakt, ausgereift und verhornt und bildet kleine Papillen aus. Auch die Basalmembran kann durchgängig beschrieben werden. Granulationsgewebe ist kaum abgrenzbar. Lediglich geringe Anteile der unteren Dermis erscheinen etwas zellreicher mit perivaskulär liegenden Lymphozyten und einzelnen Makrophagen. Die Kollagenfasern der Dermis sind horizontal ausgerichtet, von ungeordneter Struktur und noch etwas schmäler als in der Kontrollstanze des unbehandelten Tieres. Des Weiteren sind Hautanhangsgebilde zu erkennen. Es lassen sich sowohl unveränderte, zum Teil dilatierte Drüsen, als auch in Resorption befindliche Haarfollikel mit Fremdkörpergranulom beschreiben. Das Fettgewebe erscheint physiologisch.

**Tag 90**

Die durchweg schmale Epidermis weist nur wenige flache Papillen auf. Auch die Dermis zeigt sich als schmale Schicht. Kollagenreich präsentiert sich das Stratum reticulare mit teils ungeordneten, teils verschränkten Kollagenfasern. Vereinzelt sind hier Fremdkörperriesenzellen zu finden. Das Stratum papillare der Dermis lässt sich schlecht abgrenzen. Hier finden sich perivaskulär liegende Lymphozyten, Makrophagen und vereinzelt auch Granulozyten. Die Drüsen sind teils dilatiert, teils befinden sie sich in Resorption mit umgebenden Fremdkörperriesenzellen und anderen Entzündungszellen. Das Fettgewebe weist keinerlei Veränderung zu Tag 30 auf.

**4.1.1.5 Gruppe V: „Allogenes“ Amnion****Tag 3**

An der Oberfläche findet sich membranartiges, teilweise ödematöses aufgetrieben oder mehrschichtig erscheinendes Material, welches größtenteils die gesamte Oberfläche bedeckt. In Teilen zeigen sich schorfartige Auflagerungen mit abzugrenzenden Granulozyten, Erythrozyten, vereinzelt Fremdkörperriesenzellen und Bestandteilen aus Fibrin. Daran anschließend folgt eine schmale zeldichte Granulationsgewebsschicht, welche aus Fibroblasten, Granulozyten und Makrophagen besteht. Eine extrazelluläre Matrix stellt sich nicht dar. Auf die Granulationsgewebsschicht folgend ist eine ebenfalls schmale Dermis erkennbar, in welcher sich perivaskuläre Infiltrate, Granulozyten, Makrophagen, einzelne Fremdkörperriesenzellen und dilatierte Gefäße mit aktiviertem Endothel voneinander abgrenzen lassen. Die ganze Dermis ist zudem ödematös. Ödematös stellt sich auch das Fettgewebe dar, welches einzelne Makrophagen und Schaumzellen erkennen lässt.

**Tag 7**

Am 7. postoperativen Tag ist an der Oberfläche neben breitem Schorf noch in kleinen Anteilen bröckeliges hyalines Material sichtbar. Des Weiteren sind Erythrozyten, Granulozyten und Fibrin vorhanden. In zwei der insgesamt 6 ausgewerteten Stenzen kann eine beginnende Epithelialisierung beschrieben werden. Die Granulationsgewebsschicht erscheint bandförmig und zellreich mit teilweise lockerer Struktur. Die vorhandenen Zellen zeigen eine horizontale Ausrichtung. Es lassen sich sowohl Bereiche mit homogener eosinophiler extrazellulärer Matrix beschreiben, als auch Bereiche, in denen kaum extrazelluläre Matrix vorzufinden ist. Die Gefäße sind überwiegend vertikal angeordnet. Des



---

Weiteren können hier einzelne Hämorrhagien, Granulozyten, Makrophagen und teilweise viele Fremdkörperriesenzellen dargestellt werden. Im Gesamtbild erscheint innerhalb des Granulationsgewebes eine dynamische Ausreifung, welche von den tiefen Schichten ausgeht und sich zu den oberflächlich gelegenen fortsetzt. Der Schicht des Granulationsgewebes anschließend folgen Reste schmaler Dermis, welche dilatierte Gefäße und perivaskuläre Entzündungsinfiltrate aufweisen. Die apokrinen Drüsen zeigen sich zum Teil zystisch dilatiert. Das Fettgewebe wirkt ödematös und beinhaltet zahlreiche Fremdkörperriesenzellen.

### **Tag 10**

Das Epithel weist Bereiche auf, in denen eine Ausdifferenzierung erkennbar ist. Es lassen sich aber auch Bereiche darstellen, in denen das Granulationsgewebe freiliegt. In drei Stenzen kann eine beginnende Ausreifung ohne Verhornung beobachtet werden. Das Epithel erscheint im Gesamten unregelmäßig und weist sowohl einschichtige, also auch mehrschichtige Abschnitte auf. Granulozyten durchsetzen das Epithel und die Basalmembran ist noch nicht vollständig ausgebildet. Hieran anschließend zeigt sich breites zell- und gefäßreiches Granulationsgewebe. Im oberen Anteil weist das Granulationsgewebe eine lockere, leicht ödematöse Struktur auf, in welcher sich frische Hämorrhagien, Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen abgrenzen lassen. Am Übergang zum Epithel zeigen sich des Weiteren Reste hyalinen Fremdmaterials mit zahlreichen Fremdkörperriesenzellen. Im unteren Drittel bis nahezu der Hälfte der Granulationsgewebsschicht sind Fibro- bzw. Myofibroblasten mit horizontaler Ausrichtung und vermehrt homogene hyaline extrazelluläre Matrix zu finden. Daneben können ödematöse Abschnitte, vertikal verlaufende dilatierte Gefäße und sich in Resorption befindende Haarfollikel beschrieben werden. Einzelne Granulome sind darstellbar. Am Übergang zur Dermis kann der Beginn von Kollagenfaserbildung beobachtet werden. Die Dermis selbst wirkt breit und weist dilatierte apokrine Drüsen auf. Ödematös verändertes, von Schaumzellen durchsetztes Fettgewebe grenzt an die Dermis.

**Tag 30**

An Tag 30 ist das Epithel intakt. Verbreiterte Abschnitte wechseln sich mit schmalen ab. Papillen sind nicht zu erkennen. Die Ausreifung des Epithels ist noch nicht ganz abgeschlossen; eine Verhornung ist nicht vorhanden. Die Basalmembran weist keine Durchgängigkeit auf, sondern ist nur in Teilen vorhanden. Unter der Basalmembran befindet sich größtenteils homogenes Granulationsgewebe, dessen Zellen horizontal ausgerichtet sind und teilweise schon kleine längliche Zellkerne aufweisen. Die Struktur der extrazellulären Matrix kann als homogen eosinophil beschrieben werden. Wenig extrazelluläre Matrix zeigt sich im oberen Bereich. Am Übergang zum residuellen Stratum reticulare stellt sich eine beginnende Kollagenfaserbildung dar, welche ca. die 1/2-2/3 des Granulationsgewebes umfasst. Des Weiteren sind einzelne Fremdkörperriesenzellen, Makrophagen, perivaskuläre Infiltrate und dilatierte Gefäße abzugrenzen. Die Dermis weist keinerlei auffällige Veränderungen auf. Teilweise sind erweiterte apokrine Drüsen erkennbar. Der Übergang ins Fettgewebe wirkt unregelmäßig. Das Fettgewebe selbst weist Schaumzellen auf.

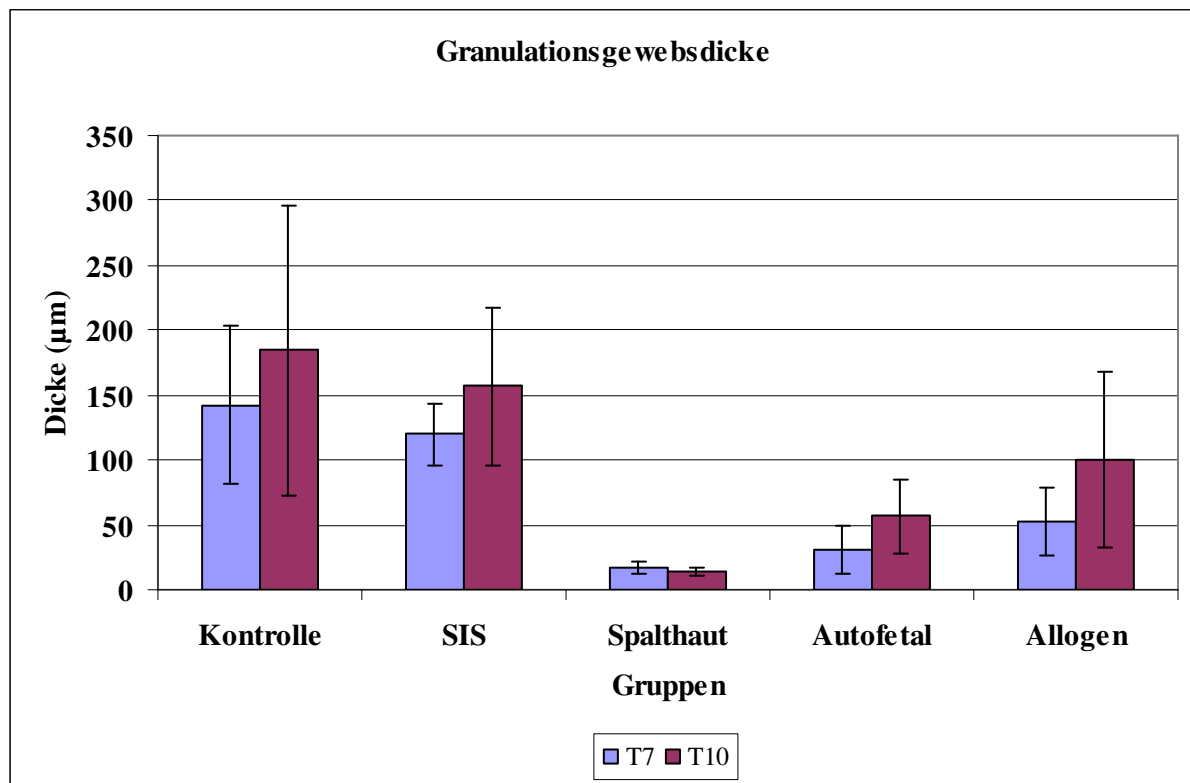
**Tag 90**

Am 90. Tag post operationem zeigt sich das Epithel intakt und ausgereift mit teilweise auffällig breiter Verhornung. Vorhandene Papillen sind eher flach ausgeprägt. Darauf folgt ein kollagenreiches Stratum papillare und ein Stratum reticulare, von dem das Granulationsgewebe sich lediglich durch eine etwas vermehrte Zelldichte und etwas zartere Kollagenfasern abgrenzen lässt. Perivaskuläre Infiltrate, bestehend aus Makrophagen und Lymphozyten kommen vor. Das Stratum reticulare setzt sich aus unregelmäßig breiten und unregelmäßig verlaufenden Kollagenfasern zusammen. Hautanhangsgebilde sind kaum vorhanden, teilweise lassen sich kleine Drüsen erkennen. Der Übergang ins Fettgewebe gestaltet sich unregelmäßig.

## 4.1.2 Quantitative Analyse

### 4.1.2.1 Granulationsgewebsdicke

In Abbildung 8 sind die Vergleiche der mittleren Granulationsgewebsdicke der unterschiedlichen Versuchsgruppen dargestellt.



**Abbildung 8:** Darstellung des Vergleichs der mittleren Granulationsgewebsdicke (µm) und der Standardabweichungen an den Tagen 7 und 10 post operationem (n=5)

#### 4.1.2.1.1 Vergleich innerhalb jeder Gruppe

Betrachtet man die Dicke des Granulationsgewebes zwischen den Tagen 7 und 10 innerhalb jeder Gruppe, so kann in der autofetalen Gruppe eine signifikante Zunahme des Granulationsgewebes von Tag 7 zu Tag 10 festgestellt werden. Sowohl in der Kontrollgruppe, der mit SIS versorgten Gruppe, der Spalthaut-Gruppe, als auch in der allogenen Gruppe sind diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede von Tag 7 zu Tag 10 erkennbar (Abb.8). Die p-Werte der Vergleiche sind in Tabelle 8 dargestellt.

#### 4.1.2.1.2 Vergleich zwischen den Gruppen

Im Vergleich zur Kontrollgruppe bzw. zur SIS-Gruppe zeigt die mit Spalthaut versorgte Gruppe an Tag 7 eine signifikant geringere Dicke der Granulationsgewebsschicht. Dasselbe Bild findet sich bei Betrachtung des Vergleichs zwischen der autofetalen Gruppe bzw. der allogenen Gruppe mit der SIS-Gruppe. Am 10. postoperativen Tag lassen sich in allen 4 Vergleichsmöglichkeiten keine signifikanten Unterschiede feststellen. Im Bezug auf die Kontrollgruppe ergeben sich an beiden Tagen sowohl bei der SIS-Gruppe, als auch bei der allogenen bzw. autofetalen Gruppe keine signifikanten Unterschiede. Dasselbe Ergebnis kann zum Einen im Vergleich autofetale mit allogener Gruppe sowie bei den Vergleichen der beiden Amnion-Gruppen mit der Spalthaut-Gruppe beschrieben werden (Abb.8). Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen sind in Tabelle 7 aufgelistet, die Darstellung der p-Werte der Vergleiche in Tabelle 9.

**Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Granulationsgewebssdicke ( $\mu\text{m}$ ) der einzelnen Gruppen an den Tagen 7 und 10**

Gruppe n=5	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	
	T7	T10
<b>Kontrolle</b>	142,07 $\pm$ 63,95	184,36 $\pm$ 121,04
<b>SIS</b>	119,79 $\pm$ 22,06	157,03 $\pm$ 63,75
<b>Spalthaut</b>	16,65 $\pm$ 3,01	13,80 $\pm$ 2,98
<b>Autofetal</b>	31,38 $\pm$ 18,93	56,68 $\pm$ 25,44
<b>Allogen</b>	52,67 $\pm$ 27,26	100,23 $\pm$ 74,43

**Tabelle 8: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Granulationsgewebsdicke innerhalb jeder Gruppe zwischen den Tagen 7 und 10 ( $p \leq 0,05$ )**

	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
<b>I</b>	0,361				
<b>II</b>		0,299			
<b>III</b>			0,241		
<b>IV</b>				<b>0,031</b>	
<b>V</b>					0,096

**Tabelle 9: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Granulationsgewebsdicke zwischen den Gruppen an den Tagen 7 und 10 ( $p \leq 0,005$ )**

	<b>T7</b>					<b>T10</b>				
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
<b>I</b>										
<b>II</b>	0,483					0,671				
<b>III</b>	<b>0,002</b>	<b>&lt;0,001</b>				0,034	0,007			
<b>IV</b>	0,006	<b>&lt;0,001</b>	0,157			0,077	0,011	0,019		
<b>V</b>	0,021	<b>0,003</b>	0,041	0,189		0,229	0,231	0,060	0,271	

## 4.1.2.2 Hautanhangsgebilde an Tag 90

In der autofetalen Gruppe ist an Tag 90 im Vergleich zu einem unbehandelten Tier ein signifikanter Unterschied bezüglich des Vorhandenseins von Hautanhangsgebilden zu erkennen. Im direkten Vergleich zur Positivkontrolle lässt sich hier eine signifikant niedrigere Anzahl an apokrinen Drüsen sowie Haarfollikeln feststellen. Die übrigen 4 Gruppen weisen im gepaarten Vergleich zur Positivkontrolle keinerlei signifikante Unterschiede auf. In Tabelle 10 sind die Mittelwerte der ausgezählten apokrinen Drüsen und Haarfollikel in Bezug zum unbehandelten Tier dargestellt, Tabelle 11 stellt die p-Werte der Vergleiche dar.

**Tabelle 10: Darstellung der Mittelwerte der ausgezählten Hautanhangsgebilde im direkten Vergleich zu einem unbehandelten Tier an Tag 90**

Gruppe	n	Mittelwerte		Summe
		Haarfollikel	Drüsen	
<b>Unbeh. Tier</b>	<b>1</b>	5	5	10
<b>Kontrolle</b>	<b>5</b>	0,6	1,0	1,6
<b>SIS</b>	<b>6</b>	1,5	3,83	5,33
<b>Spalthaut</b>	<b>6</b>	4,5	3,17	7,67
<b>Autofetal</b>	<b>6</b>	1,33	1,66	2,99
<b>Allogen</b>	<b>6</b>	0	3,66	3,66

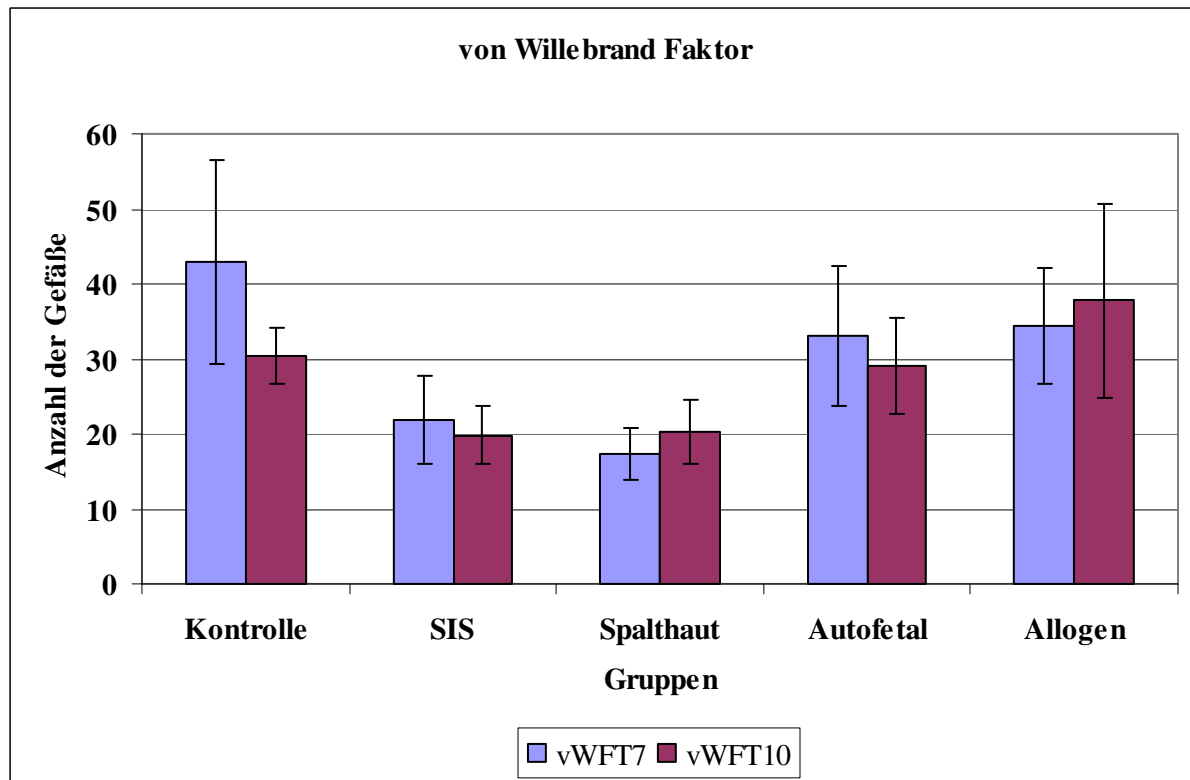
**Tabelle 11: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Anzahl der Hautanhangsgebilde gegenüber einem unbehandelten Tier an Tag 90 ( $p \leq 0,01$ )**

	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
<b>Unbeh. Tier</b>	0,025	0,068	0,552	<b>0,009</b>	0,054

## 4.2 Immunhistologie

### 4.2.1 von Willebrand Faktor: Gefäßproliferation

In Abbildung 9 sind die Vergleiche der mittleren Gefäßanzahl der unterschiedlichen Versuchsgruppen dargestellt.



**Abbildung 9:** Darstellung der mittleren Gefäßanzahl und der Standardabweichungen an den Tagen 7 und 10 post operationem bei Auszählung von 10 High Power Fields

#### 4.2.1.1 Vergleich innerhalb jeder Gruppe

Wie in Abbildung 9 dargestellt lässt sich innerhalb der Kontrollgruppe zwischen Tag 7 und Tag 10 post operationem beobachten, dass an Tag 10 signifikant weniger Gefäße zu finden sind, als an Tag 7. Der Vergleich dieser zwei Tage zeigt weder in der SIS-, noch in der Spalthaut-Gruppe signifikante Unterschiede. Dieselbe Aussage lässt sich über die mit Amnion versorgten Gruppen Autofetal und Allogen treffen. In Tabelle 13 sind die p-Werte des Vergleichs dargestellt.

#### 4.2.1.2 Vergleich zwischen den Gruppen

Signifikant weniger Gefäße weisen die Gruppen SIS (Abb.10) und Spalthaut gegenüber der Kontrollgruppe auf. Dies lässt sich sowohl für Tag 7, als auch für Tag 10 darstellen. Des Weiteren lässt sich an beiden Tagen im direkten Vergleich zur SIS-Gruppe in den Gruppen Autofetal und Allogen eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßen beschreiben. Auch im Vergleich zur Spalthaut-Gruppe zeigen beide Amnion-Gruppen sowohl an Tag 7, als auch an Tag 10 eine signifikant höhere Gefäßanzahl. Im Gruppenvergleich mit der Kontrollgruppe sind an Tag 7 und Tag 10 für beide Amnion-Gruppen keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. Dasselbe gilt für die Betrachtung der beiden Amnion-Gruppen untereinander. Auch der Vergleich zwischen der SIS- und der Spalthaut-Gruppe zeigt keine signifikanten Unterschiede (Abb.9). Eine Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gruppen findet sich in Tabelle 12. Die p-Werte des Vergleichs der mittleren Gefäßanzahl zwischen den Gruppen an den Tagen 7 und 10 wird in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 12: Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gefäßanzahl an Tag 7 und 10 post operationem**

Gruppe n=10 High Power Fields	Mittelwert ± Standardabweichung	
	T7	T10
<b>Kontrolle</b>	43,00 ± 13,59	30,40 ± 3,63
<b>SIS</b>	21,90 ± 5,92	19,80 ± 3,82
<b>Spalthaut</b>	17,30 ± 3,40	20,20 ± 4,29
<b>Autofetal</b>	33,10 ± 9,34	29,10 ± 6,44
<b>Allogen</b>	34,40 ± 7,86	37,80 ± 12,99

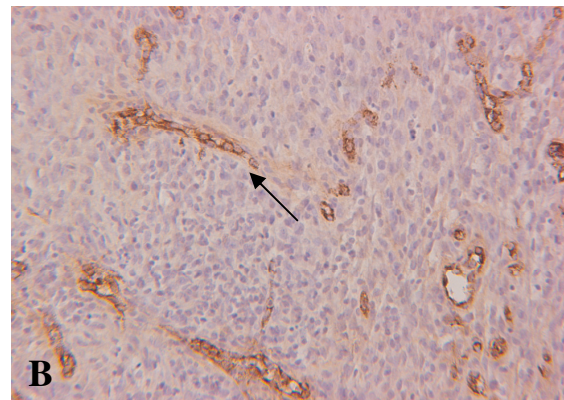
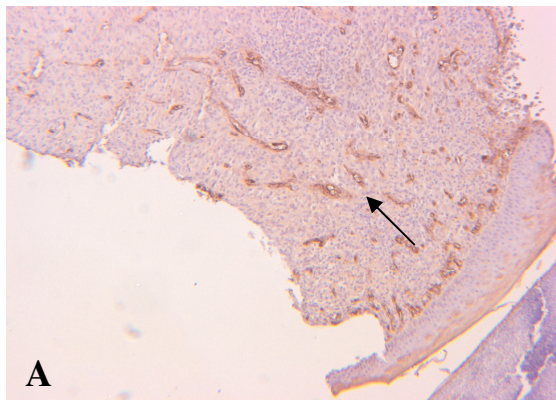
**Tabelle 13: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Gefäßanzahl innerhalb jeder Gruppe zwischen den Tagen 7 und 10 ( $p \leq 0,05$ )**

	I	II	III	IV	V
I	<b>0,016</b>				
II		0,230			
III			0,059		
IV				0,364	
V					0,556



**Tabelle 14: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Gefäßanzahl zwischen den Gruppen an den Tagen 7 und 10 ( $p \leq 0,005$ )**

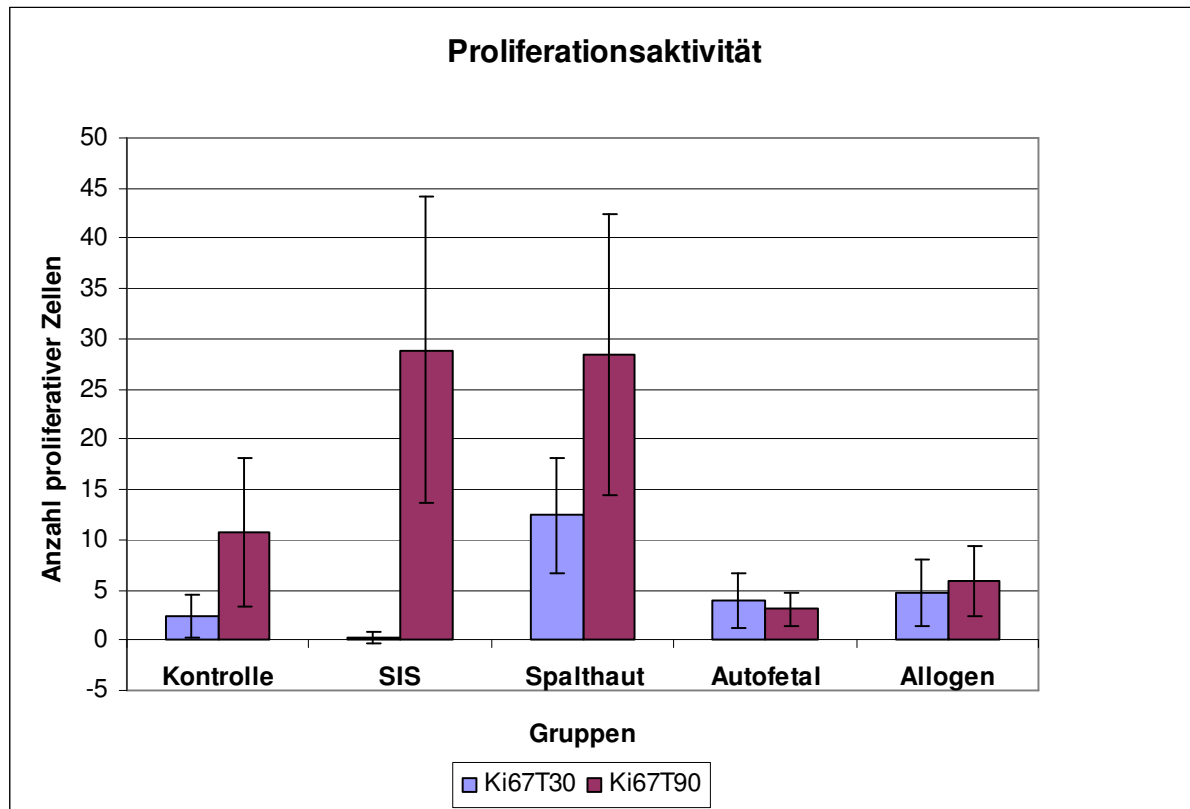
	T7					T10				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
I										
II	<0,001					<0,001				
III	<0,001	0,047				<0,001	0,828			
IV	0,074	<b>0,005</b>	<0,001			0,585	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>		
V	0,100	<b>0,001</b>	<0,001	0,740		0,112	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	0,080	



**Abbildung 10: Darstellung vWF-positiver Gefäße anhand der SIS-Gruppe: (A) 50fache und (B) 128fache Vergrößerung**

#### 4.2.2 Ki-67: proliferative Zellen

In Abbildung 11 sind die Vergleiche der mittleren Anzahl proliferativer Zellen der unterschiedlichen Versuchsgruppen dargestellt.



**Abbildung 11: Darstellung der mittleren Anzahl proliferativer Zellen und der Standardabweichungen an den Tagen 30 und 90 post operationem bei Auszählung von 10 High Power Fields**

##### 4.2.2.1 Vergleich innerhalb jeder Gruppe

In den in Abbildung 11 dargestellten Gruppen tritt in den ersten drei Gruppen ein signifikanter Unterschied an proliferativ aktiven Zellen zwischen Tag 30 und Tag 90 auf. Bei der Kontrollgruppe, der SIS-Gruppe und der mit Spalthaut behandelten Gruppe ist ein deutlicher Anstieg der Zellzahl zu verzeichnen. Innerhalb der autofetalen ist ebenso wenig eine signifikante Abweichung zwischen den zwei Tagen festzustellen wie es in der allogenen Gruppe der Fall ist. Die p-Werte der Vergleiche finden sich in Tabelle 16.

##### 4.2.2.2 Vergleich zwischen den Gruppen

Im Vergleich der Gruppen untereinander weisen die Vergleiche Kontrollgruppe mit Spalthaut-Gruppe und Spalthaut-Gruppe mit autofetaler Gruppe die deutlichsten Unterschiede

auf. Hierbei sind in der Spalthaut-Gruppe sowohl an Tag 30, als auch an Tag 90 signifikant mehr proliferative Zellen darzustellen, als es zu diesen Zeitpunkten in den anderen beiden Gruppen der Fall ist. Betrachtet man den Vergleich zwischen der Spalthaut-Gruppe und der SIS-Gruppe, weist an Tag 30 die mit Spalthaut versorgte Gruppe signifikant mehr proliferative Zellen auf als die SIS-Gruppe. An Tag 90 ist kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abb.12). Die SIS-Gruppe zeigt gegenüber der Kontrollgruppe dasselbe Verhalten, wie es im Vergleich zur allogenen Gruppe festgestellt werden kann. Bei beiden Vergleichen kann an Tag 30 kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen beschrieben werden, wohingegen an Tag 90 in der SIS-Gruppe signifikant mehr proliferativ aktive Zellen beschrieben werden können, als in den anderen beiden Gruppen. Dasselbe lässt sich beim Vergleich der Spalthaut-Gruppe mit der allogenen Gruppe feststellen. An Tag 30 besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, an Tag 90 zeigt die Spalthaut jedoch signifikant mehr proliferative Zellen als die allogene Gruppe. Bei Betrachtung der SIS-Gruppe und der autofetalen fällt ein wechselnder Unterschied auf. An Tag 30 weist die autofetale Gruppe deutlich mehr proliferative Zellen auf, an Tag 90 kann dies bei der SIS-Gruppe festgestellt werden. In den übrigen drei Vergleichen Kontrollgruppe mit autofetaler bzw. mit allogener und autofetaler mit allogener Gruppe lässt sich weder am 30., noch am 90. Tag ein Unterschied erkennen (Abb.11). In Tabelle 15 werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Anzahl an Ki-67-positiven Zellen an den Tagen 30 und 90 dargestellt. Die p-Werte der Vergleiche finden sich in Tabelle 17.

**Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Anzahl an Ki-67-positiv gezählten Zellen an den Tagen 30 und 90 post operationem**

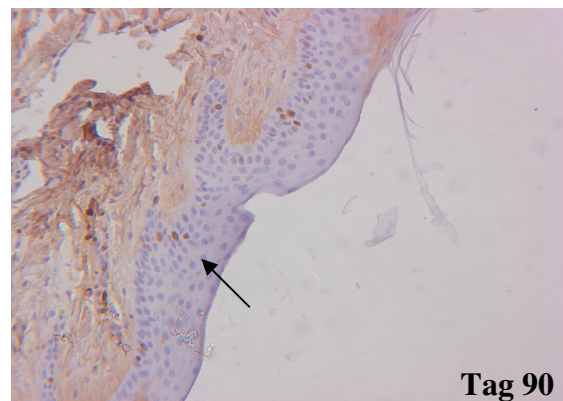
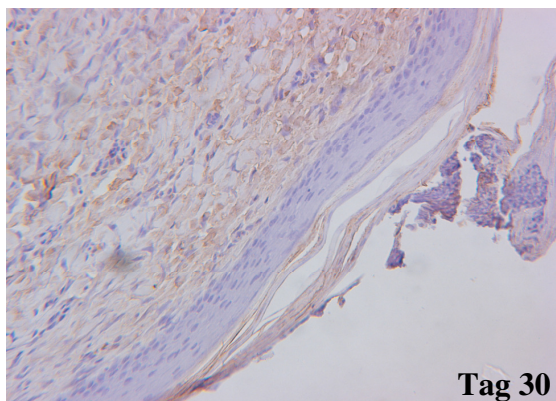
Gruppe n= 10 HPF	Mittelwert ± Standardabweichung	
	T30	T90
Kontrolle	2,40 ± 2,12	10,80 ± 7,38
SIS	0,20 ± 0,63	28,90 ± 15,24
Spalthaut	12,40 ± 5,72	28,40 ± 14,06
Autofetal	3,90 ± 2,69	3,10 ± 1,66
Allogen	4,75 ± 3,30	5,90 ± 3,57

**Tabelle 16: Darstellung der p-Werte der mittleren Anzahl an proliferativen Zellen innerhalb jeder Gruppe zwischen den Tagen 30 und 90 ( $p \leq 0,05$ )**

	I	II	III	IV	V
I	0,016				
II		<0,001			
III			0,016		
IV				0,491	
V					0,724

**Tabelle 17: Darstellung der p-Werte der mittleren Anzahl an proliferativen Zellen zwischen den Gruppen an den Tagen 30 und 90 ( $p \leq 0,005$ )**

	T30					T90				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
I										
II	0,010					0,005				
III	<0,001	<0,001				0,003	0,940			
IV	0,182	0,002	<0,001			0,009	<0,001	<0,001		
V	0,134	0,069	0,029	0,624		0,081	0,001	0,001	0,043	



**Abbildung 12: Darstellung der Ki-67-Färbung anhand der SIS-Gruppe (Tag 30) und Spalthaut-Gruppe (Tag 90: siehe Pfeil); (128fache Vergrößerung)**

### 4.2.3 Aktin: Myofibroblasten

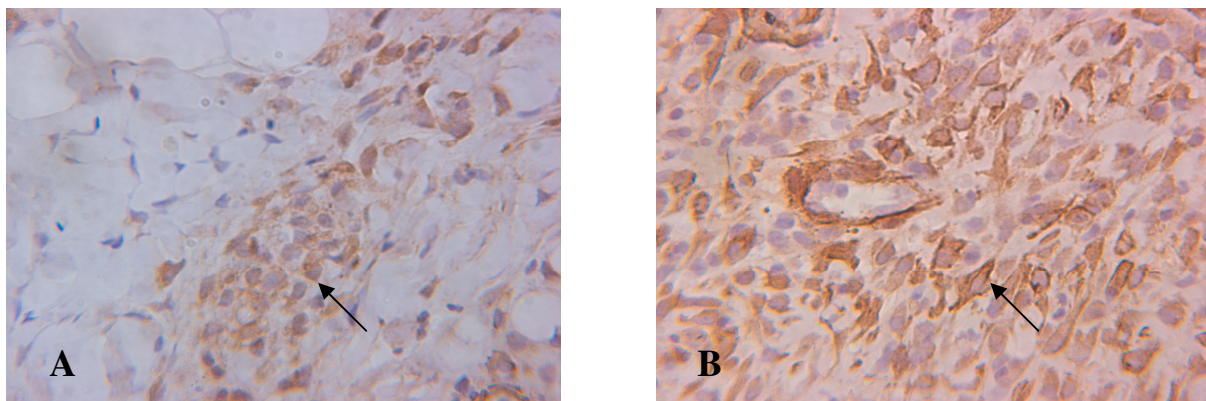
Am 10. postoperativen Tag weisen die Gruppen SIS und Allogen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich größere Anzahl an Myofibroblasten auf. Dasselbe Bild stellt sich im Vergleich allogene mit autofetaler Gruppe dar. Auch hier kann auf Seite der allogenen Gruppe eine eindeutige Mehrheit der Myofibroblasten beschrieben werden. Vergleicht man die autofetale, die allogene bzw. die SIS-Gruppe mit der Spalthaut-Gruppe, so weisen alle drei Gruppen ebenfalls signifikant mehr Myofibroblasten auf als die Spalthaut-Gruppe. Eine deutlich geringere Anzahl an Myofibroblasten zeigt die mit Spalthaut behandelte Gruppe auch gegenüber der Kontrollgruppe (Abb.13). Keine signifikanten Unterschiede sind bei den Vergleichen zwischen der Kontroll- bzw. der SIS-Gruppe mit der autofetalen Gruppe und der SIS-Gruppe mit der allogenen Gruppe zu verzeichnen. Tabelle 18 bietet einen Überblick über die Mittelwerte und Standardabweichungen der Vergleiche, die p-Werte der Vergleiche finden sich in Tabelle 19.

**Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Anzahl an Myofibroblasten an Tag 10 post operationem**

<b>Gruppe n= 10 HPF</b>	<b>Mittelwert ± Standardabweichung T10</b>
<b>Kontrolle</b>	57,70 ± 5,62
<b>SIS</b>	70,80 ± 9,68
<b>Spalthaut</b>	39,00 ± 8,10
<b>Autofetal</b>	61,90 ± 12,69
<b>Allogen</b>	82,30 ± 9,30

**Tabelle 19: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Anzahl an Myofibroblasten zwischen den Gruppen an Tag 10 ( $p \leq 0,005$ )**

	I	II	III	IV	V
I					
II	<0,001				
III	<0,001	<0,001			
IV	0,126	0,095	<0,001		
V	<0,001	0,014	<0,001	0,001	



**Abbildung 13:  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin-Färbung zur Darstellung von Myofibroblasten (siehe Pfeil): Vergleich zwischen der Gruppe Spalthaut (A) und der Kontrollgruppe (B) 320fache Vergrößerung**

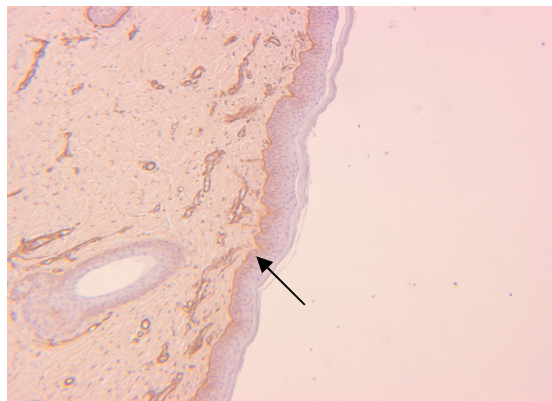
#### 4.2.4 Laminin: Darstellung der Basalmembran

Die Basalmembran ist in der mit Spalthaut versorgten Gruppe im Gegensatz zu den anderen vier Gruppen bereits von Tag 3 an intakt (Abb.14). Anhand des zeitlichen Verlaufs kann hierauf folgend an Tag 7 zum Einen in der autofetalen (Abb.15), zum Anderen in der allogenen Gruppe eine teilweise intakte Basalmembran dargestellt werden, wohingegen sowohl in der Kontroll-, als auch in der SIS-Gruppe noch keine Basalmembran abzugrenzen ist. Betrachtet man den 10. postoperativen Tag, lässt sich hier auch in den zuletzt genannten Gruppen eine teilweise intakte Basalmembran beschreiben. Dasselbe trifft immer noch für die allogene Gruppe zu. Im Gegensatz hierzu steht die autofetale Gruppe, welche an Tag 10 bereits eine vollständig vorhandene Basalmembran aufweist. Dies ist in der Kontrollgruppe an Tag 30, in der SIS-Gruppe an Tag 90 der Fall. Tabelle 20 bietet eine Übersicht über das zeitliche Auftreten einer intakten Basalmembran innerhalb der verschiedenen Gruppen.

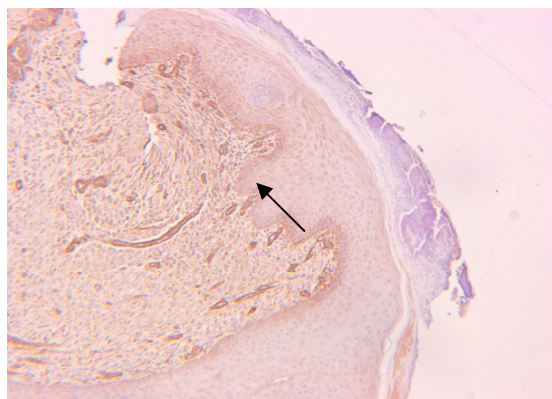


**Tabelle 20: Darstellung des zeitlichen Auftretens einer intakten Basalmembran; vollständig vorhanden (+), teilweise vorhanden ( $\pm$ ) und nicht vorhanden (-)**

Gruppe n=1	Tage post OP				
	T3	T7	T10	T30	T90
Kontrolle	-	-	$\pm$	+	+
SIS	-	-	$\pm$	$\pm$	+
Spalthaut	+	+	+	+	+
Autofetal	-	$\pm$	+	+	+
Allogen	-	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+



**Abbildung 14: Darstellung einer vollständig intakten Basalmembran (siehe Pfeil); Gruppe „Autologe Spalthaut“ Tag 3 (50fache Vergrößerung)**



**Abbildung 15: Darstellung einer teilweise intakten Basalmembran (siehe Pfeil); Gruppe „Autofetales“ Amnion Tag 7 (50fache Vergrößerung)**

## **5 Diskussion**

### **5.1 Histologische Beurteilung**

#### **5.1.1 Qualitative Analyse**

In allen Behandlungsgruppen konnte der phasenhafte Wundheilungsverlauf der exsudativen, resorptiven/proliferativen und reparativen Phase beobachtet werden, wobei sich ein fließender Übergang der Phasen darstellte. Sowohl bei der Kontroll-, der SIS-, der allogenen, als auch bei der autofetalen Gruppe lies sich eine sekundäre Wundheilung (KRAMER 2004; ACKERMANN 2009) beobachten, während die Wundheilung der Gruppe mit Spalthaut eher den Kriterien einer primären Wundheilung (KRAMER 2004) entsprach.

Als Kriterien der exsudativen Phase wurden folgende Parameter bewertet: oberflächliche Bildung von Schorf aus Fibrin, Erythrozyten und Granulozyten, dilatierte, blutgefüllte Gefäße mit aktiviertem Endothel, zum Teil mit randständigen und austretenden Granulozyten sowie Ödembildung des angrenzenden Gewebes. Aufgrund dessen, dass der erste Entnahmezeitpunkt Tag 3 post transplantationem entsprach, konnte hier bei den meisten Schnitten bereits ein Übergang in die resorptive/proliferative Phase beobachtet werden.

Bei Vorliegen der resorptiven Phase zeigte sich eine zunächst oberflächlich und um die Gefäße beginnende Bildung von Fibroblasten mit einsprossender Gefäßproliferation. Die Anzahl der Granulozyten im Gewebe trat nach und nach zurück und wurde durch zahlreiche Histiozyten ersetzt. Fokal differenzierten sich diese weiter zu Fremdkörperriesenzellen aus. Am Übergang zum Fettgewebe der Dermis traten Schaumzellen auf. Das Granulationsgewebe stellte sich zunächst ungeordnet und zellreich dar mit unregelmäßig geformten Fibroblasten und teilweise noch nicht vollständig ausdifferenzierten Gefäßen. Parallel zur Zunahme des Granulationsgewebes mit Resorption unterschiedlich großer Anteile der Dermis und zum Teil auch der Hautanhangsgebilde konnte eine Ausreifung des Granulationsgewebes (und damit ein Übergang in die reparative Phase), ausgehend von den tieferen Schichten der Dermis zur Oberfläche des Biopats beschrieben werden. Die Fibroblasten ordneten sich hierbei parallel zur Oberfläche der Stanze an und zeigten sich langgezogen, schmal mit kleinerem Zellkern. Immunhistochemisch konnte bei der Färbung für Aktin eine Differenzierung zu Myofibroblasten beobachtet werden. Die sich darstellenden Gefäße wiesen ein Lumen auf,



---

waren blutgefüllt und zeigten einen vertikalen Verlauf. Der Anteil der extrazellulären Matrix nahm zu, wobei diese sich in der HE-Färbung zunächst homogen eosinophil darstellte. Nach und nach zeigte sich eine Bildung von zunächst dünnen, schließlich dicken, in der vG-Färbung rot gefärbten kollagenen Fasern, und eine Verkleinerung und Abnahme der Zellzahl mit Differenzierung zu Fibrozyten. Daneben erfolgte an der Oberfläche der Stanze eine Reepithelialisierung aus den noch vorhandenen Hautanhangsgebilden und vom Wundrand. Zunächst stellte sich das Epithel noch ungeordnet dar und bestand aus wenigen undifferenzierten Zellschichten. Nach einer vollständigen Bedeckung der Oberfläche mit durchgehender Ausbildung einer Basalmembran war das Epithel zunächst verbreitert, z.T. mit ausgeprägten Epithelzapfen und einer mehrschichtigen, schlecht abgrenzbaren, stark proliferierenden Basalzellschicht. Eine vollständige Ausreifung und Verhornung des Plattenepithels lag zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor. Am Ende des Untersuchungszeitraumes war sowohl die Dermis, als auch die Epidermis in allen Schnitten wiederhergestellt. Das Plattenepithel zeigte eine regelrechte Ausreifung mit oberflächlicher Verhornung. Die Dermis stellte sich zellarm dar und bestand überwiegend aus breiten Kollagenfasern.

Die Kontrollstanze eines gleichaltrigen unbehandelten Tieres zeigte ein regelrecht verhornendes Plattenepithel. Das Korium (Dermis) bestand aus einem flachen Stratum papillare, bestehend aus lockerem Bindegewebe mit einzelnen Gefäßanschnitten, und ein breites Stratum reticulare, das sich überwiegend aus breiten Kollagenfaserbündeln mit wenigen Fibrozyten zusammensetzte. Die Kollagenfasern waren parallel zur Oberfläche angeordnet und zeigten eine gitternetzartige Verschränkung.

Im Vergleich hierzu zeigten die meisten Hautstanzen der Untersuchungsgruppen ein verschmälertes Epithel ohne papilläre Verzahnung mit der Dermis. Die Dermis (Korium) zeigte kein eindeutig abgrenzbares Stratum papillare. Das Stratum reticulare bestand aus unregelmäßigen, meist parallel zur Oberfläche angeordneten, nicht gitternetzartig verschränkten Kollagenfasern. Der Übergang ins subdermale Fettgewebe war häufig unregelmäßig mit teilweise verbreiterten, unregelmäßigen Bindegewebssepten innerhalb des Fettgewebes.

Diese Veränderungen konnten in allen Untersuchungsgruppen beobachtet werden. Es zeigten sich jedoch wesentliche Unterschiede im zeitlichen und qualitativen Verlauf der Behandlungsgruppen.

#### 5.1.1.1 Gruppe I: Kontrollgruppe

Bei den 5 Tieren der Kontrollgruppe, deren Defekt ohne Wundabdeckung belassen wurde, konnten die für die sekundäre Wundheilung typischen Phasen und deren Merkmale dargestellt werden. Die exsudative Phase erstreckte sich hierbei bis zum 7. Tag post operationem. Bis zu diesem Zeitpunkt waren noch Granulozyten und ödematöse Bereiche abgrenzbar. Erhöhte Permeabilität und Aktivierung von Entzündungszellen wie Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Fibroblasten sind typisch für die Entzündungsphase (HEDLUND 2009). Bei der Mehrheit der Stenzen richteten sich die Zellen des Granulationsgewebes am 10. Tag bis ca. zur Hälfte der Granulationsgewebsschicht aus und differenzierten sich bereits zu Myofibroblasten. Dies konnte in allen Stenzen erst an Tag 30 beschrieben werden. Die maximale Dicke des Granulationsgewebes war bereits an Tag 10 erreicht. Das im Gegensatz zur Spalthaut-Gruppe vermehrte Vorkommen an Granulationsgewebe ist typisch für sekundäre Wundheilung (GINN 2009). Die fortschreitende Ausreifung des Granulationsgewebes bis über den 30. Tag nach Defektsetzung ist ein weiteres Indiz, dass hier von sekundärer Wundheilung ausgegangen werden kann. Es bildet die Grundlage für die Epithelialisierung (HEDLUND 2009). Ein vollständig ausdifferenziertes Epithel konnte in der Kontrollgruppe erst an Tag 30 beschrieben werden. Am Tag 90 waren noch Reste von Granulationsgewebe sichtbar, was bedeuten könnte, dass der Ausreifungsprozess noch nicht völlig abgeschlossen war.

#### 5.1.1.2 Gruppe II: „Small Intestine Submucosa“

Auch innerhalb der SIS-Gruppe waren die Phasen der sekundären Wundheilung zu erkennen. So zeigten sich bis zum 10. Tag post operationem noch vereinzelt Granulozyten und Ödem als Hinweis dafür, dass die exsudative Phase noch geringfügig in Gang war. Des Weiteren waren in zwei Stenzen bakterielle Einschlüsse zu erkennen, was darauf hindeutet, dass es zu einer bakteriellen Sekundärinfektion kam. Vermeintliche Gründe hierfür könnten sein, dass es sich bei der SIS-Gruppe als äußerst schwierig erwies, eine optimale Adaption der Wundaufgabe zu garantieren. Die SIS-Auflage zeigte sich makroskopisch an den Stanztagen 7 und 10 als trockene, bröckelige Kruste. Auch mikroskopisch war zu erkennen, dass die oberflächliche Abdeckung der Wunde nur an Tag 3 vollständig intakt war. Nach Tag 3 zeigte sich oberflächlich immer mehr Granulationsgewebe und Fremdkörperreaktionen mit vor allem oberflächlich gebildeten Fremdkörperriesenzellen waren erkennbar. Fremdkörperreaktionen werden als eine der Hauptursachen für verzögerte Wundheilung

---

angesehen (WEISE und SCHÄFFER 2000). Fremdkörper jeglicher Art können überschießende Entzündungen auslösen. Durch sezernierte Enzyme im Wundgebiet wird dabei die Wundmatrix zerstört, die Exsudationsphase verlängert und die Bildung von Granulationsgewebe verzögert (KRAMER 2004). GOMEZ et al. berichten in ihrer Studie aus dem Jahre 2004, dass SIS und Peritoneum als Auflage fragiler waren und sich während des Verbandswechsels oft bröckelig darstellten, im Gegensatz zur dort ebenfalls verwendeten Spalthaut (GOMEZ et al. 2004). In der vorliegenden Untersuchung erreichte das Granulationsgewebe an Tag 10 seine maximale Dicke. Des Weiteren war hier bereits ein Anfang der Ausdifferenzierung dieser Schicht zu erkennen, was als Übergang der resorptiven/proliferativen Phase in die reparative Phase gedeutet werden kann. Laut PREVEL et al. wurde die Epithelialisierung von Wunden bei Ratten durch Auflage kollagenhaltiger Biomaterialien positiv beeinflusst (PREVEL et al. 1995). SWAIM et al. geben an, dass bei der Behandlung von Vollhautwunden bei Hunden die Wunden, welche mit hydrolysiertes Kollagenaufgabe behandelt wurden, eine prozentual gesehen signifikant höhere Epithelialisierung zeigen, als die Kontrollgruppe (SWAIM et al. 2000). In der hier mit SIS-behandelten Gruppe scheint dies eher nicht der Fall zu sein. GOMEZ et al. konnten bei der Anwendung von SIS auf Hautwunden an den Gliedmaßen bei Pferden keine Effekte der SIS auf die Epithelialisierung feststellen (GOMEZ et al. 2004). In der hier durchgeführten Studie erwies sich der Verlauf der Epithelialisierung innerhalb der Gruppe als ausgesprochen heterogen. Zeigte sich am 10. Tag noch ein unvollständiges, nur teilweise ausdifferenziertes Epithel, so konnte an Tag 30 bei allen Stenzen eine vollständige Epithelbedeckung beobachtet werden. Dies deckt sich in etwa mit den Beobachtungen in der Kontrollgruppe. An Tag 90 waren nur noch unregelmäßige Anordnungen in den Schichten der Dermis zu erkennen, was auf eine noch laufende Reifungsphase schließen lassen könnte.

#### 5.1.1.3 Gruppe III: „Autologe Spalthaut“

Innerhalb dieser Gruppe wurden eher Kriterien der primären Wundheilung sichtbar. Laut GINN 2009 und KRAMER 2004 können folgende Kriterien für die Abgrenzung zwischen primärer und sekundärer Wundheilung herangezogen werden: zum Einen ist die Entzündung aufgrund des größeren Substanzverlustes bei sekundärer Wundheilung stärker ausgeprägt, zum Anderen wird hierbei mehr Granulationsgewebe gebildet (KRAMER 2004; GINN 2009). Dies konnte in der Spalthaut-Gruppe bestätigt werden. Am 3. Tag war nur eine äußerst

begrenzte exsudative Entzündung sichtbar. Das Granulationsgewebe machte am 7. Tag post operationem den breitesten Eindruck, wirkte aber im Vergleich zur Granulationsgewebsschicht der Kontrollgruppe eher bandartig und wies deutliche Anzeichen beginnender Differenzierung auf. Vollständiges Epithel war bereits ab dem 3. Tag vorhanden. Ein Verlust der Abdeckung bzw. eine Abstoßung des Transplantats konnte bis zu Tag 90 nicht nachgewiesen werden.

#### 5.1.1.4 Gruppe IV: „Autofetales“ Amnion

Innerhalb der Gruppe, deren Defekte mit autofetalem Amnion als Wundauflage versorgt wurden, konnten ebenfalls Phasen der sekundären Wundheilung nachgewiesen werden. Die exsudative Phase konnte nur noch begrenzt an Tag 3 festgestellt werden. Perivaskulär traten nur noch vereinzelt Makrophagen, Granulozyten und Fibroblasten auf. Somit ist hier schon von einem Übergang in die resorptive/proliferative Phase auszugehen. YANG et al. (2006) geben an, dass der Amnionmembran durch das Freisetzen von Wachstumsfaktoren die Fähigkeit zugesprochen werden kann, Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten und letztendlich die Reepithelialisierung zu beschleunigen, des Weiteren, dass Transplantate mit denudierter Amnionmembran jene ohne Amnionmembran hinsichtlich der Keratinozytenproliferation und -differenzierung übertreffen (YANG et al. 2006). Wunden, die mit einem Substanzverlust einhergehen epithelisieren innerhalb von 4-5 Tagen (HEDLUND 2009). In der vorliegenden Untersuchung konnte dies bestätigt werden. Oberflächlich konnte am 3. Tag eine dünne, überwiegend homogen eosinophile Auflage abgegrenzt werden. Bereits am 7. Tag konnte nahezu in fast allen Stenzen eine vollständige Epithelialisierung nachgewiesen werden. MARAL et al. wandten in ihrer Studie im Jahre 1999 bei Ratten konservierte Haut, frisches Amnion und in Glycerol konservierte Amnionmembran auf Spalthautwunden an, verglichen deren Effektivität mit einer Kontrollgruppe ohne Abdeckung. Nach 7 Tagen war in allen 3 Vergleichsgruppen ein vollständiges Epithel vorhanden. Wunden, welche bis Tag 7 noch nicht vollständig verheilt waren schienen die Anhaftung des Amnions verloren zu haben und wiesen eine ähnliche Entzündungsreaktion wie die Kontrollgruppe auf (MARAL et al. 1999). In der hier durchgeführten Untersuchung konnte außer bei einer Stanze am 10. postoperativen Tag intaktes Epithel abgegrenzt werden. Neu gebildetes Epithel schien sich nur darunter zu bilden. Darauf stützend könnte es sich bei dieser Auflage vielleicht um Teile des Amnions handeln, welches die schnelle Epithelialisierung innerhalb dieser Gruppe gefördert hat. Dies deckt sich

---

mit den Eindrücken aus Studien, in denen Amnion bei extensiven Brandwunden angewendet wurde. In diesen Studien wird davon berichtet, dass Amnion eine sichere, einfach zu nutzende Wundaufgabe ist, welche sich äußerst positiv auf die Reepithelialisierung von Hautwunden auswirkt (COLOCHO et al. 1974; QUINBY et al. 1982; SAWHNEY 1989; RAMAKRISHNAN und JAYARAMAN 1997). Das vorhandene Granulationsgewebe zeigte bereits ab Tag 7 Tendenzen der Ausdifferenzierung, entwickelte sich hinsichtlich der Breite auf Tag 10 hin noch etwas weiter und differenzierte sich weiter aus. An Tag 30 war kaum noch Granulationsgewebe abgrenzbar, die Kollagenfasern der Dermis deutlich zu sehen und horizontal ausgerichtet, was als Hinweis für den bereits erfolgten Übergang in die Reifungsphase gedeutet werden könnte. Am 90. Tag erschien die Dermis schmal, das Stratum papillare war noch schlecht abgrenzbar, allerdings zeigte sich bereits eine scherengitterartige Strukturierung der kollagenen Fasern des Stratum reticulare. Aufgrund des histologischen Bildes könnte man vermuten, dass hier der Prozess der sekundären Wundheilung wesentlich schneller ablief, als es in der Kontroll- bzw. der SIS-Gruppe den Anschein macht. SAWHNEY (1989) teilte in seiner Studie 90 Patienten mit unterschiedlich tiefgehenden Verbrennungen in 3 Untergruppen auf, je nach dem wie tief die Wunde war in oberflächliche, mittlere und tiefe Brandwunden. 15 Patienten pro Gruppe erhielten frisches Amnion als Wundabdeckung, die anderen eine Wundsalbe. Ein Beurteilungskriterium war die Heilungszeit. SAWHNEY (1989) konnte eine signifikant schnellere Heilung der mit Amnion versorgten Gruppen aufzeigen: oberflächlich: 9,3 ↔ 12,5 Tage; mittlere: 15,7 ↔ 23,6 Tage; tiefe: 27,5 ↔ 37,5 Tage (SAWHNEY 1989). SUBRAHMANYAM (1994) verglich bei insgesamt 64 Patienten mit unterschiedlich tiefen Brandwunden mit Honig imprägnierte Wundgaze mit frischem Amnion und kam dabei zu dem Schluss, dass die mit Honig behandelten Wunden im Durchschnitt bereits nach 9,4 Tagen verheilt waren, die mit Amnion versorgten Wunden erst nach 17,5 Tagen (SUBRAHMANYAM 1994).

#### 5.1.1.5 Gruppe V: „Allogenes“ Amnion

Bei allen 6 Tieren der allogenen Gruppe konnte ebenfalls der Verlauf einer sekundären Wundheilung beobachtet werden. Die exsudative Phase war am 3. Tag nur noch begrenzt in Gang. Granulozyteninfiltrate konnten noch bis Tag 7, vereinzelt ödematisierte Bereiche bis zum 10. Tag nachvollzogen werden, was bedeuten könnte, dass auch in dieser Gruppe der Übergang in die resorptive/proliferative Phase bereits ab Tag 3 stattgefunden haben könnte. Am 10. Tag konnte bereits bei allen Stansen ähnlich der autofetalen Gruppe eine

---

Epithelialisierung mit Ausdifferenzierung beobachtet werden, zumindest über jeweils die Hälfte der Stanzten. Dazwischen waren Bereiche erkennbar, in denen das Granulationsgewebe noch freilag. Erklärung hierfür könnte sein, dass sich das Ablösen des Kompressionskissens an den ersten beiden Stanzterminen als etwas schwierig gestaltete und man nicht sicher gehen konnte, ob einzelne Stücke des Amnions nicht am Verband hängengeblieben waren. FAULK et al. (1980) berichten darüber, dass eine intakte Basalmembran und stromale Matrix wichtig sind für die Heilungspotenz der Amnionmembran, sprich somit auch für die schnelle Reepithelialisierung (FAULK et al. 1980). Betrachtet man das mikroskopische Bild der oberflächlichen Abdeckung, so zeigte sich diese in der vorliegenden Untersuchung nur am 3. Tag teilweise intakt als dünne, homogen eosinophile Schicht mit Spaltbildungen. Im Hinblick auf Tag 7 schien sie in Teilen bereits resorbiert. Wie YANG et al. (2006) berichten, wird der Amnionmembran durch das Freisetzen von Wachstumsfaktoren die Fähigkeit zugesprochen, Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten und letztendlich die Reepithelialisierung zu beschleunigen. Transplantate mit denudierter Amnionmembran übertreffen jene ohne Amnionmembran hinsichtlich der Keratinozytenproliferation und – differenzierung (YANG et al. 2006). Ein vollständig intaktes und ausdifferenziertes Epithel konnte in dieser Gruppe allerdings bei allen Tieren erst am 30. Tag verifiziert werden. Des Weiteren waren innerhalb dieser Untersuchungsgruppe bei fast allen Stanzten an Tag 3 und 7 vermehrte Fremdkörperreaktionen mit vor allem oberflächlich gebildeten Fremdkörperrießzellen erkennbar. Dies könnte die Vermutung unterstützen, dass Teile der Wundauflage resorbiert worden sind. Die Qualität des Granulationsgewebes konnte wie im Folgenden beschrieben beobachtet werden: am 10. Tag war in etwa die Hälfte, am 30. Tag bis zu 2/3 der Schicht ausdifferenziert. Die maximale Dicke konnte an Tag 10 festgestellt werden, an Tag 30 wirkte die Schicht des Granulationsgewebes schon deutlich schmaler. Dies könnte somit dafür sprechen, dass bereits an Tag 10 ein Übertritt in die reparative Phase erfolgte. An Tag 90 waren noch Reste des Granulationsgewebes zu sehen. Die vorhandenen Kollagenfasern wiesen noch keine scherengitterartige Struktur auf, was auf einen noch nicht vollkommenen Abschluss der Reifungsphase schließen lassen könnte.

## 5.1.2 Quantitative Analyse

### 5.1.2.1 Granulationsgewebsdicke

Laut HEDLUND (2009) beginnen die Reparationsvorgänge, somit auch die Kollagenbildung, innerhalb der ersten 3-5 Tage nach der Verletzung. An den HE-gefärbten Schnittpräparaten wurde zur Beurteilung der resorptiven/proliferativen und der reparativen Phase an je 5 Tieren pro Gruppe an Tag 7 und 10 die Dicke der Granulationsgewebsschicht gemessen. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte nur in der autofetalen Gruppe eine signifikante Zunahme der Granulationsgewebsdicke zwischen Tag 7 und 10 festgestellt werden. In den weiteren Gruppen zeigte sich dies nicht. Dies könnte bedeuten, dass in der autofetalen Gruppe die resorptive/proliferative Phase noch nicht ganz abgeschlossen war. Gegenüber der SIS-Gruppe (Tag 7:  $119,79 \pm 22,06$ ) konnte an Tag 7 allerdings sowohl innerhalb der autofetalen, als auch innerhalb der allogenen Gruppe eine signifikant geringere Dicke der Granulationsgewebsschicht gemessen werden. Zwischen den beiden Amnion-Gruppen bestand kein Unterschied. Da die Wundheilung laut HEDLUND (2009) ein komplex ablaufender Prozess serieller Reaktionen darstellt und sich somit die verschiedenen Phasen der Wundheilung überschneiden, könnten die hier aufgetretenen Ergebnisse folgendermaßen interpretiert werden: die Dicke des Granulationsgewebes nahm zwar nur innerhalb der autofetalen Gruppe signifikant zu (Tag 7:  $31,38 \pm 18,93$  ↔ Tag 10:  $56,68 \pm 25,44$ ), könnte aber aufgrund des schnelleren Verlaufs des Heilungsprozesses innerhalb der autofetalen Gruppe schneller umgebaut werden. Entsprechendes ließe sich für die allogene Gruppe behaupten, könnte hier von einer fehlerlosen Adaption der Wundauflage ausgegangen werden, da kein Unterschied zwischen den beiden Amnion-Gruppen hinsichtlich der Breite der Granulationsgewebsschicht festzustellen war. Auch bei der Spalthautgruppe war an Tag 7 eine signifikant geringere Dicke der Granulationsgewebsschicht sowohl gegenüber der Kontrollgruppe, als auch gegenüber der SIS-Gruppe festzustellen. Aufgrund der Tatsache, dass laut KRAMER (2004) und GINN (2009) die Ausprägung des Granulationsgewebes zur Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer Wundheilung herangezogen werden kann, könnten diese deutlichen Unterschiede einen weiteren Hinweis darauf liefern, dass es sich bei der Spalthaut-Gruppe um einen eher primären Wundheilungsverlauf handelt, wohingegen Kontroll- und SIS-Gruppe eher einen sekundären aufweisen. Beide Amnion-Gruppen sowie die SIS-Gruppe wiesen keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die Kontrollgruppe auf, was deren Zuteilung zur sekundären Wundheilung unterstreichen könnte.

---

### 5.1.2.2 Hautanhangsgebilde an Tag 90

In der durchgeführten Untersuchung wies die autofetale Gruppe (n=6) an Tag 90 im Vergleich zu einem unbehandelten Tier (n=1) als einzige Gruppe signifikant weniger Hautanhangsgebilde (HAG) auf (2,99 HAG↔10 HAG). Es könnte daher daraus geschlossen werden, dass sich vermehrt Narbengewebe gebildet hat bzw. sich weniger Hautanhangsgebilde regenerieren konnten als in den restlichen 4 Gruppen, da in Narbengewebe keine Hautanhangsgebilde mehr zu finden sind (WEISS und TEIFKE 2007).



## 5.2 Immunhistologie

### 5.2.1 von Willebrand Faktor: Gefäßproliferation

Die Angiogenese stellt einen der essentiellen Vorgänge der Reparationsphase dar. Durch das Einsprossen von Gefäßen in das Wundgebiet wird dort zum Einen der Sauerstoffgehalt erhöht, was die Gewebeneubildung verbessert, zum Anderen werden Abfallprodukte entfernt (ACKERMANN 2009; HEDLUND 2009). In der hier durchgeführten Auszählung der Gefäße in je 10 High Power Fields kamen folgende Auffälligkeiten zum Vorschein: die mit Spalthaut versorgte Gruppe wies am 7. sowie 10. postoperativen Tag signifikant weniger Gefäße auf, als die allogene, die autofetale oder die Kontrollgruppe. Da aufgrund der vorhandenen Menge an Granulationsgewebe davon ausgegangen werden könnte, dass es sich hierbei eher um eine primäre anstatt wie bei den anderen 3 Gruppen um eine sekundäre Wundheilung handelt, ließe sich dieses signifikant geringere Auftreten an Gefäßen erklären. Die SIS-Gruppe zeigt an beiden Tagen als einzige Gruppe keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Spalthaut-Gruppe, weist aber auch signifikant weniger Gefäße auf als die allogene, die autofetale und die Kontrollgruppe. LINHARDT und HILEMAN (1995) sowie HODDE (1996) gehen von proangiogenetischen Eigenschaften der SIS aus. Dies könnte darauf hindeuten, dass innerhalb dieser Untersuchung keine proangiogenetischen Effekte der SIS dargestellt werden konnten. Es stellt sich allerdings die Frage, ob darüber geurteilt werden kann, da auf die Schwierigkeiten der Adaption der SIS verwiesen werden muss. Die signifikant höhere Anzahl an Gefäßen innerhalb der beiden Amnion-Gruppen trotz geringerer Granulationsgewebsdicke als die SIS-Gruppe könnte die Vermutung nahe legen, dass dem Amnion proangiogenetische Effekte zuzuschreiben sind. Dies deckt sich in etwa mit den Aussagen von MIGNATTI (1989) und BODGIC (2000). Des Weiteren konnten in histologischen, immunhistologischen und Perfusionsuntersuchungen an chronischen Ulzera und intraoralen Lokalisationen, welche mit Amnion abgedeckt wurden eine eindeutige Stimulation der Angiogenese aufgezeigt werden (FAULK et al. 1980; GÜLER et al. 1997). Bestärkt werden könnte diese Vermutung dadurch, dass zwischen den beiden Amnion-Gruppen kein signifikanter Unterschied festzustellen war, obwohl innerhalb der allogenen Gruppe ebenfalls der Verdacht bestand, dass Teile des Amnions nicht immer exakt auf der Wundoberfläche adaptiert waren. Älteren Studien zufolge wurden dem Amnion eher antiangiogenetische Effekte zugesprochen (BURGOS 1986; HAO et al. 2000). Dem gegenüber steht, dass sowohl die autofetale, als auch die allogene Gruppe keinen signifikanten

---

Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe aufwies. Bezieht man hierbei allerdings die zeitlichen und qualitativen Unterschiede des Wundheilungsverlaufs innerhalb der jeweiligen Gruppe mit ein, so könnte dies eine mögliche Erklärung liefern. Zudem kann innerhalb der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der Gefäßanzahl von Tag 7 zu Tag 10 beobachtet werden.

### **5.2.2 Ki-67: proliferative Zellen**

In der durchgeführten Untersuchung zeigte die Spalthaut-Gruppe die höchste Aktivität. Zieht man die restlichen Vergleiche heran, so zeigte die mit Spalthaut versorgte Gruppe an beiden Tagen signifikant höhere Proliferationsaktivität gegenüber der autofetalen Gruppe bzw. an Tag 90 gegenüber der allogenen Gruppe. Des Weiteren waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Amnion-Gruppen erkennbar. Zwischen den Gruppen Autofetal und Allogen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Proliferationsaktivität aufgezeigt werden, wie auch beim Vergleich der Tage innerhalb jeder Gruppe. Dies kann als relativ konstante Aktivität gedeutet werden, da es mit dem histologischen Bild der reparativen Wundheilungsphase mit nur noch wenigen strukturellen Gewebsänderungen und geringem Zellumsatz übereinstimmt und das Epithel sich bereits vollständig ausgereift darstellte. Auffällig war, dass die autofetale Gruppe an Tag 30 im Vergleich zur SIS-Gruppe eine signifikant höhere Aktivität aufwies, sich dies jedoch an Tag 90 umdrehte. Dies könnte als Bestätigung angesehen werden, dass aufgrund des schnelleren Wundheilungsverlaufs die Proliferation und Ausdifferenzierung des Epithels innerhalb der autofetalen Gruppe bereits ab Tag 10 abgeschlossen war, innerhalb der SIS-Gruppe diese Beobachtungen erst an Tag 30 festgestellt werden konnten. Des Weiteren konnte sowohl bei der Kontroll-, der SIS-, als auch bei der Spalthaut-Gruppe von Tag 30 zu Tag 90 eine signifikante Zunahme der Proliferationsaktivität nachgewiesen werden. Die Spalthaut-Gruppe wiederum zeigte an beiden Tagen signifikant mehr proliferative Zellen, als die Kontrollgruppe, gegenüber der SIS-Gruppe konnte dies nur an Tag 30 festgestellt werden. Da das Epithel der Spalthaut-Gruppe bereits von Anfang an intakt war, könnte die Proliferationsaktivität des Epithels die ständigen Erneuerungen des Epithels widerspiegeln. Sowohl die Kontrollgruppe als auch die SIS-Gruppe zeigen gegenüber der mit Spalthaut versorgten Gruppe einen sekundären Wundheilungsverlauf. Dieser zeigt an Tag 30 im histologischen Bild noch teilweise Kriterien der resorptiven Phase mit erhöhtem Zellumsatz in Weichgewebe und Epithel; ein vollständig intaktes Epithel ist in beiden Gruppen erst ab

Tag 30 zu verzeichnen. Somit ist die erhöhte Proliferationsaktivität an Tag 30 und 90 innerhalb beider Gruppen auf die verlängerte Wundheilung zurückzuführen. Die Zunahme der Proliferation von Tag 30 zu Tag 90 kann dem histologischen Bild nicht zugeordnet werden. Eine Möglichkeit der Erklärung könnte ein struktureller Fehler durch den Vergleich der positiv angefärbten Zellen pro HPF sein. Da die Zellen in ruhendem Zustand meist einen kleineren Zellkern und weniger Zytoplasma aufweisen, könnte durch eine Darstellung von insgesamt dichter liegenden Zellen innerhalb eines Gesichtsfeldes ein Fehler entstanden sein. So zeigt die Kontrollgruppe erst an Tag 90 vermehrte Aktivität, liegt allerdings deutlich unter der Aktivität des Spalthaut-Epithels. Die SIS-Gruppe wiederum wies an Tag 90 eine deutliche Steigerung ihrer Proliferationsaktivität auf, schien mit der Spalthaut-Gruppe gleich auf und übertraf an diesem 90. Tag auch deutlich die Aktivität der Kontrollgruppe.

### **5.2.3 Aktin: Myofibroblasten**

Laut HEDLUND (2009) ist das Granulationsgewebe Ausgangspunkt von Myofibroblasten, welche später aufgrund ihres Aufbaus aus unterschiedlichen kontraktilen Proteinen für die Wundkontraktion verantwortlich sind (HEDLUND 2009). In der vorliegenden Untersuchung zeigte die Spalthaut-Gruppe an Tag 10 gegenüber allen anderen Gruppen signifikant weniger Myofibroblasten. Aufgrund der Annahme, dass die Wundheilung innerhalb dieser Gruppe eher den Kriterien einer primären Wundheilung folgt, somit auch weniger Granulationsgewebe vorhanden war, könnte dies als Erklärung dieser Beobachtung herangezogen werden. Sowohl die SIS-Gruppe, als auch die allogene Gruppe wiesen an Tag 10 deutlich mehr Myofibroblasten auf, als die Kontrollgruppe. Im Vergleich der SIS- und allogenen Gruppe untereinander ließen sich diesbezüglich keine Unterschiede feststellen. Dies könnte anhand der jeweils vorliegenden Wundheilungsphase und somit anhand der unterschiedlichen Ausreifungsgrade des Granulationsgewebes erklärt werden. Die SIS-Gruppe sowie die allogene Gruppe erreichten bereits an Tag 10 die maximale Dicke der Granulationsgewebsschicht und den Übertritt in die reparative Phase. Des Weiteren konnten wesentlich mehr Myofibroblasten innerhalb der allogenen Gruppe ausgezählt werden, als in der autofetalen Gruppe. Grund hierfür könnte sein, dass die Wundheilung innerhalb der autofetalen Gruppe wesentlich schneller voranging und die Wunde der allogenen Gruppe eventuell stärkere Tendenz zur Kontraktion besitzen könnte. Die Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist TGF- $\beta$ -abhängig (DESMOULIERE et al. 1993). KOIZUMI et al. (2000) berichteten in ihrer Untersuchung über die Expression von

---

Wachstumsfaktoren in Epithel und Stroma der Amnionmembran, woraus sich ergab, dass in intaktem Amnionepithel im Vergleich zu denudierter Amnionmembran eine höhere Konzentration an Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- $\beta$ , HGF, KGF und FGF vorzufinden sei. Dies könnte dazu geführt haben, dass durch das Amnionepithel die Ausreifung des Granulationsgewebes schneller ablief. Sowohl gegenüber der SIS-, als auch gegenüber der Kontrollgruppe wies die autofetale Gruppe hinsichtlich der ausgezählten Myofibroblasten keine deutlichen Unterschiede auf, was zum Einen an der histologisch erkennbaren unterschiedlichen Ausprägung der Granulationsgewebsschicht zurückzuführen sein könnte, zum Anderen aber auch aufgrund des unterschiedlichen zeitlichen Verlaufs darauf hinweisen könnte, dass dies bereits tendenziell eine vermehrte Wundkontraktion darstellt.

#### **5.2.4 Laminin: Darstellung der Basalmembran**

Die Darstellung der Basalmembran unterstreicht die in der qualitativen Analyse entstandenen Eindrücke bezüglich der Reepithelialisierung. So lässt sich verständlicher Weise innerhalb der Spalthaut-Gruppe bereits ab Tag 3 eine intakte Basalmembran darstellen. Wie HEDLUND (2009) bestätigt, ist eine intakte Basalmembran Ausgangspunkt für das Fortschreiten des Reepithelialisierungsprozesses. Ab Tag 7 konnte innerhalb der autofetalen Gruppe bereits ein teilweise intaktes Epithel, an Tag 10 ein vollständig intaktes Epithel beobachtet werden, was sich mit der Darstellung der Basalmembran deckt. Innerhalb der allogenen Gruppe wurden bereits gewisse Adaptionsfehler des Gewebes diskutiert, wodurch sich ein vollständig wirkendes Epithel erst ab Tag 30 darstellen lies. Teilweise intakt stellte sich das Epithel bereits ab Tag 7 bzw.10 dar. Auch diese Beobachtungen lassen sich anhand der Basalmembran bestätigen. Die SIS- bzw. die Kontrollgruppe weisen ab Tag 10 ein teilweise intaktes, ab Tag 30 ein vollständig intaktes Epithel auf. Dies deckt sich in etwa mit der Darstellung der Basalmembran innerhalb der beiden Gruppen.

## 6 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit vergleicht verschiedene Biomaterialien, die zur Abdeckung eines Spalthautentnahme-Defektes verwendet wurden, hinsichtlich ihres Wundheilungsverlaufs und ihrer wundheilungsfördernden Eigenschaften mit Hauptaugenmerk auf Reepithelialisierung, Neovaskularisation, Zellproliferation und der Beurteilung von Wundkontraktion und Vernarbungstendenz.

Bei allen Gruppen zeigte sich eine Ausheilung des Defektes bis zum 90. Tag, was darauf schließen lässt, dass grundsätzlich alle verwendeten Biomaterialien zur Wundabdeckung bei Spalthautwunden verwendet werden können. Histologisch konnten folgende Unterschiede des Wundheilungsverlaufs festgestellt werden:

Einzig bei der mit autologer Spalthaut versorgten Gruppe konnte eine primäre Wundheilung beobachtet werden. Alle anderen Gruppen zeigten histologisch einen sekundären Wundheilungsverlauf mit zeitlichen und qualitativen Unterschieden. Innerhalb der Kontrollgruppe erstreckte sich die exsudative Phase bis zum 7. postoperativen Tag, die resorptive/proliferative Phase bis nahezu zum 30. Tag. Ein vollständig ausdifferenziertes Epithel konnte innerhalb dieser Gruppe am 30. Tag nachgewiesen werden, bestätigt durch die immunhistologische Färbung mittels Laminin. Die Reifungsphase war bis zum 90. Tag noch nicht vollständig abgeschlossen.

Ähnlich verhielt es sich innerhalb der mit SIS versorgten Gruppe. Die exsudative Phase erstreckte sich bis zum 10. Tag, was sich anhand von auftretenden Fremdkörperreaktionen erklären lässt. Der Übergang von resorptiver/proliferativer Phase in die Reifungsphase konnte bereits am Tag 10 festgestellt werden. Eine Förderung der Reepithelialisierung war nicht zu erkennen, da ein vollständiges Epithel in allen Stenzen erst am Tag 30 zu sehen war, was auf Anhaftungsschwierigkeiten der SIS auf der Wundfläche zurückzuführen sein könnte.

Dem gegenüber zeigten beide Amnion-Gruppen eine kürzere exsudative Phase bzw. einen Übergang in die resorptive/proliferative Phase am 3. postoperativen Tag. Innerhalb der autofetalen Gruppe konnte bereits ab dem 7. Tag eine nahezu vollständige Epithelialisierung in fast allen Stenzen nachgewiesen werden. Am Tag 10 zeigten bis auf eine Stanze alle Proben ein vollständiges Epithel, was sich in der Lamininfärbung nachvollziehen lässt. Bei der allogenen Gruppe konnte dies erst am Tag 30 festgestellt werden. Allerdings zeigten auch hier bereits alle Stenzen am Tag 7 größere Bereiche ausgereiften Epithels. Dem Amnion konnte

---

somit eine die Reepithelialisierung fördernde Eigenschaft nachgewiesen werden. Bezüglich der Reifungsphase konnten leichte zeitliche Unterschiede zwischen den Amnion-Gruppen festgestellt werden. So konnte in der autofetalen Gruppe bereits an Tag 7 eine deutliche Ausreifung erkannt werden, dies zeigte sich innerhalb der allogenen Gruppe erst am 10. Tag. Am 90. postoperativen Tag war die Reifungsphase der autofetalen Gruppe vollständig abgeschlossen, innerhalb der allogenen Gruppe noch Ausreifungsprozesse sichtbar. Bezüglich der Neovaskularisation konnten zumindest in dieser Arbeit die propagierten proangiogenetischen Eigenschaften der Small Intestine Submucosa (SIS) nicht bestätigt werden. Hingegen wiesen beide Amnion-Gruppen eher proangiogenetische Effekte auf.

In der Untersuchung mittels des Proliferationsmarkers Ki-67 konnten unterschiedliche und teils divergierende Aktivitäten festgestellt werden, was die zwischen den Gruppen zeitlichen Unterschiede der Wundheilungsabläufe erklären könnte. In Bezugnahme auf die raschere Reepithelialisierungsrate kann auf einen schnelleren Ablauf der Wundheilung innerhalb der Amnion-Gruppen geschlossen werden und würde erklären, dass innerhalb der Amnion-Gruppen die Wundkontraktion früher einsetzt und daher an Tag 10 bereits stärker ausgeprägt ist als in den anderen Gruppen.

Bei der Auszählung der an Tag 90 vorhandenen Hautanhangsgebilde wiesen die Proben der autofetalen Gruppe im Vergleich zu einer Probe eines unbehandelnden Tieres zwar signifikant weniger Hautanhangsgebilde auf, was prinzipiell auf eine stärkere Narbenausbildung hindeutet, vom klinischen Eindruck aber nicht bestätigt werden konnte. Hier wäre in Folgestudien darüber nachzudenken, ob weitere Parameter, wie z.B. die Bestimmung des Gehalts der verschiedenen Kollagenformen bzw. Bestimmung der Verhältnisse zwischen Fibrozyten und Myofibroblasten für die Bewertung des Vernarbungsgrades hinzugezogen werden sollten.

## 7 Zusammenfassung

### **Deckung porciner Spalthautentnahme-Defekte mit verschiedenen Biomaterialien**

Ziel der durchgeführten Untersuchung war es, von trächtigen Sauen gewonnene und im Anschluss kryokonservierte „autofetale“ Amnionmembran gegenüber „allogener“ Amnionmembran sowie porciner „Small intestine submucosa“ und autologer Spalthaut bezüglich ihrer Eigenschaften zur Wundheilung zu untersuchen. Dazu wurden iatrogen geschaffene Spalthautdefekte mit den genannten Materialien versorgt und gegen einen nicht behandelten Spalthautdefekt verglichen. Als Versuchstiere dienten insgesamt 35 Hybrid-Schweine (Schwäbisch Hällische x Pietrain). Zur Gewinnung der Ferkel und des Amnions wurde an 5 trächtigen Muttersauen ein Kaiserschnitt vorgenommen. An jeweils 6 Ferkeln pro Muttertier wurden in der 8. Lebenswoche mittels Dermatome paravertebrale Spalthautentnahme-Defekte geschaffen, mit den zu vergleichenden Biomaterialien abgedeckt und anhand des verwendeten Materials der Gruppe porcine „Small Intestine Submucosa“, „Autologes Amnion“, „Allogenes Amnion“ oder „Autologe Spalthaut“ bzw. bei Nichtbehandlung des Defektes der Kontrollgruppe zugeteilt. An den postoperativen Tagen 3, 7, 10, 30 und 90 wurden Probiopsien entnommen. Zur qualitativen Analyse des Wundheilungsverlaufs wurden HE- und EvG-Färbungen herangezogen. An den HE-Präparaten wurde eine quantitative Messung der Granulationsgewebsdicke an den Tagen 7 und 10 post operationem sowie eine Auszählung der Hautanhangsgebilde an Tag 90 vorgenommen. Anhand der histologischen Färbungen erfolgte zudem die Auswahl der Proben zur immunhistologischen Analyse. Als immunhistologische Parameter wurden der Antikörper  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin zur Darstellung der Myofibroblasten, vWF-Antikörper zur Darstellung der Gefäße, der Proliferationsmarker Ki-67 für proliferative Zellen und eine immunhistologische Färbung mittels Laminin zur Detektion der Basalmembran herangezogen. Bei allen Gruppen konnte bis Tag 90 eine Ausheilung des Defektes festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass grundsätzlich alle verwendeten Biomaterialien zur Wundabdeckung bei Spalthautwunden verwendet werden können.

Die histologischen Ergebnisse wiesen bei der mit autologer Spalthaut versorgten Gruppe auf eine primäre Wundheilung hin, wohingegen der Wundheilungsverlauf der anderen 4 Gruppen Kriterien der sekundären Wundheilung entsprachen, was durch die Messungen der Granulationsgewebsdicke bestätigt wurde. Sowohl histologisch, als auch mittels

immunhistologischer Färbung konnten vor allem die die Reepithelialisierung fördernden Eigenschaften des Amnions herausgestellt werden. Bereits ab dem 10. postoperativen Tag konnte mittels der Laminin-Färbung ein vollständig intaktes und ausdifferenziertes Epithel bestätigt werden. Dabei zeigte sich die mit autofetalem Amnion versorgte Gruppe allen anderen getesteten Biomaterialien (ausgenommen autologe Spalthaut), auch der mit allogenen Amnion versorgten Gruppe, überlegen.



## 8 Summary

### Covering of split-skin defects with different biomaterials

The aim of the present study was to compare wound healing qualities of autogenic amniotic membrane which had been gained from pregnant sows and subsequently cryopreserved with the wound healing qualities of allogenic amniotic membrane, porcine small intestine submucosa and autogenic split skin-graft. The iatrogenic man-made split-skin defects were supplied with the different biomaterials and compared with non-covered split-skin defect. 35 hybrid-pigs were used as experimental animals. To get the piglets and the amniotic membranes, there were done caesareans on 5 pregnant sows. In postnatal week 8, there were created paravertebral split-skin defects by a dermatome on 6 piglets per sow. These split-skin defects were covered by the biomaterials used for comparison and the 5 groups were classified by the help of the used material in the porcine “small intestine submucosa”-group, “autogenic amniotic membrane”-group, “allogenic amniotic membrane”-group, “autogenic split skin-graft”-group or by doing without coverage on the split-skin defect in the “control”-group. Skin-biopsies were extracted on postoperative days 3, 7, 10, 30 and 90. The wound healing process was qualitatively analysed by using a hematoxylin-eosin staining and a van Gieson's stain. Quantitative measurements like the thickness of the granulation tissue on 7th and 10th day after operation and the enumeration of the dermal appendages on day 90 were also taken on the hematoxylin-eosin-preparations. Moreover, the samples-choices for the immunistological analyses were made by the help of the histological stainings. For the description of the myofibroblasts  $\alpha$ -smooth-muscle-actin was applied as immunhistological parameter, for the description of the vessels von Willebrand-factor-antibody, for the proliferative cells the proliferation-marker Ki-67 and for detection of the basement membrane an immunhistological staining based on laminin was carried out. On postoperative day 90 a full healing could be assessed in all experimental group; this suggests that every used biomaterial could be used as covering for split-skin-defects.

The histological results of the “autogenic split skin-graft”-group indicated a primary wound healing, whereas in the other 4 groups the wound healing process rather met the criteria of secondary wound healing. This was approved by the results of the measurements of the thickness of the granulation tissue. Both, the histological results and the immunhistological stainings pointed out the supporting quality characteristics of reepithelialisation of the amniotic membrane. By the help of the laminin-based staining, this study showed a

---

completely intact and full differentiated epithelium in the “autogenic amniotic membrane”-group on the 10th postoperative day. Here, the autogenic amnion exceeded the other tested biomaterials in this point (except for autogenic split-thickness skin graft).

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des humanen Amnions, modifiziert nach von-Versen-Höyneck, 2004. (A) Epithel, (B) Basalmembran, (C) compact layer, (D) fibroblast layer, (E) spongy layer. ....	20
Abbildung 2: Gewinnung des Amnions .....	29
Abbildung 3: Gereinigtes Amnion .....	32
Abbildung 4: Auflegung gereinigter Amnionmembran auf die Wundfläche .....	32
Abbildung 5: Hautwunden-Defekt vor Abdeckung .....	32
Abbildung 6: Hautwunden-Defekt nach Abdeckung .....	32
Abbildung 7: Graphische Darstellung der Probediopsien (POT= postoperativer Tag) .....	33
Abbildung 8: Darstellung des Vergleichs der mittleren Granulationsgewebsdicke ( $\mu\text{m}$ ) und der Standardabweichungen an den Tagen 7 und 10 post operationem (n= 5).....	58
Abbildung 9: Darstellung der mittleren Gefäßanzahl und der Standardabweichungen an den Tagen 7 und 10 post operationem bei Auszählung von 10 High Power Fields .....	62
Abbildung 10: Darstellung vWF-positiver Gefäße anhand der SIS-Gruppe: (A) 50fache und (B) 128fache Vergrößerung.....	64
Abbildung 11: Darstellung der mittleren Anzahl proliferativer Zellen und der Standardabweichungen an den Tagen 30 und 90 post operationem bei Auszählung von 10 High Power Fields .....	65
Abbildung 12: Darstellung der Ki-67-Färbung anhand der SIS-Gruppe (Tag 30) und Spalthaut-Gruppe (Tag 90: siehe Pfeil); (128fache Vergrößerung) .....	67
Abbildung 13: $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin- Färbung zur Darstellung von Myofibroblasten (siehe Pfeil): Vergleich zwischen der Gruppe Spalthaut (A) und der Kontrollgruppe (B) 320fache Vergrößerung .....	69
Abbildung 14: Darstellung einer vollständig intakten Basalmembran; Gruppe „Autologe“ Spalthaut Tag 3 (50fache Vergrößerung) .....	70
Abbildung 15: Darstellung einer teilweise intakten Basalmembran; Gruppe „Autofetale“ Amnionmembran Tag 7 (50fache Vergrößerung).....	70

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung von Transplantaten anhand ihres Ursprungs (ANDREASSI et al. 2005; HEDLUND 2009) .....	17
Tabelle 2: Übersicht über Gruppenaufteilung und der zur Abdeckung des Wunddefekts verwendeten Materialien .....	27
Tabelle 3: Durchführung der Immunhistologie auf $\alpha$ -Smooth-Muscle Actin.....	36
Tabelle 4: Durchführung der Immunhistologie auf von Willebrand.....	38
Tabelle 5: Durchführung der Immunhistologie mit Ki-67 .....	40
Tabelle 6: Durchführung der Immunhistologie auf Laminin .....	42
Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Granulationsgewebsdicke ( $\mu\text{m}$ ) der einzelnen Gruppen an den Tagen 7 und 10 .....	59
Tabelle 8: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Granulationsgewebsdicke innerhalb jeder Gruppe zwischen den Tagen 7 und 10 ( $p \leq 0,05$ ) .....	60
Tabelle 9: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Granulationsgewebsdicke zwischen den Gruppen an den Tagen 7 und 10 ( $p \leq 0,005$ ) .....	60
Tabelle 10: Darstellung der Mittelwerte der ausgezählten Hautanhangsgebilde im direkten Vergleich zu einem unbehandelten Tier an Tag 90.....	61
Tabelle 11: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Anzahl der Hautanhangsgebilde gegenüber einem unbehandelten Tier an Tag 90 ( $p \leq 0,01$ ) .....	61
Tabelle 12: Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gefäßanzahl an Tag 7 und 10 post operationem .....	63
Tabelle 13: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Gefäßanzahl innerhalb jeder Gruppe zwischen den Tagen 7 und 10 ( $p \leq 0,05$ ).....	63
Tabelle 14: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Gefäßanzahl zwischen den Gruppen an den Tagen 7 und 10 ( $p \leq 0,005$ ).....	64
Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Anzahl an Ki-67-positiv gezählten Zellen an den Tagen 30 und 90 post operationem .....	66
Tabelle 16: Darstellung der p-Werte der mittleren Anzahl an proliferativen Zellen innerhalb jeder Gruppe zwischen den Tagen 30 und 90 ( $p \leq 0,05$ ).....	67
Tabelle 17: Darstellung der p-Werte der mittleren Anzahl an proliferativen Zellen zwischen den Gruppen an den Tagen 30 und 90 ( $p \leq 0,005$ ).....	67
Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Anzahl an Myofibroblasten an Tag 10 post operationem .....	68
Tabelle 19: Darstellung der p-Werte des Vergleichs der mittleren Anzahl an Myofibroblasten zwischen den Gruppen an Tag 10 ( $p \leq 0,005$ ).....	69
Tabelle 20: Darstellung des zeitlichen Auftretens einer intakten Basalmembran; vollständig vorhanden (+), teilweise vorhanden ( $\pm$ ) und nicht vorhanden (-) .....	70

---

## 11 Literaturverzeichnis

**Ackermann, M. R., (2009):** Wundheilung und Angiogenese.

In: J. F. Z. Donald M. McGavin Pathologie der Haustiere:

Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie.

Elsevier, Urban&FischerVerlag, München. **1.Auflage:** 163-180.

**Adams, D. C. and M. L. Ramsey, (2005):**

Grafts in dermatologic surgery: review and update on full- and split-thickness skin grafts, free cartilage grafts, and composite grafts

Dermatol Surg **31**(8 Pt 2): 1055-1067.

**Akle, C. A., M. Adinolfi, et al., (1981):**

Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers

Lancet **2**(8254): 1003-1005.

**Allam, S. S. and E. Heidemann, (1974):**

Isolation, characterization and comparative studies of the N-terminal peptides from soluble pig skin collagen

FEBS Lett **39**(2): 187-189.

**Allman, A. J., T. B. McPherson, et al., (2001):**

Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response

Transplantation **71**(11): 1631-1640.

**Andreassi, A., R. Bilenchi, et al., (2005):**

Classification and pathophysiology of skin grafts

Clin Dermatol **23**(4): 332-337.

**Andriani, F., A. Margulis, et al., (2003):**

Analysis of microenvironmental factors contributing to basement membrane assembly and normalized epidermal phenotype

J Invest Dermatol **120**(6): 923-931.

**Ansaloni, L., P. Cambrini, et al., (2007):**

Immune response to small intestinal submucosa (surgisis) implant in humans: preliminary observations

J Invest Surg **20**(4): 237-241.

**Archambeau, J. O. and G. W. Bennett, (1984):**

Quantification of morphologic, cytologic, and kinetic parameters of unirradiated swine skin: a histologic model  
Radiat Res **98**(2): 254-273.

**Aughey, E. and F. L. Frye, (2001):** Placentation.

In: F. L. F. Elizabeth Aughey Comparative veterinary histology: with clinical correlates  
Manson Publishing, London. **1.Auflage:** 196.

**Barbero, A. M. and H. F. Frasc, (2009):**

Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review  
Toxicol In Vitro **23**(1): 1-13.

**Becker, H. and S. Coerper, (2007):** Wunde, Wundheilung und Wundbehandlung.

In: R. B. B. J. Rüdiger Siewert Basiswissen Chirurgie.  
Springer Medizin Verlag, Heidelberg. **1.Auflage:** 29-32.

**Bejjani, G. K. and J. Zabramski, (2007):**

Safety and efficacy of the porcine small intestinal submucosa dural substitute: results of a prospective multicenter study and literature review  
J Neurosurg **106**(6): 1028-1033.

**Belousov, A. E., S. D. Kishemasov, et al., (1993):**

A new classification of vascularized flaps in plastic and reconstructive surgery  
Ann Plast Surg **31**(1): 47-52; discussion 52-43.

**Bergstrom, S., (1971):**

Surface ultrastructure of human amnion and chorion in early pregnancy: a scanning electron microscope study  
Obstet Gynecol **38**(4): 513-524.

**Bevilacqua, M. P., J. S. Pober, et al., (1985):**

Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines  
J Clin Invest **76**(5): 2003-2011.

**Bogic, L. V., R. A. Brace, et al., (2000):**

Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes  
Placenta **21**(2-3): 203-209.

**Bourne, G. L., (1960):**

The microscopic anatomy of the human amnion and chorion  
Am J Obstet Gynecol **79**: 1070-1073.

**Bourne, G. L., (1966):**

The anatomy of the human amnion and chorion  
Proc R Soc Med **59**(11 Part 1): 1127-1128.

**Boyd, J. W. G. a. J. B., (2010):** Grafts, Flaps and Regional Flaps.

In: M. E.-K. Maria Z. Siemionow Plastic and Reconstructive Surgery.  
Springer Verlag, london. **1.Auflage**: 65-87.

**Breitkreutz, D., N. Mirancea, et al., (2009):**

Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions?  
Histochem Cell Biol **132**(1): 1-10.

**Brindeau, A., (1934):**

Création d'un vagin artificiel à l'aide des membranes ovulaires d'un oeuf à terme  
Gynéc et obstétr: 29:385.

**Broughton, G., 2nd, J. E. Janis, et al., (2006):**

The basic science of wound healing  
Plast Reconstr Surg **117**(7 Suppl): 12S-34S.

**Burgos, H., (1986):**

Angiogenic factor from human term placenta. Purification and partial characterization  
Eur J Clin Invest **16**(6): 486-493.

**Champagne, B. J., L. M. O'Connor, et al., (2006):**

Efficacy of anal fistula plug in closure of cryptoglandular fistulas: long-term follow-up  
Dis Colon Rectum **49**(12): 1817-1821.

**Chao, Y. C., S. Humphreys, et al., (1940):**

A New Method of preventing Adhesions. The Use of Amnioplastin after Craniotomy  
Br Med J **1**(4134): 517-538 511.

**Chick, L. R., (1988):**

Brief history and biology of skin grafting  
Ann Plast Surg **21**(4): 358-365.

**Colocho, G., W. P. Graham, 3rd, et al., (1974):**

Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing  
Arch Surg **109**(3): 370-373.

**COOK** (2011). "SIS - Small Intestinal Submucosa." from [http://www.cook-d.com/Produktlinien/SIS/sis\\_index.html](http://www.cook-d.com/Produktlinien/SIS/sis_index.html).

**Davis, J., (1910):**

Skin transplantation with review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital  
Johns Hopkins Hospital Report: 15:310.

**Desmouliere, A., A. Geinoz, et al., (1993):**

Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts  
J Cell Biol **122**(1): 103-111.

**Devlin, H., H. Garland, et al., (1996):**

Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus  
J Oral Maxillofac Surg **54**(9): 1087-1091.

**Dino, B. R., G. G. Eufemio, et al., (1966):**

Human amnion : the establishment of an amnion bank and its practical applications in surgery  
J Philipp Med Assoc **42**(7): 357-366.

**Dirk G. Meurer, S. W., (2007): Pathologie der Entzündung.**

In: S. W. Dirk G. Meurer Allgemeine Pathologie: Kompendium für die Veterinärmedizin.  
Schattauer Verlag, Stuttgart. **2.Auflage**: 183-196.

**Douglas, B., (1952):**

Homografts of fetal membranes as a covering for large wounds; especially those from burns; an experimental and clinical study  
J Tn State Med Assoc **45**(6): 230-235.

**Dua, H. S., J. A. Gomes, et al., (2004):**

The amniotic membrane in ophthalmology  
Surv Ophthalmol **49**(1): 51-77.



---

**Ehrenfeld, N. S. M., (2002):** Plastische und wiederherstellende Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie.

In: N. S. M. Ehrenfeld Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde:

41 Tabellen. Spezielle Chirurgie, Band 2.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart. **3.Auflage:** S.379-396.

**Faulk, W. P., R. Matthews, et al., (1980):**

Human amnion as an adjunct in wound healing

Lancet **1**(8179): 1156-1158.

**Franklin, M. and K. Russek, (2010):**

Use of porcine small intestine submucosa as a prosthetic material for laparoscopic hernia repair in infected and potentially contaminated fields: long-term follow-up assessment

Surg Endosc.

**Fukuda, K., T. Chikama, et al., (1999):**

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

Cornea **18**(1): 73-79.

**Gajiwala, K. and A. L. Gajiwala, (2004):**

Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing

Cell Tissue Bank **5**(2): 73-80.

**Ginn, A. M. H. u. P. E., (2009):** Haut.

In: J. F. Z. Donald M. McGavin Pathologie der Haustiere: Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie.

Elsevier, Urban&FischerVerlag, München. **1.Auflage:** 1004-1007.

**Godynicki, S., M. R. Fath el-Bab, et al., (1985):**

[Distribution of blood vessels in the skin of pigs at birth]

Anat Histol Embryol **14**(4): 304-315.

**Gomez, J. H., J. Schumacher, et al., (2004):**

Effects of 3 biologic dressings on healing of cutaneous wounds on the limbs of horses

Can J Vet Res **68**(1): 49-55.

**Gorodetsky, R., W. H. McBride, et al., (1988):**

Assay of radiation effects in mouse skin as expressed in wound healing

Radiat Res **116**(1): 135-144.

**Grinnell, F., (2003):**

Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices  
Trends Cell Biol **13**(5): 264-269.

**Güler, R., M. T. Ercan, et al., (1997):**

Measurement of blood flow by the <sup>133</sup>Xe clearance technique to grafts of amnion used in vestibuloplasty  
Br J Oral Maxillofac Surg **35**(4): 280-283.

**Gurtner, G. C., S. Werner, et al., (2008):**

Wound repair and regeneration  
Nature **453**(7193): 314-321.

**Habermehl, K.-H., (2005):** Haut und Hautorgane.

In: K.-H. H. Richard Nickel, August Schummer, Eugen Seiferle, Bernd Vollmerhaus, Helmut Wilkens, Helmut Waibl Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart. **4.Auflage:** 443-453.

**Hao, Y., D. H. Ma, et al., (2000):**

Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane  
Cornea **19**(3): 348-352.

**Hauben, D. J., A. Baruchin, et al., (1982):**

On the history of the free skin graft  
Ann Plast Surg **9**(3): 242-245.

**Hedlund, C. S., (2009):** Haut.

In: T. W. Fossum Chirurgie der Kleintiere.  
Elsevier GmbH, Urban&FischerVerlag, München. **2.Auflage:** 239-243.

**Hedlund, C. S., (2009):** Haut.

In: T. W. Fossum Chirurgie der Kleintiere.  
Elsevier GmbH, Urban&FischerVerlag, München. **2.Auflage:** 174-178.

**Heinrich, W., P. M. Lange, et al., (1971):**

Isolation and characterization of the large cyanogen bromide peptides from the alpha1- and alpha2-chains of pig skin collagen  
FEBS Lett **16**(1): 63-67.

**Helton, W. S., P. M. Fisichella, et al., (2005):**

Short-term outcomes with small intestinal submucosa for ventral abdominal hernia  
Arch Surg **140**(6): 549-560; discussion 560-542.

**Hewicker-Trautwein, M., (2007):** Haut.

In: W.Baumgärtner Pathohistologie für die Tiermedizin.  
Enke Verlag, Stuttgart. **1.Auflage:** 304-305.

**Hieber, A. D., D. Corcino, et al., (1997):**

Detection of elastin in the human fetal membranes: proposed molecular basis for elasticity  
Placenta **18**(4): 301-312.

**Higa, K., S. Shimmura, et al., (2005):**

Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma  
Cornea **24**(2): 206-212.

**Hodde, J. P., S. F. Badylak, et al., (1996):**

Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement  
Tissue Eng **2**(3): 209-217.

**Hodde, J. P., R. D. Record, et al., (2001):**

Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix  
Endothelium **8**(1): 11-24.

**Hoepfner, J., V. Crnogorac, et al., (2009):**

Small intestinal submucosa for reinforcement of colonic anastomosis  
Int J Colorectal Dis **24**(5): 543-550.

**Hom, D. B., G. M. Unger, et al., (2005):**

Improving surgical wound healing with basic fibroblast growth factor after radiation  
Laryngoscope **115**(3): 412-422.

**Hori, J., M. Wang, et al., (2006):**

Immunological characteristics of amniotic epithelium  
Cornea **25**(10 Suppl 1): S53-58.

**Iijima, K., Y. Igawa, et al., (2007):**

Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats  
Tissue Eng **13**(3): 513-524.

**John, T., (2003):**

Human amniotic membrane transplantation: past, present, and future  
Ophthalmol Clin North Am **16**(1): 43-65, vi.

**Kanitakis, J., (2002):**

Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin  
Eur J Dermatol **12**(4): 390-399; quiz 400-391.

**Kanyshkova, T. G., V. N. Buneva, et al., (2001):**

Lactoferrin and its biological functions  
Biochemistry (Mosc) **66**(1): 1-7.

**Kesting, M. R., D. J. Loeffelbein, et al., (2010):**

Repair of oronasal fistulas with human amniotic membrane in minipigs  
Br J Oral Maxillofac Surg **48**(2): 131-135.

**Kietzmann, M., (2007):** Pharmakologie der Haut.

In: H.-H. F. Felix R. Althaus Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

Georg Thieme Verlag Stuttgart. **2.Auflage:** 345-346.

**Kim, J. C. and S. C. Tseng, (1995):**

Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas

Cornea **14**(5): 473-484.

**Kim, J. S., J. C. Kim, et al., (2000):**

Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn

Exp Eye Res **70**(3): 329-337.

**King, I. A. and A. Tabiowo, (1980):**

The dermis is required for the synthesis of extracellular glycosaminoglycans in cultured pig epidermis

Biochim Biophys Acta **632**(2): 234-243.

**Kleinman, H. K., B. S. Weeks, et al., (1993):**

The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases

Vitam Horm **47**: 161-186.

**Koizumi, N. J., T. J. Inatomi, et al., (2000):**

Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane  
Curr Eye Res **20**(3): 173-177.

**Kramer, M., (2004):** Wundheilung.

In: L.-F. L. Olof Dietz Lehrbuch der allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner.  
Enke Verlag, Stuttgart. **6.Auflage:** 27-33.

**Kruse, F. E. and D. Meller, (2001):**

[Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the ocular surface]  
Ophthalmologie **98**(9): 801-810.

**Kunert, P., (1991):**

Structure and construction: the system of skin flaps  
Ann Plast Surg **27**(6): 509-516; discussion 517-508.

**Lawson, V. G., (1985):**

Oral cavity reconstruction using pectoralis major muscle and amnion  
Arch Otolaryngol **111**(4): 230-233.

**Lee, S. B., D. Q. Li, et al., (2000):**

Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane  
Curr Eye Res **20**(4): 325-334.

**Lee, S. H. and S. C. Tseng, (1997):**

Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration  
Am J Ophthalmol **123**(3): 303-312.

**Ley-Chavez, E., M. E. Martinez-Pardo, et al., (2003):**

Application of biological dressings from radiosterilized amnios with cobalt 60 and serologic studies on the handling of burns in pediatric patients  
Ann Transplant **8**(4): 46-49.

**Libera, R. D., G. B. Melo, et al., (2008):**

Assessment of the use of cryopreserved x freeze-dried amniotic membrane (AM) for reconstruction of ocular surface in rabbit model  
Arq Bras Oftalmol **71**(5): 669-673.

**Linhardt, R. J. and R. E. Hileman, (1995):**

Dermatan sulfate as a potential therapeutic agent  
Gen Pharmacol **26**(3): 443-451.

**Litzke, L.-F., (2004):** Wundbehandlung.

In: L.-F. L. Olof Dietz Lehrbuch der allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner.  
Enke Verlag, Stuttgart. **6.Auflage**.

**Liu, Y., J. Y. Chen, et al., (2010):**

Light microscopic, electron microscopic, and immunohistochemical comparison of Bama minipig (*Sus scrofa domestica*) and human skin  
Comp Med **60**(2): 142-148.

**Lo, V. and E. Pope, (2009):**

Amniotic membrane use in dermatology  
Int J Dermatol **48**(9): 935-940.

**Ludwig, H., H. Metzger, et al., (1974):**

[The internal surface of the amniotic epithelium. A scanning electron microscopic study (author's transl)]  
Arch Gynakol **217**(2): 141-154.

**MacLeod, T. M., P. Sarathchandra, et al., (2004):**

Evaluation of a porcine origin acellular dermal matrix and small intestinal submucosa as dermal replacements in preventing secondary skin graft contraction  
Burns **30**(5): 431-437.

**Malak, T. M., C. D. Ockleford, et al., (1993):**

Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes  
Placenta **14**(4): 385-406.

**Maral, T., H. Borman, et al., (1999):**

Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing  
Burns **25**(7): 625-635.

**Martin, G. R. and R. Timpl, (1987):**

Laminin and other basement membrane components  
Annu Rev Cell Biol **3**: 57-85.

**Martinez-Hernandez, A. and P. S. Amenta, (1983):**

The basement membrane in pathology  
Lab Invest **48**(6): 656-677.

**Martinez Pardo, M. E., M. L. Reyes Frias, et al., (1999):**

Clinical application of amniotic membranes on a patient with epidermolysis bullosa  
Ann Transplant **4**(3-4): 68-73.

**McPherson, T. B., H. S. Shim, et al., (1997):**

Grafting of PEO to glass, nitinol, and pyrolytic carbon surfaces by gamma irradiation  
J Biomed Mater Res **38**(4): 289-302.

**Medina, A. and A. Ghahary, (2010):**

Fibrocytes can be reprogrammed to promote tissue remodeling capacity of dermal fibroblasts  
Mol Cell Biochem **344**(1-2): 11-21.

**Meyer, W., (1996):**

Bemerkungen zur Eignung der Schweinehaut als biologisches Modell für die Haut des Menschen  
Hautarzt **178**-182.

**Meyer, W. and K. Neurand, (1991):**

Comparison of skin pH in domesticated and laboratory mammals  
Arch Dermatol Res **283**(1): 16-18.

**Meyer, W., K. Neurand, et al., (1994):**

Demonstration of NADPH-diaphorase (NO-synthase) in the apocrine and eccrine skin glands of domesticated mammals  
Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **40**(2): 175-181.

**Mignatti, P., R. Tsuboi, et al., (1989):**

In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases  
J Cell Biol **108**(2): 671-682.

**Mommaas, M., A. Mulder, et al., (1994):**

Functional human epidermal Langerhans cells that lack Birbeck granules  
J Invest Dermatol **103**(6): 807-810.

**Mostow, E. N., G. D. Haraway, et al., (2005):**

Effectiveness of an extracellular matrix graft (OASIS Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: a randomized clinical trial  
J Vasc Surg **41**(5): 837-843.

**Nakayama, Y. and Y. M. Chuang, (1983):**

A scalpel blade as a substitute for the calibrator of the dermatome  
Plast Reconstr Surg **72**(3): 405-407.

**Netzlaff, F., U. F. Schaefer, et al., (2006):**

Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments  
Altern Lab Anim **34**(5): 499-513.

**Niknejad, H., H. Peirovi, et al., (2008):**

Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering  
Eur Cell Mater **15**: 88-99.

**Oelschlaeger, B. K., C. A. Pellegrini, et al., (2006):**

Biologic prosthesis reduces recurrence after laparoscopic paraesophageal hernia repair: a multicenter, prospective, randomized trial  
Ann Surg **244**(4): 481-490.

**Ozturk, F. and A. T. Ermertcan, (2010):**

Wound healing: a new approach to the topical wound care  
Cutan Ocul Toxicol.

**Paillet, R., F. Laval, et al., (2001):**

Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes  
Immunology **102**(4): 396-404.

**Park, W. C. and S. C. Tseng, (2000):**

Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK  
Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(10): 2906-2914.

**Penfield, W., (1940):**

Amnioplastin: A Warning  
Br Med J **2**(4167): 668.



**Pohlman, T. H., K. A. Stanness, et al., (1986):**

An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism

J Immunol **136**(12): 4548-4553.

**Pomahac, B., T. Svensjo, et al., (1998):**

Tissue engineering of skin

Crit Rev Oral Biol Med **9**(3): 333-344.

**Prevel, C. D., B. L. Eppley, et al., (1995):**

Small intestinal submucosa: utilization as a wound dressing in full-thickness rodent wounds

Ann Plast Surg **35**(4): 381-388.

**Quinby, W. C., Jr., H. C. Hoover, et al., (1982):**

Clinical trials of amniotic membranes in burn wound care

Plast Reconstr Surg **70**(6): 711-717.

**Ramakrishnan, K. M. and V. Jayaraman, (1997):**

Management of partial-thickness burn wounds by amniotic membrane: a cost-effective treatment in developing countries

Burns **23 Suppl 1**: S33-36.

**Ramasastri, S. S., (2005):**

Acute wounds

Clin Plast Surg **32**(2): 195-208.

**Rang, H., (1973):**

[Quantitative and qualitative studies on porcine mast cells]

Zentralbl Veterinarmed A **20**(7): 546-555.

**Rejzek, A., F. Weyer, et al., (2001):**

Physical changes of amniotic membranes through glycerolization for the use as an epidermal substitute. Light and electron microscopic studies

Cell Tissue Bank **2**(2): 95-102.

**Robson, M. C. and T. J. Krizek, (1973):**

The effect of human amniotic membranes on the bacteria population of infected rat burns

Ann Surg **177**(2): 144-149.

**Rodero, M. P. and K. Khosrotehrani, (2010):**

Skin wound healing modulation by macrophages  
Int J Clin Exp Pathol **3**(7): 643-653.

**Romano, J. and L. Balaguer, (1991):**

Ultrastructural identification of Langerhans cells in normal swine epidermis  
J Anat **179**: 43-46.

**Rudolph, R., J. Vande Berg, et al., (1988):**

Slowed growth of cultured fibroblasts from human radiation wounds  
Plast Reconstr Surg **82**(4): 669-677.

**Rüsse, I., (1998):** Frühgravidität, Implantation und Plazentation.

In: I. R. F. Sinowatz Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.  
Parey Verlag. **2.Auflage**: 156-157.

**Rytz, U., (2004):** Wunde, Wundheilung.

In: M. Kramer Kompendium der Allgemeinen Veterinärchirurgie.  
Schlütersche, Hannover. **1.Auflage**: 274-277.

**Sabella, N., (1913):**

Use of the fetal membranes in skin grafting  
Med Rec NY: 83:478.

**Sarikaya, A., R. Record, et al., (2002):**

Antimicrobial activity associated with extracellular matrices  
Tissue Eng **8**(1): 63-71.

**Sawhney, C. P., (1989):**

Amniotic membrane as a biological dressing in the management of burns  
Burns **15**(5): 339-342.

**Schäffer, M. and H. D. Becker, (1999):**

[Immune regulation of wound healing]  
Chirurg **70**(8): 897-908.

**Schallberger, S. P., B. J. Stanley, et al., (2008):**

Effect of porcine small intestinal submucosa on acute full-thickness wounds in dogs  
Vet Surg **37**(6): 515-524.

---

**Schnorr, B. and M. Kressin, (2006):** Entwicklung der Hüllen und Anhänge.  
In: M. K. Bertram Schnorr Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch.  
Enke Verlag, Stuttgart. **5.Auflage:** 66-69.

**Schnurbusch, U., (2006):** Geburtshilfliche Maßnahmen.  
In: Heinritzi/Gindele/Reiner/Schnurbusch Schweinekrankheiten.  
Eugen Ulmer KG, Stuttgart (Hohenheim). **6.Auflage:** 280-282.

**Solomon, A., M. Rosenblatt, et al., (2001):**  
Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells  
cultured on the amniotic membrane stromal matrix  
Br J Ophthalmol **85**(4): 444-449.

**Sorsby, A. and H. M. Symons, (1946):**  
Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of the second degree)  
Br J Ophthalmol **30**: 337-345.

**Splichal, I. and I. Trebichavsky, (2001):**  
Cytokines and other important inflammatory mediators in gestation and bacterial  
intraamniotic infections  
Folia Microbiol (Praha) **46**(4): 345-351.

**Stern, M., (1913):**  
The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated skin surfaces,  
substituting skin grafts  
JAMA: 60:973.

**Subrahmanyam, M., (1994):**  
Honey-impregnated gauze versus amniotic membrane in the treatment of burns  
Burns **20**(4): 331-333.

**Swaim, S. F., R. L. Gillette, et al., (2000):**  
Effects of a hydrolyzed collagen dressing on the healing of open wounds in dogs  
Am J Vet Res **61**(12): 1574-1578.

**Talmi, Y. P., L. Sigler, et al., (1991):**  
Antibacterial properties of human amniotic membranes  
Placenta **12**(3): 285-288.

**Tiedemann, K., (1979):**

The allantoic and amniotic epithelia of the pig: SEM and TEM studies  
Anat Embryol (Berl) **156**(1): 53-72.

**Troensegaard-Hansen, E., (1950):**

Amniotic grafts in chronic skin ulceration  
Lancet **1**(6610): 859-860.

**Troensegaard-Hansen, E., (1963):**

Amnion implantation in peripheral vascular disease  
Lancet **1**(7276): 327-328.

**Tseng, S. C., D. Q. Li, et al., (1999):**

Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix  
J Cell Physiol **179**(3): 325-335.

**Tsukise, A. and W. Meyer, (1983):**

Histochemistry of complex carbohydrates in the hairy skin of the domestic pig  
Histochem J **15**(9): 845-860.

**von Versen-Höynck, F., C. Syring, et al., (2004):**

The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts--light and scanning electron microscopic studies  
Cell Tissue Bank **5**(1): 45-56.

**Voytik-Harbin, S. L., A. O. Brightman, et al., (1997):**

Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa  
J Cell Biochem **67**(4): 478-491.

**Weise, K., (2000):**

[Wound healing disorders in trauma surgery]  
Unfallchirurg **103**(2): 99.

**Weise, K. and M. Schäffer, (2000):**

[Treatment strategies in wound healing disorders]  
Unfallchirurg **103**(2): 100-109.

**Weiss, E. and J. P. Teifke, (2007):** Haut.

In: E. W. Erwin Dahme Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.  
Enke Verlag, Stuttgart. **6.Auflage:** 355-356.

**Wilshaw, S. P., J. N. Kearney, et al., (2006):**

Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering  
Tissue Eng **12**(8): 2117-2129.

**Xu, L. R., M. M. Carr, et al., (1993):**

Histochemistry and morphology of porcine mast cells  
Histochem J **25**(7): 516-522.

**Yang, L., Y. Shirakata, et al., (2006):**

New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane  
Cell Tissue Res **326**(1): 69-77.

**Yoshita, T., A. Kobayashi, et al., (2004):**

Oxygen permeability of amniotic membrane and actual tear oxygen tension beneath amniotic  
membrane patch  
Am J Ophthalmol **138**(3): 486-487.

**Young, C. M. and J. W. Hopewell, (1980):**

The evaluation of an isotope clearance technique in the dermis of pig skin: a correlation of  
functional and morphological parameters  
Microvasc Res **20**(2): 182-194.

**Yuan, B., X. Wang, et al., (2010):**

Comparison of fibrogenesis caused by dermal and adipose tissue injury in an experimental  
model  
Wound Repair Regen **18**(2): 202-210.

**Zykova, S. N., T. G. Jenssen, et al., (2000):**

Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II-like  
db/db mice  
Diabetes **49**(9): 1451-1458.

---

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dr. K. Heinritzi, zum Einen für die Überlassung dieses interessanten und ungewöhnlichen Themas, zum Anderen für die stets freundliche und gute Betreuung während der Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit.

Ein besonders großes Dankeschön möchte ich Frau Dr. Susanne Zöls und Herrn Dr. M. Eddicks aussprechen, die mich stets zuverlässig und über die Maßen unterstützt haben, sowohl im praktischen, als auch im theoretischen Teil meiner Arbeit. Zudem ein dickes Danke für ihre Ermutigungen bei der Durchführung dieses Versuches und für das durchweg angenehme Arbeitsklima.

Vielen herzlichen Dank auch an meine lieben Kollegen Frau Nicole Übel, Frau Dr. Astrid Kunert, Frau Dr. Daniela Schiele, Frau Dr. Rose-Leah Austin-Busse, Herrn Dr. Benjamin Müller, Herrn Dr. Frederik Wilms-Schulze-Kump, Herrn Dr. Tim Kichling und Herrn Christof Hilmer für ihre tatkräftige Unterstützung, während meines praktischen Versuches. Danke, dass ich immer auf euch zählen konnte!

Bedanken möchte ich mich auch sowohl bei unseren lieben Tierpflegern, Frau Ebru Pasculli, Herrn Gino Cafiero und Herrn Sven Brockhaus, als auch bei unserer MTA, Frau Bärbel Garner.

Vielen Dank auch an die Rotationsstudenten, die während des praktischen Teils so gut mitgearbeitet haben.

Ich danke den Mitgliedern der AG-Kesting/Wolff, Herrn Dr. Dr. Marco Kesting, Herrn Dr. Dr. Denys Löffelbein, Herrn Dr. Jan Teichmann, Herrn Dr. Nils Rohleder und Herrn Rafael Hasler für die gute und fröhliche Zusammenarbeit während des gesamten Projektes.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Mechthild Stöckelhuber und Frau Kaori Ochi, die mich bei meiner Laborarbeit nie im Stich gelassen haben.

Bei Frau Enken Drecolll möchte ich mich für ihre Unterstützung und Beratung bei der Auswertung meiner Ergebnisse bedanken.

Bei meiner Freundin Sabrina Müller möchte ich mich dafür bedanken, dass sie immer für mich da war.

Zum guten Schluss danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich während meiner gesamten Promotion so sehr unterstützt haben. Vielen Dank, dass es euch gibt.