

**Technische Universität München**

**Fakultät für Medizin**

**Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie**

**Klinikum Rechts der Isar**

**Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff**

**Mehrlagige Amnionmembran zur Rekonstruktion oronasaler  
Fisteln – ein porcines Modell**

von Anne Ania Nuber

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

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

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Dr. M. R. Kesting  
2. Univ.- Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff

Die Dissertation wurde am 21.10.2013 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.04.2014  
angenommen.

Meinen Eltern

# Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	1
<b>2.</b>	<b>Lippen-Kiefer-Gaumenspalten</b>	4
2.1.	Epidemiologie	4
2.2.	Entwicklung der Lippe, des Kiefers und des Gaumens	4
2.3.	Pathogenese	5
2.4.	Ätiologie	6
2.5.	Klassifikation	7
2.6.	Therapie	10
2.6.1.	Prächirurgische Behandlung	10
2.6.2.	Primärbehandlung	10
2.6.3.	Sekundärbehandlung	11
<b>3.</b>	<b>Oronasale Fisteln</b>	12
3.1.	Ätiologie	12
3.2.	Klassifikation	12
3.3.	Epidemiologie	13
3.4.	Probleme im Zusammenhang mit oronasalen Fisteln	14
3.5.	Verschlussmöglichkeiten oronasaler Fisteln	15
3.5.1.	Verschluss durch regionales Gewebe	16
3.5.2.	Freier Gewebetransfer	16
3.5.3.	Biologische Transplantatmaterialien	17
<b>4.</b>	<b>Die Amnionmembran</b>	18
4.1.	Anatomie	18
4.2.	Histologie	19
4.3.	Eigenschaften der Amnionmembran	19
4.3.1.	Strukturelle Eigenschaften	19
4.3.2.	Immunologisches Potential	20
4.3.3.	Antimikrobielle Wirkung	20
4.3.4.	Hemmung der Entzündungsreaktion	21
4.3.5.	Reepithelialisierung	21
4.3.6.	Analgetische Aspekte	22
4.3.7.	Beeinflussung der Angiogenese	22

4.3.8.	Verringerte Narbenbildung	23
4.4.	Anwendung in der Medizin	23
<b>5.</b>	<b>Die „Small Intestine Submucosa“</b>	<b>25</b>
5.1.	Gewinnung und Aufbau	25
5.2.	Eigenschaften der „Small Intestine Submucosa“	25
5.2.1.	Positive Auswirkung auf den Gewebeaufbau	25
5.2.2.	Immunogenität	26
5.2.3.	Anwendungsbereiche in der Medizin	26
<b>6.</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>27</b>
6.1.	Das Tiermodell	27
6.1.1.	Tiere und Haltung	27
6.1.2.	Versuchsgruppen	28
6.2.	Durchführung der Kaiserschnitte/ Gewinnung Amnion	28
6.3.	Aufbereitung Amnion/ Herstellung der Patches	29
6.3.1.	Herstellung des Konservierungsmediums	29
6.3.2.	Kryokonservierung der Amnionmembran	30
6.4.	Operatives Vorgehen	30
6.4.1.	Defektsetzung	30
6.4.2.	Defektdeckung (allogen, autofetal, SIS, Wangenschleimhaut)	32
6.4.3.	Wundkontrollen	34
6.4.4.	Euthanasie und Probeentnahme	35
6.5.	Histologie	35
6.6.	Immunhistologie	36
6.6.1.	Laminin	36
6.6.2.	Actin	38
6.6.3.	Ki67	40
6.6.4.	Von Willebrand Faktor	42
6.7.	Statistische Auswertung	44
<b>7.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
7.1.	Klinische Auswertung	45
7.1.1.	Oronasale Fisteln	45
7.1.2.	Klinische Beurteilung Versuchsgruppe I	46
7.1.3.	Klinische Beurteilung Versuchsgruppe II	47



7.1.4.	Klinische Beurteilung Versuchsgruppe III	49
7.1.5.	Klinische Beurteilung Versuchsgruppe IV	51
7.1.6.	Wundheilungsverlauf der vier Versuchsgruppen im Vergleich	52
7.2.	Histologische Beurteilung der Defektheilung	55
7.2.1.	Histologische Beurteilung Versuchsgruppe I	56
7.2.2.	Histologische Beurteilung Versuchsgruppe II	58
7.2.3.	Histologische Beurteilung Versuchsgruppe III	59
7.2.4.	Histologische Beurteilung Versuchsgruppe IV	61
7.2.5.	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse	61
7.2.6.	Statistik	63
7.2.6.1.	Ossäre Defekte im histologischen Schnitt	63
7.2.6.2.	Fistelgangresiduen im histologischen Schnitt	63
7.3.	Immunhistologische Auswertung	64
7.3.1.	Laminin	64
7.3.2.	Actin	65
7.3.3.	Ki-67	65
7.3.4.	Von-Willebrand-Faktor	66
<b>8.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
8.1.	Diskussion des Tiermodells	67
8.2.	Diskussion der klinischen Ergebnisse	69
8.3.	Diskussion der histologischen Ergebnisse	71
8.4.	Diskussion der immunhistologischen Ergebnisse	75
8.5.	Kritische Wertung	76
8.6.	Schlussfolgerung und Ausblick	77
<b>9.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>10.</b>	<b>Summary</b>	<b>81</b>
<b>11.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>12.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>13.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>14.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>101</b>
<b>15.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>102</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abs.	Absatz
Abb.	Abbildung
BSA	bovine seroalbumin
b-FGF	basic-fibroblast growth factor
C	Celsius
DAB	Diaminobenzidin
cm	Zentimeter
EvG	Elastica-van-Gieson
Fa.	Firma
H2O2	Wasserstoffperoxid
HAM	humane Amnionmembran
HE	Hämatoxylin/Eosin
HGF	Hepatocyte growth factor
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KGF	Keratinocyte growth factor
KGW	Körpergewicht
l	Liter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
POT	postoperativer Tag
P-Wert	Signifikanzwert
PBS	phosphate buffered saline
SIS	Small Intestine Submucosa
Tab	Tabelle
TGF $\alpha$	Transforming Growth Factor Alpha
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
vWF	von-Willebrand-Faktor

## 1. Einleitung und Zielsetzung

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten stellen die häufigsten Fehlbildungen des Kraniums dar (Ivy 1964; Rösch 1998). In Europa ist unter rund 500 Neugeborenen eines der Kinder Träger einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte in verschiedenster Ausprägung (Bull und Lenzen 2003). Die Therapie erfordert ein komplexes Behandlungskonzept mit einer oder mehreren Operationen. Trotz eines hohen Standards der Eingriffe bestehen weiterhin postoperative Probleme bei Spaltpatienten, sodass eine Weiterentwicklung der Behandlungsmethoden angestrebt werden sollte. Eine entscheidende Problematik stellen zum Beispiel verbleibende Restlöcher nach einem operativen Verschluss des Gaumens dar. Diese treten in 1,6 bis 35,8 Prozent der Fälle auf (Amaratunga 1988; Muzaffar, Byrd et al. 2001; Phua und de Chalain 2008; Eberlinc und Kozelj 2011; Losken, van Aalst et al. 2011). Ein vollständiger Defektverschluss der Restlöcher ist schwierig, da postoperative Vernarbungen (Honnebier, Johnson et al. 2000) sowie der Mangel an ortständigem Gewebe diesen häufig unmöglich machen (Kirschner, Cabiling et al. 2006). Bleiben die Restlöcher bestehen, können sie erhebliche funktionelle Einschränkungen mit sich bringen. Immer wiederkehrende Mittelohrentzündungen können zu einer Schwerhörigkeit und im schlimmsten Fall zum Hörverlust führen (Schultz 1986). Ebenso sind umfangreiche sprachliche Fehlentwicklungen und Defizite nachgewiesen, die mit schweren sozialen Beeinträchtigungen einhergehen (Abyholm, Borchgrevink et al. 1979). Alltägliche Probleme bei der Nahrungsaufnahme, wie etwa ein Flüssigkeitsfluss in die Nase oder das Festsetzen von Speisen in die oronasale Fistel (Abyholm, Borchgrevink et al. 1979; Schultz 1986; Amaratunga 1988; Schultz 1989) senken die Lebensqualität der Betroffenen. Diese Beeinträchtigungen der Patienten zeigen, dass ein Verschluss der oronasalen Fisteln angestrebt werden sollte. Das Problem ist die schlechte Ausgangssituation des ortständigen Gewebes. Zudem verschlechtert jeder weitere operative Eingriff die Prognose auf einen suffizienten Restlochverschluss weiter (Cole, Horn et al. 2006).

Alternativ zur Defektdeckung durch Gaumenplastiken stehen Operationen mit körpereigenen oder körperfremden Transplantaten zur Wahl. Körpereigene Materialien bringen häufig Probleme wie Entnahmemorbidität und weitere Narbenbildung in der Spenderregion mit sich. Ebenso muss mit beachtlichen funktionellen und ästhetischen Defiziten gerechnet werden. Aus diesen Gründen wären körperfremde, biokompatible Materialien wünschenswert. Jedoch sind diese zum einen in der Regel sehr kostenintensiv und

konnten bisher zum anderen nicht in ausreichendem Maße für diese spezielle Indikation geprüft werden. Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen des Körpers sind als häufige Nebenwirkungen von Allotransplantationen denkbar. Daher sollten allogene Materialien im Vorhinein an einem geeigneten Tiermodell geprüft werden.

Ein mögliches biologisches Transplantatmaterial stellt die humane Amnionmembran dar. War ihre Verwendung als frische Amnionmembran wegen des potentiellen Infektionsrisikos früher als kritisch anzusehen, finden sich seit ihrer Konservierungsmöglichkeit viele Anwendungsgebiete in verschiedensten Bereichen der Medizin (Tseng, Li et al. 1999). So sind als Beispiele die Augenheilkunde (Dua und Azuara-Blanco 1999; Kruse und Meller 2001; John 2003; Verter, Gisel et al. 2011), die Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie (Kothary 1971; Güler, Ercan et al. 1997; Gomes, dos Anjos et al. 2001; Samandari, Yaghmaei et al. 2004; Kesting, Loeffelbein et al. 2010; Velez, Parker et al. 2010) oder die Therapie von Brandwunden (Kesting, Wolff et al. 2008; Ching, Sutton et al. 2011) zu nennen. Besonders geeignet zum Einsatz als Transplantatmaterial ist die Amnionmembran aufgrund ihrer geringen Immunogenität (Kubo, Sonoda et al. 2001; Kesting, Loeffelbein et al. 2008). Außerdem wurde eine Beschleunigung der Wundepithelialisierung nach einer Wundabdeckung mit humaner Amnionmembran beobachtet (Koizumi, Inatomi et al. 2000) und eine Hemmung der Narbenbildung nachgewiesen (Ma, Wang et al. 2002; Kesting, Loeffelbein et al. 2008). Des Weiteren stellte man eine entzündungshemmende Wirkung fest (Shimmura, Shimazaki et al. 2001; Ma, Wang et al. 2002). Diese erklärt sich zum Beispiel durch die Hemmung der Freisetzung proinflammatorischer Substanzen wie Zytokinen oder Interleukinen durch Amnionzellen (Hao, Ma et al. 2000). In einer Pilotstudie, die dieser Arbeit voran ging, wurde die kryokonservierte humane Amnionmembran als Transplantatmaterial zur Deckung oronasaler Fisteln im Schweinemodell verwendet und untersucht. Mit vorliegendem Tiermodell sollte im Vergleich mit einer weiteren allogenen Membran überprüft werden, ob sie als Verschlussmaterial von oronasalen Restlöchern geeignet ist. Eine erfolgreiche Verwendung kryokonservierter humaner Amnionmembran zur spannungsfreien Deckung iatrogen geschaffener oronasaler Fisteln konnte bereits dargestellt werden (Kesting, Loeffelbein et al. 2010). Auf diesen Ergebnissen soll nun aufgebaut werden.

Ziel dieser Studie ist es, kryokonservierte autofetale und allogene Amnionmembran, porcine Small Intestine Submucosa und autologe Mundschleimhaut aus der Wangeninnenseite als Deckungsmaterialien für einen Gaumenverschluss zu vergleichen. Zwei Fragestellungen stehen dabei im Mittelpunkt dieser Arbeit:

- 1) Stellt die Amnionmembran im Vergleich zur Small Intestine Submucosa und autologer Mundschleimhaut ein geeignetes oder sogar besseres Transplantatmaterial dar?
- 2) Gibt es Vorteile bei der Verwendung autofetaler Amnionmembran als Wundabdeckung im Vergleich zur allogenen Amnionmembran?

## **2. Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten**

### **2.1. Epidemiologie**

Schon in der Antike beschäftigten sich die Menschen verschiedener Kulturen mit dem Auftreten von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, wie erhaltene Plastiken und Masken belegen (Gabka 1986). Sie sind eine der häufigsten angeborenen Fehlbildungen (Ivy 1964; Rösch 1998) und treten in Europa mit einer Inzidenz von 1:500 auf (Bull und Lenzen 2003). Die Auswertung der statistisch erhobenen Daten der letzten einhundert Jahre zeigen, dass sich in diesem Zeitraum die Inzidenz mehr als verdoppelt hat (Fogh-Andersen 1963; Tunte 1969; Fogh-Andersen 1971; Handelman und Osborne 1976; Milde 1976; Neumann 1976). Ein Grund hierfür stellt unter anderem die verbesserte Diagnostik und somit auch das Erkennen von gering ausgeprägten Formen der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten dar. Lippen-Kiefer-Gaumenspalten treten in allen ethnischen Bevölkerungsgruppen zum Vorschein, allerdings ist die Verteilung unterschiedlich. So ist die Inzidenz bei nordamerikanischen Indianern mit etwa 1:150 am größten. Europäer liegen mit einer Inzidenzrate von etwa 1:500 deutlich darunter und am geringsten fällt die Rate bei Negroiden mit etwa 1:3000 aus (Vanderas 1987; Derijcke, Eerens et al. 1996; Croen, Shaw et al. 1998; Ehrenfeld 2002).

### **2.2. Entwicklung der Lippe, des Kiefers und des Gaumens**

Die ungestörte Entwicklung des Kopfes wird in der Embryonalentwicklung zwischen dem 16. und 75. intrauterinen Tag vollzogen (Hochstetter 1944; Tessier 1976; Blechschmidt 1982; Hinrichsen 1985). Der Gaumen und die Lippe werden von der 5. bis zur 12. intrauterinen Woche aus den lateralen Nasenwülsten, dem medianen Nasenwulst dem Oberkieferwulst und dem Unterkieferwulst gebildet (Ehrenfeld 2002). Die Proliferation mittlerer Nasenwülste, seitlicher Nasenwülste, Ober- und Unterkieferwülste werden durch übergeordnete Organisationszentren, dem prosenzephalen Impulszentrum und dem rhombenzephalen Impulszentrum, induziert. Die Zwischenkopfreion stellt die Überlappung dieser Organisationzentren dar, sie verläuft von der Sella turcica über die Augenregion, die Nasenflügel und endet schließlich am Philtrum. Die Oberlippe wird durch das Verschmelzen der lateralen mit den medianen Nasenwülsten in der 5.

intrauterinen Woche gebildet (Ehrenfeld 2002). Die verschmolzenen mittleren Nasenwülste ergeben das Zwischenkiefersegment aus Philtrum und primären Gaumen. Dieses wird durch das Foramen incisivum begrenzt (Sadler 2003; Rohen 2006). Anschließend wird der sekundäre Gaumen aus den Oberkieferwülsten gebildet, die sich annähern und schließlich vom Foramen incisivum ausgehend nach dorsal verschmelzen (Horch 2007). Der primäre Gaumen und die vorderen zwei Drittel des sekundären Gaumens verknöchern zum harten Gaumen, das dorsale Drittel wird zum weichen Gaumen (Bajaj, Wongworawat et al. 2003). Entsprechend des jeweiligen Entwicklungsstandes lösen Störungen zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung ganz bestimmte Formen und Ausprägungen von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten aus.

### **2.3. Pathogenese**

Für die Spaltentstehung sind fehlerhafte Entwicklungen der Vereinigung von medianen und lateralen Nasenwülsten mit den Oberkieferwülsten verantwortlich (Töndury 1979; Sadler 2003). Dabei kann es zu zwei verschiedenen Arten der Entwicklungsstörung kommen, die eine Spaltbildung verursachen (Poltzer und Stockinger 1953; Töndury 1974). Bei der primären Spaltbildung spricht man vom Ausbleiben der mesenchymalen Kontaktbildung der Gesichtswülste. Von einer sekundären Spaltbildung spricht man, wenn die bereits bestehende Epithelmauer durch eine Nichtfusionsfähigkeit des Epithels partiell oder vollständig wieder aufgelöst wird (Hinrichsen 1985; Horch 2007). Aus primären Spaltbildungen resultieren im Vergleich zur sekundären größere Spalten (Bull und Lenzen 2003).

Je nach Zeitpunkt der Embryonalentwicklung entstehen verschiedene Spalttypen. Dabei weist jede Form eine teratologische Determinationsperiode auf, in der die Entwicklungsstörung stattfinden muss, um an entsprechender Stelle eine Schädigung hervorzurufen. So ergeben frühe Störungen in der 5. und 6. Embryonalwoche Spalten des Kiefers und der Lippe (Bajaj, Wongworawat et al. 2003). Gaumenspalten entstehen zwischen der 10. und 12. Embryonalwoche aus späteren Entwicklungsstörungen bei der Vereinigung der beiden Oberkieferwülste nach dorsal (Bull und Lenzen 2003). Diese sind wegen ebenfalls vorhandener Störungen der Kontaktbildung zwischen Nasenseptum und Gaumendach immer nach dorsal offen (Horch 2007).

## 2.4. Ätiologie

Die Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten ist nicht eindeutig geklärt. Die Kausalität wird als multifaktorielles System aus endogenen Faktoren sowie exogenen Einflüssen und Noxen dargestellt (Ehrenfeld 2002).

Lippen-Kiefer-Gaumenspaltung können in Verbindung mit Syndromerkrankungen wie zum Beispiel dem Van-der-Woude oder dem Pierre-Robin-Syndrom auftreten. Mit Syndromen assoziierte Spaltbildungen werden in ihrer Zahl auf bis zu 400 geschätzt (Sphrintzen 1989).

Die genetische Ursachenforschung beschreibt kausale Zusammenhänge zwischen der Ausbildung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Veränderungen auf Genebene. Es gelang, einige Genloci darzustellen, die in Verbindung mit Ausbildungen von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten stehen (Wong und Hagg 2004). So wurden unter anderem Abweichungen für Wachstumsfaktoren, z.B. den Transforming Growth Factor Alpha (TGF $\alpha$ ), codierende Gene festgestellt. Der TGF $\alpha$  gilt als embryonaler Wachstumsfaktor, der für Regulierung von Proliferation und Differenzierung von palatinalen Zellen verantwortlich ist (Marazita, Hu et al. 1992).

Eine Heredität wurde aus Stammbaumanalysen und Zwillingsforschung ermittelt, die Wahrscheinlichkeit liegt zwischen 14% und 33% (Gabka 1957; Fogh-Andersen 1963).

Als exogene Faktoren gelten unter anderem Nikotin- und Alkoholkonsum der Mutter (Saxen 1975; Werler, Lammer et al. 1990; Kallen 1997; Werler, Hayes et al. 1999). Außerdem werden Vitaminentzug oder Überdosierung als mögliche Risikofaktoren beschrieben (Neumann 1989; Werler, Hayes et al. 1999). Dem Kontakt zu chemischen Agenzien, einem Sauerstoffmangel im Blut und Kontakt zu ionisierender Strahlung werden ebenfalls ein erhöhtes Potential zur Spaltbildung zugesprochen (Bailey, Johnston et al. 1995; Bull und Lenzen 2003).

Diese verschiedenen Kausalitäten unterstützen die Annahme eines multifaktoriellen Systems als Auslöser für die Ausbildung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.



## 2.5. Klassifikation

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten treten in zahlreichen Variationen auf. Deshalb bedarf es einer schlüssigen und nachvollziehbaren Klassifikation zur Einordnung der verschiedenen Spalttypen. Prinzipiell lassen sich zwei Arten der Klassifikation unterscheiden. Solche auf anatomisch-morphologischer Basis und solche, die embryologische Prozesse als Grundlage der Einteilung verwenden. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts widmeten sich Davis und Ritchie einer anatomischen Einordnung (Davis und Ritchie 1922) der Spalttypen in

- I) präalveolär
- II) postalveolär
- III) alveolär

und Veau einer viergeteilten Klassifikation (Veau 1931) in

- I) Spalten des weichen Gaumens
- II) Spalten des harten Gaumens
- III) Durchgehende Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, einseitig
- IV) Durchgehende Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, beidseitig.

Diese Gruppeneinteilung war allerdings nicht ausreichend um die große Variationsbreite der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten wiederzugeben. Verschiedene Arbeitsgruppen stellten sich daraufhin die Aufgabe, eine Klassifikation zu schaffen, die die Embryologie mit einbezieht. So stellte Kernahan eine Gliederung vor, die dieses Merkmal erfüllt (Kernahan 1973):

- I) Spalten des primären Gaumens
- II) Spalten des sekundären Gaumens
- III) Spalten des primären und sekundären Gaumens.

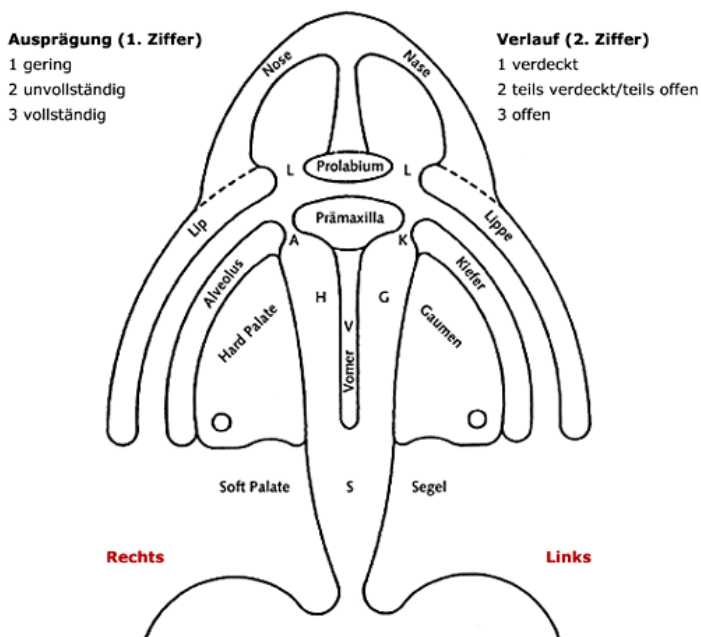
Allerdings fehlte in dieser Klassifikation eine klinische verwendbare Zuordnung der Spalttypen. Teilnehmer des vierten Internationalen Kongresses für plastische und Wiederherstellungschirurgie in Rom 1967 lieferten schließlich eine verständliche, nachvoll-

ziehbare Einteilung, die sowohl anatomische, morphologische als auch embryologische Gesichtspunkte vereint und zugleich klinische Aspekte berücksichtigt. Diese wird in der folgenden Tabelle dargestellt (Pfeifer 1989).

Gruppe 1	Spaltformen des vorderen (primären) embryonalen Gaumens Lippe uni- und bilateral Kiefer uni- und bilateral
Gruppe 2	Spaltformen des vorderen und hinteren (primären und sekundären) embryonalen Gaumens Lippe uni- und bilateral Kiefer uni- und bilateral Harter Gaumen uni- und bilateral Weicher Gaumen median
Gruppe 3	Spaltformen des hinteren (sekundären) embryonalen Gaumens harter Gaumen uni- und bilateral weicher Gaumen median
Gruppe 4	Seltene Spaltformen

**Tabelle 1: Internationale Klassifikation der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, erstellt auf dem vierten Internationalen Kongress für plastische und Wiederherstellungschirurgie in Rom 1967**

Eine weitere Klassifikation ist die LAHSHAL Einteilung nach Kriens, diese ermöglicht es, die Spaltformen einzuordnen und zu dokumentieren (Kriens 1989). Sie ist insbesondere für statistische Auswertungen geeignet und bietet eine gute Möglichkeit zur Kommunikation über die Klinikgrenzen hinaus. Die Buchstaben LAHSHAL stehen in der Klassifikation für L=lip, A=alveolus, H=hard palate, S=soft palate. Je nach Position der Spalte werden die Buchstaben rechts oder links der Mittellinie notiert. Dabei wird die Abbildung wie ein Röntgenbild gelesen, das heißt die linke Seite der Abbildung ist die rechte Seite des Patienten. Rein rechnerisch können über dieses System weit über 200 verschiedene Spaltformen diagnostiziert und präzise dokumentiert werden. Für den geübten Betrachter ergibt sich sofort eine eindeutige Diagnose. Die folgende Grafik zeigt eine schematische Darstellung der LAHSHAL Klassifikation (Koch 2012).



**Abbildung 1: Diagnoseschema mit Hilfe der LAHSHAL Klassifikation (aus Koch 2012)**

In der folgenden Tabelle sind einige der vielen möglichen Beispiele zur Codierung mittels der LASHAL Klassifikation aufgeführt.

Klassifikation	Ausgeschriebene Spaltdiagnose	Tabellenform
<b>Beispiele kompletter Spalten</b>		
L.....	Komplette rechte Lippenspalte	L-
LA....	Komplette rechte Lippen-Kieferspalte	LA
LAHS...	Komplette rechte einseitige LKG-Spalte	LAHS
..HSH..	Komplette Gaumenspalte	HSH
...S...	Komplette Segelspalte	S
...SHAL	Komplette linke einseitige LKG-Spalte	SHAL
.....AL	Komplette linke Lippen-Kieferspalte	AL
.....L	Komplette linke Lippenspalte	-L
L.....L	Komplette beidseitige Lippenspalte	L-L
LA...AL	Komplette beidseitige Lippen-Kieferspalte	LA-AL
LAHSHAL	Komplette beidseitige LKG-Spalte	LAHSHAL
<b>Beispiele partieller Spalten</b>		
l.....	Partielle rechte Lippenspalte	l-
la.....	Partielle rechte Lippen-Kieferspalte	la
...s...	Partielle Segelspalte	s

**Tabelle 2: Beispiele der Chiffrierung der LAHSHAL Klassifikation (aus Koch 2012)**

## **2.6. Therapie**

### **2.6.1. Prächirurgische Behandlung**

Die Therapieform des Nasoalveolar Molding stellt eine der modernsten frühkindlichen kieferorthopädischen und orthofazialen Behandlungsmöglichkeiten dar, vorhandene, weitreichende Spaltbildungen vor einer invasiven Primärtherapie in weniger komplizierte zu modulieren. Dabei wird eine individuell angefertigte Gaumenplatte hergestellt und durch Funktionselemente wie Klebestreifen oder einen Nasensteg ergänzt. Durch ständige Modifikation der Molding-Apparatur kann diese präoperative Therapie deutliche Vorteile bei der Behandlung von Patienten mit breiten einseitigen und bilateralen Spaltbildungen mit sich bringen (Spengler, Chavarria et al. 2006). Schwerwiegende Deformitäten können so signifikant verkleinert werden (Spengler, Chavarria et al. 2006; Kamble, Parkhedkar et al. 2013), Narbenbildungen reduziert werden (Yang, Stelnicki et al. 2003) und Asymmetrien der Nase verbessert werden (Spengler, Chavarria et al. 2006; Grayson und Shetye 2009).

### **2.6.2. Primärbehandlung**

Unter der Primärtherapie von Kindern mit Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten werden alle Maßnahmen zusammengefasst, die zum plastisch-chirurgischen Verschluss der gespaltenen Strukturen durchgeführt werden. Darunter fallen zum Beispiel die Lippenheftung, der definitive Lippenschluss, der Hartgaumenverschluss und der Weichgaumenverschluss. Diese Eingriffe finden meist zwischen dem dritten Lebensmonat und dem beendeten zweiten Lebensjahr statt, damit mit beginnender differenzierter Sprache Mund- und Nasenhöhle anatomisch getrennt sind (Ehrenfeld 1997). In Folge der chirurgischen Primärbehandlungen kann es zu Problemen kommen, die weitere Eingriffe bedingen. Ein Beispiel hierfür ist die Ausbildung oronasaler Fisteln.

### **2.6.3. Sekundärbehandlung**

Es sollte immer das Ziel sein, betroffene Kinder bis zum Zeitpunkt der Einschulung bezüglich Sprache, Gehör und auch äußerem Erscheinungsbild nahezu vollständig zu rehabilitieren. Deshalb können im 5.-6. Lebensjahr funktionelle und ästhetische Korrektur Eingriffe an Lippe und Naseneingang, sowie sprachverbessernde Operationen wie die Velopharyngoplastik, nötig sein. Zwischen dem 9. und 10. Lebensjahr findet bei weiterhin bestehenden knöchernen Kieferkammdefekten die sekundäre Kieferspaltosteoplastik statt. Abschließende chirurgische Korrekturen wie eine Kieferumstellung oder eine Nasenkorrektur erfolgen meist im 16. bis zum 18. Lebensjahr (Reinert und Krimmel 2003). Auch der Verschluss persistierender oronasaler Fisteln fällt unter die chirurgische Sekundärtherapie (Ehrenfeld 1997).

### **3. Oronasale Fisteln**

Oronasale Fisteln sind mit Epithel ausgekleidete Verbindungen von Mund- und Nasenhöhle und stellen in der Therapie von Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten eine häufig auftretende postoperative Komplikation nach operativem Gaumenverschluss dar (Diah, Lo et al. 2007). Die Entstehung, Häufigkeit ihres Auftretens und mögliche Therapieoptionen sollen im Folgenden aufgezeigt werden.

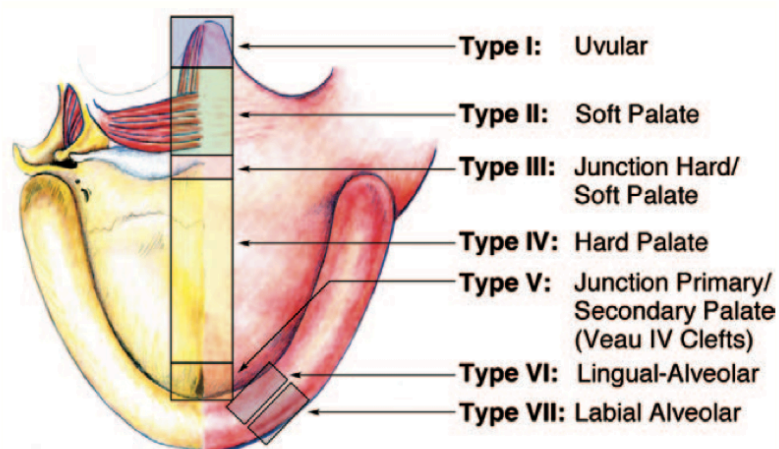
#### **3.1. Ätiologie**

Oronasale Fisteln entstehen im Zusammenhang mit der Behandlung von Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten häufig wegen einer zu großen Gewebespannung nach der Primärbehandlung durch Wiederaufreißen der adaptierten Wundränder (Sadhu 2009). Ebenso können postoperative Infektionen zu oronasalen Fistelbildungen führen (Posnick und Getz 1987). Dies ist im Speziellen bei Kleinkindern zu beobachten (Sadhu 2009). Natürlich können auch mechanische Traumata zu einer Verbindung von Mund- und Nasenhöhle führen (Posnick und Getz 1987). Auch eine Hämatombildung ist eine mögliche Ursache (Posnick und Getz 1987; Honnebier, Johnson et al. 2000).

#### **3.2. Klassifikation**

Oronasale Fisteln können nach ihrer Größe klassifiziert werden. Man unterscheidet dabei kleine (<2mm), mittlere (3-5mm) und große (>5mm) Fisteln (Muzaffar, Byrd et al. 2001). Außerdem ist eine Einordnung basierend auf der Lokalisation möglich. So unterteilt man in anteriore Fisteln, Fisteln des harten Gaumens, Fisteln am Übergang vom harten zum weichen Gaumen und Fisteln des weichen Gaumens (Diah, Lo et al. 2007). Mit dem Ziel eine standardisierte Einteilung zu entwickeln, die die Kommunikation in Klinik und Forschung erleichtert, erstellte eine Arbeitsgruppe die Pittsburgher Klassifikation (Smith, Vecchione et al. 2007). Diese orientiert sich an der Anatomie, unterteilt sieben Typen der oronasalen Fistel und ist im Folgenden dargestellt.

- Typ I: Fistel stellt sich als Uvula bifida dar
- Typ II: Fistel des weichen Gaumens
- Typ III: Fistel am Übergang vom weichen zum harten Gaumen
- Typ IV: Fistel des harten Gaumens
- Typ V: Fistel im Bereich des Foramen incisivum, am Übergang vom primären zum sekundären Gaumen
- Typ VI: Fistel im Bereich des palatinalen Alveolarknochens
- Typ VII: Fistel im Bereich des vestibulären Alveolarknochens



**Abbildung 2: Das Pittsburgher Klassifikationssystem der oronasalen Fisteln, aus: „The Pittsburgh Fistula Classification System: a standardized scheme for the description of palatal fistulas (Smith, Vecchione et al. 2007)**

### 3.3. Epidemiologie

Die Inzidenz oronasaler Fisteln variiert in der Literatur stark (Sadhu 2009). Im Folgenden sind Studien aufgeführt, die eine Rate zwischen 1,6% und 35,8% angeben. Ein Zusammenhang vom gehäuftem Auftreten oronasaler Fisteln bei bestimmten Operationstechniken wird von mehreren Autoren beobachtet (Amaratunga 1988; Muzaffar, Byrd et al. 2001; Losken, van Aalst et al. 2011). Eine der ersten Studien zum Thema führte Amaratunga 1988 durch. Er beobachtete bei 21% von 346 behandelten Patienten oronasale Fisteln nach Palatoplastik. Er stellte zudem fest, dass es bei der Operationsmethode nach Langenbeck eine höhere Inzidenz oronasaler Fisteln des Typs V gab als bei der Technik

nach Wardill, welche häufiger Hartgaumenfisteln des Typs IV auslöste (Amaratunga 1988). Zwischen 1982 und 1995 wurden von Muzaffar 103 Patienten nach Primärtherapie beobachtet und bei 8,7% das Auftreten oronasaler Fisteln beobachtet. Dabei übten Faktoren wie Operateur, Alter oder Geschlecht des Patienten, Art der Palatoplastik oder kieferorthopädische Therapie keinen signifikanten Einfluss auf die Fistelbildung aus (Muzaffar, Byrd et al. 2001). Eine Studie, in der zwischen 1990 und 2004 insgesamt 211 Neugeborene mit Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte begleitet wurden, beschreibt das Auftreten von oronasalen Fisteln nach Primärbehandlungen mit 8,1% (Phua und de Chalain 2008). Losken et al. berichten, dass nach der primären Gaumenplastik bei der Operationmethode nach Furlow eine extrem hohe Inzidenzrate oronasaler Fistelbildung von 35,8% festzustellen war. Aufgrund dessen wurden andere Operationstechniken untersucht und gezeigt, dass die Inzidenzrate bei angepasstem chirurgischen Verfahren auf 1,6% bei reduziert werden konnte. Dabei empfehlen die Autoren einen Verschluss nach Furlow nur bei Spalten unter 8mm Weite, bei größeren Defekten raten sie zur Bardach Technik (Losken, van Aalst et al. 2011). Eine andere Arbeitsgruppe, die im Zeitraum von 1984-2003 insgesamt 857 Kinder mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalten untersuchte, gab Inzidenz von 3,9% an. Chirurgische Intervention sei bei insgesamt nur 2% der Patienten nötig gewesen. Die niedrige Inzidenzrate ist mit einer spannungsfreien Wundheilung, einer optimalen Operationstechnik des jeweiligen Spalttyps und präoperativer Kieferorthopädie erklärt (Eberlinc und Kozelj 2011).

Die variablen Inzidenzraten lassen vermuten, dass diese durchaus beeinflussbar sind. Sei es zum Beispiel durch die angepasste Operationstechnik, die entsprechende Vorbehandlung, das Alter des Patienten oder durch eine spannungsfreie Einheilphase.

### **3.4. Probleme im Zusammenhang mit oronasalen Fisteln**

Eine persistierende Verbindung von Nasen- und Mundhöhle durch oronasale Fisteln kann zu erheblichen Schwierigkeiten führen. Ein Nahrungsübergang vom Mund in die Nase und ein damit verbundener Flüssigkeitsaustritt aus der Nase wird bei vielen betroffenen Patienten beobachtet (Abyholm, Borchgrevink et al. 1979; Schultz 1986; Sadhu 2009). Die Zunge nimmt eine unphysiologische Haltung ein, was weitere funktionelle Probleme zum Beispiel bei der Sprachbildung oder beim Schlucken mit sich bringt (Schultz 1986). Ebenso können oronasale Fisteln zu einer Hypernasalität der Stimme



und Sprachfehlerentwicklungen führen (Abyholm, Borchgrevink et al. 1979; Sadhu 2009). Diese sprachlichen Defizite gehen häufig mit erheblichen sozialen Beeinträchtigungen einher (Abyholm, Borchgrevink et al. 1979). In Mund- und Nasenhöhle werden chronische Entzündungen der Schleimhäute beobachtet, die aufgrund der persistierenden Fisteln nicht ausheilen können (Abyholm, Borchgrevink et al. 1979). Außerdem kommt es vermehrt zu funktionellen Beeinträchtigungen des Gehörs (Schultz 1986).

Bringen bestehende oronasale Fisteln Symptome mit sich, sollte ein zeitnaher, kompletter Verschluss angestrebt werden, um dem Patienten wenn möglich eine Beschwerdefreiheit, mindestens aber eine Verbesserung der bestehenden Situation zu verschaffen.

### **3.5. Verschlussmöglichkeiten oronasaler Fisteln**

Die Deckung oronasaler Fisteln stellt eine Sekundärbehandlung im Rahmen der Therapie von Spaltpatienten dar (Ehrenfeld 1997). Generell gilt, dass der komplette chirurgische Verschluss angestrebt werden sollte. Es ist aber auch möglich die Fisteln nicht operativ über eine Vinylprothese zu schließen (Berkman 1978). Bei großen Defekten ist der operative Verschluss allerdings obligat (Schultz 1986). Eine besondere Problematik beim chirurgischen Procedere stellt das ortsständige Gewebe dar, das aufgrund von Voroperationen meist starke Vernarbungen aufweist und gering durchblutet ist (Kirschner, Cabiling et al. 2006). Zudem ist das den harten Gaumen bedeckende Gewebe so wenig mobil, dass in der Ausheilungsphase nach operativen Eingriffen vermehrt Gewebespannungen auftreten können (Cole, Horn et al. 2006).

Um das Problem der schlechten Ausgangssituation chirurgischer Rekonstruktionen lösen zu können, wurden zahlreiche Operationstechniken beschrieben. Die am häufigsten angewendeten sollen nun vorgestellt werden.

#### **3.5.1. Verschluss durch regionales Gewebe**

Kleine oronasale Fisteln können durch lokale Mukoperiostlappen gedeckt werden (Ehrenfeld 2002; Sadhu 2009). Dabei ist die Qualität des voroperierten ortsständigen Gewebes als wichtiger Faktor hinsichtlich des Therapieerfolgs anzusehen. Mangelnde

Elastizität oder verminderte Durchblutung gefährden den erfolgreichen chirurgischen Verschluss der Fisteln (Cole, Horn et al. 2006).

Gestielte Muskel-Schleimhautlappen können ebenfalls zur Deckung verwendet werden, zum Beispiel ein bukkal gestielter Lappen aus der Wangeninnenseite (Robertson, McKeown et al. 2008).

Verschiedene Autoren berichten über die Verwendung von Zungenlappen, bei der die Zunge temporär in den Defekt eingenäht und nach einigen Wochen rückverlagert wird (Argamaso 1990; Diah, Lo et al. 2007). Es gilt jedoch zu bedenken, dass der Zeitraum bis zur Stieldurchtrennung für den Patienten wenig komfortabel ist (Cole, Horn et al. 2006). Andere Autoren berichten hingegen von einer relativ guten Toleranz bei Kleinkindern. Eine orale Ernährung sei in den meisten Fällen auch in der Anheilphase gut möglich (Sadhu 2009).

Auch die Verwendung von Expandern im Vorfeld eines Fistelverschlusses mit lokalem Gewebe wurde beschrieben. Diese Technik soll vor allem eine Alternative zum Zungenlappen darstellen (Van Damme und Freihofer 1996).

In anderen Fällen wurden anteriore Defekte mit einem Mukosalappen aus der Oberlippe gedeckt (Sadhu 2009).

### **3.5.2. Freier Gewebettransfer**

Steht kein lokales Gewebe zur Verfügung, ist es möglich Transplantate aus anderen Regionen zu gewinnen. Es wird zum Beispiel von der Verwendung freier Unterarm Transplantate (Chen, Ganos et al. 1992) oder Dorsalis-pedis-Transplantate (Correa Chem und Franciosi 1983) berichtet. Ersterer gilt wegen seiner guten Vaskularisation und dünnen Gestaltung in der Mundhöhle als besonders geeignet (Chen, Ganos et al. 1992). Auch die Schleimhaut der Concha nasalis inferior kann zur Deckung oronasaler Fisteln herangezogen werden (Penna, Bannasch et al. 2007) Eine weitere Möglichkeit stellt der Verschluss über einen freien Galea aponeurotica Lappen dar (Fallah, Baur et al. 2003).

### 3.5.5. Biologische Transplantate

Der Einsatz biologischer Transplantatmaterialien eröffnet viele Möglichkeiten, um positiv auf den postoperativen Heilungsverlauf eingreifen zu können. Deshalb werden in verschiedensten Disziplinen der Medizin solche Materialien angewendet und beforscht. Auch in der Deckung oronasaler Fisteln gibt es mehrere Anknüpfungspunkte zu allogenen Transplantaten.

So stellten mehrere Arbeitsgruppen die Verwendung der AlloDerm® als Deckungsmaterial zur chirurgischen Therapie oronasaler Fisteln im Tiermodell (Kirschner, Cabiling et al. 2006) und am Menschen (Cole, Horn et al. 2006) vor. Dabei handelt es sich um ein humanes, dezellularisiertes Hauttransplantat.

Eine andere Studie beschreibt die IntegraArtificial Skin® im Einsatz am Hundegaumen (Ophof, Maltha et al. 2008). Der gleiche Autor berichtet auch über die operative Anwendung von Dermisubstraten, ebenfalls im Hundegaumen (Ophof, Maltha et al. 2004).

Die Pilotstudie zu dieser Arbeit zeigte die erfolgreiche Verwendung humaner Amnionmembran zur Deckung oronasaler Fisteln am Minischwein (Kesting, Loeffelbein et al. 2010). Aufbauend auf den erfolgsversprechenden Ergebnissen der Pilotstudie untersucht die vorliegende Arbeit vor allem den immunologischen Aspekt der Amniontransplantation bei der Deckung oronasaler Fisteln.

## 4. Die Amnionmembran

Als Attribute der Amnionmembran werden unter anderem eine anti-inflammatorische Wirkung, antibakterielle Eigenschaften, ein geringes immunologisches Potential und Auswirkungen auf die Angiogenese genannt. Zu den Einsatzgebieten in der Medizin zählen zum Beispiel die Dermatologie, Urologie, Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie oder Onkologie (Mamede, Carvalho et al. 2012; Rohleder, Loeffelbein et al. 2013; Rommel, Rohleder et al. 2013). Im Folgenden werden die Amnionmembran, ihre Charakteristiken sowie ihre klinische Anwendungsmöglichkeiten vorgestellt.

### 4.1. Anatomie

Die Amnionmembran stellt eine von drei fetalen Membranen dar, welche dem Schutz des Embryos im Mutterleib dienen und die Eihaut bilden. Das Amnion stellt die innerste Schicht dar, gefolgt von Chorion und Dezidua. Seine Zellen setzen das Fruchtwasser in die Amnionhöhle frei und versorgen diese mit Flüssigkeit (Sadler 2003). Das bindegewebige Chorion enthält zahlreiche Blutgefäße und ist für den Nährstofftransport in das fetale Blut verantwortlich (Riau, Beuerman et al. 2010). Im Gegensatz zu Amnion und Chorion stellt die Dezidua eine Schicht maternalen Ursprungs dar. Sie ist eine weiterentwickelte Funktionsschicht des Endometriums (Riau, Beuerman et al. 2010). In der folgenden Abbildung ist der Aufbau der menschlichen Eihaut dargestellt.

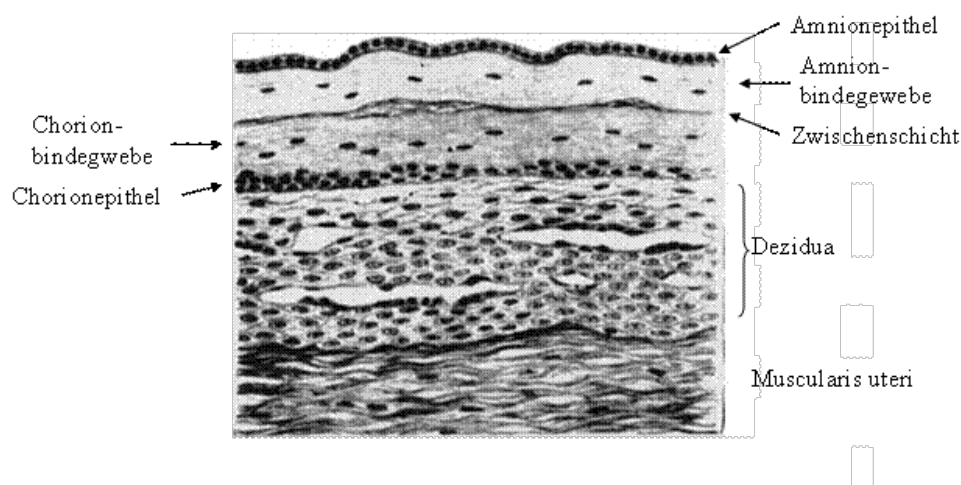


Abbildung 3: Aufbau der menschlichen Eihaut (aus Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2002)

## 4.2. Histologie

Das humane Amnion besteht aus drei Schichten, dem einlagigen Epithel, der Basalmembran und dem avaskulärem Stroma (Niknejad, Peirovi et al. 2008). Das Epithel enthält kuboidale bis zylindrische Epithelzellen, die an der apikalen Oberfläche Mikrovilli tragen. Darauf folgt die Basalmembran und Stroma, welches sich aus einer Kollagenschicht (Compact layer), einer Fibroblastenschicht (Fibroblast layer) und aus einer Schwammschicht (Spongy layer) zusammensetzt. Die Kollagenschicht sorgt für eine ausreichende Zugfestigkeit und Elastizität des Amnions. Die Fibroblastenschicht ist die dickste Schicht des Stromas und in ein Geflecht aus Retikulum gewebt. Die Schwammschicht ist maßgeblich dafür verantwortlich, dass die Amnionmembran ohne Probleme über das fixierte Chorion gleiten kann (Bourne 1960; von Versen-Hoyneck, Syring et al. 2004). Insgesamt bemisst das Amnion eine Dicke von 0,02-0,5mm (Bourne 1960). Das in vorliegender Untersuchung verwendete porcine Amnion ist der humanen Membran hinsichtlich des histologischen Aufbaus ähnlich (Bergström 1971; Tiedemann 1979).

Extrazelluläre Bestandteile beeinflussen maßgeblich die Wirkung eines Gewebes auf Faktoren wie Wachstum, Reepithelialisierung oder Wundheilung. Die fetalen Membranen enthalten optimal angeordnete Kollagene. Malak et al. wiesen Typ I und III Kollagene in den drei Schichten des Stromas nach. Außerdem fanden sich Typ V und VI Kollagene, diese mit der größten Verteilung in Kompakt- und Fibroblastenschicht. Elastin, Laminin und Fibronectin sind ebenfalls nachgewiesene Kollagene der extrazellulären Matrix (Malak, Ockleford et al. 1993). Die Basalmembran, deren Gerüstfunktion vor allem für klinische Anwendungen von hoher Bedeutung ist, enthält ein 0,2-0,3 µm dickes Kollagenband aus Typ IV Kollagen. Eine stabile Basalmembran kann die epitheliale Morphogenese, Proliferation und Differenzierung steuern und auch Apoptosen unterbinden (Andriani, Margulis et al. 2003; Grueterich, Espana et al. 2003).

## 4.3. Eigenschaften der Amnionmembran

### 4.3.1. Strukturelle Eigenschaften

Die Amnionmembran verfügt aufgrund ihrer Funktion als Hülle der Amnionhöhle über eine große Elastizität. Diese ist im hohen Elastinanteil in der extrazellulären Matrix

begründet (Kim, Nikolovski et al. 1999). Diese Eigenschaft zeichnet die Amnionmembran als geeignetes biologisches Material für Wundauflagen aus (Gajiwala und Gajiwala 2004). Außerdem ist sie durch ihre Struktur fähig, Sauerstoff diffundieren zu lassen, um die Wundheilung anzuregen (Lo und Pope 2009) und gleichzeitig den Verlust von Flüssigkeiten, Elektrolyten oder auch Wärme zu mindern (Yoshita, Kobayashi et al. 2004).

#### **4.3.2. Immunologisches Potential**

Die Immunantwort des ortsständigen Gewebes auf ein Transplantatmaterial ist maßgeblich mit für den Erfolg der Therapie mit allogenen Material verantwortlich. Eine Humanstudie belegt, dass in subkutane Taschen am Oberarm eingelegte humane Amnionimplantate nachweislich keine akuten Entzündungsreaktionen bei den Probanden auslösen. Histologisch war keine oder nur eine geringe Immunreaktion auf den Fremdkörper nachzuweisen (Akle, Adinolfi et al. 1981). Im Rahmen einer Studie, in der humane Amnionmembran als Transplant auf Bauchmuskelfaszien bei Ratten gebracht wurde, konnte zwar eine geringe lymphozytäre Reaktion, aber keine immunologische Abstoßungsreaktion nachgewiesen werden (Kesting, Loeffelbein et al. 2008). Dass die humane Amnionmembran ein immunologisch privilegiertes Gewebe mit immunmodulierenden Faktoren ist, konnte Kubo nachweisen, der an Ratten Xenotransplantationen durchführte und das Amnion unter die Nierenkapsel, in die Cornea und in verschiedene Hirnareale implantierte. Die histologischen Nachuntersuchungen ergaben keine oder nur milde Immunreaktionen (Kubo, Sonoda et al. 2001). Dennoch wird die Immunogenität der humanen Amnion kontrovers diskutiert, da in anderen Studien auch Abstoßungsreaktionen nach allogener Transplantation beobachtet wurden (Hori, Wang et al. 2006; Wang, Yoshida et al. 2006).

#### **4.3.3. Antimikrobielle Wirkung**

Es konnte nachgewiesen werden, dass bei kontaminierten Brandwunden von Ratten, die mit verschiedenen Wundauflagen therapiert wurden solche, die mit Amnion abgedeckt wurden eine geringere Keimbesiedlung aufweisen als die mit Vergleichsmaterialien behandelten Wunden (Robson und Krizek 1973). Außerdem exprimiert das Amnion

antimikrobiell wirksame Substanzen wie  $\beta$ - Defensine, Elafin und Elastase Inhibitoren (Sorsby und Symons 1946).

#### **4.3.4. Hemmung der Entzündungsreaktion**

Entzündungshemmende Wirkungen der Amnionmembran sind durch verschiedenste Studien belegt (Sippel, Ma et al. 2001; Mamede, Carvalho et al. 2012). Die Effekte resultieren beispielsweise aus der Hemmung der Freisetzung proinflammatorischer Substanzen wie Zytokinen oder Interleukinen durch Amnionzellen (Hao, Ma et al. 2000; Solomon, Rosenblatt et al. 2001). Auch die Infiltration polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten und die damit zusammenhängende Keratinozytennekrose wird gehemmt (Park und Tseng 2000). Außerdem wird die Downregulierung der Ausschüttung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  und so das Herabsenken eines Fibroserisikos beschrieben (Tseng, Li et al. 1999; Lee, Li et al. 2000).

#### **4.3.5. Reepithelialisierung**

Soll ein Material zur Wundabdeckung von defekten, normalerweise epithelialisierten Arealen dienen, ist der Einfluss auf die Reepithelialisierung dieses Areals ein wichtiges Beurteilungskriterium des Transplantats. Der Amnionmembran werden proliferationsfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Sie enthält eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\alpha$ , KGF, HGF, bFGF, TGF- $\beta$ -1, TGF- $\beta$ -2, TGF- $\beta$ -3 und andere. Diese konnte Koizumi durch eine mRNA Expression darstellen (Koizumi, Inatomi et al. 2000). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Amnionepithelzellen zum Freisetzen von Typ III und Typ IV Kollagen und weiteren Glykoproteinen wie zum Beispiel Laminin fähig sind. Diese Proteine wirken indirekt beschleunigend auf die Reepithelialisierung indem sie Liganden für die Zelladhäsion darstellen und so über die Bindung von Oberflächenrezeptoren die Signaltransduktion beeinflussen (Lo und Pope 2009).

#### **4.3.6. Analgetische Wirkung**

Die Schmerzhaftigkeit von Behandlungen ist für Patienten ein Faktor von sehr hohem Stellenwert. Verschiedene Studien berichten von einer analgetischen Wirkung unter der Verwendung von HAM als biologisches Transplantatmaterial. Der zugrundeliegende Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. So berichtet Mostaque 2011 in einer Studie mit 102 Kindern, die eine Verbrennung zweiten Grades erlitten hatten und mit HAM behandelt wurden, dass die Schmerzhaftigkeit über die gesamte Behandlungsdauer als geringer angegeben wurde als beim Vergleichsmaterial. Außerdem waren weniger Verbandswechsel nötig und der Behandlungszeitraum insgesamt geringer. Die Lebensqualität der mit Amnion behandelten Patienten wurde höher eingestuft (Mostaque und Rahman 2011). Die HAM unterbricht den direkten Kontakt von Wundaufgabe und Defekt, weshalb empfindliche Nervenendigungen im Gewebe nicht im direkten Kontakt zum Verbandsmaterial stehen. Diese Barrierefunktion zwischen Wunde und Auflage könnte ebenfalls ein Grund für die analgetische Wirkung der Amnionmembran sein (Martinez Pardo, Reyes Frias et al. 1999).

#### **4.3.7. Beeinflussung der Angiogenese**

Der Einfluss der Amnionmembran auf die Angiogenese im ortsständigen Gewebe wird in verschiedenen medizinischen Disziplinen kontrovers diskutiert. So beschreiben Studien, dass die Amnionmembran durch das Freisetzen von basic fibroblast growth factor (bFGF) und auch von vascular endothelial growth factor (VEGF) die Angiogenese unterstützt (Mignatti, Tsuboi et al. 1989; Bogic, Brace et al. 2000). Diese Meinung wird durch die Ergebnisse von Bennett, die nach der Deckung von Beinulzera mit humaner Amnionmembran eine Neoangiogenese belegen, unterstützt (Bennett, Matthews et al. 1980). Selbiges zeigte auch Güler bei Nachuntersuchungen intraoraler Vestibulumplastiken, die unter Zuhilfenahme der HAM durchgeführt wurden (Güler, Ercan et al. 1997). Im Gegensatz dazu beschreiben andere Autoren die Amnionmembran wegen ihrer avaskulären Struktur als antiangiogenetisch (Burgos 1986). Vor allem in der Ophthalmologie spielt dieser Effekt eine große Rolle. So belegte Shao ein vermindertes Wachstum von Endothelzellen und somit eine Hemmung der Neovaskularisation der Cornea (Shao, Sima et al. 2004).



#### 4.3.8. Verringerte Narbenbildung

Neben den genannten Eigenschaften wird der Amnionmembran noch ein weiteres, sich positiv auf die Wundheilung auswirkendes Attribut, zugesprochen. Verschiedene Studien belegen eine Hemmung der Narbenbildung beim Einsatz der Amnionmembran (Pessolato, Martins Ddos et al. 2011). Eine Arbeitsgruppe erklärt dieses Phänomen mit der Unterdrückung der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion und der Differenzierung narbenbildender Zellen durch die HAM (Tseng, Li et al. 1999).

#### 4.4. Anwendung in der Medizin

Die humane Amnionmembran ist ein in der Medizin variabel eingesetztes Gewebe. In der Augenheilkunde wird die kryokonservierte Amnionmembran zum Beispiel zur Rekonstruktion von verschiedenen cornealen Defekten, wie corneale Ulzera, Verbrennungen oder Verätzungen der Hornhaut eingesetzt (Kubo, Sonoda et al. 2001; John 2003; Diah, Lo et al. 2007). Erstmals wurde 1940 eine Amniontransplantation auf die Augenoberfläche von De Rötth beschrieben (Mejia, Acosta et al. 2000). Die operativen Methoden unterliegen hierbei der ständigen Weiterentwicklung. So beschäftigen sich aktuelle Studien damit, die Operationen der Hornhaut mit HAM durch einen neuartigen Verbund zwischen Hornhaut und Amnion zu verbessern. Dabei wird auf Nähte zur Fixierung der HAM verzichtet, da diese das Auge nachhaltig schädigen können. Es handelt sich um das sogenannte „photochemical tissue bonding“. Dabei wird die HAM durch ein lichtaktiviertes Bonding über Hornhautdefekte geklebt (Verter, Gisel et al. 2011; Wang, Kochevar et al. 2011). Diese wurden dadurch während der Ausheilung stabilisiert und wiesen erheblich weniger Entzündungszellen auf als die mit angenähter HAM behandelten Defekte. Dies und eine im Mikroskop gut strukturierte Kollagenschicht lassen vermuten, dass das „photomechanical tissue bonding“ zu einer geringeren Narbenbildung führt als konventionelle Operationstechniken (Wang, Kochevar et al. 2011).

In der Versorgung von Brandwunden findet die HAM ebenfalls ihren Einsatz. Aus den Ergebnissen eines Tierversuchs, die zeigten, dass der Einsatz der HAM für Brandverletzte eine Verringerung der Narbenbildung und ein schnelleres Wiederkehren der Funktion verletzter Areale mit sich bringt, wurde der Schluss gezogen, dass diese Therapie eine erhebliche Verbesserung der Lebensqualität betroffener Patienten mit sich bringen

kann (Pessolato, Martins Ddos et al. 2011). Dies ist in einer weiteren Studie belegt. Diese zeigt, dass die Wundheilung verbessert und auch die Narbenbildung durch die Verwendung von HAM verringert wird (Kesting, Wolff et al. 2008).

Ebenso ist die HAM in der Onkologie vielversprechend anwendbar (Seo, Kim et al. 2008). Es ist belegt, dass die Amnionmembran als Barriere die Versorgung von Tumorzellen unterbrechen und so die Tumorangiogenese und dessen Wachstum ebenso wie die Metastatisierung verhindern kann (Mamede, Carvalho et al. 2012).

In der rekonstruktiven Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie stellen neben ablativen Defekten vor allem auch die Transplantatentnahmestellen, sogenannte donor sites, ein Problem in der Versorgung dar. Auf der Suche nach einem biologischen Material zur Deckung und Wundheilungsförderung dieser Entnahmestellen wurde die HAM im Tierversuch untersucht. Die Studie zeigt den erfolgreichen Einsatz der HAM als Deckungsmaterial für iatrogene Vollhautwunden an Minischweinen (Loeffelbein, Baumann et al. 2012).

Auch die intraorale Verwendung der HAM wird seit über 20 Jahren propagiert. So stellte Kothary eine Rekonstruktion nach Glossektomie vor (Kothary 1971). Im Bereich der zahnmedizinischen Implantologie wird untersucht, ob der Einsatz der HAM Vorteile während der Einheilungsphase nach dem Einbringen von Implantaten erzielen kann. Eine Pilotstudie zeigt, dass die HAM die Wundheilung verbessert und die Epithelialisierung positiv beeinflusst (Velez, Parker et al. 2010). Mehrere Gruppen berichten von erfolgreicher Verwendung der HAM zur Durchführung einer Vestibulumplastik (Samandari, Yaghmaei et al. 2004; Kothari, Goudar et al. 2012). Ebenso wurde die HAM als Membran für eine „Guided Bone Regeneration“ untersucht (Gomes, dos Anjos et al. 2001). Eine weitere Studie belegt im Tierversuch an Ratten, dass präfabrizierte HAM-Fazialislappen zur intraoralen Defektdeckung eine bessere Wundheilung aufweisen als solche ohne Beschichtung (Mücke, Loeffelbein et al. 2010). Außerdem findet sich eine Studie zur Deckung von abdominalen Defekten im Rattenmodell durch ein- oder mehrlagige Amnionpatches (Kesting, Loeffelbein et al. 2008).

## **5. Die „Small Intestine Submucosa“**

### **5.1. Gewinnung und Aufbau**

Auf der Suche nach Vergleichsmaterialien zur Amnionmembran wurde speziell nach Materialien Ausschau gehalten, denen ähnliche Eigenschaften zugesprochen werden wie der HAM. Dabei standen eine geringe Immunität und fördernde Wirkungen auf den Gewebeaufbau im Vordergrund. Bei der Small Intestine Submucosa (SIS) handelt es sich um ein porcine gewonnenes Transplantatgewebe, das aus dem Dünndarm von Schweinen stammt (Hoepfner, Crnogorac et al. 2009). Sie besteht aus Kollagen, Glykoproteinen und Proteoglykanen (Hodde, Badylak et al. 1996). Außerdem sind Proteine enthalten, die nicht den Kollagenen zugeordnet sind (McPherson, Shim et al. 1997). Drei Lagen zeichnen ihren Aufbau aus, dabei handelt es sich um die Tunica mucosa, die Tunica muscularis mucosae und das Stratum compactum der Tunica mucosa (MacLeod, Sarathchandra et al. 2004). Bei der Herstellung der SIS werden Muskelschichten, Anteile der Serosa und die Schleimhaut entfernt, um die drei Lagen aus der extrahierten extrazellulären Matrix bilden zu können (Cook 2011).

### **5.2. Eigenschaften der „Small Intestine Submucosa“**

#### **5.2.1. Positive Auswirkung auf den Gewebeaufbau**

Eine Pilotstudie zeigte, dass die SIS eine konduktive Wirkung auf Zelleinwanderungen im Laufe der Wundheilung inne hat (Gastel, Muirhead et al. 2001). Demnach stellt sie ein Gerüst dar, an dem sich die Zellen entlangarbeiten, um den Gewebeaufbau anzutreiben. Außerdem erweist sich die SIS während des Heilungsprozesses als ausreichend mechanisch stabil (Franklin und Russek 2011).

Des Weiteren sind proangiogenetische Effekte dokumentiert. Diese angiogenetische Wirkung ist auf SIS-Bestandteile wie Proteoglykane, zum Beispiel Heparin, Glykosaminoglykane und diverse Kollagentypen zurückzuführen (Linhardt und Hileman 1995).

### **5.2.2. Immunogenität**

Eine Studie aus dem Jahr 2007 zeigt, dass die SIS zwar Antikörperreaktionen bei den Probanden auslösen kann, es aber zu keiner erkennbaren Abstoßung gegen das Gewebe kam (Catena, Ansaloni et al. 2007). In einer Humanstudie an 20 Patienten wurde nach operativen Hernienverschlüssen keine Abwehrreaktion auf die porcine SIS festgestellt (Ueno, Pickett et al. 2004). Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte verschiedene Gewebe auf ihre Immunogenität. Dabei wurden verschiedene Materialien subkutan transplantiert und die SIS als Material mit geringer Immunogenität eingeordnet (Allman, McPherson et al. 2001).

### **5.2.3. Anwendungsbereiche in der Medizin**

Die Small Intestine Submucosa wird sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin weitverbreitet eingesetzt. Verschiedene Arbeitsgruppen berichten vom Einsatz der SIS zur Rekonstruktion von Hernien. So stellte Oelschlaeger die SIS im erfolgreichen Einsatz in der operativen Therapie von paraoesophagealen Hernien vor (Oelschlaeger, Pellegrini et al. 2006). Außerdem wurde der Verschluss von Analfisteln mit der SIS untersucht (Champagne, O'Connor et al. 2006). Sandusky zeigt in einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1995 die Verwendung der SIS als Transplantat in der Arteria Carotis bei Hunden (Sandusky, Lantz et al. 1995). Als Material eigne sie sich besser als die in der Studie ebenfalls untersuchten expandierten Polytetrafluorethylen (ePTFE) Transplantate, da sich die Ausheilungscharakteristik überlegen darstellte. Nach 90 Tagen hatte das SIS Transplantat das gleiche histologische Erscheinungsbild wie eine normale Arterie. Bei dem ePTFE Transplantat hingegen konnte nach 180 Tagen noch immer keine vollständige Epithelialisierung nachgewiesen werden. Eine Studie zeigt die Anwendung der SIS zur dermalen Wundheilung bei Hunden. Es wurden iatrogen zwei 4x4 cm große Vollhautwunden pro Tier geschaffen. Eine davon wird mit SIS bedeckt und die andere als Kontrollgruppe der freien Granulation überlassen. Hierbei unterlag die SIS der Kontrollgruppe. Zum einen wurden akute Entzündungsreaktionen nachgewiesen, zum anderen epithelialisierten die mit SIS bedeckten Wunden langsamer als die der Kontrollgruppe (Schallberger, Stanley et al. 2008).

## 6. Material und Methode

### 6.1. Das Tiermodell

#### 6.1.1. Tiere und Haltung

Der Versuch dient dem Vergleich verschiedener Deckungsmaterialien zum Verschluss von oronasalen Fisteln. Bei den Materialien handelt es sich um autologe Mundschleimhaut aus der Wangeninnenseite, die porcine „Small Intestine Submucosa“ (SIS) und um autofetale sowie allogene Amnionmembran. Entsprechend der Materialien wurden vier Gruppen von Versuchstieren gebildet, die jeweils von einem Muttertier stammten. Dies ergibt eine Gesamtmenge von 28 Hybrid-Schweinen (Schwäbisch Hällische x Pietrain), 4 Sauen und 24 Ferkel.

Die Haltung der Tiere erfolgte nach der Schweinehaltungshygiene-Verordnung in der Klinik für Schweine in München-Oberschleißheim. In Zusammenarbeit mit den dort praktizierenden Veterinären erfolgte die Versuchsdurchführung und tägliche Beobachtung und Versorgung der Schweine.

Das Tiermodell wurde nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes bei der Regierung Oberbayern genehmigt (Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531-183-09).

Gemeinsam mit der Mutter wurden die Ferkel in den ersten 4 Wochen in Abferkelbuchten auf Stroh gehalten, additiv zur Muttermilch stand ihnen ein Milchaustauschprodukt zur Verfügung (*Bovifix Ferkel, Fa. Zimmererwerke, Landshut, Geutschland*) zur Verfügung. Nach diesen 4 Wochen wurden die Ferkel abgesetzt und in ein gereinigtes, desinfiziertes und isoliertes Stallabteil mit Stroheinstreu umgestallt. Wasser stand über Nippeltränken zur Verfügung, die Fütterung erfolgte über ein Fertigfuttermittel (*Ferkelstarter UNI, ZILA-Zuchtschwein Getreidemischeng UNI, Da. Zimmererwerke, Landshut, Geutschland*). Die Haltung bis zur Defektsetzung in der 8. Woche erfolgte in Gruppen anschließend in Einzelboxen mit Sichtkontakt zu den anderen Versuchstieren. Wasser stand ad libitum zur Verfügung und jede Box enthielt einen Futtertrog für das Fertigfuttermittel.

### 6.1.2. Versuchsgruppen

Unter Rücksichtnahme auf eine gleichmäßige Verteilung in Bezug auf Körpergewicht (KGW) und Geschlecht wurden 4 Gruppen, unterteilt nach dem jeweiligen Deckungsmaterial, aus jeweils 6 Versuchstieren gebildet, die sich wie folgt darstellten.

Gruppe	Tier	Material
I	1-6	Autofetales Amnion
II	7-12	Allogenes Amnion
III	13-18	Autologe Mundschleimhaut
IV	19-24	SIS

**Tabelle 3: Versuchsgruppen**

### 6.2. Durchführung der Kaiserschnitte/ Gewinnung Amnion

Per sectionem wurden die Versuchstiere durch Veterinäre zwischen dem 113. und 115. Tag der Trächtigkeit entbunden und zeitgleich das Amnion entnommen. Die Muttertiere erhielten nach einer Prämedikation von 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) eine Inhalationsnarkose eingeleitet mit 5% und aufrechterhalten mit 2-3% Isofluran (*Isoba®*, Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) sowie Sauerstoff (3-5l/min). Außerdem lag in der Ohrvene der Tiere ein Venenverweilkatheter mit Dauertropfinfusion isotoner Kochsalzlösung (*isotone Kochsalzlösung 0,9%®*, Fa. B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Deutschland).

Das Operationsfeld wurde gewaschen (*Jodosept®*, Fa. Vétpquinol GmbH, Ravensburg, Deutschland) und desinfiziert (*Vetsept®*, Fa. Albrecht, Aulendorf, Deutschland), die übrigen Körperbereiche mit sterilen Tüchern abgedeckt. Anschließend erfolgte der Kaiserschnitt wie im Lehrbuch „Schweinekrankheiten“ (Heinritzi 2006) beschrieben. Der Uterus wurde im Ganzen vorverlagert und an zwei Stellen eröffnet, um Ferkel und Amnion möglichst schonend entnehmen zu können.

Nach Entnahme wurde das Amnion unter sterilen Bedingungen zunächst mit Ringerlösung gespült und in selbiger Lösung steril zum Labor transportiert. Im Sterilbehälter wurde das Gewebe in einer Zeitspanne von höchstens drei Stunden gelagert.



**Abbildung 4: Ferkel noch eingehüllt in Amnionmembran**

### **6.3. Aufbereitung und Präparation der Amnionmembranen**

Die Präparation der Amnionmembranen wurde steril unter einer „Laminar flow hood“ (*HS 12®*, Heraeus Herasafe, Fa. Heraeus, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt, der Arbeitsbereich war hier mit einem saugfähigen Material (*Molinea®*, Fa. Hartmann, Heidenheim, Deutschland) bedeckt. Darüber wurde eine sterile Folie (*Foliodrape®*, Fa. Hartmann, Heidenheim, Deutschland) aufgelegt.

Die Amnionmembran wurde nun vom umliegenden Gewebe vorsichtig abpräpariert und in Membranpatches der Größe 5x5 cm geschnitten. Diese Patches wurden mit der epithelialen Seite nach oben auf einem Nitrocellulose-Tuch (*Raucocel®*, Fa. Lohmann-Rauscher, Rengsdorf, Deutschland) durch 4 Einzelknopfnähte mit 7-0 Seidenfaden (*Perma Hand-Seide®*, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) befestigt.

#### **6.3.1. Herstellung des Konservierungsmediums**

Das Konservierungsmedium wurde aus 250ml DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*, Fa. J-R Scientific, Woodland, USA), 5 ml Penicillin/ Streptomycinl Lösung und 5ml

Amphotericin B hergestellt und steril filtriert. Falcon-Tubes wurden mit je 20ml der Lösung befüllt und mit 20ml steril gefiltertem Glycerin (*Rotipuran*>86%, *Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland*) aufpipettiert. Auf diesem Weg erhielt man 10 Falcon-Tubes mit jeweils 40 ml des Konservierungsmediums.

### **6.3.2. Kryokonservierung der Amnionmembran**

Die vorbereiteten Amnionpatches wurden unter sterilen Bedingungen in die Falcon-Tubes überführt, wobei die Nitrocelluloseseite Richtung Tube-Wand und die Amnionseite der Patches in Richtung der Konservierungslösung zeigte. Die Falcon-Tubes wurden daraufhin im Gefrierschrank bei -80°C konserviert. Das Auftauen geschah eine Stunde prae operationem im Wasserbad bei 28°C.

## **6.4. Operatives Vorgehen**

### **6.4.1. Defektsetzung**

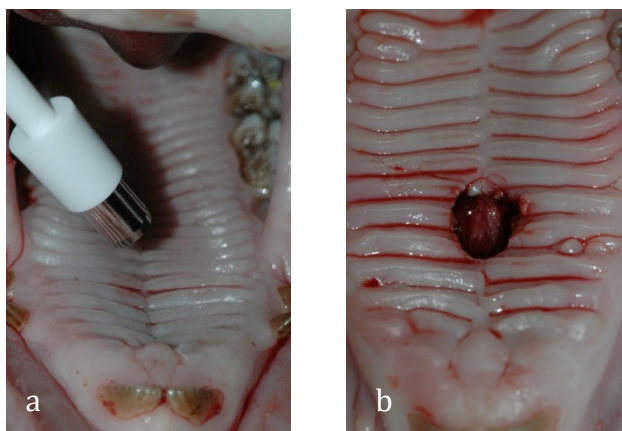
Alle Ferkel wurden mit 8 Wochen Lebensalter der ersten Operation unterzogen, sie hatten dabei ein durchschnittliches Gewicht von 16 kg. Nach einer Prämedikation von 10 mg/kg KGW Ketamin i.m. (*Ursotamin*®, *Fa. Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg, Deutschland*) und 2mg/kg KGW Azaperon i.m. (*Stresnil*®, *Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland*) wurden die Tiere durch einen Veterinär intubiert und die Narkose mit 1-2% Isofluran (*Isoba*®, *Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland*) sowie 3-5 l/min Sauerstoff aufrechterhalten. Überwacht wurde die Narkose dauerhaft von einem Veterinär. Die Tiere wurden auf dem Rücken, auf einem gewärmten OP-Tisch, gelagert und der Tubus am Unterkiefer fixiert um ein gut zugängliches Operationsfeld zu erhalten. Ein Mundsperrrer sicherte das Offenstehen der Kiefer. Des Weiteren erhielten die Tiere zur postoperativen Analgesie interoperativ 20-50 mg/kg KGW Metamizol (*Vetalgin*®, *Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland*) und 0,4 mg/kg KGW Meloxicam (*Metacam*® 20mg/ml, *Fa. Boehringer Vetmedica, Ingelheim, Deutschland*) i.m., isotone Kochsalzlösung wurde i.v. zugeführt (*isotone Kochsalzlösung 0,9%*®, *Fa. B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Deutschland*).



Der Eingriff wurde durch einen erfahrenen Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen und einer Zahnärztin als Assistenz durchgeführt.

Nach gründlicher Reinigung der Mundhöhle erfolgte eine Infiltrationsanästhesie mit 1,7 ml einer 4%-igen Articain-Lösung, Adrenalinzusatz 1:200 000 (*Ultracain forte®*, *Sano-vis-Aventis, Frankfurt, Deutschland*) zur intraoperativen Blutstillung und postoperativen Schmerzausschaltung. Vom Oberkiefer wurde ein Silikonabdruck zur Anfertigung individueller Verbandplatten genommen. Die Platten wurden zum Schutz der gedeckten Defekte angefertigt. Sie wurden im Dentallabor der Abteilung für Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie des Klinikums Rechts der Isar in München im Tiefziehverfahren aus Polymethylmethacrylat hergestellt. Der Defekt wurde mittels einer Gewebestanze (*Biopsy Punch Ø 8mm sterile®*, *Fa. Kruuse, Henry Schein Vet GmbH, Deutschland*) markiert (Abb. 2a). Dabei wurde die Gaumenschleimhaut bis auf den Knochen gestanzt und entfernt.

Der knöchernerne Defekt wurde rotierend mit einer Knochenfräse gesetzt und die Gesamtausdehnung auf 10mm erweitert. Dies geschah unter ständiger Kühlung mit isotoner Kochsalzlösung (*isotone Kochsalzlösung 0,9% ®*, *Fa. B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Deutschland*). Der critical size-Defekt wurde median an der höchsten Stelle des knöchernen Gaumens gesetzt. Unter visueller Kontrolle wurde bis auf das Septum nasi gebohrt (Abb. 5). Nasal wurde den Tieren Oxymetazolin (*Otriven, Ratiopharm, Uml, Deutschland*) verabreicht. Nach Blutstillung wurden die Tiere extubiert und blieben postoperativ in Aufwachboxen unter Beobachtung und wurden nach Freigabe der Verterinäre in die Einzelstallungen gesetzt. Wasser stand ad libitum zur Verfügung und es wurde weiterhin normale Kost gefüttert.



**Abbildung 5**

**Abb. 5a: Oberkiefer unmittelbar vor der Defektsetzung mit der Biopsiestanze**

**Abb. 5b: Dargestellter Defekt bis zum Septum nasi, intraoperativ**

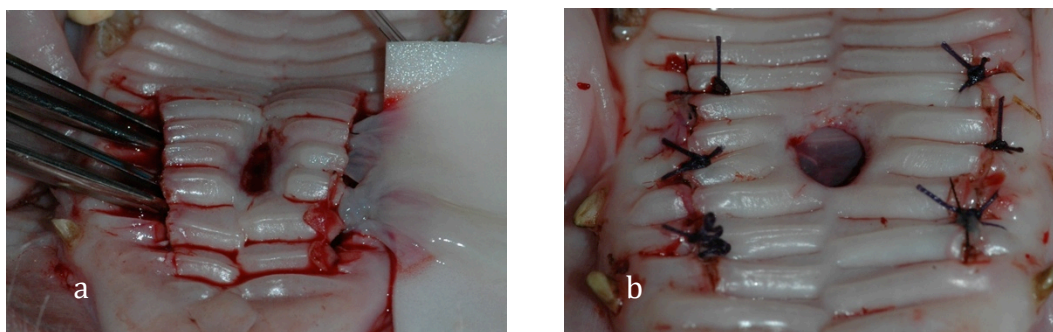
### 6.4.2. Defektdeckung

Nachdem die oronasalen Fisteln 14 Tage der Selbstheilung überlassen wurden, fand zwei Wochen nach der Defektsetzung die Deckung der Defekte statt. Die Schweine wurden hierzu erneut narkotisiert. Die Narkose fand analog zur Narkose bei der Erstoperation statt, ebenso die Lagerung und die verabreichte Schmerzprophylaxe.

Die Schnittführung erfolgte paramarginal links und rechts der oronasalen Fistel wie in der Brückenlappentechnik nach Langenbeck/Ernst/Veau beschrieben (Siewert 2006). Um die Deckungsmaterialien einbringen zu können, wurde das orale Blatt des Defektes mit dem Raspatorium subperiostal abgehoben und zwei Brückenlappen gebildet.

Gruppe I (allogenes Amnion) und Gruppe II (autofetales Amnion) wurden gleichermaßen mit 30 min präoperativ aufgetautem Amnion versorgt. Das Vorgehen war identisch, lediglich die Herkunft unterschied sich. In einem Vorversuch wurde festgestellt, dass die Stabilität bei mehrlagigem Amnion im Vergleich zu einlagigem erhöht ist (Kesting, Loeffelbein et al. 2010), weshalb 5 Schichten der 5x5 cm Amnionpatches übereinander gelegt und mit 6-0 Naht (*Ethilon, Ethicon, Norderstedt, Deutschland*) zu einem Multilayerpatch zusammengefügt wurden.

Jeweils einer der Multilayerpatches wurde dann unter den mobilisierten Lappen über den Defekt positioniert (Abb. 6a) und mit Einzelknopfnähten 4-0 Naht (*Vicryl, Ethicon, Norderstedt, Deutschland*) an beiden Seiten fixiert (Abb.6b).

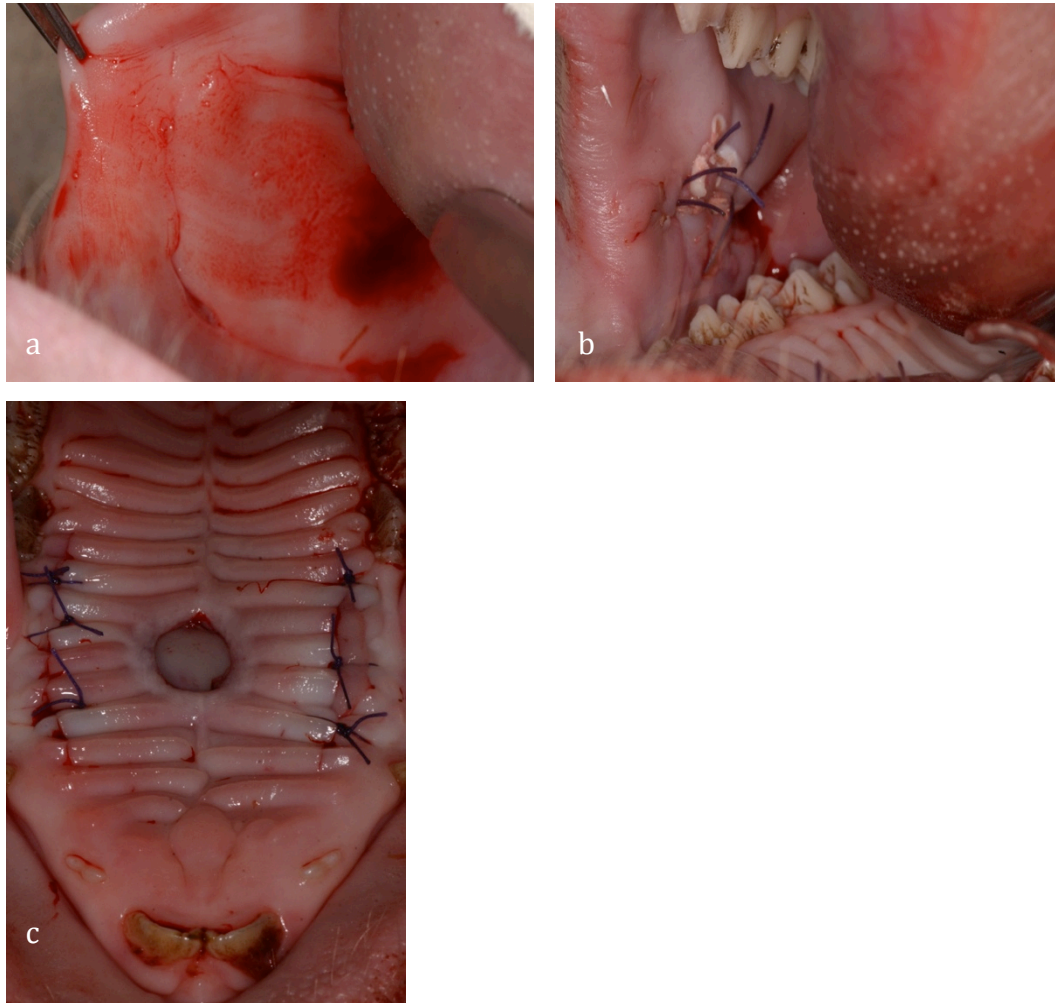


**Abbildung 6**

**Abb. 6a: Multilayer Amnion wird positioniert**

**Abb. 6b: Amnion ist über dem Defekt positioniert und fixiert**

In Gruppe III wurden 6 Tiere mit autologer Mundschleimhaut als Deckungsmaterial versorgt. Hierzu erfolgte eine spindelförmige Excision aus der Wangeninnenseite um das Transplantat zu gewinnen (Abb. 7a). Die Entnahmeregion wurde mit Einzelknopfnähten Vicryl 4 primär verschlossen (Abb. 7b). Anschließend wurde das Transplantat wie vorher bei der Amnionmebran beschrieben eingebracht und der Defekt verschlossen (Abb. 7c).



**Abbildung 7**

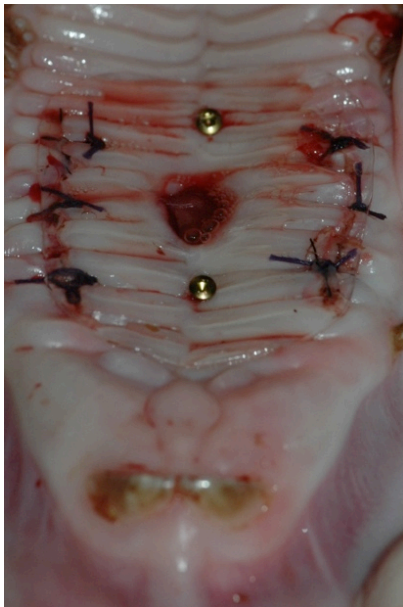
**Abb 7a: Markierung der Entnahmestelle auf der Wangeninnenseite**

**Abb 7b: Primärer Wundverschluss nach der Entnahme**

**Abb 7c: Defektdeckung mit autologer Mundschleimhaut**

Tiere der Gruppe IV wurden wie die vorhergehenden Gruppen operiert mit dem Unterschied, dass zur Defektdeckung die SIS diente.

Alle Tiere wurden nach der Operation zum Schutz der Wunden und zur Erleichterung der Nahrungsaufnahme mit den individuell gefertigten Verbandplatten versehen. Diese wurden mit 10mm langen Sinuslift- Schrauben fixiert. Die Verbandplatten wurden bis zum 10. postoperativen Tag eingesetzt. Die lateralen Wundränder, welche durch die Langenbeck/Ernst/Veau Brückenlappentechnik entstanden, granulierten frei zu (Abb. 8).



**Abbildung 8: Mit zwei Schrauben fixierte Verbandplatte am Ende der Operation**

### 6.4.3. Wundkontrollen

An den postoperativen Tagen 3, 7 und 10 wurden die Wunden kontrolliert, gesäubert und fotografiert (Tab.4). Dabei wurde der Entzündungsgrad anhand der Rötung des Gewebes subjektiv beobachtet und dokumentiert. Dies geschah unter Inhalationsnarkose, eingeleitet mit 5% und aufrechterhalten mit 1-2% Isofluran (*Isoba®*, Fa Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und 3-5l/min Sauerstoff. Als Prämedikation dienten 10mg/kg Körpergewicht Ketamin i.m. (*Ursotamin®*, Fa Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und 2mg/kg Körpergewicht Azaperon i.m. (*Stresnil®*, Fa Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland).

Beobachtungszeitraum gesamt 90 Tage	Angabe der postoperativen Tage nach Defektdeckung	
Tag 0		Iatrogene Defektsetzung
Tag 14		Defektdeckung
	POT 3	Wundkontrolle
	POT 7	Wundkontrolle
	POT 10	Wundkontrolle
Tag 90	POT 76	Euthanasie und Probeentnahme

**Tabelle 4: Übersicht Beobachtungszeitraum**

#### 6.4.4. Euthanasie und Probeentnahme

Am Tag der Euthanasie wurden die Tiere mit 10mg/kg Körpergewicht Ketamin i.m. (*Ursotamin®*, Fa Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und 2mg/kg Körpergewicht Azaperon i.m. (*Stresnil®*, Fa Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) sediert und im Anschluss mit 45mg/kg Körpergewicht Pentobarbita intravenös (*Release®*, Fa. WdT-Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland) eingeschläfert. Final wurde von jedem Tier eine weitere Wundkontrollen und Fotodokumentation angefertigt und die Kiefer auf eventuell vorhandene Restlöcher durch Sondieren mit einer Myrthenblattsonde vom Gaumen ausgehend untersucht.

Im Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians Universität München wurde in Zusammenarbeit mit den Pathologen der Kiefer im Block entnommen und in 4%-iger Formalinlösung gelagert.

#### 6.5. Histologie

Die Resektate wurden am pathologischen Institut der Ruhr-Universität Bochum in Paraffin eingebettet und 4µm dick geschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, die Schnittebene in den Bereich des Operationsgebietes zu legen. Alle Schnitte wurden einer

Hämatoxylin/ Eosin-Färbung (HE) zur Beurteilung der Zellinfiltration und Gewebsarchitektur sowie einer Elastica-van-Gieson-Färbung (EvG) zur Darstellung der elastischen Fasern und Untersuchung von eventuell vorhandenen Narbensträngen unterzogen. Die beiden Färbungen wurden am Institut für Pathologie der Technischen Universität München durchgeführt, mit dem Ziel den klinischen Ja/Nein Befund eventuell vorhandener Restlöcher zu spezifizieren.

## 6.6. Immunhistologie

Die Immunhistologischen Färbungen wurden im Labor der Abteilung für Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie des Klinikums Rechts der Isar in München angefertigt. Vier Färbungen kamen dabei zum Einsatz. Hierzu wurden die angefertigten Schnitte auf Superfrost Plus® Objektträger (*Fa. Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland*) gezogen und über Nacht zur Trocknung und Fixierung bei 48°C im Brutschrank (*Thermo Scientific Function Line, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland*) gelagert. Bei jeder Immunhistologischen Färbung wurde eine negativ-Kontrolle angefertigt, um beurteilen zu können, ob die Markierung der übrigen Schnitte erfolgreich war. Die Beurteilung erfolgte deskriptiv.

### 6.6.1. Laminin

Laminin ist ein kollagenähnliches Glykoprotein. Es befindet sich als Teil der extrazellulären Matrix in allen Basalmembranen (Timpl, Martin et al. 1978; Timpl, Rohde et al. 1979). Verschiedene Gewebe charakterisieren sich durch abweichende Eigenschaften der Basalmembranen. Es existieren unterschiedliche Formen des Laminins, die je nach Anforderungen des Gewebes an des entsprechende Epithel variieren (Aumailley, Bruckner-Tuderman et al. 2005). Basalmembranen stellen eine stabilisierende Schicht unter dem Epithel dar. Sie verhindern ein Auseinandergleiten der Epithelzellen und dienen als Leitschiene für Zellmigrationen. Die Färbung wurde ausgewählt, um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Transplantatmaterialien eine Ausbildung der Basalmembran ermöglichen und somit eine adäquate Epithelialisierung zulassen. Die Färbung wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen Laminin zur Beurteilung der Epithelialisierung und Neubildung der Basalmembran angefertigt. Es wurde das *Polyclonal Rabbit*

*Anti-Laminin, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark* herangezogen. Folgendes Protokoll wurde dabei angewendet:

Entparaffinierung	2x Xylol (je 10 min) 1x Xylol/ Ethanol (10min)
Rehydrierung	Absteigende Ethanolreihe je 2 min: 2x100%, 1x 96%, 1x80%, 1x70%, 1x50% Spülung in bi-distilliertem Wasser (1min)
Antigen Demaskierung	Aufbringen Proteinase K ( <i>Fa. Dako, Glostrup, Dänemark</i> ) 5 min
Spülung	1x in PBS- Puffer pH 7,4 (1 min)
Endogene Peroxidase- Blockierung	Inkubation der Proben in 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Aqua bidest (30 min)
Spülschritt	Aqua bidest (1min) Spülung in PBS- Puffer pH7,4 (1min)
Trocknung	Aufnehmen der Flüssigkeit mit Filterpapier
Blockierung	5%ige Blocking-Reagenz (Magermilchpulver gelöst in PBS-Puffer) (30min)
Trocknung	Aufnehmen der Reagenz mit Filterpapier
1. Antikörper	Applikation des ersten Antikörpers in der Konzentration 1:50 ( <i>Polyklonal Rabbit Anti-Laminin, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark</i> ) gelöst in einer 2% BSA Pufferlösung (30min)
Spülung	Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (3x5min)
Trocknung	Filterpapier
2. Antikörper	Applikation des zweiten Antikörpers in der Konzentration 1:200 ( <i>biotinylated anti-rabbit IgG, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) gelöst in 2% BSA-Puffer

	(45min)
Spülung	Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (3x5min)
Avidin- Biotin- Komplex	Auftragen der Streptavidin-Peroxidase-Lösung ( <i>Vectastain ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) (45min)
Spülung	Spülung in PBS- Puffer pH 7,4 (3x5min)
Chromatogenes DAB	Applikation DAB (3min)
Spülung	Aqua bidest (1min)
Gegenfärbung	Hämalaun ( <i>Mayer's hematoxylin, Fa. Bio Optice, Mailand, Italien</i> ) (3sek)
Bläuen	Unter fließendem Leitungswasser (10min)
Spülung	Aqua bidest (1min)
Dehydrierung	Aufsteigende Ethanolreihe (je 2min) 1x50%, 1x70%, 1x 80%, 1x96%, 2x100%) 1xXylol/ Ethanol (5min) 2xXylol (je 5min)
Eindeckeln	Eindeckeln der Schnitte mit DPX ( <i>Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland</i> )

**Tabelle 5: Protokoll Lamininfärbung**

### 6.6.2. Actin

Die Färbung detektiert das  $\alpha$ -Smooth-Muscle Actin, welches Bestandteil des glattmuskulären Actin-Myosin Komplexes von Myofibroblasten ist. Das sind modulierte Fibroblasten mit der Fähigkeit zur Kontraktion. Ihre Bildung wird während der Wundheilung von aktivierten Makrophagen induziert. Sie regen die Fibroblasten zur Modifikation an. Die entstandenen Myofibroblasten sind dann durch den Actin-Myosin Komplex für Wundkontraktionen und Narbenbildungen im Rahmen der Heilungsphase verantwortlich (Meister 1998). Der Marker wurde ausgewählt um das Auftreten von Wundkontraktionen und Narben beurteilen und zwischen den Gruppen vergleichen zu können. Folgendes Protokoll wurde hierzu angewendet:



Entparaffinierung	2x Xylol (je 10 min) 1x Xylol/ Ethanol (10min)
Rehydrierung	Absteigende Ethanolreihe je 2 min: 2x100%, 1x 96%, 1x80%, 1x70%, 1x50% Spülung in bi-distilliertem Wasser (1min)
Antigen Demaskierung	Aufbringen Proteinase K ( <i>Fa. Dako, Glostrup, Dänemark</i> ) 5 min
Spülung	1x in PBS- Puffer pH 7,4 (1 min)
Endogene Peroxidase- Blockierung	Inkubation der Proben in 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Aqua bidest (10 min)
Spülschritt	Aqua bidest (1min) Spülung in PBS- Puffer pH7,4 (1min)
Trocknung	Aufnehmen der Flüssigkeit mit Filterpapier
Blockierung	3%ige Blocking-Reagenz, Ziegenserum in PBS gelöst ( <i>normal goat serum S-1000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) (30min)
Trocknung	Aufnehmen der Reagenz mit Filterpapier
1. Antikörper	Applikation des ersten Antikörpers in der Konzentration 1:80 ( <i>mouse monoclonal to alpha smooth muscle actin, Fa. Abcam, Cambridge, United Kingdom</i> ) gelöst in PBS- Puffer pH 7,4 (1 Stunde bei Raumtemperatur)
Spülung	Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (3x5min)
Trocknung	Filterpapier
2. Antikörper	Applikation des zweiten Antikörpers in der Konzentration 1:200 in PBS gelöst ( <i>biotinylated antimouse IgG, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) (45 min)

Spülung	Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (3x5min)
Avidin- Biotin- Komplex	Auftragen der Streptavidin-Peroxidase-Lösung ( <i>Vectastain ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) (45min)
Spülung	Spülung in PBS- Puffer pH 7,4 (3x5min)
Chromatogenes DAB	Applikation DAB (3min)
Spülung	Aqua bidest (1min)
Gegenfärbung	Hämalaun ( <i>Mayer's hematoxylin, Fa. Bio Optice, Mailand, Italien</i> ) (3sek)
Bläuen	Unter fließendem Leitungswasser (10min)
Spülung	Aqua bidest (1min)
Dehydrierung	Aufsteigende Ethanolreihe (je 2min) 1x50%, 1x70%, 1x 80%, 1x96%, 2x100%) 1xXylol/ Ethanol (5min) 2xXylol (je 5min)
Eindeckeln	Eindeckeln der Schnitte mit DPX ( <i>Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland</i> )

**Tabelle 6: Protokoll Actinfärbung**

### 6.6.3. Ki-67

Der Marker Ki-67 gibt Auskunft über die Proliferation des Epithels. Das Protein Ki-67 ist während des Zellzyklus in der Interphase und zum Zeitpunkt der Mitose nachweisbar allerdings nicht in der Ruhephase gebildeter Zellen (Scholzen und Gerdes 2000). Es ein geeigneter Marker um eine Proliferation von Zellen zu beobachten, da es Wachstumsphasen kennzeichnet. Die Immunhistologie wurde anhand des Antikörpers *monoclonal mouse anti-human Ki-67 antigen* (*Fa. Dako, Glostrup, Dänemark*) gefärbt. Folgendes Protokoll wurde dazu verwendet:

Entparaffinierung	2x Xylol (je 10 min) 1x Xylol/ Ethanol (10min)
Rehydrierung	Absteigende Ethanolreihe je 2 min: 2x100%, 1x 96%, 1x80%, 1x70%, 1x50% Spülung in bi-distilliertem Wasser (1min)
Antigen Demaskierung	Aufbringen Proteinase K ( <i>Fa. Dako, Glostrup, Dänemark</i> ) 5 min
Spülung	1x in PBS- Puffer pH 7,4 (1 min)
Endogene Peroxidase- Blockierung	Inkubation der Proben in 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Aqua bidest (30 min)
Spülschritt	Aqua bidest (1min) Spülung in PBS- Puffer pH7,4 (1min)
Trocknung	Aufnehmen der Flüssigkeit mit Filterpapier
Blockierung	5%ige Blocking-Reagenz, Ziegen Serum in PBS gelöst ( <i>normal goat serum S-1000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) (30min)
Trocknung	Aufnehmen der Reagenz mit Filterpapier
1. Antikörper	Applikation des ersten Antikörpers in der Konzentration 1:50 ( <i>monoclonal mouse anti-human Ki67-antigen, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark</i> ) gelöst in PBS pH 7,4 (1 Stunde bei Raumtemperatur)
Spülung	Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (3x5min)
Trocknung	Filterpapier
2. Antikörper	Applikation des zweiten Antikörpers in der Konzentration 1:200 ( <i>biotinylated anti-mouse IgG, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) gelöst in PBS (45min)
Spülung	Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (3x5min)
Avidin- Biotin- Komplex	Auftragen der Streptavidin-Peroxidase-

	Lösung ( <i>Vectastain ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) (45min)
Spülung	Spülung in PBS- Puffer pH 7,4 (3x5min)
Chromatogenes DAB	Applikation DAB (3min)
Spülung	Aqua bidest (1min)
Gegenfärbung	Hämalaun ( <i>Mayer's hematoxylin, Fa. Bio Optice, Mailand, Italien</i> ) (3sek)
Bläuen	Unter fließendem Leitungswasser (10min)
Spülung	Aqua bidest (1min)
Dehydrierung	Aufsteigende Ethanolreihe (je 2min) 1x50%, 1x70%, 1x 80%, 1x96%, 2x100%) 1xXylol/ Ethanol (5min) 2xXylol (je 5min)
Eindeckeln	Eindeckeln der Schnitte mit DPX ( <i>Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland</i> )

**Tab. 7: Protokoll Ki-67- Färbung**

#### **6.6.4. Von-Willebrand-Faktor**

Der Von-Willebrand-Faktor ist ein Marker zur Beurteilung der Angiogenese. Insbesondere bei Wundheilungsvorgängen ist diese von großer Bedeutung. Durch das Einwandern neuer Gefäße wird unter anderem die Gewebeneubildung verbessert und der Abtransport von Abfallprodukten gefördert. Die Literaturrecherche ergibt kontroverse Meinungen über die angiogenetische Wirkung der Amnionmembran. Manche Autoren sprechen von Angiogenese begünstigenden Eigenschaften (Bennett, Matthews et al. 1980; Güler, Ercan et al. 1997), andere aufgrund der avaskulären Struktur der Amnionmembran von einer hemmenden Wirkung (Burgos 1986). Der Marker wurde gewählt, um eine eigene Beurteilung dieser Fragestellung verfassen zu können. Folgendes Protokoll wurde hierzu verwendet:

Entparaffinierung	2x Xylol (je 10 min) 1x Xylol/ Ethanol (10min)
Rehydrierung	Absteigende Ethanolreihe je 2 min: 2x100%, 1x 96%, 1x80%, 1x70%, 1x50% Spülung in bi-distilliertem Wasser (1min)
Antigen Demaskierung	Aufbringen Proteinase K ( <i>Fa. Dako, Glostrup, Dänemark</i> ) 5 min
Spülung	1x in PBS- Puffer pH 7,4 (1 min)
Endogene Peroxidase- Blockierung	Inkubation der Proben in 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Aqua bidest (10 min)
Spülschritt	Aqua bidest (1min) Spülung in PBS- Puffer pH7,4 (1min)
Trocknung	Aufnehmen der Flüssigkeit mit Filterpapier
Blockierung	3%ige Blocking-Reagenz, Ziegen Serum in PBS gelöst ( <i>normal goat serum S-1000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) (30min)
Trocknung	Aufnehmen der Reagenz mit Filterpapier
1. Antikörper	Applikation des ersten Antikörpers in der Konzentration 1:200 ( <i>polyclonal rabbit anti-human von Willebrand factor, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark</i> ) gelöst in PBS pH 7,4 (1 Stunde bei Raumtemperatur)
Spülung	Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (3x5min)
Trocknung	Filterpapier
2. Antikörper	Applikation des zweiten Antikörpers in der Konzentration 1:200 ( <i>biotinylated anti-rabbit IgG, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA</i> ) gelöst in PBS (45min)
Spülung	Spülung in PBS-Puffer pH 7,4 (3x5min)
Avidin- Biotin- Komplex	Auftragen der Streptavidin-Peroxidase-Lösung ( <i>Vectastain ABC Kit, Peroxidase</i> )

	<i>Standard PK-4000, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA) (45min)</i>
Spülung	Spülung in PBS- Puffer pH 7,4 (3x5min)
Chromatogenes DAB	Applikation DAB (3min)
Spülung	Aqua bidest (1min)
Gegenfärbung	Hämalaun ( <i>Mayer's hematoxylin, Fa. Bio Optice, Mailand, Italien) (3sek)</i>
Bläuen	Unter fließendem Leitungswasser (10min)
Spülung	Aqua bidest (1min)
Dehydrierung	Aufsteigende Ethanolreihe (je 2min) 1x50%, 1x70%, 1x 80%, 1x96%, 2x100%) 1xXylol/ Ethanol (5min) 2xXylol (je 5min)
Eindeckeln	Eindeckeln der Schnitte mit DPX ( <i>Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland)</i>

**Tab. 8: Protokoll Von-Willebrand-Faktor-Färbung**

## 6.7. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der histologischen Ergebnisse wurden relative und absolute Häufigkeiten angegeben und verglichen. Der exact  $\chi^2$ -Test und der Fisher-exact-test wurden mit dem Programm SPSS Statistics durchgeführt, um die vier Versuchsgruppen bezüglich vorhandener ossärer Defekte in den histologischen Präparaten zu vergleichen, wobei ein p-Wert unter 10% als signifikant festgelegt wurde.

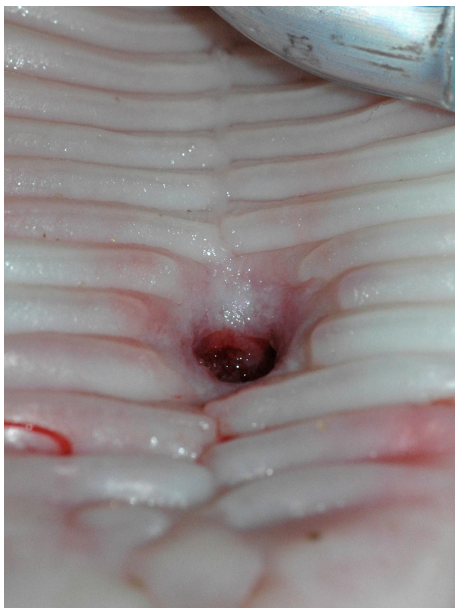
## 7. Ergebnisse

Alle Versuchstiere zeigten sich während des Versuchs bei guter Gesundheit und wurden ständig durch Veterinäre, Tierpfleger und das humanmedizinische Team des Projektes beaufsichtigt. Sie zeigten alle ein im Vergleich zu ihren Geschwistern, die nicht Teil der Versuchsreihe waren, normales Wachstum und eine ähnlich stetige Gewichtszunahme. In Bezug auf Nahrungsaufnahme und Sozialverhalten stellten sich alle Tiere als unauffällig dar.

### 7.1. Klinische Auswertung

#### 7.1.1. Oronasale Fisteln

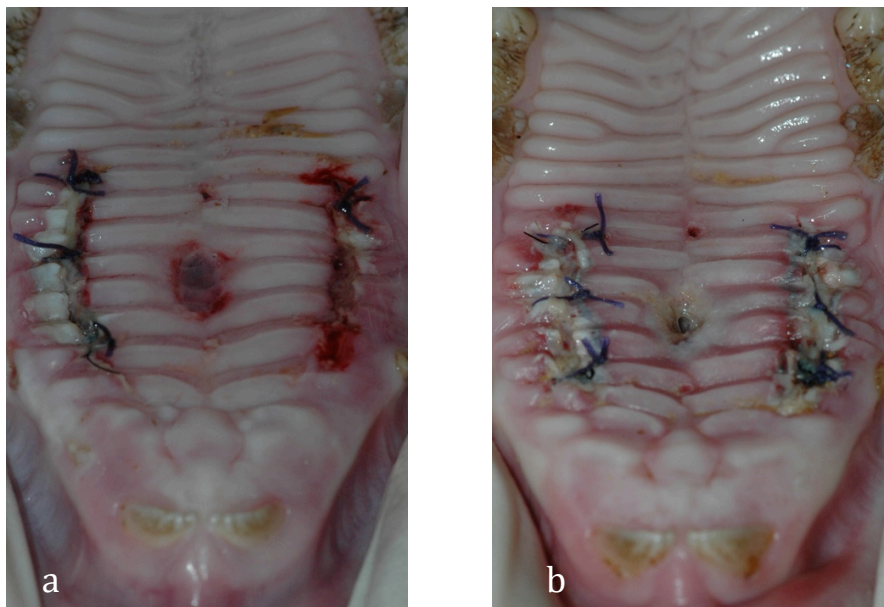
Alle Tiere zeigten zwei Wochen nach der iatrogenen Defektsetzung epithelialisierte oronasale Fisteln zwischen 7 und 10 mm Durchmesser. Die zweiwöchige Heilungsphase verlief bei allen Tieren ohne Komplikationen und die oronasalen Fisteln zeigten keine Schrumpfungstendenzen mehr.



**Abbildung 9: Defekt nach zweiwöchiger Selbstheilungsphase mit epithelialisierten Wundrändern**

### 7.1.2. Klinische Beurteilung Versuchsgruppe I - autofetales Amnion

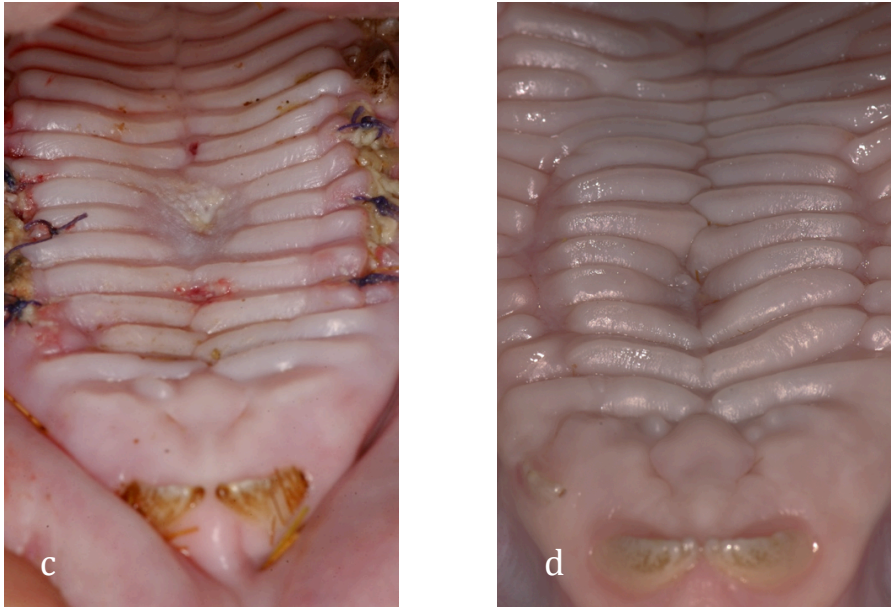
Am 3. postoperativen Tag nach Defektdeckung (Abb. 10a) wurden die Verbandplatten erstmalig entfernt und die Kiefer von unter den Platten befindlichen Speiseresten gereinigt. Bei allen Tieren war die Amnionmembran noch als solche zu erkennen. Die frei granulierenden lateralen Wundränder der Brückenlappen waren mit Fibrin belegt. Die Wundheilung stellte sich regelrecht dar, über das normale Maß der exudativen Phase hinausreichende Entzündungsreaktionen wurden nicht festgestellt. Am 7. postoperativen Tag (Abb. 10b) war bei allen Defekten eine Verkleinerung zwischen 1-4 mm zu erkennen. Die Amnionmembran war nicht mehr deutlich vom umgebenden Gewebe abzugrenzen. Am 10. postoperativen Tag (Abb. 10c) hatten sich fünf der Defekte weiter verkleinert. Der sechste Defekt war bereits komplett verschlossen und epithelialisiert. Am Tag der Euthanasie (Abb. 10d) konnte bei keinem der Tiere inspektorisch eine oronasale Fistel nachgewiesen werden. Die Gaumenschleimhäute waren entzündungsfrei und epithelialisiert.



**Abbildung 10**

- a) Postoperativer Tag 3, Tier 1: zentraler Defekt bedeckt mit Amnionmembran**
- b) Postoperativer Tag 7, Tier 3: Annähern der Wundränder, Verkleinerung des Defekts**





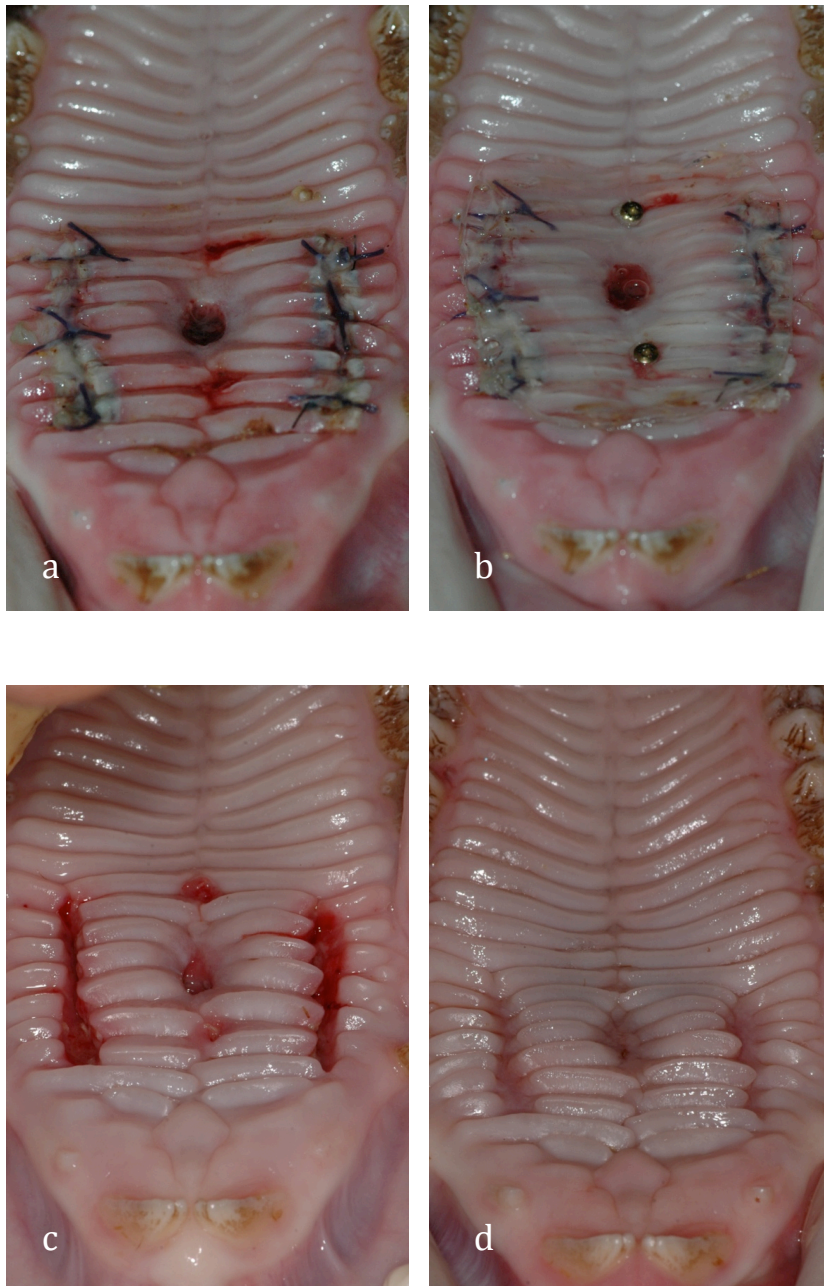
**Abbildung 10**

- c) Postoperativer Tag 10, Tier 5: entzündungsfreie Region der mit Amnion operierten Fistel  
 d) Postoperativer Tag 76, Tier 1: entzündungsfreie Gaumenschleimhaut ohne oronasale Fistel

### 7.1.3. Klinische Beurteilung Versuchsgruppe II - allogenes Amnion

Am 3. postoperativen Tag war bei allen Tieren ein dem Zeitpunkt der Wundheilung entsprechender Defekt zu sehen. Wie auch bei Versuchsgruppe 1 wiesen alle Fälle eine sichtbar intakte Amnionmembran über den jeweiligen Defekten auf. Am 7. postoperativen Tag zeigten alle Defekte deutliche Verkleinerungen zwischen 2-7mm. Am 10. Tag nach der Defektdeckung waren drei der sechs Fisteln nicht mehr sichtbar. Am letzten Untersuchungszeitpunkt, dem 76. postoperativen Tag waren alle oronasalen Fisteln geschlossen verheilt und entzündungsfrei.

Die folgende Abbildung 11a-d stellt den Verlauf des Tieres 10 POT 3-76 dar.

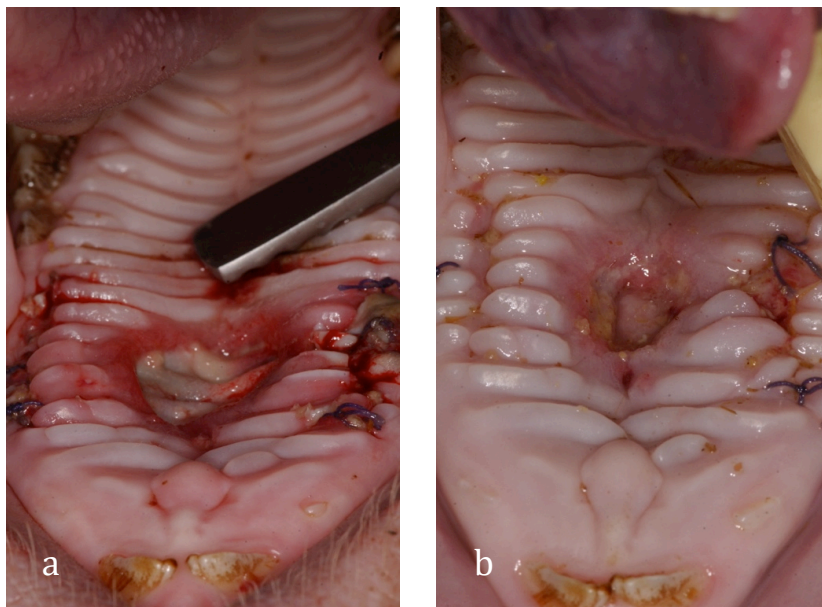


**Abbildung 11**

- a) Postoperativer Tag 3, Tier 10: zentraler Defekt mit Amnion bedeckt
- b) Postoperativer Tag 7, Tier 10: Foto mit Verbandplatte
- c) Postoperativer Tag 10, Tier 10: nach Nahtentfernung
- d) Postoperativer Tag 76, Tier 10: entzündungsfreie Gaumenschleimhaut ohne oronasale Fistel

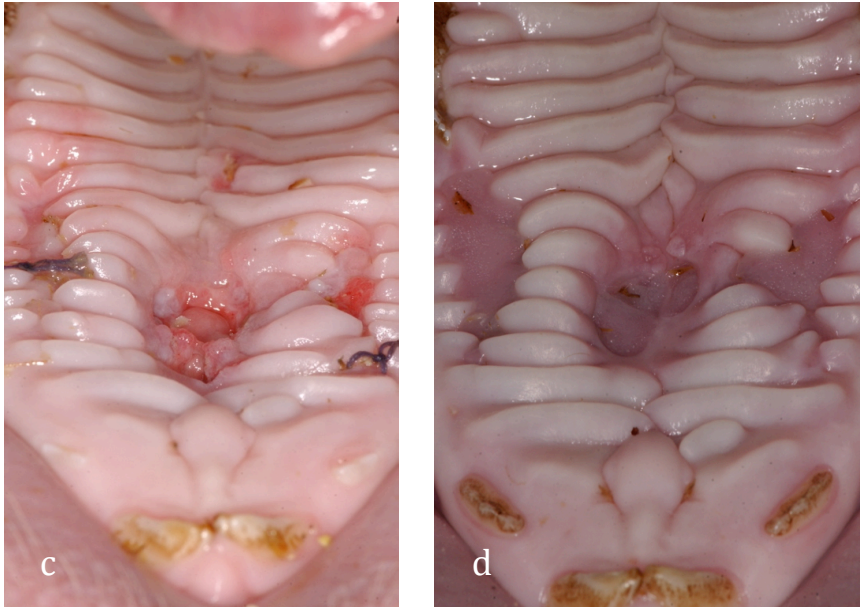
#### 7.1.4. Klinische Beurteilung Versuchsgruppe III – Mundschleimhaut

In der Versuchsgruppe III war auffällig, dass der Verschluss zunächst sehr stabil schien. Am postoperativen Tag 3 stellten sich die Defekte bei allen Tieren durch die Mundschleimhaut gut bedeckt dar. Auch am Tag 7 war dies der Fall, allerdings konnte man hier bei vier der sechs Tiere größere Entzündungszeichen feststellen als bei den anderen Versuchsgruppen. Die Wunden stellten sich stärker gerötet und geschwollen dar. Ein ähnliches Bild ergab sich bei diesen Tieren am Tag 10. Die Morphologie der Gaumenschleimhaut war stärker beeinträchtigt als bei den anderen Gruppen und es gab vermehrte klinische Zeichen einer Entzündung. Fünf der sechs Tiere hatten am 76. Tag dennoch eine verheilte Gaumenschleimhaut ohne Hinweis auf eine oronasale Fistel, allerdings mit größeren morphologischen Veränderungen der Gaumenschleimhaut bei drei von sechs Versuchstieren. Es zeichneten sich deutliche Narbenbildungen ab (Abb. 12). Bei zweien war die Morphologie vergleichbar mit den Versuchstieren der anderen Gruppen. Das sechste Tier der Gruppe entwickelte zwischen dem 10. und 76. eine oronasale Fistel mit dem Durchmesser von 5mm, die sich am Tag der Finalisierung ohne Tendenz der Verschlussheilung darstellte (Abb. 13).



**Abbildung 12**

- a) Postoperativer Tag 3, Tier 14: starke Rötung, zentraler mit autologer Mundschleimhaut bedeckter Defekt
- b) Postoperativer Tag 7, Tier 14: geringere Rötung, zentraler Defekt vollständig bedeckt



**Abbildung 12**

- c) Postoperativer Tag 10, Tier 14: bedeckter zentraler Defekt, auffällige morphologische Veränderungen
- d) Postoperativer Tag 76, Tier 14: Mundschleimhaut ohne oronasale Fistel, allerdings mit veränderter Morphologie der Gaumenschleimhaut

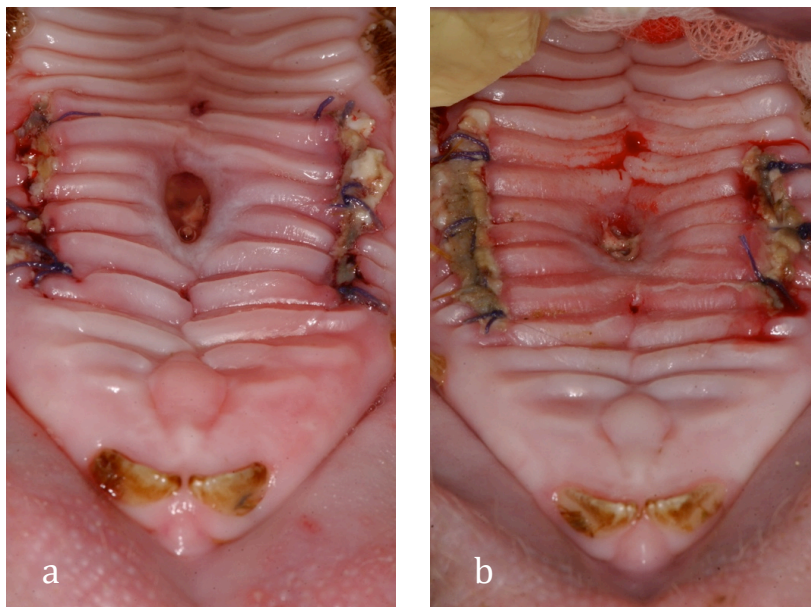


**Abbildung 13: Postoperativer Tag 76, Tier 13, oronasale Fistel mit dem Durchmesser 5mm**



### 7.1.5. Klinische Beurteilung Versuchsgruppe IV – SIS

Alle Tiere wiesen am 3. postoperativen Tag mit SIS bedeckte Defekte auf (Abb. 14a). Am 7. Tag war die SIS klinisch nicht mehr eindeutig von dem umliegenden Gewebe zu unterscheiden (Abb. 14b). Alle Defekte hatten sich um 1-4 mm verkleinert. Am 10. postoperativen Tag stellten sich fünf der sechs Tiere mit weiter verkleinerter oronasaler Fistel (weitere 1-3mm) dar (Abb. 14c) und ein Tier mit bereits verschlossenem Defekt. An den Tagen 3, 7, 10 konnten keine über das Maß der normalen Wundheilungsvorgänge hinausreichenden entzündlichen Veränderungen festgestellt werden. Am 76. postoperativen Tag stellten sich fünf der sechs Defekte verschlossen dar, die Gaumenschleimhaut der Tiere war entzündungsfrei (Abb. 14d). Bei einem Tier hatte sich der Defekt deutlich verkleinert, es bestand allerdings der Verdacht auf eine oronasale Fistel. Inspektorisch war nicht sicher zu bestimmen, ob es sich um einen Defekt oder eine Schleimhautfalte handelt. Die Histologie bestätigte später die Verbindung zwischen Mund- und Nasenhöhle.



**Abbildung 14**

- a) Postoperativer Tag 3, Tier 20: zentraler Defekt, mit SIS bedeckt, keine übermäßige Rötung
- b) Postoperativer Tag 7, Tier 21: verkleinerter zentraler Defekt, Annäherung der Wundränder



**Abbildung 14**

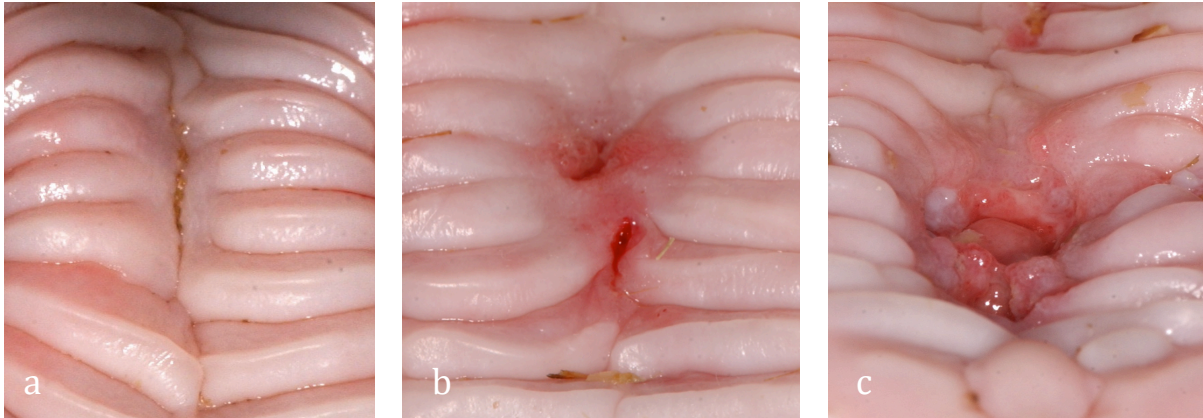
- c) Postoperativer Tag 10, Tier 21: deutliche Verkleinerung des Defekts**
- d) Postoperativer Tag 76, Tier 21: vollständig geschlossener Defekt mit entzündungsfreier Gaumenschleimhaut**

### **7.1.6. Wundheilungsverlauf der vier Versuchsgruppen im Vergleich**

Der Wundheilungsverlauf wurde subjektiv durch Beobachtung des Rötungsgrades der Gaumenschleimhaut im Bereich der Defektdeckung im Vergleich zur umgebenden gesunden Mundschleimhaut festgehalten. Dies geschah an den postoperativen Tagen 3, 7, 10 und 76, dem Tag der Euthanasie.

Folgende Skalierung zur Dokumentation des Rötungsgrades wurde gewählt:

- 0 = keine Rötung
- 1 = geringgradige Rötung
- 2 = hochgradige Rötung
- D = Durchschnittswert der jeweiligen Versuchsgruppe für den jeweiligen Beobachtungstag
- POT = Postoperativer Tag



**Abbildung 15: Beispiele der Grade 0-2 anhand 3 verschiedener Bewertungen am POT 10**

**Abb. 15a: Grad 0, am Beispiel Tier 20, POT 10**

**Abb. 15b: Grad 1, am Beispiel Tier 21, POT 10**

**Abb. 15c: Grad 2, am Beispiel Tier 14, POT 10**

Die folgenden Tabellen zeigen die Werte der jeweiligen Tage und einen Durchschnittswert der Versuchsgruppen zum jeweiligen Zeitpunkt.

	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6	D
POT 3	1	1	1	2	1	1	1,16
POT 7	1	2	1	2	2	2	1,66
POT 10	0	1	0	1	0	0	0,33
POT 76	0	0	0	0	0	0	0

**Tab. 9: Versuchsgruppe I - autofetal**

	Tier 7	Tier 8	Tier 9	Tier 10	Tier 11	Tier 12	D
POT 3	1	1	1	1	1	1	1
POT 7	2	1	1	2	2	1	1,5
POT 10	1	0	0	0	0	0	0,17
POT 76	0	0	0	0	0	0	0

**Tab. 10: Versuchsgruppe II - allogene**

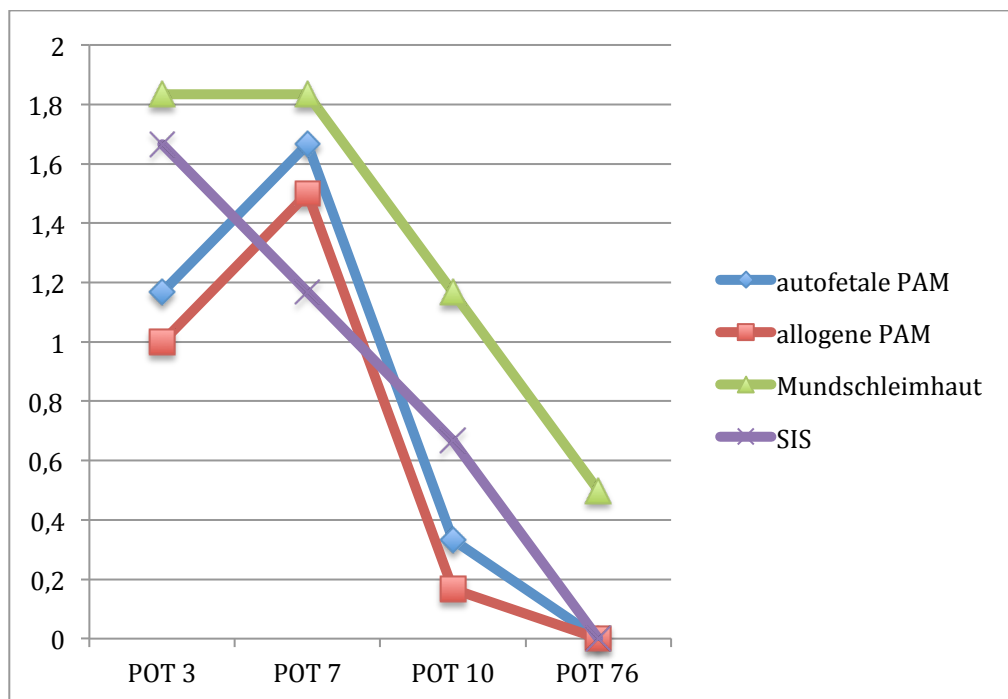
	Tier 13	Tier 14	Tier 15	Tier 16	Tier 17	Tier 18	D
POT 3	2	2	2	2	2	1	1,83
POT 7	2	2	2	2	2	1	1,83
POT 10	1	2	1	1	1	1	1,67
POT 76	2	1	0	0	0	0	0,5

**Tab. 11: Versuchsgruppe III – Mundschleimhaut**

	Tier 19	Tier 20	Tier 21	Tier 22	Tier 23	Tier 24	D
POT 3	2	1	2	2	2	1	1,67
POT 7	2	1	1	1	1	1	1,17
POT 10	1	0	1	1	1	0	0,67
POT 76	0	0	0	0	0	0	0

**Tab. 12: Versuchsgruppe IV – SIS**

Die ermittelten Durchschnittswerte der Gruppen werden zum Vergleich im folgender Abbildung dargestellt.



**Abbildung 16: Vergleich Wundheilungsverlauf Gruppe I-IV nach Rekonstruktion des Gaumendefekts**

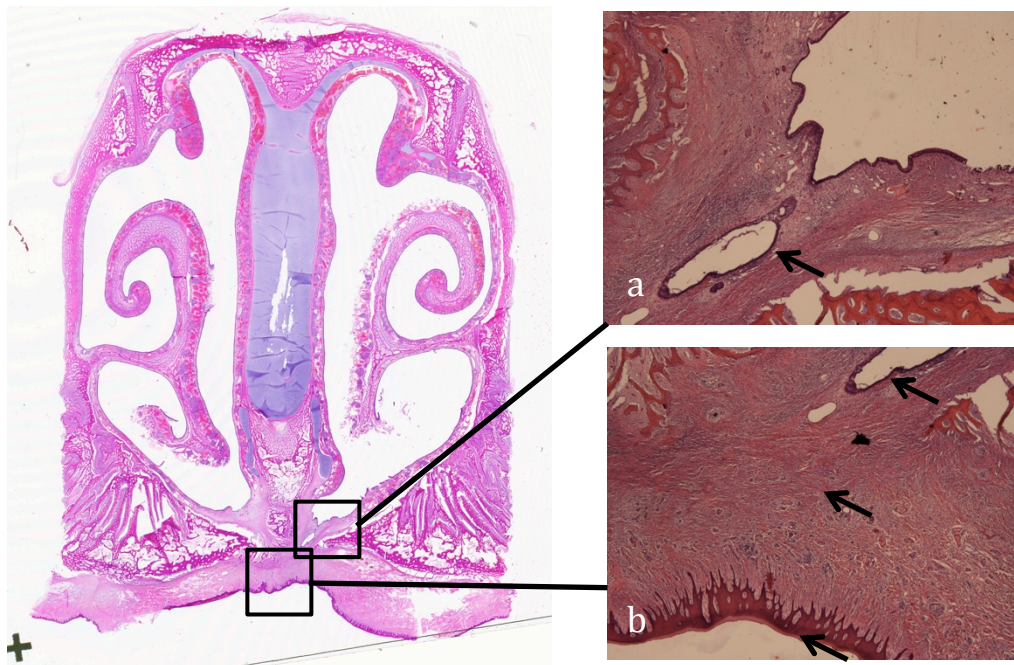


## 7.2. Histologische Beurteilung der Defektheilung

Die histologische Untersuchung gibt nach der klinischen Begutachtung der Defektheilung Aufschluss darüber, wie sich die Situation am 76. Tag nach Defektdeckung auf zellulärer Ebene darstellt. Hierzu wurden verschiedene Färbungen durchgeführt. In der HE und EvG Färbung wurde geprüft, ob und wie weit Gewebeschädigungen vorliegen. Außerdem wurde das Gewebe auf entzündliche Veränderungen und Fibrosen untersucht, deren Auftreten mit in die Bewertung des Wundheilungsvorganges einfließen. Da am Tag der Euthanasie bei dreiundzwanzig von vierundzwanzig Tieren klinisch ein geschlossener Defekt vorlag, ist es Ziel der histologischen Untersuchung den Befund einer vorhandenen oronasalen Fistel oder eines geschlossenen Gaumendaches zu spezifizieren und auch Eigenschaften des Gewebes zu erkennen, die auf verschiedene Qualitäten der Wundheilung schließen lassen. Als Idealfall der Ausheilung wurde ein entzündungsfreies Gewebe mit sekundärer Knochenheilung im Bereich der iatrogen erzeugten oronasalen Fistel festgelegt. Von kaudal nach kranial wurde besonders auf die Ausbildung folgender Strukturen geachtet: Plattenepithel, knöcherner harter Gaumen, geschlossene Nasenhöhlen ausgekleidet mit einem Flimmerepithel. Um diese Strukturen bewerten zu können, wurde das eventuelle Vorhandensein von Gewebdefekten in vier Grade unterteilt. Das Auftreten von kompletten oronasalen Fisteln oder Fistelgangabschnitten auf Höhe des Knochendefektes mit Unterbrechung der knöchernen Strukturen in der Schnittebene wurde hierbei als schlechtester Ausheilungszustand bewertet. Gefolgt von internen Gewebdefekten bzw. Resten des Fistelganges, die zwar geschlossene Epithelien gaumen- und nasenwärts, allerdings keine intakte Verknöcherung aufwiesen. Verbliebene Reste von Fistelgängen im Weichgewebe mit intakter Verknöcherung stellen den nächsten Grad der Ausheilung dar. Ein intaktes Gewebe ohne Fistelgangresiduen stellt den besten Zustand der Ausheilung dar. Beurteilt wurden pro Tier und Defekt immer zwei Messbereiche, nämlich einmal der Übergang zur rechten und einmal zur linken Nasenhöhle. Ein medianer Defekt wurde als beidseitiger Defekt gewertet. Denn bei der iatrogenen Defektsetzung wurde durch das Präparieren und Abtragen des Nasenseptums eine oronasale Fistel zu jeder der beiden Nasenhöhlen erzeugt. In der folgenden histologischen Analyse wird deshalb die Zahl der Defekte zur Beschreibung auf zwei Defekte pro Tier erhöht, insgesamt zwölf pro Gruppe.

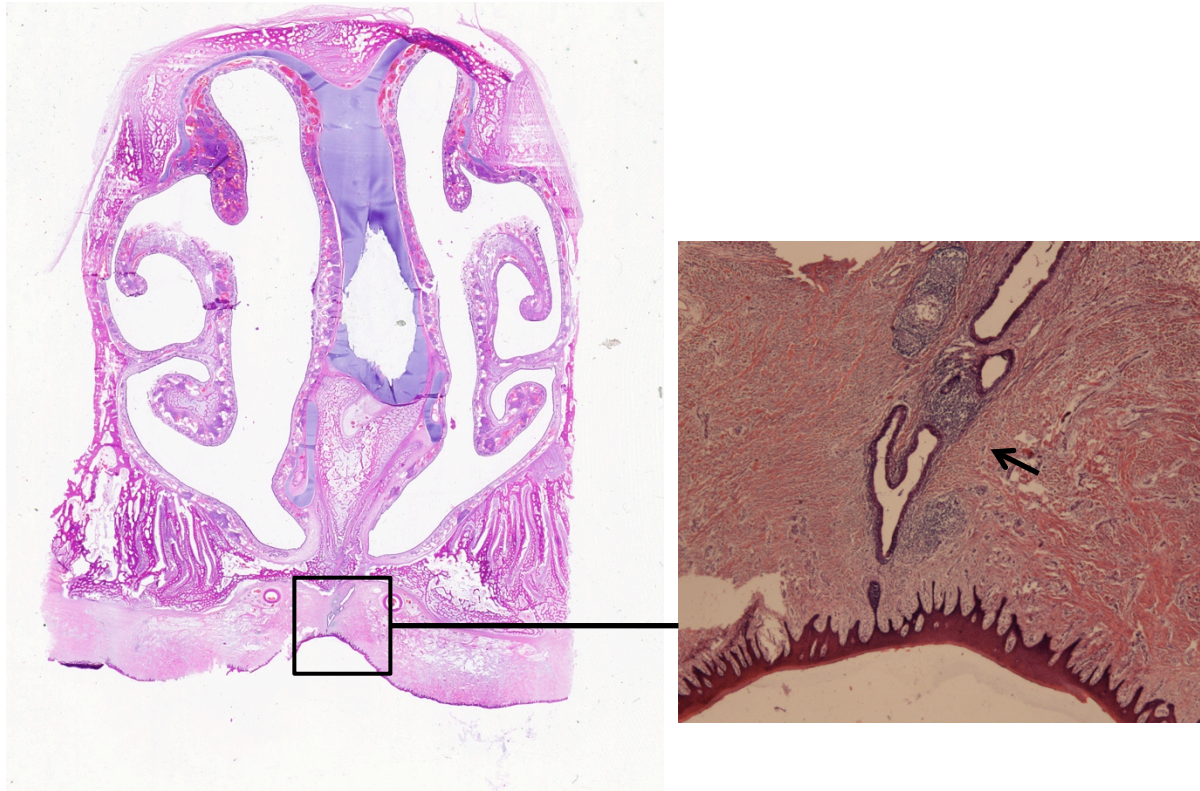
### 7.2.1. Histologische Beurteilung der Versuchsgruppe I – autofetales Amnion

Neun der zwölf untersuchten Bereiche weisen keinen Fistelgang oder Fistelgangreste auf. In einem Fall sind Fistelgangreste neben intaktem Knochen zu finden (Abb. 17). Zwei Fälle weisen Fistelganganteile auf Höhe der palatinalen Knochenanlage mit Unterbrechung der knöchernen Strukturen auf. Sie sind umgeben von einer chronischen Entzündung (Abb. 18). Die Fistelgangresiduen in dieser Versuchsgruppe sind ausschließlich mit respiratorischem Epithel ausgekleidet. Fibrosen wurden bei sechs der zwölf untersuchten Präparate gefunden. Das zur Mundhöhle gerichtete Plattenepithel stellt sich in allen Präparaten verschlossen dar.



**Abbildung 16: HE Präparat Tier 2 in Übersicht und zwei Vergrößerungen (50fache Vergrößerung). Die Übersicht soll die Lokalisation der beiden Vergrößerungen a) und b) verdeutlichen.**

- a) Zu sehen ist ein mit respiratorischem Epithel ausgekleideter Fistelgangrest (Pfeil). Weiter kranial ist der Nasenhöhlenboden zu erkennen. Er ist ebenfalls mit respiratorischem Epithel ausgekleidet.
- b) Der obere Pfeil zeigt ebenfalls auf den Fistelgangrest. Kaudal davon ist eine intakte palatinale Knochenanlage und ein zur Mundhöhle geschlossenes Plattenepithel zu sehen.

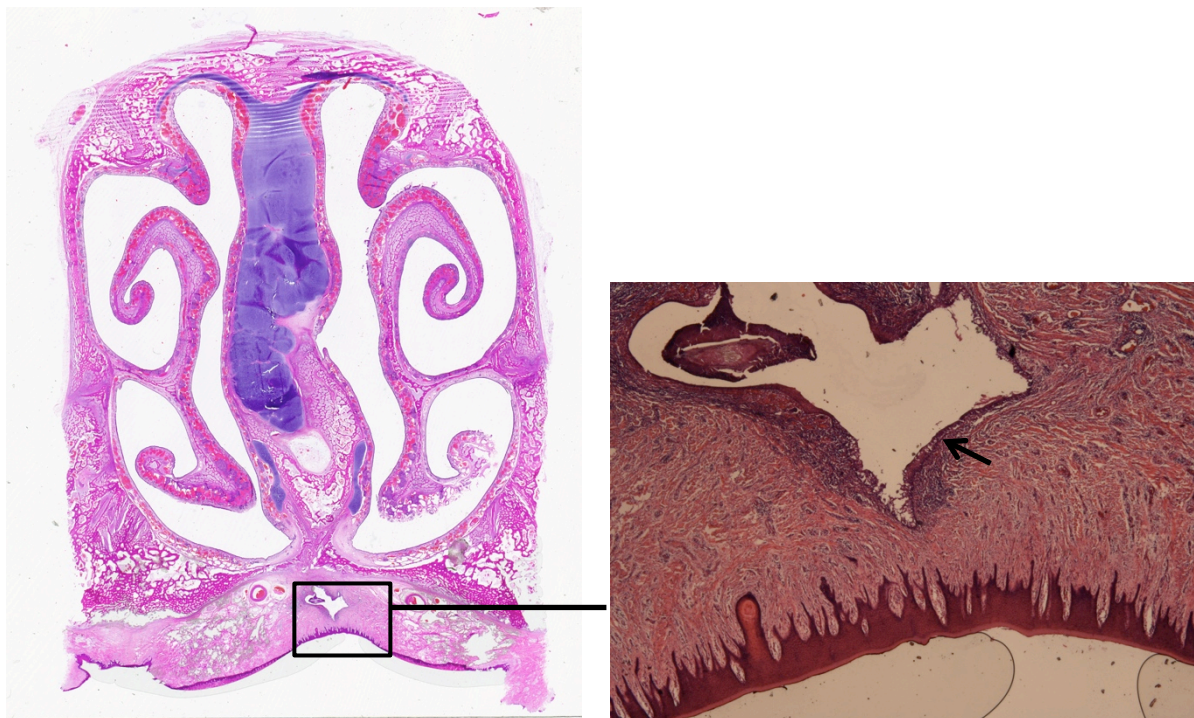


**Abbildung 18: HE Präparat Tier 1 in Übersicht und Vergrößerung (50fache Vergrößerung). Der in der Übersicht markierte Bereich zeigt in der Vergrößerung drei Fistelgangresiduen, lokalisiert auf Höhe der palatinalen Knochenanlage mit Unterbrechung der Verknöcherung. Der Pfeil zeigt eine umgebende chronische Entzündung.**



### 7.2.2. Histologische Beurteilung der Versuchsgruppe II – allogenes Amnion

In sechs der zwölf Fälle sind keine Fistelgänge oder Residuen nachzuweisen. Vier enthalten Residuen bei intaktem Knochen in der Schnittebene. Zweimal konnten Fistelganganteile auf Höhe der palatinalen Knochenanlage festgestellt werden, die die Verknöcherung unterbrechen (Abb. 19). Alle Residuen sind mit respiratorischem Epithel ausgekleidet. Das Plattenepithel der Gaumenschleimhaut ist bei allen Präparaten verschlossen.



**Abbildung 19: HE Präparat Tier 11, medianer Fistelgangrest in der Übersicht und Vergrößerung. In der Übersicht markierter Bereich stellt Ausschnitt der Vergrößerung dar (50fache Vergrößerung). Der Pfeil zeigt den Gewebsdefekt ausgekleidet mit respiratorischem Epithel.**

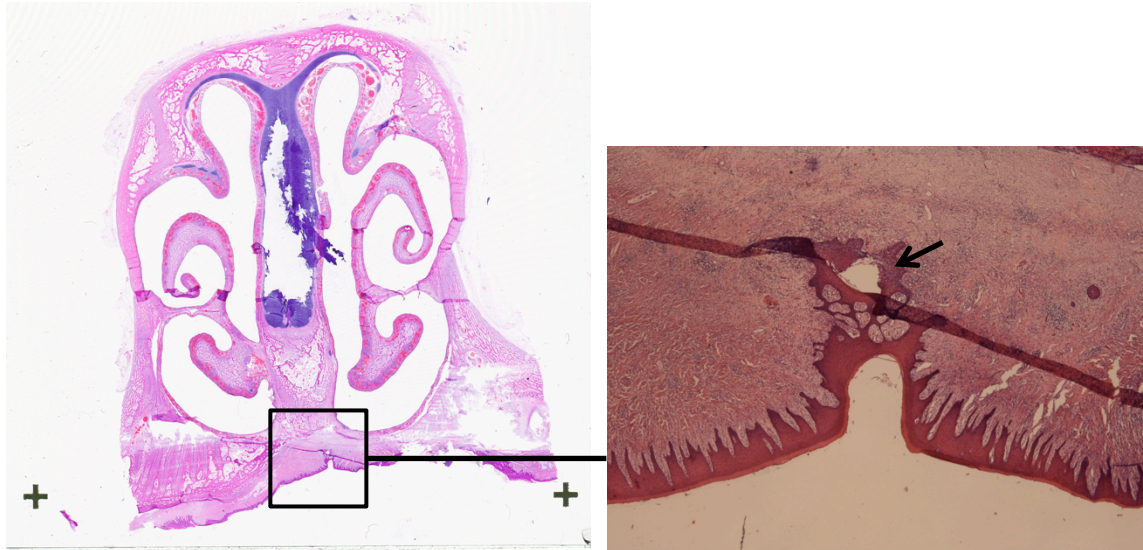
### 7.2.3. Histologische Beurteilung der Versuchsgruppe III – Mundschleimhaut

In einem der zwölf Fälle sind weder Fistelgänge noch Residuen zu finden. Alle anderen weisen solche auf. Vier Fälle zeigen Fistelgangresiduen bei intaktem Knochen. Auf zwei Präparaten sind Fistelganganteile mit einer Unterbrechung der Verknöcherung zu sehen. Bei fünf Fällen finden sich durchgehende Fistelgänge bzw. Residuen auf Höhe der palatinalen Knochenanlage mit Unterbrechung der Verknöcherung.

Drei der elf vorhandenen Fistelgangresiduen sind mit Plattenepithel ausgekleidet, die übrigen mit respiratorischem Epithel. In einem Fall findet sich ein Fremdkörpergranulom im Weichgewebe ohne Nachweis von Fremdmaterial (Tier 16). In zwei Fällen weisen die Bereiche um die Fistelgangresiduen ulzeriertes Epithel und akute eitrige Entzündungen im angrenzenden Weichgewebe auf (Tier 15 Abb. 21). Ein Präparat zeigt eine oronasale Fistel bis in die Nasenhöhle (Tier 13, siehe Abb. 20). Bei allen anderen Tieren der Gruppe zeigt sich gaumenwärts ein geschlossenes Epithel.



**Abbildung 20: HE Präparat Tier 13 als Übersicht, der Pfeil zeigt den breiten Fistelgang bis in die Nasenhaupthöhle**

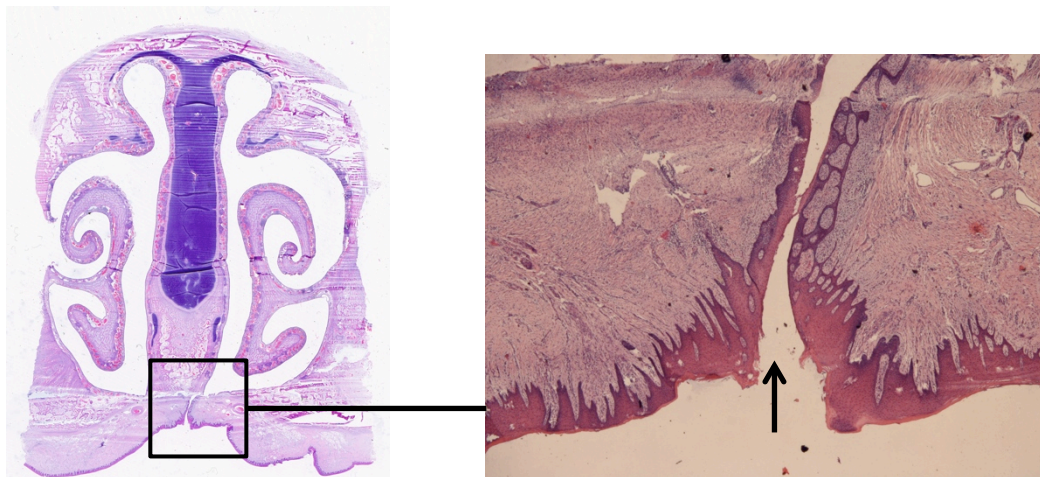


**Abbildung 21: HE Präparat Tier 15 in Übersicht und Vergrößerung (50fache Vergrößerung). Der in der Übersicht markierte Bereich zeigt in der Vergrößerung ein mit Plattenepithel ausgekleidetes Fistelgangresiduum auf Höhe der palatinalen Knochenanlage (Pfeil).**

#### 7.2.4. Histologische Beurteilung der Versuchsgruppe IV – SIS

In zwei der zwölf Fälle sind keine Hinweise auf Fistelgänge oder Fistelganganteile im Gewebe zu finden. In fünf Fällen finden sich Fistelgangreste bei intaktem Knochen. Fünf Fälle zeigen durchgehende Fistelgänge oder Fistelganganteile auf Höhe der palatinalen Knochenanlage mit Unterbrechung der Verknöcherung.

Die Fistelganganteile sind meist mit respiratorischem Epithel ausgekleidet. In zwei Fällen aber auch mit Plattenepithel. Ein Fall weist lateral des Defekts osteomyelitische Veränderungen auf (Tier 22). Bei einem Tier ist eine einseitige durchgehende oronasale Fistel zu finden (Tier 23, siehe Abb. 22). Bei diesen Tieren sind im histologischen Schnitt vermehrt Osteoklasten anzufinden.



**Abbildung 22: HE Präparat Tier 23 in Übersicht und Vergrößerung (50fache Vergrößerung). Der in der Übersicht markierte Bereich zeigt in der Vergrößerung deutlich die einseitig durchgehende oronasale Fistel (Pfeil).**

#### 7.2.5. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse

Die Tabellen 13-16 zeigen die Defektheilung zum Zeitpunkt der Euthanasie, also am 76. Tag nach Wundverschluss. Um das Auftreten von Gewebsdefekten beurteilen zu können, wurde das histologische Material in rechts und links unterteilt. Diese Trennung ergibt sich daraus, dass bei Defektsetzung bis auf das Nasenseptum präpariert und dieses kaudal eingekürzt wurde und somit eine oronalsale Fistel mit Verbindung zu beiden Nasenhöhlen geschaffen wurde.



- Defekt rechts = bezieht sich auf rechte Nasenhöhle  
 Defekt links = bezieht sich auf linke Nasenhöhle  
 ++ = durchgehender Fistelgang; Fistelgangteile auf Höhe der palatinalen Knochenanlage mit Unterbrechung der Verknöcherung  
 + = Fistelgangresiduen mit Unterbrechung der Verknöcherung des harten Gaumens in der Schnittebene  
 +- = Fistelgangreste bei in der Schnittebene intaktem Knochen  
 - = kein Fistelgang oder Fistelgangreste in der Schnittebene

	Defekt rechts	Defekt links
Tier 1	-	++
Tier 2	-	++
Tier 3	-	-
Tier 4	-	+-
Tier 5	-	-
Tier 6	-	-

**Tab. 13: Versuchsgruppe I – autofetale Amnionmembran**

	Defekt rechts	Defekt links
Tier 7	-	-
Tier 8	-	-
Tier 9	-	+-
Tier 10	++	+-
Tier 11	+-	+-
Tier 12	++	-

**Tab. 14: Versuchsgruppe II – allogene Amnionmembran**

Tier	Defekt rechts	Defekt links
Tier 13	++	+
Tier 14	+-	+-
Tier 15	+-	+-
Tier 16	++	++
Tier 17	++	-
Tier 18	++	+

**Tab. 15: Versuchsgruppe III – Autologe Mundschleimhaut**

Tier	Defekt rechts	Defekt links
Tier 19	+-	-
Tier 20	++	+
Tier 21	+-	++
Tier 22	+	+-
Tier 23	++	-
Tier 24	+-	+-

**Tab. 16: Versuchsgruppe IV – SIS**



## 7.2.6. Statistik

### 7.2.6.1. Ossäre Defekte im histologischen Schnitt

Die folgende Tabelle zeigt den Anteil ossärer Defekte in den Versuchsgruppen in relativen und absoluten Häufigkeiten. Auch hier findet sich die Aufteilung in rechts/ links entsprechend der beidseitigen Durchtrennung des Nasenbodens.

Die folgende Tabelle dient als Grundlage für die Durchführung der Tests.

	Gruppe 1 – autofetal	Gruppe 2 – allogen	Gruppe 3 – MSH	Gruppe 4 – SIS
Ossärer Defekt	16,7%	16,7%	58,3%	41,7%
	2/12	2/12	7/12	5/12

**Tabelle 17: Versuchsgruppen in relativen und absoluten Häufigkeiten**

Um die Gruppen einzeln miteinander zu vergleichen wurde ein Fisher-exact-test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 10\%$  festgelegt. Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

- |                           |  |
|---------------------------|--|
| 1) Gruppe 1 vs. Gruppe 2: | kein Unterschied, gleiche Anzahl an Defekten |
| 2) Gruppe 1 vs. Gruppe 3: | p-Wert = 0,089 (signifikant)                 |
| 3) Gruppe 1 vs. Gruppe 4: | p-Wert = 0,371 (nicht signifikant)           |
| 4) Gruppe 2 vs. Gruppe 3: | p-Wert = 0,089 (signifikant)                 |
| 5) Gruppe 2 vs. Gruppe 4: | p-Wert = 0,371 (nicht signifikant)           |
| 5) Gruppe 3 vs. Gruppe 4: | p-Wert = 0,684 (nicht signifikant)           |

### 7.2.6.2. Fistelgangresiduen im histologischen Schnitt

Die folgende Tabelle zeigt den Anteil vorhandener Fistelgangresiduen in den Versuchsgruppen in relativen und absoluten Häufigkeiten. Auch hier findet sich die Aufteilung in rechts/ links entsprechend der beidseitigen Durchtrennung des Nasenbodens.

	Gruppe 1 – autofetal	Gruppe 2 – allogen	Gruppe 3 – MSH	Gruppe 4 – SIS
Ossärer Defekt	25%	50%	91,7%	83,3%
	3/12	6/12	11/12	10/12

**Tabelle 18: Versuchsgruppen in relativen und absoluten Häufigkeiten**

Folgende Ergebnisse des Fisher-exact-tests wurden ermittelt:

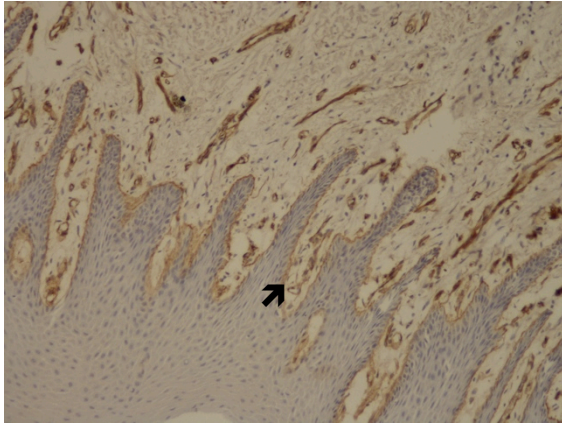
- |                           |                |                     |
|---------------------------|----------------|---------------------|
| 1) Gruppe 1 vs. Gruppe 2: | p-Wert = 0,4   | (nicht signifikant) |
| 2) Gruppe 1 vs. Gruppe 3: | p-Wert = 0,002 | (signifikant)       |
| 3) Gruppe 1 vs. Gruppe 4: | p-Wert = 0,031 | (signifikant)       |
| 4) Gruppe 2 vs. Gruppe 3: | p-Wert = 0,068 | (signifikant)       |
| 5) Gruppe 2 vs. Gruppe 4: | p-Wert = 0,193 | (nicht signifikant) |
| 5) Gruppe 3 vs. Gruppe 4: | p-Wert = 1,00  | (nicht signifikant) |

### 7.3. Immunhistologische Auswertung

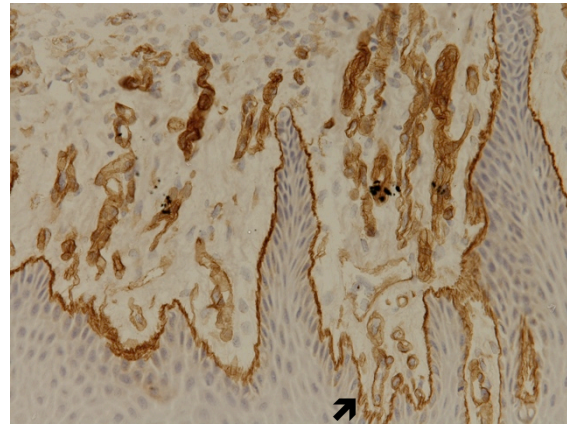
Die Auswertung der immunhistologischen Färbungen erbrachte in allen Versuchsgruppen ähnliche Ergebnisse, weshalb sie im Folgenden unter dem jeweiligen Marker zusammengefasst werden.

#### 7.3.1. Laminin

In allen Präparaten konnte das Laminin als Bestandteil der Basalmembran detektiert werden (Abb. 23, Abb. 24). Innerhalb der Versuchsgruppen und auch beim Vergleich der Gruppen I bis IV konnten keine Unterschiede über das Vorhandensein von Laminin festgestellt werden. Es zeigt sich in allen Präparaten eine durchgängige Basalmembran unterhalb des Epithels (Pfeile).



**Abbildung 23: Beispiel Lamininfärbung (Tier 11, 128fache Vergrößerung)**



**Abbildung 24: Beispiel Lamininfärbung (Tier 20, 320fache Vergrößerung)**

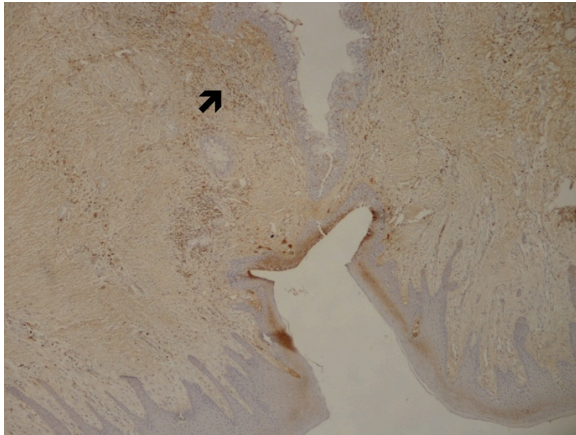
### 7.3.2. Actin

Da das  $\alpha$ -Smooth-Muscle Actin als Bestandteil des glattmuskulären Actin-Myosin Komplexes von Myofibroblasten Ausschuss über die Wundkontraktionen während der Ausheilungsphase gibt, ist dieser Prozess am 90. Postoperativen Tag mutmaßlich bereits abgeschlossen.

Zum Zeitpunkt der Euthanasie sind keine Unterschiede bezüglich des Auftretens von  $\alpha$ -Smooth-Muscle Actin zu detektieren.

### 7.3.3. Ki67

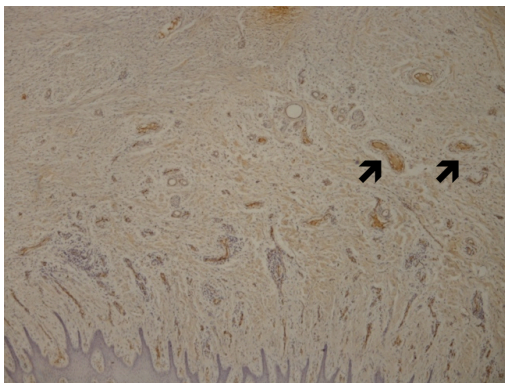
In allen Gruppen zeigten sich in der Färbung des Proliferationsmarkers ähnliche Ergebnisse ohne signifikante Unterschiede. Die Mundschleimhaut an der Oberfläche zeigte kaum positive Zellen. Diese sind, wenn vorhanden, auf die Basalmembran beschränkt. Angefärbte Zellen können in den entzündeten Arealen wie Fistelgängen oder dem Boden der Nasenhaupthöhle nachgewiesen werden. Im Bereich der Verknöcherung können bei allen Tieren positive Osteoblasten dargestellt werden (Pfeil Abb. 25).



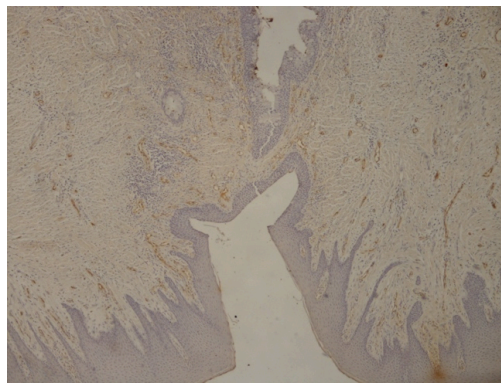
**Abbildung 25: Beispiel Ki67 (Tier 24)**  
(50fache Vergrößerung)

#### 7.3.4. Von Willebrandt- Faktor

In allen Gruppen ist das Vorhandensein von neuen Gefäßen (Pfeile) zu beobachten. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl an neuen Gefäßen zwischen den Versuchsgruppen.



**Abb. 26: Beispiel von Willebrandt Faktor**  
(Tier 2), 128fache Vergrößerung



**Abb. 27: Beispiel von Willebrandt Faktor**  
(Tier 24), 50fache Vergrößerung

## 8. Diskussion

Der Verschluss oronasaler Fisteln nach einem operativen Gaumenverschluss birgt ein hohes Risiko an Rezidiven (Kirschner, Cabiling et al. 2006). Diese Arbeit soll Aufschluss darüber geben, ob und inwiefern der Einsatz allogener oder autofetaler Amnionmembran einen Vorteil bei der chirurgischen Rekonstruktion oronasaler Fisteln darstellt und ob die Erfolgsrate derartiger Eingriffe dadurch erhöht werden kann. Bisher bekannte Verschlusstechniken sind nicht als optimal anzusehen und bedürfen daher Verbesserungen (Kirschner, Cabiling et al. 2006). Ein Vergleich zwischen autofetaler Amnionmembran und allogener Amnionmembran wurde bisher weder im Tierversuch noch in klinischen Studien durchgeführt. Außerdem sollte die Amnionmembran mit zwei Alternativmaterialien verglichen werden. Hierzu diente die SIS und Mundschleimhaut aus der Wangeninnenseite. Diese Materialien wurden ausgewählt, um ein körpereigenes und ein körperfremdes Material in das Studiendesign zu integrieren.

### 8.1. Diskussion des Tiermodells

Untersuchungen und Bewertungen von Transplantatmaterialien können in ihrer Komplexität ausschließlich an einem lebenden Organismus durchgeführt werden. Um Reaktionen des ortständigen Gewebes zu beobachten, ist es zwingend erforderlich, dass das Versuchsobjekt über ein funktionell einwandfreies Immunsystem verfügt. Abstoßungsreaktionen oder auch Interaktionen zwischen Transplantat und Gewebe sind *in vitro* nicht nachvollziehbar. Klinische Kontrollen während der Einheilphase von Transplantatmaterialien bedingen den Einsatz eines *in vivo* Verfahrens. Aus ethischen Gründen ist ein direkter klinischer Versuch am Menschen ausgeschlossen. Deshalb entschied sich unsere Forschungsgruppe für eine tierexperimentelle Studie.

Wissenschaftliche Untersuchungen von Lippen-Kiefer-Gaumen Spalten bedienen sich seit vielen Jahren derartiger Studiendesigns. Auffällig ist, dass sich kein einheitlich verwendetes Versuchstier benennen lässt, sondern viele unterschiedliche Modelle in der Literatur beschrieben sind. Es lässt sich schlussfolgern, dass kein universelles Tiermodell etabliert wurde. So werden Kleintiere wie Mäuse (Valhova 1970; Reynolds, Schaalje et al. 2003; Gritli-Linde 2012), Ratten (Schüpbach, Dorig-Schwarzenbach et al. 1984; Kurokawa, Ueda et al. 2010; Leitao, Pereira et al. 2011), Kaninchen (Hopf, Mittelmeier et

al. 1989), Katzen (van Damme, Freihofer et al. 1994; Liao, Tan et al. 2009) oder Hunde (Bardach und Kelly 1988; Aoki 2009) ebenso verwendet wie Großtiere. Hierunter fallen zum Beispiel Ziegen (Peng, Yang et al. 2010), Schafe (Canady, Landas et al. 1994; Canady, Thompson et al. 1997; Wenghoefer, Deprest et al. 2007), Kühe (Panter, Gardner et al. 1998), Primaten (El-Deep, Horswell et al. 1993) oder Schweine (Kirschner, Cabiling et al. 2006; Kesting, Loeffelbein et al. 2010). Kleintiere weisen im Vergleich zu Großtieren stark eingeschränkte Platzverhältnisse auf, was die Versuchsdurchführung erheblich erschwert. An Großtieren sind chirurgische Eingriffe am Gaumen wesentlich unkomplizierter durchzuführen und auch klinische Kontrollen gestalten sich aufgrund der Sichtverhältnisse präziser. Primaten eignen sich innerhalb der Gruppe der Großtiere wegen ihrer anatomischen Ähnlichkeit zum Menschen besonders gut als Versuchstiere in humanmedizinischen Studien (El-Deep, Horswell et al. 1993). Allerdings ist es im Vergleich zu anderen Arten ungleich schwieriger eine Tierversuchsgenehmigung in entsprechend großer Zahl von Tieren zu erhalten.

Zur Imitation persistierender oronasaler Fisteln entschied sich die Arbeitsgruppe für das porcine Modell. Es existieren zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten aus dem Gebiet der Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie denen das Schwein als Versuchstier zu Grunde liegt. So prüfte eine Arbeitsgruppe die Eignung eines porcinen Versuchsaufbaus als präklinische Untersuchungsmethode von Knochenersatzmaterialien, die in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie eingesetzt werden sollen. Dabei wurde verglichen, ob es nach dem Einbringen verschiedener Knochenersatzmaterialien Unterschiede in Bezug auf die Knochenregeneration zwischen Schweinen und Menschen gibt. Sechs Schweinen wurden in jeweils drei knöcherne Defekte im Schädel die Ersatzmaterialien inseriert. Die eingesetzten Materialien wurden ebenfalls bei 44 Sinusbodenelevationen am Menschen verwendet. Es stellte sich heraus, dass keine signifikanten Unterschiede der Mineralisationsrate zwischen Mensch und Schwein bestehen und sich dieses Modell deshalb für zukünftige präklinische Studien eignet (Schlegel, Rupprecht et al. 2009). Eine andere Arbeitsgruppe etablierte das porcine Modell in mehreren Versuchsreihen zur Untersuchung von Distraktionsosteogenesen nach Le Fort I (Papadaki, Troulis et al. 2010; Papadaki, Kaban et al. 2012). Ein anderes porcines Modell wurde zur Spaltforschung verwendet. Hier wurden am Schwein experimentelle oronasale Fisteln geschaffen, um einen Verschluss mit azellulärer Hautmatrix zu testen (Kirschner, Cabiling et al. 2006). An diesem Studiendesign orientierte sich die Machbarkeitsstudie, die der jetzigen Arbeit vorangeht. Diese Pilotstudie erprobte folgendes porcines Modell: An sieben Minipigs

wurde die humane Amnionmembran mit der auf Kollagen basierenden INTEGRA® verglichen. Jeweils drei Tiere wurden, bei gleichem Versuchsaufbau wie in der jetzigen Studie, mit mehrlagiger HAM bzw. INTEGRA®-Membran versorgt, ein Tier blieb als Kontrolltier ohne operativen Verschluss der oronasalen Fistel. Die Studie zeigte den erfolgreichen Einsatz der allogenen HAM zur Deckung persistierender oronasaler Gaumenfisteln. Zwei Defekte waren am Ende der Versuchsreihe verschlossen, ein Defekt im Umfang deutlich verkleinert (Kesting, Loeffelbein et al. 2010). Um die Resultate aus der Pilotstudie zu verifizieren und zu klären, ob es Unterschiede zwischen autofetaler Amnionmembran und allogener Amnionmembran gibt, wurde das aktuelle Modell konstruiert. Dabei sollte auch geklärt werden, ob die Amnionmembran einer Transplantation von Wangenschleimhaut überlegen ist und wie sich ein anderes biologisches Transplantat, wie die SIS, im Vergleich zu der Amnionmembran verhält. Dementsprechend wurde die Anzahl der Versuchstiere in dieser Reihe angepasst und auf 24 Tiere erhöht.

## **8.2. Diskussion der klinischen Ergebnisse**

Während des 76-tägigen Beobachtungszeitraums wurde die Wundheilung der operierten Gaumendefekte dokumentiert und anschließend analysiert. Das Studiendesign der vorliegenden Arbeit orientiert sich an den Zielen von Behandlungen von Wunden basierend auf fünf Leitlinien (Ramasastry 2005):

- 1) Vermeidung von weiteren Gewebsschädigungen
- 2) Schnellstmöglicher Wundverschluss
- 3) Wiederherstellung des betroffenen Gewebes
- 4) Patienten schnell den Weg zurück ins alltägliche Leben ermöglichen
- 5) Lebensqualität des Betroffenen wiederherstellen

Nun soll diskutiert werden, ob diese Ziele durch die Verwendung von Amnionmembran realisierbar sind.

Weitere Gewebsschädigungen könnten durch den Einsatz von körperfremden Transplantatmaterialien wie der Amnionmembran vermieden werden. Es müssten keine körpereigenen Gewebe aus anderen Regionen, wie zum Beispiel dem Unterarm (Correa

Chem und Franciosi 1983), entnommen werden um ein bestehendes Restloch am Gaumen eines Spaltkinds zu verschließen. Somit entfielen auch Probleme, die häufig mit einer autologen Weichgewebsverpflanzung einhergehen. Diese sind unter anderem die Entnahmemorbidity, Narbenbildungen, eine Hemmung des Wachstums in der Spenderregion sowie Bewegungseinschränkungen und ästhetische Defizite in diesem Gebiet.

Die Amnionmembran ist ein in ausreichendem Maße verfügbares, kostengünstiges Biomaterial, das technisch einfach zu bearbeiten und als Transplantat, mit entsprechender chirurgischer Routine des Operateurs, problemlos einzusetzen ist.

Die Verwendung der Amnionmembran ermöglicht außerdem einen zeitnahen Wundverschluss, da keine vorbereitenden Maßnahmen, wie zum Beispiel der Einsatz von Expandern am ortständigen Gewebe, (Van Damme und Freihofer 1996), durchgeführt werden müssen. Auch auf lang andauernde Behandlungen wie beim Durchführen einer Distractionsosteogenese zum Fistelverschluss (Alkan, Bas et al. 2007) kann verzichtet werden.

Das Ziel, Patienten schnell den Weg in den Alltag zu ebnet und ihre Lebensqualität wiederherzustellen, könnte durch die Durchführung einer Amniontransplantation besser erreicht werden als durch Alternativtechniken. So ist es nicht nötig, lokale gestielte Lappen, wie einen Zungenlappen, zu verwenden. Diese Operationstechnik ist zwar mit hoher Erfolgsquote durchführbar (Posnick und Getz 1987), allerdings auch mit erheblichen Einschränkungen seitens des Patienten bis zur Rückverlagerung des Lappens verbunden. Außerdem ist zur Stieldurchtrennung ein weiterer operativer Eingriff nötig (Ohsumi, Onizuka et al. 1993). Die Verwendung der Amnionmembran hingegen benötigte nur einen operativen Eingriff. Außerdem könnten postoperative Beschwerden durch die nachgewiesene analgetische Wirkung der Amnionmembran (Martinez Pardo, Reyes Frias et al. 1999; Mostaque und Rahman 2011) verringert werden.

Die Versuchsgruppen wurden hinsichtlich der Kardinalsymptome einer Entzündung während des Ausheilungsprozesses begutachtet. Die klinischen Beobachtungen belegen, dass die durchschnittlichen Entzündungswerte in den HAM-Gruppen schon am 10. postoperativen Tag deutlich unter denen der SIS Versuchsgruppe und der Versuchsgruppe autologe Mundschleimhaut liegen. Da entzündliche Veränderungen nach chirurgischen Eingriffen mit Schwellungen und Schmerzen einhergehen (Siems 2009), ist davon auszugehen, dass bei geringeren Entzündungszeichen die Lebensqualität des Patienten gesteigert wird. Dies unterstützt die von mehreren Autoren publizierte entzündungshemmende Wirkung der Amnionmembran (Hao, Ma et al. 2000; Park und Tseng 2000; Solomon, Rosenblatt et al. 2001). Vermehrte Entzündungen können zu



narbiger Ausheilung führen. Dies konnte im klinischen Vergleich hauptsächlich bei der Versuchsgruppe III (autologe Mundschleimhaut) beobachtet werden. Die Tiere wiesen am Tag der Euthanasie teilweise stark narbige Veränderungen der Gaumenschleimhaut auf. Die typische Morphologie mit den Rugae palatinae war im zentralen Gaumenbereich nahezu vollständig aufgehoben. Die mit autofetaler oder allogener Amnionmembran versorgten Versuchstiere brachten in diesem Punkt wesentlich bessere Ergebnisse hervor. Es waren weniger morphologische Veränderungen der Gaumenschleimhaut zu vermerken. Mehrere Autoren schreiben der Amnionmembran ein Herabsenken des Fibroserisikos zu (Tseng, Li et al. 1999; Pessolato, Martins Ddos et al. 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppen können durch die klinischen Beobachtungen der vorliegenden Studie unterstützt werden. Durch den Versuchsaufbau konnten wir Tiere selben Alters beobachten. Die Geschwister aus den jeweiligen Würfen wuchsen in der Klinik für Schweine in benachbarten Stallungen auf. So konnte ein direkter Vergleich in Bezug auf Nahrungsaufnahme, Wachstum und Verhalten der Tiere erfolgen. Alle Versuchstiere zeigten sich unauffällig. Es konnten keine Unterschiede zu den nicht operierten Tieren festgestellt werden. Dies untermauert die These, durch die angewandte Methode die Lebensqualität der Betroffenen während der Behandlungszeit und der Ausheilungsphase nicht über ein tolerierbares Maß hinaus einzuschränken.

Ein Vorteil der autofetalen Amnion gegenüber der allogenen Membran konnte in den klinischen Beobachtungen nicht festgestellt werden.

Aus klinischer Sicht stellt die Amnionmembran in ihrer Eigenschaft als Transplantatmaterial ein geeignetes Produkt zur Deckung oronasaler Fisteln dar. Sie ist ein ideales, sofort verfügbares Ersatzgewebe auch in der Versorgung von Neugeborenen und Säuglingen.

### **8.3. Diskussion der histologischen Ergebnisse**

Der klinische Beobachtungszeitraum nach dem operativen Gaumenverschluss betrug 76 Tage. Während dieser Phase wurden die Tiere täglich gesichtet und an den postoperativen Tagen 3, 7 und 10 wurden Wundkontrollen unter Intubationsnarkose durchgeführt. Diese intensive Beobachtung erlaubte einen umfassenden klinischen Eindruck über die Heilungsvorgänge der Defektdeckung. Ziel der Histologie ist es, diesen Eindruck auf zellulärer Ebene zu spezifizieren. Eine Schwierigkeit ergibt sich daraus, dass diese Un-

tersuchung eine Momentaufnahme des Tages der Euthanasie darstellt. An diesem Tag wurden die Schweinekiefer entnommen und später der histologischen Aufarbeitung zugeführt. Bewertet werden soll aber auch die Qualität der Wundheilungsvorgänge während des kompletten Zeitraums. Um eine Vergleichbarkeit zu schaffen, wurden deshalb drei zu diskutierende Kernfragen ausgearbeitet, auf denen die histologischen Beurteilungen basieren.

*a) Sind nach operativem Gaumenverschluss durchgehende Verbindungen zwischen Mund- und Nasenhöhle zu detektieren?*

Der vollständige Gaumenverschluss ist das wichtigste Erfolgskriterium der durchgeführten Eingriffe. Persistierende Verbindungen zwischen Mund und Nasenhöhle gehen mit zahlreichen funktionellen Beeinträchtigungen bei der Nahrungsaufnahme (Abyholm, Borchgrevink et al. 1979; Schultz 1986), der Sprachentwicklung (Abyholm, Borchgrevink et al. 1979; Sadhu 2009) oder des Gehörs (Schultz 1986) einher. Außerdem ergeben sich häufig soziale Benachteiligungen durch sprachliche Fehlentwicklungen (Abyholm, Borchgrevink et al. 1979). Verbleibt nach dem operativen Verschluss eine oronasale Fistel, verschlechtert sich die Prognose für jedes weitere operative Procedere. Dies ist vor allem auf das postoperativ stark vernarbte Gewebe zurückzuführen, welches weitere Eingriffe erschwert (Cole, Horn et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde großen Wert auf die histologische Untermauerung der klinischen Befunde gelegt. Denn diese waren nicht immer eindeutig in Bezug auf das Auffinden von kleinen bestehenden Verbindungen zwischen Mund- und Nasenhöhle. Um vorhandene Gewebebrücken nicht zu zerstören, wurde klinisch ausschließlich visuell beurteilt und nicht sondiert. Die histologische Bearbeitung sollte über das Vorliegen von Restlöchern Aufschluss geben. In den Versuchsgruppen I und II, denen der Defektverschluss mit autofetaler bzw. allogener Amnionmembran zugrunde liegt, konnten histologisch keine oronasalen Fisteln nachgewiesen werden. In allen Präparaten ist ein zur Mundhöhle geschlossen verlaufendes Plattenepithel zu beobachten. In der Versuchsgruppe III (autologe Mundschleimhaut) konnte eine durchgehende oronasale Fistel nachgewiesen werden. Die fistelbegrenzenden Gewebe sind durchgängig epithelialisiert und weisen keinerlei Verschluss-tendenzen auf. Auch in der Versuchsgruppe IV (SIS) konnte eine vollständig epithelialisierte Verbindung zwischen Mund- und Nasenhöhle dargestellt werden. Die Amnionmembran als Deckungsmaterial stellt sich in puncto auftretende oronasale Fisteln nach

operativem Verschluss in vorliegender Studie im Vergleich zu den Alternativmaterialien SIS und Mundschleimhaut als überlegen dar. Zwischen allogener und autofetaler Amnionmembran ist hingegen kein qualitativer Unterschied auszumachen.

*b) Gibt es knöcherne Defekte innerhalb des Gaumendaches - auch bei intakter palatinaler Schleimhaut?*

Um die Qualität der Wundheilungsvorgänge beurteilen zu können wurde auf zellulärer Ebene das knöcherne Gaumendach untersucht. Dabei wurde speziell auf Unterbrechungen der Verknöcherung geachtet. Kontinuitätsunterbrechungen wurden als Ausheilungsdefizite festgelegt. Ein stabiler, knöchern unterlegter Verschluss der oronasalen Fisteln ist als bestmögliche Variante der Ausheilung anzusehen. Vor diesem Hintergrund gibt es Studien mehrerer Arbeitsgruppen, die eine Defektdeckung mit Knorpel oder Knochentransplantaten beschreiben, um eine möglichst funktionelle Verknöcherung zu erreichen. So wird der Einsatz von freien Knochentransplantaten aus der Hüfte oder auch Periosttransplantate aus der Tibia (Schultz 1989) ebenso vorgestellt wie Knorpeltransplantate aus dem Nasenseptum (Murrell, Requena et al. 2001). In unserer Studie wurde kein Knochentransplantat eingesetzt, sondern auf eine sekundäre knöcherne Überbrückung des Defekts nach Einbringen einer Leitmembran gesetzt. In den Versuchsgruppen I und II (autofetale und allogene Amnionmembran) sind jeweils zwei Unterbrechungen des Knochens zu finden. Bei den übrigen Präparaten sind intakte knöcherne Gaumendächer zu sehen. Sieben, den Knochen betreffende Einschnitte sind in der Versuchsgruppe III (autologe Mundschleimhaut) zur Darstellung gekommen. Das ist ein statistisch signifikanter Unterschied zu den jeweils zwei detektierten Verknöcherungsunterbrechungen in den Amniongruppen. Die mit SIS verschlossenen Fisteln zeigten in der histologischen Untersuchung fünf Defekte auf knöcherner Ebene. Im Vergleich dieser Versuchsgruppe IV (SIS) mit den Versuchsgruppen I und II stellen sich die Amniongruppen ebenfalls als überlegen dar. Die Verwendung der Membran erbrachte in über 80% stabil ausgeheilte, knöchern untermauerte Defektheilungen, die keinerlei Tendenzen zu Rezidiven aufweisen.

*c) Sind Fistelgangresiduen im Gewebe zu finden? Mit welcher Art von Epithel sind sie ausgekleidet - was lässt sich daraus in Bezug auf die angewandte Operationsmethode und das jeweilige Material schließen?*

Fistelgangresiduen sind in allen Gruppen aufzufinden, jedoch verschieden häufig. Es handelt sich hierbei um Reste der iatrogen geschaffenen oronasalen Fistel innerhalb des Gewebes. Alle in der histologischen Untersuchung beobachteten Residuen sind von einer chronischen Entzündung umgeben. Jede Entzündung stellt qualitativ eine Abwertung der Ausheilung dar, was dauerhaft zu Problemen wie zum Beispiel rezidivierenden Defekten führen kann. Deshalb sollen die Überreste der Fisteln genau analysiert werden. Zunächst wurde das Auftreten von Residuen innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen verglichen. In Versuchsgruppe I (autofetales Amnion) weisen drei, in Versuchsgruppe II (allogenes Amnion) sechs, in Versuchsgruppe III (autologe Mundschleimhaut) elf und in Versuchsgruppe IV (SIS) zehn von jeweils zwölf untersuchten Präparaten derartige Defekte auf. Die mit autofetaler Amnion operierten Kiefer unterscheiden sich somit signifikant von den mit SIS und Mundschleimhaut operierten. Ebenso die allogene Gruppe von der SIS Gruppe. Die Versuchsgruppen I und II etablieren sich in dieser Analyse und stellen sich als überlegen dar. Gruppe III (autologe Mundschleimhaut) und Gruppe IV (SIS) liefern mit einem Anteil von 91,7% und 83,3% an nachweisbaren residualen Fisteln deutlich schlechtere Ergebnisse. Die Verwendung der Amnionmembran führt zu einer geringeren Anzahl an Fistelgangresiduen und somit auch zu einer geringeren Anzahl chronischer Entzündungen innerhalb des Gewebes. Chronische Entzündungen können das Gewebe nachhaltig schädigen und Wundheilungsvorgänge irreversibel stören (Siems 2009). Dass diese in den Amniongruppen weniger häufig auftreten, spricht für die Membran als Transplantatmaterial. Die Versuchsgruppe I (autofetale Amnionmembran) etablierte sich als Gruppe mit den wenigsten Residuen. Damit ist in diesem Vergleich auch ein Unterschied zur allogenen Gruppe nachzuweisen, die eine größere Anzahl an Fistelgangresten aufweist.

Weiteren Aufschluss über die Qualität der Ausheilung kann das Epithel, mit dem die Residuen ausgekleidet sind, geben. Handelt es sich um ein respiratorisches Epithel ist davon auszugehen, dass der Fistelgangrest vom nasalen Anteil der oronasalen Fistel stammt und die Ausheilung somit von oral adäquat erfolgt ist. Kleidet jedoch Plattenepithel den Fistelgangrest aus, muss man von einem oralen Ursprung desselben und damit einem qualitativ schlechteren operativen Verschluss ausgehen.

In den Versuchsgruppen I und II (Amniongruppen) finden sich ausschließlich mit respiratorischem Epithel ausgekleidete Residuen. In Gruppe III (autologe Mundschleimhaut) sind drei von elf Residuen mit Plattenepithel versehen. In der Versuchsgruppe IV (SIS)

sind zwei von zehn Residuen derartig mit Plattenepithel ausgekleidet. Das lässt darauf schließen, dass der Verschluss mit Amnionmembran Vorteile gegenüber den verwendeten Alternativmaterialien mit sich bringt. Der orale Wundverschluss führt in dieser Versuchsgruppe zu keinen Residuen in den betreffenden Versuchsgruppen. Ausschließlich vom Nasenboden ausgehend sind solche zu finden.

Mit Hilfe der Histologie kann deutlich gezeigt werden, dass sich die Amnionmembran gegenüber den Alternativmaterialien als überlegenes Transplantat darstellt. erinnert man sich an die von der Arbeitsgruppe um Siems aufgestellten fünf Hauptziele im Rahmen der Behandlung von Wunden (Siems 2009), nämlich:

- 1) Vermeidung von weiteren Gewebsschädigungen
- 2) Schnellstmöglicher Wundverschluss
- 3) Wiederherstellung des betroffenen Gewebes
- 4) Patienten schnell den Weg zurück ins alltägliche Leben ermöglichen
- 5) Lebensqualität des Betroffenen wiederherstellen

lässt sich nach Abschluss der histologischen Begutachtung auch der nach der klinischen Auswertung noch offene Punkt „Wiederherstellung des betroffenen Gewebes“ klären. Die Amnionmembran ist als Transplantat in der Lage, die Regeneration ortsständigen Gewebes zu fördern und unterstützt somit eine bestmögliche Ausheilung des Defektes.

#### **8.4. Diskussion der immunhistologische Ergebnisse**

Von der immunhistologischen Analyse erhoffte sich unsere Arbeitsgruppe Aufschlüsse über vier Punkte:

- 1) Kann die Ausbildung einer Basalmembran nachgewiesen werden?
- 2) Sind Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich Wundkontraktionen zu beobachten?
- 3) Ist die Zellproliferation verschieden stark nachweisbar?
- 4) Gibt es Hinweise auf Angiogenese unterstützende Eigenschaften der Amnionmembran?

Der Untersuchungszeitpunkt am postoperativen Tag 76 gibt in der immunhistologischen Analyse keine aussagekräftigen Informationen über mögliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen preis. Auch die Frage, ob die Amnionmembran zu angiogenetischer Förderung fähig, ist lässt sich nicht ermitteln, da die anderen Versuchsgruppen zum Untersuchungszeitpunkt eine vergleichbare Anzahl an neuen Gefäßen aufweisen.

Die oben genannten Untersuchungen liefern in anderen Studien sehr gute Ergebnisse zur Bewertung der Wundheilung. Allerdings sind die Studien häufig so aufgebaut, dass in verschiedenen Stadien der Wundheilung Biopsien aus dem zu untersuchenden Gewebe entnommen werden, um diese anschließend histologisch aufzuarbeiten. Dies ergibt vergleichbare Ergebnisse zu verschiedenen Zeitpunkten. So können beispielsweise beim Auswerten von Zellproliferationen Zellen ausgezählt und deren Zu- oder Abnahme nach einer bestimmten Anzahl von Tagen verglichen werden (Loeffelbein, Baumann et al. 2012). Das hier vorliegende Studiendesign erlaubt nur einen einzigen Zeitpunkt der histologischen Begutachtung. Biopsien während der Wundheilung sind nicht durchzuführen ohne das Gaumengewebe zu schädigen. Dies kann die Bewertung der Defektheilung verfälschen. Deshalb musste auf ein derartiges Vorgehen verzichtet werden. Alternativ hätten eine weitaus größere Anzahl an Tieren beobachtet und zu verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert und histologisch untersucht werden müssen.

## **8.5. Kritische Wertung**

Die vorliegende Studie vergleicht vier Biomaterialien als Transplantate zur operativen Versorgung von persistierenden oder rezidivierenden oronasalen Fisteln. Klinische und histologische Analysen führten zu aussagekräftigen Ergebnissen.

Unsere Arbeitsgruppe ging davon aus, dass zum abschließenden Untersuchungszeitpunkt auch auszuwertende Veränderungen auf zellulärer Ebene mittels immunhistologischen Untersuchungen zu beobachten sind. Die verwendeten Marker eignen sich sehr gut um die erarbeiteten Fragestellungen zu bewerten. Allerdings hat sich in der vorliegenden Studie gezeigt, dass sie wesentlich früher im Studienablauf hätten eingebettet werden müssen. Dies schloss sich aber aufgrund der geringen Tieranzahl wie bereits erläutert aus. Gegebenenfalls sollten zukünftige Studien derartig angepasst werden, um auch eine Aussage über die frühe und mittlere Phase der Wundheilung in diesem Tiermodell Aufschluss geben zu können. Die hier vorliegende Studie hat sich aufgrund der

begrenzt zur Verfügung stehenden Tieranzahl im Studiendesign auf den Zeitpunkt nach Abschluss der Wundheilung konzentriert.

Eine größere Anzahl an Versuchstieren hätte womöglich zu deutlicheren statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen geführt. Allerdings sind die Fallzahlen in einem Tierversuch aus ethischen Gründen nicht beliebig erweiterbar. Die Ausarbeitung des Studiendesigns erfolgte deshalb in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München. Ethische Aspekte und eine notwendige Mindestanzahl an Tieren wurden in vorliegender Versuchsreihe gleichermaßen berücksichtigt.

## **8.6. Schlussfolgerung und Ausblick**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Amnionmembran als mögliche Alternative zu bislang verwendeten Transplantatmaterialien in der operativen Versorgung von oronasalen Fisteln zu bewerten. Außerdem sollte festgestellt werden, ob die autofetale Membran Vorteile gegenüber der allogenen aufweist.

Die klinischen Untersuchungen belegen eine Überlegenheit sowohl der autofetalen als auch der allogenen Amnionmembran im Vergleich zu einem körpereigenen Material, der autologen Mundschleimhaut, und einem körperfremden Transplantat, der SIS. Es konnten deutlich weniger Entzündungen und narbige Ausheilungen beobachtet werden. Auch die histologische Auswertung ergab eine Überlegenheit der Amnionmembranen in den Punkten Anzahl nicht komplett verschlossener Fisteln am Ende der Versuchsreihe, Vorhandensein knöcherner Defekte bei geschlossener Gaumenschleimhaut und detektierten Fistelgangresiduen im Gewebe. Die Amnionmembran etabliert sich in diesem Tierversuch als vielversprechendes Transplantatmaterial in der operativen Therapie von oronasalen Fisteln. Der klinische Einsatz am Menschen stellt den nächsten Schritt in der Erprobung dar und wird durch die Ergebnisse dieser Studie befürwortet. Ein Vorteil der autofetalen Membran gegenüber der allogenen konnte nicht signifikant nachgewiesen werden. Dies stellt vor allem für Patienten, die keinen Zugang zu einer autofetalen Membran haben, einen erheblichen Vorteil dar. Ihnen steht ein allogenes, kryokonserviertes Transplantat zur Verfügung.

Im Rahmen der histologischen Untersuchung stellte sich heraus, dass vorhandene Fistelgangresiduen hauptsächlich mit respiratorischem Epithel ausgekleidet sind. Das lässt

auf eine qualitativ schlechtere Ausheilung von nasal her schließen. Vielleicht könnte ein doppelseitiger Verschluss von oronasalen Fisteln mit der Amnionmembran von oral und nasal zu noch besseren Ergebnissen führen. Ob dies technisch umsetzbar ist und zu Verbesserungen in der Ausheilung führt, könnte in einer weiterführenden Studie untersucht werden.

Das Potential der Amnionmembran stellt in erster Linie eine Chance dar, Patienten mit persistierenden oder rezidivierenden oronasalen Fisteln effizienter, schonender und mit größerer Erfolgsrate zu operieren. Zudem muss in der heutigen Zeit auch über die Ökonomie von Medizinprodukten diskutiert werden. Hier stellt die Amnionmembran ein in ausreichendem Maß vorhandenes, kostengünstiges Transplantatmaterial dar, was mit entsprechender Routine schnell und sicher eingesetzt werden kann.



## 9. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie vergleicht vier Biomaterialien als mögliche Transplantate zum operativen Verschluss von persistierenden oder rezidivierenden oronasalen Fisteln. Vier Muttertiere und 24 Ferkel wurden dazu in ein porcines Versuchsmodell integriert. Bei den Ferkeln wurde im Alter von acht Wochen iatrogen ein im Durchmesser 10 mm großer, zentraler Gaumendefekt mit Verbindung zur rechten und linken Nasenhöhle gesetzt. Nach zweiwöchiger Selbstheilungsphase konnten bei allen Tieren oronasale Fisteln mit epithelialisierten Wundrändern ohne Schrumpfungstendenzen beobachtet werden, die dann durch die zu testenden Biomaterialien operativ verschlossen wurden. Jeweils sechs Tiere erhielten als Transplantat die autofetale Amnionmembran, die allogene Amnionmembran, autologe Mundschleimhaut oder die Small Intestine Submucosa (SIS). An den postoperativen Tagen 3, 7, 10 und 76 fanden Wundkontrollen und eine Fotodokumentation statt. Am postoperativen Tag 76 wurden die Tiere euthanasiert und die Kiefer im Block zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

In der klinischen Analyse etablierten sich die autofetale und allogene Amnionmembran aufgrund von niedrigen Entzündungswerten während der Wundheilung und geringen morphologischen Veränderungen der Gaumenschleimhaut gegenüber der autologen Mundschleimhaut und der SIS. Die histologische Auswertung zeigt, dass alle mit Amnionmembran versorgten Tiere geschlossene Gaumendefekte ohne Hinweis auf einen Fistelgang aufweisen. In der Gruppe Mundschleimhaut und SIS ist jeweils ein Tier mit einer nicht verschlossenen oronasalen Fistel zu beobachten. Außerdem sind bei den mit Amnion operierten Tieren weniger knöcherne Ausheilungsdefizite und Gewebsdefekte nachzuweisen. Die autofetale Membran unterscheidet sich dabei signifikant von Mundschleimhaut und SIS. Auch die allogene Membran erbringt signifikant bessere Ergebnisse als die SIS. Alle vorhandenen Fistelgangresiduen in den Amniongruppen sind mit nasalem, respiratorischem Epithel ausgekleidet. In den Versuchsgruppen autologe Mundschleimhaut und SIS sind neben den mit respiratorischem Epithel ausgekleideten Fistelgangresiduen, auch solche mit oralem Plattenepithel zu finden. Dies belegt eine qualitativ hochwertigere Ausheilung der Amniongruppen, da dort keine Gewebsdefekte von oral ausgehend beobachtet wurden.

In der immunhistologischen Untersuchung konnte bei allen Versuchstieren mit verschlossener oronasaler Fistel eine epithelialisierte palatinale Schleimhaut mit durchgehender Basalmembran unterhalb des Plattenepithels nachgewiesen werden.

Die Amnionmembran stellt sich in vorliegender Studie gegenüber der autologen Mundschleimhaut und der SIS als überlegenes Transplantat dar. Zwischen autofetaler und allogener Membran können keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Dies stellt für Patienten ohne Zugang zu allogener Amnionmembran einen erheblichen Vorteil dar, da ihnen allogene, kryokonservierte Amnionmembran als Transplantatmaterial zur Verfügung stehen kann.

## 10. Summary

The present study compares the use of four biomaterials as grafting materials for the surgical closure of recurrent or persistent oronasal fistula. Four pregnant sows and 24 piglets constitute a pig model. In the age of eight weeks a iatrogenic oronasal relation with a diameter of 10mm was created in the mid of piglets palate. After two weeks of self-healing all animals had developed a full epithelized oronasal fistula without tendency to get smaller. The 24 piglets were separated in four groups, each with six animals. The palatal defects of respectively one group were repaired in a second operation with allogenic amniotic membrane, autogenic amniotic membrane, autogenic buccal mucosa and the porcine small intestine submucosa (SIS). The wounds were inspected and we did a foto documentation on postoperative days 3, 7, 10 and 76. On postoperative day 76 the animals were sacrificed and the palate had been harvested for the histological investigation.

The clinical analysis shows that palates closed with autogenic and allogenic amniotic membrane feature less inflammations and morphological diseases during the period of woundhealing than these ones covered with autologic buccal mucosa and SIS. The histological investigation established no oronasal relations in the amnion groups on postoperative day 76. Respectively one fistula had been detected in the buccal mucosa and SIS group. Animals operated with autologic and allogenic amniotic membrane had less fistula rests and defects inside the palatal bone and tissue than the other animals. In this point the use of autogenic amniotic membrane leads to significant better results than buccal mucosa and SIS. Also allogenic amniotic membrane improves SIS with significance. All detected fistula rests in the amnion groups are lined with nasal respiratory epithelium. Fistula rests lined with squamous epithelium were detected in the buccal mucosa and SIS study groups. This proves a higher quality in wound healing of amniotic membrane because there are no defects assuming from the oral squamous epithelium.

The immunhistological investigation shows a completely epithized mucosa with a closed basement membrane under the squamous epithelium in every case of a closed oronasal fistula in all groups.

The present study establishes the amniotic membrane in its use as biological grafting material as an predominant product compared to autogenic buccal mucosa and SIS. There is no significant difference in quality between autological and allogenic amniotic membrane. This fact is an important benefit for patients without access to allogenic

amniotic membrane because they can be treated with cryopreserved allogenic amniotic membrane as grafting material.

## 11. Literaturverzeichnis

- Abyholm, F. E., Borchgrevink, H. H. und Eskeland, G. Palatal fistulae following cleft palate surgery. *Scand J Plast Reconstr Surg* 13(1979): 295-300.
- Akle, C. A., Adinolfi, M., Welsh, K. I., Leibowitz, S. und McColl, I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 2(1981): 1003-1005.
- Alkan, A., Bas, B., Ozer, M. und Bayram, M. Closure of a large palatal fistula with maxillary segmental distraction osteogenesis in a cleft palate patient. *Cleft Palate Craniofac J* 44(2007): 112-115.
- Allman, A. J., McPherson, T. B., Badylak, S. F., Merrill, L. C., Kallakury, B., Sheehan, C., Raeder, R. H. und Metzger, D. W. Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response. *Transplantation* 71(2001): 1631-1640.
- Amaratunga, N. A. Occurrence of oronasal fistulas in operated cleft palate patients. *J Oral Maxillofac Surg* 46(1988): 834-838.
- Andriani, F., Margulis, A., Lin, N., Griffey, S. und Garlick, J. A. Analysis of microenvironmental factors contributing to basement membrane assembly and normalized epidermal phenotype. *J Invest Dermatol* 120(2003): 923-931.
- Aoki, A. Observation of pulpal blood flow and bone mineralization after alveolar distraction osteogenesis in a canine cleft model. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 76(2009): 37-44.
- Argamaso, R. V. The tongue flap: placement and fixation for closure of postpalatoplasty fistulae. *Cleft Palate J* 27(1990): 402-410.
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C., Kleinman, H. K., Marinkovich, M. P., Martin, G. R., Mayer, U., Meneguzzi, G., Miner, J. H., Miyazaki, K., Patarroyo, M., Paulsson, M., Quaranta, V., Sanes, J. R., Sasaki, T., Sekiguchi, K., Sorokin, L. M., Talts, J. F., Tryggvason, K., Uitto, J., Virtanen, I., von der Mark, K., Wewer, U. M., Yamada, Y. und Yurchenco, P. D. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24(2005): 326-332.
- Bailey, L. J., Johnston, M. C. und Billet, J. Effects of carbon monoxide and hypoxia on cleft lip in A/J mice. *Cleft Palate Craniofac J* 32(1995): 14-19.

- Bajaj, A. K., Wongworawat, A. A. und Punjabi, A. Management of alveolar clefts. *J Craniofac Surg* 14(2003): 840-846.
- Bardach, J. und Kelly, K. M. The influence of lip repair with and without soft-tissue undermining on facial growth in beagles. *Plast Reconstr Surg* 82(1988): 747-759.
- Bennett, J. P., Matthews, R. und Faulk, W. P. Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion. *Lancet* 1(1980): 1153-1156.
- Bergström, S. Surface ultrastructure of human amnion and chorion in early pregnancy: a scanning electron microscope study. *Obstet Gynecol* 38(1971): 513-524.
- Berkman, M. D. Early non-surgical closure of postoperative palatal fistulae. *Plast Reconstr Surg* 62(1978): 537-541.
- Blechschildt Die Entwicklungskinetik des Gesichtsschädels. Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Pfeiffer. Stuttgart-New York, Thieme(1982): 234.
- Bogic, L. V., Brace, R. A. und Cheung, C. Y. Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta* 21(2000): 203-209.
- Bourne, G. L. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol* 79(1960): 1070-1073.
- Bull, H. G. und Lenzen, C. Differential diagnosis and treatment of cheilognathopalatoschises. *Zentralbl Gynakol* 125(2003): 398-403.
- Burgos, H. Angiogenic factor from human term placenta. Purification and partial characterization. *Eur J Clin Invest* 16(1986): 486-493.
- Canady, J. W., Landas, S. K., Morris, H. und Thompson, S. A. In utero cleft palate repair in the ovine model. *Cleft Palate Craniofac J* 31(1994): 37-44.
- Canady, J. W., Thompson, S. A. und Colburn, A. Craniofacial growth after iatrogenic cleft palate repair in a fetal ovine model. *Cleft Palate Craniofac J* 34(1997): 69-72.
- Catena, F., Ansaloni, L., D'Alessandro, L. und Pinna, A. Adverse effects of porcine small intestine submucosa (SIS) implants in experimental ventral hernia repair. *Surg Endosc* 21(2007): 690.
- Champagne, B. J., O'Connor, L. M., Ferguson, M., Orangio, G. R., Schertzer, M. E. und Armstrong, D. N. Efficacy of anal fistula plug in closure of cryptoglandular fistulas: long-term follow-up. *Dis Colon Rectum* 49(2006): 1817-1821.
- Chen, H. C., Ganos, D. L., Coessens, B. C., Kyutoku, S. und Noordhoff, M. S. Free forearm flap for closure of difficult oronasal fistulas in cleft palate patients. *Plast Reconstr Surg* 90(1992): 757-762.

- Ching, Y. H., Sutton, T. L., Pierpont, Y. N., Robson, M. C. und Payne, W. G. The use of growth factors and other humoral agents to accelerate and enhance burn wound healing. *Eplasty* 11(2011): e41.
- Cole, P., Horn, T. W. und Thaller, S. The use of decellularized dermal grafting (AlloDerm) in persistent oro-nasal fistulas after tertiary cleft palate repair. *J Craniofac Surg* 17(2006): 636-641.
- Cook. (2011). SIS - Small Intestine Submucosa, Produktbeschreibung.
- Correa Chem, R. und Franciosi, L. F. Dorsalis pedis free flap to close extensive palate fistulae. *Microsurgery* 4(1983): 35-39.
- Croen, L. A., Shaw, G. M., Wasserman, C. R. und Tolarova, M. M. Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. *Am J Med Genet* 79(1998): 42-47.
- Davis, J. S. und Ritchie, H. P. Classification of congenital clefts of the lip and the palate. *JAMA* 79(1922): 1323-1332.
- Derijcke, A., Eerens, A. und Carels, C. The incidence of oral clefts: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 34(1996): 488-494.
- Diah, E., Lo, L. J., Yun, C., Wang, R., Wahyuni, L. K. und Chen, Y. R. Cleft oronasal fistula: a review of treatment results and a surgical management algorithm proposal. *Chang Gung Med J* 30(2007): 529-537.
- Dua, H. S. und Azuara-Blanco, A. Corneal allograft rejection: risk factors, diagnosis, prevention, and treatment. *Indian J Ophthalmol* 47(1999): 3-9.
- Eberlinc, A. und Kozelj, V. Incidence of Residual Oronasal Fistulas: A 20-Year Experience. *Cleft Palate Craniofac J*(2011).
- Ehrenfeld. *Plastische Chirurgie im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich - Das Machbare im Auge behalten*. BZB 5(1997): 21-23.
- Ehrenfeld, M. *Zahn- Mund- Kiefer- Heilkunde*. Stuttgart - New York, Schwenzer, Ehrenfeld.(2002)
- El-Deep, M., Horswell, B. und Waite, D. E. A primate model for producing alveolar cleft defects. *J Oral Maxillofac Surg* 43(1993): 523-527.
- Fallah, D. M., Baur, D. A., Ferguson, H. W. und Helman, J. I. Clinical application of the temporoparietal-galeal flap in closure of a chronic oronasal fistula: review of the anatomy, surgical technique, and report of a case. *J Oral Maxillofac Surg* 61(2003): 1228-1230.

- Fogh-Andersen, P. Vital Statistics of Cleft Lip and Palate - Past, Present, Future. *Acta Chir Plast* 5(1963): 169-174.
- Fogh-Andersen, P. Epidemiology and etiology of clefts. *Birth Defects Orig Artic Ser* 7(1971): 50-53.
- Franklin, M. und Russek, K. 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* 25(2011): 1693-1694.
- Gabka, J. Problem of fetal heredity of facial defects & cleft palate. *Z Arztl Fortbild (Jena)* 51(1957): 278-280.
- Gabka, J. Etiology of lip, jaw and facial clefts. *Osterr Zahnärztsztg* 37(1986): 48-53.
- Gajiwala, K. und Gajiwala, A. L. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. *Cell Tissue Bank* 5(2004): 73-80.
- Gastel, J. A., Muirhead, W. R., Lifrak, J. T., Fadale, P. D., Hulstyn, M. J. und Labrador, D. P. Meniscal tissue regeneration using a collagenous biomaterial derived from porcine small intestine submucosa. *Arthroscopy* 17(2001): 151-159.
- Gomes, M. F., dos Anjos, M. J., Nogueira, T. O. und Guimaraes, S. A. Histologic evaluation of the osteoinductive property of autogenous demineralized dentin matrix on surgical bone defects in rabbit skulls using human amniotic membrane for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16(2001): 563-571.
- Grayson, B. H. und Shetye, P. R. Presurgical nasoalveolar moulding treatment in cleft lip and palate patients. *Indian J Plast Surg* 42 Suppl(2009): S56-61.
- Gritli-Linde, A. The mouse as a developmental model for cleft lip and palate research. *Front Oral Biol* 16(2012): 32-51.
- Grueterich, M., Espana, E. M. und Tseng, S. C. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol* 48(2003): 631-646.
- Güler, R., Ercan, M. T., Ulutuncel, N., Devrim, H. und Uran, N. 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(1997): 280-283.
- Handelman, C. S. und Osborne, G. Growth of the nasopharynx and adenoid development from one to eighteen years. *Angle Orthod* 46(1976): 243-259.
- Hao, Y., Ma, D. H., Hwang, D. G., Kim, W. S. und Zhang, F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 19(2000): 348-352.



- Heinritz, H. G., G Reiner, Schnurrbusch Schweinekrankheiten. Stuttgart, Ullmer.(2006)
- Hinrichsen, K. The early development of morphology and patterns of the face in the human embryo. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 98(1985): 1-79.
- Hochstetter, F. Über die Art und Weise, in welcher sich bei Säugetieren und beim Menschen aus der sogenannten Riechgrube die Nasenhöhle entwickelt, Springer.(1944)
- Hodde, J. P., Badylak, S. F., Brightman, A. O. und Voytik-Harbin, S. L. Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement. *Tissue Eng* 2(1996): 209-217.
- Hoepfner, J., Crnogorac, V., Marjanovic, G., Juttner, E., Keck, T., Weiser, H. F. und Hopt, U. T. Small intestinal submucosa for reinforcement of colonic anastomosis. *Int J Colorectal Dis* 24(2009): 543-550.
- Honnebier, M. B., Johnson, D. S., Parsa, A. A., Dorian, A. und Parsa, F. D. Closure of palatal fistula with a local mucoperiosteal flap lined with buccal mucosal graft. *Cleft Palate Craniofac J* 37(2000): 127-129.
- Hopf, T., Mittelmeier, W. und Mittelmeier, H. Spongiosa formation in plate osteosynthesis--a comparative animal experiment study of current and auto-compression plates using the Zespol principle. *Aktuelle Traumatol* 19(1989): 65-72.
- Horch, H.-H. Kraniofaziale Fehlbildungen. Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie. München, Urban & Fischer(2007).
- Hori, J., Wang, M., Kamiya, K., Takahashi, H. und Sakuragawa, N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea* 25(2006): S53-58.
- Ivy Incidence and Etiology of Clefts of Lip, Alveolus and Palate in Humans. Treatment of Patients with Clefts of Lip, Alveolus and Palate - 2nd Hamburg Internat. Symposium, July 6-8, 1964. Schuchardt. Stuttgart, Thieme(1964).
- John, T. Human amniotic membrane transplantation: past, present, and future. *Ophthalmol Clin North Am* 16(2003): 43-65, vi.
- Kallen, K. Maternal smoking and orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J* 34(1997): 11-16.
- Kamble, V. D., Parkhedkar, R. D., Sarin, S. P. und Patil, P. G. Presurgical Nasoalveolar Molding (PNAM) for a Unilateral Cleft Lip and Palate: A Clinical Report. *J Prosthodont* 22(2013): 74-80.
- Kernahan. The cleft lip and palate classification. *Plast Reconstr Surg* 51(1973): 278.

- Kesting, M. R., Loeffelbein, D. J., Classen, M., Slotta-Huspenina, J., Hasler, R. J., Jacobsen, F., Kreutzer, K., Al-Benna, S., Wolff, K. D. und Steinstraesser, L. Repair of oronasal fistulas with human amniotic membrane in minipigs. *Br J Oral Maxillofac Surg* 48(2010): 131-135.
- Kesting, M. R., Loeffelbein, D. J., Steinstraesser, L., Muecke, T., Demtroeder, C., Sommerer, F., Hoelzle, F. und Wolff, K. D. Cryopreserved human amniotic membrane for soft tissue repair in rats. *Ann Plast Surg* 60(2008): 684-691.
- Kesting, M. R., Wolff, K. D., Hohlweg-Majert, B. und Steinstraesser, L. The role of allogenic amniotic membrane in burn treatment. *J Burn Care Res* 29(2008): 907-916.
- Kim, B. S., Nikolovski, J., Bonadio, J. und Mooney, D. J. Cyclic mechanical strain regulates the development of engineered smooth muscle tissue. *Nat Biotechnol* 17(1999): 979-983.
- Kirschner, R. E., Cabiling, D. S., Slemp, A. E., Siddiqi, F., LaRossa, D. D. und Losee, J. E. Repair of oronasal fistulae with acellular dermal matrices. *Plast Reconstr Surg* 118(2006): 1431-1440.
- Koch, J. (2012). Diagnostik von Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalten; professor-koch.de.
- Koizumi, N., Inatomi, T., Quantock, A. J., Fullwood, N. J., Dota, A. und Kinoshita, S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 19(2000): 65-71.
- Kothari, C. R., Goudar, G., Hallur, N., Sikkerimath, B., Gudi, S. und Kothari, M. C. Use of amnion as a graft material in vestibuloplasty: a clinical study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 50(2012): 545-549.
- Kothary, P. M. Management of advanced cancer of the tongue. *Indian J Cancer* 8(1971): 35-39.
- Kriens, O. What is a cleft lip and palate? A multidisciplinary update. Workshop Bremen 1987. Stuttgart, Kriens, O.(1989)
- Kruse, F. E. und Meller, D. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the ocular surface. *Ophthalmologe* 98(2001): 801-810.
- Kubo, M., Sonoda, Y., Muramatsu, R. und Usui, M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(2001): 1539-1546.
- Kurokawa, N., Ueda, K. und Kuroyanagi, Y. Improvement of the maxillary bone growth suppression in the cleft palate operation with cultured dermal substitute: animal

- experiment and patient reports in preliminary clinical application. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63(2010): 456-458.
- Lee, S. B., Li, D. Q., Tan, D. T., Meller, D. C. und Tseng, S. C. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res* 20(2000): 325-334.
- Leitao, J. M., Pereira, L. A., Goncalves, F. L., Schmidt, A. F. und Sbragia, L. The ideal timing for experimental cleft lip creation. *Cleft Palate Craniofac J* 48(2011): 38-43.
- Liao, L. S., Tan, Z., Zheng, Q., Wu, J., Shi, B., He, X., Meng, T., Lu, D. W., Wang, Y. und Li, S. Animal experimental study on repairing alveolar clefts by using rectilinear distraction osteogenesis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62(2009): 1573-1579.
- Linhardt, R. J. und Hileman, R. E. Dermatan sulfate as a potential therapeutic agent. *Gen Pharmacol* 26(1995): 443-451.
- Lo, V. und Pope, E. Amniotic membrane use in dermatology. *Int J Dermatol* 48(2009): 935-940.
- Loeffelbein, D. J., Baumann, C., Stoeckelhuber, M., Hasler, R., Mucke, T., Steinstrasser, L., Drecoll, E., Wolff, K. D. und Kesting, M. R. Amniotic membrane as part of a skin substitute for full-thickness wounds: an experimental evaluation in a porcine model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 100(2012): 1245-1256.
- Losken, H. W., van Aalst, J. A., Teotia, S. S., Dean, S. B., Hultman, S. und Uhrich, K. S. Achieving low cleft palate fistula rates: surgical results and techniques. *Cleft Palate Craniofac J* 48(2011): 312-320.
- Ma, D. H., Wang, S. F., Su, W. Y. und Tsai, R. J. Amniotic membrane graft for the management of scleral melting and corneal perforation in recalcitrant infectious scleral and corneoscleral ulcers. *Cornea* 21(2002): 275-283.
- MacLeod, T. M., Sarathchandra, P., Williams, G., Sanders, R. und Green, C. J. Evaluation of a porcine origin acellular dermal matrix and small intestinal submucosa as dermal replacements in preventing secondary skin graft contraction. *Burns* 30(2004): 431-437.
- Malak, T. M., Ockleford, C. D., Bell, S. C., Dalglish, R., Bright, N. und Macvicar, J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 14(1993): 385-406.

- Mamede, A. C., Carvalho, M. J., Abrantes, A. M., Laranjo, M., Maia, C. J. und Botelho, M. F. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res* 349(2012): 447-458.
- Marazita, M. L., Hu, D. N., Spence, M. A., Liu, Y. E. und Melnick, M. Cleft lip with or without cleft palate in Shanghai, China: evidence for an autosomal major locus. *Am J Hum Genet* 51(1992): 648-653.
- Martinez Pardo, M. E., Reyes Frias, M. L., Ramos Duron, L. E., Gutierrez Salgado, E., Gomez, J. C., Marin, M. A. und Luna Zaragoza, D. Clinical application of amniotic membranes on a patient with epidermolysis bullosa. *Ann Transplant* 4(1999): 68-73.
- McPherson, T. B., Shim, H. S. und Park, K. Grafting of PEO to glass, nitinol, and pyrolytic carbon surfaces by gamma irradiation. *J Biomed Mater Res* 38(1997): 289-302.
- Meister, P. Myofibroblasten Übersicht und Ausblick. *Der Pathologe*. München, Springer Verlag. 3(1998): 187-193.
- Mejia, L. F., Acosta, C. und Santamaria, J. P. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea* 19(2000): 288-291.
- Mignatti, P., Tsuboi, R., Robbins, E. und Rifkin, D. B. In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 108(1989): 671-682.
- Milde, H. Zur Frage der Heredität bei Lippen-Kiefer-Gaumenspalten im Krankengut der Zahn-,Mund und Kieferheilkunde Würzburg. Grundlagen, Entwicklung und Fortschritte der Mund-, Kiefer- und Gesichts-Chirurgie. Deutsche Gesellschaft für Mund-, K.-u. G. und Schuchardt, K., Georg Thieme Verlag(1976).
- Mostaque, A. K. und Rahman, K. B. Comparisons of the effects of biological membrane (amnion) and silver sulfadiazine in the management of burn wounds in children. *J Burn Care Res* 32(2011): 200-209.
- Mücke, T., Loeffelbein, D. J., Holzle, F., Slotta-Huspenina, J., Borgmann, A., Kanatas, A. N., Mitchell, D. A., Wagenpfeil, S., Wolff, K. D. und Kesting, M. R. Intraoral defect coverage with prelaminated epigastric fat flaps with human amniotic membrane in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 95(2010): 466-474.
- Murrell, G. L., Requena, R. und Karakla, D. W. Oronasal fistula repair with three layers. *Plast Reconstr Surg* 107(2001): 143-147.

- Muzaffar, A. R., Byrd, H. S., Rohrich, R. J., Johns, D. F., LeBlanc, D., Beran, S. J., Anderson, C. und Papaioannou a, A. A. Incidence of cleft palate fistula: an institutional experience with two-stage palatal repair. *Plast Reconstr Surg* 108(2001): 1515-1518.
- Neumann, D. Die Häufigkeit der LKG-Spalte. Grundlagen, Entwicklung und Fortschritte der Mund-, Kiefer- und Gesichts-Chirurgie. Deutsche Gesellschaft für Mund-, K.-u. G. und Schuchardt, K. Stuttgart, Georg Thieme Verlag(1976).
- Neumann, H. Ist eine tierexperimentelle und klinische Mussbildungsprävention möglich? *Zbl Gynäkol*(1989): 1222.
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J. und Seifalian, A. M. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater* 15(2008): 88-99.
- Oelschlager, B. K., Pellegrini, C. A., Hunter, J., Soper, N., Brunt, M., Sheppard, B., Jobe, B., Polissar, N., Mitsumori, L., Nelson, J. und Swanstrom, L. Biologic prosthesis reduces recurrence after laparoscopic paraesophageal hernia repair: a multicenter, prospective, randomized trial. *Ann Surg* 244(2006): 481-490.
- Ohsumi, N., Onizuka, T. und Ito, Y. Use of a free conchal cartilage graft for closure of a palatal fistula: an experimental study and clinical application. *Plast Reconstr Surg* 91(1993): 433-440.
- Ophof, R., Maltha, J. C., Kuijpers-Jagtman, A. M. und Von den Hoff, J. W. Implantation of tissue-engineered mucosal substitutes in the dog palate. *Eur J Orthod* 30(2008): 1-9.
- Ophof, R., Maltha, J. C., Von den Hoff, J. W. und Kuijpers-Jagtman, A. M. Histologic evaluation of skin-derived and collagen-based substrates implanted in palatal wounds. *Wound Repair Regen* 12(2004): 528-538.
- Panter, K. E., Gardner, D. R. und Molyneux, R. J. Teratogenic and fetotoxic effects of two piperidine alkaloid-containing lupines (*L. formosus* and *L. arbustus*) in cows. *J Nat Toxins* 7(1998): 131-140.
- Papadaki, M. E., Kaban, L. B. und Troulis, M. J. Minipig model of maxillary distraction osteogenesis: immunohistochemical and histomorphometric analysis of the sequence of osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 70(2012): 2629-2640.
- Papadaki, M. E., Troulis, M. J., Glowacki, J. und Kaban, L. B. A minipig model of maxillary distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 68(2010): 2783-2791.

- Park, W. C. und Tseng, S. C. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(2000): 2906-2914.
- Peng, Z., Yang, K., Liu, Y., Chen, F. und Feng, G. Animal model of goat cleft palate made by uterine cavitory operations. *Chinese J. of Rep. and Reconstr. Surg.* 24(2010): 1113-1115.
- Penna, V., Bannasch, H. und Stark, G. B. The turbinate flap for oronasal fistula closure. *Ann Plast Surg* 59(2007): 679-681.
- Pessolato, A. G., Martins Ddos, S., Ambrosio, C. E., Mancares, C. A. und de Carvalho, A. F. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. *Burns* 37(2011): 1192-1201.
- Pfeifer, G. Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Stuttgart, Thieme.(1989)
- Phua, Y. S. und de Chalain, T. Incidence of oronasal fistulae and velopharyngeal insufficiency after cleft palate repair: an audit of 211 children born between 1990 and 2004. *Cleft Palate Craniofac J* 45(2008): 172-178.
- Politzer, G. und Stockinger, L. Etiology of the dorsal cleft of the body. *Frankf Z Pathol* 64(1953): 381-394.
- Posnick, J. C. und Getz, S. B., Jr. Surgical closure of end-stage palatal fistulas using anteriorly-based dorsal tongue flaps. *J Oral Maxillofac Surg* 45(1987): 907-912.
- Ramasastry, S. S. Acute wounds. *Clin Plast Surg* 32(2005): 195-208.
- Reinert, S. und Krimmel, M. Das Tübinger Konzept zur chirurgischen Behandlung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. *Forum Logopädie* 3(2003): 6-11.
- Reynolds, P. R., Schaalje, G. B. und Seegmiller, R. E. Combination therapy with folic acid and methionine in the prevention of retinoic acid-induced cleft palate in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67(2003): 168-173.
- Riau, A. K., Beurman, R. W., Lim, L. S. und Mehta, J. S. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials* 31(2010): 216-225.
- Robertson, A. G., McKeown, D. J., Bello-Rojas, G., Chang, Y. J., Rogers, A., Beal, B. J., Blake, M. und Jackson, I. T. Use of buccal myomucosal flap in secondary cleft palate repair. *Plast Reconstr Surg* 122(2008): 910-917.
- Robson, M. C. und Krizek, T. J. The effect of human amniotic membranes on the bacteria population of infected rat burns. *Ann Surg* 177(1973): 144-149.
- Rohen, J. Anatomie des Menschen, Schattauer Verlag.(2006)

- Rohleder, N. H., Loeffelbein, D. J., Feistl, W., Eddicks, M., Wolff, K. D., Gulati, A., Steinstraesser, L. und Kesting, M. R. Repair of oronasal fistulae by interposition of multilayered amniotic membrane allograft. *Plast Reconstr Surg* 132(2013): 172-181.
- Rommel, N., Rohleder, N. H., Gabriel, C., Hennerbichler, S., Bauer, F., Mucke, T., Kolk, A., Loeffelbein, D. J., Wolff, K. D. und Kesting, M. R. Secondary correction of posttraumatic orbital wall adhesions by membranes laminated with amniotic membrane. *Br J Oral Maxillofac Surg*(2013).
- Rösch, V. S., I Röse. Häufigkeit oraler Spaltbildung in der Region Magdeburg. *Mund Kiefer Gesichtschirurgie*(1998): 5-10.
- Sadhu, P. Oronasal fistula in cleft palate surgery. *Indian J Plast Surg* 42 Suppl(2009): S123-128.
- Sadler, W. Medizinische Embryologie - Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. Stuttgart - New York, Thieme.(2003)
- Samandari, M. H., Yaghmaei, M., Ejlali, M., Moshref, M. und Saffar, A. S. Use of amnion as a graft material in vestibuloplasty: a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97(2004): 574-578.
- Sandusky, G. E., Lantz, G. C. und Badylak, S. F. Healing comparison of small intestine submucosa and ePTFE grafts in the canine carotid artery. *J Surg Res* 58(1995): 415-420.
- Saxen, I. The association between maternal influenza, drug consumption and oral clefts. *Acta Odontol Scand* 33(1975): 259-267.
- Schallberger, S. P., Stanley, B. J., Hauptman, J. G. und Steficek, B. A. Effect of porcine small intestinal submucosa on acute full-thickness wounds in dogs. *Vet Surg* 37(2008): 515-524.
- Schlegel, K. A., Rupprecht, S., Petrovic, L., Honert, C., Srour, S., von Wilmowsky, C., Felszegy, E., Nkenke, E. und Lutz, R. Preclinical animal model for de novo bone formation in human maxillary sinus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108(2009): e37-44.
- Scholzen, T. und Gerdes, J. The Ki-67: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182(2000): 311-322.
- Schultz, R. C. Management and timing of cleft palate fistula repair. *Plast Reconstr Surg* 78(1986): 739-747.

- Schultz, R. C. Cleft palate fistula repair. Improved results by the addition of bone. *J Craniomaxillofac Surg* 17 Suppl 1(1989): 34-36.
- Schüpbach, P. M., Dorig-Schwarzenbach, A. G. und Schroeder, H. E. Rare total and partial palatal clefts experimentally induced in the rat. *Cleft Palate J* 21(1984): 204-218.
- Seo, J. H., Kim, Y. H. und Kim, J. S. Properties of the amniotic membrane may be applicable in cancer therapy. *Med Hypotheses* 70(2008): 812-814.
- Shao, C., Sima, J., Zhang, S. X., Jin, J., Reinach, P., Wang, Z. und Ma, J. X. Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(2004): 1758-1762.
- Shimmura, S., Shimazaki, J., Ohashi, Y. und Tsubota, K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 20(2001): 408-413.
- Siems, W. *Allgemeine Krankheitslehre für Physiotherapeuten.* (2009).
- Siewert, J. R. *Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.* Chirurgie. Springer(2006): 282-288.
- Sippel, K. C., Ma, J. J. und Foster, C. S. Amniotic membrane surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 12(2001): 269-281.
- Smith, D. M., Vecchione, L., Jiang, S., Ford, M., Deleyiannis, F. W., Haralam, M. A., Naran, S., Worrall, C. I., Dudas, J. R., Afifi, A. M., Marazita, M. L. und Losee, J. E. The Pittsburgh Fistula Classification System: a standardized scheme for the description of palatal fistulas. *Cleft Palate Craniofac J* 44(2007): 590-594.
- Solomon, A., Rosenblatt, M., Monroy, D., Ji, Z., Pflugfelder, S. C. und Tseng, S. C. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 85(2001): 444-449.
- Sorsby, A. und Symons, H. M. Amniotic Membrane Grafts in caustic burns of the Eye (Burns of the second degree). *Br J Ophthalmol* 30(1946): 337-345.
- Spengler, A. L., Chavarria, C., Teichgraeber, J. F., Gateno, J. und Xia, J. J. Presurgical nasoalveolar molding therapy for the treatment of bilateral cleft lip and palate: A preliminary study. *Cleft Palate Craniofac J* 43(2006): 321-328.
- Sphrintzen Syndrom of Clefting: Up date. What is a Cleft Lip and Palate? A Multidisciplinary Update. Proceedings of an Advanced Workshop, Bremen 1987. Kriens, O. Stuttgart, Thieme(1989).
- Tessier, P. Anatomical classification facial, cranio-facial and latero-facial clefts. *J Maxillofac Surg* 4(1976): 69-92.



- Tiedemann, K. The allantoic and amniotic epithelia of the pig: SEM and TEM studies. *Anat Embryol (Berl)* 156(1979): 53-72.
- Timpl, R., Martin, G. R., Bruckner, P., Wick, G. und Wiedemann, H. Nature of the collagenous protein in a tumor basement membrane. *Eur J Biochem* 84(1978): 43-52.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M. und Martin, G. R. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254(1979): 9933-9937.
- Töndury, G. Pathogenesis of congenital malformations. *Med Klin* 69(1974): 617-625.
- Töndury, G. The normal and abnormal development of the central facial areas. *Rhinology* 17(1979): 133-142.
- Tseng, S. C., Li, D. Q. und Ma, X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 179(1999): 325-335.
- Tunte, W. Is there a secular increase in the incidence of cleft lip and cleft palate? *Cleft Palate J* 6(1969): 430-433.
- Ueno, T., Pickett, L. C., de la Fuente, S. G., Lawson, D. C. und Pappas, T. N. Clinical application of porcine small intestinal submucosa in the management of infected or potentially contaminated abdominal defects. *J Gastrointest Surg* 8(2004): 109-112.
- Valhova, I. Study of the polygenic character of cleft palate in model experiment in inbred mice strains. *Acta Chir Plast* 12(1970): 251.
- Van Damme, P. A. und Freihofer, H. P. Palatal mucoperiosteal expansion as an adjunct to palatal fistula repair: case report and review of the literature. *Cleft Palate Craniofac J* 33(1996): 255-257.
- van Damme, P. A., Freihofer, H. P., van't Hof, M. A., Kuijpers-Jagtman, A. M., Maltha, J. C. und Spijkers, J. M. Radiologic analysis of the effects of subperiosteal palatal soft-tissue expansion in growing cats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 23(1994): 393-394.
- Vanderas, A. P. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft Palate J* 24(1987): 216-225.
- Veau, V. Division palatine. Masson et Cie(1931).
- Velez, I., Parker, W. B., Siegel, M. A. und Hernandez, M. Cryopreserved amniotic membrane for modulation of periodontal soft tissue healing: a pilot study. *J Periodontol* 81(2010): 1797-1804.

- Verter, E. E., Gisel, T. E., Yang, P., Johnson, A. J., Redmond, R. W. und Kochevar, I. E. Light-initiated bonding of amniotic membrane to cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(2011): 9470-9477.
- von Versen-Hoyneck, F., Syring, C., Bachmann, S. und Moller, D. E. The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts--light and scanning electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank* 5(2004): 45-56.
- Wang, M., Yoshida, A., Kawashima, H., Ishizaki, M., Takahashi, H. und Hori, J. Immunogenicity and antigenicity of allogeneic amniotic epithelial transplants grafted to the cornea, conjunctiva, and anterior chamber. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(2006): 1522-1532.
- Wang, Y., Kochevar, I. E., Redmond, R. W. und Yao, M. A light-activated method for repair of corneal surface defects. *Lasers Surg Med* 43(2011): 481-489.
- Wenghoefer, M. H., Deprest, J., Goetz, W., Kuijpers-Jagtman, A. M. und Berge, S. Prenatal cleft lip and maxillary alveolar defect repair in a 2-step fetal lamb model. *J Oral Maxillofac Surg* 65(2007): 2479-2486.
- Werler, M. M., Hayes, C., Louik, C., Shapiro, S. und Mitchell, A. A. Multivitamin supplementation and risk of birth defects. *Am J Epidemiol* 150(1999): 675-682.
- Werler, M. M., Lammer, E. J., Rosenberg, L. und Mitchell, A. A. Maternal cigarette smoking during pregnancy in relation to oral clefts. *Am J Epidemiol* 132(1990): 926-932.
- Wong, F. K. und Hagg, U. An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med J* 10(2004): 331-336.
- Yang, S., Stelnicki, E. J. und Lee, M. N. Use of nasopalveolar molding appliance to direct growth in newborn patient with complete unilateral cleft lip and palate. *Pediatr Dent* 25(2003): 253-256.
- Yoshita, T., Kobayashi, A., Sugiyama, K. und Tseng, S. C. Oxygen permeability of amniotic membrane and actual tear oxygen tension beneath amniotic membrane patch. *Am J Ophthalmol* 138(2004): 486-487.

## 12. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Diagnoseschema mit Hilfe der LASHAL Klassifikation	9
Abbildung 2:	Das Pittsburgher Klassifikationssystem der oronasalen Fisteln	13
Abbildung 3:	Aufbau der menschlichen Eihaut	18
Abbildung 4:	Ferkel noch eingehüllt in Amnionmembran	29
Abbildung 5:		
Abbildung 5a:	Oberkiefer unmittelbar vor der Defektsetzung mit der Biopsiestanze	31
Abbildung 5b:	Dargestellter Defekt bis zum Septum nasi, intraoperativ	31
Abbildung 6:		
Abbildung 6a:	Multilayer Amnion wird positioniert	32
Abbildung 6b:	Amnion ist über dem Defekt positioniert und fixiert	32
Abbildung 7:		
Abbildung 7a:	Markierung der Entnahmestelle auf der Wangeninnenseite	33
Abbildung 7b:	Primärer Wundverschluss nach der Entnahme	33
Abbildung 7c:	Defektdeckung mit autologer Mundschleimhaut	33
Abbildung 8:	Mit zwei Schrauben fixierte Verbandplatte am Ende der Operation	34
Abbildung 9:	Defekt nach zweiwöchiger Selbstheilungsphase	46
Abbildung 10:		
Abbildung 10a:	Postoperativer Tag 3, Tier: 1: zentraler Defekt bedeckt mit Amnionmembran	46
Abbildung 10b:	Postoperativer Tag 7, Tier 3: Annähern der Wundränder	46
Abbildung 10c:	Postoperativer Tag 10, Tier 5: entzündungsfreie Region der mit Amnion operierten Fistel	47
Abbildung 10d:	Postoperativer Tag 76, Tier 1: entzündungsfreie Schleimhaut ohne oronasale Fistel	47
Abbildung 11:		
Abbildung 11a:	Postoperativer Tag 3, Tier 10: Defekt mit Amnion bedeckt	48
Abbildung 11b:	Postoperativer Tag 7, Tier 10: Foto mit Verbandplatte	48
Abbildung 11c:	Postoperativer Tag 10, Tier 10: nach Nahtentfernung	48
Abbildung 11d:	Postoperativer Tag 76, Tier 10: entzündungsfreie Schleimhaut ohne oronasale Fistel	48

Abbildung 12:	
Abbildung 12a: Postoperativer Tag 3, Tier 14: starke Rötung, zentraler mit autologer Mundschleimhaut bedeckter Defekt	49
Abbildung 12b: Postoperativer Tag 7, Tier 14: geringere Rötung, zentraler Defekt vollständig bedeckt	49
Abbildung 12c: Postoperativer Tag 10, Tier 14: bedeckter zentraler Defekt, auffällige morphologische Veränderungen	50
Abbildung 12d: Postoperativer Tag 76, Tier 14: Mundschleimhaut ohne oronasale Fistel, allerdings mit veränderter Morphologie der Gaumenschleimhaut	50
Abbildung 13: Postoperativer Tag 76, Tier 13: oronasale Fistel 5mm	50
Abbildung 14:	
Abbildung 14a: Postoperativer Tag 3, Tier 20: zentraler Defekt, mit SIS bedeckt, keine übermäßige Rötung	51
Abbildung 14b: Postoperativer Tag 7, Tier 21: verkleinerter zentraler Defekt, Annäherung der Wundränder	51
Abbildung 14c: Postoperativer Tag 10, Tier 21: deutliche Verkleinerung des Defekts	52
Abbildung 14d: Postoperativer Tag 76, Tier 21: vollständig geschlossener Defekt mit entzündungsfreier Gaumenschleimhaut	52
Abbildung 15:	
Abbildung 15a: Grad 0, am Beispiel Tier 20, POT 10	53
Abbildung 15b: Grad 1, am Beispiel Tier 21, POT 10	53
Abbildung 15c: Grad 2, am Beispiel Tier 14, POT 10	53
Abbildung 16: Vergleich Wundheilungsverlauf Gruppe I-IV nach Rekonstruktion des Gaumendefekts	54
Abbildung 17:	
Abbildung 17a: HE Präparat Tier 2, Fistelgangresiduum	56
Abbildung 17b: HE Präparat Tier 2, orales Plattenepithel	56
Abbildung 18: HE Präparat Tier 1 in Übersicht und Vergrößerung	57
Abbildung 19: HE Präparat Tier 11 in Übersicht und Vergrößerung	58
Abbildung 20: HE Präparat Tier 13 als Übersicht	59
Abbildung 21: HE Präparat Tier 15 in Übersicht und Vergrößerung	60

Abbildung 22: HE Präparat Tier 23 in Übersicht und Vergrößerung	61
Abbildung 23: Immunhistologie, Beispiel Lamininfärbung Tier 11	65
Abbildung 24: Immunhistologie, Beispiel Lamininfärbung Tier 20	65
Abbildung 25: Immunhistologie, Beispiel Ki67 Tier 24	66
Abbildung 26: Immunhistologie, Beispiel van Willebrandt Faktor Tier 2	66
Abbildung 27: Immunhistologie, Beispiel van Willebrandt Faktor Tier 24	66

### 13. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Internationale Klassifikation der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten	8
Tabelle 2:	Beispiele der Chiffrierung der LASHAL Klassifikation	9
Tabelle 3:	Versuchsgruppen Übersicht	28
Tabelle 4:	Übersicht Beobachtungszeitraum	35
Tabelle 5:	Protokoll Lamininfärbung	37
Tabelle 6:	Protokoll Actinfärbung	39
Tabelle 7:	Protokoll Ki-67- Färbung	41
Tabelle 8:	Protokoll Von-Willebrand-Faktor-Färbung	44
Tabelle 9:	Entzündungswerte Versuchsgruppe I	53
Tabelle 10:	Entzündungswerte Versuchsgruppe II	53
Tabelle 11:	Entzündungswerte Versuchsgruppe III	54
Tabelle 12:	Entzündungswerte Versuchsgruppe IV	54
Tabelle 13:	Defektheilung Versuchsgruppe I	62
Tabelle 14:	Defektheilung Versuchsgruppe II	62
Tabelle 15:	Defektheilung Versuchsgruppe III	62
Tabelle 16:	Defektheilung Versuchsgruppe IV	62
Tabelle 17:	Versuchsgruppen in relativen und absoluten Häufigkeiten (Ossäre Defekte)	63
Tabelle 18:	Versuchsgruppen in relativen und absoluten Häufigkeiten (Fistelgangresiduen)	64

## 14. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. med. dent. Marco Kesting für die freundliche Überlassung des Themas der Promotionsarbeit und die Unterstützung während des Projekts.

Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. med. dent. Denys Loeffelbein möchte ich herzlich für die außerordentliche Betreuung während der Versuchsreihe und beim Anfertigen der Arbeit danken.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Mechthild Stöckelhuber gilt mein Dank für die geduldigen Erklärungen zu histologischen Fragen und auch für die Bereitstellung ihres Büros zur Begutachtung und Auswertung.

Vielen Dank auch an Professor Dr. habil. Dr. med. vet. Karl Heinritzi und das gesamte Team der Schweineklinik Oberschleißheim ohne deren Engagement diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und die mich sogar an den Propädeutik Kursen zum Thema Schwein teilnehmen ließen. Insbesondere Dr. med. vet. Matthias Eddicks hatte mit seinem umfassenden Wissen immer ein offenes Ohr für das humanmedizinische Team. Danke auch an Dr. med. vet. Ute Halfmann für die Unterstützung im Rahmen der Tierbetreuung und Versuchsdurchführung.

Bei Herrn Professor Dr. oec. publ. Stefan Wagenpfeil möchte ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanken.

Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Nils Rohleder danke ich für seine Unterstützung während des Projekts und seine wertvollen Ratschläge. Außerdem danke ich Frau Dr. med. Claudia Baumann, die sich sehr viel Zeit nahm, um mich in die Laborarbeit einzuweisen und mir viele Tipps für reibungslose Abläufe gab.

Enken Drecolle möchte ich für die Hilfe bei der Auswertung der histologischen Präparate danken.

Meiner Freundin Dr. med. dent. Jasmin Schnorrenberg möchte ich dafür danken, dass sie mir diese Arbeit vermittelt und mich immer wieder zum Weiterschreiben motiviert hat.

Niels Niemann danke ich für die Unterstützung über den gesamten Zeitraum der Dissertation.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Ihr habt mir das Studium und damit auch diese Dissertation ermöglicht. Danke, von ganzem Herzen.

## 15. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Anne Ania Nuber  
 Geburtsdatum: 17. August 1984  
 Geburtsort: Landau in der Pfalz  
 Familienstand: ledig  
 Konfession: evangelisch

### Beruflicher Werdegang:

2004 Erlangung der Hochschulreife am Max-Slevogt-Gymnasium in Landau in der Pfalz

2004-2009 Studium der Zahn- Mund- und Kieferheilkunde an der Universität Witten/ Herdecke

2010 Assistenz Zahnärztin Praxis Dr. Michael Hecht MSc., Erding  
 Assistenz Zahnärztin Praxis Dr. Achim Schmidt MSc., München  
 Beginn der Dissertation an der Technischen Universität München

2011 Assistenz Zahnärztin Praxis Dr. Oliver Tillich, München  
 Assistenz Zahnärztin Praxis Dr. Andreas Gottschlich, München

Seit 2012 Assistenz Zahnärztin Praxis Dr. Martin Bernhardt, München