

**Aus der Klinik und Poliklinik für
Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Christoph-Thomas Germer**



**Makroskopische und histologische Analysen im Rattenmodell zum erstmaligen
Einsatz von Lyoplast® als Therapieoption kongenitaler Zwerchfellhernien**

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
NORA LUISE SCHÖNFELD
aus Cadolzburg

Würzburg, April 2016

Referent: Univ. – Prof. Dr. Th. Meyer

Korreferent: Prof. Dr. F. Schuster

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. November 2016
Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 2. | Einführung | 3 |
| 2.1 | Anatomische Grundlagen | 3 |
| 2.2 | Embryologie und Entstehung einer kongenitalen Zwerchfellhernie | 4 |
| 2.3 | Überblick über pränatale Diagnostik und mögliche Intervention..... | 6 |
| 2.4 | Überblick über das postnatale Management..... | 8 |
| 3. | Fragestellung | 10 |
| 4. | Material und Methoden | 11 |
| 4.1 | Zeitlicher Ablauf der Studie | 11 |
| 4.2 | Die zu vergleichenden Materialien..... | 12 |
| 4.2.1 | Gore-Tex© (PTFE)..... | 12 |
| 4.2.2 | Lyoplant® | 12 |
| 4.3 | Das Tiermodell..... | 12 |
| 4.4 | Operatives Vorgehen..... | 13 |
| 4.4.1 | Implantation | 13 |
| 4.4.2 | Explantation..... | 15 |
| 4.5 | Histologische Untersuchungen..... | 15 |
| 4.5.1 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE- Färbung) | 16 |
| 4.5.2 | Masson-Goldner-Färbung..... | 16 |
| 4.5.3 | Immunhistologische Färbungen | 17 |
| 5. | Ergebnisse..... | 21 |
| 5.1 | Entwicklung der Tiere post Implantation | 21 |
| 5.2 | Gewichtsentwicklung der Tiere | 21 |
| 5.3 | Makroskopische Ergebnisse bei Explantation | 24 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 5.4 | Ergebnisse der histologischen Auswertungen | 27 |
| 5.4.1 | Auswertung der HE-Färbungen | 28 |
| 5.4.1.1 | Analyse der Übergangsbereiche..... | 29 |
| 5.4.1.1.1 | Statistische Analyse | 30 |
| 5.4.1.2 | Analyse der Kapillarisation | 32 |
| 5.4.1.2.1 | Statistische Analyse | 33 |
| 5.4.2 | Auswertung der Masson-Goldner-Färbung..... | 35 |
| 5.4.3 | Immunhistologische Auswertung..... | 37 |
| 6. | Diskussion | 43 |
| 6.1 | Beurteilung der Machbarkeit | 43 |
| 6.2 | Bewertung der Adhäsionstendenz | 44 |
| 6.3 | Beurteilung der Integration und des Umbaus..... | 45 |
| 6.3.1 | Quantifizierte Kapillarisation..... | 48 |
| 6.4 | Beurteilung der immunologischen Prozesse | 49 |
| 6.5 | Einordnung Lyoplant® im Vergleich mit anderen Materialien..... | 51 |
| 6.6 | Ausblick..... | 54 |
| 7. | Zusammenfassung..... | 56 |
| 8. | Anhang..... | 58 |
| 8.1 | Überblick über Verwachsungen bei Explantation | 58 |
| 8.2 | Anzahl der Vermessungen je Tier zur Analyse der Übergangsbereiche .. | 61 |
| 9. | Abbildungsverzeichnis | 63 |
| 10. | Tabellenverzeichnis | 64 |
| 11. | Literaturverzeichnis | 65 |

Danksagung

Lebenslauf

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|---------|--|
| %LH | prozentuale Leberherniation |
| (G) | Gore-Tex© |
| (L) | Lyoplast® |
| CDH | Congenital Diaphragmatic Hernia (kongenitale Zwerchfellhernie) |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| dest. | destilliert |
| ECMO | Extrakorporale Membran Oxygenierung |
| FETO | Fetoskopische tracheale Okklusion |
| Fog2 | Transkriptionsfaktor, Friend of Gata2 |
| Gata4 | Transkriptionsfaktor, GATA binding protein 4 |
| HE | Hämatoxylin-Eosin-Färbung |
| IL-10 | Interleukin - 10 |
| IL-4 | Interleukin - 4 |
| LHR | Lung-to-Head-Ratio |
| LPÜ | Leber-Patch-Übergang |
| MPÜ | Muskel-Patch-Übergang |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| NDST1 | N-deacetylase/ N-sulfotransferase 1 |
| Nr2f2 | Nuclear Receptor Subfamily 2, Group F, Member 2 |
| NSA-BGS | Normal Goat Serum/ Albumin bovine Serum |
| o/e LHR | Observed/expected Lung-to-Head-Ratio |
| o/eTFLV | Observed/expected total fetal lung volume |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PTFE | Polytetrafluoroethylen |
| PLGA | Poly-lactic-co-glycolic-acid |
| PLS | Patch-Leber-Seite |
| PM | Patchmitte |
| PMS | Patch-Muskel-Seite |

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| sec. | Sekunden |
| SIS® | Surgisis® |
| SSW | Schwangerschaftswoche |
| T61 | Embutramid + Mebezonium + Tetracain |
| TH1 | Typ1-T-Zellen |
| TH2 | Typ2-T-Zellen |
| TNF α | Tumor-Nekrose-Faktor Alpha |
| WF | Wistar Furth Ratte |

1. Einleitung

Das komplexe Krankheitsbild der kongenitalen Zwerchfellhernie stellt eine große Herausforderung für die Kinderchirurgie dar.

Diese im Jahr 1575 erstmals beschriebene, angeborene Fehlbildung tritt mit einer Häufigkeit von 1:2000 – 1:4000 Neugeborenen pro Jahr auf [1-4]. Wie schwerwiegend diese Fehlbildung ist, fällt vor allem auf, wenn man auch das Auftreten einer kongenitalen Zwerchfellhernie (CDH) bezogen auf Aborte, Todgeburten und intrauterinen Fruchttod berücksichtigt. Dann liegt die Inzidenz des Defektes deutlich höher, denn ca 58% der Kinder versterben vorgeburtlich. Von den lebendgeborenen Kindern mit CDH versterben postnatal, trotz ständigen Fortschritts in der pränatalen Diagnostik, Therapie und medizinischer Versorgung, nochmals etwa 50 % - eine Zahl die auch bereits 1946 beschrieben wurde. Insgesamt liegt das Überleben damit bei nur 24,4% [1, 5, 6]. In einigen großen Therapiezentren konnten in den letzten Jahren auch geringere postnatale Mortalitätsraten (26% [7], 7% [8], 20% [9]) erreicht werden.

Neben einer Vielzahl anderer Maßnahmen, wie die Beatmung und Behandlung der pulmonalen Hypertonie, ist die operative Defektkorrektur ein wichtiger Schritt in der Behandlung der kongenitalen Zwerchfellhernie. Diese findet nach initialer intensivmedizinischer Stabilisierung des Neugeborenen statt. Je nach Größe der Hernie kann die Rekonstruktion des Zwerchfells durch Direktnaht durchgeführt werden oder die Indikation zum Patch-Verschluss muss gestellt werden. Dies ist bei etwa 50% der lebendgeborenen CDH-Kinder notwendig [10].

Die Frage nach dem optimalen Patch gibt immer wieder Anlass zu neuen Forschungsansätzen [11-18]. Ein seit langem etabliertes Material in der Medizin ist das anorganische, künstlich hergestellte Polytetrafluorethylen [=PTFE; $(C_2F_4)_n$] Gore-Tex®. Vor allem die Implantatoptionen aus Gore-Tex® haben sich stetig entwickelt und durch verschiedene Modifikationen der Polymere werden sie in nahezu allen Bereichen der chirurgischen Intervention verwendet. In Zeiten von „Tissue-Engineering“ treten auch biokompatible Materialien immer mehr in den Vordergrund der Forschung [11, 19]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich dabei mit dem Material

Lyoplast[®], ein reines Kollagenimplantat aus Rinderperikard, welches derzeit vor allem im Bereich der Neurochirurgie zur Deckung von Duralücken verwendet wird [20].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einsatz eines neuen biokompatiblen Materials (Lyoplast[®]) zur Defektdeckung von großen kongenitalen Zwerchfellhernien und damit einer Therapieoption in der postnatalen Versorgung im Rattenmodell zu etablieren.

2. Einführung

2.1 Anatomische Grundlagen

Das Zwerchfell ist der zentrale Atemmuskel des Menschen. Neben der Funktion als Atemmuskel dient das Zwerchfell auch als Barriere zwischen der Thoraxapertur und dem Abdomen. Nur bei Kontinuität des Zwerchfells kann innerhalb der Brusthöhle ein geringerer Druck als in der Abdominalhöhle beibehalten werden. Das Niederdrucksystem in der Thoraxhöhle dient nicht nur der Ausdehnung des elastischen Lungengewebes durch Verwachsung mit der Pleura viszeralis, sondern entlastet auch das Herz und fördert dadurch die Aufrechterhaltung des Kreislaufs. Zusätzlich zur regelmäßigen und unwillkürlichen Zwerchfellkontraktion, die zur Atemarbeit erforderlich ist, ist auch eine willkürliche Kontraktion des Zwerchfells möglich. Dies ist bei Betätigung der Bauchpresse, beispielsweise im Rahmen der Defäkation oder beim Erbrechen, unerlässlich [21].

Das Zwerchfell spannt sich kuppelförmig zwischen den beiden Körperhöhlen auf. Bedingt durch die darunterliegenden Organe, rechtsseitig die Leber und linksseitig Magen und Milz, bildet sich eine Asymmetrie mit einer etwas höheren Kuppel rechts aus. Anatomisch unterteilt man den Muskel je nach Ursprung in drei Teile:

(1) Pars costales, welche beidseits am Unterrand der Rippen und des Rippenknorpels der 7. bis 12. Rippe entspringen und sich mit den Ursprüngen des Musculus transversus abdominis verzahnt.

(2) Pars sternalis, welche unpaarig an der Rückfläche des Processus xiphoideus und dem hinteren Blatt der Rekussscheide entspringt.

(3) Die Pars lumbalis unterteilt sich wiederum in einen medialen und einen lateralen Teil, welche sich wiederum in jeweils rechten bzw. linken Schenkel aufgliedern. Die Pars mediales haben ihren Ursprung an den 3. (linksseitig) bzw. 4. (rechtsseitig) Lendenwirbelkörpern sowie den zugehörigen Disci intervertebrales. Die Pars laterales entspringen, vereinfacht dargestellt, der Psoas- und Quadratusarkade.

Alle Zwerchfellanteile vereinigen sich im Centrum tendineum [21, 22].

Zwischen den beschriebenen Muskelanteilen bilden sich physiologische Schwachstellen aus. Diese Bereiche sind lediglich von einer lockeren Bindegewebsschicht verschlossen, was zu einer erhöhten Bruchfrequenz führt. Zwischen Pars costalis und Pars lumbalis wird diese Prädilektionsstelle Trigonum lumbocostale oder auch Bochdalek-Dreieck genannt. Das linksseitige Trigonum sternocostale, zwischen Pars sternalis und Pars costalis, wird als Larrey-Spalte bezeichnet. Derselbe Bereich rechtsseitig trägt den Namen Morgagni-Spalte [21, 23].

Nicht nur für die erworbenen Zwerchfellhernien sind dies Prädilektionsstellen, auch die angeborenen Zwerchfellhernien können sich im Bereich des Trigonum sternocostale und lumbocostale befinden [21]. Am häufigsten - mit 80-90% aller Fälle - sind die linksseitigen Defekte der Zwerchfellmuskulatur im Bereich des Bochdalek-Dreiecks. Es folgen die rechtsseitigen Hernien mit 11% der Fälle. Die beidseitige, sternocostale Larrey-Hernie ist mit 2 % eher selten [2, 5].

2.2 Embryologie und Entstehung einer kongenitalen Zwerchfellhernie

Die genauen embryologischen Vorgänge bei der Entstehung des Zwerchfells und auch die Pathogenese der kongenitalen Zwerchfellhernie sind sehr komplex und derzeit noch nicht endgültig geklärt. Die Erkenntnisse über die embryonalen Prozesse entstammen vor allem tierexperimentellen Studien.

Der embryonale Ursprung des Zwerchfells geht auf drei Strukturen zurück:

- (1) Septum transversum (mesodermalen Ursprungs)
- (2) Pleuro-peritoneale Falte (posthepatische mesenchymale Platte [24])
- (3) Myozyten aus zervikalen Somiten.

Zunächst entsteht das Septum transversum, welches die intraembryonale Höhle in eine pleuro-perikardiale und eine peritoneale Höhle unterteilt. Eine Kommunikation der beiden Körperhöhlen findet weiter über die pleuro-peritonealen Kanäle statt. In der 4. - 6. embryonalen Entwicklungswoche des Menschen wird eine pyramidenförmige Struktur beidseits des Ösophagus sichtbar - die pleuro-peritonealen Falten - in die die pleuro-peritonealen Kanäle einwachsen und sich entlang der

Leberoberfläche nach medial und ventral ausbreiten. Sie vereinigen sich in der 7. Woche mit dem Septum transversum und dem Mesenterium des Ösophagus. Es folgt die Einwanderung von Muskelvorläuferzellen aus den zervikalen Somiten und Axonen des Nervus phrenicus. Die Differenzierung der Myoblasten zu Myofibrillen beginnt beidseits posterolateral und setzt sich über das gesamte Zwerchfell, mit Ausnahme des Zentrum tendineums, fort. Dies ist beim Menschen in etwa mit der 10. Embryonalwoche abgeschlossen. Die Entstehung des Zwerchfells findet demnach maßgeblich in der 8.- 12. Schwangerschaftswoche (SSW) statt [5, 21, 22, 24-26].

Die Pathogenese, die zur Ausbildung einer kongenitalen Zwerchfellhernie führt, scheint mesenchymalem Ursprung zu sein und nicht durch mangelnde Muskularisation begründet [27]. Im Spezielleren konnte in Tierexperimenten gezeigt werden, dass Mutationen in der pleuro-peritonealen Falte zum Defekt der kongenitalen Zwerchfellhernie führen [22, 28]. Diese ist Ursprung für das muskuläre Bindegewebe, welches die Muskularisierung und Entwicklung des Zwerchfells zu regulieren scheint [28]. Hierbei wird eine Störung im Retinoidstoffwechsel als ursächlich diskutiert [26]. Auch die Teratogenität von Nitrofen, welche bereits bei singulärer Gabe in der vulnerablen Phase zur Ausbildung einer Zwerchfellhernie führt, wird über den Einfluss in den Retinoidstoffwechsel begründet [22, 29-31]. Eine andere Hypothese postuliert, dass Störungen in der embryonalen Angiogenese für die Defektbildung verantwortlich wären [32]. Es konnten etliche Gene (beispielhaft: Gata4, Fog2, Nr2f2, NDST1) und Genloci (beispielhaft: 8p23.1, 8q22-23, 15q26.1-26.2), die mit der Ausbildung einer CDH assoziiert sind, auffindig gemacht werden [26]. Auch das Auftreten von CDH im Rahmen verschiedenster Syndrome (zum Beispiel: Brachmann-de Lange Syndromen, Fryns Syndrom, Trisomie 13, Trisomie 18) wurde mehrfach beschrieben [26, 33, 34].

Das postnatale Überleben der Patienten mit Zwerchfellhernie hängt maßgeblich von der pulmonalen Entwicklung ab. Respiratorische Probleme, bedingt durch pulmonale Hypoplasie und arterielle pulmonale Hypertonie, stellen postnatal die häufigste Todesursache dar. Direkt postnatal fallen die Neugeborenen bei ausgeprägtem Befund

durch Zyanose, Dyspnoe und inspiratorischen Stridor auf. Es kann zur respiratorischen Insuffizienz kommen. Die schwere pulmonale Hypertonie präsentiert sich normalerweise einige Stunden nach Geburt. Die therapierefraktäre, persistierende pulmonale Hypertonie verläuft langfristig letal. Sie führt zu Lungenschädigung und durch den Hochdruck im kleinen Kreislauf zu Rechtsherzinsuffizienz [5, 35-38]. Auch hier ist die embryonale Pathogenese unklar. Da beide Lungenseiten betroffen sind, die zur Hernie ipsilaterale Seite jedoch stärker beeinträchtigt ist, wurde die „Dual-Hit Hypothese“ aufgestellt. Nach dieser wird die Lungenentwicklung zum einen durch die mechanische Kompression hernierter Abdominalorgane in die Thoraxhöhle beeinträchtigt. Zum anderen scheinen aber auch genetischen Mutationen, welche zur Ausbildung der Zwerchfellhernie führen, einen direkten störenden Einfluss auf die Lungenentwicklung zu nehmen [28, 39-42]. Zusätzlich kommt es durch die Reduktion der Gefäßäste und die Verdickung von Adventitia und Media der pulmonalen Gefäße postnatal zur Ausbildung der pulmonalen Hypertonie [43].

2.3 Überblick über pränatale Diagnostik und mögliche Intervention

Die frühzeitige intrauterine und kompetente Einschätzung der Fehlbildung ist entscheidend für das perinatale Management und damit für das Überleben des Neugeborenen. Wichtig ist vor allem mittels validen prädiktiven Parametern die Ausprägung der pulmonalen Hypertonie und Hypoplasie und damit die postnatalen respiratorischen Komplikationen abzuschätzen [44-46].

Etabliert haben sich hier die Ermittlung der Lung-to-head-Ratio (LHR) [47, 48], oder auch der um die Gestationswoche normalisierten observed - to - expected LHR (o/eLHR) [49-51]. Der normalisierte Wert (o/e LHR) bietet eine höhere Aussagekraft über die postnatale Mortalität und Morbidität [50]. Die Ermittlung erfolgt 2D- oder 3D-sonographisch, oder auch mittels MRT [52, 53].

Auch die Position der Leber ist ein prognoseentscheidender Parameter. Ist die Leber in den Thorax prolabierte („liver-up“) so wirkt sich das negativ auf das Überleben aus. Hierbei kann über den prozentualen Anteil hernierter Leber (%LH) eine Voraussage über das Outcome des Patienten getroffen werden [54, 55].

Akinkuotu et al. konnten zeigen, dass sowohl o/eLHR als auch %LH und das um die Gestationswoche normalisierte totale fetale Lungenvolumen (o/e TFLV) bei Überlebenden pränatal signifikant höher lagen, verglichen mit den postnatal verstorbenen Patienten. Die Bestimmung des o/e TFLV stellte jedoch den einzigen unabhängigen, signifikanten pränatalen Voraussagewert bezüglich der sechs Monatsüberlebensrate dar [7]. Alle genannten Werte haben zudem eine signifikante Assoziation mit der postnatalen Ausbildung einer arteriellen pulmonalen Hypertonie und damit einer erhöhten Mortalität und Morbidität, im Sinne längerer Hospitalisierung und längerem Sauerstoff- und inhalativem Stickstoffmonoxidbedarf sowie auch der Ausbildung sekundärer Lungenerkrankungen [56-58].

Obwohl die Mehrzahl der kongenitalen Zwerchfellhernien isoliert besteht (ca. 70% [5]), ist die Detektion von eventuellen begleitenden Fehlbildungen wichtig für die Therapieplanung und die Einschätzung der zu erwartenden postnatalen Mortalität und Morbidität [6, 34, 59]. Die häufigsten assoziierten Fehlbildungen finden sich kardial, in den Harnwegen, im zentralen Nervensystem oder betreffen die Extremitäten [34]. Vor allem bei Patienten mit kardialen Fehlbildungen und chromosomalen Anomalien ist ein schlechtes Outcome zu erwarten [35, 60]. Uneinheitliche Ergebnisse gibt es hingegen bezüglich der Frage, ob die Lage des Defektes, ob links- oder rechtsseitig, einen Einfluss auf die Prognose hat [6, 61-63].

Eine mögliche pränatale Intervention, die das postnatale Überleben von Feten mit schlechter Prognose deutlich verbessern kann, ist die temporäre tracheale Ballonokklusion (FETO = fetal endoscopic tracheal occlusion) [64, 65]. Dabei wird meist in der 26.-28. SSW ultraschall-kontrolliert ein Endoskop in der Trachea des Fetus eingeführt und ein endoluminal liegender Ballon platziert. Durch die Retention der pulmonalen Flüssigkeit kommt es zu einem dehnungsinduzierten Lungenwachstum mit einer Zunahme der alveolären Austauschfläche sowie auch zur Ausreifung pulmonaler Gefäße. Der Ballon wird später, etwa in der 34. SSW wiederrum fetoskopisch entfernt („plug-unplug sequence“) [5, 66-69]. Komplikationen des Eingriffs sind vor allem die

Auslösung eines vorzeitigen Blasensprungs und dadurch Frühgeburtlichkeit, weshalb der Eingriff noch nicht als Standardprozedere durchgeführt wird [70, 71]. Langfristig gesehen kann es zur Ausbildung einer Tracheomegalie kommen, welche jedoch klinisch keine Relevanz zu haben scheint [72, 73].

2.4 Überblick über das postnatale Management

Entscheidend für das Überleben und die Lebensqualität der Patienten ist, dass die intensivmedizinische Behandlung, möglichst ab dem Zeitpunkt der Geburt, in Zentren mit standardisierten Konzepten stattfindet [74-77].

Durch den Wandel in der postnatalen Behandlungsstrategie, von sofortiger operativer Korrektur hin zu vorrangiger Stabilisierung der kardio-pulmonalen Situation des Patienten, konnte die Überlebenschancen der Patienten verbessert werden [78-81].

Wie bereits erwähnt ist vor allem die Lungenfunktion entscheidend für das Outcome der Patienten. Auch hier kam es in den letzten Jahren zu einem Paradigmenwechsel hin zu der Zielsetzung vorrangig ein Barotrauma der Lunge und die damit einhergehende Mortalität und Morbidität, wie die bronchopulmonale Dysplasie, zu verhindern. Ebenfalls gilt es die Behandlung der pulmonalen Hypertonie mit in das Behandlungskonzept einzubeziehen. Durch den Einsatz der extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) konnte das Outcome vieler Patienten verbessert werden. Allerdings besteht auch die Gefahr schwerwiegender bleibender Schäden, weshalb der unterstützende Gebrauch sorgsam abgewogen werden muss [36, 75, 82-86].

Für den operativen Verschluss des Defektes gilt, dass der Einsatz eines Patches einen unabhängigen, negativen Prädiktor darstellt [87]. Zu beachten ist dabei, dass gerade ausgeprägte Hernien, die auch eine stärkere Beeinträchtigung in der Lungenentwicklung zur Folge haben, eine Patch-Versorgung benötigen [35].

Ist zur Deckung einer kongenitalen Zwerchfellhernie die Verwendung eines Patch notwendig, ist Gore-Tex® momentan ein weitverbreiteter Standard [11, 12, 15, 88, 89]. Allerdings birgt die Verwendung synthetischer Materialien Risiken, wie

beispielsweise die Ausbildung von Thorax- oder Wirbelsäulendeformitäten, Reherniation ebenso wie die Keimbesiedlung des Fremdmaterials. Beide letztgenannten Komplikationen führen unumgänglich zu einer Reoperation [3, 80, 88-90]. Auch andere Materialien wurden experimentell zur Defektdeckung sowohl tierexperimentell als auch in klinischen Studien getestet [11, 12, 14, 15, 19]. Beispiele für in klinischen Studien verwendete resorbierbare biokompatible Materialien sind Sugrasis®, AlloDerm®, Permacol™ [11, 12, 19].

Neben dem Einsatz eines Patches ist auch die Durchführung einer Muskellappenplastik möglich. Diese wird auf Grund der Komplexität des Eingriffs häufig bei Wiederauftreten der Zwerchfellhernie durchgeführt, ist jedoch hinsichtlich des Outcomes vergleichbar mit dem Einsatz eines Patches als Ersttherapie [16, 91-93].

Auch der chirurgische Zugang ist Gegenstand der klinischen Forschung. Hier stellt die offene chirurgische Intervention momentan die beste Option dar, da sowohl laparoskopische Zugänge, als auch thorakoskopische Versorgungen trotz geringerer Invasivität zu schlechteren Ergebnissen führen [94-98].

3. Fragestellung

Durch frühere Forschungsergebnisse von Meyer et al. konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Lyoplant® bei Bauchdeckendefekten, wie Gastrochisis und Omphalozele, im Klein- und Großtiermodell durchaus eine Alternative zum konventionellen Gore-Tex©-Verschluss darstellt [99, 100].

Diese Ergebnisse ließen die Fragen zu, ob der Einsatz eines Lyoplant®-Patches auch bei dem ebenso komplexem, wie schwerwiegendem Krankheitsbildes der angeborenen Zwerchfellhernie möglich ist. Daran schließen sich die Fragen an, ob Lyoplant® in das Zwerchfell integriert wird und ein funktioneller Umbau durch körpereigenes Kollagen stattfindet.

In den Vorversuchen an der Bauchwand konnte, im Klein- und Großtiermodell, während der Explantation makroskopisch eine beginnende Vaskularisierung des Lyoplant®-Patch beobachtet werden. Eine histologische, quantifizierte Aussage über die Kapillarisation wurde bisher allerdings noch nicht getroffen [99, 100].

Auch soll die Frage behandelt werden, inwieweit aufgestellte immunologische Hypothese, nach der es beim Einsatz von Lyoplant® durch eine Immunantwort über den TH2-Pathway eher zu einem Remodelingprozess als zu einer „Abstoßungsreaktion“ kommt, auch für die Verwendung von Lyoplant® am Zwerchfell zu verifizieren ist [101].

4. Material und Methoden

4.1 Zeitlicher Ablauf der Studie



Abbildung 1: Übersicht des zeitlichen Ablaufs

Da es sich um die erstmalige Verwendung von Lyoplast® am Zwerchfell handelt, wurde die Studie im Rahmen eines genehmigten Tierversuchsantrags an jungen, gesunden Ratten durchgeführt. Diesen wurde operativ ein Zwerchfelldefekt gesetzt, welcher anschließend mit dem jeweiligen für den Versuch vorgesehenen Patchmaterial (Gore-Tex®, Lyoplast®) verschlossen wurde. Der Versuchszeitraum für den tierexperimentellen Teil der Studie wurde auf minimal 12 Wochen, beginnend mit dem Setzen des Zwerchfelldefektes und Implantation des Fremdmaterials, festgelegt. Während diesem Zeitraum wurden die Versuchstiere zur Beurteilung der Entwicklung des Allgemeinzustandes, des Gewichtes und der Narbenverhältnisse, regelmäßig visitiert. Nach Ablauf des festgesetzten Zeitraumes folgte die Explantation des Patches mit angrenzendem Zwerchfell. Die im Rahmen der Explantationsoperation angelegte Narkose wurde gleichzeitig zur Tötung der Tiere genutzt, da der großflächige Defekt, der durch Explantation des eingewachsenen Patches mitsamt angrenzendem Gewebe entstand, nicht mit dem Leben vereinbar gewesen wäre. Die Euthanasie erfolgte intraoperativ mittels intrakardialer Injektion von T61. Anschließend wurden die entnommenen Präparate in Formalin fixiert. Im weiteren Verlauf wurden zur histologischen Analyse, in Bezug auf verschiedene Fragestellungen, Färbungen vorgenommen (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Masson-Goldner-Färbung, immunhistologische Färbungen).

4.2 Die zu vergleichenden Materialien

4.2.1 Gore-Tex® (PTFE)

Bei dem Material Gore-Tex® handelt es sich um ein Polytetrafluorethylen [= PTFE; $(C_2F_4)_n$], ein künstlich hergestelltes, anorganisches Produkt. Folglich ergibt sich die Möglichkeit einer Resorption durch den Körper nicht. Als Implantat wird es von körpereigenem Gewebe fest umwachsen und stellt somit dessen Kontinuität wieder her [100].

4.2.2 Lyoplast®

Lyoplast® (Fa. B. Braun Aesculap, Melsungen, Deutschland) ist ein reines Kollagenimplantat, das aus Rinderperikard gewonnen wird. Auf Grund der Herstellung durch Lyophilisierung (Gefriertrocknung) bleibt die lose Faserstruktur des Kollagens erhalten. Laut Hersteller können dadurch nach Implantation körpereigene Bindegewebszellen gleichmäßig und schnell in den Patch immigrieren. Gleichzeitig soll der Patch durch den Körper komplett resorbiert werden, indem er sukzessiv enzymatisch abgebaut wird [102].

4.3 Das Tiermodell

Die tierexperimentelle Versuchsreihe wurde vor Beginn durch die Regierung Unterfranken nach §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes genehmigt. Für die Versuchsreihe wurden 15 männliche Ratten des Inzuchtrattenstammes Wistar Furth (WF) (Charles River Wiga GmbH, Deutschland; Gewicht: 155 - 205g) verwendet. Durch die langjährige Erfahrung der Tierhaltung der Experimentellen Chirurgie im Universitätsklinikum Würzburg konnte sichergestellt werden, dass alle Tiere während der Studie unter optimalen Bedingungen gehalten und versorgt wurden. Präoperativ wurden alle Tiere hinsichtlich ihres Allgemeinzustandes beurteilt. Die Implantation erfolgte nach Intubation und Beatmung durch eine mediane Laparotomie mit anschließender Resektion eines 0,5 x 1,0 cm großen Zwerchfellanteils und Defektdeckung der

entstandenen Zwerchfellhernie mit dem jeweiligen Patch. Dabei wurde darauf geachtet, dass der implantierte Patch etwas größer war als der gesetzte Defekt.

Die Tiere hatten prä- und postoperativ jederzeit freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Sie wurden entsprechend ihres Sozialverhaltens, aber unter Berücksichtigung der zunehmenden Körpergröße, immer mindestens Paarweise gehalten und zur besseren Unterscheidbarkeit mit Farbkreisen am Schwanz gekennzeichnet. Während des Visitationszeitraumes von 12 bzw. 13 Wochen wurden die Tiere anfangs täglich, später alle drei Tage visitiert.

Am Ende des Tierversuchszeitraumes wurden die Tiere im Rahmen der Explantation mittels interkardialer T61 Injektion getötet.

4.4 Operatives Vorgehen

4.4.1 Implantation

Das Versuchstier wurde zur Narkoseeinleitung für mindestens zwei Minuten einer 5%-Isofluran-Inhalationsnarkose ausgesetzt [Florene® (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether) Abbot GmbH, Deutschland; Narkosegerät: Sonderanfertigung: Gerald Büchold, Würzburg, Deutschland]. Unter Narkose erfolgten die Rasur der Bauchwand sowie die orotracheale Intubation des Tieres in Rückenlage mit Hilfe einer stumpf angeschliffenen Vasofix Braunüle (G18, 1,3mm, B-Braun- Melsungen). Anschließend wurde das Versuchstier an einen Volumen-kontrollierten Respirator angeschlossen (Eigenbau: Ugo basile, biological research apparatus comerio-(va) -Italy, Nr.25883v20). Über diesen wurde die Isofluran-Intubationsnarkose, in 2% Erhaltungsdosis, fortgeführt. Nach der intramuskulären Injektion von gewichtsadaptiert 0,2mg/100g/KG Tramadol in die Glutealmuskulatur der Ratte, erfolgte die mehrmalige Hautdesinfektion sowie das Abdecken des Operationsgebietes.



Abbildung 2: Intubierte und beatmete Versuchsratte während der Implantationsoperation

Als operativer Zugang wurde die mediane Laparotomie gewählt. Nach der Mobilisation des Magens und des linken Leberlappens konnte das linke Zwerchfell dargestellt werden. Aus diesem wurde ein 0,5 x 1,0 cm großes Stück Muskulatur reseziert.

Für die Defektdeckung wurde der Patch (PTFE = Gore-Tex©, Dual-Mesh, W.L. Gore and Associates USA; n= 5 oder Lyoplast®; n=6) etwas größer als der Defekt zurechtgeschnitten. Dabei wurde eine sechseckige Form gewählt, die mit Einzelknopfnähten eines resorbierbaren 6/0 Polyglactin-Fadens (Monocryl©, Ethicon, Deutschland) fixiert wurde. Diese wurden zunächst unter Sicht vorgelegt und anschließend geknüpft. Form und Größe wurden gewählt, um den momentanen Standardverfahren in der Versorgung von kongenitalen Zwerchfellhernien, dem Einsetzen von den Defekt überragenden, kegelförmigen Implantaten nahe zu kommen [103]. Zwei Tiere wurden lediglich mit einer Direktnaht versorgt und dienten als Kontrollgruppe.

Anschließend erfolgte der Faszienverschluss der Bauchdecke mit einem resorbierbaren 6-0 Polyglactin-Fadens (Monocryl©, Ethicon, Deutschland) in einer fortlaufenden Naht. Die Hautnaht wurde abschließend mit einem 6-0 Polypropylen-Faden (Prolene®, Ethicon, Deutschland) bei vier Tieren in Einzelknopftechnik und bei den restlichen neun Tieren fortlaufend intrakutan durchgeführt.

Nach Beenden der Narkose sowie Extubation des Versuchstiers wurde dieses gemeinsam mit einem Kontakttier noch einige Zeit unter der Wärmelampe überwacht, bevor beide wieder zu den anderen Tieren kamen.

4.4.2 Explantation

Für die Explantation wurde jeweils ein Versuchstier von den anderen Tieren separiert. Analog zur Implantationsoperation wurde das Tier für mindestens 2 Minuten einer 5% Isofluran-Inhalationsnarkose ausgesetzt [Florene® (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether), Abbot GmbH, Deutschland; Narkoseeinleitungsgerät: Sonderanfertigung: Gerald Büchold, Würzburg, Deutschland]. Es erfolgte die Bauchdeckenrasur und anschließende Fortsetzung der Narkose mit 2% Isofluran-Intubationsnarkose, mit Hilfe einer Maskenbeatmung (Sonderanfertigung: Gerald Büchold, Würzburg, Deutschland), bei selbstständiger Spontanatmung des Tieres. Nach mehrmaliger Hautdesinfektion und Abdeckung des Operationsgebietes erfolgte die mediane Laparotomie. Kranial wurde der Schnitt zur besseren Einsicht des Operationsgebietes zum beidseitigen Rippenbogenrandschnitt erweitert.

Nach Eröffnung wurde der OP-Situs auf Verwachsungen des Darmes, der abdominalen Organe mit dem Patch sowie des Patches zur Lunge inspiziert. Ebenso wurde speziell auf Veränderungen des linken Zwerchfells, im Vergleich zur rechten Zwerchfellseite, geachtet und die Entfaltung der Lunge kontrolliert. Es folgte die Tötung des Tieres durch eine intrakardiale Injektion von T61.

Anschließend wurden die Adhäsionen gelöst und der Patch mitsamt umgebendem Zwerchfellgewebe reseziert.

4.5 Histologische Untersuchungen

Das entnommene Präparat wurde zunächst zur Fixation für 4 Tage in Formaldehyd (10%) eingelegt. Anschließend wurden die Präparate zur Einbettung in Paraffin vorbereitet, indem das Formaldehyd mit Wasser ausgewaschen wurde. Die anschließende Entwässerung erfolgte durch eine standardisierte aufsteigende Alkoholreihe. Der Alkohol wiederum wurde durch Einlegen in Methylbenzoat entfernt

und das Gewebe durch Benzol gehärtet. Es folgte die Durchtränkung der Präparate mit Benzol-Paraffin und schließlich die Einbettung in Paraffin.

Im Anschluss wurden die Paraffinblöcke mit Hilfe eines Mikrotoms in 1- μ m dünne Präparate geschnitten, die nach Entparaffinierung gefärbt werden konnten.

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbung), eine Masson-Goldner-Färbung sowie verschiedene immunhistologische Färbungen angefertigt.

4.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE- Färbung)

Für die HE-Färbung wurden die Präparate durch die standardisierte absteigende Alkoholreihe entparaffiniert. Danach wurde für 30 Sekunden die Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (Fa. Merck, Darmstadt) durchgeführt. Die Präparate wurden anschließend unter fließendem Leitungswasser gebläut und daraufhin nochmals mit destilliertem Wasser gespült. Es folgte die Gegenfärbung mit 1% Eosinlösung (Fa. Merck, Darmstadt) für 10 Minuten. Anschließend wurden die Präparate mit Leitungswasser und Aqua dest. gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe (4x je 1min) und anschließendes Xylol (2x je 10min) entwässert. Es folgte die standardmäßige Einbettung der Präparate mit Pertex Schnelleinbettmedium (Fa. Mediete GmbH, Burgdorf).

4.5.2 Masson-Goldner-Färbung

Auch für die Kollagen-Färbung nach Goldner wurden die Paraffinschnittpräparate mittels Standardverfahren entparaffiniert und vorbereitet. Die Färbung erfolgte mit einem Standardfärbekit (40-011802 von Bio-Optica, Italien). Die darauffolgenden Schritte – Spülen, Entwässern, Einbetten, - erfolgen analog zu HE-Färbung (siehe unter 4.5.1).

Neben den Präparaten wurde zusätzlich auch eine Färbung eines reinen Lyoplant® Materials durchgeführt, welches in gleicher Weise wie die Versuchspräparate fixiert und eingebettet wurde. Somit konnte bei der Auswertung der Färbungen sichergestellt werden, dass es sich bei den dunkelrot gefärbten Anteilen im Patchbereich um noch nicht enzymatisch umgebautes Lyoplant® handelte (siehe 5.4.2 Abb.11). Im

Färbeprozess musste festgestellt werden, dass sich das reine in Paraffin gebettete Lyoplant®-Material sehr schwer auf dem Objektträger halten lässt und sich während der Waschvorgänge sowie der aufsteigenden Alkoholreihe mehr und mehr vom Objektträger löste.

4.5.3 Immunhistologische Färbungen

Immunhistologisch wurden CD4 und CD8 positive Zellen gefärbt. Diese wurden zuerst klassisch mit einer endogenen Peroxidasereaktion und DAB-Entwicklung angefärbt und im Folgenden wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenzfärbung angefertigt. Für jede Methode wurden die Antikörper im Vorfeld hinsichtlich ihrer Wirkweise und der optimalen Verdünnung auf Milzpräparaten von Wistar Furth Ratten ausgetestet. Dabei wurde, sowohl bei der Fixierung und Einbettung, als auch bei der eigentlichen Färbung analog zu den Versuchspräparaten verfahren.

Die Entparaffinierung erfolgte, wie auch bei den vorher beschriebenen Färbungen, nach Standardprotokoll. Daraufhin wurden die Präparate dreimalig für fünf Minuten in PBS (Phosphate Buffered Saline, Fa. Oxoid Limited, Lot. 1262056) gewaschen. Durch die Paraffinbettung der Schnitte war die Demaskierung der Epitope im Schnellkochtopfverfahren notwendig. Hierbei wurden die Schnitte für 5 min in 20 mM Citronensäure bei etwa 120°C gekocht und anschließend in fließendem Aqua dest. abgekühlt und in PBS rückgeführt. Bei den Versuchsansätzen für die DAB-Entwicklung folgte hierauf die 30-minütige Blockierung der endogenen Peroxidase bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Inkubation der Präparate mit NSA-BGS (NGS= Normal Goat Serum, Fa. Calbiochem, Catnr. NS02L; BSA= Albumin from bovine Serum, Fa. Sigma-Aldrich, Lot. 051M1873V), welches der Blockierung von Proteinen dient, für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde der jeweilige Primärantikörper in spezifischer Verdünnung (siehe Tabelle 1) aufpipettiert und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit einem speziellen Antikörperverdünnungsmedium, der zu einer zusätzlichen Hintergrundreduktion führt (Antibody Diluent, Fa. Dako REAL, Lotnr. 00091216).

| Färbung | Antikörper | Clone | Firma | Verdünnung |
|---------|---|------------|---------|--|
| CD4 | Rabbit-Anti-Rat (LotNr.821304465) | polyclonal | GeneTex | 1:100 (Immunfluoreszenz) 1:75(endogene Peroxidase) |
| CD8 | Mouse-Anti-Rat (LotNr. 821304459) | OX-8 | GeneTex | 1:100 (Immunfluoreszenz) 1:100(endogene Peroxidase) |

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Nach einer minimalen Inkubationszeit von 18 Stunden folgte wiederum ein Waschvorgang mit dreimal fünf Minuten PBS.

Da sich das weitere Vorgehen, je nach gewählter Methode – DAB-Entwicklung oder Immunfluoreszenzentwicklung - unterscheidet, sollen beide Verfahren im Folgenden getrennt voneinander dargestellt werden.

Immunfluoreszenzentwicklung:

| Färbung | Antikörper | Firma | Verdünnung |
|---------|------------------------------------|---------|------------|
| CD4 | Goat-anti-Rabbit (LotNr. 84241) | Dianova | 1:600 |
| CD8 | Goat-anti-Mouse (LotNr. 86079) | Dianova | 1:600 |

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper bei Immunfluoreszenzfärbung

Die Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:600 aufgetragen (siehe Tabelle 2). Die Verdünnung erfolgte mit PBS Lösung, sowie zusätzlich in Verdünnung 1:10 Alexa Fluor (Alexa Phalloidon 488, Fa. Invitrogen, Catnr. A12379), welches der Färbung des Zytoskeletts dient. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei

Raumtemperatur betrug eine Stunde. Daraufhin wurden die Präparate mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe des Vectaschield-Mediums (Vectaschield, Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, Lotnr: Y0322) eingedeckt und unter Lichtausschluss kühl getrocknet.

DAB- Entwicklung:

Wurde eine DAB-Entwicklung der Präparate angestrebt so wurde ebenfalls zunächst dreimalig für drei Minuten mit PBS gewaschen und anschließend der spezifische Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3) aufpipettiert. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.

| Färbung | Antikörper | Firma | Verdünnung |
|---------|--|-------|------------|
| CD4 | Goat-anti-Rabbit (LotNr. 00052233) | Dako | 1:50 |
| CD8 | Rabbit-anti-Mouse (LotNr. 00065051) | Dako | 1:50 |

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper bei endogener Peroxidasereaktion und nachfolgender DAB-Entwicklung

Nach Wiederholung des Waschvorgangs mit PBS wurde jeweils ein Tropfen DAB (3,3'-Diaminobenzidin aus dem DAB-2Komponenten-Kit, Fa. DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Lotnr. M802/M801) auf das Präparat gegeben und unter mikroskopischer Kontrolle der Zeitpunkt abgepasst, in welchem die Färbung im Vergleich zur Hintergrundfärbung am deutlichsten hervortrat. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Präparate in Aqua dest. überführt. Danach wurde, analog zur HE-Färbung, für 30 Sekunden die Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (Fa. Merck, Darmstadt) durchgeführt, ebenso wie das anschließende Bläuen der Präparate unter fließendem Leitungswasser für 10 min. Es folgte die Überführung in Aqua dest. und die aufsteigende Alkoholreihe, bevor die Schnitte mit dem Schnelleinbettungsmedium Pertex (Fa. Mediate GmbH, Burgdorf) eingedeckt wurden.

Während der Durchführung der immunologischen Färbungen wurde festgestellt, dass sich Teile der Präparate, meist Patch und Muskelanschnitte, vom Objektträger lösten. Dies war vor allem im Rahmen der Waschvorgänge nach der Demaskierung der Fall. Auf Grund dieser Beobachtung wurde der Demaskierungsvorgang vom ursprünglichen Protokoll, mit Verwendung eines 0,4 mM Citratpuffers, sowie der langsamen Abkühlung der Präparate in der Pufferflüssigkeit zu dem oben beschriebenen Prozess modifiziert. Dadurch konnte die Anzahl an verwertbaren Präparaten angehoben werden. Jedoch bestand weiterhin das Problem, dass sich vorrangig der Patchbereich (Lyoplant®-Patch > Gore-Tex©-Patch), oft mitsamt dem angrenzenden Gewebe, teilweise oder ganz vom Objektträger löste. Dieses Verhalten konnte ebenfalls bei der Färbung des reinen Lyoplant® Materials für die Masson-Goldner-Färbung, wie unter 4.5.2 beschrieben, beobachtet werden.

5. Ergebnisse

5.1 Entwicklung der Tiere post Implantation

Zwei Tiere verstarben während der Implantationsoperation bevor eines der Versuchsmaterialien eingesetzt werden konnte an einem Spannungspneumothorax, sodass die effektive Versuchstierstärke bei 13 Tieren lag. Im Visitationszeitraum, zwischen Implantation und Explantation, konnten hinsichtlich des Bewegungsverhaltens keine Unterschiede festgestellt werden. Alle Tiere präsentierten sich während des gesamten Zeitraums in gutem Allgemeinzustand. Alle oberflächlich beobachtbaren Narben verheilten entsprechend des Operationstermins gleichermaßen gut. Hinsichtlich Einzelknopfnahttechnik und Intrakutannaht konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Zur Objektivierung der Entwicklung der Versuchstiere soll der Gewichtsverlauf genauer betrachtet werden.

5.2 Gewichtsentwicklung der Tiere

Das Gewicht wurde ab dem Operationstag dokumentiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere zwischen 155 - 205g schwer. Dies entspricht in etwa der 6. bzw. 7. Lebenswoche [104]. In den folgenden 12 Wochen konnte eine beständige Gewichtszunahme aller Tiere verzeichnet werden.

Bei Explantation (18/19. Lebenswoche entsprechend [104]) wogen die Tiere zwischen 460g und 560g. Bezogen auf das Startgewicht bei Implantation entspricht dies einer Gewichtssteigerung von 130 - 261%. Die Werte für die einzelnen Tiere sind Tabelle 4 zu entnehmen.

| | | Gewicht Implantation (Gramm) | Gewicht Explantation (Gramm) | Steigerung des Gewichts in % | Mittlere Steigerung in % |
|---------------|---------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Gore- Tex© | Tier Nr.3 | 155 | 560 | 261,3 | 212,1 |
| | Tier Nr.4 | 165 | 560 | 239,4 | |
| | Tier Nr.5 | 160 | 535 | 234,4 | |
| | Tier Nr.12 | 205 | 620 | 202,4 | |
| | Tier Nr.14 | 204 | 455 | 123,0 | |
| Lyoplast® | Tier Nr.6 | 155 | 485 | 212,9 | 184,5 |
| | Tier Nr.7 | 165 | 555 | 236,4 | |
| | Tier Nr.8 | 200 | 545 | 172,5 | |
| | Tier Nr.9 | 200 | 510 | 155,0 | |
| | Tier Nr.10 | 200 | 550 | 175,0 | |
| | Tier Nr.13 | 200 | 510 | 155,0 | |
| Direktnaht | Tier Nr.11 | 190 | 505 | 165,8 | 147,9 |
| | Tier Nr.15 | 200 | 460 | 130,0 | |

Tabelle 4: Gewichtssteigerung von Implantation bis Explantation

Vergleicht man die Steigerung des Gewichts bezogen auf die drei Versuchsgruppen Gore-Tex®, Lyoplant® und die Kontrollgruppe der Direktnahttiere, so zeigten die Tiere mit Gore-Tex®-Implantaten die beste Entwicklung mit einer mittleren Steigerung um 212,1%. Die Lyoplant®-Tiere steigerten ihr Gewicht im Mittel um 184,5%. Die Direktnahttiere wogen bei Explantation nur 147,9% mehr als zu Beginn der Versuchsreihe.

Um die physiologische Entwicklung der Tiere zu verifizieren, wurden die Wachstumskurven der Versuchstiere mit der Wachstumskurve des Züchters (Charles River Wiga GmbH, Deutschland) verglichen [104]. Dafür wurde in jeder Versuchsgruppe das zum Explantationstermin jeweils leichteste und schwerste Tier betrachtet (siehe Tabelle 4). Zwischen den Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Gewichtsentwicklung beobachtet werden. Verglichen mit der Wachstumskurve des Züchters wuchsen alle Tiere überproportional gut. Dies ist wahrscheinlich auf ein reichhaltigeres Nahrungsangebot zurückzuführen. Es ist von einem physiologischen Wachstum aller Tiere auszugehen.

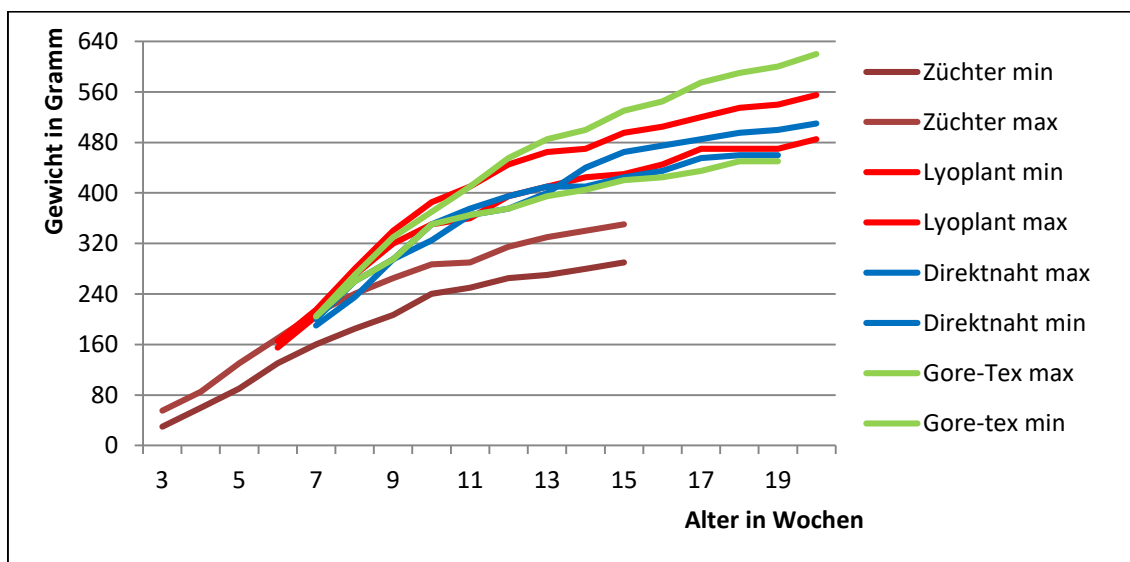


Abbildung 3: Gewichtsentwicklung des jeweils leichtesten und schwersten Tieres einer Versuchsgruppe und Referenzbereich des Züchters

Wie zu erwarten stagnierten die gemessenen Gewichte direkt nach Operation. Dies konnte in allen Wachstumskurven festgestellt werden und wird hier beispielhaft für Tier Nr.13 (Lyoplant®-Versuchsgruppe) gezeigt (siehe Abb.3).

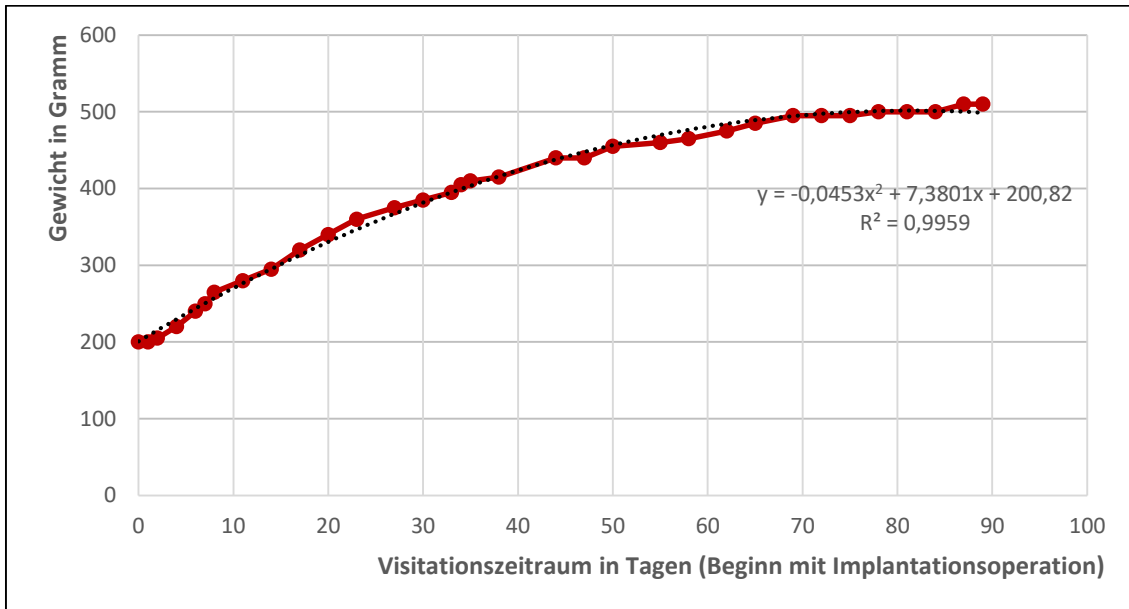


Abbildung 4: Wachstumskurve Lyoplant®-Versuchstier Tier Nr.13 mit Wachstumsstagnation nach Operation

Ein signifikanter Unterschied der Dauer der Wachstumsregression zwischen den Versuchsgruppen konnte nicht festgestellt werden.

5.3 Makroskopische Ergebnisse bei Explantation

Bei keinem der Tiere waren äußerliche Auffälligkeiten festzustellen. Hautnaht und Fasciennaht stellten sich unauffällig dar. Es war keine Narbenbildung zu erkennen.

Zur Beschreibung von Adhäsionen wurde folgende Skala festgelegt [12, 14, 89, 105, 106]:

| | |
|-----------------|--|
| Adhäsion Grad 0 | Keine Verwachsungen vorhanden |
| Adhäsion Grad 1 | Leichte Verwachsungen, leicht mit dem Finger lösbar |
| Adhäsion Grad 2 | Feste Verwachsungen, die noch stumpf mit dem Finger lösbar waren |
| Adhäsion Grad 3 | Verwachsungen, stumpf nicht lösbar, nur mittels Skalpell |

Tabelle 5 : Merkmale zur Bestimmung der Adhäsionsgrade

Vor Explantation des Patches wurde die regelhafte Entfaltung der Lunge sowie die Durchblutung von Lunge und Zwerchfell im Seitenvergleich begutachtet und erfasst. Die Befunde waren bei allen Versuchstieren physiologisch.

Ebenso wurde mit den Verwachsungen verfahren. Die makroskopischen Befunde der einzelnen Tiere sind dem Anhang (siehe Anhang 8.1 Tabelle: 9 - 11) zu entnehmen. Bei allen Tieren konnten deutliche, flächige Verwachsungen des linken Leberlappens zum Zwerchfell festgestellt werden, die sich bei keinem Tier stumpf lösen ließen (Grad 3 bei allen Tieren). Alle Gore-Tex©-Tiere zeigten ähnliche Ausprägungen der Verwachsungen, während sich die Lyoplast®-Tiere heterogener präsentierten. Bei vier Tieren der Lyoplast®-Versuchsgruppe (Tier Nr.6, Tier Nr.7, Tier Nr.9, Tier Nr.10) zeigten sich großflächig Verwachsungen zu dem Patch angrenzenden Zwerchfellanteil. Dahingegen waren die Verwachsungen bei zwei anderen Lyoplast®-Tieren (Tier Nr.8 und Tier Nr.13) lockerer, jedoch auch hier nicht stumpf lösbar.

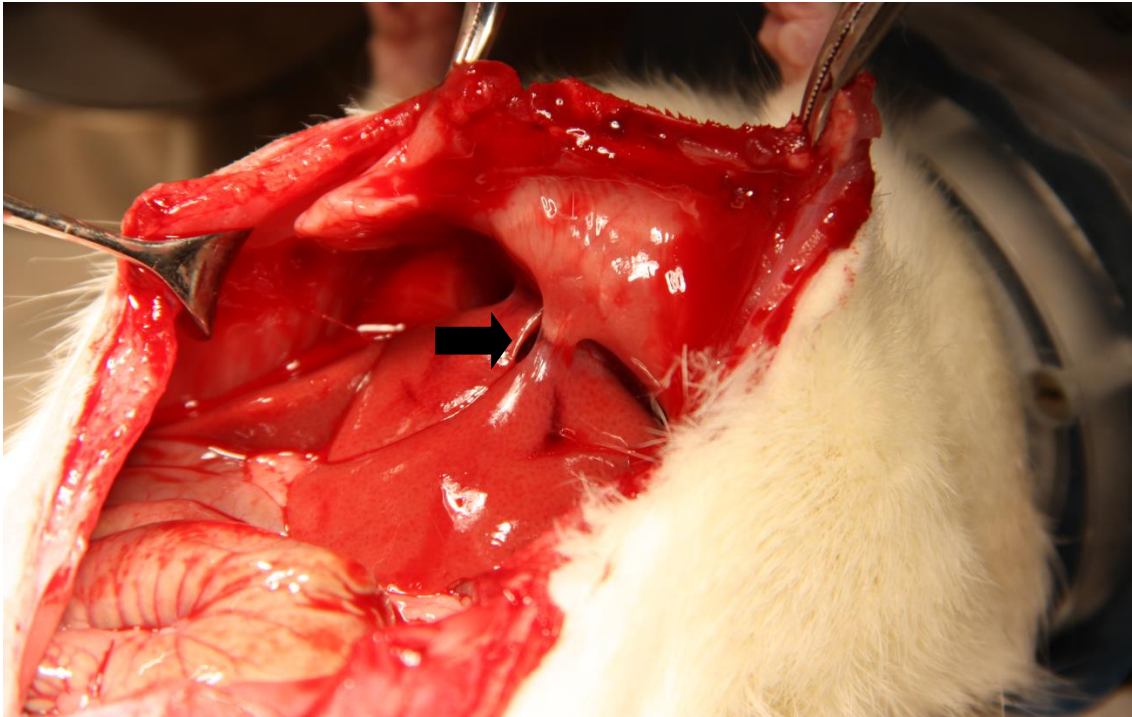


Abbildung 5: Explantation- deutliche makroskopisch sichtbare Verwachsungen des Zwerchfells mit dem linken Leberlappen (Tier Nr.13) [siehe Pfeil]

Auch bei den Direktnahttieren und damit in der Kontrollgruppe konnten die Verwachsungen zur Leber registriert werden. Diese waren jedoch sehr unterschiedlich stark ausgeprägt. Tier Nr.11 präsentierte sich mit festen großflächigen Verwachsungen, während bei Tier Nr.15 die Verwachsungen begrenzter und auch lockerer waren. Jedoch wiesen beide Tiere Adhäsionen des Grades 3 auf.

Verwachsungen der Pleura mit dem Patch konnten ausschließlich bei Tieren der Lyoplant®-Versuchsgruppe festgestellt werden. Diese variierten zwischen einzelnen, losen Verwachsungssträngen, die sich auch stumpf lösen ließen (Tier Nr.13, Grad 2) bis hin zu deutlichen strängigen Verwachsungen über den gesamten Patchbereich (Tier Nr.6, Grad 3; Tier Nr.7 Grad 3).

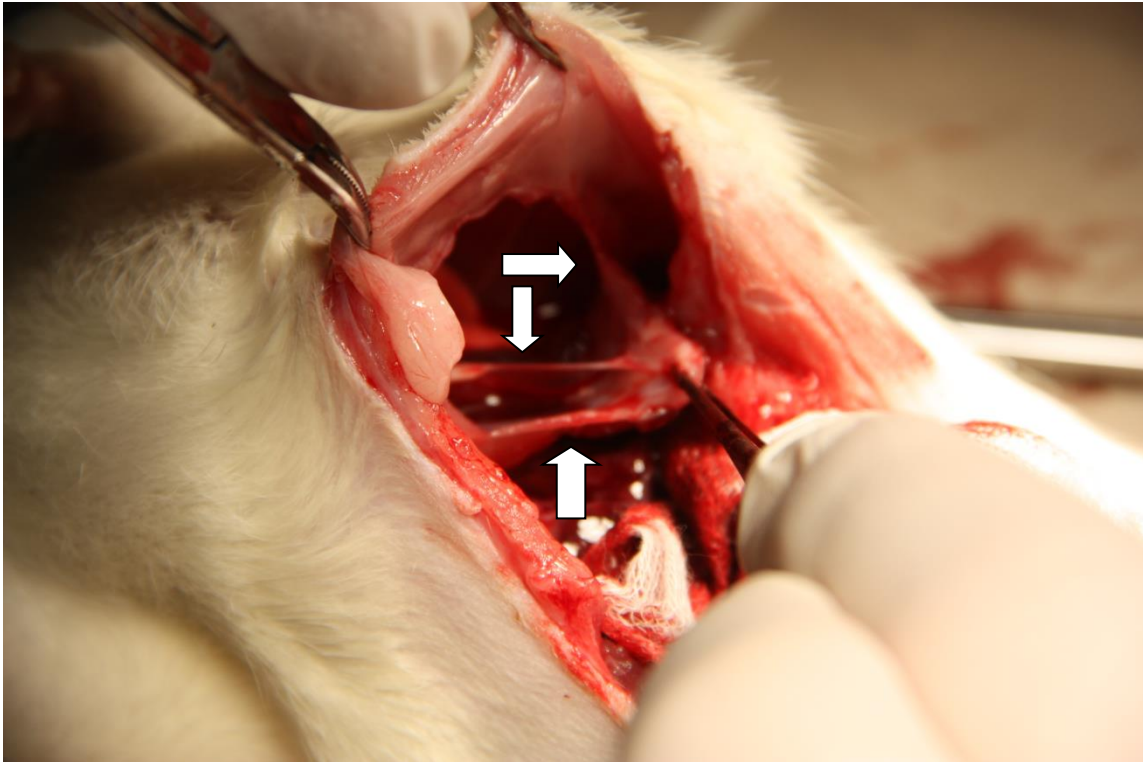


Abbildung 6: Verwachsungsstränge von der Lunge zum Patchbereich (Tier Nr.7)
[siehe Pfeile]

5.4 Ergebnisse der histologischen Auswertungen

Durch die Arbeiten am Kleintiersitus, sowie die Verwachsungen des linken Leberlappens mit dem Zwerchfell, ergaben sich hinsichtlich einer Paraffineinbettung in genauer anatomischer Lage erhebliche Schwierigkeiten. Deshalb wurde auf diese Art der Präparation verzichtet. Jedoch wurde in Bezug auf vergleichbare Schnittebenen der Präparate ein besonderes Augenmerk auf eine anatomisch reproduzierbare Entnahme und grob lagerichtige Einbettung der Präparate gelegt.

Da der Patch in das muskuläre Zwerchfell integriert wurde, ist vor allem die Betrachtung des Bereichs zwischen Patch und Muskulatur interessant. Tatsächlich waren sowohl makroskopisch als auch auf histologischer Ebene in den meisten Präparaten sowohl ein Bezug zur Leber als auch zur Muskulatur zu sehen. Dadurch ließ

sich die im Folgenden analysierte Patchumgebung systematisch in fünf Bereiche gliedern:

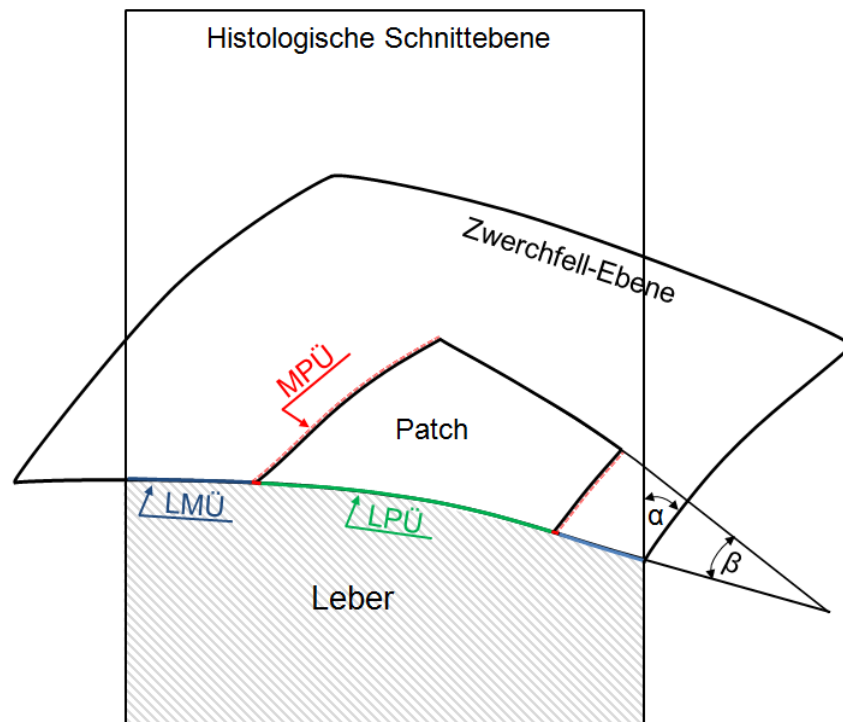


Abbildung 7: Skizze der histologischen Schnittenebene in Bezug auf die anatomischen Lageverhältnisse im Präparat

- (1) Übergangszone zwischen Muskulatur und Patch (MPÜ)
- (2) Übergangszone zwischen Leber und Patch (LPÜ)
- (3) Innerhalb des Patch an Muskelseite angrenzend (PMS)
- (4) Innerhalb des Patch an Leberseite angrenzend (PLS)
- (5) Patchmitte (PM)

5.4.1 Auswertung der HE-Färbungen

Anhand der gefärbten HE-Präparate wurden die Übergangsbereiche zwischen dem eingewachsenen Patch und den umgebenden Geweben untersucht. Dabei wurden die Übergänge systematisch ausgemessen und die Kapillaren im Sichtfeld einer 100-fachen

Vergrößerung ausgezählt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Axiophot Zeiss Mikroskop.

5.4.1.1 Analyse der Übergangsbereiche

Um Unterschiede im Einwachsungsverhalten des Lyoplast[®]-Patches gegenüber dem synthetischen Gore-Tex[®]-Patch beurteilen zu können, wurde der Übergangsbereich zwischen dem eingesetzten Patch und dem jeweils angrenzenden Gewebe genauer untersucht. Als Vergleich diente der Übergangsbereich zwischen Leber und Muskulatur (LMÜ) (siehe Abbildung 7).

Die Anzahl der Messungen wurde relativ zur Fläche des auszuwertenden Übergangsbereiches im Präparatschnitt gewählt. Je größer der Flächenanteil des Übergangsbereichs im Präparat, desto mehr Sichtfelder einer 100-fachen Vergrößerung wurden ausgezählt, im Minimum jedoch zwei. Dieses Verfahren wurde in jedem Präparat für die Übergangsbereiche [Muskel-Patch-Übergang (MPÜ), oder Leber-Patch-Übergang (LPÜ)] getrennt verwendet. Pro Sichtfeld wurden vier Messwerte erhoben. Ebenso wurde alle Anschnitte des Leber-Zwerchfell-Übergangs (LMÜ) in selber Art und Weise vermessen.

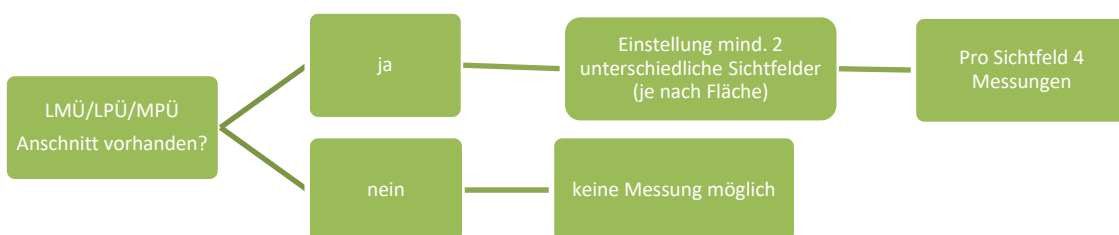


Abbildung 8: Vorgehen bei Vermessung der Übergangsbereiche

Nicht bei jedem Tier waren Anschnitte aller Übergangsbereiche vorhanden. So entstanden zwischen 8 bis 24 Messwerten pro Tier. Die genaue Anzahl der möglichen Messungen ist dem Anhang 8.2: Tabellen 12 bis 14 zu entnehmen.

Zwei der Gore-Tex©-Tiere und ein Lyoplast®-Tier wurden im Nachhinein aus der Auswertung ausgeschlossen, da hier durch die Schnittebene oder durch die Präparation (Faltung, Auffächerung des Übergangsbereiches) die Vergleichbarkeit der Übergangsbereiche mit den anderen Präparaten nicht gegeben war.

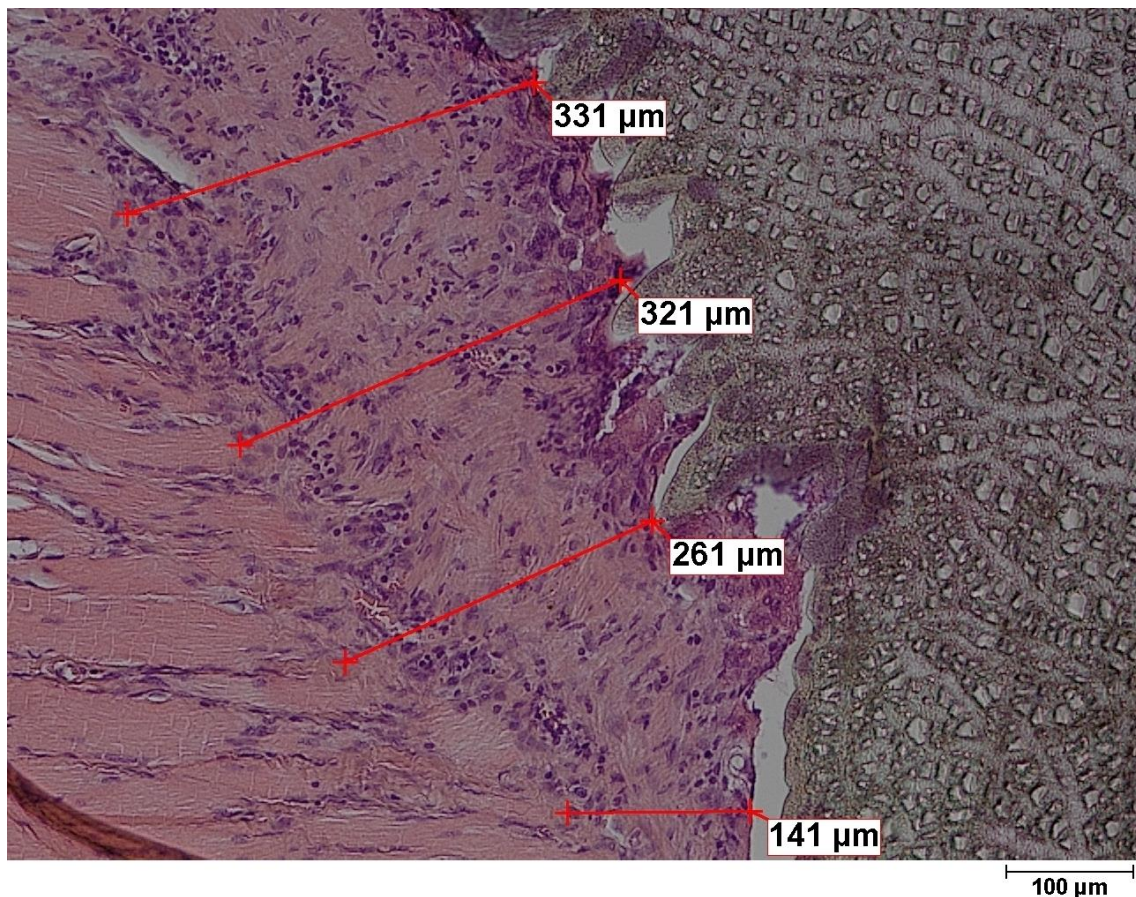


Abbildung 9: Vermessung des Zwerchfell-Patch-Übergangs (MPÜ) bei Gore-Tex©-Tier Nr.5

5.4.1.1.1 Statistische Analyse

Den Unsicherheiten im Messverfahren kann mit einer deskriptiven statistischen Analyse begegnet werden, indem mit Spannweiten (Maximalwert- Minimalwert) und Häufungen gearbeitet wird. Hierfür wurde für jedes Tier innerhalb der Spannweite die Klassenbreite berechnet und die Häufungen in den jeweiligen Klassen eingetragen. Der Mittelwert der häufigsten Klasse entspricht dem Modalwert (im Diagramm durch die gelbe Raute gekennzeichnet). Zusätzlich wurden die relativen Häufigkeiten berechnet

und aufsummiert. Bei nicht eindeutigen Verteilungstypen der Messwerte wurde, analog zur Darstellung bei Normalverteilungstyp, der Bereich der relativen Häufigkeiten zwischen 67 - 78% als Plot gewählt. Hierbei wurden alle für ein Tier und jeweiligen Übergangsbereich erhobenen Werte berücksichtigt.

Verglichen wurden diese Werte der Übergangsbereiche (MPÜ/LPÜ) mit den Messwerten für den Leber-Zwerchfell-Übergang, mit denen in gleicher Weise verfahren wurde.

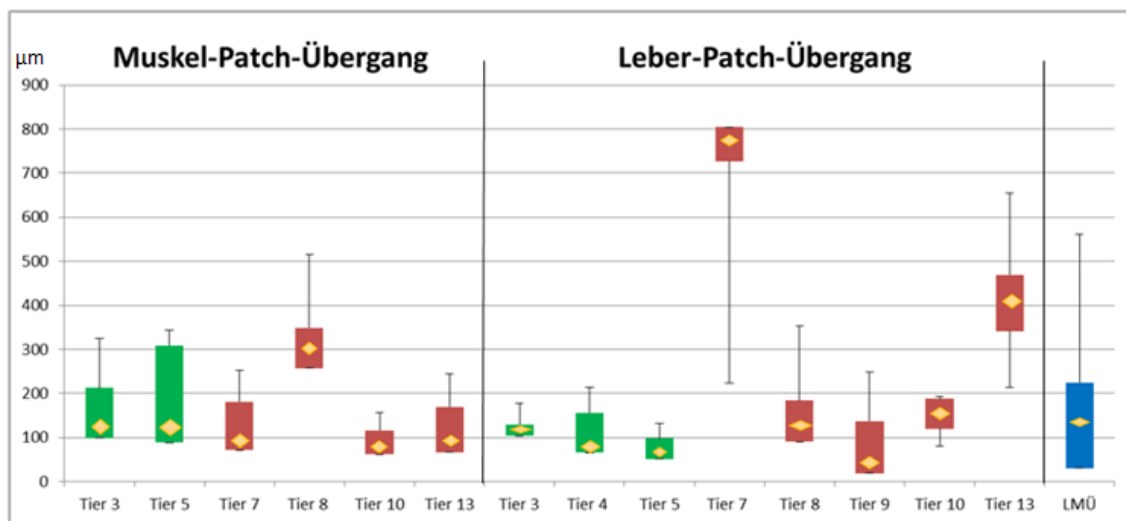


Abbildung 10: Vermessung der Übergangsbereiche [Grün: Gore-Tex®-Versuchstiere; Rot: Lyoplast®-Versuchstiere; Blau: Direkter Übergang zwischen Leber und Muskel unabhängig vom Patch]

Die in der Schnittebene gemessenen Zwerchfell-Leber-Übergänge (LMÜ) zeigen eine deutliche Häufung im Bereich der geringeren Dicken (30 – 225µm). Insgesamt stimmen die gemessenen Werte der Versuchsgruppen, sowohl der Lyoplast®-Tiere als auch die Gore-Tex®-Tiere, gut mit dem Leber-Muskel-Übergang überein. Lediglich die Tiere Nr.13 und Nr.7 der Lyoplast®-Gruppe zeigen eine deutlich breitere Streuung als der Referenzbereich des Zwerchfell-Leber-Übergangs. Auch die Häufigkeitsverteilung in den Versuchsgruppen stimmt mit den Häufigkeiten der Kontrollmessungen überein. Es lässt sich feststellen, dass sich die Gore-Tex®-Gruppe einheitlicher präsentiert als die

Lyoplant®-Versuchsgruppe, bei der sowohl im Leber-Patch-Übergang, als auch im Muskulatur-Patch-Übergang mindestens ein Tier deutlich höhere Messwerte aufweist.

5.4.1.2 Analyse der Kapillarisation

Auch zur systematischen Auszählung der Kapillaren und Analyse der Vaskularisierung des Patches sowie der Übergangsbereiche wurde die unter 5.4 bereits erläuterte Unterteilung in Bereiche verwendet.

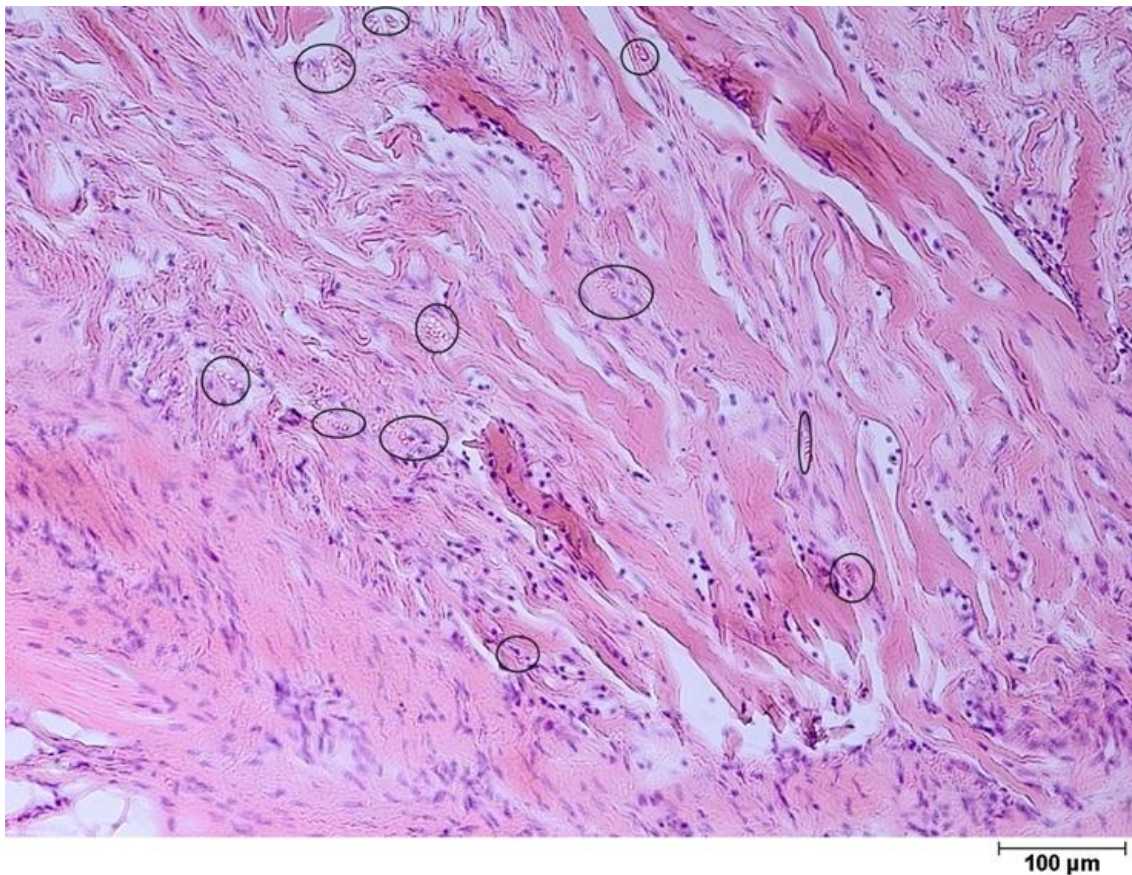


Abbildung 11: Auszählung der Kapillaren im Lyoplant®-Patch Tier Nr.8

Bei den Gore-Tex®-Tieren fehlte bei jeweils einem der fünf Tiere ein Anschnitt im Bereich 1(MPÜ) und 2(LPÜ)(siehe Anhang 8.2: Tabelle 12), sodass pro Bereich jeweils 4 Tiere bei der Auswertung berücksichtigt werden konnten. In der Lyoplant®-Versuchsgruppe waren, wie bereits bei der Übergangsbereichsauswertung, die Präparate des Tiers Nr.6, sowie der Muskel-Patch-Übergangsbereich von Tier Nr.9,

nicht auswertbar. Folglich konnten vier Lyoplant®-Tiere des Bereiches 1 (MPÜ) und fünf Lyoplant®-Tiere im Bereich 2 (LPÜ) in die Auswertung einbezogen werden

5.4.1.2.1 Statistische Analyse

Zunächst wurde überprüft, ob die Homogenität der erhobenen Werte innerhalb einer Versuchsgruppe (Lyoplant®-Tiere/ Gore-Tex©-Tiere/ Direktnahttiere) und dem untersuchten Bereich (LMÜ/MPÜ/PLS/PMS/PM), trotz individueller Unterschiede der Versuchstiere, gegeben ist. Dazu wurden die Messwerte mittels Ausreißer-Test nach Nalimov untersucht [107]. Dabei wurden Werte, die signifikant unterschiedlich zum Restkollektiv (Werte einer Versuchsgruppe und eines Bereiches) als Ausreißer identifiziert und gestrichen. Dies traf nur auf einen Messwert zu. Es kann von einer Homogenität der Werte ausgegangen werden, sodass im Folgenden individuelle Messwerte nicht berücksichtigt wurden, sondern nur noch die Versuchsgruppen (Lyoplant®/ Gore-Tex©) innerhalb des jeweiligen Bereiches unterschieden wurden.

Anschließend wurde im Vorfeld des Student-T-Tests der F-Test durchgeführt. Dieser bestimmt, ob die Varianzen der zu vergleichenden Messwertkollektive gleich oder unterschiedlich sind. Dies wiederum war für die richtige Durchführung des Mittelwert-T-Tests von Bedeutung. Mittels zweiseitigen T-Tests wurden abschließend die verschiedenen Bereiche innerhalb der Versuchsgruppe und die Versuchsgruppen miteinander verglichen [107].

Lyoplant®-Versuchsgruppe:

Zunächst wurde die Vaskularisierung der Bereiche 3 (PMS) und 4(PLS) miteinander verglichen. Hierbei war kein signifikanter Unterschied der Kapillardichte feststellbar. Beide Bereiche gemeinsam wurden mit der Patchmitte verglichen [Bereich5 (PM)]. Es gab keinen signifikanten Unterschied der Kapillareinsprossung. Auch zu dem an Leber bzw. Muskulatur angrenzenden Übergangsbereich [Bereich 1/2 (MPÜ / LPÜ)] konnte kein als signifikant zu bezeichnenden Unterschied festgestellt werden.

Gore-Tex©- Versuchsgruppe:

Innerhalb der Gore-Tex©-Versuchsgruppe konnte kein Unterschied der Kapillardichte innerhalb der Übergangsbereiche, beim Vergleich des Muskulatur-Patch-Übergangsbereich mit dem Leber-Patch-Übergangsbereich, festgestellt werden. Allerdings wurde innerhalb des Patches, in keinem der Bereiche 3 - 5, eine Kapillareinsprossung beobachtet.

Gore-Tex© verglichen mit Lyoplant®:

Vergleicht man die Übergangsbereiche 1 (MPÜ) und 2 (LPÜ) der Versuchsgruppen miteinander, so kommt man zu dem Ergebnis, dass sich Lyoplant® und Gore-Tex© hinsichtlich der Vaskularisierung nicht signifikant unterscheiden.

Innerhalb des Patches besteht jedoch ein signifikanter Unterschied. Die Lyoplant®-Gruppe ist statistisch, durch die Kapillardichte von $8,8 \pm 3,5$ pro Sichtfeld innerhalb des Patches, mit der Vaskularisierung des Übergangsbereiches gleichzusetzten. Wohingegen innerhalb des Gore-Tex©-Patches kein einziger Gefäßanschnitt gefunden werden konnte.

5.4.2 Auswertung der Masson-Goldner-Färbung

Anhand der Masson-Goldner-Färbung sollte der Umbauprozess von Lyoplant® in körpereigenes Kollagen untersucht werden.

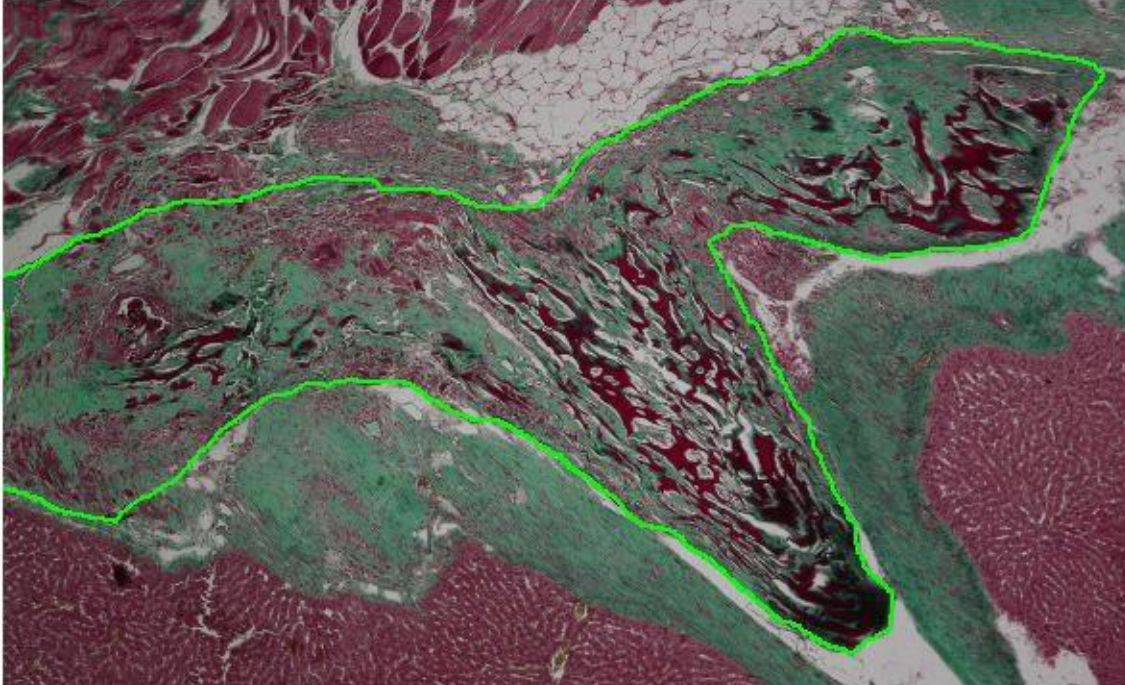


Abbildung 12: Bildauswertung der Masson-Goldner-Färbung zur Beurteilung des Umbauprozesses von Lyoplant® (Tier Nr.13)

Die Auswertung der Färbung erfolgte in 4-facher Vergrößerung an einem Biorevo BZ-9000 Keyence Mikroskop. Anschließend wurden die gewonnenen Bilder mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image Pro Plus 6.3 analysiert. Mit diesem ist es möglich eine markierte Fläche hinsichtlich bestimmter Farben aufzuschlüsseln und für diese Flächenanteile zu berechnen. Hierfür wurde der Patchbereich als zu untersuchende Fläche gekennzeichnet (siehe Abb. 12). Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst nur der Patchbereich, nicht aber die körpereigenen Faszien, beispielsweise um die Leber, mit in die Fläche eingeschlossen wurde. Außerdem wurde die gesamte in den Präparaten abgebildete Patchfläche in der Auswertung aufgenommen. Bei 4-facher Vergrößerung war es oftmals notwendig die Patchfläche in mehreren Teilbildern auszuwerten. Um die kontinuierliche Betrachtung des Patches zu gewährleisten wurden

die zu untersuchenden Flächen überlappend gewählt. Die überschneidenden Bereiche jedoch möglichst klein gehalten.

Anschließend wurden in drei Schritten, mit Hilfe des Image-Pro-Plus-6.3-Programms, die Flächenanteile bestimmt. Begonnen wurde mit der Bestimmung der Gesamtfläche. Risse und Löcher innerhalb des Präparates, die post explantationem entstanden waren, wurden von der Gesamtfläche abgezogen. Danach wurden zunächst nur die Rottöne und damit das noch nicht umgebaute Lyoplast[®]-Material in der Gesamtfläche vermessen. Zu Letzt wurde der Flächenanteil des körpereigenen Kollagens, der sich in der Masson-Goldner-Färbung grün darstellt, ausgewertet. Es folgte die prozentuale Berechnung des bereits umgebauten und noch erhaltenen Lyoplast[®]-Anteils bezogen auf die Gesamtfläche. Da die Tiere zu unterschiedlichen Zeiten operiert wurden, ergab sich ein Unterschied von maximal 5 Tagen in der Dauer des möglichen Umbaus. Dadurch konnte außerdem der Fortschritt des Umbauprozesses visualisiert werden.

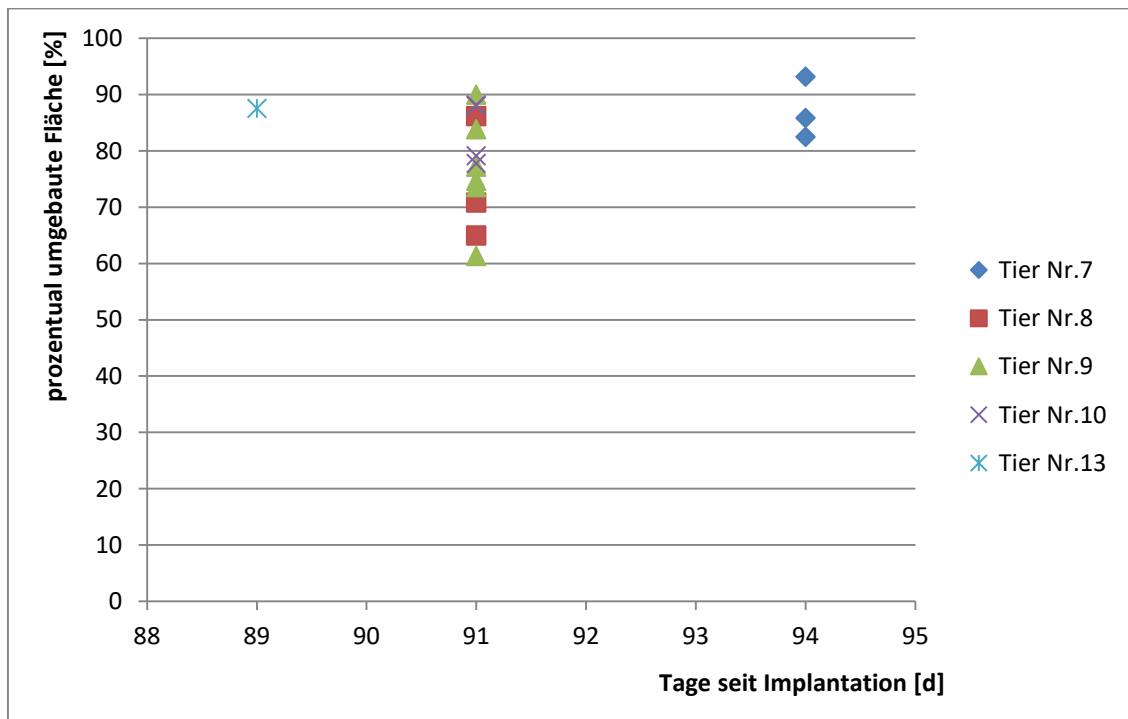


Abbildung 13: Darstellung des prozentualen Umbaus von Lyoplast[®] über der Zeit

Anhand der Abbildung lassen sich zwei Dinge verdeutlichen. Zum einen scheint es einen kontinuierlich fortschreitenden Umbau von Lyoplast[®] zu geben (siehe Steigung

der maximalen umgebauten Flächenanteile zu den Zeitpunkten 89 Tage, 91 Tage, 94 Tage $\sim 1,1\%/d$). Zum anderen gibt es große Unterschiede innerhalb eines Patches hinsichtlich des prozentualen Umbaus. Die größten Schwankungen wies Tier Nr.9 auf, welches entlang der ausgewerteten Patchfläche, die in sechs Teilbilder unterteilt wurde, einen Umbau von 61,35% - 89,99% aufweist.

5.4.3 Immunhistologische Auswertung

Die Auswertung der unter 4.5.3 beschriebenen immunhistologischen Färbungen erfolgte an einem Biorevo BZ-9000 Keyence Mikroskop.

Die zunächst durchgeführte DAB-Entwicklung der vorgenommenen Färbungen führte zu erheblichen Problemen bezüglich der Auswertbarkeit der Präparate. Grund dafür war die viel zu deutlich hervortretende Hintergrundfärbung. Die Versuche diese durch Modifikationen des unter 4.5.3 beschriebenen Färbeprotokolls [Ersetzen des PBS-Puffers in den Waschvorgängen durch einen 0,05 molaren TRIS – Puffer, sowie längere Einwirkzeiten der Präparate im Xylo] zu reduzieren brachten nicht den erwünschten Erfolg. Zudem führten die Überlagerungen von gefalteten, halb abgelösten Patchanteilen oftmals dazu, dass trotz Betrachtung mit einem Ebenenaufschlüsselnden Mikroskop (Biorevo BZ-9000 Keyence Mikroskop) nicht sicher zwischen Artefakt und einer möglichen Färbung unterschieden werden konnte. Außerdem boten Kapillare und Erythrozyten ein ähnliches Färbemuster, was die sichere Differenzierung der CD4 bzw. CD8-positiven Färbung nochmals erschwerte (siehe auch Abbildung 14).

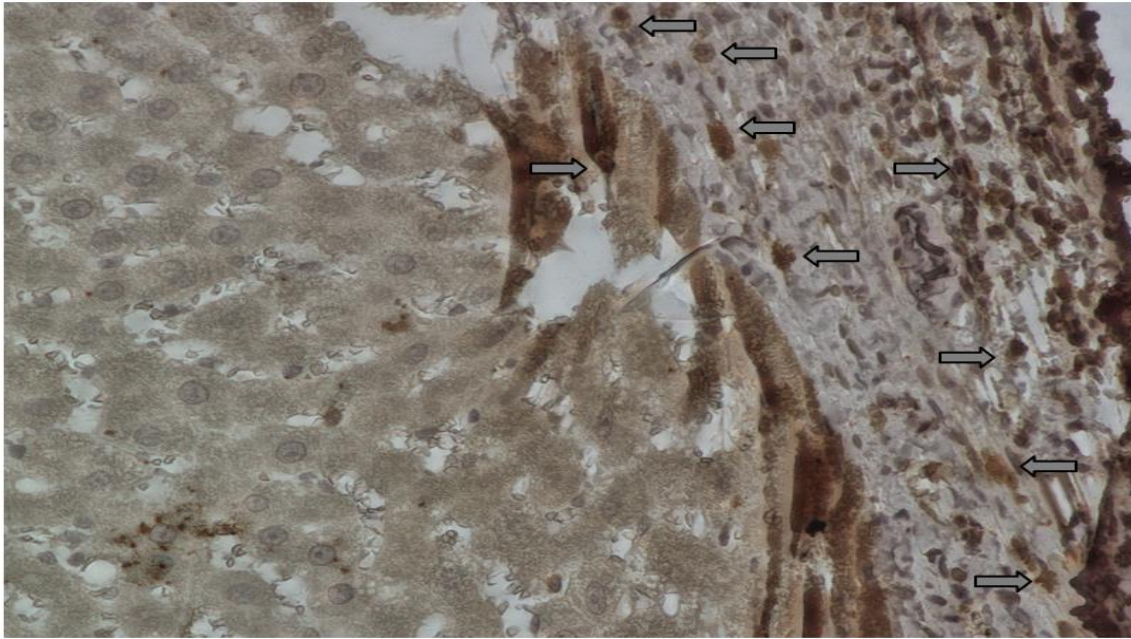


Abbildung 14: Verdeutlichung der Schwierigkeiten eine Färbung, bei mit Hilfe von DAB entwickelten Präparaten, von Artefakten zu differenzieren; am Beispiel CD8-Färbung Gore-Tex®-Tier Nr. 12; Pfeile deuten auf mögliche Färbungen

Um die Anzahl der verwertbaren Präparate zu steigern, wurde der Versuch unternommen die Präparate mit einem fluoreszierenden sekundären Antikörper, passend zum jeweiligen Primärantikörper, zu entwickeln (siehe auch 4.5.3). Dies erfolgte in der Hoffnung eine besser Unterscheidbarkeit der gesuchten, spezifischen Färbung von den unspezifischen Artefakt- und Hintergrundfärbungen zu erlangen. Zur Beurteilung der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Präparate mit Hilfe des Ebenenaufschlüsselnden Mikroskops betrachtet. Um die in Abbildung 15 gezeigten, gesuchten Färbungen von durch Überlagerung hervorgerufenen Signalen zu differenzieren, wurden Bilder der verschiedenen Ebenen aufgenommen. Erst im Anschluss daran wurden die zusammengeführten Bilder mit Hintergrundreduktion bewertet (siehe Abbildung 15).

Vor allem bei der CD8-Färbung brachte die Umstellung des sekundären Antikörpers Vorteile. Die CD4-Färbungen gestalteten sich weiterhin schwierig. Verglichen mit den

Positiv-Kontrollpräparaten der CD8 Färbung war auch hier die Anfärbung recht unspezifisch und hob sich nur wenig vom Hintergrundsignal ab (siehe Abbildung 15).

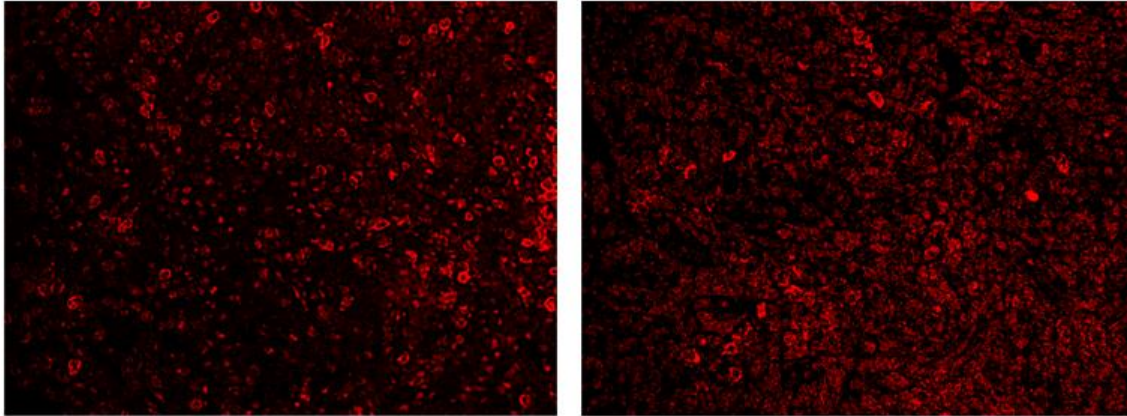


Abbildung 15: Vergleich der beiden positiv Kontrollen (Immunfluoreszenzfärbung der Milzpräparate Ratte Wistar Furth (WF)); links: CD8 1:100 4°C über Nacht; rechts: CD4 1:100 4°C über Nacht; beide 40-fache Vergrößerung

Um die Funktionalität des CD4 Antikörpers zu verifizieren wurden außerdem gefriergetrocknete Kryo-Präparate der Milz gewonnen und mit Hilfe der Immunfluoreszenzantikörper gefärbt. Auch bei diesem Vorgehen zeigte sich eine erheblich geringere Dichte an CD4-positiven Zellen, verglichen mit den CD8-positiven Zellen. Die Hintergrundfärbung war jedoch in beiden Präparaten deutlich reduziert (siehe Abbildung 16).

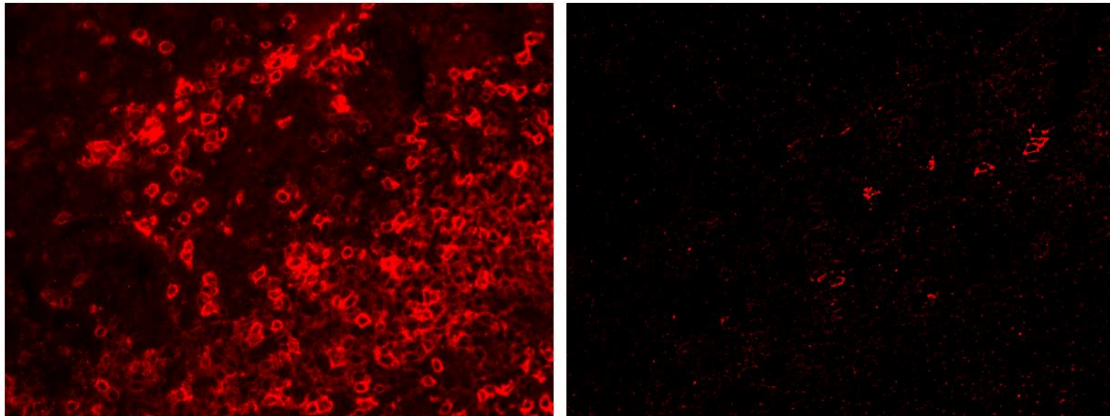


Abbildung 16: Vergleich der beiden Kryo-Präparate (Immunfluoreszenzfärbung der Milzpräparate Ratte Wistar Furth (WF)); links: CD8 1:100 4°C über Nacht; rechts: CD4 1:100 4°C über Nacht, beide 40-fache Vergrößerung

In den Versuchspräparaten war die Auswertung der CD4-positiven Färbungen, durch die Anfärbung unterschiedlicher Gewebe (Leber, Bindegewebe, Patch, Muskulatur) deren Hintergrundsignale stärker waren als die der Milz, schwieriger als in den Kontrollpräparaten. Dies führte zu einer deutlich geringeren Kontrastierung der Färbung, sodass trotz eindeutigem Färbungsnachweis in der Positivkontrolle die sichere Abgrenzung des Färbungssignales nicht möglich war und auf die Auswertung der CD4-Färbung verzichtet wurde.

Trotz der oben beschriebenen präparatorischen Schwierigkeiten mit Faltungen und Ablösungen von Präparatanteilen und der damit verbundenen geringen Anzahl an auswertbaren Präparate [n= 5, davon n= 2 Gore-Tex®-Tiere (G), n= 3 Lyoplant®-Tiere (L)] und Sichtfeldern [LPÜ: n= 15 (n=8 G, n=7 L), MPÜ: n= 6 (n=3 G, n=3 L), Patch: n= 11 (n=4 G, n=7 L)], war für die CD8-Färbung eine deskriptive Auswertung möglich. Die Beurteilung der Präparate erfolgte, wie auch in den bereits durchgeführten Auswertungen der HE-Färbung, systematisch für die Übergangsbereiche (LPÜ/MPÜ), sowie für den Patchbereich. Auf eine genauere Unterteilung des Patchbereichs [Bereiche (3)-(5), siehe Punkt 5.4.14.5] wurde in diesem Kontext verzichtet.

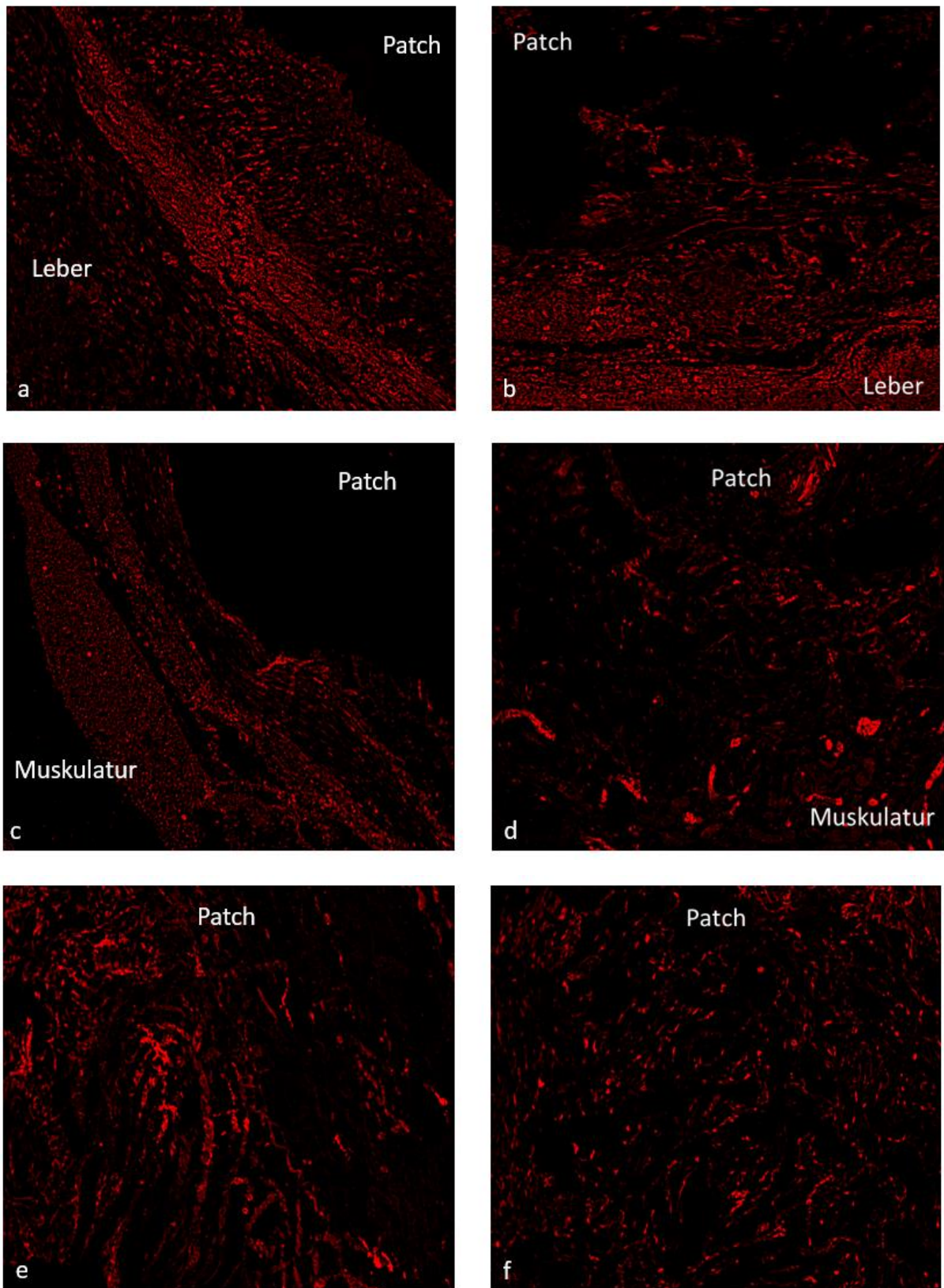


Abbildung 17: Vergleich Gore-Tex©- (linke Spalte) und Lyoplant®-Präparate (rechte Spalte) in der CD8 Immunfluoreszenzfärbung; 20-fache Vergrößerung; (a, Tier Nr. 12)

und (b, Tier Nr. 10) Vergleich des Leber-Patch-Übergangs; (c, Tier Nr. 12) und (d, Tier Nr. 13) Vergleich des Muskulatur-Patch-Übergangs; (e, Tier Nr. 4) und (f, Tier Nr. 10) Vergleich des Patchbereichs

In den Gore-Tex©-Versuchspräparaten konnte das Färbesignal vor allem in den Übergangsbereichen festgestellt werden. Bei Anschnitt beider Übergangsbereiche in einem Präparat (LPÜ/MPÜ) konnte eine Häufung der Fluoreszenzsignale im Bereich des Leber-Patch-Übergangs beobachtet werden. Teilweise gab es auch Färbesignale innerhalb eines Patches. Meist waren diese Färbungen in Bindegewebssträngen, die sich aus dem Randbereich in den Patch zogen, zu sehen. Vereinzelt waren die Fluoreszenzsignale jedoch auch unabhängig von bindegewebigen Strukturen, frei im Gore-Tex©-Patch, zu finden.

Innerhalb des Lyoplast®-Patches wurden mehr Färbesignale als im Gore-Tex©-Patch beobachtet. Die hier gefundenen CD8-Färbungen verteilten sich gleichmäßiger über den Patchbereich und waren oftmals kaum vom den Übergangsbereichen zu unterscheiden. Auch bei den Lyoplast®-Präparaten konnte eine Häufung im Leber-Patch-Übergang verglichen mit dem Muskel-Patch-Übergang festgestellt werden.

6. Diskussion

6.1 Beurteilung der Machbarkeit

Bei Ratten mit einem Startgewicht von 155 g handelt es sich um die kleinsten Tiere, die direkt nach Separation von den Muttertieren für medizinische Forschung zur Verfügung stehen. Eine Operation an solch kleinen Tieren stellt an sich bereits eine große Herausforderung dar, eine Operation am Zwerchfell und beatmeten Tieren wohl noch eine größere [99]. Auch befinden sich die Tiere damit in der Phase des größten Wachstums, was vermehrt Stress auf den eingesetzten Patch bedeutet und damit die Gefahr der Reherniation birgt [12, 108]. Diese Situation entspricht auch der Realität der Neugeborenen mit angeborener Zwerchfellhernie und bildet somit ein Problem der chirurgischen Intervention ab.

Alle Versuchstiere entwickelten sich physiologisch. Trotz einer Steigerung des Implantationsgewichtes um $\geq 155\%$ konnte bei keinem Tier eine Herniation festgestellt werden. Die makroskopische Kontinuität des Zwerchfells war bei allen Tieren zum Zeitpunkt der Explantation gegeben. Kritisch anzumerken ist allerdings, dass ein Defekt gleicher Größe sowohl für die Kontrollgruppe der Direktnahttiere als auch für die Versuchsgruppen (Gore-Tex©-Tiere und Lyoplast®-Tiere) gewählt wurde. Das bedeutet jedoch auch, dass ein Defekt dieser Größe nicht zwangsläufig mit Hilfe eines Patches versorgt werden muss und davon auszugehen ist, dass eine geringere Reherniationsrate, trotz Wachstum der Tiere, zu erwarten war. Im Bewegungsverhalten und bei Beurteilung des Allgemeinzustands der Tiere wurden während der Visiten keine Auffälligkeiten beobachtet. Zum Zeitpunkt der Explantation war es bereits zur Abflachung der Wachstumskurve gekommen, was mit dem Erreichen des Erwachsenenalters gleichzusetzen ist. Die Versuchstiere wurden in Ihrer Entwicklung durch die Implantation des Patches nicht gestört, unabhängig davon welcher Patch verwendet wurde.

Die verminderte Massezunahme direkt nach der Implantationsoperation kann zum einen durch Masseverlust durch die OP begünstigt sein (Bsp.: Rasur des Bauchfells), muss jedoch auch als physiologische Erholungsphase nach einem operativen Eingriff

gewertet werden. Die Operation am Zwerchfell im Wachstum begriffener Kleintiere unter Einsatz von Lyoplast® ist folglich möglich.

6.2 Bewertung der Adhäsionstendenz

Im Rahmen der Explantation wurden bereits makroskopisch bei allen Tieren deutliche Adhäsionen der Leber zum Zwerchfell festgestellt. Eine Beobachtung, die sich in Arbeitsgruppen, die keinen Eingriff im Abdominalraum vornahmen, jedoch ebenfalls mit Wistar Furth (WF) Ratten arbeiteten, nicht bestätigen ließ. Da sich dieses Verwachsungsmuster bei den Sham-Tieren (Tier Nr.11 und Tier Nr.15), sowie innerhalb der Versuchsgruppen, jedoch ohne Bezug zum Patch präsentierte, ist davon auszugehen das es sich hierbei um einen Prozess handelt, der durch unumgängliche Manipulation während der Implantationsoperation bedingt ist, allerdings nicht von dem Gebrauch der Versuchsmaterialien beeinflusst wird.

Beim Menschen ist die Leber physiologisch in der „Area nuda“ mit dem Zwerchfell verwachsen. Adhäsionen der Leber mit dem Zwerchfell bedeuten damit nicht per se eine Einschränkung in der Funktionalität beider Strukturen. Entgegen der Anatomie des Menschen reicht der linke Leberlappen bei der Ratte bis weit in die linke Abdominalhälfte und überdeckt damit den Bereich des gesetzten Zwerchfeldefekts.

Innerhalb der Lyoplast®-Versuchsgruppe konnten bei 50% der Tiere zusätzliche thoraxseitige makroskopische Verwachsungen festgestellt werden. Ein histologisches Äquivalent konnte in keinem der angefertigten Präparate gesehen werden. Es ist davon auszugehen, dass es sich trotz Adhäsionen Grad 3 lediglich um pleurale Bindegewebsstränge handelt, welche sich in der histologischen Auswertung nicht von den Übergangsbereichen unterscheiden. Eine Verwachsung mit dem Lungengewebe konnte ausgeschlossen werden. In wie weit diese Adhäsionen der Pleura mit dem Zwerchfell einen Einfluss auf die respiratorische Funktionalität und Belastbarkeit aufweisen ist rein spekulativ. Allerdings wurde weder die physiologische Entwicklung noch der Allgemeinzustand der Tiere beeinträchtigt. Eine Beobachtung die auch in anderen Studien, in denen pleurale Verwachsungen mit einem biokompatiblen Patch

festgestellt wurden, gemacht wurde, sodass dieser Aspekt zu vernachlässigen ist [109, 110]. Thoraxdeformitäten, die ebenfalls einen Einfluss auf die respiratorische Funktion haben können und von denen in anderen Studien, bei der Verwendung von PTFE-Patchen berichtet wurde, konnten nicht beobachtet werden [11, 80, 110-112].

Durch die Verwachsungen hin zur Pleura zeigen die Lyoplast®-Tiere eine erhöhte Adhäsionstendenz verglichen mit der Gore-Tex®-Versuchsgruppe und den Kontrolltieren.

Das biokompatible, resorbierbare Material Sugrisis®, welches bereits in der Neugeborenenchirurgie zur Defektdeckung von kongenitalen Zwerchfellhernien Anwendung findet, wird wegen seiner Tendenz zu Bridenbildung kritisiert [113]. Eine direkte Beurteilung der Adhäsionstendenz von Lyoplast® mit dem Dünndarmkonvolut ist bei Einsatz am Zwerchfell im Rattenmodell auf Grund der beschriebenen anatomischen Verhältnisse nicht möglich. Die Voruntersuchungen von Meyer et al., welche Lyoplast® zur Therapie bei Bauchwanddefekten einsetzten, konnten jedoch zeigen, dass Lyoplast® bezogen auf den Abdominalraum eine geringe Verwachsungstendenz aufweist. Tatsächlich präsentierte Lyoplast® prozentual betrachtet am wenigsten Adhäsionen, verglichen mit PTFE und PPP, jedoch konnte lediglich bezogen auf das Prolene Mesh® (PPP) eine signifikante Reduktion der Verwachsungen beschrieben werden [99, 100].

Ein makroskopisch ähnliches Bild konnte auch für die beschriebene Versuchsreihe festgestellt werden, in der sich die abdominelle Adhäsionstendenz über alle Versuchsgruppen gleich (Adhäsion Grad 3) darstellte.

6.3 Beurteilung der Integration und des Umbaus

Im Rahmen der histologischen Analyse der HE-Färbungen wurde der rein manipulativ erzeugte Übergangsbereich [Leber-Muskel-Übergang (LMÜ); siehe Abbildung 7] als Kontrolle verwendet, um eventuelle Prozesse des Einwachsungsverhaltens, die durch die eingebrachten Versuchsmaterialien (Lyoplast® /Gore-Tex®) bedingt sind, davon abzugrenzen.

Ein sich für die Auswertung ergebendes Problem war die, im Rattenmodell nicht anders zu ermöglichende, grob anatomisch lagerichtige Paraffin-Einbettung der Präparate. Die sich, bezüglich der Patchebene, einstellenden Schnittebenen der Präparate weisen bei dieser Vorgangsweise naturgemäß Winkelfehler (unter 5.4. Abbildung 7 mit α und β bezeichnet) auf, die im Kleintierexperiment unvermeidbar sind. Dies führt bei Vermessung der Gewebestrukturen (z.B. LMÜ) in der histologischen Auswertung zu größeren Variationskoeffizienten bzw. Streuungen. Von einer natürlichen Streuung der Daten muss weiterhin ausgegangen werden, da in einem biologisch, physiologischen Inkorporationsprozess der Fortschritt und damit auch die Messungen punktuell variieren. Diesen statistischen Messunsicherheiten wurde begegnet, indem die Auswertung mit Hilfe einer rein deskriptiven Statistik, mit Spannweiten, Klassenbreiten und relativem Häufigkeiten, durchgeführt wurde.

Analog zum Normalverteilungstyp wurden die relativen Häufigkeiten zwischen 67-75% als Plot dargestellt. In der Normalverteilung beträgt der Plotbereich normalerweise 2σ und damit 68%. Da hier jedoch mit einem sehr kleinen Kollektiv an Messwerten gearbeitet wurde, entspricht jeder Wert im Durchschnitt 8% der relativen Häufigkeit. Das bedeutet, dass bei Verschiebung nur eines Wertes in eine benachbarte Häufigkeitsklasse sich die jeweilige Klasse um 8% verändert. Folglich wurden relative Häufigkeiten bis 75% als Plot toleriert (siehe Abbildung 10).

Mit Hilfe der HE-Färbung konnte gezeigt werden, dass sowohl der Lyoplant®-Patch als auch Gore-Tex©-Patch bei Einsatz am Zwerchfell in das umliegende Gewebe integriert wird. Hinweise darauf, ob der Integrationsprozess der Patchmaterialien vermehrt von einem der beiden benachbarten Geweben (Muskulatur/ Leber) ausgeht, wurden jedoch nicht gefunden. Sowohl die Messwerte als auch die Häufigkeitsverteilungen der Übergangsbereiche (LPÜ, MPÜ) stimmten weitgehend mit dem manipulativ bedingten, jedoch beim Menschen auch physiologisch vorhandenen, Zwerchfell-Leber-Übergang (LMÜ) überein (siehe Abbildung 10). Eine überschießende Narbenbildung konnte somit ebenfalls ausgeschlossen werden.

Zwei der Lyoplant®-Versuchstiere (Tier Nr. 7 und Tier Nr. 13) zeigten im Bereich des Leber-Patch-Übergangs eine breitere Streuung als der Referenzbereich des Zwerchfell-Leber-Übergangs. Eine naheliegende Hypothese ist, dass es sich hierbei um Anschnitte körpereigenem Bindegewebe handelt, also bereits umgebaute Patchanteile, welche in den Randbereichen stärker ausgeprägt sind und eventuell einen Hinweis auf die Umbaurichtung bedeuten können. Diese Hypothese wird durch Sandoval et al. unterstützt, die bei der Verwendung von SIS®, einem anderen biokompatiblen Material zeigten, dass die Verwachsung mit einem soliden Organ, wie Leber oder Milz, für den erfolgreichen Inkorporationsprozess wichtig ist [109].

Andererseits zeigten alle Lyoplant®-Tiere in der Auswertung der Masson-Goldner-Färbung hohe prozentual in körpereigenes Kollagen umgebaute Flächenanteile. Obwohl innerhalb der Masson-Goldner-Auswertung nicht zwischen lebernahen oder muskelnahen Patchanteilen unterschieden wurde und Tier Nr. 7 auch hier die höchsten Werte präsentierte, können die gemessenen Übergangsbereiche nicht mit den prozentual umgebauten Flächenanteilen in Einklang gebracht werden. Dies gilt vor allem für Tiere Nr. 9 und 10, welche in allen ausgewerteten Übergangsbereichen geringe Messwerte aufzeigten, in der Masson-Goldner-Färbung jedoch trotz größerer Schwankungen Umbauraten bis zu 90% aufwiesen. Somit muss eine zweite Hypothese, die von einer präparatorischen Faltung der Leberfaszie als Artefakt während des Präparations- oder Fixationsvorganges ausgeht, in Betracht gezogen werden. Diese würde auch die große Streuung der Übergangsbereich-Messwerte der beiden Lyoplant®-Tiere (Tier Nr. 7 und Tier Nr. 13) erklären.

Mit Hilfe der Masson-Goldner-Färbung konnte bewiesen werden, dass beim Einsatz von Lyoplant® am Zwerchfell ein über die Zeit kontinuierlicher Umbau des Lyoplant®-Kollagens durch körpereigenes Kollagen stattfindet. Jedoch konnte durch die Kollagenfärbung kein sicherer Hinweis über den Ablauf des Umbauprozesses gewonnen werden. Zum Zeitpunkt der Explantation waren innerhalb eines Versuchspräparates bei Unterteilung der Patchfläche in mehrere Teilbilder erhebliche Schwankungen des Umbaufortschritts auffällig (siehe Abbildung 123 Tier Nr. 8, Tier Nr.

9). Diese konnten nicht allein durch das umgebende Gewebe erklärt werden. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden konnten keine weiteren Rückschlüsse auf die Ursache der Schwankungen getroffen werden.

Der maximal mögliche Umbau konnte bei Betrachtung über die Zeitspanne seit Implantation mit 1,1%/Tag berechnet werden. Hierbei konnte nur ein Zeitraum von fünf Tagen ausgewertet werden, da dies der Zeitspanne entspricht in der die Implantationsoperationen durchgeführt wurden. Außerdem wurde bei der Anfärbung der Präparate beschrieben, dass sich insbesondere reine Lyoplant®-Anteile des Patches leicht von den Objektträgern lösten. Es ist also möglich, dass es sich bei den beschriebenen Löchern oder Rissen innerhalb des Patchbereichs um noch nicht oder nur anfänglich umgewandeltes Lyoplant®-Kollagen handelt. Wäre dies der Fall, so müsste der berechnete maximale Umbau von 1,1%/Tag nach unten korrigiert werden. Zu beweisen wäre dies allerdings nur durch die Wahl einer anderen Fixationsmethode, was in diesem Versuchsaufbau nicht möglich war.

6.3.1 Quantifizierte Kapillarisation

Bereits in früheren Versuchen konnte makroskopisch und histologisch eine Einsprossung von Gefäßen in den Lyoplant®-Patch beobachtet werden [99, 100]. Diese beweisen die Vitalität des Gewebes, sind essentiell für das Wachstum, die Inkorporation des Patches und den Fortschritt des Umbauprozesses. Eine Quantifizierung und damit der Beweis für eine gleichmäßige Neovaskularisierung wurde bisher noch nicht durchgeführt.

In der Analyse der Vaskularisierung des Patches ergaben sich durch den Ausschluss verschiedener Tiere (siehe 5.4.1.2) ähnlich große Versuchsgruppen [MPÜ: 4 (G), 4(L); LPÜ 4(G), 5(L)], was die Voraussetzung für eine gute statistische Vergleichbarkeit war.

In den Randbereichen des Lyoplant®-Patches (MPÜ, LPÜ, PMS, PLS; siehe Abbildung 7) war kein signifikanter Unterschied der Kapillardichte feststellbar, sodass auch durch die Analyse der Kapillarisation zum Explantationszeitpunkt keine Aussage über die

vorrangige Richtung der Einsprossung der Gefäße möglich war. Ebenso war verglichen mit der Patchmitte (PM) kein signifikanter Unterschied der Neovaskularisierung zu verzeichnen. Somit kann 12 Wochen nach Implantation innerhalb der Lyoplast®-Versuchsgruppe im Kleintiermodell von einer kontinuierlichen Vaskularisierung des Zwerchfells ausgegangen werden, die durch den Patch nicht gestört wird.

Für das Implantatmaterial SIS® konnte gezeigt werden, dass bei Verwachsung mit einem soliden Organ eine bessere Neovaskularisation nachweisbar ist [109]. Weiterhin konnte für heparinisierte Kollagenpräparate nach einem kürzeren Zeitintervall von zwei Wochen gezeigt werden, dass die Kapillareinsprossung, bei vorhandener Adhäsion zur Leber, vorrangig auf der Leberseite zu finden war [114]. Es ist davon auszugehen, dass die gleichmäßige Kapillareinsprossung durch die Nähe zur Leber gefördert wird.

Innerhalb der Gore-Tex®-Versuchsgruppe war in den Randbereichen die Kapillarisation gleichermaßen ausgeprägt, wie in der Lyoplast®-Versuchsgruppe.

Allerdings wurde die Vaskularisierung durch den Patch erheblich gestört. Dieses Ergebnis wurde so erwartet, da es sich bei Gore-Tex® um ein anorganisches, künstliches Material handelt, was eine direkte Neovaskularisierung des Patches ausschließt. Kimber et al. konnten ähnliche Ergebnisse zeigen und bringen sie in Verbindung mit der beobachteten, ausgeprägten Entzündungsreaktion. Möglicherweise kann auch das Resultat dieser Arbeit als Zeichen einer immunologischen Reaktion gegen PTFE gewertet werden [115].

6.4 Beurteilung der immunologischen Prozesse

Die Frage nach den immunologisch ablaufenden Prozessen ist vor allem beim Einsatz eines Fremdmaterials wichtig. Sie geben entscheidende Hinweise über die Reaktion die das implantierte Material im Empfänger auslöst und damit über eine „Annahme“ oder „Abstoßung“ des Implantats.

Für das neue biokompatible Material Lyoplast[®], konnten Meyer et al. für den Einsatz an der Bauchwand die Hypothese aufstellen, dass es durch das vermehrte Ablaufen der Immunreaktion über den „TH2-Pathway“ zu einer Unterdrückung der Entzündungsreaktion kommt. Durch die Differenzierung der CD4-positiven Zellen zu TH2-Zellen wird die Aktivierung der Makrophagen gehemmt und es kommt zur Freisetzung der anti-entzündlich wirkenden Mediatoren IL-4 und IL-10. Damit kommt es anstatt zu einer „Abstoßungsreaktion“ zu einer „Annahme“ des Implantats und zu einem Remodulierungsvorgang [100, 101]. Ein Prozess der auch schon für andere xenogene, azelluläre, avaskuläre Implantatmaterialien, wie Sugrasis[®] beschrieben wurde [116].

Andere Prozesse laufen hingegen am synthetischen Gore-Tex[®]-Patch ab. Hier kommt es zu einer starken peripheren Fremdkörperreaktion im Sinne einer klassischen Entzündungsreaktion. Diese scheint über den „TH1-Pathway“ abzulaufen. Über diesen kommt es zur zytokingesteuerten (Interferon- γ , TNF α) Makrophagenaktivierung. Diese wiederum führt zur Aktivierung und zum Wachstum von Fibroblasten. Dadurch wird die stabile, den Gore-Tex[®]-Patch umgebende Narbenplatte gebildet, die auch in den histologischen Färbungen dieser Arbeit beobachtet werden konnte [100, 115].

Interessanterweise wurde bereits in den Versuchen zum Einsatz von Lyoplast[®] an der Bauchwand eine verstärkte Expression von CD8-positiven Zellen innerhalb der Lyoplast[®]-Versuchsgruppe beobachtet. Diese konnte zur Ermittlung des CD4/CD8-Quotienten herangezogen werden und die Hypothese des immunologischen Remodulierungsprozesses unterstützen [101]. In der hier zu Grunde liegende Arbeit konnten auf Grunde der unter 5.4.3 beschriebenen Schwierigkeiten in den immunologischen Färbungen allein die CD8-positiv gefärbten Zellen ausgewertet werden. Die ursprünglich im Versuchsaufbau geplante Berechnung des CD4/CD8-Quotienten scheiterte an der fehlenden Auswertbarkeit der CD4-Färbung. Zur Analyse dieser scheint eine Kryofixation der Präparate unerlässlich. Auch beim Einsatz von Lyoplast[®] am Zwerchfell konnte innerhalb der Lyoplast[®]-Versuchsgruppe eine vermehrte Anfärbbarkeit von CD8-positiven Zellen, verglichen mit der Gore-Tex[®]-

Versuchsgruppe festgestellt werden. Die Färbungen konnten innerhalb des Lyoplant®-Versuchstiere gleichmäßig über den gesamten Patchbereich beobachtet werden. Obwohl der Bezug zu CD4-Färbung fehlt, ist auf Grunde der Voruntersuchungen von Meyer et al. und Vorergebnissen dieser Versuchsreihe, in der durch die Masson-Goldner-Färbung ein deutlicher Umbauprozess festgestellt werden konnte, die Hypothese erlaubt, dass es sich auch hierbei um einen Hinweis auf den im Rahmen der Umbau-Hypothese stattfindenden Ablauf des „TH2-Pathways“ handelt. Jedoch gilt auch zu bedenken, dass es sich bei CD8-positiven Zellen um zytotoxische T-Zellen handelt. Trotz ähnlicher Ergebnisse in den Vorversuchen ist damit allein durch die vermehrte Anfärbbarkeit von CD8-positiven Zellen in der Lyoplant®-Versuchsgruppe die Annahme der Hypothese einer Immunantwort über den „TH2-Pathway“, für den Einsatz von Lyoplant® am Zwerchfell ohne den Bezug zur CD4 Färbung nicht möglich.

Im Übergang zur Leber konnte in beiden Versuchsgruppen, Gore-Tex© und Lyoplant®, eine Häufung der Färbungen festgestellt werden, während in der Direktnaht-Kontrollgruppe nur ganz vereinzelt Färbungen im Bindegewebe zwischen Leber und Zwerchfell zu beobachten waren. Was wiederum die Annahme von Sandoval et al., nach der die Adhäsion mit einem soliden Organ wichtig ist für den Inkorporationsprozess des Patches am Zwerchfell, unterstützt [109].

6.5 Einordnung Lyoplant® im Vergleich mit anderen Materialien

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind die ersten, die die Anwendung von Lyoplant® an Zwerchfelldefekten beschreiben. Weitere biokompatible Materialien, die ebenso wie Lyoplant® resorbierbare, azelluläre Kollagenmatrizen darstellen, die als temporäre Gewebestruktur dienen, sind: AlloDerm® (hergestellt aus humaner Dermis), Permacol™ (hergestellt aus dermalen Schweine Kollagen) oder Surgisis® (hergestellt aus der Dünndarm-Submukosa des Schweins). Für alle diese Materialien wurden eine gute Neovaskularisation sowie ein Remodelingprozess beschrieben [11]. Permacol™, AlloDerm® und Surgisis® wurden bereits klinisch eingesetzt [12, 16, 19].

Lyoplast® bietet einige Gemeinsamkeiten mit dem der klinisch am häufigsten untersuchten biokompatiblen Material Surgisis® (SIS). Für beide konnte gezeigt werden, dass ein Umbau in körpereigenes Kollagen stattfindet. Die Daten der Umbauraten für Surgisis® schwanken hierbei. Je nach Quelle wird von einem Umbau zwischen vier Wochen bis 140 Tagen gesprochen, diese variieren je nach Lokalisation [117, 118]. Zudem wurde auch für SIS® eine gleichmäßige Neovaskularisierung sowie minimale Fremdkörperreaktionen gezeigt. Dies spricht für das Remodeling des Patches [12, 118].

In der klinischen Testung von Surgisis® konnten bezogen auf die Komplikationsrate, Reherniationen und Bridenbildung und damit verbunden die Notwendigkeit der Reoperation, keine Unterschiede zu der Verwendung von Gore-Tex® gefunden werden. Auch bezüglich des Zeitpunktes zu dem die Hernie erneut auftrat und bezogen auf die Mortalitätsrate präsentierten sich beide Materialien ähnlich [12, 15, 113]. Jedoch ist die Datenlage zur klinischen Anwendungen für beide Materialien sehr heterogen. So gibt es sowohl für SIS®, als auch für Gore-Tex® Studien mit gar keinen oder sehr geringen Reherniationen [118, 119]. Auf der anderen Seite gibt es auch Versuchsreihen, in denen bei Gore-Tex®-Versorgung fast die Hälfte der Patienten eine zweite Operation benötigten [88] und auch Studien in denen der Verschluss mit Surgisis® zu deutlich erhöhten Reherniationsraten und Bridenbildung führt sowie auch zu Thoraxdeformitäten [120]. In einzelnen Fällen wurden auch Abszesse oder Serome beobachtet [11, 110].

Mitchell et al. präsentierten ihre Ergebnisse zur klinischen Anwendung von Permacol™ zur Defektdeckung von kongenitalen Zwerchfellhernien. Hierbei wurden das biokompatible Material mit dem synthetischen Standardmaterial Gore-Tex® verglichen. Bei Verwendung von Permacol™ konnte im Beobachtungszeitraum von 20 Monaten kein Wiederauftreten der Hernie beobachtet werden. Durch die unterschiedliche Fallzahl, verglichen mit Gore-Tex®, konnte jedoch keine statistische Signifikanz erreicht werden. Den Vorteil von Permacol™ sehen die Autoren darin, dass es sich bei Permacol™ um ein chemisch vernetztes Kollagen handelt. Dadurch werden geringere Abbauraten durch die Kollagenase erzielt, was die geringen

Reherniationsraten bedingen kann. Zudem wurde wiederum eine gute Integration in das umgebende Gewebe, eine geringe Entzündungsreaktion sowie normale Wundheilungen beschrieben. Bridenbildung wurde weder bei den mit Gore-Tex® versorgten Patienten noch bei den Permacol™- Patienten beobachtet [16].

Für AlloDerm® wurden nur sehr wenige klinische Anwendungen beschrieben. Die Ergebnisse der vorhandenen Tierstudien und klinische Einsätze am Patienten boten letztlich keine Vorteile gegenüber Surgisis® oder Permacol™. Die Reherniationsrate bei 5 Patienten betrug 40%, ebenso viele präsentierten Dünndarmverschlüsse durch Bridenbildung und die Re-Reherniationsrate lag bei 100%, sodass der weitere klinische Einsatz zur Defektdeckung am Zwerchfell als nicht gerechtfertigt bewertet wurde [11, 19].

Zudem gibt es Forschungsansätze in denen durch „cell-seeding“ fetale Zellen in einen azellulären Patch zur Defektdeckung eingebracht werden. Diese Modifikation des Patches führte zu verbesserten funktionellen Outcome im Kleintiermodell sowie zu signifikant verringerten Reherniationsraten. Hinsichtlich der Rehernitation erzielte AlloDerm® als Basispatch im Kleintiermodell bessere Ergebnisse als SIS®. Weiterhin konnte der Einsatz im Großtiermodell diese Ergebnisse bestätigen und zeigen, dass das Einbringen von mesenchymalen Amnionzellen, fetalen Myoblasten vorzuziehen ist [17, 121].

Ebenso wird in einigen Studien versucht verschiedene Patchmaterialien miteinander zu kombinieren und somit Vorteile beider Materialien zu verknüpfen [18, 121].

Im klinischen Einsatz konnte die Kombination der beiden synthetischen Materialien Gore-Tex® und Marlex gute Ergebnisse erzielen. So wurde lediglich bei einem Patienten (3,6%) eine Reherniation festgestellt. Jedoch kam es überproportional häufig zu Blutungskomplikationen während „Patch-Repair-Operationen“, was in 17% der Fälle eine Splenektomie notwendig machte [18].

Jancelewicz et al. kombinierten in einer klinischen Studie SIS® und PTFE. Vorteile gegenüber einem reinen PTFE-Patch konnten jedoch nicht festgestellt werden [120].

Urita et al. führten Versuche am Rattenmodell durch in denen sie ein Hybridschwamm aus Poly-lactic-co-glycolic-acid (PLGA) (Vicryl) und Kollagen zur Defektdeckung an Zwerchfellhernien nutzen. Zum Teil wurden in diesen mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks eingebracht. Sie konnten zeigen, dass trotz fast komplettem Abbau des Patchmaterials nach drei Monaten ein gut vaskularisiertes „Neo-Zwerchfell“ gebildet wurde. Zudem wurden Desmin-positive Zellen im ehemaligen Patchbereich gefunden. Eine Regeneration von Muskelzellen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Vorteile durch das „Stammzell-seeding“ konnten nicht festgestellt werden [13].

Aikawa et al. entwickelten einen komplexen, synthetischen Patch aus verschiedenen biokompatiblen Polymeren. Dieser wurde zusätzlich thoraxseitig mit Seprafilm[®], einer Adhäsionsbarriere, beschichtet. Sie konnten vielversprechende Ergebnisse beim Einsatz am Großtiermodell beschreiben. Histologisch wiesen sie bei geringer Fremdkörperreaktion, das Einwachsen von mesothelialen Zellen und eine, wenn auch nur geringfügig vorhandene, verbreiterte Muskelschicht am Patchrandbereich nach. Makroskopisch konnten, ähnlich zu unseren Ergebnissen, massive Verwachsungen zu Leber und Milz gesehen werden. Verwachsungen zur Lunge waren nur vereinzelt vorhanden und mit der Zeit rückläufig [122].

6.6 Ausblick

Diese Arbeit konnte zeigen, dass der Einsatz von Lyoplant[®] am Zwerchfell möglich ist und dass sich Lyoplant[®] ähnlich wie andere, bereits klinisch verwendete biokompatible Materialien verhält. Durch den hier beschriebenen Versuchsaufbau konnten bereits einige Antworten und Tendenzen, die für eine in weiter Zukunft liegende klinische Anwendung sprechen könnten, gefunden werden. Zuvor stellen sich jedoch viele neue Fragen, die in noch folgenden tierexperimentellen Studien am Klein- und Großtiermodell zur Verwendung von Lyoplant[®] am Zwerchfell, beantwortet werden müssen.

So konnte auf Grund der Euthanasie aller Tiere nach 12 Wochen die Frage nach dem Voranschreiten des Umbauprozesses nur von einem Endpunkt aus betrachtet werden. Hier wäre eine Betrachtung über kleinere Zeitintervalle, beispielsweise nach 4, 6, 12 Wochen, interessant. Bei dieser Art des Studiendesigns kann eventuell auch die Frage nach der vorrangigen Richtung der Kapillareinsprossung beantwortet werden. Auch sollte die Rolle der Verwachsung zur Leber genauer untersucht werden. Ebenso ist es von großer Bedeutung die immunologischen Ergebnisse zu vervollständigen, sodass der Prozess der Patch- „Annahme“ oder – „Abstoßung“ besser verstanden werden kann.

Weiterhin stellt sich bezogen auf die Anatomie die Frage, ob die verstärkte Adhäsionstendenz, die sich in diesem Experiment hinsichtlich pleuralen Verwachsungen mit Lyoplant® zeigten, bestätigen lassen und ob sich diese Tendenz zusätzlich auf der abdominalen Seite zeigt, wenn der linke Leberlappen nicht bis unter die linke Zwerchfellkuppel reicht. Vor allem die Frage, ob es zu Bridenbildung mit dem Dünndarmkonvolut kommt, ist für den eventuellen zukünftigen klinischen Einsatz von Lyoplant® an Zwerchfelldefekten ein wichtiger Aspekt, da dies die Gefahr der Ausbildung eines Ileus bedeutet und dann unweigerlich zu einer Reoperation führt. Nicht zuletzt sollte Lyoplant® direkt mit anderen biokompatiblen Materialien, wie SIS® oder Permacol™ verglichen werden, um eventuelle Vorteile herauszuarbeiten.

Für diese zukünftigen Studien am Klein- und Großtiermodell kann mit größeren Versuchstiergruppen gearbeitet werden, da wir zeigen konnten, dass der Einsatz von Lyoplant® am Zwerchfell möglich ist.

7. Zusammenfassung

Die kongenitale Zwerchfellhernie ist eine seltene aber dramatische Fehlbildung, die bis heute mit einer hohen prä- und postnatalen Mortalität vergesellschaftet ist. Der Defektverschluss ist ein entscheidender Schritt in der Therapie. Ein Primärverschluss wird angestrebt, ist jedoch nur bei kleinen Defekten möglich. Bei größeren Zwerchfellhernien muss ein Patch zum Verschluss verwendet werden. Hierbei ist die Verwendung von Gore-Tex©, ein Mesh aus PTFE, ein weit verbreiteter Standard. Auch biokompatible Materialien, wie SIS®, werden bereits in der klinischen Praxis verwendet. Obwohl biokompatible Materialien Vorteile gegenüber synthetischen Materialien wie PTFE aufweisen, konnte eine echte biokompatible Alternative zum Patchverschluss noch nicht gefunden werden [11, 15].

Meyer et al. konnten für den Einsatz an der Bauchwand im Klein und Großtiermodell zeigen, dass das neue biokompatible Material Lyoplast® eine Implantatalternative darstellt. Alle Tiere der Vorversuche an der Bauchwand entwickelten sich physiologisch. Es wurden nur minimale Adhäsionen zum Intestinum, eine gute Integration in das Nachbargewebe sowie eine gute Vaskularisierung und ein immunologisches Remodeling beobachtet [99-101].

Auf Grund dieser guten Ergebnisse für die Verwendung von Lyoplast® an der Bauchwand sollte geprüft werden, ob Lyoplast® auch für den Einsatz am Zwerchfell geeignet ist. Da es sich um die erstmalige Anwendung von Lyoplast® am Zwerchfell handelte, wurde ein Kleintiermodell zur Erprobung gewählt. Verglichen wurde die Verwendung von Lyoplast® mit dem momentanen Standardmaterial Gore-Tex©. Als Versuchstiere dienten 15 junge, gesunde Wistar Furth-Ratten, denen ein 1,0 x 0,5 cm großer Defekt im linken Zwerchfell gesetzt wurde, welcher anschließend mit dem Fremdmaterial (Gore-Tex©: n = 5; Lyoplast®: n = 6; Direktnaht-Kontrollgruppe: n = 2) verschlossen wurde. Nach einem Versuchszeitraum von 12 Wochen, in denen die Tiere regelmäßig untersucht wurden, wurde der Patch mitsamt umgebendem Gewebe zur histologischen Analyse entnommen. Alle Tiere zeigten eine physiologische Gewichtskurve. Bei keinem Tier kam es zur Hernienbildung. Starke Adhäsionen zur

Leber konnten bei allen Versuchstieren inklusive der Kontrollgruppe festgestellt werden, zur Pleura zeigten lediglich 50% der Lyoplant®-Versuchsgruppe Verwachsungen. Die Adhäsionstendenz von Lyoplant® ist damit höher als die von Gore-Tex© oder bei Primärverschluss. In der mikroskopischen Auswertung konnte gezeigt werden, dass sowohl Lyoplant®, als auch Gore-Tex© gut in das Nachbargewebe integriert werden. Auch der Umbauprozess in körpereiniges Kollagen für das biokompatible Material konnte bestätigt werden. Lyoplant® wird mit einer maximalen Umbaurate von 1,1%Flächenanteil/Tag umgewandelt. Innerhalb des Lyoplant®-Patches konnte zudem eine kontinuierliche Neovaskularisation, vergleichbar mit der der Übergangsbereiche festgestellt werden. Die immunologischen Prozesse konnten nur teilweise beurteilt werden, sodass hier kein abschließendes Urteil erlaubt ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von Lyoplant® zur Defektdeckung am Zwerchfell möglich ist. Lyoplant® präsentiert viele Ähnlichkeiten mit dem bereits klinisch genutzten Material SIS®. Um die Frage nach einer zukünftigen möglichen klinischen Anwendung beantworten zu können, sind weitere tierexperimentelle Studien im Klein- und Großtiermodell nötig.

8. Anhang

8.1 Überblick über Verwachsungen bei Explantation

| | | Verwachsungen | | | Durchblutung | |
|---------------|---------------------|-----------------|---------------------------------------|-----------|--------------|------------|
| | Versuchstier Nummer | Lunge entfaltet | zur Leber | zur Lunge | Lunge | Zwerchfell |
| Gore- Tex© | Tier Nr.3 | Ja | Starke, flächige Verwachsungen Grad 3 | Keine | o.B. | o.B. |
| | Tier Nr.4 | Ja | Starke, flächige Verwachsungen Grad 3 | Keine | o.B. | o.B. |
| | Tier Nr.5 | Ja | Starke, flächige Verwachsungen Grad 3 | Keine | o.B. | o.B. |
| | Tier Nr.12 | Ja | Starke, flächige Verwachsungen Grad 3 | Keine | o.B. | o.B. |
| | Tier Nr.14 | Ja | Starke, flächige Verwachsungen Grad 3 | Keine | o.B. | o.B. |

Tabelle 6: Überblick makroskopische Ergebnisse der Explantation (Gore-Tex©-Versuchsgruppe)

| | | Verwachsungen | | | Durchblutung | |
|------------|---------------------|-----------------|--|-----------|--------------|------------|
| | Versuchstier Nummer | Lunge entfaltet | zur Leber | zur Lunge | Lunge | Zwerchfell |
| Direktnaht | Tier Nr.11 | Ja | Feste Verwachsungen Grad 3 | Keine | o.B. | o.B. |
| | Tier Nr.15 | Ja | Weniger, lockerere Verwachsungen Grad 3 | Keine | o.B. | o.B. |

Tabelle 7: Überblick makroskopische Ergebnisse der Explantation (Direktnaht-Tiere)

| | | Verwachsungen | | | Durchblutung | |
|-----------|---------------------|-----------------|---|--------------------------------------|--------------|------------|
| | Versuchstier Nummer | Lunge entfaltet | zur Leber | zur Lunge | Lunge | Zwerchfell |
| Lyoplant® | Tier Nr.6 | Ja | Starke, flächige Verwachsungen; auch gesamtes angrenzendes Zwerchfell Grad 3 | Starke Verwachsungsstränge Grad 3 | o.B. | o.B. |
| | Tier Nr.7 | Ja | Starke, flächige Verwachsungen Grad 3 | Verwachsungsstränge Grad 3 | o.B. | o.B. |
| | Tier Nr.8 | Ja | Weniger, lockerere Verwachsungen Grad 3 | Keine | o.B. | o.B. |

| | | | | | | |
|-----------|------------|----|---|------------------------------------|------|------|
| Lyoplant® | Tier Nr.9 | Ja | Starke, flächige Verwachsungen; auch gesamtes angrenzendes Zwerchfell Grad 3 | Keine | o.B. | o.B. |
| | Tier Nr.10 | Ja | Starke, flächige Verwachsungen; auch gesamtes angrenzendes Zwerchfell Grad 3 | Keine | o.B. | o.B. |
| | Tier Nr.13 | Ja | flächige, lockerere Verwachsungen Grad 3 | Zwei Verwachsungsstränge Grad 2 | o.B. | o.B. |

Tabelle 8: Übersicht makroskopische Ergebnisse der Explantation (Lyoplant®-Versuchsgruppe)

8.2 Anzahl der Vermessungen je Tier zur Analyse der Übergangsbereiche

| Versuchsgruppe | Versuchstier Nummer | Anzahl Messungen | | | Ausschlussgrund |
|----------------|------------------------|------------------|-----|-----|--|
| | | LMÜ | LPÜ | MPÜ | |
| Gore-Tex® | Tier Nr.3 | 8 | 8 | 16 | |
| | Tier Nr.4 | / | 24 | / | |
| | Tier Nr.5 | 12 | 12 | 12 | |
| | Tier Nr.12 | / | 16 | 8 | Nur punktueller Patchanschnitt |
| | Tier Nr.14 | / | / | 24 | Patch durchtrennt und randständig getroffen, Auffächerung Präparat, keine klaren Übergänge |

Tabelle 9: Übersicht Vermessung Gore-Tex®-Versuchsgruppe

| Versuchsgruppe | Versuchstier Nummer | Anzahl Messungen | | | Ausschlussgrund |
|----------------|------------------------|------------------|-----|-----|---|
| | | LMÜ | LPÜ | MPÜ | |
| Lyoplant® | Tier Nr.6 | / | / | / | Gefaltetes, aufgefächertes Präparat, keine klaren Übergänge |
| | Tier Nr.7 | 8 | 12 | 12 | |
| | Tier Nr.8 | 8 | 8 | 8 | |
| | Tier Nr.9 | / | 10 | / | |
| | Tier Nr.10 | / | 8 | 12 | |
| | Tier Nr.13 | 8 | 12 | 12 | |

Tabelle 10: Übersicht Vermessung Lyoplant®-Versuchsgruppe

| Versuchsgruppe | Versuchstier Nummer | Anzahl Messungen | | | Ausschlussgrund |
|----------------|------------------------|------------------|-----|-----|-----------------|
| | | LMÜ | LPÜ | MPL | |
| Direktnaht | Tier Nr.11 | 8 | / | / | |
| | Tier Nr.15 | 16 | / | / | |

Tabelle 11: Übersicht Vermessungen Direktnaht-Versuchsgruppe

9. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Übersicht des zeitlichen Ablaufs | 11 |
| Abbildung 2: Intubierte und beatmete Versuchsratte während der Implantationsoperation | 14 |
| Abbildung 3: Gewichtsentwicklung des jeweils leichtesten und schwersten Tieres einer Versuchsgruppe und Referenzbereich des Züchters..... | 23 |
| Abbildung 4: Wachstumskurve Lyoplant®-Versuchstier Tier Nr.13 mit Wachstumsstagnation nach Operation | 24 |
| Abbildung 5: Explantation- deutliche makroskopisch sichtbare Verwachsungen des Zwerchfells mit dem linken Leberlappen (Tier Nr.13) [siehe Pfeil] | 26 |
| Abbildung 6: Verwachsungsstränge von der Lunge zum Patchbereich (Tier Nr.7) [siehe Pfeile] | 27 |
| Abbildung 7: Skizze der histologischen Schnittebene in Bezug auf die anatomischen Lageverhältnisse im Präparat..... | 28 |
| Abbildung 8: Vorgehen bei Vermessung der Übergangsbereiche | 29 |
| Abbildung 9: Vermessung des Zwerchfell-Patch-Übergangs (MPÜ) bei Gore-Tex®-Tier Nr.5..... | 30 |
| Abbildung 10: Vermessung der Übergangsbereiche [Grün: Gore-Tex®-Versuchstiere; Rot: Lyoplant®- Versuchstiere; Blau: Direkter Übergang zwischen Leber und Muskel unabhängig vom Patch] | 31 |
| Abbildung 11: Auszählung der Kapillaren im Lyoplant®-Patch Tier Nr.8..... | 32 |
| Abbildung 12: Bildauswertung der Masson-Goldner-Färbung zur Beurteilung des Umbauprozesses von Lyoplant® (Tier Nr.13) | 35 |
| Abbildung 13: Darstellung des prozentualen Umbaus von Lyoplant® über der Zeit | 36 |
| Abbildung 14: Verdeutlichung der Schwierigkeiten eine Färbung, bei mit Hilfe von DAB entwickelten Präparaten, von Artefakten zu differenzieren; am Beispiel CD8-Färbung Gore-Tex®-Tier Nr. 12; Pfeile deuten auf mögliche Färbungen | 38 |
| Abbildung 15: Vergleich der beiden positiv Kontrollen (Immunfluoreszenzfärbung der Milzpräparate Ratte Wistar Furth (WF)); links: CD8 1:100 4°C über Nacht; rechts: CD4 1:100 4°C über Nacht, beide 40-fache Vergrößerung | 39 |
| Abbildung 16: Vergleich der beiden Kryo-Präparate (Immunfluoreszenzfärbung der Milzpräparate Ratte Wistar Furth (WF)); links: CD8 1:100 4°C über Nacht; rechts: CD4 1:100 4°C über Nacht, beide 40-fache Vergrößerung | 40 |
| Abbildung 17: Vergleich Gore-Tex®- (linke Spalte) und Lyoplant®-Präparate (rechte Spalte) in der CD8 Immunfluoreszenzfärbung; 20-fache Vergrößerung; (a, Tier Nr. 12) und (b, Tier Nr. 10) Vergleich des Leber-Patch-Übergangs; (c, Tier Nr. 12) und (d, Tier Nr. 13) Vergleich des Muskulatur-Patch- Übergangs; (e, Tier Nr. 4) und (f, Tier Nr. 10) Vergleich des Patchbereichs | 41 |

10. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper..... | 18 |
| Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper bei Immunfluoreszenzfärbung | 18 |
| Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper bei endogener Peroxidasereaktion und nachfolgender DAB-Entwicklung | 19 |
| Tabelle 4: Gewichtssteigerung von Implantation bis Explantation | 22 |
| Tabelle 5 : Merkmale zur Bestimmung der Adhäsionsgrade..... | 25 |
| Tabelle 6: Überblick makroskopische Ergebnisse der Explantation (Gore-Tex®-Versuchsgruppe)..... | 58 |
| Tabelle 7: Überblick makroskopische Ergebnisse der Explantation (Direktnaht-Tiere)..... | 59 |
| Tabelle 8: Übersicht makroskopische Ergebnisse der Explantation (Lyoplant®- Versuchsgruppe) | 60 |
| Tabelle 9: Übersicht Vermessung Gore-Tex®-Versuchsgruppe | 61 |
| Tabelle 10: Übersicht Vermessung Lyoplant®-Versuchsgruppe | 62 |
| Tabelle 11: Übersicht Vermessungen Direktnaht-Versuchsgruppe..... | 62 |

11. Literaturverzeichnis

1. Puri, P. and T. Wester, *Historical aspects of congenital diaphragmatic hernia*. *Pediatric Surgery International*, 1997. 12(2-3): p. 95-100.
2. Reinhardt, D. and K. Schneider, *Kongenitale Zwerchfellhernie*. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 1997. 145(1): p. 67-68.
3. Bekdash, B., B. Singh, and K. Lakhoo, *Recurrent late complications following congenital diaphragmatic hernia repair with prosthetic patches: a case series*. *J Med Case Rep*, 2009. 3: p. 7237.
4. Kesieme, E.B. and C.N. Kesieme, *Congenital diaphragmatic hernia: review of current concept in surgical management*. *ISRN Surg*, 2011. 2011: p. 974041.
5. Waag, K.-L., *Zwerchfellhernie*, in: *Ute von Schweinitz, Benno Ure (Hg.): Kinderchirurgie. Viszerale und allgemeine Chirurgie des Kindesalters*. Springer Verlag, 2009. 1. Auflage: p. 15.
6. Skari, H., et al., *Congenital diaphragmatic hernia: a meta-analysis of mortality factors*. *J Pediatr Surg*, 2000. 35(8): p. 1187-97.
7. Akinkuotu, A.C., et al., *Risk-stratification of severity for infants with CDH: Prenatal versus postnatal predictors of outcome*. *J Pediatr Surg*, 2016. 51(1): p. 44-8.
8. Downard, C.D., et al., *Analysis of an improved survival rate for congenital diaphragmatic hernia*. *J Pediatr Surg*, 2003. 38(5): p. 729-32.
9. Doyle, N.M. and K.P. Lally, *The CDH Study Group and advances in the clinical care of the patient with congenital diaphragmatic hernia*. *Semin Perinatol*, 2004. 28(3): p. 174-84.
10. Lally, K.P., et al., *Defect size determines survival in infants with congenital diaphragmatic hernia*. *Pediatrics*, 2007. 120(3): p. e651-7.
11. Gasior, A.C. and S.D. St Peter, *A review of patch options in the repair of congenital diaphragm defects*. *Pediatr Surg Int*, 2012. 28(4): p. 327-33.
12. Grethel, E.J., et al., *Prosthetic patches for congenital diaphragmatic hernia repair: Surgisis vs Gore-Tex*. *J Pediatr Surg*, 2006. 41(1): p. 29-33; discussion 29-33.
13. Urita, Y., et al., *Evaluation of diaphragmatic hernia repair using PLGA mesh-collagen sponge hybrid scaffold: an experimental study in a rat model*. *Pediatr Surg Int*, 2008. 24(9): p. 1041-5.
14. Gonzalez, R., et al., *Absorbable versus nonabsorbable mesh repair of congenital diaphragmatic hernias in a growing animal model*. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*, 2011. 21(5): p. 449-54.
15. Romao, R.L., et al., *What is the best prosthetic material for patch repair of congenital diaphragmatic hernia? Comparison and meta-analysis of porcine small intestinal submucosa and polytetrafluoroethylene*. *J Pediatr Surg*, 2012. 47(8): p. 1496-500.
16. Mitchell, I.C., et al., *Permacol: a potential biologic patch alternative in congenital diaphragmatic hernia repair*. *J Pediatr Surg*, 2008. 43(12): p. 2161-4.

17. Fuchs, J.R., et al., *Diaphragmatic reconstruction with autologous tendon engineered from mesenchymal amniocytes*. J Pediatr Surg, 2004. 39(6): p. 834-8; discussion 834-8.
18. Riehle, K.J., D.K. Magnuson, and J.H. Waldhausen, *Low recurrence rate after Gore-Tex/Marlex composite patch repair for posterolateral congenital diaphragmatic hernia*. J Pediatr Surg, 2007. 42(11): p. 1841-4.
19. Laituri, C.A., et al., *Outcome of congenital diaphragmatic hernia repair depending on patch type*. Eur J Pediatr Surg, 2010. 20(6): p. 363-5.
20. Vrankovic, D., et al., *Physical and Histologic Properties of Substitutes Used for the Anterior Fossa Region Dural Repair*. Skull base surgery, 1999. 9(1): p. 9-13.
21. Benninghoff, A. and D. Drenckhahn, *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie - Band 1*. ELSEVIER Urban & Fischer, 2008. 17. Auflage: p. 3.
22. Clugston, R.D. and J.J. Greer, *Diaphragm development and congenital diaphragmatic hernia*. Semin Pediatr Surg, 2007. 16(2): p. 94-100.
23. Schünke, M., et al., *Innere Organe : 121 Tabellen*. 3., überarb. und erw. Aufl. ed. Prometheus. 2012, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XV, 486 S.
24. Mayer, S., R. Metzger, and D. Kluth, *The embryology of the diaphragm*. Semin Pediatr Surg, 2011. 20(3): p. 161-9.
25. Sadler, T.W., *Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. Georg Thieme Verlag, 2008. 11. Auflage: p. 3.
26. Merrell, A.J. and G. Kardon, *Development of the diaphragm -- a skeletal muscle essential for mammalian respiration*. FEBS J, 2013. 280(17): p. 4026-35.
27. Babiuk, R.P. and J.J. Greer, *Diaphragm defects occur in a CDH hernia model independently of myogenesis and lung formation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 283(6): p. L1310-4.
28. Merrell, A.J., et al., *Muscle connective tissue controls development of the diaphragm and is a source of congenital diaphragmatic hernias*. Nat Genet, 2015. 47(5): p. 496-504.
29. Clugston, R.D., et al., *Understanding abnormal retinoid signaling as a causative mechanism in congenital diaphragmatic hernia*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. 42(3): p. 276-85.
30. Allan, D.W. and J.J. Greer, *Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats*. J Appl Physiol (1985), 1997. 83(2): p. 338-47.
31. Cilley, R.E., et al., *Nitrofen dose-dependent gestational day-specific murine lung hypoplasia and left-sided diaphragmatic hernia*. Am J Physiol, 1997. 272(2 Pt 1): p. L362-71.
32. Zhang, B., et al., *Heparan sulfate deficiency disrupts developmental angiogenesis and causes congenital diaphragmatic hernia*. J Clin Invest, 2014. 124(1): p. 209-21.
33. Pober, B.R., *Overview of epidemiology, genetics, birth defects, and chromosome abnormalities associated with CDH*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2007. 145c(2): p. 158-71.

34. McGivern, M.R., et al., *Epidemiology of congenital diaphragmatic hernia in Europe: a register-based study*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2015. 100(2): p. F137-44.
35. Wynn, J., et al., *Outcomes of congenital diaphragmatic hernia in the modern era of management*. J Pediatr, 2013. 163(1): p. 114-9.e1.
36. van den Hout, L., et al., *Can we improve outcome of congenital diaphragmatic hernia?* Pediatr Surg Int, 2009. 25(9): p. 733-43.
37. Coppola, C.P. and J.R. Gosche, *Oxygen-induced vasodilation is blunted in pulmonary arterioles from fetal rats with nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia*. J Pediatr Surg, 2001. 36(4): p. 593-7.
38. Kinsella, J.P., A. Greenough, and S.H. Abman, *Bronchopulmonary dysplasia*. Lancet, 2006. 367(9520): p. 1421-31.
39. Keijzer, R., et al., *Dual-hit hypothesis explains pulmonary hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia*. Am J Pathol, 2000. 156(4): p. 1299-306.
40. Kitagawa, M., et al., *Lung hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. A quantitative study of airway, artery, and alveolar development*. Br J Surg, 1971. 58(5): p. 342-6.
41. Thebaud, B., J.C. Mercier, and A.T. Dinh-Xuan, *Congenital diaphragmatic hernia. A cause of persistent pulmonary hypertension of the newborn which lacks an effective therapy*. Biol Neonate, 1998. 74(5): p. 323-36.
42. Roubliova, X., et al., *Pulmonary vascular morphology in a fetal rabbit model for congenital diaphragmatic hernia*. J Pediatr Surg, 2004. 39(7): p. 1066-72.
43. Rottier, R. and D. Tibboel, *Fetal lung and diaphragm development in congenital diaphragmatic hernia*. Semin Perinatol, 2005. 29(2): p. 86-93.
44. Stege, G., A. Fenton, and B. Jaffray, *Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia*. Pediatrics, 2003. 112(3 Pt 1): p. 532-5.
45. Witters, I., et al., *Associated malformations and chromosomal anomalies in 42 cases of prenatally diagnosed diaphragmatic hernia*. Am J Med Genet, 2001. 103(4): p. 278-82.
46. Labbe, A., K. Coste, and P.J. Dechelotte, *[Congenital diaphragmatic hernia - mechanisms of pulmonary hypoplasia]*. Rev Mal Respir, 2011. 28(4): p. 463-74.
47. Jani, J., et al., *Relationship between lung-to-head ratio and lung volume in normal fetuses and fetuses with diaphragmatic hernia*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2006. 27(5): p. 545-50.
48. Metkus, A.P., et al., *Sonographic predictors of survival in fetal diaphragmatic hernia*. J Pediatr Surg, 1996. 31(1): p. 148-51; discussion 151-2.
49. Jani, J., et al., *Observed to expected lung area to head circumference ratio in the prediction of survival in fetuses with isolated diaphragmatic hernia*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2007. 30(1): p. 67-71.
50. Jani, J.C., et al., *Prenatal prediction of neonatal morbidity in survivors with congenital diaphragmatic hernia: a multicenter study*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2009. 33(1): p. 64-9.
51. Peralta, C.F., et al., *Assessment of lung area in normal fetuses at 12-32 weeks*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2005. 26(7): p. 718-24.

52. Sandaite, I., et al., *Examining the relationship between the lung-to-head ratio measured on ultrasound and lung volumetry by magnetic resonance in fetuses with isolated congenital diaphragmatic hernia*. *Fetal Diagn Ther*, 2011. 29(1): p. 80-7.
53. Jani, J.C., et al., *Lung volumes in fetuses with congenital diaphragmatic hernia: comparison of 3D US and MR imaging assessments*. *Radiology*, 2007. 244(2): p. 575-82.
54. Lazar, D.A., et al., *Defining "liver-up": does the volume of liver herniation predict outcome for fetuses with isolated left-sided congenital diaphragmatic hernia?* *J Pediatr Surg*, 2012. 47(6): p. 1058-62.
55. Cannie, M., et al., *Quantification of intrathoracic liver herniation by magnetic resonance imaging and prediction of postnatal survival in fetuses with congenital diaphragmatic hernia*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2008. 32(5): p. 627-32.
56. Spaggiari, E., et al., *Prenatal prediction of pulmonary arterial hypertension in congenital diaphragmatic hernia*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015. 45(5): p. 572-7.
57. Bagolan, P. and F. Morini, *Long-term follow up of infants with congenital diaphragmatic hernia*. *Semin Pediatr Surg*, 2007. 16(2): p. 134-44.
58. Trachsel, D., et al., *Long-term pulmonary morbidity in survivors of congenital diaphragmatic hernia*. *Pediatr Pulmonol*, 2005. 39(5): p. 433-9.
59. Garne, E., et al., *Congenital diaphragmatic hernia: evaluation of prenatal diagnosis in 20 European regions*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2002. 19(4): p. 329-33.
60. Boloker, J., et al., *Congenital diaphragmatic hernia in 120 infants treated consecutively with permissive hypercapnea/spontaneous respiration/elective repair*. *J Pediatr Surg*, 2002. 37(3): p. 357-66.
61. Akinkuotu, A.C., et al., *Revisiting outcomes of right congenital diaphragmatic hernia*. *J Surg Res*, 2015. 198(2): p. 413-7.
62. Fisher, J.C., et al., *Redefining outcomes in right congenital diaphragmatic hernia*. *J Pediatr Surg*, 2008. 43(2): p. 373-9.
63. Schaible, T., et al., *Right- versus left-sided congenital diaphragmatic hernia: postnatal outcome at a specialized tertiary care center*. *Pediatr Crit Care Med*, 2012. 13(1): p. 66-71.
64. Ruano, R., et al., *A randomized controlled trial of fetal endoscopic tracheal occlusion versus postnatal management of severe isolated congenital diaphragmatic hernia*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2012. 39(1): p. 20-7.
65. Deprest, J.A., K. Nicolaides, and E. Gratacos, *Fetal surgery for congenital diaphragmatic hernia is back from never gone*. *Fetal Diagn Ther*, 2011. 29(1): p. 6-17.
66. Ruano, R., et al., *Fetal endoscopic tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia: indications, outcomes, and future directions*. *Obstet Gynecol Surv*, 2014. 69(3): p. 147-58.

67. Khan, P.A., M. Cloutier, and B. Piedboeuf, *Tracheal occlusion: a review of obstructing fetal lungs to make them grow and mature*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2007. 145c(2): p. 125-38.
68. Flageole, H., et al., *The plug-unplug sequence: an important step to achieve type II pneumocyte maturation in the fetal lamb model*. J Pediatr Surg, 1998. 33(2): p. 299-303.
69. Kohl, T., et al., *Encouraging early clinical experience with deliberately delayed temporary fetoscopic tracheal occlusion for the prenatal treatment of life-threatening right and left congenital diaphragmatic hernias*. Fetal Diagn Ther, 2006. 21(3): p. 314-8.
70. Ali, K., et al., *Outcome of CDH infants following fetoscopic tracheal occlusion - influence of premature delivery*. J Pediatr Surg, 2013. 48(9): p. 1831-6.
71. Deprest, J.A., et al., *Changing perspectives on the perinatal management of isolated congenital diaphragmatic hernia in Europe*. Clin Perinatol, 2009. 36(2): p. 329-47, ix.
72. Zani, A., et al., *Tracheomegaly in infants with severe congenital diaphragmatic hernia treated with fetal endoluminal tracheal occlusion*. J Pediatr, 2014. 164(6): p. 1311-5.
73. Jani, J., et al., *Tracheal diameter at birth in severe congenital diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion*. Prenat Diagn, 2011. 31(7): p. 699-704.
74. Reiss, I., et al., *Standardized postnatal management of infants with congenital diaphragmatic hernia in Europe: the CDH EURO Consortium consensus*. Neonatology, 2010. 98(4): p. 354-64.
75. van den Hout, L., et al., *Actual outcome in infants with congenital diaphragmatic hernia: the role of a standardized postnatal treatment protocol*. Fetal Diagn Ther, 2011. 29(1): p. 55-63.
76. Tracy, E.T., et al., *Protocolized approach to the management of congenital diaphragmatic hernia: benefits of reducing variability in care*. J Pediatr Surg, 2010. 45(6): p. 1343-8.
77. Betremieux, P., et al., *Congenital diaphragmatic hernia: prenatal diagnosis permits immediate intensive care with high survival rate in isolated cases. A population-based study*. Prenat Diagn, 2004. 24(7): p. 487-93.
78. Wung, J.T., et al., *Congenital diaphragmatic hernia: survival treated with very delayed surgery, spontaneous respiration, and no chest tube*. J Pediatr Surg, 1995. 30(3): p. 406-9.
79. Niramis, R., *Technology assessment for management of congenital diaphragmatic hernia: immediate versus delayed surgery*. J Med Assoc Thai, 2003. 86 Suppl 3: p. S727-33.
80. Tsao, K. and K.P. Lally, *Surgical management of the newborn with congenital diaphragmatic hernia*. Fetal Diagn Ther, 2011. 29(1): p. 46-54.
81. Hollinger, L.E., et al., *A risk-stratified analysis of delayed congenital diaphragmatic hernia repair: does timing of operation matter?* Surgery, 2014. 156(2): p. 475-82.

82. Logan, J.W., et al., *Congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and summary of best-evidence practice strategies*. J Perinatol, 2007. 27(9): p. 535-49.
83. Tiryaki, S., C. Ozcan, and A. Erdener, *Initial oxygenation response to inhaled nitric oxide predicts improved outcome in congenital diaphragmatic hernia*. Drugs R D, 2014. 14(4): p. 215-9.
84. Snoek, K.G., et al., *Conventional Mechanical Ventilation Versus High-frequency Oscillatory Ventilation for Congenital Diaphragmatic Hernia: A Randomized Clinical Trial (The VICI-trial)*. Ann Surg, 2015.
85. Garcia, A. and C.J. Stolar, *Congenital diaphragmatic hernia and protective ventilation strategies in pediatric surgery*. Surg Clin North Am, 2012. 92(3): p. 659-68, ix.
86. Mok, Y.H., J.H. Lee, and I.M. Cheifetz, *Neonatal Extracorporeal Membrane Oxygenation: Update on Management Strategies and Long-Term Outcomes*. Adv Neonatal Care, 2016. 16(1): p. 26-36.
87. Brindle, M.E., M. Brar, and E.D. Skarsgard, *Patch repair is an independent predictor of morbidity and mortality in congenital diaphragmatic hernia*. Pediatr Surg Int, 2011. 27(9): p. 969-74.
88. Moss, R.L., C.M. Chen, and M.R. Harrison, *Prosthetic patch durability in congenital diaphragmatic hernia: a long-term follow-up study*. J Pediatr Surg, 2001. 36(1): p. 152-4.
89. Cullen, M.L., *Congenital diaphragmatic hernia: operative considerations*. Semin Pediatr Surg, 1996. 5(4): p. 243-8.
90. Lally, K.P., H.W. Cheu, and W.D. Vazquez, *Prosthetic diaphragm reconstruction in the growing animal*. J Pediatr Surg, 1993. 28(1): p. 45-7.
91. Masumoto, K., et al., *Effectiveness of diaphragmatic repair using an abdominal muscle flap in patients with recurrent congenital diaphragmatic hernia*. J Pediatr Surg, 2007. 42(12): p. 2007-11.
92. Nasr, A., et al., *Outcomes after muscle flap vs prosthetic patch repair for large congenital diaphragmatic hernias*. J Pediatr Surg, 2010. 45(1): p. 151-4.
93. Sydorak, R.M., et al., *Reversed latissimus dorsi muscle flap for repair of recurrent congenital diaphragmatic hernia*. J Pediatr Surg, 2003. 38(3): p. 296-300; discussion 296-300.
94. Terui, K., et al., *Surgical approaches for neonatal congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and meta-analysis*. Pediatr Surg Int, 2015. 31(10): p. 891-7.
95. Costerus, S., et al., *Thoracoscopic versus open repair of CDH in cardiovascular stable neonates*. Surg Endosc, 2015.
96. Tsao, K., P.A. Lally, and K.P. Lally, *Minimally invasive repair of congenital diaphragmatic hernia*. J Pediatr Surg, 2011. 46(6): p. 1158-64.
97. Vijfhuizen, S., et al., *Minimal access surgery for repair of congenital diaphragmatic hernia: is it advantageous?--An open review*. Eur J Pediatr Surg, 2012. 22(5): p. 364-73.
98. Lansdale, N., et al., *Neonatal endosurgical congenital diaphragmatic hernia repair: a systematic review and meta-analysis*. Ann Surg, 2010. 252(1): p. 20-6.

99. Meyer, T., et al., *A new biocompatible material (Lyoplant) for the therapy of congenital abdominal wall defects: first experimental results in rats*. *Pediatr Surg Int*, 2006. 22(4): p. 369-74.
100. Meyer, T., et al., [*PAUL procedure. A new biocompatible concept for the therapy of congenital abdominal wall defects*]. *Chirurg*, 2010. 81(3): p. 236-42.
101. Meyer, T., et al., *Immune response to xenogeneic matrix grafts used in pediatric surgery*. *Eur J Pediatr Surg*, 2007. 17(6): p. 420-5.
102. Braun, B. *Aesculap® Neuro-Patch® & Lyoplant®*. Stand 05.02.2016]; Available from: <https://www.bbraun.de/de/products/b0/lyoplant.html>, https://www.bbraun.de/content/dam/catalog/bbraun/bbraunProductCatalog/CW_DE/de-de/b3/prospekt-neuro-patchlyoplant.pdf.bb-.85555661/prospekt-neuro-patchlyoplant.pdf.
103. Loff, S., et al., *Implantation of a cone-shaped double-fixed patch increases abdominal space and prevents recurrence of large defects in congenital diaphragmatic hernia*. *J Pediatr Surg*, 2005. 40(11): p. 1701-5.
104. River, C. *Wistar Furth Rats*. Stand: 05.02.2016]; Available from: <http://animalab.pl/sites/all/pliki/produkty-dopobrania/WF.pdf>.
105. Butler, C.E., F.A. Navarro, and D.P. Orgill, *Reduction of abdominal adhesions using composite collagen-GAG implants for ventral hernia repair*. *J Biomed Mater Res*, 2001. 58(1): p. 75-80.
106. Bellon, J.M., et al., *Healing process induced by three composite prostheses in the repair of abdominal wall defects*. *J Biomed Mater Res*, 2002. 63(2): p. 182-90.
107. Kaiser, R. and G. Gottschalk, *Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten : Soforthilfe f. statist. Tests mit wenigen Messdaten*. BI-Hochschultaschenbücher. 1972, Mannheim, Wien, Zürich: Bibliographisches Institut. 68 S.
108. Gucciardo, L., et al., *Full thickness abdominal wall defect in growing rats as a model for congenital diaphragmatic hernia prosthetic repair*. *J Pediatr Surg*, 2014. 49(10): p. 1458-65.
109. Sandoval, J.A., et al., *The whole truth: comparative analysis of diaphragmatic hernia repair using 4-ply vs 8-ply small intestinal submucosa in a growing animal model*. *J Pediatr Surg*, 2006. 41(3): p. 518-23.
110. Mayer, S., et al., *Diaphragm Repair with a Novel Cross-Linked Collagen Biomaterial in a Growing Rabbit Model*. *PLoS One*, 2015. 10(7): p. e0132021.
111. Koziarkiewicz, M., A. Taczalska, and A. Piaseczna-Piotrowska, *Long-term follow-up of children with congenital diaphragmatic hernia--observations from a single institution*. *Eur J Pediatr Surg*, 2014. 24(6): p. 500-7.
112. Kuklova, P., et al., *Large diaphragmatic defect: are skeletal deformities preventable?* *Pediatr Surg Int*, 2011. 27(12): p. 1343-9.
113. St Peter, S.D., et al., *Abdominal complications related to type of repair for congenital diaphragmatic hernia*. *J Surg Res*, 2007. 140(2): p. 234-6.
114. Brouwer, K.M., et al., *Heparinized collagen scaffolds with and without growth factors for the repair of diaphragmatic hernia: construction and in vivo evaluation*. *Organogenesis*, 2013. 9(3): p. 161-7.

115. Kimber, C.P., et al., *Patch incorporation in diaphragmatic hernia*. J Pediatr Surg, 2000. 35(1): p. 120-3.
116. Allman, A.J., et al., *Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response*. Transplantation, 2001. 71(11): p. 1631-40.
117. Raghavan, D., et al., *Physical characteristics of small intestinal submucosa scaffolds are location-dependent*. J Biomed Mater Res A, 2005. 73(1): p. 90-6.
118. Smith, M.J., et al., *The SIS extracellular matrix scaffold-preliminary results of use in congenital diaphragmatic hernia (CDH) repair*. Pediatr Surg Int, 2004. 20(11-12): p. 859-62.
119. Rowe, D.H. and C.J. Stolar, *Recurrent diaphragmatic hernia*. Semin Pediatr Surg, 2003. 12(2): p. 107-9.
120. Jancelewicz, T., et al., *Long-term surgical outcomes in congenital diaphragmatic hernia: observations from a single institution*. J Pediatr Surg, 2010. 45(1): p. 155-60; discussion 160.
121. Kunisaki, S.M., et al., *Diaphragmatic repair through fetal tissue engineering: a comparison between mesenchymal amniocyte- and myoblast-based constructs*. J Pediatr Surg, 2006. 41(1): p. 34-9; discussion 34-9.
122. Aikawa, M., et al., *Newly designed bioabsorbable substitute for the treatment of diaphragmatic defects*. Surg Today, 2013. 43(11): p. 1298-304.

DANKSAGUNG

Mein freundlicher Dank gilt Prof. Dr. Thomas Meyer für die Überlassung des interessanten Themas und Begeisterung dafür sowie auch für das Fach Kinderchirurgie über die Doktorarbeit hinaus.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Patrik Sperling, der mich stets motivierte und geduldig begleitete. Ich danke ihm für die hilfreiche Betreuung und Unterstützung in allen Fragen sowie der konstruktiven Korrektur dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Dr. Irina Chodnewska danken, die mir während meiner Laborzeit und darüber hinaus immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch Alexia Witchen und Veronica Heimbach möchte ich dafür danken, dass sie mir in ihrem Labor einen Platz einräumten. Ebenso möchte ich Andrea Prappacher für die gute Versorgung unserer Versuchsratten danken.

Auch Michael Freiburger und Astrid Wagner möchte ich danken für die freundliche Organisation, Bereitstellung und Einarbeitung in das Mikroskop und dazugehöriges Computerprogramm und die Hilfe bei der Bearbeitung der Bilder.

Ebenso möchte ich Kristina Franz für den anderen Blickwinkel auf diese Arbeit und die zahlreichen Korrekturvorschläge danken.

Von ganzen Herzen bin ich meinen Eltern, Birgit und Falk Schönfeld, meiner Schwester Anna und meinem Freund Simon dankbar, die diesen manchmal steinigen Weg die letzten Jahre mit mir gegangen sind.

Ganz besonders dankbar bin ich meinen Eltern, die sowohl während meines Studiums, als auch bei der Durchführung dieser Arbeit immer voll und ganz hinter mir standen, immer ein offenes Ohr hatten, mich durch ihre wertvollen Gespräche weitergebracht haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.