

**Aus der Klinik und Poliklinik für  
Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer**

---



**Einsatz biokompatibler Polymermembranen zur Therapie  
kongenitaler Bauchwanddefekte im Rattenmodell**

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

vorgelegt von  
Isabel Bär  
aus Friedrichshafen

Würzburg, September 2017

**Referent:** Prof. Dr. med. Thomas Meyer

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Frank Schuster

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.09.2017

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Definition kongenitaler Bauchwanddefekte .....	1
1.2 Epidemiologie .....	4
1.3 Ätiologie und Pathogenese .....	4
1.4 Risikofaktoren .....	5
1.5 Diagnostik .....	5
1.6 Therapie.....	7
1.6.1 Therapie der Gastroschisis .....	7
1.6.2 Therapie der Omphalozele .....	9
1.6.3 Patchimplantation.....	9
1.7 Prognose .....	10
1.8 Historischer Rückblick.....	11
1.9 Ziele der Arbeit .....	12
<b>2. Material und Methoden</b> .....	13
2.1 Neue biokompatible Polymermembranen .....	13
2.2 Lyoplant .....	15
2.3 Versuchstiere .....	16
2.4 Implantation der Polymermembran in die Faszie der Bauchdecke .....	17
2.5 Explantation .....	18
2.6 Implantation der Polymermembran in die Nierenkapsel.....	19
2.7 Histologische Untersuchung .....	19
2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	19
2.7.2 Trichromfärbung nach Masson-Goldner.....	20
2.8 Immunhistochemische Färbungen .....	20
2.9 Histologische Auswertung.....	22

2.10 Tensiometrische Auswertung.....	22
2.11 Statistische Methoden.....	22
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
3.1 In-vivo Funktion der Polymermembranen .....	23
3.1.1 Wachstum der Versuchstiere .....	23
3.1.2 Stabilität der Bauchwand.....	25
3.2 Makroskopische Ergebnisse .....	27
3.2.1 Adhäsionen .....	27
3.2.2 Abbau und Umbau des Implantats .....	29
3.3 Mikroskopische Ergebnisse .....	30
3.3.1 HE-Färbung und Trichromfärbung nach Masson-Goldner .....	30
3.3.2 Immunhistochemie .....	33
3.4 Nierenkapselimplantat .....	34
3.5 Vergleich mit Lyoplant®.....	34
3.6 Tensiometrische Ergebnisse.....	38
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>39</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>44</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>46</b>
Abbildungsverzeichnis .....	53
Tabellenverzeichnis .....	55

## **Danksagung**

## **Lebenslauf**

## Abkürzungsverzeichnis

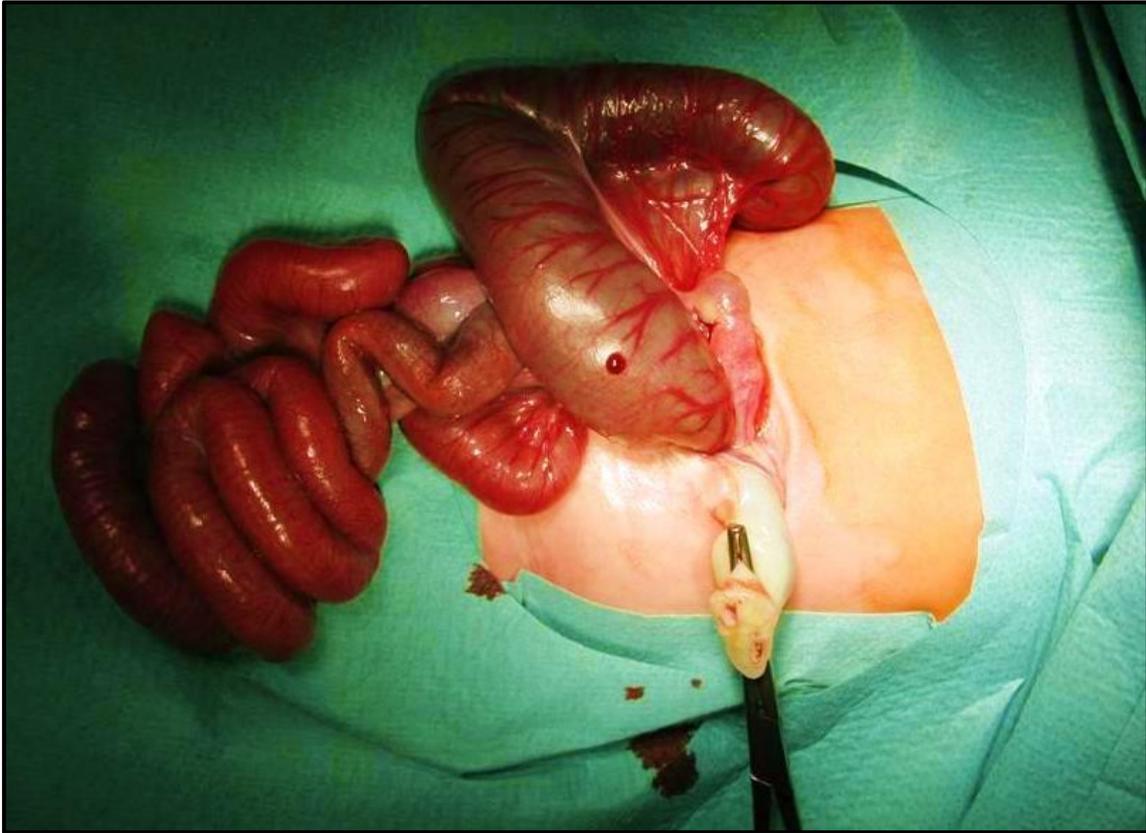
BWD	Bauchwanddefekt
DAB	3, 3'- Diaminobenzidin
dest.	destilliert
g	Gramm
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
INF $\gamma$	Interferon $\gamma$
KG	Körpergewicht
Kol	Kollagen
min	Minute
PEG	Polyethylenglycol
PLA	Polylactidsäure
PBS	Phosphate buffered saline
PTMG	Polytetramethylenglycol
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SSW	Schwangerschaftswoche
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$

# 1. Einleitung

## 1.1 Definition kongenitaler Bauchwanddefekte

Kongenitale Bauchwanddefekte sind dramatische Fehlbildungen der vorderen Bauchwand, deren Therapie eine große Herausforderung für Kinderchirurgen darstellen [1]. Die verschiedenen Formen umfassen neben der Nabelhernie, der Gastroschisis und der Omphalozele auch den Blasenextrophie-/Kloakenextrophie-Komplex. Im engeren Sinne versteht man darunter zumeist nur die Gastroschisis und Omphalozele [2].

Die **Gastroschisis**, auch als Laparoschisis (Bauchwandspalte) bezeichnet, ist ein zumeist rechts umbilikaler Defekt von etwa 3-4 cm Durchmesser, durch welchen die abdominellen Organe, vor allem Darmanteile, prolabieren können (siehe Abbildung 1). Sie liegen dann frei im Fruchtwasser, was zur Reizung der Darmwand mit ödematöser Schwellung und dunkelrotem Kolorit führt. Folglich besteht die Gefahr der Einklemmung mit intrauteriner Nekrose und das daraus resultierende Risiko eines Kurzdarmsyndroms. Zudem können verringerte Darmperistaltik und eine eingeschränkte Nährstoffresorption postpartale Probleme bereiten [1-3]. Assoziierte Fehlbildungen liegen bei 10-30% vor. Es handelt sich meist um gastrointestinale Anomalien wie Dünndarm-, Dickdarm- oder Analatresien sowie Stenosen und nur in Ausnahmefällen um Chromosomenaberrationen [1, 3].



**Abbildung 1:** Klinisches Bild einer rechts umbilikalen Gastroschisis. Dunkelrotes Kolorit der Darmschlingen ist Zeichen der gereizten Serosa (Kinderchirurgie Würzburg).

Die **Omphalozele** (Nabelschnurbruch) wird auch Exomphalos genannt. Die Größe des Bauchwanddefekts reicht von 2 cm bis hin zu Einzelfällen, deren Ausmaß beinahe die komplette vordere Abdominalwand einnimmt [1]. Die prolabierte Organe wie Darm, Leber oder seltener auch Magen, Milz, und inneres Genitale befinden sich in einem meist median gelegenen Omphalozelensack, dessen Wandschichten von außen nach innen aus Amnionhaut, Wharton Sulze und Peritoneum bestehen. Die Umbilikalgefäße inserieren nicht wie gewöhnlich an der Bauchwand sondern an der Membran des Omphalozelensacks (siehe Abbildung 2) [1, 3, 4]. Der Begriff der „giant omphalocele“ wird für Nabelschnurbrüche mit einem Durchmesser  $>5$  cm verwendet und bedarf häufig einer anderen Therapie [5]. Im Vergleich zur Laparoschisis ist die Wahrscheinlichkeit von Begleitfehlbildungen und chromosomalen Aberrationen bei der Omphalozele weitaus höher. Die Inzidenzangaben in der Literatur schwanken zwischen

40% und 88%. Hierbei muss beachtet werden, dass der Schweregrad der assoziierten Fehlbildungen und die damit verbundene hohe Rate an Fehlgeburten je nach Datenerhebung zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Die Anomalien umfassen Chromosomenabberationen (40-60%) wie Trisomie 13, 18, 21, Turner Syndrom, Klinefelter Syndrom, Herzfehler (30-50%), Fehlbildungen des Urogenitaltrakts (40%) und des Neuralrohrs sowie muskuloskelettale (10-30%) und gastrointestinale (40%) Anomalien. Zudem ist die Omphalozele Teil des Beckwith-Wiedemann Syndroms (5-10%) sowie des Prune-Belly Syndroms und der Cantrell Pentalogie [1, 6-8].



**Abbildung 2:** Klinisches Bild einer kleinen Omphalozele. Die Nabelschnur inseriert am Omphalozelensack (Kinderchirurgie Würzburg).

## **1.2 Epidemiologie**

Über genaue Zahlen zum Vorkommen von kongenitalen Bauchwanddefekten ist sich die Literatur nur bedingt einig. Die epidemiologischen Angaben variieren stark. Laut EUROCAT, der European registration of congenital anomalies, ist die Prävalenz der Omphalozele von 1996-2012 von 2,54 auf 3,12:10.000 und die Prävalenz der Gastroschisis von 1,81 auf 2,87:10.000 angestiegen. Hierbei wurden die Anzahl der jeweiligen Bauchwanddefekte von Lebend- und Totgeburten sowie Schwangerschaftsabbrüchen nach pränataler Diagnostik gezählt [6, 9, 10]. Weitere Quellen berichten von einer Prävalenz der Omphalozele von 0,6 - 4,8:10.000 und der Gastroschisis von 4,5:10.000 Geburten [3]. Große Omphalozelen, mit einem Defekt >5 cm Durchmesser, haben eine Prävalenz von 1:100.000 Lebendgeburten. Es konnte keine Korrelation zwischen der Größe des Bauchwanddefekts und assoziierten Fehlbildungen nachgewiesen werden [7, 11]. Bei isolierter Omphalozele und Gastroschisis besteht kein erhöhtes Wiederholungsrisiko, da sie meist sporadisch auftreten [12]. Einheitlich wird eine weltweit steigende Prävalenz der Gastroschisis vermerkt, welche durch die steigende Anzahl an Müttern unter 21 Jahren, Umwelteinflüsse und pharmakologische Teratogene begründet wird (siehe 1.3 Ätiologie und Pathogenese) [5, 13].

## **1.3 Ätiologie und Pathogenese**

Die Abdominalwand entwickelt sich bereits in der 3. SSW während der Fusion der vier ektomesodermalen Platten (zwei laterale und je eine kephale und eine kaudale). Eine Fusionsstörung der lateralen Platten resultiert in einer klassischen Omphalozele, wohingegen eine epigastrische Omphalozele durch eine Störung der kephalen Platte bedingt ist. Da die ektomesodermalen Platten erst gegen Ende des ersten Trimenons vollständig fusioniert haben, wird bis zu diesem Zeitpunkt bei periumbilikal prolabierenden Abdominalorganen mit Bruch sack von einem physiologischen Nabelbruch gesprochen [12]. Diese zeitlich begrenzte Hernierung der Intestinalorgane ist durch das schnelle Größenwachstum bedingt. Da der physiologische Nabelbruch gewöhnlich bis zur 12. SSW besteht, kann auch erst nach diesem Zeitpunkt die Diagnose des Bauchwanddefekts gestellt werden [14]. Omphalozelen, die durch eine Fusionsstö-

rung der kephalen Platte bedingt sind und epigastrisch liegen, treten häufig mit Herzektopen oder im Rahmen des oberen Mittelliniendefektes, der sogenannten Cantrell Pentalogie auf. Inkomplette Fusion der kaudalen Platte ist häufig mit dem Blasenextrophie-/Kloakenextrophie-Komplex vergesellschaftet [5]. Die beiden letztgenannten Fehlbildungen sind allerdings mit Inzidenzen von 1:1.000.000 bzw. 1:500.000 sehr selten [14].

Die Ätiologie der Gastroschisis ist weniger hinreichend geklärt. Es existieren aber mehrere unterschiedliche Entstehungstheorien. Der Verdacht, dass eine Thrombose in der rechten Vena omphalomesenterica, zu einer Nekrose der Darmwand führt, wird dadurch begründet, dass die Gastroschisis meist rechts-umbilikal liegt [5]. Eine retrospektive Studie hat zudem eine erhöhte Inzidenz bei Müttern unter Einnahme von vasokonstriktiven Medikamenten wie Katecholaminen, Kokain oder Rauchen während der Schwangerschaft gezeigt [15]. Eine weitere mögliche Ursache könnte eine fehlende physiologische Hernierung in die Nabelschnur sein, die den abdominellen Druck erheblich erhöht und so dem Verschluss der mesoektodermalen Platten entgegenwirkt [5, 16]. Des Weiteren kann ein frühes Einreißen des physiologischen Nabelbruchs zum Bild einer Gastroschisis führen [1].

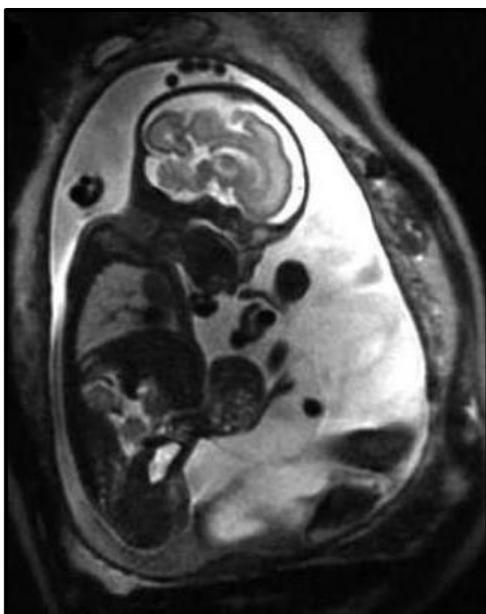
#### **1.4 Risikofaktoren**

Mögliche Risikofaktoren ergeben sich unter anderem aus den Theorien der Ätiopathogenese. Der wichtigste Risikofaktor der Omphalozele ist ein erhöhtes mütterliches Alter. Bei der Laparoschisis spielen mütterliches Untergewicht, Konsum vasokonstriktiver Substanzen, junges mütterliches Alter und Rauchen eine Rolle [3, 17].

#### **1.5 Diagnostik**

Die Mutterschaftsrichtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses sehen in Deutschland drei Ultraschall-Screening Untersuchungen zur Überwachung einer normal verlaufenden Schwangerschaft vor [18]. Frühestens ab der 12. SSW lassen sich Typ und Ausprägung des BWD im pränatalen Ultraschall darstellen [19]. Zumeist erfolgt die Diagnose in der 18.-20. SSW. Die Sensitivität der Ultraschalluntersuchung liegt bei der Omphalozele bei etwa 75% und bei der Gast-

roschisis bei ca. 83% [20]. Sonographisch finden sich neben der viszer abdominalen Disproportion häufig auch ein Polyhydramnion. Bei der Gastroschisis oder einer rupturierten Omphalozele sind die Darmschlingen aufgrund der Reizung durch das Fruchtwasser meist ödematös angeschwollen [3]. Zusätzliche Pränataldiagnostik wird besonders bei Verdacht auf Omphalozele und eventuelle Fehlbildungen und Chromosomenaberrationen durchgeführt. Bei der Amniozentese werden das Fruchtwasser und die darin enthaltenen fetalen Zellen untersucht. Eine Erhöhung des Alphafetoproteins (AFP) kann bei Nichtvorliegen einer Myelomeningocele den Verdacht auf einen BWD erhärten. Auch die Acetylcholinesterase kann aufgrund eines kongenitalen Bauchwanddefektes erhöht sein, ist jedoch für die Gastroschisis spezifischer [5, 21]. Eine weitere Bildgebung erfolgt nur in Ausnahmefällen: Ein 3D-Ultraschall kann zur Planung der postnatalen Therapie herangezogen werden, eine magnetresonanztomographische Bildgebung wird aufgrund der Kosten und der Verfügbarkeit nicht standardgemäß durchgeführt, hat jedoch im Vergleich zum Ultraschall eine höhere Auflösung und Sensitivität, siehe Abbildung 3 und Abbildung 4 [1].



**Abbildung 3:** T2 gewichtetes sagittales MRT eines Fetus mit Omphalozele in der 30. SSW [1].



**Abbildung 4:** T2 gewichtetes sagittales MRT eines Fetus mit Gastroschisis in der 36. SSW (die gestrichelte Linie begrenzt die herniierten Organe) [1].

Eine frühzeitige Diagnosestellung ermöglicht die Entbindung des Kindes in einem Perinatalzentrum mit der Möglichkeit zur sofortigen kinderchirurgischen Intervention [19]. Folglich lässt sich durch eine pränatale Diagnose die Komplikationsrate senken und das Outcome verbessern [22].

## **1.6 Therapie**

Um mögliche Komplikationen eines Bauchwanddefektes zu vermeiden, ist eine frühe pränatale Diagnostik wichtig. Sie ermöglicht eine Entbindung in einer spezialisierten Klinik und, wenn nötig, einen der Pathologie angemessenen Geburtszeitpunkt und -modus [23]. Ob ein Kaiserschnitt im Vergleich zu einer vaginalen Geburt die Mortalität und Komplikationsrate senkt, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Jedoch zeigte sich ein Vorteil für die Entbindung in einem neonatologischen Zentrum mit Anschluss an eine kinderchirurgische Versorgung [1, 24, 25].

### **1.6.1 Therapie der Gastroschisis**

Neben der symptomatischen Therapie des Neugeborenen sollte bei einer **Gastroschisis** eine operative Behandlung innerhalb der ersten Stunden postpartal angestrebt werden [14]. Untersuchungen ergaben, dass es nur geringe Unterschiede im Outcome des primären und sekundären operativen Wundverschlusses gibt [26]. Jedoch wird in Deutschland stets der primäre Bauchdeckenverschluss als Methode der Wahl angestrebt. Nach Inspektion und Desinfektion des Intestinums kann dieses reponiert werden. Falls nötig, kann der Defekt etwas erweitert werden. Entleeren des Darmes per Einlauf, manuell oder mittels Magensonde sowie das Dehnen der Bauchdecke können die Reposition erleichtern [3]. Bei ca. 10-20% kann aufgrund eines Missverhältnisses an hernierten Organen und Abdominalgröße kein primärer Verschluss durchgeführt werden. Bei dieser sogenannten viszero-abdominellen Dysproportion wäre die Gefahr eines intraabdominellen Kompartments zu groß. Ein Druck von >20 mmHg, gemessen über eine Magensonde oder einen Blasenkatheter sollte unbedingt vermieden werden, um mögliche Nebenwirkungen wie Darmnekrosen und Malperfusionen zu verhindern. Die Therapie der Wahl ist in diesem Fall eine **Schusterplastik**. Hier wird eine Silastikfolie zirkulär in die Bauchwand einge-

näht und oben verschlossen. Die sich außerhalb der Bauchhöhle befindenden Organe werden nun von der Silastikfolie geschützt. Das so genannte „Silo“ kann nun mit einer Klemme am Inkubator aufgehängt werden [14]. Durch die Dehnung der Bauchdecke reponieren sich die Organe der Schwerkraft nach. Ein sekundärer Verschluss findet innerhalb der ersten zehn Lebenstage statt. Bei sehr großen Defekten muss dennoch die Implantation eines Patches in Betracht gezogen werden [3].



**Abbildung 5:** Neugeborenes nach Anlage einer Schusterplastik. Unter der transparenten Silastikfolie sind die eventrierten Organe zu sehen (Kinderchirurgie Würzburg).

Seit einigen Jahren wird auch an der fetalchirurgischen Therapie der Gastroschisis geforscht. Um den prolabierte Darm vor einer Reizung durch das Fruchtwasser zu schützen, wird intrauterin ein biokompatibles Patch zur Defektdeckung implantiert. Ob der Vorteil von weniger intestinalen Komplikationen

die Gefahr der Frühgeburtlichkeit oder gar Abort überwiegt, bleibt umstritten [27, 28].

### **1.6.2 Therapie der Omphalozele**

Auch bei der **Omphalozele** ist der primär operative Verschluss die Methode der Wahl. Die Dringlichkeit ist jedoch bei nicht rupturierter Omphalozele geringer als bei der Gastroschisis. Zudem ist die Therapie von der Größe des Defektes abhängig. Kleinere Omphalozelen können nach Eröffnen des Omphalozelensacks, Ligatur der Umbilikalgefäße und Reposition der Darmschlingen direkt durch Naht aller Bauchwandschichten verschlossen werden [3, 14]. Für größere Omphalozelen, bei denen eine sofortige Bauchdeckenrekonstruktion nicht möglich ist, stehen mehrere Alternativen zur Verfügung. Unter anderem die oben beschriebene temporäre Anlage einer Schusterplastik, eine Verschiebeplastik der Abdominalwand mit späterem Verschluss der lateralen Faszienlücke, die konservative Therapie mit sekundärem Faszienverschluss und die Implantation eines Patches nach Schusterplastik oder direkt. Bei der konservativen Therapie, auch als „paint and wait“ Therapie bezeichnet, werden desinfizierende Lösungen auf den Omphalozelensack aufgetragen, um eine Spontanepithelialisierung mit anschließendem sekundären Wundverschluss zu ermöglichen [3]. Neben der Applikation von Betaisadonna (cave: Hyperthyreose) konnten auch antibakterielle Silbersalze wie beispielsweise Silbersulfadiazin ein gutes Outcome bei großen Omphalozelen erzielen [29]. Ab einem Alter von sechs Jahren erfolgt die Operation der überhäuteten Omphalozele mit Bauchdeckenverschluss [14]. Zu jedem Zeitpunkt kann durch erhöhten intraabdominellen Druck nach Reposition die Implantation eines Patches notwendig sein, um ein Kompartment Syndrom zu vermeiden. Die hierbei implantierten Materialien sind vielfältig und lassen sich in zwei Kategorien, resorbierbar und nicht resorbierbar, unterteilen [3].

### **1.6.3 Patchimplantation**

Der häufigste Grund für postoperative Mortalität bei kongenitalen Bauchwanddefekten sind septische Komplikationen [30]. Ein primärer Verschluss der Abdominalwand senkt also nicht nur die Anzahl an Infektionen sondern folglich

auch die postoperative Mortalität [31]. Bei viszero-abdomineller Disproportion gelingt ein Primärverschluss nur mittels Patcheinlage. Die hierbei verwendeten Materialien sind nicht immer resorbierbar.

Zu den nicht resorbierbaren Materialien gehören unter anderem Polypropylen (PPP) und Polytetrafluorethylen (PTFE, GoreTex) [32]. Bei ihnen ergaben sich Komplikationen wie Infektionen, Darm- und Hauterosionen sowie Adhäsionen [33]. Der Trend geht daher zu resorbierbaren Materialien aus zum Beispiel humaner Dura [34-36], Rinderperikard (Lyoplast®) [32, 37, 38], porciner Dünndarmsubmukosa (Surgisis) [33, 39, 40], humaner Amnionmembran [41] und vielen weiteren. Die früher häufig implantierte Dura wird seit dem Publikwerden der neuen Variante der Creutzfeldt-Jacob Krankheit in den späten 1990er Jahren, nur noch in Ausnahmefällen zur Defektdeckung herangezogen [31, 42].

Der Vorteil eines resorbierbaren Patches ist, dass er vom Körper absorbiert wird und durch körpereigenes Gewebe ersetzt wird. Das Implantat wächst mit dem Kind und muss nicht explantiert oder gar ausgetauscht werden. Probleme entstehen jedoch beispielsweise, wenn das Kind zu schnell wächst oder der Patch sich zu schnell auflöst und erneute Eingriffe notwendig werden. Das perfekte Material wurde bis jetzt noch nicht gefunden [33, 43]. Idealerweise ist es resorbierbar, löst sich nicht zu schnell und nicht zu langsam auf und wächst mit dem Kind mit. Es sollte auf der viszeralen Seite für Proteine und Zellen nicht adhäsiv sein, wohingegen es auf der zur Bauchdecke zugewandten Seite Zellen wie Fibroblasten die Invasion ermöglichen soll. Der Patch sollte dem Gewebe entsprechende Stabilität verleihen, elastisch und gut zu nähen sein. Zudem darf er vom Körper nicht als Fremdmaterial abgestoßen werden. Auch spielen die Materialkosten eine, wenn auch nur sekundäre Rolle.

## **1.7 Prognose**

Hinsichtlich der Prognose müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Nicht nur die Therapieart, konservativ oder operativ, sondern auch die Art und der Zeitpunkt der Operation und eventuelle begleitende Fehlbildungen beeinflussen das Outcome. Der primäroperative Defektverschluss, welcher in 75-98% der Fälle durchgeführt werden kann, erzielt aufgrund von weniger Infektio-

nen, selteneren Hernien und besseren kosmetischen Ergebnissen das beste Ergebnis. Die Funktionalität des Ersatzgewebes bei einer eventuell notwendigen Patchimplantation führt oftmals noch durch eine massive Vernarbung zu deutlichen Einschränkungen [3].

Bei Wahl der konservativen Therapie persistiert in mehr als 80% der Fälle eine Bauchwandhernie [44]. In manchen Fällen wird die Prognose stark von weiteren Fehlbildungen beeinträchtigt. Bei der Omphalozele spielen kardiale Fehlbildungen eine große Rolle, wohin gegen bei der Gastroschisis gastrointestinale Fehlbildungen und Obstruktionen gehäuft Probleme bereiten (siehe 1.1 Definition kongenitaler Bauchwanddefekte) [45]. Die Mortalität liegt je nach Quellenangabe bei der Omphalozele bei etwa 20% und bei der Gastroschisis bei 12%. Im Lauf der vergangenen Jahre ist eine starke Abnahme der Sterblichkeit zu beobachten. Dies ist durch Fortschritte in Therapie und Diagnostik begründet [46]. Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung besteht in Bezug auf die Lebensqualität kein signifikanter Unterschied [47, 48]. Einzelne Fallberichte beschreiben problemlose Schwangerschaften und vaginale Entbindungen bei Patientinnen mit Zustand nach kongenitalem Bauchwanddefekt [49].

### **1.8 Historischer Rückblick**

Die Erstbeschreibung einer Omphalozele stammt von dem im Elsass geborenen Humanisten Conrad Lycosthenes aus dem Jahre 1557 [50]. Fast ein Jahrhundert später, 1634, beschreibt der französische Chirurg Ambroise Paré erneut das Krankheitsbild des Nabelbruchs. Über die Gastroschisis berichtet erstmals 1733 der schottische Arzt James Calder. 1803 therapiert William Hey eine Omphalozele mit einem primären Verschluss. 140 Jahre später, 1943, gelingt dem Amerikaner Watkins erstmalig der Primärverschluss einer Gastroschisis. Die Überlebensrate steigt langsam aber kontinuierlich an. Robert Gross verschließt 1948 einen Bauchwanddefekt mittels lateral mobilisierter Hautlappen. 1953 wird die Klassifikation der Bauchwanddefekte von Moore und Stokes eingeführt, welche bis heute gültig ist. In den 1960er Jahren führen die Möglichkeit der künstlichen Beatmung und der parenteralen Ernährung sowie die Verbesserung der kinderchirurgischen Operationstechniken und die Entwicklung

der Pränataldiagnostik zu höheren Überlebenschancen [51-53]. 1967 schafft Samuel Schuster mit der nach ihm benannten „Schuster-Plastik“ eine weitere Therapiealternative zum primären Verschluss der Bauchdecke. Das langsame Reponieren der prolabierten Organe erfolgt nach dem Einnähen einer Teflonfolie, welche in einem zweiten Eingriff, bei dem endgültigen Bauchwandverschluss entfernt wird. Zwei Jahre später ergänzen Allen und Wrenn die Methode von Schuster mit einem sogenannten „Silo“, woran die Teflonfolie befestigt wird. Der Omphalozelensack kann so Tag für Tag „ausgemolken“ werden [14]. In den darauf folgenden Jahren werden viele unterschiedliche resorbierbare und nicht resorbierbare Materialien für Fälle, in denen ein Primärverschluss nicht möglich ist, erprobt. Polypropylene, Gore-Tex®, Surgisis® und Lyoplast® sind nur einige der erprobten „Patches“ [32, 33].

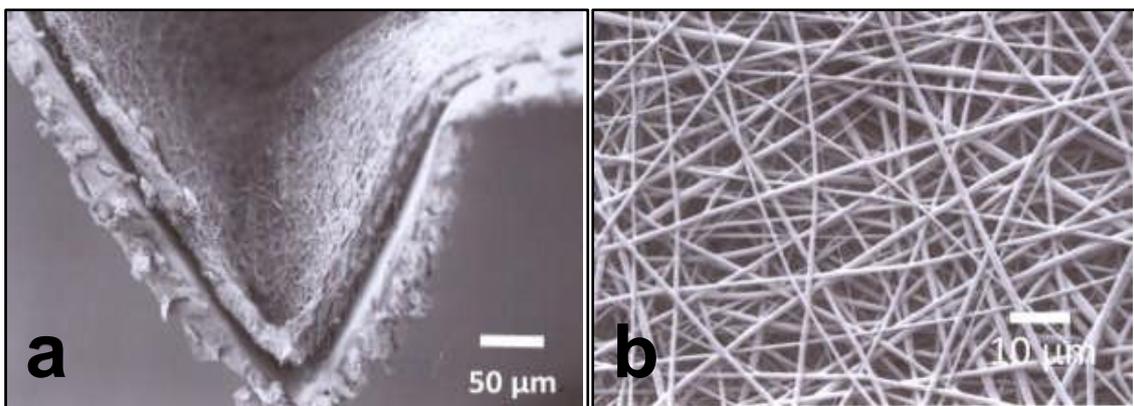
### **1.9 Ziele der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung einer biokompatiblen Polymermembran zur effektiven und sicheren Therapie kongenitaler Bauchwanddefekte im Rattenmodell. Um kongenitale Bauchwanddefekte, bei denen ein primärer Verschluss ohne Patch-Implantat nicht möglich ist, mit möglichst geringem Komplikations- und Mortalitätsrisiko zu therapieren, ist es notwendig, neben den prä- und perinatalen Vorkehrungen auch eine perfektionierte postnatale operative Therapie zu entwickeln. Da bis heute noch nicht das ideale Material zur Implantation gefunden wurde [33], soll im Folgenden die Eignung von verschiedenen bipolaren Membranen aus resorbierbaren Polymilchsäuren (PLA) und kollagenbasierten Membranen in situ getestet werden. Hierbei wird auf die Endpunkte Wachstum, Gewichtszunahme, Adhäsionen, Hernienbildung, histologische Veränderungen inklusive Zellinfiltration, Vaskularisation und Um- bzw. Abbau des Polymers geachtet. Zum Vergleich dient das von Meyer et al. bereits etablierte PAUL-Procedure (postnatales abdomino-umbilikales Lyoplast® - Procedure) [2].

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Neue biokompatible Polymermembranen

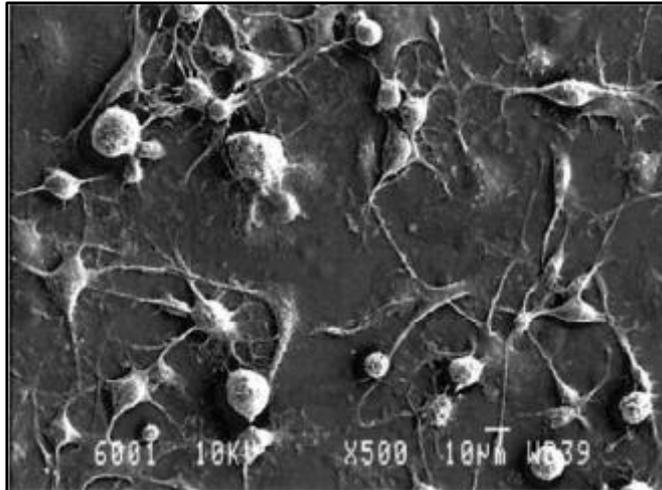
Die Anforderungen an einen Patch zum operativen Verschluss eines Bauchwanddefekts sind hoch (siehe 1.6.3 Patchimplantation). Neben den funktionellen spielen auch die kosmetischen Ergebnisse eine wichtige Rolle [47]. Trotz des dringenden Bedarfs an biokompatiblen Materialien, gibt es bis heute kaum Produkte, die die vielseitigen Anforderungen erfüllen. Die drei grundlegenden Komponenten für biokompatible Implantate umfassen die Resorbierbarkeit des Materials, die Ansiedlung von Zellen zur Gewebebildung und biologische Faktoren zur Kontrolle der Zellfunktion [54]. Die von uns eingesetzten Implantate sind bipolare Membranen aus unterschiedlichen Polymeren. Sie bestehen aus einem Film aus unterschiedlichen Polymeren in variabler Dicke und einem darauf mittels „solution electrospinning“ hergestellten Vlies (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von bipolaren Membranen (Film + Vlies) aus nicht adhäsiven PEG-PLA Copolymeren (a) und von gesponnen Fasern des Vlies (b).

Der Film ist glatt und antiadhäsiv. Er stellt bei Implantation die den Abdominalorganen zugewandte Seite dar. Es wurden drei verschiedene Polymere für die Herstellung verwendet. Das **Resomer LR708**, ein reines Polylactid (PLA), ist relativ hydrophob. Das lineare **PEG-PLA** ist ein Triblockcopolymer aus Polylactid und Polyethylenglycol (PEG). Das PEG dient als Weichmacher für das an-

sonsten relativ spröde PLA. Es erhöht die Hydrophilie des Polymers und beschleunigt den Abbau. Das dritte Polymer **CW1681** ist ein Polyurethan. Sein Hauptbestandteil ist ebenfalls PLA, allerdings alternierend mit Polytetramethylenglycol (PTMG) als hydrophilem Bestandteil. Die hydrophile Oberfläche unterstützt das Zellwachstum und hemmt die Proteinadsorption und Zelladhäsion, was wiederum zu einem kontrollierten Gewebewachstum führt. Mit Filmdicken von 20 – 67  $\mu\text{m}$  soll der Gewebeab- und -umbau in Abhängigkeit von der Zeit getestet und optimiert werden. Idealerweise liegen Abbau des Implantates und Aufbau von Extrazellulärmatrix durch eingelagerte Zellen im Gleichgewicht [54]. Die andere Seite der Polymermembranen besteht aus einzelnen Fasern aus PLA mit einem Durchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$ , welche auf den Film gesponnen werden (siehe Abbildung 6b). Die Oberfläche ist rau und strukturiert. Zwischen den Fasern bestehen Zwischenräume von 2-3  $\mu\text{m}$ , in denen sich Zellen wie Fibroblasten ansiedeln können. PLA unterstützt die Gewebegenerierung, hat allerdings aufgrund der Proteinanlagerung und der dadurch vermittelten Adhäsionsfähigkeit auch Nachteile (siehe Abbildung 7) [55]. Diese Seite des Patches zeigt deshalb bei Implantation zur Bauchdecke, beziehungsweise zur mobilisierten Cutis. Das Verfahren, mit dem die PLA-Fasern auf den Film aufgebracht werden, nennt sich Electrospinning. Es wurde unter anderem schon als Vektor eingesetzt, um DNA-Plasmide in zu transplantierendes Gewebe zu integrieren [56, 57]. Beim Electrospinning werden Polymerlösungen, in unserem Fall flüssiges PLA, durch eine dünne, geladene Nadel gespritzt und auf einem gegensätzlich geladenen Kollektor aufgetragen. Während der Zeit von der Nadelspitze zum Empfänger verdampft das Lösungsmittel und das PLA lagert sich als ungeordnete Fasern auf dem Film an [54]. Eine amerikanische Studie ergab, dass die PLA-Fasern innerhalb der ersten sieben Wochen 65% ihres Gewichts verlieren [58], was in Kombination mit Gewebeumbau besonders bei schnell wachsenden Geweben, wie es bei Neugeborenen der Fall ist, von Vorteil wäre.



**Abbildung 7:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Zellen auf einem PLA-Polymer nach 3 h Inkubation [55].

## 2.2 Lyoplast®

Lyoplast® ist ein azelluläres und avaskuläres aus Rinderperikard hergestelltes Kollagen-Implantat der Firma B.Braun (Melsungen). Es zeichnet sich durch Elastizität, Reißfestigkeit und Resorbierbarkeit aus. Bei seiner Herstellung wird es gefriergetrocknet. Bei diesem so genannten Lyophilisierungsverfahren, werden nicht kollagene Bestandteile wie Proteine, Enzyme und Fette entfernt. Das lose Kollagengerüst bleibt erhalten und bietet mit seiner Struktur körpereigenen Zellen die Möglichkeit zur Infiltration. Nach und nach wird dann das azelluläre Perikard enzymatisch abgebaut und durch körpereigene extrazelluläre Matrix ersetzt [59]. Mit der Etablierung des „PAUL-Procedure“ (postnatale abdomino-umbilikale Lyoplast®-Procedure) konnte 2006 durch Meyer et al. bereits die Biokompatibilität, die Transplantatakzeptanz und eine geringe intraabdominelle Adhäsionsrate im Groß- und Kleintierversuch aufgezeigt werden. Die Immunreaktion über den TH-2 Pathway bestätigt die stattfindende Implantatakzeptanz. Jedoch bleibt zu berücksichtigen, dass im Bereich des Bauchdeckendefekts nur eine unphysiologische Narbe entsteht [2, 60]. Ein Nachteil von Lyoplast® ist die nicht zu variierende Implantatdicke. So kann die Festigkeit und Resorbierbarkeit nicht individuell an den Patienten angepasst werden. In unserer Versuchsreihe dient Lyoplast® als bereits erprobtes Material zur Kontrolle und zum Vergleich zu den neuen biokompatiblen Polymermembranen.

### 2.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 34 männliche Wistar Furth Zuchtratten (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, Frankreich) mit einem anfänglichen Gewicht von durchschnittlich ~250 g. Die Haltung der Tiere erfolgte nach den geltenden Tierschutzbestimmungen in Scanbur-Schränken unter keimarmen Bedingungen. Die Ratten wurden randomisiert und in Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 1), wobei Tiere einer Versuchsgruppe immer das gleiche Patch implantiert bekamen. Zudem wurden sieben Ratten als Kontrollgruppe ohne anschließende Implantation eines Patches laparotomiert. Alle Versuche unterlagen nach „Antrag auf Genehmigung eines Tierschutzvorhabens nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes“ der Genehmigung der Regierung von Unterfranken.

**Tabelle 1:** Anzahl der Versuchstiere in Abhängigkeit vom Implantat

<b>Implantat</b>	<b>Anzahl der Versuchstiere</b>
LR708 20 µm	3
LR708 47 µm	6
LR708 62 µm	2
PEG-PLA 20 µm	3
PEG-PLA 46 µm	5
PEG-PLA 62 µm	2
CW1681-1 48 µm	2
CW1681-1 67 µm	2
Lyoplant®	2
Kontrolle	7

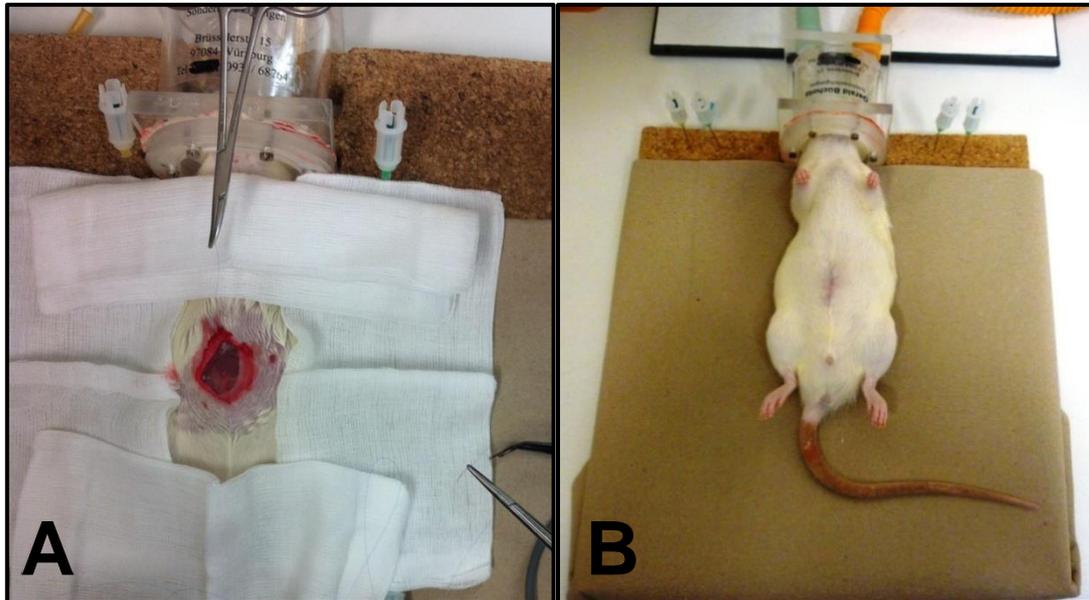


**Abbildung 8:** Wistar Furth Ratte in ihrem Käfig.

#### **2.4 Implantation der Polymermembran in die Faszie der Bauchdecke**

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 5 L/min Forene® (Isofluran, 1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoro-methylether, Abbott, Wiesbaden) in einer Narkosekammer (Sonderanfertigung, Gerald Büchold, Würzburg). Nach Rasur erfolgte die Lagerung und Fixation in Rückenlage sowie die Fortsetzung der volatilen Narkose mit 2 L/min. Die Operation wurde unter keimarmen Bedingungen durchgeführt. Zunächst erhielten die Versuchstiere zur perioperativen Analgesie eine intramuskuläre Tramal®-Injektion (1 mg/kg KG, Tramadol, Grünenthal, Aachen). Nach ausführlicher Hautdesinfektion erfolgte eine etwa 25 mm lange Hautinzision und stumpfes Präparieren bis zur Faszie der Bauchdeckenmuskulatur, welche entlang der Linea alba schließlich durchtrennt wurde. Im Anschluss wurde ein ca. 2,0 x 2,0 cm großer Vollwanddefekt bestehend aus Peritoneum, Faszie und Bauchdeckenmuskulatur exzidiert, welcher mit Einnähen des gleichgroßen Patches in fortlaufender Naht pro Seite wieder geschlossen wurde. Als Nahtmaterial diente ein monofiler, nicht resorbierbarer Prolene® –Faden der Stärke 7.0 (Ethicon, Norderstedt). Die Haut über dem Implantat wurde mit Prolene® 4.0 (Ethicon, Norderstedt) in Einzelknopfnahnt verschlossen. Nach er-

neuer Hautdesinfektion erfolgte die Ausleitung der Narkose. Die Inspektion der Wunde und des Abdomens sowie eine Gewichtskontrolle erfolgten bis zum Tag der Explantation täglich.



**Abbildung 9:** Intraoperativer Rattensitus bei Implantation. Der Bauchwanddefekt von 2x2 cm wird mit einem Patch verschlossen (A). Intraoperative Lagerung, hier kurz vor der Explantation (B).

## 2.5 Explantation

Ein erneuter Eingriff erfolgte am 21. postoperativen Tag. Vor der Explantation wurde das Versuchstier auf Vorliegen einer Hernie untersucht. Nach Einleitung der Narkose und Lagerung (siehe 2.4 Implantation der Polymermembran in die Faszie der Bauchdecke) erfolgte zunächst wiederum erneut eine abdominelle Hautinzision sowie die stumpfe Präparation bis auf das Implantat. Um die Polymermembran inklusive des angrenzenden Gewebes zu explantieren, wurden mögliche Adhäsionen gelöst. Zudem wurde für die spätere Immunhistochemie als Referenzgewebe eine Splenektomie durchgeführt.

## **2.6 Implantation der Polymermembran in die Nierenkapsel**

Ein weiteres späteres Einsatzgebiet der Polymermembranen könnte in tubulärer Form der Ersatz der Speiseröhre sein. Bei Ösophagusatresien, angeborenen Fehlbildungen der Speiseröhre, ist bei einem Defekt über eine längere Strecke ebenfalls ein Implantat notwendig [14]. Um ähnliche Druckverhältnisse und somit geringere Drücke als im Abdomen zu testen, wurde das Patch auf eine Größe von 0,5 x 0,5 cm zugeschnitten und in die Nierenkapsel von vier Ratten implantiert. Die Narkose und Lagerung erfolgte wie in 2.4 Implantation der Polymermembran in die Faszie der Bauchdecke) beschrieben. Nach Aufsuchen der rechten Niere wurde die Nierenkapsel am Unterpol mit dem Skalpell eröffnet und das Implantat eingesetzt. Die Explantation erfolgte ebenfalls nach 21 Tagen im direkten Anschluss an die Explantation des Implantats der Bauchdecke. Auch die histologische Aufbereitung und Färbung unterschied sich nicht.

## **2.7 Histologische Untersuchung**

Zur Fixierung und histologischen Untersuchung wurde das Resektat in Einfrier- röhren in Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Staufen) eingebettet, mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C kryokonserviert und bei -20 °C bis zur weiteren Unters- chung gelagert. Mit einem Kryostat (Leica CM3050S, Wetzlar) wurden Gefrier- schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und, auf Superfrost® Plus Objekt- träger (R. Langenbrick, Emmendingen) übertragen, bis zur histologischen Fär- bung bei -20 °C aufbewahrt.

### **2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Nach einer fünfminütigen Acetonfixierung wurden die Gefrierschnitte 10 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend erfolgte über 15 min die Kernfär- bung in wässrigem Hämalaun nach Meyer (Merck, Darmstadt). Danach wurden die Gewebeschnitte zuerst 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und dann in Aqua dest. kurz gespült. Auf die fünfminütige Gegenfärbung mit einer 1%-igen, wässrigen Eosinlösung (Sigma-Aldrich, München) folgte wieder- um ein Spülen in Aqua dest. Es schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe in Ethanol absolut (Sigma-Aldrich, München) in vier Küvetten über 3x1 min und

1x5 min an. Nach 2x10 min Xylol konnten die Gewebeschnitte mit dem Einschlußmedium Entellan® (Merck, Darmstadt) eingedeckt werden.

### **2.7.2 Trichromfärbung nach Masson-Goldner**

Die Färbung erfolgte mit einem Färbe-Kit der Firma Bio-Optica, Italien. Zunächst wurden die Gefrierschnitte kurz in Aqua dest. gespült. Anschließend wurden je 6 Tropfen von Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung A und B aufgetragen. Nach 10 min ließ man die Reagenzien vom Objektträger abtropfen und trug 10 Tropfen Pikrinsäure für 4min auf. Daraufhin wurde kurz mit Aqua dest. gespült und Ponceausäure Fuchsin nach Masson aufgetragen, welche wiederum nach 4 min mit Aqua dest. abgespült wurde, bevor 10 Tropfen Molybdato-phosphorsäure aufgetropft wurden. Nach weiteren 10 min wurde das Reagenz abgetropft und zuletzt die hellgrüne Goldner-Lösung für 5 min aufgetragen. Danach folgte ein kurzes Spülen in Aqua dest., eine aufsteigende Alkoholreihe (3x1 min und 1x4 min) und Xylol (2x10 min) zum dehydrieren. Zuletzt erfolgte das Einbetten mit Entellan® (Merck, Darmstadt).

### **2.8 Immunhistochemische Färbungen**

Zuerst wurden die Kryoschnitte in Aceton (4 °C) 2 min fixiert und anschließend für 20 min bei RT luftgetrocknet. Danach wurde die endogene Peroxidase in Methanol (Sigma-Aldrich, München) und Wasserstoffperoxid (30% in wässriger Lösung, Sigma-Aldrich, München) während einer Inkubationszeit von 30 min blockiert. Nach 3x5 min Waschen mit PBS pH 7,4 (Oxoid, UK) wurden 100 µl des Primärantikörpers in der jeweiligen Verdünnung auf das Präparat aufgetragen (siehe Tabelle 2). Die Antikörper wurden mit Antibody Diluent (Dako, Dänemark) verdünnt. Die Inkubationszeit erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.

**Tabelle 2:** Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper

Target	Antikörper	Spezifität	Firma	Verdünnung
CD4	GTX76103-250	Maus mono-klonal Anti-Ratte	GeneTex, USA	1:100
CD8a	EXB-11-678-C100	Maus mono-klonal Anti-Ratte	Exbio, Tschechien	1:250
CD68	GTX41868-100	Maus mono-klonal Anti-Ratte	GeneTex, USA	1:100
Kollagen I	CED-CL50141AP-1	Kaninchen polyklonal Anti-Ratte	Cedarlane, Kanada	1:500
Kollagen III	CED-CL50341AP-1	Kaninchen polyklonal Anti-Ratte	Cedarlane, Kanada	1:500
Kollagen IV	CED-CL50441AP-1	Kaninchen polyklonal Anti-Ratte	Cedarlane, Kanada	1:500

Am darauf folgenden Tag wurde nach erneutem Waschen mit PBS (Oxoid, UK) der entsprechende Sekundärantikörper aufgetragen (siehe Tabelle 3). Nach 30 min Inkubation bei RT in der feuchten Kammer und Waschen mit PBS wurde das DAB-Reagenz (BioGenex, USA) auf das Präparat pipettiert. Die DAB-Inkubation erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle und wurde mit dem Spülen in Aqua dest. beendet. Es folgte eine Hämalaun-Färbung nach Meyer (Merck, Darmstadt) für 20 sec und das Bläuen der Schnitte in fließendem Leitungswasser für 5 min. An ein kurzes Spülen in Aqua dest. folgte eine Alkoholreihe in Ethanol absolut (Sigma-Aldrich, München) für 3x1 min und 1x5 min sowie 2x5 min in Xylol. Zuletzt konnten die Präparate mit dem Einschlussmedium Entellan® (Merck, Darmstadt) eingedeckt werden.

**Tabelle 3:** Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Sekundärantikörper

Target	Antikörper	Spezifität	Firma	Verdünnung
Anti-Maus IgG	P0161	Kaninchen Anti-Maus	Dako, Dänemark	1:100
Anti-Kaninchen IgG	P0448	Ziege Anti-Kaninchen	Dako, Dänemark	1:100

### 2.9 Histologische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der histologischen Präparate erfolgte an einem Olympus BX50 Lichtmikroskop bei einer 10-40-fachen Vergrößerung. Die fotografischen Aufnahmen wurden an einem BIOREVO Mikroskop der Firma Keyence Modelreihe BZ-9000 angefertigt.

### 2.10 Tensiometrische Auswertung

Zur Bestimmung der Reißfestigkeit der biokompatiblen Polymermembranen wurden tensiometrische Tests durchgeführt. Hierbei wurden die PEG-Polymere und Lyoplast® in ein Tensiometer der Firma Instron (Darmstadt) eingespannt. Die Ergebnisse dienen im Vergleich zu Lyoplast® als indirekter Marker für den Grad der Integration des biokompatiblen Materials in den Organismus.

### 2.11 Statistische Methoden

Die Bearbeitung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2010.

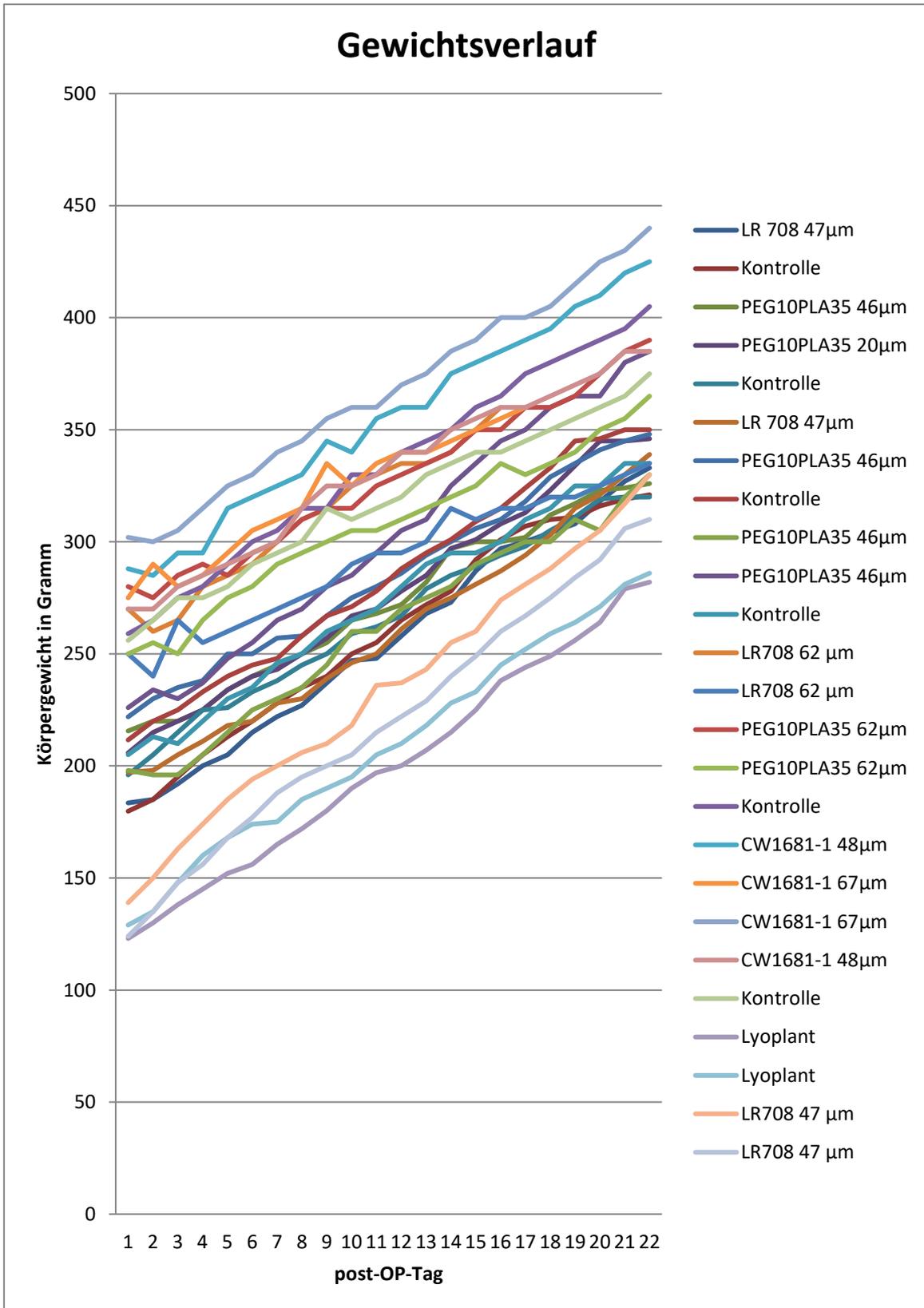
### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 In-vivo Funktion der Polymermembranen**

Um die Implantatakzeptanz und -kompatibilität bewerten zu können, ist zunächst die Funktion der Polymermembran im transplantierten Tier zu betrachten. Hierbei wurden das physiologische Wachstum der Ratten und die Stabilität der Bauchwand untersucht.

##### **3.1.1 Wachstum der Versuchstiere**

Von n=34 Ratten verstarb n=1 intraoperativ, n=3 an einem Platzbauch und n=1 Tier an einer 4-Quadranten-Peritonitis nach Darmperforation. n=4 Ratten verstarben an einer Wunddehiszenz, welche am ehesten durch technische Gründe bedingt auftrat. Alle explantierten Wistar Furth Ratten (n=25) zeigten im dreiwöchigen postoperativen Verlauf ( $\Delta t=3$  Wochen) physiologische Gewichtskurven (siehe Abbildung 10). Das durchschnittliche Gewicht bei Implantation betrug 218 g, bei Explantation 351 g. Der Gewichtsunterschied zwischen den Ratten ist durch natürliche Schwankungen und durch das um einzelne Tage schwankende Alter der Tiere zu Versuchsbeginn begründet.

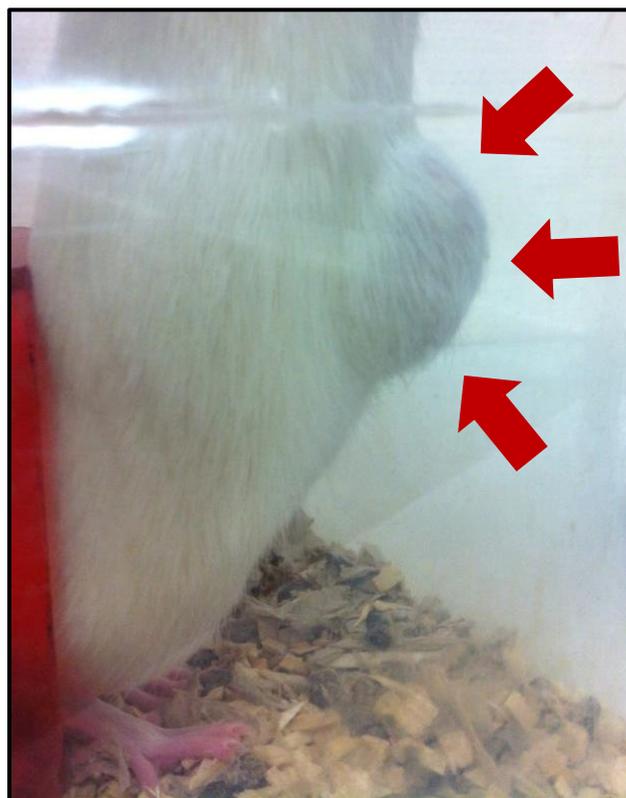


**Abbildung 10:** Postoperativer Gewichtsverlauf der explantierten Tiere (n=25).

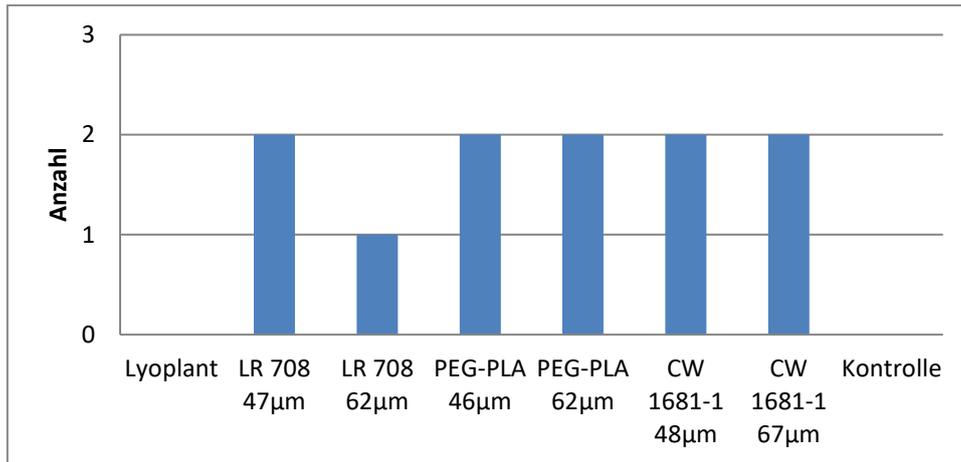
Bei n=6 Tieren wurde eine erneute OP mit Narkose zum Anfrischen der Wundränder und erneutem Wundverschluss notwendig. Bei n=1 Tier sogar zweifach. Um eine erneute Revision zu verhindern, wurden n=2 Tiere vier Tage vor Versuchsende, am 17. postoperativen Tag, frühzeitig explantiert.

### 3.1.2 Stabilität der Bauchwand

Äußerlich auffällig war das Auftreten einer abdominalen Hernierung der Ratten, welche sich unabhängig von Art und Dicke des Kunststoffpolymers zwischen dem 2. und 11. postoperativen Tag entwickelte (siehe Abbildung 11). Einzig die Ratten mit Lyoplast® Implantat und die Kontrolltiere wiesen keine Hernierung der Bauchwand auf (siehe Abbildung 12).

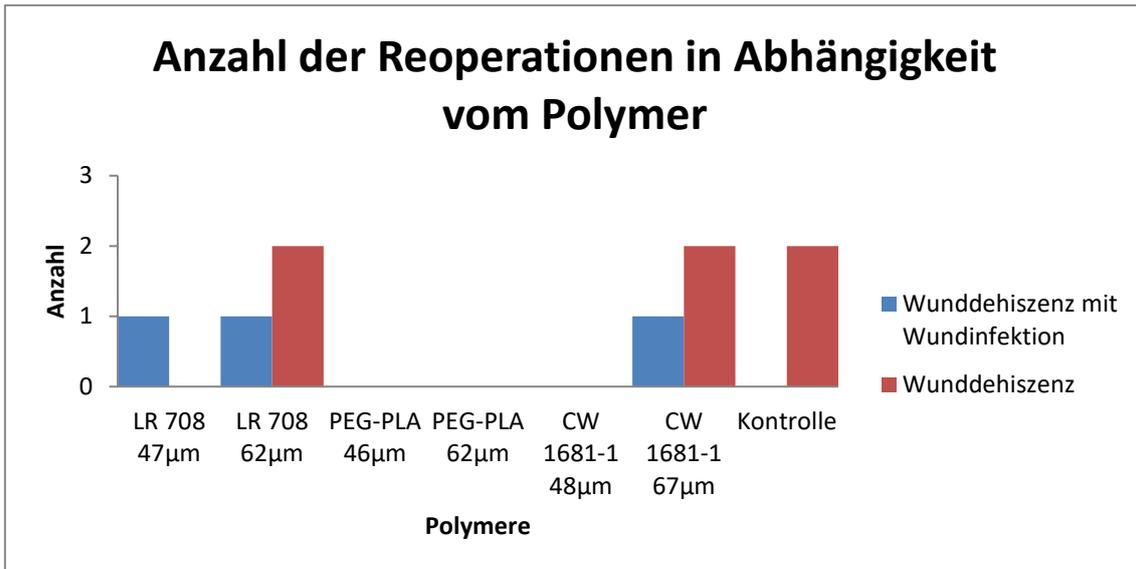


**Abbildung 11:** Abdominelle Narbenhernie (rote Pfeile) bei einer im Käfig stehenden Ratte mit CW1681 67 µm Implantat am 21. postoperativen Tag.



**Abbildung 12:** Prävalenz abdomineller Narbenhernien in Abhängigkeit vom Polymer.

Durch das starke Wachstum der Ratten und den schnellen Abbau bzw. die flächenhafte Ausdehnung des Implantats, kam es nicht nur zu Narbenhernien sondern auch zu druck- und spannungsbedingten Wunddehiszenzen. Bei n=6 Tieren waren Reoperationen notwendig (siehe Abbildung 13). Das Auftreten von Dehiszenzfällen bei Kontrolltieren zeigt jedoch, dass nicht nur das Implantat sondern auch der operative Eingriff an sich für die Dehiszenz verantwortlich sein kann. Auch Wundinfektionen, welche bei n=3 Tieren makroskopisch und mikroskopisch nachgewiesen werden konnten, spielten oft eine ausschlaggebende Rolle in der Pathogenese einer Wunddehiszenz.

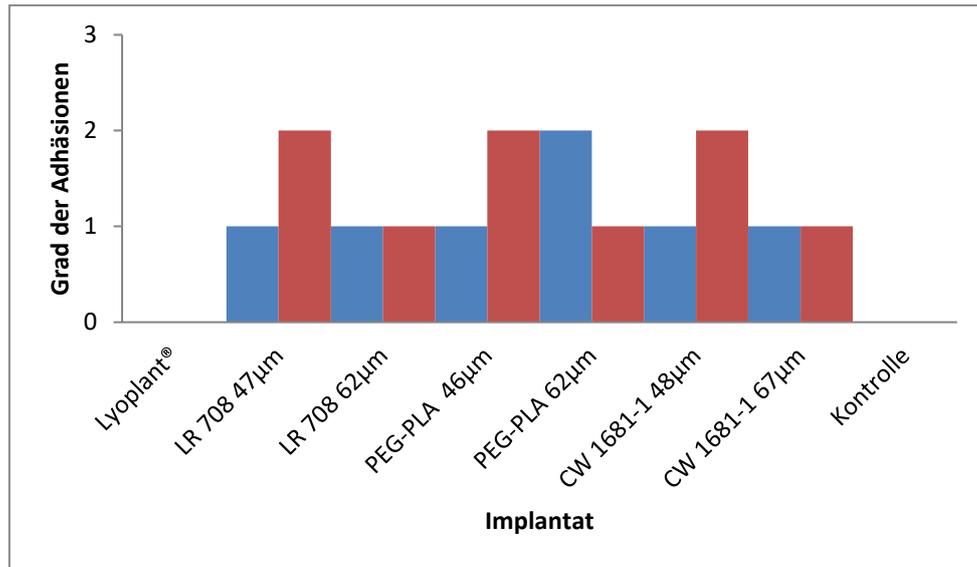


**Abbildung 13:** Anzahl der Reoperationen in Abhängigkeit vom Polymer.

## 3.2 Makroskopische Ergebnisse

### 3.2.1 Adhäsionen

Vor der Explantation der bipolaren Polymermembranen wurden die Tiere intraoperativ auf Verwachsungen untersucht. Die Stärke der Adhäsionen wurde auf einer Skala von Grad 0–2 angegeben, wobei bei Grad 0 keine Adhäsionen vorlagen. Bei Grad 1 handelte es sich um leichte Adhäsionen, die mit dem Finger leicht gelöst werden konnten. Grad 2 Adhäsionen waren nur mit dem Skalpell zu lösen. Adhäsionen von Grad 1 und Grad 2 fanden sich unabhängig von der Polymermembran und deren Dicke bei allen Tieren. Einzig die Ratten mit Lyoplast® (n=2) und die Kontrolltiere (n=7) ohne Implantat wiesen keine Adhäsionen auf (siehe Abbildung 14). Die Verwachsungen waren meist zwischen Implantat und dem anliegenden Omentum majus. In drei Fällen (n=3) lagen Adhäsionen zum Intestinum vor. Abbildung 15 zeigt Adhäsionen zweiten Grades eines PEG10PLA35 Implantates mit 46 µm Dicke zum Omentum majus und dem Darm der Ratte. Eine Lösung der Verwachsung war hier nur mit dem Skalpell möglich.



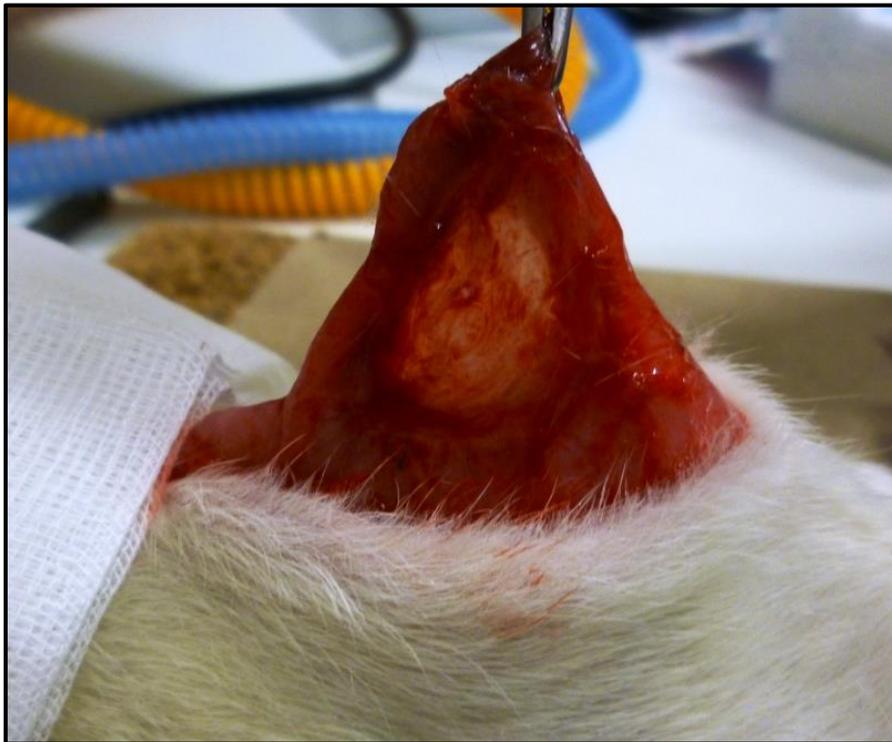
**Abbildung 14:** Grad der Adhäsionen in Abhängigkeit vom implantierten Patch, inklusive Kontrollgruppe.



**Abbildung 15:** Adhäsionen Grad II bei der Explantation eines PEG10PLA35 46 µm Implantates. Am unteren Präparatrand ist blaues Nahtmaterial zu sehen.

### 3.2.2 Abbau und Umbau des Implantats

Die Größe der Polymermembran betrug bei Implantation 2 x 2 cm und war somit deckungsgleich mit der Fläche des Bauchwanddefekts. Bei der Explantation des Patches mit dem angrenzenden Gewebe nach drei Wochen war bei allen Tieren das Implantat beziehungsweise Implantatüberreste und Nahtmaterial zu sehen. In einigen Fällen, besonders bei den Implantaten LR708 46 µm, CW1681-1 47 µm und PEG10PLA35 62 µm war das Patch sehr ausgedünnt und hatte sich flächig ausgedehnt (siehe Abbildung 16). Die Implantatfläche hatte sich in einem Fall auf ca. 3 x 3 cm vergrößert, was einer Flächenverdopplung entspricht.



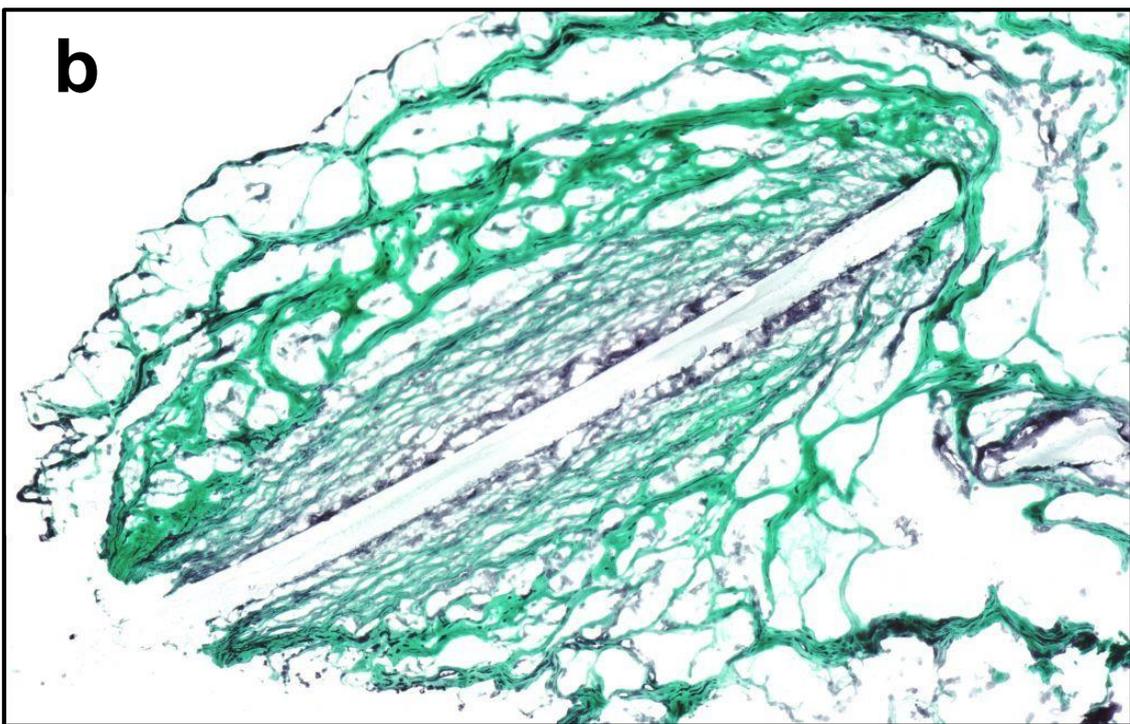
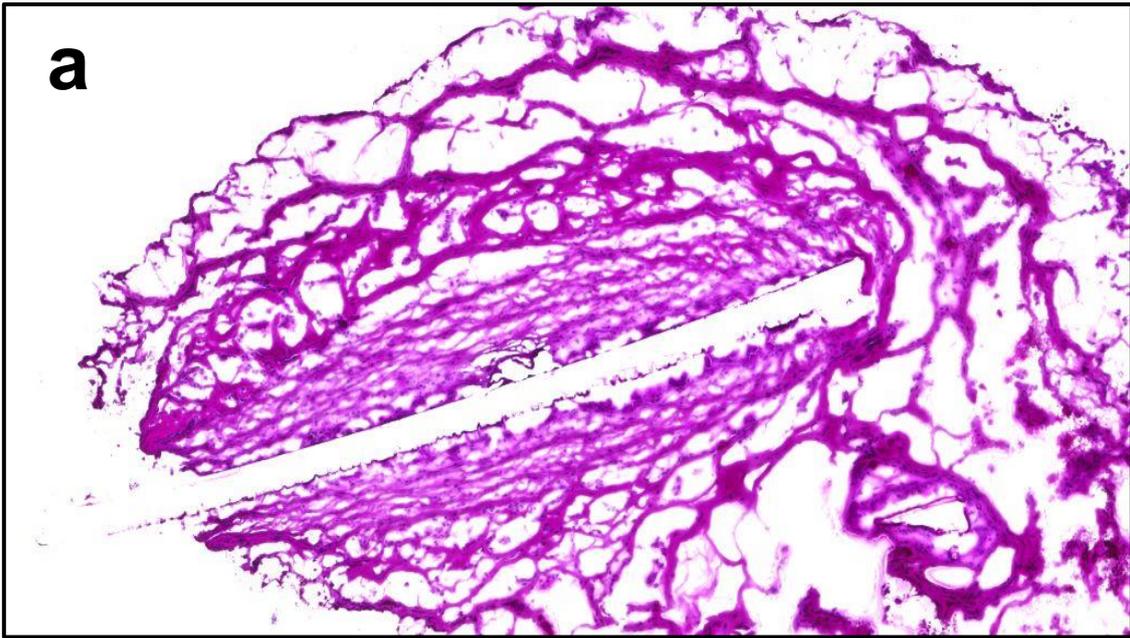
**Abbildung 16:** Sehr dünner Patch PEG10PLA35 62µm bei Explantation aufgrund von flächiger Ausdehnung des Implantats.

### **3.3 Mikroskopische Ergebnisse**

Bei der histologischen Untersuchung sollten postoperative Veränderungen am Implantat und dessen angrenzenden Gewebe dargestellt werden. Bei der Auswertung wurden die Präparate auf Zellinfiltration und Vaskularisation in Vergrößerungen von 4-40-fach untersucht. Da die bipolaren Polymermembranen in Alkohol löslich sind, erfolgte die Einbettung in Kryoblöcken. Die histologische Auswertung der ersten n=8 Tiere, deren Explantat in Paraffin eingebettet wurde, war aufgrund des HerauslöSENS des Patches nur bedingt möglich. Die folgenden histologischen Ergebnisse beziehen sich deshalb überwiegend auf n=17 Tiere, deren Gewebe unter Kryokonservierung fixiert wurde. Auch hier sieht man oftmals nur das Negativbild, das heißt die Stelle, wo der Patch ursprünglich war, bevor er sich bei Fixierung in Ethanol während der histologischen Färbung gelöst hat.

#### **3.3.1 HE-Färbung und Trichromfärbung nach Masson-Goldner**

Bei Explantation nach 21 Tagen waren die Implantate mäßig bis gar nicht vaskularisiert. Das Gewebe um die bipolare Polymermembran zeigt eine strukturelle Veränderung. Es zeigte sich eine bindegewebige Reorganisation des Gewebes um das Implantat (siehe Abbildung 17). Ein Beweis für Zellinfiltration ist bei herausgelösten Patch schwer möglich. Allenfalls Zellen am Rand des Implantats können den Hinweis auf mögliche Protein- und Zelladhäsionen geben.



**Abbildung 17:** Bindegewebiger Umbau um das LR708 62 µm Implantat bei Explantation nach drei Wochen bei 20facher Vergrößerung in HE-Färbung (a) und Masson-Goldner Färbung (b).

Auffällig bei n=3 Tieren war eine hohe Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Implantat- und Wundbereich. n=2 Tiere hatten außerdem eine dreimalig zu therapierende Wunddehiszenz, die den Verdacht auf einen inflammatorischen Pro-

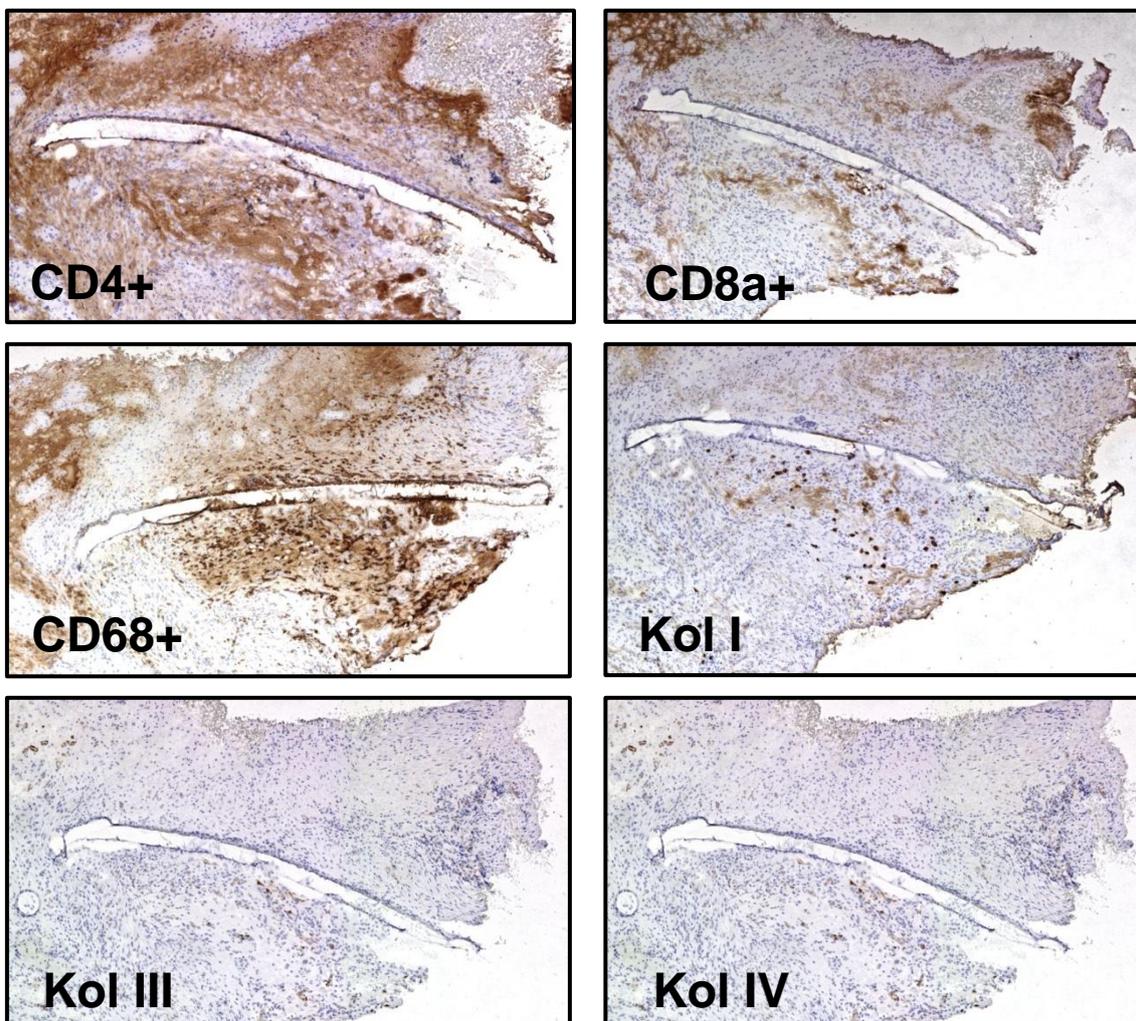
zess weiter erhärteten. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Tiere, deren Implantate, die Anzahl der Gewebeproben pro Tier und histologische Auffälligkeiten.

**Tabelle 4:** Überblick über die Anzahl der histologischen Präparate und Auffälligkeiten.

Tiernummer	Implantat	Explantationstag	Anzahl der Gewebeproben	Anmerkungen
I3	PEG10PLA35 46 µm	21	6	fragliche Zellinfiltration
II1	PEG10PLA35 46 µm	21	6	wenig Implantat sichtbar
II2	Kontrolle	21	4	-
II3	LR708 62 µm	17	6	viele Neutrophile, 3x Dehiszenz, frühzeitige Explantation
III1	LR708 62 µm	21	6	fragliche Zellinfiltration
III2	PEG10PLA35 62 µm	21	6	fragliche Zellinfiltration
III3	PEG10PLA35 62 µm	21	6	wenig Implantat sichtbar
IV1	Kontrolle	21	4	Bauchdekenhämatom bei Explantation
IV2	CW1681-1 48 µm	21	6	viele neutrophile Granulozyten
IV3	CW1681-1 67 µm	17	6	viele Neutrophile, 3x Dehiszenz, frühzeitige Explantation
V1	CW1681-1 67 µm	21	6	wenig Implantat sichtbar
V2	CW1681-1 48 µm	21	6	wenig Implantat sichtbar
V3	Kontrolle	21	4	-
VI1	LR708 48 µm	21	6	gute Vaskularisation, zusätzliches Nierenkapselimplantat
VI2	LR708 48 µm	21	6	zusätzliches Nierenkapselimplantat
VI3	Lyoplant®	21	6	sehr gute Implantatvaskularisation, zusätzliches Nierenkapselimplantat
VI4	Lyoplant®	21	6	sehr gute Implantatvaskularisation, zusätzliches Nierenkapselimplantat

### 3.3.2 Immunhistochemie

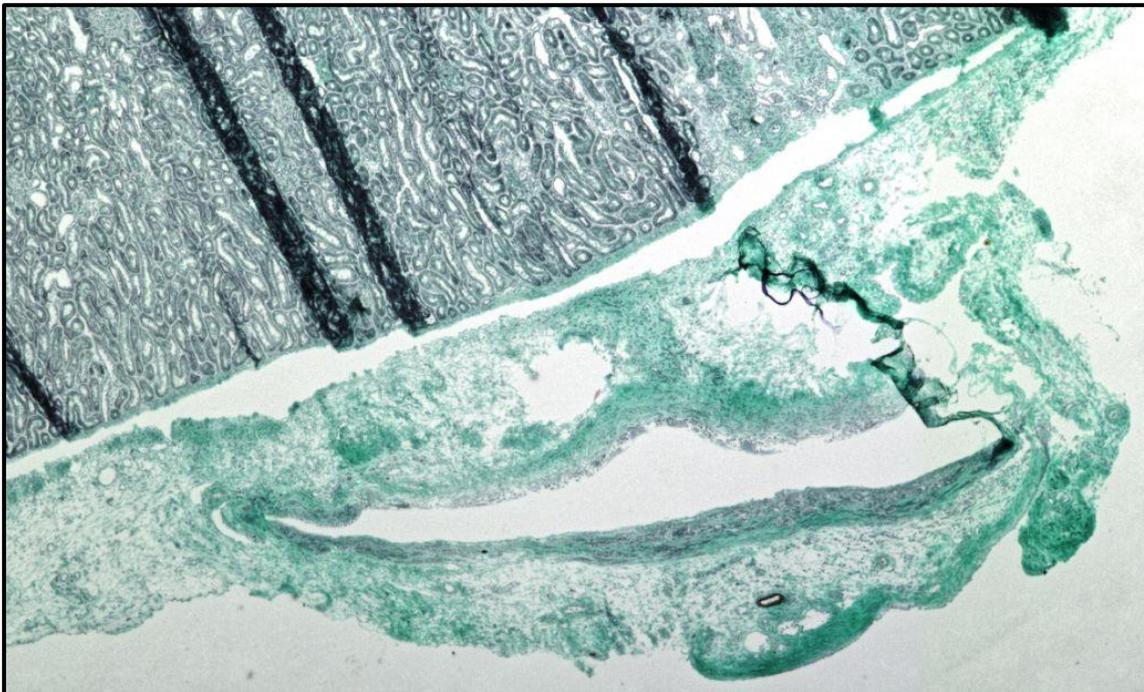
Bei der immunhistochemischen Färbung stand der Nachweis von T-Zellen (CD4 und CD8a positive Zellen), Makrophagen (CD68 positive Zellen) und den Kollagenen I, III und IV im Vordergrund. Die Präparate zeigten eine erhöhte Zellinfiltration von CD68 positiven Makrophagen. Die Anzahl an Kollagen I bildenden Zellen war ebenfalls erhöht. Besonders auffallend ist die Anordnung der Kollagenfasern auf nur einer Seite des Implantats (siehe Abbildung 18: Immunhistochemische Färbungen des LR708 47µm Implantats zum Nachweis von CD4-, CD8a- und CD68-positiven Zellen sowie Kollagen I, Kollagen III und Kollagen IV. 10fache Vergrößerung.



**Abbildung 18:** Immunhistochemische Färbungen des LR708 47µm Implantats zum Nachweis von CD4-, CD8a- und CD68-positiven Zellen sowie Kollagen I, Kollagen III und Kollagen IV. 10fache Vergrößerung.

### 3.4 Nierenkapselimplantat

Auf Grund der starken abdominellen Hernierung nach Implantation der bipolaren Polymermembranen in die Bauchdecke, sollte bei n=4 Ratten die Implantatfunktion in der Nierenkapsel getestet werden. Hier wurde das Implantat einem sehr viel niedrigeren Druck als im Abdomen ausgesetzt. Die histologischen Ergebnisse sind identisch mit denen der abdominellen Implantation (siehe Abbildung 19). Makroskopisch zeigt sich im Gegensatz zu den Präparaten aus der Bauchdecke keine flächige Ausdehnung.

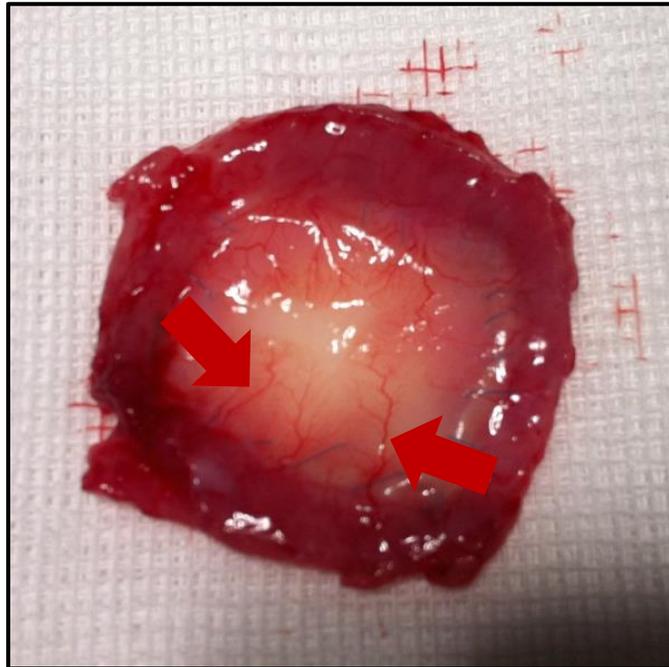


**Abbildung 19:** Masson-Goldner Färbung eines in die Nierenkapsel implantierten Patches, welcher sich während der Färbung nach rechts hin aufgerollt hat. Angeschnittene Nierentubuli im oberen linken Teil der Aufnahme. 4-fache Vergrößerung.

### 3.5 Vergleich mit Lyoplant®

Durch die hohe Elastizität ist die Implantation von Lyoplant® technisch einfacher durchführbar als die Implantation der bipolaren Polymermembranen. Die Nähte reißen außerdem nicht so schnell aus. Zudem entwickelten die Ratten

mit Lyoplant® im Gegensatz zu dem anderen Patch keine Bauchwandhernie. Makroskopisch zeigte sich bei dem aus Rinderperikard hergestellten Kollagenimplantat am 21. postoperativen Tag eine ausgeprägte Neovaskularisation. Die Gefäße sprossen marginal ein und durchdrangen am Explantationstag, abgesehen von einer kleinen Fläche im Zentrum, das ganze Präparat (siehe Abbildung 20).



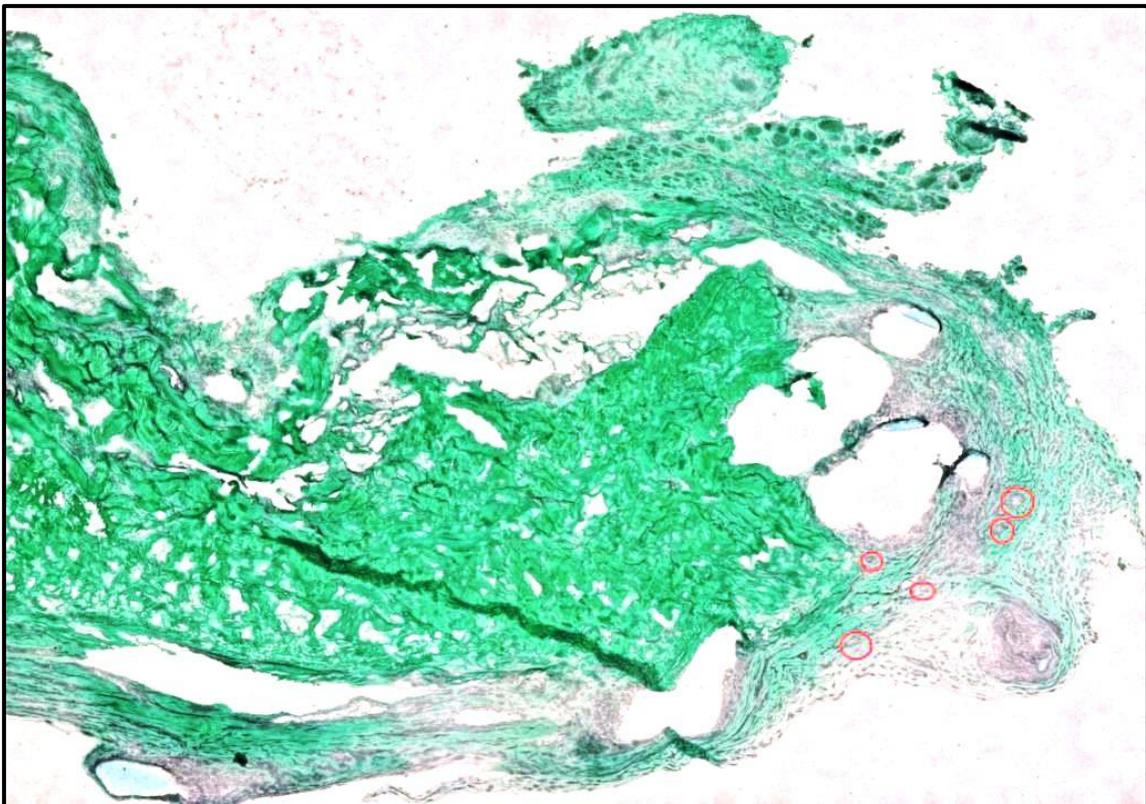
**Abbildung 20:** Lyoplant® Präparat nach Explantation am 21. postoperativen Tag. Makroskopisch Gefäßeinsprossung zu sehen (Pfeile).

In der histologischen Auswertung wird deutlich, dass der Um- und Abbau von Lyoplant® langsamer abläuft als der der anderen Implantate. Lyoplant® hat eine Dicke von 3-5 mm, was der 150-250 fachen Dicke der Polymermembranen entspricht (siehe Abbildung 21). Nach drei Wochen ist Lyoplant® noch genauso dick wie zuvor, eine flächige Ausdehnung hat ebenfalls in einem nicht messbaren Bereich stattgefunden.



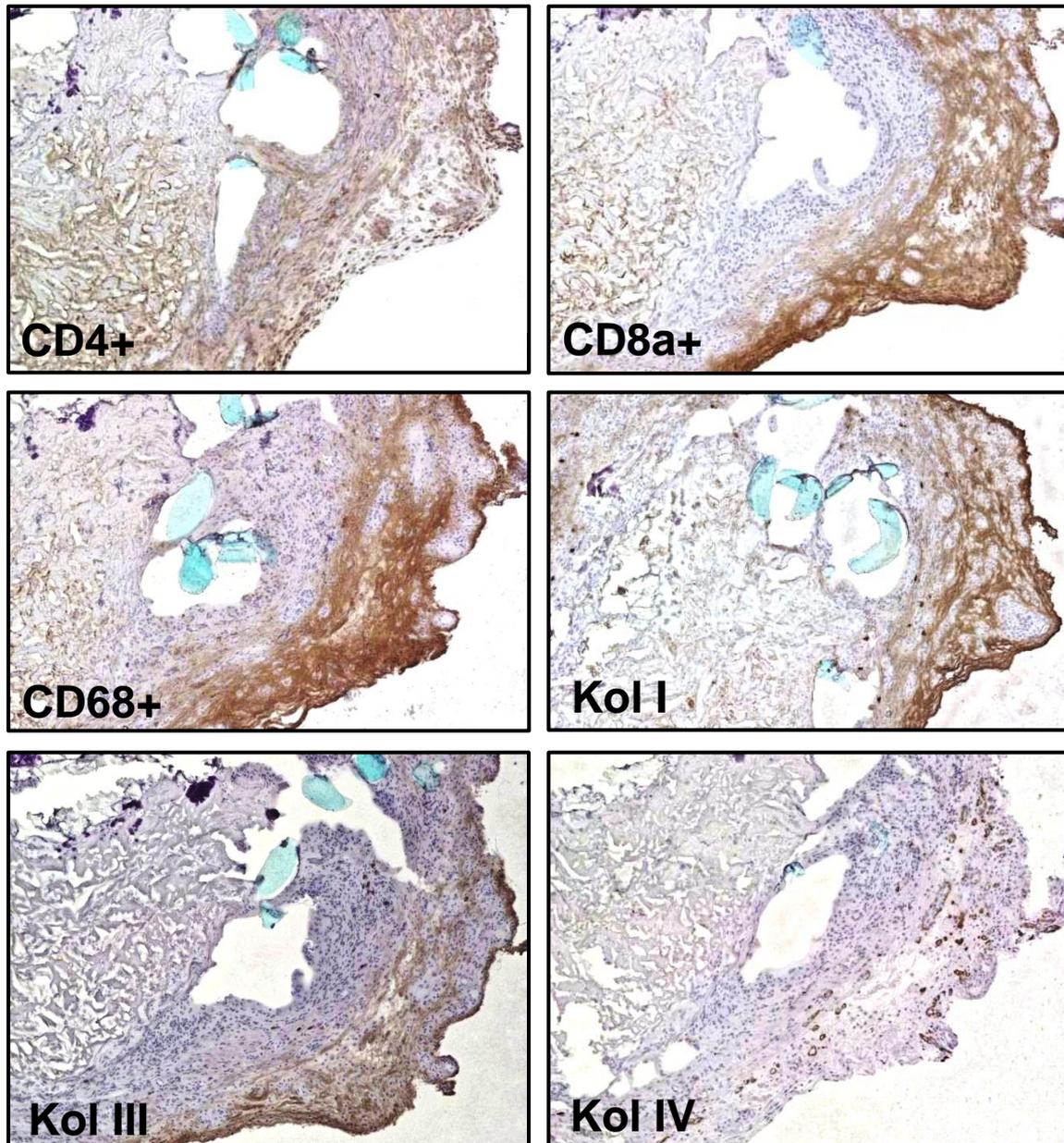
**Abbildung 21:** Lyoplant® im Querschnitt in Masson-Goldner Färbung. 4-fache Vergrößerung.

Die makroskopisch sichtbare Neovaskularisation des Lyoplant®-Implantats lässt sich auch mikroskopisch bestätigen. Die vom Rand her einwachsenden Gefäßeinsprossungen sind in Abbildung 22 am unteren rechten Bildrand rot markiert.



**Abbildung 22:** Mikroskopisch sichtbare Vaskularisation am Rand des Lyoplant®-Implantats (rot eingekreist). 10-fache Vergrößerung.

In der immunhistologischen Färbung zeigen sich bei Lyoplast® weniger CD68 positive Zellen als bei den Polymermembranen. Auch die bindegewebige Veränderung ist weniger bis kaum ausgeprägt (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Immunhistochemische Färbungen eines Lyoplast® Implantats zum Nachweis von CD4-, CD8a- und CD68-positiven Zellen sowie Kollagen I, Kollagen III und Kollagen IV. Bei den blauen Strukturen handelt es sich um das Nahtmaterial Prolene. 10fache Vergrößerung.

### **3.6 Tensiometrische Ergebnisse**

In der Tensiometrie wiesen die PEG-Polymere eine deutlich geringere Reißfestigkeit auf als Lyoplast®. Das Kollagenmesh war viermal so reißfest wie das Polymer LR708 und sogar 18-mal fester als das PEG-Polymer 10 PLA 35 mit einer Dicke von 62 µm. Dies bestätigt auch den makroskopischen Befund der Tiere, welche im Gegensatz zu den Ratten mit Lyoplast® alle eine abdominale Hernie ausbildeten.

## 4. Diskussion

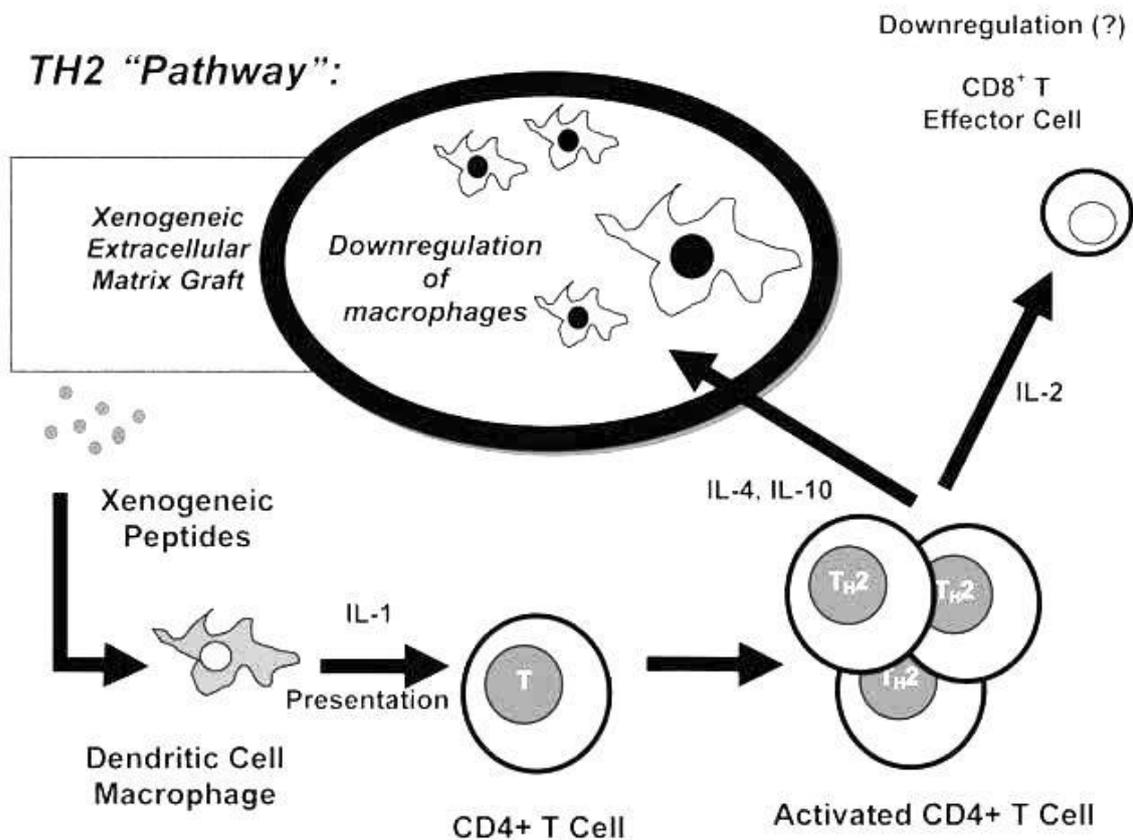
Um die Mortalität bei Patienten mit großen kongenitalen Bauchwanddefekten zu senken, wird zur Vermeidung von Infektionen und weiteren Komplikationen ein primärer Bauchdeckenverschluss mit Patchimplantation angestrebt [31]. Nicht resorbierbare Materialien wie Polypropylen und Polytetrafluorethylen (GoreTex) führen häufig zu Adhäsionen, Infektionen und erfordern zumeist einen erneuten operativen Eingriff zur Explantation oder zum Implantatwechsel [32, 61]. Dies führte daher zur Erprobung von resorbierbaren Materialien wie zum Beispiel humaner Dura [34-36], Rinderperikard (Lyoplant®) [2, 32, 37], porkiner Dünndarmsubmukosa (Surgisis) [33, 39, 40], humaner Amnionmembran [41] und vielen weiteren. Das perfekte Implantat wurde allerdings bis heute noch nicht gefunden [33, 43]. Das Material sollte idealerweise einfach handzuhaben und gut nähbar sein. Es muss in der Lage sein die mechanische Funktion der Bauchdecke hinsichtlich der Stabilität zu erfüllen und sollte bestenfalls mit dem Kind mitwachsen. Das heißt, es darf keine Fremdgewebsreaktion mit Narbenbildung aktivieren, sondern soll resorbiert und durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden. Zudem sollte es zur viszeralen Seite hin antiadhäsiv sein und auf der Gegenseite Fibroblasten die Möglichkeit zur Invasion bieten. Ein weiterer Punkt stellt die Finanzierbarkeit des Implantats dar [32].

Die von uns implantierten bipolaren Polymermembranen wurden auf ihre Biokompatibilität und oben aufgeführte Punkte im Rattenmodell getestet. Endpunkte hierbei waren Wachstum und Gewichtszunahme der Tiere im dreiwöchigen Verlauf, intraabdominelle Adhäsionen, Bildung von Hernien sowie histologische Veränderungen in dem Patch angrenzenden Gewebe. Zum Vergleich wurde das von Meyer et al. etablierte Verfahren mit Lyoplant® herangezogen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die aus Milchsäure hergestellten Polymere viele der oben genannten Eigenschaften erfüllen, jedoch aber nicht alle. Von den Ratten, welche ein Polymer implantiert bekamen, zeigten alle im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe eine physiologische Gewichtszunahme und Wachstumsverlauf. Die Stabilität der PLA-Polymere zeigte sich als nicht ausreichend. Alle Ratten, unabhängig von Dicke und Zusammensetzung des Polymers, entwickelten eine abdominelle Hernie. Von den Tieren mit dem azellulari-

sierten Kollagen Mesh Lyoplant® entwickelten, wie schon in den Versuchen von Meyer et al., keine der Ratten eine Hernie. Dies bestätigen auch die Ergebnisse aus den tensiometrischen Tests, in denen Lyoplant® eine 4-18 fach höhere Reißfestigkeit und Stabilität aufwies. Bei Explantation zeigte sich eine starke flächige Ausdehnung der Polymere, die als Hauptgrund für die Hernien angesehen werden kann. Lyoplant® weist folglich eine ausreichende Stabilität auf. Auch in Bezug auf Verwachsungen wiesen die erprobten Patches Nachteile auf. Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu Tieren mit Lyoplant® wiesen alle leichte bis mittlere Adhäsionen auf. Besonders bei der Therapie von kongenitalen Bauchwanddefekten, bei der die Implantate direkten Kontakt mit den intestinalen Organen haben, können bindegewebige Verwachsungen (Briden) und Adhäsionen zu unerwünschten Komplikationen und Reinterventionen bis hin zur Implantatexplantation führen. Trotz der unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten der bipolaren Polymere konnten Adhäsionen nicht verhindert werden. Der zum Intestinum gewandte glatte Film aus PLA hat seine anti-adhäsive Funktion nicht ausreichend erfüllt.

Mikroskopisch zeigten sich ausgeprägte bindegewebige Veränderungen um den Patch, die mit einer Narbenbildung gleichzusetzen sind. Anzeichen von einsprossenden Gefäßen im Sinne einer Neovaskularisation konnten nicht nachgewiesen werden. Lyoplant® hingegen zeigte bei der Explantation nach drei Wochen fast im gesamten Patchbereich eine deutliche Neovaskularisation. Ein Um- oder Abbau der Polymere konnte mikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Lediglich die Dicke des Implantats hatte sich durch die flächige Ausdehnung reduziert. Im Vergleich dazu wiesen die Polymere, die in die Nierenkapsel implantiert wurden, bei Explantation noch die gleiche Dicke auf. Dies ist durch die geringeren Druck- und Spannungsverhältnisse in der Nierenkapsel zu begründen. Die Dicke und Reißfestigkeit der bipolaren Polymermembranen stellt folglich einen Grund für das Implantatversagen dar. Der zweischichtige Aufbau wird durch das Spinnen von PLA-Fasern auf einen Polymerfilm erreicht. Mit dem Verfahren des Electrospinnings ist es leider nicht möglich die Dicke der Implantate weiter zu erhöhen.

Die Fibrosierung des Gewebes um das Polymer lässt einen Patchumbau unwahrscheinlich werden. Im Gegensatz zu den Ratten mit Lyoplant®, fand sich in der immunhistochemischen Auswertung eine höhere Anzahl an CD68 positiven Zellen (Makrophagen) im Gewebe um den Patch. Die Arbeitsgruppe Meyer et al. erstellte im Rahmen des PAUL-Procedure [2] die Theorie, dass die Biokompatibilität des Implantats vom ablaufenden TH1- bzw. TH2-Pathway abhängig ist. Folglich findet bei biokompatiblen Materialien, wie beispielsweise Lyoplant®, eine Immunantwort auf dem TH2-Pathway statt. Hierbei aktivieren xenogene Peptide des Implantats dendritische Zellen zur Ausschüttung von IL-1, was wiederum CD4 positive T-Zellen aktiviert und über den TH2-Weg, vermittelt durch die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, die Makrophagenaktivität (CD68 positive Zellen) senkt. Es folgt eine Gewebeumwandlung und –integration (siehe Abbildung 24). Läuft die Immunreaktion nach Implantation jedoch über den TH1-Pathway ab, führt eine Aktivierung der Makrophagen über den Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) und Interferon gamma (INF $\gamma$ ) sowie dem Zytokin IL-1 zu einer starken Fibrosierung durch Fibroblastenaktivierung und zu einer Gewebeerstörung, was einer Abstoßungsreaktion gleich kommt [2, 37]. Weitere Arbeitsgruppen konnten die Theorie des TH1-Pathways als Teil einer Abstoßungsreaktion bei allogenen und xenogenen Implantaten bestätigen [60, 62-64]. Die histologisch sichtbar erhöhte Anzahl an Makrophagen und Kollagenfasern um die bipolaren Polymere spricht für eine fehlende Gewebeintegration und ist am ehesten als Transplantatabstoßung zu deuten. Bei Lyoplant® hingegen konnte der Remodeling-Vorgang mit einer geringeren Anzahl CD68 positiver Zellen bestätigt werden.



**Abbildung 24:** Immunologische Reaktion des Organismus auf die Implantation eines biokompatiblen Materials. Der Remodulierungsvorgang wird über den TH2-Pathway eingeleitet [37].

Um eine nicht inflammatorische Transplantatakzeptanz zu begünstigen, werden heutzutage häufig so genannte Bioscaffolds eingesetzt. Hierbei handelt es sich um künstlich hergestellte oder azellularisierte Implantate, welche mit extrazellulären Matrixproteinen besetzt sind und im Lauf der Zeit nach Implantation durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden [65]. So wäre beispielsweise eine azelluläre Matrix mit verschiedenen Regulatorproteinen, durch die Zellwachstum und -differenzierung beeinflusst werden könnten, denkbar [61]. Auch die Besiedelung der Patches mit Zellen kann die Biokompatibilität, Neovaskularisation und mechanische Stabilität verbessern, da besonders bei rein synthetischen Materialien eine Zellmigration oft nicht möglich ist [43, 66]. Insbesondere Stammzellen mit ihrem großen Differenzierungspotenzial werden derzeit erprobt. In der Stammzellforschung können ethische und gesetzliche Probleme, sowie Kos-

teneffektivität eine Rolle spielen [67]. Ob die Herstellung eines Bioscaffolds mit Protein- oder Zellintegration bei unseren Polymeren möglich ist, müsste überprüft werden. Jedoch ist weiterhin fraglich, ob eine Integration ins Gewebe stattfindet und ob diese ausreicht, um genügend Stabilität zu gewähren.

Inzwischen haben viele Kollagen-basierte Materialien Einzug im biomedizinischen Bereich gefunden [27, 32, 62, 68, 69]. Doch auch hierunter ist nicht das perfekte biokompatible Material. Eine zu geringe Stabilität [70] und fehlende Zellmigration [61] erfordern eine weitere Optimierung. Das von uns zum Vergleich eingesetzte Lyoplant® verfügt über viele Eigenschaften des „perfekten Patches“. Es überzeugt mit seiner guten Nähbarkeit und einfachen Handhabung, mit einer hohen in-situ Stabilität, minimalen Adhäsionen und einem langsamen, nicht zu schnellen Implantatumbau. Die stattfindende Vaskularisierung und Transplantatakzeptanz über den TH2-Pathway sprechen ebenfalls für die Biokompatibilität des Kollagen-Meshs. Nachteile zeigen sich jedoch in der nicht zu variierenden Dicke des Implantats, was keine individuelle Anpassung an Größe und Gewicht des Neugeborenen ermöglicht.

## 5. Zusammenfassung

Kongenitale Bauchwanddefekte sind dramatische Fehlbildungen der vorderen Bauchwand. Zu den Defekten gehören neben der Nabelhernie und dem Blasenextrophie-Komplex im engeren Sinne die Gastroschisis und die Omphalozele. Die Therapie stellt die behandelnden Kinderchirurgen und Neonatologen vor eine große Herausforderung [1]. Methode der Wahl ist der primär operative Bauchdeckenverschluss. Falls aufgrund der Größe des abdominalen Defekts oder der viszeroabdominellen Diskrepanz ein primärer Verschluss nicht möglich ist, wird eine Schusterplastik angelegt oder ein Patch implantiert [14]. Bei den Implantaten unterscheidet man nicht-resorbierbare Materialien wie Polypropylen und Polytetrafluorethylene (GoreTex) von resorbierbaren Patches wie zum Beispiel humane Dura [34], porkine Dünndarmsubmukosa [33], oder azellularisiertes Rinderperikard (Lyoplant®) [32]. Die Ansprüche an ein solches Implantat sind hoch und das perfekte Material wurde bis heute noch nicht gefunden [43]. Ideale Eigenschaften sind eine gute Handhabung und Nähbarkeit, Resorbierbarkeit, Anti-Adhäsivität zum Intestinum, Stabilität und Elastizität sowie die Transplantatakzeptanz.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung bipolarer Polymermembranen zur sicheren und effektiven Therapie kongenitaler Bauchwanddefekten im Rattenmodell. Bei den Polymermembranen handelt es sich um zweischichtige Implantate, welche aus einem Film und einem aufgesponnen Vlies bestehen. Der Film besteht aus dem Resomer LR708, dem linearen PEG-PLA und dem Polyurethan CW1681. Der mittels Electrospinning auf den Film aufgebrachte Vlies ist aus reinem PLA. Die Implantate sind zwischen 20 und 67  $\mu\text{m}$  dick. Als Vergleich diente das bereits im Klein- und Großtiermodell von Meyer et al. etablierte Kollagen-Mesh Lyoplant®.

Als Versuchstiere des Experiments dienten  $n=34$  männliche Wistar Furth Ratten, denen intraoperativ ein 2 x 2 cm großer Bauchwanddefekt zugeführt wurde, der anschließend mit einem gleich großen Patch verschlossen wurde.  $N=25$  Tiere erhielten eine bipolare Polymermembran,  $n=2$  Tiere Lyoplant und  $n=7$  Ratten dienten zur Kontrolle. Nach 21 Tagen fand ein erneuter Eingriff statt. Hierbei

wurde das Implantat samt umliegendem Gewebe explantiert und histologisch ausgewertet. Neben der Gewichtszunahme wurden die Ratten auf die Bildung von Hernien und intraabdominellen Adhäsionen sowie auf histologische Veränderungen untersucht. Von n=34 Ratten verstarben n=9 aus unterschiedlichen Gründen. Alle explantierten Wistar Furth Ratten (n=25) zeigten im dreiwöchigen postoperativen Verlauf ( $\Delta t=3$  Wochen) physiologische Gewichtskurven. Alle Ratten mit Polymer-Implantat entwickelten im dreiwöchigen Verlauf eine abdominelle Hernie sowie Adhäsionen. Eine Zellinfiltration und Gefäßeinsprossung im Sinne einer Neovaskularisation konnte nicht nachgewiesen werden. Die histologische Auswertung ergab eine bindegewebige Veränderung im angrenzenden Gewebe, die zusammen mit der immunhistochemisch gesicherten hohen Anzahl an CD68 positiven Zellen (Makrophagen) einer Immunreaktion über den TH1-Pathway entspricht. Bei fehlender Integration in das Gewebe, kommt dies einer Implantatabstoßung gleich. In den Tieren mit Lyoplast® konnten wir die Ergebnisse von Meyer et al. bestätigen [32].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die bipolaren Polymermembranen viele Eigenschaften eines idealen biokompatiblen Materials erfüllen, jedoch aufgrund der fehlenden mechanischen Stabilität nicht zur Therapie von kongenitalen Bauchwanddefekten geeignet sind. Lyoplast® hingegen erwies sich in Bezug auf fehlende Hernienbildung und Adhäsionen, Gefäßeinsprossung und Transplantatakzeptanz im Vergleich zu den Polymeren als äußerst gut geeignetes Material. Um das operative Ergebnis weiter zu perfektionieren, könnte die Besiedelung des Kollagen-Meshs mit Stammzellen experimentell getestet werden. Inwieweit Lyoplast® dann für die Therapie der kongenitalen Bauchwanddefekte geeignet ist, müssen weitere klinische Studien zeigen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Ionescu S., Mocanu M., Andrei B., et al.** Differential Diagnosis of Abdominal Wall Defects - Omphalocele versus Gastroschisis. *Chirurgia* 2014; Vol.109, S.7-14.
2. **Meyer T., Seifert A., Meyer B., et al.** PAUL procedure - A new biocompatible concept for the therapy of congenital abdominal wall defects. *Chirurg* 2010; Vol.81, S.236-242.
3. **Deutsche Gesellschaft für Kinderchirurgie.** Leitlinien Bauchwanddefekte (Laparoschisis/Omphalozele) AWMF Nr. 006/045, 2012, S. 1-8.
4. **Muntau A. C.** Intesivkurs Pädiatrie. Kapitel 1, S.22-23. Elsevier, München; 2011.
5. **Mortellaro V., Peter S., Fike S., et al.** Review of the evidence on the closure of abdominal wall defects. *Pediatr Surg Int* 2011; Vol.27, S.391-397.
6. **Krause H., Pötzsch S., Haß H.-J., et al.** Ventrale Bauchwanddefekte – Darstellung der Entwicklung in Prävalenz und operativem Vorgehen anhand von Gastroschisis und Omphalozele. *Zentralblatt Chirurgie* 2009; Vol.134, S.524–531.
7. **Ledbetter D. J.** Gastroschisis and omphalocele. *The Surgical clinics of North America* 2006; Vol.86, S.249-260.
8. **Henrich K., Huemmer H., Reingruber B., et al.** Gastroschisis and omphalocele: treatments and long-term outcomes. *Pediatr Surg Int* 2008; Vol.24, S.167-173.
9. **EUROCAT.** Prevalence tables 2014. European surveillance of congenital anomalies; 2014.
10. **Calzolari E., Bianchi F., Dolk H., et al.** Omphalocele and gastroschisis in Europe: a survey of 3 million births 1980-1990. EUROCAT Working Group. *American journal of medical genetics* 1995; Vol.58, S.187-194.
11. **Mehrabi V., Mehrabi A., Kadivar M., et al.** Staged repair of giant recurrent omphalocele and gastroschisis "camel-litter method"-a new technique. *Acta medica Iranica* 2012; Vol.50, S.388-394.
12. **Strauss A.** *Ultraschallpraxis - Geburtshilfe und Gynäkologie.* Kapitel 2, S. 193-195. Springer, Heidelberg; 2008.

13. **Laughon M., Meyer R., Bose C., et al.** Rising birth prevalence of gastroschisis. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 2003; Vol.23, S.291-293.
  
14. **von Schweinitz D. und Ure B.** *Kinderchirurgie. Kapitel 39*, T.Boemers, S.556-563. Springer, Heidelberg; 2013.
  
15. **Werler M. M., Sheehan J. E. und Mitchell A. A.** Association of vasoconstrictive exposures with risks of gastroschisis and small intestinal atresia. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 2003; Vol.14, S.349-354.
  
16. **Feldkamp M. L., Carey J. C. und Sadler T. W.** Development of gastroschisis: review of hypotheses, a novel hypothesis, and implications for research. *American journal of medical genetics Part A* 2007; Vol.143a, S.639-652.
  
17. **Skarsgard E. D., Meaney C., Bassil K., et al.** Maternal risk factors for gastroschisis in Canada. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2015; Vol.103, S.111-118.
  
18. **Gemeinsamer Bundesausschuss.** *Richtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung.* Berlin; 2014.
  
19. **Rodeck B. und Zimmer K.-P.** *Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung. Kapitel 10*, J. Fuchs, S. 325-327. Springer, München; 2013.
  
20. **Barisic I., Clementi M., Hausler M., et al.** Evaluation of prenatal ultrasound diagnosis of fetal abdominal wall defects by 19 European registries. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; Vol.18, S.309-316.
  
21. **Tucker J. M., Brumfield C. G., Davis R. O., et al.** Prenatal differentiation of ventral abdominal wall defects. Are amniotic fluid markers useful adjuncts? *The Journal of reproductive medicine* 1992; Vol.37, S.445-448.
  
22. **Cohen-Overbeek T. E., Tong W.H., Hatzmann T. R., et al.** Omphalocele comparison of outcome following prenatal and postnatal diagnosis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; Vol.36, S.687–692.
  
23. **Hsieh T. T., Lai Y. M., Liou J. D., et al.** Management of the fetus with an abdominal wall defect: experience of 31 cases. *Taiwan yi xue hui za zhi Journal of the Formosan Medical Association* 1989; Vol.88, S.469-473.

24. **Nasr A., Langer J. C. und Canadian Paediatric Surgery Network.** Influence of location of delivery on outcome in neonates with gastroschisis. *J Pediatr Surg* 2012; Vol.47, S.2022-2025.
25. **Langer J. C.** Abdominal wall defects. *World journal of surgery* 2003; Vol.27, S.117-124.
26. **Schmidt A. F., Goncalves A., Bustorff-Silva J. M., et al.** Does staged closure have a worse prognosis in gastroschisis? *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* 2011; Vol.66, S.563-566.
27. **Roelofs L. A., Eggink A. J., Hulsbergen-van de Kaa C. A., et al.** Fetal abdominal wall repair with a collagen biomatrix in an experimental sheep model for gastroschisis. *Tissue engineering Part A* 2008; Vol.14, S.2033-2040.
28. **Sun J., Wang F., Deng G., et al.** Preliminary experimental study on intrauterine abdominal wall defect repair of fetal lamb at late pregnancy. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waikewaxue zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery* 2011; Vol.25, S.689-692.
29. **Ein S. und Langer J.** Delayed management of giant omphalocele using silver sulfadiazine cream: an 18-year experience. *Journal of Pediatric Surgery* 2012; Vol.47, S.494-500.
30. **Hofmann-von Kapherr S. und Emmrich P.** Causes of postoperative deaths in gastroschisis and omphalocele. *Progress in pediatric surgery* 1979; Vol.13, S.63-70.
31. **Rahn S. und M. Bahr.** Single-center 10-year experience in the management of anterior abdominal wall defects. *Hernia* 2008; Vol.12, S.345-350.
32. **Meyer T., Schwarz K., Ulrichs K., et al.** A new biocompatible material (Lyoplant) for the therapy of congenital abdominal wall defects: first experimental results in rats. *Pediatr Surg Int* 2006; Vol.22, S.369-374.
33. **Beres A., Christison-Lagay E., Romao R., et al.** Evaluation of Surgisis for patch repair of abdominal wall defects in children. *Journal of Pediatric Surgery* 2012; Vol.47, S.917-919.
34. **Smith S., Gantt N., Rowe M. I., et al.** Dura versus Gore-Tex as an abdominal wall prosthesis in an open and closed infected model. *J Pediatr Surg* 1989; Vol.24, S.519-521.

35. **Bellon J. M., Contreras L. A., Pascual G., et al.** Neoperitoneal formation after implantation of various biomaterials for the repair of abdominal wall defects in rabbits. The European journal of surgery = Acta chirurgica 1999; Vol.165, S.145-150.
36. **Heiming E. und Jerusalem C. R.** Langzeiterfahrungen mit lyophilisierter Weichdura (Lyodura®S) als Bindegewebsersatz in der Kinderchirurgie. Eur J Pediatr Surg 1989; Vol.44, S.67-71.
37. **Meyer Th, Schwarz K., Germer C. T., et al.** Immune response to xenogeneic extracellular matrix grafts: „Remodeling rather than rejection“. Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2009; Vol.38, S.311-312.
38. **Meyer T., Seifert A., Meyer B., et al.** PAUL procedure. A new biocompatible concept for the therapy of congenital abdominal wall defects. Chirurg 2010; Vol.81, S.236-242.
39. **Clarke K. M., Lantz G. C., Salisbury S. K., et al.** Intestine submucosa and polypropylene mesh for abdominal wall repair in dogs. The Journal of surgical research 1996; Vol.60, S.107-114.
40. **Badylak S., Kokini K., Tullius B., et al.** Morphologic study of small intestinal submucosa as a body wall repair device. The Journal of surgical research 2002; Vol.103, S.190-202.
41. **Szabo A., Haj M., Waxsman I., et al.** Evaluation of seprafilm and amniotic membrane as adhesion prophylaxis in mesh repair of abdominal wall hernia in rats. European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes 2000; Vol.32, S.125-128.
42. **Sato T.** Infectious prion disease: CJD with dura mater transplantation. Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology 2003; Vol.43, S.870-872.
43. **Song Z., Peng Z., Liu Z., et al.** Reconstruction of abdominal wall musculofascial defects with small intestinal submucosa scaffolds seeded with tenocytes in rats. Tissue engineering Part A 2013; Vol.19, S.1543-1553.
44. **Bonnard A., Zamakhshary M., de Silva N., et al.** Non-operative management of gastroschisis: a case-matched study. Pediatr Surg Int 2008; Vol.24, S.767-771.
45. **van Eijck F. C., Wijnen R. M. und van Goor H.** The incidence and morbidity of adhesions after treatment of neonates with gastroschisis and omphalocele: a 30-year review. J Pediatr Surg 2008; Vol.43, S.479-483.

46. **Kaiser M. M., Kahl F., von Schwabe C., et al.** Omphalocele and gastroschisis. Outcome--complications--follow-up--quality of life. *Chirurg* 2000; Vol.71, S.1256-1262.
47. **van Eijck F. C., Hoogeveen Y. L., van Weel C., et al.** Minor and giant omphalocele: long-term outcomes and quality of life. *J Pediatr Surg* 2009; Vol.44, S.1355-1359.
48. **Henrich K., Huemmer H. P., Reingruber B., et al.** Gastroschisis and omphalocele: treatments and long-term outcomes. *Pediatr Surg Int* 2008; Vol.24, S.167-173.
49. **Kim W. B., Kim J., Boo Y. J., et al.** Successful vaginal delivery following laparoscopic abdominal wall reconstruction in an adult survivor of an omphalocele without prior surgical repair: report of a case. *Hernia* 2009; Vol.13, S.431-434.
50. **Penz H., Menardi G. und Brezinka C.** Omphalocele and gastroschisis in Tirol- incidence and epidemiology 1985-1996. *Gynakologisch-geburtshilfliche Rundschau* 1998; Vol.38, S.216-221.
51. **Puri A. und Bajpai M.** Gastroschisis and omphalocele. *Indian journal of pediatrics* 1999; Vol.66, S.773-789.
52. **Swartz K., Harrison M., Campbell J., et al.** Selective Management of Gastroschisis. *Annals of Surgery* 1986; Vol.203, S.214-218.
53. **Pastora A. C., Phillips J. D., Fenton S. F., et al.** Routine use of a SILASTIC spring-loaded silo for infants with gastroschisis: a multicenter randomized controlled trial. *Journal of Pediatric Surgery* 2008; Vol.43, S.1807–1812.
54. **Tessmar J. K. und M. Göpferich A.** Customized PEG-Derived Copolymers for Tissue-Engineering Applications. *Macromolecular Bioscience* 2007; Vol.7, S.23-39.
55. **Lieb E., Tessmar J., Hacker M., et al.** Poly(D,L-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers control adhesion and osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. *Tissue engineering* 2003; Vol.9, S.71-84.
56. **Luu Y. K., Kim K., Hsiao B. S., et al.** Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2003; Vol.89, S.341-353.

57. **Abebe D. G., Kandil R., Kraus T., et al.** Three-Layered Biodegradable Micelles Prepared by Two-Step Self-Assembly of PLA-PEI-PLA and PLA-PEG-PLA Triblock Copolymers as Efficient Gene Delivery System. *Macromolecular Bioscience* 2015.
58. **Kim K., Yu M., Zong X., et al.** Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(D,L-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications. *Biomaterials* 2003; Vol.24, S.4977-4985.
59. **B. Braun Melsungen AG.** Lyoplast® - Biologischer, vernährbarer Duraersatz. Produktinformation; Melsungen; 2015.
60. **Allman A. J., McPherson T. B., Badylak S. F., et al.** Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response. *Transplantation* 2001; Vol.71, S.1631-1640.
61. **Gamba P., Conconi M., Lo Piccolo R., et al.** Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. *Pediatr Surg Int* 2002; Vol.18, S.327-331.
62. **Zheng F., Lin Y., Verbeken E., et al.** Host response after reconstruction of abdominal wall defects with porcine dermal collagen in a rat model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2004; Vol.191, S.1961-1970.
63. **Grimm P. C., McKenna R., Nickerson P., et al.** Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1999; Vol.10, S.1582-1589.
64. **Lao W. W., Wang Y. L., Ramirez A. E., et al.** A new rat model for orthotopic abdominal wall allotransplantation. *Plastic and reconstructive surgery Global open* 2014; Vol.2, S.e136.
65. **Wolf M. T., Dearth C. L., Sonnenberg S. B., et al.** Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction. *Advanced drug delivery reviews* 2014.
66. **Conconi M. T., Coppi P., Bellini S., et al.** Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. *Biomaterials* 2005; Vol.26, S.2567-2574.
67. **Petter-Puchner A. H., Fortelny R. H., Gruber-Blum S., et al.** The future of stem cell therapy in hernia and abdominal wall repair. *Hernia* 2015; Vol.19, S.25-31.

68. **Adedeji O. A., Bailey C. A. und Varma J. S.** Porcine dermal collagen graft in abdominal-wall reconstruction. British journal of plastic surgery 2002; Vol.55, S.85-86.

69. **Soiderer E. E., Lantz G. C., Kazacos E. A., et al.** Morphologic study of three collagen materials for body wall repair. The Journal of surgical research 2004; Vol.118, S.161-175.

70. **Hengirmen S., Cete M., Soran A., et al.** Comparison of meshes for the repair of experimental abdominal wall defects. Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research 1998; Vol.11, S.315-325.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Klinisches Bild einer rechts umbilikalen Gastroschisis. Dunkelrotes Kolorit der Darmschlingen ist Zeichen der gereizten Serosa (Kinderchirurgie Würzburg). .....	2
<b>Abbildung 2:</b> Klinisches Bild einer kleinen Omphalozele. Die Nabelschnur inseriert am Omphalozelensack (Kinderchirurgie Würzburg). .....	3
<b>Abbildung 3:</b> T2 gewichtetes sagittales MRT eines Fetus mit Omphalozele in der 30. SSW [1]. .....	6
<b>Abbildung 4:</b> T2 gewichtetes sagittales MRT eines Fetus mit Gastroschisis in der 36. SSW (die gestrichelte Linie begrenzt die herniierten Organe) [1]. .....	6
<b>Abbildung 5:</b> Neugeborenes nach Anlage einer Schusterplastik. Unter der transparenten Silastikfolie sind die eventrierten Organe zu sehen (Kinderchirurgie Würzburg). .....	8
<b>Abbildung 6:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von bipolaren Membranen (Film + Vlies) aus nicht adhäsiven PEG-PLA Copolymeren (a) und von gesponnen Fasern des Vlies (b). .....	13
<b>Abbildung 7:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Zellen auf einem PLA-Polymer nach 3 h Inkubation [55]. .....	15
<b>Abbildung 8:</b> Wistar Furth Ratte in ihrem Käfig. ....	17
<b>Abbildung 9:</b> Intraoperativer Rattensitus bei Implantation. Der Bauchwanddefekt von 2x2 cm wird mit einem Patch verschlossen (A). Intraoperative Lagerung, hier kurz vor der Explantation (B). .....	18
<b>Abbildung 10:</b> Postoperativer Gewichtsverlauf der explantierten Tiere (n=25). .....	24
<b>Abbildung 11:</b> Abdominelle Narbenhernie (rote Pfeile) bei einer im Käfig stehenden Ratte mit CW1681 67 µm Implantat am 21. postoperativen Tag. ...	25
<b>Abbildung 12:</b> Prävalenz abdomineller Narbenhernien in Abhängigkeit vom Polymer. ....	26
<b>Abbildung 13:</b> Anzahl der Reoperationen in Abhängigkeit vom Polymer. ....	27
<b>Abbildung 14:</b> Grad der Adhäsionen in Abhängigkeit vom implantierten Patch, inklusive Kontrollgruppe. ....	28
<b>Abbildung 15:</b> Adhäsionen Grad II bei der Explantation eines PEG10PLA35 46 µm Implantates. Am unteren Präparatrand ist blaues Nahtmaterial zu sehen..	28

<b>Abbildung 16:</b> Sehr dünner Patch PEG10PLA35 62µm bei Explantation aufgrund von flächiger Ausdehnung des Implantats.....	29
<b>Abbildung 17:</b> Bindegewebiger Umbau um das LR708 62 µm Implantat bei Explantation nach drei Wochen bei 20facher Vergrößerung in HE-Färbung (a) und Masson-Goldner Färbung (b). .....	31
<b>Abbildung 18:</b> Immunhistochemische Färbungen des LR708 47µm Implantats zum Nachweis von CD4-, CD8a- und CD68-positiven Zellen sowie Kollagen I, Kollagen III und Kollagen IV. 10fache Vergrößerung. ....	33
<b>Abbildung 19:</b> Masson-Goldner Färbung eines in die Nierenkapsel implantierten Patches, welcher sich während der Färbung nach rechts hin aufgerollt hat. Angeschnittene Nierentubuli im oberen linken Teil der Aufnahme. 4-fache Vergrößerung. ....	34
<b>Abbildung 20:</b> Lyoplast® Präparat nach Explantation am 21. postoperativen Tag. Makroskopisch Gefäßeinsprossung zu sehen (Pfeile). ....	35
<b>Abbildung 21:</b> Lyoplast® im Querschnitt in Masson-Goldner Färbung. 4-fache Vergrößerung. ....	36
<b>Abbildung 22:</b> Mikroskopisch sichtbare Vaskularisation am Rand des Lyoplast®-Implantats (rot eingekreist). 10-fache Vergrößerung.....	36
<b>Abbildung 23:</b> Immunhistochemische Färbungen eines Lypoplast® Implantats zum Nachweis von CD4-, CD8a- und CD68-positiven Zellen sowie Kollagen I, Kollagen III und Kollagen IV. Bei den blauen Strukturen handelt es sich um das Nahtmaterial Prolene. 10fache Vergrößerung. ....	37
<b>Abbildung 24:</b> Immunologische Reaktion des Organismus auf die Implantation eines biokompatiblen Materials. Der Remodulierungsvorgang wird über den TH2-Pathway eingeleitet [37]. ....	42

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Anzahl der Versuchstiere in Abhängigkeit vom Implantat .....	16
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper.....	21
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Sekundärantikörper .....	22
<b>Tabelle 4:</b> Überblick über die Anzahl der histologischen Präparate und Auffälligkeiten.....	32

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Th. Meyer für die freundliche Überlassung des Themas und die Betreuung in allen theoretischen und praktischen Bereichen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. K. Backhaus, die mich stets unterstützte und motivierte. Vielen Dank für die Hilfsbereitschaft im Labor und das Korrekturlesen der Arbeit.

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Groll, Herrn Dr. rer. nat. J. Teßmar sowie Martina Keßler vom Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde (FMZ Würzburg) für die Anfertigung und Bereitstellung der Polymermembranen.

Auch danken möchte ich Frau Dr. I. Chodnevsckaja für ihre Hilfe im Labor und bei der histologischen Auswertung.

Im Übrigen danke ich meiner Freundin und Kommilitonin Milena Balz, die mir mit ihren praktischen Ideen und ihrer Erfahrung unterstützend zur Seite stand.

Ein herzliches Dankeschön auch an meine Familie und Philipp Stühler, die mich motivierten und immer für mich da waren.