

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Ulf Peter Neumann)

PLGA/sP(EO-stat-PO)-Nanoweb zur Oberflächenmodifikation von Netzen

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Yelena Ushakova

aus

Taschkent (Usbekistan)

Berichter: Frau Privatdozentin
Dr. med. Gabriele Böhm

Herr Professor
Dr. med. Bernd Klosterhalfen

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 2013

***Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.***

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie und Physiologie des Zwerchfells.....	1
1.2	Kongenitale diaphragmatische Hernie	3
1.3	Ätiologie und Pathogenese der CDH	4
1.4	Mortalitätsrate	5
1.5	Biomaterialien	6
1.6	Adhäsionen.....	8
1.7	Sternkonfiguriertes NCO-sP(EO-stat-PO).....	10
1.8	Biomaterialien bei CDH.....	11
2	Zielsetzung	13
3	Material und Methoden.....	14
3.1	Studiendesign	14
3.2	Verwendete Mesh-Materialien	14
3.3	Beschichtung der Netze mit NCO-Poly(EO-stat-PO)	15
3.4	Tiermodell	17
3.4.1	Versuch I.....	17
3.4.2	Versuch II.....	19
3.5	Explantation	20
3.5.1	Versuch I.....	20
3.5.2	Versuch II.....	21
3.6	Histologie	21
3.7	Immunhistochemische Aufbereitung.....	22
3.7.1	Ki-67	23
3.7.2	CD68.....	24
3.7.3	Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA).....	25
3.7.4	TUNEL	26
3.7.5	Kollagen I zu Kollagen III Quotient.....	27
3.8	Radiologische Untersuchung	28
3.9	Statistik	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Versuch I.....	32
4.1.1	Gewicht.....	32
4.1.2	Makroskopische Beurteilung.....	33
4.1.3	Adhäsionen.....	35

4.1.4	Defektschrumpfung.....	36
4.1.5	Histologie	37
4.1.6	Immunhistochemische Aufbereitung.....	39
4.1.7	Radiologische Untersuchung	44
4.2	Versuch II	51
4.2.1	Gewicht.....	51
4.2.2	Makroskopische Beurteilung.....	52
4.2.3	Adhäsionen.....	53
4.2.4	Netzschrumpfung.....	54
4.2.5	Defektschrumpfung.....	55
4.2.6	Histologie	57
4.2.7	Immunhistochemische Aufbereitung.....	63
5	Diskussion	72
6	Schlussfolgerung	80
7	Zusammenfassung	81
8	Literatur	83
9	Danksagung	94
10	Erklärung zur Datenaufbewahrung	95
11	Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 10 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung.....	96
12	Lebenslauf.....	98

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Anatomische Darstellung des Zwerchfells. Sicht von abdominaler Seite. (Quelle: Nason et al., 2012)	1
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Zwerchfellentwicklung (Quelle: Nason et al., 2012)	2
Abb. 1.3: Zwerchfellhernie (diaphragmale Hernie) einer Katze. Laterale Ansicht. Links im Bild ist der Bauchraum mit Magen, Darm und Gallenblase zu sehen. Auf der rechten Seite befindet sich der Brustkorb. Dort ist als Bruchinhalt der größte Teil der Leber zu sehen, rechts daneben das Herz (Quelle: Wikipedia)	3
Abb. 1.4: Chemische Struktur des NCO-SP(EO- <i>stat</i> -PO) (Quelle: Grafahrend et al., 2011)	10
Abb. 1.5: Schematische Darstellung des NCO-SP(EO- <i>stat</i> -PO)	11
Abb. 3.1: Polypropylen	14
Abb. 3.2: Eine mit Ammoniak-Plasma aktivierte Meshfibrille wird mit NCO-SP(EO- <i>stat</i> -PO) inkubiert (a). Dabei entsteht eine 10 nm dicke antiadhäsive Schicht (b), die weiterhin mit Nanoweb aus PLGA/NCO-SP(EO- <i>stat</i> -PO)elektrobesponnen wird (c). Beschichtung mit NCO-SP(EO- <i>stat</i> -PO)-Hydrogel zu weiterer Luftdichtigkeit (d).	16
Abb. 3.3: PLGA	16
Abb. 3.4: Rasterelektronenmikroskopie des elektrobesponnenen mUP-Netzes	17
Abb. 3.5: In NaCl Lösung eingelegtes modifiziertes Netz bereit für die Implantation	17
Abb. 3.6: mUP-Netz in situ direkt nach der Implantation. Sicht von abdominaler Seite	19
Abb. 3.7: Auswertungsbereiche	22
Abb. 3.8: UP-Kontrollnetz. Pfeile zeigen auf Ki-67 positiv gefärbte Zellen (Ki-67-Färbung, x400)	23
Abb. 3.9: mUP-Netz. Pfeile zeigen auf CD68 positiv gefärbte Zellen. (CD68-Färbung, x400)	25
Abb. 3.10: UP-Kontrollnetz. Pfeil zeigt auf SMA positiv gefärbte Zellen (SMA-Färbung, x400)	26
Abb. 3.11: mUP-Netz. Pfeile zeigen auf apoptotische Zellen, Sternchen zeigt auf apoptotische Körperchen (TUNEL-Färbung, x400)	27
Abb. 3.12: UP-Kontrollnetz. Digitale Auswertung des Kollagen I/III Quotienten mit Hilfe der Software „Image Pro Plus“. Innerhalb AOI von 100x100 µm sind Kollagen I (rot) und Kollagen III (gelb) markiert. (Sirius Red Färbung, x400)	28
Abb. 3.13: Bild einer präoperativen radiologischen videoskopischen Aufnahme. Das Kaninchen wurde mit dem Rücken auf einem Röntgentisch mit einer integrierten Skala von 1x1 cm fixiert	30
Abb. 4.1: Gewichtszunahme in kg nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert ± Standardabweichung	32

Abb. 4.2: mUP-Netz in situ nach vier Monaten Implantationszeit. Sicht von abdominaler Seite	33
Abb. 4.3: Granulom im Bereich des mPP-Netzes. Sicht von abdominaler Seite	34
Abb. 4.4: Adhäsionen zwischen der Leber und dem mPP-Netz nach vier Monaten Implantationszeit. Sicht von abdominaler Seite	35
Abb. 4.5: Defektdurchmesser (mm) von mUP- und mPP-Netz nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	36
Abb. 4.6: Proliferationsrate von mUP- und mPP-Netz im Defekt, Neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	39
Abb. 4.7: Apoptoserate von mUP- und mPP-Netz im Defekt, Neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	40
Abb. 4.8: Prozentzahl der CD68 positiven Zellen von mUP- und mPP-Netz im Defekt, neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	41
Abb. 4.9: Prozentzahl der SMA positiven Zellen von mUP- und mPP-Netz im Defekt, neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	42
Abb. 4.10: Kollagen I zu Kollagen III Quotient von mUP- und mPP-Netz im Defekt, neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	43
Abb. 4.11: Zeitlichen Entwicklung der Atemfrequenzpräoperativ, zwei und vier Monate nach Implantation von mUP- und mPP-Netzen. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	44
Abb. 4.12: Entwicklung der Zwerchfellexkursion präoperativ, zwei und vier Monate nach Implantation von mUP- und mPP-Netz. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	46
Abb. 4.13: Quotient Kontroll-/Netzseite der Zwerchfellexkursion präoperativ, zwei und vier Monate nach Implantation von mUP- und mPP-Netz. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	47
Abb. 4.14: Entwicklung der Normvolumina präoperativ, zwei und vier Monate nach Implantation von mUP- und mPP-Netz. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	48
Abb. 4.15: Zwerchfellexkursion von mUP- und mPP-Netz nach zwei Monaten mit Einbezug der Granulombildung. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	49
Abb. 4.16: Zwerchfellexkursion von mUP- und mPP-Netzen nach vier Monaten mit Einbezug der Granulombildung. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	50
Abb. 4.17: Gewichtszunahme in kg nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	51
Abb. 4.18: Adhäsionen zwischen der Leber und dem UP-Kontrollnetz nach vier Monaten Implantationszeit. Sicht von abdominaler Seite	53

Abb. 4.19: Defektdurchmesser (mm) von mUP-, mPP-Netz und UP-Kontrollnetz nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	55
Abb. 4.20: Sicht von der thorakalen Seite auf das Zwerchfell eines mit mPP-Netz behandelten Tieres nach zwei Monaten Implantationszeit. Die Spitze vom Instrument zeigt auf einen verschlossenen Defekt	56
Abb. 4.21: Vernarbung im Defekt. Elastische Fasern sind schwarz gefärbt (EVG-Färbung, x40)	58
Abb. 4.22: Vorfalt des Leberparenchyms in den eingesetzten Defekt zwischen Netzfaser (HE-Färbung, x100).....	59
Abb. 4.23: Fibrosereaktion am Netzrand am ehesten um Prolenenah (HE-Färbung, x200)	61
Abb. 4.24: Proliferationsrate von mUP-,mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	63
Abb. 4.25: Proliferationsrate von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	64
Abb. 4.26: Apoptoserate von mUP-,mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	65
Abb. 4.27: Apoptoserate von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	65
Abb. 4.28: Prozentzahl der CD68 positiven Zellen von mUP-,mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	67
Abb. 4.29: Prozentzahl der CD68 positiven Zellen von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	67
Abb. 4.30: Prozentzahl der SMA positiven Zellen von mUP-,mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	68
Abb. 4.31: Prozentzahl der SMA positiven Zellen von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	69
Abb. 4.32: Kollagen I zu Kollagen III Quotient von mUP-,mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	70
Abb. 4.33: Kollagen I zu Kollagen III Quotient von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	71

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Klassifikation der Adhäsionen nach Zühlke (Quelle: Zühlke et al., 1990)	21
Tab. 4.1: Semiquantitativ gemessene Ergebnisse der histologischen Untersuchung von mUP- und mPP-Netz im Defekt, neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Untersuchung Das Ausmaß jedes Merkmals wurde in vier Grade unterteilt (0=kein; 1=minimal; 2=mittelmäßig; 3=sehr ausgeprägt)	38
Tab. 4.2: Netzbreite und Netzlänge in cm (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) nach vier Monaten Implantationszeit	54
Tab. 4.3: Netzbreite und Netzlänge in cm (Median) nach zwei Monaten Implantationszeit	54
Tab. 4.4: Semiquantitativ gemessene Ergebnisse der histologischen Untersuchung von mUP- , mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Das Ausmaß jedes Merkmals wurde in vier Grade unterteilt (0=kein; 1=minimal; 2=mittelmäßig; 3=sehr ausgeprägt)	60
Tab. 4.5: Semiquantitativ gemessene Ergebnisse der histologischen Untersuchung von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Das Ausmaß jedes Merkmals wurde in vier Grade unterteilt (0=kein; 1=minimal; 2=mittelmäßig; 3=sehr ausgeprägt)	62

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	Alpha Actin der glatten Muskelzellen (engl.: alpha smooth muscle actin)
Abb.	Abbildung
AOI	engl.: area of interest
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	engl.: cluster of differentiation
CDH	Kongenitale diaphragmatische Hernie (engl.: Congenital diaphragmatic hernia)
cm	Zentimeter
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Deoxyribonucleic acid)
engl.	englisch
et al.	und andere (lat.: et altera)
EVG	Elastika van Gieson
Fa.	Firma
g/m ²	Gramm pro Quadratmeter
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
g/mol	Gramm pro Mol
HE	Hämatoxylin-Eosin
HCl	Salzsäure
IgG	Immunoglobulin G
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

kGy	Kilogray
lat.	lateinisch
mbar	Millibar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Mw	Molekulargewicht (engl.: molecular weight)
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
mPP	modifiziertes Polypropylen
mUP	modifiziertes Ultrapro
N	Normalität
n	Anzahl (engl.: number)
NaCl	Natriumchlorid
NCO	Isocyanatgruppe
NCO-sP(EO- <i>stat</i> -PO)	sternkonfiguriertes Poly(Ethylenoxid- <i>stat</i> -Propylenoxid) mit reaktiver Isocyanatgruppe
NH ₂ -	Aminogruppe
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
p-Wert	Wahrscheinlichkeit (engl.: probability)
p.i.	postimplantation
PBS	engl.: Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
PLGA	Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid)
pH	Säuregrad (pH = -log[H ⁺]) (lat.: pondus hydrogenii)
PP	Polypropylen
s	Sekunde

SAS	engl.: Statistical Analysis Software
sccm	Standardkubikzentimeter
sog.	sogenannte
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
TUNEL	engl.: Terminale Desoxyribosyl Transferase - mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling
UK	United Kingdom
UP	Ultrapro®
USA	engl.: United States of America
usw.	und so weiter
V_{norm}	Normvolumen
vs.	gegen (lat.: versus)
W	Watt
γ -Strahlen	Gamma-Strahlen
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie des Zwerchfells

Das Zwerchfell erfüllt zwei sehr wichtige Funktionen. Einerseits ist es der respiratorische Hauptmuskel, andererseits bildet es eine physiologische Barriere zwischen abdominalem und thorakalem Raum (Clugston & Greer, 2007). Das Zwerchfell besteht aus 3 Hauptsegmenten: einem zentralen nicht kontraktilem Segment, dem so genannten Centrum tendineum und zwei separaten Muskelteilen, dem costalen und cruralen Diaphragma. Das Centrum tendineum besteht aus einer bindegewebigen Membran, aus der die Muskelfasern der beiden muskulären Anteile ausstrahlen. Die beiden Muskelanteile unterscheiden sich in embryologischer Herkunft, Faseraufbau, Innervation und Funktion (De Troyer et al., 1981) (Abb. 1.1).

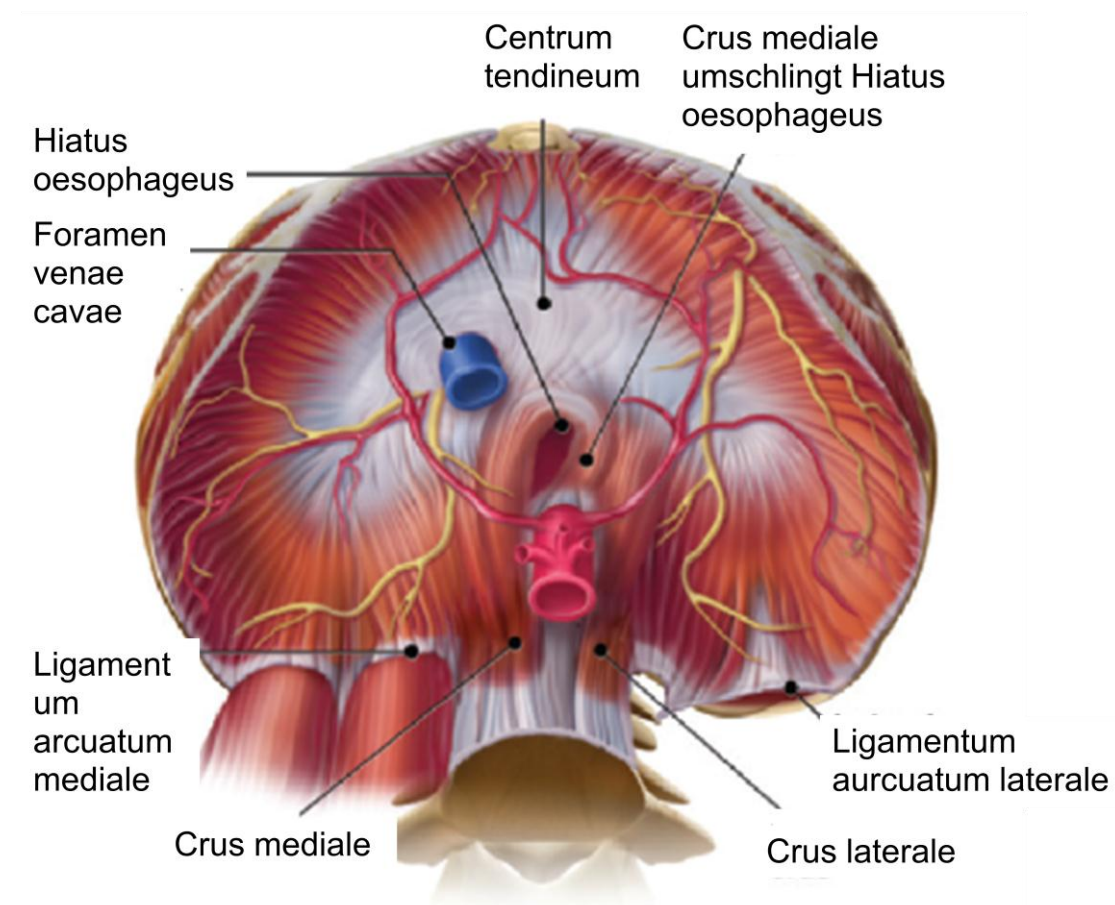


Abb. 1.1: Anatomische Darstellung des Zwerchfells. Sicht von abdominalen Seite. (Quelle: Nason et al., 2012)

Die Entwicklung des Zwerchfells beginnt etwa in der vierten Woche der Gestation. Es entwickelt sich aus mehreren Strukturen: einer unpaaren ventralen Anlage, dem Septum transversum, einer paarigen dorsalen Pleuroperitonealfalte und dem Mesenterium des Ösophagus. Aus dem Septum transversum entwickelt sich das Centrum tendineum und die vorderen Zwerchfellanteile. Am dorsalen Rand des Septums bleiben zunächst Pleuroperitonealkanäle als Verbindung zwischen Brust- und Bauchhöhle erhalten. Anschließend wächst die Pleuroperitonealfalte nach ventral in die Pleuroperitonealkanäle vor und verwächst in der 7. Woche mit dem Septum transversum und dem Mesenterium des Ösophagus. So entwickeln sich im Verschmelzbereich zwischen Pleuroperitonealfalte und Mesenterium des Ösophagus die Zwerchfellschenkel. Im weiteren Verlauf dringen Myoblasten und Nervenendigungen in die Pleuroperitonealfalte ein und bilden so den muskulären Anteil vom Zwerchfell (Babiuk et al., 2003).

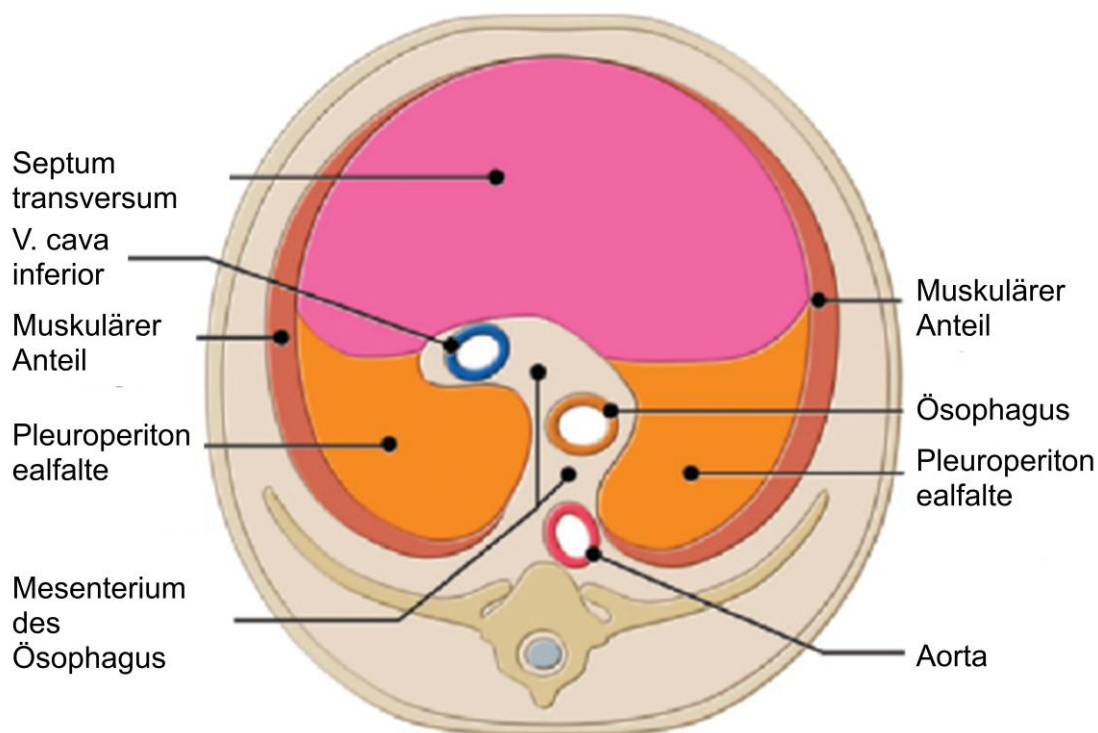


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Zwerchfellentwicklung (Quelle: Nason et al., 2012)

Die mechanische Aktion des Zwerchfells ist vor allem durch die Anatomie und die Bindung an den Brustkorb bedingt (Loring & Mead, 1982). Dem Brustkorb anliegende Zwerchfellanteile gehören zu einer sogenannten Appositionszone.

Während der Zwerchfellkontraktion werden die Bauchorgane nach caudal verschoben, der abdominale Druck in der Appositionszone steigt und der Brustkorb erweitert sich. Eine Störung der Zwerchfellinnervation, der anatomischen Zwerchfellstruktur und der Muskelkontraktilität können zur Zwerchfelldysfunktion führen (Laghi & Tobin, 2003; McCool & Tzelepis, 2012).

1.2 Kongenitale diaphragmatische Hernie

Kongenitale diaphragmatische Hernie (CDH) ist ein Defekt zwischen thorakalem und abdominalem Raum, der mit einer Lungenhypoplasie kombiniert ist, und zu einer Herniation der abdominalen Organe in den Thoraxraum führt (Inselman & Mellins, 1981; Clugston & Greer, 2007) (Abb. 1.3).

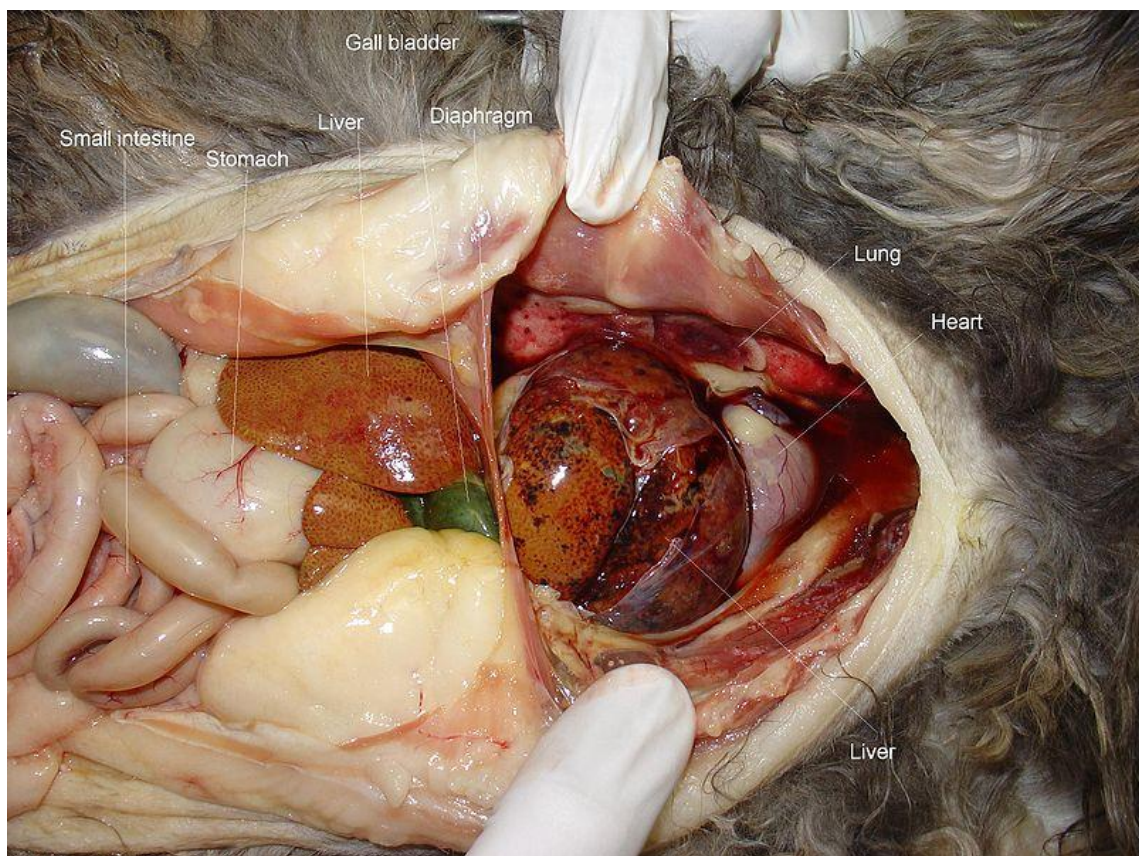


Abb. 1.3: Zwerchfellhernie (diaphragmale Hernie) einer Katze. Laterale Ansicht. Links im Bild ist der Bauchraum mit Magen, Darm und Gallenblase zu sehen. Auf der rechten Seite befindet sich der Brustkorb. Dort ist als Bruchinhalt der größte Teil der Leber zu sehen, rechts daneben das Herz (Quelle: Wikipedia)

Die Erstbeschreibung der CDH erfolgte 1679 durch Riverius. Ein Jahrhundert später beschrieb Morgagni in seiner Monographie verschiedene Typen der Zwerchfellhernien einschließlich der anterioren Hernie, die heute seinen Namen

trägt. 1848 beschrieb Bochdalek die CDH als einen posterolateralen Defekt im Zwerchfell (Puri & Wester, 1997).

Die Inzidenz der CDH beträgt 1:2500-6500 Lebendgeborenen (Wenstrom et al., 1991; Langham, Jr. et al., 1996). In 84% der CDH ist die linke Seite des Zwerchfells betroffen, in 14% die rechte Seite und weniger als 1% sind bilateral (Langham, Jr. et al., 1996; Neville et al., 2003). Häufig sind die CDH mit kardialen, gastrointestinalen, genitourethralen, skelettalen oder neurologischen Anomalien und verschiedenen Trisomien assoziiert (Langham, Jr. et al., 1996; Kaiser & Rosenfeld, 1999). Die CDH tritt in ca. 40% mit einer oder mehreren dieser Anomalien auf (Fauza & Wilson, 1994).

Auf Grund der Komplexität der Zwerchfellentwicklung und der daraus resultierenden Vielfältigkeit der Morphologie der CDH fehlt immer noch eine einheitliche morphologische Klassifikation der CDH (Lally et al., 2007; Pober, 2008). Grundsätzlich können CDH phänotypisch in vier Typen, abhängig von der Lokalisation des Defektes, unterteilt werden. Mit 95% der Fälle stellt der posterolaterale Defekt (Bochdalek-Hernie) den häufigsten Typ der CDH dar. Die restlichen 5% bilden retrosternale Hernien, Morgagni-Hernien und Defekte im Centrum tendineum (Torfs et al., 1992; Clugston & Greer, 2007).

1.3 Ätiologie und Pathogenese der CDH

Der zugrunde liegende Fehler der CDH ist eine Störung in der Entwicklung des Zwerchfells während der Embryogenese. Die Ursache dieser Fehlentwicklung ist bis heute nicht eindeutig geklärt (Gosche et al., 2005; Keijzer & Puri, 2010). Vermutlich kommt es bei der Entstehung der CDH zu einem Zusammenwirken von genetischen Veränderungen und Umweltfaktoren.

In 10-20% der Fälle wurden bei der CDH chromosomale Aberrationen identifiziert (Bollmann et al., 1995; Geary et al., 1998). Der kausale Zusammenhang zwischen spezifischen chromosomalen Anomalien und CDH konnte jedoch nicht gefunden werden (Borys & Taxy, 2004). Die festgestellten Anomalien lassen aber das Vorhandensein von spezifischen Genen als mögliche Ursache oder Prädisposition für eine CDH vermuten (Goumy et al., 2010).

Ein wichtiger Umweltfaktor bei der Entstehung der CDH ist die Retinsäure, ein Vitamin-A-Derivat. In einem Tiermodell wurde gezeigt, dass die Retinsäure-

Rezeptor-Signalgebung eine entscheidende Rolle in der Zwerchfellentwicklung spielt und die Hemmung dieser Signalgebung die Entstehung einer CDH bewirkt. Durch die alimentäre Substitution von Retinsäure in derselben Studie konnte die Bildung einer CDH verhindert werden (Clugston et al., 2010). Ein weiterer Hinweis auf den Einfluss der Retinsäure auf die Ätiologie von CDH ist die verminderte Vitamin A-Plasmakonzentration bei Patienten mit CDH (Major et al., 1998).

Verschiedene Hypothesen wurden zur Erklärung der Entstehungsmechanismus einer CDH vorgeschlagen, einschließlich des Fehlverschlusses des Pleuroperitonealkanals, der fehlerhaften Myotubusbildung (Skandalakis et al., 1994) und der pathologischen Muskelinnervation durch den Nervus phrenicus (Iritani, 1984). Die derzeit am meisten anerkannte Hypothese ist jedoch die Fehlbildung der Pleuroperitonealfalte (Allan & Greer, 1997).

Die Grundlage für die letztgenannte Theorie bildete ein Tiermodell, in dem durch eine Nitrofengabe CDH induziert wurde. Anhand von diesem Modell hat man festgestellt, dass die mesenchymale Komponente der Pleuroperitonealfalte defekt ist. Dies verursacht eine gestörte Migration der Muskelzellen und führt somit zu einer Bildung von CDH (Clugston & Greer, 2007). Clugston und andere haben ein postmortales Zwerchfellgewebe von Menschen mit CDH untersucht und haben festgestellt, dass das dem Defekt umliegende Gewebe signifikant dicker im Vergleich zur gesunden Kontrollseite ist. Dies führten die Untersucher auf eine Ansammlung der Muskelzellen um die defekte Pleuroperitonealfalte und anschließende Proliferation und Differenzierung zurück (Clugston et al., 2006).

1.4 Mortalitätsrate

Die CDH bei Neugeborenen war am Anfang des 20. Jahrhunderts generell betrachtet eine fatale Erkrankung. Der Bericht von Ladd und Gross (1940), in dem eine erfolgreiche chirurgische Korrektur der CDH demonstriert wurde, war ein Meilenstein im chirurgischen Management der CDH. Ladd und Gross postulierten, dass eine Politik des Wartens, bis das Neugeborene groß genug ist, schlechte Auswirkungen hat. Sie schlugen Sofortoperation vor, mit der Begründung, dass die Reduktion des Hernieninhaltes durch Dekompression der Lunge

auf der betroffenen Seite zur Verbesserung der Respiration führt. Dies hatte zur Folge, dass bis in die 1990er Jahre CDH als ein akuter chirurgischer Notfall galt. Mittlerweile ist bekannt, dass pulmonale Hypoplasie zusammen mit persistierender pulmonaler Hypertension eine Hauptrolle in der Pathophysiologie der CDH spielt. Allerdings wurde beobachtet, dass nach der Operation die Compliance des respiratorischen Systems abnimmt (Sakai et al., 1987), was zu einer Veränderung der Behandlungsstrategie der CDH führte. Dabei wurde der Zeitpunkt der chirurgischen Intervention aufgeschoben, bis der Patient eine hämodynamische Stabilität erreicht hat (Moyer et al., 2002). Andere wichtige therapeutische Veränderungen waren die Vermeidung von Barotrauma durch die Einführung von lungenprotektiver Beatmung und die selektive Nutzung von extrakorporaler Membranoxygenierung (Logan et al., 2007).

Durch diese und weitere Fortschritte in der neonatologischen Intensivversorgung ist die Mortalitätsrate von mehr als 50% in den 1970er Jahren auf 10 bis 30% in aktuellen Studien gesunken (Lally et al., 2007; Logan et al., 2007). Dennoch kann die tatsächliche Mortalität immer noch sehr hoch sein, wenn pränatale Sterblichkeit und nicht berichtete Sterbefälle außerhalb der Häuser der Maximalversorgung berücksichtigt werden (Steger et al., 2003; Mah et al., 2011). Die Überlebensrate hängt außerdem von dem Ausmaß der begleitenden Lungenhypoplasie (Bohn et al., 1987), Leberposition (Hedrick et al., 2007), Größe des Zwerchfelldefektes und assoziierten Anomalien ab (Lally et al., 2006; Lally et al., 2007).

Der Zwerchfelldefekt muss chirurgisch rekonstruiert werden. Kleine Hernien kann man mit einer Primärnaht verschließen. Zur Deckung größerer Zwerchfelldefekte ist eine einfache Naht nicht ausreichend. In diesem Fall kann der Defekt mit Hilfe eines Biomaterials geschlossen werden. Die operative Versorgung muss so schnell wie möglich erfolgen, um das kompromittierte Kind nicht zusätzlich durch aufwendige Rekonstruktionen zu gefährden. Deswegen soll der Defekt mit leicht implantierbaren Biomaterialien geschlossen werden.

1.5 Biomaterialien

Seitdem Usher im Jahre 1958 erfolgreich die erste Narbenhernie mittels eines Kunststoffnetzes operiert hat (Usher et al., 1958), ist die Entwicklung textiler

Netzstrukturen weit vorangeschritten, sodass eine Vielzahl von verschiedenen synthetischen Netzen zur Hernienreparation zur Verfügung steht (Klinge et al., 2010). So kommen auch in der CDH-Chirurgie verschiedene Mesh-Materialien zum Einsatz (Clark et al., 1998).

Biomaterialien können synthetisch oder biologisch hergestellt werden. Grundsätzlich unterscheidet man bei synthetischen Materialien zwischen resorbierbaren, teilresorbierbaren und nicht resorbierbaren Materialien bzw. schwergewichtigen und leichtgewichtigen Netzen mit mono- oder polyfaser Struktur. Bei biologischen Materialien unterscheidet man zwischen natürlich vorkommenden (z.B. Perikard vom Rind) und azellulären Materialien (z.B. Surgisis®, Permacol® und andere).

In Bezug auf Adhäsionsbildung (Gonzalez et al., 2011) und Reherniationsrate (Gupta et al., 2006) zeigen biologische Materialien keine Vorteile im Vergleich zu synthetischen Kunststoffnetzen. Rauth et al. haben zwei biologische Netze (SiS Gold® und LyoSis®) mit einem nichtresorbierbarem Kunststoffnetz (expandiertes Polytetrafluorethylen) bei einem intraperitonealem Einsatz bei Schweinen verglichen. Biologische Netze zeigten zwar eine bessere Gewebsintegration und Neovaskularisierung, im Gegensatz zum Kunststoffnetz haben diese aber eine deutlich stärkere Schrumpfung (Rauth et al., 2007).

Eine der wichtigsten Eigenschaften, die ein Mesh beim Einsatz am Zwerchfell erfüllen sollte, ist seine Belastbarkeit durch ständige Zwerchfellbewegungen bei der In- und Expiration. Weitere Anforderungen sind eine ausreichende Reißfestigkeit, Elastizität und Luftdichtigkeit. Die Porengröße und Gewicht eines Meshes spielen bei der Gewebsintegration eine entscheidende Rolle. Dabei weisen leichtgewichtige, großporige Kunststoffnetze eine verminderte Entzündungsreaktion und Fibrose auf, was für die Erhaltung der Elastizität des Netzes von Bedeutung ist und ein Bridging verhindern kann (Klinge et al., 2002a; Klinge et al., 2002b). Böhm et al. haben verschiedene auf dem Markt etablierte Netze (Ultrapro®, Proceed® und Surgisis®) in Bezug auf Elastizität und Reißfestigkeit untersucht. Dabei zeigten beide synthetischen Netze (Ultrapor® und Proceed®) im Vergleich zum biologischen Netz (Surgisis®) deutlich bessere mechanische Eigenschaften in Bezug auf Zugfestigkeit und Federkonstante.

Diese Unterschiede hatten aber keine Auswirkung auf geometrische oder dynamische Eigenschaften des Zwerchfells (Böhm et al., 2010a).

Die Reaktion des Organismus auf ein Biomaterial beinhaltet Verletzung, Blut/Material-Interaktion, initiale Matrixformation, akute Entzündungsreaktion, chronische Entzündungsreaktion, Entwicklung der Granulationsgewebe, Fremdkörper- und Fibrosereaktion (Anderson JM, 2001; Anderson et al., 2008). Das Ausmaß der Fibrosereaktion korreliert mit der zellulären Entzündungsreaktion (Klinge et al., 2002a; Klinge et al., 2002b). Es kommt zu einer Aktivierung und Rekrutierung von Entzündungszellen zur Implantationsstelle. Dabei sind Makrophagen der dominante Zelltyp (Rosch et al., 2003). Ab dem dritten postinterventionellen Tag kommt es zur Einsprossung von neuen Blutgefäßen, der sog. Angiogenese. Letztendlich bildet sich das Granulationsgewebe aus, das das implantierte Biomaterial in das umliegende Gewebe inkorporiert (Laschke et al., 2005). Abhängig von der Mesh-Struktur, -Porosität, -Oberflächenmodifikation und dem Mesh-Gewicht gibt es signifikante Unterschiede im Ausmaß der Entzündungsreaktion, der Fibrose, der Adhäsionsbildung und der Angiogenese (Klosterhalfen et al., 1998; Klinge et al., 1999; Bellon et al., 2007; Bellon et al., 2008; Laschke et al., 2009; Schreinemacher et al., 2009).

Bei der Implantation von alloplastischen Netzmaterialien wurden verschiedene Komplikationen wie Infektion, chronischer Schmerz, Bildung von Serom und Adhäsionen beschrieben. In Abhängigkeit von verwendeten Mesh-Materialien werden spezifische Komplikationen häufiger oder seltener beobachtet (Robinson et al., 2005).

Die Rezidivrate für eine CDH Reparatur mit Netzen ist mit teilweise bis zu 50% innerhalb der ersten drei Jahre nach Netzimplantation weiterhin sehr hoch (Hajer et al., 1998; Moss et al., 2001; Loff et al., 2005; Grethel et al., 2006).

1.6 Adhäsionen

Peritoneale Adhäsionen entstehen meistens durch Verletzung, Entzündung und Ischämie des Bauchfells sowie Reaktionen des Peritoneums auf Fremdkörper (Treutner & Schumpelick, 2000). Sie treten in 93% von Patienten nach Laparatomie auf (Menzies & Ellis, 1990). Adhäsionen können zu verschiedenen

Komplikationen führen wie zum Beispiel Dünn- oder Dickdarmobstruktion, adhäsionsbedingte Organperforation, starke Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und führen somit zu gehäuften Krankhausaufnahmen (Ellis et al., 1999).

Im Jahre 1997 hat Bendavid den pathophysiologischen Mechanismus der Adhäsionsbildung in Gegenwart von synthetischen Biomaterialien zusammengefasst. Er ist zu dem Schluss gekommen, dass Adhäsionen in Folge von Fibrinexsudation nach einem Trauma entstehen. Diese Fibrinexsudationen bilden temporäre Adhäsionen, die durch fibrinolytische Aktivität absorbiert werden. Durch Entzündung, Ischämie oder Fremdkörper wird diese Absorption gehemmt, wodurch Fibroblasten, Makrophagen und neuen Gefäßen ermöglicht wird in die temporären Adhäsionen einzudringen und permanente Adhäsionen auszubilden (Bendavid, 1997).

Auch aktuelle Studien zeigen, dass der intraperitoneale Einsatz von synthetischen Netzen mit Adhäsionsbildung verbunden ist (Halm et al., 2007; Bellon et al., 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es durch den direkten Kontakt von Bauchorganen mit dem Netz zur Bildung von Adhäsionen mit anschließenden Obstruktionen sowie durch mechanische Reibung von Organen am Netz oder durch Entzündungsreaktionen zur sekundären Fistelbildung kommen kann (Leber et al., 1998).

Deshalb ist die Reduktion von Adhäsionen von großer klinischer Bedeutung. In einem Tierversuchsmodell wurde durch den intraperitonealen Einsatz von großporigen leichtgewichtigen Netzen eine verminderte Adhäsionsbildung im Vergleich zu kleinporigen schwergewichtigen Netzen beobachtet (Conze et al., 2004; Bellon et al., 2008). Auch teilresorbierbare Netze im Gegensatz zu nicht resorbierbaren Netzen zeigten eine verminderte Adhäsionsbildung (Bellon et al., 2008). In den letzten Jahren wurden neue Mesh-Komposite entwickelt, die durch Auflage bzw. Beschichtung von nichtresorbierbaren Netzen mit biodegradierbaren Materialien, wie Kollagen, Polyglactin, Zellulose und andere, eine Reduktion der Adhäsionsbildung erreichen möchten. Aktuelle Studien zeigen, dass die Adhäsionsbildung trotz der Einlage von resorbierbarem Polyglactin zwischen Polypropylen-Netz und Viszeralorganen nicht minimiert werden kann (de Vries Reilingh et al., 2007).

1.7 Sternkonfiguriertes NCO-sP(EO-*stat*-PO)

Polyethylenglykol (PEG) ist längst für seine Biokompatibilität bekannt und fand breite Anwendung als ein Beschichtungsmaterial. Es ist nicht toxisch, nicht immunogen und besitzt eine Resistenz gegen nicht spezifische Proteinabsorption (Harris & Zalipsky, 1997).

Die Substanz, mit der in dieser Studie die Netze modifiziert wurden, ist ein sechsarmiges sternkonfiguriertes PEG Molekül (Abb. 1.4, Abb. 1.5). Seine Basisstruktur besteht aus Poly(Ethylenoxid-*stat*-Propylenoxid) mit einer reaktiven Isocyanatgruppe (NCO-) an jedem Arm des sternförmigen Moleküls (NCO-sP(EO-*stat*-PO)) mit einem 80% Anteil von Ethylenoxid und einem Molekulargewicht von 12kDa. Neben den gleichen positiven antiadhäsiven Eigenschaften wie linear konfiguriertes PEG besitzt NCO-sP(EO-*stat*-PO) zusätzlich den Vorteil miteinander vernetzen zu können und somit die Oberflächendichte zu erhöhen (Heyes et al., 2007). Die Isocyanatgruppe an dem Molekülarmende ermöglicht außerdem eine weitere Ankopplung von Wirkstoffen (Groll et al., 2005b; Groll et al., 2005c; Grafahrend et al., 2011). Diese zusätzliche Wirkstoffanbindung kann dann zu einer Beeinflussung der Fremdkörperreaktion eingesetzt werden.

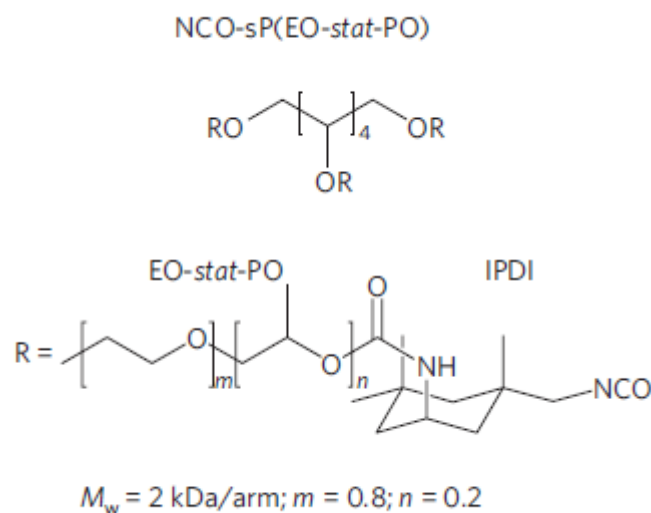
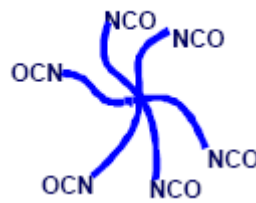


Abb. 1.4: Chemische Struktur des NCO-sP(EO-*stat*-PO) (Quelle: Grafahrend et al., 2011)

Abb. 1.5: Schematische Darstellung des NCO-sP(EO-*stat*-PO)

1.8 Biomaterialien bei CDH

Die chirurgische Rekonstruktion der CDH erfolgt traditionellerweise durch eine offene Thorako- oder Laparotomie (Clark et al., 1998). Im Zeitalter der minimal-invasiven Chirurgie wird diese in manchen Kliniken mittels Thorako- bzw. Laparoskopie durchgeführt (Tsao et al., 2011). Nach dem Zurückziehen der vorgefallenen Organe wird der Zwerchfelldefekt erfasst. Im Idealfall kann der Defekt primär mit einer nicht resorbierbaren, fortlaufenden Naht geschlossen werden. Im Falle eines großen Defektes oder einer Diaphragmaagenesie kann der Verschluss nur mit Hilfe eines Biomaterials geschlossen werden. Der Verschluss mit einem Biomaterial ist wichtig, um eine spannungsfreie Rekonstruktion zu erreichen (de Buys Roessingh & nh-Xuan, 2009). Die CDH Study Group berichtete, dass das Kunststoffnetz in 51% von 461 Patienten mit CDH zwischen 1995 und 1996 eingesetzt wurde (Clark et al., 1998). In der Studie von Moss et al haben 41% von 109 Patienten zwischen 1989 und 1996 ein synthetisches Material zur Defektdeckung bekommen. Auch heutzutage werden Netze in 31-53% zur Rekonstruktion des Zwerchfelldefektes verwendet (Laituri et al., 2010; Brindle et al., 2011; Tsai et al., 2012). Häufig kommen nicht resorbierbare Kunststoffnetze wie ein expandiertes Polytetrafluorethylen (GORE-TEX®) oder biologische Netze wie ein Dünndarmsubmucosa vom Schwein (Surgisis®) zum Einsatz (Clark et al., 1998; Loff et al., 2005; Rygl et al., 2007; Kunisaki et al., 2008; Jancelewicz et al., 2010; Laituri et al., 2010; Tsai et al., 2012; Romao et al., 2012). In der letzten Zeit werden auch andere biologische Netze immer häufiger eingesetzt (Mitchell et al., 2008). Viel seltener kommen andere Materialien wie Polypropylen (Marlex®) oder Polyethylenterephthalat (Dacron®) zum Einsatz (Clark et al., 1998; Loff et al., 2005). Die Verwendung von autologem Gewebe wie Muskellappen wurde ebenfalls beschrieben (Simpson & Gossage, 1971; Samarakkody et al., 2001; Sydorak et al., 2003). Allerdings ist dieses

Verfahren zeitlich sehr aufwendig und zeigt gegenüber synthetischen Biomaterialien keine Vorteile im kurz- sowie langfristigen Verlauf (Nasr et al., 2010).

Trotz intensiver Materialforschung und einer Vielfalt an verfügbaren Biomaterialien, existiert immer noch kein optimales Mesh-Material. Die Langzeitverlaufsuntersuchungen haben gezeigt, dass innerhalb von drei Jahren bei bis zu 40% der Patienten Rezidivhernien auftreten. Dünndarmobstruktionen infolge von Adhäsionen sind weitere häufige Komplikationen nach einer Biomaterialimplantation (Moss et al., 2001; St Peter et al., 2007). Das Auftreten von Thoraxdeformitäten und Skoliose nach Netzimplantation ist ebenfalls beschrieben (Jancelewicz et al., 2010). Die Netzimplantation an sich scheint aber nicht der kausale Faktor der Entwicklung von Skelettdeformitäten zu sein, es ist eher die Folge eines großen Zwerchfelldefektes (Kuklova et al., 2011). Auch der Einsatz von biologischen Mesh-Materialien wie z.B. Surgisis® konnte keine deutliche Verbesserung bezüglich Rezidivrate und Inzidenz von Dünndarmobstruktionen nach der Operation zeigen (Grethel et al., 2006; St Peter et al., 2007; Jancelewicz et al., 2010). Surgisis® ist ein resorbierbares Netz, das zeitig abgebaut wird. Somit hat es keine strukturelle Stabilität, um die Bildung von Rezidivhernien zu verhindern.

Somit besteht weiterhin der Bedarf an funktionell verbesserten Netzen. Das Netz soll vor allem die Anforderungen der Luftdichtigkeit für die CDH und der leichten Handhabung erfüllen. Zugleich muss es elastischer als z.B. Polytetrafluorethylen sein, um eine freie Beweglichkeit des Zwerchfells zu ermöglichen, sowie antiadhäsiver als z.B. Surgisis®, um mögliche Dünndarmobstruktionen zu verhindern.

2 Zielsetzung

Zur Behandlung der CDH werden seit Jahrzehnten verschiedene Kunststoffnetze erfolgreich eingesetzt. Dadurch und durch die verbesserte intensivmedizinische Betreuung konnte vor allem die Rezidivrate deutlich gesenkt werden. Nichtsdestotrotz können netz- und materialspezifische Komplikationen auftreten. Diese deuten darauf hin, dass es trotz einer Vielfalt an verfügbaren Biomaterialien immer noch kein optimales Kunststoffnetz zur Behandlung der CDH gibt. Das Netz soll leicht in der Handhabung sein und eine uneingeschränkte Zwerchfellbeweglichkeit ermöglichen, gleichzeitig aber formstabil sein.

In vorangegangenen Studien (Böhm et al., 2010a; Böhm et al., 2010b) wurden die mechanischen Eigenschaften und Biokompatibilität von Proceed®, Surgisis® und Ultrapro® *in vivo* beim Einsatz am Zwerchfell untersucht. Anhand von diesen Ergebnissen wurde Ultrapro® als Basisnetz für eine weitere Oberflächenmodifikation ausgesucht. Ultrapro® zeigte eine gute Biokompatibilität bei gleichzeitig besseren mechanischen Eigenschaften. Da Ultrapro® aus dem resorbierbaren Monocryl® und dem nicht resorbierbaren Prolene® besteht, wurde der resorbierbare Anteil entfernt und das sogenannte Prolenenacktnetz als zweites Basisnetz für die Oberflächenmodifikation verwendet. Damit sollte eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch den resorbierbaren Anteil von Ultrapro® ausgeschlossen werden und gleichzeitig die Menge an Fremdmaterial reduziert werden.

Es erfolgte eine Oberflächenmodifikation der beiden Basisnetze. Die neuentwickelte Oberflächenbeschichtung sollte für den Einsatz am Zwerchfell luftdicht sein sowie eine weitere Wirkstoffankopplung ermöglichen, um in weiteren Studien eine verbesserte Defektheilung bzw. Gewebeintegration zu zeigen.

Das Ziel dieser Studie war es zunächst die Biokompatibilität der neuen Oberflächenbeschichtung *in vivo* zu untersuchen. Zusätzlich sollte eine mögliche Auswirkung der Oberflächenbeschichtung auf eine Defektheilung und Adhäsionsbildung untersucht werden. Desweiteren sollten beide oberflächenmodifizierte Basisnetze miteinander verglichen werden. In wieweit eine mögliche Einschränkung der Zwerchfellbeweglichkeit besteht, sollte mittels radiologischer Methoden untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Die Analyse der Biokompatibilität modifizierter Netze erfolgte durch eine Untersuchung der *in vivo* Reaktion in Kaninchen. Die Untersuchung wurde im Tierversuchsmodell durch Implantation verschiedener Kunststoffnetze am Zwerchfell durchgeführt.

In vitro Untersuchungen der modifizierten Netze erfolgten am Deutschen Wollforschungsinstitut (DWI) an der RWTH-Aachen e.v. (Grafahrend et al., 2011)

Die radiologische, histologische und immunhistochemische Auswertung erfolgte 16 Wochen nach der Implantation.

3.2 Verwendete Mesh-Materialien

In beiden Versuchsgruppen wurden zwei Netztypen als Basisnetz eingesetzt: Ultrapro® (UP) und Polypropylen (PP). In der zweiten Versuchsgruppe diente Ultrapro® zusätzlich als Kontrollnetz.

Das UP-Netz (Ethicon, Tochterfirma von Johnson & Johnson Company, Germany) ist ein teilresorbierbares, leichtgewichtiges (28 g/m² - verbleibendes nicht resorbierbares Polypropylen) und monofiles Netz, das zu etwa gleichen Teilen zusammengesetzt ist aus:

- Prolene® - nicht resorbierbares PP (Abb. 3.1)
- Monocryl® - resorbierbares Poliglecapon (Resorption innerhalb von 90-120 Tagen). Dieser besteht aus dem Kopolymer aus Glycolid und E-Caprolacton im Verhältnis 3:1 (Schumpelick et al., 2011)

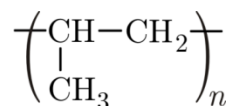


Abb. 3.1: Polypropylen

Das PP-Netz (Ethicon, Tochterfirma von Johnson & Johnson Company, Germany) ist ein nichtresorbierbares, leichtgewichtiges (28 g/m²) und monofiles Netz, das aus Prolene® (nicht resorbierbares PP) besteht. Dieses PP-Netz

wurde aus dem UP-Netz hergestellt, wobei der Poliglecapon-Anteil ausgewaschen wurde.

3.3 Beschichtung der Netze mit NCO-Poly(EO-*stat*-PO)

UP- und PP-Netze wurden zuerst mittels eines Ammoniak-Plasmas (NH_3 -Plasma) oberflächenaktiviert (Abb. 3.2a), wobei der Prozessgasfluss 30 sccm Ammoniakgas bei einem Gasdruck von 0,4 mbar betrug. Die Behandlung dauerte 120 s bei einer Leistung von 300 W (Salber et al., 2007).

Im Anschluss wurden diese Netze mit Isocyanat-funktionalisiertem (NCO) sechssarmigem sternförmigem Poly(EO-*stat*-PO) ($M_n = 12$ kDa) beschichtet (Abb. 3.2a). Vor der Beschichtung wurden 50 mg NCO-Poly(EO-*stat*-PO) unter Inertgasatmosphäre in 0,5 ml Tetrahydrofuran (THF) (absolut wasserfrei; Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland) gelöst und dann mit deionisiertem Wasser im Verhältnis 1:9 (THF/Wasser) gemischt. Durch diese Beschichtung entsteht eine kovalente Bindung zwischen den NH_2 -Resten des mit NH_3 -Plasma aktivierten Netzes und den Isocyanat-Resten der sternförmigen Moleküle. Da das umgebende Wasser eine Vernetzung zwischen sternförmigen Molekülen auslöst, führt es zu einem ganz dichten Netzwerk, das die Netzfilamente umgibt und weitere Zelladhäsionen und Proteinabsorption verhindert (Abb. 3.2b)

In einem zweiten Schritt wurden die Netze mit einer Mischung aus resorbierbarem Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) (PLGA) (Abb. 3.3) und NCO-sP(EO-*stat*-PO) in Aceton elektrobesponnen, das sog. „Nanoweb“ (PLGA/NCO-sP(EO-*stat*-PO)), das sich auf der Netzoberfläche ablegte (Abb. 3.2c). Diese Bespinnung sorgte für die Luftdichtigkeit und sollte die Anheftung weiterer bioaktiver Moleküle ermöglichen.

Zur weiteren Abdichtung wurden die Netze zusätzlich noch mit einem NCO-sP(EO-*stat*-PO)-Hydrogel bedeckt (Abb. 3.2d).

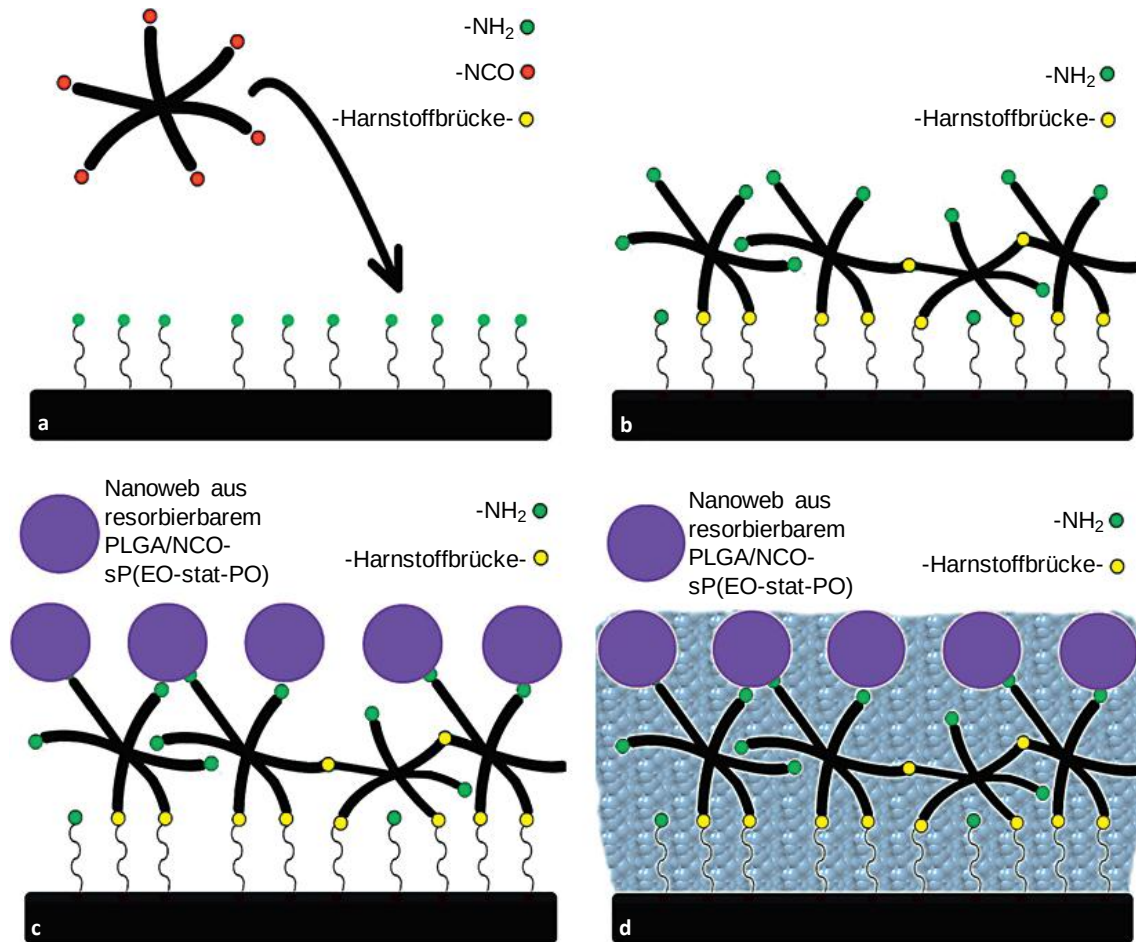


Abb. 3.2: Eine mit Ammoniak-Plasma aktivierte Meshfibrille wird mit NCO-sP(EO-stat-PO) inkubiert (a). Dabei entsteht eine 10 nm dicke antiadhäsive Schicht (b), die weiterhin mit Nanoweb aus PLGA/NCO-sP(EO-stat-PO) elektrobessponnen wird (c). Beschichtung mit NCO-sP(EO-stat-PO)-Hydrogel zu weiterer Luftdichtigkeit (d).

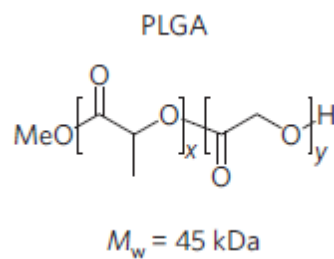


Abb. 3.3: PLGA

Zur Sterilisation wurden die modifizierten Netze doppelt verpackt und anschließend mit γ -Strahlen (25 kGy) sterilisiert.

Abb. 3.4 veranschaulicht die Morphologie des modifizierten UP-Netzes (mUP) mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopie.

Unmittelbar eine Stunde vor der Implantation wurden die Netze in sterile 0,9% NaCl Lösung eingelegt, damit das Hydrogel mit Wasser angereichert werden konnte (Abb. 3.5).

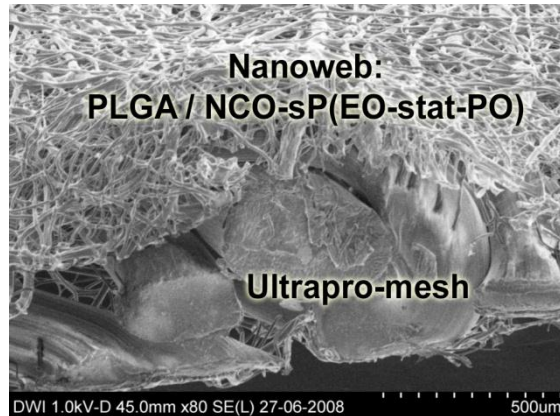


Abb. 3.4: Rasterelektronenmikroskopie des elektrobesponnenen mUP-Netzes

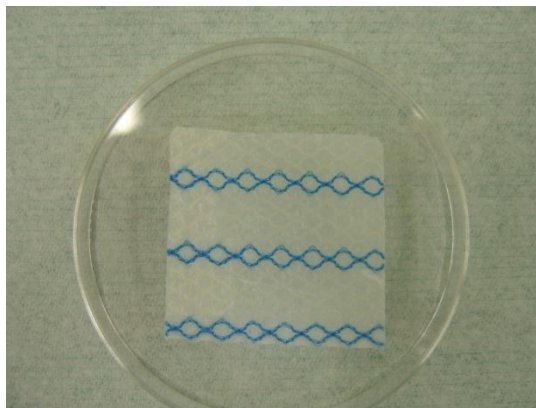


Abb. 3.5: In NaCl Lösung eingelegtes modifiziertes Netz bereit für die Implantation

3.4 Tiermodell

Der Versuch ist aus zwei Teilen aufgebaut: Versuch I und Versuch II.

3.4.1 Versuch I

Bei 18 weiblichen Chinchilla Bastard Kaninchen im Alter von 40 bis 60 Tagen und Gewicht von $1,54 \pm 0,07$ kg wurden mUP-Netze (n=8) und modifizierte PP-Netze (mPP) (n=10) am Zwerchfell inseriert. Die Tiere wurden bei konstanter Temperatur und Tageslicht gehalten und erhielten eine Diät bestehend aus Kaninchenfutter und Wasser während des gesamten Studienverlaufs.

Vor der Operation wurde das Gewicht gemessen. Nach der Einleitung einer Narkose erfolgte die erste radiographische Aufnahme der Zwerchfellbeweglichkeit.

Die Anästhesie erfolgte intramuskulär mit einer Lösung aus 2% Xylazinhydrochlorid, 10% Ketamin und 0,9% NaCl im Verhältnis 1:1:1. Nach der Einleitung der Narkose wurden die Tiere mit Tubus ohne Cuff (Größe 4) intubiert. Während der Operation wurde die Narkose über eine Vene des Ohres fortgesetzt. Außerdem erhielt jedes Tier bei der Einleitung der Narkose eine intramuskuläre Single-shot-Antibiotikaphylaxe mit Enrofloxacin (0,6 ml 2,5% subcutan).

Nach Rasur der gesamten Bauchhaut und einer gründlichen Desinfektion erfolgte eine sterile Abdeckung des Operationsfeldes. Durch Medianlaparotomie wurde unter Sicht die Bauchhöhle eröffnet. Dann wurden die Aufhängungen der Leber zum linken und mittleren Zwerchfell durchtrennt, damit der linke Leberlappen bei der Implantation des Netzes nach rechts retrahiert werden konnte. Dann wurde ein 1cm großer Defekt auf der linken Seite des Zwerchfells im muskulären Anteil gesetzt und dieser mit einem 3x3 cm Netz bedeckt. Alle Netze wurden mit Prolene 5/0 fortlaufend am Rand zum Zwerchfell angenäht (Abb. 3.6). Der durch operatives Verfahren erzeugte linksseitige Pneumothorax wurde direkt vor dem Verschluss der Bauchwand mithilfe einer transdiaphragmalen oder einer transthorakalen Braunüle (Vasofix® Safety, G18, Fa. B. Braun, Deutschland) abgesaugt. Diese Plastikkanüle verblieb dann bis die postoperative Röntgenkontrolle die komplette Evakuierung des Pneumothorax bestätigte. Die Bauchfaszie wurde fortlaufend mit Vicryl 2/0 verschlossen. Die Haut wurde mit fortlaufendem Prolene 4/0 vernäht. Die Tiere erhielten prophylaktisch eine Depotinjektion von Enrofloxacin (0,6 ml 2,5% subcutan). Dann erfolgte der Sprühwundverband mit SanDitan® Aluminium-Spray (Fa. Veyx-Pharma GmbH, Deutschland).

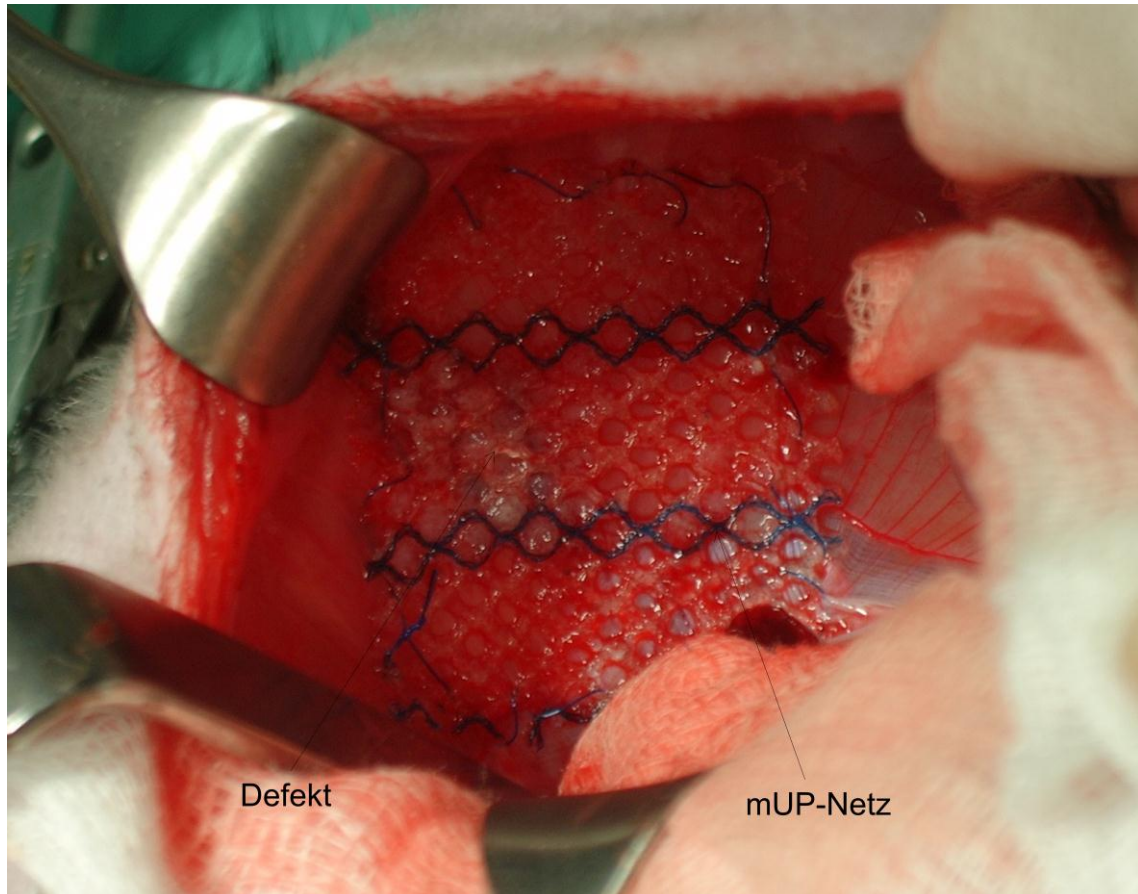


Abb. 3.6: mUP-Netz in situ direkt nach der Implantation. Sicht von abdominalen Seite

Nach acht Wochen erfolgte die Halbzeit-Untersuchung mit der Gewichtsmessung sowie einer in Narkose durchgeführten radiologischen Messung (Kapitel 3.8).

Nach 16 Wochen wurde erneut das Gewicht der Tiere gemessen und die dritte radiologische Aufnahme unter Sedierung (Kapitel 3.8) durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere mit einer Überdosis von 1 ml Phenobarbital in die Ohrvene euthanasiert. Nach einer Medianlaparatomie wurden die Netze zusammen mit dem Zwerchfell explantiert.

3.4.2 Versuch II

Für den zweiten Versuchsteil wurden 18 weibliche Chinchilla Bastard Kaninchen im Alter 40 bis 60 Tage verwendet. Das mittlere Gewicht betrug $1,67 \pm 0,1$ kg. Die Tiere wurden auf dieselbe Weise, wie oben beschrieben, gehalten.

Die Kaninchen wurden in drei Gruppen randomisiert mit $n=6$ je Gruppe: mUP-Netze, mPP-Netze und UP als Kontrollnetz.

Vor der Operation wurde das Gewicht gemessen.

In diesem Versuchsteil wurde keine radiologische Untersuchung der Tiere durchgeführt.

Anästhesie wurde entsprechend dem ersten Versuchsteil durchgeführt. Die Operation war bis auf die Operationsmethode am Zwerchfell bei Kontrollnetzen (n=6) gleich. Es wurde bei drei Tieren zuerst ein 1 cm großer Defekt auf der linken Seite der Diaphragma gesetzt, dann mit Prolene 3/0 vernäht und anschließend mit dem Netz bedeckt. Bei drei anderen Tieren wurde das Netz direkt auf das Zwerchfell, ohne Defektsetzung, implantiert. Bei Kontrolltieren wurde bewusst auf eine Defektsetzung verzichtet, da man hauptsächlich die Biokompatibilität der Kontrollnetze mit beschichteten Netzen vergleichen wollte.

Nach acht Wochen erfolgte die Halbzeituntersuchung mit der Gewichtsmessung aller Tiere. Anschließend wurden jeweils zwei Tiere aus der modifizierten UP- und PP-Gruppe zwecks Zwischenkontrolle geopfert, Zwerchfellproben entnommen und untersucht.

Nach 16 Wochen wurde nochmals das Gewicht gemessen. Danach erfolgten Euthanasie und Probenentnahme.

3.5 Explantation

3.5.1 Versuch I

Nach Ablauf von vier Monaten wurden die Tiere mittels Gabe von 1 ml Pentobarbital (Narcoren®, Rhone Merieux, Laupheim, Deutschland) in die Ohrvene getötet. Nach der Medianlaparotomie wurde das Ausmaß der Adhäsionsbildung gemessen. Der Berechnung von Adhäsionen lag die Zühlke-Klassifikation zugrunde (Zühlke et al., 1990) (Tab. 3.1). Die Explantation der Netze erfolgte mit- samt der umgebenden Zwerchfelmuskulatur. Die veränderte Defektgröße wurde in dem nativen Präparat von der thorakalen Seite gemessen und mit der Ursprungsgröße von 1 cm verglichen. Anschließend wurde das explantierte Material in einer 4% Formalinlösung bis zur weiteren Verarbeitung fixiert.

Tab. 3.1: Klassifikation der Adhäsionen nach Zühlke (Quelle: Zühlke et al., 1990)

Grad	Beschreibung
I	Hauchdünne Adhäsion: leicht zu trennen mit stumpfer Präparation
II	Festere Adhäsion: stumpfe Präparation möglich, teilweise scharfe Präparation notwendig, beginnende Vaskularisierung
III	Feste Adhäsion: Lyse mit scharfer Präparation; eindeutige Vaskularisierung
IV	Sehr feste Adhäsion: Lyse mit scharfer Präparation; Organe über mehrere Adhäsionen verbunden, Organschädigungen schwer verhinderbar

3.5.2 Versuch II

Zwei Tiere aus der mUP-Gruppe und zwei Tiere aus mPP-Gruppe wurden nach zwei Monaten Implantationszeit getötet. Die Tötung der restlichen Tiere erfolgte vier Monate nach der Implantation. Euthanasie, Beurteilung der Adhäsionsbildung und Messung der Defektgröße wurden entsprechend dem Versuch I durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Messung der Netzgröße. Dafür wurde beim nativen Präparat die Netzlänge, die parallel dem blauen Streifen gemessen wurde, und die Netzbreite, die senkrecht zum blauen Streifen gemessen wurde, mit der Ursprungsgröße des Netzes von 3 x 3 cm verglichen.

Zur Kontrolluntersuchung wurden die Gewebsschnitte des rechten Zwerchfells genommen.

Alle Präparate wurden anschließend in einer 4% Formalinlösung bis zur weiteren Verarbeitung fixiert.

3.6 Histologie

Die histologische Auswertung der Präparate erfolgte unter der Leitung von Prof. Dr. med. Benita Hermanns-Sachweh in der Klinik für Pathologie am Universitätsklinikum Aachen.

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden Präparate in einer 10% Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet, dann in 3 µm dicke Schnitte geschnitten und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Elastika van Gieson (EVG) gefärbt.

In beiden Versuchsteilen wurden auf einem Schnitt immer drei Netzbereiche untersucht: ein Defektbereich, ein Bereich zwischen dem Defekt und dem Netzrand und ein Netzrandbereich (Abb. 3.7).

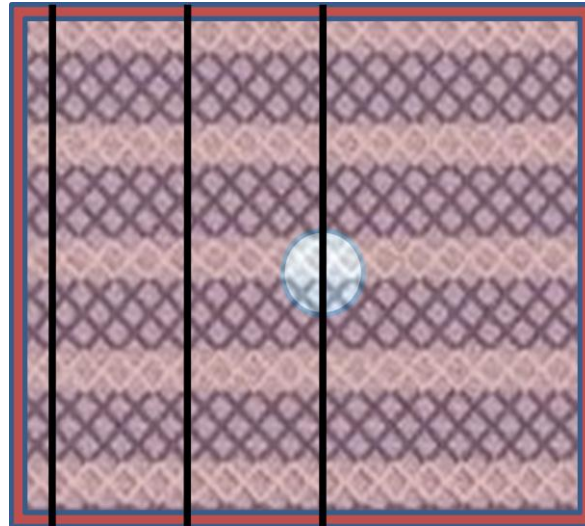


Abb. 3.7: Auswertungsbereiche

Die morphologische Ausmessung erfolgte semiquantitativ. Das Ausmaß jedes Merkmals wurde in vier Grade unterteilt (0=kein; 1=minimal; 2=mittelmäßig; 3=sehr ausgeprägt).

Folgende Eigenschaften wurden semiquantitativ analysiert: Entzündungsreaktion, Bindegewebe, Fremdkörperriesenzellen, Plasmazyten, Lymphozyten, Granulozyten, Fibrose, Verkalkungen, Nekrose.

3.7 Immunhistochemische Aufbereitung

Präparate wurden zunächst in 4% Formalinlösung fixiert, dann entwässert, in Paraffin eingebettet und in ca. 3 µm dicken Schnitten geschnitten. Danach wurden diese bei 37°C im Brutschrank über Nacht entparaffiniert. Anschließend erfolgten die unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungen.

Von jedem Schnitt wurden immer drei Granulome und drei Bereiche zwischen Granulomen mit jeweils fünf vordefinierten „area of interest“ (AOI) von 100 x 100 µm (x400) untersucht. Die digitale Bildaufnahme erfolgte mittels einer Olympus C3030 ZOOM Kamera (Olympus, Hamburg, Deutschland) auf einem Olympus BX51 Lichtmikroskop. Der prozentuale Anteil von positiven Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe von einer digitalen Bildanalyse-

Software (Image Pro Plus – Version 4.1 (Fa. Media Cybernetics; Silver Spring, Maryland, USA)) ermittelt.

Die Immunhistochemische Aufbereitung von Ki-67, CD68 und SMA wurde nach der Avidin-Biotin Methode durchgeführt. Dafür wurden käuflich erworbene Antikörper verwendet. Ein Primärantikörper diente zur Bindung des detektierenden Antigens. Ein Sekundärantikörper wurde zur Markierung des Primärantikörpers eingesetzt. Als Chromogen diente 3,3'-Diaminobenzidin-Lösung (DAB-Lösung). Die Gegenfärbung erfolgte mit einer Hämalaunlösung.

3.7.1 Ki-67

Ki-67 (MIB-5) ist ein monoklonaler Antikörper, der ein 345 und 395 kDa nukleares Antigen pKi-67 identifizieren kann, das nur in den aktiven Phasen des Zellzyklus, also in der G1-, S-, G2- und M-Phase vorhanden ist, nicht aber in ruhenden Zellen, also in der G0-Phase (Gerdes et al., 1984; Gerdes et al., 1991). Somit diente Ki-67 als Proliferationsmarker (Abb. 3.8).

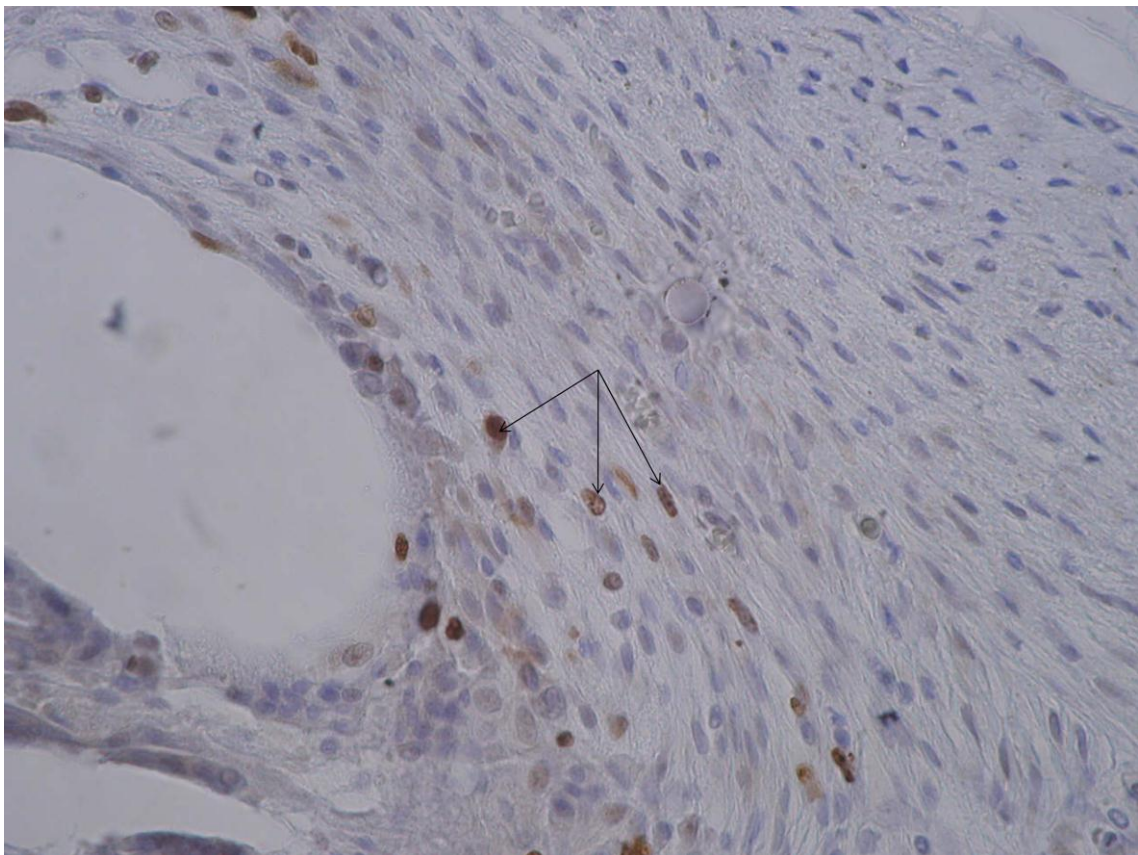


Abb. 3.8: UP-Kontrollnetz. Pfeile zeigen auf Ki-67 positiv gefärbte Zellen (Ki-67-Färbung, x400)

Die vorgefertigten Schnitte wurden zunächst ins Wasser, dann in die PBS-Lösung und anschließend in Citratpuffer pH 6,0 eingelegt und in der Mikrowelle bei 600 W 3 mal 5 Minuten lang aufgewärmt. Anschließend wurden diese auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut mit der PBS-Lösung behandelt. Nach Blockierung mit Ziegen-Serum (1:20 verdünnt in 1% Milchpulver) wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper (MIB-5 monoklonaler Maus-Antikörper; Fa. Dako, Dänemark; 1:10 Verdünnung) bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte auf Raumtemperatur gebracht, dann mit der PBS-Lösung gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus-Antikörper, Fa. Dako, Dänemark; 1:300 Verdünnung) bearbeitet. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte erneut eine Spülung mit PBS-Lösung und Zugabe von Avidin-Biotin-Komplex. Daraufhin wurden die Präparate wiederum 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS-Lösung gespült. Es erfolgte eine Behandlung der Schnitte mit der aktivierten DAB-Lösung für 5 Minuten, deren Reste dann mit Wasser ausgewaschen wurden. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Hämalaunlösung für 15 s behandelt, dann mit Wasser ausgespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit einem Deckglas eingedeckt.

3.7.2 CD68

CD68 ist ein 110-kDa wiegendes Transmembranglykoprotein, das reichlich bei Monozyten und Gewebsmakrophagen exprimiert wird. CD68 ist eine Komponente von zytoplasmatischen Granula und wird nicht in der zytoplasmatischen Matrix gefunden (Saito et al., 1991). Es diente somit als Makrophagenmarker (Abb. 3.9).

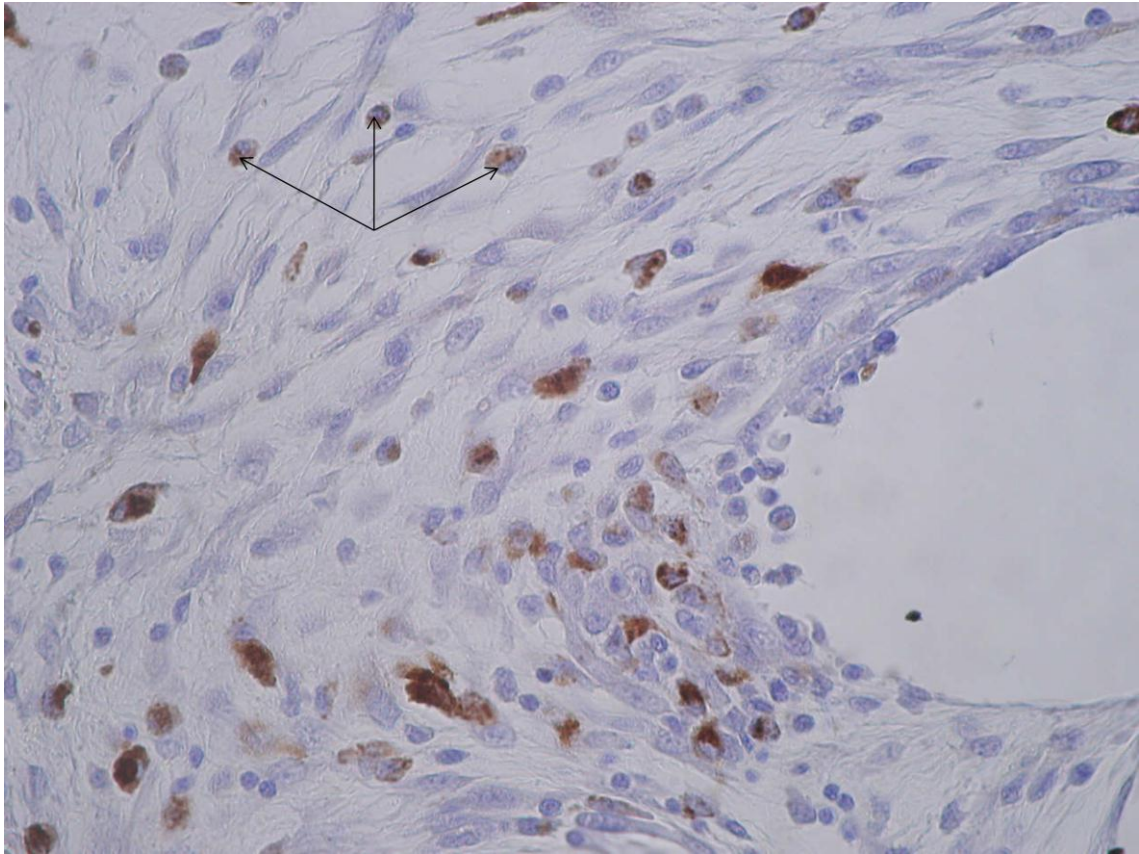


Abb. 3.9: mUP-Netz. Pfeile zeigen auf CD68 positiv gefärbte Zellen. (CD68-Färbung, x400)

Die immunhistochemische Aufbereitung hatte den gleichen Ablauf wie die von Ki-67. Markiert wurde das Antigen mittels eines monoklonalen Maus-Antikörper (Fa. Dako, Dänemark; 1:50 Verdünnung). Als Sekundärantikörper diente Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Fa. Dako, Dänemark; 1:300 Verdünnung).

3.7.3 Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA)

Alpha Actin der glatten Muskelzellen (α -SMA) ist der Hauptbestandteil des kontraktilen Apparates und wird praktisch in allen Glattmuskelzellen exprimiert (Skalli et al., 1987). Dieses Actin wird auch temporär in Myofibroblasten gefunden (Darby et al., 1990a). Myofibroblasten sind die Zellen des Granulationsgewebes, die von Fibroblasten abstammen und kontraktile Eigenschaften aufweisen (Darby et al., 1990b). Somit diente das α -SMA als Marker für Myofibroblasten.

Die immunhistochemische Aufarbeitung für α -SMA wurde entsprechend der Ki-67 durchgeführt. Der Primärantikörper, ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper

(1:300, Abcam, Cambridge, UK), markierte das α -SMA. Als Sekundärantikörper diente ein polyklonaler Schaf-anti-Kaninchen IgG (1:500; Fa. Dako, Dänemark).

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden als positive Zellen nur solche gemessen, die einen blauen Kern und ein deutlich abgrenzbares, gefärbtes Zytoplasma aufwiesen und sich nicht in der topographischen Nähe von Blutgefäßen oder Kapillaren befanden. Solche Zellen wurden als „Myofibroblasten“ bezeichnet. Positiv gefärbte glatte Muskelzellen der Gefäße wurden von der Messung ausgeschlossen (Abb. 3.10).

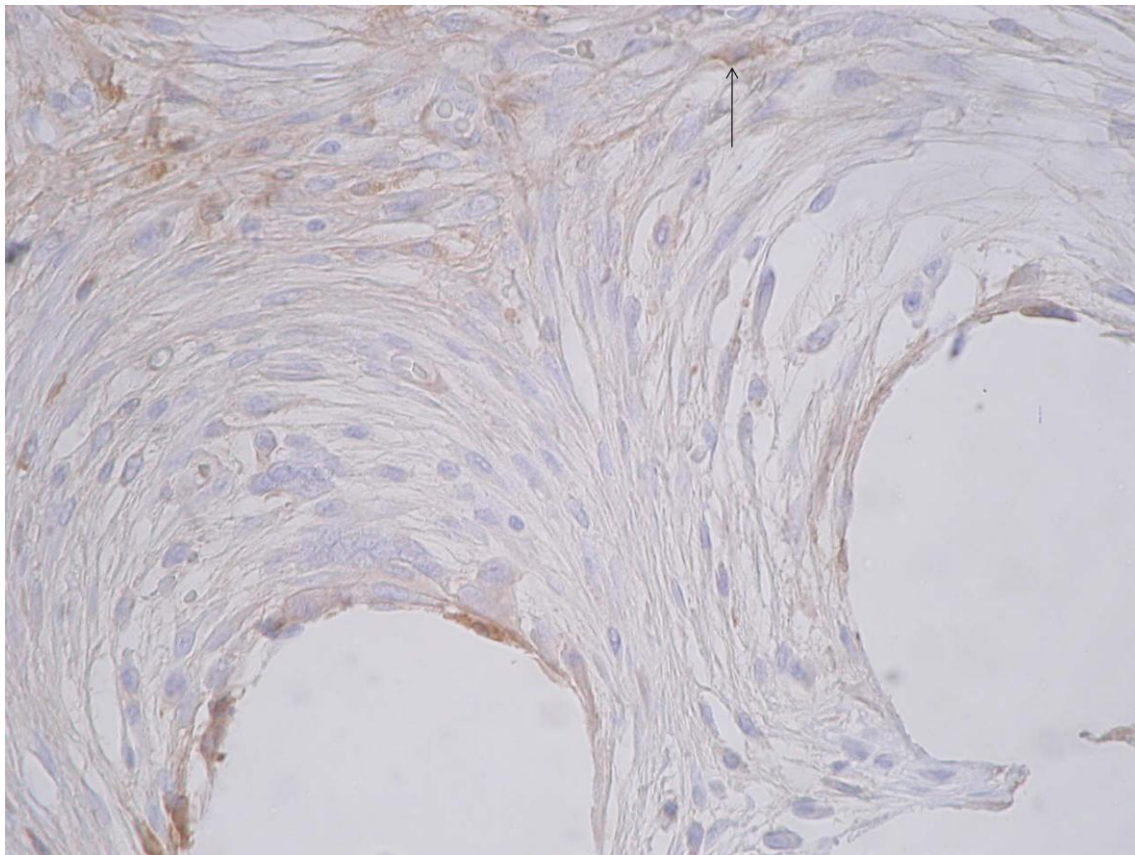


Abb. 3.10: UP-Kontrollnetz. Pfeil zeigt auf SMA positiv gefärbte Zellen (SMA-Färbung, x400)

3.7.4 TUNEL

Der programmierte Zelltod ist ein selektiver Prozess der physiologischen Zellelimination. Morphologisch ist er als Apoptose bekannt (Kerr et al., 1972). Mit der TUNEL Methode (Terminale Desoxyribosyl Transferase –mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling) kann man diesen Prozess mikroskopisch erfassen. Dabei werden die DNA-Strandbrüche durch enzymatische Markierung freier 3'-OH-Terminalen mit modifizierten Nukleotiden identifiziert. Diese neuen DNA-Endungen, die sich während einer DNA-Fragmentierung bilden, werden entwe-

der in morphologisch identifizierbarem Kern oder apoptotischen Körperchen lokalisiert. Im Gegensatz dazu werden die normalen oder proliferativen Kerne nicht mit diesem Kit gefärbt. Mit dieser Methode können sogar die frühen Stadien der Apoptose erfasst werden (Gavrieli et al., 1992).

Die immunhistochemische Untersuchung erfolgte mittels des „Apoptosis Detection Kit“ (ApopTag® Peroxidase Kit, S7100, Intergen, Oxford, UK) (Abb. 3.11).

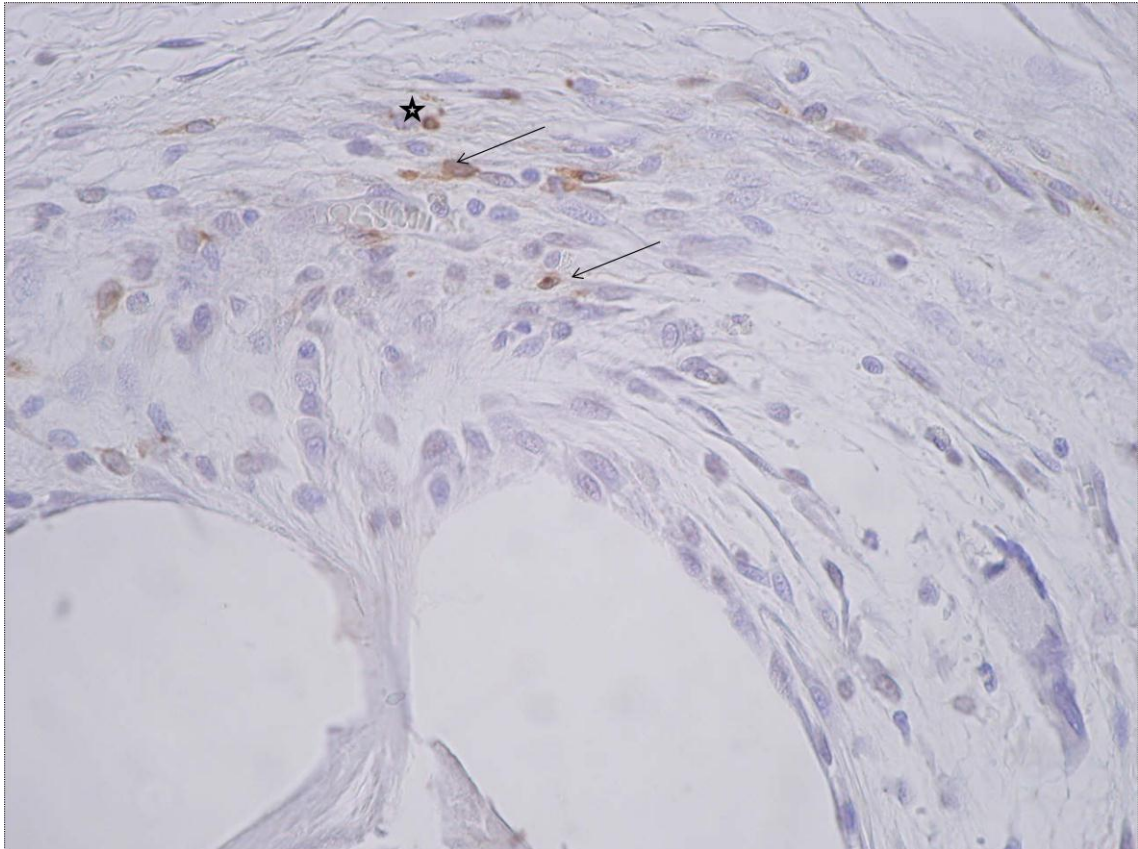


Abb. 3.11: mUP-Netz. Pfeile zeigen auf apoptotische Zellen, Sternchen zeigt auf apoptotische Körperchen (TUNEL-Färbung, x400)

3.7.5 Kollagen I zu Kollagen III Quotient

Die Bestimmung von Kollagen I/III Quotient erfolgte nach der von Junqueira et al. beschriebenen Methode (Junqueira et al., 1978; Junqueira et al., 1979).

Hierzu wurden 5 µm dicke Schnitte nach Entparaffinisierung für eine Stunde in 0,1% Sirius-Red Lösung (Farbstoff Sirius-Red F3BA mit gesättigter Pikrinsäurelösung) bei pH 2 gefärbt. Danach wurden die Schnitte für 2 Minuten in 0,01 N HCl gewaschen, dehydriert, gereinigt und in ein synthetisches Resin angelegt (Junqueira et al., 1979).

Die Quantifizierung von Kollagen I/III Quotient erfolgte mittels Kreuzpolarisationsmikroskopie.

Alle Strukturen, die mit Sirius Red rot gefärbt sind und eine Doppelbrechung haben, entsprechen den Kollagenfasern. (Junqueira et al., 1979). Mittels Polarisationsmikroskopie kann man dabei zwischen Kollagen Typ I und III unterscheiden. Die dicken gelben, orangen oder roten Fasern beziehen sich ausschließlich auf Kollagen Typ I, die dünnen grüngefärbten Fasern auf Kollagen Typ III (Junqueira et al., 1978).

Mit Hilfe der Software „Image Pro Plus“ konnte die digitale Auswertung des Kollagen I/III Quotienten durchgeführt werden. Die Kollagenbestimmung erfolgte in perifilamentären Bereichen der Granulome bei 400x Vergrößerung. Innerhalb einer vordefinierten AOI von 100x100 µm wurden mit Hilfe von zwei Farbklassen Kollagen I und Kollagen III Anteile markiert und quantifiziert (Abb. 3.12).

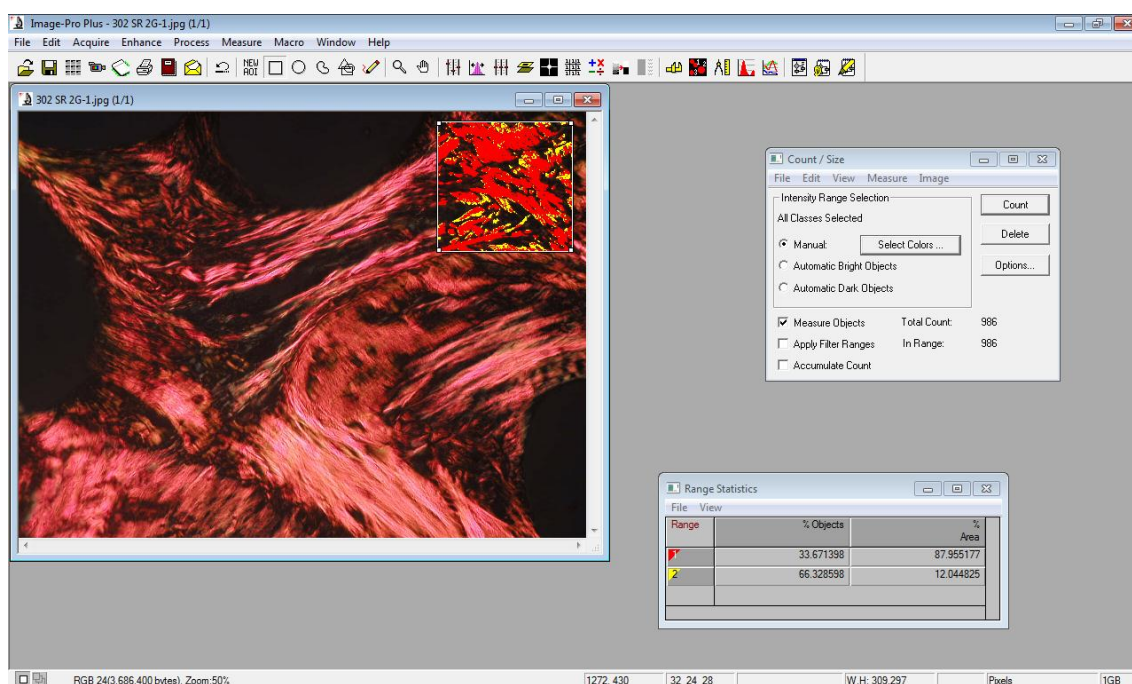


Abb. 3.12: UP-Kontrollnetz. Digitale Auswertung des Kollagen I/III Quotienten mit Hilfe der Software „Image Pro Plus“. Innerhalb AOI von 100x100 µm sind Kollagen I (rot) und Kollagen III (gelb) markiert. (Sirius Red Färbung, x400)

3.8 Radiologische Untersuchung

Die Messung der Zwerchfellbeweglichkeit erfolgte mit Hilfe radiologischer Durchleuchtung. Die radiologische Untersuchung wurde unter Anästhesie an drei Zeitpunkten durchgeführt: unmittelbar vor der Netzimplantation (Aus-

gangswert), zwei und vier Monate nach der Implantation direkt vor der Explantation. Für die Zeit der Durchleuchtung wurden die Tiere von der Beatmungsmaschine getrennt und atmeten spontan. Die Tiere wurden mit dem Rücken auf einem Röntgentisch mit einer integrierten Skala von 1x1 cm fixiert (Abb. 3.13). Für jede Messung wurden die Atemfrequenz sowie der Zwerchfellabstand bei maximaler In- und Expiration ermittelt.

Die aufgenommenen Videos wurden digitalisiert. Die Messung der Zwerchfellbeweglichkeit erfolgte dann mit der Schnappschusstechnik. Es wurde bei jedem Tier fünf Zwerchfellexkursionen (Abstand bei der maximalen In- und Expiration in cm) jeweils für die rechte (Kontrollseite) und die linke Zwerchfellseite (Netzseite) gemessen und daraus anschließend ein Mittelwert gebildet. Zusätzlich wurde die linke mit der rechten Zwerchfellseite verglichen und ein Quotient daraus berechnet. Gleichzeitig erfolgte die Messung der Atemfrequenz. Daraufhin wurde der Mittelwert (cm) der Atemexkursion mit der Atemfrequenz (Hübe/s) multipliziert. Das Ergebnis der standardisierten Zwerchfellbewegung wurde als Normvolumen definiert (V_{norm}).

$$V_{\text{norm}} = \text{Mittelwert der Zwerchfellexkursion (cm)} * \text{Atemfrequenz (1/s)}$$

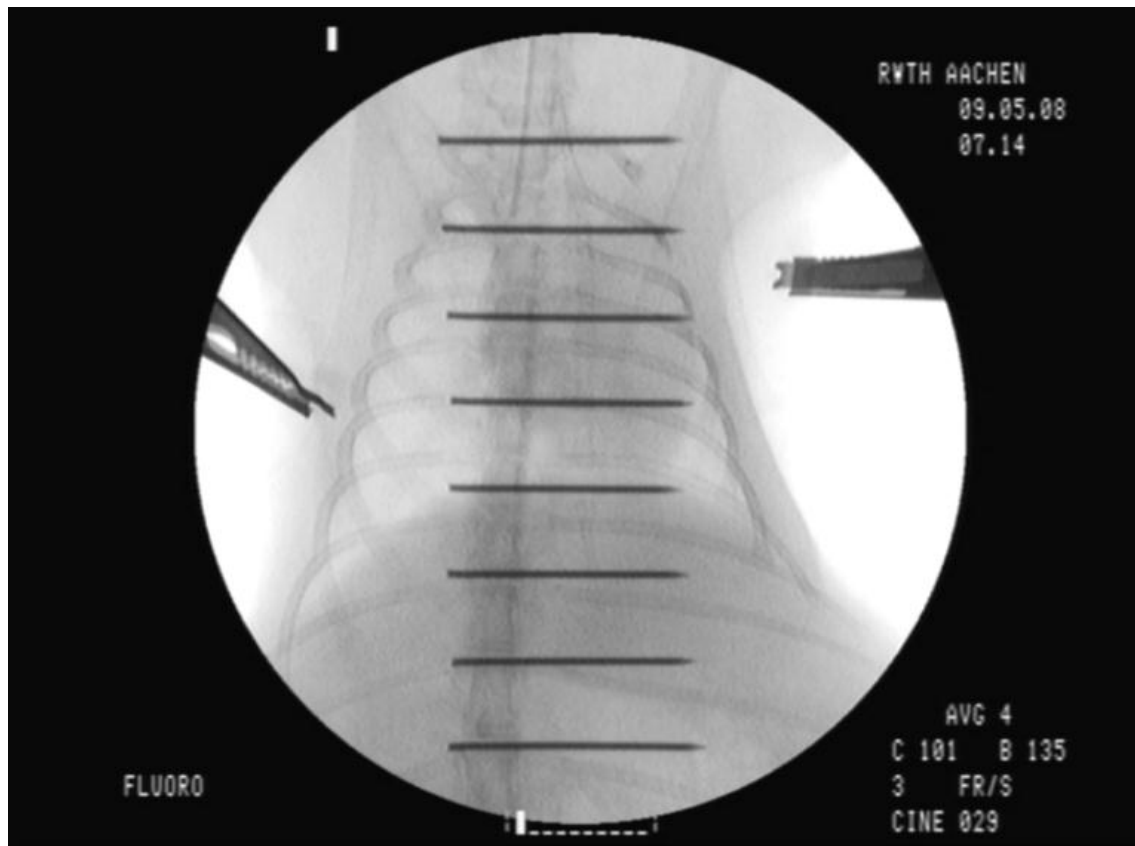


Abb. 3.13: Bild einer präoperativen radiologischen videoskopischen Aufnahme. Das Kaninchen wurde mit dem Rücken auf einem Röntgentisch mit einer integrierten Skala von 1x1 cm fixiert

3.9 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen oder Medianwerten angegeben. Sowohl histologische Ergebnisse, als auch Adhäsionsgrade wurden mittels Wilcoxon-Test für den Vergleich zweier Gruppen und Kruskal-Wallis-Test für den Vergleich dreier Gruppen evaluiert. Die Analyse der Defektgröße erfolgte mittels des T-Tests im ersten Versuchsteil und des Varianzanalyse-Modells (Analysis of Variance Model) im zweiten. Bei den zahlreichen Messungen von immunhistochemischen Auswertungen wurde das Varianzanalyse-Modell mit Messwiederholungen verwendet.

Ergebnisse der radiologischen Untersuchungen aus der ersten Versuchsreihe wurden ebenfalls als Mittelwert mit Standardabweichung separat für jede Netzgruppe (mUP und mPP), Zwerchfellseite (rechts Kontrolle und links Zwerchfellseite) und Untersuchungszeitpunkt (präoperativ, zwei und vier Monate nach Implantation) dargestellt. Dreifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen wurde durchgeführt, um Netz-, Seiten- und Zeiteffekte sowie zweifaktoriell-

le Interaktion auf Zwerchfellexkursion und dreifaktorielle Interaktion auf Normvolumen zu analysieren. Die Auswirkung auf die Atemfrequenz sowie auf die Seitenverhältnisse wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse ausgewertet.

Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ gewählt. Alle Testergebnisse wurden auf eine explorative Weise untersucht. P-Werte unter 0,05 galten als statistisch signifikant.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des SAS „Statistical Analysis Software“ (SAS für Windows, Version 9.1; SAS Institut, Cary, NC, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Versuch I

4.1.1 Gewicht

Alle Tiere aus beiden Versuchsgruppen haben sich zeitgerecht entwickelt. Hinsichtlich der Gewichtszunahme bestanden auch keine Unterschiede. Nach vier Monaten Implantationszeit betrug das durchschnittliche Gewicht $3,28 \pm 0,37$ kg in der mUP-Gruppe und $3,24 \pm 0,3$ kg in der mPP-Gruppe ($p=0,84$) (Abb. 4.1). Postoperativ verstarb ein Tier aus der mPP-Gruppe, am ehesten infolge von Verblutung nach einem in der Obduktion festgestellten Leberriss. Die Auswertung wurde insgesamt bei 17 Tieren durchgeführt, acht aus mUP- und neun aus mPP-Gruppe.

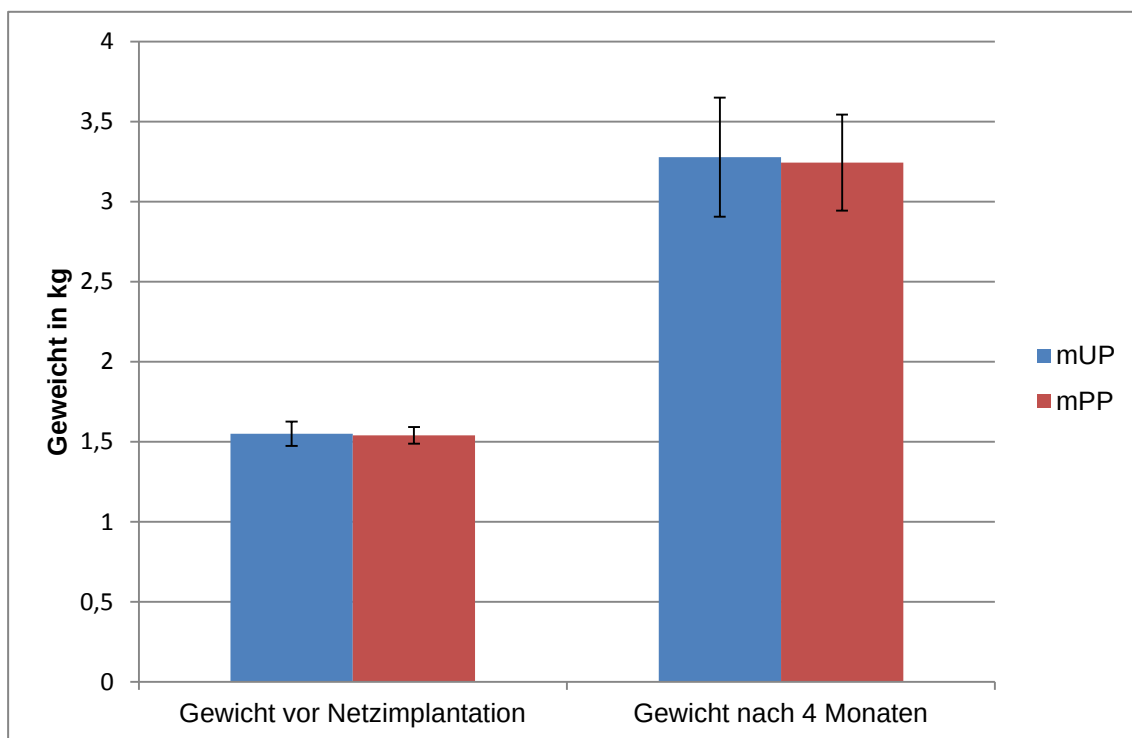


Abb. 4.1: Gewichtszunahme in kg nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.1.2 Makroskopische Beurteilung

Makroskopisch zeigte sich eine gute Netzintegration in das umliegende Zwerchfellgewebe (Abb. 4.2).

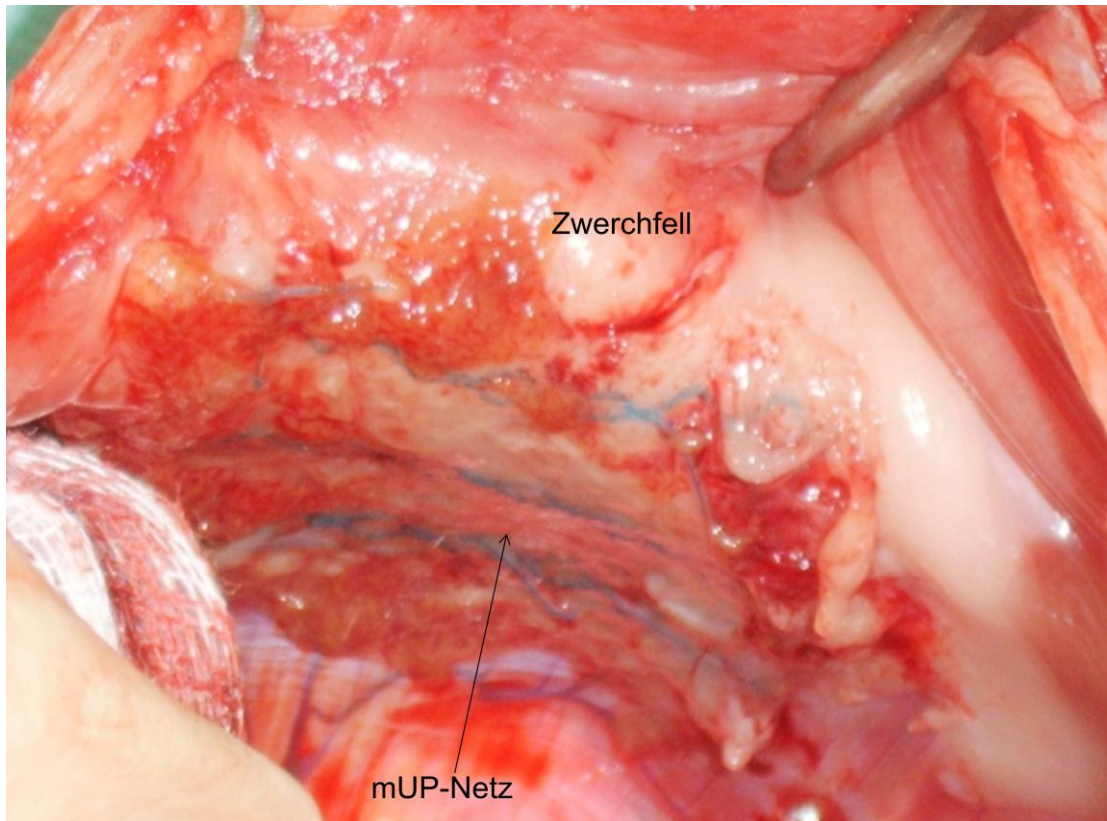


Abb. 4.2: mUP-Netz in situ nach vier Monaten Implantationszeit. Sicht von abdominalen Seite

Bei fünf Tieren der mUP-Gruppe und acht Tieren der mPP-Gruppe fielen granulomatöse Herde im Bereich des Netzes auf (Abb. 4.3). Mikroskopisch zeigten sich diese Herde mit Nekrosen und Verkalkungen oder standen häufig in Verbindung mit einem basophilen amorphen Material. Derartige Granulombildung ist für parasitäre Erkrankungen der Versuchstiere typisch. Allerdings konnten weder parasitäre noch andere infektiöse Ursachen bei diesen granulomatösen Herden nachgewiesen werden.

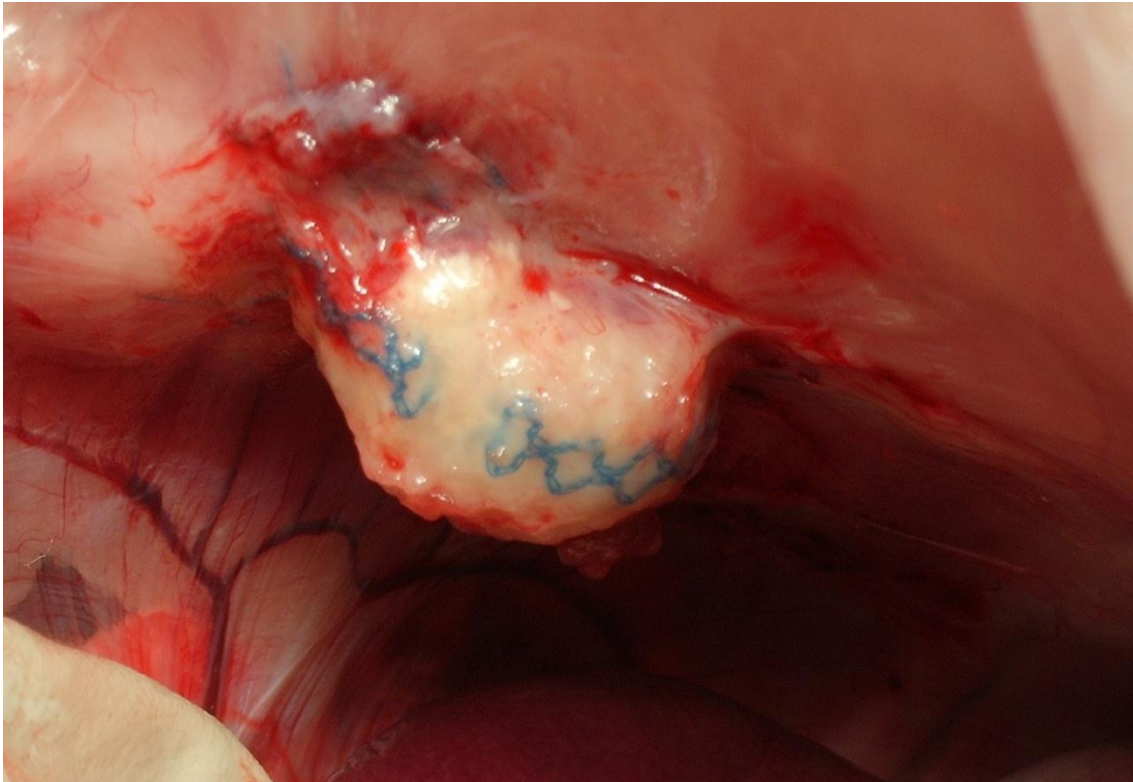


Abb. 4.3: Granulom im Bereich des mPP-Netzes. Sicht von abdominalen Seite

4.1.3 Adhäsionen

Bei allen Tieren aus beiden Versuchsgruppen wurden Adhäsionen zwischen Leber und Netz gebildet (Abb. 4.4). Eine Abtrennung der Leber konnte nur mit einem scharfen Instrument erfolgen. Dermaßen starke Adhäsionsbildung entsprach dem 4. Grad nach Zühlke Klassifikation (p=1,0).

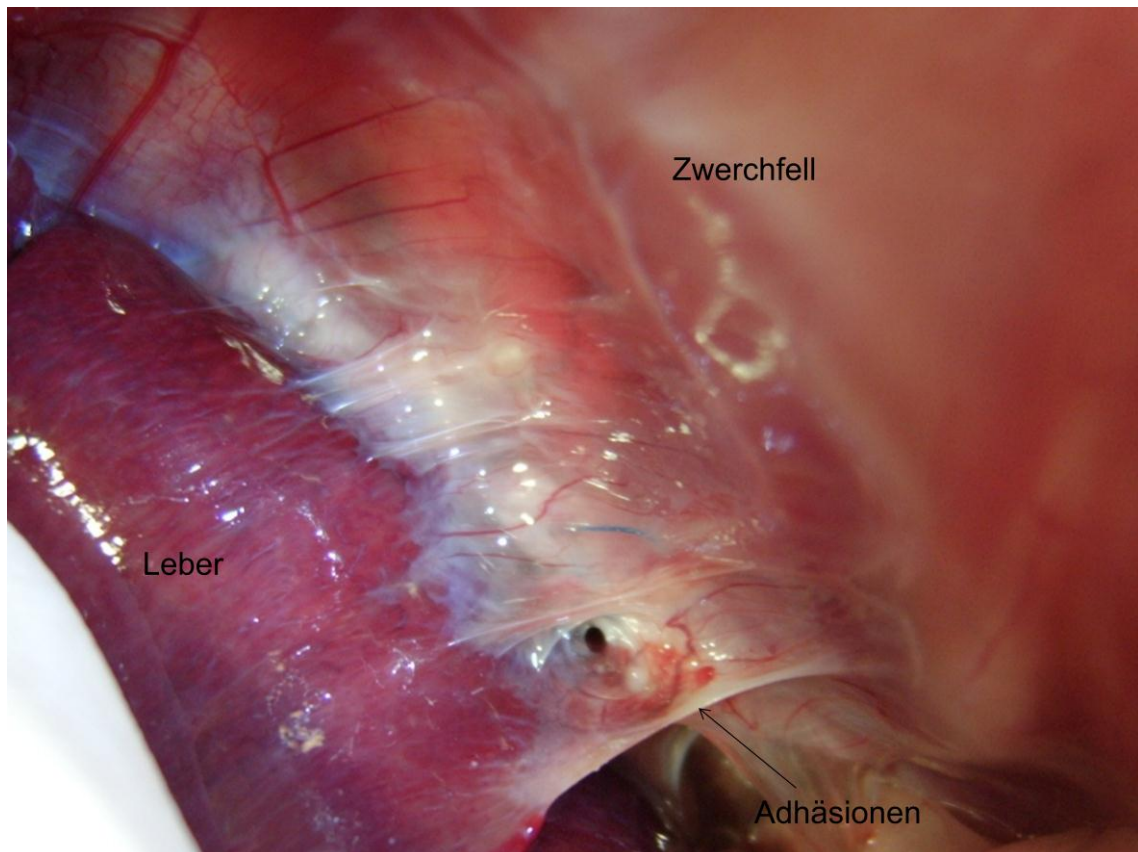


Abb. 4.4: Adhäsionen zwischen der Leber und dem mPP-Netz nach vier Monaten Implantationszeit. Sicht von abdominalen Seite

4.1.4 Defektschrumpfung

Der initial 10 mm Große Zwerchfelldefekt schrumpfte nach vier Monaten bei allen Tieren. Für die mUP-Gruppe betrug der Mittelwert des Defektes $0,48 \pm 0,88$ mm und für die mPP-Gruppe $0,31 \pm 0,92$ mm. Der Defekt war komplett verschlossen bei sechs Tieren in der mUP-Gruppe und bei sieben Tieren in der mPP-Gruppe. Es wurde keine statistische Signifikanz zwischen den beiden Gruppen beobachtet ($p=0,7$) (Abb. 4.5).

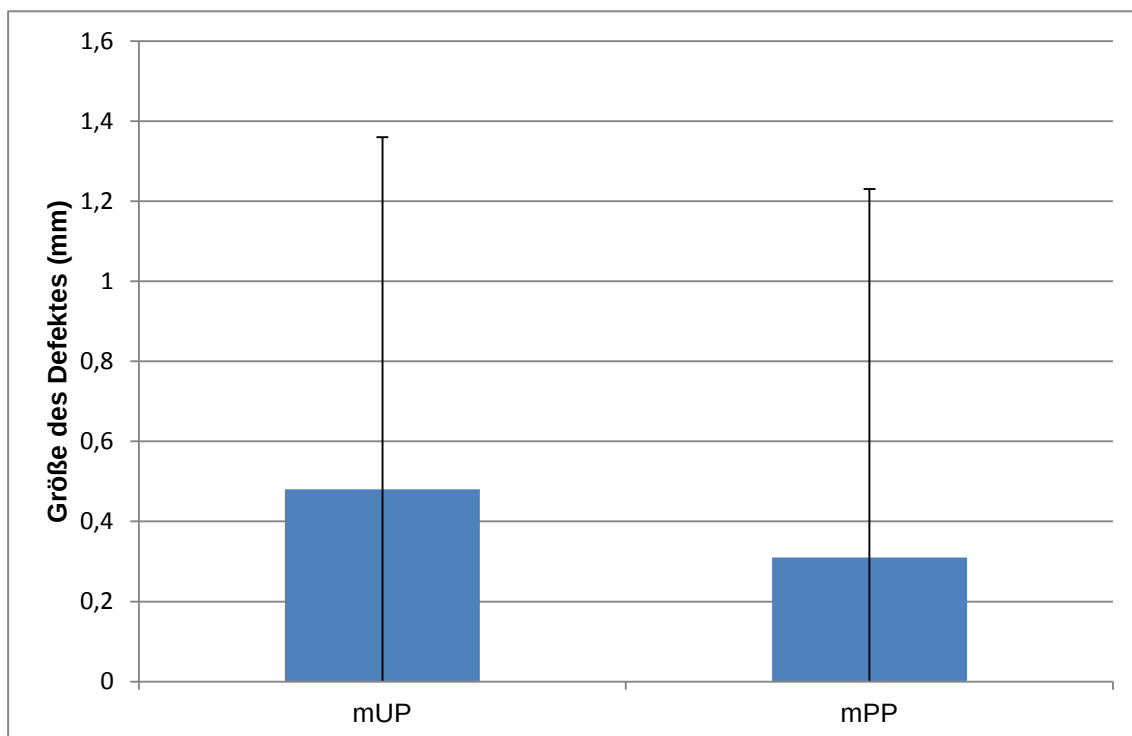


Abb. 4.5: Defektdurchmesser (mm) von mUP- und mPP-Netz nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.1.5 Histologie

Die Netzimplantate riefen, soweit von der Entzündungsreaktion auf das amorphe Fremdmaterial zu diskriminieren, eine geringgradige chronische Begleitentzündung und Fremdkörperreaktion hervor (Tab. 4.1).

Den Granulomen angrenzend bestand ein gemischt entzündliches Zellinfiltrat mit gehäuftem Plasmazellvorkommen, Granulozyten und Lymphozyten.

Die Entzündungsreaktion wurde bei beiden Netzgruppen mittelmäßig ausgeprägt. Einen signifikanten Unterschied gab es zwischen den zwei Gruppen nur im Bereich des Netzrandes mit leicht erhöhter entzündlichen Reaktion für mPP-Netze ($p=0,03$).

Die Fremdkörperriesenzellen kamen hauptsächlich im Bereich der granulomatösen Herden vor und waren nur in geringerem Maße mit dem Netzmaterial der beiden untersuchten Tiergruppen assoziiert.

Sowohl die Lymphozyten- als auch die Plasmazellreaktion war bei beiden Netzgruppen mittelmäßig bis stark vorhanden. Am Netzrand zeigte sich bei mUP-Netzen eine signifikant geringere Ausprägung dieser Reaktionen im Vergleich zu mPP-Netzen.

Die Fibrose war in allen drei untersuchten Bereichen bei beiden Netzgruppen stark ausgeprägt. Mit Ausnahme des Netzrandes gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Netzgruppen ($p=0,02$).

Bei der mUP-Gruppe fiel die Granulozytenreaktion im Vergleich zu der mPP-Gruppe geringer aus. Signifikant war dieser Unterschied nur im Defektbereich ($p=0,02$).

Sowohl Verkalkungen als auch Nekrosen waren bei beiden Netzgruppen relativ stark ausgeprägt. Lediglich am Netzrand bei der mUP-Gruppe zeigte sich eine deutlich kleinere Verkalkungs- ($p<0,05$) und Nekroserate ($p=0,009$).

In allen Kontrollpräparaten vom Zwerchfell der Gegenseite waren keine Entzündungszellinfiltrate, Bindegewebsproliferate oder narbige Veränderung ersichtlich.

Tab. 4.1: Semiquantitativ gemessene Ergebnisse der histologischen Untersuchung von mUP- und mPP-Netz im Defekt, neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Untersuchung Das Ausmaß jedes Merkmals wurde in vier Grade unterteilt (0=kein; 1=minimal; 2=mittelmäßig; 3=sehr ausgeprägt)

Variable	mUP	mPP	p-Wert
Entzündung Defekt	2.5	3	0.08
Entzündung Neben	3	3	0.47
Entzündung Rand	2	3	0.03
Fremdkörperriesenzellen Defekt	1	1	0.87
Fremdkörperriesenzellen Neben	1	2	0.42
Fremdkörperriesenzellen Rand	1	1	0.17
Granulozyten Defekt	1	2	0.02
Granulozyten Neben	1	2	0.11
Granulozyten Rand	1	2	0.10
Lymphozyten Defekt	2	2	0.22
Lymphozyten Neben	2	2	0.18
Lymphozyten Rand	1	2	0.01
Plasmazellen Defekt	3	3	0.14
Plasmazellen Neben	3	3	0.35
Plasmazellen Rand	2	3	0.01
Fibrose Defekt	3	3	0.06
Fibrose Neben	3	3	0.24
Fibrose Rand	2.5	3	0.02
Verkalkungen Defekt	2	3	0.23
Verkalkungen Neben	3	3	0.63
Verkalkungen Rand	0.5	2	0.05
Nekrose Defekt	2	3	0.19
Nekrose Neben	3	3	0.63
Nekrose Rand	0.5	3	0.01

4.1.6 Immunhistochemische Aufbereitung

4.1.6.1 Proliferationsrate

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen mittels Ki-67 zeigte sich im Vergleich der beiden Netzgruppen kein signifikanter Unterschied (Abb. 4.6). Im Defektbereich betrug der Mittelwert in der mUP-Gruppe $2,32 \pm 2,97\%$ und in der mPP-Gruppe $1,63 \pm 2,24\%$ ($p=0,59$). Neben dem Defekt ist die Proliferationsrate für beide Netztypen deutlich höher und war bei den mUP-Netzen $9,62 \pm 6,11\%$ und bei den mPP-Netzen $6,52 \pm 4,79$ ($p=0,26$). Am Netzrand waren die Mittelwerte vergleichbar klein mit denen im Defektbereich und betrugen $2,29 \pm 2,51\%$ in der mUP-Gruppe und $1,17 \pm 1,64\%$ in der mPP-Gruppe ($p=0,29$).

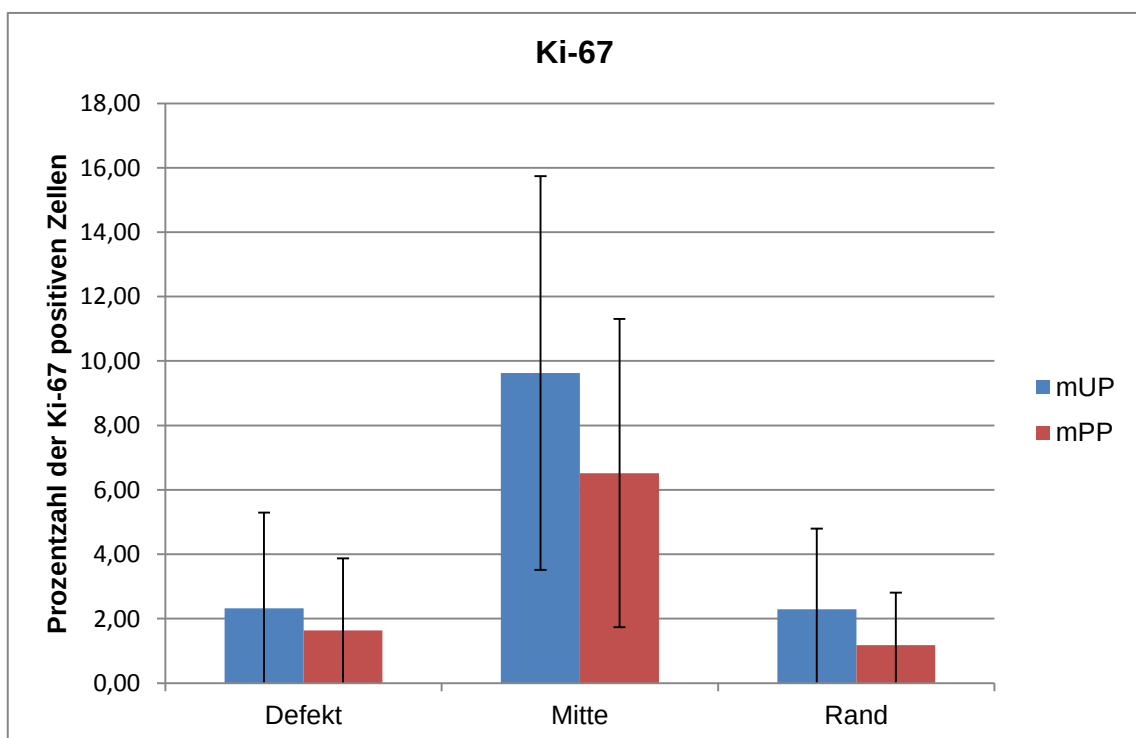


Abb. 4.6: Proliferationsrate von mUP- und mPP-Netz im Defekt, Neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.1.6.2 Apoptoserate

Der Anteil der apoptotischen Zellen zeigte in beiden Netzgruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 4.7). Im Defektbereich betrug der Mittelwert in der mUP-Gruppe $36,41 \pm 25,27\%$ und in der mPP-Gruppe $37,03 \pm 27,15\%$ ($p=1$). Zwischen dem Defekt und dem Netzrand war die Apoptoserate in der mUP-Gruppe $41,71 \pm 18,12\%$. In der mPP- war der Mittelwerte etwas kleiner $29,89 \pm 23,70$ ($p=0,31$). Im Bereich des Netzrandes war der Mittelwert am höchsten in beiden Gruppen, nämlich $44,88 \pm 23,80\%$ in der mUP-Gruppe und $41,19 \pm 21,59\%$ in der mPP-Gruppe ($p=0,74$).

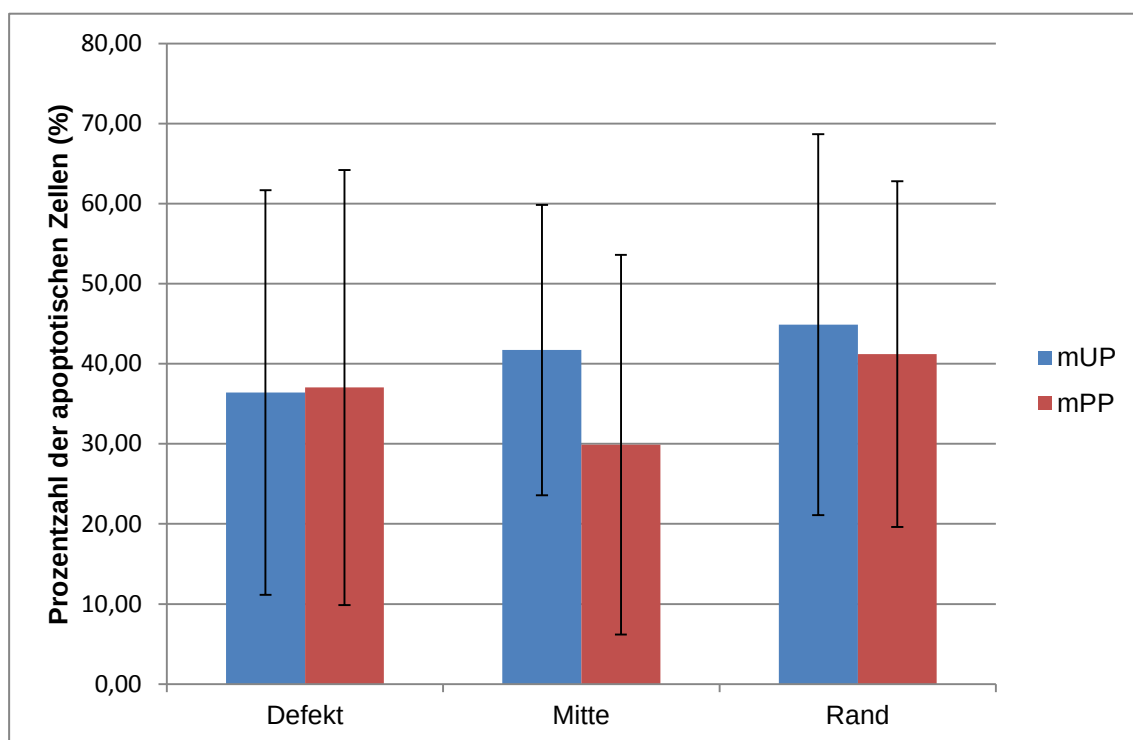


Abb. 4.7: Apoptoserate von mUP- und mPP-Netz im Defekt, Neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.1.6.3 Makrophagen

Der Anteil an CD68 positiven Zellen zeigte in beiden Netzgruppen keinen signifikanten Unterschied. Über alle drei untersuchten Netzbereiche war der Mittelwert vergleichbar. Für mUP- und mPP-Netze betrug der Mittelwert im Defektbereich jeweils $26,34 \pm 10,32\%$ und $24,68 \pm 12,65\%$ ($p=0,78$), neben dem Defekt jeweils $24,27 \pm 7,31\%$ und $30,79 \pm 9,62\%$ ($p=0,15$) und am Netzrand jeweils $21,25 \pm 11,58\%$ und $21,51 \pm 17,44\%$ ($p=0,97$) (Abb. 4.8).

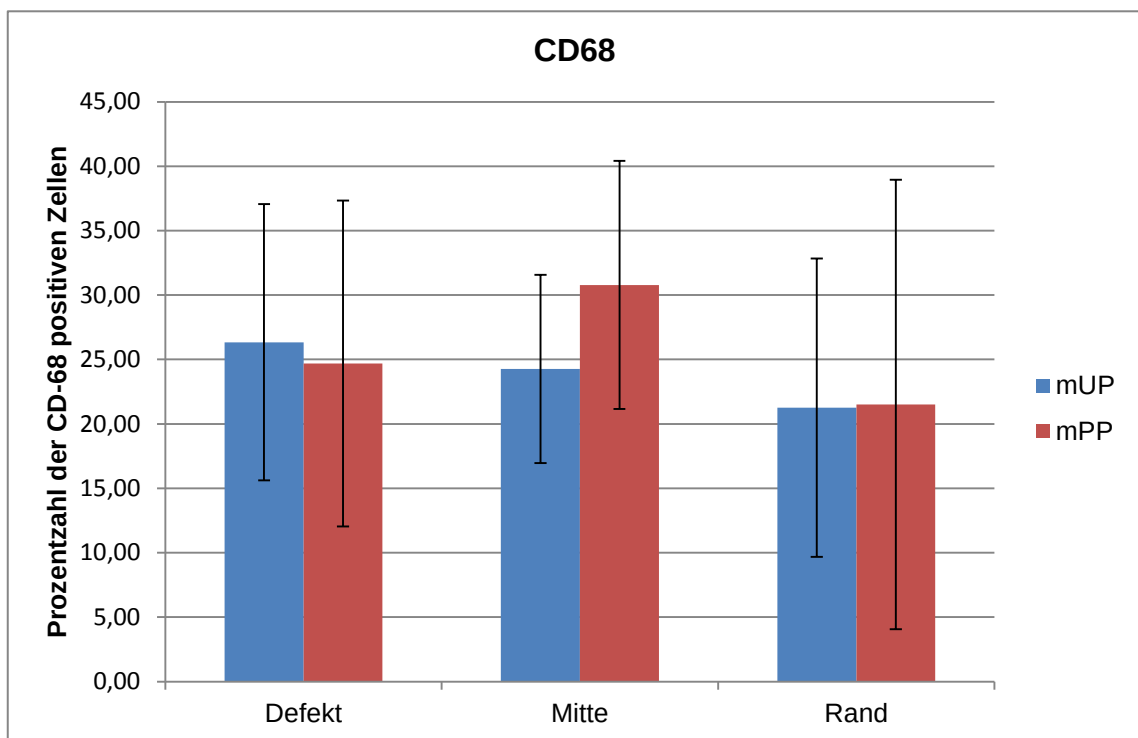


Abb. 4.8: Prozentzahl der CD68 positiven Zellen von mUP- und mPP-Netz im Defekt, neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.1.6.4 Myofibroblasten

Die immunhistochemischen Untersuchungen von Myofibroblasten mit Hilfe der SMA ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Netzgruppen. Im Defektbereich betrug der Mittelwert $11,25 \pm 12,23\%$ für die mUP-Gruppe und $7,76 \pm 5,17\%$ für die mPP-Gruppe ($p=0,45$). Neben dem Defekt zeigte das mUP-Netz $8,87 \pm 10,28\%$ und das mPP-Netz $11,98 \pm 7,46\%$ der positiv gefärbten Zellen ($p=0,48$). Im Bereich des Netzrandes war der Mittelwert $7,33 \pm 6,71\%$ beim mUP-Netz und $5,43 \pm 3,80\%$ beim mPP-Netz ($p=0,48$) (Abb. 4.9).

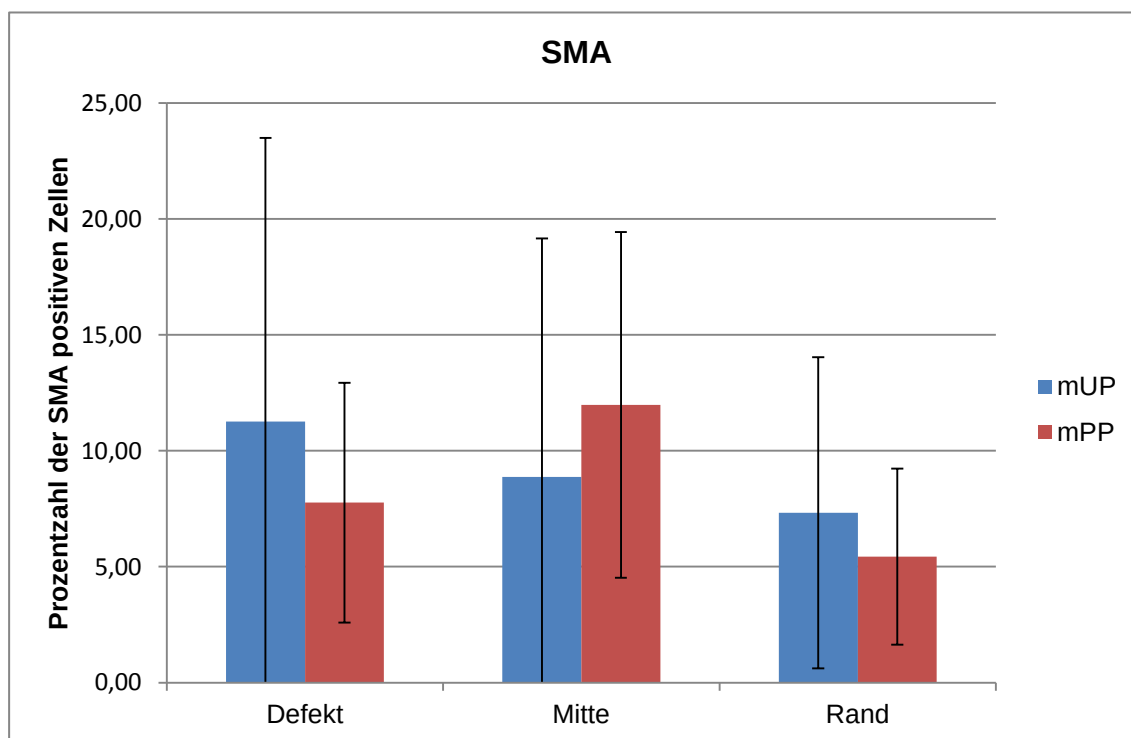


Abb. 4.9: Prozentzahl der SMA positiven Zellen von mUP- und mPP-Netz im Defekt, neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.1.6.5 Kollagen I zu Kollagen III Quotient

Die Messung des Kollagen I zu Kollagen III Quotienten zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der untersuchten Netzgruppen. Im Defektbereich lag der Mittelwert in der mUP-Gruppe bei $7,89 \pm 6,98$ und in der mPP-Gruppe bei $5,34 \pm 3,29$ ($p=0,29$). Neben dem Defekt zeigte sich ein leichter Anstieg der Kollagen I Fasern mit einem Quotienten von $13,28 \pm 9,63$ beim mUP-Netz und $17,27 \pm 12,15$ beim mPP-Netz ($p=0,47$). Am Netzrand hat sich der Anteil an Kollagen I Fasern fast verdoppelt und betrug $30,53 \pm 16,56$ in der mUP-Gruppe und $43,68 \pm 26,00$ in der mPP-Gruppe ($p=0,24$) (Abb. 4.10).

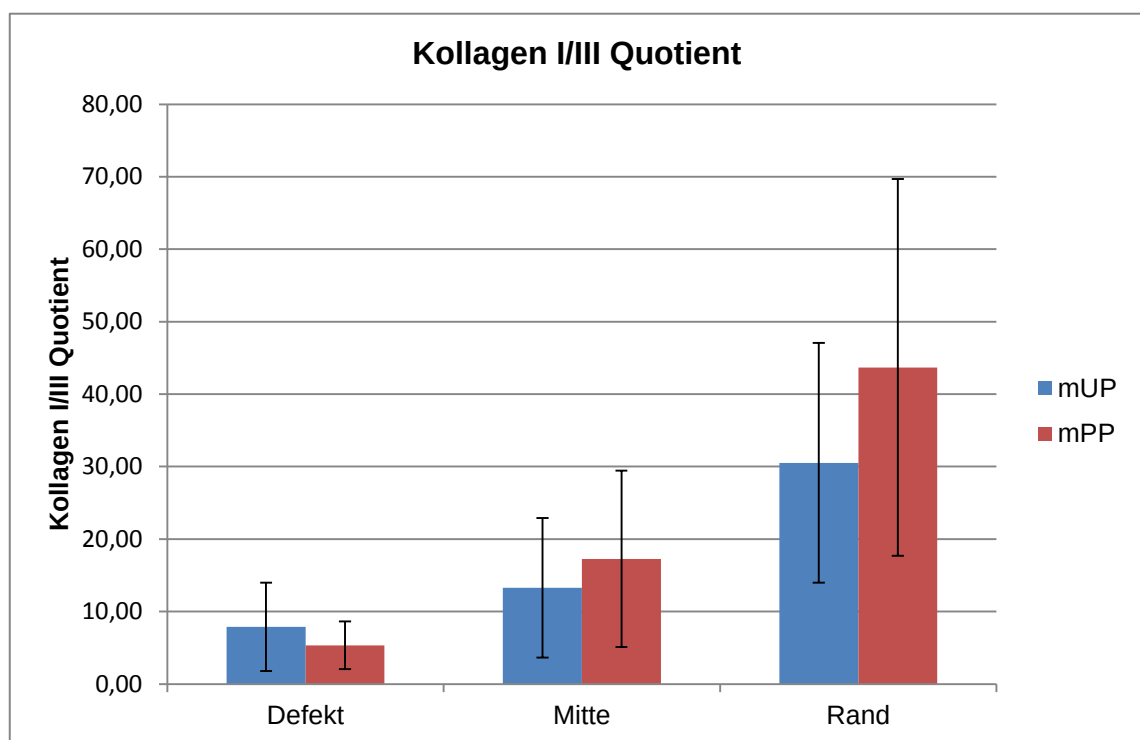


Abb. 4.10: Kollagen I zu Kollagen III Quotient von mUP- und mPP-Netz im Defekt, neben dem Defekt und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.1.7 Radiologische Untersuchung

Die Zwerchfellbeweglichkeit wurde im Verlauf der Studie präoperativ, zwei und vier Monate nach der Netzimplantation mit Hilfe der radiologischen Durchleuchtung gemessen. Als Ausgangswert dienten die unmittelbar präoperativ ermittelten Messungen.

Die Atemfrequenz blieb über den Beobachtungszeitraum in beiden Netzgruppen konstant (Abb. 4.11). In der mUP-Gruppe zeigte sich die Atemfrequenz minimal höher, was bereits bei den Ausgangsmessungen beobachtet wurde. Die durchschnittliche Atemfrequenz lag über den gesamten Beobachtungszeitraum in der mUP-Gruppe bei $1,02 \pm 0,02/s$ und in der mPP-Gruppe bei $0,93 \pm 0,05/s$ (Abb. 4.11).

Die Unterschiede der Atemfrequenz und –tiefe sind bei untersuchten Tieren wenig ausgeprägt. Dies lässt sich auf eine gleichmäßige Narkosewirkung zurückführen.

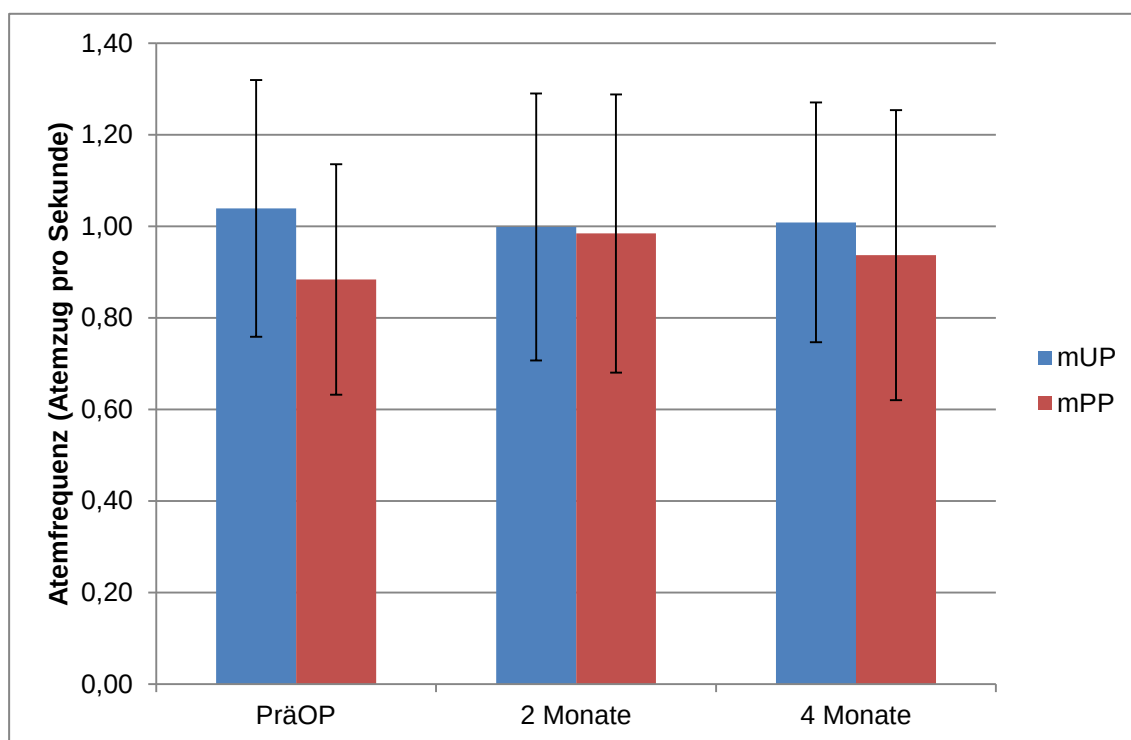


Abb. 4.11: Zeitlichen Entwicklung der Atemfrequenz präoperativ, zwei und vier Monate nach Implantation von mUP- und mPP-Netzen. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

Die präoperativ gemessene Zwerchfellexkursion bei allen Tieren stellt relativ gleichmäßige Atembewegungen sowohl auf der rechten Kontrollseite als auch

auf der linken Netzseite dar. Die durchschnittliche Zwerchfellbewegung variiert zwischen $1,9 \pm 0,8$ mm für die Kontrollseite des mUP-Netzes und $2,6 \pm 0,7$ mm für die Netzseite des mPP-Netzes (Abb. 4.12).

Nach Ablauf von zwei Monaten nahm die Zwerchfellexkursion der nicht operierten rechten Seite in beiden Netzgruppen signifikant zu und war $3,4 \pm 0,8$ mm in der mUP- und $3,3 \pm 0,9$ mm in der mPP-Gruppe. Die Zwerchfellexkursion der operierten linken Seite blieb dagegen in beiden Netzgruppen im Vergleich zu Ausgangswerten fast unverändert und war um 1,3 mm (mUP-Gruppe) und um 0,8 mm (mPP-Gruppe) kleiner als auf der rechten Seite. Die relative Differenz betrug somit 38% in der UP- und 24% in der PP-Gruppe.

Vier Monate nach der Implantation wurde weiterhin dieselbe Tendenz der Entwicklung der Zwerchfellexkursion beobachtet. So nahm die Zwerchfellexkursion der Kontrollseite in beiden Netzgruppen weiter zu und betrug $4,3 \pm 1,4$ mm in der mUP- und $4,5 \pm 1,1$ mm in der mPP-Gruppe. Auf der operierten Netzseite nahm der Atemhub auch etwas zu, erreichte aber immer noch nicht die Werte der Kontrollseite. Somit blieb die absolute Differenz von 1,3 mm (mUP-Gruppe) und 1,1 mm (mPP-Gruppe) zwischen Kontroll- und Netzseite fast unverändert im Vergleich zu den Untersuchungen vor zwei Monaten. Die relative Differenz betrug 30% in der mUP- und 24% in der mPP-Gruppe.

Statistisch zeigte die Zwerchfellexkursion im Bezug auf die Messzeitpunkte und untersuchte Zwerchfellseiten einen signifikanten Unterschied ($p=0,0037$).

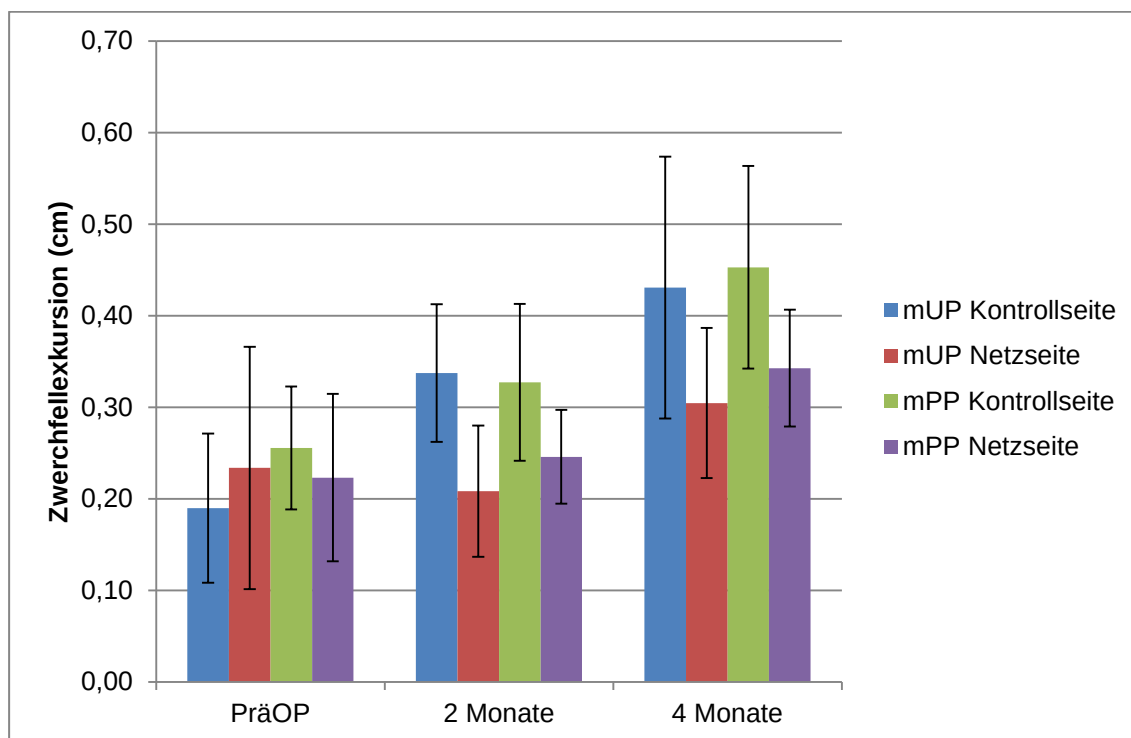


Abb. 4.12: Entwicklung der Zwerchfellexkursion präoperativ, zwei und vier Monate nach Implantation von mUP- und mPP-Netz. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

Das Verhältnis der Netz- zu Kontrollseite von der Zwerchfellexkursion zeigt die Abb. 4.13. Im Verlauf von vier Monaten hat sich das Verhältnis der Netz- zu Kontrollseite in der mPP-Gruppe wenig geändert. Präoperativ lag der Mittelwert bei 87 ± 28 %, nach zwei Monaten nahm er etwas ab und betrug dann 80 ± 24 %. Dieses Verhältnis blieb dann nach vier Monaten mit 79 ± 20 % unverändert (Abb. 4.13).

In der mUP-Gruppe hat die Beweglichkeit der linken Zwerchfellseite im Vergleich zu rechten stark abgenommen von 147 ± 94 % präoperativ auf 61 ± 15 % nach zwei Monaten. Dieser Wert stieg dann nach vier Monaten auf 75 ± 23 %, erreichte aber dennoch nicht die Ausgangswerte.

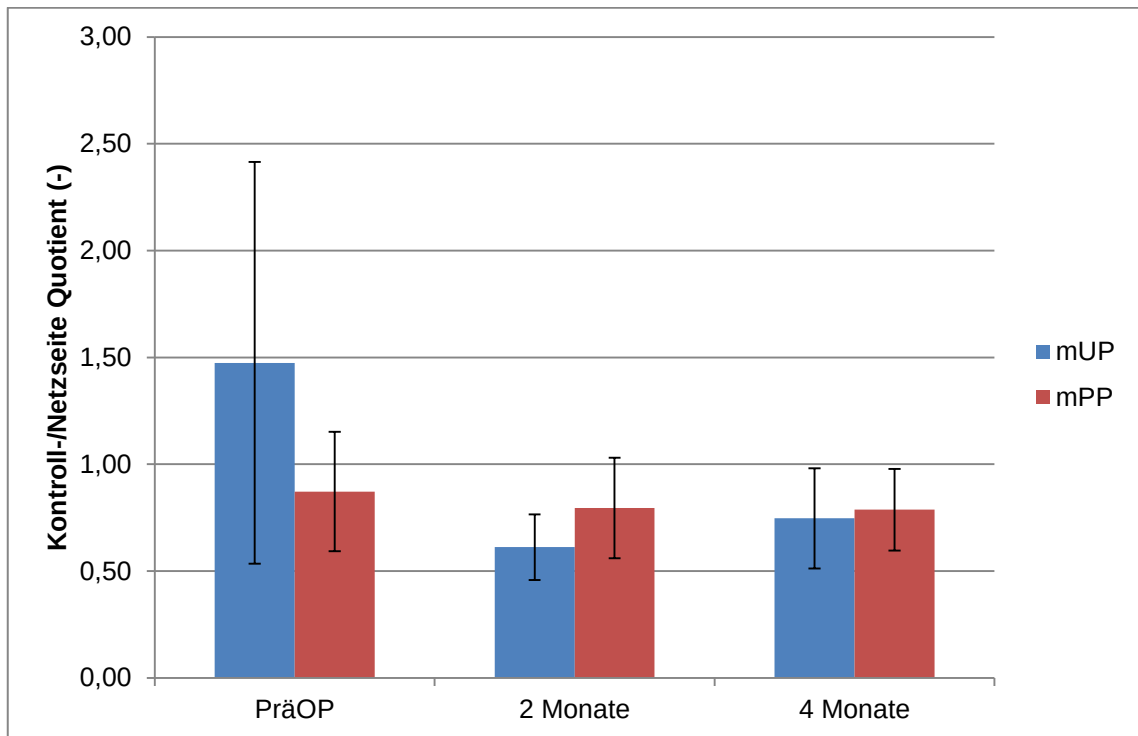


Abb. 4.13: Quotient Kontroll-/Netzseite der Zwerchfellexkursion präoperativ, zwei und vier Monate nach Implantation von mUP- und mPP-Netz. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

Der Zusammenhang zwischen Atemfrequenz (Atemzug/s) und Zwerchfellexkursion (cm/Hub) wurde mittels Normvolumen (cm/s) standardisiert.

$$V_{\text{norm}} = \text{Mittelwert der Zwerchfellexkursion (cm)} * \text{Atemfrequenz (1/s)}$$

Dieses Normvolumen beschreibt das Atemvolumen, das pro Zeit umgesetzt wird. Abb. 4.14 zeigt Entwicklung der Normvolumina präoperativ, zwei und vier Monate nach Netzimplantation. Die Atemfrequenz (Abb. 4.11) hatte kaum Einfluss auf das Normvolumen. Viel mehr ist die Entwicklung des Normvolumens mit der Entwicklung der Zwerchfellexkursion (Abb. 4.12) vergleichbar. Dies ist auf eine relativ gleichmäßige Atemfrequenz mit ca. einem Atemzug pro Sekunde zurückzuführen. Lediglich die Standardabweichungen steigen. Statistisch zeigte die Zwerchfellexkursion im Bezug auf die Messzeitpunkte und untersuchte Zwerchfellseite einen signifikanten Unterschied ($p=0,0145$).

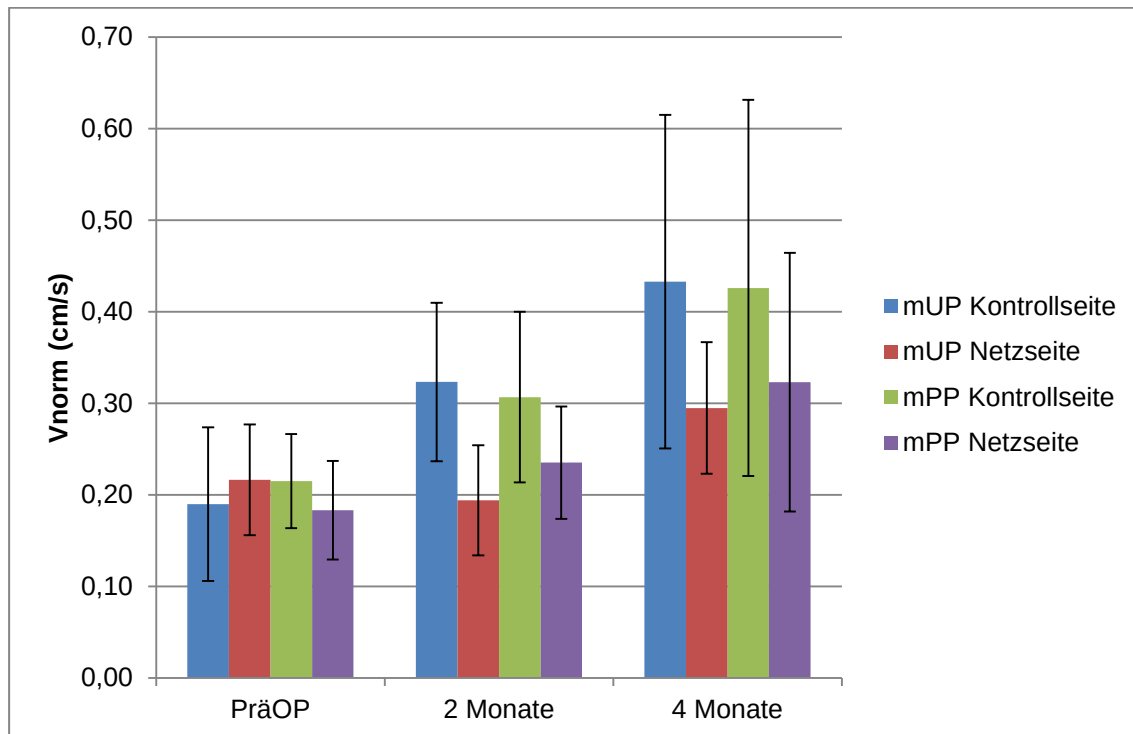


Abb. 4.14: Entwicklung der Normvolumina präoperativ, zwei und vier Monate nach Implantation von mUP- und mPP-Netz. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

Eine mögliche Auswirkung der Granulombildung auf die Zwerchfellbewegung wurde ebenfalls untersucht (Abb. 4.15, Abb. 4.16). Bei separater Betrachtung der Zwerchfellexkursion von Tieren mit Granulomen und ohne war deutlich zu erkennen, dass die Granulombildung wenig Auswirkung auf die Zwerchfellbewegung hatte. So war die Zwerchfellexkursion nach zwei Monaten bei Tieren mit Granulomen $3,4 \pm 1,3$ mm (mUP/Kontrollseite) und $2,2 \pm 0,9$ mm (mUP/Netzseite). Bei Tieren ohne Granulombildung war die Beweglichkeit auf der entsprechenden Seite sogar um 0,1 mm (mUP/Kontrollseite) und 0,2 mm (mUP/Netzseite) kleiner. In der PP-Gruppe betrug die Zwerchfellexkursion bei Tieren mit Granulomen $3,3 \pm 0,5$ mm (mPP/Kontrollseite) und $2,4 \pm 0,5$ mm (mPP/Netzseite). Bei Tieren ohne Granulome war die Beweglichkeit auf der Kontrollseite um 0,1 mm kleiner und auf der Netzseite um 0,2 mm größer im Vergleich mit Tieren mit Granulomen (Abb. 4.15).

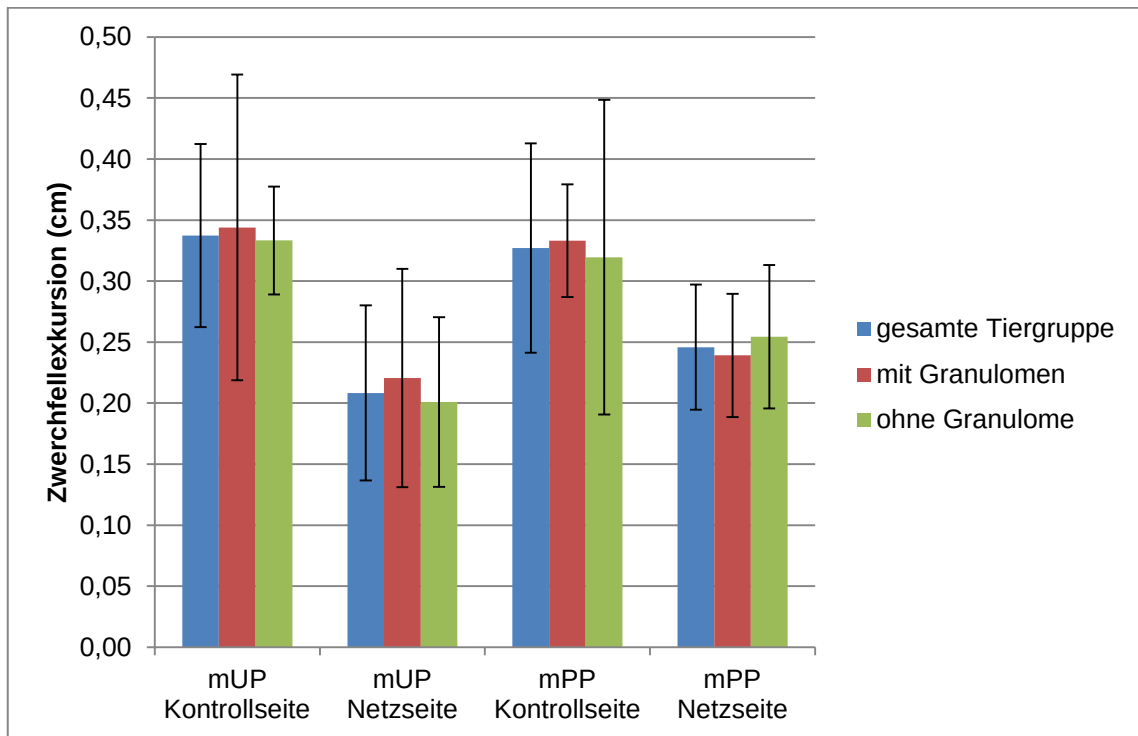


Abb. 4.15: Zwerchfellexkursion von mUP- und mPP-Netz nach zwei Monaten mit Einbezug der Granulombildung. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

Nach vier Monaten waren die Unterschiede zwischen Tieren mit Granulombildung und ohne bis auf die Netzseite der mPP-Gruppe etwas größer. So betrug die Zwerchfellbeweglichkeit der Tiere mit Granulomen $3,1 \pm 0,6$ mm (mUP/Kontrollseite) und $2,7 \pm 0,7$ mm (mUP/Netzseite). Im Vergleich dazu war die Zwerchfellexkursion der Tiere ohne Granulome um 1,9 mm (mUP/Kontrollseite) und 0,6 mm (mUP/Netzseite) größer. Die Zwerchfellexkursion der Kontrollseite von PP-Gruppe war $4,2 \pm 1,3$ mm bei Tieren mit Granulomen und $5,0 \pm 0,7$ mm ohne Granulome. Die Zwerchfellexkursion auf der Netzseite war wiederum bei Tieren mit Granulomen mit $3,5 \pm 0,7$ mm minimal besser im Vergleich zu Tieren ohne Granulome mit $3,3 \pm 0,6$ mm (Abb. 4.16).

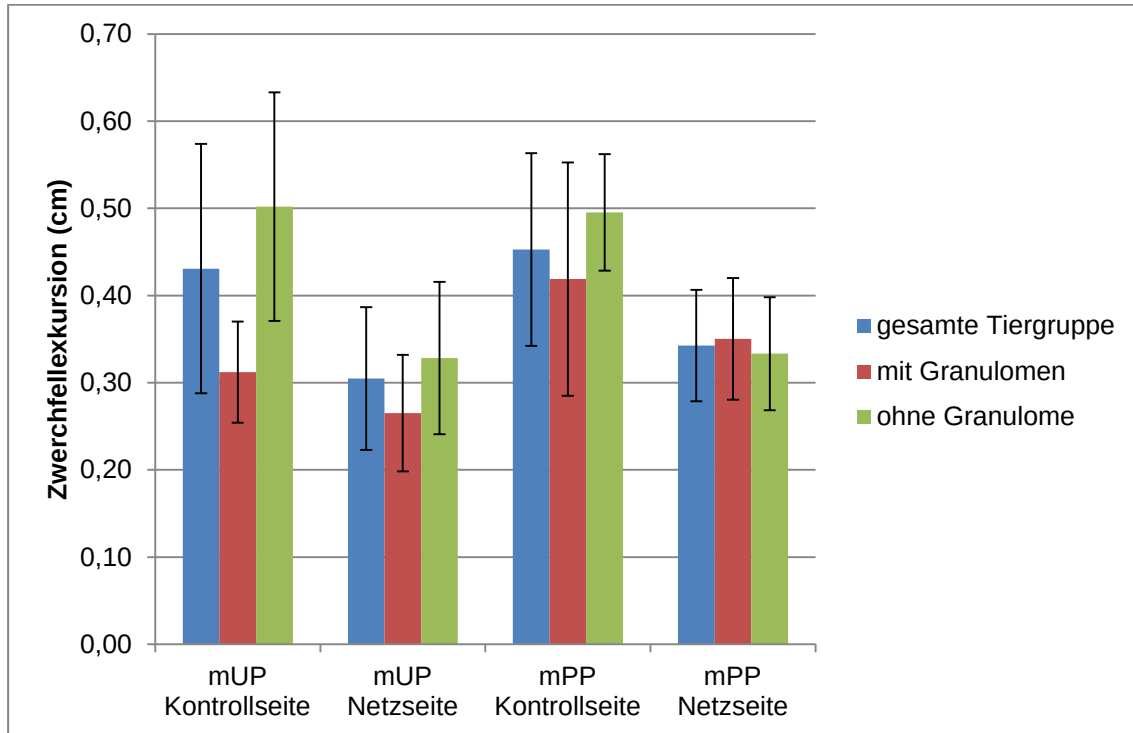


Abb. 4.16: Zwerchfellexkursion von mUP- und mPP-Netzen nach vier Monaten mit Einbezug der Granulombildung. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.2 Versuch II

Zwei Monate nach der Netzimplantation wurden jeweils zwei Tiere aus der mUP- und mPP-Gruppe zwecks vorzeitiger Evaluation und Beurteilung der Granulombildung euthanasiert. Da keine Granulombildung festgestellt werden konnte, wurden die restlichen Tiere bis zum Ablauf des vierten Monats gehalten.

4.2.1 Gewicht

Alle Tiere aus drei Netzgruppen haben sich zeitgerecht entwickelt. Auch in Hinsicht auf Wachstum- und Gewichtszunahme bestand kein Unterschied im Vergleich der drei Tiergruppen. Das mittlere Gewicht (kg) betrug nach vier Monaten Implantationszeit $3,58 \pm 0,24$ in der mUP-Gruppe, $3,47 \pm 0,08$ in der mPP-Gruppe und $4 \pm 0,4$ bei der UP-Kontrollgruppe ($p=0,08$) (Abb. 4.17).

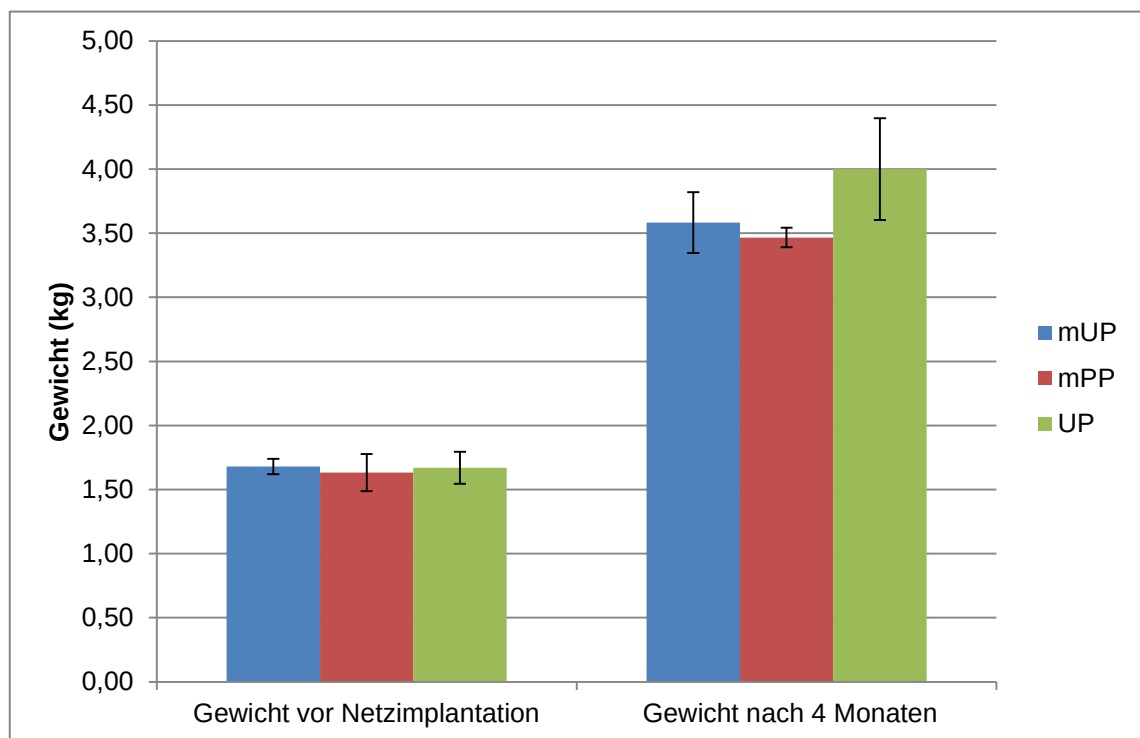


Abb. 4.17: Gewichtszunahme in kg nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

Umgehend postoperativ verstarb ein Tier aus der mUP-Gruppe. Die Todesursache war am ehesten kardiovaskuläre Genese. Die Obduktion konnte keine chirurgischen Fehler als Ursache feststellen. Drei Wochen postoperativ verstarb ein Tier aus der mPP-Gruppe infolge von Pneumonie. Die Auswertung wurde

insgesamt bei 16 Tieren durchgeführt. Zwei Monate alte Tiere wurden aus der Gesamtauswertung ausgenommen und separat bewertet.

4.2.2 Makroskopische Beurteilung

Bei allen Tieren zeigte sich eine gute Integration von Netzen in das umliegende Zwerchfellgewebe.

Im Gegensatz zum ersten Versuch konnte bei keinem der Tiere eine atypische Granulombildung nachgewiesen werden.

4.2.3 Adhäsionen

Nach vier Monaten Implantationszeit zeigte sich genauso wie in der ersten Versuchsreihe eine starke Adhäsion der Leber an das Netzmaterial (Abb. 4.18). Zusätzlich wurde in manchen Fällen eine Adhäsionsbildung zwischen Netzimplantat und Omentum majus beobachtet. Der Medianwert nach Zühlke Klassifikation betrug vier für alle Tiere ohne Ausnahmen.

Im Gegensatz dazu war die Adhäsionsbildung bei zwei Monate alten Tieren in geringerem Maß ausgeprägt und entsprach dem 2. Grad nach Zühlke Klassifikation.

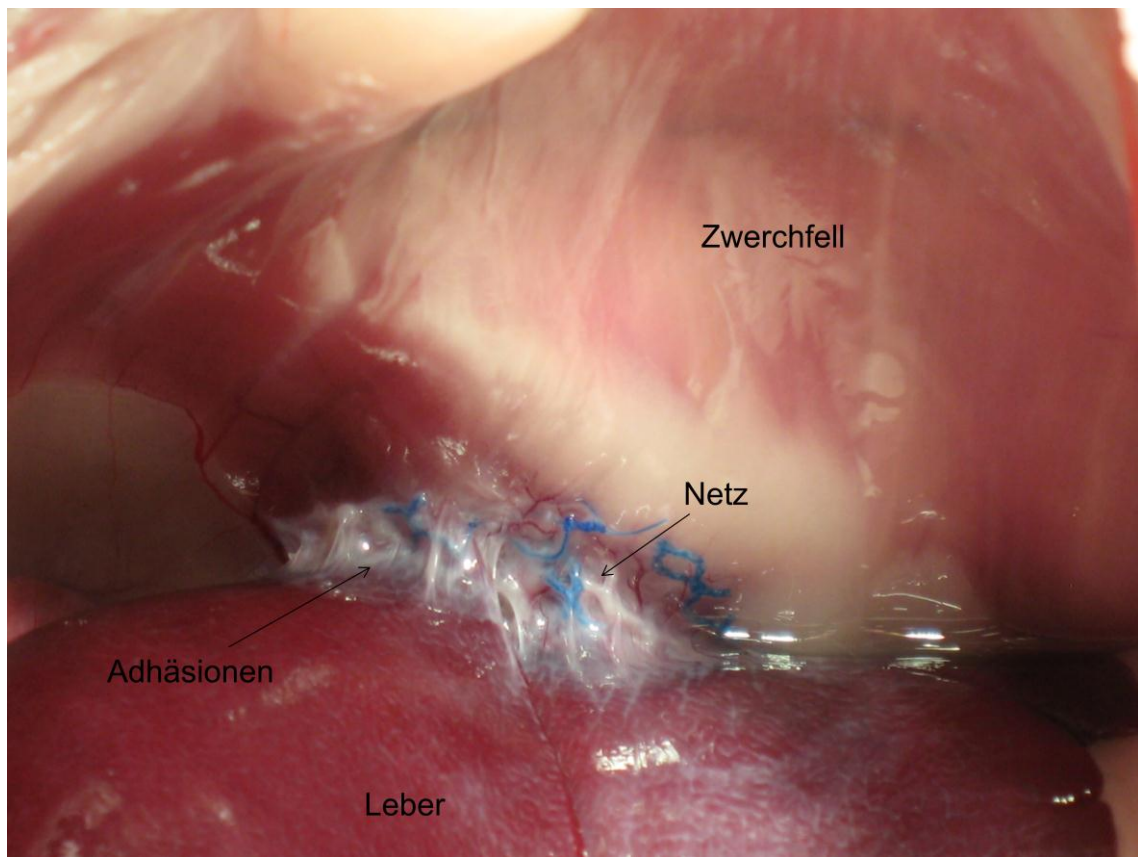


Abb. 4.18: Adhäsionen zwischen der Leber und dem UP-Kontrollnetz nach vier Monaten Implantationszeit. Sicht von abdominalen Seite

4.2.4 Netzschrumpfung

Die ursprüngliche Netzgröße bei der Implantation betrug 3 x 3 cm. Nach Ablauf der vier Monate blieb die Netzlänge bei allen Tieren fast unverändert, die Netzbreite dagegen hat sich um etwa 23% in beiden modifizierten Netzgruppen und um 26% in der Kontrollgruppe verkleinert ($p=0,51$) (Tab. 4.2).

Bei den zwei Monate alten Tieren wurde eine ähnliche Veränderung der Netzlänge und –breite beobachtet. Tab. 4.3 zeigt die Veränderung der Netzgröße nach zwei Monaten Implantationszeit.

Tab. 4.2: Netzbreite und Netzlänge in cm (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) nach vier Monaten Implantationszeit

	Netzbreite	Netzlänge
mUP	2,37 $\pm$ 0,25	3,10 $\pm$ 0,10
mPP	2,33 $\pm$ 0,23	3,27 $\pm$ 0,12
UP	2,22 $\pm$ 0,15	3,15 $\pm$ 0,05

Tab. 4.3: Netzbreite und Netzlänge in cm (Median) nach zwei Monaten Implantationszeit

	Netzbreite	Netzlänge
mUP	2,5	3,1
mPP	2,2	3,2

4.2.5 Defektschrumpfung

Sowohl nach zwei Monaten als auch nach vier Monaten schrumpfte der initial 10 mm große Defekt bei allen Tieren (Abb. 4.19). Die mittlere Defektgröße betrug nach vier Monaten Implantationszeit in der mUP-Gruppe $7,33 \pm 2,08$ mm und in der mPP-Gruppe $2,33 \pm 4,04$ mm. Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen beobachtet werden ($p=0,13$). Bei einem Tier aus der mPP-Gruppe war der Defekt komplett verschlossen.

Bei den zwei Monate alten Tieren war der Defekt jeweils bei einem Tier in jeder Gruppe verschlossen (Abb. 4.20). Bei dem anderen Tier aus mUP- und mPP-Gruppe betrug der Defektdurchmesser entsprechend 4mm und 2 mm.

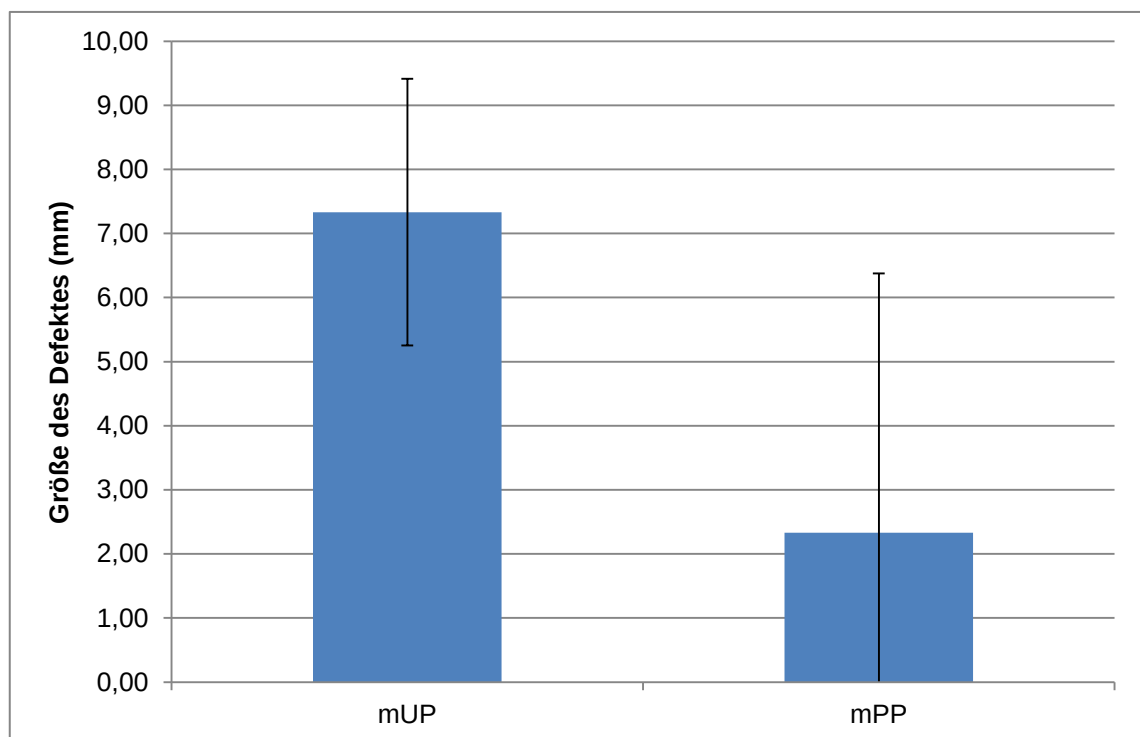


Abb. 4.19: Defektdurchmesser (mm) von mUP-, mPP-Netz und UP-Kontrollnetz nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

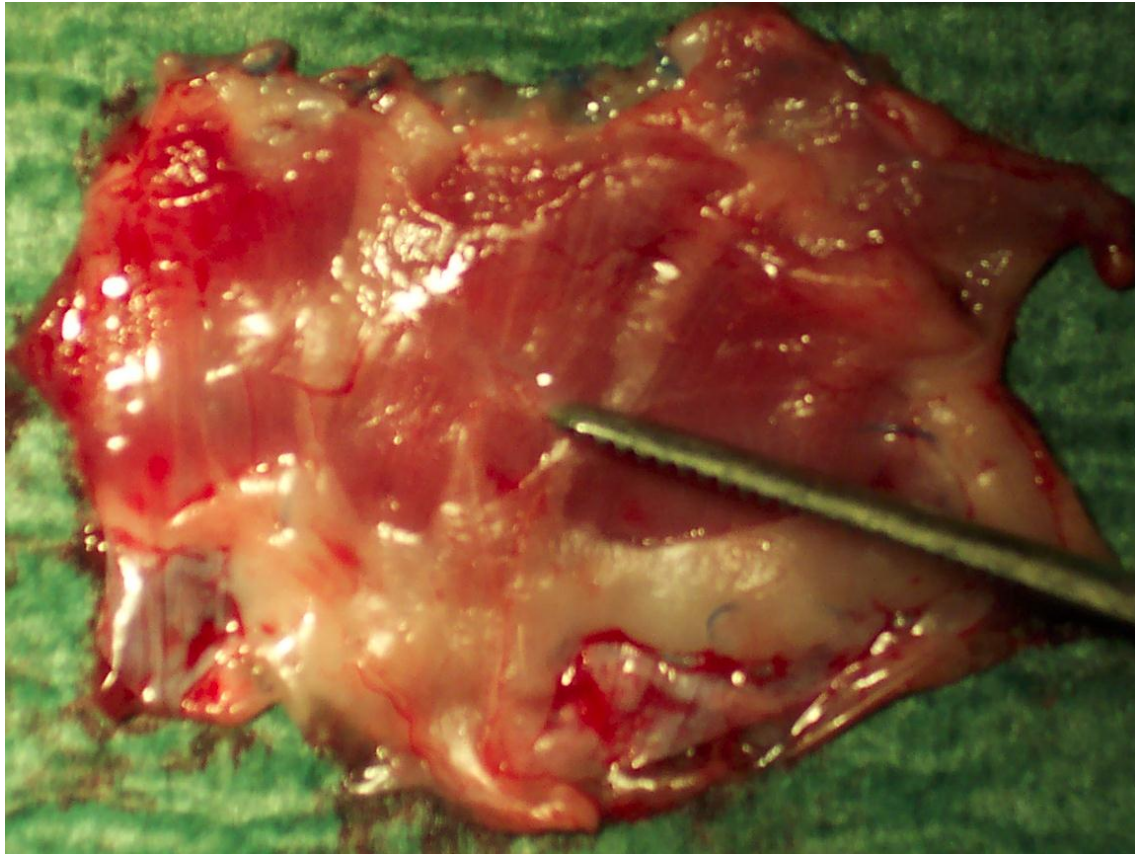


Abb. 4.20: Sicht von der thorakalen Seite auf das Zwerchfell eines mit mPP-Netz behandelten Tieres nach zwei Monaten Implantationszeit. Die Spitze vom Instrument zeigt auf einen verschlossenen Defekt

4.2.6 Histologie

Die histologische Untersuchung nach vier Monaten Implantationszeit zeigte eine nahezu identische entzündliche Begleitreaktion bei allen untersuchten Netzproben (Tab. 4.4). Im Defektbereich zeigte sich eine Vernarbung mit wenig Kollagen und mit besonders vielen elastischen Fasern (Abb. 4.21). In manchen Fällen wurde ein „pilzförmiger“ Vorfall des Leberparenchyms zwischen Zwerchfellmuskel im Defektbereich beobachtet (Abb. 4.22).

Die Entzündungsreaktion war bei allen Netzgruppen mittelmäßig und nahezu ohne Unterschied zwischen dem Defektareal, der Netzmitte und dem Netzrand mit einer geringfügigen Infiltration von Plasma- und Lymphozyten ausgeprägt. Eine minimale Granulozyteninfiltration wurde ausschließlich im Defektbereich festgestellt, allerdings ohne signifikanten Unterschied zwischen den drei Netzgruppen ($p=0,54$).

Fremdkörperriesenzellen waren nur in geringem Maße und hauptsächlich um die Netzfilamente lokalisiert.

Fibrose war bei allen Netzgruppen ohne signifikanten Unterschied mittelstark ausgeprägt. Im Randbereich aller Netzgruppen fand sich eine etwas vermehrte Fibrosereaktion (Abb. 4.23).

In untersuchten Netzproben wurden keine Nekrosen beobachtet. Bei einzelnen Netzproben konnte in der Netzmitte eine Verknöcherung festgestellt werden, am ehesten durch das Mitschneiden der Rippe bedingt. Weder zwischen der mUP- und mPP-Gruppe noch zwischen diesen beiden Gruppen und dem UP-Kontrollnetz konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p=0,15$).

Nach zwei Monaten Implantationszeit zeigte sich eine mittelstark ausgeprägte chronische Entzündungsreaktion (Tab. 4.5). Im Vergleich zu Netzpräparaten der vier Monate alten Tiere zeigte sich kein Unterschied in Bezug auf das Ausmaß der Fibrose, Fremdkörperriesenzellen-, Plasm-, Lymphozyteninfiltration, Nekrose und Verkalkungen. Lediglich die Granulozyteninfiltration wurde in minimaler Ausprägung nicht nur im Defektareal, sondern auch in der Netzmitte und am Netzrand sichtbar.

In allen Kontrollpräparaten vom Zwerchfell der Gegenseite waren keine Entzündungszellinfiltrate, Bindegewebsproliferate oder narbige Veränderung vorhanden.

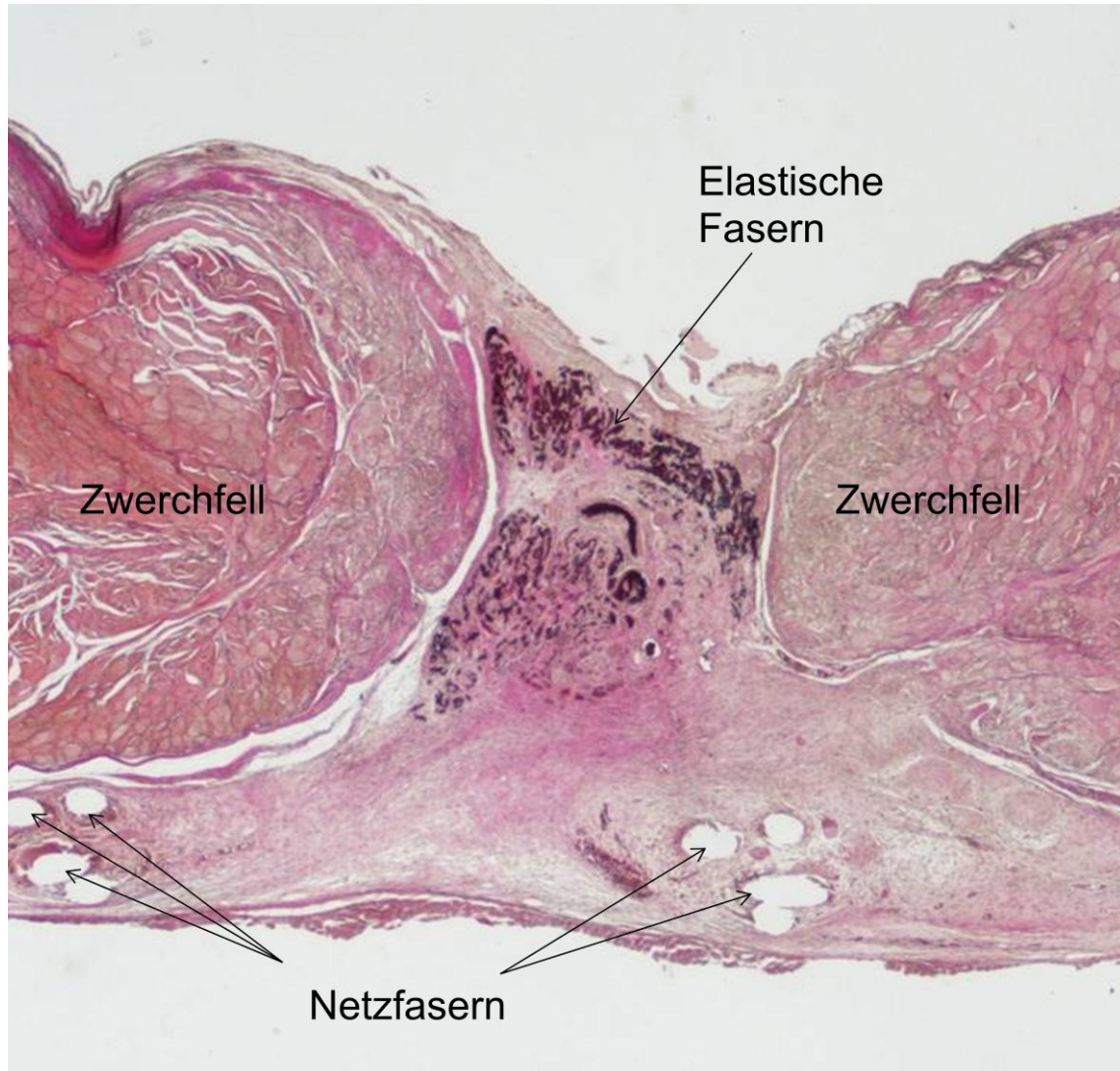


Abb. 4.21: Vernarbung im Defekt. Elastische Fasern sind schwarz gefärbt (EVG-Färbung, x40)



Abb. 4.22: Vorfall des Leberparenchyms in den eingesetzten Defekt zwischen Netzfasern (HE-Färbung, x100)

Tab. 4.4: Semiquantitativ gemessene Ergebnisse der histologischen Untersuchung von mUP- , mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Das Ausmaß jedes Merkmals wurde in vier Grade unterteilt (0=kein; 1=minimal; 2=mittelmäßig; 3=sehr ausgeprägt)

Variable	mUP	mPP	UP	p-Wert
Entzündung Defekt	2	2	2	0.54
Entzündung Neben	2	2	1	0.24
Entzündung Rand	2	1	1	0.19
Fremdkörperriesenzellen Defekt	1	1	1.5	0,85
Fremdkörperriesenzellen Neben	2	2	1	0.54
Fremdkörperriesenzellen Rand	1	0	0	0.62
Granulozyten Defekt	1	1	1	0.54
Granulozyten Neben	0	0	0	0.54
Granulozyten Rand	0	0	0	0.22
Lymphozyten Defekt	1	1	1	0.61
Lymphozyten Neben	1	1	1	1.00
Lymphozyten Rand	1	1	1	0.58
Plasmazellen Defekt	2	2	2	0.61
Plasmazellen Neben	2	2	1	0.54
Plasmazellen Rand	1	1	1	1.00
Fibrose Defekt	2	2	2	0.54
Fibrose Neben	2	2	2	0.61
Fibrose Rand	3	1	2	0.63
Verkalkungen Defekt	0	0	0	0.33
Verkalkungen Neben	3	3	3	0.15
Verkalkungen Rand	0	0	0	1.00
Nekrose Defekt	0	0	0	1.00
Nekrose Neben	0	0	0	1.00
Nekrose Rand	0	0	0	1.00

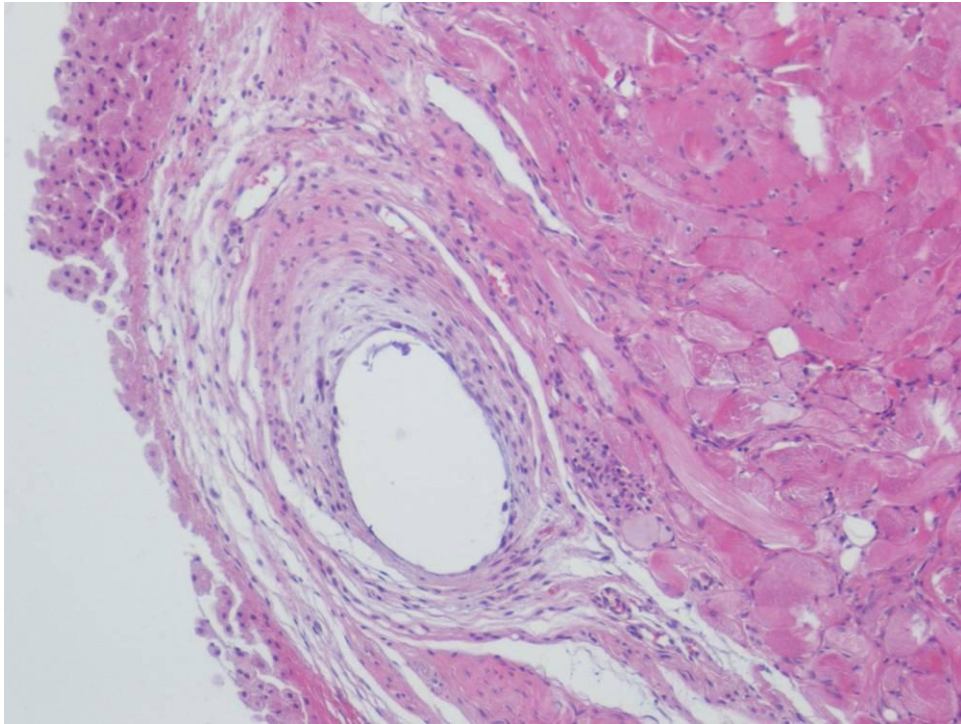


Abb. 4.23: Fibrosereaktion am Netzrand am ehesten um Prolenenahrt (HE-Färbung, x200)

Tab. 4.5: Semiquantitativ gemessene Ergebnisse der histologischen Untersuchung von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Das Ausmaß jedes Merkmals wurde in vier Grade unterteilt (0=kein; 1=minimal; 2=mittelmäßig; 3=sehr ausgeprägt)

Variable	mUP	mPP
Entzündung Defekt	2	2
Entzündung Neben	2	1.5
Entzündung Rand	1.5	1.5
Fremdkörperriesenzellen Defekt	1.5	1.5
Fremdkörperriesenzellen Neben	1.5	1
Fremdkörperriesenzellen Rand	0.5	0.5
Granulozyten Defekt	1	1
Granulozyten Neben	1	0.5
Granulozyten Rand	0.5	0.5
Lymphozyten Defekt	1	1
Lymphozyten Neben	1	1
Lymphozyten Rand	1.5	1
Plasmazellen Defekt	2	2
Plasmazellen Neben	2	1.5
Plasmazellen Rand	1	1.5
Fibrose Defekt	2	2.5
Fibrose Neben	2	2
Fibrose Rand	2	2
Verkalkungen Defekt	0	0
Verkalkungen Neben	0	0
Verkalkungen Rand	0.5	0
Nekrose Defekt	0	0
Nekrose Neben	0	0
Nekrose Rand	0	0

4.2.7 Immunhistochemische Aufbereitung

4.2.7.1 Proliferationsrate

Der Anteil Ki-67 positiver Zellen zeigte in drei Netzgruppen keinen signifikanten Unterschied ($p=0,06$) (Abb. 4.24). Im Defektbereich betrug der Mittelwert in der mUP-Gruppe $11,23 \pm 5,31\%$, in der mPP-Gruppe $16,98 \pm 5,41\%$ und in der UP-Kontrollgruppe $9,60 \pm 4,23\%$. Zwischen dem Defekt und dem Netzrand war die Proliferationsrate in der mUP-Gruppe etwa genauso hoch wie im Defektbereich, nämlich $11,06 \pm 6,39\%$. In der mPP- und UP-Kontrollgruppe dagegen waren die Werte etwas kleiner $11,24 \pm 6,70$ und $5,97 \pm 4,51$. Im Bereich des Netzrandes war der Mittelwert $15,28 \pm 4,97\%$ in der mUP-Gruppe, $11,14 \pm 0,64\%$ in der mPP-Gruppe und am kleinsten in der UP-Kontrollgruppe $7,14 \pm 4,68\%$.

Die Proliferationsrate im rechten Kontrollzwerchfell war $2,32 \pm 1,99\%$.

Die Abb. 4.25 stellt die Mittelwerte nach zwei Monaten Implantationszeit dar. Insgesamt ist die Proliferationsrate zu diesem Messzeitpunkt deutlich kleiner und nimmt nach weiteren zwei Monaten um mehr als das Doppelte zu.

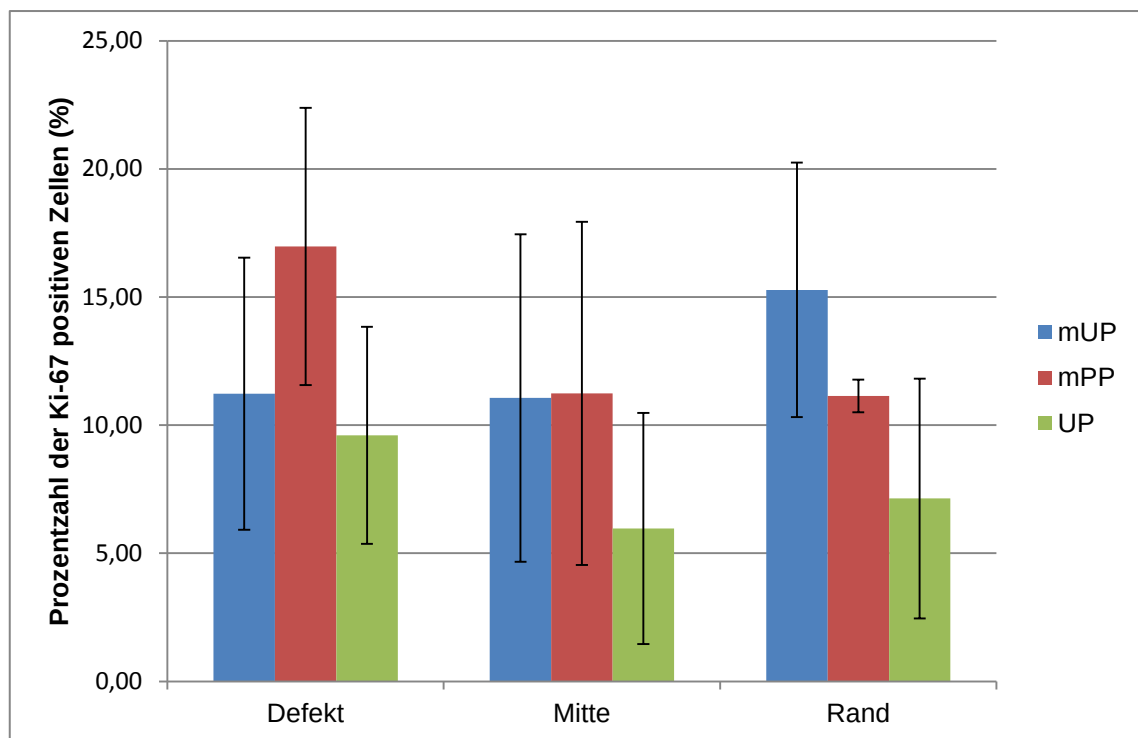


Abb. 4.24: Proliferationsrate von mUP-, mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

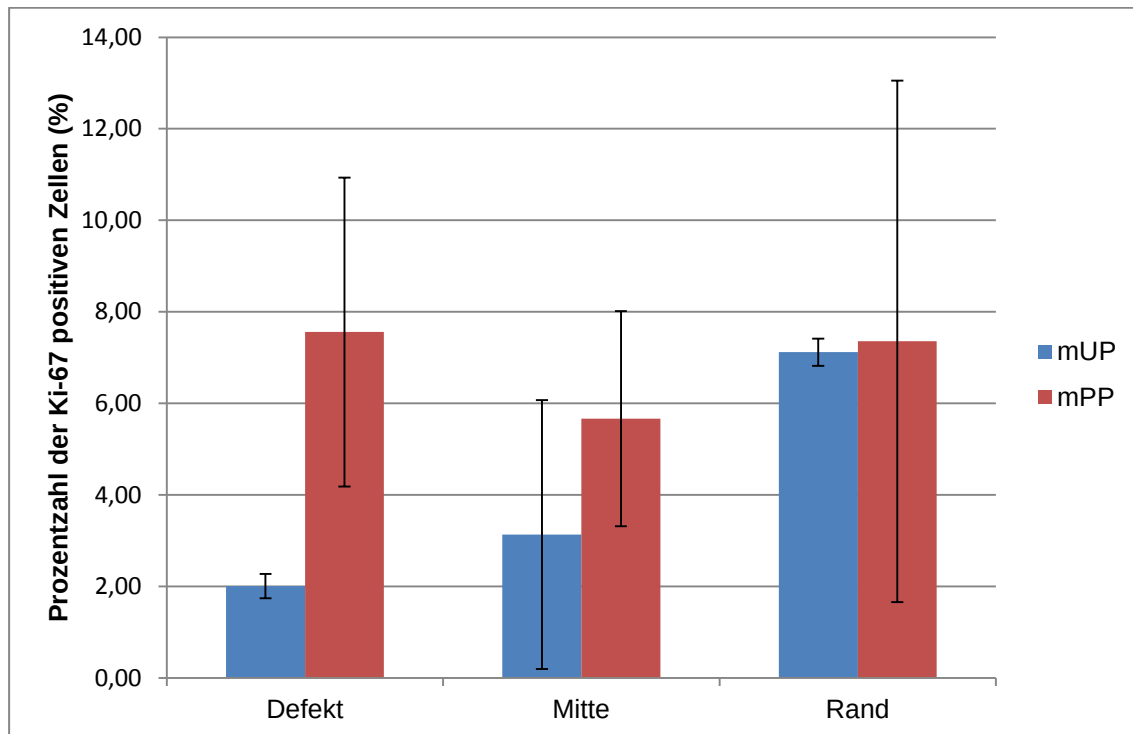


Abb. 4.25: Proliferationsrate von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.2.7.2 Apoptoserate

Der Anteil apoptotischer Zellen wurde graphisch in der Abb. 4.26 dargestellt. Es zeigte sich im Vergleich der drei Netzgruppen nach vier Monaten Implantationszeit kein signifikanter Unterschied ($p=0,51$). Die Apoptoserate im Defektbereich war in der mUP-Gruppe $1,84 \pm 0,71\%$, in der mPP-Gruppe $5,00 \pm 7,72\%$ und in der UP-Kontrollgruppe $2,20 \pm 3,19\%$. In der Netzmitte blieb die Apoptoserate in der mUP-Gruppe und UP-Kontrollgruppe fast unverändert, nämlich $3,53 \pm 2,21\%$ und $1,25 \pm 2,65\%$. In der mPP-Gruppe stieg sie dagegen um etwa 8% und betrug $12,87 \pm 20,95\%$. Am Netzrand blieb die Apoptoserate in der mUP-Gruppe praktisch unverändert bei $2,88 \pm 3,53\%$. In der mPP-Gruppe erreichte sie $13,07 \pm 19,36\%$. In der UP-Kontrollgruppe stieg sie auf $10,07 \pm 14,07\%$ an.

Zum Vergleich betrug die Apoptoserate im rechten Kontrollzwerchfell $6,61 \pm 3,37\%$.

Abb. 4.27 zeigt die Mittelwerte nach zwei Monaten Implantationszeit. Die Werte zu den folgenden Messzeitpunkten sind etwas höher als in Vergleichsgruppen nach vier Monaten Implantationszeit.

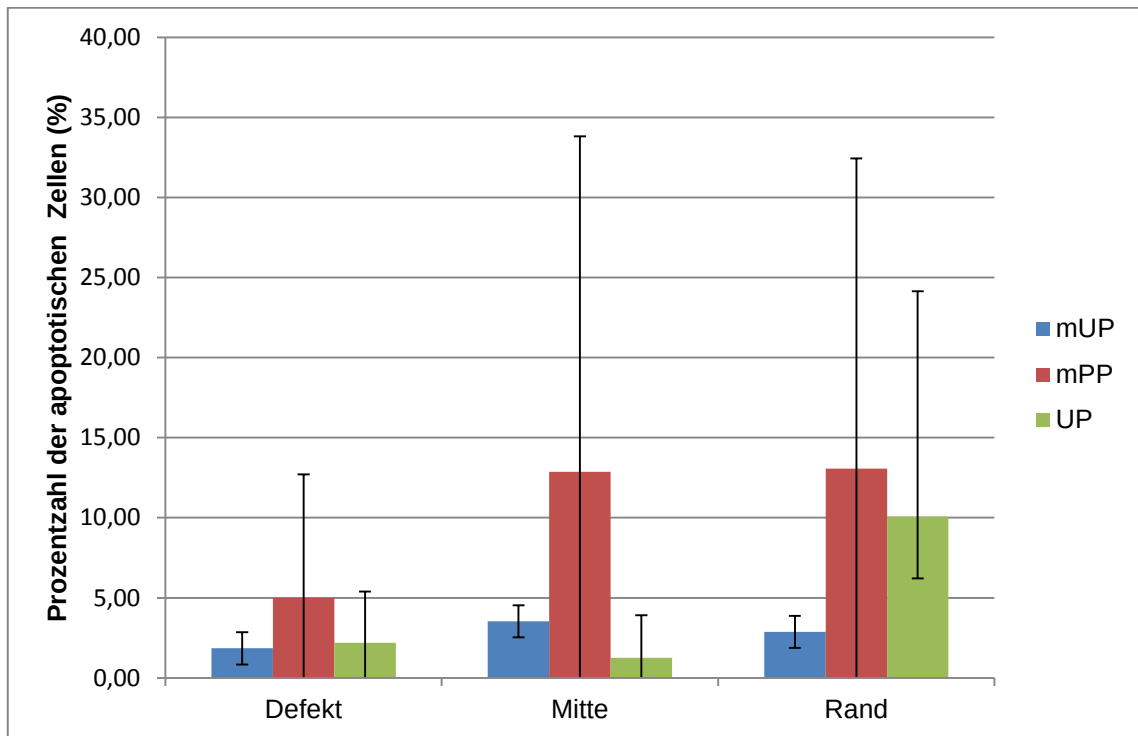


Abb. 4.26: Apoptoserate von mUP-,mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

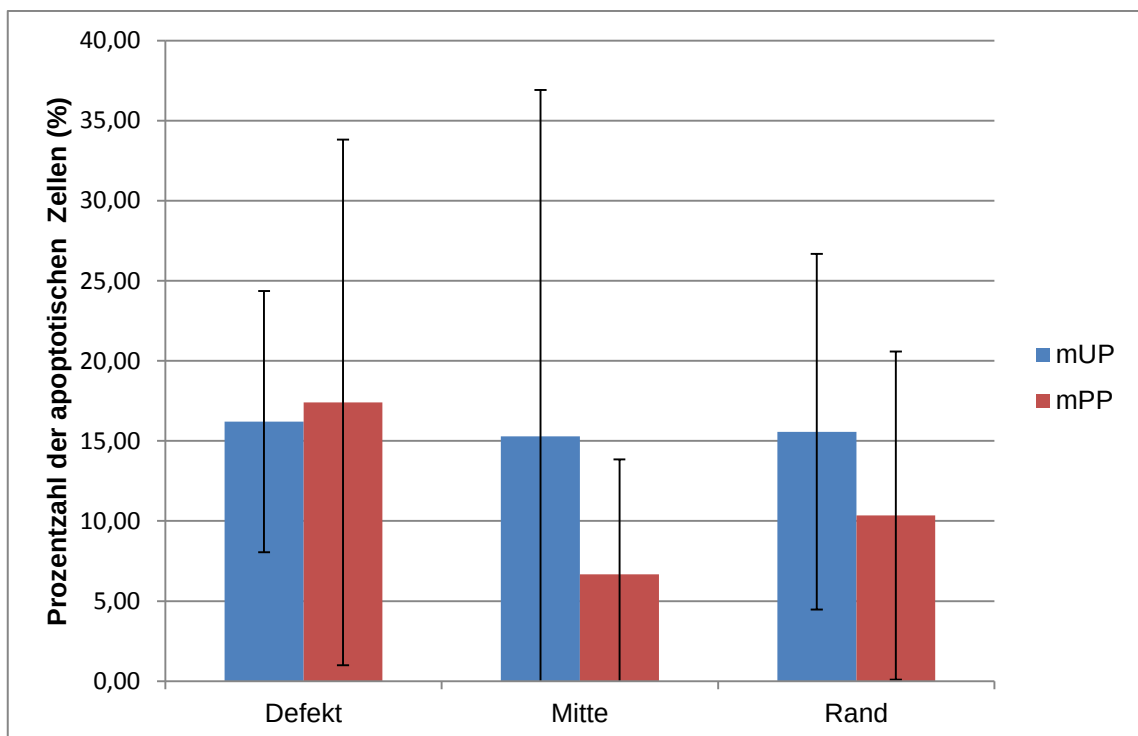


Abb. 4.27: Apoptoserate von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.2.7.3 Makrophagen

Bei der in der Abb. 4.28 dargestellten Gegenüberstellung der Makrophagenzellzahl zeigte sich nach vier Monaten Implantationszeit kein signifikanter Unterschied zwischen der mUP- und der mPP-Gruppe sowie der UP-Kontrollgruppe ($p=0,77$). Die Mittelwerte im Defektbereich waren für mUP-Netz $10,92 \pm 9,47\%$, für mPP-Netz $12,37 \pm 2,44\%$ und für UP-Kontrollnetz $11,28 \pm 5,43\%$. Im Vergleich zum Defektbereich war der Makrophagenanteil in der Netzmitte bei allen drei Netzgruppen minimal angestiegen und betrug für das mUP-Netz $12,55 \pm 4,24\%$, für das mPP-Netz $15,62 \pm 5,39\%$ und für das UP-Kontrollnetz $12,18 \pm 7,57\%$. Am Netzrand war die Makrophagenzellzahl wiederum bei allen drei Netzgruppen gesunken. In der mUP-Gruppe waren sie $10,71 \pm 2,87\%$, in der mPP-Gruppe $8,42 \pm 6,25\%$ und in der UP-Kontrollgruppe $6,77 \pm 3,87\%$.

Keine Makrophagen konnten im Kontrollzwerchfell der Gegenseite detektiert werden.

Abb. 4.29 zeigt den Vergleich der mUP- mit der mPP-Gruppe nach zwei Monaten Implantationszeit. In beiden Netzgruppen waren die Mittelwerte über drei untersuchte Netzbereiche etwas höher. Dies ist am ehesten auf eine erhöhte Entzündungsreaktion in früheren Monaten zurückzuführen.

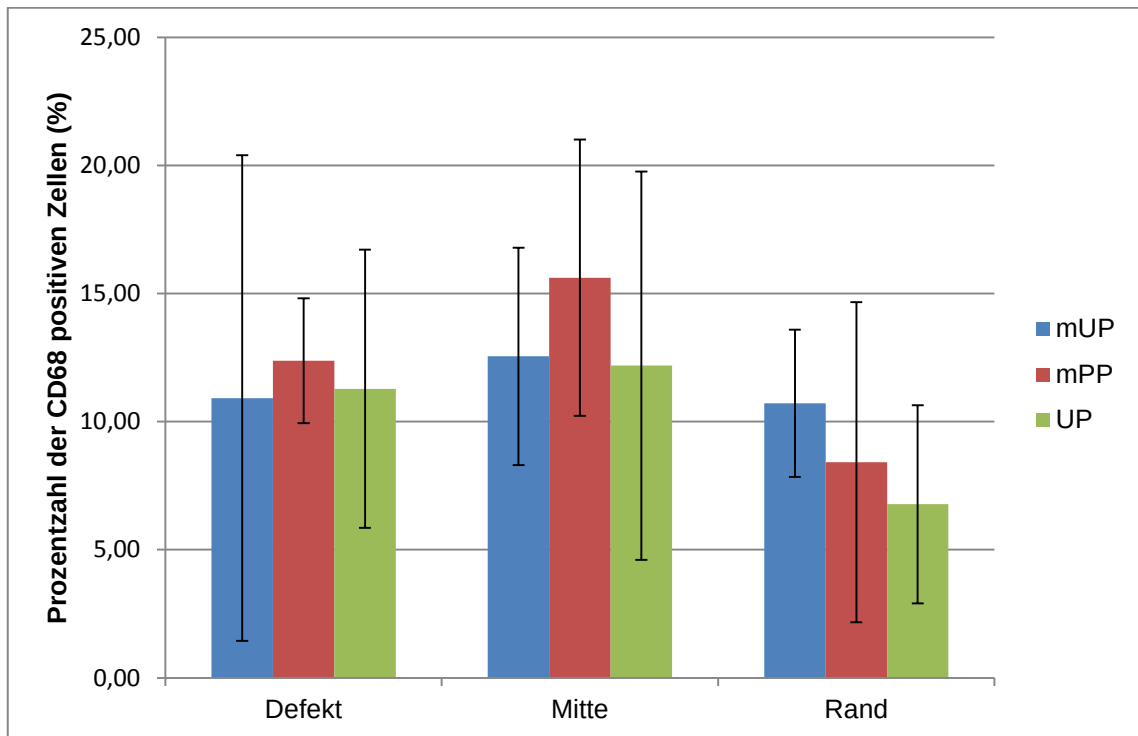


Abb. 4.28: Prozentzahl der CD68 positiven Zellen von mUP-,mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

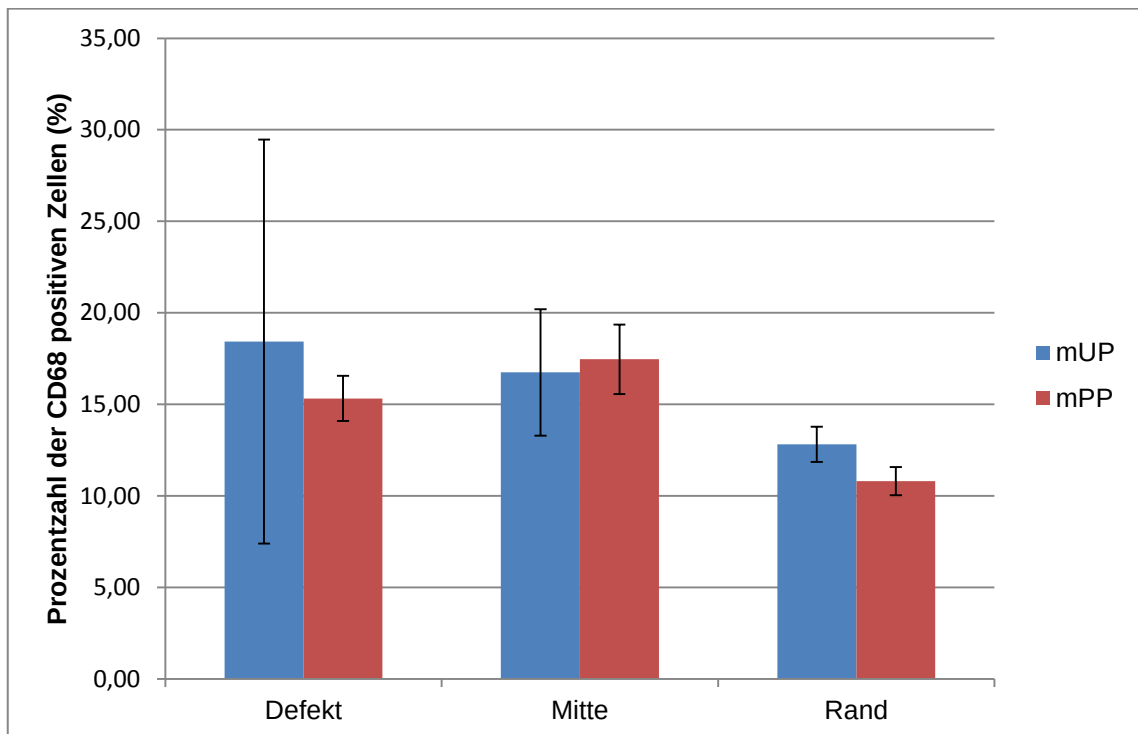


Abb. 4.29: Prozentzahl der CD68 positiven Zellen von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.2.7.4 Myofibroblasten

Der Anteil der Myofibroblasten nach vier Monaten Implantationszeit, die mittels SMA markiert wurden, ist in der Abb. 4.30 dargestellt. Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen den drei Netzgruppen gesehen ($p=0,54$). Im Defektbereich war der Anteil der SMA positiven Zellen in der mUP- und der mPP-Gruppe mit $2,30\pm2,35\%$ und $2,39\pm1,21\%$ fast gleich. In der UP-Kontrollgruppe betrug er $3,57\pm3,83\%$. In der Netzmitte zeigte die mUP-Gruppe mit $1,80\pm1,06\%$ den geringsten Anteil an SMA positiven Zellen. Den höchsten Wert mit $8,96\pm6,12\%$ zeigte die mPP-Gruppe. Der Wert für die UP-Kontrollgruppe lag bei $3,06\pm3,10\%$. Am Netzrand stieg der Anteil der SMA positiven Zellen in der mUP-Gruppe und betrug $5,30\pm2,40\%$. In der mPP-Gruppe sank der Wert um mehr als 6% und betrug $2,77\pm1,79\%$. Der Wert für UP-Kontrollgruppe lag bei $2,49\pm2,67\%$.

Die Prozentzahl der SMA positiven Zellen im Kontrollzwerchfell der Gegenseite lag bei $8,03\pm1,79\%$.

Die Abb. 4.31 stellt die Mittelwerte nach zwei Monaten Implantationszeit dar.

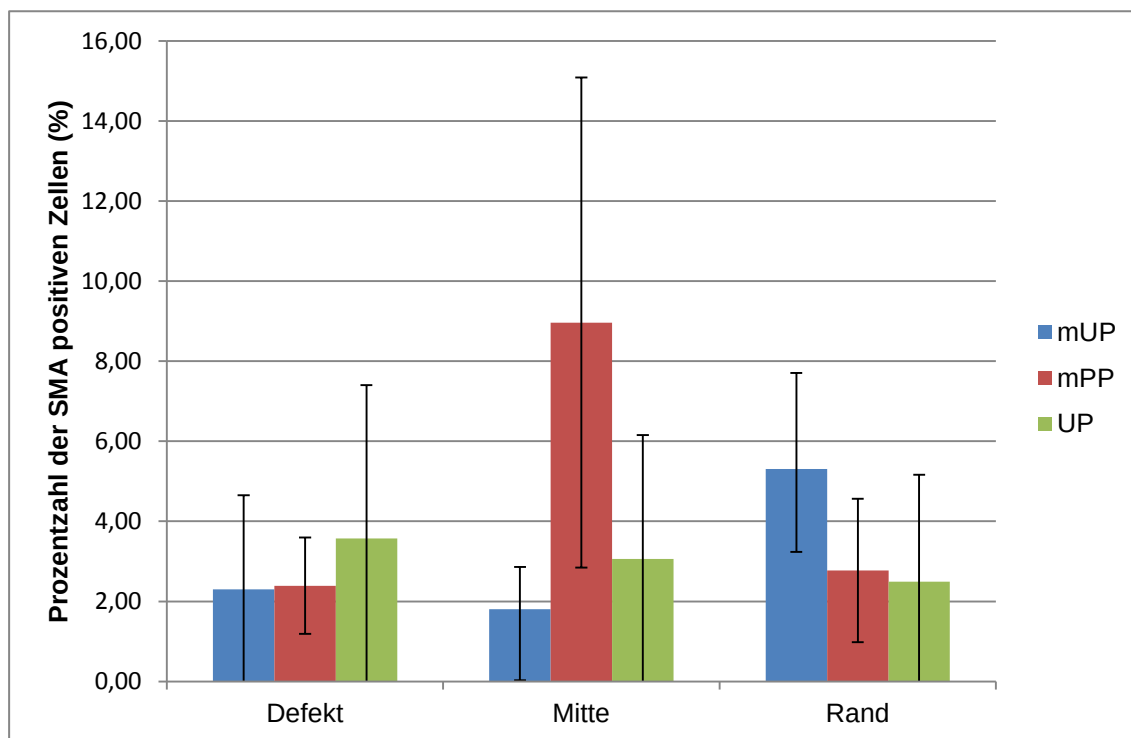


Abb. 4.30: Prozentzahl der SMA positiven Zellen von mUP-,mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

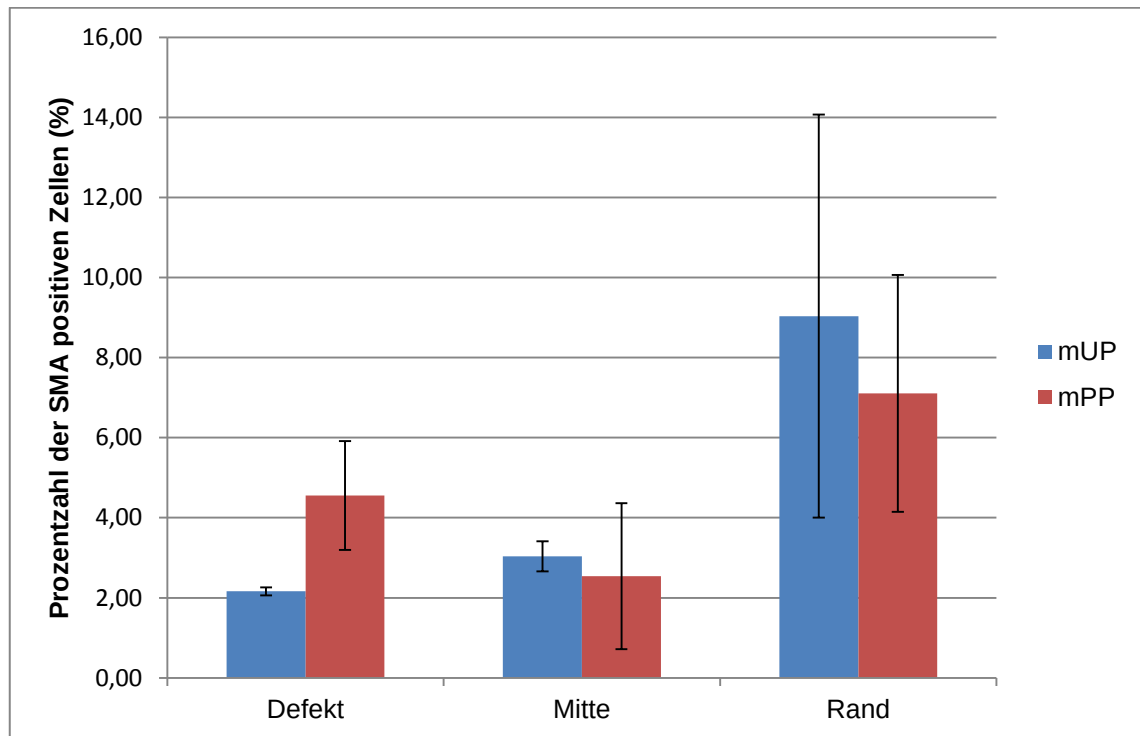


Abb. 4.31: Prozentzahl der SMA positiven Zellen von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.2.7.5 Kollagen I zu Kollagen III Quotient

Der Vergleich des Kollagen I zu Kollagen III Quotienten zwischen drei Netzgruppen nach vier Monaten Implantationszeit wurde graphisch in der Abb. 4.32 dargestellt. Es wurden keine signifikante Unterschiede zwischen drei untersuchten Netzgruppen festgestellt ($p=0,77$). Den höchsten Kollagen I Anteil im Bereich des Defektes zeigte die mUP-Gruppemit $17,81 \pm 21,27$. In der mPP-Gruppe bzw. UP-Kontrollgruppe war der Kollagen I/III Quotient im Defektbereich etwas kleiner mit $10,77 \pm 6,14$ bzw. $10,86 \pm 5,75$. In der Netzmitte sank der Kollagen I Anteil in der mUP-Gruppe stark und betrug $4,51 \pm 1,75$. In der mPP-Gruppe ist der Kollagen I Anteil in der Netzmitte mit $7,26 \pm 1,78$ auch etwas gesunken. Dagegen stieg der Quotient in der UP-Kontrollgruppe mit $12,78 \pm 7,06$ an. Am Netzrand stieg der Kollagen I/III Quotient in allen drei Gruppen erneut und betrug für die mUP- $7,48 \pm 2,07$, für die mPP-Gruppe $12,21 \pm 10,66$ und für die UP-Kontrollgruppe $13,92 \pm 10,31$.

Der Kollagen I/III Quotient im Kontrollzwerchfell der rechten Seite betrug $9,69 \pm 5,82$.

Die Abb. 4.33 stellt den Kollagen I/III Quotienten nach zwei Monaten Implantationszeit dar. Zu diesem Zeitpunkt war der Kollagen I Anteil in der mUP- und mPP-Gruppe im Defekt und in der Mitte noch nicht so stark ausgebaut wie nach vier Monaten Implantationszeit. Am Netzrand war dieser Wert in der mPP-Gruppe annähernd so groß wie nach vier Monaten Implantationszeit. In der mUP-Gruppe war der Quotient fast doppelt so groß wie nach vier Monaten Implantationszeit.

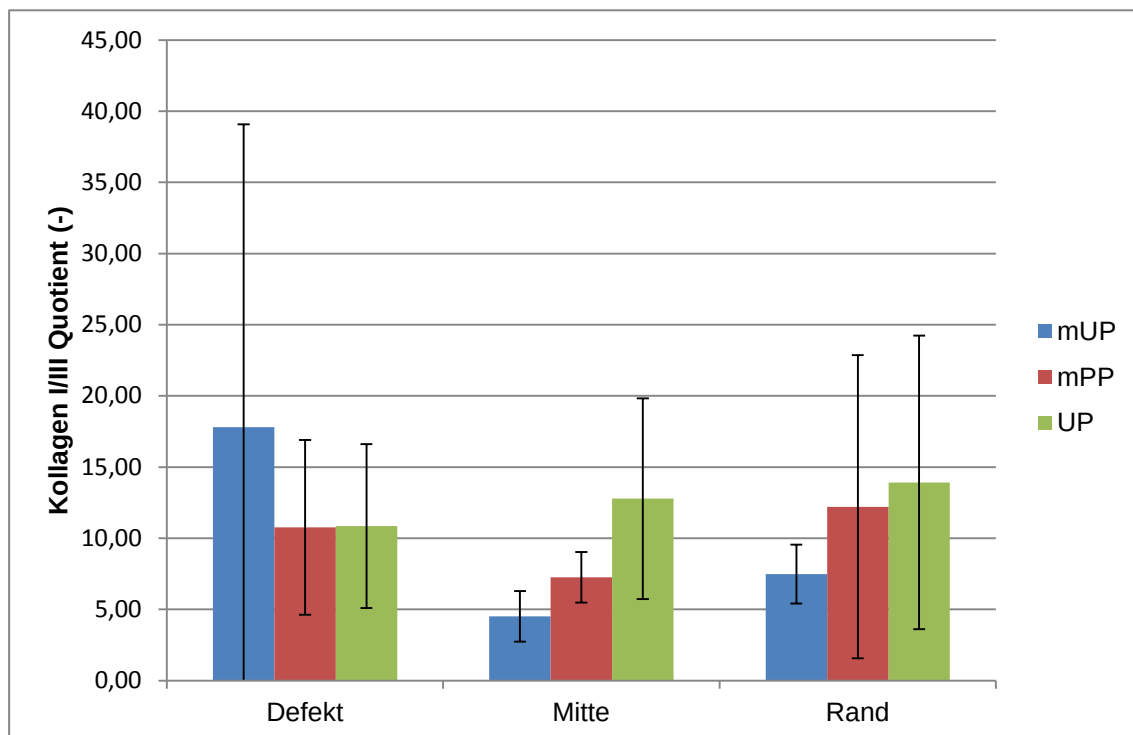


Abb. 4.32: Kollagen I zu Kollagen III Quotient von mUP-,mPP-Netz und UP-Kontrollnetz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach vier Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

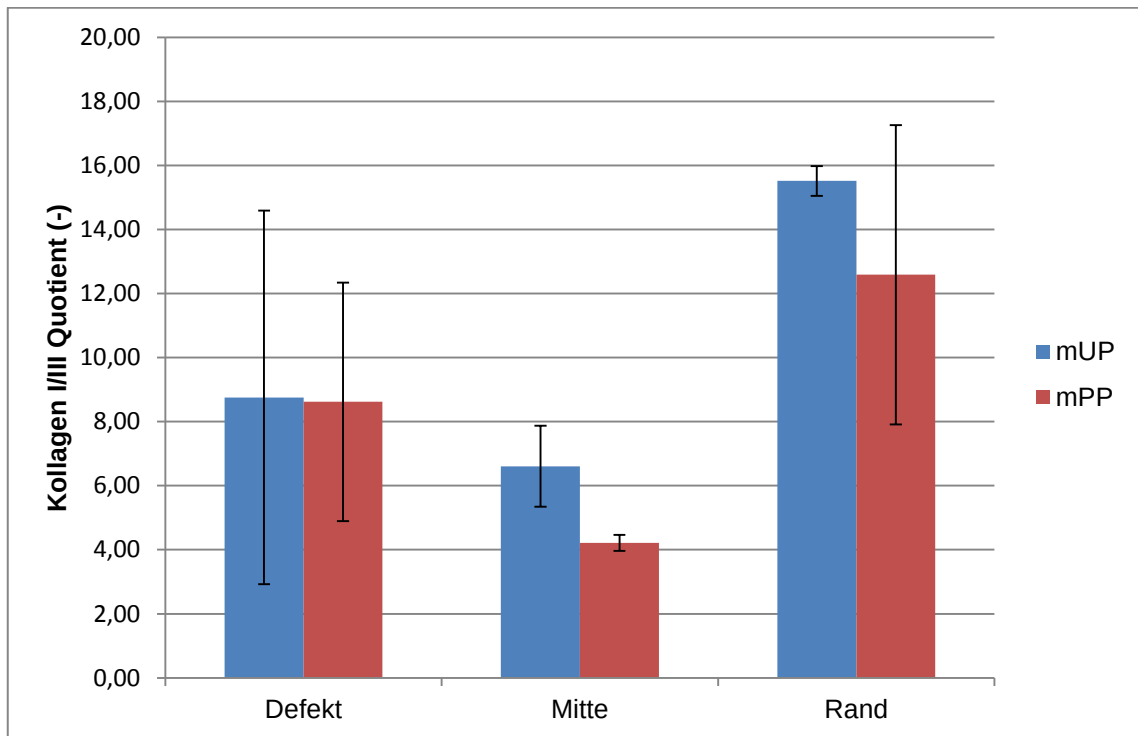


Abb. 4.33. Kollagen I zu Kollagen III Quotient von mUP- und mPP-Netz im Defekt, in der Netzmitte und am Netzrand nach zwei Monaten Implantationszeit. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

In der vorliegenden Arbeit wurden *in vivo* die mit PLGA/NCO-sP(EO-stat-PO)-beschichteten Netze in Kaninchen untersucht. Die Biokompatibilität wurde sowohl makro- als auch mikroskopisch bewertet. Bei der makroskopischen Analyse konnte eine erfolgreiche Netzintegration in das umliegende Gewebe nachgewiesen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die verwendete Oberflächenbeschichtung keinen Einfluss auf die Adhäsionsbildung im Vergleich zum unbeschichteten Kontrollnetz hatte. Eine analoge Biokompatibilität im Vergleich zum Kontrollnetz konnte auch mikroskopisch durch Analyse von Fibrose, Nekrose, Entzündung, Proliferation und Apoptose festgestellt werden. Radiologische Untersuchungen haben außerdem eine gute Zwerchfellbeweglichkeit auf der Seite der Implantation bei beiden modifizierten Netzgruppen gezeigt. Außerdem bewies sich der Einsatz von modifizierten Netzen für die Heilung von Zwerchfelldefekten als vielversprechend. Sowohl mUP- als auch mPP-Netze resultierten in vielen Fällen in einem kompletten Defektverschluss.

5 Diskussion

CDH ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die einer schnellen diagnostischen und therapeutischen Intervention bedarf. Die hohe Mortalitätsrate bei Patienten mit CDH ist nicht nur durch die Größe des Zwerchfelldefektes bedingt, sondern vielmehr durch begleitende Anomalien wie pulmonale Hypoplasie, persistierende pulmonale Hypertension, Herzfehler und weitere Faktoren (Lally et al., 2007).

Die großen Zwerchfelldefekte sollen mit Hilfe eines Biomaterials geschlossen werden, um eine spannungsfreie Rekonstruktion zu erreichen (de Buys Roesingh & nh-Xuan, 2009). Zur Deckung des Zwerchfelldefektes können verschiedene Biomaterialien eingesetzt werden (Clark et al., 1998). Trotz der Fortschritte in der Entwicklung von Biomaterialien, besteht weiterhin der Bedarf an funktionell verbesserten Netzen, um sowohl die Komplikations- als auch die Rezidivrate zu reduzieren.

Diese Arbeit stellt die *in vivo* Untersuchung auf Biokompatibilität von PLGA/sP(EO-*stat*-PO)-beschichteten Netzen dar. Da sich in vorausgegangenen Studien am Tierversuchsmodell UP als ein mechanisch funktionelles wie auch biokompatibles und damit geeignetes Netz für den Einsatz am Zwerchfell erwiesen hat (Böhm et al., 2010a; Böhm et al., 2010b), wurde in den gezeigten Versuchen dieses Netz als Basisnetz für die zu untersuchende Beschichtung verwendet. Der resorbierbare Anteil des UP-Netzes sollte hauptsächlich zwei Ziele erfüllen: zum einen sollte es nach der Implantation zurückbleibendes Kunststoffmaterial minimalisieren, zum anderen die Fremdkörper- und Fibrosereaktion verbessern (Bellon et al., 2007). Zusätzlich wurde ein reines PP-Netz mit derselben Beschichtung oberflächenmodifiziert. Dieses Netz wurde aus UP hergestellt, wobei der resorbierbare Anteil entfernt wurde. Der resorbierbare Anteil wurde weggelassen, mit der Aussicht auf eine UP-vergleichbare Qualität des Netzes und einer möglichen Ersparnis an implantiertem Kunststoffmaterial.

In dieser Arbeit wurden neben der *in vivo* Biokompatibilität zusätzlich die Defektheilung, die Veränderung der Netzgröße sowie die Zwerchfellbeweglichkeit bei der Implantation von oberflächenmodifizierten Netzen am Zwerchfell unter konstanten Scherbedingungen in wachsenden Kaninchen untersucht.

Biokompatibilität von modifizierten Netzen

Der chirurgische Verschluss des Zwerchfelldefektes ist eine Herausforderung für die Kinderchirurgen. Wenn der Defekt zu groß ist, kann er nicht primär verschlossen werden. Seit Jahrzehnten werden zur Behandlung von solchen großen Zwerchfelldefekten verschiedene Kunststoffnetze erfolgreich eingesetzt. Wie die „CDH Study Group“ berichtete, benötigten 48,3% der operierten Kinder mit CDH ein Biomaterial zum Verschluss des Zwerchfelldefektes (Tsao et al., 2010). Durch verbesserte Biomaterialien sowie einen Fortschritt auf dem Gebiet der Intensivmedizin konnten zwar Sterblichkeits- und Rezidivrate deutlich gesenkt werden (Lally et al., 2007; Logan et al., 2007), dennoch zeigen Langzeitstudien, dass es trotz der Vielfalt an Kunststoffnetzen häufig zu netz- und materialspezifischen Komplikationen kommt (Moss et al., 2001; Grethel et al., 2006; St Peter et al., 2007). Insofern besteht weiterhin der Bedarf an funktionell verbesserten Netzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz von zwei modifizierten Netzen bei einem Zwerchfelldefekt in Kaninchen untersucht. Diese Netzmodifizierung ermöglicht im nächsten Schritt verschiedene Wirkstoffe kovalent wie auch nicht kovalent in vielfacher Menge an sowie in das Netz zu integrieren. Dies ist das Endziel unserer chemischen Netzveränderung. Die Biokompatibilität der modifizierten Netze wurde dabei unter makro- und mikroskopischen Gesichtspunkten analysiert. Unabhängig von der Art des eingesetzten Netzes waren die Tiere klinisch unauffällig, gediehen gut und verdoppelten ihr Gewicht innerhalb von vier Monaten. Makroskopisch zeigte sich eine gute Integration in das umliegende Zwerchfellgewebe.

Aus der Literatur ist bekannt, dass intraperitoneal eingesetzte Fremdmaterialien durch eine Reaktion des Peritoneums Adhäsionen auslösen (Treutner & Schumpelick, 2000). Halm et al. evaluierten Patienten mit einem primären intra- bzw. präperitonealen Einsatz von Kunststoffnetzen (93% waren Polypropylen-Netze) und fanden, dass intraperitoneal eingesetzte Materialien eine signifikant höhere Adhäsionsrate im Vergleich zu präperitoneal eingesetzten Netzen auslösen (62% vs. 26%), was zu einer komplikationsreichen Adhäsioolyse, perioperativen Komplikationen (76% vs. 29%), Dünndarmresektionen (20% vs. 0%),

enterokutanen Fisteln (5% vs. 0%) und postoperativen Infektionen (26% vs. 4%) führte (Halm et al., 2007).

In Abhängigkeit von der Tierart, dem Inzisionsort und der Implantationszeit wurde bei den intraperitoneal eingesetzten Prolene®- und UP-Netzen Adhäsionen mit Einbezug von 0 bis 90% der Netzoberfläche beschrieben (Novitsky et al., 2007; Schug-Pass et al., 2008; Bellon et al., 2008; Junge et al., 2009; Schreinemacher et al., 2009). Jansen et al. haben eine vergleichbare adhäsive Reaktion mit Einbezug von der Leber, dem Magen und Omentum majus beim Einsatz von UP und Prolene® am Zwerchfell beschrieben (Jansen et al., 2007).

Die Oberflächenmodifizierung von Biomaterialien ist ein wichtiger Faktor in der Beeinflussung der Gewebsintegration und der Biokompatibilität des implantierten Materials (Salata, 2004). *In vitro* Untersuchungen haben eine effektive Prävention der Proteinadsorption und Zelladhäsion durch die Beschichtung mit NCO-sP(EO-stat-PO) gezeigt (Groll et al., 2005a; Groll et al., 2005b). Auch beim Kontakt mit Vollblut weist diese Beschichtung antiadhäsive Eigenschaften auf (Hoffmann et al., 2006). Gleichzeitig kann man diese Beschichtung mit weiteren Wirkstoffen funktionalisieren und dadurch eine spezifische Zelladhäsion beeinflussen (Groll et al., 2005b; Groll et al., 2005c; Grafahrend et al., 2011). Dabei bewahrt die NCO-sP(EO-stat-PO)-Beschichtung konfigurationsspezifische biochemische Eigenschaften des angekoppelten Proteinmoleküls (Fiedler et al., 2011). Zusätzlich reduziert diese Beschichtung bakterielle Adhäsionen und hat somit eine antibakterielle Wirkung (Groll et al., 2009). Auch die PLGA/sP(EO-stat-PO) weist *in vitro* sowohl proteinantiadsorptive als auch zell-antiadhäsive Eigenschaften auf und kann auch durch Modifizierung mit zusätzlichen Wirkstoffen spezifische Zelladhäsion auslösen (Grafahrend et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Eigenschaften zum ersten Mal *in vivo* untersucht. Im ersten Versuchsteil wurden UP- und PP-Netze mit PLGA/sP(EO-stat-PO) beschichtet und auf Biokompatibilität, Defektheilung, Adhäsionsbildung und Beeinflussung der Zwerchfellbeweglichkeit untersucht. Im zweiten Versuchsteil wurden mit PLGA/sP(EO-stat-PO) beschichtete UP- und PP-Netze mit einem unbeschichteten UP-Netz auf Biokompatibilität, Defektheilung, Adhäsionsbildung und Netzschrumpfung verglichen. Sowohl im ersten als auch im zweiten Versuch wurden zwischen den Netzen keine Unterschiede bezüglich

der adhäsiven Reaktion beobachtet. Nach vier Monaten Implantationszeit war die Adhäsionsbildung vor allem zwischen dem Netz und der Leber sehr stark ausgebildet, sodass nur durch Abtrennen mit einem scharfen Messer das Netz freigelegt werden konnte. Zum einen kann es daran liegen, dass zum Zeitpunkt der Explantation die obengenannte Beschichtung komplett resorbiert wurde. Zum anderen lagen die Netze in einem direkten Kontakt mit der Leber. Durch ständige Scherbewegungen des am Zwerchfell befestigten Netzes könnte es mit der Zeit zu Lacerationen der Leber geführt haben, was ein Einwachsen der Leber zwischen Netzporen, wie in manchen Fällen beobachtet wurde, erklären kann. Außerdem kann eine starke peritoneale Reaktion, ausgelöst durch einen Fremdkörper, antiadhäsive Eigenschaften der Beschichtung überwinden und somit zur Adhäsionsbildung führen.

Bei der intraperitonealen Implantation der mit NCO-sP(EO-stat-PO) beschichteten Polypropylenetze und Kontrollnetze (unbeschichtetes Polypropylenetz) wurden einige Adhäsionen bei den Kontrollnetzen beobachtet während kaum Adhäsionen bei NCO-sP(EO-stat-PO) beschichteten Polypropylenetzen festgestellt wurden. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (Grafarend et al., 2011).

Ein wichtiger mikroskopischer Parameter für die Biokompatibilität von Netzen ist die Fibrose. Bei der Fibrosereaktion spielt vor allem das Kollagen eine entscheidende Rolle. Kollagen ist eins der wichtigsten Proteine des Körpers und stellt das wichtigste Skleroprotein der Extrazellulärmatrix dar. Während der physiologischen Wundheilung werden unreife dünne Kollagen III Fasern durch reife dicke Kollagen I Fasern ersetzt. Birk und Mayne stellten in ihrer Studie über Kollagenveränderungen während der Sehnenentwicklung fest, dass der Kollagen I/III Quotient die Reißfestigkeit der Narbe widerspiegelt. Folglich korrespondiert ein verminderter Quotient des Typ I zu Typ III Kollagen mit einer reduzierten Gewebsstabilität (Birk & Mayne, 1997). Wie die Tierstudie von Junge et al. zeigte, induzieren Kunststoffnetze einen verminderte Kollagen I/III Quotienten im Vergleich zum einfachen Nahtverschluss nach der Laparotomie (Junge et al., 2002). Weitere Versuche der Kunststoffnetze haben einen höheren Kollagen I/III Quotienten der großporigen Netze im Vergleich zu kleinporigen Netzen gezeigt (Greca et al., 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden,

dass weder die Oberflächenbeschichtung mit PLGA/NCO-sP(EO-*stat*-PO) noch die Art des Netzes einen Einfluss auf den Kollagen I/III Quotienten hatte. Trotz fehlender statistischer Signifikanz konnte beim Vergleich der drei untersuchten Netzbereiche (Netzrand, Netzmitte und Defekt) ein tendenziell höherer Quotient im Defekt festgestellt werden.

Die Gewebsreaktion auf implantierte Netze zeigte eine moderate Entzündungsform mit einer Beschränkung auf perifilamentäre Strukturen ohne signifikanten Unterschied zwischen untersuchten Netzen. Wie aus der Abb. 4.2 ersichtlich ist, sind die Netze in das umliegende Gewebe sehr gut integriert.

Im ersten Versuchsteil zeigten sich in manchen Proben granulomatöse Herde. Eine derartige Granulombildung ist für parasitäre Erkrankungen der Versuchstiere typisch. Klinisch waren die Tiere unauffällig und gediehen gut. Weder Parasiten noch andere infektiöse Ursachen konnten gefunden werden. Aufgrund von diesen Befunden wurde eine zweite Versuchsreihe untersucht, um einen möglichen Einfluss der Oberflächenbeschichtung auszuschließen. In diesem Versuchsteil konnten weder granulomatöse Herde noch andere atypische Formationen gefunden werden. Obwohl die Ursache für die Granulome im ersten Versuch nicht festgestellt werden konnte, wurde der Einfluss des eingesetzten modifizierten Netzes durch den zweiten Versuch ausgeschlossen.

Vernachlässigt man beim ersten Versuch die ausgeprägte granulomatöse Reaktion und zieht nur die perifilamentäre Reaktion des Netzes in Betracht, so ist diese als geringgradig einzustufen. Wie auch im zweiten Versuch zeigten der Defekt und dem Defekt angrenzende Areale eine vergleichbare Histologie. Nur am Rand des Netzes bildete sich eine etwas stärkere fibrotische Reaktion aus, die sich auf einen zusätzlichen Einfluss der Prolene-Naht zurückführen lässt.

Die Makrophagen spielen eine zentrale Rolle in der Antwort des Gewebes auf ein implantiertes Material und somit in der Biokompatibilität. Sie sind nicht nur in die Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplementkaskade involviert, sondern produzieren auch zahlreiche Mediatoren, die Proliferation und Proteinsynthese anderer an der Entzündungsreaktion und Wundheilung beteiligten Zellen induzieren (Anderson, 1988). Die immunhistochemische Untersuchung von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen mittels CD68 Marker ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Netzgruppen. Obwohl UP-Netze

einen zusätzlichen resorbierbaren Anteil im Vergleich zu PP enthielten, was einen erhöhten Anteil an CD68 positiven Zellen erwarten ließ, war nach vier Monaten Implantationszeit kein Unterschied zwischen den beiden Netzgruppen zu sehen. Wie Bellon et al. beschrieben haben, klingt die am Anfang ausgeprägtere Makrophagenreaktion bei teilresorbierbaren Netzen allmählich ab, so dass es nach 90 Tagen keinen Unterschied zwischen nicht resorbierbaren und teilresorbierbaren Netzen gibt (Bellon et al., 2007; Bellon et al., 2008).

Bei der Untersuchung des Zellumsatzes mittels Ki-67 Marker (Proliferationsrate) und Tunel-Kit (Apoptoserate) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen untersuchten Netzgruppen gefunden.

In Übereinstimmung mit Junge et al., der ebenfalls UP und reines PP in Raten untersucht hat, war die Reaktion auf implantierte Netze moderat ausgeprägt (Junge et al., 2005). Zu beachten ist, dass verschiedene Tierarten (Ratte/Kaninchen) unterschiedlich auf einen Fremdkörper reagieren können. In der Gruppe der mPP-Netze konnten leicht erhöhte Werte der Proliferations- und Apoptoserate im Vergleich zur mUP-Gruppe beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die das reine UP-Netz mit identischem PP oder mit vergleichbarem leichtgewichtigen Netz untersucht haben (Junge et al., 2005; Schug-Pass et al., 2008). Die Oberflächenmodifikation hat in diesem Versuch keinen signifikanten Einfluss auf den Zellumsatz gezeigt. Novitsky et al. haben gezeigt, dass die apoptotischen Werte der leichtgewichtigen Netze sehr nah an physiologischen Werten liegen (Novitsky et al., 2008). Dies konnte in den vorliegenden Versuchen bestätigt werden.

Zwerchfellbeweglichkeit von modifizierten Netzen

Die Untersuchung der Zwerchfellbewegung wurde mittels radiologischer Durchleuchtung durchgeführt. Mit dieser Methode kann man gut Zwerchfellbewegungen qualitativ und quantitativ untersuchen (Yi et al., 2011). Da sich die Zwerchfellbewegung unter mechanischer Ventilation und Spontanatmung unterscheidet (Hubmayr et al., 1987), wurde die radiologische Untersuchung zwar unter Einleitung der Narkose, aber mit Abkopplung des Beatmungsschlauches und unter Spontanatmung durchgeführt. Obwohl man bei einem wachsenden Tier mit einer Abnahme der Atemfrequenz rechnen muss, war diese in beiden Tiergruppen im Verlauf von vier Monaten konstant. Die Zwerchfellexkursion nahm

dagegen etwas zu, was auf eine Zunahme der Atemvolumina hindeutet. Das Verhältnis der rechten zur linken Zwerchfellseite blieb in der mPP-Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum von vier Monaten unverändert, was auf einen relativ kleinen Einfluss des Kunststoffnetzes auf die Zwerchfellbewegung schließen lässt. In der mUP-Gruppe dagegen sank die Zwerchfellbewegung der linken Netzseite im Vergleich zur rechten Kontrollseite um mehr als das Doppelte. Zum einen kann das auf eine Einschränkung der Bewegung durch das Netz hindeuten, zum anderen war schon bei präoperativen Ausgangswerten die Beweglichkeit der linken Seite deutlich höher als die der rechten. Somit war eine starke Reduktion des Quotienten der rechten zur linken Seite nach der Netzimplantation zu beobachten. Der Vergleich der mUP- (75%) mit der mPP-Gruppe (79%) nach vier Monaten Implantationszeit hingegen zeigt einen nur unwesentlichen Unterschied.

In Anbetracht der Tatsache, dass sich die Zwerchfellexkursion der Tiere mit Granulomen kaum von der der Tiere ohne Granulome unterschied, kann man von keinem oder nur einem minimalen Einfluss der Granulome auf die Zwerchfellbeweglichkeit ausgehen.

Defekt- und Netzgröße von modifizierten Netzen

Die Netzschrumpfung ist eine Konsequenz der Wundkontraktion, die ihrerseits durch das Ausmaß der Entzündungsreaktion und die Narbenbildung in Abhängigkeit vom eingesetzten Material bedingt ist. So schrumpfen leichtgewichtige Netze deutlich weniger im Vergleich zu schwergewichtigen (Klinge et al., 1998). Das Phänomen der Netzschrumpfung, die im zweiten Versuch gemessen wurde, fand im gleichen Ausmaß bei allen Netzgruppen statt. Die im Versuch beobachtete Netzschrumpfung von 23% der Netzbreite ist mit Ergebnissen anderer Studien vergleichbar (Garcia-Urena et al., 2007; Schug-Pass et al., 2008; Junge et al., 2009).

Der Beobachtungszeitraum von vier Monaten soll laut Zinther et al. zur Evaluation der postoperativen Schrumpfung ausreichen. In dieser Studie haben die Autoren dieses Phänomen über die Zeit von 18 Monaten untersucht, wobei sie zu dem Schluss kamen, dass es zu keiner zusätzlichen Schrumpfung nach drei Monaten kommt und dass man die Langzeituntersuchung auf drei Monate begrenzen kann (Zinther et al., 2010).

In beiden Versuchen schrumpfte der Defekt bei allen Tieren nach vier Monaten Implantationszeit. Zwischen beiden oberflächenmodifizierten Netzen wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Im zweiten Versuch wurde eine bessere Defektheilungstendenz in der mPP-Gruppe beobachtet. So war der Defekt in zwei von drei Tieren in der mPP-Gruppe und in keinem der Tiere in mUP-Gruppe verschlossen. Dadurch, dass beide Netze einen nicht resorbierbaren Anteil haben, bieten sie eine stabile Vorlage zur Prävention der Reherniation. Wie sich die Netze bei einem größeren Defekt verhalten werden, muss in weiteren genaueren Untersuchungen erforscht werden.

Ein unbeeinträchtigtes Zwerchfell besteht hauptsächlich aus Muskelgewebe, was für die Kontraktilität des Zwerchfells verantwortlich ist. Folglich ist die Kontraktilität des neugebildeten Bindegewebes an der Implantationsstelle ein wichtiges Kriterium für einen erfolgreichen Verschluss des Defektes. Während der Wundheilung geht die Entwicklung der Granulationsgewebe mit der Umwandlung der Fibroblasten in Myofibroblasten einher. Sobald sich Fibroblasten zu Myofibroblasten entwickelt haben, erhalten sie für eine lange Zeit kontraktile Eigenschaften (Gabbiani, 2003) und können somit die Funktion der fehlenden Muskelzellen zum Teil kompensieren. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Myofibroblasten im Defektbereich mittels des α -SMA – einer der zuverlässigsten Marker für Myofibroblasten (Gabbiani, 2003) – quantifiziert. Erwartungsgemäß wurden im zweiten Versuch dieser Arbeit bei allen drei Netzen deutlich weniger Myofibroblasten (2-4%) im Defektbereich gemessen als im Kontrollbereich des Zwerchfells der Gegenseite (8%). Damit konnte hier die Neubildung von Myofibroblasten nachgewiesen werden.

6 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit stellt den *in vivo* Einsatz von PLGA/NCO-sP(EO-stat-PO)-beschichteten Netzen in Kaninchen dar. Eine analoge Biokompatibilität im Vergleich zum Kontrollnetz konnte sowohl makro- als auch mikroskopisch festgestellt werden. Somit können diese Netze als Ausgangsmaterial eingesetzt werden.

Außerdem bewies sich der Einsatz von modifizierten Netzen für die Heilung von Zwerchfelldefekten als vielversprechend. Sowohl mUP- als auch mPP-Netze resultierten in vielen Fällen in einem kompletten Defektverschluss. Da es bei Patienten mit CDH erst dann zum Einsatz eines Kunststoffnetzes kommt, wenn der Defekt mit einer Primärnaht nicht verschlossen werden kann, sollen weitere Untersuchungen an einem größeren Defekt erfolgen. Somit kann man den Einfluss der Oberflächenbeschichtung auf Defektheilung mit einer Defektheilung bei einem therapeutischen Kunststoffnetzeinsatz vergleichen.

In Anbetracht der geringen Tierzahl sind Untersuchungen an größeren Tierzahlen erforderlich, um feststellen zu können, welche in dieser Studie untersuchten Faktoren statistisch signifikante Einflüsse auf Defektheilung und Fremdkörperreaktion haben. Der Hauptansatz dieser Studie war Biokompatibilität. Diese konnte nachgewiesen werden. Da keinerlei negative Effekte beobachten worden waren, ist für diese Aussage keine höhere Tierzahl notwendig.

Grundsätzlich kann diese Oberflächenbeschichtung mit weiteren Wirkstoffen kombiniert werden. Die so modifizierten Basisnetze können somit als Ausgangsmaterial für weitere Wirkstoffanbindungen eingesetzt werden, um die Fremdkörperreaktion weiterhin zu verbessern.

7 Zusammenfassung

Große kongenitale diaphragmatische Hernien werden unter Einsatz von Kunststoffnetzen oder anderer Biomaterialien verschlossen. Trotz der Fortschritte in der Entwicklung von verbesserten Biomaterialien, besteht weiterhin der Bedarf an funktionell verbesserten Netzen, um sowohl die Komplikations- als auch die Rezidivrate zu reduzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden auf dem Weg zum idealen Netz bereits erprobte Netze im Nanobereich oberflächenmodifiziert und zum ersten Mal in vivo untersucht. Nach Beschichtung von UP- und PP-Netzen mit sechs-armigen sternkonfigurierten sP(EO-stat-PO) -Molekülen erfolgte zwecks Luftabdichtung am Zwerchfell eine Nanoweb-Bespinnung mit kurzzeit-resorbierbarem $\text{PLGA/sP(EO-stat-PO)}$. Zur weiteren Abdichtung wurden die Netze zusätzlich mit einem $\text{NCO-sP(EO-stat-PO)}$ -Hydrogel bedeckt. Die sechs-armigen sP(EO-stat-PO) -Moleküle reagieren untereinander. Pro Molekül verbleiben bis zu vier freie Arme, welche mit Wirkstoffen bestückt werden können. Damit ergibt sich die Möglichkeit der Bestückung der Netze je nach Bedarf der Beeinflussung der Wundheilung oder auch Adhäsion umgebender Zellen und Strukturen, abhängig von der Lokalisation und dem Zweck des Einsatzes.

Bei Kaninchen wurden iatrogen erzeugte Zwerchfelldefekte mit drei Kunststoffnetzen (mUP-, mPP-Netz und UP-Kontrollnetz) verschlossen. Die Zwerchfellbeweglichkeit wurde präoperativ, zwei und vier Monate nach Netzimplantation radiologisch untersucht. Nach vier Monaten wurden die Netze explantiert. Adhäsionsbildung, Defekt- und Netzgröße wurden ermittelt. Anschließend erfolgten histologische und immunhistochemische Untersuchungen.

Die oberflächenmodifizierten Basisnetze zeigten hinsichtlich ihrer adhäsiven und histologischen Eigenschaften sowie in Bezug auf Apoptose und Proliferationsrate, Anzahl der Myofibroblasten, Makrophagen und Kollagen I/III Quotienten keine signifikanten Unterschiede untereinander bzw. zur Kontrollgruppe. Die Defektgröße schrumpfte in beiden modifizierten Netzgruppen. Radiologisch zeigte sich eine gute Zwerchfellexkursion.

Die hier beschriebene Oberflächenmodifikation zeigt eine im Vergleich zu herkömmlichen Netzen vergleichbare Biokompatibilität. Die so modifizierten Basis-

netze können damit als Ausgangsmaterial für weitere Wirkstoffanbindungen eingesetzt werden.

Der mögliche Einsatz am Zwerchfell wird durch die gute relative Zwerchfellbeweglichkeit, auch nach vier Monaten Implantationszeit, unterstützt.

8 Literatur

Allan, D. W., and J. J. Greer, 1997, Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats: *J.Appl.Physiol*, v. 83, no. 2, p. 338-347.

Anderson JM, 2001, Biological responses to materials: *Annu Rev Mater Res*, v. 31, p. 81-110.

Anderson, J. M., 1988, Inflammatory response to implants: *ASAIO Trans.*, v. 34, no. 2, p. 101-107.

Anderson, J. M., A. Rodriguez, and D. T. Chang, 2008, Foreign body reaction to biomaterials: *Semin.Immunol.*, v. 20, no. 2, p. 86-100.

Babiuk, R. P., W. Zhang, R. Clugston, D. W. Allan, and J. J. Greer, 2003, Embryological origins and development of the rat diaphragm: *J.Comp Neurol.*, v. 455, no. 4, p. 477-487.

Bellon, J. M., M. Rodriguez, N. Garcia-Honduvilla, V. Gomez-Gil, G. Pascual, and J. Bujan, 2008, Postimplant behavior of lightweight polypropylene meshes in an experimental model of abdominal hernia: *J.Invest Surg.*, v. 21, no. 5, p. 280-287.

Bellon, J. M., M. Rodriguez, N. Garcia-Honduvilla, G. Pascual, and J. Bujan, 2007, Partially absorbable meshes for hernia repair offer advantages over nonabsorbable meshes: *Am.J.Surg.*, v. 194, no. 1, p. 68-74.

Bendavid, R., 1997, Composite mesh (polypropylene - e-PTFE) in the intraperitoneal position. A report of 30 cases: *Hernia*, v. 1, p. 5-8.

Birk, D. E., and R. Mayne, 1997, Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter: *Eur.J.Cell Biol.*, v. 72, no. 4, p. 352-361.

Böhm, G. et al., 2010a, Influence of the Elasticity Module of Synthetic and Natural Polymeric Tissue Substitutes on the Mobility of the Diaphragm and Healing Process in a Rabbit Model: *J.Biomater.Appl.*

Böhm, G., G. Steinau, E. Krahling, V. Schumpelick, B. Hermanns-Sachweh, S. Stanzel, and A. Ottinger, 2010b, Is Biocompatibility Affected by Constant Shear Stress? - Comparison of Three Commercially Available Meshes in a Rabbit Model: *J.Biomater.Appl.*

Bohn, D., M. Tamura, D. Perrin, G. Barker, and M. Rabinovitch, 1987, Ventilatory predictors of pulmonary hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia, confirmed by morphologic assessment: *J.Pediatr.*, v. 111, no. 3, p. 423-431.

Bollmann, R., K. Kalache, H. Mau, R. Chaoui, and C. Tennstedt, 1995, Associated malformations and chromosomal defects in congenital diaphragmatic hernia: *Fetal Diagn.Ther.*, v. 10, no. 1, p. 52-59.

Borys, D., and J. B. Taxy, 2004, Congenital diaphragmatic hernia and chromosomal anomalies: autopsy study: *Pediatr.Dev.Pathol.*, v. 7, no. 1, p. 35-38.

Brindle, M. E., M. Brar, and E. D. Skarsgard, 2011, Patch repair is an independent predictor of morbidity and mortality in congenital diaphragmatic hernia: *Pediatr.Surg.Int.*, v. 27, no. 9, p. 969-974.

Clark, R. H., W. D. Hardin, Jr., R. B. Hirschl, T. Jaksic, K. P. Lally, M. R. Langham, Jr., and J. M. Wilson, 1998, Current surgical management of congenital diaphragmatic hernia: a report from the Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group: *J.Pediatr.Surg.*, v. 33, no. 7, p. 1004-1009.

Clugston, R. D., and J. J. Greer, 2007, Diaphragm development and congenital diaphragmatic hernia: *Semin.Pediatr.Surg.*, v. 16, no. 2, p. 94-100.

Clugston, R. D., J. Klattig, C. Englert, M. Clagett-Dame, J. Martinovic, A. Benachi, and J. J. Greer, 2006, Teratogen-induced, dietary and genetic models of congenital diaphragmatic hernia share a common mechanism of pathogenesis: *Am.J.Pathol.*, v. 169, no. 5, p. 1541-1549.

Clugston, R. D., W. Zhang, S. Alvarez, A. R. de Lera, and J. J. Greer, 2010, Understanding abnormal retinoid signaling as a causative mechanism in congenital diaphragmatic hernia: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 42, no. 3, p. 276-285.

Conze, J., R. Rosch, U. Klinge, C. Weiss, M. Anurov, S. Titkova, A. Oettinger, and V. Schumpelick, 2004, Polypropylene in the intra-abdominal position: influence of pore size and surface area: *Hernia.*, v. 8, no. 4, p. 365-372.

Darby, I., O. Skalli, and G. Gabbiani, 1990b, Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing: *Lab Invest*, v. 63, no. 1, p. 21-29.

Darby, I., O. Skalli, and G. Gabbiani, 1990a, Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing: *Lab Invest*, v. 63, no. 1, p. 21-29.

de Buys Roessingh, A. S., and A. T. nh-Xuan, 2009, Congenital diaphragmatic hernia: current status and review of the literature: *Eur.J.Pediatr.*, v. 168, no. 4, p. 393-406.

De Troyer, A., M. Sampson, S. Sigrist, and P. T. Macklem, 1981, The diaphragm: two muscles: *Science*, v. 213, no. 4504, p. 237-238.

de Vries Reilingh, T. S., G. H. van, M. J. Koppe, M. E. Bodegom, T. Hendriks, and R. P. Bleichrodt, 2007, Interposition of polyglactin mesh does not prevent adhesion formation between viscera and polypropylene mesh: *J.Surg.Res.*, v. 140, no. 1, p. 27-30.

Ellis, H. et al., 1999, Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study: *Lancet*, v. 353, no. 9163, p. 1476-1480.

Fauza, D. O., and J. M. Wilson, 1994, Congenital diaphragmatic hernia and associated anomalies: their incidence, identification, and impact on prognosis: *J.Pediatr.Surg.*, v. 29, no. 8, p. 1113-1117.

Fiedler, J., J. Groll, E. Engelhardt, P. Gasteier, C. Dahmen, H. Kessler, M. Moeller, and R. E. Brenner, 2011, NCO-sP(EO-stat-PO) surface coatings preserve biochemical properties of RGD peptides: *Int.J.Mol.Med.*, v. 27, no. 1, p. 139-145.

Gabbiani, G., 2003, The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases: *J.Pathol.*, v. 200, no. 4, p. 500-503.

Garcia-Urena, M. A., R. Vega, V. G. A. Diaz, J. M. Baez Perea, L. M. Marin Gomez, F. J. Carnero Hernandez, and M. A. Velasco Garcia, 2007, Differences in polypropylene shrinkage depending on mesh position in an experimental study: *Am.J.Surg.*, v. 193, no. 4, p. 538-542.

Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S. A. Ben-Sasson, 1992, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation: *J.Cell Biol.*, v. 119, no. 3, p. 493-501.

Geary, M. P., L. S. Chitty, J. J. Morrison, V. Wright, A. Pierro, and C. H. Rodeck, 1998, Perinatal outcome and prognostic factors in prenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia: *Ultrasound Obstet.Gynecol.*, v. 12, no. 2, p. 107-111.

Gerdes, J., H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab, and H. Stein, 1984, Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67: *J.Immunol.*, v. 133, no. 4, p. 1710-1715.

Gerdes, J. et al., 1991, Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67: *Am.J.Pathol.*, v. 138, no. 4, p. 867-873.

Gonzalez, R., S. J. Hill, S. G. Mattar, E. Lin, B. J. Ramshaw, C. D. Smith, and M. L. Wulkan, 2011, Absorbable versus nonabsorbable mesh repair of congenital diaphragmatic hernias in a growing animal model: *J.Laparoendosc.Adv.Surg.Tech.A*, v. 21, no. 5, p. 449-454.

Gosche, J. R., S. Islam, and S. C. Boulanger, 2005, Congenital diaphragmatic hernia: searching for answers: *Am.J.Surg.*, v. 190, no. 2, p. 324-332.

Goumy, C., L. Gouas, G. Marceau, K. Coste, L. Veronese, D. Gallot, V. Sapin, P. Vago, and A. Tchirkov, 2010, Retinoid Pathway and Congenital Diaphragmatic Hernia: Hypothesis from the Analysis of Chromosomal Abnormalities: *Fetal Diagn.Ther.*.

Grafahrend, D., K. H. Heffels, M. V. Beer, P. Gasteier, M. Moller, G. Boehm, P. D. Dalton, and J. Groll, 2011, Degradable polyester scaffolds with controlled surface chemistry combining minimal protein adsorption with specific bioactivation: *Nat.Mater.*, v. 10, no. 1, p. 67-73.

Greca, F. H., Z. A. Souza-Filho, A. Giovanini, M. R. Rubin, R. F. Kuenzer, F. B. Reese, and L. M. Araujo, 2008, The influence of porosity on the integration histology of two polypropylene meshes for the treatment of abdominal wall defects in dogs: *Hernia*, v. 12, no. 1, p. 45-49.

Grethel, E. J., R. A. Cortes, A. J. Wagner, M. S. Clifton, H. Lee, D. L. Farmer, M. R. Harrison, R. L. Keller, and K. K. Nobuhara, 2006, Prosthetic patches for congenital diaphragmatic hernia repair: Surgisis vs Gore-Tex: *J.Pediatr.Surg.*, v. 41, no. 1, p. 29-33.

Groll, J., T. Ameringer, J. P. Spatz, and M. Moeller, 2005a, Ultrathin coatings from isocyanate-terminated star PEG prepolymers: layer formation and characterization: *Langmuir*, v. 21, no. 5, p. 1991-1999.

Groll, J., J. Fiedler, K. Bruellhoff, M. Moeller, and R. E. Brenner, 2009, Novel surface coatings modulating eukaryotic cell adhesion and preventing implant infection: *Int.J.Artif.Organs*, v. 32, no. 9, p. 655-662.

Groll, J., J. Fiedler, E. Engelhard, T. Ameringer, S. Tugulu, H. A. Klok, R. E. Brenner, and M. Moeller, 2005b, A novel star PEG-derived surface coating for specific cell adhesion: *J.Biomed.Mater.Res.A*, v. 74, no. 4, p. 607-617.

Groll, J., W. Haubensak, T. Ameringer, and M. Moeller, 2005c, Ultrathin coatings from isocyanate terminated star PEG prepolymers: patterning of proteins on the layers: *Langmuir*, v. 21, no. 7, p. 3076-3083.

Gupta, A., K. Zahriya, P. L. Mullens, S. Salmassi, and A. Keshishian, 2006, Ventral herniorrhaphy: experience with two different biosynthetic mesh materials, Surgisis and Alloderm: *Hernia.*, v. 10, no. 5, p. 419-425.

Hajer, G. F., F. H. vd Staak, A. F. de Haan, and C. Festen, 1998, Recurrent congenital diaphragmatic hernia; which factors are involved?: *Eur.J.Pediatr.Surg.*, v. 8, no. 6, p. 329-333.

Halm, J. A., L. L. de Wall, E. W. Steyerberg, J. Jeekel, and J. F. Lange, 2007, Intraperitoneal polypropylene mesh hernia repair complicates subsequent abdominal surgery: *World J.Surg.*, v. 31, no. 2, p. 423-429.

Harris, J. M., and S. Zalipsky, 1997, Harris, J. M., and S. Zalipsky Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications: Washington DC, American Chemical Society.

Hedrick, H. L. et al., 2007, Liver position and lung-to-head ratio for prediction of extracorporeal membrane oxygenation and survival in isolated left congenital diaphragmatic hernia: *Am.J.Obstet.Gynecol.*, v. 197, no. 4, p. 422-424.

Heyes, C. D., J. Groll, M. Moller, and G. U. Nienhaus, 2007, Synthesis, patterning and applications of star-shaped poly(ethylene glycol) biofunctionalized surfaces: *Mol.Biosyst.*, v. 3, no. 6, p. 419-430.

Hoffmann, J., J. Groll, J. Heuts, H. Rong, D. Klee, G. Ziemer, M. Moeller, and H. P. Wendel, 2006, Blood cell and plasma protein repellent properties of star-PEG-modified surfaces: *J.Biomater.Sci.Polym.Ed*, v. 17, no. 9, p. 985-996.

Hubmayr, R. D., J. R. Rodarte, B. J. Walters, and F. M. Tonelli, 1987, Regional ventilation during spontaneous breathing and mechanical ventilation in dogs: *J.Appl.Physiol*, v. 63, no. 6, p. 2467-2475.

Inselman, L. S., and R. B. Mellins, 1981, Growth and development of the lung: *J.Pediatr.*, v. 98, no. 1, p. 1-15.

Iritani, I., 1984, Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia: *Anat.Embryol.(Berl)*, v. 169, no. 2, p. 133-139.

Jancelewicz, T. et al., 2010, Long-term surgical outcomes in congenital diaphragmatic hernia: observations from a single institution: *J.Pediatr.Surg.*, v. 45, no. 1, p. 155-160.

Jansen, M., J. Otto, P. L. Jansen, M. Anurov, S. Titkova, S. Willis, R. Rosch, A. Ottinger, and V. Schumpelick, 2007, Mesh migration into the esophageal wall after mesh hiataloplasty: comparison of two alloplastic materials: *Surg.Endosc.*, v. 21, no. 12, p. 2298-2303.

Junge, K., M. Binnebosel, R. Rosch, M. Jansen, D. Kammer, J. Otto, V. Schumpelick, and U. Klinge, 2009, Adhesion formation of a polyvinylidenfluoride/polypropylene mesh for intra-abdominal placement in a rodent animal model: *Surg.Endosc.*, v. 23, no. 2, p. 327-333.

Junge, K., U. Klinge, B. Klosterhalfen, P. R. Mertens, R. Rosch, A. Schachtrupp, F. Ulmer, and V. Schumpelick, 2002, Influence of mesh materials on collagen deposition in a rat model: *J.Invest Surg.*, v. 15, no. 6, p. 319-328.

Junge, K., R. Rosch, C. J. Krones, U. Klinge, P. R. Mertens, P. Lynen, V. Schumpelick, and B. Klosterhalfen, 2005, Influence of polyglecaprone 25 (Monocryl) supplementation on the biocompatibility of a polypropylene mesh for hernia repair: *Hernia*, v. 9, no. 3, p. 212-217.

Junqueira, L. C., G. Bignolas, and R. R. Brentani, 1979, Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections: *Histochem.J.*, v. 11, no. 4, p. 447-455.

Junqueira, L. C., W. Cossermelli, and R. Brentani, 1978, Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy: *Arch.Histol.Jpn.*, v. 41, no. 3, p. 267-274.

Kaiser, J. R., and C. R. Rosenfeld, 1999, A population-based study of congenital diaphragmatic hernia: impact of associated anomalies and preoperative blood gases on survival: *J.Pediatr.Surg.*, v. 34, no. 8, p. 1196-1202.

Keijzer, R., and P. Puri, 2010, Congenital diaphragmatic hernia: *Semin.Pediatr.Surg.*, v. 19, no. 3, p. 180-185.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie, 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics: *Br.J.Cancer*, v. 26, no. 4, p. 239-257.

Klinge, U., K. Junge, M. Stumpf, A. P. AP, and B. Klosterhalfen, 2002a, Functional and morphological evaluation of a low-weight, monofilament polypropylene mesh for hernia repair: *J.Biomed.Mater.Res.*, v. 63, no. 2, p. 129-136.

Klinge, U., C. D. Klink, and B. Klosterhalfen, 2010, [The "ideal" mesh--more than a mosquito net]: *Zentralbl.Chir*, v. 135, no. 2, p. 168-174.

Klinge, U., B. Klosterhalfen, V. Birkenhauer, K. Junge, J. Conze, and V. Schumpelick, 2002b, Impact of polymer pore size on the interface scar formation in a rat model: *J.Surg.Res.*, v. 103, no. 2, p. 208-214.

Klinge, U., B. Klosterhalfen, M. Muller, A. P. Ottinger, and V. Schumpelick, 1998, Shrinking of polypropylene mesh in vivo: an experimental study in dogs: *Eur.J.Surg.*, v. 164, no. 12, p. 965-969.

Klinge, U., B. Klosterhalfen, M. Muller, and V. Schumpelick, 1999, Foreign body reaction to meshes used for the repair of abdominal wall hernias: *Eur.J.Surg.*, v. 165, no. 7, p. 665-673.

Klosterhalfen, B., U. Klinge, and V. Schumpelick, 1998, Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair: *Biomaterials*, v. 19, no. 24, p. 2235-2246.

Kuklova, P., D. Zemkova, M. Kyncl, K. Pycha, Z. Stranak, J. Melichar, J. Snajdauf, and M. Rygl, 2011, Large diaphragmatic defect: are skeletal deformities preventable?: *Pediatr.Surg.Int.*, v. 27, no. 12, p. 1343-1349.

Kunisaki, S. M., C. E. Barnewolt, J. A. Estroff, L. P. Nemes, R. W. Jennings, J. M. Wilson, and D. O. Fauza, 2008, Liver position is a prenatal predictive factor of prosthetic repair in congenital diaphragmatic hernia: *Fetal Diagn.Ther.*, v. 23, no. 4, p. 258-262.

Laghi, F., and M. J. Tobin, 2003, Disorders of the respiratory muscles: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 168, no. 1, p. 10-48.

Laituri, C. A., C. L. Garey, P. A. Valusek, B. F. Fike, A. J. Kaye, D. J. Ostlie, C. L. Snyder, and S. D. St Peter, 2010, Outcome of Congenital Diaphragmatic Hernia Repair Depending on Patch Type: *Eur.J.Pediatr.Surg.*.

Lally, K. P. et al., 2007, Defect size determines survival in infants with congenital diaphragmatic hernia: *Pediatrics*, v. 120, no. 3, p. e651-e657.

Lally, K. P., P. A. Lally, K. P. Van Meurs, D. J. Bohn, C. F. Davis, B. Rodgers, J. Bhatia, and G. Dudell, 2006, Treatment evolution in high-risk congenital diaphragmatic hernia: ten years' experience with diaphragmatic agenesis: *Ann.Surg.*, v. 244, no. 4, p. 505-513.

- Langham, M. R., Jr., D. W. Kays, D. J. Ledbetter, B. Frentzen, L. L. Sanford, and D. S. Richards, 1996, Congenital diaphragmatic hernia. Epidemiology and outcome: Clin.Perinatol., v. 23, no. 4, p. 671-688.
- Laschke, M. W., J. M. Haufel, C. Scheuer, and M. D. Menger, 2009, Angiogenic and inflammatory host response to surgical meshes of different mesh architecture and polymer composition: J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater., v. 91, no. 2, p. 497-507.
- Laschke, M. W., J. M. Haufel, H. Thorlacius, and M. D. Menger, 2005, New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo: J.Biomed.Mater.Res.A, v. 74, no. 4, p. 696-704.
- Leber, G. E., J. L. Garb, A. I. Alexander, and W. P. Reed, 1998, Long-term complications associated with prosthetic repair of incisional hernias: Arch.Surg., v. 133, no. 4, p. 378-382.
- Loff, S., H. Wirth, I. Jester, S. Hosie, C. Wollmann, T. Schaible, O. Ataman, and K. L. Waag, 2005, Implantation of a cone-shaped double-fixed patch increases abdominal space and prevents recurrence of large defects in congenital diaphragmatic hernia: J.Pediatr.Surg., v. 40, no. 11, p. 1701-1705.
- Logan, J. W., H. E. Rice, R. N. Goldberg, and C. M. Cotten, 2007, Congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and summary of best-evidence practice strategies: J.Perinatol., v. 27, no. 9, p. 535-549.
- Loring, S. H., and J. Mead, 1982, Action of the diaphragm on the rib cage inferred from a force-balance analysis: J.Appl.Physiol, v. 53, no. 3, p. 756-760.
- Mah, V. K., P. Chiu, and P. C. Kim, 2011, Are we making a real difference? Update on 'hidden mortality' in the management of congenital diaphragmatic hernia: Fetal Diagn.Ther., v. 29, no. 1, p. 40-45.
- Major, D., M. Cadenas, L. Fournier, S. Leclerc, M. Lefebvre, and R. Cloutier, 1998, Retinol status of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia: Pediatr.Surg.Int., v. 13, no. 8, p. 547-549.
- McCool, F. D., and G. E. Tzelepis, 2012, Dysfunction of the diaphragm: N.Engl.J.Med., v. 366, no. 10, p. 932-942.
- Menzies, D., and H. Ellis, 1990, Intestinal obstruction from adhesions--how big is the problem?: Ann.R.Coll.Surg.Engl., v. 72, no. 1, p. 60-63.
- Mitchell, I. C., N. M. Garcia, R. Barber, N. Ahmad, B. A. Hicks, and A. C. Fischer, 2008, Permacol: a potential biologic patch alternative in congenital diaphragmatic hernia repair: J.Pediatr.Surg., v. 43, no. 12, p. 2161-2164.
- Moss, R. L., C. M. Chen, and M. R. Harrison, 2001, Prosthetic patch durability in congenital diaphragmatic hernia: a long-term follow-up study: J.Pediatr.Surg., v. 36, no. 1, p. 152-154.

Moyer, V., F. Moya, R. Tibboel, P. Losty, M. Nagaya, and K. P. Lally, 2002, Late versus early surgical correction for congenital diaphragmatic hernia in newborn infants: *Cochrane.Database.Syst.Rev.*, no. 3, p. CD001695.

Nason, L. K., C. M. Walker, M. F. McNeeley, W. Burivong, C. L. Fligner, and J. D. Godwin, 2012, Imaging of the diaphragm: anatomy and function: *Radiographics*, v. 32, no. 2, p. E51-E70.

Nasr, A., M. C. Struijs, S. H. Ein, J. C. Langer, and P. P. Chiu, 2010, Outcomes after muscle flap vs prosthetic patch repair for large congenital diaphragmatic hernias: *J.Pediatr.Surg.*, v. 45, no. 1, p. 151-154.

Neville, H. L., T. Jaksic, J. M. Wilson, P. A. Lally, W. D. Hardin, Jr., R. B. Hirschl, and K. P. Lally, 2003, Bilateral congenital diaphragmatic hernia: *J.Pediatr.Surg.*, v. 38, no. 3, p. 522-524.

Novitsky, Y. W., J. A. Cristiano, A. G. Harrell, W. Newcomb, J. H. Norton, K. W. Kercher, and B. T. Heniford, 2008, Immunohistochemical analysis of host reaction to heavyweight-, reduced-weight-, and expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)-based meshes after short- and long-term intraabdominal implantations: *Surg.Endosc.*, v. 22, no. 4, p. 1070-1076.

Novitsky, Y. W., A. G. Harrell, J. A. Cristiano, B. L. Paton, H. J. Norton, R. D. Peindl, K. W. Kercher, and B. T. Heniford, 2007, Comparative evaluation of adhesion formation, strength of ingrowth, and textile properties of prosthetic meshes after long-term intra-abdominal implantation in a rabbit: *J.Surg.Res.*, v. 140, no. 1, p. 6-11.

Pober, B. R., 2008, Genetic aspects of human congenital diaphragmatic hernia: *Clin.Genet.*, v. 74, no. 1, p. 1-15.

Puri, P., and T. Wester, 1997, Historical aspects of congenital diaphragmatic hernia: *Pediatr.Surg.Int.*, v. 12, no. 2/3, p. 95-100.

Rauth, T. P., B. K. Poulouse, L. B. Nanney, and M. D. Holzman, 2007, A comparative analysis of expanded polytetrafluoroethylene and small intestinal submucosa--implications for patch repair in ventral herniorrhaphy: *J.Surg.Res.*, v. 143, no. 1, p. 43-49.

Robinson, T. N., J. H. Clarke, J. Schoen, and M. D. Walsh, 2005, Major mesh-related complications following hernia repair: events reported to the Food and Drug Administration: *Surg.Endosc.*, v. 19, no. 12, p. 1556-1560.

Romao, R. L., A. Nasr, P. P. Chiu, and J. C. Langer, 2012, 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.*, v. 47, no. 8, p. 1496-1500.

Rosch, R., K. Junge, A. Schachtrupp, U. Klinge, B. Klosterhalfen, and V. Schumpelick, 2003, Mesh implants in hernia repair. Inflammatory cell response in a rat model: *Eur.Surg.Res.*, v. 35, no. 3, p. 161-166.

Rygl, M., K. Pycha, Z. Stranak, J. Melichar, L. Krofta, L. Tomasek, and J. Snajdauf, 2007, Congenital diaphragmatic hernia: onset of respiratory distress and size of the defect: analysis of the outcome in 104 neonates: *Pediatr.Surg.Int.*, v. 23, no. 1, p. 27-31.

Saito, N., K. A. Pulford, J. Breton-Gorius, J. M. Masse, D. Y. Mason, and E. M. Cramer, 1991, Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes: *Am.J.Pathol.*, v. 139, no. 5, p. 1053-1059.

Sakai, H., M. Tamura, Y. Hosokawa, A. C. Bryan, G. A. Barker, and D. J. Bohn, 1987, Effect of surgical repair on respiratory mechanics in congenital diaphragmatic hernia: *J.Pediatr.*, v. 111, no. 3, p. 432-438.

Salata, O., 2004, Applications of nanoparticles in biology and medicine: *J.Nanobiotechnology.*, v. 2, no. 1, p. 3.

Salber, J. et al., 2007, Influence of different ECM mimetic peptide sequences embedded in a nonfouling environment on the specific adhesion of human-skin keratinocytes and fibroblasts on deformable substrates: *Small*, v. 3, no. 6, p. 1023-1031.

Samarakkody, U., M. Klaassen, and B. Nye, 2001, Reconstruction of congenital agenesis of hemidiaphragm by combined reverse latissimus dorsi and serratus anterior muscle flaps: *J.Pediatr.Surg.*, v. 36, no. 11, p. 1637-1640.

Schreinemacher, M. H., P. J. Emans, M. J. Gijbels, J. W. Greve, G. L. Beets, and N. D. Bouvy, 2009, Degradation of mesh coatings and intraperitoneal adhesion formation in an experimental model: *Br.J.Surg.*, v. 96, no. 3, p. 305-313.

Schug-Pass, C., C. Tamme, F. Sommerer, A. Tannapfel, H. Lippert, and F. Kockerling, 2008, A lightweight, partially absorbable mesh (Ultrapro) for endoscopic hernia repair: experimental biocompatibility results obtained with a porcine model: *Surg.Endosc.*, v. 22, no. 4, p. 1100-1106.

Schumpelick, V., J. Siewert, and M. Rothmund, 2011, Schumpelick, V., J. Siewert, and M. Rothmund *Gastroenterologische Chirurgie* (3. Auflage): Springer.

Simpson, J. S., and J. D. Gossage, 1971, Use of abdominal wall muscle flap in repair of large congenital diaphragmatic hernia: *J.Pediatr.Surg.*, v. 6, no. 1, p. 42-44.

Skalli, O., J. Vandekerckhove, and G. Gabbiani, 1987, Actin-isoform pattern as a marker of normal or pathological smooth-muscle and fibroblastic tissues: *Differentiation*, v. 33, no. 3, p. 232-238.

Skandalakis, J. E., S. W. Gray, and R. R. Ricketts, 1994, The diaphragm, in JE Skandalakis and SW Gray eds., *Embryology for Surgeons*: Baltimore, MD: Williams & Wildins, p. 491-539.

St Peter, S. D., P. A. Valusek, K. Tsao, G. W. Holcomb, III, D. J. Ostlie, and C. L. Snyder, 2007, Abdominal complications related to type of repair for congenital diaphragmatic hernia: *J.Surg.Res.*, v. 140, no. 2, p. 234-236.

Stege, G., A. Fenton, and B. Jaffray, 2003, Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia: *Pediatrics*, v. 112, no. 3 Pt 1, p. 532-535.

Sydorak, R. M., W. Hoffman, H. Lee, C. D. Yingling, M. Longaker, J. Chang, B. Smith, M. R. Harrison, and C. T. Albanese, 2003, Reversed latissimus dorsi muscle flap for repair of recurrent congenital diaphragmatic hernia: *J.Pediatr.Surg.*, v. 38, no. 3, p. 296-300.

Torfs, C. P., C. J. Curry, T. F. Bateson, and L. H. Honore, 1992, A population-based study of congenital diaphragmatic hernia: *Teratology*, v. 46, no. 6, p. 555-565.

Treutner, K. H., and V. Schumpelick, 2000, [Prevention of adhesions. Wish and reality]: *Chirurg*, v. 71, no. 5, p. 510-517.

Tsai, J., J. Sulkowski, N. S. Adzick, H. L. Hedrick, and A. W. Flake, 2012, Patch repair for congenital diaphragmatic hernia: is it really a problem?: *J.Pediatr.Surg.*, v. 47, no. 4, p. 637-641.

Tsao, K., N. D. Allison, M. T. Harting, P. A. Lally, and K. P. Lally, 2010, Congenital diaphragmatic hernia in the preterm infant: *Surgery*, v. 148, no. 2, p. 404-410.

Tsao, K., P. A. Lally, and K. P. Lally, 2011, Minimally invasive repair of congenital diaphragmatic hernia: *J.Pediatr.Surg.*, v. 46, no. 6, p. 1158-1164.

Usher, F. C., J. Ochsner, and L. L. Tuttle, Jr., 1958, Use of marlex mesh in the repair of incisional hernias: *Am.Surg.*, v. 24, no. 12, p. 969-974.

Wenstrom, K. D., C. P. Weiner, and J. W. Hanson, 1991, A five-year statewide experience with congenital diaphragmatic hernia: *Am.J.Obstet.Gynecol.*, v. 165, no. 4 Pt 1, p. 838-842.

Yi, L. C., O. A. Nascimento, and J. R. Jardim, 2011, Reliability of an analysis method for measuring diaphragm excursion by means of direct visualization with videofluoroscopy: *Arch.Bronconeumol.*, v. 47, no. 6, p. 310-314.

Zinther, N. B., P. Wara, and H. Friis-Andersen, 2010, Shrinkage of intraperitoneal onlay mesh in sheep: coated polyester mesh versus covered polypropylene mesh: *Hernia*, v. 14, no. 6, p. 611-615.

Zühlke, H. V., E. M. Lorenz, E. M. Straub, and V. Savvas, 1990, [Pathophysiology and classification of adhesions]: *Langenbecks Arch.Chir Suppl II Verh.Dtsch.Ges.Chir*, p. 1009-1016.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Yelena Ushakova, Benita Hermanns-Sachweh, Tillmann Braunschweig, Jürgen Groll, Karl-Heinz Heffels, Volker Schumpelick, Gabriele Böhm

PEG-Nanoweb zur Oberflächenmodifikation von Netzen (Vortrag)

7. Jahrestagung der DHG - Deutsche Hernien Gesellschaft, Neuss, 19.-20.06.2009

Gabriele Böhm, **Yelena Ushakova**, Benita Hermanns-Sachweh, Tillmann Braunschweig, Jürgen Groll, Karl-Heinz Heffels, Martin Moeller, Volker Schumpelick

PEG-Nanoweb for surface-modification on meshes (Poster)

4th International Hernia Congress, Berlin, 4.-6.09.2009

Gabriele Böhm, **Yelena Ushakova**, Hamid Patrick Alizai, Till Braunschweig, Christina Lente, Karl-Heinz Heffels, Jürgen Groll, Ulf Peter Neumann, Karsten Junge

Biocompatibility of PLGA/sP(EO-stat-PO)-Coated Mesh Surfaces under Constant Shearing Stress (Artikel)

Eur.Surg.Res., v. 47, no. 3, p. 118-129

9 Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und die hervorragende fachliche Unterstützung danke ich Frau PD Dr. med. Gabriele Böhm sehr herzlich. Ihre stets wertvollen Anmerkungen und Ratschläge waren mir eine sehr große Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. M. Afify für die ausführliche Erklärung und die Unterstützung bei der Auswertung der immunhistochemischen Präparate.

Frau Prof. Dr. med. B. Hermanns-Sachweh und Herrn Dr. med. T. Braunschweig danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung der histologischen Bilder.

Ich bedanke mich herzlich bei Frau E. Krott für ihre Unterstützung im Labor, stetige Hilfsbereitschaft und wertvollen Ratschläge.

Des Weiteren danke ich Frau Dipl.-Math. C. Lente und Frau Dr. rer. medic N. Heussen für die kompetente Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Herrn M. Speer danke ich für die Auswertung der radiologischen Daten.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Versuchstierkunde besonders Frau Dr. med. vet. K. Scherer, Herrn T. Stopinski und Frau Dr. med. vet. N. Gronloh für die hervorragende Betreuung der Tiere und Hilfsbereitschaft während des gesamten Versuchs.

Ganz besonders danke ich Herrn. D. Hristodorov für seine wertvollen Ratschläge und Anregungen beim Schreiben dieser Arbeit.

Großer Dank an meine Eltern und meinen Freund Herrn T. Vildanov, durch deren wertvolle Unterstützung es mir möglich war viel Zeit für die wissenschaftliche Arbeit zu investieren.

10 Erklärung zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, Yelena Ushakova, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.

11 Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 10 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, **Frau Yelena Ushakova** an Eides statt, geboren am 23.04.1984 in Taschkent, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „PLGA/sP(EO-stat-PO)-Nanoweb zur Oberflächenmodifikation von Netzen“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

- Teilnahme an der chirurgischen Explantation der Netze im zweiten Versuchsteil
- Durchführung eines Teiles der immunhistochemischen Auswertungen (Apoptose) des ersten Versuchsteils
- Durchführung sämtlicher immunhistochemischer Auswertungen des zweiten Versuchsteils
- Datenerhebung
- Datenbankverwaltung
- Statistische Auswertung (Mittelwert, Median, Standardabweichung) immunhistochemischer Auswertungen des ersten Versuchsteils sowie sämtlicher Ergebnisse des zweiten Versuchsteils
- Interpretation der Resultate mit grafischer Darstellung
- Literaturrecherche in „PubMed“
- Ausarbeitung und Durchführung des Vortrags, PEG-Nanoweb zur Oberflächenmodifikation von Netzen, bei der 7. Jahrestagung der DHG (Deutsche Hernien Gesellschaft) in Neuss, 20.06.2009

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

- A. Dr. M. Afify: Einarbeitung und Unterstützung bei der Auswertung der immunhistochemischen Daten
- B. E. Krott: Vorbereitung der lichtmikroskopischen Präparate, Unterstützung bei der Anästhesie der Tiere
- C. Prof. Dr. med. B. Hermanns-Sachweh und Dr. med. T. Braunschweig: Auswertung der histologischen Präparate

- D. Dipl.-Math. C. Lente und Dr. rer. medic N. Heussen: Unterstützung bei der statistischen Auswertung
- E. Institut für Versuchstierkunde: Betreuung der Tiere
- F. M. Speer: Auswertung der radiologischen Daten
- G. PD Dr. med. G. Böhm: Studiendesign und –Durchführung, Betreuung und Anleitung der Doktorandin, Interpretation der Daten, Korrektur der Dissertation, Korrektur beim Vortrag, immunhistochemische und radiologische Auswertungen des ersten Versuchsteils

Yelena Ushakova

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Yelena Ushakova
Geburtsdatum	23. April 1984
Geburtsort	Taschkent (Usbekistan)
Staatsangehörigkeit	usbekisch
Familienstand	ledig

Berufliche Tätigkeit

Seit 03/2012	Assistenzärztin am Krankenhaus Düren gem. GmbH Abteilung für Innere Medizin
10/2009-06/2010	Studentische und wissenschaftliche Hilfskraft in der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie)
06/2009-09/2009	Studentische Aushilfe in der Klinik für Allgemein-, und Viszeralchirurgie, Marienhospital Aachen
09/2007-03/2008	Studentische Aushilfe in der Notaufnahme, Elisabeth-Krankenhaus Mönchengladbach

Studium

10/2006-11/2011	Medizinstudium an der RWTH Aachen
09/2008	Ärztliche Basisprüfung
11/2011	Ärztliche Prüfung
09/2001-04/2005	Studium an der Ersten Medizinischen Hochschule in Taschkent (davon wurden an der RWTH-Aachen 2 Semester anerkannt)

Praktisches Jahr

Innere Medizin	Medizinische Klinik, Marienhospital Aachen, Prof. Dr. med. M. Gatzen
Gynäkologie:	Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin, Universitätsklinikum Aachen, Prof. Dr. med. N. Maass
Chirurgie:	Klinik für Allgemein-, und Viszeralchirurgie, Marienhospital Aachen, PD Dr. med. C. Krones

Famulaturen

Innere Medizin:	Klinik für Innere Medizin, Franziskushospital Aachen, Dr. med. M Spinner, Dr. med. B. Schwick
Chirurgie:	Klinik für Allgemein-, und Viszeralchirurgie, Marienhospital Aachen, Prof. Dr. med. K. Nagel
Ambulanz:	Notaufnahme, Universitätsklinikum Aachen, Dr. med. P. Petersen
Augenheilkunde:	Augenklinik, Universitätsklinikum Aachen, Prof. Dr. med. P. Walter

Schulbildung

09/1991-06/2001	S.-Borodin-Schule-Gymnasium N178 in Taschkent (Reifezeugnis/Mittelschulabschluss)
-----------------	---