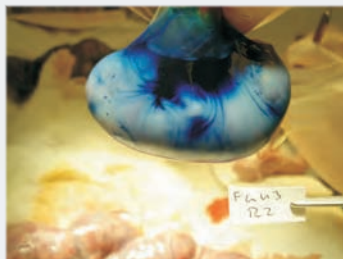


VERGLEICH DER VERSCHLUSSMÖGLICHKEITEN FETOSKOPISCH ERZEUGTER AMNIONMEMBRAN- DEFEKTE MIT DEZELLULARISierter HUMANER AMNIONMEMBRAN UND KOLLAGEN

SUSANNE RIEDER



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinik für Kleintiere, Chirurgie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: PD Dr. med. vet. Sabine Tacke
und

Dem Zentrum für Präklinische Forschung,
Klinikum Rechts der Isar, Technische Universität München

Betreuerin: PD Dr. med. vet. Julia Henke

**Vergleich der Verschlussmöglichkeiten fetoskopisch erzeugter
Amnionmembrandefekte mit dezellularisierter humaner
Amnionmembran und Kollagen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med.vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Susanne Rieder

Tierärztin aus München

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil Georg Baljer

Gutachterinnen: Privatdozentin Dr. Sabine Tacke
Privatdozentin Dr. Julia Henke

Tag der Disputation: 05.03.2009

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>SCHRIFTTUM.....</u>	<u>3</u>
2.1	STRUKTUR DER HUMANEN FETALEN MEMBRANEN	3
2.2	RUPTUR DER FETALEN MEMBRANEN.....	4
2.3	BEDEUTUNG VON SPONTANEM UND IATROGENEM PPROM	6
2.4	SCHWANGERSCHAFTSERHALTUNG UND MANAGEMENT NACH PPROM	7
2.5	FETOSKOPIE UND PPROM.....	8
2.5.1	INDIKATIONEN FÜR FETOSKOPIE UND FETALE CHIRURGIE	8
2.5.2	KOMPLIKATIONEN VON FETOSKOPIE UND FETALER CHIRURGIE	10
2.5.3	EINFLUSS VON PPROM AUF DIE FETALE ENTWICKLUNG	11
2.6	LÖSUNGSANSÄTZE UND ERGEBNISSE	12
2.6.1	MÖGLICHKEITEN DER SPONTANHEILUNG	12
2.6.2	MÖGLICHKEITEN DES AMNIONVERSCHLUSSES	13
2.6.2.1	Amniopatch.....	13
2.6.2.2	Verschluss mittels Fibrinklebung.....	14
2.6.2.3	Verschluss durch Gelatineschwämmchen.....	14
2.6.2.4	Verschluss eines Amniondefektes mittels Kryoprezipitat, Thrombin, Amicar, CaCl ₂ und Thrombozyten	15
2.6.2.5	Verschluss durch Injektion von Thrombozyten, Fibrinkleber und pulverisierter Kollagenmasse.....	17
2.6.2.6	Verschluss durch Myometriumnaht, Myometriumnaht und Naht der fetalen Membranen, Kollagenpfropfen und Fibrinkleber.....	17
2.6.3	STUDIEN AM KANINCHENMODELL	19
2.6.3.1	Verschluss durch Myometriumnaht, Fibrinkleber, homologen Blutpfropfen und Kollagenpfropfen.....	19
2.6.3.2	Verschluss mit Hilfe einer Extrazellulärmatrix und Kollagenpfropfen	20
2.6.3.3	Verschluss des Amniondefekts mittels einer bioaktiven Membran.....	22
2.6.3.4	Verschluss durch humane Amnionmembran, Kollagenfolie, Kollagenpfropf und Fibrinkleber	23

2.6.3.5 Verschluss mittels humaner Amnionmembran, Kollagenfolie, Kollagenpfropf und Fibrinkleber und Kollagenpfropf mit Amniozyten und Fibrinkleber	25
2.6.3.6 Zusammenfassung der Studien am Kaninchenmodell	26

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN..... 28

3.1 MATHERIAL UND METHODE 28

3.1.1 TIERMODELL 28

3.1.1.1 Haltungsbedingungen, Fütterung 28

3.1.2 METHODE 29

3.1.2.1 Herstellung der dezellularisierten humanen Amnionmembranen..... 29

3.1.2.2 Durchführung der Operation 30

3.1.2.2.1 Vorbereitung und Narkose..... 30

3.1.2.2.2 Narkoseüberwachung 31

3.1.2.2.3 Durchführung der Fetoskopie und des Amnionverschlusses 33

3.2 AUSWERTUNG 39

3.2.1 AUSWERTUNGSKRITERIEN, AUSWERTUNGSTESTS 39

3.2.2 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG 42

3.2.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG 43

3.3 ERGEBNISSE..... 44

3.3.1 ÜBERLEBENSRATE 44

3.3.2 AMNIONINTEGRITÄT UND ANWESENHEIT VON AMNIONFLÜSSIGKEIT 45

3.3.3 FETALE ENTWICKLUNG 47

3.3.3.1 Fetales Körpergewicht 47

3.3.3.2 Fetales Lungengewicht..... 47

3.3.3.3 Quotienten aus fetalem Lungen- und Körpergewicht 48

3.3.3.4 Fetales Lungen- und Herzgewicht 48

3.3.3.5 Quotienten aus fetalem Lungen- und Herzgewicht und fetalen Körpergewicht..... 49

3.3.4 HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE 50

4 DISKUSSION..... 51

4.1 EXPERIMENTELLES MODELL..... 51

4.2 ERGEBNISSE..... 53

4.2.1 AMNIONINTEGRITÄT..... 53

4.2.2	FETALE ENTWICKLUNG	55
4.2.3	HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG	56
4.3	VORZÜGE UND EIGENSCHAFTEN DER DAM.....	57
<u>5</u>	<u>SCHLUSSFOLGERUNG</u>	<u>59</u>
<u>6</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>60</u>
<u>7</u>	<u>SUMMARY.....</u>	<u>61</u>
<u>8</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>62</u>
<u>9</u>	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>70</u>
<u>10</u>	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>71</u>
<u>11</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>72</u>
<u>12</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>74</u>

1 EINLEITUNG

In den letzten Jahren wurde die Früherkennung von fetalen Krankheiten und Fehlbildungen mit Hilfe von sonographischen-, dopplersonographischen- und echokardiographischen-, MRT-, sowie den invasiveren Untersuchungen, zu denen die Amniozentese, die Chorionzottenbiopsie (ab der 11. Schwangerschaftswoche) und die Cordozentese (ab der 18. Schwangerschaftswoche) gehört, immer weiter verbessert.

Bei einigen der Krankheiten, die nun schon in einem frühen Stadium der Schwangerschaft diagnostiziert werden können, wie feto-fetalen-Transfusionssyndrom, Obstruktion der unteren Harnwege oder kongenitale Diaphragmahernie, ist ein frühes, pränatales Eingreifen für das Überleben des Fetus notwendig (DEPREST et al. 1997). Bei anderen Fehlbildungen, zum Beispiel beim Auftreten von Lippen- Kiefer- Gaumenspalten, wäre eine intrauterine Operation mit ihren Vorteilen der narbenlosen Wundheilung und kallusarmen Knochenheilung wünschenswert (PAPADOPULOS et al. 2003b).

Eine neue Möglichkeit der intrauterinen Chirurgie wurde durch den Einsatz von Endoskopen geschaffen. Die Fetoskopie wird zwischen der achtzehnten und sechsundzwanzigsten Schwangerschaftswoche durchgeführt (YANG et al. 1998). Sie wird nur in wenigen Fällen, zum Beispiel zur Entnahme von Hautbiopsien diagnostisch eingesetzt, eine größere Rolle spielt sie für den therapeutischen Einsatz. Doch auch bei dieser minimalinvasiven Chirurgie treten Komplikationen auf. Es kann zu Verletzungen des Fetus oder der Plazenta, beziehungsweise des Uterus mit anschließender Einblutung in die Amnionhöhle kommen. Außerdem besteht die Gefahr einer intrauterinen Infektion sowie der Auslösung von Aborten und Frühgeburten (HOLZGREVE 1988) durch einen vorzeitigen Blasensprung (PPROM: preterm premature rupture of membranes).

Durch neue Methoden des Amnionverschlusses nach der Fetoskopie wurde versucht das Risiko eines vorzeitigen Blasensprunges zu verringern. Als Versuchstiermodell etablierten PAPADOPULOS et al. 1999 ein Kaninchenmodell. An diesem Modell wurden Möglichkeiten des Amnionverschlusses durch Myometriumnaht, Fibrinkleber, autologen maternalen Blutpfropf und Kollagenpfropf (DEPREST et al. 1999b), Kollagenpfropf und extrazelluläre Matrix (GRATACOS et al. 2000), biokompatible Matrix und folgende Naht (DEVLEIEGER et al. 2003), humane Amnionmembran, Kollagenfolie und Kollagenpfropf (PAPADOPULOS et al. 2003a) und der Verschluss mittels Kollagenpfropf mit Amniozyten, humaner Amnionmembran, Kollagenfolie und Kollagenpfropf (PAPADOPULOS et al. 2006) getestet.

Keine der bislang getesteten Möglichkeiten kommt beim Menschen routinemässig erfolgreich zum Einsatz.

In dieser Studie wurde versucht im Anschluss an die Fetoskopie einen anatomisch korrekten Verschluss des Amnions zu erzeugen um eine vorzeitige Ruptur der Membranen zu verhindern. Verwendet wurde dafür eine humanen dezellularisierten Amnionmembran, die ohne eine Immunreaktion auszulösen den Defekt verschliessen und einwandernden Amnionzellen als Grundlage für eine Wiederherstellung der Amnionmembran dienen soll. Getestet und verglichen wurden zwei Möglichkeiten um den mit dem Fetoskop gesetzten Defekt zu verschließen. In einer Gruppe wurde der Defekt mit Hilfe eines Kollagenpfropfs (Gruppe I, n= 10) verschlossen. In einer Zweiten (Gruppe II, n= 10) erfolgte der Verschluss mittels humaner dezellularisierter Amnionmembran, die in den Defekt eingebracht und mit Fibrinkleber am Amnion fixiert wurde. Operierte, nicht verschlossene Ampullen (n= 7) dienten als positive, nicht operierte (n= 31) als negative Kontrollgruppen.

Eine Woche nach dem Eingriff wurden die Integrität des Amnions mit Hilfe eines Farbtests und die Entwicklung der Feten, mit Hilfe von Gewichtsmessungen der Feten und deren Herzen und Lungen und den sich daraus ergebenden Quotienten, beurteilt. Aus dem Operationsgebiet wurden Proben für eine histologische Untersuchung entnommen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Struktur der humanen fetalen Membranen

Bei den humanen fetalen Membranen, Amnion und Chorion, können acht Schichten voneinander isoliert werden (Tabelle 1).

Die humane Amnionmembran besteht aus 5 Lagen. Sie enthält keine Blutgefäße und Nerven. Die Nährstoffversorgung erfolgt über die Amnionflüssigkeit. Die innerste Schicht ist das kubische Amnionepithel. Die Amnionepithelzellen sezernieren Kollagen Typ III und IV und diverse Glycoproteine wie beispielsweise Laminin und Fibronectin, aus denen die zweite Schicht, die Basalmembran, geformt wird. Der Basalmembran folgt eine kompakte Lage aus Kollagen Typ I, III, V und VI, welches von den mesenchymalen Zellen der folgenden Fibroblastenschicht sezerniert wird. Die Fibroblastenschicht ist die dickste der fünf Schichten und besteht aus mesenchymalen Zellen und Makrophagen in einer extrazellulären Matrix. Das Kollagen dieser Schicht (Typ I, III, VI) formt zusammen mit anderen Glycoproteinen ein loses Netzwerk. Zwischen Amnion und Chorion liegt eine Zwischenschicht aus hydrierten Proteoglykanen, Glycoproteinen und Kollagen Typ I, III, und IV. Diese Schicht ermöglicht dem Amnion auf dem darunterliegenden Chorion zu gleiten.

Das Chorion besteht aus 3 Schichten, der Retikularschicht, bestehend aus Kollagen Typ I, II, IV, V, VI und Proteoglykanen, der Basalmembran, die sich hauptsächlich aus Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin zusammensetzt und der Trophoblastenschicht. Es besteht keine klare Trennungslinie zwischen der Trophoblastenschicht und der angrenzenden maternalen Dezidua (CASEY et al. 1996, MALAK et al. 1993, DANFORTH et al. 1958).

SCHRIFTTUM

Schicht	Komponenten der extrazellulären Matrix	Produzierte MMP oder TIMP
Amnion		
Amnionepithel		MMP- 1, MMP- 2, MMP-9
Basalmembran	Kollagen Typ III, IV, V, Laminin, Fibronectin, Nidogen	
Kompaktschicht	Kollagen Typ I, III, V, VI, Fibronectin	
Fibroblastenschicht	Kollagen Typ I, III, VI, Nidogen, Laminin Fibronectin,	MMP- 1, MMP-9, TIMP- 1
Zwischenschicht	Kollagen Typ I, III, IV, Proteoglykane	
Chorion		
Retikularschicht	Kollagen Typ I, III, IV, V, Proteoglykane	
Basalmembran	Kollagen Typ IV, Fibronectin, Laminin	
Trophoblastenschicht		MMP- 9

Tabelle 1: Die Struktur der fetalen Membranen (PARRY et al. 1998)

MMP= Matrixmetalloproteinase, TIMP= Gewebeinhibitoren der Matrixmetalloproteinasen

2.2 Ruptur der fetalen Membranen

Bei einer normal verlaufenden Schwangerschaft rupturieren die fetalen Membranen bei Einsetzen der Wehen während der Geburt bei einer Öffnung des Muttermundes auf 8-9 cm. Der frühe vorzeitige Blasensprung in Abwesenheit von Wehen und ohne Öffnung des Muttermundes spielt eine Rolle bei Frühgeburten und tritt möglicherweise auch bei späteren Schwangerschaften, zumeist ohne Klärung der Ursache, wiederholt auf (ALGER et al. 1986). Die Ruptur der fetalen Membranen während der Geburt ist Folge einer generalisierten Schwächung der Membranen durch Uteruskontraktionen und wiederholte Überdehnung (LAVERY et al. 1982). Membranen, die vorzeitig rupturieren, scheinen einen lokalen Defekt und keine generalisierte Schwäche aufzuweisen. Das Gebiet um die Rupturstelle ist

gekennzeichnet durch Schwellung und Zerreißen des fibrillären Kollagennetzwerkes in der Kompakt-, Fibroblasten- und Zwischenschicht der Membranen (MALAK et al. 1994). Der Abbau von Kollagen wird über Enzyme, sogenannte Matrixmetalloproteinasen, vermittelt, die durch Gewebeinhibitoren gehemmt werden können. Die Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) und die Matrixmetalloproteinase-8 (MMP-8) zerstören die Tripelhelixstruktur des Kollagen Typ I und III. Der weitere Abbau erfolgt durch MMP-2 und MMP-9, die auch Kollagen Typ IV, Fibronektin und Proteoglykane abbauen (VADILLO-ORTEGA et al. 1995, VETTRAINO et al. 1996). Gewebeinhibitoren bilden Komplexe mit den Matrixmetalloproteinasen und hemmen ihre proteolytische Wirkung. Die koordinierte Aktivität von Matrixmetalloproteinasen und ihren Gewebeinhibitoren ist essenziell für die Umbauprozesse der extrazellulären Matrix. Sowohl bei einer normalen Geburt als auch bei einer vorzeitigen Ruptur der fetalen Membranen können erhöhte Spiegel von Matrixmetalloproteinasen insbesondere der MMP-9 in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden. Außerdem liegen bei einer vorzeitigen Ruptur verminderte TIMP-1-Spiegel vor (VADILLO-ORTEGA et al. 1996). Ein vorzeitiger Blasensprung kann durch ein Ungleichgewicht zwischen der Aktivität der Matrixmetalloproteinasen und ihrer Gewebeinhibitoren und den damit verbundenen Veränderungen der Kollagenstruktur verursacht werden (VADILLO-ORTEGA et al. 1990). Die MMP-9 scheint neben anderen MMPs, die in den Membranen von Frauen mit vorzeitigem Blasensprung erhöht sind, vorherrschend zu sein (DRAPER et al. 1995).

Auch Infektionen können eine Rolle bei der vorzeitigen Ruptur der fetalen Membranen spielen. Bei tragenden Kaninchen, denen *Escherichia coli* in die Cervix eingebracht wurden, konnte bei 97% der Tiere *E. coli* in der Amnionflüssigkeit und in der Dezidua nachgewiesen werden. Durch die intrazervikale Inokulation von *E. coli* konnte ein fetales Sterben, begleitet von Fieber, Blutungen, Geburt und positivem Nachweis der *E. coli* in der Bakterienkultur nachgewiesen werden (HEDDLESTON et al. 1993). Verschiedene Organismen, die für gewöhnlich in der Vaginalflora vorhanden sind, sowie Mikroorganismen die Vaginitiden verursachen, sezernieren Proteasen, die Kollagen abbauen und die fetalen Membranen schwächen können (MC GREGOR et al. 1987).

Auch eine Entzündungsreaktion kann zu einer vorzeitigen Ruptur beitragen. Durch eine Behandlung von Chorionzellen mit $\text{TNF-}\alpha$ wird die Synthese von MMP-1, MMP-3 und PGE_2 gesteigert. Die Produktion von TIMP wird durch $\text{TNF-}\alpha$ supprimiert (SO et al. 1992). Interleukin-1 stimuliert Zellen des Chorions zu einer Prokollagenaseproduktion und beschleunigt die Biosynthese und Sekretion von Hyaluronsäure. Es hat keinen Einfluss auf die

Synthese von sulfatierten Glykosaminoglykanen. So wird die Konzentration von Hyaluronsäure im Gegensatz zu den sulfatierten Glykosaminoglykanen signifikant gesteigert, was zu einer Schwächung der fetalen Membranen führt (KATSURA et al. 1989). Im Kaninchenmodell wurde nachgewiesen, dass Progesteron und Östradiol die Umformung der extrazellulären Matrix in den Reproduktionsorganen hemmen. Beide Hormone senken die Konzentration von MMP-1 und MMP-3 und erhöhen die Konzentration der Gewebeinhibitoren (SATO et al. 1991). In der maternalen Dezidua werden die beiden humanen Relaxine H1 und H2 produziert. Relaxin kehrt den inhibitorischen Effekt von Progesteron und Östrogen um und verursacht steigende MMP-3 und MMP-9 Aktivität in den fetalen Membranen (QUIN et al. 1997).

2.3 Bedeutung von spontanem und iatrogenem PPRM

Eine *spontane* frühzeitige Ruptur der fetalen Membranen (sPPROM: spontaneous preterm premature rupture of membranes) vor der 37. Schwangerschaftswoche ist für 30-40% aller Frühgeburten verantwortlich und tritt in 3% der Schwangerschaften auf. Die Gründe dafür sind multifaktoriell, es spielen mechanische Belastung, Infektionen und auch Stress eine Rolle (PARRY et al. 1998, MEDINA et al. 2006).

Die *iatrogene* frühzeitige Ruptur der fetalen Membranen (iPPROM: iatrogenic preterm premature rupture of membranes) ist eine mögliche Komplikation und der limitierende Faktor bei invasiven pränatalen Untersuchungen und Eingriffen. Die Häufigkeit des Auftretens liegt bei 1,2% der Patientinnen nach Amniozentese und 3-5% nach diagnostischer Fetoskopie.

Nach therapeutischer Fetoskopie tritt der vorzeitige Blasensprung in 5-8% der Fälle auf (QUINTERO 2003). In einer Studie von VILLE et al. 1998 zur Laserkoagulation beim fetofetalen Transfusionssyndrom lag die Häufigkeit bei 10%, in einer Studie von HARRISON et al. 1998 zur Korrektur der kongenitalen Diaphragmahernie sogar bei 62,5%.

Vorkommen, Zeitpunkt und Mechanismus von iPPROM nach Fetoskopie sind nicht bekannt, die Ursache kann im Abstand zwischen den Endoskopiестellen oder der angewendeten Verschluss technik liegen (YANG et al. 1998). Auch die Anzahl der benutzten Trokare sowie die Dauer und Komplexizität des chirurgischen Eingriffs scheinen eine Rolle zu spielen (PAPADOPULOS et al. 2000).

2.4 Schwangerschaftserhaltung und Management nach PPROM

Nach PPROM kann entweder die Geburt eingeleitet, oder unter strenger Überwachung zunächst abgewartet werden. Wichtig ist es mit Hilfe von Antibiotika eine drohende intrauterine Infektion zu verhindern. Die Häufigkeit einer neonatalen Sepsis nach PPROM wird mit 2 bis 20% angegeben. 5% der Feten sterben als Folge einer intrauterinen Infektion (PARRY et al. 1998).

Die Gabe von Kortikosteroiden senkt die perinatale Morbidität und Mortalität. Laut einer Studie konnte durch die Gabe von Kortikosteroiden die Gefahr eines Neugeborenen-Atemnotsyndroms, einer intraventrikulären Hämorrhagie, und das Risiko einer nekrotisierenden Enterokolitis gesenkt werden ohne die Gefahr einer maternalen oder neonatalen Infektion zu erhöhen (HARDING et al. 2001).

Der Einsatz von Tokolytika wird diskutiert. Es liegen keine Studien vor, in denen eine Gruppe die mit Kortikosteroiden, Antibiotika und Tokolytika behandelt wurde mit einer Gruppe die nur Kortikosteroide und Antibiotika erhalten hat verglichen wurde. Da die Mehrzahl der Patientinnen mit PPROM innerhalb weniger Tage bis eine Woche nach der Membranruptur gebären ist eine Langzeitgabe von Tokolytika meist nicht das Ziel. Ausserdem dürfen die Risiken einer tokolytischen Therapie nicht außer Acht gelassen werden. So können durch Tokolytika Anzeichen einer Infektion der Mutter oder des Kindes verdeckt und somit übersehen werden (FONTENOT et al. 2001).

Abhängig vom Zeitpunkt der Ruptur der fetalen Membranen ist ein unterschiedliches Vorgehen nötig.

Studien haben gezeigt, dass bei einem Blasensprung zwischen der 34. und 36. Woche die Einleitung der Geburt für den Säugling sicher ist, und dass durch dieses Vorgehen Komplikationen durch maternale und neonatale Infektionen vermindert werden (NAEF et al. 1998).

Bei Patientinnen mit einem Blasensprung zwischen der 32. und 33. Woche, deren Feten eine ausreichende Lungenreife aufweisen, kann ebenfalls eine Einleitung der Geburt und entsprechende Betreuung des Neugeborenen in Betracht gezogen werden (EHERNBERG et al. 2001). Feten ohne dokumentierte ausreichende Lungenreifung sollten Antibiotika und Kortikosteroide verabreicht werden. Nach 48 Stunden, oder unter strenger Überwachung des fetalen Befindens bezüglich einer möglichen intraamniotischen Infektion, kann dann in der 34. Woche die Geburt eingeleitet werden (MEDINA et al. 2006).

Eine Geburt vor der 32. Woche geht mit einer hohen neonatalen Morbidität und Mortalität einher. Die Patientinnen sollten Kortikosteroide und Antibiotika erhalten und täglich oder, wenn nötig, ständig überwacht werden (SMITH et al 1987).

Eine Studie, in der das Management nach PPROM im Krankenhaus mit einer ambulanten Betreuung verglichen wurde, zeigte, dass lediglich 18% der betroffenen Patientinnen die Kriterien für eine zuverlässige Überwachung zu Hause erfüllten (CARLAN et al. 1993).

2.5 Fetoskopie und PPROM

2.5.1 Indikationen für Fetoskopie und fetale Chirurgie

Es gibt zahlreiche Indikationen, bei denen nach strenger Abwägung der Risiken und Vorteile für Mutter und Kind ein fetoskopischer Eingriff durchgeführt werden sollte (Tabelle 2).

Fetoskopische Operationstechniken wurden beispielsweise für die Behandlung von Zwerchfeldefekten, Dekompression der ableitenden Harnwege und Ligation pathologischer Gefäßverbindungen beim Feto-Fetalen-Transfusions-Syndrom entwickelt (DANZER et al. 2001).

Bei der kongenitale Diaphragmahernie (CDH) können unkomplizierte Fälle nach der Geburt behandelt werden. Fälle, die eine Leberhernie und ein niedriges Lungen-zu-Kopf-Verhältnis zeigen, profitieren hingegen von einer temporären Trachealokklusion (HARRISON et al. 1998).

Ebenso wie bei der CDH kann es bei einer kongenitalen zystisch-adenomatoiden Lungenmalformation (CCAM) zu einem verminderten Lungenwachstum kommen. Eine obstruktive Uropathie kann zu einer Nierenschädigung und ebenfalls zu einer Lungenhypoplasie führen. Bei der Spina bifida (Myelomeningozele), einem Neuralrohrdefekt mit freiliegenden Rückenmarksanteilen, werden die exponierten Nervenfasern in utero durch die potenziell toxische Amnionflüssigkeit nach und nach bis zur Funktionslosigkeit geschädigt (CRISERA et al. 2003).

SCHRIFTTUM

Fehlbildung	Effekt auf die fetale Entwicklung	Chirurgische Behandlungsmöglichkeiten	Vorteil einer intrauterinen Therapie
Harnwegsobstruktion	Nierenversagen Lungenhypoplasie	vesiko- amnialer Shunt, Vesikostomie	Verhindern eines Nierenversagens und einer Lungenhypoplasie
Zwerchfellhernie	Lungenhypoplasie pulmonale Hypertension	fetoskopische Trachealokklusion	Verhindern einer Lungenhypoplasie und Hypertension
kongenitale zystisch-adenomatoide Lungenmalformation	Lungenhypoplasie fetaler Hydrops intrauteriner Fruchttod	offene Resektion des Tumors, fetoskopische Resektion des Tumors	Verhindern einer Lungenhypoplasie
Steißbeinteratom	Herzversagen fetaler Hydrops intrauteriner Fruchttod	offene Resektion des Tumors, Radiofrequenzablation des Blutzuflusses	Verhindern des Herzversagens und einer Frühgeburt ausgelöst durch ein Hydramnion
Myelomeningozele (Spina bifida)	neurologische Ausfälle Arnold- Chiari- Malformation Hydrozephalus	offene Deckung in utero, fetoskopische Deckung des Defektes	Verhindern der Schädigung der Nerven durch die Amnion-flüssigkeit, Wiederherstellung des cerebro-spinalen Druckes und Korrektur einer Arnold-Chiari- Malformation
Feto-Fetales-Transfusions- Syndrom	Herzversagen intrakranielle Blutungen fetaler Hydrops intrauteriner Fruchttod	fetoskopische Laserablation der plazentaren Gefäß-anastomosen, fetoskopische Ligatur der Nabelschnur	Verhindern eines Herzversagens und /oder neurologischer Schädigung
Obstruktion der oberen Luftwege (CHAOS)	Lungenhyperplasie Hydrops,intra-uteriner Fruchttod	fetoskopische Tracheostomie, Ex Utero Intrapartum Treatment (EXIT)	Verhindern einer Lungenhypoplasie
Fetaler Hydrothorax	Lungenhypoplasie Lungenversagen	thorako- amnialer Shunt	Verhindern einer Lungenhypoplasie
Amnion-Band-Syndrom	Irreversible neurologische und/oder vaskuläre Schäden		Verhindern eines Amnion-Band-Syndroms

Tabelle 2: Anomalien, die von einem fetalen Eingriff profitieren (DANZER et al. 2001, DEPREST et al. 2006)

2.5.2 Komplikationen von Fetoskopie und fetaler Chirurgie

Fetale Chirurgie und Fetoskopie sind für Mutter und Kind mit einem beträchtlichen Risiko verbunden (Tabelle 3).

Die häufigste Komplikation der Fetoskopie ist der iatrogene frühe vorzeitige Blasensprung (DEPREST et al. 1999a), der bis heute als die „Achillesferse“ der intrauterinen Chirurgie bezeichnet wird.

Eine häufige Komplikation der Fetoskopie ist das Auftreten von Blutungen. Die gefürchtetste Komplikation ist das Auftreten von Frühgeburten (HARRISON 1996), wofür verschiedene Ursachen wie eine plötzliche Änderung des Uterusvolumens, Infektionen, hormonelle Veränderungen, Stress in Verbindung mit vermehrter Produktion des Kortikotropin-Releasing-Hormon und ein vorzeitiger Blasensprung sowie idiopathische Ursachen in Frage kommen (BOCKING 1998).

Auch die Trennung der chorioamniotischen Membranen (CMS) spielt eine Rolle. Eine völlige Trennung der Membranen ist ein früher Indikator für einen vorzeitigen Blasensprung und kann zu einer Frühgeburt führen (GRAF et al. 1997). Das Vorkommen eines frühen vorzeitigen Blasensprungs war bei Müttern mit vorangegangener Trennung der chorioamniotischen Membran erhöht (SYDORAK et al. 2002).

Die Auswertung von 75 Fällen nach fetaler Chirurgie durch SYDORAK et al. 2002 ergab eine Häufigkeit der Trennung der chorioamniotischen Membranen (CMS) von 47%. Es gab einen statistisch signifikanten Anstieg der Häufigkeit für eine CMS nach Operationen, bei denen eine Flüssigkeitsperfusionspumpe benötigt wurde und Operationen mit einer größeren Anzahl verwendeter Trokare. Das Vorkommen eines frühen vorzeitigen Blasensprungs, Frühgeburt und Chorioamnionitis war bei Müttern mit CMS signifikant erhöht.

Eine retrospektive Studie über 172 Zwillings- und 3 Drillingsschwangerschaften mit Feto-Fetalem-Transfusionssyndrom und fetoskopischer Laser-Koagulation wurde 2005 von YAMAMOTO et al. durchgeführt. In 47 Fällen überlebte keines (27%) der Babies die nächsten 6 Monate, in 67 ein Neugeborenes (38%) und in 61 Fällen zwei Babies (35%). In 13 Fällen trat Amnionflüssigkeit in die maternale Bauchhöhle aus, in 7 Fällen kam es zu vaginalen Blutungen und in deren Folge bei vier der Patientinnen zum frühen vorzeitigen Blasensprung. Drei der Patientinnen erlitten eine Plazentaablösung, PPROM trat in 49 Fällen (28%) auf. Vier der Patientinnen bekamen nach dem frühen vorzeitigen Blasensprung eine Chorioamnionitis (2,3%). In 14 Fällen kam es zu intraoperativen Blutungen, die Operation konnte jedoch meist zu Ende geführt werden. Andere Faktoren wie die Lokalisation der

Plazenta, transplazentärer Eintritt des Fetoskopes, intra- amniotische Blutungen oder präoperative Amnioreduktion standen nicht mit dem Auftreten von maternalen Komplikationen in Zusammenhang.

Mütterliches Risiko	Fetales Risiko
Frühzeitige Wehen, vorzeitiger Blasensprung	Tod des Fetus
Frühgeburt	Frühgeburt
Nebenwirkungen der Tokolytika und Narkotika (z.B. Lungenödem, Herzrhythmusstörungen)	Chorioamniotische Separation
Wundinfektionen (<5%)	Misserfolg des fetalen Eingriffes- erhebliche postnatale Mortalität und Morbidität
Chorioamnionitis	
massiver Blutverlust	
lange Bettruhe –Gefahr einer Thrombose	
Notwendigkeit einer Sectio caesarea bei allen folgenden Schwangerschaften und der damit verbundenen Komplikationen	

Tabelle 3: Risiken der fetalen Chirurgie (DANZER et al. 2001)

2.5.3 Einfluss von PPRM auf die fetale Entwicklung

Die normale Entwicklung der Lunge während der Schwangerschaft erfordert das Vorhandensein einer ausreichenden Menge an Amnionflüssigkeit (PERLMANN et al. 1976). Der Verlust von Amnionflüssigkeit führt zu einer ständigen Druckwirkung des Uterus auf den Fetus und daraus resultierendem abnormalen fetalen Wachstum und Entwicklung. Das und der Verlust von intrapulmonärer Flüssigkeit führt zu einer Lungenhypoplasie (ADZICK et al. 1984).

KING et al. untersuchten 1986 am Kaninchenmodell den Effekt eines Oligohydramnions auf die fetale Lungenentwicklung. Dabei stellen sie bei den Feten mit experimentell erzeugtem Oligohydramnion ein signifikant vermindertes Körpergewicht und ein tendenziell verringertes Lungengewicht und maximales Lungenvolumen gegenüber der Kontrollgruppe fest. Auf die Entwicklung der Leber konnte kein Einfluss festgestellt werden.

2.6 Lösungsansätze und Ergebnisse

Obwohl bereits in einer ganzen Reihe von experimentellen Ansätzen eine Möglichkeit gesucht wurde eine Methode des Membranverschlusses zu finden, mit der das iPPROM-Risiko nach Fetoskopie verringert werden kann, gibt es bis heute keine Methode, die standardisiert und mit Erfolg eingesetzt wird.

2.6.1 Möglichkeiten der Spontanheilung

DEVLIEGER et al. beschäftigten sich 2000 mit dem Einfluss von Matrixmetalloproteinase-2 und -9 (MMP-2/-9) und deren endogenen Gewebehinhibitoren (TIMP) auf die Reparatur der fetalen Membranen nach einer Fetoskopie am Kaninchen. Die Fetoskopie wurde am 23. Tag der Trächtigkeit durchgeführt, die Eintrittsstellen wurden mit einer einfachen Myometriumsnaht verschlossen. Die Relaparotomie erfolgte in einer Gruppe am 27. und in einer am 30. Tag der Trächtigkeit. Dabei wurde Amnion- Chorion- und Allantoisflüssigkeit gewonnen und jeweils die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen-2 und -9 mit Hilfe von Zymography und die Aktivität der Gewebehinhibitoren (TIMP) durch reverse Zymography bestimmt. MMP-2-Aktivität wurde vorherrschend in latenter Form (72kDa) in Amnion-, Allantois- und extraembryonaler Coelomflüssigkeit während der zweiten Hälfte der Trächtigkeit gefunden. Die Sekretion von MMP-2 in der Amnion- und Allantoisflüssigkeit stieg mit fortschreitender Trächtigkeit signifikant an. Die MMP-9-Aktivität war kaum messbar, ebenfalls vor allem in der latenten Form (92kDa), in Amnion-, Chorion-, Allantois- und extraembryonaler Coelomflüssigkeit zu finden. Ein breites Sortiment von TIMP-Aktivität konnte in Amnion- Allantois- und extraembryonaler Coelomflüssigkeit nachgewiesen werden, allerdings waren keine Unterschiede bezüglich des unterschiedlichen Trächtigkeitsstadiums feststellbar. Verglichen mit den Kontrollgruppen konnte ein signifikanter Anstieg ($p<0,05$) der MMP-2-Aktivität in der Amnionflüssigkeit bei den fetoskopierte Gruppen festgestellt werden. Außerdem wurde ein signifikanter Anstieg der MMP-2 Sekretion in extraembryonaler Coelomflüssigkeit gefunden. In der Allantoisflüssigkeit war keine Änderung der MMP-2- Sekretion nachweisbar. Auch die Analyse der TIMP-Aktivitäten in der Amnionflüssigkeit ergab einen signifikanten Anstieg ($p<0,05$) nach einem Trauma der fetalen Membranen. Ein signifikanter Anstieg ($p<0,05$) bezüglich der TIMP-Aktivität konnte auch in extraembryonaler Coelomflüssigkeit nachgewiesen werden. 46% der Amniondefekte verschlossen sich. Es konnte nachgewiesen

werden, dass die Sekretion der MMP und TIMP und folgende Reparatur spezifisch für die chirurgisch traumatisierten Höhlen war.

In einer 1990 von JOHNSON et al. veröffentlichten Fallstudie zur Spontanheilung der fetalen Membranen, ohne vorangehende Fetoskopie, konnte ein spontaner Wiederverschluss der Membranen bei 11% der Patientinnen mit einem frühen vorzeitigen Blasensprung nachgewiesen werden. Diese Gruppe hatte, im Vergleich zu den Patientinnen mit persistierendem Amniondefekt, längere Schwangerschaftsdauern, größere Babies, längere Krankenhausaufenthalte für die Mütter, kürzere Krankenhausaufenthalte für die Neugeborenen und eine geringere perinatale Morbidität und Mortalität.

GRATACOS et al. untersuchten 2006 die Möglichkeit der Spontanheilung bei 15 Patientinnen, bei denen während der Schwangerschaft eine Fetoskopie durchgeführt wurde. Die fetalen Membranen zeigten kaum Heilungstendenz. Bei allen war der Membrandefekt nach einem Zeitraum von 3-112 Tagen nach der Fetoskopie noch nachweisbar.

2.6.2 Möglichkeiten des Amnionverschlusses

2.6.2.1 Amniopatch

QUINTERO et al. veröffentlichten 1996 einen Fallbericht zum erfolgreichen Verschluss eines Membrandefekts mittels Amniopatch.

1999 versuchten QUINTERO et al. erneut bei Patientinnen mit iatrogenem frühen vorzeitigen Blasensprung zwischen der 16. und 24. Woche der Schwangerschaft den Defekt mithilfe einer intraamniotischen Injektion von Thrombozyten und Kryoprezipitat (Amniopatch) zu verschließen und hatten in 3 von 7 Fällen Erfolg.

2004 veröffentlichten LEWI et al. einen Fallbericht von zwei Patientinnen mit erfolgreich durchgeführtem Amniopatch.

Die verwendeten Blutbestandteile wurden bevorzugt von den Patienten selbst (autologer Patch) gewonnen. Waren die Patienten nicht in der Lage Blut zu spenden, wurden heterologe Plättchen und Kryopräzipitat verwendet.

2.6.2.2 Verschluss mittels Fibrinklebung

GENZ berichtete 1979 von einer Methode des Amnionverschlusses mittels Fibrinklebung (Fibrinkleber Human Immuno[®], Topostasin[®], 3000 N.H. Einheiten Thrombin, Hoffmann- La Roche AG, Trasylol[®]/Antagosan[®], 20 000 KIE/ml Aprotinin, Bayer AG, Behringwerke AG, CaCl₂- Lösung, Aqua pro injectione, 7,23%- 0,5 molar, Fresenius, Bad Homburg).

BAUMGARTEN et al. versuchten 1986 bei 26 Frauen durch eine Fibrinklebung (Tissucol[®]) den Verlust von Amnionflüssigkeit zu unterbrechen und die Regeneration des Chorion und Amnion, sowie deren engen Kontakt zur Dezidua zu fördern. Die Fibrinlösung geronn mit Thrombin (500 IU/ml) und wurde durch die Polymerisation von Fibrinmonomeren stabilisiert. Eine Fibrinolyse wurde durch Zugabe von Proteinaseinhibitoren verhindert. Bei dieser Methode kam es zu keinem direkten Verschluss der Eihäute. Das Fibrin sollte den unteren Eipol gegen die Zervix abdichten. Zusätzlich wurde der Zervikalkanal verschlossen, da vorhergehende Versuche gezeigt hatten, dass der Fibrinklumpen bei offenem Zervikalkanal nicht oder nur unzureichend ausgeformt wird, beziehungsweise frühzeitig zusammen mit Amnionflüssigkeit ausgespült wird. 17 der 26 Kinder kamen lebend zur Welt (65%).

2.6.2.3 Verschluss durch Gelatineschwämmchen

In einem Tiermodell mit fünf Schafen und fünf Rhesusaffen wurde der Einsatz von Gelatineschwämmchen (Gelfoam[®], Pharmacia & Upjohn, Bridgewater, NJ) zum Verschluss der Fetoskopistellen getestet. Die Schwämmchen wurden mit Hilfe einer Kanüle und eines Applikators in den Defekt eingebracht, das Myometrium wurde vernäht. Bei den Schafen wurden insgesamt 15 Gelatineschwämmchen eingebracht. Bei der Sektion konnte makroskopisch kein transuteriner Fluss von Amnionflüssigkeit festgestellt werden. Die Hysterotomiewunden waren verheilt, histologische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt. Bei den Rhesusaffen wurden bei jedem Tier 3 Schwämmchen eingebracht. Ein Tier abortierte innerhalb 24 Stunden, ein zweites nach sechs Tagen. Bei keinem der Aborte wurde Amniorhexis oder eine Amnionitis festgestellt. Wöchentliche ultrasonographische Kontrollen der überlebenden Feten zeigten ein normales Amnionflüssigkeitsvolumen ohne Anzeichen einer Undichtigkeit oder Membranruptur. Eine histologische Untersuchung wurde aufgrund von spontanen Geburten bei diesen Tieren nicht durchgeführt (LUKS et al. 1999).

2001 untersuchten O'BRIEN et al. in einem *in vitro* Modell die Tauglichkeit von Gelatineschwämmchen (Gelfoam[®], Pharmacia & Upjohn, Bridgewater, NJ). Insgesamt 15 Defekte in verschiedenen Größen wurden gesetzt und mit Gelatineschwämmchen verschlossen. Gelatineschwämmchen mit einer Größe von 1x1cm verschlossen alle Defekte die kleiner als 7 mm Länge waren. Bei größeren Defekten konnte der Austritt von Flüssigkeit mit den Schwämmchen nicht verhindert werden. Beim folgenden Einsatz der Methode bei einer Frau mit vorzeitigem Blasensprung in der zwanzigsten Schwangerschaftswoche wurde zusätzlich eine Zervikalcerklage nach MacDonald gelegt. In der zweiunddreißigsten Woche der Schwangerschaft setzten vaginale Blutungen ein, drei Tage später war die Symptomatik des vorzeitigen Blasensprunges wieder vorhanden.

2.6.2.4 Verschluss eines Amniondefektes mittels Kryoprezipitat, Thrombin, Amicar, CaCl₂ und Thrombozyten

In einem *in vitro* Versuch wurde eine Amnionmembran über eine 20 ml Spritze gezogen und mit elastischen Ringen befestigt. Die Spritze wurde mit 20 ml Amnionflüssigkeit aufgefüllt. Ein Trichter mit einem 3 cm langen Hals simulierte die Cervix. Die Amnionmembran wurde mit einer 20-Gauge Spinalkanüle punktiert, und nachdem 2 ml der Amnionflüssigkeit abgeflossen waren durch einen doppelumigen Katheter ein transamniotischer Verschluss im Bereich der Amnionflüssigkeit- Luft Grenze eingebracht. Der doppelumige Katheter ermöglichte es zwei Komponenten einzubringen ohne sie vorher zu vermischen (Abbildung 1).

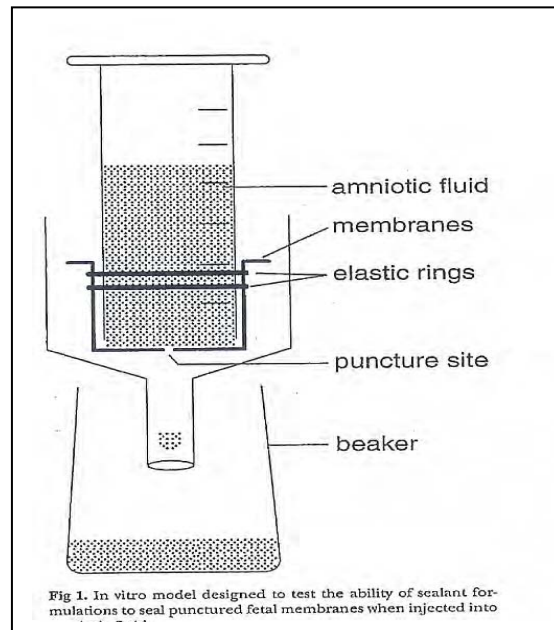


Abbildung 1: Versuchsaufbau von REDDY et al. 2001

Der Verlust der Amnionflüssigkeit wurde in den ersten 30 Minuten ständig, die nächsten 4 Stunden stündlich und dann alle 6 Stunden kontrolliert. Das Experiment wurde abgebrochen, wenn weniger als 2 ml Amnionflüssigkeit in der Spritze übrig waren.

Das beste Ergebnis wurde mit einer kommerziell erhältlichen Mischung aus Fibrinogen, Thrombin, Aprotinin und Calcium (Tisseel®, Baxter Corp, Glendale, Kalifornien) erzielt. In dieser Gruppe konnte der Amnionflüssigkeitsverlust im Vergleich mit der Kontrollgruppe deutlich verlangsamt werden (Tabelle 4) (Reddy et al. 2001).

Material	Zeit bis zur Undichtigkeit		Anzahl der Versuche
	Mittel (min)	Bereich (min)	
Kontrollgruppe	2,3	2,1-2,8	7
Thrombozyten	5,0	3,1-1440	9
Kryoprezpitat/Thrombin/Amicar/CaCl ₂ /Thrombozyten	450	420-870	7
Kryoprezpitat/Thrombin/Amicar/CaCl ₂	1440	900-2700	7
Kryoprezpitat/Thrombin, 10 000Einheiten	1950	1020-6780	8
Kryoprezpitat/Thrombin, 5000 Einheiten	2700	450-8640	7
Tisseel® und Thrombozyten	3960	2610-7200	7
Tisseel®	5520	4320-25560	7

Tabelle 4: Ergebnisse von REDDY et al. 2001

2.6.2.5 Verschluss durch Injektion von Thrombozyten, Fibrinkleber und pulverisierter Kollagenmasse

In einer Studie wurde bei acht Patientinnen nach einem endoskopischen intrauterinen Eingriff der Verschluss mit 15 ml homologen Plättchen, 2-5 ml Fibrinkleber (Hemaseel[®], Haemacure Corp, Sarasota, USA) und 5-15 ml pulverisierte Kollagenmasse (Avitene[®], Avitene Microfibrillar Collagen Hemostat, Davol Inc., Cranston, USA) getestet. Bei einer Patientin rupturierten die Membranen nach 12 Stunden erneut, eine andere Patientin entschloss sich die Schwangerschaft 48 Stunden nach dem Eingriff abubrechen obwohl keine Undichtigkeit vorlag, die übrigen Patientinnen setzten ihre Schwangerschaft für 8 Wochen ohne Verlust von Amnionflüssigkeit fort (YOUNG et al. 2004b).

Diese Technik wurde erneut an vier Patientinnen mit sPPROM und an vier Patientinnen mit iPPROM nach Amniozentese getestet. Die intrauterine Endoskopie erlaubte eine direkte Darstellung des Defekts und eine schnell aufeinanderfolgende Injektion von Thrombozyten, Fibrinkleber und pulverisierte Kollagenmasse. In der Gruppe mit iPPROM nach Amniozentese kamen drei Kinder lebend zur Welt, bei einer Patientin kam es 12 Stunden nach dem Verschluss zu einer erneuten Ruptur der Membranen. In der Gruppe mit spontaner Ruptur der Membranen kam es in zwei Fällen 2 Tage nach dem Verschluss zur Frühgeburt, in einem Fall nach 12 Stunden zum fetalen Tod und in einem Fall zu einer Entbindung in der 31. Schwangerschaftswoche, das Neugeborene litt an einem akuten Atemnotsyndrom (YOUNG et al. 2004a).

2.6.2.6 Verschluss durch Myometriumnaht, Myometriumnaht und Naht der fetalen Membranen, Kollagenpfropfen und Fibrinkleber

In einer Studie mit weißen Neuseeländer Kaninchen wurden vier Möglichkeiten des Amnionverschlusses nach einer Laparotomie mit folgender Eröffnung des Uterus und Amnions (Hysteroamniotomie) verglichen. In Gruppe 1 „Myometrium“ wurden nur die Myometriumschichten mit drei Spannungs- und zwei zusätzlichen Nähten (Prolene[®] 6-0) verschlossen während in Gruppe 2 alle fünf Nähte das Myometrium und die fetalen Membranen (Prolene[®] 6-0) fassten. In der dritten Gruppe wurde der Membrandefekt mit einem 1x 2 cm großen Kollagenpfropfen (Colgen[®], Inter-Phar, Paris) und in Gruppe 4 mit Fibrinkleber (Tissucol[®], Immuno, Paris), die außen auf das Amnion gelegt bzw. aufgebracht

SCHRIFTTUM

wurden, abgedeckt und das Myometrium jeweils wie bei der ersten Gruppe verschlossen. Bei Gruppe 5 wurde der Defekt im Myometrium und in den Membranen ohne Verschluss und Naht offen gelassen. Diese Gruppe dient als positive Kontrolle, die nicht manipulierten Amnionsäcke als negative Kontrolle. Das beste Ergebnis bezüglich der Amnionintegrität erzielte die Gruppe „Myometrium“ mit 80% (Tabelle 5) (PAPADOPULOS et al. 1998).

Studiengruppe	Anzahl (n)	Amnion- integrität (%)	Anwesen- heit von Amnion- flüssigkeit (%)	Überlebens- rate (%)	Mittleres Körper- gewicht (g)	FLBWR (fetal Lung- Body-Weight- Ratio)
1) Myometrium- Naht	12	80,0 ⁺	60,0 ⁺	83,3 [*]	34,4± 8,2	-
2) Myometrium- und Membrannaht	12	42,9 ⁺	42,9 ⁺	66,7	36,3± 11,5	-
3) Kollagen- pfropfen	8	0,0 ⁺	0,0 ⁺	100,0	41,6± 7,6	-
4) Fibrinkleber	12	28,6 ⁺	28,6 ⁺	58,3	34,3± 9,0	-
5) Positive Kontrollen	12	0,0 ⁺	0,0 ⁺	58,3	39,0± 7,1	-
Negative Kontrollen	257	99,4 [*]	96,1 [*]	72,4 [*]	38,0±11,2	-
*p<0,05 verglichen mit positiven Kontrollen ⁺ p<0,05 verglichen mit negativen Kontrollen						

Tabelle 5: Ergebnisse der Studie von PAPADOPULOS et al. 1998

2.6.3 Studien am Kaninchenmodell

Keine der Untersuchungen *in vitro*, am Menschen und am Tiermodell, wurde in einer ausreichenden Fallzahl erfolgreich durchgeführt. Um standardisierte Versuche in ausreichender Zahl zu ermöglichen und die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurde als Standard-Kleintiermodell für die Untersuchung von Verschlussmethoden der fetalen Membranen nach Fetoskopie 1999 von PAPADOPULOS et al. das Kaninchenmodell etabliert.

An diesem Modell ließen sich reproduzierbar anhaltende Membrandefekte nach einer Fetoskopie und als Folge ein Oligohydramnion sowie eine Lungenhypoplasie produzieren (GRATACOS et al. 1999).

Die bei den Studien gemachten Angaben bezüglich der Amnionintegrität beziehen sich auf die zum Zeitpunkt der Euthanasie lebenden Feten.

2.6.3.1 Verschluss durch Myometriumnaht, Fibrinkleber, homologen Blutpfropfen und Kollagenpfropfen

In einem Versuch am Kaninchen wurde in Gruppe 1 nur das Myometrium mit einem Heft mit Nylon 6/0 verschlossen, Amnion und Chorion blieben unverschlossen. In einer zweiten und dritten Gruppe wurde einmal 0,3 ml Fibrinkleber (Tissucol[®], Immuno, Paris, Frankreich), und einmal homologes, mütterliches, frisches Vollblut aus der Ohrvene entnommen und in den Defekt eingebracht, wobei sowohl Amnion als auch Chorion und Myometrium auf diese Weise verschlossen wurden. Die vierte Studiengruppe war die Kollagengruppe. Hier wurde ein ca. 0,5 cm langes, trockenes Kollagenstück (Colgen[®], Inter-Phar, Paris, Frankreich) mit Hilfe eines Schiebers durch das Lumen des Trokars eingebracht. Durch das Aufsaugen der umgebenden Flüssigkeit quoll das Kollagen auf und verschloss so ebenfalls Amnion, Chorion und Myometrium. In diesen drei Gruppen wurde das Myometrium nicht zusätzlich vernäht. Die positive Kontrollgruppe blieb nach der Fetoskopie unverschlossen, die nicht operierten Säcke blieben als negative Kontrolle (DEPREST et al. 1999b). Die Amnionintegrität war in dieser Studie in der Gruppe in der nur das Myometrium vernäht wurde am höchsten (Tabelle 6).

SCHRIFTTUM

Studiengruppe	Anzahl (n)	Amnion- integrität (%)	Anwesen- heit von Amnion- flüssigkeit (%)	Überlebens- rate (%)	Mittleres Körper- gewicht (g)	FLBWR (fetal Lung- Body-Weight- Ratio)
1) Myometrium- naht	14	44,4*	44,4*	64,3	Studien- gruppen, mit intakten Mem- branen KGW: 31,83± 15,61 FLBWR: 0,0288± 0,003	Studien- gruppen, mit nicht intakten Membranen KGW: 35,20± 9,6 FLBWR: 0,0256± 0,005**
2) Fibrinkleber	15	36,4*	36,4*	73,3		
3) homologer Blutpfropfen	13	20,0*	20,0*	76,9		
4) Kollagen- pfropfen	14	40,0*	50,0*	71,4		
Positive Kontrollen	16	41,7*	41,7*	75,0	-	-
Negative Kontrollen	216	94,3	93,2	71,7	35,15± 0,52	0,030± 0,017
*p<0,05 verglichen mit negativen Kontrollen						
**p<0,05 verglichen mit negativen Kontrollen mit intakten Membranen						

Tabelle 6: Ergebnisse der Studie von DEPREST et al. 1999b

2.6.3.2 Verschluss mit Hilfe einer Extrazellulärmatrix und Kollagenpfropfen

GRATACOS et al. 2000 verschlossen den Membrandefekt nach der Fetoskopie in Gruppe 2 mit 0,3 ml Matrigel, einer Extrazellulärmatrix (Matrigel[®], BD Labware, Bedford, Mass), und das Myometrium mit einem Heft mit Prolene[®] 6-0. In Gruppe 3 diente ein Kollagenpfropfen als Verschluss. Das Kollagen wurde trocken in Streifen mit einer Länge von 3-4 mm zurechtgeschnitten und ein Faden (Prolene[®] 7-0) durchgezogen. Nachdem das

SCHRIFTTUM

Endoskop entfernt wurde, wurde das Kollagen mit Hilfe eines Schiebestabes durch den Trokar in die Amnionhöhle eingebracht. Der Trokar wurde so entfernt, dass sich das Kollagen teilweise in der Amnionhöhle befand. Mithilfe des Prolene-Zügels wurde es anschliessend so platziert, dass es den Membrandefekt verschloss. Der Kollagenpfropfen wurde dann mit einem Heft mit Prolene® 6-0, das sowohl den Kollagenpfropfen als auch das Myometrium einschloss befestigt. Auch hier blieben die positiven Kontrollen (Gruppe 1) unverschlossen und die nicht operierten Amnionsäcke dienten als negative Kontrollen (Tabelle 7).

Studiengruppe	Anzahl (n)	Amnion- integrität (%)	Anwesen- heit von Amnion- flüssigkeit (%)	Überlebens- rate (%)	Mittleres Körper- gewicht (g)	FLBWR (fetal Lung- Body-Weight- Ratio)
2) Matrigel und Naht	23	38,0*	44,0*	78,0	Studien- gruppen, mit intakten Mem- branen KGW: 31,1± 7,1 FLBWR: 0,00311± 0,007	Studien- gruppen, mit nicht intakten Membranen KGW: 33,2± 7,8 FLBWR: 0,0249± 0,007**
3) Kollagen- pfropfen und Naht	22	82,0 ⁺	82,0 ⁺	77,0		
1) Positive Kontrolle	24	41,0*	41,0*	79,0	-	-
Negative Kontrolle	129	98,0	98,0	75,0	33,4±7,8	0,0307± 0,005
*p<0,0001 verglichen mit negativer Kontrollgruppe im χ^2 - Test, ⁺ p<0,05 verglichen mit positiver Kontrollgruppe im χ^2 - Test, **p<0,001, Varianztest für multiple Vergleiche, für Studiengruppen mit nicht intakten Membranen mit negativer Kontrollgruppe oder Studiengruppen mit intakten Membranen						

Tabelle 7: Ergebnisse der Studie von GRATACOS et al. 2000

2.6.3.3 Verschluss des Amniondefekts mittels einer bioaktiven Membran

BioSIS® (BioSIS®, Cook, Strombeek- Bever, Belgium), eine biokompatible Matrix, die aus Schweinedünndarm gewonnen wurde und Kollagen Typ I, II und IV, Fibronectin, Decorin, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfatase A, Heparansulfat und die Wachstumsfaktoren TGF-β und bFGF enthielt, wurde 2003 für den Membranverschluss verwendet (DEVLIEGER et al. 2003). Runde Matrixstücke mit einem Durchmesser von maximal 5mm wurden wie ein Fallschirm gefaltet und ein Faden (Prolene® 7/0) durchgezogen. Das Endoskop wurde aus dem Trokar entfernt und der vorbereitete Pfropfen durch das Lumen in die Amnionhöhle eingeführt. Anschließend wurde der Trokar entfernt und die Matrix mit Hilfe des Fadens in dem Membrandefekt platziert. Sie wurde dann mit einem Einzelheft mit Prolene 6/0 durch den äußeren Teil der Matrix und das Myometrium fixiert. In der positiven Kontrollgruppe blieb der Defekt unverschlossen, die nicht operierten Amnionsäcke dienten auch hier als negative Kontrolle (Tabelle 8).

Studiengruppe	Anzahl (n)	Amnion- integrität (%)	Anwesen- heit von Amnion- flüssigkeit (%)	Überlebens- rate	Mittleres Körper- gewicht (g)	FLBWR (fetal Lung- Body-Weight- Ratio)
BioSIS und Naht	50	70,0	68,0	80,0	30,6± 5,6	0,032± 0,006
Positive Kontrollen	50	41,0	38,0	64,0	29,7± 5,05	0,027± 0,008
Negative Kontrollen	55	92,0	87,0	95,0	29,5± 6,2	0,032± 0,007
Statistischer Vergleich zwischen BioSIS und positiver Kontrollgruppe: p value: Amnionintegrität: < 0,01, Anwesenheit von Amnionflüssigkeit: <0,05, Körpergewicht: kein signifikanter Unterschied, FLBWR: <0,05						

Tabelle 8: Ergebnisse der Studie von DEVLIEGER et al. 2003

2.6.3.4 Verschluss durch humane Amnionmembran, Kollagenfolie, Kollagenpfropf und Fibrinkleber

Im selben Jahr veröffentlichten PAPADOPULOS et al. 2003a eine Studie, bei der drei verschiedene Verschlussmöglichkeiten verglichen wurden.

In Gruppe 1 wurden die Membrandefekte mit einer humanen Amnionmembran (Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz, Berlin) und Fibrinkleber, in Gruppe 2 mit einer Kollagenfolie (Tissufoil E[®], Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) und in Gruppe 3 mit einem 1 cm langen Kollagenpfropf (Tissufleece E[®], Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim), der durch den Endoskop-Trokar in den Defekt eingesetzt wurde verschlossen. Bei allen drei Gruppen wurde zusätzlich Fibrinkleber (Tissucol Duo S 2ml Immuno[®], Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) aufgetragen. Das Myometrium wurde in allen Gruppen getrennt von den fetalen Membranen mit Prolene[®] 6/0 (Prolene[®], Ethicon, Norderstedt) vernäht. In Gruppe 4 blieben die Amnionsäcke als positive Kontrolle unverschlossen, alle unoperierten Säcke dienten als negative Kontrollen (Tabelle 9).

SCHRIFTTUM

Studiengruppe	Anzahl (n)	Amnion- integrität (%)	Anwesen- heit von Amnion- flüssigkeit (%)	Überlebens- rate (%)	Mittleres Körper- gewicht (g)	FLBWR (fetal Lung- Body-Weight- Ratio)
1) humane Amnion- membran	9	33,3*	66,7*	100,0	Studien- gruppen, mit intakten Mem- branen KGW: 36,2±4,41 FLBWR: 0,043± 0,0045	Studiengruppen, mit nicht intakten Membranen KGW: 26,89± 6,62* ⁺ FLBWR: 0,042± 0,0048 ⁺¹
2) Kollagen- folie	9	62,5	62,5*	88,8		
3) Kollagen- pfropf	9	66,7	77,8	100,0		
4) positive Kontrolle	8	50,0*	75,0	100,0	-	-
Negative Kontrolle	49	85,0	92,5	81,6	34,40± 7,88	0,045± 0,0047
<p>*versus negative Kontrolle: $p < 0,005$ (χ^2 Fisher's exact two- tailed test)</p> <p>*⁺$p < 0,05$ Varianzanalysetest (Tamhane) im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe und behandelten Gruppen mit intakten Membranen;</p> <p>⁺¹$p < 0,05$ Varianzanalysetest (LSD) im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe mit intakten Membranen</p>						

Tabelle 9: Ergebnisse der Studie von PAPADOPULOS et al. 2003a

2.6.3.5 Verschluss mittels humaner Amnionmembran, Kollagenfolie, Kollagenpfropf und Fibrinkleber und Kollagenpfropf mit Amniozyten und Fibrinkleber

2006 setzten PAPADOPULOS et al. ihre Studien fort und testete den Amnionverschluss mit 1) humaner Amnionmembran (Gewebebank des deutschen Institutes für Zell- und Gewebeersatz, Leipzig, Deutschland) und Fibrinkleber (Tissucol Duo S 2ml Immuno[®], Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim), 2) Kollagenfolie (Tissufoil E[®], Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) und Fibrinkleber (Tissucol Duo S 2ml Immuno[®], Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim), 3) Kollagenpfropf (Tissufleece E[®], Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) und Fibrinkleber und 4) mit Kollagenpfropf (Tissufleece E[®], Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) der mit *in vitro* gezüchteten Amniozyten bedeckt war und Fibrinkleber. Bei allen Gruppen wurde das Myometrium vernäht. Wie in den vorhergehenden Studien blieben Amnionsäcke unverschlossen und dienten als positive Kontrollen, die nicht operierten verblieben als negative Kontrollgruppe (Tabelle 10).

SCHRIFTTUM

Studiengruppe	Anzahl (n)	Amnion- integrität (%)	Anwesen- heit von Amnion- flüssigkeit (%)	Überlebens- rate (%)	Mittleres Körper- gewicht (g)	FLBWR (fetal Lung- Body-Weight- Ratio)
Negative Kontrollen	121	87,8	92,2	74,7	31,35± 11,73	0,041± 0,0065
Positive Kontrollen	23	52,9**	76,5	73,9	-	-
1) Humane Amnion- membran	23	26,3***	47,4*	82,6	Studien- gruppen, mit intakten	Studien- gruppen, mit nicht intakten
2) Kollagen- Folie	16	64,3**	78,6	87,5	Membranen KGW:	Membranen KGW: 29,47±
3) Kollagen- Pfropf	19	58,8**	64,7**	89,5	31,64±9,887 FLBWR:	11,987 FLBWR:
4) Kollagen- Pfropf mit Amniozyten	19	62,5**	62,5**	84,2	0,0394± 0,00667	0,0369± 0,00710 ⁺
*versus negative Kontrolle: p<0,001 (χ^2 Fisher's exact two- tailed test)						
** versus negative Kontrolle: p<0,05 (χ^2 Fisher's exact two- tailed test)						
*** versus negative Kontrolle und Gruppen 2)- 4): p<0,005 (χ^2 Fisher's exact two- tailed test), ⁺ p<0,05 verglichen mit negativen Kontrollen mit intakten Membranen						

Tabelle 10: Ergebnisse der Studie von PAPADOPULOS et al. 2006

2.6.3.6 Zusammenfassung der Studien am Kaninchenmodell

Als vielversprechendes Material zeigte sich in vielen Studien Kollagen (Tabelle 11). Es wurde in verschiedenen Formen, als Pfropf, als Folie und angereichert mit Amniozyten, verwendet. Ausserdem wurden die Möglichkeiten der Applikation, mithilfe eines Schiebers und eines Trokars oder mithilfe eines Fadenzügels, sowie zusätzliche Möglichkeiten der Befestigung, mittels Fibrinkleber oder Naht, getestet.

SCHRIFTTUM

Verschlussmethode	Überlebensrate (%)	Amnionintegrität (%)	Literaturangabe
Kollagenpfropfen	71,4	40,0	DEPREST et al. 1999
Kollagenpfropfen und Naht	77,0	82,0	GRATACOS et al. 2000
Kollagenpfropf	100,0	66,7	PAPADOPULOS et al. 2003
Kollagenpfropf	89,5	58,8	PAPADOPULOS et al. 2006
Kollagenpfropf mit Amniozyten	84,2	62,5	PAPADOPULOS et al. 2006
Kollagenfolie	88,8	62,5	PAPADOPULOS et al. 2003
Kollagenfolie	87,5	64,3	PAPADOPULOS et al. 2006

Tabelle 11: Anwendung von Kollagen

Desweiteren wurde mehrfach versucht den Membrandefekt mithilfe biologischer Membranen und Extrazellulärmatrizes zu verschließen (Tabelle 12). Auch hier kamen die bei der Anwendung von Kollagen bereits beschriebenen Applikations- und zusätzlichen Befestigungsmöglichkeiten zum Einsatz. Lediglich bei der Verwendung von BioSIS konnten ähnlich gute Erfolge wie beim Einsatz von Kollagen erzielt werden.

Verschlussmethode	Überlebensrate (%)	Amnionintegrität (%)	Literaturangabe
Matrigel und Naht	78,0	38,0	GRATACOS et al. 2000
BioSIS und Naht	80,0	70,0	DEVILIEGER et al. 2003
Humane Amnionmembran	100,0	33,3	PAPADOPULOS et al. 2003
Humane Amnionmembran	82,6	26,3	PAPADOPULOS et al. 2006

Tabelle 12: Anwendung von Membranen und Extrazellulärmatrizes

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG in der Fassung vom 25.05.1998, BGBl I S. 1105. zuletzt geändert am 06.08.2002, BGBl I S.3082) durch der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 209.1/211-2531-73/04).

3.1 Material und Methode

3.1.1 Tiermodell

Als Tiermodell wird das bereits für den Verschluss der fetalen Membranen nach einer Fetoskopie etablierte Kaninchenmodell mit weißen Neuseeländer Kaninchen gewählt. Dieses Modell wurde bereits in zahlreichen Vorarbeiten (GRATACOS et al. 1999, DEPREST et al. 1999b, GRATACOS et al. 2000, DEVLIEGER et al. 2003, PAPADOPULOS et al. 2003a, PAPADOPULOS et al. 2006) verwendet und gilt heute als Goldstandard für den experimentellen fetoskopischen Amnionverschluss am Kleintiermodell.

3.1.1.1 Haltungsbedingungen, Fütterung

Zur Durchführung der Studie werden acht trächtige weiße Neuseeländer Kaninchen (New Zealand White Rabbits, Vertrieb Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland) eine Woche vor Beginn der ersten Operationen, zur Eingewöhnung in die neue Umgebung, eingestellt. Die Tiere werden in Einzelboxen bei freiem Zugang zu Futter (Heu, Pellets, Karotten) und Wasser, bei Raumtemperatur und künstlichem Licht gehalten.

3.1.2 Methode

3.1.2.1 Herstellung der dezellularisierten humanen Amnionmembranen

Die verwendeten dezellularisierten Amnionmembranen stammen von sechs verschiedenen Patientinnen und wurden im Rahmen von Kaiserschnitten gewonnen. Alle Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Entnahme zwischen 23 und 32 Jahre alt und in der 37,3 \pm 2-ten.

Schwangerschaftswoche ihrer ersten oder zweiten Schwangerschaft. Sie wurden auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C sowie Streptokokkeninfektionen, Röteln und Toxoplasmose untersucht und negativ getestet.

Es wird darauf geachtet, dass nur zusammenhängende, durchscheinene Membranstücke ohne Löcher, Risse oder Blutverunreinigung gewonnen werden. Die gewonnenen Stücke haben eine Größe von 150-200 cm². Zur Plazenta wurde ein Sicherheitsabstand von 2 cm eingehalten. Nach Trennung des Amnion vom Chorion wird das Amnion sofort mit einer PBS- Lösung mit pH 7,4 und Zusatz von 50 µg/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin gewaschen.

Anschließend werden die Membranen in eine dezellularisierende Lösung mit 0,5% Sodiumdeoxycholate, 0,02% EDTA und zwei Proteaseinhibitor-Cocktail Tabletten (Roche Diagnose GmbH, Mannheim, Deutschland) pro 100 ml Lösung verbraucht und für eine Stunde gleichmäßig bei 4°C geschwenkt. Danach werden die Membranen mit 1.2 U/ml Dispase II (Gibco, BRL, Basel) in PBS für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wird durch mildes Abkratzen der Membran mit einem Zellschaber und Waschung mit PBS die Oberfläche der Membranen von sichtbaren Zellen befreit. Es folgt eine Inkubation mit 1 µl/ml DNase und RNase (Roche Diagnose GmbH, Mannheim, Deutschland) für drei Stunden bei Raumtemperatur. Die so präparierten Membranen werden in PBS, angereichert mit Antibiotika (Penicillin/ Streptomycin), bis zur Verwendung in der Operation aufbewahrt. Ein Teil von jeder Membran wird in phosphatgepufferter 4% Paraformaldehydlösung zur histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchung fixiert.

Die verwendeten dezellularisierten Membranen wurden im Universitätsspital Zürich (Klinik für Geburtshilfe, Universitätsspital Zürich, Schweiz) hergestellt.

3.1.2.2 Durchführung der Operation

3.1.2.2.1 Vorbereitung und Narkose

Die Operationen werden am 23. Trächtigkeitstag durchgeführt.

Die Kaninchen werden im Vorbereitungsraum einer Allgemeinuntersuchung unter besonderer Beachtung der anästhesierelevanten Parameter, insbesondere Atmung, Kreislaufsituation und Körpertemperatur unterzogen. Sie bekommen venöse Zugänge (BD VenflonTMPro, 22GA) in die lateralen Ohrvenen beider Ohren gelegt. Zur Narkoseeinleitung wird initial Propofol 4-5 mg/kg (Propofol[®] 1% Fresenius Emulsion, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) verabreicht. Die weitere Propofolgabe erfolgt nach Wirkung. Zur Analgesie und Spasmolyse werden Metamizol-Natrium 50 mg/kg 1:3 verdünnt langsam i.v.

(Novaminsulfon-ratiopharm[®] 2,5, ratiopharm GmbH, Ulm), und als zusätzliche analgetische Komponente Fentanyl 0,01 mg/kg i.v. (Fentanyl[®] 0,5mg Curamed Injektionslösung, Dr. W. Schwabe GmbH & Co Abt. Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe) injiziert.

Die antibiotische Abdeckung erfolgt mit Trimethoprim-Sulfadoxin 0,5 ml/kg s.c. (Borgal-Lösung[®] 7,5%, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim). Zum Schutz der Hornhaut vor Austrocknung während der Narkose wird Dexpanthenol-Augensalbe (Bepanthen[®] Augen und Nasensalbe, Bayer AG, Leverkusen) korneal appliziert. Es folgt die Intubation mit einem Ch 12, 2,5 mm Hartgummi Tubus (Willy Rüschi AG, Waiblingen).

Die Lagerung erfolgt in Rückenlage, die Gliedmaßen werden nach vorne und hinten ausgebunden. Die Beatmung erfolgt über eine Beatmungsgerät (Hallowell EMC Model AWS, Veterinary Anaesthesia Workstation, Voelker GmbH, Kaltenkirchen, Deutschland).

Zur Fortführung der Narkose wird den Kaninchen Propofol 2% 1,5-1-0,5 mg/kg/h i.v. nach Wirkung (Propofol[®] 2 % Fresenius Emulsion, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) über einen Propofol-Perfusor verabreicht. Außerdem erhalten sie eine Dauertropfinfusion mit Ringer-Lösung 10 ml/kg/h (Ringer DeltaSelect, DeltaSelect GmbH, Dreieich), zu der über einen Dreiwegehahn alle 30 Minuten Fentanyl 0,01 mg/kg i.v. (Fentanyl[®] 0,5mg Curamed Injektionslösung, Dr. W. Schwabe GmbH & Co Abt. Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe) zur Aufrechterhaltung der Analgesie verabreicht werden. Die Gesamtdauer der Narkose liegt zwischen 1,5 und 3 Stunden.

3.1.2.2.2 Narkoseüberwachung

Zur Überwachung werden während der Narkose Puls und Sauerstoffsättigung mit Hilfe eines High-Speed-Pulsoximeters (NONIN 8600V, mediquip Medizintechnik, Kirchzarten) und der endexpiratorische CO₂-Partialdruck mit Hilfe eines Capnometers (Datex- Ohmeda S/5, Datex- Ohmeda GmbH, Freiburg) überwacht. Operationszeit, Sauerstoffsättigung, endexpiratorischer CO₂-Wert, Herzfrequenz und aktuelle Propofol und Fentanylgabe werden alle 15 Minuten auf einem Anästhesieprotokoll vermerkt (Abbildung 2). Die Körperinnentemperatur wird zu Beginn und Ende der Operation durch rektale Messung kontrolliert.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Kaninchen # : _____ OP-Datum: _____ Gewicht (g): _____ Trächtigkeitstag: _____	Operateur: _____ Anästhesie: _____ OP-Beginn: _____ OP-Dauer: _____
-----------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------

Hautschnitt

Peritoneum

Uterus ex, Feten zählen

Operation der Studiengruppen

Peritoneum

Hautnaht

OP-Zeit	0:00	0:15	0:30	0:45	1:00	1:15	1:30	1:45	2:00	2:15	2:30	2:45	3:00
Uhrzeit													
O2													
CO2													
Propofol													
Fentanyl													
Hf													
T													

T
 Propofol
 Fentanyl

Hf
 CO2

Notizen

Abbildung 2: Narkoseprotokoll

3.1.2.2.3 Durchführung der Fetoskopie und des Amnionverschlusses

Das Abdomen wird mit Alkohol (Cutasept F[®], Bode Chemie, Hamburg) und Polividon-Jod (Braunol[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen) desinfiziert. Es erfolgt die sterile Abdeckung mittels Lochtuch. Nach Überprüfung der vollständigen Analgesierung erfolgt der mediane Hautschnitt über der Linea alba und die anschließende schichtweise Präparation auf die Bauchwand. Anschließend wird die Bauchhöhle durch einen Schnitt in der Linea alba eröffnet. Der Uterus wird aufgesucht und vorgelagert. Die Ampullen werden gezählt und systematisch durchnummeriert. Die Nummern und die operierten Ampullen werden auf dem OP-Protokoll tabellarisch und graphisch dokumentiert (Abbildung 3).

Um das Abortrisiko zu minimieren, wird nur jeder zweite Fetus fetoskopiert. Die der Zervix direkt benachbarten Feten werden aus dem selben Grund ebenfalls nicht behandelt. Diese, sowie die übrigen nicht operierten Feten dienen als Negativkontrollen (n=31). Bei den Positivkontrollen (n=7) erfolgt nach Entfernung des Fetoskopes kein Verschluss. Die Fetoskopie wird unter Sicht durch Lupenbrillen mit vierfacher Vergrößerung und mit Mikroinstrumenten vorbereitet und mit einem 1.2 mm, 10,000-pixel, 0° Fiberendoskop (Karl Storz, Tuttlingen) durchgeführt.

Um ein Auskühlen und Austrocknen des Uterus zu vermeiden wird der Uterus zurück in die Bauchhöhle verlagert. Nur die zu operierende Ampulle wird vorgelagert und mit warmen, mit Ringerlösung (RingerDeltaSelect Spüllösung, DeltaSelect GmbH, Dreieich) befeuchteten Bauchtüchern abgestützt. Es erfolgt eine 2-3 mm große Inzision des Myometriums mit Hilfe einer Mikroschere auf der antimesenterialen Seite des Uterus. Durch dosierten manuellen Druck lassen sich Chorion und Amnion vorwölben. Nach Eröffnung des Chorions durch Auseinanderziehen mittels zweier Mikropinzetten, wird das Fetoskop durch einen 14 Gauge Trokar durch das Amnion in die Uterushöhle eingebracht. Es erfolgt eine fünfminütige explorative Fetoskopie. Um die Lage der Feten in der Amnionhöhle zu verifizieren werden charakteristische Körperteile wie Ohranlagen (Abbildung 5), Pfotenanlagen (Abbildung 4) oder Kopfanlagen aufgesucht. Entwichene Amnionflüssigkeit wird durch maximal 10 ml körperwarmer Ringerlösung (RingerDeltaSelect Spüllösung, DeltaSelect GmbH, Dreieich) ersetzt.



Abbildung 4: Endoskopie: Pfotenanlage



Abbildung 5: Endoskopie: Ohranlage

Bei den Studiengruppen wird das Endoskop aus dem Trokar gelöst und zurückgezogen. Der Trokar verbleibt in der Öffnung. Es wird ein Mandrin durch den Trokar eingeführt. Über den Mandrin wird nachdem der Trokar entfernt wurde, eine Kunststoff-Hülse eines zentralen

Venenkatheters (Cavafix®- Certo®, Braun, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) in die Uterus-Chorion- Amnion- Öffnung geschoben.

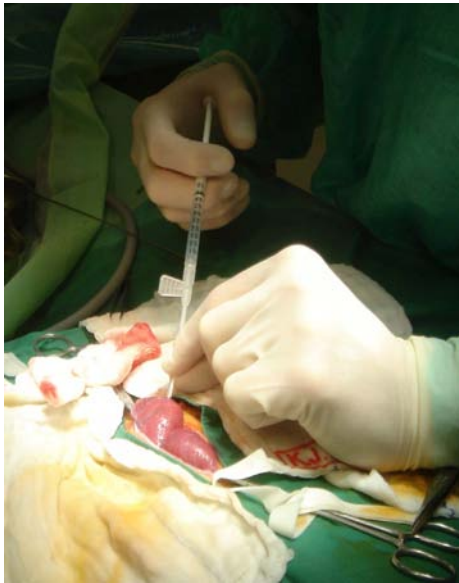


Abbildung 6: Einbringen der DAM/K

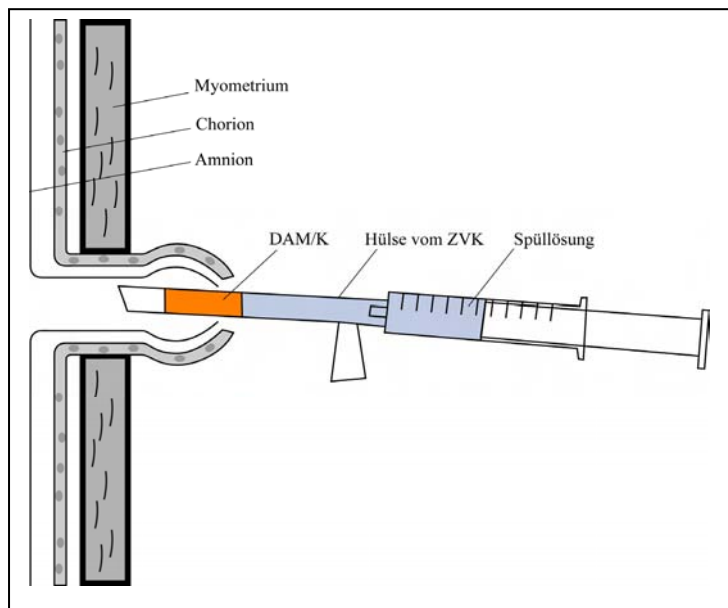


Abbildung 7: Einbringen der DAM/K

Nun wird auch der Mandrin entfernt. Es wird ein ca. 1x1 cm großes Stück dezellularisierte Amnionmembran (DAM) (Gruppe II, n=10) oder Kollagen (K) (Gruppe I, n=10) (TissuFleece E®, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) mit Hilfe einer 1ml Spritze mit körperwarmer Ringerlösung unter langsamem Zurückziehen der Kanüle in den Amnionmembrandefekt eingebracht (Abbildung 6 und 7), so dass ein Teil des verwendeten Materials in der Amnionhöhle und ein Teil außerhalb der Amnionhöhle zu liegen kommt (Abbildung 8 und 9).

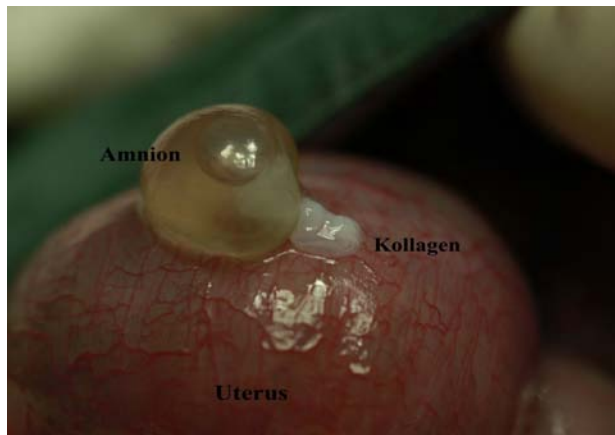


Abbildung 8: Eingebrochenes Kollagen

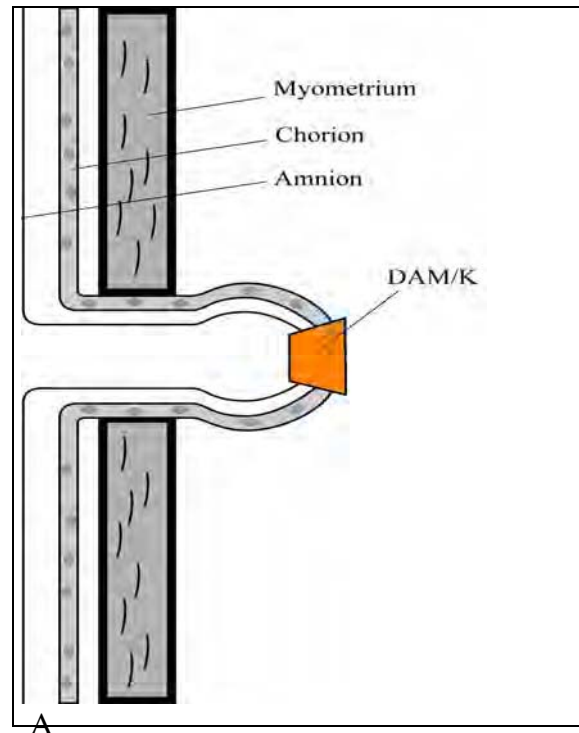


Abbildung 9: Eingebrochenes K/DAM

Anschließend werden die DAM oder das Kollagen mit 0,4 ml Fibrinkleber (Tissucol Duo[®] 2 ml Immuno, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) fixiert. Der Verschluss der Uteruswand erfolgt gesondert vom Verschluss der Membranen mit 3-4 Knopfheften mit Prolene 6/0 (Prolene[®] 6-0, Ethicon GmbH, Norderstedt) (Abbildung 10).

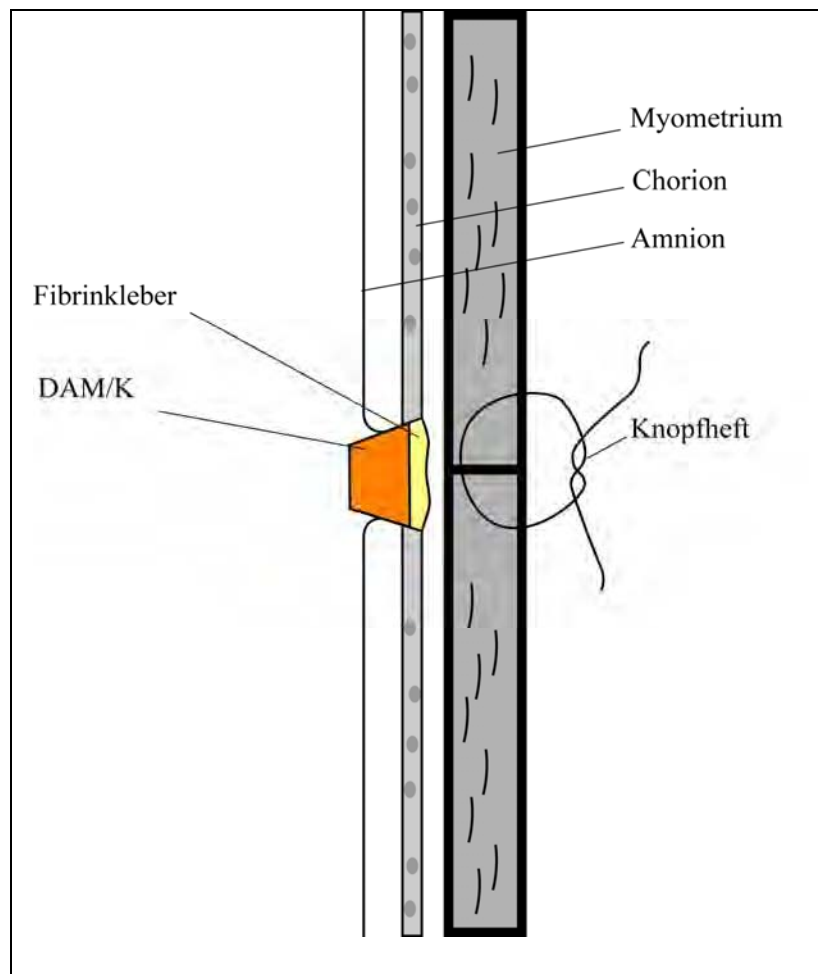


Abbildung 10: Verschluss des Myometriums

Die Bauchwand wird fortlaufend mit Vicryl 3/0 (Vicryl[®], Ethicon GmbH, Norderstedt) verschlossen. Es folgt der schichtweise Verschluss von Haut und Unterhaut durch versenkte Einzelknopfnähte mit Vicryl 2/0, (Vicryl[®], Ethicon GmbH, Norderstedt), um einem Ausbeißen der Fäden bzw. einer Automutilation vorzubeugen.

Nach der Operation wird den Kaninchen Medroxyprogesteronacetat 4,5 mg/kg i.m. (Supprestral[®] 50mg/kg, Selectavet Dr Otto Fischer GmbH, Weyarn-Holzolling) zur Uterusrelaxation injiziert. Zur Fortführung der Analgesie wird Metamizol-Natrium 50 mg/kg 1:3 verdünnt s.c. (Novaminsulfon-ratiopharm[®] 2,5, ratiopharm GmbH, Ulm) direkt postoperativ, sowie alle 6 Stunden für weitere 3 Tage verabreicht.

3.2 Auswertung

Am siebten postoperativen Tag (30. Trächtigkeitstag) erfolgt eine Relaparatomie nach Euthanasie des Muttertiers mit 60 mg/kg Pentobarbital i.v. (Narcoren®, Merial GmbH, Halbergmoos). Zur Auswertung wird der Uterus erneut mit Mikroinstrumenten an der antimesenterialen Seite eröffnet. Die Feten werden vorsichtig mit ihren fetalen Membranen aus dem Uterus entnommen.

3.2.1 Auswertungskriterien, Auswertungstests

Als Parameter für die Auswertung dienen das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Amnionflüssigkeit, die Amnionintegrität, das Gewicht der Feten sowie deren Herz und Lungengewicht und die sich aus den Lungen-, Herz-, und Körpergewicht ergebenden Quotienten ($FLKGQ = \text{fetaler Lungengewicht} / \text{Körpergewicht} - \text{Quotient}$; $FLHKGQ = \text{fetaler Lungen} + \text{Herzgewicht} / \text{Körpergewicht} - \text{Quotient}$). Alle Auswertungsparameter werden protokolliert (Abbildung 14).

Die Amnionintegrität wird zusätzlich zur Adspektion durch einen Farbttest (Abbildung 11) getestet. Dazu werden 5 ml Methylenblau durch eine Braunüle (BD Venflon™ Pro, 22GA) an der mesenterialen Seite des Uterus, gegenüber des Amniondefektes, in die Amnionhöhle injiziert. So werden auch kleinste Membrandefekte durch Austritt der blauen Flüssigkeit dargestellt.



Abbildung 11: Methylenblautest

Zur Auswertung werden nur Feten herangezogen, die zum Zeitpunkt der Euthanasie leben (Abbildung 13). Tote, bereits mazerierte Feten (Abbildung 12) werden als solche notiert und gehen nicht in die statistische Bewertung ein. Die Feten, die bei der Entnahme aus den Eihäuten noch leben, erhalten 60mg/kg Pentobarbital i.p. (Narcoren®, Merial GmbH, Halbergmoos, Germany). Ein Kaninchen hatte nach der Operation einen Abort. Die Ursache konnte nicht festgestellt werden, die Feten wurden nicht zur Auswertung herangezogen.



Abbildung 12: zum Zeitpunkt der Euthanasie mazerierter Fetus



Abbildung 13: zum Zeitpunkt der Euthanasie lebender Fetus

Auswertungsprotokoll											
Tier- Nr.:	OP- Datum:	Opferung:	GA:	Gewicht:	Anzahl der Feten:	links:	rechts:				
Nr. Fetus											
(-)											
(+)											
DAM											
Kollagen											
lebend/ tot											
Amnion- Flüssigkeit											
Amnion- Integrität											
Fetus- Gewicht											
Lunge + Herz											
Lunge - Herz											
FLKGQ											
FLHKGQ											
Histologie											
Notizen											

Abbildung 14: Auswertungsprotokoll

3.2.2 Histologische Auswertung

Die DAM und das Kollagen, beziehungsweise der zur Fixation verwendeten Fibrinkleber, werden vor dem Einbringen in den Defekt mit Tätowierfarbe gekennzeichnet. Diese Kennzeichnung erleichtert bei der Sektion die Identifikation der Operationsstelle und ermöglicht die Wiedergewinnung des eingesetzten Materials für die histologische Untersuchung. Das so markierte Material kann auch in H/E gefärbten Gewebeschnitten wiedergefunden werden (Abbildung 15).

Für die histologischen Untersuchungen wird bei einigen der operierten Feten das Operationsgebiet in toto entnommen und eine halbe Stunde in 4% Paraformaldehyd und anschließend in PBS fixiert und zur Anfertigung histologischer Schnitte in Paraffin eingebettet. Die Anfärbung erfolgt mit Hematoxylin-Eosin (H/E). Die histologische Auswertung erfolgt im Universitätsspital Zürich (Klinik für Geburtshilfe, Universitätsspital Zürich, Schweiz).

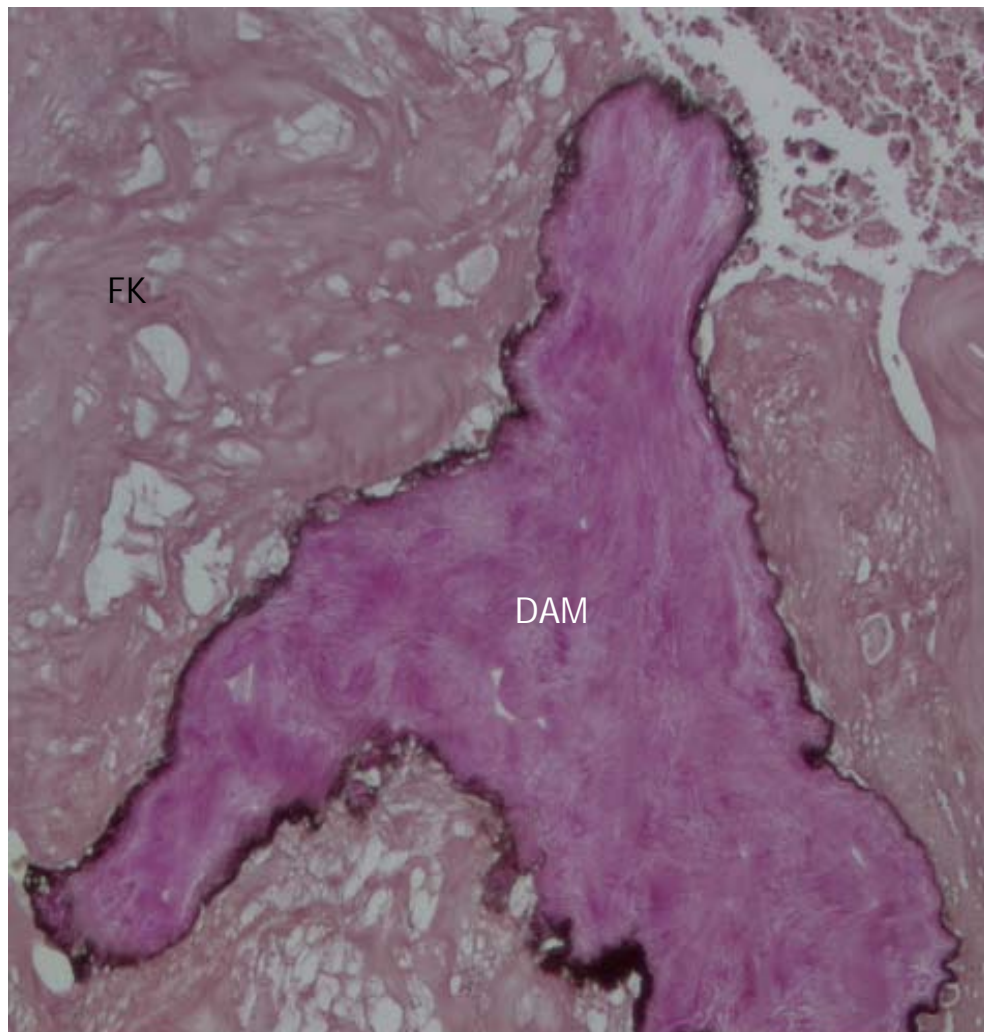


Abbildung 15: histologisches Bild der gefärbten DAM

3.2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wird mit Hilfe des SPSS 11.0 für Windows Softwarepakets mit Unterstützung des Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München durchgeführt. Verwendet wird der Exakte Test nach Fisher und eine Varianzanalyse (ANOVA LSD). Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,001$. Verglichen werden die Amnionintegrität und die Anwesenheit von Amnionflüssigkeit in den einzelnen Studiengruppen mit den Negativkontrollen und untereinander. Außerdem wird das Gewicht der Feten, Lungen-, und Herzgewicht und die Quotienten aus Lungengewicht/ Körpergewicht (FLKGQ- Herz) und Lungen- und Herzgewicht/ Körpergewicht (FLKGQ+ Herz) der Studiengruppen mit intakter Membran, der Studiengruppen mit Membrandefekt und der Negativkontrollen verglichen.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Überlebensrate

Die Überlebensrate der Feten beträgt bei der Gruppe II (DAM) 80%. In Gruppe I (K) überleben 70% und in der positiven Kontrollgruppe 57,1%. In der negativen Kontrollgruppe überleben 70,1% der Feten (Diagramm 1, Tabelle 13).

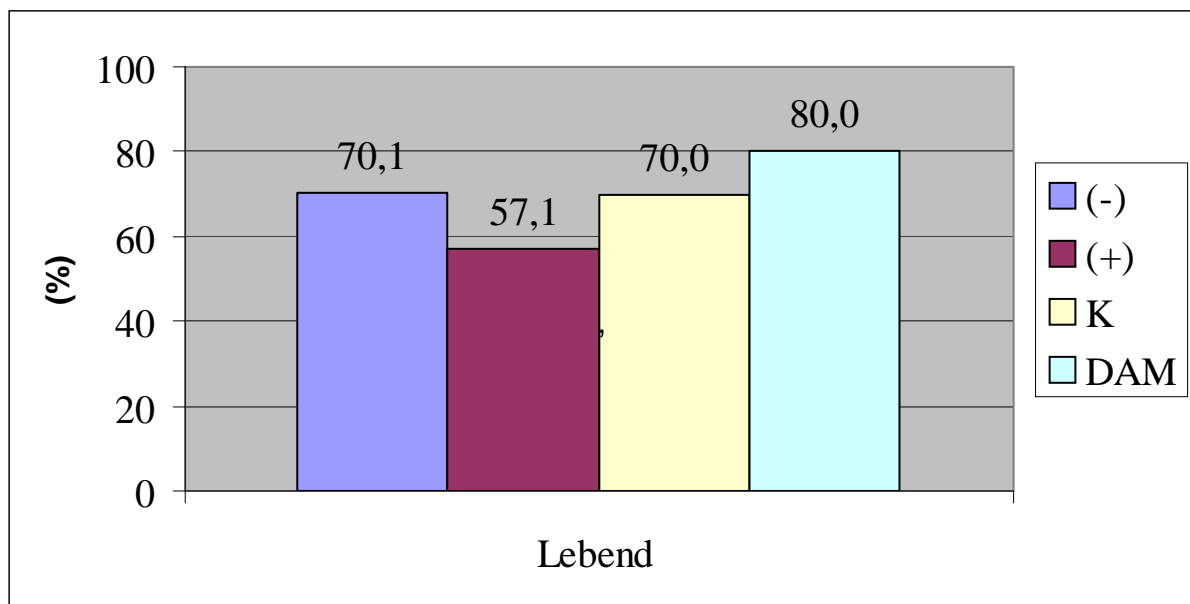


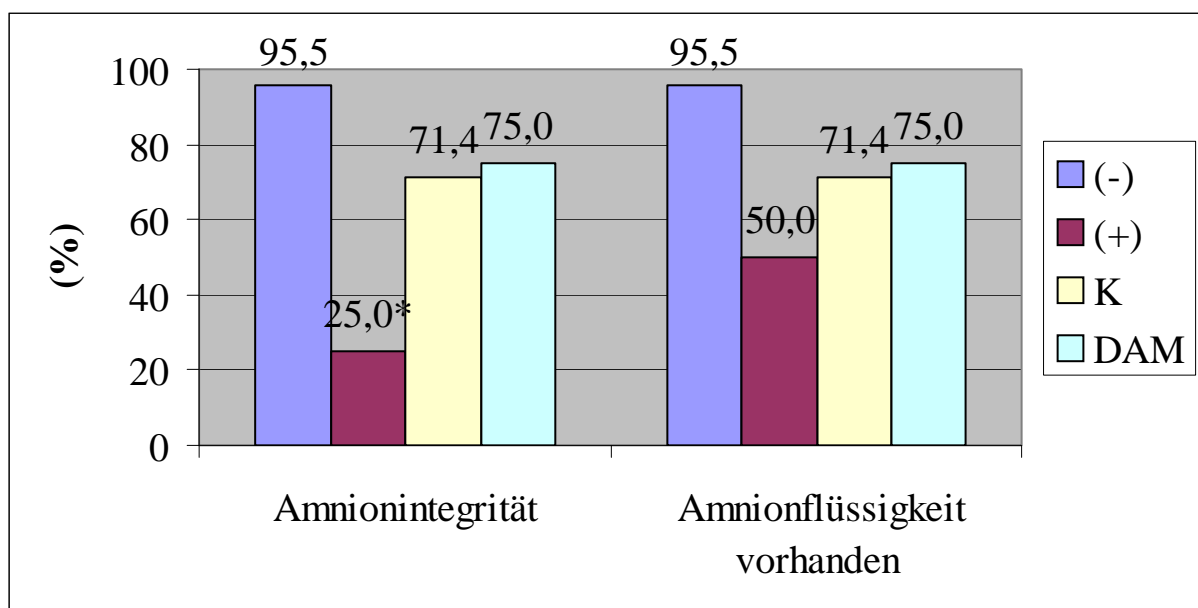
Diagramm 1: Anzahl der überlebenden Feten in %

Studiengruppe	Anzahl	Überlebensrate	
		No.	%
Negative Kontrollgruppe	n = 31	22/ 31	70,1
Positive Kontrollgruppe	n = 7	4/7	57,1
Kollagen (Gruppe I)	n = 10	7/10	70,0
DAM (Gruppe II)	n = 10	8/10	80,0

Tabelle 13: Fetale Auswertungsparameter: Überlebensrate am 30. Trächtigkeitstag

3.3.2 Amnionintegrität und Anwesenheit von Amnionflüssigkeit

Die Amnionintegrität in der negativen Kontrollgruppe liegt bei 95%. Bei den Studiengruppen beträgt sie bei 71,4% in Gruppe I (K) und 75% in Gruppe II (DAM). Bei den positiven Kontrollen besteht eine Amnionintegrität von 25%. Die Anwesenheit von Amnionflüssigkeit zeigt bei allen Studiengruppen außer den positiven Kontrollen dieselben Werte wie die Amnionintegrität. Bei den positiven Kontrollen liegt sie bei 50,0% (Diagramm 2). Bezüglich der Amnionintegrität besteht zwischen der positiven und negativen Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied (Tabelle 14).



*verglichen mit Negativkontrolle: $p < 0.001$

Diagramm 2: Amnionintegrität und Anwesenheit von Amnionflüssigkeit (bezogen auf Überlebende)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Studiengruppe	Anzahl	Amnionintegrität		Anwesenheit von Amnion- flüssigkeit	
		No.	%	No.	%
Negative Kontrollgruppe	n = 31	21/22	95,5	21/22	95,5
Positive Kontrollgruppe	n = 7	1/4 *	25,0	2/4	50,0
Kollagen (Gruppe I)	n = 10	5/7	71,4	5/7	71,4
DAM (Gruppe II)	n = 10	6/8	75,0	6/8	75,0

*verglichen mit Negativkontrolle: $p < 0.001$

Tabelle 14: Fetale Auswertungsparameter: Amnionintegrität und Anwesenheit von Amnionflüssigkeit am 30. Trächtigkeitstag

3.3.3 Fetale Entwicklung

Fetales Körpergewicht, Lungengewicht, Herz- und Lungengewicht, sowie die sich daraus ergebenden Quotienten FLKGQ und FLHKGQ werden zwischen der negativen Kontrollgruppe (n= 21) und den Studiengruppen verglichen. Die Studiengruppen werden aufgeteilt in solche mit intakter Amnionmembran (n= 12) und solche mit rupturierter Amnionmembran (n= 7).

3.3.3.1 Fetales Körpergewicht

Das Körpergewicht der negativen Kontrollgruppe liegt bei $24,42 \pm 6,45$ g. Die Studiengruppen mit intakter Amnionmembran erreichen ein Gewicht von $25,29 \pm 7,79$ g.

Die Entwicklung des fetalen Körpergewichts (KGW) zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Studiengruppen deren Amnionmembran rupturiert war, zeigen mit einem Gewicht von $21,34 \pm 9,23$ g eine Tendenz zu verminderten Körpergewicht (Tabelle 15).

	Negative Kontrollgruppe n= 21)	Studiengruppen, Amnionsäcke mit intakter Membran (n= 12)	Studiengruppen, Amnionsäcke mit rupturierter Membran (n= 7)
Fetales KGW (g)	$24,42 \pm 6,45$	$25,29 \pm 7,79$	$21,34 \pm 9,23$
Mittelwerte \pm SD. Keine signifikanten Unterschiede (ANOVA (LSD))			

Tabelle 15: Vergleich fetales Körpergewicht

3.3.3.2 Fetales Lungengewicht

Das fetale Lungengewicht der negativen Kontrollgruppe beträgt $0,570 \pm 0,253$ g. Die Feten der Studiengruppen mit intakten Membranen weisen ein Lungengewicht von $0,505 \pm 0,229$ g, die mit rupturierten Membranen $0,431 \pm 0,244$ g auf. Es gibt eine Tendenz zur Gewichtsabnahme von der Kontrollgruppe über die Studiengruppen mit intakten Membranen zu denen mit einer Membranruptur (Tabelle 16).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

	Negative Kontrollgruppe (n= 21)	Studiengruppen, Amnionsäcke mit intakter Membran (n= 12)	Studiengruppen, Amnionsäcke mit rupturierter Membran (n= 7)
Fetales Lungengewicht (g)	0,570± 0,253	0,505± 0,229	0,431± 0,244
Mittelwerte ± SD. Keine signifikanten Unterschiede (ANOVA (LSD))			

Tabelle 16: Vergleich fetales Lungengewicht

3.3.3.3 Quotienten aus fetalem Lungen- und Körpergewicht

Der Quotient aus fetalem Lungen- und Körpergewicht beträgt bei der negativen Kontrollgruppe $0,023 \pm 0,005$ g, bei den Studiengruppen mit intakter Membran $0,019 \pm 0,005$ und bei den Studiengruppen mit Membranruptur $0,019 \pm 0,003$. Es gibt keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 17).

	Negative Kontrollgruppe (n= 21)	Studiengruppen, Amnionsäcke mit intakter Membran (n= 12)	Studiengruppen, Amnionsäcke mit rupturierter Membran (n= 7)
FLKGQ	0,023± 0,005	0,019± 0,005	0,019± 0,003
Mittelwerte ± SD. Keine signifikanten Unterschiede (ANOVA (LSD))			

Tabelle 17: Vergleich der Quotienten aus fetalem Lungen- und Körpergewicht

3.3.3.4 Fetales Lungen- und Herzgewicht

Beim Vergleich des fetalen Gewichts von Lunge und Herz zeigt sich eine Tendenz zur Gewichtsabnahme von der negativen Kontrollgruppe $0,780 \pm 0,273$ g zu den Studiengruppen mit intakter Membran $0,735 \pm 0,276$ g und den Studiengruppen mit rupturierter Membran $0,623 \pm 0,292$ g. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht (Tabelle 18).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

	Negative Kontrollgruppe (n= 21)	Studiengruppen, Amnionsäcke mit intakter Membran (n= 12)	Studiengruppen, Amnionsäcke mit rupturierter Membran (n= 7)
Fetales Lungen- und Herzgewicht (g)	0,780 ± 0,273	0,735± 0,276	0,623± 0,292
Mittelwerte ± SD. Keine signifikanten Unterschiede (ANOVA (LSD))			

Tabelle 18: Vergleich Fetales Lungen- und Herzgewicht

3.3.3.5 Quotienten aus fetalem Lungen- und Herzgewicht und fetalen Körpergewicht

Der Quotient aus fetalem Lungen- und Herzgewicht und fetalen Körpergewicht bei der negativen Kontrollgruppe ist $0,032 \pm 0,005$ g. Er ist tendenziell höher als die Quotienten bei den Studiengruppen, die bei den Studiengruppen mit intakter Amnionmembran bei $0,029 \pm 0,006$ g und bei denen mit rupturierten Membranen bei $0,029 \pm 0,004$ g liegen. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 19).

	Negative Kontrollgruppe (n= 21)	Studiengruppen, Amnionsäcke mit intakter Membran (n= 12)	Studiengruppen, Amnionsäcke mit rupturierter Membran (n= 7)
FLHKGQ	0,032± 0,005	0,029± 0,006	0,029± 0,004
Mittelwerte ± SD. Keine signifikanten Unterschiede (ANOVA (LSD))			

Tabelle 19: Vergleich der Quotienten aus fetalem Lungen- und Herzgewicht und fetalen Körpergewicht

3.3.4 Histologische Ergebnisse

Die histologische Untersuchung der Proben zeigt keine Infiltration mit Entzündungszellen oder anderen Zellen und keine Anzeichen einer Abkapselung oder Abstoßung des eingebrachten Materials. Es konnte kein Einwandern von Zellen und keine beginnende Wundheilung nachgewiesen werden (Abbildung 16).

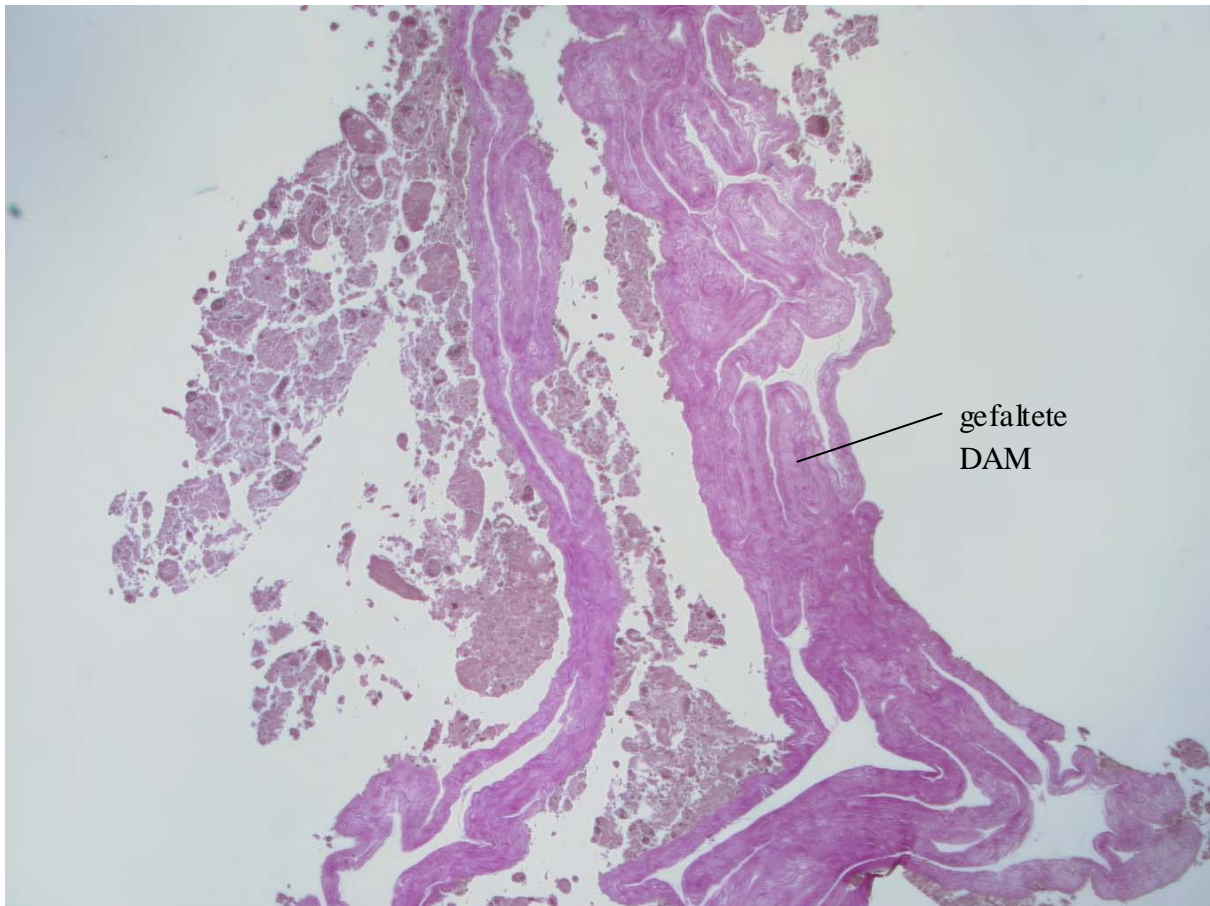


Abbildung 16: histologische Auswertung

4 DISKUSSION

4.1 Experimentelles Modell

Als Standard-Kleintiermodell für die Untersuchung von Verschlussmethoden der fetalen Membranen wurde das Kaninchenmodell etabliert (PAPADOPULOS et al. 1999, GRATACOS et al. 1999).

Vorteile des Kaninchenmodells sind die ausreichende Größe des Uterus und der Feten und die damit verbundene chirurgische Durchführbarkeit der Operationsmethode. Allerdings erlaubt die Größe der Kaninchen keine perkutane Fetoskopie, wie sie in der Humanmedizin üblich ist. Der Uterus der Kaninchen weist bis zu 16 Ampullen auf. Eine genaue ultrasonographische Zählung, Nummerierung und Fetoskopie ausgewählter Ampullen ist schwierig. Eine direkte Punktion der Amnionhöhle verursacht aufgrund mangelnder Kontrolle über die Tiefe des Eindringens und mangelndem Überblick über den möglichen Bewegungsspielraum in der kleinen Amnionhöhle in manchen Fällen ein direktes fetales Trauma. Zusätzlich besteht die Gefahr einer Fehlpositionierung des Endoskopes (extraamniotisch) (GRATACOS et al. 1999, PAPADOPULOS et al. 1999).

Durch die multifetale Trächtigkeit ist es möglich mit einer geringen Zahl an Versuchstieren auszukommen und die Effektivität verschiedener Verschlussmöglichkeiten intraindividuell zu vergleichen.

Bei der Bewertung zu berücksichtigen sind die anatomischen Unterschiede zwischen Menschen und Kaninchen. Beide haben eine discoide Plazenta haemochoralis, doch der Einfluss benachbarter Ampullen beim Kaninchen als multipara auf die Entwicklung der Feten ist mit der Situation beim Menschen nicht ganz zu vergleichen. Die Uteruswand eines Kaninchens ist dünner als die eines Menschen und die durch die verwendeten Endoskope und Trokare gesetzten Defekte im Verhältnis wesentlich größer, was Einfluss auf die Wundheilung hat.

Die Fetoskopie wird beim Menschen zwischen der achtzehnten und sechsundzwanzigsten Schwangerschaftswoche durchgeführt (YANG et al. 1998). Das hat zur Folge, dass der Kollagenpfropfen beziehungsweise die Membran für einige Wochen in dem Defekt der fetalen Membranen verbleiben und diesen verschliessen muss. Aufgrund der relativ kurzen Gestationsdauer des Kaninchens von nur 31-32 Tagen sind Untersuchungen über einen längeren Zeitraum mit diesem Modell nicht möglich.

Die Dauer der Fetoskopie war in dieser Studie auf 5 Minuten beschränkt, die Anzahl der gesetzten Defekte auf Einen. Beim therapeutischen Einsatz der Fetoskopie beim Menschen wird eine Operationszeit von 5 Minuten in vielen Fällen nicht ausreichen, und es werden je nach Operationstechnik mehr als ein Zugang zur Amnionhöhle nötig sein.

Dass die Anzahl der verwendeten Trokare sowie die Dauer und Komplexizität des Eingriffs eine Rolle bei der Entstehung von iPPROM spielen zeigten PAPADOPULOS et al. 2000.

In vorangegangenen Studien zeigte sich ein erhöhtes Abortrisiko nach Fetoskopie der der Zervix benachbarten Ampulle. Aus diesem Grund wurden die der Zervix benachbarten Ampullen nicht fetoskopiert sondern der negativen Kontrollgruppe zugeordnet. Beim Menschen ist dieses Vorgehen nicht möglich, wurde aber im Tierversuch aus ethischen Gründen, um die Anzahl der benötigten Tiere und um die Verlustrate der Kaninchen gering zu halten, durchgeführt.

Die hohe Überlebensrate in unserer Studie von 57,1% bei den positiven Kontrollen, bei denen der gesetzte Defekt nicht verschlossen wurde, weist möglicherweise auf eine verminderte Abortanfälligkeit nach Ruptur der fetalen Membranen beim Kaninchen im Vergleich zum Menschen hin. Bekräftigt wird diese Annahme durch die Ergebnisse aus vorangegangenen Studien am Kaninchenmodell. Nach einer Hysteroaminotomie von 1 cm Länge überlebten 58,3% der Feten, deren Amnion unverschlossen blieb, obwohl es bei 7 von 12 Feten zusätzlich zu einer Herniation durch die Uterusöffnung kam (PAPADOPULOS et al. 1998).

In der Studie zur Eignung des Kaninchenmodells als Kleintiermodell für den fetoskopischen Verschluss der fetalen Membranen wurde nur der Uterus verschlossen. Die an den fetalen Membranen gesetzten Defekte blieben unverschlossen. Alle Muttertiere überlebten den Eingriff. Es gab keine Infektionen oder Aborte. Die Überlebensrate der Feten lag bei den fetoskopierten Feten bei 100%, in der negativen Kontrollgruppe bei 85,7% (kein signifikanter Unterschied) (PAPADOPULOS et al 1999).

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Amnionintegrität

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der Verschluss fetoskopisch erzeugter Amniondefekte mit humaner dezellularisierter Amnionmembran und Kollagen chirurgisch gut durchführbare und effektive Methoden sind.

Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien, in denen der Verschluss eines fetoskopisch erzeugten Amnionmembrandefektes mittels humaner Amnionmembran lediglich in 33,3% (PAPADOPULOS et al. 2003a) und 26,3% (PAPADOPULOS et al. 2006) gelang, konnten wir mit unserer DAM in 75% einen funktionellen Verschluss nachweisen.

GRATACOS et al. 2000 verwendeten Matrigel, ebenfalls eine Extrazellulärmatrix, mit der lediglich in 38% ein Verschluss des Defekts nachweisbar war.

Mit BioSIS, einer biokompatible Matrix, konnte eine Membranintegrität von 70% erreicht werden (DEVLIEGER et al. 2003).

OCHSENBEIN- KÖLBLE et al. 2007 führten eine Studie mit einer dezellulierten Amnionmembran durch, bei der die verwendete heterologe Amnionmembran von Kaninchen gewonnen wurde und verglichen diese mit einer synthetischen DegraPol-Membran (Polesterurethanmembran). In der DegraPol-Gruppe konnte im Gegensatz zur Amnionmembrangruppe eine der positiven Kontrollgruppe gegenüber signifikant höhere Anwesenheit von Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden. Sowohl die Reepithelisierungsrate, als auch der Proliferationsindex der Gruppe mit der Amnionmembran waren höher als die der DegraPol- Gruppe. Die DegraPol- Membran lockerte sich in 2 von 9 Fällen und wurde schlechter integriert als die Amnionmembran. Die Reepithelialisierung war schwächer und es zeigten sich Anzeichen einer milden lokalen Entzündungsreaktion.

Unser Verschluss mittels Kollagenpfropfen erzielte eine Amnionintegrität von 71,4%.

GRATACOS et al konnten 2000 in 82% den Defekt erfolgreich mit einem Kollagenpfropfen verschließen.

DISKUSSION

Das ursprüngliche Ziel dieser Studie war es, zu zeigen, dass wir mit Hilfe der DAM einen anatomisch korrekten Verschluss des Membrandefektes erzielen können.

Sowohl bei dem Verschluss mit BioSIS, als auch bei GRATACOS et al.'s Kollagenpfropfen wurde das zum Verschluss verwendete Material mit dem Myometrium vernäht (Abbildung 18). Bei unserer Verschlussmethode konnte durch den schichtweisen Verschluss von Amnion und Chorion und der gesonderten Naht des Myometriums die natürliche Verschieblichkeit zwischen den fetalen Membranen und dem Myometrium erhalten werden (Abbildung 17).

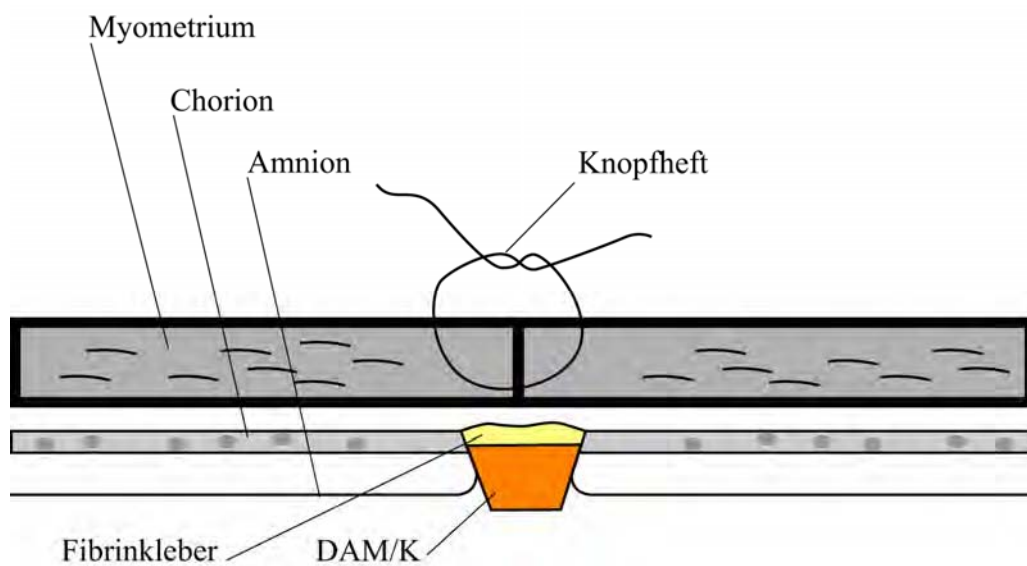


Abbildung 17: schichtweiser Verschluss in unserer Studie

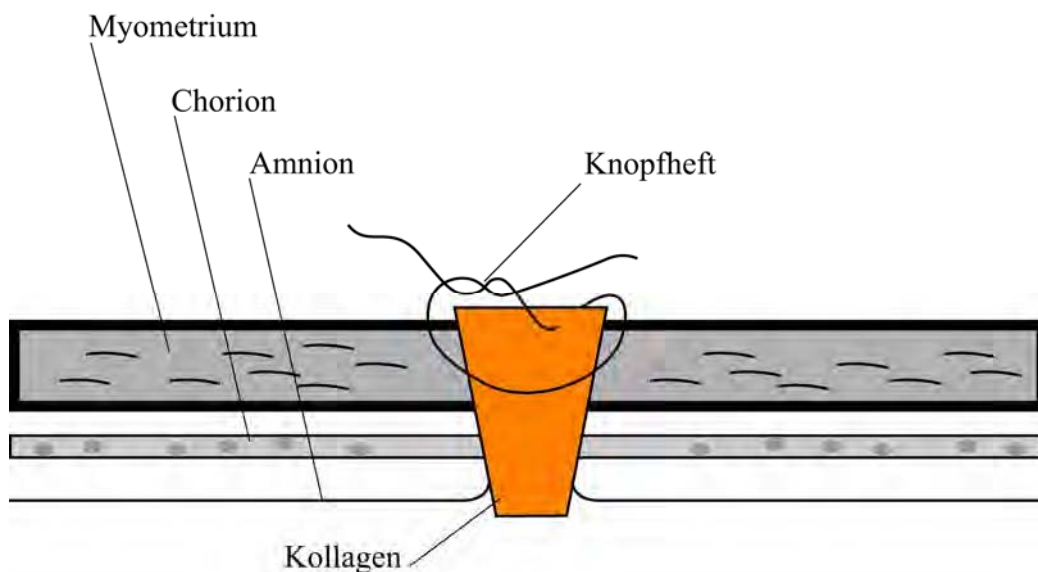


Abbildung 18: modifizierter Verschluss nach GRATACOS et al. 2000

4.2.2 Fetale Entwicklung

In unserer Studie zeigen die Feten aus den Studiengruppen mit rupturierten Membranen keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Entwicklung. Man sieht eine Tendenz zu einem verminderten Körper- und Lungengewicht gegenüber den Feten aus der negativen Kontrollgruppe und denen aus den Studiengruppen mit intakten Membranen. Auch der Quotient aus fetalem Lungen- und Körpergewicht zeigt eine Tendenz zur Abnahme von der negativen Kontrollgruppe über die Feten aus Studiengruppen mit intakten Membranen zu denen mit anhaltender Membranruptur.

Zusätzlich haben wir das fetale Herz- und Lungengewicht gemessen, sowie den Quotienten aus Herz- und Lungengewicht und Körpergewicht bestimmt. Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt.

In vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich am Kaninchenmodell reproduzierbar anhaltende Membrandefekte und als Folge ein Oligohydramnion sowie eine Lungenhypoplasie produzieren lassen (GRATACOS et al.1999), und dass beim Kaninchen wie beim Menschen Feten mit experimentell erzeugtem Oligohydramnion ein signifikant vermindertes Körpergewicht und ein tendenziell verringertes Lungengewicht und maximales Lungenvolumen aufweisen. Nicht nur das absolute Lungengewicht war geringer, sondern auch das Lungengewicht im Verhältnis zum Körpergewicht (Quotient Lungengewicht/Körpergewicht) (KING et al. 1986).

Wir haben uns bei der Auswertung darauf beschränkt die Anwesenheit von Amnionflüssigkeit mit „anwesend“ oder „nicht anwesend“ zu beurteilen. Somit lässt sich nicht feststellen ob und wie stark das Oligohydramnion, das zu den Unterschieden in der fetalen Entwicklung führt, ausgebildet war. Da die Amnionflüssigkeit beim Kaninchen sehr geringe Mengen aufweist, ist die vollständige Gewinnung und Messung der Amnionflüssigkeitsmenge schwierig und kann zu Fehlern führen (PAPADOPULOS et al 1998).

4.2.3 Histologische Auswertung

Unsere histologische Auswertung zeigt keinerlei Anzeichen für eine Entzündungsreaktion oder fibrinöse Abkapselung um die DAM.

In vorangegangenen Studien mit Extrazellulärmatrizes, Membranen, aber auch bei der Verwendung von Kollagen, konnten unspezifische Entzündungsreaktionen mit Einwanderung von polymorphonucleären Zellen nachgewiesen werden (DEVLEGER et al. 2003, GRATACOS et al. 2000, OCHSENBEIN- KÖLBLE et al. 2007).

Es ist bekannt, dass die Methode der Dezellularisierung sowohl bei allogenen, als auch bei xenogenen Geweben zu einem nicht- immunogenen Verhalten des Materials führt (GILBERT et al. 2006).

Nach Abschluss der Auswertung unserer Ergebnisse können wir zu diesem frühen postoperativen Zeitpunkt eine Zellpenetration durch die DAM und ihre Umwandlung in eine natürliche fetale Membran nicht nachweisen. Die DAM scheint zu diesem Zeitpunkt vor allem eine mechanische Barriere für die Amnionflüssigkeit darzustellen.

Diese Feststellung deckt sich mit dem Wissen über die geringe Wundheilungstendenz der Amnionmembran (GRATACOS et al. 2006).

Amnionzellen scheinen eine sehr viel langsamere Heilung zu erzielen als epitheliale Zellen, was mit der Anzahl sich aktiv teilender Zellen zusammenhängt (QUINTERO et al. 1996).

Auch das Verfahren der Dezellularisierung kann durch Entfernung adhesiver Proteine die Zellmigration auf die Matrix verlangsamen (GILBERT et al. 2006).

In Vitro konnte die Eignung der dezellulisierten Amnionmembran zur Wiederbesiedelung mit Amniozyten nachgewiesen werden (PORTMANN-LANZ et al. 2006).

Das die Reepithelisierung auch *in vivo* möglich ist, zeigten OCHSENBEIN- KÖLBLE et al. 2007. Sie konnten in ihrer Studie mit dezellularisierter Kaninchen-Amnionmembran auf der der Amnionhöhle zugewante Seite der Amnionmembran eingewanderte epitheliale Zellen nachweisen, die von geringen Anzeichen einer Entzündung umgeben waren. In einem Fall konnte eine vollständige Wiederherstellung der Membranintegrität durch Reepithelisierung der Amnionmembran festgestellt werden.

Für eine Beurteilung der Eignung der dezellulisierten Membranen als Grundlage für ein vollständiges Einheilen und eine Neubesiedelung mit Amniozyten sind Studien, die eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum ermöglichen nötig.

4.3 Vorzüge und Eigenschaften der DAM

DAM besteht aus von Amnionzellen sezernierten strukturellen und funktionellen Proteinen wie Kollagenfasern, Proteoglycanen und Glycosaminoglycanen. Für die Dezellularisierung sollte das Ausgangsmaterial so dünn wie möglich sein. Da die Amnionmembran der humanen fetalen Membranen nur 0,1mm dick ist und keine Blutgefäße enthält ist sie ideal um eine azelluläre extrazelluläre Matrix aus ihr herzustellen. Die Vorgehensweise wurde 2006 von PORTMANN- LANZ et al. veröffentlicht. Die Idee war die natürliche Histoarchitektur der extrazellulären Amnionmatrix zu erhalten und so verschiedenen Arten von (humanen) Zellen, inklusive Amnionzellen auf der Grundlage dieser Matrix zum Einwandern zu bringen.

Klinisch wichtige Eigenschaften sind Sicherheit und Lagerfähigkeit der DAM. Die gewonnene DAM war lager- und transportfähig. DAM zeigte bei Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung bei 4°C über 1 Jahr keinerlei Auflösungserscheinungen.

Gegenüber anderen Materialien weist die DAM einige Vorzüge auf (Tabelle 20), so ist sie einfach herzustellen und unkompliziert in der Anwendung, hat keine immunogene Wirkung, ist biokompatibel, lagerfähig und transportierbar.

Aus unserer Sicht war die Handhabung der DAM einfacher als die des Kollagenpfropfens. Das weiche, flexible DAM- Material konnte leicht durch die Hülse des Fetoskopes appliziert werden, während das Kollagen im trockenen Zustand sperrig war, sobald es feucht wurde in der Hülse aufquoll und nur mit mehr Druck und damit weniger exakt platziert werden konnte. Die DAM wurde durch den Druck der Spülflüssigkeit beim Einbringen in den Defekt komprimiert. Die resultierende DAM konnte mit guter Präzision in den Defekt eingebracht werden, in dem sie sich aufweitete und einen Pfropfen mit einer Dimension von 1cm Reichweite formte. Die klebrige Konsistenz der feuchten DAM trug ebenso zur Fixation in der Lesion bei. Nachdem die DAM in den Defekt eingebracht war, konnten die äußeren Anteile außerhalb des Amnions ausgebreitet und mit Fibrinkleber befestigt werden.

DISKUSSION

Vorteile der DAM gegenüber Kollagen	Folgen
keine immunogene Wirkung	<ul style="list-style-type: none"> • keine Entzündung- und Abstossungsreaktion
größere Geschmeidigkeit	<ul style="list-style-type: none"> • bessere Kontrolle und leichteres Einbringen durch die Hülse in den Defekt
kein Aufquellen der Membran durch Feuchtigkeit	<ul style="list-style-type: none"> • kein Verstopfen der Hülse • gleichmäßigerer Druck beim Platzieren der Membran • weniger Druck nötig um Membran gut zu platzieren • kein Verlust der Membran in die Amnionhöhle durch zu viel/ zu plötzliche Druckanwendung
natürliche „Klebrigkeit“	<ul style="list-style-type: none"> • gute Eigenhaftung an den natürlichen Membranen
Ausdehnungsvermögen	<ul style="list-style-type: none"> • automatische Aufweitung nach Einbringen in den Defekt führt automatisch zum Verschluss
leichtere Handhabung	<ul style="list-style-type: none"> • schnelleres Erlernen der Methode durch den Chirurgen • kürzere Operationszeiten • weniger Verluste

Tabelle 20: Vorteile der DAM gegenüber Kollagen

5 SCHLUSSFOLGERUNG

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die DAM ein interessantes und vielversprechendes Material für die chirurgische Behandlung und Vorbeugung eines frühen vorzeitigen Blasensprungs nach einer Fetoskopie ist. Die von uns angewandte Methode ist gut durchführbar und zum Verschluss eines definierten, zugänglichen Defektes geeignet. Größere, nicht direkt visualisierbare Defekte, wie sie im Rahmen einer spontanen Ruptur der fetalen Membranen entstehen, können auf diese Art nicht verschlossen werden.

Das Kaninchenmodell ist gut geeignet um eine neue Methode des Membranverschlusses auf ihre grundsätzliche Tauglichkeit zu untersuchen. Vor dem Einsatz der Methode beim Menschen werden allerdings weitere experimentelle Studien an Tieren mit einer längeren Gestationsdauer, wie das Schafmodell und Rhesusaffenmodell, sowie größeren Fallzahlen nötig sein.

An diesen Modellen wird man sehen, ob die DAM über einen längeren Zeitraum stabil integriert wird und ob es zu einem Anwachsen der Membran und einer Einwanderung von Amniozyten und somit zu einer vollständigen Integration kommt, oder ob die Membran ohne Einheilung über längere Zeit einen physikalischen Verschluss des Defektes gewährleisten kann. Möglicherweise wird durch eine andere Applikationsart, als der von uns verwendete Stopfen, die Integration der DAM in die dünne Amnionmembran erleichtert.

Weiter zu untersuchen ist die Eignung der DAM bei der Anwendung im Rahmen einer perkutanen Fetoskopie wie sie in der Humanmedizin durchgeführt wird.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurde die Effektivität extrazellulärer Matrices bei ihrer Verwendung zum Verschluss von fetoskopisch erzeugten Amniondefekten getestet. Verglichen wurde humane dezellularisierte Amnionmembran mit handelsüblicher Kollagenmatrix.

Acht trächtige Kaninchen mit insgesamt 74 Amnionsäcken wurden am 23. Trächtigkeitstag einer Laparotomie und anschließenden Fetoskopie unterzogen. Die mit dem Endoskop gesetzten Amnionmembrandefekte wurden den beiden Verschlussmethoden dezellularisierte humaner Amnionmembran (DAM, n=10) und Kollagenpfropf (K, n= 10) sowie den positiven (kein Verschluss, n=7) und negativen (keine Punktion, n= 31) Kontrollgruppen zugeteilt. Die Matrix wurde in beiden Studiengruppen in den Defekt eingebracht und zusätzlich mit Fibrinkleber primärfixiert. Das Myometrium wurde anschließend vernäht und die Laparatomiewunde verschlossen. Am 30. Trächtigkeitstag erfolgte die Euthanasie der Tiere und in einer zweiten Laparotomie die Feststellung der Amnionintegrität, des Vorhandenseins von Amnionflüssigkeit, das Überleben der Feten sowie die Messung deren Körper-, Herz- und Lungengewicht. Die sich daraus ergebenden Quotienten wurden verglichen. Die Amnionmembranen wurden entnommen und einer histologischen Untersuchung unterzogen. Die DAM- Gruppe zeigte eine Amnionintegrität von 75%, die Kollagengruppe von 71,4% und damit keinen signifikanten Unterschied zu den übrigen Gruppen. Bei der positiven Kontrollgruppe wurde eine Amnionintegrität von 25% festgestellt, bei der negativen Kontrollgruppe waren 95,5% der Membranen intakt. Die Entwicklung des fetalen Körpergewichts sowie der fetalen Lungen und Herzgewichte ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen der negativen Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen mit rupturierten oder intakten Membranen.

Beide Matrices erwiesen sich als geeignete Materialien für einen effektiven Verschluss fetoskopisch verursachter Amniondefekte. Die dezellularisierte humane Amnionmembran (DAM) erwies sich als einfacher anwendbar bezüglich der intraoperativen Handhabung. Es werden weitere Studien an Tieren mit längerer Gestationsdauer nötig sein um die Tauglichkeit der Membran über einen längeren Zeitraum zu beurteilen und um zu sehen, ob bei einem längeren Verbleiben der Membran Amnionzellen in die Matrix einwandern.

7 SUMMARY

Closure of fetoscopic created iatrogenic defects in fetal membranes with decellularised human amnion plug in a rabbit model

In our study we compared the efficiency of two extracellular matrices, which were used to seal fetal membrane defects after fetoscopy in the midgestational rabbit model. We used human decellularized amniotic membrane and a commercial collagen matrix.

Eight pregnant rabbits with a total of 74 amnion sacs were used. Amniondefects were created at midgestational day 23 by fetoscopy after laparotomy. The defects were closed either with human decellularized amniotic membrane (DAM, n=10) or a collagen plug (K, n=10), 7 sacs were left open after fetoscopy as positive control group, 31 sacs were left untreated as negative control group. In both groups the matrix was plugged in the membrane defect and fixed with fibrin glue and the myometrium was closed by suturing. In the following relaparotomy at gestational day 30, integrity of amnion membrane, presence of amniotic fluid, survival rates, fetal bodyweight, fetal weight of heart and lung were assessed and the treated fetal membranes were collected for histological examination.

In 75% of cases treated with human decellularized amniotic membrane and in 71,4% of cases treated with collagen plug membrane integrity was found. In the negative control group 95% were intact, in the positive control group 25%. The development of fetal bodyweight, weight of heart and lung und the resulting quotients were not significantly different between the groups.

Both methods were found as surgically practical and effective methods to close fetoscopic defects in fetal membranes. The surgical handling of human decellularized amniotic membrane was easier than the handling of collagen plug.

Further studies with animals with longer time of gestation will show if there is an efficiency of human decellularised amniotic membrane over a longer period.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, Villa RL, Finkbeiner W
Experimental pulmonary hypoplasia and oligohydramnios: relative contributions of lung fluid and fetal breathing movements.
J Pediatr Surg. 1984 Dec:658-665

Alger LS, Pupkin MJ
Etiology of preterm premature rupture of the membranes.
Clin Obstet Gynecol. 1986 Dec:758-770

Baumgarten K, Moser S
The technique of fibrin adhesion for premature rupture of the membranes during pregnancy.
J Perinat Med. 1986:43-49

Bocking AD
Preterm labour: recent advances in understanding of pathophysiology, diagnosis and management.
Curr Opin Obstet Gynecol. 1998 Apr:151-156

Carlan SJ, O'Brien WF, Parsons MT, Lense JJ
Preterm premature rupture of membranes: a randomized study of home versus hospital management.
Obstet Gynecol. 1993 Jan:61-64

Casey ML, MacDonald PC
Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells.
Biol Reprod. 1996 Dec:1253-1260

Crisera CA, Marosky JK, Longaker MT, Gittes GK
Organogenesis particularly relevant to fetal surgery.
World J Surg. 2003 Jan:38-44

Danforth D, Hull RW
The microscopic anatomy of the fetal membranes with particular reference to the detailed structure of the amnion.
Am J Obstet Gynecol. 1958 Mar:536-550

Danzer E, Schier F, Paek B, Harrison MR, Albanese CT
Fetal surgery for severe congenital abnormalities
Z Geburtshilfe Neonatol. 2001 Sep-Oct:174-188

Deprest J, Gratacos E
Obstetrical endoscopy.
Curr Opin Obstet Gynecol. 1999a Apr:195-203

Deprest J, Jan J, Ochsenbein- Kölble N, Cannie M, Done E, Roubllova X, Van Meghem T, Debeer A, Debuck F, Sbragia L, Toelen J, Devlieger R, Lewi P, Van de Velde M
Fetoscopic surgery: encouraged by clinical experience and boosted by instrument innovation.
Semin Fetal Neonatal Med. 2006 Dec:398-412

Deprest J, Lerut T, Vanderberghe K
Operative fetoscopy: New perspective in fetal therapy?
Prenat. Diagn. 1997 Dec:1247-1260

Deprest J, Papadopoulos NA, Decaluw H, Yamamoto H, Lerut TE, Gratacos E
Closure techniques for fetoscopic access sites in the rabbit at mid-gestation.
Hum Reprod. 1999b Jul:1730-1734

Devlieger R, Ardon H, Verbist L, Gratacos E, Pijnenborg R, Deprest JA
Increased polymorphonuclear infiltration and iatrogenic amniotic band after closure of fetoscopic access sites with a bioactive membrane in the rabbit at midgestation.
Am J Obstet Gynecol. 2003 Mar:844-848

Devlieger R, Deprest JA, Gratacos E, Pijnenborg R, Leask R, Riley SC
Matrix metalloproteinases -2 and -9 and their endogenous tissue inhibitors in fetal membrane repair following fetoscopy in a rabbit model.
Mol Hum Reprod. 2000 May:479-485

Draper D, McGregor J, Hall J, Jones W, Beutz M, Heine RP, Porreco R
Elevated protease activities in human amnion and chorion correlate with preterm premature rupture of membranes.
Am J Obstet Gynecol. 1995 Nov:1506-1512

Ehrenberg HM, Mercer BM
Antibiotics and the management of preterm premature rupture of the fetal membranes.
Clin Perinatol. 2001 Dec:807-818

Fontenot T, Lewis DF
Tokolytic therapy with preterm premature rupture of membranes.
Clin Perinatol. 2001 Dec:787-796

Genz HJ
Treatment of premature rupture of the fetal membranes by means of fibrin adhesion.
Med Welt. 1979 Oct 19:1557-1559

Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF
Decellularization of tissues and organs.
Biomaterials. 2006 Jul:3675-3683

Graf JL, Bealer JF, Gibbs DL, Adzick NS, Harrison MR
Chorioamniotic membrane separation: a potentially lethal finding.
Fetal Diagn Ther. 1997 Mar-Apr:81-84

Gratacos E, Sanin-Blair J, Lewi L, Toran N, Verbist G, Cabero L, Deprest J
A histological study of fetoscopic membrane defects to document membrane healing.
Placenta. 2006 Apr-May:452-456

Gratacos E, Wu J, Yesildaglar N, Devlieger R, Pijnenborg R, Deprest JA
Successful sealing of fetoscopic access sites with collagen Pfofens in the rabbit model.
Am J Obstet Gynecol. 2000 Jan:142-146

Gratacos E, Yamamoto H, Papadopoulos NA, Adriaenssens T, Philips T, Lerut TE, Deprest JA
The midgestational rabbit as a model for the creation of membrane defects after needle
fetoscopy.
Am J Obstet Gynecol. 1999 May:1263-1267

Harding JE, Pang J, Knight DB, Liggins GC
Do antenatal corticosteroids help in the setting of preterm rupture of membranes?
Am J Obstet Gynecol. 2001 Jan:131-139

Harrison MR
Fetal surgery.
Am J Obstet Gynecol. 1996 Apr:1255-1264

Harrison MR, Mychaliska GB, Albanese CT, Jennings RW, Farrell JA, Hawgood S, Sandberg P, Levine AH, Lobo E, Filly RA
Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero IX: fetuses with poor prognosis (liver herniation and low lung-to-head ratio) can be saved by fetoscopic temporary tracheal occlusion.
J Pediatr Surg. 1998 Jul:1017-1023

Heddleston L, McDuffie RS Jr, Gibbs RS
A rabbit model for ascending infection in pregnancy: intervention with indomethacin and delayed ampicillin-sulbactam therapy.
Am J Obstet Gynecol. 1993 Sep:708-712

Holzgreve W
Endoscopy in prenatal diagnosis and therapy.
Z Kinderchir 1988 Sep,Suppl I: 6-7

Johnson JW, Egerman RS, Moorhead J
Cases with ruptured membranes that "reseal".
Am J Obstet Gynecol. 1990 Sep:1024-1032

Katsura M, Ito A, Hirakawa S, Mori Y
Human recombinant interleukin-1 alpha increases biosynthesis of collagenase and hyaluronic acid in cultured human chorionic cells.
FEBS Lett. 1989 Feb 27:315-318

King JC, Mitzner W, Butterfield AB, Queenan JT
Effect of induced oligohydramnios on fetal lung development.
Am J Obstet Gynecol. 1986 Apr:823-830

Lavery JP, Miller CE, Knight RD
The effect of labor on the rheologic response of chorioamniotic membranes.
Obstet Gynecol. 1982 Jul:87-92

Lewi L, Van Schoubroeck D, Van Ranst M, Bries G, Emonds MP, Arabin B, Welch R, Deprest J
Successful patching of iatrogenic rupture of the fetal membranes.
Placenta. 2004 Apr:352-356

Luks FI, Deprest JA, Peers KH, Steegers EA, van Der Wildt B
Gelatin sponge Pfropfen to seal fetoscopy port sites: technique in ovine and primate models.
Am J Obstet Gynecol. 1999 Oct:995-996

Malak TM, Bell SC
Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site.
Br J Obstet Gynaecol. 1994 May:375-386

Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalglish R, Bright N, Macvicar J
Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes.
Placenta. 1993 Jul-Aug:385-406

McGregor JA, French JI, Lawellin D, Franco-Buff A, Smith C, Todd JK
Bacterial protease-induced reduction of chorioamniotic membrane strength and elasticity.
Obstet Gynecol. 1987 Feb:167-174

Medina TM, Hill DA
Preterm premature rupture of membranes: diagnosis and management.
Am Fam Physician. 2006 Feb:659-664

- Naef RW 3rd, Allbert JR, Ross EL, Weber BM, Martin RW, Morrison JC
Premature rupture of membranes at 34 to 37 weeks' gestation: aggressive versus conservative management.
Am J Obstet Gynecol. 1998 Jan:126-130
- O'Brien JM, Mercer BM, Barton JR, Milligan DA
An in vitro model and case report that used gelatin sponge to restore amniotic fluid volume after spontaneous premature rupture of the membranes.
Am J Obstet Gynecol. 2001 Nov:1094-1097
- Ochsenbein-Kolble N, Jani J, Lewi L, Verbist G, Vercruysse L, Portmann-Lanz B, Marquardt K, Zimmermann R, Deprest J
Enhancing sealing of fetal membrane defects using tissue engineered native amniotic scaffolds in the rabbit model.
Am J Obstet Gynecol. 2007 Mar:263.e1-7
- Papadopoulos NA, Deprest JA, Dumtrascu I, Mserez M, Yesildaglar N, Vandenberghe K, Lerut TE
Endoskopische fetale Chirurgie: eine neue Perspektive in der fetalen Therapie?
Sozialpädiatr Kinder Jugendheilkd 2000 22:14-22
- Papadopoulos NA, Dumitrascu I, Ordonez JL, Decaluwe H, Lerut TE, Barki G, Deprest JA
Fetoscopy in the pregnant rabbit at midgestation.
Fetal Diagn Ther. 1999 Mar-Apr:118-121
- Papadopoulos NA, Klotz S, Raith A, Foehn M, Schillinger U, Henke J, Kovacs L, Horch RE, Biemer E
Amnion Cells Engineering: A New Perspective in Fetal Membrane Healing after Intrauterine Surgery?
Fetal Diagn Ther. 2006 Sep 12: 494-500
- Papadopoulos NA, Klotz S, Raith A, Henke J, Klöppel M, Brill T, Müller D, Kovacs L, Erhardt W, Biemer E
Chirurgische Verschlussmethoden von fetoskopisch erzeugten Membrandefekten am mittelträchtigen Kaninchenmodell.
Geburtsh Frauenheilk 2003a:651- 657
- Papadopoulos NA, Van Ballaer PP, Ordonez JL, Laermans IJ, Vandenberghe K, Lerut TE, Deprest JA
Fetal membrane closure techniques after hysteroamniotomy in the midgestational rabbit model.
Am J Obstet Gynecol. 1998 May:938-942

Papadopoulos NA, Zeilhofer H- F, Papadopoulos MA, Feussner H, Henke J, Kovacs L, Horch H-H, Biemer E
Tierexperimentelle endoskopische intrauterine Chirurgie bei kraniofazialen Fehlbildungen am Beispiel der Lippen- Kiefer- Gaumen- Spalten.
Mund Kiefer GesichtsChir 2003b:70-75

Parry S, Strauss JF
Premature rupture of the fetal membranes.
N Engl J Med. 1998 Mar 5:663-670

Perlman M, Williams J, Hirsch M
Neonatal pulmonary hypoplasia after prolonged leakage of amniotic fluid.
Arch Dis Child. 1976 May:349-353

Portmann-Lanz CB, Ochsenbein-Kolble N, Marquardt K, Luthi U, Zisch A, Zimmermann R
Manufacture of a Cell-free Amnion Matrix Scaffold that Supports Amnion Cell Outgrowth In Vitro.
Placenta. 2006 Mar 2

Qin X, Chua PK, Ohira RH, Bryant-Greenwood GD
An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1).
Biol Reprod. 1997 Apr:812-820

Quintero RA
Treatment of previable premature ruptured membranes.
Clin Perinatol. 2003 Sep:573-589

Quintero RA, Carreno CA, Yelian F, Evans MI
Repair kinetics of amnion cells after microsurgical injury.
Fetal Diagn Ther. 1996 Sep-Oct:348-356

Quintero RA, Morales WJ, Allen M, Bornick PW, Arroyo J, LeParc G
Treatment of iatrogenic previable premature rupture of membranes with intra-amniotic injection of platelets and cryoprecipitate (amniopatch): preliminary experience.
Am J Obstet Gynecol. 1999 Sep:744-749

Quintero RA, Romero R, Dzieczkowski J, Mammen E, Evans MI
Sealing of ruptured amniotic membranes with intra-amniotic platelet-cryoprecipitate plug.
Lancet. 1996 Apr 20:1117

Reddy UM, Shah SS, Nemiroff RL, Ballas SK, Hyslop T, Chen J, Wapner RJ, Sciscione AC
In vitro sealing of punctured fetal membranes: potential treatment for midtrimester premature rupture of membranes.
Am J Obstet Gynecol. 2001 Nov:1090-1093

Sato T, Ito A, Mori Y, Yamashita K, Hayakawa T, Nagase H
Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts. Modulation of synthesis of procollagenase, prostromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by progesterone and oestradiol-17 beta.
Biochem J. 1991 May 1:645-650

Smith CV, Greenspoon J, Phelan JP, Platt LD
Clinical utility of the nonstress test in the conservative management of women with preterm spontaneous premature rupture of the membranes.
J Reprod Med. 1987 Jan:1-4

So T, Ito A, Sato T, Mori Y, Hirakawa S
Tumor necrosis factor-alpha stimulates the biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells.
Biol Reprod. 1992 May:772-778

Sydorak RM, Hirose S, Sandberg PL, Filly RA, Harrison MR, Farmer DL, Albanese CT
Chorioamniotic membrane separation following fetal surgery.
J Perinatol. 2002 Jul-Aug:407-410

Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, Strauss JF
92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor.
Am J Pathol. 1995 Jan:148-156

Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Karchmer S, Cruz NM, Ayala-Ruiz A, Lama MS
Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes.
Obstet Gynecol. 1990 Jan:84-88

Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-Avila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF
Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes.
Am J Obstet Gynecol. 1996 Apr:1371-1376

Vettraino IM, Roby J, Tolley T, Parks WC
Collagenase-I, stromelysin-I, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy.
Placenta. 1996 Nov:557-563

Ville Y, Hecher K, Gagnon A, Sebire N, Hyett J, Nicolaides K
Endoscopic laser coagulation in the management of severe twin-to-twin transfusion syndrome.
Br J Obstet Gynaecol. 1998 Apr:446-453

Yamamoto M, El Murr L, Robyr R, Leleu F, Takahashi Y, Ville Y
Incidence and impact of perioperative complications in 175 fetoscopy-guided laser
coagulations of chorionic plate anastomoses in fetofetal transfusion syndrome before 26
weeks of gestation.
Am J Obstet Gynecol. 2005 Sep:1110-1116

Yang EY, Adzick NS
Fetoscopy.
Semin Laparosc Surg. 1998 Mar:31-39

Young BK, Mackenzie AP, Roman AS, Stephenson CD, Minior V, Rebarber A, Timor-
Tritsch I
Endoscopic closure of fetal membrane defects: comparing iatrogenic versus spontaneous
rupture cases.
J Matern Fetal Neonatal Med. 2004a Oct:235-240

Young BK, Roman AS, MacKenzie AP, Stephenson CD, Minior V, Rebarber A, Timor-
Tritsch I
The closure of iatrogenic membrane defects after amniocentesis and endoscopic intrauterine
procedures.
Fetal Diagn Ther. 2004b May-Jun:296-300

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Die Struktur der fetalen Membranen (PARRY et al. 1998)
Tabelle 2:	Anomalien, die von einem fetalen Eingriff profitieren (DANZER et al. 2001, DEPREST et al 2006)
Tabelle 3:	Risiken der fetalen Chirurgie (DANZER et al. 2001)
Tabelle 4:	Ergebnisse von REDDY et al. 2001
Tabelle 5:	Ergebnisse der Studie von PAPADOPULOS et al. 1998
Tabelle 6:	Ergebnisse der Studie von DEPREST et al. 1999b
Tabelle 7:	Ergebnisse der Studie von GRATACOS et al. 2000
Tabelle 8:	Ergebnisse der Studie von DEVLIEGER et al. 2003
Tabelle 9:	Ergebnisse der Studie von PAPADOPULOS et al. 2003a
Tabelle 10:	Ergebnisse der Studie von PAPADOPULOS et al. 2006
Tabelle 11:	Anwendung von Kollagen
Tabelle 12:	Anwendung von Membranen und Extrazellulärmatrizes
Tabelle 13:	Fetale Auswertungsparameter: Überlebensrate am 30. Trächtigkeitstag
Tabelle 14:	Fetale Auswertungsparameter: Amnionintegrität und Anwesenheit von Amnionflüssigkeit am 30. Trächtigkeitstag
Tabelle 15:	Vergleich fetales Körpergewicht
Tabelle 16:	Vergleich Fetales Lungengewicht
Tabelle 17:	Vergleich der Quotienten aus fetalem Lungen- und Körpergewicht
Tabelle 18:	Vergleich Fetales Lungen- und Herzgewicht
Tabelle 19:	Vergleich der Quotienten aus fetalem Lungen- und Herzgewicht und fetalen Körpergewicht
Tabelle 20:	Vorteile der DAM gegenüber Kollagen

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Versuchsaufbau von Reddy et al 2001
Abbildung 2:	Narkoseprotokoll
Abbildung 3:	OP- Protokoll
Abbildung 4:	Endoskopie: Pfotenanlage
Abbildung 5:	Endoskopie: Ohranlage
Abbildung 6:	Einbringen der DAM/K
Abbildung 7:	Einbringen der DAM/K
Abbildung 8:	Eingebrachtes Kollagen
Abbildung 9:	Eingebrachtes K/DAM
Abbildung 10:	Verschluss des Myometrium
Abbildung 11:	Methylenblautest
Abbildung 12:	zum Zeitpunkt der Euthanasie mazerierter Fetus
Abbildung 13:	zum Zeitpunkt der Euthanasie lebender Fetus
Abbildung 14:	Auswertungsprotokoll
Abbildung 15:	histologisches Bild der gefärbten DAM
Abbildung 16:	histologische Auswertung
Abbildung 17:	schichtweiser Verschluss in unserer Studie
Abbildung 18:	modifizierter Verschluss nach GRATACOS et al. (2000)

Diagramm 1: Anzahl der überlebenden Feten in %

Diagramm 2: Amnionintegrität und Anwesenheit von Amnionflüssigkeit
(bezogen auf Überlebende)

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(-)	negative Kontrollgruppe
(+)	positive Kontrollgruppe
%	Prozent
ANOVA	<u>A</u> nalysis of <u>V</u> ariance (Varianzanalyse)
CCAM	kongenitalen zystisch- adenomatoiden Lungenmalformation
CDH	<u>C</u> ongenitale <u>D</u> iaphragma <u>h</u> ernie
Ch	<u>C</u> harriere
CHAOS	<u>C</u> ongental <u>h</u> igh <u>a</u> irway <u>o</u> bstruction <u>s</u> yndrome
CMS	<u>C</u> horioamnotic <u>M</u> embrane <u>S</u> eparation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAM	<u>d</u> ezellularisierte humane <u>A</u> mnion <u>m</u> embran
E. coli	Escherichia coli
FK	Fibrinkleber
FLBWR	<u>f</u> etal <u>l</u> ung- / <u>b</u> ody <u>w</u> eicht- <u>r</u> atio
FLHKGQ	<u>f</u> etaler <u>L</u> ungen-und <u>H</u> erz- / <u>K</u> örpergewichts- <u>Q</u> uotient
FLKGQ	<u>f</u> etaler <u>L</u> ungen- / <u>K</u> örpergewichts- <u>Q</u> uotient
g	<u>G</u> ramm
GA	<u>G</u> estationstag
h	Stunde
H/E	Hematoxylineosin
HF	<u>H</u> erz <u>f</u> requenz
HIV	<u>H</u> umanes <u>I</u> mmundefizienz <u>V</u> irus
iPPROM:	<u>i</u> atrogenic <u>p</u> reterm <u>p</u> remature <u>r</u> upture of <u>m</u> embranes
i.p.	<u>i</u> ntraperitoneal
i.v.	<u>i</u> ntrav <u>e</u> nös
K	<u>K</u> ollagen
kg	<u>K</u> ilogramm
KGW	<u>K</u> örper <u>g</u> ewicht
KT	<u>K</u> örp <u>e</u> r <u>t</u> emperatur
L	<u>l</u> inks
LSD	<u>L</u> east <u>S</u> ignificant <u>D</u> ifference (geringste signifikante Differenz)
min	<u>M</u> inute

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ml	<u>M</u> illiliter
mm	<u>M</u> ilim <u>e</u> ter
MMP-1/ -2/ -3/ -8/ -9	<u>M</u> atrix- <u>M</u> etalloproteinase-1/ -2/ -3/ -8/ -9
MRT	<u>M</u> agnetresonanztomographie
n	Anzahl
O ₂	Sauerstoff
OP	<u>O</u> peration
PBS	<u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered saline <u>s</u> olution (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PGE ₂	<u>P</u> rostaglandin <u>E</u> ₂
PPROM	<u>p</u> reterm premature <u>r</u> upture of <u>m</u> embranes
R	<u>r</u> echts
s.c.	<u>s</u> ub <u>c</u> utan
sPPROM:	<u>s</u> pontaneous <u>p</u> reterm premature <u>r</u> upture of <u>m</u> embranes
TIMP	<u>T</u> issue inhibitors of <u>m</u> etalloproteinases, Gewebeinhibitoren der Matrixmetalloproteinasen
TNF- α	<u>T</u> umor- <u>N</u> ekrose- <u>F</u> aktor- α
Z	<u>Z</u> ervix

12 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Frau PD Dr. med. vet. Sabine Tacke und Frau PD Dr. med. vet. Julia Henke (mittlerweile bei Boehringer Ingelheim GmbH & Co KG, Biberach tätig) für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

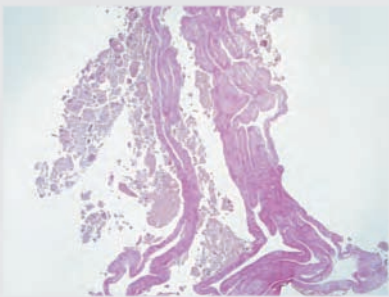
Bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Nikolaos Papadopoulos für die Überlassung des Themas, die Hilfestellung beim experimentellen Teil der Arbeit und die Unterstützung und Korrektur der vorliegenden Ausarbeitung.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Roland Zimmermann und Herrn Dr. med. Andreas Zisch sowie allen anderen Mitarbeitern unserer Kooperationspartner aus der Klinik für Geburtshilfe am Universitätsspital Zürich für die Bereitstellung und histologische Auswertung der DAM.

Frau Regine Hollweck und Herrn Tibor Schuster vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München danke ich für Ihre Beratung, Unterstützung und Geduld bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt Andreas Fichter für die gute Zusammenarbeit beim experimentellen Teil der Arbeit, seine Nachteinsätze bei der Versorgung der Kaninchen, seine unermüdlichen Verbesserungsvorschläge und Korrekturen dieser Arbeit und für viele aufbauende Worte und fröhliche Stunden.

Außerdem bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für Ihr Verständnis und Ihre Unterstützung.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5444-X



Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

9