

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine Chirurgie Tübingen
Arbeitsgruppe Wundheilung
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. H. D. Becker**

**Altersabhängigkeit des Insulin-like Growth Factor Systems
bei der Wundheilung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Odilo Trabold
aus
Stuttgart
2003**

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1.Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. h. c. H. D. Becker
2.Berichterstatter:	Professor Dr. M. B. Ranke

*meiner Mutter,
meinem Vater*

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	Seite
1.1 Wundheilung und Wachstumsfaktoren	1
1.2 Wundheilung im Alter	5
1.3 Insulin-like Growth Factors (IGFs), Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs) und Acid-labile Subunit (ALS)	7
1.4 Altersabhängigkeit des IGF-Systems bei der Wundheilung	9
1.5 Fragestellung	11
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Probensammlung	12
2.2 Radioimmunoassays (RIA)	14
▪ Insulin-like growth factor-I - RIA	
▪ Insulin-like growth factor-II - RIA	
▪ Insulin-like growth factor binding protein-2 - RIA	
▪ Insulin-like growth factor binding protein-3 - RIA	
2.3 Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)	15
▪ Acid-labile subunit - ELISA	
2.4 Gesamtprotein-, Laktat- und pH-Wert-Bestimmung	16
2.5 Stabilität der Insulin-like growth factors	17
2.6 Molarer Quotient	18
2.7 Reagenzien	18
2.8 Statistische Verfahren	19

3. ERGEBNISSE	
3.1 Patientengruppen	20
3.2 Insulin-like growth factor-I (IGF-I)	21
3.3 Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3)	22
3.4 Acid-labile subunit (ALS)	23
3.5 Korrelation von IGF-I, IGFBP-3 und ALS in Plasma und Wundflüssigkeit	24
3.6 Insulin-like growth factor-II (IGF-II)	25
3.7 Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2)	26
3.8 Korrelation von IGF-II und IGFBP-2 in Plasma und Wundflüssigkeit	27
3.9 Molarer Quotient von IGF-I + IGF-II und IGFBP-3	28
3.10 ALS in der Wundflüssigkeit	28
3.11 Gesamtprotein, Laktat, pH-Wert	30
3.12 Klinische Chemie	30
4. DISKUSSION	32
5. ZUSAMMENFASSUNG	39
6. ANHANG	40
7. LITERATURVERZEICHNIS	44
DANKSAGUNG	53
LEBENS LAUF	54

1. EINLEITUNG

1.1 Wundheilung und Wachstumsfaktoren

Jedes Gewebe des menschlichen Körpers reagiert auf eine Verletzung mit reparativen Prozessen. Ziel der Wundheilung sind der Ersatz von zugrundegegangenen Gewebe und die Wiederherstellung der Integrität des verletzten Gewebes. Auch der Erfolg jedes chirurgischen Eingriffs und der darauffolgenden Rehabilitation beruht auf einer komplikationslosen, zeitgerechten Wundheilung.

Wundheilung ist ein dynamischer Prozess, der ein abgestimmtes Zusammenspiel von biochemischen und zellulären Systemen erfordert. Die zeitliche Abfolge reparativer Vorgänge wird klassisch in drei Phasen gegliedert: eine exsudative bzw. inflammatorische, eine proliferative und eine regenerative Phase [1]. Diese Phasen beinhalten Koagulation, Entzündung, Kollagensynthese, Angiogenese, Epithelialisierung, Kontraktion und Umbau in Narbengewebe [2]. Der Ablauf des Heilungsprozesses wird in allen Phasen von Wachstumsfaktoren kontrolliert [3-7].

Wachstumsfaktoren sind signaltransduzierende Peptide, die an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche binden und durch autokrine bzw. parakrine Stimulation eine Zellproliferation oder Migration auslösen [8]. Sie bilden eine Untergruppe der Zytokine, die als interzelluläre Mediatoren wirken [9].

In der **Entzündungsphase** hat eine Verletzung eine Blutung mit enzymatischer Aktivierung der Gerinnungs-, Komplement- und Kininkaskade zur Folge. Es entsteht ein Netzwerk von Fibrinfasern, Plasmabestandteilen (Fibronektin, Vitronektin) und Thrombozyten. Durch Aggregation und Aktivierung von Thrombozyten, die ein Reservoir von Zytokinen und Wachstumsfaktoren darstellen, werden *transforming growth factor- β* (TGF- β), *platelet-derived*

growth factor (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF) und *insulin-like growth factor* (IGF) aus den α -Granula freigesetzt [10]. Neutrophile Zellen wandern schon wenige Minuten nach der Verletzung in die Wunde ein. Sie phagozytieren und produzieren proinflammatorische Zytokine, die zu einer Aktivierung von Fibroblasten und Keratinozyten führen. Voraussetzung für eine intakte Neutrophilenfunktion und eine erfolgreiche Infektabwehr ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Wunde [11]. Wachstumsfaktoren stimulieren die Einwanderung von Makrophagen, die als Monozyten aus dem zirkulierenden Blut in die Wunde gelangen. Makrophagen wiederum phagozytieren Bakterien und Gewebetrümmer und sezernieren selbst IGF-I, VEGF, TGF- α und TGF- β und PDGF [12]. Makrophagen nehmen eine Schlüsselstellung in dieser Phase der Wundheilung und beim Übergang zu reparativen Vorgängen ein [13]. Diese erste Phase der Wundheilung geht nach ein bis drei Tagen in die Proliferationsphase über.

In der **Proliferationsphase** stimulieren Wachstumsfaktoren die Wundheilung durch eine Steigerung der Kollagensynthese und -ablagerung, der Angiogenese und der Epithelneubildung [14]. Kollagenneubildung und Neoangiogenese sind eng aneinander geknüpft: die Kollagensynthese erfordert Sauerstoff und Nährstoffe, die Neubildung der Gefäße erfordert extrazelluläre Matrix als Leitstruktur für die gerichtete Gefäßneubildung. Fibroblasten beginnen unter der Wirkung von Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten, Makrophagen, Keratinozyten zu proliferieren und kollagenreiche Matrix zu synthetisieren. Es entsteht ein provisorisches Gerüst aus Fibrin, Fibronectin und Hyaluronsäure, das die Grundlage für das neugebildete Granulationsgewebe darstellt. Fibroblasten sezernieren selbst FGF, IGF-I und PDGF. Keratinozyten sezernieren Kollagenasen, *keratinocyte growth factor* (KGF), VEGF und TGF- β . Neue Gefäße wachsen aus den Kapillaren der Umgebung unter Wirkung von FGF und VEGF ein. Endothelzellen setzen IGF-I, PDGF, FGF und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) frei [3]. Diese Phase umfaßt den 4. bis 7. Tag nach der Verletzung.

In der **Regenerationsphase** nehmen Zelldichte und Vaskularisierung ab. Diese Phase wird von PDGF, TGF- β , FGF reguliert. Fibroblasten wandeln sich unter Wirkung von TGF- β und mechanischen Faktoren in Myofibroblasten um, deren Aktivität die Wundkontraktion maßgeblich reguliert. Für die Migration zur Wundoberfläche bilden Keratinozyten in ihrem Zytoplasma periphere Aktinfilamente, intensive Zell-Zell-Kontakte im Verband der Keratinozyten lösen sich (Tonofilamente retrahieren sich, Desmosomen lösen sich auf). Migration und Proliferation der Keratinozyten werden durch lokal freigesetzte Wachstumsfaktoren, wie *epidermal growth factor* (EGF), TGF- α und *keratinocyte growth factor* (KGF) und mechanische Effekte („free edge“ effect) beeinflusst [15,16]. Epidermale Zellen exprimieren Integrinrezeptoren und interagieren mit Proteinen der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin und Vitronectin, die als Leitstrukturen für Zellwanderungen dienen. Der letzte Schritt der Reepithelisierung ist die Zellreifung mit der Verankerung der Zellen untereinander und mit der wiederhergestellten Basalmembran. Intensive Zell-Zell-Kontakte (z.B. Desmosomen) sind wieder nachweisbar. Der Reparatursprozess wird mit der Kontraktion der Dermis und der Differenzierung der Keratinozyten abgeschlossen. In der Narbe entwickelt sich eine Balance zwischen Kollagenaufbau und -abbau. Die Reifung der Kollagenfasern durch dreidimensionale Vernetzung wird eingeleitet. Es entsteht mechanisch belastbares Narbengewebe [17] (Abb.1).

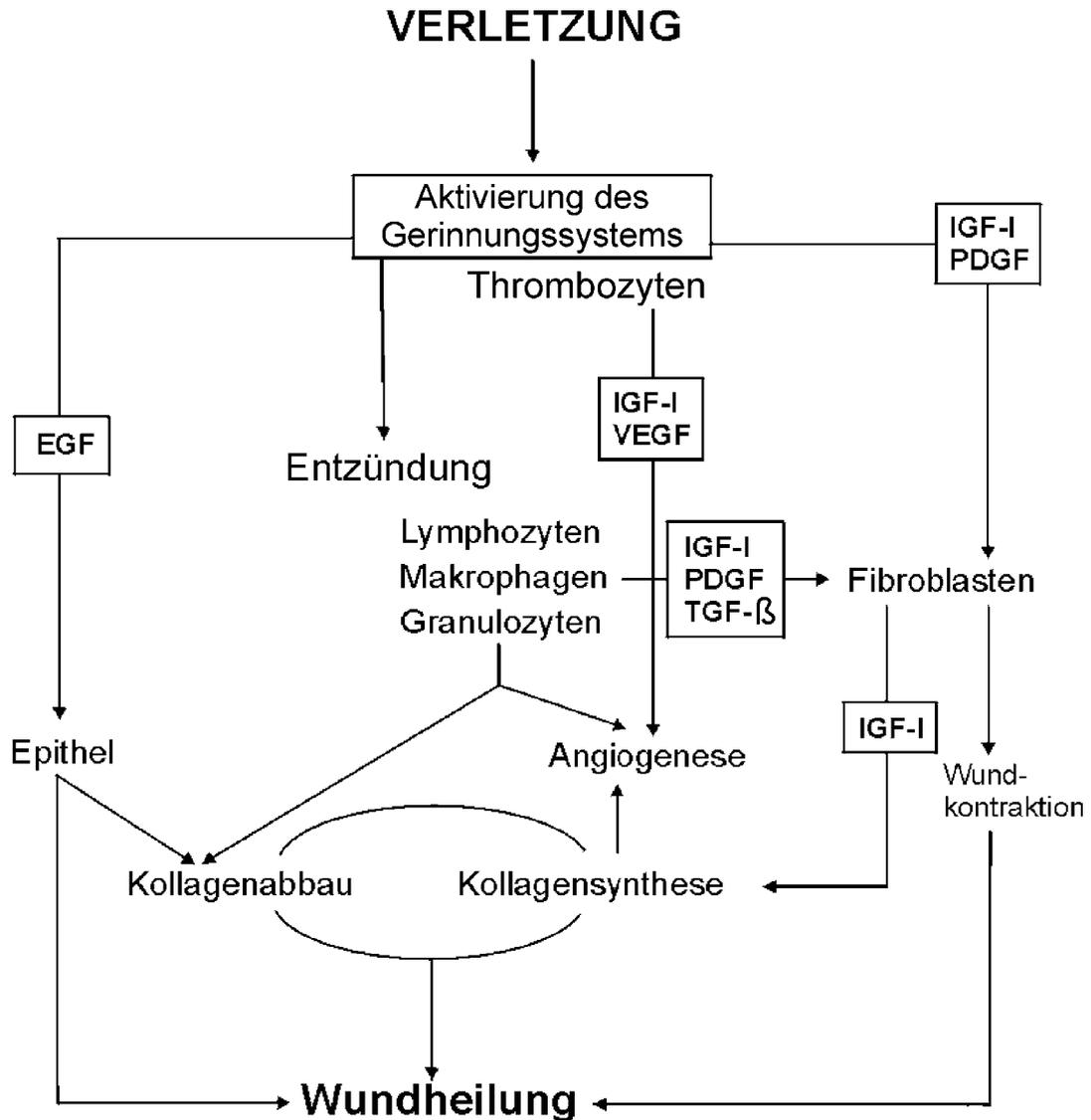


Abb.1: Schematische Darstellung des Wundheilungsablaufes, modifiziert nach Thomas K. Hunt [18]

Tierexperimentelle und klinische Studien haben gezeigt, daß der oben skizzierte komplexe Heilungsverlauf in allen Phasen durch exogene und endogene Faktoren wie Steroide, diabetische Stoffwechsellage, Hypoxie, Immunsuppression, Bestrahlung, Mangelernährung, Komorbidität und Alter beeinflusst werden kann [19-21].

1.2 Wundheilung im Alter

Trotz einer stetig steigenden Zahl älterer Menschen in unserer Gesellschaft [22] und einer klinisch bekannten Beeinträchtigung der Wundheilung in dieser Patientengruppe ist wenig über den Einfluß des Alters auf die Wundheilung beim Menschen bekannt. Dies betrifft sowohl akute als auch chronische Wunden, die ein zunehmendes sozioökonomisches Problem bei älteren Menschen darstellen.

Störungen der Wundheilung im Alter können grundsätzlich durch extrinsische oder intrinsische Faktoren hervorgerufen und beeinflusst werden. Extrinsische Faktoren beruhen auf einer hohen Komorbidität im Alter und umfassen koronare Herzerkrankung, zerebrovaskuläre Insuffizienz, Karzinome, periphere arterielle Verschlusskrankheit, pulmonale Grunderkrankungen, Diabetes mellitus, bakterielle Infektionen und Mangelernährung [23, 24]. So werden die Wundheilung und die Abwehr gegen Wundinfektionen stark durch kardiopulmonale Erkrankungen beeinflusst [25]. Dieser Zusammenhang ist für alle Altersgruppen beschrieben, kommt jedoch bei älteren Patienten häufiger vor. Neue Erkenntnisse in der intensivmedizinischen Versorgung haben gezeigt, daß eine verbesserte anästhesiologische und chirurgische Versorgung die Auswirkungen der Komorbidität auf die Wundheilung vermindern kann [26]. Intrinsische Einflüsse sind unabhängig von Komorbiditäten und sind Auswirkungen des Alterungsprozesses an sich. In vitro und in vivo Studien an Tieren zeigen eine auf das Alter zurückzuführende Beeinträchtigung der Makrophagenfunktion [27,28], der Entzündungsreaktion [29], der Fibroblastenproliferation [30], der Kollagensynthese [31], der Epithelneubildung [32], der Angiogenese [31,33], des Basalmembranaufbaus [32] und der Reißfestigkeit [34]. Die gealterte humane Haut besitzt weniger und kleinere Fibroblasten [35, 36] mit einer reduzierten Lebensdauer [37]. Alte Fibroblasten haben, im Gegensatz zu jungen, ihre Fähigkeit verloren, eine Wachstumsfaktor-induzierte Proliferation und Zellfunktion auszulösen [38]. Auch gealterte Keratinozyten zeigen in Zellkultur einen Rückgang ihrer Antwort auf Wachstumsfaktoren und

sind in ihrer Proliferationskapazität eingeschränkt [39, 40]. Klinische Studien zeigen im Alter eine verminderte Epithelneubildung [41], eine abgeschwächte Entzündungsreaktion [42] und Wundkontraktion. Die Studie von DuNuoy und Carrell aus dem ersten Weltkrieg zeigt einen deutlichen Unterschied in der Heilungsrate zwischen 20- und 40-Jährigen. Die Verletzungen der jungen Beobachtungsgruppe heilen schneller und zeigen eine stärkere Wundkontraktion als die der alten Beobachtungsgruppe [43]. Das Auftreten von Wunddehiszenzen nach chirurgischen Interventionen bei duodenalen Ulzera nimmt linear mit dem Alter zu [44]. Sandblom bestätigt die höhere Inzidenz von Wundheilungsstörungen bei alten Patienten mit Hilfe eines klinischen Tests der Reißfestigkeit [45].

Die Mechanismen der verzögerten Wundheilung beim alten Menschen sind noch ungeklärt. Ashcroft zeigt tierexperimentell im Alter sowohl eine verzögerte Heilungsrate als auch ein verzögertes Auftreten von Wachstumsfaktoren, wie PDGF, EGF und TGF- β [32, 46]. Für den Wachstumsfaktor IGF, der eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung spielt, ist eine Altersabhängigkeit im Plasma bekannt. IGF wird sowohl durch den Alterungsprozeß an sich als auch durch Komorbiditäten im Alter beeinflusst.

1.3 Insulin-like Growth Factors (IGFs), Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs) and Acid-labile Subunit (ALS)

Insulin-like growth factors (IGFs) sind Zytokine, die Wachstum, Zellteilung, Zellproliferation und Differenzierung regulieren [47]. Sie sind mitogene Stoffe, deren Aktivität durch die Verfügbarkeit von freiem IGF bestimmt wird, das an zelluläre IGF-Rezeptoren bindet [48]. IGFs stimulieren den Glukose- und Aminosäuretransport, die DNA-, RNA-, Glykogen- und Proteinsynthese sowie

die Proliferation, Hemmung der Apoptose, Differenzierung und Zellmigration [49].

IGF-I ist ein einzelkettiges Polypeptid aus 70 Aminosäuren. IGF-I wird zum größten Teil in der Leber produziert. Zusätzlich wird es lokal in Niere, Herz, Lunge, Fettgewebe, Skelettmuskel und Knorpel gebildet. Im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren besitzt es neben parakriner und autokriner Aktivität einen endokrinen Effekt. IGF-I ist das Effektormolekül des Wachstumshormons (GH) und wird durch GH in seiner Produktion und Aktivität reguliert. Eine basale IGF-I Produktion bleibt jedoch von GH unabhängig [49].

IGF-II enthält 67 Aminosäuren und weist zu IGF-I eine Sequenzhomologie von 62% auf. IGF-II hat eine ähnliche mitogene Aktivität wie IGF-I in vitro, ist aber in vivo weniger wirksam. IGF-II wird nicht direkt von GH reguliert [50-52].

Wegen der kurzen Halbwertszeit von freiem IGF-I und IGF-II im Plasma liegen 99% dieser Polypeptide an spezifische Bindungsproteine gebunden vor. Es sind sechs Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1 bis IGFBP-6) charakterisiert, die hohe Sequenzhomologie aufweisen. Zu den Funktionen der Bindungsproteine zählen neben der Transportfunktion im Plasma und der Regulation der Halbwertszeit von zirkulierenden IGFs auch die Regulation des Transports von IGFs zwischen intra- und extrazellulärem Raum. Die Wirksamkeit der IGFs auf die IGF-Rezeptoren kann durch die Bindung an IGFBPs einerseits vermindert werden; andererseits kann die Verfügbarkeit von freiem IGF durch die Aktivität von spezifischen IGFBP-Proteasen in Geweben stark erhöht werden [53]. IGF-I und IGF-II bilden zusammen mit IGFBP-2 und IGFBP-3 einen in Plasma zirkulierenden binären Komplex (Abb. 2) [53-55].

IGFBP-3 ist das wichtigste Transportprotein von IGF-I und IGF-II im Plasma. IGFBP-3 bindet über 90% der zirkulierenden IGFs. Die molekulare Konzentration von IGFBP-3 im Plasma ist nahezu identisch mit der Summe aus IGF-I und IGF-II. **IGFBP-2** ist die zweithäufigste Form der IGFBPs im Plasma und besitzt

eine 4-fach höhere Affinität zu IGF-II als zu IGF-I. Wachstumshormon ist der wichtigste hormonale Faktor in der Kontrolle der Plasmakonzentration von IGFBP-3 und IGFBP-2. IGF-I reguliert ebenfalls die Plasmakonzentration von IGFBP-3 und IGFBP-2.

Im humanen Plasma liegen IGFs meist in einem 150 kDa großen ternären Proteinkomplex vor, der aus einem Molekül IGF-I oder IGF-II, IGFBP-3 und einer sogenannten Acid-labile Subunit (**ALS**) besteht (Abb.2). Die erste Beschreibung von ALS basiert auf der Beobachtung, daß eine Ansäuerung des ternären 150 kDa-Komplexes zu seiner Dissoziation in die Säure-stabilen Komponenten IGF-I (7.5kDa) und IGFBP-3 (50kDa) führt und sich durch eine anschließende Neutralisation der Probe aber kein 150kDa-Komplex zurückbilden läßt [54]. ALS wird in der Leber als Peptid mit 578 Aminosäuren GH-abhängig synthetisiert. Die Bindung des binären Komplexes an ALS führt zu einer Verlängerung der Halbwertszeit des binären Komplexes von 20-30 min auf 12-15 Stunden [56-59].

Bildung des IGF -BP-3 -ALS Komplex

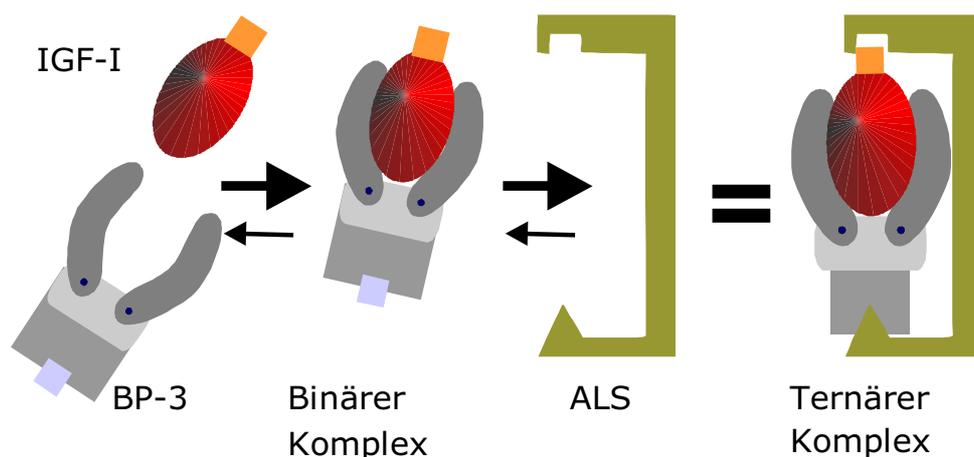


Abb. 2: Bildung des binären und ternären Komplexes aus IGF-I, IGFBP-3 und ALS nach Ranke & Eimlinger [60].

1.4 Altersabhängigkeit der IGF-Systems bei der Wundheilung

Beim Menschen ist eine altersabhängige Regulation des Wachstumshormons und des IGF-Systems im Plasma bekannt. Die GH-Plasmakonzentration nimmt ab dem 20. Lebensjahr um 14% in jedem folgendem Lebensjahrzehnt ab [61, 62].

IGFs sind zentrale Regulatoren der Wundheilung [6,63]. IGF-I steuert den Wundheilungsprozeß durch Stimulation der Kollagensynthese [6, 64], der Fibroblastenproliferation [6, 65, 66] und der Endothelproliferation [67]. Im Verlauf der Wundheilung wird IGF-I von Makrophagen [68], Fibroblasten [69], Thrombozyten [70] und Endothelzellen [71] produziert und freigesetzt. IGF-I fördert die VEGF-Synthese und reguliert die Angiogenese [72, 73] (Abb.1). Bei hypophysektomierten Ratten beobachtet man einen Rückgang der IGF-Konzentration in Wunden und eine Beeinträchtigung der Wundheilung mit erniedrigter Kollagensynthese und Hydroxyprolinkonzentration [66]. Durch im Überschuß zugeführtes exogenes IGF-BP-3 wird freies IGF-I gebunden und kann somit nicht mehr an die Rezeptoren der Zellen binden. Dies führt tierexperimentell zu einer 50%-igen Reduktion der Kollagenproduktion in der Wunde [74]. Koshizuka zeigt, daß durch die Gabe von rekombinantem IGF-I (rIGF-I) die Proteinkonzentration und Reißfestigkeit bei alten Mäusen erhöht werden kann. Bei jungen Mäusen hingegen zeigt die Behandlung mit rIGF-I keinen zusätzlich stimulierenden Effekt auf die Wundheilung [75]. Ebenso kann nachgewiesen werden, daß humanes Wachstumshormon (hGH) ein fördernden Effekt mit auf die Wundheilung, speziell bei brandverletzten Kindern besitzt [76]. Papadakis und Hunt zeigen, daß durch eine geringe Menge an exogen verabreichtem hGH bei gesunden älteren Männern (Durchschnittsalter 74,3 Jahre) die IGF-I Blutkonzentrationen auf Werte von jüngeren Patienten gesteigert werden können. Dadurch kann in standardisierten Wunden in der Behandlungsgruppe mit hGH eine Steigerung der Kollagenablagerung, des Gesamtproteins und der DNA in einem standardisierten Wundheilungsmodell von ungefähr 20% gemessen werden. Diese Studie zeigt, daß die Wundheilung

im Alter gezielt beeinflusst werden kann [77]. Inwieweit sich eine Modulation der IGF-Spiegel in Plasma auf das Wundmilieu auswirkt, bzw. inwieweit sich altersabhängige Unterschiede im IGF-System in der Wundflüssigkeit widerspiegeln, ist jedoch nicht bekannt.

1.5 Fragestellung

Die Beeinträchtigung der Wundheilung im Alter ist ein klinisch relevantes Problem. Die Ursachen einer verzögerten Wundheilung sind beim alten Menschen bisher wenig beschrieben. IGF-I reguliert zentrale Komponenten der Wundheilung. Im Alter nimmt die Plasmakonzentration von IGF-I ab. Der Einfluß des Alters auf die IGF-Komponenten in Wunden ist bisher nicht untersucht. In der vorliegenden prospektiven Studie wurden die Komponenten des IGF-Systems in der Wundflüssigkeit und im Plasma bei jungen und alten chirurgischen Patienten in der frühen postoperativen Phase untersucht.

Folgende Hypothesen liegen der Untersuchung zugrunde:

- (1) Die Konzentrationen der Komponenten des IGF-Systems in der Wundflüssigkeit nehmen mit zunehmendem Alter ab.
- (2) Die IGF-Konzentrationen in der Wundflüssigkeit korrelieren mit den jeweiligen Plasmakonzentrationen.
- (3) Das Verhältnis der IGFs zu den IGF-BPs ändert sich mit zunehmendem Alter. Die Bioverfügbarkeit von freiem IGF nimmt mit zunehmendem Alter ab.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Probensammlung

Patienten:

Die Studie wurde an Patienten mit elektiven Operationen in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen durchgeführt. Die Patienten wurden nach folgendem **Einschlußkriterien** prospektiv ausgewählt:

- Gruppe 1:**
- Alter: 18-30 Jahre
 - Operationen: Metallentfernungen (ME) aus langen Röhrenknochen (Femur- und Tibianagel), Hüfttotalendoprothesen
- Gruppe 2:**
- Alter: >70 Jahre
 - Operationen: Hüfttotalendoprothese (HTP), Knieendoprothese (KTP), Schulterendoprothese, Plattenosteosynthese langer Röhrenknochen

Ausschlußkriterien waren:

akutes Trauma, akute Infektionen, septische Wunden, insulinpflichtiger Diabetes mellitus, Steroidmedikation, Gewichtsverlust (>5kg in den letzten zwei Monaten), Zytostatikatherapie und onkologische Grunderkrankungen.

Probensammlung:

Wundflüssigkeit wurde aus einem Hochvakuum-Wunddrainagensystem entnommen. Intraoperativ wurde eine Redon-Drainage (Redon-Drain® B. Braun, Melsungen, Deutschland) subfaszial in die Wunde eingelegt und an eine Drainage-Flasche (Drainobag®300 B. Braun) angeschlossen. Die Wundflüssigkeit wurde alle 24 Stunden durch einen Wechsel der Drainage-Flaschen vom 1.- 4. postoperativen Tag zur Untersuchung entnommen. Die

Studie war auf 4 Tage begrenzt, da die Drainagen spätestens am 4. postoperativen Tag routinemäßig entfernt werden.

Plasma und EDTA-Blut wurden präoperativ und vom 1.- 4. postoperativen Tag alle 24 Stunden aus einem peripher-venösen Gefäß am Unterarm des Patienten entnommen. Der Wechsel der Drainage-Flaschen mit Entnahme der Wundflüssigkeit und die Blutabnahme erfolgten immer zwischen 6-8 Uhr morgens. Im Labor wurden die Wundflüssigkeit und die Röhrchen bei 2000 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Die EDTA-Blutproben wurden im Routinelabor der Klinik analysiert.

Untersuchungsparameter:

Im **Plasma** wurden IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, ALS, sowie die Gesamteiweißkonzentration und Laktatkonzentration bestimmt.

In der **Wundflüssigkeit** wurden die Konzentrationen von IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS bestimmt. Die Gesamteiweißkonzentration, die Laktatkonzentration und der pH-Wert wurden als „Referenzgrößen“ gemessen.

Im **EDTA-Blut** wurden zur Kontrolle der Leberfunktion Prothrombinzeit (Quick), partielle Thromboplastinzeit (PTT), GOT, GPT, γ -GT, Alkalische Phosphatase und Gesamtbilirubin gemessen. Kreatinin und Harnstoff wurden als Parameter der Nierenfunktion, die Leukozytenzahl und C-reaktives Protein (CRP) wurden als allgemeine Entzündungsparameter bestimmt. Die Messungen der Parameter im EDTA-Blut wurde in dem Routinelabor der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen durchgeführt.

2.2 Radioimmunoassay (RIA)

Messung von IGF-I

IGF-I wurde mit einem Radioimmunoassay (RIA) (Blum, Gallaher et al. 1992) der Firma Mediagnost, Tübingen, Deutschland) gemessen. Es handelt sich dabei um einen IGFBP-geblockten IGF-I RIA. Das Antiserum war ein Kaninchen-anti-IGF-I-Serum und als Präzipitationsreagenz diente Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Serum. Als Standard wurde rhIGF-I der Firma Pharmacia (GmbH, Erlangen, Deutschland) mit Standard 7 = 500 pg/100 μ l verwendet. Die analytische Sensitivität des IGF-I-RIAs betrug 0,1 ng/ml. Plasma und die Wundflüssigkeit wurden 1:100 in saurem Puffer (pH 2,8, siehe Reagenzien im Anhang Seite 37 ff.) verdünnt.

Messung von IGF-II

Für den IGF-II RIA [78] wurde die Serum- und Wundflüssigkeitsprobe nach der Methode von Daughaday et al. [79] mit einem Säure-Alkohol-Gemisch extrahiert und mit Assaypuffer auf 1:10 verdünnt. Als Antikörper diente ein Kaninchen-anti-IGF-II-Serum, welches mit rhIGF-II-Stammlösung verdünnt wurde. Als Tracer wurde ¹²⁵Jod-IGF-II-Stammlösung verwendet. Die Standards waren rhIGF-II der Firma Pharmacia (GmbH, Erlangen, Deutschland), mit Standard 8 = 5 ng/100 μ l. Die Sensitivität des IGF-II-RIAs betrug 0,2 ng/ml.

Messung von IGFBP-2

IGFBP-2 wurde mit einem Doppelantikörper Radioimmunoassay (RIA) gemessen [80]. Zur Antikörpergewinnung wurden weiße Neuseelandkaninchen mit 100 μ g verdünntem rhIGFBP-2 (Sandoz Pharma, Basel, Schweiz) immunisiert. Das gewonnene Antiserum zeigte keine Kreuzreaktionen mit rhIGFBP-3. Die Plasma- und Wundflüssigkeitsproben wurden 1:50 in Assaypuffer verdünnt. Als Tracer wurde rhIGFBP-2 mit einer modifizierten

Chloramin-T-Methode [81], zu ¹²⁵Jod-rhIGFBP-2 jodiert. Die Sensitivität lag bei 0,2 ng/ml und die Intra- und Interassay-Varianz bei 5,6%.

Messung von IGFBP-3

Wie IGFBP-2 wurde auch der IGFBP-3-Spiegel im Plasma und in der Wundflüssigkeit mit einem Doppelantikörper-RIA gemessen [82]. Das polyklonale IGFBP-3-Antiserum wurde durch Immunisierung von weißen Neuseelandkaninchen mit 100 µg nativem rhIGFBP-3 gewonnen. Als Tracer für den RIA diente ¹²⁵Jod-IGFBP-3 (Mediagnost, Tübingen, Deutschland). Als Standard diente eine lyophilisierte Serumpoolverdünnung mit Standard 7 = 4 ng/100µl in Assaypuffer verdünnt. Die Plasma- und Wundflüssigkeit wurden 1:600 in Assaypuffer verdünnt. Die Sensitivität des IGFBP-3 Assays betrug 0,1 ng/ml und die Intra- und Interassayvarianz lag bei 7,6 %.

Alle Ergebnisse der IGF- und IGFBP-Konzentrationen wurden in ng/ml angegeben. Es wurde bei allen RIAs Doppelwertbestimmungen durchgeführt und bei jeder Messung wurde eine hohe und eine niedere Serumkontrolle sowie eine Kontrolle der nichtspezifischen Bindung mitbestimmt. Die genaue Auflistung der benötigten Reagenzien ist im Anhang aufgeführt (Seite 40 ff.).

2.3 Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)

Der hier verwendete Total-ALS-ELISA ist ein enzymatischer „Two-step-sandwich“-Immunoassay (Firma DSL Sinsheim). In diesem Assay wurden Standards, Kontrollen und Proben in Mikrotiterplatten inkubiert. Diese sind mit ALS-Antikörpern beschichtet. Nach dem Inkubieren und Waschen wurde ein zweiter ALS-Antikörper, der an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, zugegeben. Nach der zweiten Inkubation und einem weiteren Waschschrift wurde die Mikrotiterplatten mit Tetramethylbenzidin inkubiert. Durch Zugabe von Schwefelsäure wurde die Farbreaktion gestoppt und die Absorption durch Wellenlängenmessung (bei 420 nm) bestimmt.

Die Konzentrationen der Acid-labile Subunit (ALS) wurden in der Wundflüssigkeit und im Plasma gemessen.

Verdünnung: Es wurden 5 µl Plasma bzw. Wundflüssigkeit und 500 µl ALS-Probenpuffer vermischt und für die Testdurchführung verwendet. Es wurden Einzelwertbestimmungen durchgeführt.

Die Sensitivität des verwendeten Assays betrug 0,7 ng/ml. Die verwendeten Antikörper waren hochspezifisch, und es waren keine Kreuzreaktionen oder Interferenzen mit IGF-I, IGF-II, rIGFBP-2 und rIGFBP-3 zu erwarten.

2.4 Gesamtprotein-, Laktat- und pH-Wert-Bestimmung

Gesamtprotein:

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in der Wundflüssigkeit erfolgte mit der Biuretreaktion. Diese Reaktion wird in einer alkalischen Lösung mit Kupferionen durchgeführt, deren Farbintensität der Proteinkonzentration proportional ist und bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen wird [83].

Laktatbestimmung:

Die Laktatkonzentration wurde direkt aus 25µl Wundflüssigkeit bzw. Plasma mit einem Laktatmessgerät (YSI 2300s) bestimmt. Die Kalibrierung wurde mit 5mM und 15mM Standard-Laktat-Lösung durchgeführt.

pH-Bestimmung:

Die pH-Werte der Wundflüssigkeit wurden nach Kalibrierung mit pH 4,0 und pH 10,0 mit einem pH-Meter (WTW 535 Multi Cal) bestimmt.

2.5 Stabilität der Insulin-like growth factors

Im Plasma und in der Wundflüssigkeit zirkulieren IGFBP-Proteasen, welche IGFBPs proteolytisch spalten [84]. Dieser Mechanismus stellt freies, aktives IGF zur Verfügung, das aufgrund seiner geringen Halbwertszeit (10-20 min) schnell an Wirkung verliert. Bei den Meßintervallen von 24h bestand die Möglichkeit, daß die Messung der IGFs in der Wundflüssigkeit durch Proteolysevorgänge beeinflusst wird und somit Konzentrationsschwankungen auftreten.

Die beiden folgenden Kontrollexperimente wurden durchgeführt um Stabilität der IGFs über die Zeit zu überprüfen.

- a) Im ersten Kontrollexperiment wurden die Konzentration der IGFs in kurzen Zeitabständen mit dem RIA gemessen. Wundflüssigkeit wurde im Labor bei Raumtemperatur aufbewahrt und die IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3-Konzentrationen in Abständen von 2,5 - 5 - 8 - 10 - 20 Stunden im RIA bestimmt. Alle Parameter waren über diese Zeit stabil (Abb. 3).

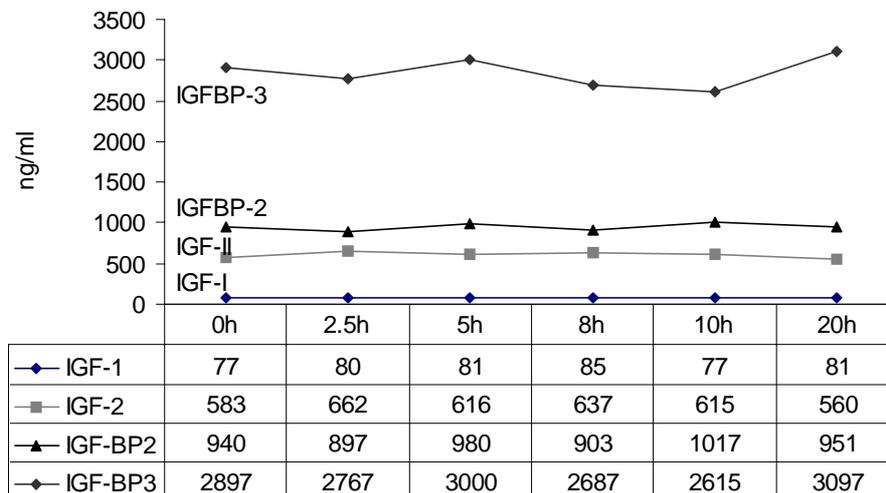


Abb. 3: Verlauf der IGF-I-, IGF-II-, IGFBP-2 und IGFBP-3-Konzentration (ng/ml) in der Wundflüssigkeit nach 0 - 2,5 - 5 - 8 - 10 - 20 Stunden.

- b) Wundflüssigkeit wurde zusätzlich im Abstand von 4 – 6 – 9 – 11 – 21 Stunden nach der Operation aus der Drainage-Flasche am Patientenbett entnommen und die IGF-I-, IGF-II-, IGFBP-2- und IGFBP-3-Konzentrationen im RIA bestimmt. Alle Parameter waren entsprechend dem ersten Kontrollexperiment über die Zeit stabil.

2.6 Molarer Quotient

Im Plasma besteht aufgrund der raschen Clearance von freiem IGF-I und IGF-II und der erheblich längeren Halbwertszeit von IGF-BP-gebundenen Peptiden [85] ein molares Verhältnis von angenähert 1:1 zwischen IGFs und IGF-Bindungsproteinen [86]. Das heißt, weniger als 1% der IGFs liegen ungebunden, d.h. in der biologisch aktiven Form vor. Das molare Verhältnis bzw. der molare Quotient reflektiert das physiologische Verhältnis zwischen IGFs und IGFBPs, wobei IGFBP-3 das häufigste Bindungsprotein im Plasma ist und über 90% der IGFs bindet [53].

Zur Berechnung des molaren Quotienten von IGF-I + IGF-II und IGFBP-3 wurden die Parameter zuerst auf die Molmasse/ml umgerechnet. Nach Division der Konzentration (ng/ml) durch die entsprechende Molmasse (g/mol) wurde die Summe der Molmassen von IGF-I und IGF-II mit dem Wert des Bindungsproteins ins Verhältnis gesetzt und der daraus entstandene Quotient als q definiert. Folgende Molmassen wurden verwendet: IGF-I: 7650 g/mol; IGF-II: 7470 g/mol, IGFBP-3: 43000 g/mol.

2.7 Reagenzien

Alle benötigten Reagenzien sind im Anhang aufgeführt (Seite 40 ff.).

2.8 Statistische Verfahren

Zur Datenerfassung und Datenhaltung wurde das Tabellenkalkulationsprogramm EXEL eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Statistik-Software JMP für Windows und in Abstimmung mit dem Institut für Medizinische Informationsverarbeitung der Universität Tübingen.

Die Datenanalyse erfolgte unter Prüfung der Verteilungsannahme parametrisch mittels Varianzanalyse (2-faktoriell mit den beiden Einflußgrößen Altersgruppe und Entnahmezeitpunkt) bzw. Zwei-Stichproben-t-Test für den Mittelwert. Zusätzlich wurden die Konfidenzintervalle für den Mittelwert auf dem 95%-Niveau mittels Standardabweichung und Stichprobengröße errechnet. Zur Beschreibung der Stärke des linearen Zusammenhangs zweier Merkmale wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Patientengruppen

Während des Studienzeitraums von 7 Monaten wurden 15 junge und 15 alte Patienten in die Studie aufgenommen. Der Altersunterschied der Mittelwerte beider Gruppen beträgt über 55 Jahre. Die klinische Beurteilung der postoperativen Wundheilung zeigt weder bei den jungen noch bei den alten Patienten Wundkomplikationen wie Hämatome, postoperative Wundinfekte, Wunddehiszenzen oder Nachblutungen (Beobachtungszeitraum bis zur stationären Entlassung). In der jungen Gruppe werden mehr männliche Patienten und in der alten Gruppe mehr weibliche Patienten in die Studie aufgenommen. Die Operationsdauer der beiden Gruppen unterscheidet sich nicht signifikant. Die Charakteristika der untersuchten Gruppen sowie die durchgeführten Operationen sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Alter (Mittelwert und Standardabweichung), Altersbereich, Geschlechtsverteilung, Operationsdauer sowie Operationsart der jungen (n = 15) und alten (n = 15) Patientengruppe (ME = Metallentfernung)

	Gruppe 1	Gruppe 2
Alter	23,5 ± 3,3 Jahre	78,9 ± 6,2 Jahre
Altersbereich	17 - 28 Jahre	71 - 91 Jahre
Geschlecht	5 weiblich, 10 männlich	11 weiblich, 4 männlich
Operationsdauer	113 ± 58 min	103 ± 32 min
Operationsart	6 x ME Tibianagel 3 x ME Femurnagel 5 x ME Femur- u. Tibiaplatte 1 x Hüfttotalendoprothese	7 x Knie totalendoprothese 6 x Hüft totalendoprothese 1 x Humeruskopfendoprothese 1 x Plattenosteosynthese Femur

3.2 Insulin-like growth factor I

Die IGF-I-Konzentrationen im Plasma und der Wundflüssigkeit des jungen und alten Patientenkollektivs unterscheiden sich an allen untersuchten postoperativen Tagen signifikant ($p < 0,0001$). Die alten Patienten zeigen im Vergleich zu den jungen Patienten niedrigere IGF-I Konzentrationen sowohl im Plasma als auch in der Wundflüssigkeit (Abb. 4 u.Tab. 2).

Es besteht ein konstantes Verhältnis der IGF-I-Konzentration zwischen Plasma und Wundflüssigkeit in beiden Patientengruppen. IGF-I zeigt im Verlauf über 4 postoperative Tage weder im Plasma noch in der Wundflüssigkeit signifikante Veränderungen.

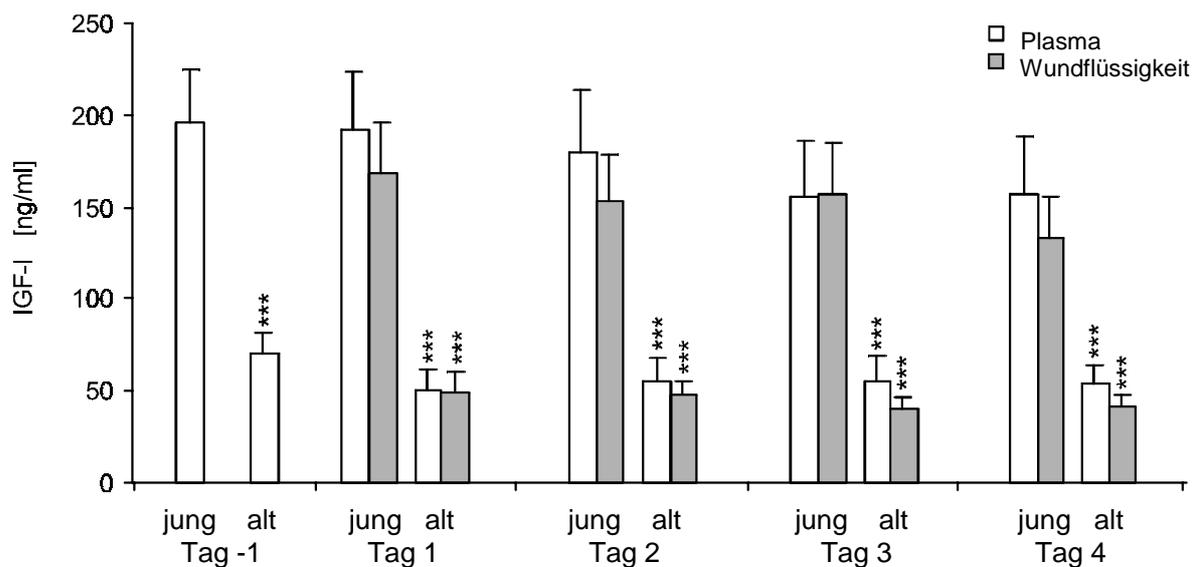


Abb.4: IGF-I-Konzentration in Plasma präoperativ (Tag -1) und an 4 postoperativen Tagen in Plasma und Wundflüssigkeit. Mittelwert und Standardabweichung des jungen ($n = 15$) und alten ($n = 15$) Patientenkollektivs. (95%-Konfidenzintervall; *** = $p < 0,0001$)

3.3 Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3

IGFBP-3 ist bei den alten Patienten im Gegensatz zu der jungen Patienten erniedrigt. Dieser Unterschied ist an allen 4 postoperativen Tagen sowohl im Plasma als auch in der Wundflüssigkeit signifikant ($p < 0,0001$; Abb. 5 u. Tab. 2). Es besteht an allen postoperativen Tagen ein konstantes Verhältnis zwischen der IGFBP-3-Konzentration in Plasma und Wundflüssigkeit. Die IGFBP-3-Konzentrationen in Plasma und Wundflüssigkeit verändern sich im Verlauf über die 4 postoperativen Tage nicht signifikant.

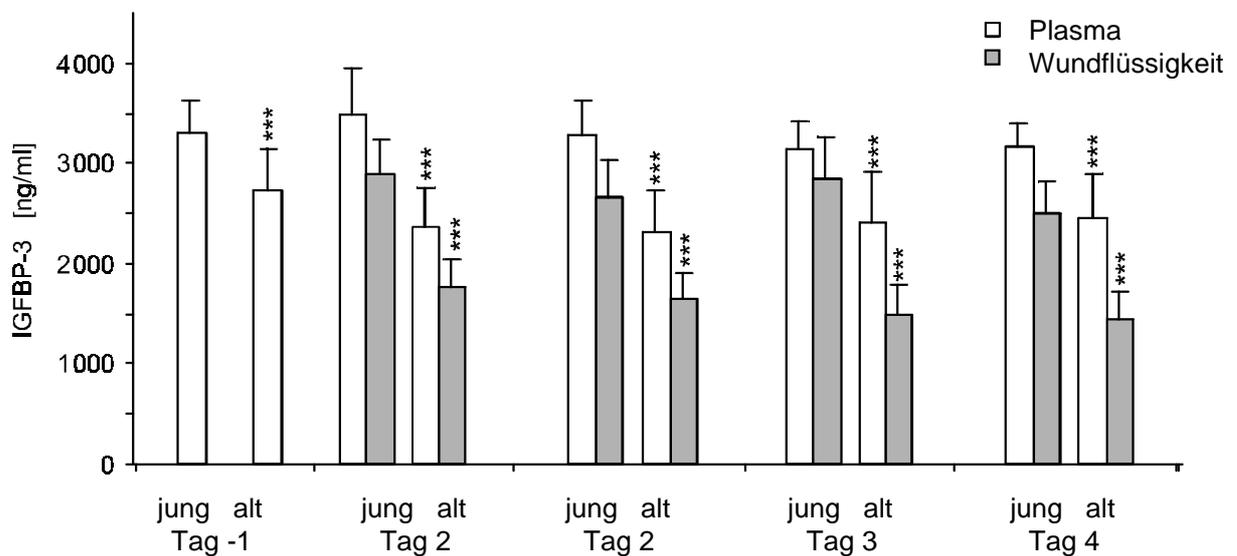


Abb. 5: IGFBP-3-Konzentration in Plasma präoperativ und an 4 postoperativen Tagen in Wundflüssigkeit und Plasma. Mittelwert und Standardabweichung des jungen ($n = 15$) und alten ($n = 15$) Patientenkollektivs (***) = $p < 0,0001$)

3.4 Acid-Labile Subunit

Die ALS-Konzentrationen im Plasma und in der Wundflüssigkeit sind bei den alten Patienten an allen gemessenen Zeitpunkten signifikant niedriger als bei den jungen Patienten ($p < 0,0001$; Abb. 6 u. Tab. 2).

Die ALS Konzentrationen fallen über die 4 postoperativen Tage in der jungen Patientengruppe im Plasma um 21% und in der Wundflüssigkeit um 24%. In der alten Patientengruppe nehmen die ALS-Konzentrationen im Plasma um 29% und in der Wundflüssigkeit um 48% ab. Die Abnahme der Konzentrationen im Plasma ($p < 0,0009$) und in der Wundflüssigkeit ($p < 0,002$) ist sowohl bei den alten als auch bei den jungen Patienten signifikant.

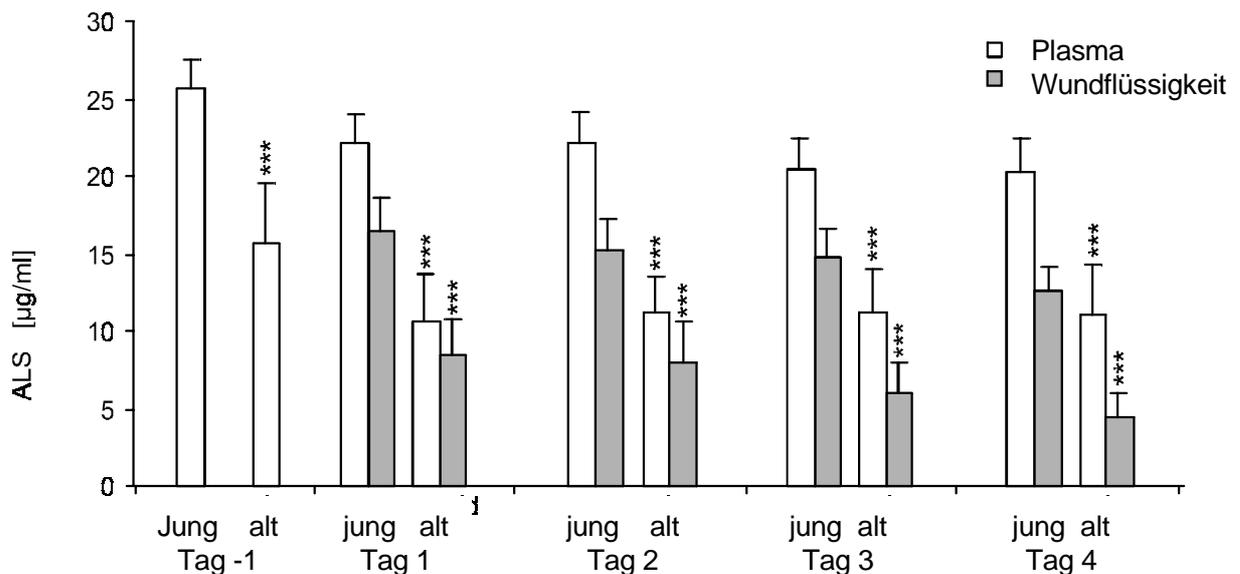


Abb. 6: ALS-Konzentration in Plasma präoperativ und an 4 postoperativen Tagen in Wundflüssigkeit und Plasma. Mittelwert und Standardabweichung des jungen ($n = 15$) und alten ($n = 15$) Patientenkollektivs (***) = $p < 0,0001$)

Tabellarische Übersicht IGF-I, IGFBP-3 und ALS

Tab. 2: Mittelwert und Standardabweichung der Plasmakonzentrationen von IGF-I, IGFBP-3 und ALS am 1. und 4. postoperativen Tag bei jungen (n = 15) und alten (n = 15) Patienten (***) = $p < 0,0001$)

		junge Patienten		alte Patienten	
		Tag 1	Tag 4	Tag1	Tag 4
IGF-I (ng/ml)	Plasma	192 ±62	156 ±64	51 ±21 ***	54 ±21 ***
	Wundflüssigkeit	168 ±57	133 ±44	50 ±20 ***	41 ±13 ***
IGFBP-3 (ng/ml)	Plasma	3498 ±907	3173 ±452	2370 ±763 ***	2456 ±842 ***
	Wundflüssigkeit	2901 ±675	2512 ±617	1762 ±557 ***	1444 ±563 ***
ALS (µg/ml)	Plasma	22,2 ±3,6	20,3 ±4,3	10,6 ±6,2 ***	11,1 ±6,3 ***
	Wundflüssigkeit	16,5 ±4,3	12,6 ±3	8,5 ±4,6 ***	4,4 ±3,2 ***

3.5 Korrelation in Plasma und Wundflüssigkeit von IGF-I, IGFBP-3 und ALS

Die Berechnung des Koeffizienten nach Pearson für alle Patienten zeigt, daß IGF-I, IGFBP-3 und ALS zwischen Wundflüssigkeit und Plasma signifikant korrelieren. Die beste Korrelation besteht für IGF-I, und dies besonders an den beiden ersten postoperativen Tagen. IGF-I ($p < 0,001$), IGFBP-3 ($p < 0,01$), ALS ($p < 0,001$) (Tab. 3).

Tab. 3: Korrelationskoeffizienten nach Pearson von IGF-I, IGF-II, IGFBP-3 und ALS zwischen den Konzentrationen im Plasma und in der Wundflüssigkeit bei jungen und alten Patienten (n = 30, $p < 0,02$)

Korrelation nach Pearson	Plasma u. Wundflüssigkeit			
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
IGF-I	0,91	0,9	0,85	0,83
IGFBP-3	0,73	0,71	0,69	0,73
ALS	0,83	0,79	0,76	0,8

3.6 Insulin-like growth factor II

Die IGF-II-Konzentrationen im Plasma und der Wundflüssigkeit sind bei den alten Patienten an allen 4 postoperativen Tagen niedriger als in den jungen Patienten ($p < 0,0001$; Abb. 7 u. Tab. 4).

In der Wundflüssigkeit fällt die IGF-II-Konzentration bei den jungen Patienten vom 1. bis zum 4. Tag um 34%, bei den alten Patienten um 41% ab ($p < 0,0001$). Die IGF-II Konzentrationen im Plasma verändern sich im Verlauf über die 4 postoperativen Tage nicht signifikant.

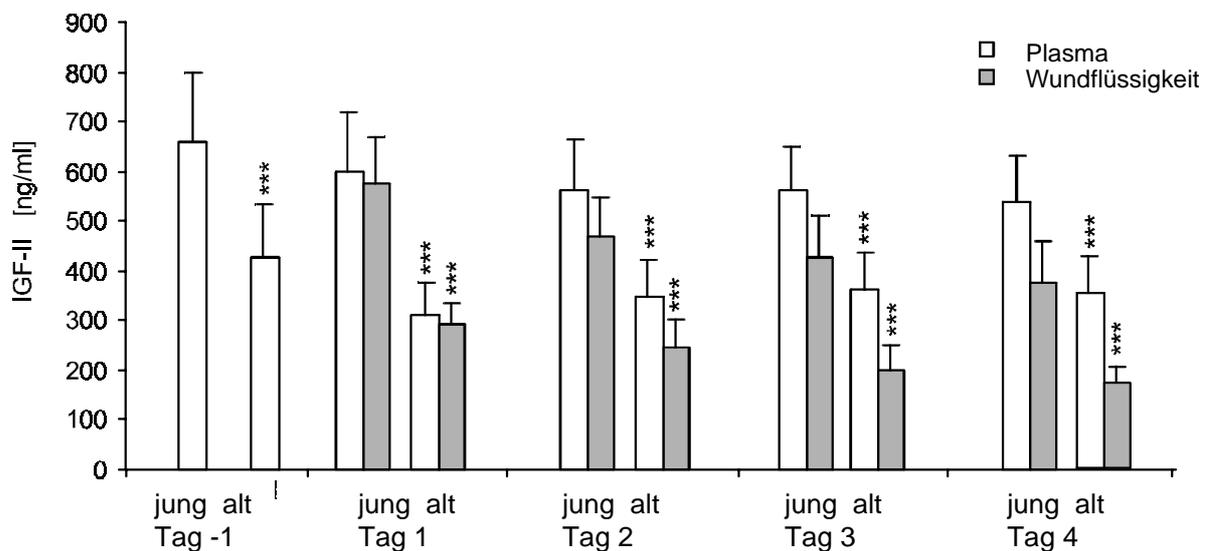


Abb. 7: IGF-II-Konzentration in Plasma präoperativ und an 4 postoperativen Tagen in Wundflüssigkeit und Plasma. Mittelwert und Standardabweichung des jungen ($n = 15$) und alten ($n = 15$) Patientenkollektivs (***) = $p < 0,0001$)

3.7 Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2

Die Konzentrationen der IGFBP-2 Werte im Plasma und in der Wundflüssigkeit zeigen bei den alten Patienten statistisch signifikant höhere Werte als bei den jungen Patienten ($p < 0,0001$, Abb. 8 u. Tab. 4).

IGFBP-2 zeigt bei den alten Patienten einen signifikanten Abfall der Konzentration in der Wundflüssigkeit über die vier postoperativen Tage (42%). Die jungen Patienten dagegen zeigen keine statistisch signifikante Änderung der IGFBP-2-Konzentration in der Wundflüssigkeit an den 4 postoperativ gemessenen Tagen. Die IGFBP-2 Konzentrationen im Plasma verändern bei beiden Patientengruppen über die 4 postoperativen Tage nicht statistisch signifikant.

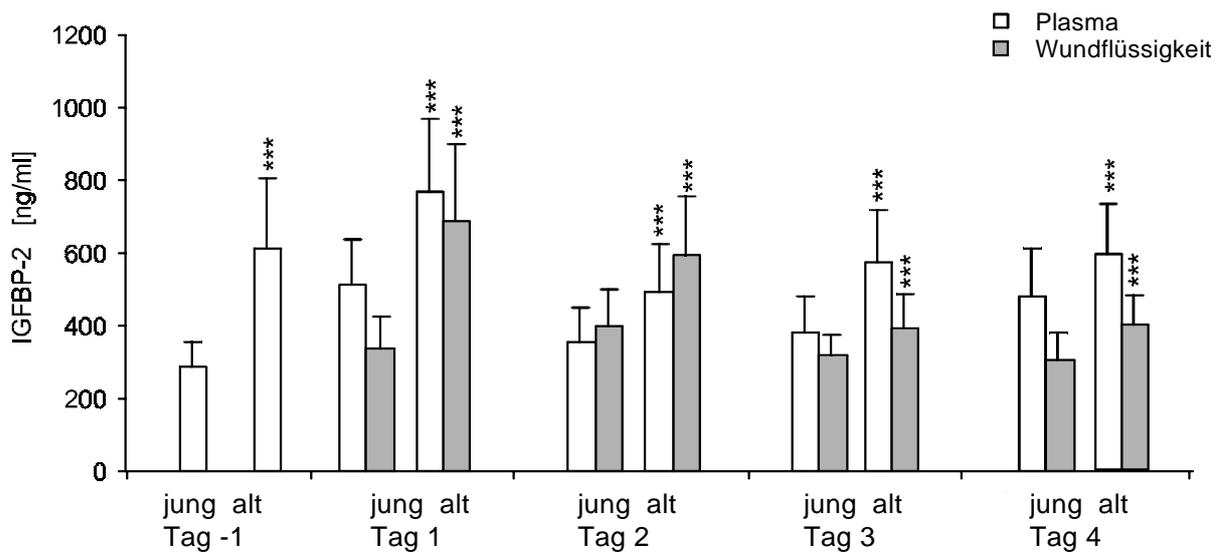


Abb. 8: IGFBP-2-Konzentration in Plasma präoperativ und an 4 postoperativen Tagen in Wundflüssigkeit und Plasma. Mittelwert und Standardabweichung des jungen ($n = 15$) und alten ($n = 15$) Patientenkollektivs (***) = $p < 0,0001$).

Tabellarische Darstellung von IGF-II und IGFBP-2

Tab. 4: Mittelwert und Standardabweichung der IGF-II- und IGFBP-2-Plasmakonzentration am 1. und 4. postoperativen Tag bei jungen (n = 15) und alten (n = 15) Patienten (***) = $p < 0,0001$).

		junge Patienten		alte Patienten	
		Tag 1	Tag 4	Tag1	Tag 4
IGF-II (ng/ml)	Plasma	599 ±233	593 ±180	311 ±124 ***	354 ±143 ***
	Wundflüssigkeit	574 ±189	377 ±164	294 ±81 ***	172 ±67 ***
IGFBP-2 (ng/ml)	Plasma	510 ±255	481 ±256	771 ±396 ***	593 ±275 ***
	Wundflüssigkeit	340 ±171	309 ±146	689 ±417 ***	398 ±171 ***

3.8 Korrelation in Wundflüssigkeit und Plasma von IGF-II und IGFBP-2

Die Berechnung des Koeffizienten nach Pearson für alle Patienten zeigt, daß IGF-II und IGFBP-2 zwischen Wundflüssigkeit und Plasma signifikant korrelieren. Die beste Korrelation besteht an dem ersten postoperativen Tag. IGF-II ($p < 0,01$), IGFBP-2 ($p < 0,02$), (Tab. 5).

Tab. 5: Korrelationskoeffizienten nach Pearson von IGF-II und IGFBP-2 zwischen den Konzentrationen im Plasma und in der Wundflüssigkeit bei jungen und alten Patienten (n = 30, $p < 0,02$).

Korrelation nach Pearson	Plasma u. Wundflüssigkeit			
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
IGF-II	0,87	0,83	0,74	0,7
IGFBP-2	0,86	0,77	0,67	0,59

3.9 Der molarer Quotient von IGF-I + IGF-II und IGFBP-3

Der Quotient $q = \text{IGF-I} + \text{IGF-II} / \text{IGFBP-3}$ ist ein möglicher Indikator für freies IGF im Plasma bzw. in der Wundflüssigkeit. Dabei wird die Bindungskapazität von IGFBP-2 vernachlässigt. Der Mittelwert des Quotienten über alle Tage bei den jungen Patienten ist $q = 1,2$ und bei den alten Patienten $q = 0,9$. Die Quotienten beider Gruppen unterscheiden sich signifikant sowohl im Plasma ($p < 0,002$) als auch in der Wundflüssigkeit ($p < 0,02$). In der Tabelle 6 sind die errechneten Quotienten der einzelnen Tage dargestellt. Der geringere Quotient im Alter deutet auf weniger freies IGF hin. Dies wird durch die im Alter höheren IGFBP-2-Werte noch weiter untermauert.

Tab. 6: Molare Quotienten von IGF-I + IGF-II und IGFBP-3 an vier postoperativen Tagen in Wundflüssigkeit und Plasma für alte ($n = 15$) und junge ($n = 15$) Patienten.

junge Patienten	Tage	-1	1	2	3	4
n=15	Plasma	1,37	1,19	1,19	1,21	1,15
	Wundflüssigkeit		1,35	1,24	1,08	1,07
alte Patienten	Tage	-1	1	2	3	4
n=15	Plasma	0,97	0,81	0,92	0,91	0,88
	Wundflüssigkeit		1,03	0,93	0,85	0,78

3.10 ALS in der Wundflüssigkeit

ALS bildet zusammen mit IGF-I und IGFBP-3 einen ternären Komplex im Plasma. Die Berechnung der Korrelationen sowohl im Plasma als auch in der Wundflüssigkeit kann auf eine ähnliche Regulation in beiden Kompartimenten hinweisen. Es besteht eine sehr gute Korrelation im Plasma zwischen der Konzentration von ALS und IGF-I ($r = 0,75$) und zwischen ALS und IGFBP-3 ($r = 0,72$). Die Konzentrationen von ALS und IGFBP-2 im Plasma zeigen

hingegen eine negative Korrelation ($r = -0,49$). In der Wundflüssigkeit sind sehr gute Korrelationen zwischen ALS und IGF-I ($r = 0,75$) sowie ALS und IGFBP-3 ($r = 0,73$) vorhanden. ALS korreliert, entsprechend den Werten aus dem Plasma, in der Wundflüssigkeit mit IGFBP-2 negativ ($r = -0,29$). Zur Berechnung der Korrelationen werden die Plasma- und Wundflüssigkeitskonzentrationen beider Patientengruppen und aller 4 postoperativen Tagen verwendet (Abb. 9 a+b).

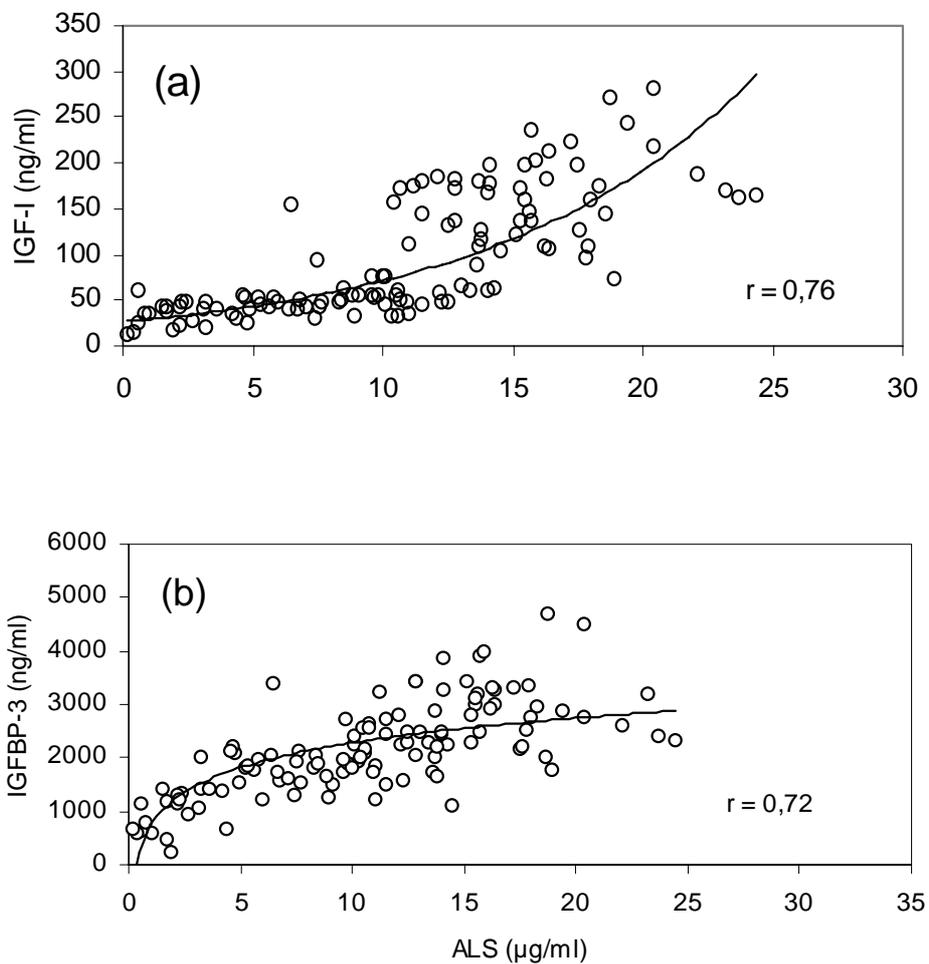


Abb. 9 (a)+(b): Korrelationen in der Wundflüssigkeit zwischen (a) ALS und IGF-I (b) ALS und IGFBP-3 von jungen und alten Patienten ($n = 30$) und 4 postoperativen Tagen. Der Korrelationskoeffizient ist (a) $r = 0,7553$ und (b) $r = 0,7197$.

3.11 Gesamtprotein, Laktat und pH-Wert

Die Analyse der Wundflüssigkeit auf Gesamtprotein, Laktat und pH-Wert vom 1. bis 4. postoperativen Tag entspricht dem normalen Wundmilieu. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der jungen und der alten Patientengruppe und zwischen den Meßwerten an den einzelnen Tagen. Die Mittelwerte und Standardabweichung der Gesamtprotein- und Laktatkonzentration, sowie des pH-Wertes in der Wundflüssigkeit sind in der Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Mittelwert und Standardabweichung der Gesamtprotein- und Laktatkonzentration sowie des pH-Wertes in der Wundflüssigkeit der jungen und alten Patienten am 1. und 4. postoperativen Tag.

	junge Patienten		alte Patienten	
	Tag 1	Tag 4	Tag 1	Tag 4
Gesamtprotein (g/dl)	7,3 ±2,0	7,5 ±2,7	5,7 ±1,4	5,1 ±1,5
Laktat (ng/ml)	14,5 ±2,7	14,4 ±2,4	13,5 ±4,2	16,9 ±5,3
pH	7,4 ±0,2	7,8 ±0,2	7,4 ±0,1	7,6 ±0,2

3.12 Klinische Chemie

Die präoperativen Werte des C-reaktiven Proteins (CRP) liegen bei beiden Patientengruppen im Normbereich (junge Patienten: 2 ±3 mg/l, alte Patienten 5 ±5mg/l). Die CRP-Konzentrationen im Plasma steigen in beiden Patientengruppen am zweiten postoperativen Tag auf die höchsten Werte an und zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied (junges Kollektiv: 77 ±53 mg/l, altes

Kollektiv: 156 ± 36 mg/l). Am 3. und 4. Tag nehmen die Konzentrationen im Plasma in beiden Gruppen wieder ab und bleiben signifikant unterschiedlich (4. Tag: junge Patienten: 38 ± 35 mg/l, alte Patienten: 81 ± 40 mg/l).

Die Leberfunktion wird während der Studienzeit mit folgenden Parametern beurteilt: Prothrombinzeit (Quick), partielle Thromboplastinzeit (PTT), GOT, GPT, γ -GT, Alkalische Phosphatase, Gesamtbilirubin und LDH. Die gemessenen Leberwerte aller 30 Patienten bleiben unauffällig.

Die Nierenfunktion wird durch die Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff während der Studiendauer beurteilt. Kreatinin und Harnstoff aller 30 Patienten bleiben im Normbereich.

4. DISKUSSION

Wundheilung und Wundbehandlung nehmen eine zentrale Stellung im chirurgischen Alltag ein. Störungen des Heilungsablaufs, wie chronische Wunden, Wunden bei multimorbiden Patienten oder Wundheilung im Alter gewinnen volkswirtschaftlich an Brisanz. Die zugrundeliegenden Mechanismen einer gestörten Wundheilung beim alten Menschen sind häufig noch unerklärt. Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß die Wundheilung durch Wachstumsfaktoren, wie IGF, FGF, PDGF, TGF- β und VEGF gesteuert wird [15, 19, 87, 88]. Die relevanten Wachstumsfaktoren, einschließlich der IGFs und ihrer Bindungsproteine, sind in der extrazellulären Flüssigkeit von Menschen und Tieren nachgewiesen worden [89]. Das IGF-System ist von zentraler Bedeutung für die Wundheilung, es stimuliert die Kollagensynthese und reguliert die Angiogenese. Eine Erhöhung der IGF-Konzentration in Tierversuchen führt zu einer signifikanten Verbesserung der Wundheilung. Auch in einer humanen Studie konnte gezeigt werden, daß die Erhöhung von IGF-I Konzentrationen im Plasma durch die Verabreichung von rekombinantem humanen Wachstumshormon in einer Gruppe älterer Patienten die Wundheilung signifikant verbessert [77]. Eine Alterabhängigkeit des IGF-Systems im Plasma ist bekannt.

In der vorliegenden prospektiven Studie wurden die Konzentrationen der Komponenten des IGF-Systems im Plasma und in der Wundflüssigkeit bei jungen und alten chirurgischen Patienten verglichen. Die Ergebnisse zeigen, daß die Komponenten des IGF-Systems in der frühen postoperativen Phase sowohl im Plasma als auch in der Wundflüssigkeit mit steigendem Alter signifikant abnehmen. Die Konzentrationen von IGF-I und -II, IGFBP-3 und ALS sind in der Wundflüssigkeit der älteren Patienten um 25-75% erniedrigt. Die Parameter des IGF-Systems in der Wundflüssigkeit zeigen sowohl bei den jungen als auch bei den alten Patienten ein konstantes Verhältnis zum Plasma. Das verringerte Verhältnis von IGFs zu IGFBPs bei den älteren Patienten, das

in dieser Untersuchung gemessen wurde, deutet auf eine reduzierte biologische Verfügbarkeit von IGFs in der Wunde und im Plasma im Alter hin.

Es ist bekannt, daß IGF im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren in bedeutender Menge im Blut vorhanden ist. Thrombozyten enthalten neben TGF- β und PDGF auch IGF-I und IGF-II, welches bereits in der frühen Phase der Wundheilung in die Wunde gelangt. „Endogene“ Quellen der IGF-Produktion, wie z.B. Makrophagen und Fibroblasten, gelangen erst im Laufe des Heilungsprozesses in das Wundmilieu. Danach nimmt ihre Zahl beinahe exponentiell zu. In der aktuellen Studie sind die IGF-Konzentrationen schon am ersten postoperativen Tag in der Wunde hoch und bleiben dies auch bis zum vierten Tag. Es ist wahrscheinlich, daß die hohen IGF-Spiegel in der Wunde in den ersten Tagen der Wundheilung aus dem Blut und den Thrombozyten stammen und nicht durch lokale Sekretion in der Wunde freigesetzt werden. In der Literatur sind sehr hohe Werte von IGF-I in der Wundflüssigkeit von chronischen, schlecht heilenden Wunden beschrieben [90]. Inwieweit eine lokale IGF-Produktion für eine komplikationslose Wundheilung erforderlich ist, ist nicht bekannt.

In der vorliegenden Studie wurden die IGF-Konzentrationen im Plasma und der Wundflüssigkeit in den ersten vier Tagen nach dem operativen Eingriff gemessen. In dem gewählten klinischen „Modell“ werden nach diesem Zeitpunkt alle Drainagen entfernt, und die Wundflüssigkeit ist für eine Analyse nicht mehr verfügbar. Die Beschränkung auf die frühe postoperative Phase stellt eine Einschränkung des Modells dar. Gleichzeitig ist bekannt, daß die frühe postoperative Phase die nachfolgende „Wundheilungskaskade“ nachhaltig beeinflusst. Ereignisse in dieser Phase, wie z.B. Steroid-Einnahme oder unkontrollierter Diabetes mellitus, beeinflussen den Heilungsverlauf für einige Wochen oder darüber hinaus [91, 92]. IGF-I und IGF-II wirken auf die Zellproliferation, die VEGF-Freisetzung und die Zellmigration. Alle diese Vorgänge treten innerhalb der ersten Tage des Heilungsprozesses auf. Die Folge erniedrigter IGF-Konzentrationen im Plasma und in der Wundflüssigkeit

wäre eine Verzögerung des Heilungsprozesses. Inwieweit sich diese Effekte der frühen postoperativen Phase im Alter auf den weiteren Heilungsverlauf auswirken, ist noch nicht bekannt.

Frühere Untersuchungen und die vorliegenden Daten deuten darauf hin, daß erniedrigte IGF- und IGFBP-3-Konzentrationen im Plasma und in Wunden einen verlangsamten und verzögerten Heilungsprozeß mit sich bringen. IGF-I oder IGFBP-3-Konzentrationen können daher möglicherweise als prognostische Faktoren eingesetzt werden, um eine Einschätzung des Risikos für Wundheilungskomplikationen bei älteren Patienten vorzunehmen. Die Einschätzung des Risikos für Wundheilungsstörungen könnte insbesondere für ältere Patientenkollektive mit zusätzlichen Komorbiditäten relevant werden. Bei diesen Patienten könnten rekombinant hergestelltes Wachstumshormon durch intravenöse Applikation, Testosteronanaloga [93] oder andere orale verabreichte anabolische Wirkstoffe genützt werden, um die IGF-Komponenten im Blut und in Wunden zu erhöhen und dabei das Risiko für Wundheilungsstörungen zu verringern [93].

Die IGF-Konzentration im Blut reagiert auf eine systemische Gabe von Wachstumshormon innerhalb von Stunden. Zu welchem Zeitpunkt eine Erhöhung der IGF-Werte bei elektiven operativen Eingriffen oder auch in Notfallsituationen klinisch von Nutzen sein kann, ist im Moment nicht bekannt. Modulationen der lokalen oder systemischen IGF-Konzentrationen mit dem Ziel einer beschleunigten Wundheilung sind bisher vorwiegend im Tierversuch durchgeführt worden. Eine klinische Anwendung dieses Konzeptes ist bisher erfolgreich bei Kindern mit schweren Brandverletzungen umgesetzt worden. Dort zeigte die Therapie mit rekombinantem Wachstumshormon verbesserte klinische Verläufe [94]. Die enge Korrelation zwischen IGF-I und IGF-II und deren Bindungsproteinen im Plasma und in Wunden läßt vermuten, daß eine Stimulation mit systemischem Wachstumshormon präoperativ oder in der frühen postoperativen bzw. posttraumatischen Phase schnell und effektiv durchgeführt werden kann. Über den genauen Zeitpunkt, die Dauer sowie die

Dosis einer solchen Therapie liegen jedoch keine Daten vor. Frühere klinische Studien an septischen Patienten und Patienten mit kataboler Stoffwechsellage, bei denen Wachstumshormon in supraphysiologischen Konzentrationen eingesetzt wurde, haben zu erheblichen Nebenwirkungen mit Stoffwechselentgleisungen und Ödemen geführt und keine positiven Auswirkungen auf klinische Verläufe bzw. auf die Wundheilung gezeigt.

Die Frage, ob das Heilungsdefizit, welches bei alten Menschen beobachtet wird, von einem eigentlichen Mangel an IGF oder von Begleiterkrankungen ausgeht, welche auch IGF verringern, kann mit dieser Studie nicht eindeutig beantwortet werden. Viele Komorbiditäten, einschließlich Lebererkrankungen, Sepsis, Karzinomen, Kachexie, Diabetes mellitus und der Schweregrad von Verletzungen, wirken sich auf das IGF-System aus und verzögern die Wundheilung [95]. Die vorliegenden Daten legen nahe, daß sowohl das Alter an sich als auch die im Alter beobachteten Komorbiditäten in einen lokalen IGF-Mangel in Wunden münden können.

Die vorliegenden Daten zeigen Variationen innerhalb des IGF-Systems. Während die IGF-I-Konzentrationen, beispielsweise, ein konstantes Verhältnis zwischen Plasma und Wundflüssigkeit zeigen, fallen die IGF-II-Werte in der Wundflüssigkeit im Verlauf der ersten vier postoperativen Tage im Vergleich zum Plasma ab. Dieser Verlauf ist bei den älteren Patienten besonders deutlich. Die IGF-I-, IGF-II-, IGFBP-3- und ALS-Werte verhalten sich innerhalb des Systems konstant und mit zunehmendem Alter waren alle Konzentrationen fallend. Im Gegensatz dazu zeigt IGFBP-2 einen anderen Verlauf: IGFBP-2-Konzentrationen waren sowohl im Plasma als auch in der Wundflüssigkeit bei den alten Patienten erhöht. Dies läßt sich möglicherweise auf die unterschiedliche Regulation von IGFBP-2 und IGFBP-3 durch Wachstumshormon auf zellulärer Ebene zurückführen [80]. Für IGFBP-2 wurde in serumfreiem Medium gezeigt, daß es ein wirksamer Inhibitor der DNA-Synthese in Fibroblastenkulturen ist und die stimulierende mitogene Wirkung sowohl von IGF-I als auch von IGF-II hemmt [96]. Weiter werden die Kollagensynthese [97]

und die Synthese von Karzinomzellen der Lunge durch IGFBP-2 gehemmt [98]. Inwieweit sich die erhöhten IGFBP-2-Konzentrationen, die bei dem älteren Patientenkollektiv beobachtet wurden, alleine oder in Kombination mit anderen Faktoren ungünstig auf die Wundheilung auswirken, ist bisher nicht bekannt.

Eine früher publizierte Studie zeigt, daß IGF-I Werte im Plasma von Patienten nach elektiven chirurgischen Eingriffen ansteigen [99]. Der IGF-I-Anstieg wurde in Zusammenhang mit einer erhöhten Proteolyse von IGFBP-3 und damit verbunden mit einer erhöhten IGF-I-Freisetzung gesehen. Eine andere Studie läßt wiederum einen deutlichen Abfall der Werte für IGF-I, IGF-II und IGFBP-3 vier Tage nach abdominalchirurgischen Eingriffen erkennen. Western ligand blots der IGFBP-Profile zeigten, daß intaktes IGFBP-3 bereits sehr früh postoperativ vollständig fehlte. In der vorliegenden Studie blieben die IGF-I, IGF-II und IGFBP-3-Werte in Plasma und Wundflüssigkeit postoperativ in beiden Gruppen über die gemessenen vier Tage stabil. Eine Western blot Analyse der IGFBPs in Plasma und Wundflüssigkeit bestätigte die Ergebnisse der Radioimmunoassays und zeigte einen altersabhängigen Rückgang der IGFBP-3-Konzentrationen (Daten nicht gezeigt).

Immunoreaktives ALS wurde bereits in früheren Untersuchungen in peritonealer, intestinaler, folliculärer und synovialer Flüssigkeit gemessen [100], nicht jedoch in Wundflüssigkeit. Die vorliegende Studie zeigt, daß sich die Konzentration von ALS über die vier postoperativen Tage altersabhängig in der Wundflüssigkeit verringert. In den ersten postoperativen Tagen gelangt ALS vermutlich als Plasmaexsudat und über die geschädigte Endothelzellbarriere in die Wunde. Der 150-kDa Komplex kann jedoch die neugebildete Endothelzellbarriere der Blutgefäße, die während der Heilung entsteht, nicht mehr passieren [101]. Der Rückgang der ALS-Werte in der Wundflüssigkeit und die konstant hohe systemische Verfügbarkeit im Blut sprechen für einen passiven Einstrom von ALS am Anfang der Wundheilung. Eine bedeutende lokale Bildung von ALS erscheint daher unwahrscheinlich und unterstützt die These, daß ALS die zirkulierende Form der IGFs im Plasma darstellt.

Die Untersuchungen von Baxter et al. zeigt in Plasmaproben von Kindern eine sehr gute Korrelation zwischen den Konzentrationen von IGFBP-3 und ALS [57]. In der vorliegenden Studie zeigt sich zusätzlich zu der Korrelation von IGFBP-3 und ALS eine gute Korrelation zwischen IGF-I und ALS im Plasma. Dies trifft sowohl für die jungen als auch die älteren Patienten zu. Analog zum Plasma zeigen auch die Ergebnisse der Wundflüssigkeit, altersentsprechend gute Korrelationen. Zusammen mit den Ergebnissen des molaren Quotienten erscheint eine aufeinander abgestimmte Regulation aller drei Faktoren wahrscheinlich. Es ist bekannt, daß die IGF-I-, IGFBP-3- und ALS-Plasmakonzentrationen von Wachstumshormon abhängig sind [49]. Möglicherweise reguliert Wachstumshormon alle drei Komponenten unabhängig oder die Regulation der Bindungsproteine, IGFBP-3 und ALS wird entsprechend dem Bedarf von freiem IGF-I, sekundär über IGF-I vermittelt.

Die Plasmakonzentration von IGF-I unterliegt einem tageszeitlichen Rhythmus [86]. IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 zeigen dagegen nur eine geringe tageszeitliche Änderung ihrer Konzentration [86]. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Blutentnahmen und die Drainagen-Wechsel täglich zur gleichen Zeit vorgenommen, um den Einfluß der physiologischen Schwankungen so gering zu halten. Neben dem Biorhythmus ist die Ernährung eine wichtige Einflußgröße auf den IGF-I-Plasmaspiegel. Bei gesunden Probanden wird durch eine 24-stündigen Nahrungskarenz eine Erniedrigung des IGF-I Spiegels um bis zu 30% beobachtet [102]. Die Konzentrationen von IGF-II und IGFBP-3 verändern sich in diesem Zeitraum nur minimal, während IGFBP-2 sogar bei einer Nahrungskarenz leicht ansteigt. Bei dem untersuchten Patientenkollektiv kann eine Beeinflussung, auch aufgrund der veränderten Ernährung unter stationären Bedingungen und postoperativ, nicht ausgeschlossen werden.

Frühere Untersuchungen des IGF-Systems im Plasma zeigen nur geringe geschlechtsspezifische Unterschiede. Weibliche Probanden haben im Vergleich zu männlichen leicht erhöhte Werte. Ein maximaler Unterschied von 8% in den

Plasmawerten konnte für IGF-I, IGFBP-3 und ALS gemessen werden. Bei IGF-II liegt der Unterschied bei ca. 2%. Lediglich bei IGFBP-2 werden bei Männern leicht erhöhte Konzentrationen gemessen [103]. Die Signifikanz der Ergebnisse der Studie wird auch bei unterschiedlicher Geschlechtsverteilung in den beiden Patientenkollektiven nicht beeinflusst.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, daß das Alter die Parameter des IGF-Systems im Plasma und in Wunden beeinflusst. Der altersabhängige Rückgang der Komponenten des IGF-Systems im Plasma wird in das Wundmilieu übertragen. Die Komponenten des IGF-Systems in Plasma und Wundflüssigkeit während der ersten entscheidenden Tage nach einem chirurgischen Eingriff in einer engen Beziehung zueinander stehen. Die Daten sind von therapeutischer Relevanz, da ein auf das Alter zurückzuführendes IGF-Defizit in Wunden grundsätzlich korrigierbar ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eine verlängerte und komplikationsbehaftete Wundheilung nach Operationen oder Verletzungen ist ein zunehmendes Problem in einer alternden Bevölkerungsstruktur. Es ist wenig über die Auswirkungen des Alters auf die Mechanismen des Heilungsprozesses beim alten Menschen bekannt. Das Insulin-like Growth Factor-System ist von zentraler Bedeutung für die Wundheilung. Es stimuliert die Kollagensynthese, reguliert die Angiogenese und wird in vielen Wundzellen gebildet. Die Konzentrationen von Insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II und Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) nehmen mit zunehmendem Alter im Plasma ab. Der Einfluß des Alters auf die IGF-Komponenten in Wunden ist bisher nicht untersucht.

In der vorliegenden prospektiven Studie wurden IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS-Konzentrationen in Plasma und Wundflüssigkeit aus subfaszialen Drainagen von 15 jungen ($23,5 \pm 3,3$ Jahre) und 15 alten ($78,9 \pm 6,2$ Jahre) Patienten vor und vier Tage nach einem elektiven chirurgischen Eingriff mit einem spezifischen Radioimmunoassay gemessen.

Die Konzentrationen der IGFs, von IGFBP-3 und ALS nehmen im Plasma und in der Wundflüssigkeit mit zunehmendem Alter ab. In der Wundflüssigkeit zeigen sich bei den alten Patienten im Gegensatz zu der jungen Patientengruppe signifikant niedrigere Konzentrationen ($p < 0,0001$). Die Parameter des IGF-Systems in der Wunde zeigen in der frühen postoperativen Phase eine konstante Beziehung zu den Plasmaspiegeln und lassen vermuten, daß Blut die Hauptquelle der in der Wunde vorhandenen IGFs darstellt. Die alten Patienten zeigen ein ungünstigeres Verhältnis der IGFs zu den IGFBPs, die Bioverfügbarkeit von freiem IGF nimmt mit zunehmendem Alter ab. Der Abfall des IGF-Systems bei den alten Patienten im Plasma und in der Wundflüssigkeit trägt möglicherweise zu dem Heilungsdefizit im Alter bei.

Die Daten sind von therapeutischer Relevanz, da ein auf das Alter zurückzuführendes IGF-Defizit während des Wundheilungsprozesses grundsätzlich korrigierbar ist.

6. ANHANG

6.1 Reagenzien

IGF-I-RIA:

- Puffer A: 20 mM Phosphat Puffer pH 2,8 (mit konz. HCL)

2,5926 mM ortho-Phosphorsäure	205 µl/l
16,409 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2,264 g/l
5 mM EDTA	1,860 g/l
120 mM NaCl	7,010 g/l
0,02 % NaN ₃	0,2 g/l
0,20 % BSA fettfrei	2,0 g/l
0,10 % Triton X-100	1,0 ml/l
- Puffer B: 100 mM Phosphat-Puffer ph 7,8

75,55 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	13.45g/l
24,45 mM NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	3,37g/l
40,00 mM NaCl	2,34g/l
0,02 % NaN ₃	0,2g/l
0,20 % BSA fettfrei	2,0g/l
0,10 % Triton X-100	1,0 ml/l
- Puffer für Zellkulturüberstände ph 1,25

0,5 Ortho-Phosphorsäure (3,37 ml / 100 ml), 1% BSA	
1% Triton X-100, 0,1 % NaN ₃ , mM PMSF (200 µl 0,5	
- Kaninchen-Gammaglobulin-Lösung: 50µl/ml Kaninchen-Gammaglobulin in B
- Antikörper: Kaninchen-anti-IGF-I-Serum 1:50000 in D verdünnt mit 250 ng/ml rhIGF-II
- Tracer: I-IGF-I-Stammlösung mit B auf 15000cpm/100µl verdünnt
- Präzipitationsreagenz: Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Serum 1:160 verdünnt mit 4°C kaltem 4%PEG (frisch hergestellt)

IGF-II-RIA:

- Säure-Alkohol-Gemisch: 875 ml Ethanol + 125 ml 2N
- HCl-Tris Puffer (zur Neutralisation): 103,57 g/l Tris + 200 mg/l Na-Azid
- Assay-Puffer: 0,05 mol/l Natriumphosphat (7,1 g/l NaH₂PO₄ x 2H₂O, 1,35 g/l NaH₂PO₄ x 2H₂O), 0,10 mol/l NaCl (5,83 g/L), 0,05% NaN₃, 0,2% fettsäure-freies BSA, 0,1% Triton X-100, mit 2 N NaOH auf ph 7,4 einstellen
- Kaninchen-Gammaglobulin-Lösung: 50 µg/ml Kaninchen-Gammaglobulin in A
- 1.Antikörper: Kaninchen-anti-IGF-II-Serum 1:10000 in B verdünnt mit 375 ng/ml rhIGF-I
- Tracer: 125J-IGFBP-2-Stammlösung mit A auf 15000 cpm/100µl verdünnt
- Präzipitationsreagenz: Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Serum 1:160 verdünnt mit 4°C kaltem 4% PEG (frisch hergestellt)
- 4°C-kaltes deionisiertes Wasser

IGFBP-2-RIA:

- Assay Puffer (siehe IGF-II-RIA)
- Kaninchen-Gammaglobulin-Lösung: 50 µg/ml Kaninchen-Gammaglobulin in A
- 1. Antikörper: Kaninchen-anti-IGFBP-2-Serum 1:50000 in B verdünnt
- Tracer: ¹²⁵J-IGFBP-2-Stammlösung mit A auf 150000 cpm/100µl verdünnt
- Präzipitationsreagenz: Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Serum 1:160 verdünnt mit 4°C kaltem 4% PEG (frisch hergestellt)
- 4°C-kaltes deionisiertes Wasser

IGFBP-3-RIA:

- Assay Puffer (siehe IGF-II-RIA)
- Kaninchen-Gammaglobulin-Lösung: 50 µg/ml Kaninchen-Gammaglobulin in A
- 1. Antikörper: Kaninchen-anti-IGFBP-3-Serum 1:10000 in B verdünnt
- Tracer: ¹²⁵J-IGFBP-3-Stammlösung mit A auf 150000 cpm/100µl verdünnt
- Präzipitationsreagenz: Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Serum 1:160 verdünnt mit 4°C kaltem 4% PEG (frisch hergestellt)
- 4°C-kaltes deionisiertes Wasser

ELISA:

- Anti-ALS beschichtete Mikrotiterplatte (mit Anti-ALS-IgG)
- Total-ALS-Standards (Bereich 0-0,35-1,5-5,5-16,5-50 µg/ml)
- Total-ALS-Kontrollen
- ALS-Assay-Puffer (enthält Proteinpuffer (BSA))
- Total-ALS-Antikörper-Enzym-Konjugat (enthält ALS-Antikörper, die an Meerrettichperoxidase gekoppelt sind)
- TMB-Chomogen-Lösung (Lösung aus Tetramethylbenzidin in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid)
- Waschkonzentrat (enthält gepufferte Kochsalzlösung mit einem nichtionischem Detergenz)
- ALS-Probenpuffer
- Stopp-Lösung (enthält 0,2 M Schwefelsäure)

6.2 Materialien

Chemikalien:

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Vertriebsort</u>
Ampuwa	Fresenius	Bad Homburg
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg
BSA,fettsäurefrei,reinst	Sigma	München
Chloramin T	Serva	Heidelberg
EDTA	Merck	Darmstadt
IGFBP-2	Dr. Schwander	Basel
IGFBP-3	Dr. Dr. Blum	Tübingen
Kaninchen-Gamma-Globulin G	Sigma	München
IGF-I-Antiserum (Kaninchen)	Mediagnost	Tübingen
IGF-II-Antiserum (Kaninchen)	Dr. Dr. Blum	Tübingen
IGFBP-2 Antiserum (Kaninchen)	Dr. Dr. Blum	Tübingen
IGFBP-3 Antiserum (Kaninchen)	Dr. Dr. Blum	Tübingen
Na ¹²⁵ I-Lösung	Amersham-Buchler	Braunschweig
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Merck	Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Merck	Darmstadt
NaCl	Merck	Darmstadt
NaN ₃	Merck	Darmstadt
o-Phosphorsäure	Merck	Darmstadt
Polyethylenglykol	Merck	Darmstadt
IGF-I, rekombinant, human	Kabi, Pharmacia	Stockholm
IGF-II, rekombinant, human	Kabi, Pharmacia	Stockholm
SDS	Serva	Heidelberg
Transferin, Mensch	Sigma	München
Triton X-100	Serva	Heidelberg
Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Serum	IBL	Hamburg

Säulen und Säulenmaterial:

Sephadex G-50	Pharmacia	Freiburg
Sephadex G-75	Pharmacia	Freiburg
Sephadex G-100	Pharmacia	Freiburg
PD 10 Einmalsäulen	Pharmacia	Freiburg

Verbrauchsmaterial:

Polysterolröhrchen 4.5 ml	Greiner	Nürtingen
Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg

Geräte:

Multicrystal-Gamma-Counter	Dr.Berthold	Wildbad
Rotix A	Hettich	Tuttlingen
Varifuge K	Heraeus Christ	Osterode
Dilutor, Mikrolab 900	Hamilton	Darmstadt
Vortex, Genie 2	Bender&Habein	Zürich
Laktatmessgerät YSI 2300		
PH-Messgerät 535 Multi Cal	WTW	Weilheim

Kit:

ACTIVETM Total-ALS-ELISA	DSL	Sinsheim
--------------------------	-----	----------

Nicht aufgeführte Verbrauchsmaterialien und Geräte entsprechen der normalen Laborausüstung.

Wunddrainagensystem:

Hochvakuum-System Drainobag®	B.Braun AG Melsungen
Redon-Drain®PVC	B.Braun AG Melsungen

Blutentnahmeröhrchen:

S-Monovette® 2,7ml KE (hämatolog. Bestimmungen), Inhalt: Kalium-EDTA, 1,6mg EDTA/ml Blut	Firma Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette® 5,5ml LH (Plasmagewinnung), Inhalt: Lithium Heparin, 15 I.U. Heparin/ml Blut	Firma Sarstedt, Nümbrecht

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Knapp, U. and M. Hansis, *Die Wunde: Pathophysiologie, Behandlung*, ed. Aufl. 1999, Stuttgart, New York: Thieme.
2. Robson, M.C.S., B.D. ,Heggens, J.P., *Wound Healing alterations caused by infection*. *Clinical Plastic Surgery*, 1990. **17**: p. 485-492.
3. Bennett, N.T. and G.S. Schultz, *Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors*. *Am J Surg*, 1993. **165**(6): p. 728-37.
4. Bennett, N.T. and G.S. Schultz, *Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing*. *Am J Surg*, 1993. **166**(1): p. 74-81.
5. Robson, M.C., *Growth factors as wound healing agents*. *Curr Opin Biotechnol*, 1991. **2**(6): p. 863-7.
6. Spencer, E.M., G. Skover, and T.K. Hunt, *Somatomedins: do they play a pivotal role in wound healing?* *Prog Clin Biol Res*, 1988. **266**: p. 103-16.
7. Declair, V., *The importance of growth factors in wound healing*. *Ostomy Wound Manage*, 1999. **45**(4): p. 64-8, 70-2, 74 passim.
8. Steenfos, H.H., *Growth factors and wound healing*. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 1994. **28**(2): p. 95-105.
9. Sporn, M.B. and A.B. Roberts, *Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer*. *J Clin Invest*, 1986. **78**(2): p. 329-32.
10. Knighton, D.R., *et al.*, *Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis*. *Ann Surg*, 1982. **196**(4): p. 379-88.
11. Knighton, D.R., B. Halliday, and T.K. Hunt, *Oxygen as an antibiotic. The effect of inspired oxygen on infection*. *Arch Surg*, 1984. **119**(2): p. 199-204.
12. Köveker, G.B. *Physiology of wound healing*. in *3rd Joint Meeting of the European Tissue Repair Society & The Wound Healing Society*. 1999. Bordeaux, France.
13. Leibovich, S.J. and R. Ross, *The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum*. *Am J Pathol*, 1975. **78**(1): p. 71-100.

14. Cohen, I.K., *The Biology of Wound Healing*, in *A supplement to Contemporary Surgery*. 2000: Dowden Health Media, Inc. p. 4-8.
15. Werner, S., *et al.*, *The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds*. *Science*, 1994. **266**(5186): p. 819-22.
16. Nanney, L.B. and L.E.J. King, *Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha*. *The molecular and cellular biology of wound repair*, ed. R.A. Clark. Vol. 2 nd. 1996, New York: Plenum Press. 171-194.
17. Hatz, R.A., *et al.*, *Wound Healing and Wound Management*. Berlin, Heidelberg. 1994: Springer.
18. Hunt, T.K., *et al.*, *Cellular control of repair*, in *Soft and Hard Tissue Repair: Biological and Clinical Aspects*, T.K. Hunt, *et al.*, Editors. 1984, Praeger Scientific Publications: New York. p. 3-19.
19. Wicke, C., *et al.*, *Effects of steroids and retinoids on wound healing*. *Arch Surg*, 2000. **135**(11): p. 1265-70.
20. Barbul, A. and W.A. Purtil, *Nutrition in wound healing*. *Clin Dermatol*, 1994. **12**(1): p. 133-40.
21. Barbul, A. and M.C. Regan, *Immune involvement in wound healing*. *Otolaryngol Clin North Am*, 1995. **28**(5): p. 955-68.
22. *Compendium of Health Care Statistics London: Office of Health Economics.*, . 1992.
23. Lawrence, W.T., *Clinical management of nonhealing wounds*, in *Wound Healing Biochemical & Clinical Aspects*, I.K. Cohen, R.F. Diegelmann, and W.J. Lindbald, Editors. 1992, W.B. Saunders Company: Philadelphia. p. 541-561.
24. Mast, B.A., *The Skin*, in *Wound Healing Biochemical & Clinical Aspects*, I.K. Cohen, R.F. Diegelmann, and W.J. Lindbald, Editors. 1992, W.B. Saunders Company: Philadelphia. p. 344--355.
25. Hunt, T.K., B. Zederfeldt, and T.K. Goldstick, *Oxygen and healing*. *Am J Surg*, 1969. **118**(4): p. 521-5.
26. Kurz, A. and D.L. Sessler, *Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. Study of Wound Infection and Temperature*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(19): p. 1209-15.
27. Cohen, B.J., D. Danon, and G.S. Roth, *Wound repair in mice as influenced by age and antimacrophage serum [published erratum*

- appears in J Gerontol 1987 Sep;42(5):481]. J Gerontol, 1987. 42(3): p. 295-301.*
28. Danon, D., M.A. Kowatch, and G.S. Roth, *Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(6): p. 2018-20.
 29. Ashcroft, G.S., M.A. Horan, and M.W. Ferguson, *Aging alters the inflammatory and endothelial cell adhesion molecule profiles during human cutaneous wound healing*. Lab Invest, 1998. **78**(1): p. 47-58.
 30. Bruce, S.A. and S.F. Deamond, *Longitudinal study of in vivo wound repair and in vitro cellular senescence of dermal fibroblasts*. Exp Gerontol, 1991. **26**(1): p. 17-27.
 31. Swift, M.E., H.K. Kleinman, and L.A. DiPietro, *Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice*. Lab Invest, 1999. **79**(12): p. 1479-87.
 32. Ashcroft, G.S., M.A. Horan, and M.W. Ferguson, *Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in a murine incisional wound healing model*. J Invest Dermatol, 1997. **108**(4): p. 430-7.
 33. Yamaura, H. and T. Matsuzawa, *Decrease in capillary growth during aging*. Exp Gerontol, 1980. **15**(2): p. 145-50.
 34. Sussman, M.D., *Aging of connective tissue: physical properties of healing wounds in young and old rats*. Am J Physiol, 1973. **224**(5): p. 1167-71.
 35. Plisko, A. and B.A. Gilchrest, *Growth factor responsiveness of cultured human fibroblasts declines with age*. J Gerontol, 1983. **38**(5): p. 513-8.
 36. Schroeder, F., I. Goetz, and E. Roberts, *Age-related alterations in cultured human fibroblast membrane structure and function*. Mech Ageing Dev, 1984. **25**(3): p. 365-89.
 37. Gilchrest, B.A., *Prior chronic sun exposure decreases the lifespan of human skin fibroblasts in vitro*. J Gerontol, 1980. **35**(4): p. 537-41.
 38. West, M.D., *The cellular and molecular biology of skin aging*. Arch Dermatol, 1994. **130**(1): p. 87-95.
 39. Gilchrest, B.A., *A review of skin ageing and its medical therapy*. Br J Dermatol, 1996. **135**(6): p. 867-75.

40. Yaar, M., *Skin aging: observations at the cellular and molecular levels*. *Isr J Med Sci*, 1996. **32**(11): p. 1053-8.
41. Holt, D.R., *et al.*, *Effect of age on wound healing in healthy human beings*. *Surgery*, 1992. **112**(2): p. 293-7; discussion 297-8.
42. Gilchrest, B.A. and M. Yaar, *Ageing and photoageing of the skin: observations at the cellular and molecular level*. *Br J Dermatol*, 1992. **127 Suppl 41**: p. 25-30.
43. DuNuoy, P. and A. Carrell, *Cicatrization of wounds*. *J Exper Med*, 1921. **34**: p. 339-348.
44. Ostenreich, N. and V.J. Selmanowitz, *Levels of biological functions with aging*. *Trans NY Acad Sci*, 1969. **31**: p. 992-1012.
45. Sandblom, P., P. Peterson, and A. Muren, *Determination of tensile strength of healing wound as a clinical test*. *Acta Chir Scand*, 1953. **105**: p. 252-257.
46. Ashcroft, G.S., M.A. Horan, and M.W. Ferguson, *The effects of ageing on wound healing: immunolocalisation of growth factors and their receptors in a murine incisional model*. *J Anat*, 1997. **190**(Pt 3): p. 351-65.
47. Daughaday, W.H. and P. Rotwein, *Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations*. *Endocr Rev*, 1989. **10**(1): p. 68-91.
48. LeRoith, D., *et al.*, *The role of the insulin-like growth factor-I receptor in cancer*. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. **766**: p. 402-8.
49. Jones, J.I. and D.R. Clemmons, *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions*. *Endocr Rev*, 1995. **16**(1): p. 3-34.
50. Irminger, J.C., *et al.*, *Tissue-specific expression of insulin-like growth factor II mRNAs with distinct 5' untranslated regions [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1988 Feb;85(4):1070]*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(18): p. 6330-4.
51. Lee, W.H., *et al.*, *Measurement of insulin-like growth factor-II in physiological fluids and tissues. II. Extraction quantification in rat tissues*. *Endocrinology*, 1991. **128**(2): p. 815-22.
52. O'Dell, S.D. and I.N. Day, *Insulin-like growth factor II (IGF-II)*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998. **30**(7): p. 767-71.

53. Clemmons, D.R., *Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions*. Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**(1): p. 45-62.
54. Baxter, R.C. and J.L. Martin, *Binding proteins for the insulin-like growth factors: structure, regulation and function*. Prog Growth Factor Res, 1989. **1**(1): p. 49-68.
55. Baxter, R.C., *Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins: the role of serum IGFBPs in regulating IGF availability*. Acta Paediatr Scand Suppl, 1991. **372**: p. 107-14.
56. Baxter, R.C., *Characterization of the acid-labile subunit of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex*. J Clin Endocrinol Metab, 1988. **67**(2): p. 265-72.
57. Baxter, R.C., *Circulating levels and molecular distribution of the acid-labile (alpha) subunit of the high molecular weight insulin-like growth factor-binding protein complex*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. **70**(5): p. 1347-53.
58. Barreca, A., et al., *Effect of the acid-labile subunit on the binding of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 to [125I]IGF-I*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(4): p. 1318-24.
59. Guler, H.P., et al., *Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates*. Acta Endocrinol (Copenh), 1989. **121**(6): p. 753-8.
60. Ranke, M.B. and M. Elmlinger, *Functional role of insulin-like growth factor binding proteins*. Horm Res, 1997. **48**(Suppl 4): p. 9-15.
61. Rudman, D., et al., *Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity*. J Clin Invest, 1981. **67**(5): p. 1361-9.
62. Corpas, E., S.M. Harman, and M.R. Blackman, *Human growth hormone and human aging*. Endocr Rev, 1993. **14**(1): p. 20-39.
63. Mueller, R.V., et al., *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors. The Role of IGF-I and IGFBP-3 in Wound Healing*, ed. E.M. Spencer. 1991: Elsevier Science Publishing Co.,Inc.
64. Goldstein, R.H., et al., *Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human lung fibroblasts*. Endocrinology, 1989. **124**(2): p. 964-70.

65. Conover, C.A., et al., *Insulin-like growth factor I/somatomedin-C (IGF-I/SM-C) and glucocorticoids synergistically regulate mitosis in competent human fibroblasts*. J Cell Physiol, 1983. **116**(2): p. 191-7.
66. Steenfos, H., E.M. Spencer, and T.K. Hunt, *Insulin-like Growth Factor I has a major role in wound healing*. Surg Forum, 1989: p. 68-71.
67. King, G.L., et al., *Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulinlike growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta*. J Clin Invest, 1985. **75**(3): p. 1028-36.
68. Nagaoka, I., B.C. Trapnell, and R.G. Crystal, *Regulation of insulin-like growth factor I gene expression in the human macrophage-like cell line U937*. J Clin Invest, 1990. **85**(2): p. 448-55.
69. Clemmons, D.R. and D.S. Shaw, *Variables controlling somatomedin production by cultured human fibroblasts*. J Cell Physiol, 1983. **115**(2): p. 137-42.
70. Spencer, E.M., A. Tokunaga, and T.K. Hunt, *Insulin-like growth factor binding protein-3 is present in the alpha-granules of platelets*. Endocrinology, 1993. **132**(3): p. 996-1001.
71. Taylor, W.R., R.M. Nerem, and R.W. Alexander, *Polarized secretion of IGF-I and IGF-I binding protein activity by cultured aortic endothelial cells*. J Cell Physiol, 1993. **154**(1): p. 139-42.
72. Warren, R.S., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29483-8.
73. Punghia, R.S., et al., *Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I*. Diabetes, 1997. **46**(10): p. 1619-26.
74. Sommer, A., C. Maack, and S. Spratt, *Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors*. Molecular genetics and actions of recombinant insulin-like growth factor binding protein-3, ed. e. Spencer EM. 1991, New York: NY: Elsevier Science Publishing Co Inc. 715-728.
75. Koshizuka, S., et al., *The beneficial effects of recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) on wound healing in severely wounded senescent mice*. Surg Today, 1997. **27**(10): p. 946-52.
76. Herndon, D.N., et al., *Characterization of growth hormone enhanced donor site healing in patients with large cutaneous burns*. Ann Surg, 1995. **221**(6): p. 649-56; discussion 656-9.

77. Papadakis, M.A., *et al.*, *Growth hormone replacement in healthy older men improves body composition but not functional ability [see comments]*. *Ann Intern Med*, 1996. **124**(8): p. 708-16.
78. Blum, W.F., M.B. Ranke, and J.R. Bierich, *A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I*. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1988. **118**(3): p. 374-80.
79. Daughaday, W.H., I.K. Mariz, and S.L. Blethen, *Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1980. **51**(4): p. 781-8.
80. Elmlinger, M.W., *et al.*, *Insulin-like growth factor binding protein 2 is differentially expressed in leukaemic B- and T-cell lines*. *Growth Regul*, 1996. **6**(3): p. 152-7.
81. Hunter, W.M. and F.C. Greenwood, *Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity*. *Nature*, 1962. **194**: p. 495-496.
82. Blum, W.F. and M.B. Ranke, *Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) with special reference to IGFBP-3*. *Acta Paediatr Scand Suppl*, 1990. **367**: p. 55-62.
83. Bradford, M., *A rapid and sensitive assay for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-254.
84. Maile, L.A. and J.M. Holly, *Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation*. *Growth Horm IGF Res*, 1999. **9**(2): p. 85-95.
85. Robertson, J.G., D.A. Belford, and F.J. Ballard, *Clearance of IGFs and insulin from wounds: effect of IGF-binding protein interactions*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(4 Pt 1): p. E663-71.
86. Blum, W.F., *Insulin-like growth factor-binding protein 3: Entwicklung eines Radioimmunoassays und Untersuchungen zur klinischen Bedeutung*. Habilitationsschrift - Universität Tübingen, 1993.
87. Folkman, J. and P.A. D'Amore, *Blood vessel formation: what is its molecular basis?* *Cell*, 1996. **87**(7): p. 1153-5.
88. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(10): p. 738-46.

89. Martin, J.L. and R.C. Baxter, *IGF binding proteins as modulators of IGF action*. Totowa, NJ: Humana Press, Inc.; 2000: 227-255, 2000.
90. Tarnuzzer, R.W. and G.S. Schultz, *Biochemical analysis of acute and chronic wound environments*. Wound Repair and Regeneration, 1996. **4**: 321-6.
91. Goodson, W.H., 3rd and T.K. Hunt, *Wound healing in experimental diabetes mellitus: importance of early insulin therapy*. Surg Forum, 1978. **29**: p. 95-8.
92. Salmela, K., *Comparison of the effects of methylprednisolone and hydrocortisone on granulation tissue development. An experimental study in rat*. Scand J Plast Reconstr Surg, 1981. **15**(2): p. 87-91.
93. Demling, R.H., *Comparison of the anabolic effects and complications of human growth hormone and the testosterone analog, oxandrolone, after severe burn injury*. Burns, 1999. **25**(3): p. 215-21.
94. Herndon, D. N., et al., *Muscle protein catabolism after severe burn: effects of IGF-1/IGFBP-3 treatment*, Ann Surg 1999. 229 (5): p.713-20
95. Ponzer, S., et. al., *Nutritional status, insulin-like growth factor-1 and quality of life in elderly women with hip fractures*, Clin Nutr. 1999, 18: p.241-6
96. Schwander, J., et al., *The regulation of the mRNA of an insulin-like growth factor binding protein (IBP-2) in the rat*, in *Insulin-like Growth factor Binding Proteins*, I.D.S.H.R. (eds), Editor. 1989, Elsevier Science Publisher: Amsterdam. p. 125-131.
97. Feyen, J.H., et al., *Recombinant human [Cys281]insulin-like growth factor-binding protein 2 inhibits both basal and insulin-like growth factor I-stimulated proliferation and collagen synthesis in fetal rat calvariae*. J Biol Chem, 1991. **266**(29): p. 19469-74.
98. Ross, M., et al., *Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins inhibit the biological activities of IGF-1 and IGF-2 but not des-(1-3)-IGF-1*. Biochem J, 1989. **258**(1): p. 267-72.
99. Davenport, M.L., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis is induced after elective surgery*. J Clin Endocrinol Metab, 1992. **75**(2): p. 590-5.
100. Labarta, J.I., et al., *Immunoblot studies of the acid-labile subunit (ALS) in biological fluids, normal human serum and in children with GH deficiency and GH receptor deficiency before and after long-term therapy with GH or IGF-I respectively*. Clin Endocrinol (Oxf), 1997. **47**(6): p. 657-66.

101. Khosravi, M.J., *et al.*, *Acid-labile subunit of human insulin-like growth factor-binding protein complex: measurement, molecular, and clinical evaluation [see comments]*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. **82**(12): p. 3944-51.
102. Isley, W.L., L.E. Underwood, and D.R. Clemmons, *Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in humans*. *J Clin Invest*, 1983. **71**(2): p. 175-82.
103. Yu, H., *et al.*, *Insulin-Like Growth Factors (IGF-I, Free IGF-I, and IGF-II) and Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in Blood Circulation*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1999. **13**: p. 166-172.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Becker und Herrn Prof. Dr. Hunt (University of California, San Francisco) möchte ich für die Überlassung des Themas danken. Bei Frau Dr. Wicke und Frau Dr. Wagner, unter deren Anleitung ich die Doktorarbeit durchgeführt habe, möchte ich für die hervorragende Betreuung danken. Für die Möglichkeit, die Patienten aus der BG-Unfallklinik Tübingen zu rekrutieren, bedanke ich mich bei Herrn Prof. Weise und Herrn Dr. Müller. Herrn Prof. Ranke und Herrn Dr. Elmlinger danke ich für die Möglichkeit, in ihrem Labor die Messungen durchzuführen und die anschließende Diskussion der Ergebnisse. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Weber für die Anleitung im Labor und dem gesamten endokrinologischen Laborteam der Kinderklinik Tübingen. Bei Herrn Dr. Blumenstock bedanke ich mich für die statistische Beratung.

LEBENS LAUF

ODILO TRABOLD

geboren am 12. April 1975 in Stuttgart

1986-1995	Dillmann-Gymnasium Stuttgart
8/95-9/96	Zivildienst: Diakonissen-Krankenhaus Stuttgart
10/96-9/97	Studium der Humanmedizin an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
10/97-5/03	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
8/98	Physikum
3/99-4/99	Famulatur: Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik, Tübingen
9/99-10/99	Famulatur: Klinik für Anästhesiologie & operative Intensivmedizin, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin
3/00	1. Staatsexamen
9/00-4/01	University of California, San Francisco (Academic Year / Biomedical Science Exchange Program)
1/01-2/01	Famulatur: Department of Surgery, Kaiser Permanente Hospital, San Francisco
3/02	2. Staatsexamen
5/02-3/02	Praktisches Jahr
5/02-8/02	Universitäts-Hautklinik, Abteilung für Dermatologie, Universität Tübingen
8/02-11/02	Innere Medizin, Spital Zimmerberg, Wädenswil, Schweiz
12/02-1/03 2/02-3/02	Departement Chirurgie, Universität Zürich, Schweiz Department of Surgery, Concord Hospital, University of Sydney
27.05.2003	3. Staatsexamen