

**Aus der Universitätsklinik für  
Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer**

**Stimulation der Wundheilung durch wiederholte lokale  
Applikation von Insulin-like growth factor-I (IGF-I) unter dem  
Aspekt unterschiedlicher Applikationsformen**

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

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

**vorgelegt von  
Sebastian Alexander Daniel Haack  
aus Stuttgart**

**2008**

Dekan: Professor Dr. I. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Coerper

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Köveker

**Einleitung:** Die Wirksamkeit einer lokalen Therapie mit Insulin-like growth factor-I (IGF-I) zur Stimulation der kutanen Wundheilung scheint erheblich vom verwendeten Trägersystem und der damit verbundenen Applikationskinetik abhängig zu sein. Bisher konnte bei lokaler Anwendung nur für die Kombination aus IGF-I und einem seiner Bindungsproteine ein positiver Effekt nachgewiesen werden, während hingegen IGF-I alleine nur in einer unphysiologisch hohen Dosierung eine beschleunigte Heilung induzieren konnte. Wurde IGF-I als Monosubstanz jedoch kontinuierlich lokal appliziert, war wiederum ein schnellerer Wundverschluß zu beobachten. Eine wiederholte lokale Verabreichung von IGF-I ist bisher jedoch noch nicht beforscht worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, im Tiermodell den Effekt von wiederholt lokal appliziertem IGF-I auf die kutane Wundheilung unter dem Aspekt unterschiedlicher Applikationsformen zu untersuchen.

**Material und Methoden:** Es wurden dabei zwei verschiedene Trägersysteme, nämlich ein Hydrogelverband und ein Methylzellulose-Gel, gewählt. Bei 40 männlichen Sprague-Dawley Ratten wurden 8 mm durchmessende Vollhautdefekte am Rücken induziert. Diese Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt: die eine Gruppe erhielt zur Induktion einer verzögerten Heilung subkutan ein Depot-Steroidpräparat (Depo-Medrate, Pharmacia Upjohn), während die andere Gruppe die „gesunde“ Kontrolle darstellte. Die Wunden wurden dann jeweils mit einem Standard-Hydrogelverband (Hydrosorb, Hartmann), mit IGF-I gelöst in 0,2% Methylzellulose-Gel (IGF-I Gel) oder mit einem IGF-I haltigen Hydrogelverband (IGF-I Verband) behandelt. Bei allen Tieren wurden tägliche Verbandswechsel durchgeführt. Nach 7 Tagen erfolgte die Tötung der Tiere, die fotoplanimetrische Vermessung und die anschließende histologische Aufarbeitung.

**Ergebnisse:** Bei gesunden Tieren, konnte der IGF-I Verband keine Verbesserung der Wundheilung, gemessen als Verkleinerung der Wundgröße, erbringen ( $p=0,84$ ). Bei „Kortisontieren“ hingegen erbrachte die Applikation von IGF-I eine signifikante Verbesserung der Wundheilung ( $p=0,0001$ ). Sowohl der IGF-I Verband als auch IGF-I Gel waren in der Lage, die Abheilung zu beschleunigen, wobei der IGF-I Verband noch effektiver als IGF-I Gel war. Die

Zellproliferation und die Bildung von neuen Gefäßen waren jedoch nur durch den IGF-I Verband gesteigert.

**Zusammenfassung:** Unsere Daten zeigen, dass die wiederholte lokale Anwendung von IGF-I den heilungsverzögernden Effekt von Kortison auf die kutane Wundheilung neutralisieren kann. Der Wirkmechanismus scheint dabei jedoch wesentlich von der verwendeten Trägersubstanz abzuhängen.

Meinen Eltern

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>4</b>
1.1	Physiologische Wundheilung .....	4
1.1.1	Entzündungsphase .....	4
1.1.2	Proliferationsphase .....	7
1.1.3	Reparative Phase .....	9
1.2	Insulin-like Growth Factors I und II (IGF-I und -II).....	10
1.2.1	Biologie und Physiologie von IGF-I und -II.....	11
1.2.2	Die IGF-Rezeptoren.....	12
1.2.3	Insulin-like Growth Factor Bindungsproteine (IGFBPs).....	13
1.2.4	Expression und Wirkungen in der Dermis.....	14
1.2.5	Expression und Wirkungen in der Epidermis .....	15
1.2.6	Natürliche Effekte der IGFs während der Wundheilung .....	17
1.2.7	Therapeutische Effekte der IGFs während der Wundheilung .....	18
1.3	Wunden und Wundheilungsstörungen .....	20
1.3.1	Chronische Wunden .....	20
1.3.2	Ätiologie der Wundheilungsstörungen .....	21
1.4	Fragestellung .....	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1	Der IGF-I Verband.....	24
2.1.1	Aufbau des IGF-I Verbandes .....	24
2.1.2	Quantifizierung der IGF-I Freisetzung.....	25
2.1.3	IGF-I in Methylzellulose gelöst.....	26
2.2	Tiermaterial .....	26
2.2.1	Versuchstiergruppen.....	26
2.3	Versuchsaufbau .....	27
2.3.1	Wundinduktion .....	27
2.3.2	Kortisonapplikation.....	27

## Inhaltsverzeichnis

---

2.3.3	Das Befestigungssystem .....	27
2.3.4	Verbandswechsel.....	28
2.3.5	Probenentnahme .....	29
2.4	Histologische Aufarbeitung .....	29
2.4.1	Vorbehandlung der Objektträger.....	30
2.4.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	30
2.4.2	Immunhistochemie.....	30
2.5	Auswertung .....	32
2.5.1	Wundgrößen .....	32
2.5.2	Immunhistochemie.....	32
2.5.3	Systemischer IGF-I Spiegel .....	32
2.5.4	Statistik .....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
3.1	Wundgrößen .....	34
3.2	PCNA-Färbung .....	37
3.3	SMA-Färbung.....	40
3.4	Systemischer IGF-Spiegel .....	43
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>45</b>
4.1	Wundgrößen .....	45
4.2	Proliferationsverhalten .....	49
4.3	Angioneogenese .....	50
4.4	Systemischer IGF-I Spiegel .....	51
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>53</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>74</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Physiologische Wundheilung

Die Wundheilung beschreibt die Fähigkeit des Organismus Defekte, die an einem oder mehreren Organen entstanden sind, durch Reparation und Regeneration zu verschließen. Je nach Ausmaß und Beschaffenheit des Defektes kommt es zur Heilung per primam intentionem mit minimaler Narbenbildung, bei z.B. primärer Hautnaht, oder zur Heilung per secundam intentionem mit Ausbildung einer breiten fibrotischen Narbe, z.B. bei Defektwunden.

Der physiologische Ablauf der kutanen Wundheilung kann in drei sich gegenseitig überlappende Phasen eingeteilt werden:

1. Entzündungsphase (1. bis 3. Tag)
2. Proliferative Phase (4. bis 7. Tag)
3. Reparative Phase (8. bis 12 Tag)

### 1.1.1 Entzündungsphase

Die Entzündungsphase kann in einen frühen exsudativen und einen späten resorptiven Abschnitt unterteilt werden. Der Beginn der Wundheilung wird durch die Verletzung der Haut eingeleitet. Dabei kommt es zur Zerstörung zellulärer Bestandteile der Kutis, der darunterliegenden Gewebeschichten und zur Verletzung von Blutgefäßen. Durch den Kontakt von ausgetretenen Blutbestandteilen aus dem intravasalen Raum mit subendotheliale Kollagen, dem von geschädigten Zellen freigesetzten tissue procoagulant factor, dem von Willebrand Faktor, den von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen exprimierten surface membrane coagulation factors und Phospholipiden wird die Gerinnungskaskade angestoßen.<sup>53</sup> Die Thrombozytenaktivierung und

-aggregation werden durch den Kontakt mit subendotheliale Kollagen und dem von Willebrand Faktor initiiert.

Zusätzlich zur Gerinnungsaktivierung wird die Komplementkaskade ausgelöst,<sup>71</sup> außerdem wird Bradykinin aus den zerstörten Zellen der Wundumgebung freigesetzt. C3a, C5a<sup>49</sup> und Bradykinin<sup>141,94</sup> steigern die Permeabilität unverletzter Gefäße. Dadurch ist der Austritt von Plasmaproteinen ins Interstitium möglich. Im Wundbereich bildet sich ein intra- und extravasaler Thrombus. Dieser wird durch verschiedene Mechanismen auf das geschädigte Wundgebiet begrenzt. So hemmt freigesetztes Prostacyclin die Thrombozytenaggregation,<sup>92</sup> Thrombin wird in seiner Funktion durch Antithrombin gehemmt,<sup>124</sup> die Gerinnungsfaktoren V und VIII werden durch Protein C abgebaut<sup>74</sup> und die Thrombolysen wird durch freigesetzten Plasminogenaktivator in Gang gesetzt.<sup>84</sup> Zum einen führt der gebildete Thrombus zur Hämostase, zum anderen dient er, bestehend aus Fibrin, Fibronectin, Vitronectin, von Willebrand Faktor und Thrombospondin als provisorische Matrix für einwandernde Zellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten,<sup>24,78</sup> Fibroblasten<sup>62,73</sup> und endotheliale Zellen.<sup>27</sup>

Die aktivierten Thrombozyten setzen aus ihren Granula gerinnungsaktive Substanzen wie ADP, Serotonin, Calciumionen und Pyrophosphate, sowie von Willebrand Faktor, Thrombospondin, Fibrinogen und Fibronectin frei. Des Weiteren werden aus den Alpha-Granula Wachstumsfaktoren wie TGF- alpha,<sup>39</sup> TGF-beta,<sup>122</sup> PDGF<sup>113</sup> und EGF<sup>64,13</sup> freigesetzt.

Schließlich kommt es zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten aus dem peripheren Blut und dem umliegenden Gewebe. Beide Zelltypen werden durch eine Vielzahl chemotaktischer Substanzen wie Fibrinolyseprodukte, C5a, Leukotrien B4, bakterielle Formyl-Methionyl-Peptide und thrombozytäre Wachstumsfaktoren, PDGF und Platelet factor 4, chemotaktisch in den Wundbereich geleitet.

In der frühen Entzündungsphase überwiegt die Zahl der neutrophilen Granulozyten. Ihre Aufgabe ist die Elimination von Bakterien und anderer Fremdkörper. Dazu phagozytieren die neutrophilen Granulozyten die pathogenen Organismen zunächst, um sie dann durch die in den Granula

enthaltenen Proteine und Enzyme zu zerstören. Während dieser aktiven Phase werden Enzyme wie Myeloperoxidase, Lysozym, Kollagenase und Histaminase und Sauerstoffradikale freigesetzt.

Bei Ausbleiben einer größeren Wundkontamination beginnt die Zahl der neutrophilen Granulozyten nach etwa 3-4 Tagen zu sinken. Nun überwiegt die Zahl der im unverletzten Gewebe nur spärlich vorkommenden, sich aus Monozyten entwickelten Gewebsmakrophagen im Wundgebiet. Dies stellt den Beginn der späten Entzündungsphase dar. Zusätzlich zu den oben genannten chemotaktischen Substanzen werden Monozyten durch Thrombin-, Kollagen-, Elastin- und Fibronectinfragmente in das Wundgebiet gezogen.<sup>25</sup> Die im Blut zirkulierenden Monozyten werden wie die neutrophilen Granulozyten stimuliert, im Wundgebiet an das Gefäßendothel zu binden und anschließend die Gefäßwand zu durchwandern.<sup>44</sup> Die aus eingewanderten Monozyten entstandenen Makrophagen phagozytieren wie die neutrophilen Granulozyten pathogene Organismen und säubern die Wundumgebung von nekrotischen Gewebeteilen und Zelltrümmern. Hierzu setzen sie u.a.  $H_2O_2$ ,  $O_2\cdot$  und NO frei. Im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten besitzen Makrophagen die Fähigkeit, benötigte Enzyme kontinuierlich selbst zu produzieren und länger im Wundgebiet zu verweilen.<sup>23</sup>

Makrophagen spielen durch weitere Funktionen eine Schlüsselrolle im Übergang von der Entzündungs- zur Proliferationsphase. So produzieren Makrophagen Prostaglandine. Diese besitzen einen stark vasodilatatorischen Effekt und beeinflussen die Permeabilität der kleinen Gefäße. Außerdem produzieren Makrophagen für die Bildung des Granulationsgewebes wichtige Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF- $\beta$  und FGF. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Angiogenese der frühen Heilungsphase mit der Anwesenheit von Makrophagen korreliert.<sup>23</sup>

### 1.1.2 Proliferationsphase

In dieser Phase wird das Granulationsgewebe gebildet. Während der Entzündungsphase wird eine Vielzahl von chemotaktischen und mitogenen Faktoren freigesetzt, die Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen in das Wundgebiet ziehen und zum Proliferieren anregen. Granulationsgewebe ist ein Begriff aus der makroskopischen Pathologie und beschreibt das durch die große Menge an Kapillarschlingen „körnig“ wirkende Regenerationsgewebe. Diese hohe Gefäßdichte lässt gesundes Granulationsgewebe rot erscheinen.

Granulationsgewebe besteht aus einem lockeren bindegewebigen Gerüst aus Fibrin, Fibronectin, Kollagen und Hyaluronsäure, durchsetzt von dichten Fibroblasten- und Makrophagenpopulationen und Kapillarschlingen.<sup>25</sup>

Die Formierung des Granulationsgewebes beginnt mit der Migration und Proliferation von Fibroblasten aus der Wundumgebung.<sup>64</sup> Die Proliferation wird durch mitogene Faktoren wie z.B. FGF, IGF-I und PDGF gesteuert.<sup>63,72</sup>

Während der Migration in den Wundraum werden der Golgi-Apparat und die endoplasmatischen Retikula in den perinukleären Bereich zurückgezogen. Im zytoplasmatischen Rand bilden sich Aktinfilamente und formen Lamellopodien. Sobald die Fibroblasten ihr Ziel in der Wunde erreicht haben durchlaufen sie eine phänotypische Veränderung in spezifische Myofibroblasten. Nun produzieren sie eine große Menge extrazellulärer Matrix und richten sich parallel zur Wundoberfläche aus. Nach Ausbildung einer kollagenreichen Matrix lässt die Kollagensynthese nach. Die Myofibroblasten haben nun über gebündelte Aktinfilamente kontraktile Eigenschaften und erzeugen nun eine Zytoskelett vermittelte Spannung auf das Granulationsgewebe. Somit werden die Wundränder zusammengezogen. Wahrscheinlich werden diese Vorgänge moduliert durch Zytokine wie TGF-beta, PDGF sowie durch extrazelluläre Matrixsubstanzen.<sup>136</sup> Nach dem Wundschluß gehen die Myofibroblasten durch Apoptose zu Grunde und die Wundspannung nimmt ab.<sup>40</sup>

Zeitgleich zu den verschiedenen Fibroblastenaktivitäten beeinflusst die Neovaskularisation die Proliferationsphase entscheidend. Die Bildung neuer Gefäße ist essentiell für die Blutversorgung der heilenden, metabolisch aktiven

Wunde. Die Proliferation und Migration der Endothelzellen scheinen von Hypoxie, erhöhten Laktatkonzentrationen, Heparin, dem Fibronektin Gehalt der extrazellulären Matrix<sup>26</sup> und Wachstumsfaktoren wie FGF<sup>51</sup> und PDGF<sup>132</sup> stimuliert zu werden. Nach ein bis zwei Tagen beobachtet man am Wundrand von intakten Kapillaren aus migrierende Endothelzellen. Dazu werden die Endothelzellen durch basic-FGF, TGF-beta1, IL-1 oder TNF-alfa aktiviert und sezernieren daraufhin Proteasen, die es ihnen ermöglichen die extrazelluläre Matrix aufzuspalten und entlang eines chemotaktischen Gradienten, verursacht durch erhöhte Konzentrationen von z.B. PDGF und basic-FGF, ins Granulationsgewebe einzuwandern. Gleichzeitig wird eine gesteigerte Proliferationsrate der am Ausgangsgefäß verbliebenen Endothelzellen beobachtet. Aus diesen Endothelzellen bilden sich neue Kapillarschlingen, die wiederum Schlingen in Richtung des Wundraumes aussenden, bis dieser komplett durch den Kapillarplexus gefüllt ist.<sup>25</sup>

Die Reepithelialisierung beginnt innerhalb weniger Stunden nach Verletzung mit der Bewegung von Keratinozyten aus der Epidermis des Wundrandes über eine provisorische Matrix, hauptsächlich bestehend aus Fibrin und Fibronectin, zum Defekt hin. In diesem frühen Stadium der Epithelialisierung tragen die Keratinozyten durch Sezernierung von GM-CSF, IL-1, TNF-alpha und TGF-beta zum Entzündungsgeschehen bei. Sowohl das frischgebildete Epithel als auch das Granulationsgewebe stellen eine neue Gewebsgeneration dar.<sup>25</sup>

Besteht die Wunde aus einem primär nicht verschlossenen Vollhautdefekt ist der Wundrand die einzige Quelle der einwandernden Keratinozyten. Bei Wunden, die nicht bis in das subkutane Fettgewebe reichen, kann die Migration von mit Haarfollikeln assoziierten Keratinozyten ausgehen. Dies führt gegenüber Vollhautdefekten zu einer schnelleren Reepithelialisierung.

Während der Migration durchlaufen die Epithelzellen ähnlich den Fibroblasten eine Änderung ihres Phänotyps. Die intrazellulären Tonofilamente nehmen ab, die interzellulären Desmosomen lösen sich, und es formen sich Aktinfilamente im peripheren Zytoplasma.<sup>54</sup> Die Epithelzellen am Wundrand verlieren ihre baso-apikale Polarität und dehnen Pseudopodien in Richtung des Wundraumes aus. Durch diese Veränderungen ergeben sich Mobilität und Motilität der

Zellen.<sup>27</sup> Ein bis zwei Tage nach der Verletzung beginnen die Zellen des ursprünglichen Wundrandes zu proliferieren. Auslöser hierfür könnte die lokale Freisetzung von Zytokinen durch Thrombozyten, Makrophagen und durch epidermale Zellen selbst sein. Eine Rolle scheinen dabei EGF,<sup>21</sup> TGF-alpha,<sup>120</sup> basic-FGF<sup>98</sup> und KGF<sup>50</sup> zu spielen.

Bei der Luft ausgesetzten Wunde bildet sich über dem Granulationsgewebe eine Schicht (Schorf) bestehend aus getrocknetem Wundexsudat und abgestorbenen Zellen. Diese Schicht bedeutet zwar einen gewissen Schutz für die Wunde, gleichzeitig stellt sie aber auch eine Barriere für die Migration der Keratinozyten dar, so dass diese sich unter dem Schorf hindurch arbeiten müssen, um die Neoepidermis zu bilden. Die Verhinderung dieser Schorfbildung durch Aufrechterhaltung eines optimal feuchten Wundmilieus beschleunigt daher die Epithelialisierung.<sup>138</sup> Diese Beobachtung hat zur Entwicklung der aktuellen Verbandsmaterialien geführt, die durch einen bestimmten Grad an Wasserdampfdurchlässigkeit einerseits ein Austrocknen der Wunde und andererseits eine Übersättigung der Wunde mit Feuchtigkeit und anschließender Mazeration des Gewebes verhindern.

### 1.1.3 Die reparative Phase

Das Hauptmerkmal der reparativen Phase ist die Ablagerung von Kollagen in die Wunde. Aus klinischer Sicht ist diese die wichtigste Heilungsphase, da die Rate, Qualität und absolute Menge der Matrixablagerung die Festigkeit der Narbe bestimmen. Viele Wundheilungsdefizite werden erst sekundär klinisch durch zu geringe Kollagenablagerung manifest, wobei unterschiedliche Ursachen zu Grunde liegen können.

Die Veränderungen der Wundmatrixzusammensetzung verlaufen in einer bestimmten Zeitabfolge. Anfangs besteht die Wundmatrix hauptsächlich aus Fibrin und Fibronectin, die während der Hämostasephase von Makrophagen produziert werden.<sup>77</sup> Ein weiteres früh erscheinendes Protein ist auch das Thrombospondin-1. Dann werden Glykosaminoglykane, Proteoglykane und

weitere Proteine wie z.B. das SPARC (secreted proteine acid rich in cystem) synthetisiert, die ihrerseits die weitere Matrixablagerung und Matrixumbau fördern.<sup>5,107</sup> Anschließend wird Kollagen das vorherrschende Protein des Matrixgewebes.<sup>14</sup>

Die intakte Haut besteht vorwiegend aus Kollagen Typ I (80-90%) und Typ II (10-20%). Im Granulationsgewebe ist das Vorkommen von Kollagen Typ III erhöht, wohingegen es in einer älteren Narbe erniedrigt ist.<sup>4,90</sup> Zusätzlich ließ sich nachweisen, dass sich vorübergehend auch Kollagen Typ IV in der Wundmatrix finden lässt. Die Kollagensynthese ist über einen Zeitraum von mindestens 4 bis 5 Wochen nach Verletzung erhöht.<sup>6,42,87,118</sup>

Auch die Struktur der Wundmatrix verändert sich im Verlauf des Heilungsprozesses. Normale Haut weist eine korbhenkelartige Kollagenstruktur auf, während in der Narbe die Kollagenfasern sich dünner darstellen und parallel zur Haut ausgerichtet sind. Diese dünnen Fasern werden nach und nach dicker und richten sich nach den Hautspannungslinien aus. Schließlich führen diese Veränderungen zu einer höheren Narbenreißfestigkeit.<sup>45</sup> Trotz einer langen reparativen Umwandlungsphase erreichen die Kollagenfasern in Narbengewebe nie den Organisationsgrad wie in intakter Haut. Folglich erlangt auch eine Narbe nie die Reißfestigkeit von normaler Haut. Nach einer Woche erreicht die Wunde gerade 3% und nach 3 Wochen 20 % der später endgültig erreichten Reißfestigkeit.<sup>5</sup> Die maximale Zugfestigkeit einer Narbe wird nach ca. 3 Monaten erreicht und beträgt lediglich 70-80% der Reißfestigkeit von intakter Haut.<sup>139</sup>

### 1.2 Insulin-like Growth Factors I und II (IGF-I und -II)

Die IGFs nehmen an dem Wachstum und der Funktion von fast jedem Organ des menschlichen Körpers teil. Auf Grund der Vielzahl Ihrer Beteiligungen an biologischen Effekten und Ihrer möglichen therapeutischen Potenz sind sie in den Fokus einer immer größer werdenden Forschergruppe gelangt.

Bereits 1957 entdeckten Salmon und Daughady, dass bestimmte Faktoren in Rattenserum den Einbau von <sup>35</sup>S-Sulfat in Knorpelgewebe induzieren.<sup>116</sup> Froesch et al beschrieben 1963 Faktoren aus Humanserum, welche insulin-ähnliche Wirkungen auf Muskel- und Fettgewebe haben.<sup>52</sup> Schließlich wurde 1972 ein Faktor beschrieben, der Hühnerfibroblasten in der Zellkultur aktivieren kann. Anfangs wurden alle diese Stoffe unter dem Namen Somatomedine zusammengefasst. Erst nachdem man im Laufe der Zeit diese Substanzen weiter reinigen, sequenzieren und immunologisch näher charakterisieren konnte, ergab sich die heutige gültige Nomenklatur. So wurden aus den zwei zwischenzeitlich gefundenen Peptiden, deren insulin-ähnliche Wirkung nicht durch Insulinantagonisten unterdrückt werden konnten und die deshalb nonsuppressible insulin-like activity I und II (NSILA-I/II) genannt wurden, später die insulin-like growth factors I und II (IGF-I/II). Ausserdem zeigte sich, dass Somatomedin-A, Somatomedin-C und IGF-I identisch sind. Ein weiterer Faktor, den man fand und der auf Grund seiner mitogenen Wirkung auf zahlreiche verschiedene Zelltypen auch Multiplication-Stimulating Activity (MSA) genannt wurde, stellte sich identisch zu IGF-II heraus.

### 1.2.1 Biologie und Physiologie von IGF-I und -II

IGF-I und -II sind Polypeptide und weisen eine Sequenzhomologie mit Proinsulin auf. Ungefähr 50% Ihrer Aminosäuren stimmen mit Insulin überein. IGF-I besteht aus 70 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 7,5 kD. IGF-II dagegen weist nur 67 Aminosäuren auf und das Molekulargewicht beträgt 7,47 kD.<sup>110</sup>

Die Hauptquelle für zirkulierendes IGF-I postnatal ist die Leber. Es wird aber auch in Nervengewebe, Pankreas, Herz, Spermien, Ovar, Muttermilch, Nieren, in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen. In der Haut wird IGF-I hauptsächlich von dermalen Fibroblasten und Makrophagen produziert.<sup>106</sup>

IGF-II wird vor allem in fetalem Lebergewebe gefunden und spielt eine wichtige Rolle als embryonaler und fetaler Wachstumsfaktor. Bei der Geburt liegen die



Blutspiegel von IGF-I bei etwa der Hälfte der Werte von Erwachsenen. Vor der Pubertät kommt es zu einem steilen Anstieg der IGF-I Spiegel im Blut, wobei Mädchen einen 2-3fach höheren Anstieg aufweisen als Jungen. Ab einem Alter von ca. 25 Jahren bleiben die IGF-I Spiegel relativ konstant bis zum Alter von ca. 60 Jahren. Ab diesem Alter ist wieder ein leichter Abfall der Serumspiegel zu verzeichnen.<sup>36</sup> IGF-I und IGF-II werden durch unterschiedliche Gene codiert, die gewebe- und entwicklungsspezifisch exprimiert werden. IGF-I ist auf dem langen Arm von Chromosom 12 (12q23) lokalisiert. IGF-II liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p5).

Transgene Mäuse, bei denen spezifische Komponenten des IGF-Systems ausgeschaltet wurden, bestätigen die Rolle der IGFs für das somatische Wachstum, für die spezifische Organ-/ Gewebsentwicklung und zeigen, dass jedes der Peptide jeweils eigene wachstumsfördernde Wirkungen zu bestimmten Entwicklungsstadien ausübt. Die wachstumsfördernden Effekte sind durch die mitogenen Wirkungsweisen der IGFs bedingt. Differenzierungsfördernde Effekte sind für viele Zelltypen, wie z.B. für Zellen des hämatopoetischen Systems, für Myoblasten, für Adipozyten, für Osteoblasten sowie für Zellen des zentralen Nervensystems bekannt.<sup>68</sup> Außerdem wirken die IGFs stark antiapoptotisch.<sup>34,35,41,103,108,109</sup>

Abnormale Expression von Komponenten des IGF-Systems wurden für einige maligne Tumoren und Zelllinien beschrieben und weisen auf eine Bedeutung in der Tumorgenese hin.<sup>34,41,70,103,108,109</sup>

### 1.2.2 Die IGF-Rezeptoren

IGF-Rezeptoren kommen ubiquitär in allen Geweben vor. Mindestens zwei Klassen von IGF-Rezeptoren sind bekannt: der IGF-I Rezeptor und der IGF-II-Mannose-6-Phosphat Rezeptor.

Der IGF-I Rezeptor ist ein 350 kD grosses Transmembran-Glykoprotein. Der mature Rezeptor ist ein Heterotetramer und besteht aus je zwei alpha und beta Untereinheiten. Die IGF-I Bindung erfolgt an den 135 kD großen alpha-Ketten,

wobei die beta-Untereinheiten die Tyrosinkinase-Aktivität entfalten. Das Gen für den IGF-I Rezeptor liegt bei dem Menschen auf Chromosom 15q25-26.

Klonierung und Sequenzierung des IGF-I Rezeptors ergab, dass dieser Rezeptor eine große Homologie mit dem Insulinrezeptor aufweist. In der cytoplasmatischen Domäne der beta-Untereinheit in der Region der Tyrosinkinase ist die Aminosäuresequenz des IGF-I Rezeptors zu 85% identisch mit der Sequenz des Insulinrezeptors.

Der IGF-II-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor unterscheidet sich strukturell von den Insulin und IGF-I Rezeptoren. Seine intrazellulären Wirkungsweisen sind derzeit noch nicht bekannt.

IGF-I bindet mit hoher Affinität an den IGF-I Rezeptor, aber schwächer auch an den Insulin- sowie den IGF-II Rezeptor. Insulin selbst bindet mit hoher Affinität an den Insulin Rezeptor und schwächer auch an den IGF-I Rezeptor. IGF-II bindet sowohl an den IGF-I als auch an den IGF-II Rezeptor, mit höherer Affinität jedoch an den IGF-II Rezeptor.

### 1.2.3 Insulin-like Growth Factor Bindungsproteine (IGFBPs)

Die IGFBPs sind lösliche Proteine, die IGFs mit hoher aber variierender Affinität binden. Dabei sind bis zu 99% der IGFs im Blut an die spezifischen Trägerproteine gebunden. Es sind derzeit sechs verschiedene IGFBP (IGFBP-1 bis IGFBP-6) bekannt mit unterschiedlichem Molekulargewicht und dem gemeinsamen Merkmal von 18 Cysteinresten am Amino- und Carboxyende der Moleküle. Die Interaktion von hypophysärem Wachstumshormon und dem entsprechenden Rezeptor stimuliert die Expression sowohl der mRNA von IGF-I als auch von IGF-Bindungsprotein-3, dem quantitativ wichtigstem Bindungsprotein.<sup>85</sup> Es bindet mehr als 95% des IGFs im Serum.<sup>80</sup> Wichtige Produzenten von IGFBPs sind Haut, Lungenfibroblasten, Keratinozyten, Dezidualzellen, Granulosazellen, Hypophysenzellen, Osteoblasten, Hepatozyten und Endometrialzellen sowie viele Tumorzellen und Dauerzelllinien. Im Gegensatz zu den anderen IGFBPs besitzt IGFBP-3 die

Eigenschaft, nach Assoziation von IGF-I oder IGF-II ein weiteres Protein, die sogenannte säure-labile Untereinheit (acid-labile subunit, ALS) zu binden. Dadurch entsteht ein großmolekularer Komplex mit einem Molekulargewicht von etwa 125-150 kD, der im Blut retiniert wird und somit als Speicherform der IGFs fungiert. In diesem Komplex haben die IGFs eine Halbwertszeit von mehreren Stunden. Gebildet wird das IGFBP-3 von den Kupferzellen und den Sinusoiden der Leber.<sup>134</sup> Die säurelabile Untereinheit wird in den Hepatozyten synthetisiert. Wichtigster Regulationsfaktor für das zirkulierende IGFBP-3 ist ebenso wie für das zirkulierende IGF-I ist das hypophysäre Wachstumshormon.

Durch die weite Verbreitung im Serum, im Gewebe und im Extrazellulärraum üben die IGF-BPs verschiedene Funktionen im IGF-System aus: sie regulieren die Verfügbarkeit und die Halbwertszeit der IGFs im Serum und im Interstitium;<sup>10,19</sup> sie modulieren die IGF/IGF-Rezeptor Interaktion; sie verstärken oder inhibieren die IGF Wirkungen;<sup>37,29</sup> außerdem zeigen sie IGF unabhängige Aktivität.<sup>91</sup>

Zusätzlich werden durch die Bindungsproteine starke Schwankungen des Blutzuckerspiegels und Hypoglykämien infolge der insulin-ähnlichen Wirkungen an den Insulinrezeptoren vermieden.

Zu den IGF unabhängigen Wirkungen zählen die Förderung der Zellmigration, Stimulation oder Inhibition der Zellproliferation und eine proapoptotische Aktivität.<sup>11,91,119</sup>

### 1.2.4 Expression und Wirkungen in der Dermis

Alle Komponenten des IGF-Systems werden von dermalen Fibroblasten produziert. So produzieren humane dermale Fibroblasten sowohl IGF-I und -II als auch die IGF-I und IGF-II Rezeptoren.<sup>8,128,97,130,30</sup>

Auch die Synthese von IGFBP 4 und 5 konnten für adulte dermalen Fibroblasten beschrieben werden.<sup>9</sup> In vitro Analysen gezüchteter humaner Fibroblasten wiesen zusätzlich ein Expression von IGFBP-3 und -6 nach.<sup>97,130,30</sup>

Mehrer Effekte der IGFs auf Fibroblasten sind beschrieben worden. So sollen die Proliferation,<sup>32</sup> das Überleben,<sup>126</sup> die Migration,<sup>142</sup> sowie die Produktion von Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF beta-1<sup>56</sup> beeinflusst werden. Außerdem reguliert IGF-I die Produktion von extrazellulären Matrix-komponenten. So stimuliert IGF-I z.B. die Kollagensynthese und verhindert die Kollagenase Produktion.<sup>57,129,60</sup> Es gibt Hinweise dafür, dass auch die IGF-II-Interaktion am M-6-P-Rezeptor über die Aktivierung von TGF beta-1 die Proliferation der Fibroblasten beeinflusst.<sup>58</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass die IGF-BPs die IGF-I stimulierte Proliferation sowohl abschwächen als auch verstärken können. Durch Sequestration des IGF-I vom IGF-I Rezeptor kann z.B. IGF-BP-3 die IGF-I vermittelte Proliferation abschwächen.<sup>37</sup> Im Gegensatz dazu verursacht eine Vorbehandlung von Fibroblasten mit IGF-BP-3 eine Zellmembranassoziation und Proteolyse von IGF-BP3, und führt so zu einer verminderten Affinität für IGF-I. Die bewirkt schliesslich eine Potenzierung der IGF-I stimulierten Proliferation. Auch die extrazelluläre Matrix, die die Fibroblasten umgibt, wird durch die IGF-BP Aktivität beeinflusst.<sup>37,29</sup>

### 1.2.5 Expression und Wirkungen in der Epidermis

Die Expression der IGF-IR in der Epidermis korreliert generell mit dem Proliferieren der Keratinozyten. Zur Zeit ist noch ungeklärt ob die IGF-IR in allen Zelllagen der Epidermis oder nur in der Basalmembran der normalen menschlichen Haut und in undifferenzierten Zellen der Hautanhangsgebilde vorkommen.<sup>67,114</sup>

Auch die zelluläre Herkunft der IGFs in der Epidermis ist noch nicht vollständig geklärt. So gibt es Studien, die zeigen, dass humane Keratinozyten keine IGFs produzieren.<sup>127,7</sup> In erster Linie würden die in der Haut freigesetzten IGFs aus dermalen Fibroblasten stammen und parakrin die IGF-IR der Keratinozyten stimulieren.<sup>127</sup> Diese Beobachtung stimmt mit der generellen Überlegung überein, dass IGFs normalerweise von Zellen mesenchymalen Ursprungs

produziert werden.<sup>47</sup> Andere Studien belegen jedoch, dass die IGFs von dermalen Keratinozyten produziert werden. Rudmann et al.<sup>114</sup> demonstrierten, dass IGF-I mRNA und Protein in der Epidermis humaner Hautabschnitte exprimiert werden. Bei genauer Betrachtung zeigte sich, dass IGF-I im Stratum granulosum und in von der Haut abstammenden Zellen der Haarfollikel lokalisiert sind. Außerdem lassen Wundheilungsstudien erkennen, dass die mRNAs von IGF-I und IGF-II während der dermalen Heilungsphase von Keratinozyten produziert werden.<sup>67,55,20</sup> Letztendlich lassen die zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse den Schluss vernünftig erscheinen, dass Keratinozyten in vivo die IGFs unter speziellen Bedingungen, wie z.B. fetales Wachstum oder Wundheilung, produzieren. So ist es durchaus möglich, dass IGF-I und vielleicht sogar IGF-II autokrin oder parakrin innerhalb der Epidermis wirken. Parakrine Aktivität in der Epidermis könnte daher möglich sein, da Melanozyten ebenso IGF-I produzieren.<sup>127</sup> Außerdem scheinen Melanozyten ebenso IGF-IR zu exprimieren, da diese auf IGF-I reagieren.<sup>46,66</sup>

Die Expressionsprofile der IGFBP in der Haut stellen sich in adulter und fetaler Epidermis spezifisch dar. So konnte nachgewiesen werden, dass in adulter Haut nur IGFBP-3 mRNA und Protein von einzelnen Basalzellen produziert werden.<sup>9,140</sup> Im Gegensatz dazu wurden die mRNAs von IGFBP-1,-3,-4 und -6 in fetaler humaner Epidermis gefunden.<sup>38</sup>

Ein deutlicher Beweis für die wichtige Bedeutung des IGF Systems für die epidermale Homöostase, zumindest für die fetale Entwicklung lieferten die IGF-IR knockout Mäuse. Diese imponieren mit einer dünnen transparenten Haut, bei der es neben einem Fehlen des Stratum spinosum zu einer Reduktion der Zahl und Größe der Haarfollikel kommt.<sup>82</sup>

Durch mehrere Studien konnte gezeigt werden, dass Insulin, IGF-I und IGF-II die Proliferation von Keratinozyten stimulieren.<sup>144,95</sup> So wurde durch Ablation der IGF-IR der Keratinozyten durch Einsetzen eines anti-IGF-IR Antikörpers diese Beobachtung bekräftigt.<sup>95</sup> Dabei wirkt IGF-I stärker proliferativ auf Keratinozyten als IGF-II, was sich durch eine höhere Affinität von IGF-I auf die IGF-IR erklären lassen könnte.<sup>68</sup>

Das IGF System scheint eng mit anderen Wachstumsfaktorsystemen verknüpft zu sein. So stimuliert die Kombination von IGF-I und EGF das Keratinozyten Wachstum zu einem viel höheren Grad als die beiden Wachstumsfaktoren jeweils alleine.<sup>111,98,33</sup> Wobei IGF-I hierbei den EGF Rezeptor aktiviert und die Liganden an diesem Rezeptor, wie z.B. TGF-alpha und das heparin-binding EGF-like Protein hochreguliert.<sup>75,133,88</sup> Es konnte auch gezeigt werden, dass IGF-I synergistisch mit basic-FGF auf die Keratinozyten Proliferation in vitro wirkt.<sup>111</sup>

Die unkomplette und dünne Haut der IGF-IR knockout Mäuse lässt eine wichtige Rolle des IGF Systems auch für die Keratinozyten Differenzierung vermuten.<sup>82</sup> Rudman et al.<sup>114</sup> postulieren, dass durch die Immunreaktivität der IGF-IRs in den suprabasalen Schichten der Epidermis auf eine Regulierungsfunktion der IGFs für die Differenzierung der Keratinozyten geschlossen werden kann.

Die Motilität der Keratinozyten ist essentiell für die normale Zelldifferenzierung und Wundheilung. Verschiedene Zellmodelle konnten nachweisen, dass humane Keratinozyten als Antwort auf IGF-I migrieren.<sup>131,1,143,3,2</sup>

Zusätzlich scheint das IGF-System auch die Apoptose der Keratinozyten zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass exogenes IGF-I die Keratinozyten vor UVB induzierter Apoptose schützt.<sup>76</sup> Und Di Giovanni et al. zeigten, dass bei transgene Mäuse mit einer Überexpression von IGF-I in der Basalmembran der Epidermis die UVB induzierte Apoptose unterdrückt ist.<sup>43</sup>

### 1.2.6 Natürliche Effekte der IGFs während der Wundheilung

Das IGF-System scheint essentiell für die Wundheilung zu sein. So sind die oben beschriebenen fördernden Effekte auf Proliferation, Überlebensdauer, Migration der Fibroblasten, sowie die Steigerung der Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten und die proliferative und migrationsfördernde Wirkung auf Keratinozyten elementare Bestandteile der Wundheilung.

Die Menge des lokalen IGF-I und -II wechselt während der unterschiedlichen Wundheilungsphasen. So gilt generell, dass die Konzentration der IGFs in der Wundflüssigkeit oder im umgebenden Gewebes wenige Stunden und/ oder Tage nach Wundsetzung am höchsten ist. Dies scheint besonders mit der Zellproliferation und Zellmigration zu korrelieren.<sup>55,88,135</sup> Dabei ist die IGF-I Konzentration 24 Stunden nach Wundsetzung am höchsten, um dann zu einer Ausgangskonzentration bei Vollendung der Heilung zurückzukehren.<sup>135</sup> In einem Heilungsmodell am Schwein war eine Konzentrationserhöhung in der Wundflüssigkeit für die ersten 6 Tage festgestellt worden und wurde dann korrelierend mit der kompletten Reepithelialisierung der Wunde laborchemisch nicht mehr nachweisbar.<sup>88</sup> Die in der Wundflüssigkeit vorkommenden IGFs können von einwandernden Keratinozyten, Epithelzellen der Hautanhangsgebilde, Fibroblasten des Granulationsgewebes, Entzündungszellen und aus dem Serum stammen.<sup>55,20</sup> Beeinträchtigungen des IGF-Systems scheinen bei der Verursachung von verzögert heilenden Wunden mitbeteiligt zu sein. So konnte man bei diabetischen Ratten eine verminderte IGF-I und -II Expression feststellen.<sup>20</sup> Durch eine Studie am Menschen von Blakytny et al.<sup>18</sup> wurde gezeigt, dass in der Epidermis und den dermalen Fibroblasten diabetischer Haut mit verzögerter Wundheilung IGF-I reduziert ist oder sogar vollständig fehlt. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass es unter Kortisontherapie sowohl im Serum als auch in der Wundflüssigkeit zu einem Mangel an IGF-I kommt.<sup>137,48,117</sup>

### 1.2.7 Therapeutische Effekte der IGFs während der Wundheilung

Basierend auf der Beobachtung des IGF-Mangels bei verzögert heilenden Wunden ergab sich der Therapieansatz der Substitution der Wachstumsfaktoren.

In einigen Fällen konnte durch systemische IGF-I Applikation eine verbesserte Wundheilung erreicht werden. Dennoch können die hierbei entstehenden Nebenwirkungen wie Hypoglykämie, Elektrolytverschiebungen und Ödem-

bildung nicht ignoriert werden.<sup>102</sup> Außerdem ist durch den Transfer des IGF-I durch den Extrazellulärraum mit einem Effektivitätsverlust der IGF-I Behandlung zurechnen. So scheint es effektiver zu sein, eine lokale IGF-I Applikation vorzunehmen. Unter einer lokalen IGF-I Therapie konnte durch Zunahme der Reepithelialisierung,<sup>15</sup> der Angiogenese,<sup>112</sup> und der dermalen Kollagenneubildung<sup>59</sup> verbesserte Wundheilungsraten beobachtet werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch eine lokale IGF-I Therapie die Heilung durch Diabetes<sup>17</sup> oder Kortisontherapie<sup>125</sup> verzögert heilender Wunden verbessert werden konnte. Dennoch bestätigten weitere Studien die positiven Effekte der lokalen IGF-I Applikation auf die Wundheilungsraten nicht.<sup>86,79</sup> Ein Grund für das Ausbleiben des Therapieerfolges, kann die Veränderung der biologischen Aktivität des auf eine Wunde applizierten IGF-I sein. So wird ungebundenes IGF-I im Wundmilieu schnell durch Proteasen abgebaut.<sup>29</sup> Gleichzeitig führt eine hochdosierte lokale IGF-I Applikation zu einer Downregulation der IGF-IR und wird so ineffektiv.<sup>28,145</sup>

Puolakkainen et al. beschrieben die signifikanten Unterschiede von lokal appliziertem TGF-beta1 auf die Wundheilung in Abhängigkeit von dem jeweils benutzten Trägersystem.<sup>104</sup>

Um einen positiven Effekt auf die Wundheilung durch lokale IGF-I Applikation zu erzielen, scheint das Applikationssystem folgende Bedingungen erfüllen zu müssen:

- 1.) Verhinderung der Downregulation der IGF-R
- 2.) Verhinderung des Abbaus des IGFs durch Proteasen
- 3.) Erhöhung der IGF-Verweildauer (Halbwertszeit) im Wundgebiet
- 4.) Erhöhung der IGF-I Konzentration in der Wunde
- 5.) Sicherstellung einer suffizienten und klinisch praktikablen Applikation im Wundgebiet



### 1.3 Wunden und Wundheilungsstörungen

Eine Wunde ist eine Unterbrechung der Gewebekontinuität durch Einwirkung einer Noxe auf eine Gewebestruktur. Dieser Vorgang kann innere oder äußere Gewebestrukturen betreffen. Unter einer kutanen Wunde wird eine Verletzung der Hautoberfläche und der darunter liegenden Gewebeschichten verstanden. Hier kann zwischen akuten und chronischen Wunden unterschieden werden. Eine akute Wunde tritt als Folge eines akut erlittenen Traumas auf. In der Regel dauert die physiologisch unkomplizierte Wundheilung 2 Wochen.

#### 1.3.1 Chronische Wunden

Eine chronische Wunde wird definiert als Wunde, welche trotz ursachenbezogener Lokalthherapie keine Heilungstendenz innerhalb eines adäquaten zeitlichen Rahmens aufweist. Eine Definition in Bezug auf die Heilungszeit alleine wäre nicht korrekt, da große Wunden eine vergleichsweise längere Abheilungszeit benötigen, zudem beeinflussen verschiedene Faktoren wie Alter und Allgemeinzustand des Patienten die physiologische Heilungsgeschwindigkeit.

Chronische Wunden wie z.B. chronische Ulzera an den unteren Extremitäten sind durch Therapieresistenz und hohe Rezidivraten gekennzeichnet. Die teilweise viele Jahre bestehenden Wunden stellen für den Patienten durch Funktionsminderung und Schmerzen, als Eintrittspforte für pathogene Keime und als auch als kosmetisches Problem eine erhebliche Beeinträchtigung dar. Ungeachtet ihrer Ätiologie ist der Kostenaufwand für die langwierige Behandlung der Wunden erheblich. Aus diesen Gründen wurde in den letzten Jahren versucht, neue Therapiekonzepte für chronische Wunden zu entwickeln. Auf Grund der Beobachtung der lokalen Störung der Wachstumsfaktorensysteme wurde der Therapieansatz der lokalen Wachstumsfaktorensubstitution entwickelt. Derzeit ist PDGF als Therapeutikum chronisch venöser Ulcera und des diabetischen Fußsyndroms zugelassen.

### 1.3.2 Ätiologie der Wundheilungsstörungen

Chronische Wunden durchlaufen den zeitlich geordneten Reparationsprozeß nur unvollständig und gelangen daher nicht zur anatomischen und funktionellen Wiederherstellung. Chronische Wunden liegen erst dann vor, wenn das Gleichgewicht der zellulären und humoralen Faktoren zugunsten heilungshemmender Faktoren verschoben ist. Daher besteht das therapeutische Ziel darin, z.T. durch einfache Korrekturmaßnahmen, wie z.B. Keimreduktion durch Verbandstoffe, Debridement und Hauttransplantation, das Gleichgewicht zugunsten der Heilung zu beeinflussen.

Allgemeine und auch lokale Faktoren wie Mangelernährung, Anämien, Diabetes, Gefäßerkrankungen, Infektionen, Serome, Hämatome, Fremdkörper etc. haben einen negativen Einfluss auf die verschiedenen Phasen der Wundheilung und unterbrechen oder verzögern somit den Heilungsprozeß.

Einen Überblick bietet hier Tabelle I.

Vaskuläre Ursachen	venös	CVI, postthrombotisches Syndrom, Perforansveneninsuffizienz
	arteriell	pAVK, Vaskulitiden
	Mischtyp	Kombination arterieller und venöser Ursachen
Infektionen	Kapillär	Vaskulitiden, Pyoderma gangränosum, art. Hypertonie
	Bakteriell	Staphylokokken, Streptokokken, Treponema pallidum, Leishmanien, Clostridien, Mischinfektionen
	Mycobakteriell	Tbc, Lepra, Mycobakterium ulcerans
Physikalisch/ Chemisch	Protozoen	Dracunculus medinensis
	Trauma	Druck, Verletzungen, Verbrennungen, Strahlenschäden
Systemerkrankungen	metaboslich	Diabetes mellitus, Gicht, Amyloidose, medikamentös
	Neoplasien	Plattenepithelkarzinome, Basallzellkarzinome, Melanome, Sarkome, Lymphoproliferative Erkrankungen, kutane Filiae
	Hämatologisch	Sichelzellanämie, Thalasämie, Polycythämia vera, Leukämien, Plasmozytom

**Tabelle 1**

nach Philips<sup>99</sup>

### 1.4 Fragestellung

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, leitet sich aus der pathophysiologischen Beobachtung des relativen Mangels an Wachstumsfaktoren bei chronischen Wunden das Therapiekonzept der lokalen Wachstumsfaktorenapplikation ab. Die Ergebnisse über den Erfolg der lokalen Gabe von Wachstumsfaktoren sind kontrovers. Dies scheint zum Teil durch die unterschiedlichen zum Einsatz kommenden Trägersysteme und der damit verbundenen unkontrollierten Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus dem Vehikel in die offene Wunde begründet zu sein. Deshalb entwickelte das Deutsche Zentrum für Biomaterialien und Organersatz (BMOZ) ein neuartiges Verbandsystem, welches eine kontinuierliche und kontrollierte Abgabe des zum Einsatz kommenden Wachstumsfaktors (IGF-I) ermöglicht.

Folgende Fragestellungen sollen in der vorliegenden Arbeit behandelt werden:

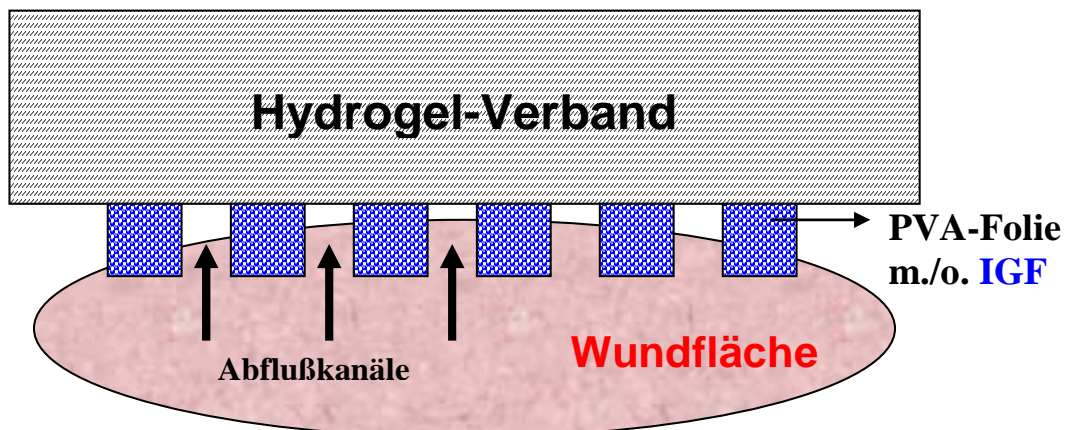
1. Welchen Effekt hat lokal durch den neuen Verband appliziertes IGF-I auf die kutane Wundheilung.
2. Welchen Effekt hat lokal durch den neuen Verband appliziertes IGF-I auf das Proliferationsverhalten und die Angiogeneese während der kutanen Wundheilung.
3. Welchen Effekt hat lokal durch den neuen Verband appliziertes IGF-I auf die kutane Wundheilung im Verhältnis zu einem anderen Trägersystem zur lokalen IGF-I Applikation (IGF-I in Methylzellulosegel gelöst).
4. Hat lokal appliziertes IGF-I einen messbaren Effekt auf den systemischen IGF-I Spiegel.

## 2 Material und Methoden

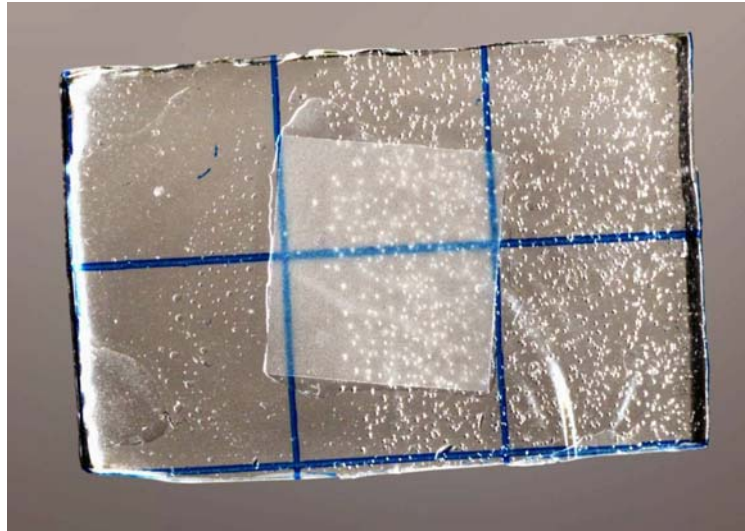
### 2.1 Der IGF-I Verband

#### 2.1.1 Aufbau des IGF-I Verbandes

Zur kontinuierlichen Applikation von IGF-I entwickelte das BMOZ ein zweischichtiges Verbandsystem. Zunächst wurde Polyvinylalkohol PVA (Mowiol 56-98, Hoechst, 200kDa) bei 90°C in Wasser gelöst, um eine 10%ige polymere Lösung zu erhalten. 1 mg IGF-I wurde in 1 ml PBS Puffer gelöst und zu 10 ml der polymeren PVA Lösung hinzu gegeben. Diese wurde für 30 Minuten erhitzt und anschließend auf eine definierte 100 cm<sup>2</sup> große Glasfläche aufgetragen. Nach einer 24stündigen Trocknungsperiode bei Raumtemperatur wurde der Verbandsfilm von dem Glas entfernt und in 100mm<sup>2</sup> große Folienabschnitte geschnitten. Diese nun 100mm<sup>2</sup> großen Einheiten enthalten jeweils 10µg IGF-I. In diese Folienabschnitte wurden mit einer Stanzmaschine Abflusskanäle von einer Fläche von insgesamt 10mm<sup>2</sup> eingearbeitet, um ein möglichst ungestörtes Abfließen des Wundexsudates zu ermöglichen. Die präparierte PVA Folie wurde auf einen Hydrogel-Verband (Hydrosorb comfort®, Hartmann AG, Germany) so aufgebracht, dass der Hydrogel-Verband die Folie allseits um 5-10 mm überlappte (Abb.1). Der Kontrollverband wurde in gleicher Art und Weise, allerdings ohne Beladung mit IGF-I, hergestellt.



**Abbildung 1:** Hydrogel-Verband mit aufgebracht PVA-Folie im Schema.



**Abbildung 2:** Neues Verbandsystem mit Hydrogel-Verband und PVA-Folie.

### 2.1.2 Quantifizierung der IGF-I Freisetzung

Um die Freisetzungsrates des aufgetragenen IGF-I zu bestimmen, wurde der Verband in 1 ml 0,1% Phosphat gepufferter BSA-Lösung (Bovine-Serum-Albumin-Lösung) inkubiert. Nach Zeitintervallen von 0, 10, 30, 60, 120 und 1440 Minuten wurden Proben entnommen und die IGF-I Konzentration wurde mit dem IGF-I-ELISA-Testverfahren (IBL Hamburg) bestimmt.

**Tabelle 2:** Darstellung der in vitro IGF-I Freisetzung aus dem IGF-I Verband.

Minuten	Konz. (ng/ml)	Freisetzung IGF-I
0	0,00	0.00%
10	2676.75	45.40%
30	2098.00	87.60%
60	451.75	<b>96.60%</b>
120	159.25	99.60%
1440	20.50	100.00%

Nach 60 min kam es zu einer Freisetzung von ca. 50% des aufgetragenen IGF-I (5,3µg/10µg). Danach erfolgte keine weitere signifikante Freisetzung mehr.

### 2.1.3 IGF-I in Methylzellulose gelöst

Eine Versuchstiergruppe (V-CMI) wurde mit unkontrolliert freigesetztem humanem rekombinaten IGF-I (Tebu) behandelt. Hierzu wurden 5 µg IGF-I in 0,2ml 0,2% Methylzellulose Gel gelöst. Im Rahmen der täglichen Verbandswechsel wurde dieses IGF-I-Methylzellulose Gel den entsprechenden Tieren auf die Wunde pipettiert und diese anschließend mit dem Hydrogel-PVA Kontrollverband abgedeckt.

## 2.2 Tiermaterial

Zur Verfügung standen männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 399,48 Gramm am Operationstermin. Die Tiere waren in Einzelkäfigen und einem jeweils 12 Stunden dauernden Tag-Nacht-Zyklus, bei einer konstanten Temperatur von 20-22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70% untergebracht. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter, bestehend aus handelsüblichen Pellets.

### 2.2.1 Versuchstiergruppen

Die Tiere wurden in folgende Versuchstiergruppen eingeteilt:

- |                           |   |
|---------------------------|---|
| Versuchstiergruppe V:     | Kontrollgruppe; gesunde Tiere behandelt mit dem Kontrollverband.                        |
| Versuchstiergruppe V-I:   | Gesunde Tiere behandelt mit dem IGF-I Verband.  |
| Versuchstiergruppe V-C:   | Kortisoniere behandelt mit dem Kontrollverband.   |
| Versuchstiergruppe V-CI:  | Kortisoniere behandelt mit dem IGF-I Verband.   |
| Versuchstiergruppe V-CMI: | Kortisoniere behandelt mit IGF-I in Methylzellulose Gel gelöst und dem Kontrollverband. |

### 2.3 Versuchsaufbau

#### 2.3.1 Wundinduktion

Nach intraperitonealer Narkoseinduktion mit Ketamin (100 mg/kgKG, Ketanest®) und Xylazin (15 mg/kgKG, Rompun®), Rasur und Desinfektion des Rückenbereiches erfolgte die Wundsetzung am Rücken der Tiere. Die Vollhautdefekte wurden über der Wirbelsäule, 3 cm distal einer gedachten Verbindungslinie zwischen beiden Schulterblättern mit einer 8 mm durchmessenden sterilen Biopsie-Stanze (Fläche:0,502 cm<sup>2</sup>) generiert.

#### 2.3.2 Kortisonapplikation

Um die Wundheilungsstörung zu induzieren, wurde den betreffenden Tieren unmittelbar nach Wundsetzung 18 mg/kgKG Methylprednisolon-21-acetat (Depomedrate®), ein Depot-Präparat, subcutan appliziert. Dies erfolgte 6 cm distal des Vollhautdefektes über der Wirbelsäule (Abb. 3: \*, \*\*).

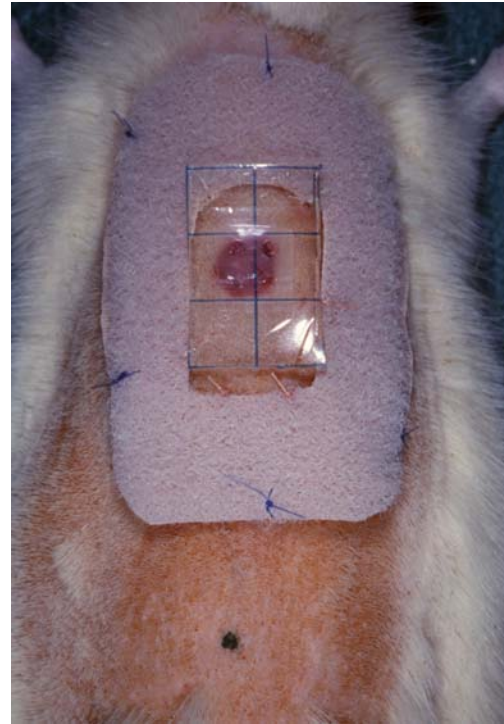
#### 2.3.3 Das Befestigungssystem

Um ein permanentes Aufliegen und einen zügigen Wechsel des Verbandes zu ermöglichen, wurde den Tieren der Boden eines 7×5 cm großen Klettverschlusses mit 3/0 Hautfäden und Einzelkopfnähten am Rücken befestigt. Dieser Boden enthielt eine über der Wunde gelegene Aussparung, die in etwa der Größe des Hydrosorb-Anteils des Verbandes entsprach. Durch Auflegen des Deckels wurde der Verband dauerhaft über der Wunde fixiert und gewährleistete einen konstanten Kontakt des PVA-Flieses mit dem Wundgewebe (Abb.4).





**Abbildung 3:** \* Vollhautdefekt,  
\*\*Kortisonapplikationsort.



**Abbildung 4:** Hydrogel-PVA-  
Verband u. Bodenplatte des  
Befestigungsmechanismus.

#### 2.3.4 Verbandswechsel

Bei allen Tieren wurde täglich in Inhalationsnarkose mit Enfluran (Ethrane®) ein Verbandswechsel durchgeführt. Nach Öffnen des Klettverschluss-Deckels wurde der alte Verband entfernt, die Wunde gereinigt und ein neuer Verband, mit oder ohne eingearbeitetem IGF-I, jeweils den verschiedenen Versuchsgruppen entsprechend, angebracht. Den betreffenden Tieren wurde vor Auflegen des Verbandes 0,2 ml des IGF-I Methylzellulose Gels aufpipettiert.

### 2.3.5 Probenentnahme

Am siebten postoperativen Tag wurden die Tiere durch eine Überdosis Inhalationsnarkotikum getötet, thorakotomiert um Blut aus dem rechten Vorhof zur systemischen IGF-I Bestimmung zu entnehmen. Anschließend wurden die Wunden zur späteren Vermessung folienplanimetrisch dokumentiert und fotografiert. Das Wundareal mit angrenzender gesunder Haut wurde schließlich exzidiert und über einen Korkblock gespannt.

### 2.4 Histologische Aufarbeitung

Zur weiteren Verarbeitung wurden die exzidierten Wundareale in 4%iger gepufferter Paraformaldehyd-Lösung 12-24 Stunden bei 4°C fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Durch eine einstündige Inkubation in 70 %igen Ethanol wurde das Formalin ausgewaschen. Zur Übertragung der Präparate in das hydrophobe Einbettmedium Paraffin mussten diese zunächst entwässert werden. Durch stufenweise Entwässerung mit Hilfe des Einkammersystems eines Gewebeeinfiltrationsautomaten (Leica) konnten Zerreißen und Schrumpfen vermieden werden.

Mit dem Mikrotom (Leitz) wurden von den jeweiligen Paraffinblöcken Schnitte von 1 µm Schichtdicke gewonnen. Diese Schnitte wurden in ein Kaltwasserbad (ca. 20°C) überführt um dann im Warmwasserbad (ca. 40°C) ausgespannt zu werden. Dies ermöglichte ein glattes Aufziehen auf die entsprechend vorbehandelten Objektträger. Anschließend wurden die aufgezogenen Schnitte bei 40°C auf der Wärmeplatte über Nacht getrocknet.

### 2.4.1 Vorbehandlung der Objektträger

Um eine optimale Haftung der Paraffinschnitte auf den Objektträgern zu erreichen, wurden diese mit 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTEX) beschichtet. Die Objektträger wurden hierfür zunächst mit Aceton entfettet, anschließend in 2% APTEX für 5 Minuten inkubiert, abgespült und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Anfertigung der Schnitte mit dem Mikrotom wurden diese auf die APTEX beschichteten Objektträger aufgezogen.

### 2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Von allen Präparaten wurde eine HE-Färbung angefertigt.

Nach Entparaffinierung der Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe (Xylol 3×10 Minuten, Ethanol 100% 2×5 Minuten, Ethanol 96% 5 Minuten, Ethanol 70% 5 Minuten) wurden die Kerne 5-10 Minuten in Hämatoxylin nach Mayer (Merck), 1:5 mit Aqua dest. verdünnt, gefärbt. Dann wurden die Präparate 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut, und schließlich erfolgte die Zytoplasmafärbung 0,5-2 Minuten in Eosin (Merck) 1%, es wurde kurz in Aqua dest. gespült, die aufsteigende Alkoholreihe angeschlossen und mit Roti-Histokit (Roth) eingedeckt.

### 2.4.2 Immunhistochemie

Der Nachweis von Proliferating Cell Nuclear Antigen (Monoclonal Anti-PCNA, DAKO) und Gefäßen (Monoclonal Anti- $\alpha$  Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, Sigma) erfolgte an Paraffinschnitten.

Nach Anfertigung von 1  $\mu$ m dicken Schnitten, Aufziehen auf 2%ige APTEX (3-aminopropyltriethoxysilane) beschichtete Objektträger, Trocknung und Entparaffinierung wurde über die indirekte Immunhistochemie mit der ABC-

(Avidin-Biotin) Methode angefärbt, mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen (FLUCA).

Bei allen Präparaten wurde die endogene Oxidase mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol (Merck) durch eine Inkubationszeit von 15 Minuten geblockt, um eine falsch positive Reaktion bei Substratentwicklung zu vermeiden. Nach Waschen in TBS-Puffer (0,05M, pH 7,6) erfolgte die enzymatische Vorbehandlung über 15 Minuten mit Pronase (0,1%, Camon), um die Antigenstellen zu demaskieren. Nach drei Waschschritten in TBS-Puffer erfolgte die Blockung unspezifischer Bindungsstellen mit Nonimmunserum (DAKO X902) 1:5 verdünnt in 5%igem BSA-Verdünnungspuffer (Fraktion V, Serva) 20 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Diese Blockung verhindert unspezifische Adsorptionen des Primärantikörpers an stark polare Kollagen- und Bindegewebelemente. Anschließend wurde mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBS-Puffer folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Rabbit-anti-Mouse; biot.), 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Dieser wurde zur Vorbereitung mit normalem Rattenserum auf Eis inkubiert, zentrifugiert und der Überstand 1:400 mit 5% BSA/TBS-Puffer verdünnt. Der Sekundärantikörper wurde mit TBS-Puffer abgewaschen und im Anschluß wurden die Schnitte für 30 Minuten mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (DAKO K377) in der Feuchtkammer inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in TBS-Puffer erfolgte schließlich die Detektion mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB 0,05%, Fluka). Die Schnitte wurden intermittierend unter dem Mikroskop bis zum Erreichen der gewünschten Farbintensität kontrolliert. Dann wurden die Präparate in Aqua dest. und Leitungswasser gespült und mit Hämatoxylin nach Mayer (1:5; Merck) gegengefärbt. Zuletzt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Roti -Histokitt (Roth) eingedeckt.

### 2.5 Auswertung

#### 2.5.1 Wundgrößen

Die Wundfläche wurde mit Hilfe einer transparenten Polyurethanfolie (Opsite, Smith Nephew) planimetriert. Die Ulcusgrößen wurden verblindet, d.h. ohne Kenntnis der über die jeweilige Gruppenzugehörigkeit fotoplanimetrisch ausgemessen.

Die Flächen wurden in mm<sup>2</sup> angegeben.

#### 2.5.2 Immunhistochemie

Die Quantifizierung der histologischen Schnitte erfolgte mit dem Quantimet Mikroskop (Leica) unter 40x Vergrößerung.

Um systematische Fehler bei unterschiedlichen Wundgrößen zu vermeiden, wurde bei den auszuwertenden Wunden die Wundränder aufgesucht und das sich anschließende Granulationsgewebe in 4 Quadranten eingeteilt. In den sich ergebenden 4 Quadranten erfolgte nun wundrandnah die Auszählung von jeweils einem Gesichtsfeld. Hiervon wurden dann die Mittelwerte gebildet und auf die Gesamtzellzahl der PCNA positiven Zellen auf einen mm<sup>2</sup> Wundgewebe hochgerechnet. Zur Wertung gelangten hier nur fluoreszenzmikroskopisch sicher erfassbare dunkelbraune PCNA positive Zellen. Bei der SMA Färbung wurden ebenso die vier Quadranten ausgezählt und auf Gefäße pro mm<sup>2</sup> hochgerechnet. Gewertet wurden nur Gefäße, die innerhalb des Färbebandes ein eindeutiges Gefäßlumen aufwiesen.

#### 2.5.3 Systemischer IGF-I Spiegel

Am siebten postoperativen Tag wurden die Tiere nach der Tötung thorakotomiert, um anschließend den rechten Vorhof zu punktieren und Blut zur

Bestimmung des systemischen IGF-I Spiegels zu entnehmen. Aus diesen Proben wurde vom Hormonlabor Prof. Ranke (Universitätskinderklinik Tübingen) der IGF-I Plasmaspiegel bestimmt.

### 2.5.4 Statistik

Die Zielgrößen wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler erhoben. Zur Beurteilung der Signifikanz wurden die Diskussionsgrößen nicht-parametrisch durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet, wobei  $p < 0,05$  als Signifikanzniveau gewählt wurde. Die Mittelwerte der untersuchten Parameter wurden graphisch in den jeweiligen Abbildungen dargestellt. Für multiples Testen bei mehr als zwei Gruppen, wurden die Werte nach Bonfferoni korrigiert.

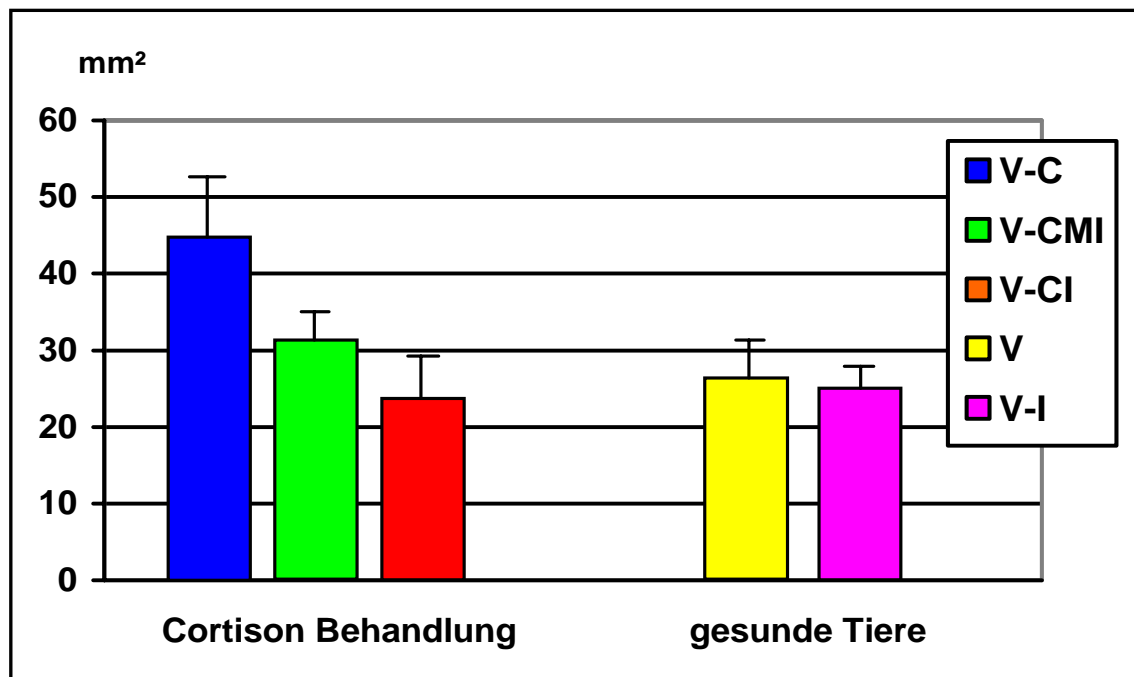
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Wundgrößen

Die Auswertung der fotoplanimetrisch gemessenen Wundgrößen der fünf Versuchsgruppen am siebten postoperativen Tag ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3:** Wundgrößen als Mittelwert mit min. /max. Wert und Standardabweichung. Einheit: [mm<sup>2</sup>].

Versuchstiergruppe	Mittelwert	SD	Min.	Max.
V	26,2	6	20	35
V-I	24,8	5	18	31
V-C	44,5	9	33	65
V-CI	23,7	7	12	33
V-CMI	31,3	3	27	37



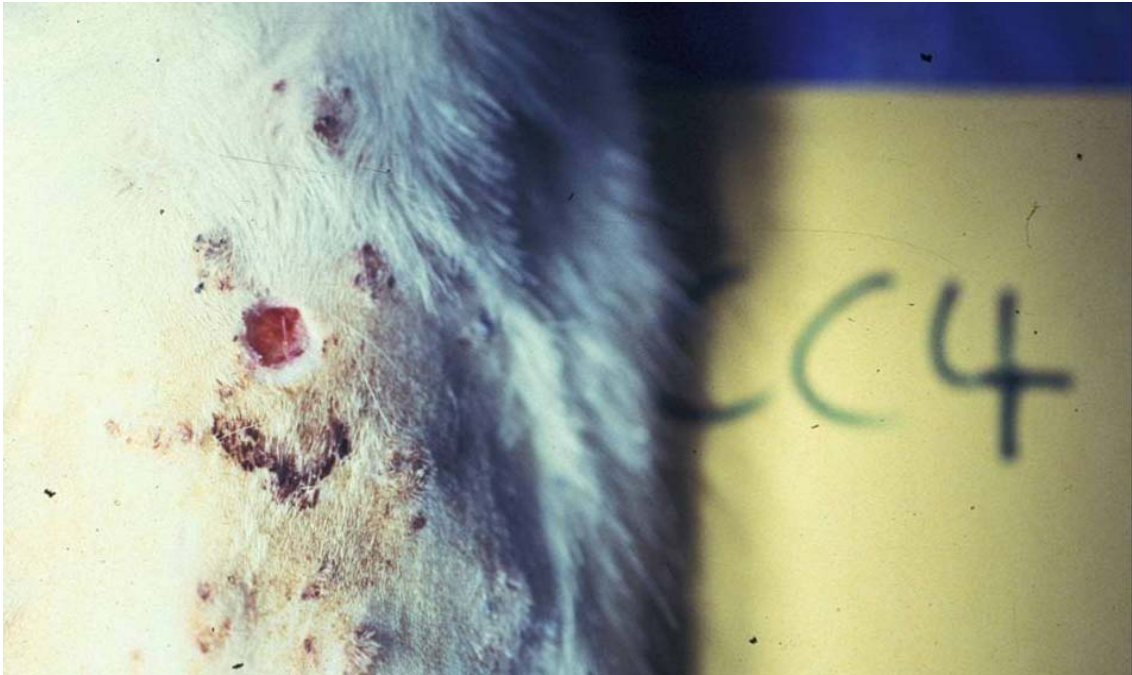
**Abbildung 5:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Wundgrößen in mm<sup>2</sup>.

Nach sieben Tagen Standardbehandlung mit dem Hydrogel-PVA Verband ließen sich bei den mit Kortison behandelten Tieren signifikant größere Wunden als bei den gesunden Tieren feststellen (V vs. V-C:  $p=0.001$ ). Durch die Behandlung von gesunden Tieren mit dem neuen IGF-I Verband konnte keine weitere Wundheilungsbeschleunigung erreicht werden (V vs. V-I:  $p=0.84$ ). Die Behandlung der Kortisontiere mit dem neuen IGF-I Verband führte jedoch zu signifikant kleineren Wunden (V-C vs. V-CI:  $p=0.0001$ ). Die Wundgrößen von mit dem neuen IGF-I Verband behandelten Cortisontieren unterschieden sich nicht mehr von gesunden Tieren (V-CI vs. V:  $p=0,662$ ), somit konnte der wundheilungsverzögernde Effekt des Kortisons aufgehoben werden. Auch durch die Therapie der Kortisontiere mit dem gelösten IGF-I konnten signifikant kleinere Wunden erreicht werden (V-CMI vs. V-C:  $p=0.0001$ ). Allerdings erwies sich der die Therapie mit dem neuen IGF-I Verband als signifikant effektiver als die Therapie mit gelöstem IGF-I (V-CI vs. V-CMI:  $p=0,031$ ).

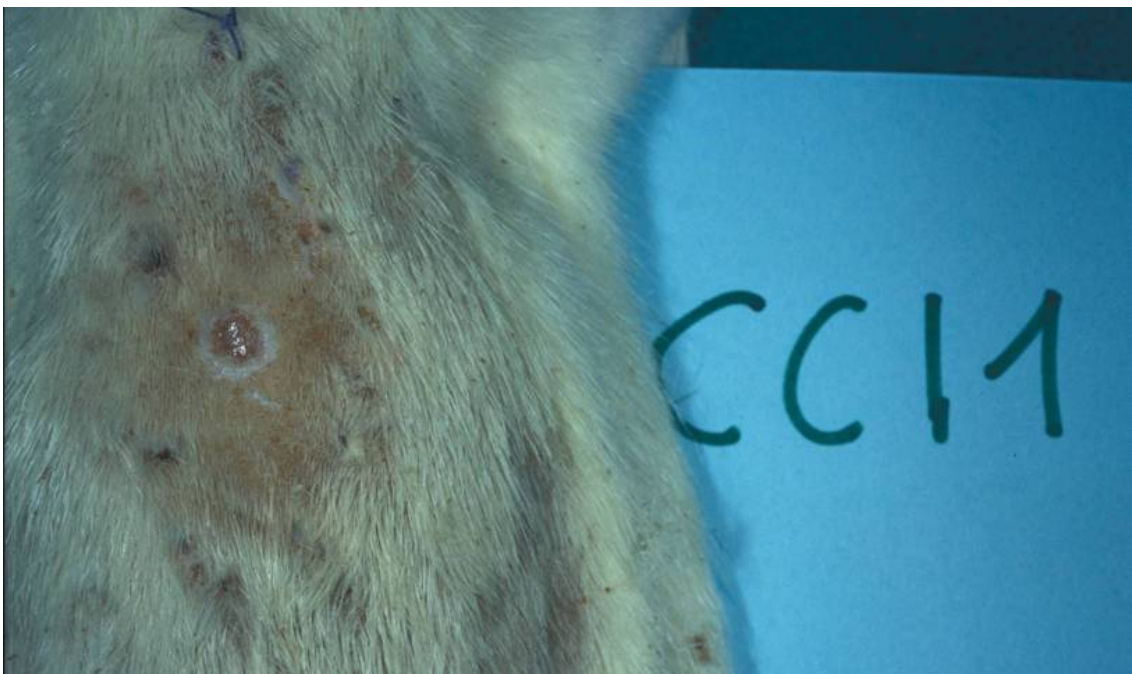
**Tabelle 4:** Darstellung der Signifikanzen der Wundgrößen. Mittelwerte in  $\text{mm}^2$ .

Vergleichsgruppen	Mittelwerte	p-Werte
V-C vs. V	44,5 vs. 26,2	0,001
V-I vs. V	24,8 vs. 26,2	0,84
V-CI vs. V-C	23,7 vs. 44,5	0,0001
V-CI vs. V.CMI	23,7 vs. 31,3	0,031
V-CI vs. V	23,7 vs. 26,2	0,662





**Abbildung 6:** Tier Nr. 4 mit Kortisonapplikation, therapiert mit Hydrogel-PVA-Verband ohne IGF-I, am 7. post-op Tag; Wundgröße 41 mm<sup>2</sup>.



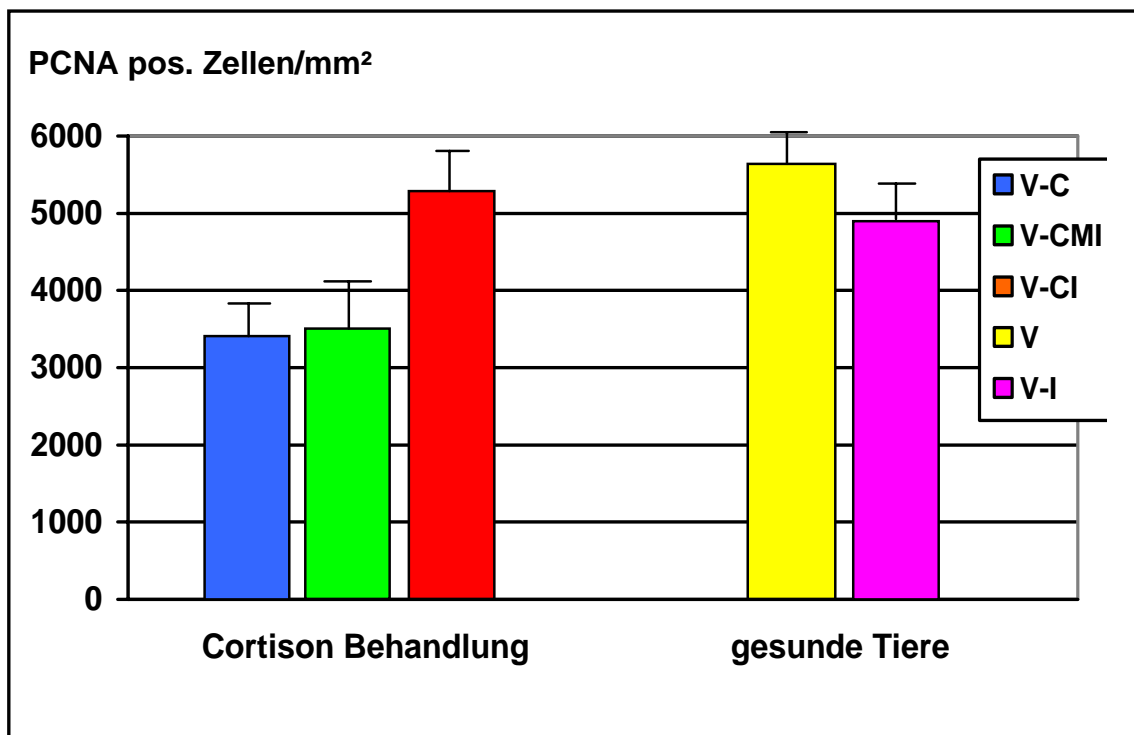
**Abbildung 7:** Tier Nr. 1 mit Kortisonapplikation, therapiert mit IGF-I Verband, am 7. post-op Tag; Wundgröße 20 mm<sup>2</sup>.

3.2 PCNA-Färbung

Zur Darstellung des Proliferationsverhaltens der Wunden der einzelnen Versuchsgruppen wurden die PCNA positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> ausgezählt und statistisch ausgewertet.

**Tabelle 5:** Mittelwerte, Standardabweichungen und min./max. Werte, der PCNA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup>.

Versuchstiergruppe	Mittelwert	SD	Min.	Max.
V	5763	690	4388	7964
V-I	4934	460	3360	5970
V-C	3403	459	2721	4053
V-CI	5241	611	3360	5970
V-CMI	3474	653	2496	4889

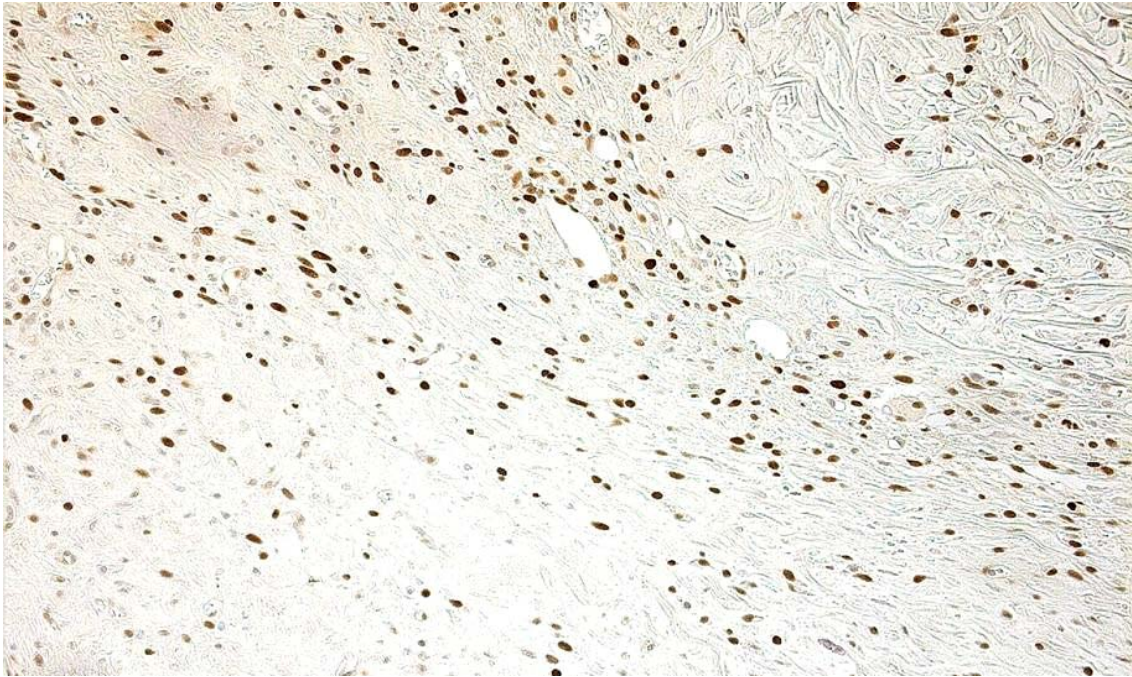


**Abbildung 8:** Mittelwerte und SD der PCNA positiven Zellen/ mm<sup>2</sup>.

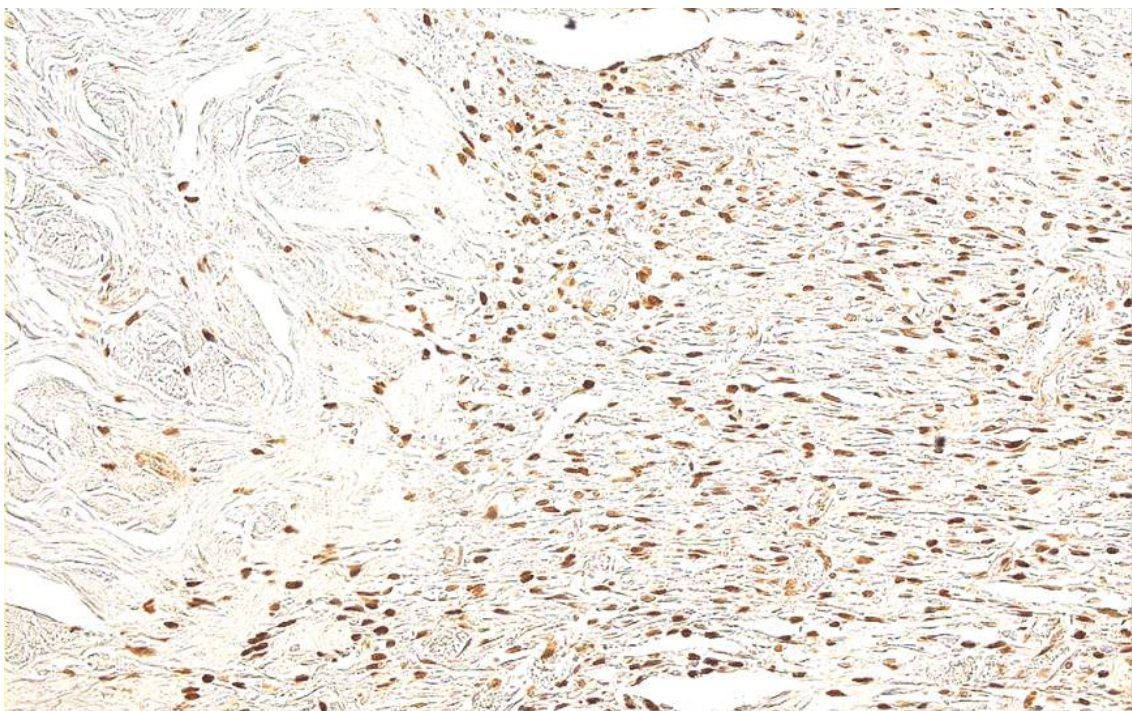
Signifikanzen wurden aus den PCNA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> errechnet. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Methylprednisolon die Anzahl der sich in Teilung befindenden Zellen signifikant gegenüber gesunden Tieren reduziert (Gruppe V vs. V-C, p= 0,002). Durch die Behandlung gesunder Tiere mit dem IGF-I Verband konnte keine wesentliche Änderung im Proliferationsverhalten erzielt werden (V vs. V-I, p= 0,095). Allerdings wurde durch die Behandlung mit dem IGF-I Verband die kortisonvermittelte Reduzierung der Proliferation vermindert (V-C vs. V-CI, p= 0,0001), so dass ein Proliferationsniveau gesunder Tiere erreicht werden konnte (V vs. V-CI, p= 0,254). IGF-I, gelöst in Methylzellulose, konnte die proliferationshemmende Wirkung des Kortisonpräparates nicht aufheben (V-C vs. V-CMI, p= 0,481). Die kortisonvermittelte Reduzierung der Proliferation konnte durch den IGF-I Verband aufgehoben werden, durch in Methylzellulose gelöstes IGF-I nicht.

**Tabelle 6:** Signifikanzen der Mittelwerte der PCNA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup>.

Vergleichsgruppen	Mittelwerte	p-Werte
V-C vs. V	3403 vs. 5763	0,002
V-I vs. V	4934 vs. 5763	0,095
V-CI vs. V-C	5241 vs. 3403	0,0001
V-C vs. V-CMI	3403 vs. 3474	0,481
V-CI vs. V-CMI	5241 vs. 3474	0,001
V-CI vs. V	5241 vs. 5763	0,254



**Abbildung 9:** PCNA-Färbung bei Tier 7 mit Kortisonapplikation, Therapie mit Kontrollverband.



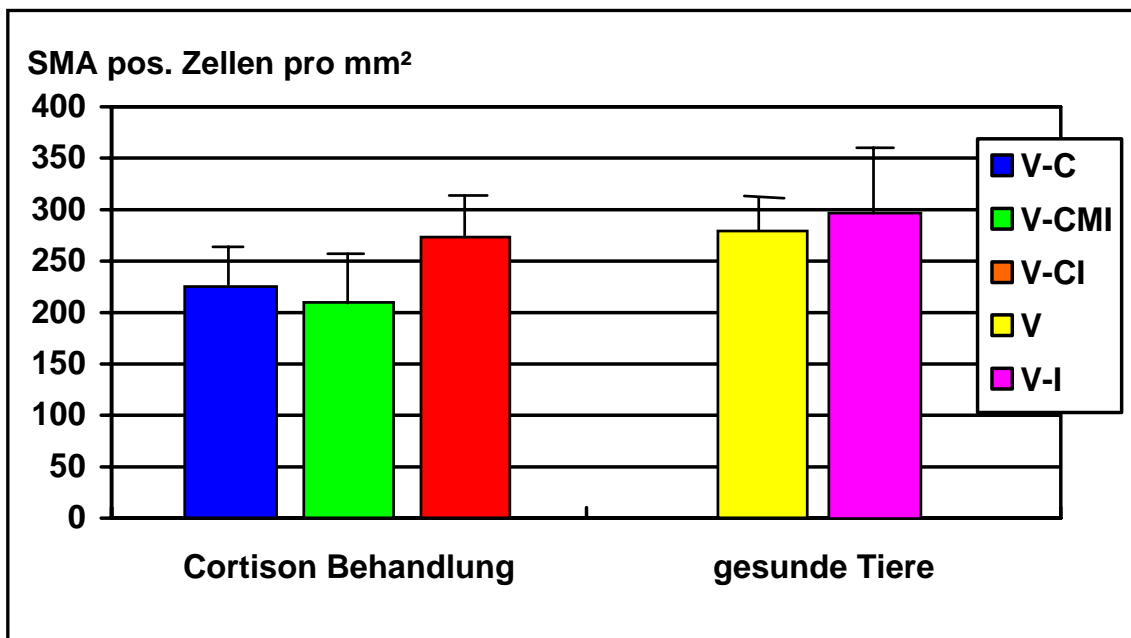
**Abbildung 10:** PCNA-Färbung bei Tier 2 mit Kortisonapplikation, Therapie mit dem IGF-I Verband.

3.3 SMA-Färbung

Die Darstellung der Angiogenese erfolgte durch Auszählung und statistischer Auswertung der SMA-positiven Gefäße pro mm<sup>2</sup>.

**Tabelle 7:** Mittelwerte, Standardabweichungen, min. und max. Werte der SMA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup>.

Versuchstiergruppe	Mittelwert	SD	Min.	Max.
V	284	38	233	324
V-I	298	65	218	390
V-C	228	43	177	296
V-CI	275	41	196	317
V-CMI	218	53	145	291

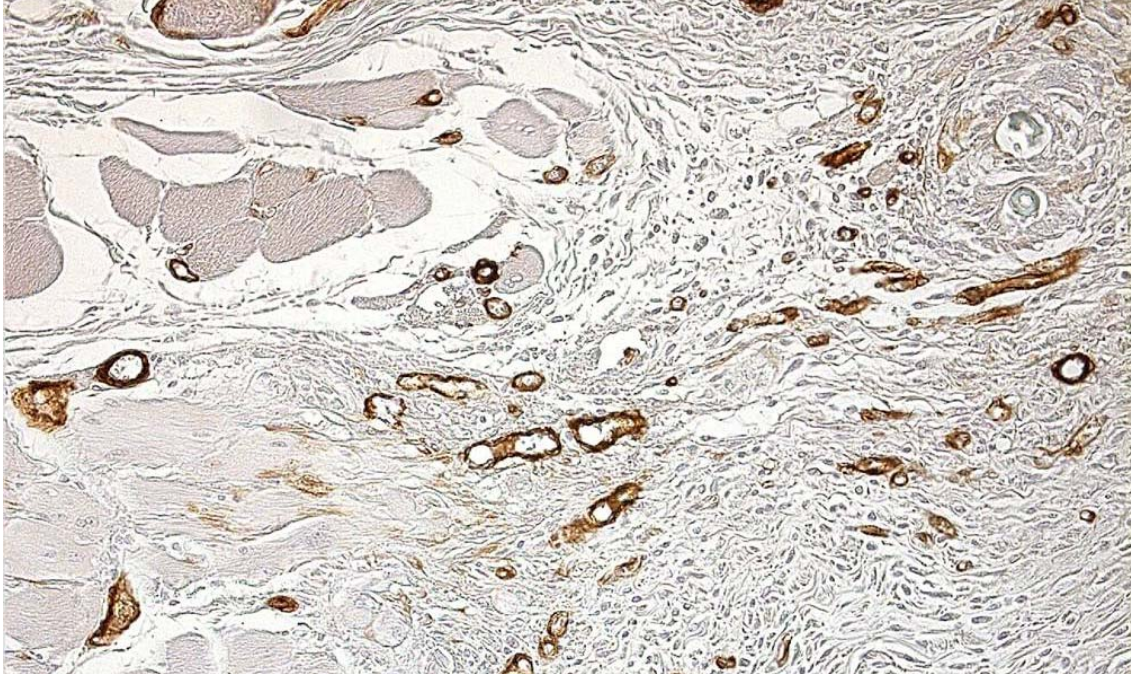


**Abbildung 11:** Mittelwerte und Standardabweichungen der SMA pos. Zellen pro mm<sup>2</sup>.

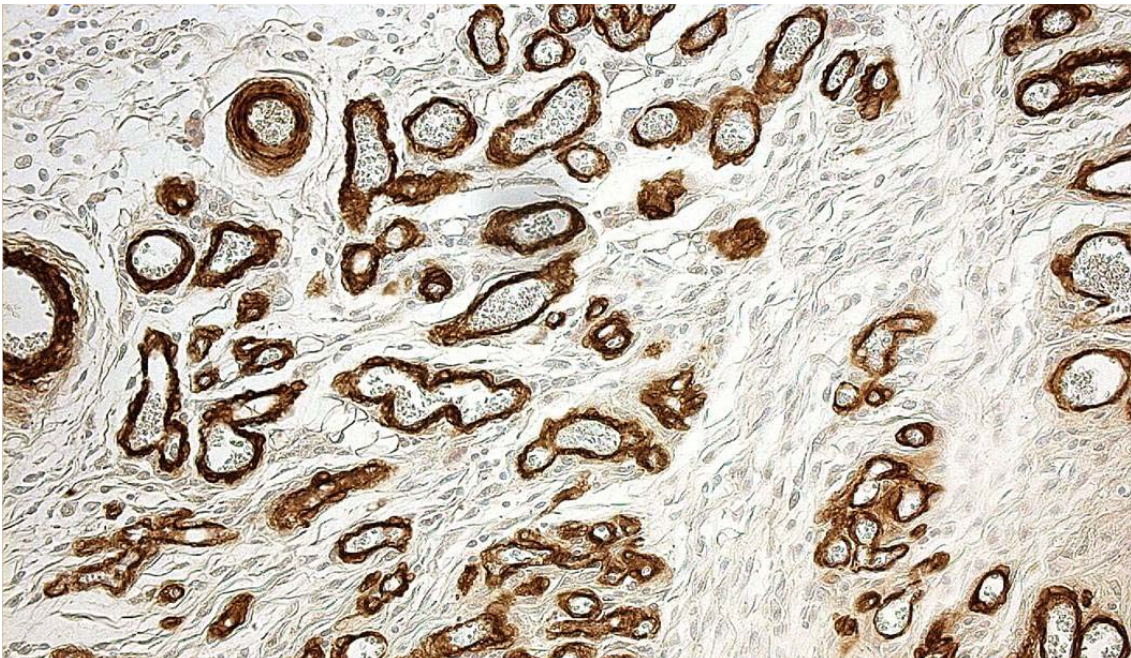
Signifikanzen wurden aus den SMA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> errechnet. Die Applikation von Methylprednisolon führte zu einer signifikant geringeren Zahl an SMA positiven Zellen als bei gesunden Tieren (V-C vs. V: p=0,03). Durch die Behandlung von gesunden Tieren mit dem IGF-I Verband konnte keine zusätzliche Steigerung der Angiogenese erreicht werden (V-I vs. V: p=0,69). Allerdings ließ sich eine signifikante Erhöhung der SMA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> bei mit dem IGF-I Verband behandelten Tieren aus der Kortison Gruppe nachweisen (V-CI vs. V-C: p=0,02). Die mit dem IGF-I Verband behandelten Kortisontiere zeigten schließlich keinen Unterschied zu gesunden Tieren mehr (V-CI vs. V: p= 0,7). Die Behandlung von Tieren aus der Kortisongruppe mit dem in Methylzellulose gelöstem IGF-I konnte im Gegensatz dazu keine Steigerung der SMA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> erbringen (V-C vs. V-CMI: p=0,78).

**Tabelle 8:** Signifikanzen aus den Mittelwerten der SMA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup>.

Vergleichsgruppen	Mittelwerte	p-Werte
V-C vs. V	228 vs. 284	0,03
V-I vs. V	298 vs. 284	0,69
V-CI vs. V-C	275 vs. 228	0,02
V-C vs. V.CMI	228 vs. 218	0,78
V-CI vs. V	275 vs. 284	0,7



**Abbildung 12:** SMA-Färbung des Granulationsgewebes von Tier 4 aus der Kortisongruppe nach Behandlung mit dem Kontrollverband.



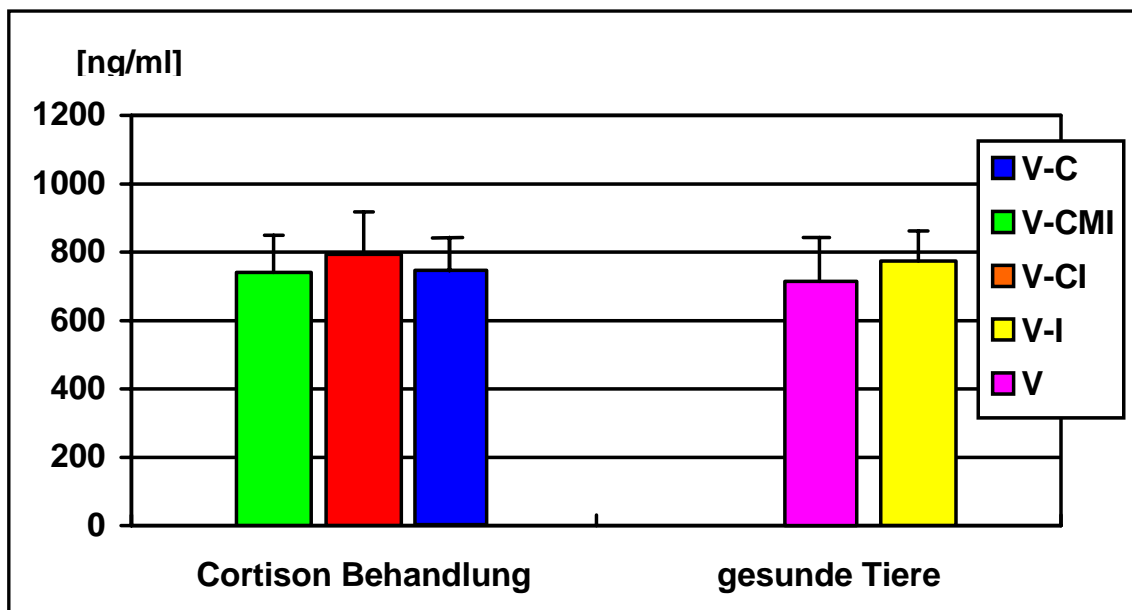
**Abbildung 13:** SMA-Färbung des Granulationsgewebes von Tier 8 aus der Kortisongruppe nach Behandlung mit dem IGF-I Verband.

3.4 Systemischer IGF-Spiegel

Zur Bestimmung des systemischen IGF-I Plasmaspiegels wurden am Versuchsende Blutproben aus dem rechten Vorhof entnommen.

**Tabelle 9:** Mittelwerte, Standardabweichungen, min./max. Werte des systemischen Plasma IGF-I Spiegels bei Versuchsende. Einheit: ng/ml.

Versuchstiergruppe	Mittelwert	SD	Min.	Max.
V	720,6	127,6	544	954
V-I	774,1	87,5	650	887
V-C	749	88,8	636	891
V-CI	793,1	125,27	601	1076
V-CMI	741,9	108,4	618	914



**Abbildung 14:** Mittelwerte und Standardabweichungen des systemischen Plasma IGF-I Spiegels bei Versuchsende.



## Ergebnisse

---

Signifikanzen wurden aus den Plasmaspiegeln des IGF-I in ng/ml bei Versuchsende ermittelt. Bei keiner der Versuchsgruppen konnte zu Versuchsende signifikante Unterschiede der systemischen IGF-I Plasmaspiegel festgestellt werden. Einerseits ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden und cortisonbehandelten Tieren nachweisen (V-C vs. V:  $p=0,562$ ). Andererseits wirkte sich auch die Applikation von IGF-I, sowohl durch den neuen Verband als auch in Methylzellulose Gel gelöst, nicht systemisch auf den IGF-I Plasmaspiegel aus (V-I vs. V:  $p=0,237$ ; V-C vs. V-CMI:  $p=0,984$ ).

**Tabelle 10:** Signifikanzen aus den systemischen IGF-I Plasmaspiegeln bei Versuchsende. Einheit: ng/ml.

Vergleichsgruppen	Mittelwerte	p-Werte
V-C vs. V	749 vs. 720,6	0,562
V-I vs. V	774,1 vs. 720,6	0,237
V-CI vs. V-C	793,1 vs. 749	0,748
V-C vs. V-CMI	749 vs. 741,9	0,984
V-CI vs. V	793,1 vs. 720,6	0,145

## 4 Diskussion

### 4.1 Wundgrößen

Die Wundheilung ist ein komplexes biologisches Phänomen. Eine Vielzahl physiologischer Vorgänge trägt zu einem ungestörten Heilungsprozess bei. So sind die Proteinsynthese, die Ablagerung von Matrixproteinen, die Einwanderung und Replikation von Zellen sowie die Gefäßneubildung elementare Bestandteile einer physiologischen Wundheilung. Noxen unterschiedlichster Ätiologie können nun durch Störung eines oder mehrerer Heilungsvorgänge in den einzelnen Heilungsstadien zu Entwicklung verzögert heilender und letztendlich chronischer Wunden führen.

Im klinischen Alltag gut bekannt sind die verzögert heilenden Wunden chronisch kranker Patienten unter permanenter Therapie mit Kortisonpräparaten. Physiologisch besteht die Hauptaufgabe der Glukokortikoide in der Bereitstellung von Energieträgern (Glukose und Fettsäuren) zur Bewältigung von Stresssituationen. Vor allem aber die antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkungen werden pharmakologisch genutzt und haben größten Einfluss auf die Wundheilung.

So konnten tierexperimentelle Untersuchungen eine dosisabhängige Hemmung der Heilung nach perioperativer Glukokortikoidgabe während der frühen Entzündungsphase des Heilungsverlaufs zeigen.<sup>48</sup> Pathophysiologisch ließ sich ein Mangel an Wachstumsfaktoren unter Cortisontherapie feststellen.<sup>46,111,130</sup>

Dies führte zum Therapiekonzept der Substitution von Wachstumsfaktoren.

Exemplarisch ist hier die Arbeit von Brown<sup>21</sup> zu nennen, bei der erstmals eine echte Verkürzung der Heilungszeit durch die Applikation von rekombinatem EGF erreicht werden konnte. Andere Forschungsgruppen konnten in vitro und im Tierversuch sowohl eine Stimulation der Zellproliferation als auch eine Beschleunigung der Narbenbildung beobachten. Ebenso wurde die gesteigerte Synthese von Matrixproteinen postuliert.<sup>61,98,100,101,105,121,79</sup>

Auch für IGF-I konnte unter Cortisonbehandlung ein Mangel sowohl im Blut als auch in der Wundflüssigkeit nachgewiesen werden.<sup>48,117,137</sup> Dennoch ergaben

Therapieansätze mit lokaler IGF-I Therapie sehr unterschiedliche Ergebnisse. Einerseits wurde eine verbesserte Wundheilung diabetischer oder kortison-induzierter Wunden unter lokaler IGF-I Therapie beobachtet.<sup>16,125</sup> Andererseits konnten diese positiven Effekte der lokalen IGF-I Applikation auf die Wundheilung in weiteren Studien nicht bestätigt werden.<sup>79,86</sup>

In diesem Zusammenhang wurde zur Effektivitätssteigerung der lokalen IGF-I Therapie die kombinierte Gabe mit verschiedenen insulin-like growth factor binding proteins (IGF-BP) untersucht. Hierbei wurde sowohl eine Steigerung<sup>29</sup> als auch Verschlechterung<sup>89</sup> der Wirksamkeit der lokalen IGF-I Therapie festgestellt. Conover beschreibt, dass durch eine Bindung des IGF-I an seine IGF-BP die Downregulation der IGF-I Rezeptoren (IGF-IR) gehemmt werden kann. Hieraus leitet er die Forderung eines Fließgleichgewichtes der IGF-I Besetzung am IGF-IR ab.<sup>31</sup> Allerdings scheint hier das molare Verhältnis von appliziertem IGF-I zu IGF-BP entscheidend zu sein. So konnte nur ein molares Verhältnis von 11:1 und 5:1 signifikant die Wundheilungsparameter der Wunden steigern, wohingegen ein Verhältnis von 1:1 nicht zu einem positiven Effekt führte.<sup>69</sup> In einem Verhältnis von 1:1 scheint das IGF-I am IGF-BP weitgehend komplett gebunden zu sein und erst ab einem molaren Verhältnis von 5:1 IGF-BP:IGF-I können die IGF-BPs durch eine konstante Abgabe von IGF-I, dessen Verfügbarkeit am Rezeptor erhöhen und so zu einem positiven Effekt auf die Wundheilung beitragen.<sup>93, 65</sup> Dieser positive Effekt der IGF-BPs in bestimmten molaren Konzentrationen scheint auf der kontinuierlichen Freisetzung von ungebundenem IGF-I in das Wundmilieu zu basieren. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen, dass ungebundenes IGF-I im Wundmilieu schnell durch Proteasen abgebaut wird,<sup>29</sup> und dass eine hochdosierte lokale IGF-I Applikation zu einer Downregulation der IGF-I Rezeptoren führt.<sup>28</sup> Puolakkainen et al. beschrieben signifikante Unterschiede von lokal applizierten TGF-beta auf die Wundheilung in Abhängigkeit von dem jeweils benutzten Trägersystem.<sup>104</sup> So muss von dem verwendeten Trägersystem gefordert werden, die Bioaktivität des verwendeten Wachstumsfaktors im Wundbereich zu erhöhen, ohne dass es zu einer Downregulation der IGF-I Rezeptoren, zu einem schnellen proteolytischen Abbau des freien IGF-I, sowie zu einem

unnötigen Verlust des Wachstumsfaktors in die Umgebung (z.B. Auslaufen aus dem Wundgebiet, Aufsaugen durch Kompressen) kommt.

Auf diesem Hintergrund entwickelte das Deutsche Zentrum für Biomaterialien und Organersatz (BMOZ) einen Verband bestehend aus zwei Komponenten, der eine kontinuierliche und gezielte Abgabe des Wachstumsfaktors IGF-I ermöglicht. Auf einen Hydrogel Wundverband (Hydrosorb comfort®, Hartmann AG) wurde eine 100 mm<sup>2</sup> große PVA-Folie aufgebracht. In diese PVA-Folie wurde zuvor das IGF-I gleichmäßig so eingearbeitet, dass sich in den verwendeten 100 mm<sup>2</sup> großen PVA Folienabschnitten jeweils 10µg IGF-I befanden. Zudem wurde die Textur der PVA Folie so gestaltet, dass ein Kanalsystem ein möglichst ungestörtes Abfließen des Wundexsudates ermöglichte. In vitro Analysen konnten eine kontinuierliche Freisetzung von 96,6% des eingearbeiteten IGF-I innerhalb der ersten 60 Minuten nachweisen. Danach erfolgte keine weitere signifikante Freisetzung mehr.

In dieser Studie sollte nun untersucht werden, welchen Effekt kontinuierlich und lokal appliziertes IGF-I auf die Wundheilung im Tiermodell hat. Dazu wurden insgesamt 5 Versuchstiergruppen gebildet. Allen Tieren wurden am OP Tag 0,502cm<sup>2</sup> messende Vollhautdefekte im Rückenbereich gesetzt. Zwei der Versuchstiergruppen bestanden aus gesunden Tieren (V und V-I), wobei die Gruppe V mit dem Kontrollverband und die Gruppe V-I mit dem neuen IGF-I Verband behandelt wurde. Man konnte hier zeigen, dass bei gesunden Tieren keine Verbesserung der Wundheilung durch den IGF-I Verband erreicht werden kann. Da es unter Bedingungen der ungestörten physiologischen Wundheilung nicht zu einem Mangel an lokalem IGF-I kommt, entspricht dieses Resultat den zu Grunde liegenden pathophysiologischen Beobachtungen. Bei den drei weiteren Versuchstiergruppen wurden durch die Applikation eines Depot-Kortison-Präparates Wundheilungsstörungen induziert.

Im Einklang mit vielen Studien und klinischen Beobachtungen konnte die Wirksamkeit des Kortisons zur Induktion von Wundheilungsstörungen bestätigt werden. Die Tiere mit Kortisonapplikation und Behandlung durch den Kontrollverband zeigten signifikant größerer Wunden als gesunde Tiere. Der nächsten Gruppe wurde ebenso Kortison appliziert. Hier ließ sich zeigen, dass

durch die lokale Therapie mit kontrolliert abgegebenen IGF-I signifikant kleinere Wunden als im Vergleich zur Therapie mit dem Kontrollverband erreicht werden konnten. Die Verbesserung des Wundheilungsniveaus führte zu einer Aufhebung der Wundheilungsverzögerung. Die Wundheilung von mit dem neuen IGF-I Verband behandelte Kortisoniere unterschied sich statistisch nicht mehr von der Wundheilung gesunder Tiere. Dies bestätigt die Ergebnisse von Suh et. al., der durch lokale Infiltration von Hunt-Schilling Wundkammern mit IGF-I eine deutliche Verbesserung verschiedener Wundheilungsparameter der durch Kortison verzögert heilenden Wunden zeigen konnte.<sup>125</sup> Eine weitere Versuchstiergruppe aus der Kortisonreihe wurde mit in Methylzellulose-Gel gelöstem IGF-I und Kontrollverband behandelt (V-CMI). Auch hier ließ sich eine signifikante Verbesserung der Wundheilung gegenüber Tieren aus der Kortisonreihe, behandelt mit dem Kontrollverband, nachweisen. Allerdings konnte durch den neuen IGF-I Verband mit einer kontinuierlichen IGF-I Abgabe eine signifikant effektivere Verbesserung der Wundheilung erreicht werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von Puolakkainen, der Vollhautwunden bei Ratten mit TGF- $\beta$ 1, gelöst in verschiedenen Trägersystemen, behandelte. Dabei konnte die umfangreichste Steigerung der Wundheilungsparameter mit Hilfe der Trägersubstanz erzielt werden, die konstant den höchsten Prozentsatz des gelösten TGF- $\beta$ 1 abgab.<sup>104</sup> Jyung<sup>69</sup> und Hamon<sup>65</sup> konnten eine signifikante Verbesserung der Wundheilung nur durch Applikation von IGF-I gebunden in bestimmten molaren Verhältnissen an IGF-binding proteins (IGF-BP) feststellen. Dies führten die Autoren darauf zurück, dass vermittelt durch die IGF-BPs ein proteolytischer Abbau des IGF-I sowie eine Downregulation der IGF-I Rezeptoren verhindert werden kann. Zusätzlich dienen die IGF-BPs als Speicher für das IGF-I, aus denen der Wachstumsfaktor zur konstanten Belegung am Rezeptor kontinuierlich abgegeben wird. Die in dieser Studie gewonnen Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch den neuen Verband mit kontinuierlicher lokaler IGF-I Applikation, ähnlich der Therapie mit IGF-I im Komplex mit den IGF-BPs, die kompromittierende Wirkung von Cortison auf die kutane Wundheilung deutlich verringert werden kann. Die Applikationsform ist hierbei entscheidend für die Wirksamkeit des verwendeten Wachstumsfaktors.

### 4.2 Proliferationsverhalten

Auf histologischer Ebene kommt es nach Glukokortikoidgabe zu einer verminderten Entzündungsreaktion aller Immunzellen. So konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung, die Funktion<sup>91,12</sup> und die Gesamtanzahl der Makrophagen/ Monozyten<sup>81</sup> in Wunden durch Glukokortikoidgabe vermindert werden. Barbul et al. konnte nach 75%iger Depletion aller T-Lymphozyten durch Antikörper eine deutliche Hemmung der Heilung zeigen. Durch Gabe von Methylprednisolon konnte im Tiermodell eine signifikante Reduktion der Lymphozyten-Zahl im Granulationsgewebe nachgewiesen werden.<sup>115</sup> Folglich kommt es zu einer Suppression der Matrix-, Kollagen- und Epithelbildung sowie der Angiogenese.<sup>48,125</sup> Mit ein wesentlicher Grund dafür scheint der durch Glukokortikoide vermittelte Mangel an IGF-I darzustellen.<sup>123,93,137</sup> Durch immunhistochemische Anfärbung des Proliferating Cell Nuclear Antigens kann das Proliferationsverhalten in Wunden dargestellt werden. In dieser Studie konnte der proliferationshemmende Effekt von Kortison auf die kutane Wundheilung bestätigt werden. Es ließ sich eine signifikant reduzierte Zahl PCNA positiver Zellen unter Kortisonbehandlung gegenüber gesunden Tieren nachweisen. Korrelierend zu den oben beschriebenen Wundgrößen konnte der proliferationshemmende Effekt von Kortison durch den neuen IGF-I Verband deutlich abgeschwächt werden. Das Proliferationsverhalten der Kortison-Wunden, die mit dem IGF-I Verband behandelt wurden, unterschied sich statistisch nicht mehr von dem Proliferationsniveau der Wunden gesunder Tiere. Durch die Behandlung gesunder Tiere mit dem IGF-I Verband konnte allerdings keine wesentliche Änderung des Proliferationsverhaltens erzielt werden. Das Heilungsverhalten der einzelnen Gruppen bezogen auf die Wundgrößen spiegelt sich also in dem durch die PCNA-Färbung dargestellten Proliferationsverhalten in den Wundrändern wieder. Eine Ausnahme bilden hier allerdings die Tiere aus der Cortisongruppe, die mit dem in Methylzellulose Gel gelösten IGF-I behandelt wurden. Die Wunden dieser Tiere stellten sich zwar am Ende des Versuches signifikant kleiner gegenüber der Kontrollgruppe dar, das Proliferationsniveau entsprach aber dem der mit den Kontrollverband

behandelten Tieren aus der Kortisongruppe. Durch die Therapie mit dem IGF-I Verband konnte ein signifikant höheres Proliferationsverhalten in den Wundrändern der Kortisontiere erreicht werden als durch die Behandlung mit dem in Methylzellulose Gel gelöstem IGF-I. Die glukokortikoidvermittelte Reduzierung der Proliferation konnte durch den IGF-I Verband aufgehoben werden, durch in Methylzellulose Gel gelöstes IGF-I nicht. Es ist also als wahrscheinlich anzusehen, dass ein Grund für die signifikant bessere Heilung unter der Therapie mit dem IGF-I Verband das signifikant höhere Proliferationsniveau der Wunden ist. Die Ursachen für das Ausbleiben der Steigerung Proliferation durch die Therapie des in Methylzellulose Gel gelösten IGF-I bei zugleich signifikant kleineren Wunden gegenüber Cortisontieren, behandelt mit dem Kontrollverband, bleibt ungeklärt. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine gesteigerte Wundkontraktion. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung, dass die biologische Aktivität eines lokal abgegebenen Wachstumsfaktors von dem verwendeten Applikationssystem abhängig ist. So ist es durchaus möglich, dass in dem komplexen Ablauf der Wundheilung einzelne Komponenten in Abhängigkeit des verwendeten Applikationssystems in unterschiedlichem Ausmaß gefördert werden.

### 4.3 Angiogeneese

Für eine ungestörte Wundheilung ist eine suffiziente Angiogeneese essentiell. Bereits in den frühen Wundheilungsphasen erweitern aktivierte Endothelzellen durch Proliferation und Migration das Gefäßnetz. Nach der Bildung eines den Wundraum ausfüllenden Kapillarplexus ist die Ausbildung stabiler Gefäßlumina sowie der Umbau bzw. Erhalt der neu gebildeten Gefäße eine wichtige Komponente. Dem IGF-I kommt in diesen Prozessen entscheidende Bedeutung zu.<sup>83,96</sup>

Hashimoto et al. zeigten nun, dass vor allem durch lokale Glukokortikoidgabe die Neovaskularisation zum Teil drastisch reduziert ist. Diese Ergebnisse konnten durch unsere Studie bestätigt werden. Durch immunhistologische

Färbung des Aktins der glatten Muskelzellen im Granulationsgewebe wurde die Angiogenese dargestellt und ausgewertet. Die Applikation von Methylprednisolon führte zu einer signifikant geringeren Zahl SMA positiver Gefäßlumina verglichen mit gesunden Tieren. Ein Grund für die reduzierte Gefäßneubildung scheint in dem durch Cortison supprimierten IGF-I System liegen zu können. Dies bestätigend ließ sich bei gesunden Tieren mit intaktem IGF-I System durch Therapie mit dem neuen IGF-I Verband keine Verbesserung der Angiogenese erreichen. Die Therapie allerdings von Kortison-Wunden mit dem neuen IGF-I Verband erbrachte eine signifikante Steigerung der Gefäßneubildung. Dies liegt im Einklang mit den Ergebnissen von Chen et al., der durch Therapie mit IGF-I, dessen mitogene Potenz auf die glatten Gefäßmuskelzellen bestätigen und eine signifikante Steigerung der glatten Gefäßmuskelzellen nachweisen konnte.<sup>22</sup> Aber auch der positive Effekt von lokal appliziertem IGF-I auf die Gefäßneubildung scheint von dem verwendeten Trägersystem abhängig zu sein. Denn nur durch die Therapie mit kontrollierter IGF-I Freisetzung konnte die Angiogenese verbessert werden. Die Therapie mit in Methylzellulose Gel gelöstem IGF-I und somit unkontrollierter Freisetzung des Wachstumsfaktors konnte die kortisoninduzierte Supprimierung der Angiogenese nicht aufheben.

#### 4.4 Systemischer IGF-I Spiegel

Bei chronischen Wunden konnte ein lokaler IGF-I Mangel festgestellt werden. Daraus entwickelte sich der Therapieansatz der gezielten IGF-I Substitution. Einige Studien mit systemischer IGF-I Therapie konnten eine Verbesserung der Wundheilung bewirken. Allerdings sind Nebenwirkung wie Hypoglykämie, Elektrolytverschiebungen und Ödembildung zu bedenken.<sup>102</sup> Eine gezielte topische IGF-I Therapie soll zum einen die Effektivität des eingesetzten IGF-I erhöhen als auch die systemischen Nebenwirkungen reduzieren. Zur



Bestimmung des systemischen IGF-I Plasmaspiegels wurde den Tieren bei Versuchsende Blut aus dem rechten Vorhof entnommen.

Es ließen sich bei allen 5 Gruppen keine signifikanten Unterschiede der IGF-I Plasmaspiegel bei Versuchsende feststellen. Einerseits konnte man keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden und cortisonbehandelten Tieren nachweisen. Andererseits wirkte sich auch die Applikation von IGF-I, sowohl durch den neuen Verband als auch in Methylcellulose Gel gelöst, nicht systemisch auf den IGF-I Plasmaspiegel aus. Die ausbleibende Reduzierung des systemischen IGF-I Spiegels unter Kortisontherapie kann bedeuten, dass die in diesem Versuch gewählte Dosierung des Kortisondepot-Präparates nicht ausreichte den systemischen IGF-I Spiegel zu supprimieren. Da aber die Kortisontherapie signifikant größere Wunden gegenüber gesunden Tieren ergab scheint es wahrscheinlicher zu sein, dass am 7. postoperativen Tag bereits wieder eine Normalisierung des systemischen IGF-I Spiegels eingetreten und eine Veränderung des Spiegels nicht mehr messbar war. Eine Veränderung des systemischen IGF-I Spiegels am Versuchsende durch topische IGF-I Therapie konnte nicht nachgewiesen werden.

## 5 Zusammenfassung

Wachstumsfaktoren sind für den ungestörten Ablauf der Wundheilung von entscheidender Bedeutung. Folglich entwickelte sich aus der Beobachtung des lokalen und systemischen Mangels an Wachstumsfaktoren bei chronischen Wunden der Therapieansatz der gezielten Substitution einzelner Faktoren. Die experimentelle lokale Therapie mit IGF-I ergab jedoch recht widersprüchliche Ergebnisse. So scheinen die verwendeten Trägersysteme und die jeweils damit verbundene Applikationskinetik von entscheidender Bedeutung für die Wirksamkeit einer lokalen IGF-I Therapie zu sein.

Hierzu entwickelte das Deutsche Zentrum für Biomaterialien und Organersatz ein Verbandsystem, bestehend aus zwei Komponenten, das eine kontinuierliche und gezielte Abgabe des Wachstumsfaktors IGF-I ermöglicht. Durch die kontinuierliche Freisetzung soll eine Downregulation des IGF-I Rezeptors sowie ein proteolytischer Abbau von ungebundenen IGF-I verhindert werden. Außerdem ermöglicht das Verbandsystem eine gezielte lokale Therapie mit IGF-I. Ein Auslaufen aus dem Wundgebiet und ein Aufsaugen durch Verbandsmaterialien werden so verhindert.

40 männlichen Sprague-Dawley Ratten wurden 0,502 cm<sup>2</sup> große Vollhautdefekte am Rücken induziert. Diese Tiere wurden in fünf Gruppen eingeteilt. Die ersten beiden Gruppen bestanden aus gesunden Tieren, die mit dem neuen Verband ohne IGF-I (Kontrollverband) (V, n=5) und mit dem neuen Verband mit IGF-I (V-I, n=5) behandelt wurden. Den anderen 30 Tieren applizierte man zur Induktion von Wundheilungsstörungen ein Depot-Kortison Präparat subkutan. Es wurden drei Gruppen bestehend aus jeweils 10 Tieren gebildet. Dabei behandelte man eine Gruppe mit dem Kontrollverband (V-C, n=10), eine mit dem neuen IGF-I Verband (V-CI, n=10) und eine mit in Methylzellulose Gel gelöstem IGF-I und Kontrollverband (V-CMI, n=10). Bei allen Tieren wurden täglich Verbandswechsel durchgeführt. Nach 7 Tagen erfolgte das Versuchsende, das Ausmessen der Wunden, die Tötung der Tiere und die anschließende histologische Aufarbeitung.

Die Behandlung gesunder Tiere mit dem neuen IGF-I Verband erbrachte sowohl bezogen auf die Wundgröße (V-I vs. V;  $p=0,84$ ), als auch bezogen auf die PCNA- (V vs. V-I,  $p=0,095$ ) und die SMA-Expression (V-I vs. V:  $p=0,69$ ) keine Verbesserung der Wundheilung. Das Modell zur Induktion von Wundheilungsstörungen durch präoperative Kortisonapplikation konnte bestätigt werden. Auf histologischer Ebene erklärt eine verminderte Proliferations- (V vs. V-C,  $p=0,002$ ) und Gefäßneubildungsrate (V-C vs. V:  $p=0,03$ ) einen Aspekt der cortisoninduzierten Wundheilungsstörung. Die Behandlung der durch Cortisonapplikation verzögert heilenden Defekte mit dem neuen IGF-I Verband erbrachte signifikant kleinere Wunden als die Behandlung mit dem Kontrollverband (V-CI vs. V-C, 23,7 vs. 44,5;  $p=0,0001$ ). Sowohl die Wundgrößen (V-CI vs. V:  $p=0,662$ ) als auch die Zellproliferationsrate (V vs. V-CI,  $p=0,254$ ) und die Angiogenese (V-CI vs. V:  $p=0,7$ ) von gesunden und von mit dem neuen IGF-I Verband behandelten Kortisontieren unterschieden sich statistisch nicht mehr von einander. Auch durch die Behandlung von Kortisontieren mit dem in Methylzellulose gelöstem IGF-I und Kontrollverband konnte eine signifikante Wundheilungsverbesserung erreicht werden (V-CMI vs. V-C:  $p=0,0001$ ). Allerdings erwies sich die Behandlung mit dem neuen IGF-I Verband als signifikant effektiver gegenüber der Behandlung mit in Methylzellulose gelöstem IGF-I (V-CI vs. V-CMI:  $p=0,031$ ). Dies kann dadurch begründet sein, dass die Applikation von IGF-I durch ein Methylzellulose Gel die Proliferation (V-C vs. V-CMI,  $p=0,481$ ) und die Angiogenese nicht signifikant verbessern konnte (V-C vs. V-CMI:  $p=0,78$ ).

Die kontinuierliche lokale Applikation des IGF-I durch ein neues Verbandssystem erwies sich gegenüber einer lokalen Therapie mit unkontrollierter IGF-I Freisetzung signifikant überlegen. Die Beurteilung der Wirksamkeit einer lokalen IGF-I Therapie kann nur unter Berücksichtigung der jeweiligen Applikationsform erfolgen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ando, Y. and Jensen, P. J. (1993)  
Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration  
J.Invest Dermatol. 100(5),633-639.
2. Andresen, J. L. and Ehlers, N. (1998)  
Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta  
Curr.Eye Res. 17(1),79-87.
3. Andresen, J. L., Ledet, T., Ehlers, N. (1997)  
Keratocyte migration and peptide growth factors: the effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-I, aFGF and TGF-beta on human keratocyte migration in a collagen gel  
Curr.Eye Res. 16(6),605-613.
4. Bailey, A. J., Sims, T. J., Lous, Le. , Bazin, S. (1975)  
Collagen polymorphism in experimental granulation tissue  
Biochem.Biophys.Res.Commun. 66(4),1160-1165.
5. Barbul, A. and Regan, M.C. (1995)  
Immune involvement in wound healing  
Otolaryngol Clin North Am. 28(5):955-68.
6. Barnes, M. J. (1975)  
Function of ascorbic acid in collagen metabolism  
Ann.N.Y.Acad.Sci. 258:264-77.,264-277.
7. Barreca, A., De Luca, M., Del Monte, P., Bondanza, S., Damonte, G., Cariola, G., Di Marco, E., Giordano, G., Cancedda, R., Minuto, F. (1992)  
In vitro paracrine regulation of human keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-like growth factors  
J.Cell Physiol. 151(2),262-268.
8. Barreca, A., Larizza, D., Damonte, G., Arvigo, M., Ponzani, P., Cesarone, A., Lo, Curto F., Severi, F., Giordano, G., Minuto, F. (1997)  
Insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) and IGF-binding protein-3 production by fibroblasts of patients with Turner's syndrome in culture  
J.Clin.Endocrinol.Metab. 82(4),1041-1046.

9. Batch, J. A., Mercuri, F. A., Edmondson, S. R., Werther, G. A. (1994)  
Localization of messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factor-binding proteins in human skin by in situ hybridization  
*J.Clin.Endocrinol.Metab.* 79(5),1444-1449.
10. Baxter, R. C. (1994)  
Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review  
*Horm.Res.* 42(4-5),140-144.
11. Baxter, R. C. (2000)  
Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities  
*Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* 278(6),E967-E976.
12. Baybutt, H. N. and Holsboer, F. (1990)  
Inhibition of macrophage differentiation and function by cortisol  
*Endocrinology.* 127(1),476-480.
13. Bennett, N. T. and Schultz, G. S. (1993)  
Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors  
*Am.J.Surg.* 165(6),728-737.
14. Bentley, J. P. (1967)  
Rate of chondroitin sulfate formation in wound healing  
*Ann.Surg.* 165(2),186-191.
15. Bhora, F. Y., Dunkin, B. J., Batzri, S., Aly, H. M., Bass, B. L., Sidawy, A. N., Harmon, J. W. (1995)  
Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin  
*J.Surg.Res.* 59(2),236-244.
16. Bitar, M. S. (1997)  
Insulin-like growth factor-1 reverses diabetes-induced wound healing impairment in rats  
*Horm.Metab Res.* 29(8),383-386.
17. Bitar, M. S., Pilcher, C. W., Khan, I., Waldbillig, R. J. (1997)  
Diabetes-induced suppression of IGF-1 and its receptor mRNA levels in rat superior cervical ganglia  
*Diabetes Res.Clin.Pract.* 38(2),73-80.
18. Blakytyn, R., Jude, E. B., Martin, Gibson J., Boulton, A. J., Ferguson, M. W. (2000)  
Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers  
*J.Pathol.* 190(5),589-594.

19. Boisclair, Y. R., Rhoads, R. P., Ueki, I., Wang, J., Ooi, G. T. (2001)  
The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex:  
an important but forgotten component of the circulating IGF system  
*J.Endocrinol.* 170(1),63-70.
20. Brown, D. L., Kane, C. D., Chernausek, S. D., Greenhalgh, D. G. (1997)  
Differential expression and localization of insulin-like growth factors I and II  
in cutaneous wounds of diabetic and nondiabetic mice  
*Am.J.Pathol.* 151(3),715-724.
21. Brown, G. L., Nanney, L. B., Griffen, J., Cramer, A. B., Yancey, J. M.,  
Curtsinger, L. J., III, Holtzin, L., Schultz, G. S., Jurkiewicz, M. J., Lynch, J.  
B. (1989)  
Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth  
factor  
*N.Engl.J.Med.* 321(2),76-79.
22. Chen, Y., Capron, L., Magnusson, J. O., Wallby, L. A., Arnqvist, H. J.  
(1998)  
Insulin-like growth factor-I stimulates vascular smooth muscle cell  
proliferation in rat aorta in vivo  
*Growth Horm.IGF.Res.* 8(4),299-303.
23. Cherry, G. W., Hughes, M. A., Kingsnorth, A. N., Arnold, F. W. (1994)  
Wound Healing  
in Morris, P.J.: *Oxford Textbook of Surgery, Vol.1*, 3-23  
4. Aufl., Oxford University Press, New York,3-23.
24. Ciano, P. S., Colvin, R. B., Dvorak, A. M., McDonagh, J., Dvorak, H. F.  
(1986)  
Macrophage migration in fibrin gel matrices  
*Lab Invest* 54(1),62-70.
25. Clark, R. A. (1985)  
Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I  
*J.Am.Acad.Dermatol.* 13(5 Pt 1),701-725.
26. Clark, R. A. (1993)  
Basics of cutaneous wound repair  
*J.Dermatol.Surg.Oncol.* 19(8),693-706.
27. Clark, R. A. (1993)  
Biology of dermal wound repair  
*Dermatol.Clin.* 11(4),647-666.
28. Clemmons, D. R. (1992)  
IGF binding proteins: regulation of cellular actions  
*Growth Regul.* 2(2),80-87.

29. Conover, C. A. (1992)  
Potentiation of insulin-like growth factor (IGF) action by IGF-binding protein-3: studies of underlying mechanism  
Endocrinology. 130(6),3191-3199.
30. Conover, C. A., Hintz, R. L., Rosenfeld, R. G. (1987)  
Impaired synergism between somatomedin C/insulin-like growth factor I and dexamethasone in the growth of fibroblasts from a patient with insulin resistance  
Pediatr.Res. 22(2),188-191.
31. Conover, C. A., Ronk, M., Lombana, F., Powell, D. R. (1990)  
Structural and biological characterization of bovine insulin-like growth factor binding protein-3  
Endocrinology. 127(6),2795-2803.
32. Conover, C. A., Rosenfeld, R. G., Hintz, R. L. (1986)  
Hormonal control of the replication of human fetal fibroblasts: role of somatomedin C/insulin-like growth factor I  
J.Cell Physiol. 128(1),47-54.
33. Cook, P. W., Pittelkow, M. R., Shipley, G. D. (1991)  
Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes: production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors  
J.Cell Physiol. 146(2),277-289.
34. D'Ambrosio, C., Ferber, A., Resnicoff, M., Baserga, R. (1996)  
A soluble insulin-like growth factor I receptor that induces apoptosis of tumor cells in vivo and inhibits tumorigenesis  
Cancer Res. 56(17),4013-4020.
35. D'Ambrosio, C., Valentinis, B., Prisco, M., Reiss, K., Rubini, M., Baserga, R. (1997)  
Protective effect of the insulin-like growth factor I receptor on apoptosis induced by okadaic acid  
Cancer Res. 57(15),3264-3271.
36. Daughaday, W. H. and Rotwein, P. (1989)  
Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations  
Endocr.Rev. 10(1),68-91.
37. De Mellow, J. S. and Baxter, R. C. (1988)  
Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-I-stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts  
Biochem.Biophys.Res.Commun. 156(1),199-204.

38. Delhanty, P. J., Hill, D. J., Shimasaki, S., Han, V. K. (1993)  
Insulin-like growth factor binding protein-4, -5 and -6 mRNAs in the human fetus: localization to sites of growth and differentiation?  
Growth Regul. 3(1),8-11.
39. Derynck, R. (1988)  
Transforming growth factor alpha  
Cell 54(5),593-595.
40. Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., Gabbiani, G. (1995)  
Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar  
Am.J.Pathol. 146(1),56-66.
41. Dews, M., Nishimoto, I., Baserga, R. (1997)  
IGF-I receptor protection from apoptosis in cells lacking the IRS proteins  
Recept.Signal.Transduct. 7(4),231-240.
42. Diegelmann, R. F., Rothkopf, L. C., Cohen, I. K. (1975)  
Measurement of collagen biosynthesis during wound healing  
J.Surg.Res. 19(4),239-243.
43. DiGiovanni, J., Bol, D. K., Wilker, E., Beltran, L., Carbajal, S., Moats, S., Ramirez, A., Jorcano, J., Kiguchi, K. (2000)  
Constitutive expression of insulin-like growth factor-1 in epidermal basal cells of transgenic mice leads to spontaneous tumor promotion  
Cancer Res. 60(6),1561-1570.
44. Doherty, D. E., Haslett, C., Tonnesen, M. G., Henson, P. M. (1987)  
Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium  
J.Immunol. 138(6),1762-1771.
45. Doillon, C. J., Dunn, M. G., Bender, E., Silver, F. H. (1985)  
Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness  
Coll.Relat Res. 5(6),481-492.
46. Edmondson, S. R., Russo, V. C., McFarlane, A. C., Wraight, C. J., Werther, G. A. (1999)  
Interactions between growth hormone, insulin-like growth factor I, and basic fibroblast growth factor in melanocyte growth  
J.Clin.Endocrinol.Metab. 84(5),1638-1644.



47. Edmondson, S. R., Werther, G. A., Russell, A., LeRoith, D., Roberts, C. T., Jr., Beck, F. (1995)  
Localization of growth hormone receptor/binding protein messenger ribonucleic acid (mRNA) during rat fetal development: relationship to insulin-like growth factor-I mRNA  
Endocrinology. 136(10),4602-4609.
48. Ehrlich, H. P. and Hunt, T. K. (1968)  
Effects of cortisone and vitamin A on wound healing  
Ann.Surg. 167(3),324-328.
49. Fernandez, H. N., Henson, P. M., Otani, A., Hugli, T. E. (1978)  
Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions  
J.Immunol. 120(1),109-115.
50. Finch, P. W., Rubin, J. S., Miki, T., Ron, D., Aaronson, S. A. (1989)  
Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth  
Science 245(4919), 752-755.
51. Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987)  
Vascular physiology. A family of angiogenic peptides  
Nature 329(6141), 671-672.
52. Froesch, E. R., Buergi, H., Ramseier, E. B., Bally, P., Labhart, A. (1963)  
Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity  
J.Clin.Invest. 42:1816-34.,1816-1834.
53. Furie, B. and Furie, B. C. (1988)  
The molecular basis of blood coagulation  
Cell 20;53(4),505-518.
54. Gabbiani, G., Chaponnier, C., Huttner, I. (1978)  
Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing  
J.Cell Biol. 76(3),561-568.
55. Gartner, M. H., Benson, J. D., Caldwell, M. D. (1992)  
Insulin-like growth factors I and II expression in the healing wound  
J.Surg.Res. 52(4),389-394.
56. Ghahary, A., Shen, Q., Shen, Y. J., Scott, P. G., Tredget, E. E. (1998)  
Induction of transforming growth factor beta 1 by insulin-like growth factor-1 in dermal fibroblasts  
J.Cell Physiol. 174(3),301-309.

57. Ghahary, A., Shen, Y. J., Nedelec, B., Scott, P. G., Tredget, E. E. (1995)  
Enhanced expression of mRNA for insulin-like growth factor-1 in post-burn hypertrophic scar tissue and its fibrogenic role by dermal fibroblasts  
*Mol.Cell Biochem.* 148(1),25-32.
58. Ghahary, A., Tredget, E. E., Mi, L., Yang, L. (1999)  
Cellular response to latent TGF-beta1 is facilitated by insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptors on MS-9 cells  
*Exp.Cell Res.* 251(1),111-120.
59. Ghahary, A., Tredget, E. E., Shen, Q. (1999)  
Insulin-like growth factor-II/mannose 6 phosphate receptors facilitate the matrix effects of latent transforming growth factor-beta1 released from genetically modified keratinocytes in a fibroblast/keratinocyte co-culture system  
*J.Cell Physiol.* 180(1),61-70.
60. Gillery, P., Leperre, A., Maquart, F. X., Borel, J. P. (1992)  
Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates protein synthesis and collagen gene expression in monolayer and lattice cultures of fibroblasts  
*J.Cell Physiol.* 152(2),389-396.
61. Greenhalgh, D. G., Sprugel, K. H., Murray, M. J., Ross, R. (1990)  
PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse  
*Am.J.Pathol.* 136(6),1235-1246.
62. Grinnell, F., Feld, M., Minter, D. (1980)  
Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin)  
*Cell* 19(2),517-525.
63. Grotendorst, G. R., Soma, Y., Takehara, K., Charette, M. (1989)  
EGF and TGF-alpha are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration  
*J.Cell Physiol.* 139(3),617-623.
64. Hammar, H. (1993)  
Wound healing  
*Int.J.Dermatol.* 32(1),6-15.
65. Hamon, G. A., Hunt, T. K., Spencer, E. M. (1993)  
In vivo effects of systemic insulin-like growth factor-I alone and complexed with insulin-like growth factor binding protein-3 on corticosteroid suppressed wounds  
*Growth Regul.* 3(1),53-56.

66. Herlyn, M., Mancianti, M. L., Jambrosic, J., Bolen, J. B., Koprowski, H. (1988)  
Regulatory factors that determine growth and phenotype of normal human melanocytes  
Exp.Cell Res. 179(2),322-331.
67. Hodak, E., Gottlieb, A. B., Anzilotti, M., Krueger, J. G. (1996)  
The insulin-like growth factor 1 receptor is expressed by epithelial cells with proliferative potential in human epidermis and skin appendages: correlation of increased expression with epidermal hyperplasia  
J.Invest Dermatol. 106(3),564-570.
68. Jones, J. I. and Clemmons, D. R. (1995)  
Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions  
Endocr.Rev. 16(1),3-34.
69. Jyung, R. W., Mustoe, J. A., Busby, W. H., Clemmons, D. R. (1994)  
Increased wound-breaking strength induced by insulin-like growth factor I in combination with insulin-like growth factor binding protein-1  
Surgery. 115(2),233-239.
70. Kanter-Lewensohn, L., Dricu, A., Girnita, L., Wejde, J., Larsson, O. (2000)  
Expression of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and p27Kip1 in melanocytic tumors: a potential regulatory role of IGF-1 pathway in distribution of p27Kip1 between different cyclins  
Growth Factors. 17(3),193-202.
71. Kaplan, A. P., Ghebrehiwet, B., Silverberg, M., Sealey, J. E. (1981)  
The intrinsic coagulation-kinin pathway, complement cascades, plasma renin-angiotensin system, and their interrelationships  
Crit Rev.Immunol. 3(1),75-93.
72. Katz, M. H., Alvarez, A. F., Kirsner, R. S., Eaglstein, W. H., Falanga, V. (1991)  
Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth  
J.Am.Acad.Dermatol. 25(6 Pt 1),1054-1058.
73. Knox, P., Crooks, S., Rimmer, C. S. (1986)  
Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots  
J.Cell Biol. 102(6),2318-2323.
74. Koedam, J. A., Meijers, J. C., Sixma, J. J., Bouma, B. N. (1988)  
Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor  
J.Clin.Invest. 82(4),1236-1243.

75. Krane, J. F., Murphy, D. P., Carter, D. M., Krueger, J. G. (1991)  
Synergistic effects of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor I/somatomedin C (IGF-I) on keratinocyte proliferation may be mediated by IGF-I transmodulation of the EGF receptor  
*J.Invest Dermatol.* 96(4),419-424.
76. Kuhn, C., Hurwitz, S. A., Kumar, M. G., Cotton, J., Spandau, D. F. (1999)  
Activation of the insulin-like growth factor-1 receptor promotes the survival of human keratinocytes following ultraviolet B irradiation  
*Int.J.Cancer.* 80(3),431-438.
77. Kurkinen, M., Vaheri, A., Roberts, P. J., Stenman, S. (1980)  
Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue  
*Lab Invest.* 43(1),47-51.
78. Lanir, N., Ciano, P. S., Van de Water L., McDonagh, J., Dvorak, A. M., Dvorak, H. F. (1988)  
Macrophage migration in fibrin gel matrices. II. Effects of clotting factor XIII, fibronectin, and glycosaminoglycan content on cell migration  
*J.Immunol.* 140(7),2340-2349.
79. Lawrence, W. T., Norton, J. A., Sporn, M. B., Gorschboth, C., Grotendorst, G. R. (1986)  
The reversal of an Adriamycin induced healing impairment with chemoattractants and growth factors  
*Ann.Surg.* 203(2),142-147.
80. Le Roith, D. (1997)  
Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center.  
Insulin-like growth factors  
*N.Engl.J.Med.* 336(9),633-640.
81. Leibovich, S. J. and Ross, R. (1975)  
The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum  
*Am.J.Pathol.* 78(1),71-100.
82. Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J., Efstratiadis, A. (1993)  
Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (IGF-1) and type 1 IGF receptor (IGF1R)  
*Cell.* 75(1),59-72.
83. Lopez-Lopez, C., LeRoith, D., Torres-Aleman, I. (2004)  
Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101(26),9833-9838.

84. Loskutoff, D. J. and Edgington, T. E. (1977)  
Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 74(9),3903-3907.
85. Lund, P. K., Moats-Staats, B. M., Hynes, M. A., Simmons, J. G., Jansen, M., D'Ercole, A. J., Van Wyk, J. J. (1986)  
Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues  
J.Biol.Chem. 261(31),14539-14544.
86. Lynch, S. E., Colvin, R. B., Antoniades, H. N. (1989)  
Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds  
J.Clin.Invest. 84(2),640-646.
87. Madden, J. W. and Peacock, E. E., Jr. (1968)  
Studies on the biology of collagen during wound healing. Rate of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat  
Surgery. 64(1),288-294.
88. Marikovsky, M., Vogt, P., Eriksson, E., Rubin, J. S., Taylor, W. G., Joachim, S., Klagsbrun, M. (1996)  
Wound fluid-derived heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growth factor-I for Balb/MK keratinocyte proliferation  
J.Invest Dermatol. 106(4),616-621.
89. McCusker, R. H., Busby, W. H., Dehoff, M. H., Camacho-Hubner, C., Clemmons, D. R. (1991)  
Insulin-like growth factor (IGF) binding to cell monolayers is directly modulated by the addition of IGF-binding proteins  
Endocrinology. 129(2),939-949.
90. Miller, E. J. (1976)  
Biochemical characteristics and biological significance of the genetically-distinct collagens  
Mol.Cell Biochem. 13(3),165-192.
91. Mohan, S. and Baylink, D. J. (2002)  
IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms  
J.Endocrinol. 175(1),19-31.
92. Moncada, S., Gryglewski, R. J., Bunting, S., Vane, J. R. (1976)  
A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (prostaglandin X) which prevents platelet aggregation  
Prostaglandins. 12(5),715-737.

93. Mueller, R. V., Hunt, T. K., Tokunaga, A., Spencer, E. M. (1994)  
The effect of insulin-like growth factor I on wound healing variables and macrophages in rats  
Arch.Surg. 129(3),262-265.
94. Mueller-Esterl, W. (1989)  
Kininogens, kinins and kinships  
Thromb.Haemost. 61(1),2-6.
95. Neely, E. K., Morhenn, V. B., Hintz, R. L., Wilson, D. M., Rosenfeld, R. G. (1991)  
Insulin-like growth factors are mitogenic for human keratinocytes and a squamous cell carcinoma  
J.Invest Dermatol. 96(1),104-110.
96. Nicosia, R. F., Nicosia, S. V., Smith, M. (1994)  
Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro  
Am.J.Pathol. 145(5),1023-1029.
97. Nissley, S. P. and Rechler, M. M. (1984)  
Somatomedin/insulin-like growth factor tissue receptors  
Clin.Endocrinol.Metab. 13(1),43-67.
98. O'Keefe, E. J., Chiu, M. L., Payne, R. E., Jr. (1988)  
Stimulation of growth of keratinocytes by basic fibroblast growth factor  
J.Invest Dermatol. 90(5),767-769.
99. Phillips, T. J. and Dover, J. S. (1991)  
Leg ulcers  
J.Am.Acad.Dermatol. 25(6 Pt 1),965-987.
100. Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Deuel, T. F. (1988)  
Transforming growth factor beta induces increased directed cellular migration and tissue repair in rats  
Prog.Clin.Biol.Res. 266:93-102.,93-102.
101. Pierce, G. F., Vande, Berg J., Rudolph, R., Tarpley, J., Mustoe, T. A. (1991)  
Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds  
Am.J.Pathol. 138(3),629-646.
102. Pierre, E. J., Perez-Polo, J. R., Mitchell, A. T., Matin, S., Foyt, H. L., Herndon, D. N. (1997)  
Insulin-like growth factor-I liposomal gene transfer and systemic growth hormone stimulate wound healing  
J.Burn Care Rehabil. 18(4),287-291.

103. Prisco, M., Hongo, A., Rizzo, M. G., Sacchi, A., Baserga, R. (1997)  
The insulin-like growth factor I receptor as a physiologically relevant target of p53 in apoptosis caused by interleukin-3 withdrawal  
*Mol.Cell Biol.* 17(3),1084-1092.
104. Puolakkainen, P. A., Twardzik, D. R., Ranchalis, J. E., Pankey, S. C., Reed, M. J., Gombotz, W. R. (1995)  
The enhancement in wound healing by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) depends on the topical delivery system  
*J.Surg.Res.* 58(3),321-329.
105. Quaglino, D., Jr., Nanney, L. B., Kennedy, R., Davidson, J. M. (1990)  
Transforming growth factor-beta stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin. I. Excisional wound model  
*Lab Invest.* 63(3),307-319.
106. Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J., Werb, Z. (1988)  
Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping  
*Science.* 241(4866),708-712.
107. Reed, M. J., Puolakkainen, P., Lane, T. F., Dickerson, D., Bornstein, P., Sage, E. H. (1993)  
Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization  
*J.Histochem.Cytochem.* 41(10),1467-1477.
108. Resnicoff, M., Abraham, D., Yutanawiboonchai, W., Rotman, H. L., Kajstura, J., Rubin, R., Zoltick, P., Baserga, R. (1995)  
The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo  
*Cancer Res.* 55(11),2463-2469.
109. Resnicoff, M., Burgaud, J. L., Rotman, H. L., Abraham, D., Baserga, R. (1995)  
Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors  
*Cancer Res.* 55(17),3739-3741.
110. Rinderknecht, E. and Humbel, R. E. (1978)  
The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin  
*J.Biol.Chem.* 253(8),2769-2776.
111. Ristow, H. J. and Messmer, T. O. (1988)  
Basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I are strong mitogens for cultured mouse keratinocytes  
*J.Cell Physiol.* 137(2),277-284.

112. Roesel, J. F. and Nanney, L. B. (1995)  
Assessment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair  
J.Surg.Res. 58(5),449-459.
113. Ross, R., Bowen-Pope, D. F., Raines, E. W. (1990)  
Platelet-derived growth factor and its role in health and disease  
Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci. 327(1239),155-169.
114. Rudman, S. M., Philpott, M. P., Thomas, G. A., Kealey, T. (1997)  
The role of IGF-I in human skin and its appendages: morphogen as well as mitogen?  
J.Invest Dermatol. 109(6),770-777.
115. Salmela, K., Roberts, P. J., Lautenschlager, I., Ahonen, J. (1980)  
The effect of local methylprednisolone on granulation tissue formation. II. Mechanisms of action  
Acta Chir Scand. 146(8),541-544.
116. Salmon, W. D., Jr. and Daughaday, W. H. (1957)  
A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro  
J.Lab Clin.Med. 49(6),825-836.
117. Sandberg, N. (1964)  
Time relationship between administration of cortisone and wound healing in rats  
Acta Chir Scand. 127:446-55.,446-455.
118. Scharffetter, K., Kulozik, M., Stolz, W., Lankat-Buttgereit, B., Hatamochi, A., Sohnchen, R., Krieg, T. (1989)  
Localization of collagen alpha 1(I) gene expression during wound healing by in situ hybridization  
J.Invest Dermatol. 93(3),405-412.
119. Schedlich, L. J. and Graham, L. D. (2002)  
Role of insulin-like growth factor binding protein-3 in breast cancer cell growth  
Microsc.Res.Tech. 59(1),12-22.
120. Schultz, G. S., White, M., Mitchell, R., Brown, G., Lynch, J., Twardzik, D. R., Todaro, G. J. (1987)  
Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor-alpha and vaccinia growth factor  
Science 235(4786),350-352.



121. Sporn, M. B. and Roberts, A. B. (1992)  
Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges  
*J.Cell Biol.* 119(5),1017-1021.
122. Steenfos, H. H., Hunt, T. K., Scheuenstuhl, H., Goodson, W. H., III. (1989)  
Selective effects of tumor necrosis factor-alpha on wound healing in rats  
*Surgery.* 106(2),171-175.
123. Stern, D. M., Bank, I., Nawroth, P. P., Cassimeris, J., Kisiel, W., Fenton, J. W., Dinarello, C., Chess, L., Jaffe, E. A. (1985)  
Self-regulation of procoagulant events on the endothelial cell surface  
*J.Exp.Med.* 162(4),1223-1235.
124. Suh, D. Y., Hunt, T. K., Spencer, E. M. (1992)  
Insulin-like growth factor-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats  
*Endocrinology.* 131(5),2399-2403.
125. Tamm, I. and Kikuchi, T. (1991)  
Activation of signal transduction pathways protects quiescent Balb/c-3T3 fibroblasts against death due to serum deprivation  
*J.Cell Physiol.* 148(1),85-95.
126. Tavakkol, A., Elder, J. T., Griffiths, C. E., Cooper, K. D., Talwar, H., Fisher, G. J., Keane, K. M., Foltin, S. K., Voorhees, J. J. (1992)  
Expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-1 receptor mRNA and proteins in human skin  
*J.Invest Dermatol.* 99(3),343-349.
127. Tavakkol, A., Varani, J., Elder, J. T., Zouboulis, C. C. (1999)  
Maintenance of human skin in organ culture: role for insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor  
*Arch.Dermatol.Res.* 291(12),643-651.
128. Telasky, C., Tredget, E. E., Shen, Q., Khorramizadeh, M. R., Iwashina, T., Scott, P. G., Ghahary, A. (1998)  
IFN-alpha2b suppresses the fibrogenic effects of insulin-like growth factor-1 in dermal fibroblasts  
*J.Interferon Cytokine Res.* 18(8),571-577.
129. Thorsson, A. V., Hintz, R. L., Enberg, G., Hall, K. (1985)  
Characterization of insulin-like growth factor II binding to human fibroblast monolayer cultures  
*J.Clin.Endocrinol.Metab.* 60(2),387-391.
130. Tsuboi, R., Sato, C., Shi, C. M., Ogawa, H. (1992)  
Stimulation of keratinocyte migration by growth factors  
*J.Dermatol.* 19(11),652-653.

131. Usuki, K., Heldin, N. E., Miyazono, K., Ishikawa, F., Takaku, F., Westermark, B., Heldin, C. H. (1989)  
Production of platelet-derived endothelial cell growth factor by normal and transformed human cells in culture  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 86(19),7427-7431.
132. Vardy, D. A., Kari, C., Lazarus, G. S., Jensen, P. J., Zilberstein, A., Plowman, G. D., Rodeck, U. (1995)  
Induction of autocrine epidermal growth factor receptor ligands in human keratinocytes by insulin/insulin-like growth factor-1  
J.Cell Physiol. 163(2),257-265.
133. Villafuerte, B. C., Koop, B. L., Pao, C. I., Gu, L., Birdsong, G. G., Phillips, L. S. (1994)  
Coculture of primary rat hepatocytes and nonparenchymal cells permits expression of insulin-like growth factor binding protein-3 in vitro  
Endocrinology. 134(5),2044-2050.
134. Vogt, P. M., Lehnhardt, M., Wagner, D., Steinau, H. U. (1998)  
Growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in acute wound fluid  
Growth Horm.IGF.Res. 8 Suppl B:107-9.,107-109.
135. Welch, M. P., Odland, G. F., Clark, R. A. (1990)  
Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction  
J.Cell Biol. 110(1),133-145.
136. Wicke, C., Halliday, B., Allen, D., Roche, N. S., Scheuenstuhl, H., Spencer, M. M., Roberts, A. B., Hunt, T. K. (2000)  
Effects of steroids and retinoids on wound healing  
Arch.Surg. 135(11),1265-1270.
137. Winter, G. D. (1962)  
Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig  
Nature 20;193:293-4.,293-294.
138. Witte, M. B. and Barbul, A. (1997)  
General principles of wound healing  
Surg.Clin.North Am. 77(3),509-528.
139. Wraight, C. J., Edmondson, S. R., Fortune, D. W., Varigos, G., Werther, G. A. (1997)  
Expression of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) in the psoriatic lesion  
J.Invest Dermatol. 108(4),452-456.

140. Yamamoto, T. and Cochrane, C. G. (1981)  
Guinea pig Hageman factor as a vascular permeability enhancement factor  
Am.J.Pathol. 105(2),164-175.
141. Yoshimoto, H., Ishihara, H., Ohtsuru, A., Akino, K., Murakami, R., Kuroda, H., Namba, H., Ito, M., Fujii, T., Yamashita, S. (1999)  
Overexpression of insulin-like growth factor-1 (IGF-I) receptor and the invasiveness of cultured keloid fibroblasts  
Am.J.Pathol. 154(3),883-889.
142. Zeigler, M. E., Krause, S., Karmioli, S., Varani, J. (1996)  
Growth factor-induced epidermal invasion of the dermis in human skin organ culture: dermal invasion correlated with epithelial cell motility  
Invasion Metastasis. 16(1),3-10.
143. Zendegui, J. G., Inman, W. H., Carpenter, G. (1988)  
Modulation of the mitogenic response of an epidermal growth factor-dependent keratinocyte cell line by dexamethasone, insulin, and transforming growth factor-beta  
J.Cell Physiol. 136(2),257-265.
144. Zhao, L.L., Galiano, R.D., Cox, G.N., Sanford, I.R., Mustoe, T.A. (1996)  
Effects of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-I on wound healing in a dermal ulcer model  
J. Clin. Invest. 1996 Dec 98(11),2462-8

## 7 Abkürzungsverzeichnis

µg	µ Gramm	IGF-IR	Insulin-like Growth Factor –I Rezeptor
%	Prozent		
°C	Grad Celsius	KD	Kilo-Dalton
ADP	Adenosindiphosphat	M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
APTEX	Aminopropyltriethoxy-silane	max.	maximal
BMOZ	Deutsches Zentrum für Biomaterialien u. Organersatz	mg	Milligramm
		min	Minute
BSA	Bovine-Serum-Albumin, Rinderalbumin	min.	minimal
		ml	Milliliter
C5	Komponente des Komplement-Systems	mm	Millimeter
		mRNA	messenger Ribonucleinsäure
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter		
DAB	Diaminobenzidin	MSA	Multiplication-Stimulating Activity
EGF	Epidermal Growth Factor		
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	n	nano
		p	p-Wert
FGF	Fibroblast Growth Factor	PBS	phosphate buffered saline
FNf	Fragments of fibronectin	g	Gramm
		PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
GH	Wachstumshormon ; Somatotropin		
GM-CSF	Granulozyten-Macrophagen Colony Stimulating Factor	PDGF	Plateled Derived Growth factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	PVA	Polyvinylalkohol
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule	SD	Standard-Deviation
IFN	Interferon	TGF	Transforming Growth Factor
IGF-I/-II	Insulin-like Growth Factor I u. II		
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Bindungsproteine	TNF	Tumor Nekrose Factor

## Abkürzungsverzeichnis

---

U	Units
vs.	versus
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## 8 Anhang

**Tabelle 11:** Einzelwerte bei Versuchsende; Wundgrößen in mm<sup>2</sup>, PCNA positive Zellen pro mm<sup>2</sup>, SMA positive Gefäßlumina pro mm<sup>2</sup>, systemischer Plasma IGF-I Spiegel in ng/ml.

Versuchstier	Wundgrößen in mm <sup>2</sup>	PCNA pos. Zellen/mm <sup>2</sup>	SMA pos. Gefäße/mm <sup>2</sup>	sys. Plasma IGF-I Spiegel
V 1	23	7469	265	801
V 2	25	4388	233	954
V 3	20	5388	282	708
V 4	28	4421	324	634
V 5	35	6655	292	544
V-C 1	46	2721	215	636
V-C 2	48	3611	296	711
V-C 3	65	3711	226	779
V-C 4	41	3198	262	891
V-C 5	51	3609	177	814
V-C 6	33	2837	264	811
V-C 7	50	3687	193	645
V-C 8	38	3179	187	860
V-C 9	36	4053	208	692
V-C 10	37	3421	253	653
V-I 1	18	5970	390	784
V-I 2	22	5681	329	887
V-I 3	28	4642	265	857
V-I 4	31	5015	288	693
V-I 5	25	3360	218	650
V-CI 1	12	9889	222	835
V-CI 2	20	4678	292	683
V-CI 3	31	2949	311	872
V-CI 4	31	4510	317	798
V-CI 5	25	4922	273	601
V-CI 6	23	4405	303	670
V-CI 7	33	4259	196	1076
V-CI 8	14	5378	266	962
V-CI 9	15	4352	305	814
V-CI 10	22	7065	264	620
V-CMI 1	36	3363	242	845
V-CMI 2	28	3475	250	817
V-CMI 3	30	2496	149	618
V-CMI 4	29	2943	225	786
V-CMI 5	27	3750	145	733
V-CMI 6	37	3216	226	914
V-CMI 7	30	3576	291	620
V-CMI 8	35	3555	227	697
V-CMI 9	31	4889	186	684
V-CMI 10	29	3485	241	705

## 9 Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Schaffung der Voraussetzungen zur Verwirklichung der Arbeit danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. med. Stephan Coerper.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Stefan Beckert für die hervorragende Zusammenarbeit, die kompetente und unermüdliche Betreuung, die ich auch zu jeder Tages und Nacht Zeit in Anspruch nehmen konnte.

Mein Dank gilt dem gesamten Labor-Team der AG Wundheilung im „Zentrum für medizinische Forschung“ für die vielfache Unterstützung während des Versuchsvorhabens.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Jutta Hahn, die mir bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen von großer Hilfe war.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Hierlemann bedanke ich mich für die Herstellung und die Überlassung des neuen IGF-I Verbandes.

Meinen Eltern danke ich für vertrauensvolle Unterstützung und die Ermöglichung des Studiums.

## 10 Lebenslauf

Sebastian Alexander Daniel Haack

geboren am 23. November 1976 in Stuttgart

als zweites der zwei Kinder

von Regine Haack und Dr. med. Dieter Haack

Allgemeine Hochschulreife am 25. Juni 1996

Fanny-Leicht-Gymnasium Stuttgart

Zivildienst von Juli 1996 bis August 1997

Krankentransport und Rettungsdienst des Deutschen Roten  
Kreuzes Stuttgart

Medizinstudium ab dem Wintersemester 1997/1998 in Tübingen

Ärztliche Vorprüfung      September 1999

1. Staatsexamen              April 2001

2. Staatsexamen              April 2003

Praktisches Jahr mit Wahlfach Plastische Chirurgie

3. Staatsexamen              12. Mai 2004

Arzt im Praktikum

von Juli 2004 bis September 2004 und

Assistenzarzt

seit Oktober 2004 im Zentrum für Plastische Chirurgie des  
Marienhospitals Stuttgart (Ärztl. Direktoren: Prof. Dr. M. Greulich  
und Prof. Dr. W. Gubisch)