

Entwicklung eines flexiblen Epidermistransplantates zur Behandlung von Vollhautwunden am Schwein

Alexandra Fürst



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Abteilung für Plastische- und Handchirurgie,
Städtisches Krankenhaus München-Bogenhausen
(Chefarzt: apl. Prof. Dr. W. Mühlbauer)

Entwicklung eines flexiblen Epidermistransplantates zur Behandlung von Vollhautwunden am Schwein

Alexandra Fürst

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. W. Mühlbauer
2. Univ.-Prof. Dr. E. Biemer
3. Univ.-Prof. Dr. J.R. Siewert

Die Dissertation wurde am 25.05.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.02.2002 angenommen.

Meinen Eltern

1	Einleitung	1
1.1	Mechanismen der Wundheilung.....	1
1.1.1	Anatomie der Haut	1
1.1.2	Phasen der Wundheilung.....	3
1.2	Klinische Problematik	5
1.3	Entwicklung der Hautzüchtung und Transplantation	8
1.4	Klinischer Einsatz	9
1.5	Ziel der Untersuchungen	11
2	Material und Methoden	14
2.1	Das epikutane Wundkammermodell am Deutschen Landschwein	14
2.1.1	Versuchstiere und experimentelle Hautwunden.....	14
2.1.2	Vinylkammer und Flüssigkeitsmilieu	16
2.1.3	Mikrobiologie	17
2.1.4	Wundphotographie und Bestimmung der Wundkontraktion.....	18
2.1.5	Histologie und Rasterelektronenmikroskopie	19
2.1.6	Immunhistochemie	19
2.1.7	Proteinmessung	20
2.2	Bestimmung der Wachstumsfaktoren in der Wundflüssigkeit.....	21
2.3	Transplantation von Keratinozyten in kutane Wunden.....	22
2.3.1	Gewinnung und Kultivierung	22
2.3.2	Microcarrier (MC)	24
2.3.2.1	Aufbau und Vorbereitung	24
2.3.2.2	Besiedelung der Microcarrier mit Keratinozyten.....	25
2.3.3	Transplantationstechnik	25
2.4	Versuchsgruppen	26
2.5	Versuchsdauer	27

2.6	Statistische Methoden	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Heilung der Vollhautwunden im Kurzzeitversuch	30
3.1.1	Mikrobiologie	30
3.1.2	Histologie und Immunhistochemie	31
3.1.3	Proteinbestimmung	36
3.1.4	Wachstumsfaktoren in Kammerflüssigkeit und Serum.....	38
3.1.4.1	PDGF-AB	38
3.1.4.2	TGF- β 1.....	39
3.1.4.3	TGF- β 2.....	40
3.1.4.4	basic FGF.....	41
3.1.5	Planimetrie	42
3.2	Heilungsverlauf im Langzeitversuch.....	45
3.2.1	Histologie	45
3.2.2	Immunhistochemie	48
3.2.2.1	Cytokeratin 5/6.....	48
3.2.2.2	Cytokeratin 10.....	49
3.2.2.3	Makrophage CD 11b.....	51
3.2.2.4	Makrophage CD 68.....	51
3.2.2.5	B-Zellen.....	52
3.2.2.6	T-Zellen.....	53
3.2.2.7	PGP 9.5	54
4	Diskussion	56
4.1	Das Schweinemodell.....	56
4.2	Das Kammermodell.....	57
4.3	Einfluss der Microcarrier auf die Wundheilung.....	58

4.4	Untersuchungen zur Proteinbestimmung in Wundflüssigkeiten	61
4.5	Wachstumsfaktoren und epidermale Proliferation.....	61
4.5.1	Beschreibung der Einzelfaktoren	62
4.5.1.1	PDGF-AB	63
4.5.1.2	TGF-β.....	64
4.5.1.3	FGF	65
4.5.2	Interaktion der Wachstumsfaktoren bei der Proliferation von Keratinozyten	66
4.6	Untersuchungen von Wachstumsfaktoren in Wundflüssigkeiten	67
4.7	Allgemeine Untersuchungen zur Transplantation kultivierter Keratinozyten	70
5	Zusammenfassung.....	73
6	Literaturverzeichnis	75
7	Anhang	89
7.1	Danksagung	89
7.2	Lebenslauf.....	90

Abkürzungen

b FGF	Basic Fibroblast Growth Factor
CK	Cytokeratin
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco´s Minimal Essential Medium
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
H&E	Hämatoxilin und Eosin
IE	Internationale Einheiten
K	Kollagen
µg	Mikrogramm = 10 ⁻⁶ Gramm
µl	Mikroliter = 10 ⁻⁶ Liter
MC	Microcarrier
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm = 10 ⁻³ Gramm
ml	Milliliter = 10 ⁻³ Liter
mM	Millimolar = Millimol / Liter

NaCl	Natriumchlorid
Opti-MEM	optimiertes Minimal Essential Medium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
pg	Pikogramm = 10^{-12}
rpm	rounds per minute
sf	serumfrei
T 162-Kolben	Gewebekulturflasche mit einer Fläche von 162 cm^2
TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1
TGF- β 2	Transforming Growth Factor β 2

1 Einleitung

1.1 Mechanismen der Wundheilung

Als erstes soll ein Überblick über den strukturellen Aufbau der Haut gegeben werden. Daran schließt sich eine kurze Ausführung über die einzelnen Phasen der Wundheilung.

1.1.1 Anatomie der Haut

Die Haut ist die natürliche Barriere des menschlichen Körpers nach außen. Sie reguliert den Wasserhaushalt und die Körpertemperatur und schützt somit vor Austrocknung. Bis zu einem gewissen Maße kann sie die Sonnenstrahlung filtern und das Eindringen von Bakterien oder Chemikalien verhindern. Außerdem besitzt sie ein großes Selbstheilungspotential, das von der Restitutio ad integrum bis zur Defektheilung reichen kann.

Die Haut wird strukturell in mehrere Schichten untergliedert. Die Hautdecke (Integumentum commune) setzt sich aus Haut (Cutis) und Unterhaut (Subcutis) zusammen. Die Cutis wiederum unterteilt sich in die Epidermis (Oberhaut) und die Dermis (Lederhaut, Corium) (Leonhardt 1990). Das Stratum papillare der Dermis ist mit der Epidermis verzahnt, während das nachfolgende Stratum reticulare an seiner Grenze zur Subkutis die Hauptmasse der Drüsen und Blutgefäße enthält. Die Epidermis unterteilt sich in weitere Schichten. Die unterste Ebene, das Stratum basale, besteht aus zylindrischen Zellen. Zusammen mit dem Stratum spinosum bildet es das Stratum germinativum. Nach oben schließt sich das Stratum granulosum an, dem das Stratum lucidum aufliegt. Im Stratum corneum gehen die Zellkerne und Organellen, nachdem sie terminal ausdifferenziert sind, allmählich zugrunde (Sobotta/Hammersen 1985 und Holbrook 1994). Eine Veranschaulichung gibt Abbildung 1 und Abbildung 2.

1 EINLEITUNG

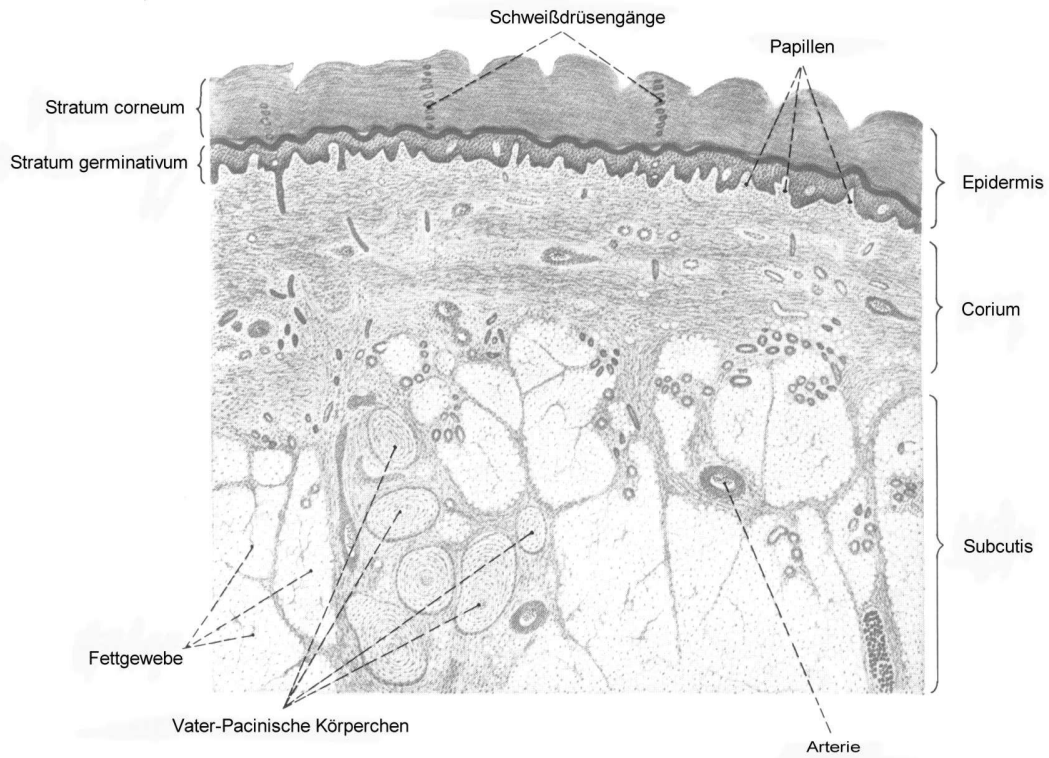


Abbildung 1: Histologisch struktureller Aufbau der Haut, Vergrößerung x 18 (Sobotta/Hammersen 1985).

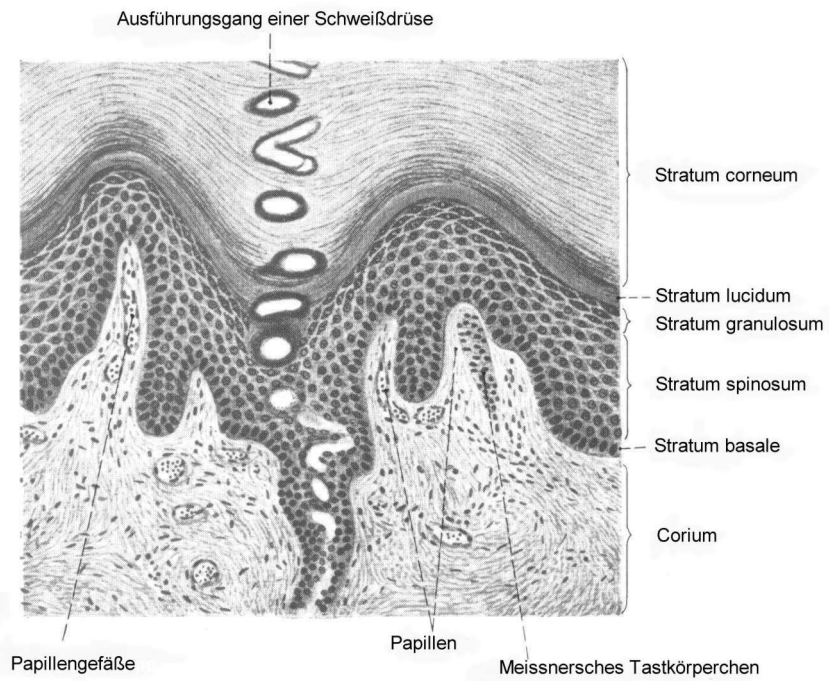


Abbildung 2: Aufbau der Epidermis, Vergrößerung x 170 (Sobotta/Hammersen 1985).

Der Hauptzelltyp der Epidermis ist der Keratinozyt. Organisiert in multiplen Schichten, wandert der Keratinozyt von der Proliferations- bzw. Basalzellschicht über das Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum bis hin zum Stratum corneum. In dieser Zeit differenziert sich der Keratinozyt terminal (Poumay und Pittelkow 1995). Andere Zellen wie Melanozyten, Langerhans Zellen und Merkel-Zellen, sind in der Epidermis zwar angesiedelt, nehmen aber nicht direkt an der Organisation des Gewebes teil (De Luca und Cancedda 1992). Diese Zellen sind verantwortlich für UV-Absorption, Immunabwehr und Sensibilität gegenüber mechanischen Reizen an der Hautoberfläche.

Die Epidermis ist also ein mehrschichtiges Epithel, in dessen Mittelpunkt der Keratinozyt steht.

1.1.2 Phasen der Wundheilung

Die Mechanismen der Wundheilung sind sehr komplex. Viele Faktoren sind daran beteiligt und miteinander verwoben. Bis heute sind alle Details noch nicht genau geklärt. Die Ausführungen zu diesem Thema sind hauptsächlich an die Artikel von Kiritsy et al. (1993) und Clark (1995) angelehnt.

Die Wundheilung teilt sich in drei Phasen. Der Hämostase und Entzündung folgt die Granulationsgewebsbildung. Die Matrixbildung und Umgestaltung findet in der letzten Phase statt. Der Übergang zwischen den Phasen ist fließend.

Partielle oder Vollhautdefekte führen zu einer vollständigen Zerstörung der Blutzufuhr. Blutplättchen strömen ein und bilden einen Pfropfen an den beschädigten Gefäßen. Diese Aktivierung der Blutplättchen und die Adhäsion an subendotheliales Gewebe bewirkt die Freisetzung einer Mischung vielerlei Substanzen, darunter auch Wachstumsfaktoren, die für die Entzündungsphase stehen. Entsprechend werden nun Entzündungszellen angeregt, die Bildung von Granulationsgewebe und die Epithelisierung gefördert. Die schnelle Anhäufung von Neutrophilen in der frühen Entzündungsphase (Clark 1995) verhindert eine bakterielle Kontamination durch Phagozytose und fördert die Beseitigung kaputten Gewebes (Martin 1997). Verbrauchte Neutrophile werden durch Gewebsmakrophagen entfernt, deren Anzahl

1 EINLEITUNG

mit abnehmender Neutrophilenzahl ansteigt. Hat eine bakterielle Kontamination stattgefunden, so bleibt die Anzahl der Neutrophilen hoch. Die Gewebsmakrophagen helfen das Wundgebiet zu reinigen und bereiten so das Einwachsen des neuen Gewebes vor. Vereinzelt wandern auch Eosinophile in die Wunde ein. So bedingen also Neutrophile, Monozyten bzw. Makrophagen und Eosinophile im Zusammenspiel mit den Wachstumsfaktoren die entzündliche Phase im Wundheilungsprozess (Kiritsy et al. 1993).

Daran schließt sich die Phase der Neubildung des Granulationsgewebes und der Reepithelialisierung. Das Granulationsgewebe bildet sich aus eingewanderten Makrophagen, Fibroblasten und Blutgefäßen. Durch Wachstumsfaktoren stimulierte Fibroblasten fördern ihre Bildung durch einen positiven autocrinen Feedbackmechanismus selbst und verstärken somit den Heilungsprozess. Die Anzahl an Eosinophilen steigt. Sie dienen als Mediatoren des Gewebstoffwechsels und erleichtern die Epithelproliferation und Neovaskularisation (Kiritsy et al. 1993). Die Gefäßneubildung ist einer der wichtigsten Vorgänge in der Phase der Neubildung von Granulationsgewebe. Sie wird wieder durch das Zusammenspiel einzelner Wachstumsfaktoren unterstützt (Clark 1995). Fibroblasten, abgelagertes Fibronectin, Glucosaminoglycane und Kollagen bilden eine neue Matrix. Die Anzahl an Myofibroblasten steigt. Diese haben direkte Auswirkung auf die Wundkontraktion. Die Reepithelialisierung verläuft parallel zur Entzündung und Neubildung von Granulationsgewebe. Bereits Stunden nach der Verletzung wandern Epithelzellen unter den Wundschorf und über darunterliegendes, noch vitales Bindegewebe. Sie stammen entweder aus den Wundrändern oder aus Resten der Hautanhangsgebilde. Die Epithelzellen sind eine der wichtigsten Quelle für Wachstumsfaktoren während der Wundheilung. Der Wundverschluss geschieht in dieser Phase vor allem durch Kontraktion und Granulationsgewebebildung.

Der letzte Schritt im Heilungsverlauf ist die Umbauphase. Diese kann bis zu einem Jahr nach der Verletzung andauern. Extrazelluläre Matrixkomponenten wie Fibronectin, Hyaluronsäure und Kollagenfibrillen folgen nun der Granulationsgewebesbildung. Kollagen und Proteoglycane bewirken mehr Zugfestigkeit und Elastizität des Narbengewebes. Trotz allem ist das Narbengewebe

in seiner Reißfestigkeit und der Penetrierbarkeit von Nährstoffen und Sauerstoff der unverwundeter Haut unterlegen (Martin 1997). So können auch funktionelle Einbußen des Gewebes entstehen. Der Prozess der Wundheilung ist durch die Bildung eines Ersatzgewebes abgeschlossen.

Eine Veranschaulichung im Zeitverlauf mit deutlich sichtbaren Überlappungen der drei Phasen gibt Abbildung 3.

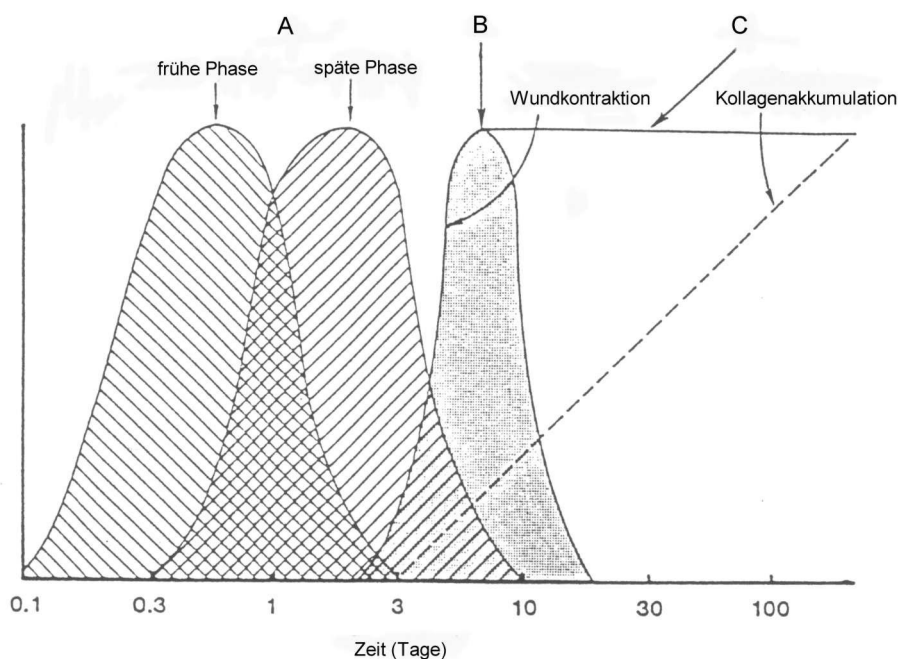


Abbildung.3: Die drei Phasen der Wundheilung: (A) frühe und späte Entzündungsphase, (B) Granulationsgewebsbildung, (C) Matrixformation und Umbau. (Kiritsy et al. 1993)

1.2 Klinische Problematik

Bei großflächiger und tiefreichender Schädigung der Haut durch Verbrennung, Verbrühung, Verätzung oder Elektrotrauma scheidet eine Spontanheilung aus. Das frühzeitige Entfernen der Brandschorfe und Deckung der Brandwunden ist immer noch die optimale Behandlung der sogenannten Verbrennungskrankheit. Als Hautersatz kommen autologe Materialien (Spalthaut, gezüchtete Haut), allogene Transplantate (Leichendermis, Amnion), xenogener Ersatz (Schweine- oder Kanninchenhaut), oder alloplastische Transplantate aus synthetischen oder biosynthetischen Materialien (Biobrane[®], Op-site[®], Silastic[®]) zum Einsatz

1 EINLEITUNG

(Hansbrough und Cooper 1990, Navsaria et al. 1995). Die autologe Spalthauttransplantation ist im Hinblick auf zeitliche Verfügbarkeit und Effizienz bei akzeptablem ästhetischen Ergebnis nach wie vor die beste Methode zur Versorgung tiefgradiger Verbrennungen.

Hierin zeigt sich jedoch schon das erste Problem. Nicht jedesmal ist genügend gesundes Spenderhautareal verfügbar. Es kommt zu einer zusätzlichen Schwächung des Patienten mit weiteren Schmerzen und einer späteren Entstellung durch Narben und Pigmentveränderungen (Mühlbauer et al. 1995). Für diesen Fall reicht es aus, ein Hautstück von der Größe einer Briefmarke zu entnehmen. Dieses Hautstück kann dann innerhalb von drei bis vier Wochen auf eine, ungefähr der Körperoberfläche des Menschen entsprechende, Fläche von 1,5-2 m² herangezüchtet werden. Bis dahin muss der Verletzte durch intensivmedizinische Betreuung und Interimsmaßnahmen über die Zeit gebracht werden. Die ungeschützten Wunden neigen zur Kontamination mit zum Teil hoch resistenten Keimen bis hin zur Wundsepsis (Smith et al. 1994). Weitere Komplikationen der Verbrennungskrankheit liegen in einem zusätzlichen Inhalationstrauma und einer generalisierten Sepsis. Diese wird unterstützt durch eine generalisierte Immunsuppression aller Schwerbrandverletzten (Deitch et al. 1985) und kann bis zum Multiorganversagen führen.

Als temporärer Hautersatz kommen allogene, xenogene oder alloplastische Transplantate zur Anwendung. Bei tiefgradigen Verbrennungen (IIb°-III°), bei denen die Dermis nicht mehr vorhanden ist, hat sich die Deckung mit Leichenhaut bewährt. Letztendlich wird nur die Dermis transplantiert. Die Epidermis wird nämlich nach einigen Tagen tangential abgetragen und durch Transplantation von autologen kultivierten Keratinozyten ersetzt (Hickerson et al. 1994). Das Problem bei allen Fremdtransplantaten ist die Abstoßungsreaktion des Empfängers. Studien haben ergeben, dass die Immunogenität vor allem in der Epidermis und weniger in der Dermis sitzt (Hoffman et al. 1994). Denn nur die Langerhanszellen der Epidermis exprimieren das Klasse II Antigen des Major Histocompatibility Complex. So konnte gezeigt werden, dass bei der allogenen Keratinozytentransplantation diese Zellen in der Wunde komplett eliminiert werden und somit nicht überlebensfähig sind

(Rouabhia et al. 1995, Phillips et al. 1993). Deshalb werden im Tierversuch bereits Kombinationstransplantate aus allogenen und autologen Keratinozyten verwendet, um die benötigte Anzahl von körpereigenen Zellen zu reduzieren. Die allogenen Keratinozyten werden dann im Verlauf durch die autologen Zellen ersetzt (Rouabhia et al. 1994, Suzuki et al. 1995). Ein weiterer Vorteil der allogenen kultivierten Epidermistransplantate liegt in der beschleunigten Wundheilung und einer deutlichen Schmerzlinderung. Außerdem stimulieren die allogenen Zellen die Einwanderung und Proliferation körpereigener Zellen von außen. Sie können zudem Wachstumsfaktoren aktivieren und diese selbst produzieren (Muehleman und Wise 1993, Teepe et al. 1993). Auch die Kombination von maximal expandierter autologer Spalthaut und autologen kultivierten Keratinozyten führt zu einer schnelleren Epithelisierung und Stimulierung der umgebenden Zellen (Dejardin et al. 1994). Allerdings kann die Anheilung der kultivierten Epidermistransplantate durch Infektionen limitiert werden (Paddle-Ledinek et al. 1997). Weitere dermale Äquivalente sind Amnion (allogen) oder Schweinehaut (xenogen). Die Wunde wird bis zur permanenten Deckung vor Austrocknung oder Kontamination geschützt (Hansbrough und Cooper, 1990). Synthetische Materialien wie zum Beispiel Biobrane[®], Laserskin[®], Integra[®], Silastic[®] oder Dermagraft[®], sind ebenfalls im klinischen Gebrauch. Aus unterschiedlichen Bestandteilen, wie Kollagen, Glucosaminoglycanen oder Silikon zusammengesetzt, dienen sie als dermale Komponente und Untergrund für gezüchtete Keratinozyten (Cairns et al. 1993).

Abschließend lassen sich folgende Aussagen festhalten. Die Problematik in der Therapie von Schwerbrandverletzten besteht in der Notwendigkeit, möglichst rasch die großen Wundflächen zu decken, um den Patienten vor Infektionen und Flüssigkeitsverlusten zu schützen. Die Deckung mit körpereigenem Material wäre wünschenswert. Bei kleinflächigen Verbrennungen ist die Spalthauttransplantation das Mittel der Wahl. Ist eine größere Fläche zu therapieren, muss gezüchtete, am besten körpereigene Haut verwendet werden. Die Kultivierung eines autologen Epidermistransplantates benötigt aber mehrere Wochen. Bis dahin muss die Zeit durch die Deckung mit anderen temporären Hautersatz-Materialien überbrückt werden.

1.3 Entwicklung der Hautzüchtung und Transplantation

In diesem Abschnitt soll ein kurzer Überblick über die Entwicklung der Keratinozytenzüchtung und Hauttransplantation gegeben werden.

Der erste Versuch, humane Haut in Kultur zu bringen, geht zurück auf das Jahr 1898. Ljunggren gelang es, Hautfragmente für längere Zeit in aszitischer Flüssigkeit zu erhalten und zu retransplantieren. Danach folgten Carrel und Burrows (1910), Hadda (1912) und Kreibich (1914). Die Zusammensetzung des Mediums in diesen ersten Kultivierungsversuchen bestand lediglich aus einfacher Salzlösung mit oder ohne Zusatz von Glucose, angereichert mit biologischen Flüssigkeiten, wie Serum oder Aszites. In den 30er und 40er Jahren entdeckte man, dass Keratinozyten zur Migration fähig waren (Andreassi 1992). Weitere Fortschritte in den Kultivierungsmethoden und Medienzusammensetzungen wurden gemacht. Ein unlösbares Problem jedoch bestand in der Überwucherung der Keratinozytenkulturen durch Fibroblasten, die aber eine wichtige wachstumsfördernde Wirkung hatten (Parshley und Simm 1950). Medawar zeigte 1948, dass kultivierte Epidermis auf seinen Spender wieder replantiert werden konnte (Andreassi 1992). Andere Autoren beschrieben mehr oder weniger erfolgreiche Transplantationen von suspendierten und trypsinisierten epithelialen Zellen (Billingham und Reynolds 1952) oder Zellaggregaten, die zur Epithelneubildung fähig waren (Moscona 1961). Nachdem Cohen 1962 durch den Zusatz von epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) eine weitere Verbesserung des Kulturmediums erzielte, gelang es Waymouth schließlich 1965 ein standardisiertes Medium zu entwickeln. Dies ermöglichte erst die Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Andreassi 1992). Die erste vollständig dokumentierte Transplantation autologer Keratinozyten in Kanninchen beschrieb Karasek 1968. Ein großer Schritt gelang Karasek und Charlton 1974 mit der Züchtung von Keratinozyten auf Kollagen beschichteten Plastikschalen. Damit erkannte man die Notwendigkeit eines „feeder layer“, einer Unterlage für die Keratinozyten. Letal bestrahlte, sogenannte 3T3 Fibroblasten oder durch Mitomycin gehemmte Fibroblasten sicherten gutes Zellwachstum. Das Problem der Überwucherung der Kulturen mit Fibroblasten war gelöst (Andreassi 1992). Der absolute Durchbruch bestand in einer von Rheinwald

und Green (1975) etablierten und perfektionierten Kultivierungstechnik, bei der es möglich war, große Zellmengen zu züchten und diese durch nachfolgende Subkultivierung nochmals zu erweitern. Des weiteren zeigten sie, dass EGF ein potenter Stimulator für Keratinozytenkulturen ist, die Koloniebildung verstärkt und die Zellausbeute erhöht (Rheinwald und Green 1977). Seither wurden die Kultivierungstechniken weiter verfeinert. In den 80er Jahren erkannte man die wichtigen Funktionen von Calciumkonzentration, Spurenelementen, Wachstumsfaktoren, Hormonen, Hydrocortison, Transferrin und Insulin. Die Studien führten zu einem perfekt zusammengesetzten Medium. Damit war es möglich, Keratinozyten ohne „feeder layer“ zu züchten. Sie wuchsen subkonfluent in einer Einzelzellschicht, relativ undifferenziert, konnten aber dennoch ausdifferenzieren und in mehreren Schichten wachsen. Dazu mussten sie in ein mit fetalem Rinderserum angereichertes Medium überführt werden (Pittelkow und Scott 1986). Man konnte also entweder subkonfluente, wenig differenzierte Keratinozyten züchten, oder durch Kultivierung in serumhaltigem Medium, ausdifferenzierte, in mehreren Schichten konfluent wachsende Keratinozyten gewinnen. Eisinger et al. (1979) gelang sogar der Nachweis, dass Zellproliferation und -differenzierung weder ein „feeder-layer“, noch ein Kollagensubstrat braucht. Hohe Konzentrationen von fetalem Rinderserum oder Hormonzusätze sind ebenfalls nicht nötig. Des weiteren ist die Kultivierungsdauer von subkonfluent gezüchteten Keratinozyten kürzer, die Transplantation dieser Kulturen also früher möglich.

Die Züchtung epidermaler Zellen zu transplantablen Kolonien in fest definierten Medien war einer der Meilensteine in der Geschichte der Hautzüchtung. Damit konnten die Anfänge für den klinischen Einsatz zur Deckung von Hautdefekten gemacht werden.

1.4 Klinischer Einsatz

Wie schon erwähnt wurde der Grundstein für die Hauttransplantation durch die richtungsweisenden Entwicklungen von Rheinwald und Green (1975) gelegt. Es stellt sich nun die Frage, in wie weit diese Methoden zur klinischen Anwendung kommen.

1 EINLEITUNG

Nach Abschluss der ersten Transplantationsversuche an Mäusen ohne Thymusdrüse versuchten sich O`Connor und Mulliken an Transplantationen bei Erwachsenen mit teilweise drittgradigen Verbrennungen (O`Connor und Mulliken 1981). Drei Jahre später behandelten Gallico et al. (1984) bereits Kinder mit mehr als 90% verbrannter Körperoberfläche, unter denen wiederum über 80% drittgradig waren. Compton et al. (1989) untersuchten in Langzeitstudien den Heilungsverlauf nach der Behandlung mit kultivierten, autologen epidermalen Transplantaten. Dabei wurden die Patienten bis zu fünf Jahre postoperativ betreut und die strukturellen Veränderungen an Dermis und Epidermis über die Zeit histologisch erfaßt. Nach einer Woche waren die Wunden bereits epithelisiert. Die Bildung einer Basalmembran zeigte sich nach vier Wochen, während sich Rete-Leisten und Ankerfibrillen, die zum histologischen Bild normaler Haut gehören, erst nach ein bis zwei Jahren ausbildeten. Melanozyten wanderten überwiegend sekundär ein. Es dauerte zwischen vier Wochen und sechs Monaten bis die Repigmentierung abgeschlossen war. Langerhans Zellen migrierten innerhalb von zwei bis sechs Monaten aus der peripheren Blutbahn in die neu gebildete Haut ein (De Luca et al. 1988).

In den letzten 25 Jahren, seit der Einführung der Technik durch Rheinwald und Green, sind diese Art der Hauttransplantate nahezu unverändert hergestellt und verwendet worden. Der große Vorteil liegt darin, dass nur ein kleines Stück Haut entnommen werden muss und nach entsprechender Kultivierung genug Material zur Deckung der gesamten Körperoberfläche gewonnen werden kann. Nach Still et al. (1994) erfolgt gegen autologe Zellen keine Abstoßungsreaktion, so dass ein optimaler Transplantationserfolg erreicht werden kann. Die funktionellen und ästhetischen Ergebnisse sind durch den Einsatz kultivierter epidermaler Transplantate denen der narbigen Spontanheilung, mit Ausbildung von Kontrakturen oder hypertrophen Narben, überlegen (Mühlbauer et al. 1995).

Heute werden die epidermalen Transplantate nicht mehr nur zur Deckung von Brandwunden gezüchtet, sondern auch zur Behandlung von anderen pathologischen Hautveränderungen. Gallico et al. (1989) exzidierten erstmals einen großen Tierfellnävus und deckten den Defekt mit kultivierten epidermalen Transplantaten.

Auch bei chronisch venösen Ulcera am Unterschenkel konnte eine bessere Wundheilung erzielt werden (Leigh et al. 1987). Weitere Einsatzmöglichkeiten für kultivierte epidermale Transplantate bestehen beispielsweise in der Behandlung von chronisch entzündlichen Mittelohr- und Mastoiderkkrankungen (Premachandra et al. 1993), der dystrophischen Epidermolysis bullosa (Verplancke et al. 1997), Pyoderma gangraenosum (Límová und Mauro 1994), oder Vitiligo und Hypomelanosis (Hann et al. 1995, Kumagai und Uchikoshi 1997). Ebenso wurden schon erfolgreiche Transplantationen nach Exzisionen von Tätowierungen beschrieben (Kumagai et al. 1994).

Die Einsatzmöglichkeiten der gezüchteten epidermalen Transplantate sind also sehr vielfältig. Der größte Vorteil liegt in der Tatsache, dass aus einem winzigen Spenderhautstück in einigen Wochen eine große Fläche an Haut gezüchtet werden kann. Des weiteren beschleunigt der Einsatz epidermaler Hauttransplantate zur Deckung von Wunden die Wundheilung und vermindert Schmerzen (Teepe et al. 1993).

1.5 Ziel der Untersuchungen

Kultivierte epidermale Transplantate haben in den letzten Jahren zunehmend an Attraktivität gewonnen. Durch die Optimierung der Kultivierungsmethoden ist es gelungen, eine vielversprechende Alternative gegenüber den herkömmlichen Spalthauttransplantationen zur Behandlung von Hautdefekten aller Art zu etablieren. Verfeinerungen und Abstimmungen in der Medienzusammensetzung, sowie Zusätze von Hormonen, Wachstumsfaktoren oder anderen Zytokinen haben es möglich gemacht, Einfluss auf den Zellzyklus und somit auf die Funktion der Zelle zu nehmen und die Wundheilung zu beschleunigen. Dennoch birgt dieses Verfahren der serumhaltigen Kultivierung einige Nachteile in sich. Die Zeit, bis ein konfluentes, mehrschichtiges Epithel zur Transplantation gebracht werden kann, beträgt auch heute noch drei bis vier Wochen. Hinzu kommt, dass durch die mehrmaligen enzymatischen Abдавorgänge die Zellen eine verminderte Vitalität aufweisen. Die Keratinozyten sind zum Zeitpunkt der Transplantation bereits stark differenziert und in ihrer Proliferationspotenz vermindert. Auch die Fragilität der Transplantate während der Anwendung stellt ein Problem dar. Hinzu kommt der hohe personelle,

apparative und finanzielle Aufwand (Mühlbauer et al. 1995; Meuli und Raghunath 1997).

Im Hinblick auf die genannten Nachteile erscheint es sinnvoll, nicht konfluente, wenig differenzierte und dafür mehr proliferative Keratinozyten auf einem flexiblen Trägersystem zur Anwendung zu bringen. Durch serumfreie Zellkultur lassen sich wenig differenzierte Keratinozyten mit hohem Proliferationspotential züchten. Die somit gewonnene Zellsuspension muss nur noch auf ein geeignetes Trägersystem aufgebracht werden. Diese Aufgabe soll der Microcarrier erfüllen. Die Microcarriertechnik wurde in der Mikrobiologie entwickelt, um Zellen tierischer und humaner Herkunft, einschließlich epithelialer Zellreihen im großen Maßstab anzuzüchten (Van Wezel 1967). Microcarrier werden als Microsphären aus synthetischen oder biologischen Substanzen hergestellt. Diese unterscheiden sich in Größe, Porosität und Oberflächeneigenschaften (Pharmacia LKB Biotechnology 1989). Erste in-vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass Microcarrier als Trägersystem für subkonfluente Keratinozyten sehr geeignet sind und deren Migration und Proliferation mit Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels erlauben (Hecht et al. 1997).

Ziel der vorliegenden Studie ist die Behandlung von standardisierten Vollhautwunden am Schwein mit einem flexiblen Epidermistransplantat. Dieses Transplantat besteht aus subkonfluenten Keratinozyten auf Microcarriern, die in einem Gel aus hydrierter Methylzellulose suspendiert sind. Zwei Sorten von Microcarriern werden getestet. Zum einen Microcarrier aus kollagenbeschichteten Dextranmolekülen, und zum anderen Microcarrier aus bovinem Kollagen Typ I. Die Microcarrier sollen von Schweinekeratinozyten besiedelt werden, und deren Migration und Proliferation in den Vollhautwunden untersucht werden. Durch histologische und immunhistochemische Untersuchungen ist zu klären, ob dieses flexible Epidermistransplantat einen schnelleren Wundverschluss bewirkt, und wie das neu gebildete Epithel charakterisiert ist. Gleichzeitig werden verschiedene Proteinkonzentrationen und Wachstumsfaktorkonzentrationen in Wundflüssigkeiten und Serum gemessen. Die Kontraktion der Wundflächen wird durch planimetrische Messverfahren bestimmt. Daneben ist die biologische Verträglichkeit und

Abbaubarkeit des Trägersystems von Bedeutung. Durch die Applikation in Form eines streichfähigen Gels lassen sich mit dem flexiblen Epidermistransplantat auch unebene und schwer zugängliche Wunden behandeln. Je nach Zusammensetzung des Microcarriers können zudem verschiedene Matrixproteine wie Kollagen, Elastin, Proteoglykane und ähnliches in die Wunde gebracht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Das epikutane Wundkammermodell am Deutschen Landschwein

2.1.1 Versuchstiere und experimentelle Hautwunden

Alle Versuche werden bei der Regierung von Oberbayern zur Durchführung von Tierexperimenten angezeigt und genehmigt und in der Abteilung für experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München durchgeführt.

Verwendet werden deutsche Landschweine mit einem Gewicht von 20 bis 25 kg zu Beginn der Versuchsreihen. Alle Schweine stammen aus dem staatlichen Lehr- und Versuchsgut Grub in Oberbayern und werden im Institut für experimentelle Chirurgie unter konstanten Bedingungen und normaler Kost gehalten.

Zur Spalthautentnahme für die Keratinozytenzüchtung werden die Tiere mit Ketamin / Xylazin intramuskulär sediert und durch einen venösen Zugang mit Propofol intravenös anästhesiert. Alle späteren Eingriffe, wie die Erzeugung der Vollhautwunden, Verbandswechsel und Entnahme von Biopsiematerial, werden, nach einmaligem Legen eines zentralvenösen Katheters, mit einer Einleitungsanästhesie mittels Propofol i.v. und anschließender Intubationsnarkose mit Isofluran, Sauerstoff und Lachgas durchgeführt. Während der Eingriffe werden kontinuierlich Herzfrequenz, Atemfrequenz, rektale Körpertemperatur und periphere Sauerstoffsättigung gemessen. Postoperativ erfolgt eine routinemäßige Therapie mit Metamizol über drei Tage, bzw. bei Bedarf darüber hinaus. Am Versuchsende werden die Tiere nach Einleitung einer Inhalationsnarkose durch eine einmalige i.v.-Injektion von 5 g Thiopenthal-Natrium (Pentothal, Abbott Laboratories, Chicago, USA) geopfert.

Für die Keratinozytenzüchtung wird 14 Tage vor Versuchsbeginn Spalthaut glutäal und nuchal entnommen. In Seitenlage erfolgt eine Enthaarung des betreffenden Hautareals mittels Nassrasur und eine anschließende Hautdesinfektion und Entfettung (je drei Minuten 7,5 %iges Polyvidoniod, 10 %iges Polyvidoniod, 70 %iger Isopropylalkohol und Trichlorethylen). Nach sterilem Abdecken des

Operationsgebietes wird unter Verwendung eines elektrischen Padgett Dermatomes (Kansas City Assemblage Co. Inc., Kansas City USA) die Spalthaut in einer Größe von ca. 100 cm² und 0,3 mm Dicke gewonnen. Die Haut wird in ein mit speziellem Transportmedium, bestehend aus 500 ml DMEM und je 5 ml Ciprobay 100 und Amphotericin B 100x, gefülltes Gefäß überführt und sofort zur weiteren Verarbeitung in das Zellkulturlabor der Firma Boehringer in Penzberg gebracht.

Beim Setzen der Vollhautwunden wird die gesamte Rückenhaut des Tieres in Bauchlage zunächst wieder nass rasiert und anschließend durch eine jeweils dreiminütige Anwendung von 7,5 %igem Polyvidoniod, 10 %igem Polyvidoniod und 70 %igem Isopropylalkohol desinfiziert und mit Trichlorethylen entfettet. Nach sterilem Abdecken wird jede Hautwunde mit einem sterilen Farbstift und einer Schablone (15 mm x 15 mm) markiert. Die Wundränder werden danach mit blauer Tusche tätowiert, um die Wundkontraktion im Zeitverlauf photoplanimetrisch messen zu können. Die Exzision der Wunden erfolgt mit einem Skalpell der Größe 11 und erfasst sowohl Epidermis als auch Dermis bis auf das subkutane Fettgewebe der Faszie des darunterliegenden Muskels, der in toto erhalten bleiben soll. Die Blutstillung wird durch Kompression und gezielte monopolare Elektrokoagulation von blutenden Gefäßen erreicht. Die Uniformität der Wunden wird anhand histologischer Schnitte der Exzidate überprüft.

Pro Tier werden insgesamt 20 Wunden gesetzt, wobei diese den jeweiligen Versuchsgruppen randomisiert zugeordnet werden. Die typische Anordnung mit der symmetrisch-paraspinalen Platzierung der Wunden ist in Abbildung 4 wiedergegeben.

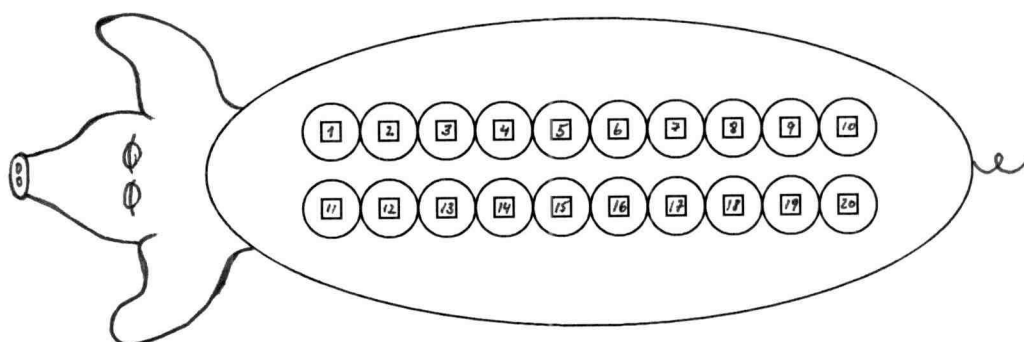


Abbildung 4: Anordnung der paraspinal platzierten Wunden am Schwein.

In den Langzeitversuchen wird die Größe der Wunden auf 25 x 25 mm erhöht. Die Wundanzahl insgesamt sinkt auf n=14, je Schwein.

2.1.2 Vinylkammer und Flüssigkeitsmilieu

Alle Hautwunden werden mit einer wasser- und luftdichten Vinylkammer (P.A. Medical Corp., Colombia, TN, USA) bedeckt. In Abbildung 5 ist eine derartige Wundkammer dargestellt.

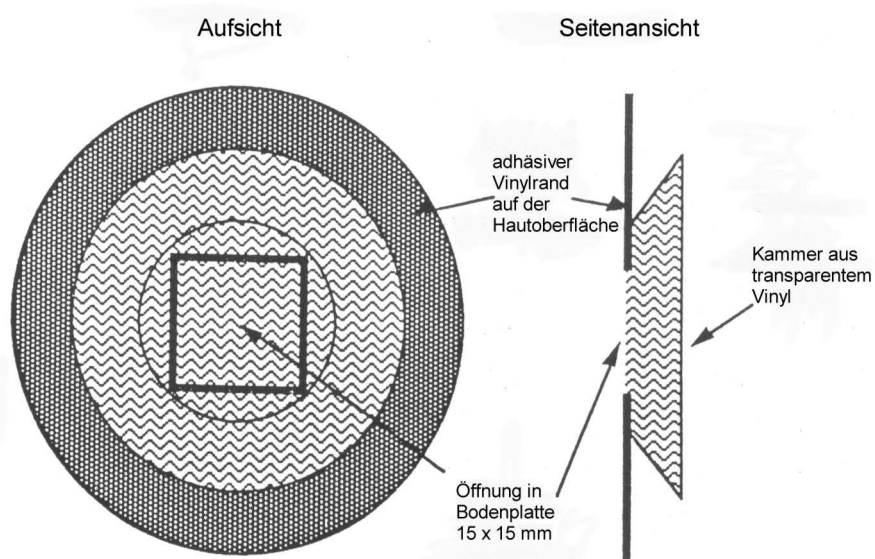


Abbildung 5: Die Brigham-Wundkammer nach Breuing et al. 1992.

Die selbstklebende Bodenplatte ermöglicht ein Befestigen der Kammer auf der die Wunde umgebenden intakten Haut. Die zentrale Öffnung entspricht exakt der Wundfläche. Zusätzlich wird der Sitz der Basisplatte durch das Aufbringen von Stomaadhäsivklebstoff (Medical Adhesive, No. 7730, Hollister Inc., Libertyville, IL, USA) gesichert. Die Kammern werden mit 1,0 ml einer ungepufferten physiologischen Kochsalzlösung aufgefüllt (0,9 %ige Natriumchloridlösung mit 100 IE Benzylpenicillin-Natrium und 100 µg Streptomycin-Sulfat). Die Antibiotikakonzentrationen entsprechen den Empfehlungen für Zellkulturen (Vogt et al, 1993). Auch die Keratinozytensuspensionen werden in dieser Flüssigkeit resuspendiert.

Beim Langzeitversuch beträgt das instillierte Kammervolumen 2,5 ml.

Die Vinylkammern werden in täglichen Abständen entleert, ausgewechselt und erneut gefüllt. Das Flüssigkeitsvolumen (Kochsalzlösung plus sezernierte Wundflüssigkeit) wird gemessen und für weitere biochemische Assays vorbereitet. Dazu werden die Wundflüssigkeiten der einzelnen Wunden in 1 ml fassende Eppendorf-Cups gegeben und bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert, um eventuelle Koagel oder zelluläre Bestandteile von der eigentlichen Wundflüssigkeit zu trennen. Der Überstand wird in mehreren Eppendorf-Cups aliquotiert, mit den genauen Versuchsdaten beschriftet und bei -80°C sofort tiefgefroren. Nach dem gleichen Prinzip wird am Operationstag und den jeweiligen Biopsietagen venöses Blut aus dem Katheter entnommen, zentrifugiert, das so gewonnene Serum aliquotiert und eingefroren.

Im Langzeitversuch erfolgt der Wundverband nach dem 12. postoperativen Tag mit einer nicht-adhärennten Fettgaze (Jelonet[®], Smith & Nephew, GB).

2.1.3 Mikrobiologie

Um Auswirkungen von Infektionen auf den Heilungsverlauf beurteilen zu können, werden jeweils an den vorgesehenen Biopsietagen (Tag 4, Tag 6 und Tag 8) Wundabstriche aus den Wunden genommen, die zur Biopsie anstehen. So kann

2 MATERIAL UND METHODEN

beurteilt werden, ob die exzidierte Wunde zum Zeitpunkt der Entnahme eine erhöhte Keimbesiedelung aufweist.

Aerobes und anaerobes Wachstum wird auf Blut- bzw. MacConkey-Agar beobachtet. Die mikrobiologische Untersuchung erfolgt am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität München.

Die Keimbesiedelung wird differenziert in kein Wachstum (--), nur in Anreicherung (+), vereinzelt +, mäßig viel ++ und reichlich +++. Als infiziert gilt diejenige Wunde, die ein Bakterienwachstum zwischen mäßig viel und reichlich aufweist.

2.1.4 Wundphotographie und Bestimmung der Wundkontraktion

Alle Wunden werden am Operationstag (Tag 0) und an den vorgesehenen Biopsietagen (Tag 4, Tag 6 und Tag 8) mittels eines speziell angefertigten Distanzapparates (Abbildung 6) photographiert.

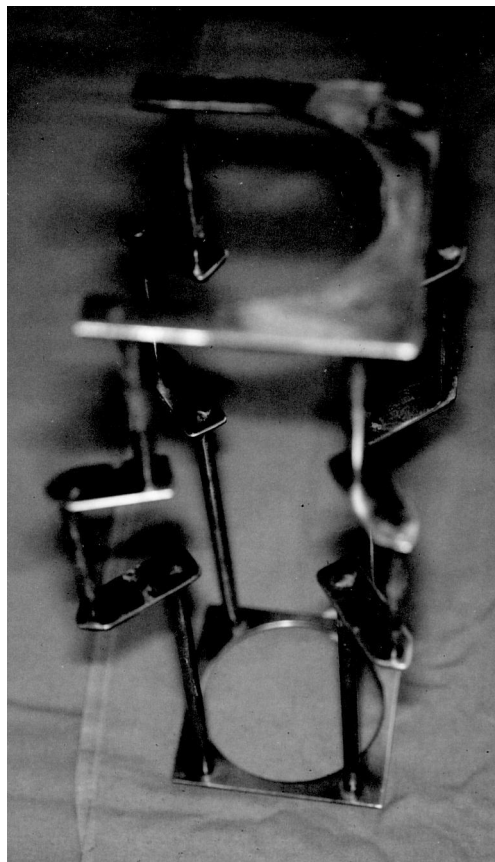


Abbildung 6: Distanzapparat.

Für die Auswertung und Vermessung der Bilder wird das Messprogramm SigmaScan®, Image Measurement Software, Version 4.01 von Jandel Scientific verwendet (Copyright 1987-1997, SPSS Inc.).

Zunächst wird dabei die Originalwundfläche vom Tag 0 mit der Maus umfahren und so vermessen. Der Grad der Epithelisierung, bzw. Kontraktion der Wundflächen an den folgenden Biopsietagen zeigt sich durch eine Reduktion der gemessenen Wundfläche.

2.1.5 Histologie und Rasterelektronenmikroskopie

Das Biopsiematerial der Wunden wird zu den vorgegebenen Zeitpunkten mittels kompletter Exzision unter Mitnahme umgebender intakter Haut gewonnen. Die Gewebeproben werden in 10 %igem Formalin fixiert und zur weiteren histologischen Aufarbeitung in das pathologische Institut der LMU München gebracht. Nach Paraffineinbettung der Exzidate werden Schnitte sowohl aus dem Wundzentrum, als auch von den Wundrändern angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Alle Schnitte werden lichtmikroskopisch ausgewertet und fotodokumentiert.

Ergänzend zu den lichtmikroskopischen Untersuchungen werden einige Schnitte der vollbehandelten Gruppen unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet (Institut für experimentelle Chirurgie der TU München).

2.1.6 Immunhistochemie

An den gewonnen Exzisaten werden darüber hinaus auch immunhistochemische Färbungen nach der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode durchgeführt. Zu Beginn der Versuchsreihen werden die Antikörper Cytokeratin (CK) 5 und 10, KL-1, Laminin, Kollagen (K) IV und Vimentin verwendet. Im weiteren Verlauf der Experimente (Langzeituntersuchungen) wird die Immunhistochemie auf die Antikörper CK 5, 6 und 10, CD 11b, CD 68, CD 79a, CD 3 und PGP 9,5 (protein gene product 9,5) umgestellt.

Zur Spezifität der einzelnen Antikörper siehe folgende Tabelle 1.

2 MATERIAL UND METHODEN

Antikörper gegen	Spezifität
Cytokeratin CK 5/6	färbt im normalen Plattenepithel Basalzellen und z.T. Stratum spinosum
CK 10	reagiert mit Cytokeratin 10 in suprabasalen, weit differenzierten Schichten verhornender und nichtverhornender Epithelien
KL-1	Pan-Epithelmarker
Laminin	ubiquitärer Basalmembranbestandteil, Matrix-Protein
Kollagen K IV	ebenfalls ubiquitärer Basalmembranbestandteil, Matrix-Protein
Vimentin	für mesenchymal differenzierte Zellen
CD 3	reagiert mit T-Zellen auf CD 3 Antigen
CD 11b	bindet an Komplementrezeptor Typ 3, einem Plasmaprotein auf Monozyten
CD 68	reagiert mit Makrophagen sowie Monozyten und Granulozyten des peripheren Blutes
CD 79a	reagiert mit B-Zellen auf CD 79a Antigen
PGP 9,5	reagiert mit neuronalem zytoplasmatischem Protein PGP 9,5; Marker für alle efferenten und afferenten Nervenfasern und neuroendokrinen Zellen

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten Antikörper und deren Spezifität.

2.1.7 Proteinmessung

Die tägliche Bestimmung von Gesamtprotein in der Kammerflüssigkeit dient als nicht invasiver, endogener Marker für die vollständige Reparatur der epithelialen Barriere. Durch die Neubildung des Epithels nimmt die Permeabilität für endogenes Protein ab und es kommt dadurch folglich auch zu einer Verminderung des Proteingehaltes in

der Wundflüssigkeit (Breuing et al. 1992). Parallel dazu soll auch das Serum auf seine Proteinkonzentration untersucht werden, um eventuelle Veränderungen über den Versuchszeitraum zu erfassen.

Zur Messung des Proteins dient der BCA-Assay der Firma Pierce, USA. Mit diesem kann quantitativ die Proteinkonzentration der Kammerflüssigkeit gemessen werden. Dazu wird ein Teil der aliquotierten und tiefgefrorenen Wundflüssigkeiten bei Raumtemperatur aufgetaut und im Verhältnis 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. In 96-well Mikrotiterplatten werden nun jeweils 10 µl aller Lösungen nacheinander in die Mikrotiterplatten pipettiert. Zur Kontrolle der Messgenauigkeit wird von jeder Probe eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Als nächstes werden alle „wells“ mit 200 µl der vorgefertigten Reaktionslösung beschickt und für mindestens 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die entstandene Absorption des Präzipitates kann nun bei 550 nm spektrophotometrisch gegen einen zuvor festgelegten Proteinstandard gemessen werden. Aus den Standardwerten mit bekannten Proteinkonzentrationen kann so mittels linearer Regression die Konzentration der verschiedenen Proben errechnet werden. Dies erfolgt nach folgender Formel.

$$\text{Proteinkonzentration(mg/ml)} = \frac{\text{OD}_u}{\text{OD}_{st}} \cdot 100$$

OD_u = optische Dichte der unbekannt Probe

OD_{st} = optische Dichte Standard

2.2 Bestimmung der Wachstumsfaktoren in der Wundflüssigkeit

Zur Bestimmung der Wachstumsfaktoren in den Kammerflüssigkeiten und Serumproben werden die tiefgefrorenen Aliquots bei Raumtemperatur aufgetaut und mittels ELISA-Analysen bestimmt.

Der ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Quantikine[®], R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) beruht auf dem quantitativen „Sandwich-Prinzip“, bei dem eine Mikrotiterplatte (96 well) mit einem monoklonalen Antikörper gegen den jeweiligen Wachstumsfaktor beschichtet ist. Standards und Proben (200 µl/well)

2 MATERIAL UND METHODEN

werden in die Platte hineinpipettiert und zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diese Weise wird vorhandener Wachstumsfaktor vom immobilisierten Antikörper an die Platte fixiert. Durch dreimaliges Auswaschen mit Waschpuffer (400 µl/well) wird freies Protein der Standards und Proben entfernt. Danach wird enzymgebundener polyklonaler Antikörper spezifisch für den jeweiligen Wachstumsfaktor (200 µl/well) hinzugegeben und bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Durch diesen zweiten Antikörper wird das Wachstumsfaktormolekül sandwichartig an das Enzym gebunden. Es erfolgt erneut dreimaliges Waschen, um freies Antikörper-Enzym-Reagens zu eliminieren. Anschließend wird Substrat (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin zu 200 µl/well) hinzugegeben. Durch Reaktion des an den Wachstumsfaktor fixierten Enzyms mit dem Substrat entsteht eine Farbreaktion proportional zur Menge des Wachstumsfaktors. Die Farbentwicklung wird mit 2N-Schwefelsäure gestoppt. Anschließend erfolgt die spektrophotometrische Messung der optischen Dichte bei 450 nm. Die Konzentration in der Probe, angegeben in pg/ml, wird durch Korrelation mit der optischen Dichte der bekannten Standardkonzentrationen ermittelt.

Alle Proben werden in Dreifachbestimmung angesetzt und gemittelt. Für die Standardkurve wird eine logarithmische Darstellung gewählt. Eine Transformation der Werte in die Endkonzentration von pg/ml wird durch eine Regressionsanalyse erreicht.

Für unsere Untersuchungen sind die Faktoren PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), TGF-β1 (Transforming Growth Factor β1) und TGF-β2 (Transforming Growth Factor β2) von Interesse.

Die Bestimmung der Wachstumsfaktoren wird in den Zellkulturlaboren der Firma Boehringer Mannheim in Penzberg durchgeführt.

2.3 Transplantation von Keratinozyten in kutane Wunden

2.3.1 Gewinnung und Kultivierung

Primäre Keratinozytenkulturen werden aus Spalthaut gewonnen. In Vollnarkose wird jedem Tier ca. 100 cm² Spalthaut von 0,3 mm bis 0,5 mm Dicke glutäal und nuchal

entnommen und sofort in spezielle Transportlösung (500 ml DMEM + 5 ml Ciprobay 100 + 5 ml Amphotericin B 100x) überführt. Im Labor wird die Haut von subcutanem Fettgewebe befreit und anschließend über Nacht mit Dispaselösung (0,25 % Dispase in Gibco-sf Medium, Boehringer Mannheim) in einer Petrischale bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Hautstücke dreimal mit jeweils 20 ml DMEM gewaschen und mit Pinzetten die Epidermisanteile von der Dermis abgeschabt. Die DMEM-Lösung trübt sich. Die so entstandene Einzelzellsuspension wird durch einen Cell-Strainer (Falcon, Porengröße 100 µm) gegeben, um große Epidermisstücke zurückzuhalten. Die Dispase wird durch Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS) endgültig gestoppt. Die Keratinozytensuspension wird 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet in Kulturmedium aufgenommen. Das serum-reduzierte Medium besteht aus Calcium-freiem Opti-MEM^R-1 (Gibco-BRL, Life Technologies), angereichert mit 10% DMEM (Gibco-BRL, Life Technologies) und Penicillin 100 IE / Streptomycin 100 µg je ml, 2 mM L-Glutamin, 1,25 µg Amphotericin je ml und 1% FCS. Die endgültige Calcium-Konzentration wird durch Hinzugabe von 1 M CaCl₂ auf 0,05 mM Ca⁺⁺ eingestellt. Anschließend wird die Zellzahl und die Vitalität mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu werden jeweils gleiche Volumina der Zellsuspension mit dem Farbstoff Trypanblau vermischt. Nach ca. zwei Minuten färben sich tote Zellen mit dem Farbstoff an. In der Zählkammer kann nun sowohl die Anzahl der vitalen, als auch die Anzahl der toten Zellen bestimmt werden. Für die optimale Einsaat einer Primärkultur ist eine Zellzahl von 1×10^5 / cm² bei mindestens 50 %iger Vitalität ausreichend. Diese erfolgt in, mit Rindercollagen beschichteten, T 162-Kolben mit jeweils 50 ml Kulturmedium. Das Kulturmedium setzt sich aus 500 ml Opti-MEM + 50 ml DMEM + 5,5 ml FCS + 5 ml Ciprobay 100 + 5 ml Amphotericin B 100x zusammen und wird in zweitägigen Abständen gewechselt. Bereits nach zwei Stunden hat sich die Hälfte der eingesäten Keratinozyten gleichmäßig am Boden der Kulturflasche abgesetzt. Nach der Einsaat lagern sich die Zellen in der Regel zu Clustern zusammen. Um sie herum bilden sich Proliferationsinseln.

Die weitere Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte. Um eventuell tote und adhärente Zellen aus der Kultur zu entfernen kann diese kurz antrypsiniert (5 min Trypsin / EDTA 1x, Boehringer Mannheim) und

2 MATERIAL UND METHODEN

mit frischem Medium gewaschen werden. Ist der Boden des Kolbens zu etwa 80-90% mit einem konfluenten Zellrasen bewachsen müssen die Zellen passagiert werden, da sie ansonsten ihr Wachstum irreversibel einstellen.

Zur Passage wird das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen für ca. 25 Minuten mit einer Enzymlösung, bestehend aus 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS, inkubiert. Nach dieser Zeit wird der Kolben 2-3mal hart aufgeschlagen, um die Zellen abzulösen. Es resultiert eine milchige Lösung. Durch die Zugabe von 5 ml FCS kann die Reaktion des Trypsins gestoppt werden. Die Zellsuspension wird 5 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand abkantiert und das Pellet wieder in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wird bestimmt. Die Aussaatdichte in den Passagen soll 2×10^4 / cm² betragen.

2.3.2 Microcarrier (MC)

2.3.2.1 Aufbau und Vorbereitung

Zu Beginn der Versuchsreihen werden zwei Arten von Microcarriern verwendet. Dabei handelt es sich zum einen um Cytodex-3-Microcarrier (Pharmacia, Stockholm) aus Dextran und zum anderen um Cellgen-Microcarrier (Koken Co. LTD, Tokio) aus Rinderkollagen. Im folgenden sollen beide Microträger (Beads) beschrieben werden.

Der Durchmesser der Dextran-Beads beträgt 100-230 µm. Die Matrix besteht aus vernetzten Dextranmolekülen. Die Oberfläche dieser Microcarrier ist mit Schweinekollagen Typ I homogen überzogen. Auf dieser Schicht adhäreren neben Keratinozyten auch Hepatozyten, Endothelien, Fibroblasten und Chondrozyten (Pharmacia LKB Biotechnology, 1989). Cytodex 3[®] (Pulver) muss in PBS zunächst über Nacht quellen. Die Microcarrier setzen sich am Boden des Gefäßes ab und das PBS wird nach und nach durch serumfreies Kulturmedium ersetzt, bis eine Konzentration von 1×10^5 MC / ml Medium resultiert. Diese Lösung kann bis zur weiteren Verwendung bei +4°C gelagert werden.

Die Koken-Beads sind mit einem Durchmesser von 200-350 µm etwas größer als die Dextran-Beads. Der gesamte Microträger setzt sich aus vernetztem Rinderhautkollagen zusammen und hat keine spezielle Beschichtung. Die Hautzellen

haften somit direkt auf dem Kollagen. Cellgen-MC werden bereits aufgequollen in einer Konzentration von 3×10^6 MC / 15 ml PBS in PBS geliefert. Zur Umstellung auf das Keratinozytenmedium werden die Microcarrier sanft zentrifugiert (10 min bei 100 g). Der Überstand wird verworfen und die Beads in Kulturmedium resuspendiert. Für die weitere Verwendung wird eine Lösung mit einer Endkonzentration von 1×10^5 MC / ml Medium hergestellt und bei $+4^\circ\text{C}$ gelagert.

2.3.2.2 Besiedelung der Microcarrier mit Keratinozyten

Die Besiedelung der Microträger mit den Keratinozyten erfolgt unabhängig von der Trägerart mit der Spinner-Kulturtechnik.

Dabei werden die subkultivierten Keratinozyten mit Trypsin wieder in Suspension gebracht und mit den vorbereiteten Microträgern für 72 h bei 37°C , 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchte inkubiert und alle 90 min für 30 sec mit 20 rpm geschüttelt.

Das Verhältnis von Microcarriern zu Keratinozyten beträgt 1:20. Dies entspricht in einem Spinnerkulturvolumen von 20 ml der Anzahl von ca. 1×10^6 Microträgern und der zwanzigfachen Menge an gelösten Zellen.

2.3.3 Transplantationstechnik

Die einzelnen Suspensionen mit den unterschiedlichen Versuchsgruppen (siehe Kapitel 2.4) werden in Insulinspritzen mit 1 ml Fassungsvermögen aufgezogen. Die Wundumgebung wird zunächst mit dem Stomaadhäsivekleber unter Abdeckung der Wunde versehen. Danach wird die Injektionsnadel unter die Befestigungsplatte der Wundkammer platziert. Die Suspensionen können so auf die Wunde aufgebracht werden. Nach der Injektion wird die Nadel unter der Klebplatte herausgezogen, so dass auch der Injektionskanal mit der Haut verklebt. (Siehe Abbildung 7)



Abbildung 7: Injektionstechnik der Suspensionen.

Nach dem selben Prinzip erfolgt auch die Instillation der Antibiotika-Kochsalz-Lösung beim täglichen Verbandswechsel (siehe dazu Kapitel 2.1.2).

2.4 Versuchsgruppen

Im Verlauf müssen zwei Versuchsreihen unterschieden werden. Dadurch ergibt sich auch eine Veränderung in der Verteilung und Zusammensetzung der einzelnen Versuchsgruppen auf die Versuchstiere.

Im ersten Versuchsabschnitt (später als Kurzzeitversuch bezeichnet) sollen zunächst Methodik und Galenik des flexiblen Epidermistransplantates getestet werden. Es werden dazu sechs Behandlungsgruppen unterschieden. Auf jedem Schwein werden insgesamt 20 Vollhautwunden platziert. Für jede Versuchsgruppe werden so drei Wunden ($n=18$) reserviert. Die restlichen zwei Wunden werden als Reservewunden gesehen und mit der höchsten Therapiestufe behandelt. Die Aufteilung der Gruppen stellt sich folgendermaßen dar (Tabelle 2).

Gruppe 1	0,9 %ige Natriumchloridlösung
Gruppe 2	Microcarrier + NaCl
Gruppe 3	Keratinozyten auf MC + NaCl
Gruppe 4	4 % hydrierte Methylzellulose (Gel)
Gruppe 5	MC + Gel
Gruppe 6	Keratinozyten auf MC + Gel

Tabelle 2: Behandlungsgruppen im Kurzzeitversuch.

Der Prozentanteil der Methylzellulose wurde in Vorversuchen bestimmt. Bei 4% ergibt sich ein optimales Verhältnis zwischen nötiger Fluidität und gewünschter Viskosität, im Sinne eines streichfähigen Gels. In diesem Gel werden je nach Versuchsgruppe entweder nur die Microcarrier, oder die Keratinozyten-MC-Suspension aufgenommen.

Im zweiten Versuchsabschnitt (Langzeitversuch) liegt das Hauptaugenmerk auf dem Einfluss des flexiblen Epidermistransplantates auf die Wundheilung. Die Anzahl der Versuchsgruppen wird auf zwei (Behandlungsgruppe versus Kontrollgruppe) reduziert. So ergibt sich nachstehende Konstellation (Tabelle 3).

Gruppe 1	NaCl (Kontrollgruppe)
Gruppe 2	Keratinozyten auf MC + Gel

Tabelle 3: Behandlungsgruppen im Langzeitversuch.

Es werden nur noch die Microcarrier aus Rinderkollagen benutzt.

2.5 Versuchsdauer

Die experimentellen Untersuchungen an den Schweinen können in Kurzzeitversuche und Langzeitversuche unterschieden werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Dauer der ersten Experimente wird auf acht Tage festgesetzt. Nach dieser Vorgabe werden insgesamt acht Schweine behandelt und ausgewertet. Die Wunden werden an den Tagen 4, 6 und 8 biopsiert und für die histologische Aufarbeitung vorbereitet. Im Anschluss an diese ersten Versuchsreihen werden nochmals vier Schweine für die Dauer von 55 Tagen behandelt. Für diese Experimente sind die Biopsiezeitpunkte für die Tage 4, 8, 14, 21, 28, 35, 41 und 55 vorgesehen.

Einen zusammenfassenden Überblick über das gesamte Wundmonitoring in den Kurz- und Langzeitversuchen gibt Abbildung 8 und 9.

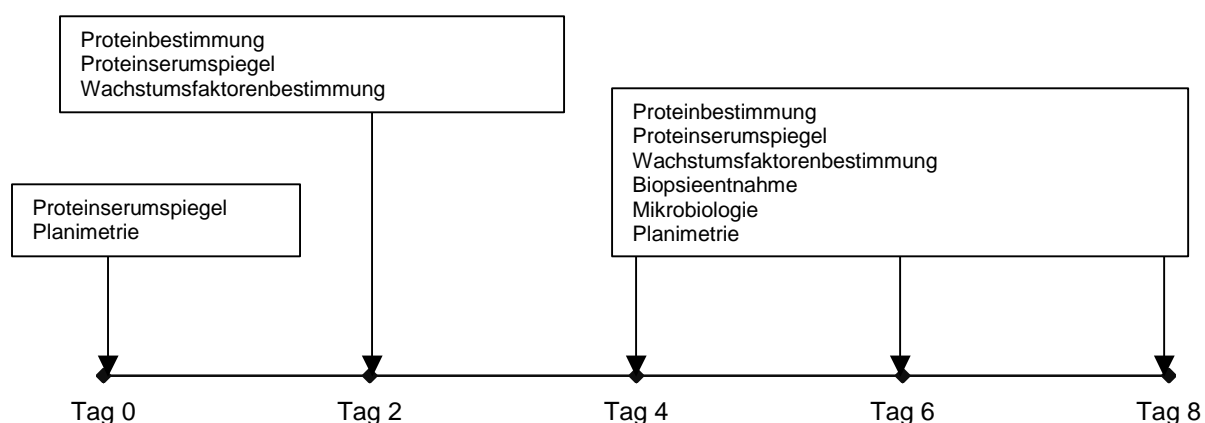


Abbildung 8: Zusammenfassung des Wundmonitoring im Kurzzeitversuch.

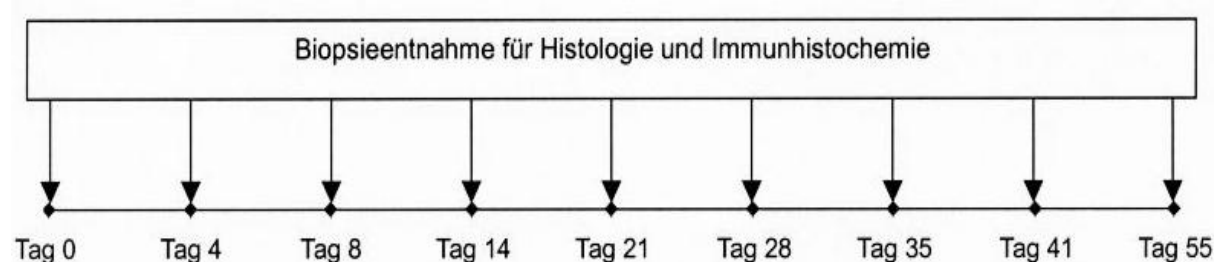


Abbildung 9: Schematische Darstellung zum zeitlichen Ablauf des Langzeitversuches.

2.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung unserer Versuchsergebnisse erfolgt in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München.

Für alle Daten werden Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und das 95%-Konfidenzintervall berechnet. Als Signifikanzniveau wird $p < 0,05$ gesetzt.

Zur statistischen Berechnung wird dabei die Varianzanalyse mit zwei Faktoren und Wechselwirkungsfaktor für unverbundene Stichproben verwendet.

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse aller durchgeführten Untersuchungen aufgezählt. Dabei wird der Heilungsverlauf nach den Resultaten der Kurzzeit- und Langzeitversuche unterschieden.

3.1 Heilung der Vollhautwunden im Kurzzeitversuch

3.1.1 Mikrobiologie

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen der Wundabstriche aus unseren Biopsaten sind nachfolgend aufgeführt.

Insgesamt wurden 120 Wundabstriche untersucht. 36 am Tag 4 und jeweils 42 an den Tagen 6 und 8. Als infiziert galten alle Wunden, die mäßig viel oder reichlich Bakterienwachstum aufwiesen. Eine Wunde konnte auch mit mehreren Erregern kontaminiert sein.

Bestimmt wurden folgende Erreger:

Koagulasenegative Staphylokokken, Staphylokokkus aureus, Escherichia coli, Serratia liquefaciens, Enterokokken, Escherichia fergusonii und Enterobacter spezies.

Im Hinblick auf die Erregerverteilung zeigte sich, dass 35 % der Wunden mit koagulasenegativen Staphylokokken besiedelt waren. Am zweithäufigsten waren Infektionen mit Staphylokokkus aureus (12 %). Der Anteil an Escherichia coli betrug 2 %. Jeweils 0,8 % der Wunden waren mit Escherichia fergusonii und Enterobacter spezies infiziert.

An Tag 4 waren 18 der 36 biopsierten Wunden keimbesiedelt, an Tag 6 18 von 42 und an Tag 8 17 von 42. Das entsprach einem prozentualen Anteil von 50 %, 43 % und 40 %. Eine Veranschaulichung gibt Abbildung 10.

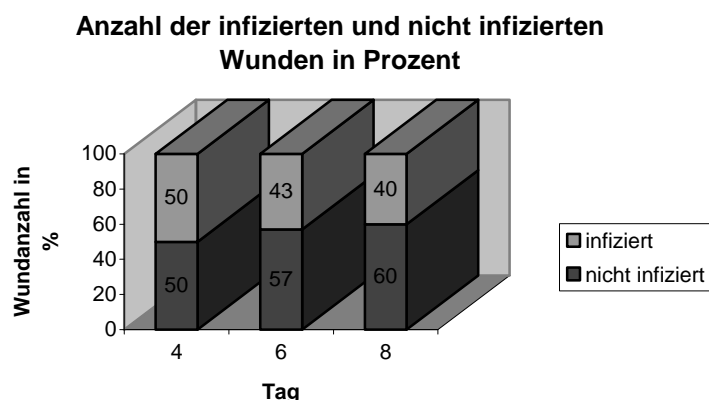


Abbildung 10: Überblick über den Prozentsatz an infizierten und nicht infizierten Wunden.

3.1.2 Histologie und Immunhistochemie

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung nach HE-Färbung, bzw. immunhistochemischer Aufbereitung sind Gegenstand dieses Abschnittes. Es wird dabei nach den Trägergruppen getrennt.

Generell adhärten die Keratinozyten mittels Spinner-Kulturtechnik auf den Microcarriern am besten, wenn das eingebrachte Verhältnis Microcarrier : Keratinozyt bei 1 : 20 in 20 ml Kulturmedium lag. Die Besiedelungsdichte auf den Microträgern war allerdings nicht homogen, sondern konnte im Durchschnitt zwischen 10 und 70 % der Oberfläche variieren (siehe dazu Abbildung 11).

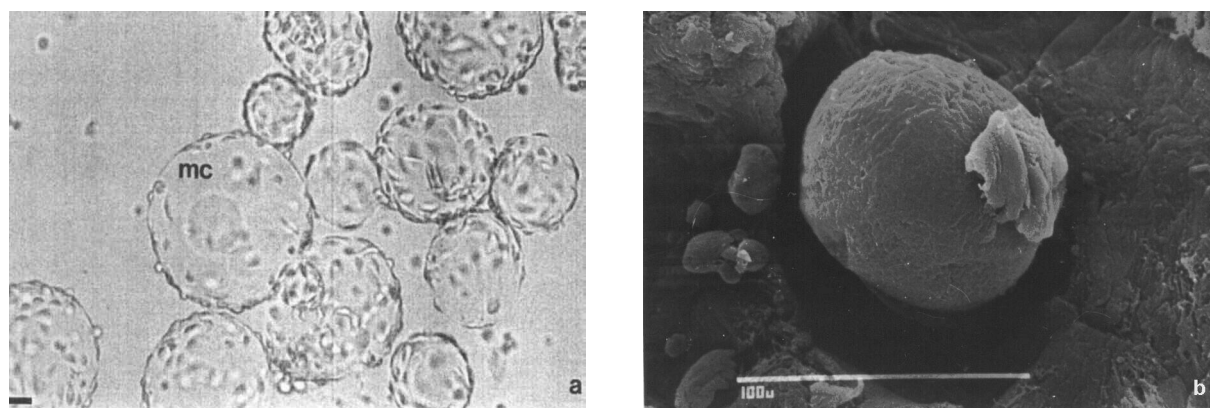


Abbildung 11: (a) Microcarrier (mc) besiedelt mit Keratinozyten nach 24 h Inkubation, der Balken entspricht 50 µm; (b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Microcarriers, Vergrößerung x 600.

3 ERGEBNISSE

Während es in den Kontrollgruppen der Versuchsreihe mit den Dextranbeads zu einer Epithelisierung ausgehend von den Wundrändern mit kompletter Defektdeckung im Behandlungsverlauf kam (Abbildung 12), war im selben Beobachtungszeitraum, aufgrund der massiven Wundheilungsstörung durch die Dextranbeads, in den Behandlungsgruppen nur eine partielle Defektdeckung möglich.

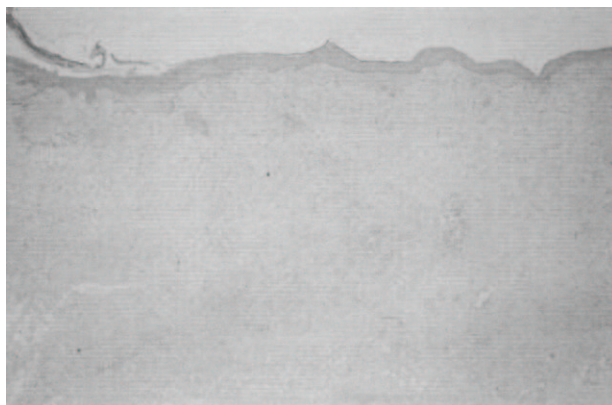


Abbildung 12: unbehandelte Kontrollgruppe an Tag 8, kompletter Epithelschluss, HE-Färbung, Vergrößerung x 25.

Das Dextran verursachte eine ausgeprägte granulozytäre und vor allem histiozytär / riesenzellige Entzündungsreaktion mit der Ausbildung von Fremdkörpergranulomen. Die Dextranträger wurden im Verlauf nur partiell abgebaut. Siehe dazu Abbildung 13(a) und (b).

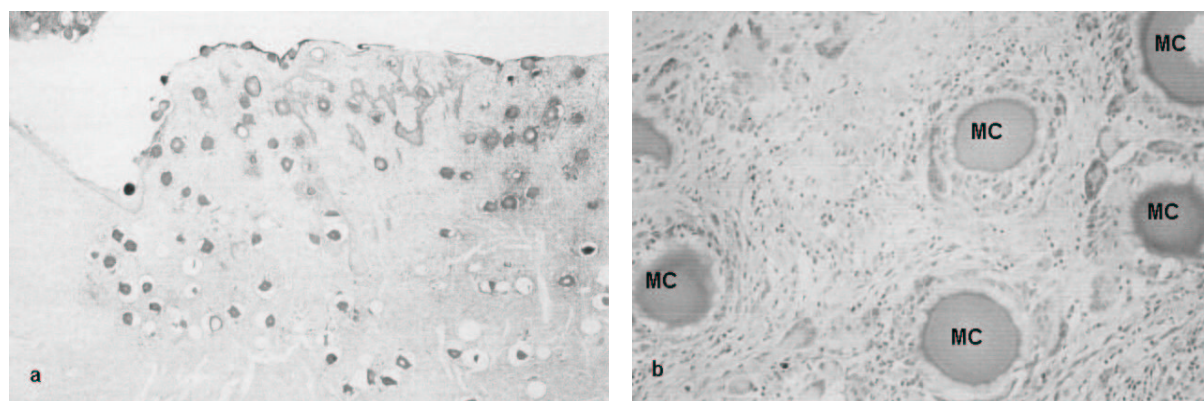


Abbildung 13: Dextranbeads, HE-Färbung an Tag 8; (a) Behandlungsgruppe, Epithelzysten und -nester, verzögerte Wundheilung, Vergrößerung x 25; (b) Gruppe 3, massive Fremdkörperreaktion ohne wesentliche Degradation der Microcarrier (MC), Vergrößerung x 200.

Insgesamt ließen sich nur vereinzelt vitale, basal gelegene Keratinozyten mittels CK 5 nachweisen. Eine Granulationsgewebsbildung erfolgte bereits nach vier Tagen mit deutlicher Abnahme des Zellreichtums bis zum Versuchsende. Die Expression von KL-1 und CK 10 wurde mit einer zeitlichen Latenz in den suprabasalen und apikalen Keratinozyten sichtbar. Laminin und Kollagen IV zeigte sich vom Wundrand zur Mitte hin mit zunehmender diskontinuierlicher extrazellulärer Deposition. Vimentin war im Granulationsgewebe und punktuell zwischen den basalen Keratinozyten zu finden. Zentral und in der Tiefe des Granulationsgewebes kam es zur Ausbildung weniger Epithelnester. Interindividuell zwischen den Versuchstieren dieser Versuchsreihe ließen sich im allgemeinen keine bedeutenden Unterschiede erkennen.

In den Versuchen mit den Kollagen-MC dagegen ließen sich geringe Unterschiede hinsichtlich Entzündung und Ausmaß der Epithelisierung zwischen den Schweinen aufzeigen. Intraindividuell kam es zu keiner nennenswerten Fremdkörperreaktion auf die Kollagen-MC. Eine granulozytäre Entzündungsreaktion in den Gruppen 2, 3, 5, und 6 im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne Microträger war nur gering ausgeprägt. Insgesamt fand unabhängig von der Art der Behandlung eine von den Wundrändern ausgehende Epithelisierung statt. Dabei war die Wunde in jeder Gruppe nach vier Tagen zu ca. 15-25 %, nach sechs Tagen zu ca. 40-50 % und nach acht Tagen zu 80-90 % geschlossen. Auch hier bildete sich Granulationsgewebe nach vier Tagen und nahm im Verlauf an Zellreichtum wieder ab. Auffallend war die Ausbildung von Epithelinseln. Diese war minimal in den Kontrollgruppen 1 und 4 ausgeprägt. Deutlicher zeigte sich dieses Phänomen in den Gruppen 2 und 5. Hier war die Absiedelung von Epithelnestern auf den Wundrand beschränkt. Augenscheinlich fanden sich auch die MC gehäuft an den Wundrändern. Zentral waren keine Epithelanhäufungen zu sehen. Am ausgeprägtesten war der Befund in den Gruppen 3 und 6. Epithel bildete sich entlang der MC, sowohl zahlreich an den Wundrändern, aber auch zentral in der Tiefe des Granulationsgewebes, also je nach Lage des MC (Abbildung 14(a) und (b)). Es kam zur Ausbildung von Epithelzapfen, -nestern und Epithelzysten. Die Epithelschichtung, sprich Epitheldifferenzierung, war dabei in der Regel nach innen und nur vereinzelt nach außen gerichtet.

3 ERGEBNISSE

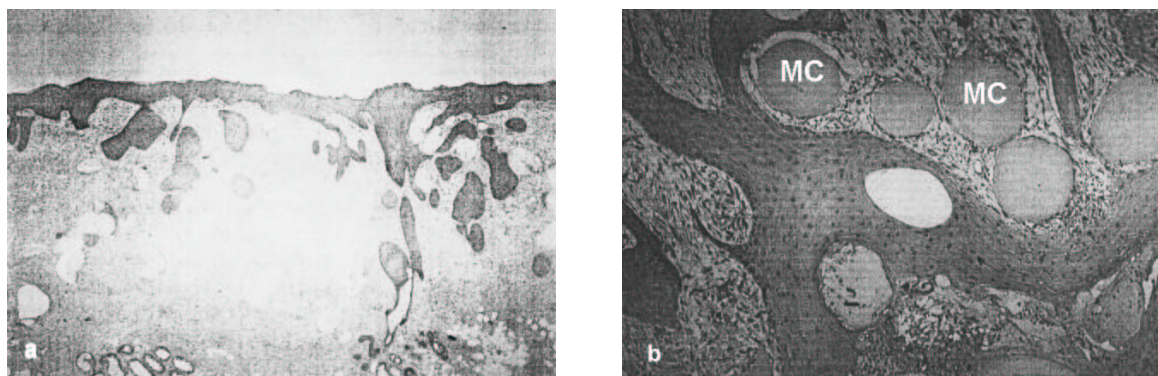


Abbildung 14: Behandlungsgruppe mit Kollagen-Beads, HE-Färbung an Tag 8; (a) Epithelzysten und -nester zentral im Granulationsgewebe, Vergrößerung x 25; (b) Microcarrier (MC) als Leitschiene für Epithelisierung, Vergrößerung x 100.

Immunhistochemisch (CK 5/10) ließen sich diese Zellen eindeutig von den Keratinozyten der MC ableiten. Insgesamt nahm die Zahl der nachweisbaren MC innerhalb von acht Tagen ab. Tabelle 4 stellt diese Ergebnisse noch einmal in komprimierter Form dar.

Zusammenfassend lässt sich folgendes festhalten. Rein quantitativ war im Kurzzeitversuch zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen und deren Einfluss auf die Epithelisierung kein Unterschied zu erkennen. Qualitative Differenzen konnten beschrieben werden. Besonders hervorzuheben ist, dass Dextranbeads eine massive Abstoßungsreaktion auslösten und die Wundheilung störten. Das hatte ein Absterben der an sie gebundenen Keratinozyten zur Folge. Kollagenbeads riefen nur in geringem Maße Entzündungsreaktionen hervor. Sie bildeten jedoch Epithelabsiedelungen im Granulationsgewebe. Diese konnten sich, sowohl am Wundrand wie auch im Zentrum der Wunde, in Nestern, Zysten oder Zapfen organisieren und waren bis zum achten Tag noch nicht abgebaut.

	Gruppen 1 (NaCl) und 4 (Methylzellulose-Gel)	Gruppen 2 (MC + NaCl) und 5 (MC + Gel)	Gruppen 3 (Keratinocyten + MC + NaCl) und 6 (Keratinocyten + MC + Gel)
nach 4 Tagen	Epithelisierung vom Wundrand ausgehend 15-25%, geringe granulozytäre und chronisch-granulierende Entzündung, keine Fremdkörperreaktion	Epithelisierung 15-25%, leicht vermehrte granulozytäre Entzündung (> Gruppe 1), keine Fremdkörperreaktion, MC akkumulieren / versinken entlang der Wundränder, dort auch Ausbildung von Epithelzapfen	Epithelisierung 15-25%, Entzündungsreaktion wie Gruppen 2 und 5, geringe Fremdkörperreaktion, Epithelinseln auch zentral und in der Tiefe
nach 6 Tagen	Epithelisierung 40-50%, weniger granulozytäre und mehr chronisch-granulierende Entzündung, keine Fremdkörperreaktion	Epithelisierung 40-50%, keine Fremdkörperreaktion, MC areaktiv im Granulationsgewebe vermindert, Epithelzapfen	Epithelisierung 40-50%, geringe Fremdkörperreaktion, zunehmend Epithelinseln, -zapfen und -zysten im ges. Wundgrund
nach 8 Tagen	Epithelisierung 80-90%, Granulationsgewebe zellärmer, Epithel gering verworfen	Epithelisierung 80-90%, nur wenige MC vorhanden, Epithelinseln an Wundrändern, oberflächliches Epithel zentral gering verworfen	Epithelisierung 80-90%, nur wenige MC vorhanden, Epithelinseln im ges. Wundgrund verteilt, oberflächliches Epithel zentral gering verworfen

Tabelle 4: Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse der Versuchsreihe mit den Kollagen-Beads.

3 ERGEBNISSE

3.1.3 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Wundflüssigkeit wurde täglich bestimmt. Zusätzlich wurden die Serumproteinkonzentrationen an den Tagen 0, 2, 4, 6 und 8 ausgewertet. Alle Werte geben Mittelwerte aus allen Wunden einer Gruppe wieder. Außerdem wurde eine Auswertung durchgeführt, die nur alle nicht infizierten Wunden berücksichtigte.

Es zeigte sich, dass in allen Behandlungsgruppen die Proteinkonzentration der Wundflüssigkeit bis zum Versuchsende hin abnahm. Maximal wurden an Tag 1 Mittelwerte bis 24,4 mg/ml (Gruppe 3) gemessen, der Minimalwert lag bei 13,6 mg/ml für die Gruppe 2. Bis zum 8. Tag sanken alle Werte auf Konzentrationen zwischen 9,1 mg/ml (Gruppe 6) und 2,1 mg/ml (Gruppe 3).

Allgemein fanden sich bis zum Tag 4 gleichbleibend hohe Proteinkonzentrationen um 20 mg/ml. Danach war in allen Gruppen ein Konzentrationsabfall auf Werte unter 10 mg/ml bis zum Tag 8 zu beobachten.

In der statistischen Auswertung zeigte sich insgesamt kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen und dem Verlauf der Proteinkonzentration.

Einen Überblick gibt Abbildung 15.

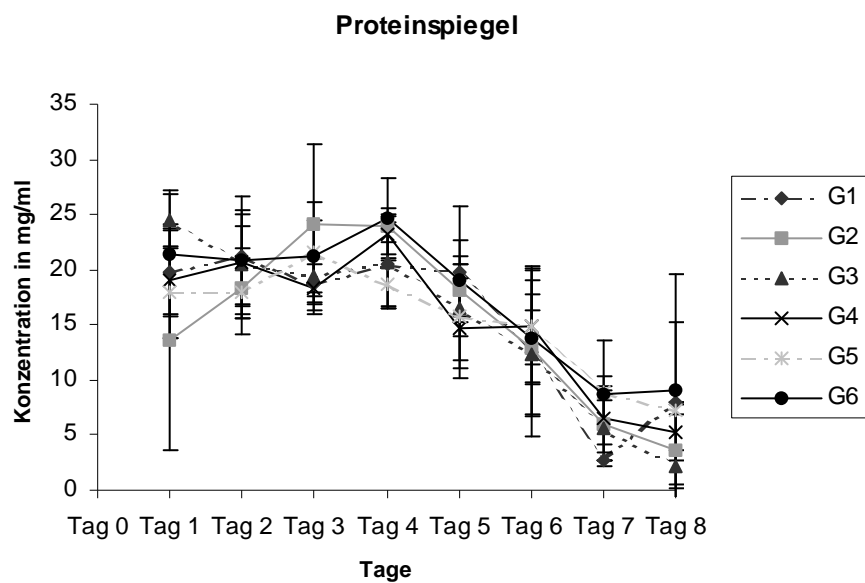


Abbildung 15: Proteinkonzentrationen in Wundflüssigkeiten in mg/ml.

Nahm man die als infiziert geltenden Wunden aus der Wertung änderte sich am Diagrammverlauf nichts. (Siehe Abbildung 16)

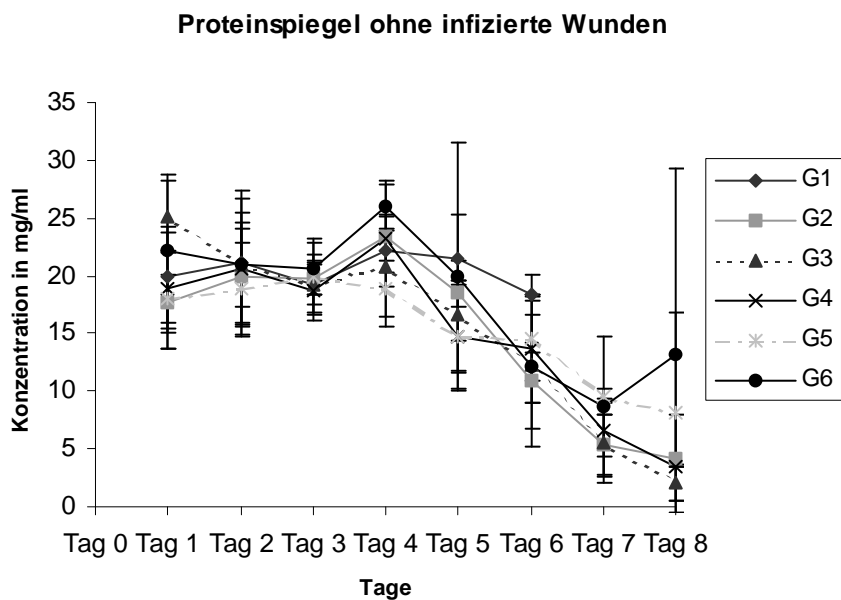


Abbildung 16: Proteinkonzentrationen in Wundflüssigkeiten ohne infizierte Wunden.

3 ERGEBNISSE

Die gemessenen Serumkonzentrationen unterlagen während den 8 Versuchstagen keinen größeren Schwankungen. Sie bewegten sich um Werte zwischen 40 mg/ml und 42 mg/ml (Abbildung 17).

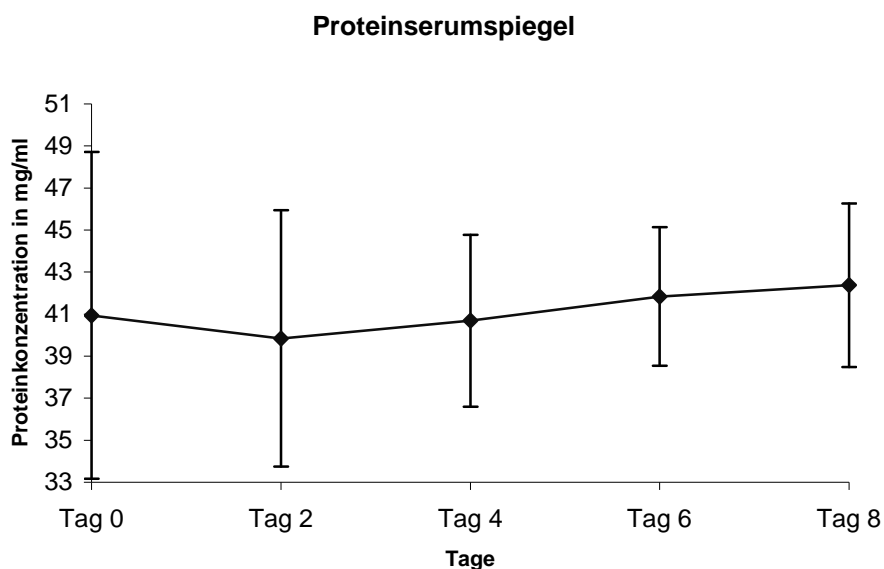


Abbildung 17: Proteinkonzentration im Serum.

3.1.4 Wachstumsfaktoren in Kammerflüssigkeit und Serum

Die Bestimmung der Wachstumsfaktoren mittels ELISA erfolgte nur für die Gruppen 1 und 6, also Kontrollgruppe gegen Behandlungsgruppe. Daneben wurden noch Serumwerte zum Vergleich mit gemessen. Eine Auswertung der infizierten Wunden erfolgte erst gar nicht.

3.1.4.1 PDGF-AB

Insgesamt schwankten die gemessenen Werte zwischen den Schweinen stark. Eine einheitliche Tendenz war nicht festzustellen. Im Mittel zeigten beide Gruppen bis zum Tag 6 hohe PDGF-AB Konzentrationen (zwischen 120 und 160 pg/ml). Erst danach fielen die Werte unter die Nachweisgrenze. Nur bei einem Schwein konnte für die Gruppe 6 an Tag 8 noch ein Wert von 85,3 pg/ml gemessen werden. Abbildung 18 gibt einen Überblick.

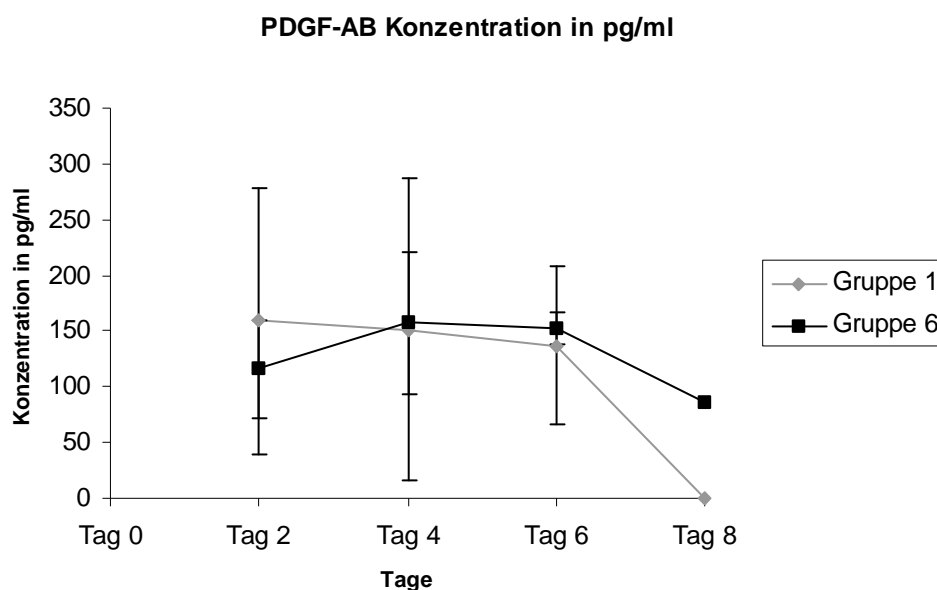


Abbildung 18: In den Wundflüssigkeiten gemessene Konzentration von PDGF-AB in pg/ml.

Die Serumwerte bewegten sich zwischen 182,5 pg/ml und 39,1 pg/ml. Tendenziell ist ein Abfall bis zum Versuchsende zu beobachten.

3.1.4.2 TGF- β 1

Beide Gruppen begannen auf ähnlichem Konzentrationsniveau (2.423 pg/ml in Gruppe 1 und 1.876,9 pg/ml in Gruppe 6). An Tag 4 zeigte sich ein Anstieg in der Behandlungsgruppe 6 auf 4.716,0 pg/ml. Dies entsprach dem 1,5-fachen Wert im Vergleich zur Gruppe 1, die sich ungefähr gleichbleibend auf 2.981,7 pg/ml hielt. Dieser Konzentrationsunterschied war bis zum sechsten Behandlungstag zu beobachten. Danach fielen beide Gruppen auf Werte zwischen 1.105,8 pg/ml (Gruppe 1) und 1.554,5 pg/ml (Gruppe 6) ab. (Siehe Abbildung 19)

Die Serumkonzentrationen für TGF- β 1 bewegten sich im Mittel um die 16.000 pg/ml (Min. 7.400 pg/ml, Max. 21.800 pg/ml).

3 ERGEBNISSE

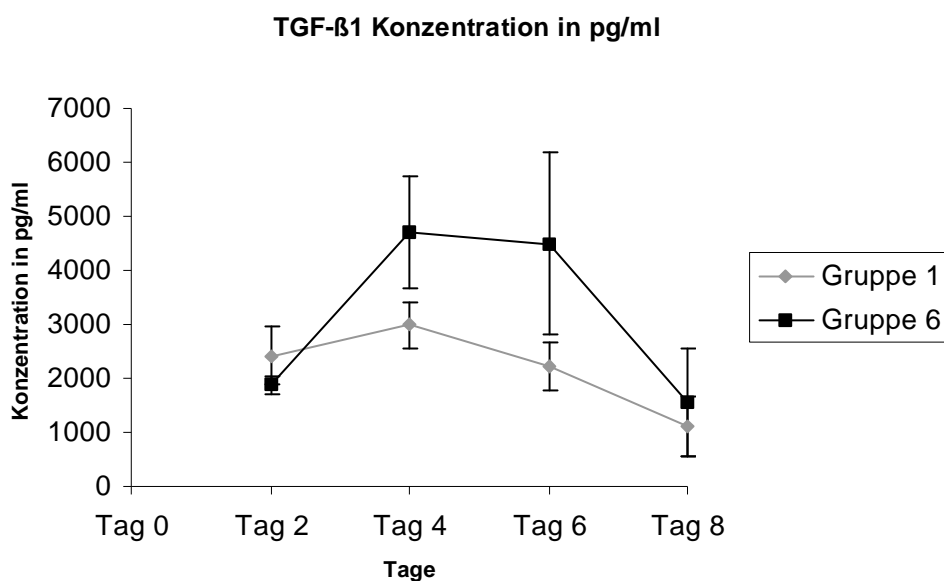


Abbildung 19: In den Wundflüssigkeiten gemessene Konzentration von TGF-β1 in pg/ml.

3.1.4.3 TGF-β2

Die Ausgangskonzentration für beide Gruppen war nahezu identisch. 795,8 pg/ml in Gruppe 1 und 785,8 pg/ml in Gruppe 6. Bis zum Tag 4 ereignete sich ein Konzentrationsanstieg auf 4.940,3 pg/ml für Gruppe 1 und 7.500 pg/ml für Gruppe 6. Das Konzentrationsverhältnis in Gruppe 6 war im Vergleich zur Gruppe 1 um 50 % höher. Die Maximalkonzentration in beiden Gruppen war an Tag 6 erreicht. 8.926,8 pg/ml : 12.511,4 pg/ml (Gruppe 1:6). An Tag 8 zeigte sich immer noch ein 1,7-fach höherer Wert für die Gruppe 6 (7.371,9 pg/ml) als für die Kontrollgruppe (4.210,9 pg/ml).

Die Serumwerte bewegten sich um einen Mittelwert von 5.263 pg/ml (Min. 2.399,7 pg/ml, Max. 6.989,8 pg/ml).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Mittel für die Therapiegruppe zwischen Tag 4 und 8 1,5-fach höhere Konzentrationen an TGF-β2 zu finden waren, als für die Kontrollgruppe. Eine Veranschaulichung gibt Abbildung 20.

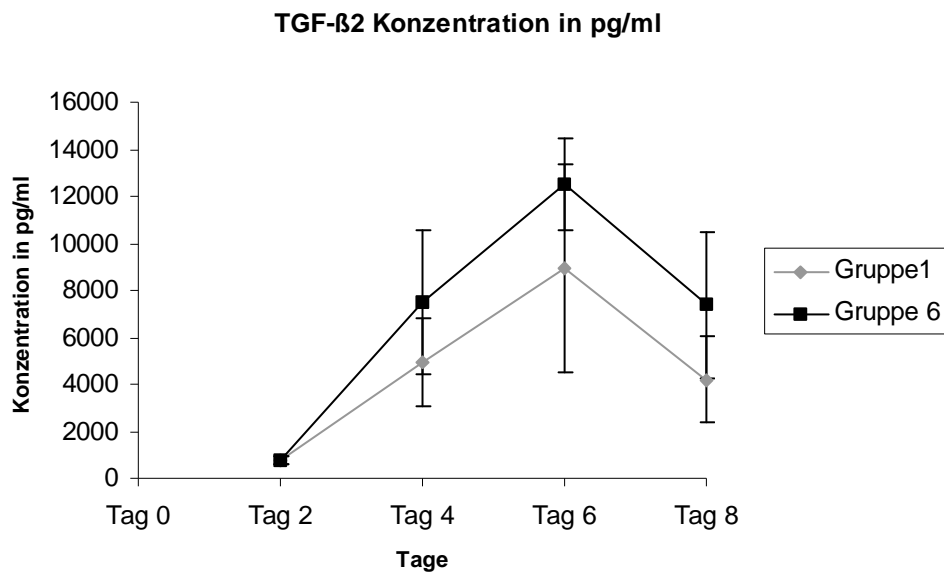


Abbildung 20: In den Wundflüssigkeiten gemessene Konzentration von TGF- β 2 in pg/ml.

3.1.4.4 basic FGF

Der Mittelwert für die Gruppe 1 an Tag 2 lag bei 7,7 pg/ml, während der Wert für die Gruppe 6 27,3 pg/ml betrug. Dies stellte die 3,5-fache Menge an FGF basic dar. Bereits an Tag 4 hatten sich die Werte für beide Gruppen im Bereich von 2-3 pg/ml angeglichen und blieben auch für den Rest des Versuchs in einem Konzentrationsbereich von maximal 6,5 pg/ml (Gruppe 1 / Tag 8).

Die gemessenen Serumkonzentrationen lagen zwischen 1,5 und 7 pg/ml (Mittelwert 3,3 pg/ml) im gesamten Behandlungszeitraum.

Einen kurzen Überblick gibt Abbildung 21.

3 ERGEBNISSE

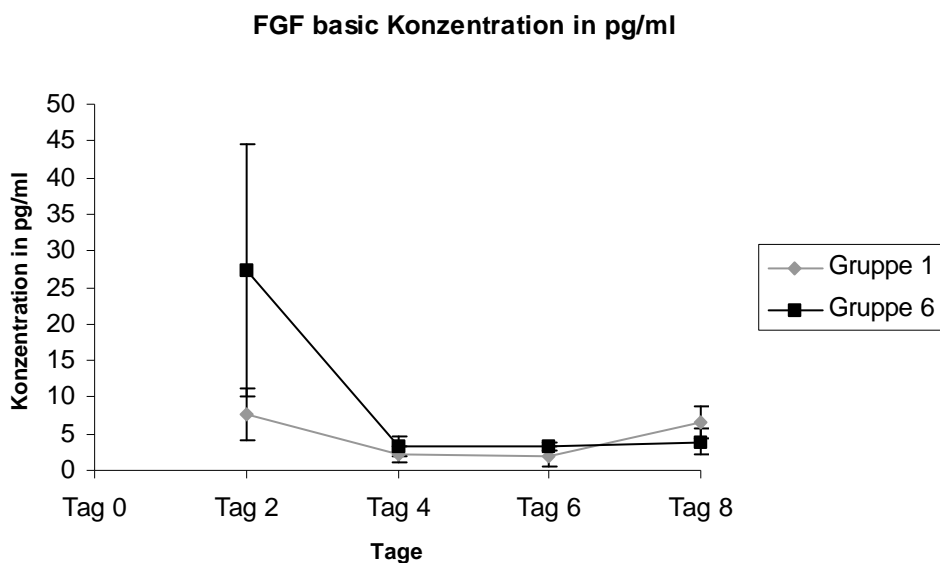


Abbildung 21: In den Wundflüssigkeiten gemessene Konzentration von FGF basic in pg/ml.

3.1.5 Planimetrie

In der Planimetrie wurde der Grad der Wundkontraktion durch die Verkleinerung der Fläche in Pixel bzw. Prozent gemessen. Da jede Wunde von definierter Größe war, konnte die Fläche an Tag 0 auf 100 % gesetzt werden. Jede Wundkontraktion äußert sich in einer Verringerung der Pixelzahl und somit auch in einer prozentualen Verkleinerung der Wundfläche. Wie sich dies im Verlauf photoplanimetrisch darstellt zeigt beispielhaft Abbildung 22.

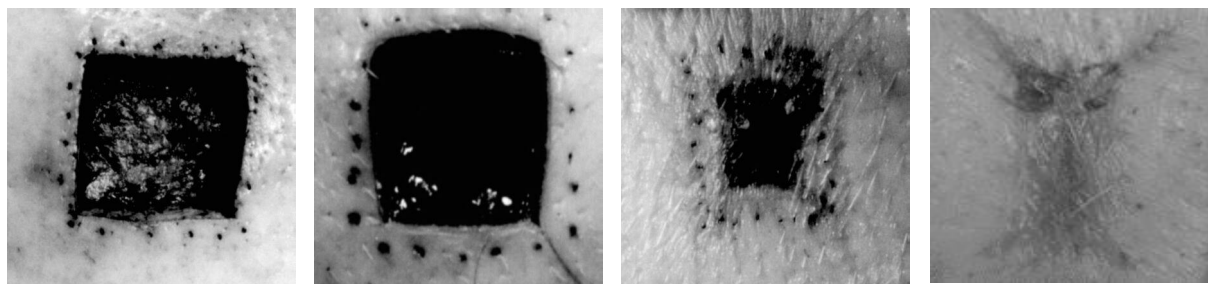


Abbildung 22: Photoplanimetrischer Verlauf der Wundheilung von Tag 0 über Tag 4 und 6 bis Tag 8.

Bei einem Ausgangswert von ca. 10.000 Pixel (Min. 9.519 Pixel, Max. 10.021 Pixel) zeigte sich bis Tag 8 eine stetige Flächenabnahme bis auf Werte zwischen 1.223 Pixel (Gruppe 1) und 2.768 Pixel (Gruppe 6). Betrachtet man die Ergebnisse in

ihrer prozentualen Verteilung, so nahm auch hier die Wundfläche auf Werte zwischen 15 und 29 % vom Ausgangswert ab. Siehe dazu die Abbildung 23 und Abbildung 24.

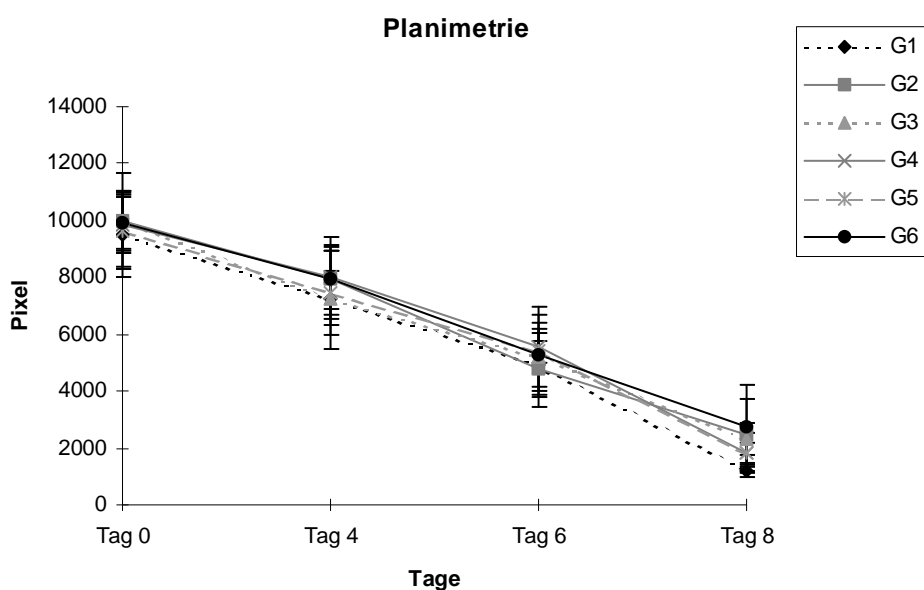


Abbildung 23: Ergebnisse der planimetrischen Vermessung der Wundflächen in Pixel.

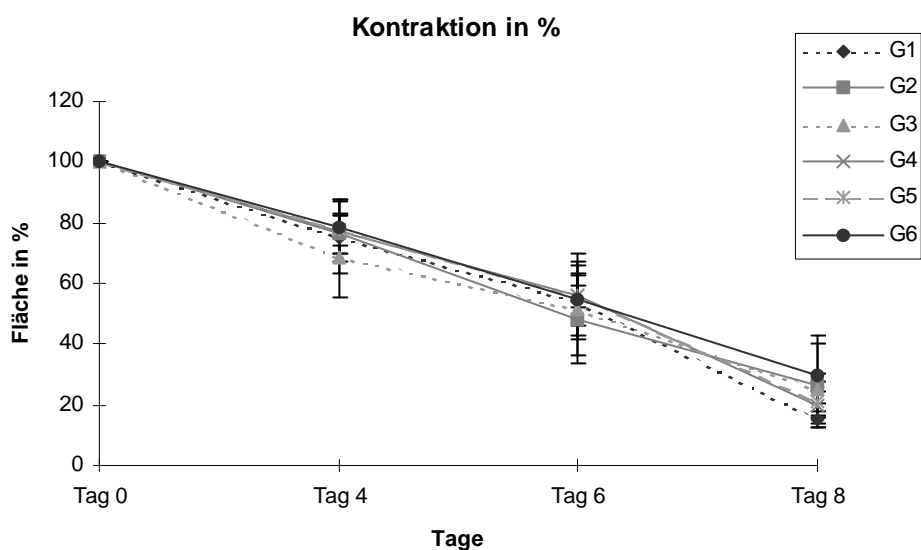


Abbildung 24: Ergebnisse der planimetrischen Wundflächenbestimmung in Prozent.

3 ERGEBNISSE

Lässt man die kontaminierten Wunden unberücksichtigt, zeigte sich im Mittel ein identisches Bild (Abbildung 25 und Abbildung 26).

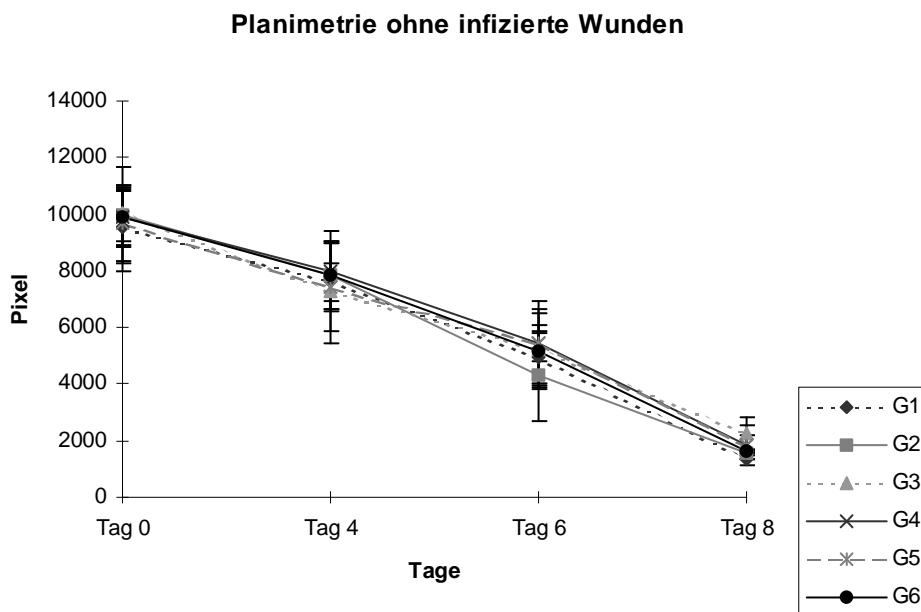


Abbildung 25: Ergebnisse der Wundflächenbestimmung der nicht infizierten Wunden in Pixel.

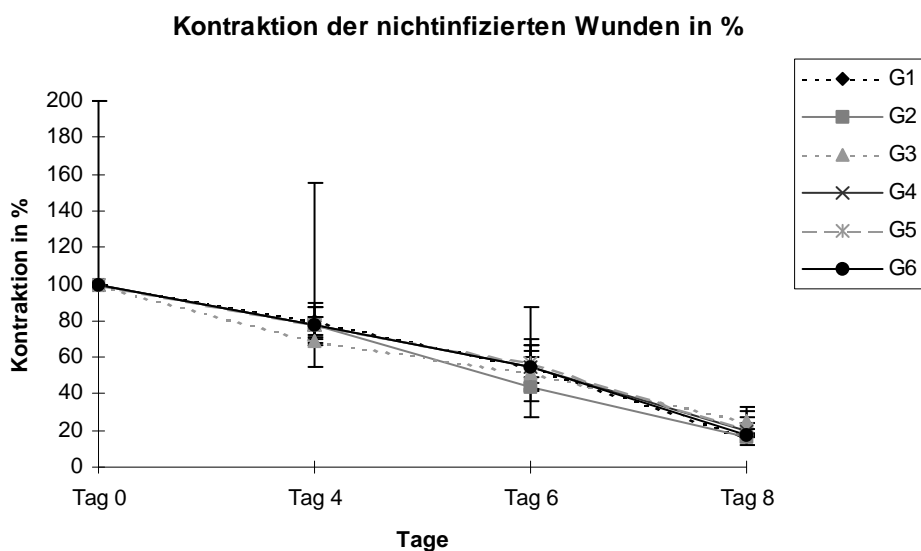


Abbildung 26: Bestimmung der Kontraktion der nicht infizierten Wunden in Prozent.

Insgesamt ließ sich nach statistischer Auswertung der Ergebnisse aussagen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bestand. Alle Wunden kontrahierten sich bis zum Versuchsende auf ca. 20 % ihrer

Ausgangsfläche. Selbst Wundinfektionen hatten keinen Einfluss auf den Verlauf der Kontraktion.

3.2 Heilungsverlauf im Langzeitversuch

Im Langzeitversuch wurden die Wunden nur histologisch und immunhistochemisch ausgewertet.

3.2.1 Histologie

An Tag 4 zeigte sich in beiden Gruppen eine Ansammlung der MC bevorzugt am Wundrand. In der Gruppe 2 war bereits eine beginnende Epithelleistenbildung, d.h. ein Abwachsen der Keratinozyten von den MC sichtbar (siehe Abbildung 27 (a) und (b)).

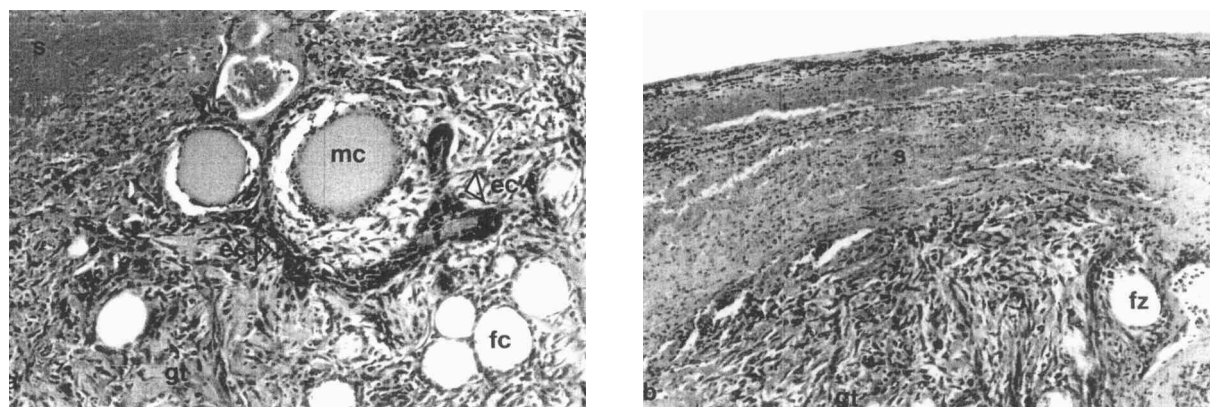


Abbildung 27: (a) Flexibles Epidermistransplantat (Gruppe 2) an Tag 4. Microcarrier (mc) mit adhären Epithelzellen (ec) im Granulationsgewebe (gt), Wundschorf (s), Fettzellen (fc); HE-Färbung, Vergrößerung x 150; (b) Kontrollwunde (Gruppe 1) am Tag 4, Wundschorf (s), Fettzellen (fz); HE-Färbung, Vergrößerung x 150.

An Tag 8 waren alle Wunden deutlich kontrahiert. Eine einsetzende Vaskularisierung war bei beiden Gruppen erkennbar. Der Großteil der Kontrollwunden war noch nicht von Epithel bedeckt. In Gruppe 2 (Behandlungsgruppe) waren die Wunden dagegen mit deutlicher Leisten- und Zapfenbildung komplett epithelisiert. Die Ausbildung von Rete-Leisten (siehe Markierungen in Abbildung 28 (a) und (b)) und Anzeichen einer Verhornung wurden bereits sichtbar.

3 ERGEBNISSE

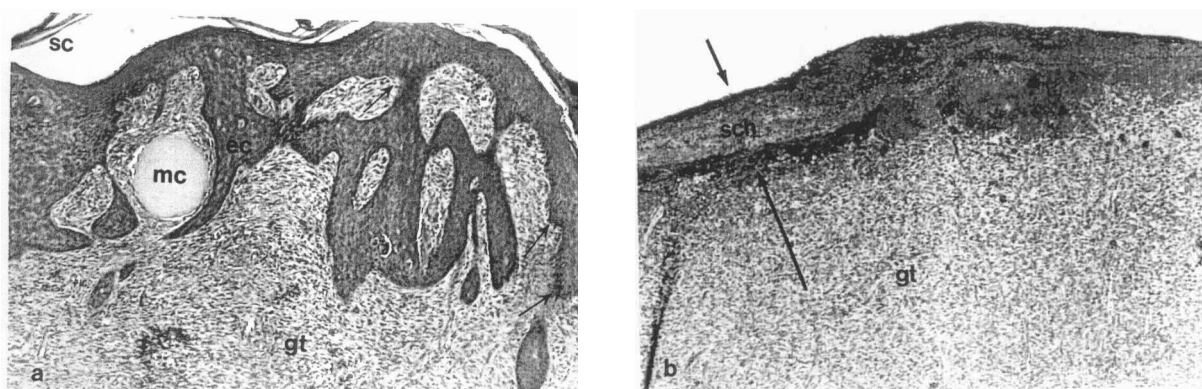


Abbildung 28: (a) Flexibles Epidermistransplantat (Gruppe 2) an Tag 8, Microcarrier (mc) mit Epithelinseln, Granulationsgewebe (gt), Stratum corneum (sc), HE-Färbung, Vergrößerung x 100; (b) Kontrollwunde (Gruppe 1) an Tag 8, Wundschorf (sch), HE-Färbung, Vergrößerung x 100.

Nach 14-21 Tagen waren auch die Wunden der Gruppe 1 geschlossen. Das neu gebildete Epithel zeigte sich teils glatt, teils gut verzahnt. Auch die Epidermis der Gruppe 2 war eher glatt und wies nur wenige säulenartig angeordnete Epithelleisten auf (Abbildung 29). Die Zapfen- und Leistenbildung war rückläufig. Die Microcarrier waren in beiden Gruppen noch deutlich sichtbar, befanden sich aber teilweise schon im Abbau.

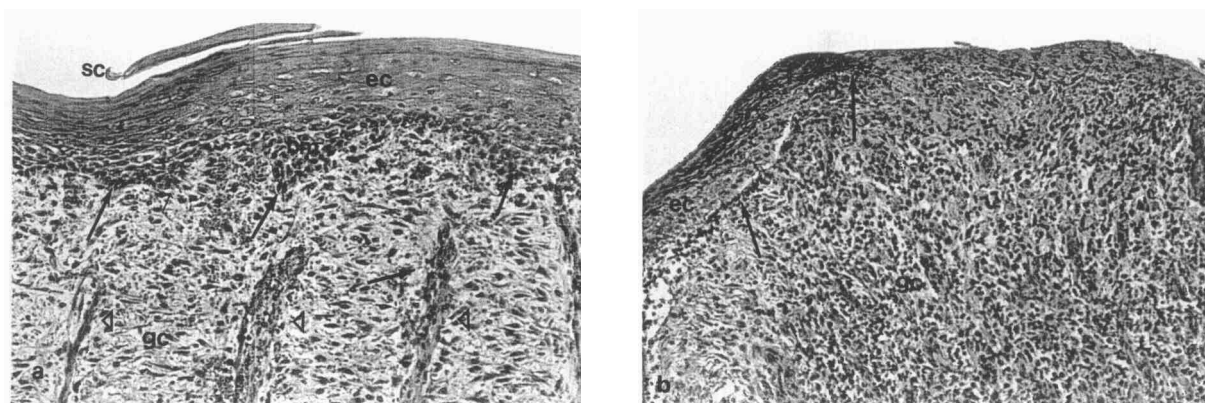


Abbildung 29: (a) Flexibles Epidermistransplantat (Gruppe 2) an Tag 14, Basalmembran (Pfeil), Epithelzellen (ec), Stratum corneum (sc), Vergrößerung x 150; (b) Kontrollwunde (Gruppe 1) an Tag 14, HE-Färbung, Vergrößerung x 150.

An Tag 21 waren die Wunden der Gruppe 1 von verhornender, basal glatter Epidermis bedeckt. Eine ausgeprägte Vaskularisierung war erkennbar. Das Epithel der Gruppe 2 stellte sich stellenweise noch mit Rete-Leisten, insgesamt jedoch gut verzahnt und verhornend dar. Drüsengewebe, kollagenes Bindegewebe, sowie

beginnende Borstenneubildung war erkennbar. In manchen Fällen zeigte sich an den glatten Epidermisstellen jedoch auch die Tendenz zur Ablösung. Nach einer weiteren Woche (Tag 28) war in Gruppe 1 die Verzahnung des Epithels sichtbar, ebenso wie Borstenneubildung, Drüsengewebe und kollagenes Bindegewebe. In Gruppe 2 fiel eine starke Verhornung der Epidermis auf. Es existierten Bereiche mit ausgeprägten Leisten, aber auch völlig glatte Bereiche. Hautanhangsgebilde blieben weiterhin erkennbar. Immer noch fanden sich im Abbau befindliche MC, teilweise auch umgeben von Lymphozyten. An Tag 35 war die Epidermis der Gruppe 1 bis auf die Randbereiche der Wunden eher glatt mit scheinbar losem Kontakt zur Dermis. Auch in den Wunden der Gruppe 2 war die Epidermis glatt. Die MC waren noch immer nicht vollständig abgebaut. Bis zum Tag 41 ergaben sich keine größeren Veränderungen mehr. Das Epithel in beiden Gruppen war teilweise glatt und von der Dermis abgelöst, teilweise gut verzahnt. Auch jetzt fanden sich noch Microcarrier in den Wunden. Erst an Tag 55 waren keine ganzen MC mehr sichtbar, sondern nur noch sich im Abbau befindliche (Abbildung 30).

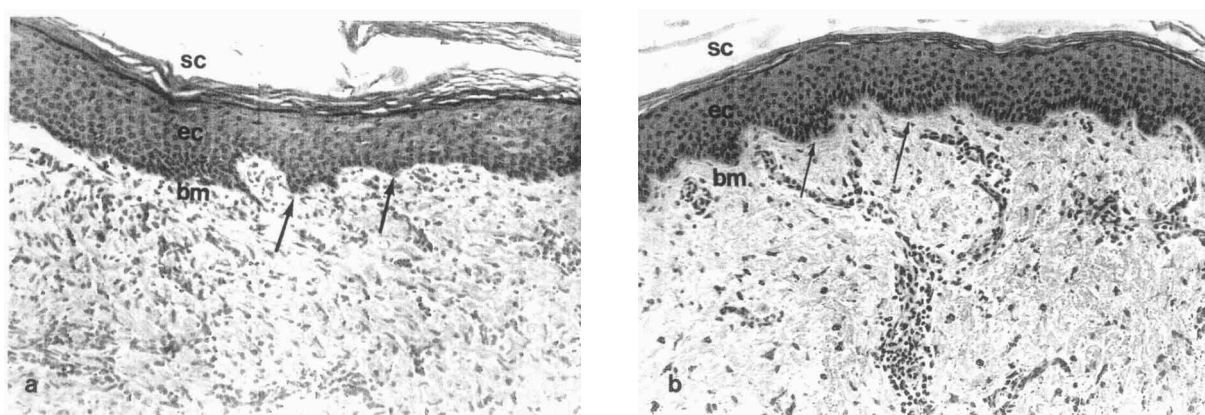


Abbildung 30: (a) Flexibles Epidermistransplantat (Gruppe 2) an Tag 55, Stratum corneum (sc), Epithelzellen (ec), Basalmembran (bm), Rete-Leisten (Pfeil), HE-Färbung, Vergrößerung x 150; (b) Kontrollwunde (Gruppe 1) an Tag 55, HE-Färbung, Vergrößerung x 150.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die Wunden der Behandlungsgruppe im Vergleich zu den Kontrollwunden schneller epithelisierten. In der Behandlungsgruppe waren die Wunden nach acht Tagen komplett, mit hoher Schichtdicke epithelisiert. Ein eindeutiger Unterschied in der Epithelbeschaffenheit

3 ERGEBNISSE

zwischen den Gruppen fand sich nicht. Insgesamt dauerte es bis zu acht Wochen bis die Microcarrier abgebaut waren.

3.2.2 Immunhistochemie

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen spezifisch für jeden einzelnen Antikörper aufgezählt. Verwendet wurden Cytokeratin 5/6, Cytokeratin 10, CD 11b, CD 68, CD 79a, CD 3 und PGP 9.5.

3.2.2.1 Cytokeratin 5/6

Wie bereits erwähnt färbt CK 5/6 im normalen Plattenepithel vor allem Basalzellen.

Nach acht Tagen war eine deutliche Färbung der Keratinozyten, die die Microcarrier umgeben, bzw. von ihnen abgewandert sind, zu erkennen. Ebenfalls gefärbt stellten sich die von den MC ausgehenden Epithelleisten dar (vgl. Abbildung 31(a) und (b)). Etwa die Hälfte der MC waren ohne gefärbte Keratinozyten in der Tiefe der Wunden sichtbar. An Tag 14 war die Anfärbung schwächer. Der Großteil der basalen Zellen der Epidermis war nicht markiert. Auch die gefärbten Epithelleisten und -inseln nahmen an Anzahl ab. Die meisten MC waren nicht von Keratinozyten umhüllt. Nach drei Wochen war keine Färbung des Epithels oder der Keratinozyten um die MC mehr sichtbar.

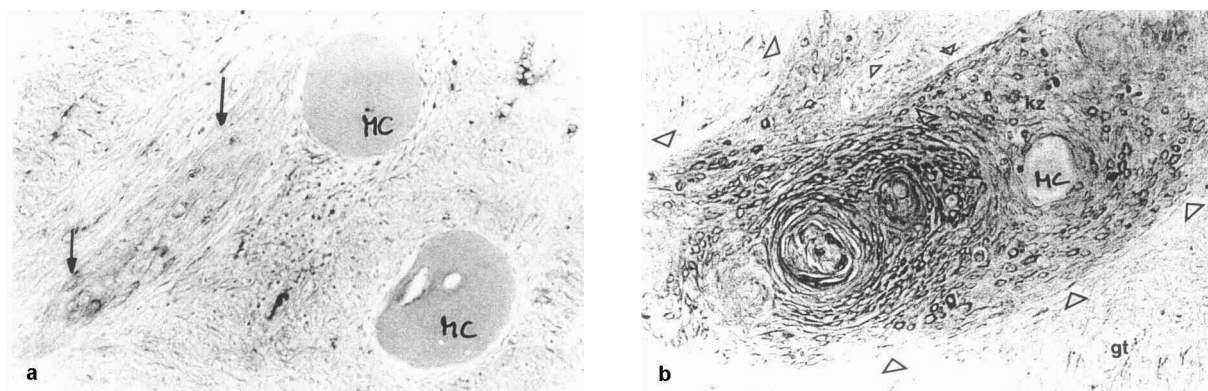


Abbildung 31: Flexibles Epidermistransplantat, immunhistologische Färbung mit anti-CK 5/6 an Tag 8; (a) CK 5/6 positive, von den Microcarriern abwandernde Zellen (Pfeil), Vergrößerung x 150; (b) CK 5/6 positive Epithelleiste, Microcarrier (MC), Granulationsgewebe (gt), Vergrößerung x 150.

Daraus ergibt sich, dass die basalen Keratinozyten von den Microcarriern initial abwanderten und später differenzierten. Aufgrund des unterschiedlichen Färbeverhaltens des Antikörpers war eine ausgeprägte Spezies-Spezifität des humanen Antikörpers nicht auszuschließen (siehe auch Abbildung 32).

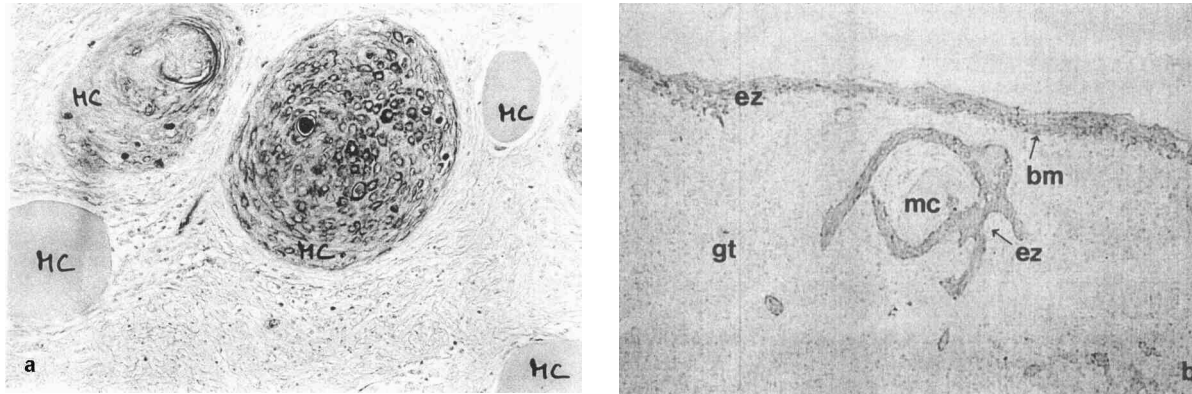


Abbildung 32: Flexibles Epidermistransplantat; (a) Microcarrier (MC) in der Wunde an Tag 8 mit und ohne CK 5/6 positive Zellen, Vergrößerung x 150, (b) CK 5/6 positive Epithelzellen an Tag 4 (ez) auf einem Microcarrier (mc) in der Wunde, Basalmembran (bm), Granulationsgewebe (gt), Vergrößerung x 150.

3.2.2.2 Cytokeratin 10

CK 10 findet sich in suprabasalen Schichten verhornender und nicht verhornender Epithelien.

Nach acht Tagen waren in der neu gebildeten Epidermis noch keine CK 10-positiven Zellen sichtbar. Nur vereinzelt fanden sich in der Wundtiefe um Microcarrier, bzw. in den Epithelleisten einige angefärbte Zellen (Abbildung 33(a)). An Tag 14 erschienen in der Epidermis einige CK 10-positive Zellen (Abbildung 33(b)).

3 ERGEBNISSE

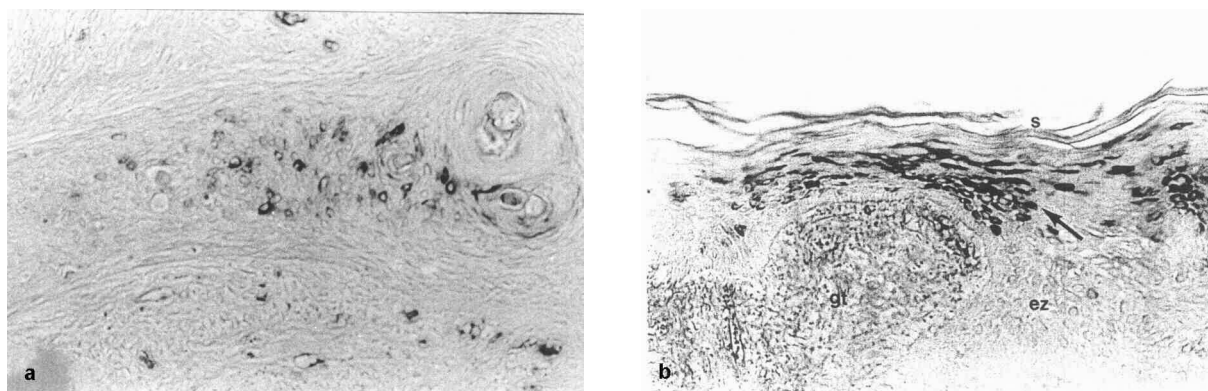


Abbildung 33: Flexibles Epidermistransplantat, immunhistologische Färbung mit anti-CK 10; (a) Tag 8, CK 10 positive Zellen in der Epithelleiste, Vergrößerung x 150; (b) Tag 14, CK 10 positive Epithelzellen (ez, Pfeil) in neugebildeter Epidermis, Granulationsgewebe (gt), Hornschicht (s), Vergrößerung x 150.

Im Vergleich dazu waren die suprabasalen Epidermisschichten der Wundränder deutlich markiert, was auch in den darauffolgenden Wochen so blieb (Abbildung 34(a) und (b)).

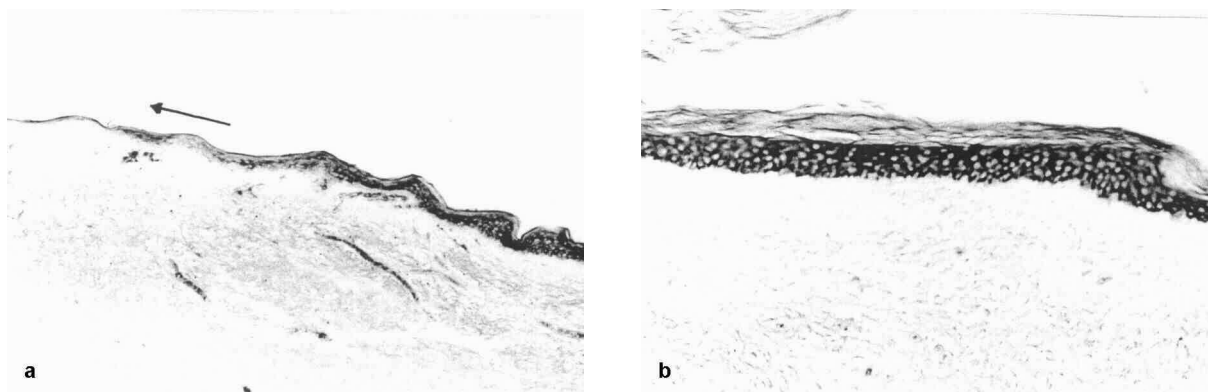


Abbildung 34: Flexibles Epidermistransplantat, (a) Tag 14, CK 10 positive Zellen der neugebildeten Epidermis, Wachstumsrichtung (Pfeil) der vom Wundrand ausgehenden Epidermisneubildung, Vergrößerung x 150; (b) nach drei Wochen CK 10 positive Zellen der neugebildeten Epidermis, Vergrößerung x 150.

Durch diese Färbung ist erkennbar, dass die Neubildung der Epidermis hauptsächlich von den Wundrändern ausging. In der Wundtiefe waren keine angefärbten Zellen sichtbar. Die initial von den MC abgewanderten CK 5/6-positiven Zellen hatten sich differenziert und färbten sich nun CK 10-positiv. Eine Differenzierung von basalen in suprabasale Zellen fand statt.

3.2.2.3 Makrophage CD 11b

Dieser Antikörper bindet an den Komplement-Rezeptor Typ 3, ein Plasmaprotein, das auf Monozyten zu finden ist.

Die untersuchten Präparate zeigten nur sehr schwache Anfärbung einzelner Zellen an den Tagen 35 und 41. Weder um im Abbau befindliche MC noch um in der Wunde sichtbare Verbandsmaterialreste waren deutliche Makrophagenansammlungen erkennbar. Eine eindeutige Fremdkörperreaktion war nicht zu erkennen.

3.2.2.4 Makrophage CD 68

Das CD 68-Antigen wird von Makrophagen, Monozyten und Granulozyten des peripheren Blutes exprimiert.

Auch hier wurden erst Präparate zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich von den Tagen 28, 35 und 41 untersucht. Insgesamt waren nur einzelne, über die gesamte Wunde verteilte Zellen, gefärbt (Abbildung 35(a)). Es zeigte sich keine auffällige Makrophagenansammlung um die Microcarrier oder anderes Fremdmaterial (Abbildung 35(b)). Das bedeutet, dass auch hier keine Fremdkörperreaktion nachzuweisen war.

3 ERGEBNISSE

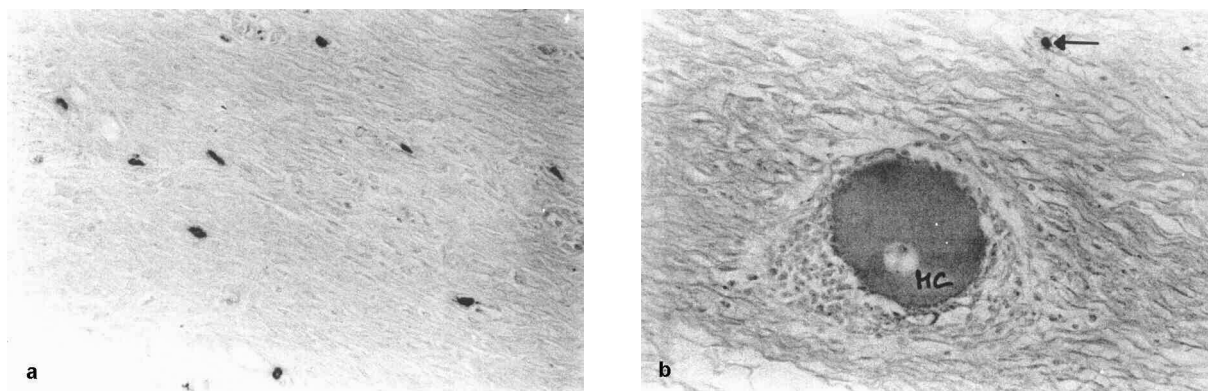


Abbildung 35: Immunhistologische Färbung mit anti-CD 68 nach mehr als vier Wochen; (a) einzelne CD 68 positive Zellen in der Wunde, Vergrößerung x 300; (b) Microcarrier (MC) im Abbau, der Pfeil zeigt eine CD 68 positive Zelle, Vergrößerung x 300.

Insgesamt stellte sich die Färbung nur schwach dar. Zum Vergleich ist in Abbildung 36 die Positivkontrolle menschlichen Lungengewebes gezeigt.

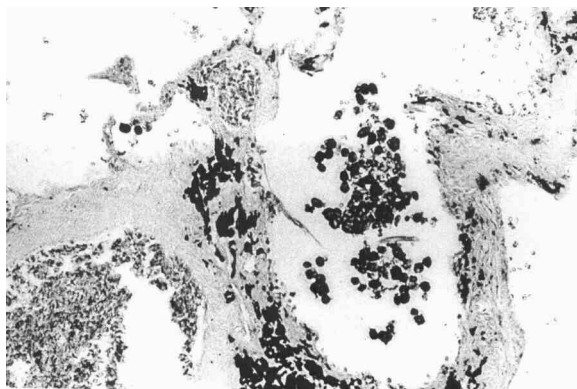


Abbildung 36: Positivkontrolle, CD 68 positive Zellen in der menschlichen Lunge, Vergrößerung x 150.

3.2.2.5 B-Zellen

Dieser Antikörper reagiert mit dem auf B-Zellen sitzenden CD 79a-Antigen.

An Tag 28 war in der Gruppe 1 eine deutliche Anfärbung von Zellen im Bereich von in der Wunde verbliebenem Verbandsmaterial erkennbar (Abbildung 37(a) und (b)).

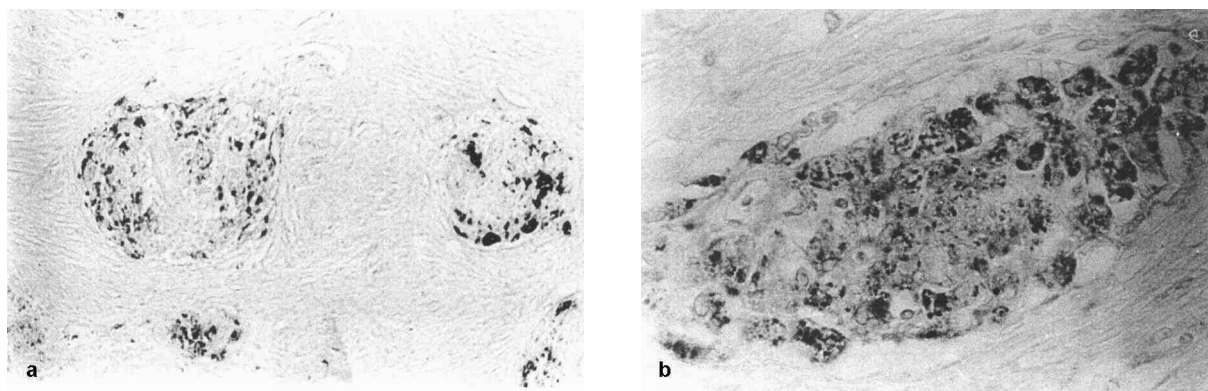


Abbildung 37: Gruppe 1, B-Zellreaktion im Entzündungsbereich um Verbandsmaterial in der Wunde; (a) Vergrößerung x 150; (b) Vergrößerung x 600.

In der Gruppe 2 fielen keine positiv gefärbten Zellen um die MC auf. Diese Tatsache blieb auch an den Tagen 35 und 41 bestehen (Abbildung 38).

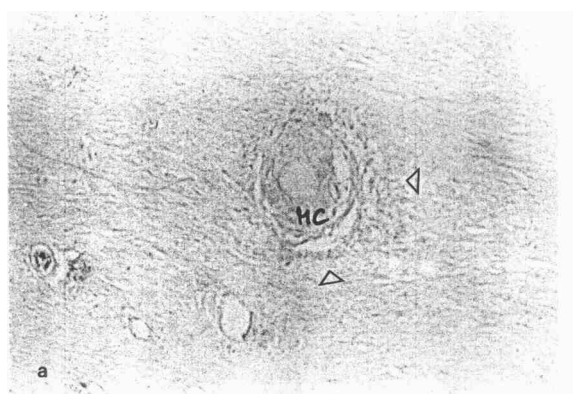


Abbildung 38: Flexibles Epidermistransplantat an Tag 35, Microcarrier (MC) im Abbau, keine B-Zell-Reaktion, Vergrößerung x 150.

B-Zellen reagierten auf verbliebenes Fremdmaterial eindeutig positiv, während die Microträger keine eindeutige Immunreaktion auslösten.

3.2.2.6 T-Zellen

Mit dieser Untersuchung können T-Zellen erkannt werden. Der Antikörper reagiert mit der intrazytoplasmatischen Region des CD 3-Antigens auf den T-Zellen.

3 ERGEBNISSE

Nur vereinzelt wurden positiv gefärbte Zellen um Microcarrier gefunden. Stärker färbten sich jedoch Bereiche um Fremdmaterial an. Siehe dazu Abbildung 39 und Abbildung 40.

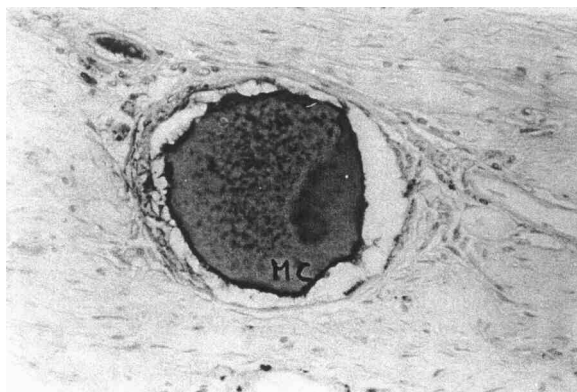


Abbildung 39: Flexibles Epidermistransplantat an Tag 35, immunhistologische Färbung mit anti-CD 3, Microcarrier (MC) im Abbau ohne positive T-Zell-Reaktion, Vergrößerung x 300.

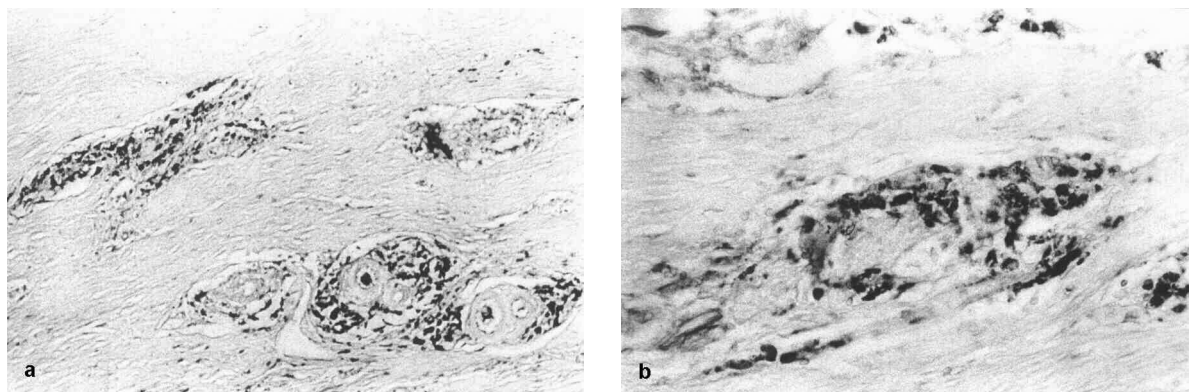


Abbildung 40: Immunhistologische Färbung mit anti-CD 3, starke T-Zell-Reaktion um Fremdmaterial in der Wunde; (a) Vergrößerung x 150; (b) Vergrößerung x 300.

Eingebrachtes Verbandsmaterial löste somit eine stärkere Entzündungsreaktion aus, als die Reste der Microcarrier.

3.2.2.7 PGP 9.5

Hierbei handelt es sich um einen spezifischen Antikörper gegen das neuronale zytoplasmatische Protein PGP 9.5 (protein gene product 9.5). Er ist ein Marker für alle efferenten und afferenten Nervenfasern und neuroendokrinen Zellen.

Es wurden Wunden von den Tagen 14, 21, 28, 35 und 41 untersucht. Dabei waren deutlich gefärbte Zellen sichtbar. Zusätzlich waren einige wenige, meist gefäßbegleitende Nerven erkennbar. Insgesamt schienen aber nur wenige Nerven vorhanden zu sein.

Ein Unterschied zwischen den Gruppen fand sich nicht. Besonders erwähnenswert war die beobachtete Kreuzreaktion (Abbildung 41), die eine Beurteilung schwierig machte.

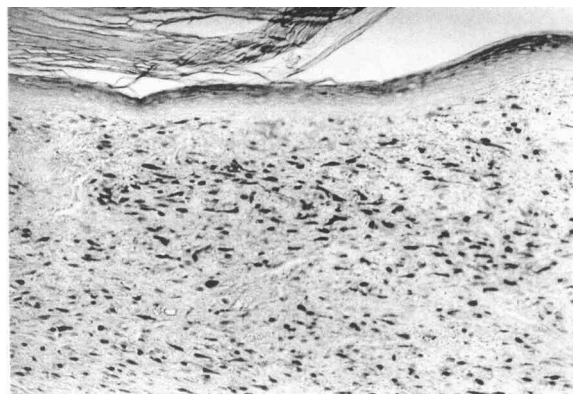


Abbildung 41: Immunhistologische Färbung mit anti-PGP 9,5. Kreuzreaktion in der gesamten Wunde, Vergrößerung x 150.

Zusammenfassend müssen die immunhistochemischen Ergebnisse sehr kritisch bewertet werden. Die Spezies-Spezifität (Vergleichbarkeit Tier - Mensch) für die einzelnen Antikörper ist nicht genau definierbar. Insgesamt fanden sich keine Gruppenunterschiede. Die Microcarrier schienen keine größeren Immunreaktionen hervorzurufen. Die Neubildung der Epidermis ging hauptsächlich vom Wundrand aus. Eine Epitheldifferenzierung konnte vereinzelt beobachtet werden.

4 Diskussion

4.1 Das Schweinemodell

Zunächst stellt sich die Frage, welches Tiermodell für die Erforschung der Wundheilungsmechanismen am geeignetsten ist und in wie weit die Ergebnisse auf die menschliche Wundheilung übertragbar sind.

Kangesu et al. (1993) erforschten die morphologischen Unterschiede von menschlicher Haut und Schweinehaut. Es zeigte sich, dass nicht nur die Morphologie sondern auch die Mechanismen der Wundheilung der menschlichen sehr ähnlich sind. So ist die relative Dicke von Epidermis und Dermis gleichartig. Beide enthalten eine papilläre dermale Schicht, epidermale Reteleisten, Talgdrüsen, apokrine Schweißdrüsen, subdermales Fett und eine vergleichbare Haardichte. Unterschiede finden sich in weniger durchbluteter Dermis und dem Fehlen von eccrinen Schweißdrüsen beim Schwein. Der Vergleich von gezüchteten Keratinozyten zeigte keinerlei Unterschiede im Aufbau der Hautschichten (Kangesu et al. 1993). Auch Compton (1994) kam zu dem Schluss, dass das Schwein aufgrund seiner strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zum Menschen als Tiermodell für Wundheilungsstudien am besten geeignet ist.

Obwohl die Maus als Versuchstier sehr einfach in Tierhaltung und Umgang ist (Compton 1994), besteht hier das Problem, dass gerade bei Nagern die Wundheilung vornehmlich durch Kontraktion des unter der Haut liegenden Musculus panniculosus erfolgt (Kennedy und Cliff 1979, Compton 1994). Vergleichende Studien zeigten, dass die Kontraktion bei Vollhautwunden am Schwein deutlich geringer ausfällt als bei der Ratte (Chvapil und Chvapil 1992). Danach ist eine Vollhautwunde am Schwein nach einer Woche zu ca. 40% kontrahiert. Dieses deckt sich auch nahezu mit unseren Ergebnissen. Daneben ist die Gewinnung von kultivierbaren Keratinozyten bei pelztragenden Tieren schwieriger (Compton 1994).

Weiterhin scheint die Wahl der Wundenplatzierung am Tier eine Rolle zu spielen. Zum Beispiel kontrahieren lateral gesetzte Wunden stärker als Wunden paraspinal am Rücken (Chvapil und Chvapil 1992). Untersuchungen von Hinrichsen et al.

(1997) kamen zu dem Ergebnis, dass nicht nur die Lage, sondern auch Größe und Form der Wunde die Kontraktion und Epithelisierung beeinflussen.

Trotz aller Ähnlichkeit zwischen menschlicher und Schweinehaut bleibt das Problem, dass bei immunhistochemischen Untersuchungen und auch bei ELISA-Tests Kreuzreaktionen mit verschiedenen Antikörpern auftreten können. Kangesu et al. (1993) beschrieb die dadurch erschwerte Interpretierbarkeit der Ergebnisse.

Zusammenfassend lässt sich nun festhalten, dass Schweine als Versuchstiere zur Untersuchung von Wundheilungsvorgängen aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Hautbeschaffenheit mit der des Menschen am besten geeignet sind. Ergebnisse müssen zwar kritisch bewertet werden, sind aber im großen und ganzen auf den Menschen übertragbar. Nachteilig sind die erheblichen Kosten durch Haltung, erhöhter operativer Aufwand, auch an Material, und Schwierigkeiten in der postoperativen Überwachung (Compton 1994).

4.2 Das Kammermodell

Bereits 1962 erkannte Winter die positiven Effekte der okklusiven Wundverbände. Er demonstrierte, dass durch diese Technik nicht nur eine Vertiefung der Wunde, sondern auch Narbenbildung reduziert, die Reepithelisierung hingegen um 50 % beschleunigt werden kann. Eine Austrocknung der Wunde dagegen endet in weiterem Gewebeschaden und unerwünschter Narbenbildung.

Die Methode der feuchten Wundbehandlung mittels geschlossenem Kammermodell etablierte Breuing et al. (1992). Er beschrieb ebenfalls, dass sich im feuchten Milieu die Narbenbildung und Gewebnekrose reduziert. Eine Mazeration von Gewebe tritt nicht ein und Entzündungsreaktionen werden weniger oft beobachtet.

Die Entwicklung der Wundkammer macht gezieltes Monitoring, aber auch Sammeln von Wundflüssigkeiten möglich. Durch Instillation verschiedener Faktoren, wie z.B. Antibiotika oder Wachstumsfaktoren, kann direkt Einfluss auf die Wundatmosphäre genommen werden. Außerdem hat die Wundkammer eine Schutzfunktion gegen äußere Einflüsse oder Austrocknung der Wunde.

Untersuchungen von Breuing et al. (1992) zeigten, dass trotz Antibiotikazusatz auch in den flüssigkeitsgefüllten Wundkammern bakterielle Kontaminationen von über 70% auftraten. Diese haben aber, da histologisch keine Veränderungen nachzuweisen waren, offensichtlich keinen Einfluss auf Heilung oder Epithelisierung. Unsere Ergebnisse zeigten sogar geringere Wundinfektionsraten (40-50%). Auswirkungen auf Histologie, Planimetrie oder Proteinbestimmung konnten auch wir nicht feststellen.

Das Kammermodell ist also ein möglicher Weg zur Untersuchung der Wundheilung im flüssigen Milieu mit vielen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten. Es kann viele Informationen zur Physiologie und Biochemie der Wundheilung liefern.

4.3 Einfluss der Microcarrier auf die Wundheilung

In diesem Abschnitt werden Erkenntnisse aus der Literatur über Microcarrier diskutiert und im Besonderen der Unterschied zwischen verschiedenen Trägersystemen noch einmal herausgearbeitet.

Im Microcarrier-System können sehr viele Zellen auf dessen Oberfläche adhären. Dennoch wird die Kontaktinhibition vermieden (Gorodetsky et al. 1999). Zellen bilden keinen Monolayer und können leicht in geeignetem Medium suspendiert werden (Tang et al. 1994). Somit ist eine subkonfluente Züchtung mit wenig differenzierten Zellen möglich. Hecht et al. (1997) zeigten im organotypischen Hautmodell in vitro, dass subkonfluent gezüchtete Keratinozyten auf MC adhären und wieder von den MC auf eine Unterlage migrieren, dort adhären und weiter proliferieren können. Dies deckte sich auch mit unseren Ergebnissen im Tiermodell. Die Keratinozyten verließen den MC und bildeten ein neues Epithel. Die MC schienen sogar als eine Art Leitstruktur für die Epithelbildung zu dienen. Es ließen sich zahlreiche Epithelzapfen, -nester und -zysten im Bereich der Wundränder erkennen. Je nach Lage der Microcarrier kamen diese auch zentral und in der Tiefe des Granulationsgewebes vor. Vermutlich bedingt durch die hohe Zelldichte bei der Aussaat, prägte sich dieses Phänomen besonders stark in den Gruppen mit besiedelten Microcarrier aus. Durch die große Oberfläche der MC können sehr viele Zellen darauf adhären. Butler et al. (1998) stellten den Zusammenhang zwischen

hoher Zelldichte, daraus resultierender Epitheldicke und linearem Anstieg der Zellzystenbildung dar. So scheint sowohl der Microcarrier, wie auch die eingesäte Zellzahl für die beobachtete Zystenbildung verantwortlich zu sein. Ein weiteres Merkmal bildet die nach innen gerichtete Epitheldifferenzierung. Butler et al. (1999) beschrieben den Aufbau ihrer Epithelzysten ebenfalls in dieser Weise. Peripher fand sich die Basalzellschicht und im Zentrum der Zyste das Stratum corneum. Der Abbau dieser Epithelzysten begann ungefähr nach zwei bis drei Wochen. Dies entsprach auch unseren Ergebnissen. Auch Vogt et al. (1993) beobachteten die Formation von Keratinozytenkonglomeraten bis zum 12.Tag. Sie postulierten aber, dass diese wahrscheinlich den folliculären Anteilen der Epidermis entsprächen. Dem intraepidermalen Endteil des Haarfollikels fehle der zur Ausreifung nötige Stimulus, so dass es folglich wieder zum Abbau käme.

Weiterhin zeigte sich, dass die Wahl des Microcarriers entscheidenden Einfluss auf die Wundheilung hat. So bewirkten die Dextran-Beads, obwohl sie mit denaturiertem Schweinekollagen Typ I beschichtet sind, eine massive Abstoßungsreaktion. Hingegen lösten die Kollagen-Beads nur in geringem Maße eine Entzündungsreaktion aus. In den Dextrangruppen fand sich eine hochgradige Wundheilungsstörung. Diese resultierte in einer lediglich partiellen Defektdeckung infolge einer ausgeprägten granulozytären und vor allem histiozytär / riesenzelligen Entzündungsreaktion mit Ausbildung von Fremdkörpergranulomen. Nur vereinzelt gelang uns der Nachweis vitaler Keratinozyten durch CK 5. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das Schweinekollagen abgebaut wurde und das darunter liegende Dextran die Fremdkörperreaktion hervorgerufen hat. Dextran wird auch in der Klinik zum Beispiel als kolloidales Volumenersatzmittel eingesetzt. In seltenen Fällen kann es zu allergischen Reaktionen kommen. Franklin et al. (1995) zeigten, dass sich Monozyten um Agarosebeads sammeln und so frühzeitig eine Granulombildung bedingen können. Im Vergleich dazu konnte bei den mit Rinderkollagen-Carriern behandelten Schweinen keine nennenswerte Fremdkörperreaktion beobachtet werden. Die Epithelisierung war hier nach acht Tagen bereits zu 80-90 % erfolgt.

Die Abbaubarkeit des Carriers ist für die Wundheilung ebenfalls wichtig. Gorodetsky et al. (1999) beispielsweise verwendeten abbaubare Carrier aus Fibrin. In unseren

4 DISKUSSION

Untersuchungen war die Anzahl der Microträger insgesamt rückläufig. Nach acht Wochen waren alle Carrier teils abgebaut, teils im Abbau befindlich.

Es bleibt abschließend noch zu diskutieren, ob der Microcarrier überhaupt ein geeignetes Trägersystem für Zellkulturen darstellt. In der Literatur werden viele verschiedene Materialien und Systeme untersucht. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der schnellen Anzucht subkonfluenter, proliferationsfähiger, nicht ausdifferenzierter Keratinozyten, sowie einer einfachen Handhabung beim Transplantationsvorgang.

So verwendeten Horch et al. (1998) in Fibrinkleber suspendierte Keratinozyten. Tánczos et al. (1999) kultivierten die Keratinozyten zunächst auf Microcarriern und suspendierten diese dann erst im Fibrinkleber. Silikon-Nylonnetz-Membranen mit Kollagenbeschichtung (Biobrane[®]) oder eine laserperforierte Membran aus Hyaluronsäure (Laserskin[®]) erfüllen ebenfalls diese Ansprüche mit guten Ergebnissen (Myers et al. 1997 und Singer et al. 1999).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass der Microcarrier ein geeignetes Trägersystem darstellt. Er dient als Matrix zur Adhäsion der Keratinozyten. Mit Hilfe seiner großen Oberfläche kann die Zahl der einsähbaren Zellen erhöht werden. Dennoch bleibt die Kultivierung subkonfluent und die Zellen in einem proliferationsfähigen Stadium. Somit ist auch der Kultivierungszeitraum kürzer als bei den herkömmlichen, konfluent gezüchteten Sheets. In Suspension ist die Handhabung und Transplantation auf die Wunde ebenfalls erleichtert. Um Wundheilungsstörungen zu vermeiden, muss der Microcarrier biocompatibel und im Verlauf der Wundheilung auch vollständig abbaubar sein. Vor allem unterscheidet sich der MC gegenüber anderen Transplantations- bzw. Kultivierungsmethoden durch die große Zelldichte, die zur Transplantation gebracht werden kann. Nicht zuletzt kann eine Vielzahl von Zellen oder Matrixproteinen mit Hilfe des Microcarriers transplantiert werden.

4.4 Untersuchungen zur Proteinbestimmung in Wundflüssigkeiten

Die Untersuchungen von Breuing et al. (1992) zeigten, dass von dem sinkenden Proteingehalt in Wundflüssigkeiten während der Wundheilung direkt auf die Wiederherstellung der Barrierefunktion des Epithels geschlossen werden kann. Deshalb berücksichtigen die Ergebnisse der Proteinbestimmungen in Wundflüssigkeiten hauptsächlich diesen Aspekt.

Unsere Resultate zeigten, dass von Versuchsbeginn an bis zum vierten Tag der Proteingehalt in allen Gruppen zwischen 15-25 mg/ml lag. Auch Vogt et al. (1994) beschrieb nahezu gleichbleibende Proteinwerte bis zum vierten Tag. Seine Werte lagen um die 2000 mg/dl (= 20 mg/ml). Danach stellte er einen steilen Abfall der Konzentrationen bis zum achten Tag auf Werte unter 5 mg/dl fest. Unsere Zahlen zeigten zwar auch einen Konzentrationsabfall bis zum achten Tag, allerdings lagen wir mit Werten zwischen 4-10 mg/ml (= 400-1000 mg/dl) um zwei Zehnerpotenzen höher. Die Untersuchungen von Breuing et al. (1994) stimmten mit denen von Vogt überein. Sie legten den Zeitpunkt der Reepithelisierung mit 9,3 Tagen fest. Nach dieser Zeit entsprach die Proteinkonzentration der unverwundeter Haut, nämlich 4 mg/dl (= 0,04 mg/ml). Prinzipielle Übereinstimmungen fanden sich im allgemeinen Konzentrationsverlauf. Gleichbleibend hohen Proteinkonzentrationen für die ersten vier Tage folgte ein Abfall der Werte bis zum achten Tag. Eine mögliche Erklärung für die gemessenen Konzentrationsunterschiede könnte die noch unvollständige Epithelisierung unserer Wunden nach acht Tagen sein.

Im Kurzzeitversuch konnten mit Hilfe der Proteinbestimmung keine beschleunigte Wundheilung durch das flexible Epidermistransplantat detektiert werden. Anfangs ließen sich unsere Resultate noch mit der Literatur vergleichen. Zum Versuchsende hin zeigt der Konzentrationsunterschied, dass die Reepithelisierung in unseren Wunden noch nicht abgeschlossen war.

4.5 Wachstumsfaktoren und epidermale Proliferation

In diesem Kapitel wird zunächst ein kurzer Überblick über den Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktoren und deren Einfluss auf die epidermale Proliferation gegeben. Dieser beinhaltet eine Beschreibung der einzelnen, für unsere

4 DISKUSSION

Untersuchungen relevanten Wachstumsfaktoren. Danach werden die Faktoren im Hinblick auf ihre Interaktion mit den Keratinozyten diskutiert.

4.5.1 Beschreibung der Einzelfaktoren

Die epidermale Wundheilung teilt sich in drei Phasen. Hämostase und Entzündung, Bildung von Granulationsgewebe und letztendlich Matrixneubildung (Kiritsy et al 1993). Alle Prozesse unterliegen eng in sich verzahnten Vorgängen, die bis heute noch nicht in Ihrer Ganzheit und ihrem Zusammenspiel untereinander geklärt werden konnten. In diesem System spielen die Wachstumsfaktoren eine wesentliche Rolle (Falanga 1993). Sie können sowohl stimulierend, als auch hemmend wirken (Gniadecki 1998). Die stimulierende oder inhibierende Wirkung richtet sich nach der Interaktion mit weiteren Peptiden, der momentanen Zellaktivität und dem Differenzierungsstadium (Stoof et al. 1994). Eine Vielzahl von Zellen, wie Blutplättchen, Makrophagen, Fibroblasten und Keratinozyten setzen während der Wundheilung Faktoren frei, die wiederum ein breites Spektrum an Zielzellen besitzen (Bennett und Schultz 1993).

Nach Bennett und Schultz (1993) können Wachstumsfaktoren sowohl durch autocrine, paracrine oder endocrine Stimulation auf Zellen einwirken. Das heißt also entweder sich selbst, benachbarte Zellen oder systemisch andere Zellen beeinflussen. Die für die Wundheilung fünf wichtigsten Gruppen sind PDGF, TGF- β , FGF, IGF und EGF.

Unsere Untersuchungen beschränkten sich auf die Bestimmung der vier Wachstumsfaktoren, PDGF-AB, TGF- β 1, TGF- β 2 und basic FGF. Im folgenden wird auf diese Faktoren näher eingegangen. Abbildung 42 zeigt im zeitlichen Verlauf alle an der Wundheilung beteiligten Wachstumsfaktoren.

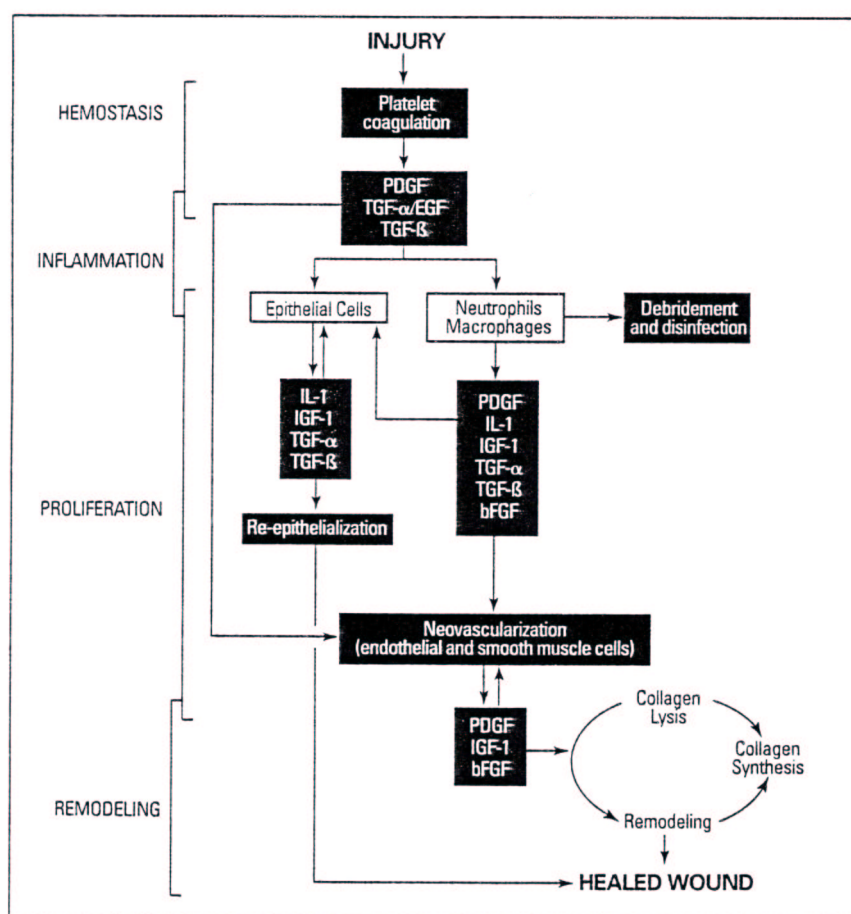


Abbildung 42: Übersicht zu Wachstumsfaktoreninteraktionen im Heilungsverlauf nach Kiritsy et al. (1993).

4.5.1.1 PDGF-AB

Der Faktor PDGF findet sich in den α -Granula zirkulierender Blutplättchen und wird während der Gerinnung ausgeschüttet. Er existiert in drei Isoformen, PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB, deren einzelne Ketten über Disulfidbrücken verbunden sind (Kiritsy et al. 1993). Nach Bennett und Schultz (1993) tragen Fibroblasten, glatte Gefäßmuskulatur, Mesangiumzellen, Gliazellen und Endothelzellen Rezeptoren für PDGF. Auch Kiritsy et al. (1993) berichteten über einen stimulierenden Einfluss von PDGF auf Fibroblasten und Zellen mesenchymalen Ursprungs. Zudem schrieb er, dass PDGF sowohl die Proteinsynthese im Ganzen, als auch die Kollagensynthese in Fibroblasten anregt. In in vitro Versuchen ist bereits gezeigt worden, dass die Kollagenmatrix durch stimulierte Fibroblasten kontrahieren kann. So scheint es, dass PDGF einen positiven autocrinen Feedback-Mechanismus verstärkt, der die

4 DISKUSSION

Synthese von endogenem PDGF und anderen Wachstumsfaktoren bewirkt und somit die Wundheilung fördert (Wang et al. 1996).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PDGF eine positive Wirkung auf die Fibroblasteneinwanderung und -proliferation, die Synthese von Glucosaminoglykanen und Kollagen, sowie die Aktivität der Kollagenase und der Einwanderung von Macrophagen hat (Martin 1997). Eher hemmend wirkt er auf die Generation von Myofibroblasten (Kiritsy et al. 1993). Insgesamt ist PDGF in allen Phasen der Wundheilung zu finden (Abbildung 42).

4.5.1.2 TGF- β

Auch TGF- β findet sich in den α -Granula der Blutplättchen in gleichen Mengen wie PDGF wieder (Kiritsy et al. 1993). Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten, Knochenzellen und Keratinozyten synthetisieren diesen Faktor gleichfalls. Fast alle Zellen besitzen TGF- β Rezeptoren (Bennett und Schultz 1993). Fünf Subtypen, TGF- β 1-5 können unterschieden werden (Stoof et al. 19994). Nach Kiritsy et al. (1993) stimuliert TGF- β das Einströmen von Neutrophilen und Monozyten, bzw. Makrophagen in der frühen Entzündungsphase. Vergleichbar mit der Wirkung von PDGF beeinflusst TGF- β zunächst den Vorgang der Wundreinigung. Nach der Granulationsphase fördert TGF- β u.a. die Angiogenese (Singer und Clark 1999). Dies geschieht wohl indirekt durch die Stimulation von Makrophagen, die wiederum angiogenetisch wirken. Kiritsy et al. (1993) beschrieben allerdings konträr zu der positiven Wirkung, dass eine Applikation von TGF- β in vitro die Bildung von Endothelzellen hemmt. Des weiteren postulierten sie, dass TGF- β der potenteste Stimulator für Fibronectin und die Kollagenproduktion ist, aber auch die Produktion von Kollagenase und anderen Gewebsproteasen hemmen kann. Nach Stoof et al. (1994) fördert TGF- β die Proliferation vieler mesenchymaler Zellen. Außerdem ist er ein potenter Wachstumshemmer für hämatopoetische Zellen und die meisten epithelialen Zellen, einschließlich dem Keratinozyten. Durch seine Wirkung auf T-Zellen, Lymphozyten und Monozyten wandern diese in Entzündungsgebiete ein (Stoof et al. 1994). In vivo bewirkt die Injektion von TGF- β eine überschießende Kollagenanhäufung (Falanga 1993).

Abschließend kann festgehalten werden, dass TGF- β einerseits den Fibroblasteneinstrom, die Fibronectin- und Kollagensynthese und die Kollagenreifung, also die Neubildung extrazellulärer Matrix, sowie die Anziehung von Entzündungszellen positiv beeinflusst, andererseits negativ auf den Kollagenabbau und die Myofibroblastengeneration wirkt (Kiritsy et al. 1993, Bennett und Schultz 1993, Singer und Clark 1999). TGF- β ist somit ein multifunktionaler Wachstumsregulator (Stoof et al. 1994) und vor allem während der inflammatorischen und der proliferativen Phase aktiv (Kiritsy et al. 1993).

4.5.1.3 FGF

Die Familie des „Fibroblast growth factors“ beinhaltet eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, die alle großen Einfluss auf ectodermales, mesodermales und endodermales Gewebe haben (Stoof et al. 1994). Nach Bennett und Schultz (1993) unterscheidet man acidic FGF (aFGF), basic FGF (bFGF) und keratinocyte growth factor (KGF). FGF wirkt direkt auf Endothelzellen und stimuliert deren Migration und Proliferation. Ebenso regt FGF die Bildung von Fibronectin und verschiedenen Kollagentypen durch Endothelzellen an. Auf die Kollagenbildung im Fibroblasten des Wundgebietes wirkt FGF eher hemmend, wobei es die Kollagenaseproduktion verstärkt (Kiritsy et al. 1993). Nach Falanga (1993) ist FGF der potenteste, direkt auf die Angiogenese wirkende Wachstumsfaktor. Bennett und Schultz (1993) beschrieben die Wirkung von FGF wie folgt. FGF wirkt proliferationsfördernd auf die meisten, am Wundheilungsprozess beteiligten Zellen. Darunter fallen kapilläre und vaskuläre Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, sowie Chondrozyten und Myoblasten. Weiterhin induziert bFGF die Zellmigration, Gefäßneubildung und Bildung von Granulationsgewebe im Tiermodell. Auch Kiritsy et al. (1993) beschrieben, dass Macrophagen in der Wunde FGF produzieren, wo dann ein Proliferationsreiz auf Endothelzellen zur Granulationsgewebsbildung gesetzt wird.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bFGF den Einstrom von Fibroblasten und deren Proliferation, die Synthese von Fibronectin und Glucosaminoglycanen, sowie die Kollagenaseaktivität und die Migration von Endothelzellen positiv beeinflusst (Singer und Clark 1999). Hemmend wirkt er auf die Kollagensynthese

4 DISKUSSION

und -reifung (Kiritsy et al. 1993). Im zeitlichen Verlauf ist er in der Phase der Proliferation und des Remodeling zu finden (Abbildung 42).

4.5.2 Interaktion der Wachstumsfaktoren bei der Proliferation von Keratinozyten

Der Keratinozyt produziert eine Vielzahl an Cytokinen selbst. Er kann als Signalverstärker wirken und exogene Stimuli in Produktion von Cytokinen, Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Faktoren umsetzen. Dies kann über autocrine und paracrine Mechanismen funktionieren (Stoof et al. 1994). Daneben wirken auf den Keratinozyten auch verschiedene Faktoren ein. Der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Proliferationsfähigkeit des Keratinozyten ist nun Gegenstand der Betrachtungen.

In der initialen Wundheilungsphase wird zunächst PDGF und TGF- β von Blutplättchen ausgeschüttet. Diese stimulieren die Proliferation von Fibroblasten und wirken auf Neutrophile, Makrophagen und glatte Muskelzellen äußerst anziehend (Epstein 1999). Es entsteht ein in sich selbst positiv verstärkend wirkender Prozess. Nach 48 Stunden besiedeln Makrophagen die Wunde und übernehmen die Hauptrolle. Angiogenese und Stabilisierung der neu gebildeten Matrix folgt. EGF, TGF und FGF bewirken die Einwanderung epidermaler Zellen, so auch die der Keratinozyten (Falanga 1993).

Der Effekt von TGF- β beispielsweise ist abhängig von der Dosis und dem Zeitpunkt. So behindert er zwar die Proliferation von Epithelzellen, scheint aber in niedrigen Dosen die Migration dieser Zellen zu fördern (Kiritsy et al. 1993). Stoof et al. (1994) beschrieben, dass TGF- β das Wachstum humaner Keratinozyten und die Calcium induzierte Differenzierung hemmt. Insgesamt wirkt TGF- β also antiproliferativ. Jedoch bewirkt eine unkontrollierte Sezernierung von TGF- β eine Überproduktion von extrazellulärer Matrix und somit eine vermehrte Narbenbildung (Myers et al. 1995). TGF- β 1 wird sogar in Zusammenhang mit pathogenetischen fibrotischen Zuständen bei Leber-, Nieren- und Lungenkrankheiten und auch mit der Narbenbildung in Hautwunden diskutiert (Martin 1997). Diese Ansicht wird auch durch Adzick und Lorenz (1994) vertreten. So ist die Fibrose und Narbenbildung charakteristisch für die Wundheilung beim Erwachsenen und mit einem hohen

Spiegel an TGF- β zu assoziieren, während sich die narbenlose fetale Wundheilung durch einen Mangel an diesen inflammatorisch wirkenden Cytokinen auszeichnet. Die Gabe von Antikörpern gegen TGF- β 1 und TGF- β 2 zum Zeitpunkt der Verwundung reduziert die Narbenbildung. Ebenso die exogene Applikation von TGF- β 3, welches die Aktivität der beiden anderen Isoformen nach unten reguliert (Martin 1997). Dagegen ist bFGF ein potentes Mitogen für Melanozyten, Fibroblasten und Keratinozyten und fördert die Proliferation von Keratinozyten in Kultur. Auch nach Bennett und Schultz (1993) stimuliert FGF die Keratinozytenproliferation. Speziell mit bFGF behandelte Vollhautwunden an diabetischen Mäusen zeigten eine verstärkte Ansammlung von Entzündungszellen, die wiederum die Kaskade der Freisetzung von Wachstumsfaktoren stimulierten und somit die Wundheilung beschleunigten (Tanaka et al. 1996). Uhl et al. (1993) veröffentlichten, dass bFGF in ischämischem Gewebe einen signifikant erhöhten positiven Effekt auf die Wundheilung besitzt. Mit PDGF therapierte Wunden zeigten eine beschleunigte Wundheilung im Tierversuch durch vermehrte Bildung von Granulationsgewebe (Bennett und Schultz 1993). Mittlerweile ist sogar das erste Produkt aus biotechnologisch hergestelltem PDGF zur Heilung von diabetischen Ulzera erfolgreich auf dem Markt (Wieman et al. 1998).

4.6 Untersuchungen von Wachstumsfaktoren in Wundflüssigkeiten

Viele Wundflüssigkeiten enthalten chemotaktisch wirksame Substanzen (Falanga 1993). Darunter finden sich vor allem die Wachstumsfaktoren. Wundflüssigkeiten aus akuten Wunden weisen die größte Aktivität an Wachstumsfaktoren auf (Meyer-Ingold 1993). Im Hinblick auf die verschiedenen Phasen der Wundheilung postulierten Ono et al. (1994), dass der fünfte Tag eine entscheidende Rolle spielt, da hier die Entzündungsphase in die Phase der Epithelisierung übergeht. In diesem Kapitel werden nun Daten aus der Literatur zu Konzentrationen von Wachstumsfaktoren während der Wundheilung mit unseren Ergebnissen verglichen.

PDGF ist in humanen Wundflüssigkeiten bis zu einigen Tagen nach Verletzung nachweisbar (Bennett und Schultz 1993). Kiritsy et al. (1993) zeigten, dass PDGF von Tag 1 bis 3 nach Verletzung in seiner Konzentration ansteigt und danach für die

4 DISKUSSION

restliche Zeit der Reepithelialisierung nur noch in ganz geringen Mengen zu messen ist. Nach Wang et al. (1996) wirkt PDGF durch die Wundmakrophagen mittels positivem Feedbackmechanismus als beschleunigender Faktor für die Wundheilung. Weiterhin setzen nicht nur Makrophagen und Blutplättchen PDGF frei, sondern auch Keratinozyten produzieren PDGF (Ansel et al. 1993). Wir beobachteten hohe PDGF-AB Konzentrationen in den ersten Tagen der Wundheilung. Histologisch ist hier der größte Anteil an Plättchen, Makrophagen und Keratinozyten zu erwarten. Vogt et al. (1993) ermittelten in ihren Untersuchungen Werte von 86,7 pg/ml mit einem Anstieg bis Tag 5 auf 271,2 pg/ml und einem darauffolgenden Abfall nach einer Woche unterhalb der Nachweisgrenze. Cooper et al. (1994) fanden in chronischen Wunden PDGF-AB Konzentrationen von 49 - 867 pg/ml. Unsere Konzentrationen liegen mit Werten von 120 bis 160 pg/ml zwischen den von Cooper ermittelten Bereichen. Ono et al. (1995) beschrieben ebenfalls hohe Mengen an PDGF und TGF nach fünf Tagen in Wundflüssigkeiten von humanen Spalthautentnahmestellen. McCarthy et al. (1996) gelang es, Konzentrationen um die 1.500 pg/ml über vier Tage zu messen. Danach war ein Nachweis von PDGF noch bis zu zwei Wochen an der Brandwunde möglich. Im Gegensatz dazu konnten Grayson et al. (1993) in menschlichen Hautentnahmestellen kein PDGF nachweisen. Zu Serumwerten finden sich ebenfalls unterschiedliche Daten in der Literatur. Während Vogt et al. (1993) Werte um 65 pg/ml maßen, fanden Olutoye et al. (1996) um die 900 pg/ml beim ausgewachsenen Yorkshire Schwein. Unsere Werte schwankten zwischen 40 - 180 pg/ml.

Auch TGF- β findet sich in großen Mengen in Wundflüssigkeiten (Ono et al. 1995). In einer früheren Veröffentlichung gaben Ono et al. (1994) TGF- β Konzentrationen von 0.9 bis 2,45 ng/ml an. Olutoye et al. (1996) maßen Werte um die 30 pg/ml TGF- β 1 und ca. 13 pg/ml TGF- β 2 im Schwein. Vogt et al. (1993) ermittelten für TGF- β 2 Werte von 655 pg/ml nach 24 Stunden, mit einem Maximum von 1.100 pg/ml nach einer Woche und einem steilen Absinken auf 632 pg/ml an Tag 8. In unseren Untersuchungen lagen die Konzentrationen für TGF- β 1 mit Werten zwischen 2.000 und 5.000 pg/ml deutlich höher, jedoch nahe an den Werten von Ono et al. (1994). Auch gegen Versuchsende fielen die Konzentrationen nicht unter 1.000 pg/ml. Unsere Serumkonzentrationen für TGF- β 2 bewegten sich um die 5.000 pg/ml,

während Vogt et al. (1993) nur bis zu 125 pg/ml maßen. Dagegen konnte in chronischen Wunden TGF- β nicht nachgewiesen werden (Cooper et al. 1994).

Grayson et al. (1993) konnten in humanen Wundflüssigkeiten, wenn überhaupt, Konzentrationen von 9,5 bis 14 ng/ml für bFGF messen. Das Gleiche galt für Ono et al. (1994). Wundflüssigkeit, die aus Spalthautentnahmestellen aufgefangen wurde, enthielt keine nachweisbaren Konzentrationen des basic Fibroblast Growth Factors. Dagegen sezernieren chronische Wunden bFGF zwischen 47 und 697 pg/ml (Cooper et al. 1994). Vogt et al. (1993) fanden einen doppelgipfligen Kurvenverlauf mit Konzentrationen um 20 pg/ml nach 24 Stunden und sechs Tagen. Die kleinsten Werte wurden um 5 - 9 pg/ml gemessen. In unseren Untersuchungen ergaben sich bFGF Konzentrationen von 2 - 6,5 pg/ml. Der Kurvenverlauf war nahezu geradlinig. Nur mit dem flexiblen Epidermistransplantat wurde nach 48 Stunden ein Wert von 27,3 pg/ml erreicht, der im Rahmen der Literaturangaben lag. Den doppelgipfligen Verlauf von Vogt et al. konnten wir nicht nachvollziehen. Die Serumkonzentrationen erreichten durchschnittlich 3,3 pg/ml, während Vogt et al. 18,61 pg/ml beschrieb.

Insgesamt differieren einzelne Untersuchungsergebnisse in der Literatur ganz erheblich und müssen kritisch bewertet werden. So sind die meisten Antikörper, die für die ELISA-Untersuchungen verwendet werden, nicht speziell auf ihre Spezifität bei Schweinen getestet worden. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass wir für unsere Messungen einen Pool an Wundflüssigkeiten für die einzelnen Gruppen verwendet hatten. Aus der Literatur gehen solche Angaben nicht hervor, so dass dies ein Vergleichen der Daten erschwert. Die meist höheren Wachstumsfaktorkonzentrationen in den Behandlungsgruppen könnte auf die Microcarrier zurückzuführen sein. Entweder regen sie die Wunde zu vermehrter Faktorbildung an, oder die dadurch resultierende größere Anzahl an eingesäten Keratinozyten produziert mehr entsprechende Faktoren. Ein weiterer interessanter Ansatz wäre im Hinblick auf die Untersuchungen von Puolakkainen et al. (1995) zu diskutieren. Ihnen gelang es, Microträger mit TGF- β 1 zu beschichten und dadurch eine beschleunigte Wundheilung zu erreichen. Möglicherweise könnte der MC vermehrt Wachstumsfaktoren aufnehmen und in der Wundflüssigkeit konzentrieren.

4.7 Allgemeine Untersuchungen zur Transplantation kultivierter Keratinozyten

Eine erfolgreiche Transplantation von kultivierten Keratinozyten hängt wesentlich von Parametern wie Proliferations- und Differenzierungsstadium der Keratinozyten und der Anwesenheit von dermalen Komponenten ab. Außerdem wird die Wundkontraktion maßgeblich durch die Transplantation von Keratinozyten beeinflusst. In diesem Zusammenhang sind auch die Ausführungen zu den Microträgern bei der Wiederherstellung der epithelialen Barriere und die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Keratinozyten zu beachten.

Breitkreutz et al. (1998) waren in der Lage, mit der immortalisierten humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT die regulatorischen Aspekte der Physiologie und Pathologie von Keratinozyten nachzuvollziehen. So gelang es ihnen, die prinzipiellen Phasen der Wundheilung zu erschließen und für die Proliferation wichtige Zellen zu unterscheiden. Die Proliferation geschieht nur in den basalen Keratinozyten, welche man wieder in Stammzellen und transitorisch verstärkende Zellen unterscheidet (Gniadecki 1998). Sowohl Kolodka et al. (1998), als auch Jones (1996) beschrieben, dass die Stammzellen in der Basalzellschicht lokalisiert sind und von dort aus eine ausdifferenzierte Epidermis bilden können. Werden Keratinozyten unter konventionellen Methoden gezüchtet, proliferieren sie rasch und differenzieren, sobald sie konfluentes Wachstum erreicht haben (Fusenig 1994). Um hochproliferative Zellen zu gewinnen, müssen sie subkonfluent in serumfreien Medium und niedriger Calciumkonzentration kultiviert werden. Nach Konfluenz stellen die Zellen ihr Wachstum nämlich irreversibel ein und beginnen mit der terminalen Differenzierung (Poumay und Pittelkow 1995). Itin et al. (1994) entdeckten, dass physiologisch niedrige Konzentrationen von Vitamin D Metaboliten einen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferation haben. Aus diesen Gründen wurde die Kultivierung in einem serumreduzierten Medium bei niedriger Calciumkonzentration durchgeführt. Histologische Untersuchungen zeigten dann auch Keratinozyten vom Basalzelltyp mit geringer Differenzierung in den untersuchten Wunden. Breitkreutz et al. (1997) beschrieben, dass eine hohe Keratinozytenproliferationsrate vor allem um den vierten Tag zu finden ist. Danach

ist eine deutliche Abnahme bis zur zweiten Woche hin registrierbar. Eine definierte Basalmembran findet sich nach 14 Tagen. Auch unsere Beobachtungen zeigten die höchste Proliferationsrate zu Versuchsbeginn. Nach 8 Tagen waren suprabasale Zellen sichtbar, also die eingesäten Keratinozyten differenzierten sich. Mittels immunhistochemischer Färbungen konnten wir nachweisen, dass Keratinozyten vom basalen Typ von uns transplantiert wurden, welche dann proliferierten und ein neues Epithel bildeten.

Bei der Keratinozytentransplantation stellt sich weiterhin die Frage nach der Notwendigkeit, eine dermale Matrix zu verwenden. So hielt Myers et al. (1995) nach Untersuchungen am Tiermodell eine dermale Substitution als Empfängerbett bei der Keratinozytentransplantation für unabdingbar. Verschiedene Möglichkeiten der dermalen Ersatzmatrix wurden schon untersucht. So verwendeten Cooper et al. (1993) Fibroblasten auf einer Kollagen-Glucosaminoglycan-Membran und konnten signifikante Vorteile im Vergleich mit den herkömmlichen Hautsheets zeigen. Eine Variante mit Fibroblasten auf Kollagengel gebrauchten Medalie et al. (1997), Nolte et al. (1994) und Hansbrough et al. (1994) mit den gleichen Ergebnissen. Die dermale Substitution hat sogar Auswirkung auf die Repigmentierung, epidermale Differenzierung und Ausbildung von Reteleisten (Medalie et al. 1997). Lamme et al. (1996) verwendeten natives Rinderkollagen und erzielten gute Ergebnisse. Mit Hilfe einer dermalen Komponente kann die Schnelligkeit und Qualität der Wundheilung bei Vollhautwunden positiv beeinflusst werden. Auch eine Membran aus Hyaluronsäure mit kultivierten Fibroblasten und Keratinozyten kann eingesetzt werden (Zacchi et al. 1998). Im Langzeitversuch beobachteten auch wir eine schnellere Epithelisierung mit dem flexiblen Epidermistransplantat. So schien es, dass der Microcarrier aus Rinderkollagen als dermale Matrixkomponente inkorporiert wurde. Auf die Proliferation oder Differenzierung der Zellen zeigte der MC keine Auswirkung. Dies würde sich mit den Erfahrungen von Daniels et al. (1997) decken, die verschiedene Matrixkomponenten daraufhin untersucht hatten und zu keinem signifikanten Ergebnis gekommen waren.

Ralston et al. (1997) untersuchten den Einfluss von Keratinozyten auf die Wundkontraktion. Sie zeigten, dass Keratinozyten und nicht wie vermutet

4 DISKUSSION

Fibroblasten die Wundkontraktion hervorrufen. In azellulärer Dermis ohne Epidermis verursachte der Keratinozyt Kontraktionen von 25%, während in der Gruppe mit reinen Fibroblasten keine signifikante Kontraktion erkennbar war. Dies könnte auch als ein weiterer Grund für die Wundkontraktionen in unserem Modell angesehen werden. Die kontraktile Wirkung von Fibroblasten und Myofibroblasten in vivo verstärken noch diesen Effekt. Epstein beschrieb 1999, dass die Kontraktion sowohl bei Stimulation durch TGF- β 1, TGF- β 2 und PDGF, als auch beim Einbau von Fibroblasten in die Kollagenmatrix erfolgt. Myofibroblasten erscheinen mit der Verdichtung des Bindegewebes.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es viele Einflüsse auf die Kultivierung und Transplantation von Keratinozyten gibt. Das beginnt bereits mit der Zusammensetzung des Kulturmediums und den verwendeten Substraten zur Transplantation. So kann man direkt auf das Proliferations- oder Differenzierungsstadium der Zelle einwirken.

5 Zusammenfassung

Seit Beginn der achtziger Jahre werden epidermale Transplantate aus konfluent gezüchteten Keratinozyten zur Behandlung von Schwerbrandverletzten eingesetzt. Vor allem, wenn eine Versorgung der Brandwunden durch Spalthauttransplantation, aufgrund mangelnden Spenderhautareals, nicht mehr möglich ist. Die aufwendige und langwierige Kultivierung, die komplizierte Handhabung der Hautsheets und nicht zuletzt die bereits weit fortgeschrittene Differenzierung der Keratinozyten mit der Bildung eines nahezu ausgereiften mehrschichtigen Epithels zwingen nach anderen Möglichkeiten zu suchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines flexiblen Epidermistransplantates zur Behandlung von Vollhautwunden am Schwein. Hierzu wurden auf Microcarriern adhärent wachsende, subkonfluente Keratinozyten in einem Gel aus Methylzellulose suspendiert. Mit diesem System wurde die Fähigkeit zur Regeneration einer Neo-Epidermis in vivo untersucht. Dabei wurden zwei Arten von Microsphären betrachtet. Zum einen Beads aus Dextran mit einer Beschichtung aus porcinem Kollagen und zum anderen Microcarrier aus Rinderkollagen. Im standardisierten Wundmodell wurden verschiedene Behandlungsmuster erforscht. Zunächst wurde im Kurzzeitversuch von Placebo bis hin zum kompletten Transplantat in sechs Behandlungsgruppen unterschieden. Dabei sollte die galenische Zusammensetzung des Epidermistransplantates mit zwei verschiedenen Carriersorten auf ihre Unbedenklichkeit und Verträglichkeit getestet werden. Betrachtet wurde die Schnelligkeit der Epidermisneubildung einschließlich einer histologischen und immunhistochemischen Charakterisierung. Weiterhin wurden die Änderungen in den Konzentrationen von Protein und Wachstumsfaktoren, deren Einflüsse auf die Wundkontraktion, sowie die Biokompatibilität und Abbaubarkeit der Trägersysteme untersucht. Es zeigte sich, dass das flexible Epidermistransplantat quantitativ keinen signifikant schnelleren Wundverschluss erzielte als alle anderen Gruppen. Die Wundheilung erfolgte vor allem von den Wundrändern her. Es konnte jedoch auch eine Migration der Keratinozyten von den Microcarriern weg an die Oberfläche gezeigt werden. Dort differenzierten die Keratinozyten aus. An Microträger gebundene Keratinozyten verursachten die Bildung von Epithelnestern

und -zapfen in der Tiefe der Wunde. Histologische Untersuchungen zeigten eine starke Fremdkörperreaktion auf die Dextranbeads. Daraufhin wurden diese Beads bei weiteren Untersuchungen nicht mehr verwendet.

Diese Ergebnisse veranlassten uns, die Versuchsdauer im Langzeitversuch zu verlängern und die Wunden zu vergrößern. Ziel war es, den Abbau der Microcarrier über die Zeit, sprich ihre Biokompatibilität zu verfolgen. Durch die größeren Wunden sollte außerdem die vom Wundrand ausgehende Epithelisierung besser von der Epithelisierung durch die transplantierten Zellen unterschieden werden können. Schließlich wurden nur noch Keratinozyten auf dem Kollagenträger in Methylzellulose suspendiert, als Vergleich mit einer Placebogruppe, eingesetzt. Nun konnte gezeigt werden, dass von den Microcarriern abgewanderte basale Keratinozyten durch Proliferation auf der Wunde ein mehrschichtiges Epithel bildeten. Dieses entsprach dem morphologischen und dem immunhistochemischen Erscheinungsbild normaler Epidermis. Gegenüber den Kontrollwunden ergab sich ein signifikant schnellerer Wundverschluss. Alle Kollagenträger wurden langfristig abgebaut und führten zu keiner Fremdkörperreaktion.

Letztlich wurden ausschließlich gering differenzierte subkonfluente Keratinozyten transplantiert, die erst auf der Wunde proliferierten und zu einem konfluenten Zellverband ausdifferenzierten. Dadurch konnte die Kultivierungszeit im Vergleich zur Herstellung konventioneller Hautsheets um eine Woche verkürzt werden. Ein enzymatischer Abdauvorgang, der die Zellen schädigen und zu einer verminderten Vitalität führen kann, entfällt bei dieser Methode. Durch den Microcarrier selbst können je nach Zusammensetzung auch für den Aufbau einer dermalen Matrix nötige Proteine in die Wunde eingebracht werden. Die Flexibilität des Transplantates in Form eines streichfähigen Gels ermöglicht es, auch schwer zugängliche Körperhöhlen und unregelmäßig strukturierte Wundoberflächen zu behandeln. Zukünftig kann dieses System auch mit anderen Zellen, wie Fibroblasten oder Endothelzellen, aber auch mit genetisch veränderten Zellen, verwendet werden. Somit scheint eine phasengerechte physiologische Wundbehandlung möglich.

6 Literaturverzeichnis

1. Adzick N.S. und Lorenz H.P.:
Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair.
Ann Surg, 1994; **220(1)**: 10-18
2. Andreassi L.:
History of keratinocyte cultivation.
Burns, 1992; **18, Suppl 1**: S2-S4
3. Ansel J.C., Tiesmann J.P., Olerud J.E., Krueger J.G., Krane J.F., Tara D.C., Shipley G.D., Gilbertson D., Usui M.L., Hart C.E.:
Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor.
J Clin Invest, 1993; **92**: 671-678
4. Billingham R.E. und Reynolds J.:
Transplantation studies on sheet of pure epidermal epithelium and of epidermal cell suspensions.
Br J Plast Surg, 1952; **23**: 25-31
5. Breuing K., Eriksson E., Liu P., Miller D.R.:
Healing of partial thickness porcine skin wounds in a liquid environment.
J Surg Res, 1992; **52**: 50-58
6. Butler C.E., Orgill D.P., Yannas I.V., Compton C.C.:
Effect of keratinocyte seeding of glycosaminoglycan membranes on the regeneration of skin in a porcine model.
Plast Rec Surg, 1998; **101(6)**: 1572-1579

7. Butler C.E., Yannas I.V., Compton C.C., Correia C.A., Orgill D.P.:
Comparison of cultured and uncultured keratinocytes seeded into a collagen-GAG matrix for skin replacements.
Brit J Plast Surg, 1999; **52**: 127-132
8. Cairns B.A., deSerres S., Peterson H.D., Meyer A.A.:
Skin replacements. The biotechnological quest for optimal wound closure.
Arch Surg, 1993; **128**: 1246-1252
9. Carrel A. und Burrows M.T.:
Cultivation of adult tissues and organs outside the body.
JAMA, 1910; **55**: 1379-1385
10. Chvapil M., Chvapil T.A.:
Wound-healing models in the miniature Yucatan Pig. Swine as models in biomedical research.
Iowa State University Press, Ames, 1992; 265-289
11. Clark R.A.F.:
Wound repair. Overview and general considerations.
The molecular and cellular biology of wound repair. (second edition), edited by R.A.F. Clark; Plenum Press, New York 1995; 3-50
12. Cohen S.:
Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal.
J Biol Chem, 1962; **237**: 1555-1561
13. Compton C.:
Keratinocyte grafting: animal models.
The Keratinocyte Handbook by Irene Leigh, Birgitte Lane and Fiona Watt; Cambridge University Press; 1994; 513-526

14. Compton C.C., Gill J.M., Bradford D.A., Regauer S., Gallico G.G., O'Connor N.E.:
Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting.
J Lab Invest, 1989; **60(5)**: 600-612
15. Cooper D.M., Yu E.Z., Hennessey P., Ko F., Robson M.C.:
Determination of endogenous cytokines in chronic wounds.
Ann Surg, 1994; **219(6)**: 688-692
16. Cooper M.L., Andree C., Hansbrough J.F., Zapata-Sirvent R.L., Spielvogel R.L.:
Direkt comparison of a cultured composite skin substitute containing human keratinocytes and fibroblasts to an epidermal sheet graft containing human keratinocytes on athymic mice.
J Invest Dermatol, 1993; **101**: 811-819
17. Daniels J.T., Kearney J.N., Ingham E.:
An investigation into the potential of extracellular matrix factors for attachment and proliferation of human keratinocytes on skin substitutes.
Burns, 1997; **23(1)**: 26-31
18. De Luca M., Cancedda R.:
Culture of human epithelium.
Burns, 1992; **18, Suppl 1**: 5-10
19. De Luca M., D'Anna F., Bondanza S., Franzi A.T., Cancedda R.:
Human epithelial cells induce human melanocyte growth in vitro but only skin keratinocytes regulate its proper differentiation in the absence of dermis.
J Cell Biol, 1988; **46**: 176-180
20. Deitch E.A., Dobke M., Baxter C.R.:
Failure of local immunity.
Arch Surg, 1985; **120**: 78-84

21. Dejardin C., Vanderkelen A., Vanwijck R.:
Enhancement of healing of mesh grafts with autologous keratinocytes.
Acta Chir Bel, 1994; **94**: 113-115
22. Eisinger M., Lee J.S., Hefton J.M., Darzynkiewicz Z., Chiao J.W., de Harven E.:
Human epidermal cell cultures: Growth and differentiation in the absence of dermal components or medium supplements.
Proc Natl Acad Sci, 1979; **76(10)**: 5340-5344
23. Franklin G.F., Coghill G., McIntosh L., Cree I.A.:
Monocyte aggregation around agarose beads in collagen gels: a 3-dimensional model of early granuloma formation?
J Immun Meth, 1995; **186**: 285-291
24. Fusenig N.E.:
Epithelial-mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation in vitro.
The Keratinocyte Handbook by Irene Leigh, Birgitte Lane and Fiona Watt;
Cambridge University Press; 1994; 71-74
25. Gallico G.G., O'Connor N.E., Compton C.C., Remensnyder J. .P., Kehinde O., Green H.:
Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi.
Plast Reconstr Surg, 1989; **84(1)**: 1-9
26. Gallico G.G., O'Connor N.E., Compton C.C., Remensnyder J.P., Kehinde O., Green H.:
Permanet coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelial.
N Engl J Med, 1984; **311(7)**: 448-451
27. Gniadecki R.:
Regulation of keratinocyte proliferation.
Gen Pharmac, 1998; **30(5)**: 619-622

28. Gorodetsky R., Clark R.A.F., An J., Gailit J., Levdansky L., Vexler A., Berman E., Marx G.:
Fibrin Microbeads (FMB) as biodegradable carriers for culturing cells and for accelerating wound healing.
J Invest Dermatol, 1999; **112**: 866-872
29. Grayson L.S., Hansbrough J.F., Zapata-Sirvent R.L., Dore C.A., Morgan J.L., Nicolson M.A.:
Quantitation of cytokine levels in skin graft donor site wound fluid.
Burns, 1993; **19(5)**:401-405
30. Hadda S.:
Aus der Chirurg-Abteilung des israelitischen Krankenhauses zu Breslau. Die Kultur lebender Körperzellen.
Klin Wschr, 1912; **49**: 11-15
31. Hann S.K., Im S., Bong H.W., Park Y.:
Treatment of stable vitiligo with autologous epidermal grafting and PUVA.
J Am Acad Dermatol, 1995; **32**: 943-948
32. Hansbrough J.F. und Cooper M.L.:
Methods of skin coverage.
Critical Care Report, 1990; **2**: 50-62
33. Hansbrough J.F., Morgan J., Greenleaf J., Parikh M., Nolte C., Wilkins L.:
Evaluation of graftskin composite grafts on full-thickness wounds on athymic mice.
J Burn Care Rehabil, 1994; **15**: 346-353
34. Hecht J., Hoefter E.A., Hecht J., Haraida S., Nerlich A., Hartinger A., Mühlbauer W., Dimoudis N.:
Kultivierte Keratinozyten auf Microcarriern: In-vitro-Untersuchungen zu einem neuartigen Trägersystem.
Handchir. Mikrochir. Plast. Chir., 1996; **29**: 101-106

35. Hickerson W.L., Compton C., Fletchall S., Smith R.L.:
Cultured epidermal autografts and allodermis combination for permanent burn wound coverage.
Burns, 1994; **20(1)**: 52-56
36. Hinrichsen N., Birk-Sørensen L., Gottrup F., Hjortdal V.:
Wound contraction in an experimental porcine model.
Scand J Plast Reconstr Hand Surg, 1998; **32**: 243-248
37. Hoffman D.K., Sibley R.K., Korman J.M., Press B.H.J.:
Light microscopic and immunohistochemical features in serial biopsies of epidermal versus dermal allografts.
Ann Plast Surg, 1994; **33**: 295-299
38. Holbrook K.A.:
Ultrastructure of the epidermis.
The Keratinocyte Handbook by Irene Leigh, Birgitte Lane and Fiona Watt;
Cambridge University Press; 1994; 356-399
39. Horch R.E., Bannasch H., Kopp J., Andree C., Stark G.B.:
Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis.
Cell Trans, 1998; **7(3)**: 309-317
40. Itin P.H., Pittelkow M.R., Kumar R.:
Effects of Vitamin D metabolites on proliferation and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free or defined medium.
Endocrinology, 1994; **135**: 1793-1798
41. Jones P.H.:
Isolation and characterization of human epidermal stem cells.
Clinical Science, 1996; **91**: 141-146

42. Kangesu T., Navsaria H.A., Manek S., Shurey C.B., Jones C.R., Fryer P.R., Leigh I.M., Green C.J.:
A porcine model using skin graft chambers for studies on cultured keratinocytes.
Brit J Plast Surg, 1993; **46**: 393-400
43. Karasek M. A. und Charlton M.E.:
Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels.
J Invest Dermatol, 1971; **56**: 205-211
44. Karasek M.A.:
Growth and differentiation of transplanted epithelial cell cultures.
J Invest Dermatol, 1968; **51**: 247-252
45. Kennedy D.F., Cliff W.J.:
A systematic study of wound contraction in mammalian skin.
Pathology, 1979; **11**: 207-222
46. Kiritsy C.P., A.B. und Lynch S.E.:
Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review.
Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 1993; **4(5)**: 729-760
47. Kolodka T.M., Garlick J.A., Taichman L.B.:
Evidence for keratinocyte stem cells in vitro: Long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes.
Proc Natl Acad Sci, 1998; **95**: 4356-4361
48. Kreibich K.:
Kultur erwachsener Haut auf festem Naehrboden.
Arch Dermatol Syph, 1914; **120**: 168-173
49. Kumagai N. und Uchikoshi T.:
Treatment of extensive hypomelanosis with autologous cultured epithelium.
Ann Plast Surg, 1997; **39**: 68-73
50. Kumagai N., Matsuzaki K., Fukushi S., Masayoshi T., Hideo O., Ishida H.:
Grafting of autologous-cultured epithelium after excision of tattoos.
Ann Plast Surg, 1994; **33**: 385-391

51. Lamme E.N., de Vries H.J.C., van Veen H., Gabbiani G., Westerhof W., Middelkoop E.:
Extracellular matrix characterization during healing of full thickness wounds treated with a collagen/elastin dermal substitute shows improved skin regeneration In pigs.
Wound Repair and Regeneration, 1996; **4(1)**: Abstracts, A160
52. Leigh I.M., Purkis P.E., Navsaria H.A., Phillips T.:
Treatment of chronic venous ulcers with sheets of cultured allogeneic keratinocytes.
Br J Dermatol, 1987; **117**: 591-597
53. Leonhardt H.:
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.
Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York 1990
54. Límová M. und Mauro T.:
Treatment of Pyoderma Gangraenosum with cultured keratinocyte autografts.
J Dermatol Surg Oncol, 1994; **20**: 833-836
55. Ljunggren C.A.:
Von der Fähigkeit des Hautepithels, ausserhalb des Organismus sein leben zu behalten, mit Berücksichtigung der Transplantation.
Deutsch Z Chir, 1898; **47**: 608-610
56. Martin P.:
Wound healing – aiming for perfect skin regeneration.
Science, 1997; **Vol. 276**: 75-81
57. McCarthy D.W., Dowing M.T., Brigstock D.R., Luquette M.H., Brown K.D., Abad M.S., Besner G.E.:
Production of heparin-binding epidermal growth faktor-like growth factor (HB-EGF) at sites of thermal injury in pediatric patients.
J Invest Dermatol, 1996; **106**: 49-56

58. Medalie D.A., Eming S.A., Collins M.E., Tompkins R.G., Yarmush M.L., Morgan J.R.:
Differences in dermal analogs influence subsequent pigmentation, epidermal differentiation, basement membrane, and rete ridge formation of transplanted composite skin grafts.
Transplantation, 1997; **64**: 454-465
59. Meuli M. und Raghunath M.:
Tops and flops using cultured epithelial autografts in children.
Pediatr Surg Int, 1997; **12**: 471-477
60. Meyer-Ingold W.:
Wound therapy: growth factors as agents to promote healing.
TIBTECH, 1993; **11**: 387-392
61. Moscona A.:
Rotation-mediated histogenic aggregation of dissociated cells.
Exp Cell Res, 1961; **22**: 455-459
62. Muehleman C. und Wise R.D.:
Epidermal culture and grafting. A Brief Review.
J Am Pod Med Ass, 1993; **83(8)**: 462-465
63. Mühlbauer W., Henckel von Donnersmarck G., Hoefter E., Hartinger A.:
Keratinozytenzüchtung und -transplantation.
Chirurg, 1995; **66**: 271-276
64. Myers S., Navsaria H., Sanders R., Green C., Leigh I.:
Transplantation of keratinocytes in the treatment of wounds.
Am J Surg, 1995; **170**: 75-83
65. Myers S.R., Grady J., Soranzo C., Sanders R., Green C., Leigh I.M., Navsaria H.A.:
A hyaluronic acid membrane delivery system for cultured keratinocytes: Clinical "take rates" in the porcine kerato-dermal model.
J Burn Care Rehabil, 1997; **18**: 214-222

66. Navsaria H.A., Myers S.R., Leigh I.M., McKay I.A.:
Culturing skin in vitro for wound therapy.
TIBTECH, 1995; **13**: 91-100
67. Nolte C.J.M., Oleson M.A., Hansbrough J.F., Morgan J., Greenleaf G.,
Wilkins L.:
Ultrastructural features of composite skin culture grafted onto athymic mice.
J Anat, 1994; **185**: 325-333
68. O`Connor N.E. und Mulliken J.B.:
Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal
cells.
Lancet, 1981; 75-78
69. Olutoye O.O., Yager D.R., Cohen I.K., Diegelmann R.F.:
Lower cytokine release by fetal porcine platelets: a possible explanation for
reduced inflammation after fetal wounding.
J Pediatr Surg, 1996; **31**: 91-95
70. Ono I., Gunji H., Suda K., Iwatsuki K., Kaneko F.:
Evaluation of cytokines in donor site wound fluids.
Scand J Plast Reconstr Hand Surg, 1994; **28**: 269-273
71. Ono I., Gunji H., Zhang J.Z., Maruyama K., Kaneko F.:
Studies on cytokines related to wound healing in donor site wound fluid.
J Dermatol Sci, 1995; **10**: 241-245
72. Paddle-Ledinek J.E., Cruickshank D.G., Masterton J.P.:
Skin replacement by cultured keratinocyte grafts: an Australian experience.
Burns, 1997; **23(3)**: 204-211
73. Parshley M.S. und Simm H.S.:
Cultivation of adult skin epithelial cells (chicken and human) in vitro.
Am J Anat, 1950; **86**: 163-166
74. Pharmacia LKB Biotechnology:
Microcarrier cell culture: principles and methods.
Almquist & Wiksell Tryckeri AB, Uppsala 1981, reprinted 1989

75. Phillips T.J., Provan A., Colbert D., Easley W.:
A randomized single-blind controlled study of cultured epidermal allografts in the treatment of split-thickness skin graft donor sites.
Arch Dermatol, 1993; **129**: 879-882
76. Pittelkow M.R. und Scott R.E.:
New techniques for the in vitro culture of human skin keratinocytes and perspectives on their use for grafting of patients with extensive burns.
Mayo Clin Proc, 1986; **61**: 771-778
77. Poumay Y. und Pittelkow M.R.:
Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins.
J Invest Dermatol, 1995; **104**: 271-276
78. Premachandra D.J., Woodward B., Milton C.M., Sergeant R.J., Fabre J.W.:
Long-term results of mastoid cavities grafted with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells to prevent chronic otorrhea.
Laryngoscope, 1993; **103**: 1121-1125
79. Puolakkainen P.A., Twardzik D.R., Ranchalis J.E., Pankey S.C., Reed M.J., Gombotz W.R.:
The enhancement in wound healing by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) depends on the topical delivery system.
J Surg Res, 1995; **58**: 321-329
80. Ralston D.R., Layton C., Dalley A.J., Boyce S.G., Freedlander E., MacNeil S.:
Keratinocytes contract human dermal extracellular matrix and reduce soluble fibronectin production by fibroblasts in a skin composite model.
Brit J Plast Surg, 1997; **50**: 408-415
81. Rheinwald J.G. und Green H.:
Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes.
Nature, 1977; **265**: 421-429

82. Rheinwald J.G. und Green H.:
Serial cultivation of strain of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells.
Cell, 1975; **6**: 331-344
83. Rouabhia M., Germain L., Bergeron J., Auger F.A.:
Allogeneic-syngeneic cultured epithelia.
Transplantation, 1995; **59(9)**: 1229-1235
84. Rouabhia M., Germain L., Bergeron J., Auger F.A.:
Successful transplantation of chimeric allogeneic-autologous cultured epithelium.
Transpl Proc, 1994; **26(6)**: 3361-3362
85. Singer A.J. und Clark R.A.F.:
Cutaneous wound healing.
The New England Journal of Medicine, 1999; **September 2**: 738-746
86. Smith D.J., Thomson P.D., Garner W.L., Rodriguez J.L.:
Burn wounds: Infection and healing.
Am J Surg, 1994; **167(1a)**: 46-48
87. Sobotta/Hammersen:
Histologie. Farbatlas der Mikroskopischen Anatomie.
Urban & Schwarzenberg, 1985; 3. Auflage: 205-206
88. Still J.M., Orlet H.K., Law E.J.:
Use of cultured epidermal autografts in the treatment of large burns.
Burns, 1994; **20(6)**: 539-541
89. Stoof T.J., Boorsma D.M., Nickoloff B.J.:
Keratinocytes and immunological cytokines.
The Keratinocyte Handbook by Irene Leigh, Birgitte Lane and Fiona Watt;
Cambridge University Press; 1994; 356-399

90. Suzuki T., Ui K., Shioya N., Ihara S.:
Mixed cultures comprising syngeneic and allogeneic mouse keratinocytes as a graftable skin substitute.
Transplantation, 1995; **59(9)**: 1236-1241
91. Tanaka E., Ase K., Okuda T., Okumura M., Nogimori K.:
Mechanism of acceleration of wound healing by basic fibroblast growth factor in genetically diabetic mice.
Biol Pharm Bull, 1996; **19**: 1141-1148
92. Tánczos E., Horch R.E., Bannasch H., Andree C., Walgenbach K.-J., Voigt M., Stark G.B.:
Keratinocyten transplantation und Tissue Engineering.
Zentralbl Chir, 1999; **124, Suppl 1**: 81-86
93. Tang J.S., Chao C.F., Au M.K.:
Growth and metabolism of cultured bone cells using microcarrier and monolayer techniques.
Clin Ort. Rel Res, 1994; **300**: 254-258
94. Teepe R.G.C., Koch R., Haeseker B.:
Randomized trial comparing cryopreserved cultured epidermal allografts with tulle-gras in the treatment of split-thickness skin graft donor sites.
J Trauma, 1993; **35(6)**: 850-854
95. Uhl E., Barker J.H., Bondàr I., Galla T.J., Leiderer R., Lehr H.-A., Messmer K.:
Basic fibroblast growth factor accelerates wound healing in chronically ischaemic tissue.
Br J Surg, 1993; **80**: 977-980
96. Van Wezel A.L.:
Growth of cell strains and primary cells on microcarriers.
Nature, 1967; **216**: 65-67

97. Verplancke P., Beele H., Monstrey S., Naeyaert J.M.:
Treatment of dystrophic epidermolysis bullosa with autologous meshed split-thickness skin grafts and allogeneic cultured keratinocytes.
Dermatology, 1997; **194**: 380-382
98. Vogt P.M., Thompson S., Andree C., Liu P., Breuing K., Hatzis D., Brown H., Mulligan R.C., Eriksson E.:
Genetically modified keratinocytes transplanted to wounds reconstitute the epidermis.
Proc Natl Acad Sci USA, 1994; **91**: 9307-9311
99. Vogt P.M.:
Kutane Wundheilung. Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß von Wundmilieu und gentechnisch modulierten zellulären Transplantaten auf die epitheliale Regeneration.
Habilitationsschrift Universitätsklinik Ruhr-Universität Bochum, 1993
100. Wang H.J., Wan H.L., Yang T.S., Wang D.S., Chen T.M., Chang D.M.:
Acceleration of skin graft healing by growth factors.
Burns, 1996; **22(1)**: 10-14
101. Wieman T.J., Smiell J.M., Su Y.:
Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (Becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers.
Diabetes Care, 1998; Vol.21, Nr. 5: 822-827
102. Winter G.D.:
Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig.
Nature, 1962; **193** (4812): 293-299
103. Zacchi V., Soranzo C., Cortivo R., Radice M., Brun P., Abatangelo G.:
In vitro engineering of human skin-like tissue.
J Biomed Mater Res, 1998; **40**: 187-194

7 Anhang

7.1 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1996 bis Dezember 1998 für die Abteilung Plastische Chirurgie, Wiederherstellende- und Handchirurgie, Zentrum für Schwerbrandverletzte, Städtisches Krankenhaus München Bogenhausen angefertigt.

Prof. Dr. W. Mühlbauer danke ich für die Stellung des Themas und für seine Geduld.

Dr. N. Dimoudis der Firma Boehringer-Mannheim GmbH, Forschungszentrum Penzberg, Division Therapeutica danke ich für die Finanzierung des Projekts.

Bei meinem Betreuer Dr. E.A. Hoefter bedanke ich mich für seine Geduld und sein Engagement, einem Doktoranden naturwissenschaftliche Arbeits- und Denkweisen zu vermitteln.

Dr. J. Hecht danke ich für die Betreuung im Bereich Zellkultur, für seine freundliche Anteilnahme und Hilfsbereitschaft in allen Fragen.

Dank auch an Dr. T. Brill für die Betreuung der Tierversuche an der Abteilung für Experimentelle Chirurgie, Klinikum rechts der Isar der TU München.

Mein besonderer Dank gilt Frau R. Busch, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München, für die freundliche und unkomplizierte Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse.

Herrn Dr. A. Nerlich, Frau Dr. S. Haraida und Frau Wiest aus dem pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München, sowie Frau Dr. F. Lange und Herrn Dr. A. Lange aus dem anatomischen Institut der LMU danke ich für die histologischen und immunhistochemischen Färbungen.

7.2 Lebenslauf

Zur Person

Alexandra Fürst
Geboren am 24.01.1972 in Regen
ledig

Schulbildung

1978 - 1991 Grundschule und Gymnasium in Deggendorf
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

SS 1992 – WS 1998 Studium der Humanmedizin an der LMU München

01.1999 – 06.2000 Ärztin im Praktikum in der chirurgischen Abteilung des
 Kreiskrankenhauses Prien am Chiemsee

07.2000 Approbation als Ärztin

09.2000 Medical Manager bei der SWITCH Biotech AG, Bereich
 Klinische Forschung und Entwicklung