

---

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik  
Klinik für Hand-, Plastische-, Rekonstruktive- und  
Verbrennungschirurgie  
an der Universität Tübingen

**In vivo Evaluation von rhGDF-5 (growth differentiation  
factor 5) im Heilungsverlauf tieferdermaler Wunden an  
Göttinger Minipigs**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Rahmanian Koushkaki, Shahab

2018

---

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Held
2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Strölin

Tag der Disputation: 15.02.2018

---

Für meine Familie

---

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
1 Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung .....	2
1.1 Anatomie der Haut .....	2
1.1.1 Epidermis .....	2
1.1.2 Dermis .....	3
1.1.3 Subkutis .....	4
1.2 Die Wunde .....	4
1.3 Mechanismen der Wundheilung .....	6
1.4 Growth and Differential Faktor 5 (GDF-5).....	8
1.5 Wissenschaftliche Fragestellung .....	10
2 Material und Methoden .....	11
2.1 Materialien .....	11
2.1.1 Chemikalien .....	11
2.1.2 Instrumente.....	12
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.4 Software.....	13
2.2 Methoden .....	14
2.2.1 Aufbau der Studie .....	14
2.2.2 Matrix als Trägermaterial .....	18
2.2.3 GDF-5.....	19
2.2.4 Versuchstiere .....	22
2.2.5 Konditionierung der Tiere .....	23
2.2.6 Verbandstechnik .....	24
2.2.7 Die Operation.....	26

---

2.2.8	Obduktion .....	29
2.2.9	Analgesie .....	30
2.2.10	Applikation und Verbandswechsel .....	30
2.2.11	Dokumentation und Auswertung.....	31
2.2.12	Datenerfassung und statistische Auswertung.....	36
3	Ergebnisse .....	38
3.1	Planimetrie .....	38
3.1.1	Wundverschlusszeiten.....	38
3.1.2	Prozentualer Wundverschlussverlauf .....	43
3.2	Histologie .....	47
3.2.1	Epidermisdicke .....	47
3.2.2	Epidermiszellzahl.....	52
3.3	Bilder.....	55
4	Diskussion .....	62
4.1	Wachstumsfaktoren in der Wundheilung .....	63
4.2	GDF-5 beschleunigt die Wundverschlussdauer.....	66
4.3	Konzentrationsabhängiger Einfluss von GDF-5.....	69
4.4	Frequenzabhängiger Einfluss von GDF-5.....	70
4.5	Stellwert von Kollagenmatrix als GDF-5 Träger.....	72
4.6	Minipig als Tiermodell .....	74
4.7	Stellenwert der Konditionierung .....	77
4.8	Limitation in Studiendesign und Durchführung .....	78
4.9	Aussichten und klinische Relevanz.....	79
5	Zusammenfassung .....	81
6	Literaturverzeichnis.....	83

---

7	Abbildungsverzeichnis .....	90
8	Tabellenverzeichnis .....	93
9	Erklärung zum Eigenanteil .....	94
10	Danksagung.....	95

## Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
ANOVA	Analysis of variance
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
BMPR	Bone morphogenetic protein Rezeptor
CDMP	Cartilage-derived morphogenetic protein
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
GDF	Growth differentiation factor
HPLC	High performance liquid chromatography
I.m.	Intramuskulär
I.v.	Intravenös
IGF	Insulin-like growth factor
KGF	Keratinocyte Growth Factor
P	Probability
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived growth factor
PNPP	P-Nitrophenylphosphat
SD	Standardabweichung
TGF	Transforming growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# 1 Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

## 1.1 Anatomie der Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von durchschnittlich 1,6 m<sup>2</sup> das größte und vielseitigste Organ des menschlichen Körpers. Sie dient der Abgrenzung zwischen Organismus und Umwelt und schützt darunterliegende Gewebe vor mechanischen, chemischen und physikalischen Einflüssen. Weiterhin übernimmt die Haut eine wichtige Rolle im Stoffwechsel und bei immunologischen Funktionen des Körpers. Sie besteht bei Säugetieren aus drei Schichten: Der Epidermis, der sich ständig erneuernden Oberschicht, gefolgt von der Dermis, einer mechanisch stabilen Bindegewebsschicht und schließlich der Subkutis, die als Verschiebe- und Verbindungsschicht dient.

### 1.1.1 Epidermis

Die Epidermis ist mit einer Dicke von 0,8 bis 1,4 mm die oberste Hautschicht. Sie besteht aus mehrschichtigem, verhorntem Plattenepithel und zu 95 Prozent aus Keratinozyten. Dies sind die verhornenden Epithelzellen der Epidermis. Sie produzieren Keratin, welches der Oberhaut Festigkeit verleiht. Die Anzahl der Keratinozyten ist im Epithel normalerweise gleichbleibend, weil sich Proliferation, Differenzierung und Apoptose ausgleichen. Durch die Anordnung von Keratinozyten lässt sich die Epidermis morphologisch von innen nach außen in fünf Schichten aufteilen:

Die unterste Schicht, das Stratum basale, besteht aus kubischen oder prismatischen Keratinozyten, die über feine basale Fortsätze an der Basallamina verankert sind. In dieser Schicht entstehen durch ständige mitotische Teilung der Basalzellen die primären Epithelzellen. Diese Zellen wandern in etwa drei bis vier Wochen zur Hautoberfläche und werden dabei immer flacher, bis sie schließlich an der Oberfläche als verhornte Zellen abgeschilfert werden. Des Weiteren befinden sich in dieser Schicht Melanozyten, die das Farbpigment Melanin produzieren, Merkelzellen als

Druckrezeptoren und Zellen des Immunsystems.

An das Stratum basale schließt das Stratum spinosum, zusammengefasst als Stratum germinativum bezeichnet. In dieser Schicht haben die Keratinozyten deutlich größere Zellvolumina, sind jedoch in ihrer Form flacher. Sie besitzen eine polygonale Form mit vielen Zellausläufern und sind über stachelartige Zellbrücken (Desmosomen) miteinander verbunden. Bereits in dieser Schicht beginnt der als Keratinisierung bezeichnete Verhornungsprozess.

Das darüberliegende Stratum granulosum besteht aus zwei bis fünf Schichten abgeflachter Keratinozyten. Charakteristisch für diese Zellen sind die basophilen Keratohyalin granula sowie membranumschlossene lamelläre Granula mit Sphingomyelin, Glucosylceramiden, freien Fettsäuren, Cholesterin und katabolischen Enzymen wie Sphingomyelinase und Phospholipase A2. Diese sogenannten „lamellar bodies“ sind durch die Abgabe von Sekret im Interzellularraum für die Barrierefunktion der Haut entscheidend.

Das Stratum lucidum oder auch Glanzschicht ist nur an Fußsohlen und Handflächen zu erkennen.

Das Stratum corneum ist schließlich das Endprodukt der keratinisierten Epidermis und besteht aus etwa 10 bis 20 Zellschichten kernloser Korneozyten, die keine zytoplasmatischen Organellen enthalten.

Die Epidermis ist gefäßfrei und wird ausschließlich per Diffusion aus der gefäßreichen Dermis versorgt (Matoltsy 1986).

### **1.1.2 Dermis**

Die Dermis oder Lederhaut ist die bindegewebige Schicht unterhalb der Epidermis, und dient unter anderem der Verankerung und Ernährung der gefäßfreien Epidermis. Sie macht 15 bis 20 Prozent des Körpergewichts des Menschen aus und ist durch eine dünne Basalmembran aus Proteoglykanen und Kollagen von der Epidermis getrennt (Welsch 2005). Die Dermis besteht überwiegend aus Kollagenfasern, elastischen Fasern, Mikrofibrillen und

Hyaluronsäure. Letztere ist für die Speicherung von Wasser verantwortlich. In der Dermis befinden sich unterschiedliche Zelltypen wie Fibroblasten und Zellen der Immunabwehr, beispielsweise Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen. Zudem sind Lymph- und Blutgefäße sowie Haarwurzeln und Drüsengewebe epidermaler Herkunft eingebettet (Matoltsy 1986). Morphologisch lässt sich die Lederhaut in zwei Schichten unterteilen. Das oberflächliche Stratum papillare besteht aus lockerem Bindegewebe und überwiegend Kollagen Typ III, während das Stratum reticulare aus dichtem Bindegewebe und Kollagen Typ I zusammengesetzt ist.

### **1.1.3 Subkutis**

Die Subkutis besteht überwiegend aus Fettgewebe, welches durch Bindegewebssepten in Lappen unterteilt wird. Unter anderem liegen in dieser Schicht die Vater-Pacini-Körperchen, die für die Druck- und Vibrationswahrnehmung zuständig sind.

## **1.2 Die Wunde**

Die Wunde wird als Verlust der Organintegrität definiert. Sie ist die Unterbrechung des Zusammenhangs von Körpergewebe mit oder ohne Substanzverlust durch exogene oder endogene Reize (Pschyrembel W 1998). Die durch exogene Noxen verursachten Wunden können nach ihrer Genese weiter unterteilt werden. Zu den häufigsten Formen zählen die mechanisch verursachten Wunden durch Gewalteinwirkung, vor allem am Hautorgan. Hierbei wird zwischen spitzen, beispielsweise Schnitt- und Stichwunden, und stumpfen, wie Platz-, Riss-, Quetsch- und Schürfwunden, unterschieden. Eine Kombination aus scharf-stumpfen mechanischem Reiz stellt die Schusswunde dar. Zu den exogenen Reizen zählen auch Hitze (Verbrennung) und Kälte (Erfrierung), die zu thermischen Wunden führen können. Durch Säuren, Laugen oder andere zytotoxische Substanzen verursachte Verätzungen werden als

chemische Wunden bezeichnet. Durch Einwirkung ultravioletter oder ionisierender Strahlung können Strahlenwunden verursacht werden. Weiterhin unterscheidet man einfache von komplizierten Wunden. Als komplizierte Wunden werden definitionsgemäß tiefergehende Schädigungen bezeichnet, die das Muskelgewebe, das Skelettsystem oder innere Organe betreffen (Hunt 1988, Lazarus, Cooper et al. 1994).

Der Organismus repariert das vorliegende Gewebstrauma einer Wunde durch Wundheilungsvorgänge und bildet Ersatzgewebe aus. Klinisch lassen sich nach Ausmaß des gebildeten Granulationsgewebes zwei Formen der Wundheilung unterscheiden: die primäre (*sanatio per primam intentionem*) und die sekundäre Wundheilung (*sanatio per secundam intentionem*). Voraussetzung für die primäre Wundheilung sind gut adaptierte glatte Wundränder, ohne größere Gewebsverluste. Diese Wundheilungsform wird heutzutage durch entsprechende Naht- und Verbandstechniken angestrebt. Charakteristisch für die primäre Wundheilung sind Schnitt- und chirurgische Wunden. Hierbei verläuft die Heilung meist schnell, in etwa fünf bis zehn Tagen, und weist im Endresultat eine funktional günstige Strichnarbe auf (Ackermann 2009).

Zur Sekundärheilung kommt es, wenn die primäre Heilung durch traumatische, chemische oder bakterielle Noxen verhindert wird, oder bei großen Gewebsdefekten. Die entsprechenden Wunden sind meist infiziert, und der Organismus muss den Defekt zuerst durch Granulationsgewebe überbrücken. Eine weitere Sonderform stellt Heilung unter Schorf dar. Diese betrifft sehr oberflächliche Wunden, bei denen nur die Epidermis geschädigt ist.

Wird der physiologische Wundheilungsverlauf einer Wunde gestört, heilt sie schlecht oder gar nicht. Derartige Wundheilungsstörungen können durch lokale, das heißt von den im Wundgebiet vorherrschenden Verhältnissen ausgehende Störungen oder durch bestehende Grunderkrankungen hervorgerufen werden (Weise and Schaffer 2000). Letzteres trifft beispielsweise auf chronische Wunden zu, die große Probleme im klinischen Alltag darstellen. Hierbei handelt es sich definitionsgemäß um sekundär heilende Wunden, die innerhalb von acht Wochen keine Tendenz zur Heilung zeigen (Röthel 1997). Ausgenommen

hiervon sind Wunden, die aufgrund ihrer Größe unter guten Bedingungen einen längeren Zeitraum zur Abheilung benötigen. Sie lassen eine randständige Epithelialisierung als Vitalitätszeichen erkennen.

### **1.3 Mechanismen der Wundheilung**

Die Wundheilung ist ein komplexer Mechanismus unter Beteiligung vieler Faktoren. Bei Menschen und Säugetieren lässt sich die Wundheilung in drei aufeinanderfolgende und überlappende Phasen unterteilen. Der Übergang zwischen den Phasen ist nicht klar abgegrenzt und hängt von der Reifung und Differenzierung der wichtigsten Zellpopulationen der Haut, der Keratinozyten, Fibroblasten und Makrophagen, ab.

#### 1. Exsudationsphase

Die Exsudationsphase beginnt direkt nach einer Verletzung und dauert drei bis fünf Tage, abhängig vom Ausmaß der Verletzung und der Reaktionsfähigkeit des Individuums. Durch die Zerstörung der Blutgefäße wird die Wunde mit Blut gefüllt und gereinigt. Um den Blutverlust zu minimieren, kommt es nach fünf bis zehn Minuten durch Katecholamine, Bradykinin, Serotonin und Histamin zu einer Vasokonstriktion (Broughton, Janis et al. 2006). Gleichzeitig bewirken die Mediatoren der Prostaglandinreihe, Histamin, Serotonin und Bradykinin eine Vasodilatation der umliegenden Gefäße (Broughton, Janis et al. 2006). Dadurch gelangen Gerinnungsfaktoren und Fibrinogen in die Wunde. Durch Ausschüttung von Thromboplastin aus den verletzten Epithelzellen wird die Gerinnungskaskade aktiviert. Dabei kommt es durch Aggregation von Thrombozyten zu einem Blutgerinnsel, welches durch Fibrin-Quervernetzungen stabilisiert wird. Dieses Fibringerüst verklebt die Wundränder und ist für die Hämostase verantwortlich. Andererseits dient es auch als Grundgerüst für die einwandernden Zellen der Immunabwehr, wie beispielsweise neutrophile Granulozyten und Monozyten. Diese Zellen verhindern eine bakterielle Kontamination durch Phagozytose und fördern die Beseitigung von zerstörten

Zelltrümmern (Martin and Timpl 1987). Zeitgleich werden von den Thrombozyten verschiedene Wachstumsfaktoren, welche für die späteren Wundheilungsphasen von Bedeutung sind, freigesetzt. Zu diesen Faktoren zählen epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) und  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Somit entsteht ein geeignetes Milieu für den zweiten Schritt der Wundheilung, die Proliferationsphase (Clark 1993, Fleischmann, Russ et al. 1998, Ashcroft, Mills et al. 2002).

### 2. Proliferationsphase

Diese Phase wird aufgrund des hellroten, körnigen Aussehens des Gewebes Granulationsphase genannt. Hierfür sind die neugebildeten Kapillarbäumchen zuständig, welche neben Makrophagen und Fibroblasten die Hauptrolle in dieser Phase spielen. Die Makrophagen stimulieren durch ihre Aktivität die Fibroblastenproliferation und Angiogenese. Durch Wachstumsfaktoren stimulierte Fibroblasten werden durch einen positiven autokrinen Feedbackmechanismus zusätzlich in ihrer Aktivität stimuliert und beschleunigen so den Heilungsprozess (Kiritsy, Lynch et al. 1993). Weiterhin steigt die Anzahl der Eosinophilen, die als Mediatoren des Gewebstoffwechsels dienen und die Epithelproliferation und Neovaskularisation erleichtern (Kiritsy, Lynch et al. 1993). Die Gefäßneubildung ist eine der wichtigsten Vorgänge in dieser Phase. Sie wird vor allem durch vascular endothelial growth factor (VEGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) beeinflusst. Die Neovaskularisation beginnt mit der Proteolyse der extrazellulären Matrix und Basalmembran der umliegenden Gefäße. Unreife Endothelzellen wandern ein und bilden durch ihre Proliferation neue Endothelröhrchen, die sich zu Kapillaren differenzieren. Durch die neugebildeten Kapillarbäumchen steigt der Sauerstoffgehalt, was die Gewebsneubildung verbessert. Gleichzeitig können Kohlenstoffdioxid und andere Abfallprodukte entfernt werden (Ackermann 2009).

### 3. Differenzierungsphase

In dieser Phase wird durch den Umbau des neuen Gewebes und die Epithelisierung die Wunde verschlossen. Fibroblasten werden durch den Einfluss von PDGF-Isoformen aus Blutplättchen und Makrophagen in Myofibroblasten umgewandelt. Diese besitzen ähnliche Eigenschaften wie glatte Muskulatur und können sich kontrahieren. Die Myofibroblasten sind durch Integrin-Rezeptoren mit extrazellulärer Matrix verbunden und können so durch ihre Kontraktion die Wundfläche verkleinern. Des Weiteren ist durch die Verletzung die Anzahl an Chalone-produzierenden Zellen gesunken. Chalone sind Glykoproteine, welche die Zellteilung von Epidermiszellen drosseln. Somit steigt im Wundrandbereich aufgrund der geringen Menge an Chalonen die Mitoserate im Stratum basale der Haut. Dieser Vorgang wird zusätzlich durch Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten, Fibroblasten und Makrophagen unterstützt. Die Epithelisierung orientiert sich entlang der Kollagenfasern. Epithelzellen lösen sich am Wundrand von der Basalmembran und bewegen sich auf reifem Granulationsgewebe zur anderen Seite, bis der komplette Defekt geschlossen ist. Dennoch ist die Wundheilung noch nicht komplett abgeschlossen. Je nach Wundgröße und -tiefe kann der Umbau in strapazierfähiges und ausgereiftes Narbengewebe bis zu einem Jahr dauern.

### **1.4 Growth and Differentiation Factor 5 (GDF-5)**

Growth differentiation factor und bone morphogenetic proteins (BMPs) gehören zu der TGF- $\beta$  Superfamilie und sind wichtige Wachstumsfaktoren in der Embryonalzeit sowie im erwachsenen Organismus. Sie sind für die Regulierung von zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration und Differenzierung von verschiedenen Zellen verantwortlich. Die TGF- $\beta$  Superfamilie wird anhand von Sequenzhomologien in vier Untergruppen unterteilt. Diese vier Gruppen sind TGF- $\beta$ , die Activine/Inhibine, die BMPs/GDFs und eine heterogene Gruppe. Alle vier Untergruppen der TGF- $\beta$  Superfamilie haben trotz unterschiedlicher Funktionen einen gemeinsamen Mechanismus der Signaltransduktion (Lutz and Knaus 2002). Alle Proteine werden als inaktive Form, sogenannte

Präproteine, synthetisiert und haben eine Länge von 400 bis 500 Aminosäuren. Das Präprotein besitzt ein reifes C-terminales Ende, eine Prädomäne sowie ein Signalpeptid am N-terminalen Ende. Diese Proteine werden durch Proteinkonvertasen unter hydrolytischer Spaltung der Prädomäne aktiviert. Dies geschieht an der spezifischen Erkennungssequenz R-X-X-R. Charakteristisch für diese aktive Form des Proteins ist ein stark konserviertes Strukturelement, das aus sieben Cysteinen, dem sogenannten Cysteinknoten, besteht. Davon bilden sechs Cysteine intramolekulare Disulfidbrücken, während das vierte Cystein für die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke im Homodimer verantwortlich ist. Für die BMP/GDF-Gruppe sind bisher zwei Rezeptoren von Typ 1 und 2 identifiziert (BMPRI, BMPRII) (Nohe, Keating et al. 2004). Diese gehören zur Gruppe der membranständigen Serin/Threonin-Kinasen und bilden an der Zelloberfläche Komplexe zu aktiven Hetero- und Homodimeren (Gilboa, Nohe et al. 2000).

Das menschliche GDF-5 Gen ist für die Entwicklung des Extremitätenskelettes beim Menschen und der Maus essentiell und wurde erstmals 1994 kloniert. Expressionsstudien an Maus und Huhn zeigen, dass GDF-5 in den frühen Knorpelkondensationszentren sowie bei der Gliedmaßenentwicklung im Gelenkspalt und Perichondrium exprimiert wird (Storm, Huynh et al. 1994, Luyten 1997). Vor diesem Hintergrund gibt es eine Vielzahl von Studien, die sich mit der Wirkung von rh-GDF-5 auf die Heilung von Knochen und Sehnen beschäftigen. In vitro Versuche haben gezeigt, dass GDF-5 nicht nur die osteogene Differenzierung von Rattenfettzellen-abgeleiteten Stromazellen fördern kann, sondern auch die Angiogenese durch Erhöhung der VEGF-Genexpression (Zeng, Li et al. 2007).

Die positiven in vitro Wirkungen von GDF-5 auf die Zellproliferation und -migration sowie Angiogenese sind allesamt entscheidende Faktoren in der kutanen Wundheilung. Vor diesem Hintergrund ist der Einsatz von GDF-5 in der regenerativen Medizin ein vielversprechender Ansatz.

### 1.5 Wissenschaftliche Fragestellung

Ziel dieses Projektes war die Evaluation einer neuen aktiven Wundaufgabe aus dem Wachstumsfaktor GDF-5, eingebettet in einer Kollagenmatrix, zur Optimierung der Heilung tief dermalen Wunden im Großtiermodell (Göttinger Minipig). Zu den tief dermalen Wunden zählen unter anderem großflächige Verbrennungswunden und chronische Wunden. Chronische Wundheilungsstörungen stellen ein erhebliches medizinisches Problem für die Betroffenen dar. Die normalen Wundheilungsmechanismen können durch andere Grunderkrankungen gestört werden, wodurch nicht heilende Wunden, wie beispielsweise im Falle diabetischer Ulcera, entstehen können. Mit solchen Wunden geht ein hoher Therapiebedarf einher, um das Infektionsrisiko und weitere Spätfolgen, wie die Amputation von Gliedmaßen, einzudämmen (Kremer, Lang et al. 2000). Die hohe Erkrankungsrate an Typ-II-Diabetes macht diabetische Ulcera zu einem wesentlichen Gesundheitsproblem in westlichen Ländern (Vogt, Kolokythas et al. 2007). Im Rahmen dieser Studie sollte ein neuer Therapieansatz zur Heilung tief dermalen Wunden im klinisch relevanten Großtiermodell (Minischwein) überprüft werden. Prinzipiell besteht der Ansatz aus einer Trägerkollagenmatrix mit einem integrierten Wachstumsfaktor GDF-5 (growth differentiation factor 5) im Wundbereich mit prolongierter Freisetzung. Auf dem Hautsektor wurde der Wachstumsfaktor GDF-5 in vivo im Modell Schwein erstmalig in tief dermalen Wunden getestet. Diese Studie dient dazu, die Optimierung der Wundheilung durch Einsatz von GDF-5 in Bezug auf die Wundverschlussdauer sowie die Qualität der Neoepidermis (Dicke und Zellzahl) zu evaluieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Art	Label	Hersteller
Antibiotikum	Veracin compositum®	Albrecht GmbH, Vet.-med. Erzeugnisse, Aulendorf, Deutschland
Atropin	Atropin-100 mg Inj.lsg.®	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Deutschland
Azaperon	Stresnil®	Janssen Animal Health, Division of Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Butorphanol	Butomidol Inj.lsg.®	Vetoquinol GmbH, Ravensburg, Deutschland
Eindeckmedium	Entellan®	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Eosin-Lösung	Eosin-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid 14.9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketamin	Ursotamin Inj.lsg.®	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Mayer's Häkalaunlösung	Mayer's Häkalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Medetomidin	Dorbene vet Inj.lsg.®	Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland
Meloxicam	Meloxidyl	Ceva Sante Animale, Libourne, Frankreich
Midazolam	Midazolam-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm/Donautal, Deutschland
Muskelrelaxans	Vecuronium Inresa 10 mg®	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
Thiopental	Trapanal	Nycomed GmbH, Konstanz, Deutschland
Xylazin	Sedaxylan®	WdT - Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland

Tabelle 1: Liste der verwendeten Materialien

2.1.2 Instrumente

Art	Label	Hersteller
Elektrische Schermaschine	Favorita II	Aesculap AG&Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Gewebeeinbettungs-Station	Leica EG 1160	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Gewebeverarbeitung	Shandon Pathcentre Tissue Processor	Thermo Scientific, Astmoor, Runcorn, Cheshire, UK
Kamera	Canon Powershot A650 IS	Canon Europe N.V., Amstelveen, Niederlande
Mikroskop	Axio Observer.Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskopkamera	AxioCam ERc 5s	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Minischwein-Schlinge	Sling size L	Ellegaard Göttingen Minipigs A/S, Dalmoose, Dänemark
Schablone		Selbst hergestellt, BG Unfallklinik Tübingen
Stativ		Selbst hergestellt, BG Unfallklinik Tübingen
Stempel		Selbst hergestellt, BG Unfallklinik Tübingen
Tätowiergerät	Professional Make-up kit, G-9740	Giant Sun Industry Co., Ltd., New Taipei City, Taiwan
Zentrifuge	Labofuge 300	Heraeus, Osterode, Deutschland

Tabelle 2: Liste der verwendeten Instrumente

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Art	Label	Hersteller
Desinfektionsmittel	Sterillium®	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Elisa-kit GDF-5	Growth Differentiation Factor 5 (GDF5) ELISA Kit	antibodies-online GmbH, Aachen, Deutschland
Verbandfixierung	Fixomull®	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Folie, nicht klebend	Renasys Transparent Film	Smith & Nephew Orthopaedics GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kanüle	Vygonüle V	Vygon GmbH und Co. KG, Aachen, Deutschland
Schweine-Jacken	Ellegaard Minipig Jacket Large Full Body	Lomir Biomedical Inc., Notre-Dame-de-l'Île-Perrot, Quebec, Kanada
Verschlussfolie	Renasys Transparent Film	Smith & Nephew Orthopaedics GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

### 2.1.4 Software

Funktion	Programmname	Hersteller
Textverarbeitung	MS Word 2003	Microsoft Corporation, Redmond, US
Mikroskopie-Software	ZEN blue edition 2011	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Literaturverwaltung	EndNote X4	Thomson Reuters, New York, US
Illustration von Grafiken	MS PowerPoint 2003	Microsoft Corporation, Redmond, US
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems, San Jose, US
Analyse und Darstellung von Daten	MS Excel 2003	Microsoft Corporation, Redmond, US

Tabelle 4: Liste der verwendeten Programme

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Aufbau der Studie

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung des Wachstumsfaktors GDF-5 auf die Heilung tief dermaler Wunden in einem Minipigmodell evaluiert. Für tief dermale Wunden haben verschiedene Studien einen vollständigen Wundverschluss innerhalb von drei Wochen ergeben. In diesem Zusammenhang ist die Studie von Fu et al. (Fu, Fang et al. 2007) zu nennen, die einen vollständigen Wundverschluss von Vollhautdefekten (2,5 cm x 3,0 cm) auf dem Rücken von Minischweinen nach 21 Tagen zeigte. Weiter beschreiben Glerup et al. die Granulierung und vollständige Reepithelisierung tiefer Hautwunden mit einem Durchmesser von 2,0 cm innerhalb von zwei bis drei Wochen (Glerup 2011). Bezugnehmend auf diese Studien wurde ein Versuchszeitraum von 21 Tagen gewählt. Die Versuche wurden an zwölf, in zwei Gruppen eingeteilten, weiblichen Göttinger Minischweinen durchgeführt. Um eine Variation in der Applikation der Wundauflagen zu erreichen, wurden die Minipigs wie folgt eingeteilt:

- Sechs Minischweine: Versuchsteil I (Einfachapplikation)
- Sechs Minischweine: Versuchsteil II (Mehrfachapplikation)

Die Operationen wurden nach einer Zeit der Gewöhnung und Konditionierung in standardisierter Weise durchgeführt. Hierbei wurden auf dem Rücken jedes Tiers paravertebral acht kreisförmige Vollhautdefekte (2,0 cm Durchmesser, 0,6 cm Tiefe) operativ entfernt und mit den Wundauflagen versorgt (Abbildung 1).

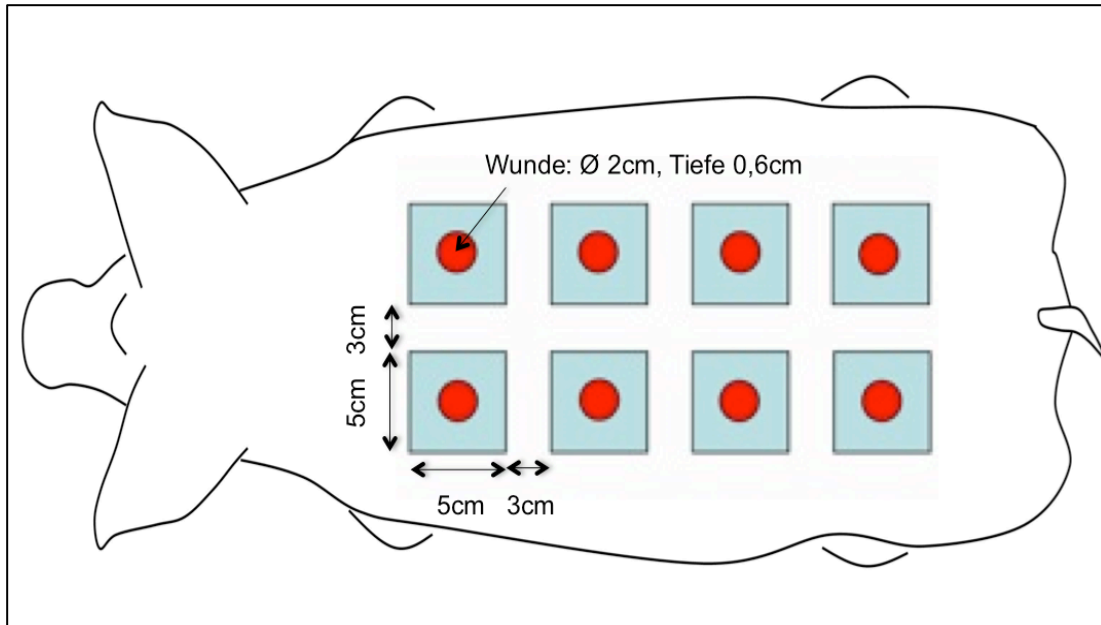


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wundplatzierungen

Für die vorliegende Studie wurden lediglich fünf der acht Wunden verwendet, die übrigen drei dienten einer separaten Studie. Jeweils eine Wunde jedes Schweines wurde einer Kontrollgruppe zugeteilt. Die übrigen vier Wunden wurden mit folgenden Wundauflagen versorgt:

- 1) Unbehandelt
- 2) 100 ng GDF-5 (Scaffold 30 g/m<sup>2</sup>)
- 3) 500 ng GDF-5 (Scaffold 75 g/m<sup>2</sup>)
- 4) 1000 ng GDF-5 (Scaffold 150 g/m<sup>2</sup>)
- 5) 5000 ng GDF-5 (Scaffold 90 g/m<sup>2</sup>)

Um einen systematischen Fehler zu vermeiden, wurden die Platzierungen der Wundauflagen randomisiert. Die Tiere im Versuchsteil I erhielten eine einmalige Applikation der Wundaufgabe bei der Operation. Im Versuchsteil II wurden die Wunden wie in Tabelle 5 und Tabelle 6 beschrieben alle zwei Tage mit Wundaufgaben versorgt.

## Material und Methoden

Zeit	Konditionierung	Rasur	Tätowierung	Operation	Fotodokumentation	Euthanasie
Woche 1						
Woche 2						
Woche 3						
Woche 4						
Woche 5						
Woche 6						
Woche 7						
Woche 8						
Woche 9						
Woche 10						

Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf, Experiment Teil I

## Material und Methoden

Zeit	Konditionierung	Rasur	Tätowierung	Operation	Fotodokumentation	Euthanasie
Woche 1						
Woche 2						
Woche 3						
Woche 4						
Woche 5						
Woche 6						

Tabelle 6: Zeitlicher Verlauf, Experiment Teil

### 2.2.2 Matrix als Trägermaterial

Als Trägermatrix für den Wachstumsfaktor GDF-5 wurde ein neuartiges Kollagenvlies auf Gelatinebasis verwendet. Die Scaffolds wurden von der Firma Freudenberg durch ein standardisiertes Spinnverfahren hergestellt. Hierbei wurden Fasern mit der Dicke von 2 und 10  $\mu\text{m}$  kombiniert. Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopisches Bildausschnitt (500-fache Vergrößerung) zeigt den dreidimensionalen Aufbau des Scaffolds in einem rasterelektronenmikroskopischen Bild. Die Porengrößen liegen unabhängig von den Gerüststücken im Bereich von 35 bis 70  $\mu\text{m}$ . In der vorliegenden Studie wurden Vliese in vier verschiedenen Dicken eingesetzt:

- 1) Scaffold 30  $\text{g}/\text{m}^2$
- 2) Scaffold 75  $\text{g}/\text{m}^2$
- 3) Scaffold 150  $\text{g}/\text{m}^2$
- 4) Scaffold 90  $\text{g}/\text{m}^2$

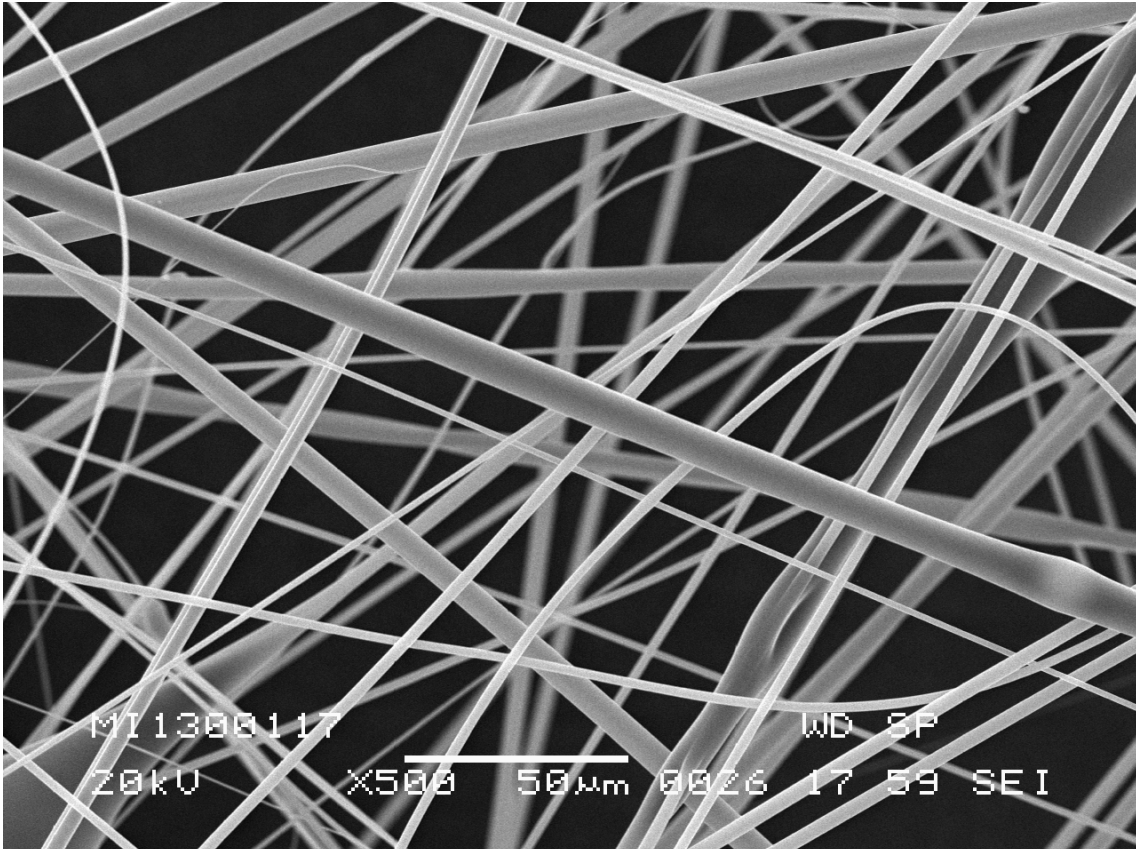


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopisches Bildausschnitt (500-fache Vergrößerung) - Freudenberg Technology Innovation SE & Co. KG, Weinheim, Deutschland

### 2.2.3 GDF-5

#### 2.2.3.1 Proteinexpression und Aufreinigung von rhGDF-5

Der Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5 (rhGDF-5) wurde bei Biopharm in dem *E. coli* Stamm W3110 BP exprimiert. Das Protein wurde in Form von Einschlusskörpern (inclusion bodies) in den Bakterien abgelegt. Durch die Isolation der Einschlusskörper entsteht ein relativ reines Protein, welches jedoch durch weitere Chromatographieschritte aufgereinigt werden muss. Nach der Extraktion der Proteine aus den Einschlusskörpern erfolgte zunächst eine Ionenaustauschchromatographie, um störende *E. coli* Proteine abzutrennen. Die HPLC-Fractionen wurden in einem Polyacrylamidgel mit anschließender Silberfärbung auf Anwesenheit der rhGDF-5-Proteine untersucht. Die Fractionen mit dem größten GDF-5-Gehalt wurden vereinigt. Im zweiten Schritt wurden die noch denaturierten Proteine einer Faltungsprozedur (Refolding)

unterzogen, um biologisch aktives Protein zu erhalten. Durch den Faltungsprozess entstehen aus den monomeren Proteinen (13 kDa) dimere Proteine, die sich durch ihr Molekulargewicht (26 kDa) unterscheiden. Im dritten Aufreinigungsschritt wurde eine zweite RP-HPLC (Chromatographie mit Umkehrphase) durchgeführt, um das korrekt gefaltete dimere Protein von der nicht-gefalteten Proteinfraktion abzutrennen. Aufgrund der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften war es möglich, die korrekt gefalteten Proteine zu identifizieren und zu isolieren. Die Fraktionen mit der größten Reinheit wurden vereinigt und abschließend auf einem Polyacrylamidgel untersucht. Das Protein wurde unter nicht-reduzierenden (- DTT) und reduzierenden Bedingungen (+ DTT) analysiert. Der Faltungsprozess und das Aufreinigungsverfahren waren effizient, es entstand ein gefaltetes dimeres Protein, welches durch Reduktion (+ DTT) zurück in die monomere Form überführt werden kann.

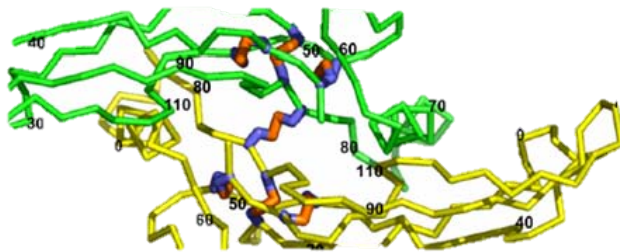


Abbildung 3: A) Struktur von GDF-5. GDF-5 ist ein dimeres Protein der TGF- $\beta$  Superproteinfamilie. Die Untereinheiten (gelb und grün) sind über eine Schwefelbrücke miteinander verbunden. Durch Reduktionsmittel wie DTT wird die Schwefelbrücke gespalten und das Molekül wird in die beiden Untereinheiten überführt. B) Analyse von rhGDF-5 im SDS PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. Das Protein wurde unter nicht-reduzierenden (- DTT) und reduzierenden Bedingungen (+ DTT) analysiert. M = Protein-Molekulargewichtsmarker - BIOPHARM GmbH, Eppelheim, Deutschland

### 2.2.3.2 Bioassay

Nach der Aufreinigungsprozedur wurde die biologische Aktivität des Wachstumsfaktors rhGDF-5 in einem zellulären Bioassay getestet. Die Aktivität wurde im Alkalischen Phosphatase (ALP) Assay bestimmt. Dazu wurde rhGDF-5 in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 1200 ng/ml mit murinen Bindegewebezellen MCHT1/26-Zellen (Dr. Plöger; Biopharm; Heidelberg) kultiviert. Das rhGDF-5 steigert die Produktion Alkalischer Phosphatase in

diesen Zellen. Die ALP-Aktivität in MCHT1/26-Zelllysaten wird durch einen colorimetrischen Test gemessen. Die Farbreaktion basiert auf der Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat (PNPP) in p-Nitrophenol, das im alkalischen Milieu als gelbes p-Nitrophenolatanion vorliegt. Die ALP-Aktivität steigt in Abhängigkeit von der eingesetzten rhGDF-5-Proteinmenge. Wie dem konzentrationsabhängigen Kurvenverlauf in Abbildung 4 zu entnehmen ist, ist rhGDF-5 biologisch aktiv.

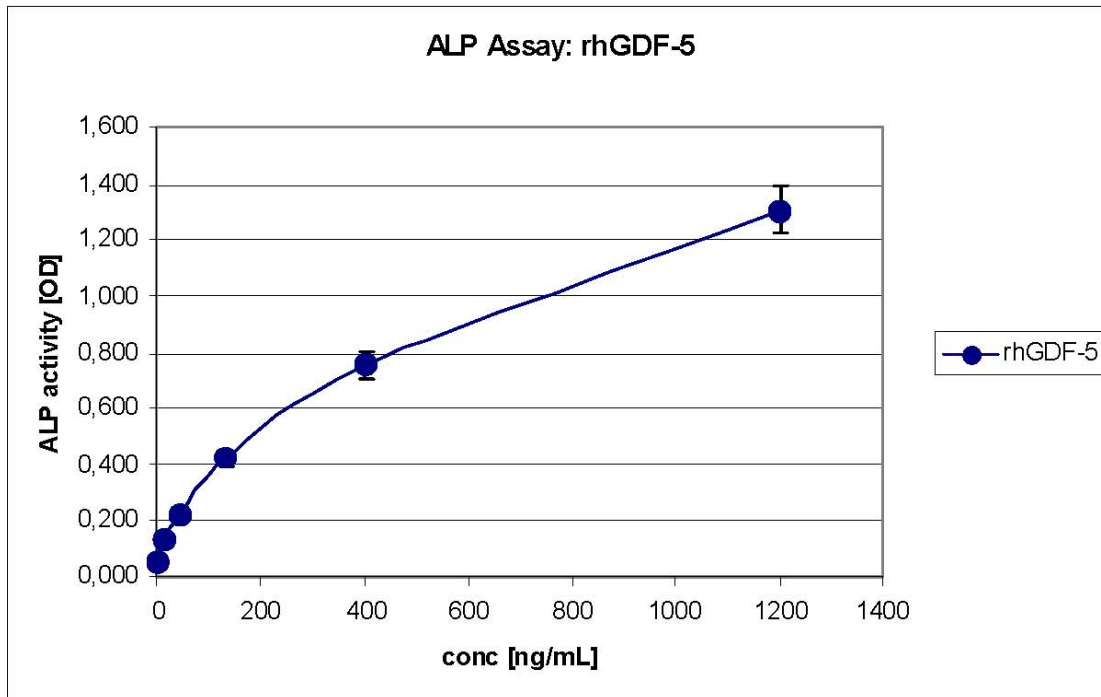


Abbildung 4: Als Nachweis für die biologische Aktivität wurde rhGDF-5 im ALP Assay mit MCHT1/26-Zellen getestet. rhGDF-5 wurde in einer Konzentration von 0 bis 1200 ng/ml eingesetzt. Der durch die Alkalische Phosphatase induzierte Substratumsatz von p-Nitrophenylphosphat wurde bei einer Absorption von 405 nm gemessen - BIOPHARM GmbH, Eppelheim, Deutschland

### 2.2.4 Versuchstiere

Die Tiere wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) behandelt. Die Studie wurde mit Genehmigung vom Ministerium für Ländlichen Raum und Verbraucherschutz Baden-Württemberg (Zulassungsnummer AT 1/12) durchgeführt.

Alle zwölf von der Firma Ellegaard Göttingen Minipigs A/S (Dalmose, Dänemark) erhaltenen Göttinger Minipigs wurden während der Studie in der Tierhaltung Tübingen in zwei Gruppen untergebracht. Sie wurden in einem Temperaturbereich von  $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , bei  $60\% \pm 10\%$  Luftfeuchtigkeit und einem 12-Stunden-Tag- und Nachtzyklus ( $150 \pm 50\text{ lx}$ , 9 Uhr bis 21 Uhr Licht) gehalten.

Bei der Ankunft wogen die Minipigs  $22,6\text{ kg} (\pm 0,9\text{ kg})$  und waren im Durchschnitt 39 Wochen ( $\pm 14,7\text{ Tage}$ ) alt. Sie hatten permanenten Zugang

zum Trinkwasser und wurden täglich mit 400 g einer Standard-Minischwein-Ernährung versorgt. Um ein ordnungsgemäßes Wachstum zu gewährleisten, wurden sie routinemäßig wöchentlich gewogen (Tabelle 7).

Tier	Nummer	Gewicht OP-Tag	Gewicht Nekropsie-Tag	Gewichtszunahme
A	212022	27,9	29,6	1,7
B	212274	25,5	25,4	-0,1
C	212299	22,8	22,6	-0,2
D	212073	26,5	27,5	1
E	212217	22,5	25,6	3,1
F	212209	24,8	24,3	-0,5
K	307841	22,3	23,7	1,4
L	307829	24,3	25,5	1,2
M	307839	23,6	24,6	1
N	307814	22,6	24,0	1,4
O	307838	23,7	24,4	0,7
P	307802	23,6	25,5	1,9
	Mittelwert	24,175	25,225	1,05
	SD	1,66	1,76	0,96

**Tabelle 7: Gewicht der Minipigs**

### 2.2.5 Konditionierung der Tiere

Vor Beginn der operativen Verfahren erhielten die Tiere etwa sechs Wochen Gewöhnungszeit. Während dieser Zeit hatten alle Minischweine die Möglichkeit, ihre Umgebung zu erforschen und sich an die beteiligten Mitarbeiter zu gewöhnen. Außerdem wurden die Tiere konditioniert, in einer speziellen Minischwein-Schlinge zu liegen. In dieser Schlinge wurden später prä- und postoperative Verfahren wie Verbandswechsel und Fotodokumentation durchgeführt. In der Gewöhnungs- und Konditionierungsphase verbrachten mindestens zwei Mitarbeiter täglich über zwei Stunden Zeit mit den Tieren. Sie streichelten und unterhielten die Schweine und hoben diese in die Schlinge -

solange bis alle Minischweine mit dem gesamten Personal vertraut waren und sich ohne größere Probleme in die Schlinge lagern ließen. Ebenso wurden in der Schlinge bereits Verbandswechsel und Fotodokumentationen durchgeführt, um die Tiere an diese postoperativen Verfahren zu gewöhnen. Dies war für den späteren Versuchsverlauf und -erfolg von entscheidender Bedeutung und führte zur Minimierung von Zeitaufwand und Stresspotenzial für alle Beteiligten.



Abbildung 5: In Schlinge liegendes Minipig

### 2.2.6 Verbandstechnik

Um den besten postoperativen Wund- und Wundauflagenschutz zu gewährleisten, wurden in der Konditionierungsphase verschiedene Verbandstechniken systematisch getestet. Den besten Schutz schien folgende Technik zu bieten:

## Material und Methoden

Zuerst wurden kleine nicht-klebende Membranen über jeder zukünftigen Wundstelle platziert. Diese Membranen sollten das Verkleben der Wundauflagen mit der luftdichten Kleber- und Verschlussfolie, welche den kompletten Wundbereich einschließlich der tätowierten Quadrate abdeckte, verhindern. Die äußeren Ränder der Folie wurden zusätzlich mit Fixomull an den Schweinerücken befestigt. Darüber hinaus wurden die Tiere konditioniert, die individuell angefertigten Schweinejacken für den postoperativen Verbandschutz zu tragen. Um ihr Verrutschen zu verhindern, wurden auch diese Jacken sowohl auf dem Rücken des Tieres als auch an den Vorderbeinen mit Fixomull befestigt.



Abbildung 6: Platzierung der nichtklebenden Membranen und der Kleber- und Verschlussfolie



Abbildung 7: Anziehen der Jacke und Befestigen mit Fixomull

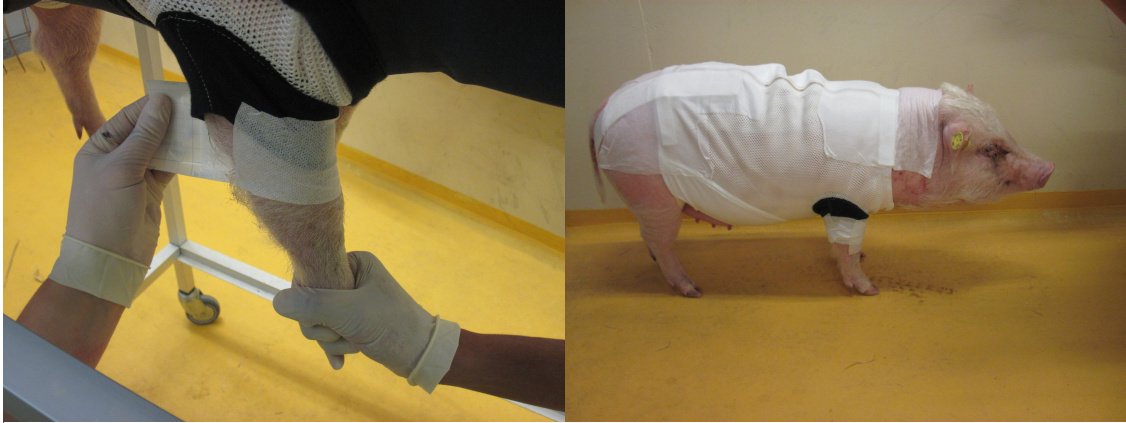


Abbildung 8: Befestigung der Jacke an den Beinen mit Fixomull

### 2.2.7 Die Operation

#### 2.2.7.1 Präoperatives Verfahren

Präoperativ wurden zuerst die Rücken der Tiere zur besseren Übersicht rasiert. Anschließend wurde mithilfe einer eigens angefertigten Schablone die Wundplatzierung markiert (Abbildung 9). Hierbei wurde der Rücken jedes Schweines mit acht quadratischen Kästchen (5 cm x 5 cm), jeweils im Abstand von 3 cm, und jeweils mit einem zentralen Kreis von 2 cm Durchmesser versehen. Die äußeren Kästchen dienen der späteren planimetrischen Auswertung des Wundheilungsverlaufes. Diese standardisierten Markierungen wurden schließlich tätowiert (Abbildung 10). Für die Tätowierung erhielten alle Minischweine eine kombinierte Sedierung mit 0,2 mg/kg Butorphanol, 15 mg/kg Ketamin und 2 mg/kg Xylazin (Sedaxylan®).

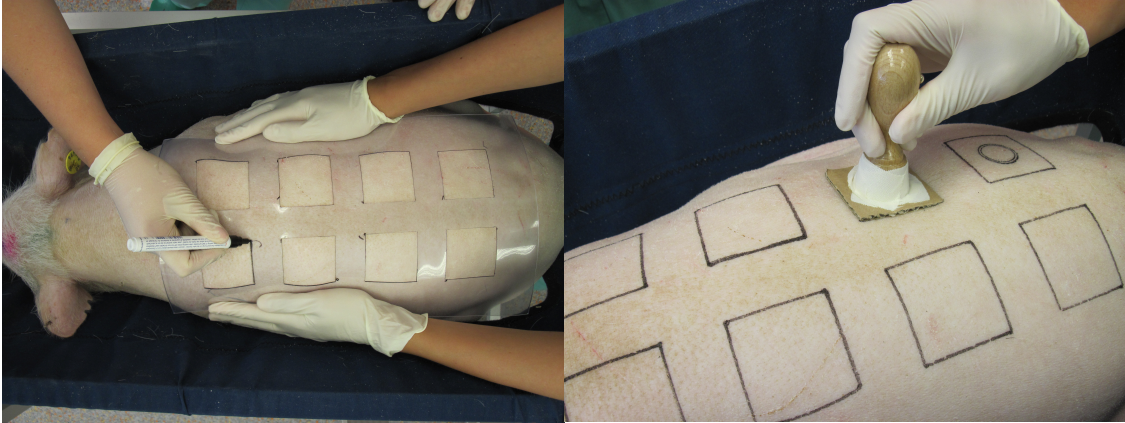


Abbildung 9: Markierung der Wundflächen und äußeren Quadrate



Abbildung 10: Tätowierung

### **2.2.7.2 Intraoperatives verfahren**

Alle Operationen fanden nach einer Nüchternzeit von mindestens zwölf Stunden statt. Zuerst wurden die Tiere mit einer, auf ihr Gewicht angepassten, intramuskulären Injektion von 2 mg/kg Azaperon und 0,05 mg/kg Atropin sediert. In sediertem Zustand wurden die Minischweine anschließend gewogen und in den Operationssaal gebracht. Hier wurden sie über einen intravenösen Zugang an einer Ohrvene mit 0,2 mg/kg Butorphanol, 10 mg/kg Ketamin und 0,08 mg/kg Medetomidin in Narkose versetzt. Bei Bedarf wurden zusätzlich 10 mg/kg Ketamin und 0,3 mg/kg Midazolam verabreicht, um die Narkose zu verlängern.

Die Schweinerücken wurden dann zunächst mit alkoholhaltigem Desinfektionsmittel (Sterilium) desinfiziert. Anschließend wurden entlang der markierten Kreise acht tief dermale Wunden mit einem Durchmesser von 2,0 cm und einer Tiefe von 0,6 cm gesetzt (Abbildung 11). Der Abstand zwischen den Wunden betrug überall 6,0 cm, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.



**Abbildung 11: Operation der Wunden**

Danach wurden die Wunden mit den verschiedenen Wundauflagen in einer Größe von 5,0 cm x 5,0 cm versorgt. Diese wurden in die Mitte der Wunden gelegt und die Kanten so gefaltet, dass die jeweils spezifische Auflage vollständig in die Wunde eingebracht werden konnte (Abbildung 12 und Abbildung 13). Lediglich die Kontrollwunde blieb unbehandelt. Die weitere Versorgung der Wunden wurde mit den oben beschriebenen Verbandstoffen und Techniken durchgeführt (2.2.6).

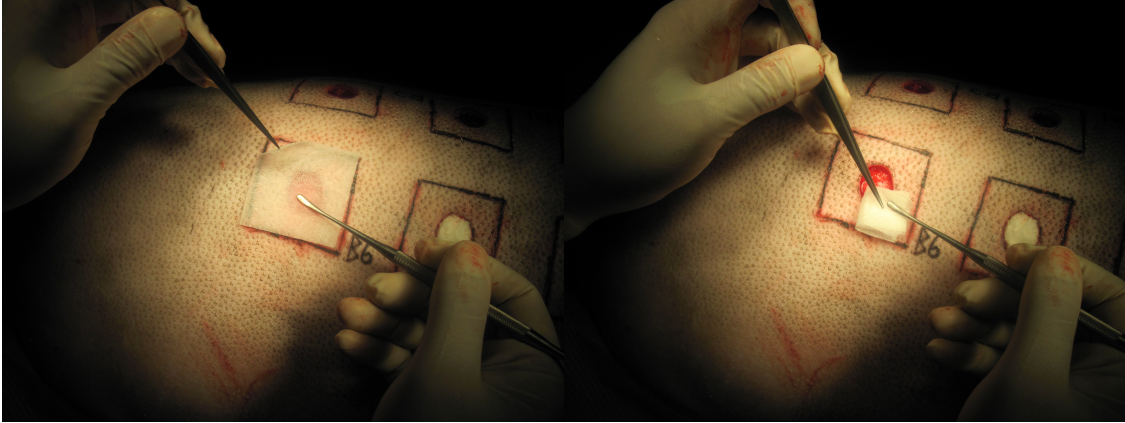


Abbildung 12: Zweimaliges Falten der Wundauflage

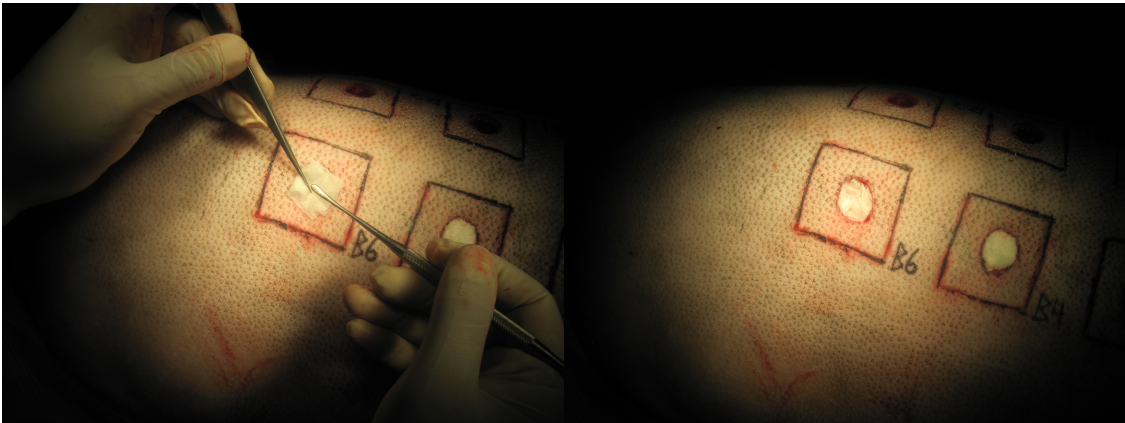


Abbildung 13: Einbringen der Wundauflage in die Wunde

### 2.2.8 Obduktion

In Vorbereitung auf die Obduktion, 21 Tage nach Versuchsbeginn, erhielten alle Minipigs eine Prämedikation wie oben beschrieben. Nach intraösophagealer Temperaturmessung wurde die Narkose mit 15 mg/kg Ketamin i.m., 1 g/kg Thiopental i.v. und 0,1 mg/kg Muskelrelaxans i.v. verabreicht. Schließlich wurden die Tiere durch intravenöse Injektion einer letalen Dosis (40 ml) Kaliumchlorid (14,9 %) eingeschläfert. Danach wurde der Bereich um die Wunde vorsichtig mit Alkohol gereinigt und eine standardisierte Fotodokumentation durchgeführt. Nach dem Herzstillstand wurde das gesamte

Gebiet der anfänglichen Wunde entlang der tätowierten Kreise in einer Dicke von 1,5 cm herausgeschnitten (Abbildung 14).

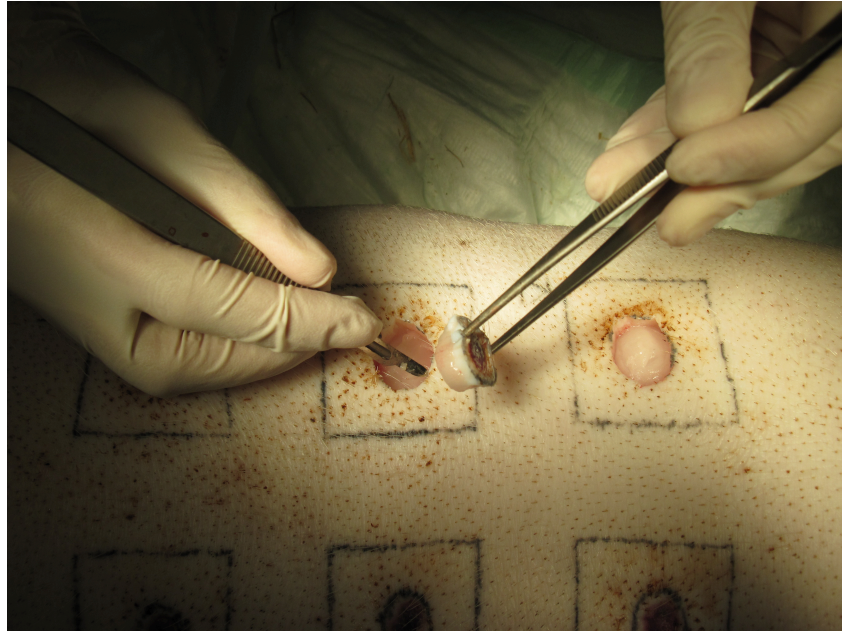


Abbildung 14: Obduktion

### 2.2.9 Analgesie

Postoperativ erhielten alle Tiere eine intramuskuläre Injektion von Meloxicam (Meloxidyl) für eine ausreichende Analgesie sowie einer Kombination aus Penicillin und Streptomycin (Veracin compositum ®) für die Antibiotikabehandlung. Beide Injektionen wurden zwei Tage nach der Operation wiederholt.

### 2.2.10 Applikation und Verbandswechsel

Die Verbände wurden zweimal täglich kontrolliert, um eine schnelle Reaktion im Falle einer Verbandsverschiebung zu gewährleisten. Ein Verbandswechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Hierbei wurden die Tiere in die spezielle Schlinge

gelegt, um die Jacke besser öffnen zu können und den Verband zu wechseln. Im Falle exsudierter Wundflüssigkeit über dem Wundrand wurde die betroffene Wunde mit sterilen Kompressen gereinigt. Während des Verbandwechsels wurde die standardisierte Fotodokumentation für die planimetrische Auswertung durchgeführt. Nach der Dokumentation erhielten die Tiere der Gruppe II (Mehrfachapplikation) erneut die Wundauflage. Um den Prozess der Wundheilung nicht durch mechanische Einwirkung zu beeinflussen, musste die Größe der Wundauflage im Laufe des Versuchszeitraums angepasst werden. Hierbei wurde ab dem 8. postoperativen Tag nur ein Viertel der Wundauflage appliziert (Tabelle 6). Schließlich wurden die Wunden mit kleinen nichtklebenden Folien bedeckt, um eine Verklebung der Wundauflage mit der luftdichten Folie zu vermeiden. Der Verband wurde wie oben beschrieben angelegt (2.2.6).

### **2.2.11 Dokumentation und Auswertung**

#### **2.2.11.1 *Planimetrische Evaluierung***

Für die planimetrische Auswertung wurde alle zwei Tage während des Verbandwechsels über allen Wunden eine standardisierte Fotodokumentation mit einer Canon Powershot A650 durchgeführt. Dabei wurde die Kamera auf einem speziell angefertigten Stativ fixiert, um die Konstanz von Distanz (12 cm) und Winkel zur Wundoberfläche zu gewährleisten (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Stativ für die standardisierte Fotodokumentation**

Anhand der Fotos wurde mithilfe der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop der prozentuale Wundverschluss ermittelt. Hierzu wurde bei jedem Foto der Wundrand sowie die äußere quadratische Markierung ausgewählt und die Fläche berechnet. Die Wundfläche wurde durch die Fläche des standardisierten Quadrats geteilt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedliche Stellungen der Schweine zu minimieren. Der prozentuale Wundverschluss wurde dann in Bezug auf die anfängliche Wundgröße berechnet. Darüber hinaus wurde der Tag des vollständigen Wundverschlusses individuell für jede Wunde an Hand der Fotos bestimmt. Als Kriterium für den Wundverschluss wurde die neugebildete Epitheldecke definiert (Fu, Fang et al. 2007).

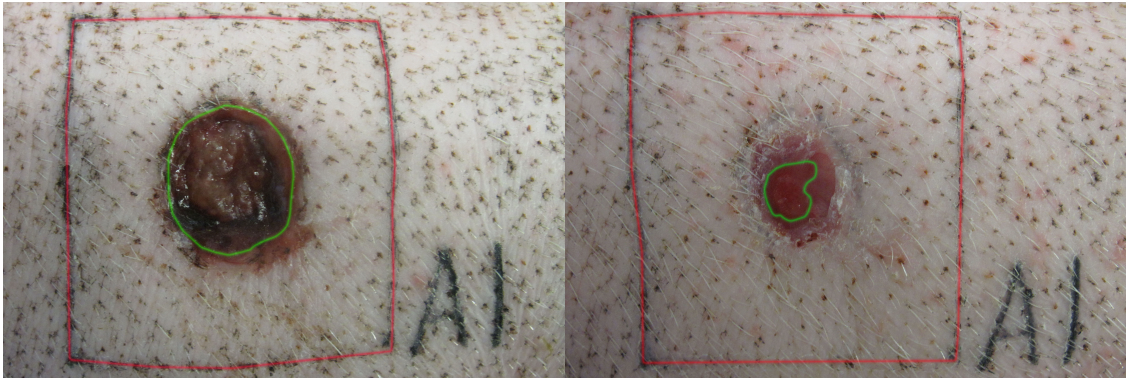


Abbildung 16: Beispiel für die planimetrische Auswertung des prozentualen Wundverschlusses. Grün: Nicht-epithelialisierter Wundbereich; Rot: Äußeres tätowiertes Quadrat

### 2.2.11.2 Histologie

#### **Verarbeitung und Einbettung:**

Alle Proben wurden vorübergehend in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) anschließend in 4% gepuffertem Paraformaldehyd für 48 Stunden bei 4 °C, und schließlich für die Standard-Hämatoxylin-Eosin-Färbung und lichtmikroskopische Auswertung verarbeitet. Während des Prozesses wurden alle Proben durch abgestufte Ethanolbäder zur Entwässerung übertragen, mit Xylol gelöscht und mit Paraffin infiltriert.

Im Detail durchlief jede Probe folgende Dehydrierungsbäder:

- 1) 70 % Ethanol für 30 Minuten
- 2) 70 % Ethanol für 30 Minuten
- 3) 96 % Ethanol für 30 Minuten
- 4) 96 % Ethanol für 30 Minuten
- 5) 100 % Ethanol für 30 Minuten
- 6) 100 % Ethanol für 30 Minuten
- 7) 100 % Ethanol für 60 Minuten
- 8) Erste Clearingstelle (Xylol) für 60 Minuten
- 9) Zweite Clearingstelle (Xylol) für 120 Minuten
- 10)Wachs (Paraffin) bei 60 °C für 60 Minuten
- 11)Wachs (Paraffin) bei 60 °C für 120 Minuten

Danach wurden die Proben einzeln in kleinen Wachs-Blöcken eingebettet.

### ***Mikrotomie und Paraffinschnitt-Herstellung:***

Vor dem Schneiden wurden die Wachsblöcke mit den Proben eingefroren. Danach wurden sie in das Mikrotom eingesetzt. Zum Schneiden der Proben wurde das Zifferblatt des Mikrotoms zuerst auf 20 µm eingestellt, um den Block eben zuzuschneiden, dann auf 5 µm, um zwei vertikale Gewebeschnitte zu erhalten. Anschließend wurden alle Schnitte auf der Oberfläche von einem 56 °C-Wasserbad floriert, um das Bilden von Falten zu verhindern. Schließlich wurden die Schnitte auf Objektträger und Gewebe-gerahmte Dias montiert und 12 Stunden bei 37 °C getrocknet.

### ***Hämatoxylin und Eosin Färbung:***

Für die Routine-Hämatoxylin- und -Eosin-Färbung waren die warmen Abschnitte entparaffiniert und rehydriert. Sie wurden für 3 Minuten in Mayers Hämaunlösung eingelegt und dann für 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser und anschließend in Eosin-Lösung gespült. Weiter wurden die gefärbten Schnitte wieder für 30 Sekunden unter fließendem Leitungswasser gespült, dann in Ethanolbädern mit zunehmender Konzentration dehydriert und in Xylol geklärt. Vor dem Abkühlen wurden die warmen Objektträger mit Deckgläsern mit Eindeckmedium versiegelt.

### ***Histologische Beurteilung:***

Die histologischen Schnitte wurden mit Hilfe eines Zeiss-Mikroskops (Axio Observer.Z1), einer Mikroskop-Kamera (AxioCam ERc 5s) und Mikroskopie-Software (ZEN blue edition, 2011) ausgewertet. Hierbei wurden die epidermale Dicke und die Gesamtmenge von Epidermiszellen aller Hämatoxylin- und Eosin-gefärbten Objektträger bewertet. Die Epidermisdicke wurde vom Stratum basale bis zur Hornschicht an drei Punkten mit gleichem Abstand auf jedem Schieber (Abbildung 17) gemessen, und die mittlere Dicke der Epidermis bestimmt. Die Epidermiszellen wurden in einem Abschnitt von 100 µm Breite in der gesamten epidermalen Höhe (Abbildung 18) gezählt.

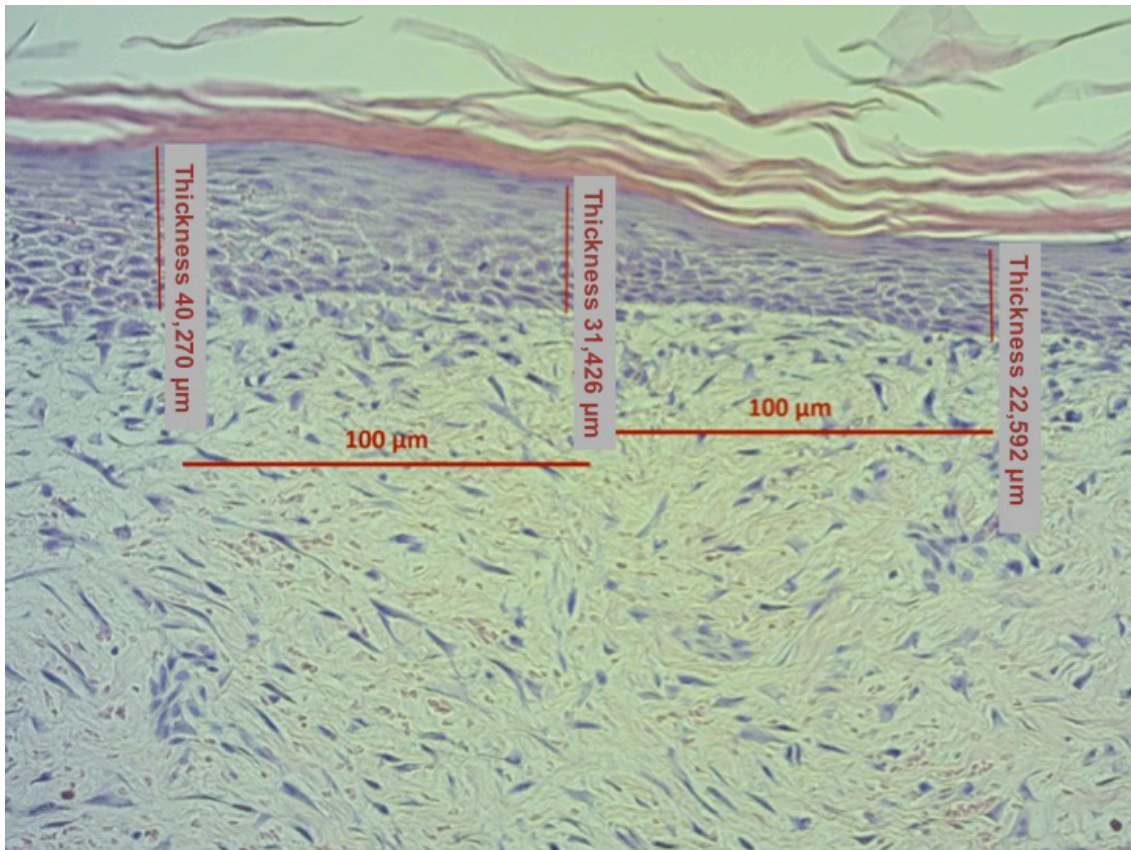


Abbildung 17: Messung der Epidermisdicke

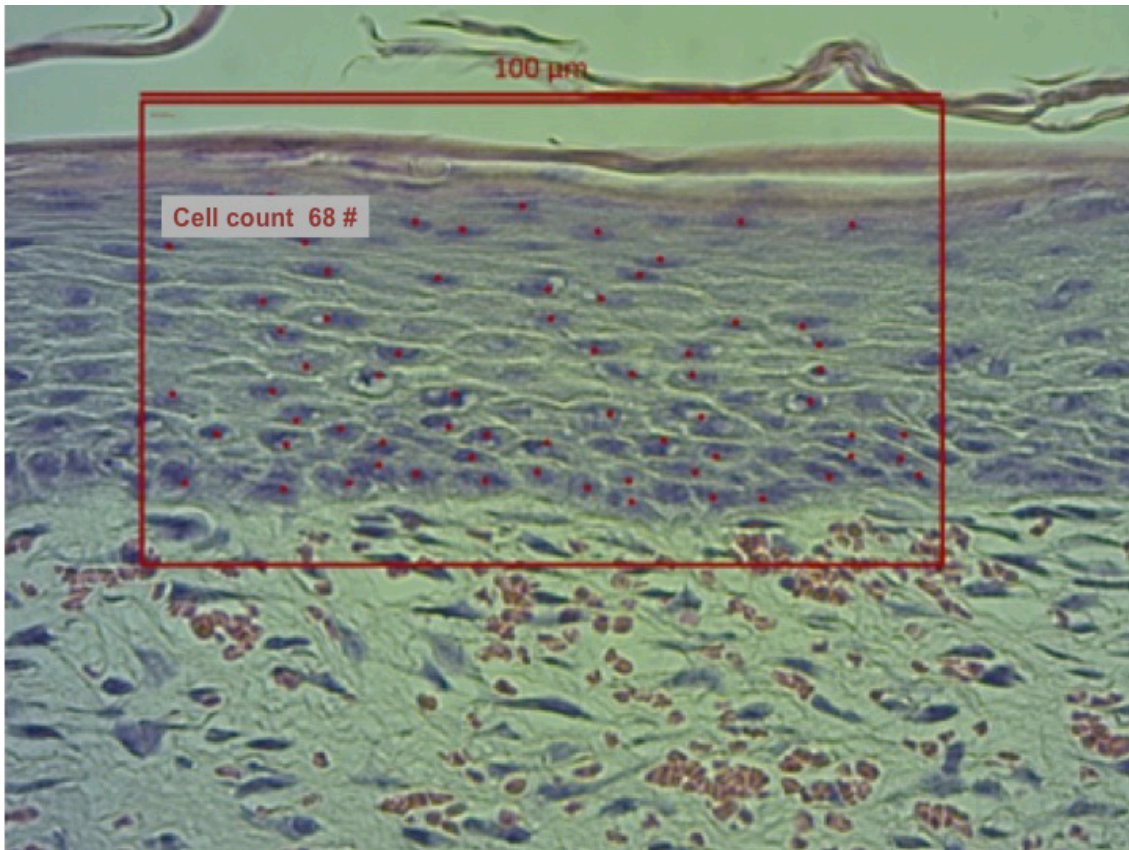


Abbildung 18: Berechnung der Epidermiszellzahl

### 2.2.12 Datenerfassung und statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programmsystem SPSS, Version 14. Von den stetig messbaren Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Daten wurden auf Normalverteilung überprüft, eine Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend ein Post-Hoc-Test (Scheffé-Test) durchgeführt. In den Tabellen sind, soweit nicht anders angegeben, der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und die Anzahl der Werte (n) aufgeführt. Um Gruppenunterschiede bei den stetigen Variablen herauszufinden, wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  wurde als Signifikanzniveau festgelegt. Die graphische Darstellung erfolgte durch Linien- und Balkendiagramme. Die einzelnen Mittelwerte der Versuchstiere einer Gruppe wurden durch verschiedene Symbole und Farben dargestellt. Die

statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte nach Beratung durch das Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen.

### 3 Ergebnisse

Alle zwölf Minischweine erhielten paravertebral acht tief dermale Wunden, wobei lediglich fünf dieser Wunden für die vorliegende Studie verwendet wurden. Eine der fünf Wunden blieb für die Kontrollgruppe unbehandelt, die anderen vier erhielten eine Wundauflage mit GDF-5 in verschiedenen Konzentrationen. Für die Untersuchung wurden zwei Gruppen mit jeweils sechs Schweinen gebildet: Während die Minipigs der ersten Gruppe eine einmalige Applikation der Wundauflage bei der Operation erhielten, wurde die Wundauflage bei den Minipigs der zweiten Gruppe jeden zweiten Tag neu appliziert (Tabelle 6). Durch Randomisierung der Wundauflagen wurde versucht, einen systematischen Fehler zu vermeiden.

#### 3.1 Planimetrie

Für die planimetrische Auswertung erfolgte im Rahmen des Verbandwechsels alle zwei Tage eine standardisierte Fotodokumentation, um den prozentualen Wundverschlussverlauf sowie die Wundverschlusszeiten zu evaluieren.

##### 3.1.1 Wundverschlusszeiten

Die Auswertung der standardisierten Fotos zeigte bei der Kontrollgruppe im Durchschnitt einen kompletten Wundverschluss nach 13,5 (SD 1,19) Tagen. Alle Wunden dieser Gruppe wiesen innerhalb von 12 bis 16 Tagen postoperativ eine mit Neoepidermis verschlossene Oberfläche auf. Verglichen mit der Kontrollgruppe erreichten die mit GDF-5 behandelten Wunden einen schnelleren Wundverschluss innerhalb von 10 bis 14 Tagen postoperativ. Die Einfachapplikation führte im Vergleich zur Kontrollgruppe insgesamt zu einer Beschleunigung der Wundverschlussdauer um 1,0 Tage. Wunden dieser Gruppe waren nach 12,5 (SD 1,19) Tagen postoperativ verschlossen. Die besten Ergebnisse lieferten die Wunden mit Mehrfachapplikation von GDF-5. Mit einer durchschnittlichen Verschlusszeit von 10,9 (SD 1,0) Tagen postoperativ zeigen diese eine signifikante Verbesserung von 2,6 Tagen gegenüber der Kontrollgruppe beziehungsweise von 1,6 Tagen gegenüber der

## Ergebnisse

Einfachapplikationsgruppe. In Tabelle 8 sind alle Wundverschlusszeiten einzelner Wunden aufgelistet.

Wunde:		Tier 1 - 6					Mittelwert	SD	
unbehandelt		14	14	12	14	12	14	13,5	1,19
		12	12	16	14	14	14		
Mehrfachapplikation:	100 ng GDF-5	10	12	12	12	10	12	11,3	0,94
	500 ng GDF-5	10	10	10	12	10	10	10,3	0,75
	1000 ng GDF-5	12	10	10	12	10	10	10,7	0,94
	5000 ng GDF-5	12	12	10	12	10	12	11,3	0,94
	GDF-5								10,9
Einfachapplikation:	100 ng GDF-5	12	10	14	12	12	14	12,3	1,37
	500 ng GDF-5	12	14	12	14	12	12	12,7	0,94
	1000 ng GDF-5	12	12	10	12	14	14	12,3	1,37
	5000 ng GDF-5	14	12	14	12	12	12	12,7	0,94
	GDF-5								12,5

**Tabelle 8: Wundverschlusszeiten**

## 3.1.1.1 Einfachapplikation

In der Gruppe der Einfachapplikation zeigten die mit 100 ng GDF-5 und 1000 ng GDF-5 behandelten Wunden leicht bessere Ergebnisse im Vergleich zu den mit anderen Präparaten behandelten Wunden dieser Gruppe. Sie waren mit 12,3 (SD 1,37) Tagen postoperativ um 1,2 Tage früher verschlossen als die der Kontrollgruppe mit 13,5 (SD 1,19) Tagen. Weiter konnte durch Einfachapplikation der oben genannten Konzentrationen bei jeweils einer von sechs Wunden bereits nach 10 Tagen postoperativ ein Wundverschluss erzielt werden.

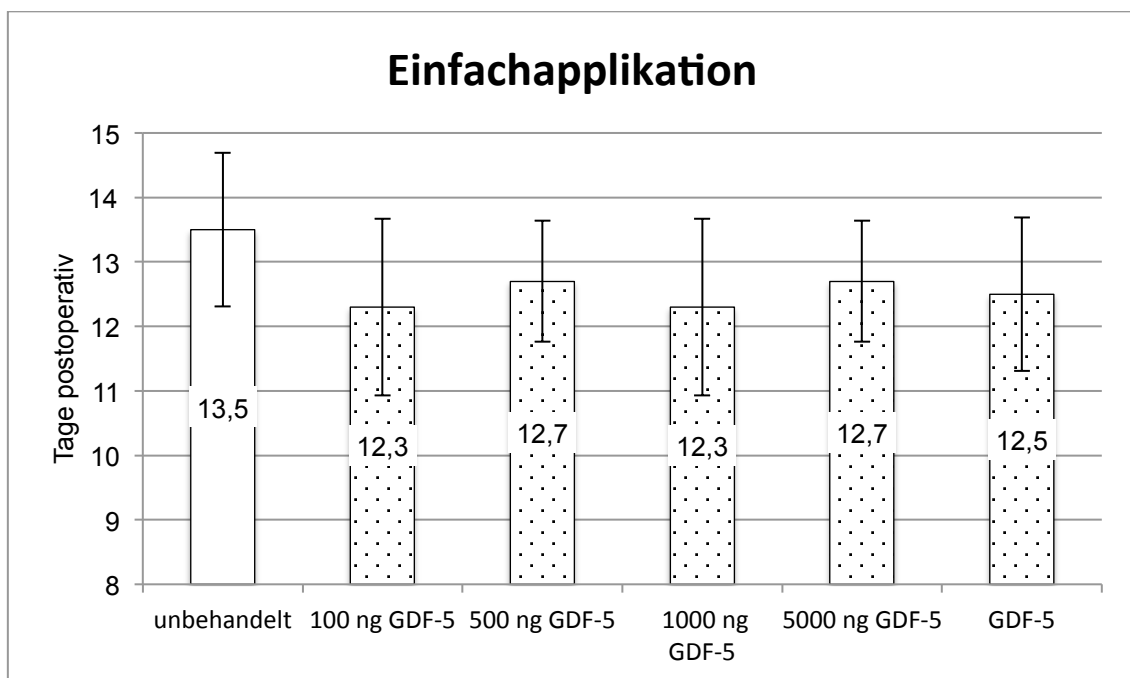


Abbildung 19: Wundverschlusszeiten Einfachapplikation vs. Kontrollgruppe

## 3.1.1.2 Mehrfachapplikation

In der Gruppe der Mehrfachapplikation von GDF-5 konnten mit einem durchschnittlichen Wundverschluss nach 10,9 (SD 1,0) Tagen postoperativ signifikante Ergebnisse erzielt werden. Die mit 500 ng GDF-5 behandelten Wunden erreichten mit 10,3 (SD 0,75) Tagen postoperativ einen um 3,2 Tage schnelleren Verschluss der Epitheldecke verglichen mit der Kontrollgruppe mit 13,5 (SD 1,19) Tagen. Bereits nach 10 Tagen waren fünf der sechs Wunden verschlossen, in der Kontrollgruppe dagegen waren die Wunden erst ab dem 12. Tag verschlossen. Die zweitbesten Ergebnisse zeigten die Wunden mit Mehrfachapplikation von 1000 ng GDF-5. Mit 10,7 (SD 0,94) Tagen postoperativ waren diese Wunden um 2,9 Tage früher verschlossen als die der Kontrollgruppe.

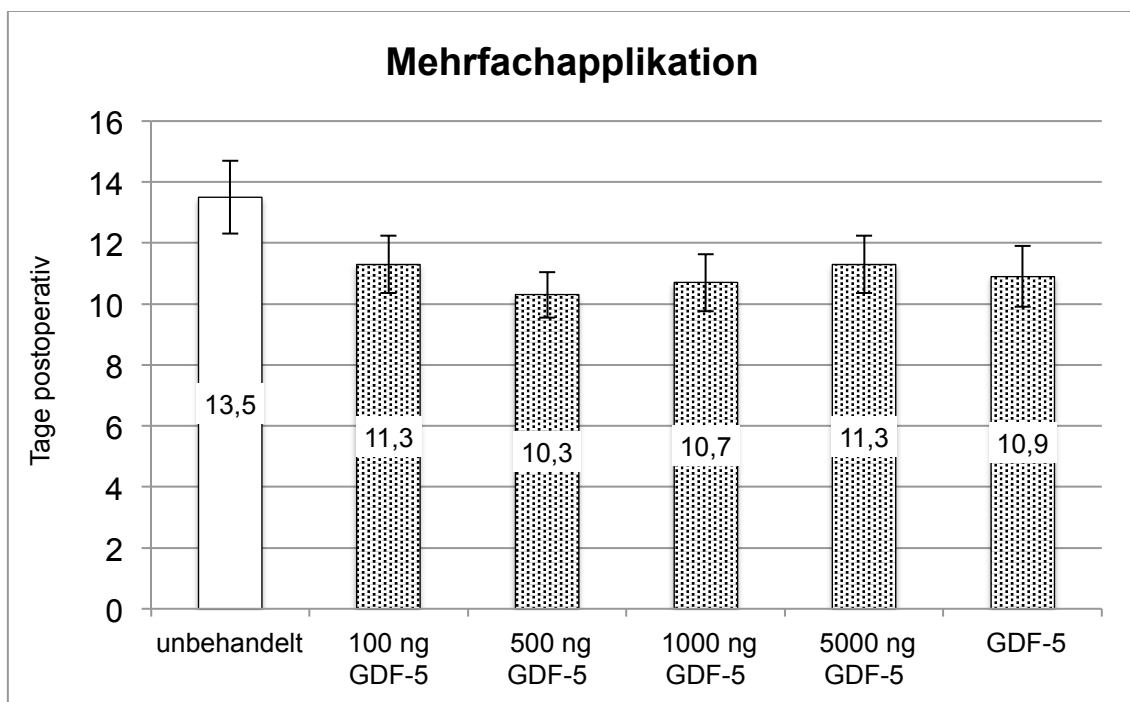


Abbildung 20: Wundverschlusszeiten Mehrfachapplikation vs. Kontrollgruppe

### 3.1.1.3 Einfachapplikation vs. Mehrfachapplikation

Die Wunden mit Mehrfachapplikation von GDF-5 zeigten einen schnelleren Heilungsverlauf als die mit Einfachapplikation. Mit 10,9 (SD 1,0) Tagen postoperativ (Mehrfachapplikation) verglichen mit 12,5 (SD 1,19) Tagen postoperativ (Einfachapplikation) ließen diese Wunden eine Verbesserung der Wundverschlussdauer um 1,6 Tage beobachten. Besonders deutlich war der Unterschied bei dem Präparat 500 ng GDF-5. Hier war mit 2,4 Tagen Unterschied eine signifikante Verbesserung der Wundverschlussdauer bei Mehrfachapplikation im Vergleich zur Einfachapplikation zu erkennen. Im Gegensatz dazu konnte bei dem Präparat mit der niedrigsten GDF-5-Konzentration von 100 ng durch die Mehrfachapplikation nur ein geringerer Unterschied von 1,0 Tagen erreicht werden. Auch bei den mit hoher Konzentration von GDF-5 behandelten Wunden (1000 ng GDF-5 bzw. 5000 ng GDF-5) war durch die Mehrfachapplikation verglichen mit der Einfachapplikation eine Verbesserung der Wundverschlussdauer um 1,6 beziehungsweise 1,4 Tage zu beobachten.

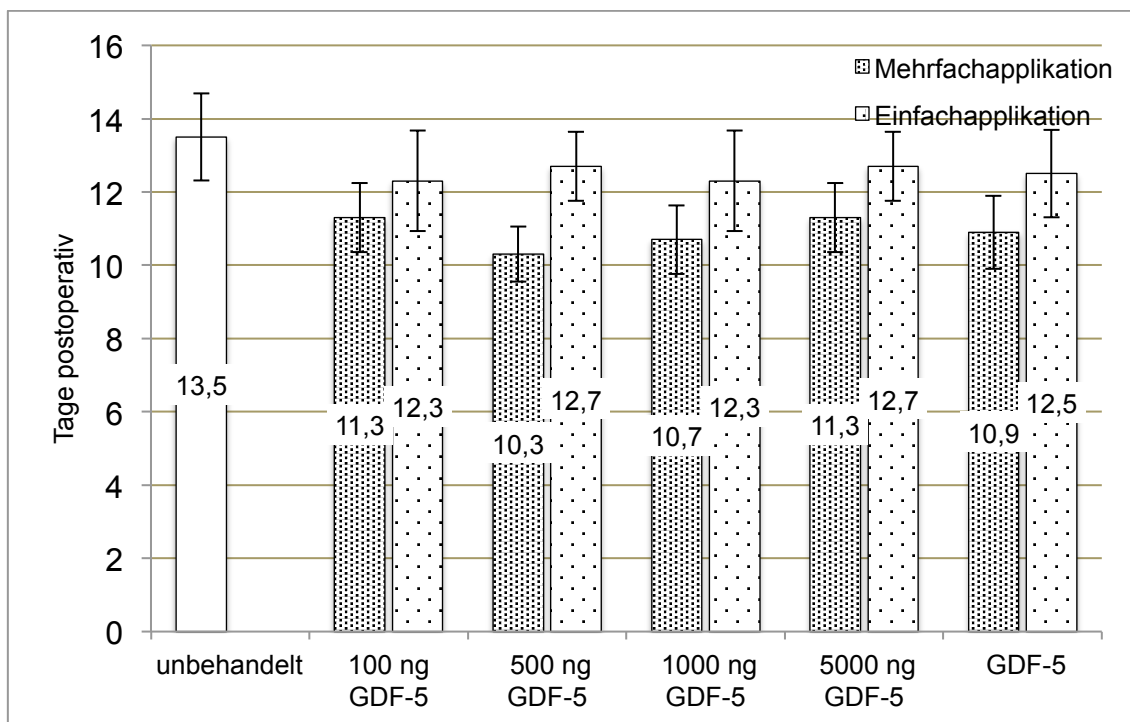


Abbildung 21: Wundverschlusszeiten Einfach- vs. Mehrfachapplikation

## 3.1.2 Prozentualer Wundverschlussverlauf

Weiterhin wurde bei allen Wunden der Verlauf der Wundheilung prozentual zur anfänglichen Wundgröße berechnet. (Tabelle 10 und Tabelle 11)

Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigte sich bei den mit GDF-5 behandelten Gruppen eine Beschleunigung der Wundheilung ab dem 8. postoperativen Tag. Während sich bis dahin postoperativ ein minimal verzögerter Wundverschluss beobachten ließ, war nach diesem Zeitpunkt eine deutliche Beschleunigung erkennbar. Insgesamt waren die Wunden der mit GDF-5 behandelten Gruppen schneller verschlossen als die der Kontrollgruppe. Dieses Verhalten war insbesondere bei Mehrfachapplikation von GDF-5 zu beobachten.

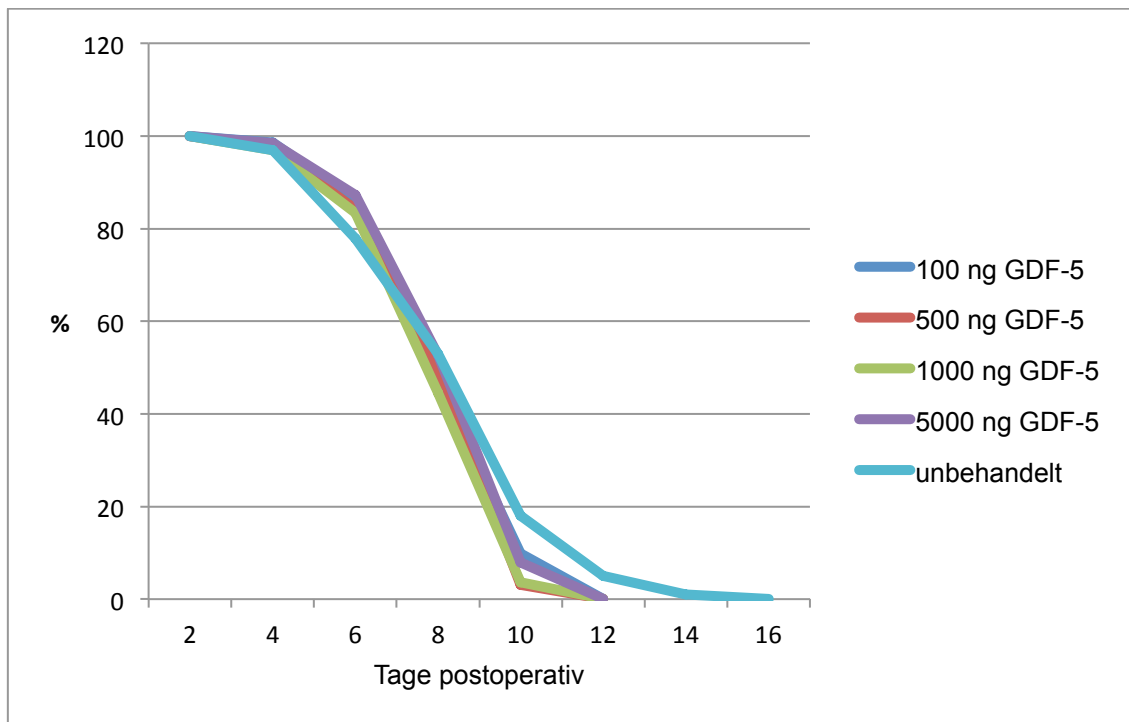


Abbildung 22: Prozentualer Verlauf der Wundheilung, Mehrfachapplikation

Tage postop.	unbehandelt											Mittelwert	
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	97,06	96,84	97,11	98,44	99,48	98,91	99,19	100,05	96,29	99,84	93,91	86,84	97
6	77,05	65,688	78,63	87,68	83,04	74,26	71,07		89,09	90,5	65,53	74,83	77,9
8	46,93	34,36	59,78	56,85	48,09	58,58	44,24	56,73	57,94	60,05	38,94	69,01	52,6
10	14,17	2,7	23,09	31,38	9,27	14,58	17,35	27,79	25,95	18,16	7,32	17,29	17,4
12	0	0	15,38	6,72	3,96	2,45	6,31	7,95	0	8,89	0	4,99	4,7
14	0	0	8,77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,7
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 9: Prozentualer Verlauf der Wundheilung, Kontrollgruppe. Werte: prozentuale Angabe Restdefekt

## Ergebnisse

Tage postoperativ	100 ng GDF-5						Mittelwert
2	100	100	100	100	100	100	100
4	89,04	95,2	99,31	97,73	99,55	100,02	96,81
6	70,54	71,31	96,95	95,32		96,2	86,06
8	23,27	1,43	53,68	71,63	39,91	71,61	43,59
10	7,53	0	27	28,85	13,38	52,93	21,62
12	0	0	9,2	0	0	16,79	4,33
14	0	0	0	0	0	0	0
Tage postoperativ	500 ng GDF-5						Mittelwert
2	100	100	100	100	100	100	100
4	99,39	97,52	90,96	99,74	101,03		97,73
6	85,99		79,89		86,8	68,24	80,23
8	40,08	34,46	46,93	52,22	52,54	32,5	43,12
10	12,65	8,11	18,92	29,31	9,48	8,39	14,48
12	0	3,25	0	0	0	0	0,54
14	0	0	0	0	0	0	0
Tage postoperativ	1000 ng GDF-5						Mittelwert
2	100	100	100	100	100	100	100
4	87,01	96,32	98,73	96,48	98,66		95,44
6		60,86	76,4		86,51	75,53	74,83
8	32,21	38,25	26,68	63,84	50,3	35,43	41,12
10	16,92	10,54	0	25,34	13,85	12,47	13,19
12	0	0	0	9,59	2,16	0	1,96
14	0	0	0	0	0	0	0
Tage postoperativ	5000 ng GDF-5						Mittelwert
2	100	100	100	100	100	100	100
4	100,36	89,63	94,81	98,21	99,72	99,73	97,08
6	98,62	70,74	86,39	83,79	85,96		85,1
8	62,14	34,94	51,09	67,83	43,23	53,6	52,14
10	40,64	9,32	22,61	21,01	25,61	17,63	22,8
12	13,45	0	13	0	0	0	4,41
14	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 10: Prozentualer Verlauf der Wundheilung, Einmalapplikation. Werte: prozentuale Angabe Restdefekt

## Ergebnisse

Tage postoperativ	100 ng GDF-5						Mittelwert
2	100	100	100	100	100	100	100
4	100,69	99,67	96,46	101,02	99,78	93,79	98,6
6	81,87	84,25		96,6	85,65	82,8	86,2
8	49,57	58,56	60,16	30,96	32,64	53,05	47,5
10	0	21,93	11,65	13,28	0	11,98	9,8
12	0	0	0	0	0	0	0
Tage postoperativ	500 ng GDF-5						Mittelwert
2	100	100	100	100	100	100	100
4	99,32	99,92	93,18	99,69	98,02	93,07	97,2
6	84,34	83,71	87,65	89,11	87,55	72,74	84,2
8	61,4	43,33	53,38	59,84	48,76	27,53	49
10	0	0	0	18,41	0	0	3,1
12	0	0	0	0	0	0	0
Tage postoperativ	1000 ng GDF-5						Mittelwert
2	100	100	100	100	100	100	100
4	98,89	83,92	101,03	100,03	98,83	99,08	97
6	89,12	63,76	85,93	87,25	84,47	89,77	83,4
8	51,93	22,62	50,83	62,33	30,53	49,26	44,6
10	10,95	0	0	11,1	0	0	3,7
12	0	0	0	0	0	0	0
Tage postoperativ	5000 ng GDF-5						Mittelwert
2	100	100	100	100	100	100	100
4	97,88	99,84	95,67	100,47	99,52	97,58	98,5
6	87,68	85,98		87,68	88,75	85,72	87,2
8	53,87	63,78	45,9	62,55	37,596	52,35	52,7
10	9,43	16,88	0	12,82	0	8,411	7,9
12	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 11: Prozentualer Verlauf der Wundheilung, Mehrfachapplikation. Werte: prozentuale Angabe Restdefekt

### 3.2 Histologie

#### 3.2.1 Epidermisdicke

Die histologische Auswertung zeigte bei allen mit GDF-5 behandelten Wunden eine statistisch signifikante Erhöhung der durchschnittlichen Epidermisdicken verglichen mit der Kontrollgruppe, bei der diese 21,49 µm betrug.

Wunde	Einfachapplikation					
	unbehandelt	100 ng GDF-5	500 ng GDF-5	1000 ng GDF-5	5000 ng GDF-5	GDF-5
Epidermisdicke in µm	12,52	16,71	21,65	20,13	16,2	
	12,77	19,39	24,41	24,49	19,64	
	13,52	19,42	24,79	25,3	22,83	
	15,97	21,71	24,8	26,51	29,75	
	16,94	23,83	26,31	29,28	36,09	
	17,68	23,86	26,73	29,63	36,34	
	18,18	25,31	26,8	36,33	42,47	
	20,62	26,02	30,44	39,28	42,8	
	22,36	26,03	30,69	41	45,11	
	22,63	27,98	37,33	48,93	45,67	
	23,57	28,71	37,56	49,94	46,67	
	25,77	28,76	40,26	50,61	54,46	
	26,03	58,45	40,47	51,34	57,44	
	27,75	64,39	45,45	59,04	60,26	
	28,44	64,85	45,67	63,4	76,44	
	34,88		46,75	70,46		
	37,61		48,12	71,22		
39,57		57,2	76,35			
Mittelwert	21,23	31,69	35,30	45,18	42,14	38,73
SD	6,17	15,85	10,12	17,23	15,72	15,83
P		0,02	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Statistische Signifikanz		+	++	++	++	++

Tabelle 12: Epidermisdicke, Einfachapplikation

## Ergebnisse

Wunde	Mehrfachapplikation					
	unbehandelt	100 ng GDF-5	500 ng GDF-5	1000 ng GDF-5	5000 ng GDF-5	GDF-5
Epidermisdicke in $\mu\text{m}$	12,52	32,54	27,75	40,37	21,6	
	12,77	33,54	33,14	40,89	28,77	
	13,52	34,63	40,02	48,13	31,42	
	15,97	39,81	41,5	49,34	31,42	
	16,94	40,03	49,19	53,6	31,91	
	17,68	40,72	51,34	53,76	33,14	
	18,18	41,59	59,2	56,91	35,19	
	20,62	42,59	60,92	57,47	43,94	
	22,36	44,77	61,29	58,92	48,13	
	22,63	52,16	62,14	63,62	48,13	
	23,57	54,08	62,49	64,47	48,13	
	25,77	57,21	67,26	66,04	54,02	
	26,03	57,45	68,25	67,02	55,25	
	27,75	58,75	68,3	67,81	57,04	
	28,44	58,8	76,84	70,38	58,94	
	34,88	59,48	77,23	70,96	58,97	
37,61	63,59	81,21	70,96	65,57		
39,57	100,91	98,4	72,23	68,06		
Mittelwert	21,23 €	50,70 €	60,36 €	59,60 €	45,54 €	54,05 €
SD	6,17 €	15,63 €	17,32 €	9,93 €	13,52 €	15,65 €
P		<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Statistische Signifikanz		++	++	++	++	++

**Tabelle 13: Epidermisdicke, Mehrfachapplikation**

## 3.2.1.1 Einfachapplikation

In der Gruppe der GDF-5 Einfachapplikation wiesen die mit dem Präparat 1000 ng GDF-5 behandelten Wunden mit 44,97  $\mu\text{m}$  die dickste Epidermis auf. Somit erreichten diese Wunden eine signifikante Erhöhung der Epidermisdicke um 23,48  $\mu\text{m}$  verglichen mit der Kontrollgruppe (21,49  $\mu\text{m}$ ). Die geringste Verbesserung verglichen mit der Kontrollgruppe erzielten die mit 100 ng GDF-5 behandelten Wunden in der Gruppe der Einfachapplikation mit einer signifikanten Erhöhung von 10,46  $\mu\text{m}$ .

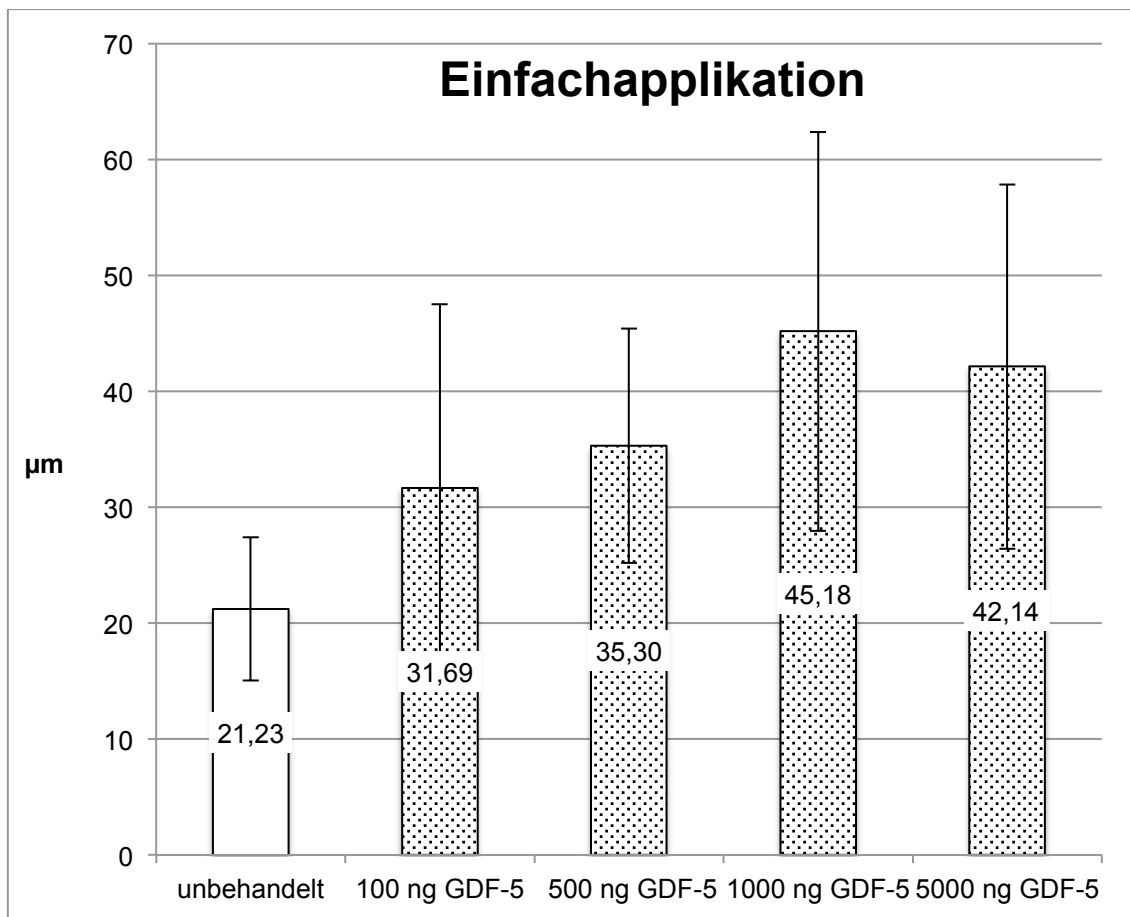


Abbildung 23: Epidermisdicke, Einfachapplikation vs. Kontrollgruppe

## 3.2.1.2 Mehrfachapplikation

In der Gruppe der GDF-5 Mehrfachapplikation zeigten die Wunden mit den Präparaten 500 ng GDF-5 (61,72  $\mu\text{m}$ ) und 1000 ng GDF-5 (61,27  $\mu\text{m}$ ) die höchsten Werte. Die Epidermis dieser Wunden erreichte im Vergleich zur Kontrollgruppe (21,49  $\mu\text{m}$ ) eine um etwa 40  $\mu\text{m}$  signifikant erhöhte Epidermisdicke. Die mit 100 ng GDF-5 (48,47  $\mu\text{m}$ ) und 5000 ng GDF-5 (48,13  $\mu\text{m}$ ) behandelten Wunden zeigten verglichen mit der Kontrollgruppe eine Erhöhung um circa 27  $\mu\text{m}$ .

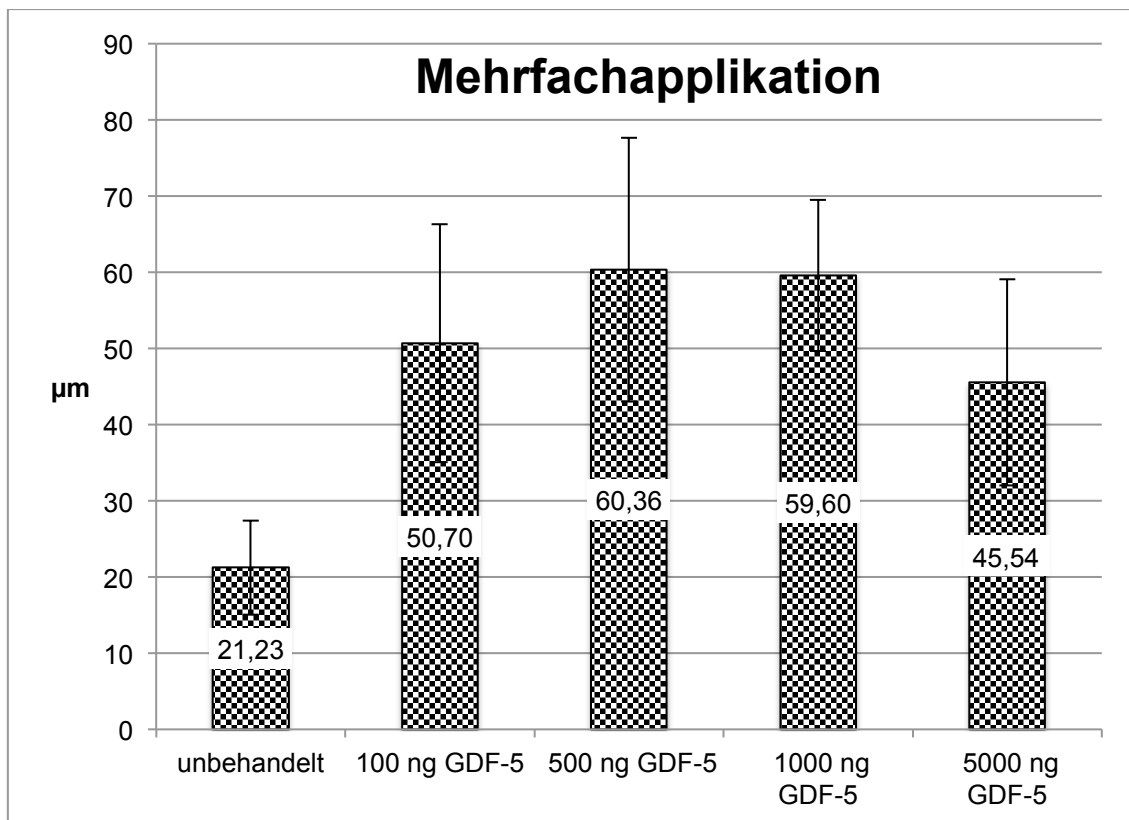


Abbildung 24: Epidermisdicke, Mehrfachapplikation vs. Kontrollgruppe

### 3.2.1.3 Einfachapplikation vs. Mehrfachapplikation:

Der Vergleich beider Gruppen (Einfach- und Mehrfachapplikation) miteinander ließ erkennen, dass die Epidermisdicke bei allen Präparaten im Rahmen der Mehrfachapplikation gestiegen ist.

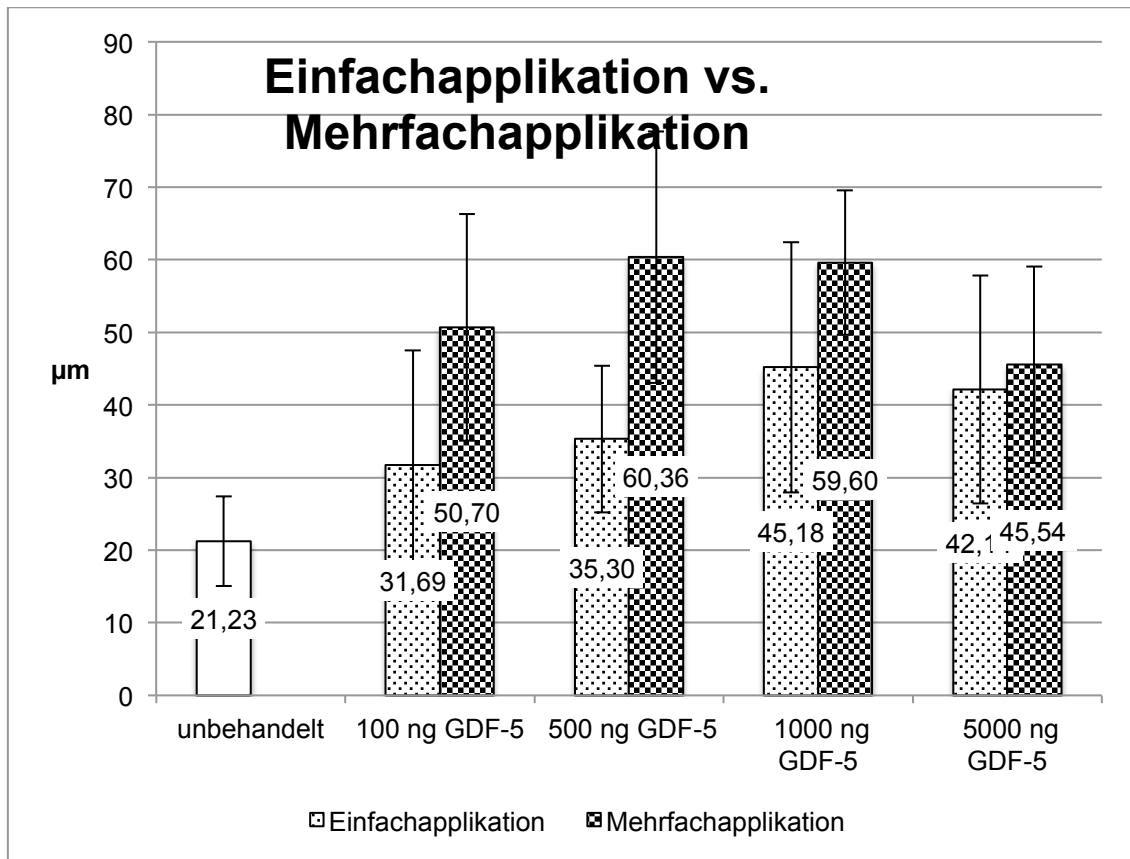


Abbildung 25: Epidermisdicke, Einfach- vs. Mehrfachapplikation

## Ergebnisse

### 3.2.2 Epidermiszellzahl

Die Anzahl der Zellen der Epidermis auf 100 µm ist bei allen mit GDF-5 behandelten Wunden verglichen mit der Kontrollgruppe gestiegen.

	Einfachapplikation					
Wunden	unbehandelt	100 ng GDF-5	500 ng GDF-5	1000 ng GDF-5	5000 ng GDF-5	GDF-5
Epidermiszellzahl	68		63	69	64	
	48	46	84	70	45	
	22	47	33	54	68	
	47	42	45	76	58	
	28	35	60	64	69	
	35	98	117	89		
Mittelwert	41,33	53,60	67,00	70,33	60,80	63,45
SD	15,16	22,60	27,37	10,72	8,80	20,23
P		0,36	0,096	0,006	0,047	0,024
Statistische Signifikanz		-	-	+	+	+

Tabelle 14: Epidermiszellzahl, Einfachapplikation

	Mehrfachapplikation					
Wunde	Unbehandelt	100 ng GDF-5	500 ng GDF-5	1000 ng GDF-5	5000 ng GDF-5	GDF-5
Epidermiszellzahl	68	57	38	91	73	
	48	79	99	61	92	
	22	109	55	94	38	
	47	154	135	104	110	
	28	55	88	83	72	
	35	102	103	62	48	
Mittelwert	41,33	92,67	86,33	82,50	72,17	83,42
SD	15,16	34,14	31,96	16,07	24,42	28,56
p		0,012	0,017	0,002	0,037	0,002
Statistische Signifikanz		+	+	++	+	++

Tabelle 15: Epidermiszellzahl, Mehrfachapplikation

## 3.2.2.1 Einfachapplikation:

In der Gruppe der Einfachapplikation zeigten die mit den Präparaten 100 ng GDF-5 (46) und 500 ng GDF-5 (61,5) behandelten Wunden verglichen mit der Kontrollgruppe (41) leicht erhöhte Zellzahlen. Die mit hohen Konzentrationen von GDF-5 behandelten Wunden (1000 ng GDF-5 (69,5) und 5000 ng GDF-5 (64)) ließen eine statistisch signifikante Erhöhung der Zellzahlen erkennen.

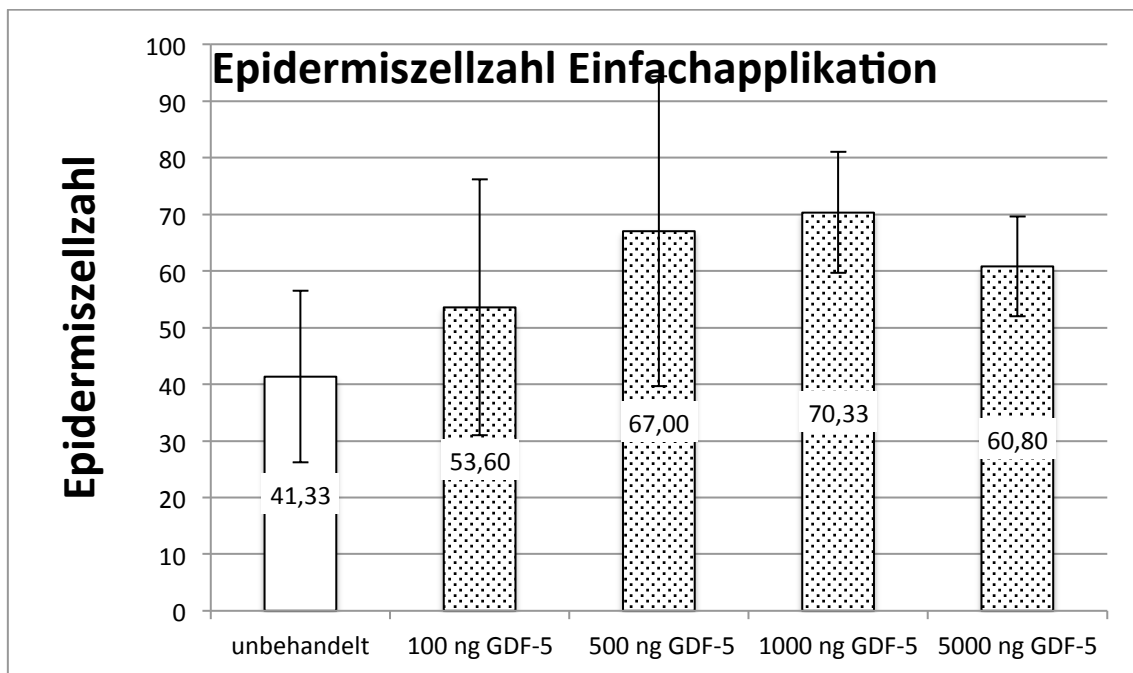


Abbildung 26: Epidermiszellzahl, Einfachapplikation vs. Kontrollgruppe

## 3.2.2.2 Mehrfachapplikation:

In der Gruppe der Mehrfachapplikation von GDF-5 zeigten alle behandelten Wunden verglichen mit der Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Steigerung der Epidermiszellzahl. Die mit 500 ng GDF-5 mehrfach behandelten Wunden erreichten mit 93,5 insgesamt die besten Ergebnisse.

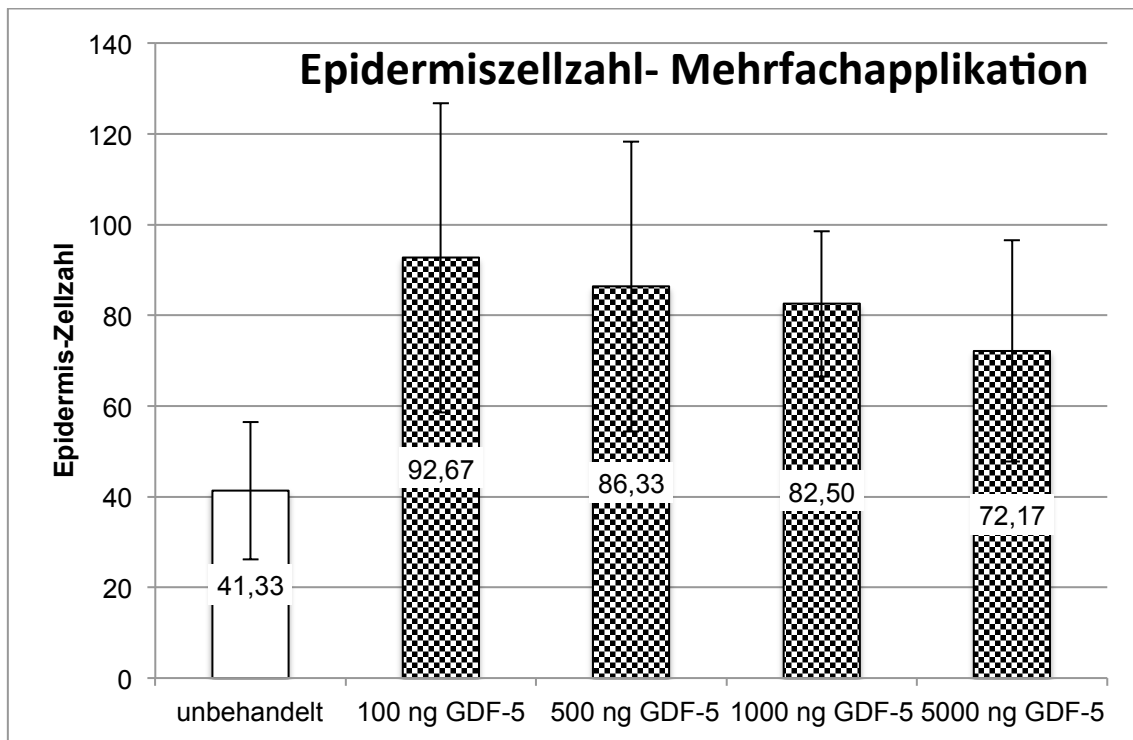


Abbildung 27: Epidermiszellzahl, Mehrfachapplikation vs. Kontrollgruppe

### 3.2.2.3 Einfach- vs. Mehrfachapplikation

Weiterhin war bei allen Präparaten ein Anstieg der Zellzahl durch Mehrfachapplikation von GDF-5 im Vergleich zur Einfachapplikation zu beobachten.

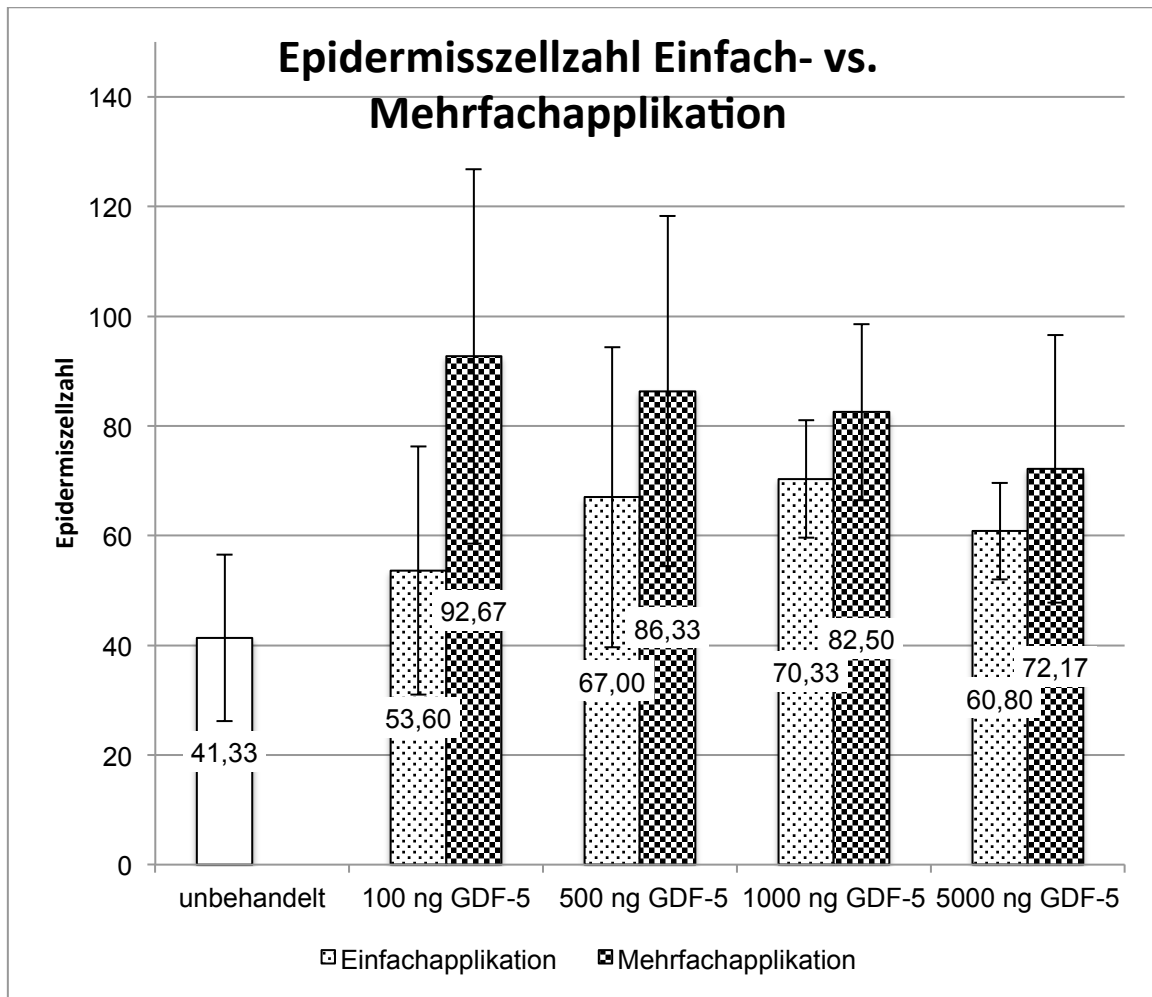


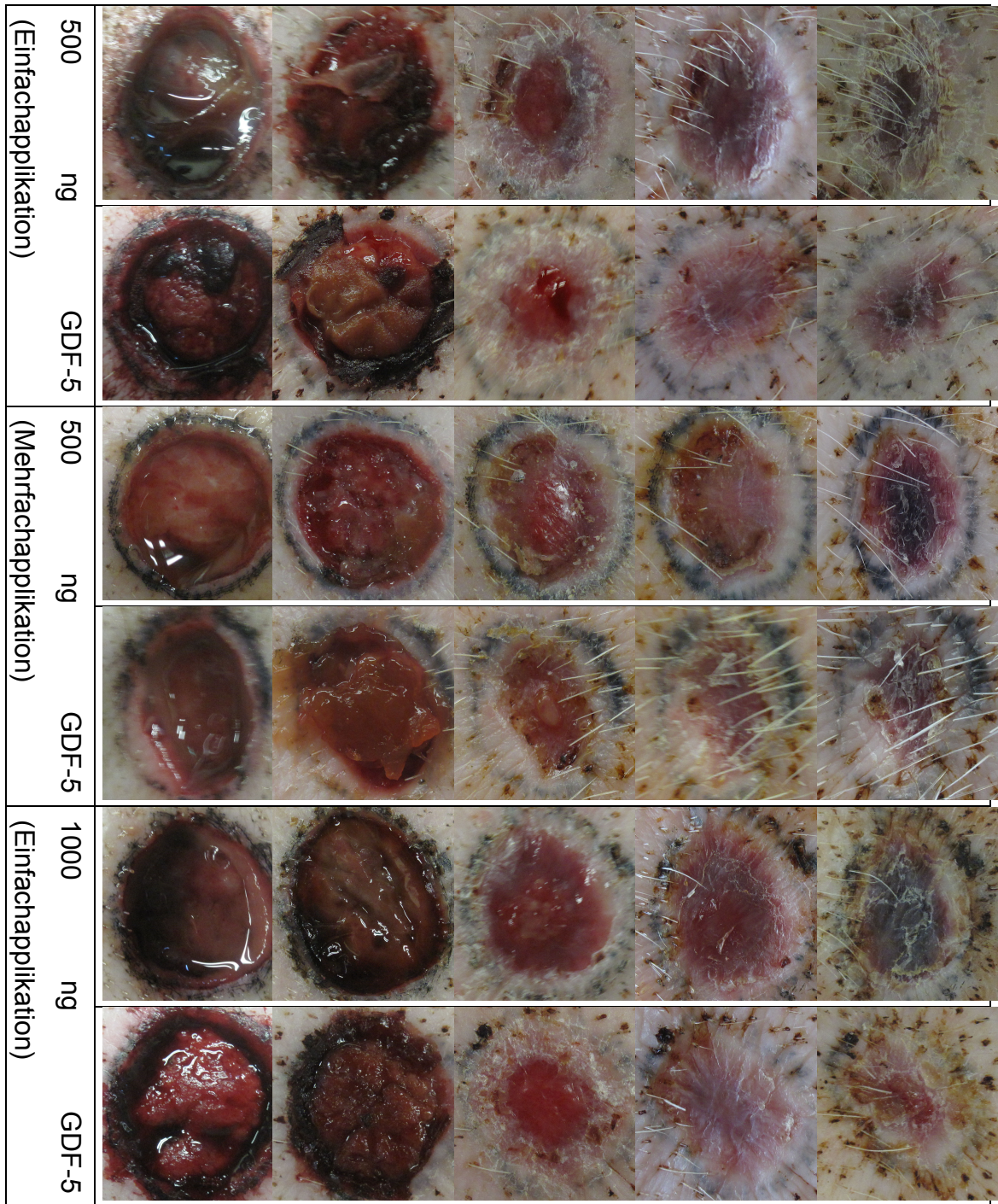
Abbildung 28: Epidermisszellzahl, Einfach- vs. Mehrfachapplikation

### 3.3 Bilder Wundheilung

# Ergebnisse

Wunden:	Tag 2	Tag 6	Tag 10	Tag 14	Tag 20
Unbehandelt					
100 ng GDF-5 (Einfachapplikation)					
100 ng GDF-5 (Mehrfachapplikation)					

# Ergebnisse



# Ergebnisse

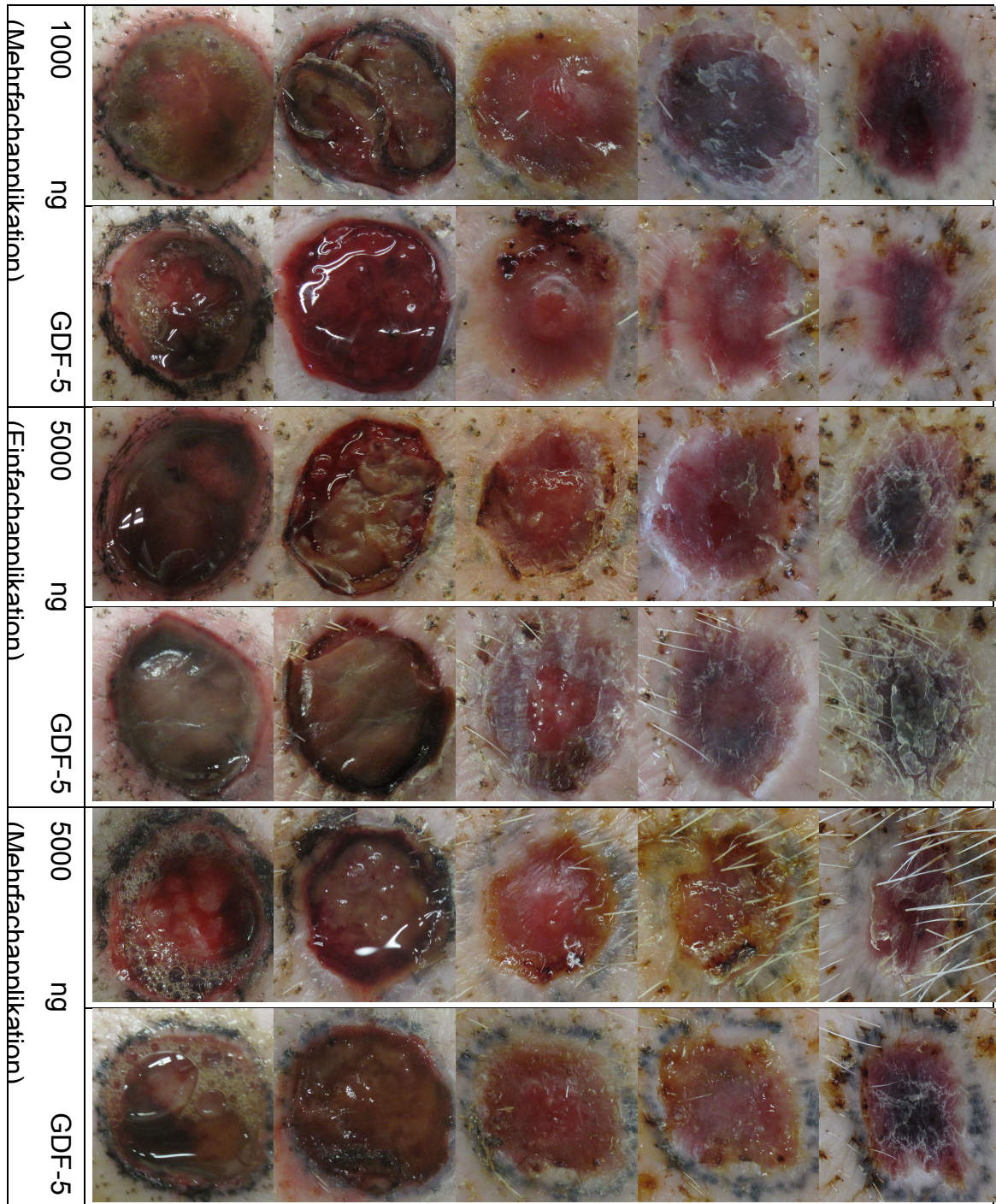
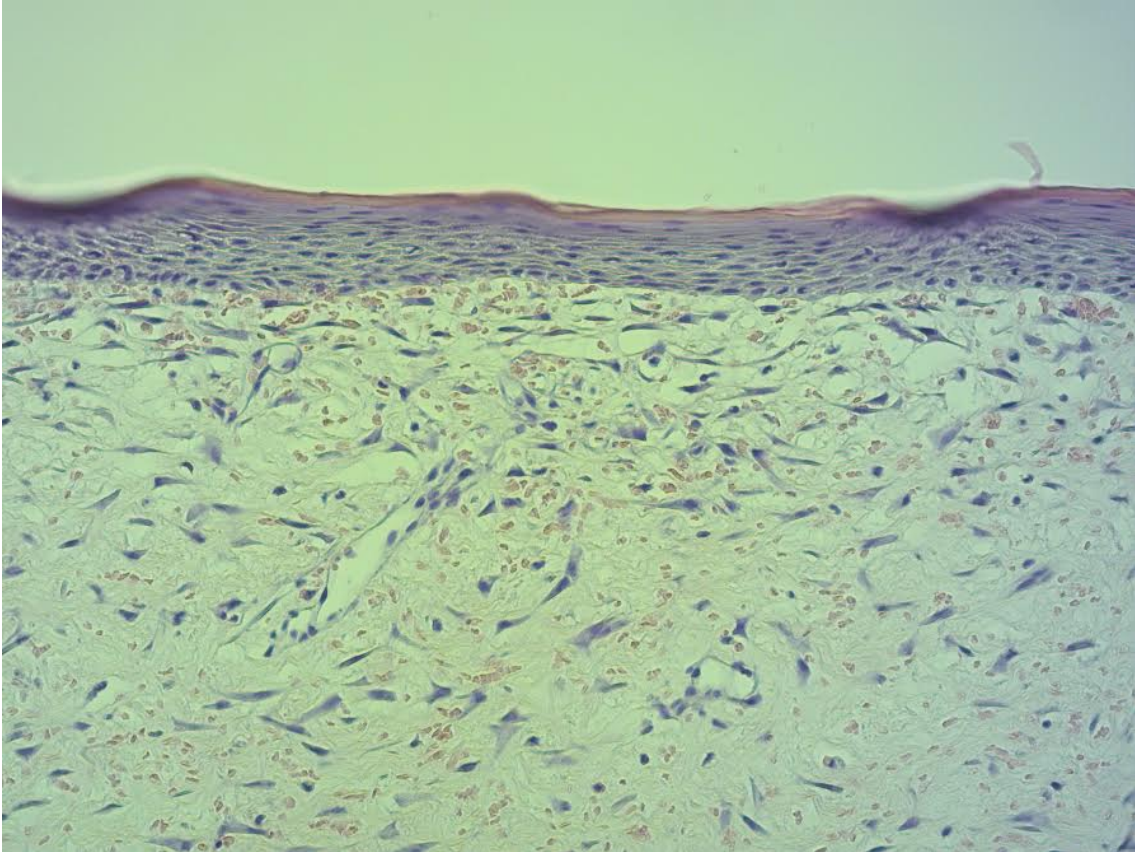


Abbildung 29: Beispielhafte Bilder aller Wunden an den postoperativen Tagen 2, 6, 10, 14 und 20.



**Abbildung 30: Beispiel für histologische Bilder der unbehandelten Kontrollgruppe: Hautschichten, Vergrößerung: 20x, Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

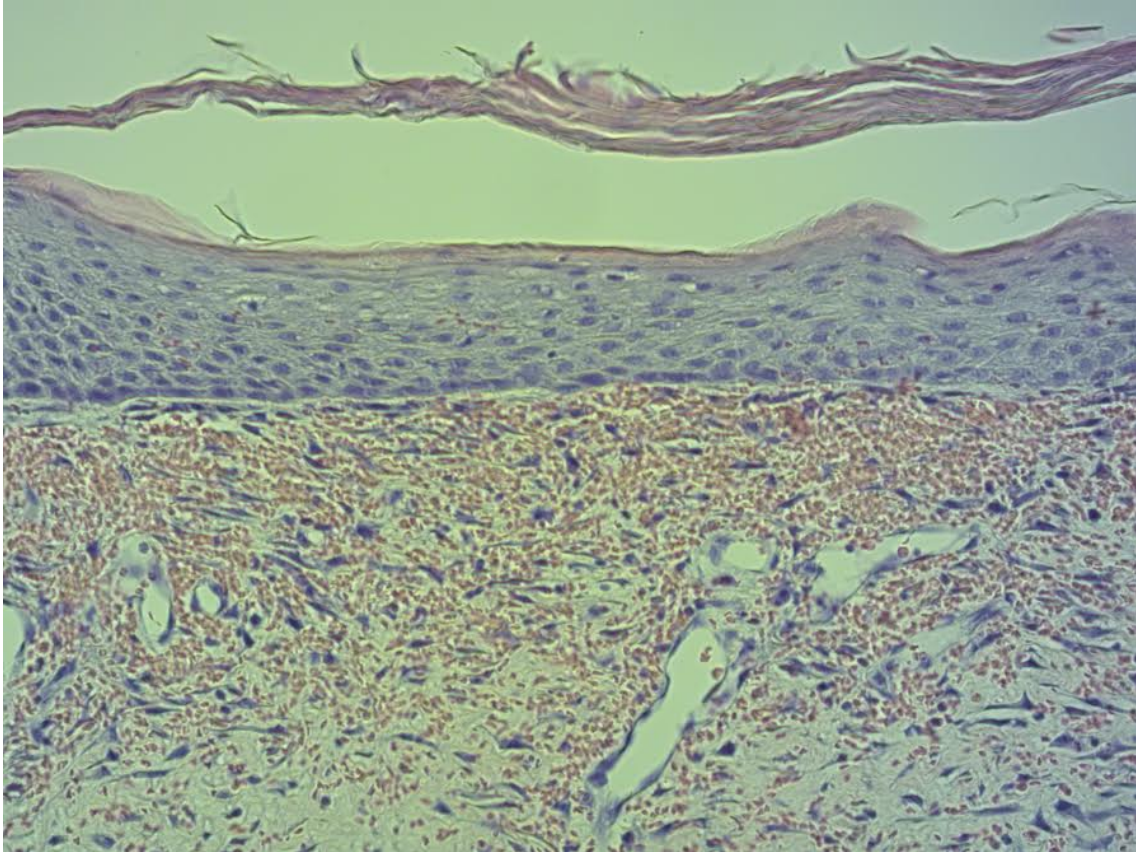


Abbildung 31: Beispiel für histologische Bilder mit Einfachapplikation von 500 ng GDF-5: Hautschichten, Vergrößerung: 20x, Hämatoxylin-Eosin-Färbung

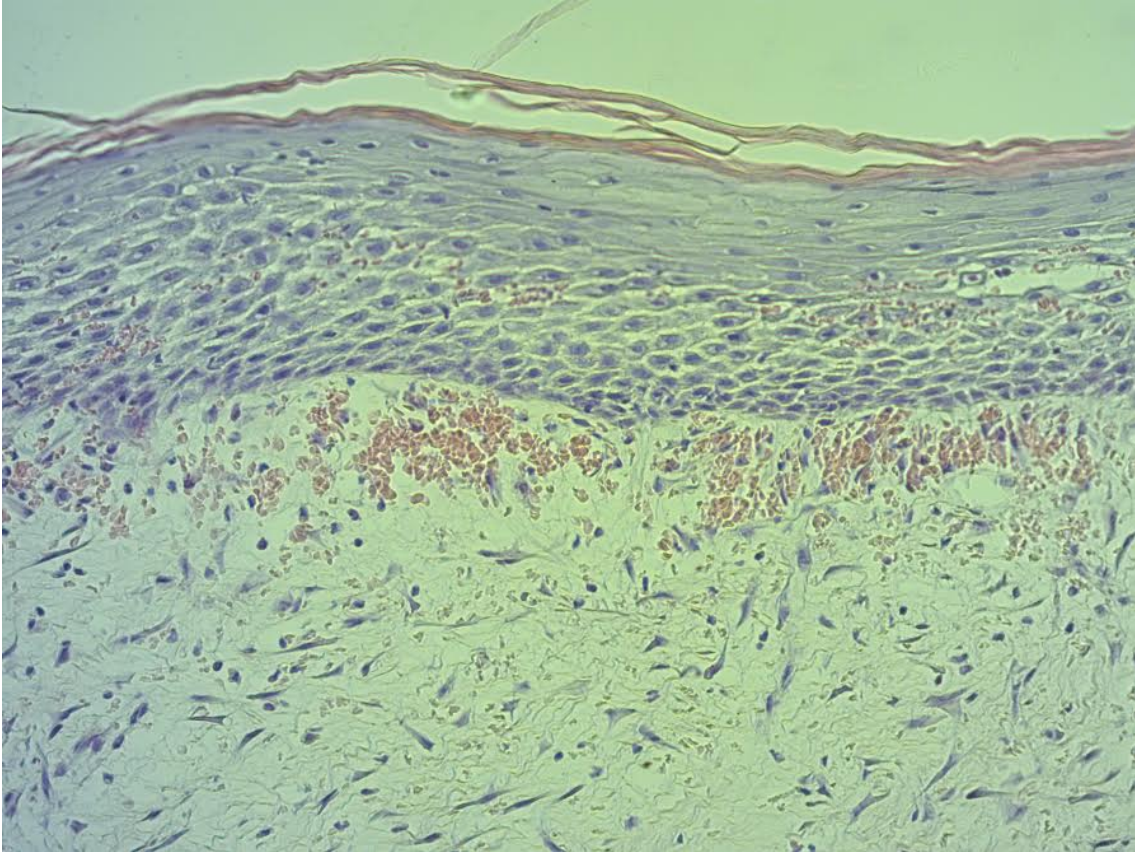


Abbildung 32: Beispiel für histologische Bilder mit Mehrfachapplikation von 1000 ng GDF-5: Hautschichten, Vergrößerung: 20x, Hämatoxylin-Eosin-Färbung

### 4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde ein beschleunigter Verschluss tief dermalen Wunden durch die Applikation des rekombinanten Wachstumsfaktors GDF-5 im Göttinger Minipigmodell festgestellt. Alle Behandlungsgruppen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verbesserte Heilungstendenz in Abhängigkeit von Applikationsdosis und Frequenz. Signifikante Unterschiede konnten überwiegend durch die Mehrfachapplikation von GDF-5 erzielt werden. Hier zeigte sich eine verkürzte Wundverschlusszeit um 2,6 Tage im Vergleich zu den unbehandelten Wunden der Kontrollgruppe. Die histologische Auswertung ließ eine signifikante Optimierung der Neoepidermis im Hinblick auf Dicke und Zellzahl erkennen.

Die Therapie chronischer und komplexer Wunden stellt trotz des mittlerweile enormen Fortschritts im Bereich des Wundmanagements weiterhin eine große Herausforderung für die Rekonstruktive Chirurgie dar. Chronische Wunden sind mit einem erheblichen Verlust an Lebensqualität sowie mit langen Behandlungszeiten und erhöhten Kosten verbunden. Hinzu kommen Einschränkungen in der Alltagsaktivität und Mobilität, gepaart mit Beeinträchtigungen des seelischen Wohlbefindens Betroffener (Persoon, Heinen et al. 2004, Briggs and Flemming 2007, Herber, Schnepf et al. 2007).

Aus sozioökonomischer Sicht ist die Behandlung dieser Wunden kritisch zu betrachten, denn durch die Heilungsverzögerung und die damit verbundene Verlängerung der Behandlungsdauer entstehen erhebliche Kosten. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko für tief dermale Wunden. Der volkswirtschaftliche Aspekt der Wundbehandlung tritt durch die Bevölkerungsentwicklung zunehmend in den Vordergrund.

Zu den prädisponierenden Faktoren einer Wundheilungsstörung zählen unter anderem der manifeste oder latente Diabetes mellitus (Peters, Koberg et al. 1996) sowie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (Eneroth and Persson 1993). Diese führen dazu, dass die komplexen Wundheilungsphasen in ihrem Ablauf behindert oder dabei maßgebliche Zelltypen durch hemmende Einflüsse beeinträchtigt werden (Harding, Morris et al. 2002). Infolgedessen heilt die

Wunde nur verzögert oder gar nicht ab. Als Ursache solcher Problemwunden steht die Minderperfusion des Gewebes im Vordergrund, die durch pathologische Veränderungen des arteriellen Zustroms und/oder des venösen Abstroms (Mikrozirkulation) bedingt ist. Gesteuert wird die Wundheilung aber auch durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und die transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ ), um nur einige zu erwähnen. Dementsprechend kann auch eine ungenügende Verfügbarkeit dieser Wachstumsfaktoren zur Bildung chronischer Wunden beitragen.

Folglich zielen therapeutische Strategien für chronische Wunden einerseits auf die Behandlung von Grunderkrankungen und andererseits auf den Ersatz und die Stimulation von Wachstumsfaktoren ab.

### **4.1 Wachstumsfaktoren in der Wundheilung**

Wachstumsfaktoren sind körpereigene, lösliche Polypeptide, die zur Klasse der Cytokine gehören. Sie besitzen die Fähigkeit, durch Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren und die damit verbundene Signaltransduktion verschiedene Zelltransduktionsmechanismen zu induzieren. Auch der komplexe Vorgang der Wundheilung wird von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren reguliert und gesteuert. Hierbei beeinflussen diese durch verschiedene Mechanismen sowohl molekulare als auch zelluläre Vorgänge der Wundheilung (Kiritsy, Lynch et al. 1993, Garrett and Garrett 1997). Somit sind die endogenen Wachstumsfaktoren, die als Antwort auf einen Reiz in der Wunde gebildet und sezerniert werden, ein wesentlicher Bestandteil bei der Abfolge der physiologischen Wundheilung (Lawrence and Diegelmann 1994, Koveker 2000, Grose and Werner 2004). Im Hinblick auf die Wirkung von Wachstumsfaktoren im Rahmen der Wundheilung lassen sich verschiedene Mechanismen unterscheiden:

- 1) Chemotaxis von Entzündungszellen und Fibroblasten ins Wundgebiet
- 2) Mitogenaktivität mit daraus resultierender Zellproliferation
- 3) Stimulierung der Angiogenese
- 4) Produktion und Abbau von Extrazellulärmatrix und Inhibition von Proteasen
- 5) Beeinflussung der Synthese und Chemotaxis anderer Cytokine und Wachstumsfaktoren

Insbesondere während der Exsudationsphase werden viele Wachstumsfaktoren, die chemotaktische Reize ausüben und die Zellproliferation steuern, sezerniert. Diese Wachstumsfaktoren üben regenerative Reize aus und sind wichtige Bestandteile der Reepithelialisierung sowie Angiogenese und des Aufbaus von Granulationsgewebe während der Wundheilung (Coerper, Koveker et al. 1996, Scheid, Meuli et al. 2000, Werner and Grose 2003).

Durch die zentrale Rolle und die positiven Auswirkungen der Wachstumsfaktoren bei der Wundheilung werden in die Therapie komplexer Wunden mit Wachstumsfaktoren große Erwartungen gelegt. Der Reiz einer aktiven Beschleunigung und Verbesserung der Wundheilung durch Wachstumsfaktoren führt dazu, dass die Applikation exogener Wachstumsfaktoren ein wesentliches Forschungsthema darstellt. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass verschiedene Wachstumsfaktoren einen Heilungsimpuls auf chronische Wunden ausüben können. Einige der wichtigsten Wachstumsfaktoren in der Wundheilung sind VEGF, TGF- $\beta$ , PDGF und KGF.

Galiano et al. untersuchte anhand einer Tierstudie an genetisch diabetischen Mäusen die Wirkung von appliziertem VEGF in Vollhautwunden. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Verbesserung der Wundheilung in Bezug auf die Wundverschlusszeiten (12 Tage gegenüber 25 Tagen bei der Kontrollgruppe) sowie eine beschleunigte Epithelisierung und Zellproliferation (Galiano, Tepper et al. 2004).

Weiterhin wurde bei Patienten mit chronischen diabetischen Fußulzera durch Applikation des Wachstumsfaktors EGF eine signifikante Verbesserung der Wundheilung beobachtet (Piazuelo, Jimenez et al. 2000, Tsang, Wong et al. 2003).

Ebenfalls ein entscheidender Faktor der Wundheilung ist TGF- $\beta$ , welches in verschiedenen Wundheilungsphasen in unterschiedlicher Konzentration vorkommt. Vor allem in der Frühphase und am 7. Tag der Wundheilung sind große Konzentrationen nachweisbar. Verschiedene Studien zeigten, dass sich die Anwendung von exogenem TGF- $\beta$  positiv auf die Wundheilung auswirkt. Es kann die Kollagensynthese stark stimulieren und die Kollagenasen hemmen. Weiterhin spielt TGF- $\beta$  als Immunsuppressor eine entscheidende Rolle in der Wundheilung. So wurde in einer Tierstudie nachgewiesen, dass bei niedriger Konzentration von TGF- $\beta$ 1 eine erhöhte Entzündungsreaktion vorliegt und die Wundheilung langsamer abläuft (Cromack, Sporn et al. 1987). Des Weiteren zeigten in vivo Studien, dass durch exogen verabreichtes TGF- $\beta$ , aufgrund einer positiven Wirkung auf die Bildung von Granulationsgewebe und den Fibroblastenumbau, eine Verbesserung der Wundheilung vorliegt (Breuing, Andree et al. 1997, Yang, Qiu et al. 1999, Crowe, Doetschman et al. 2000).

Mit der vorliegenden Studie konnte auch für den rekombinanten Wachstumsfaktor GDF-5 eine protektive Wirkung in der Heilung tief dermalen Wunden in einem Tiermodell nachgewiesen werden. Signifikante Optimierungen des Heilungsverlaufs ließen sich sowohl in Abhängigkeit von der GDF-5-Konzentration als auch von der Applikationsfrequenz erkennen.

### **4.2 GDF-5 beschleunigt die Wundverschlussdauer**

Das humane GDF-5 (auch als BMP-14 oder CDMP-1 bekannt) ist ein gut charakterisiertes, hochwirksames Peptidhormon, welches die Entwicklung vieler Zellen und Gewebe im embryonalen und reifen Stadium beeinflusst. Neben der bekannten Induktion von Knochen und Knorpel (Yamashita, Shimizu et al. 1997, Yoshimoto, Yamamoto et al. 2006, Sena, Sumner et al. 2007, Zeng, Li et al. 2007, Hayashi, Zhao et al. 2011, James, Kumbar et al. 2011, Zhang, Yang et al. 2011, Cheng, Yang et al. 2012) wurden inzwischen einige weitere Eigenschaften dieses Proteins entdeckt, die eine entscheidende Rolle in der Wundheilung übernehmen könnten.

Der Faktor GDF-5 wurde erstmals aus embryonalem Hautgewebe isoliert, was auf seine generelle Bedeutung bei der Entwicklung und Homöostase der Haut hindeutet. Dies wird auch durch eine starke Expression von GDF-5 in adulter Haut gestützt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der rekombinante Wachstumsfaktor GDF-5 in vitro eine erhöhte Proliferation und Migration von 3T3 Fibroblasten bewirkt und damit die Wundheilung beschleunigt (Sena, Sumner et al. 2007, Basile, Dadali et al. 2008, Cheng, Yang et al. 2012). Zudem ist bekannt, dass GDF-5 beim Knochenaufbau beteiligt ist und damit einhergehend die Angiogenese induziert (Sena, Sumner et al. 2007, Hayashi, Zhao et al. 2011, James, Kumbar et al. 2011, Zhang, Yang et al. 2011, Cheng, Yang et al. 2012). Die Unterstützung der Angiogenese spielt eine Schlüsselrolle in der Wundheilung.

Chronische Wunden entstehen durch vaskuläre Unterversorgung. Neu einsprossende Gefäße, bedingt durch die angiogenetische Wirkung von GDF-5, könnten die Wundsituation verbessern. Diese Annahmen stützten sich bisher allerdings auf in vitro Ansätze und in vivo Untersuchungen an oberflächlichen Hautdefekten. Die Wirkung auf tief dermale Wunden war bisher unbekannt.

Zusammenfassend zeigt der Wachstumsfaktor eine hervorragende Rolle in der Umformung und Neubildung von Blutgefäßen, Nerven und Weichgewebe. Die

Verflechtung von dermato-, angio- und neurogenen Fähigkeiten ist von besonderer Bedeutung im Prozess der Wundheilung und lässt vielversprechende Ergebnisse erwarten (Sena, Sumner et al. 2007, Hayashi, Zhao et al. 2011, James, Kumbar et al. 2011, Zhang, Yang et al. 2011, Cheng, Yang et al. 2012).

In vorhandenen, bislang nicht publizierten Vorstudien in Kooperation mit der Charité Berlin wurde wie bereits erwähnt in einem ähnlichen Versuchsaufbau eine positive Wirkung von GDF-5 auf die Wundheilung oberflächlicher Wunden nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten sowohl für Fibroblasten als auch für Keratinozyten bei einer GDF-5-Konzentration von 50 bis 75 ng/ml eine erhöhte Proliferation und Zelldichte. Hierfür wurde zuerst in einer in vitro-Studie anhand von humanen Keratinozyten und Fibroblasten die optimale GDF-5-Dosis für die Proliferation und Migration ermittelt, um dann im Schweinmodell die potentielle Wirkung auf die Wundheilung oberflächlicher Wunden zu testen.

Zur Dosisfindung wurde in einem ersten Durchgang mit einer großen Variationsbreite und in einem zweiten Durchgang mit einer mittleren Variationsbreite des Wachstumsfaktors gearbeitet. Dafür wurden jeweils acht Biopsien für neun Tage in Kultur beobachtet. Die Ergebnisse zeigten sowohl für das Fibroblasten- als auch für das Keratinozytenwachstum eine Abhängigkeit von der GDF-5-Konzentration. In beiden Fällen lag die optimale GDF-5-Konzentration für maximale Proliferation und Zelldichte bei 50 ng/ml. Dabei reagierten die Keratinozyten stärker auf die Wirkung des Faktors als die Fibroblasten, die Tendenz war jedoch ähnlich.

Es bleibt eindeutig festzustellen, dass die Migration von Hautzellen positiv durch den Wachstumsfaktor in vitro beeinflusst wird. Dieser Fakt kann eine entscheidende Rolle im Rahmen der beschleunigten Wundheilung spielen, da die erhöhte Migration randständiger Keratinozyten für einen raschen Wundverschluss von Vorteil wäre.

Für die in vivo Studie wurden auf dem Rücken von Schweinen fünf oberflächliche Wunden mit einer Schnitttiefe von 1,2 mm und einer Wundfläche

von jeweils 5 cm x 5 cm gesetzt. Auf den Wunden wurden mit einem Hohlfaserkapillarsystem modifizierte Wundauflagen fixiert. Der Ansatz umfasste eine Kontrollwunde ohne Behandlung (A), eine Kontrollwunde, die mit der Puffersubstanz Trehalose-1% des Wachstumsfaktors gespült wurde (B), eine Wunde, die mit Puffersubstanz und GDF-5 behandelt wurde (C), eine mit Nutriflex®-Nährlösung behandelte Wunde (D) und eine Wunde, welche mit Nutriflex®-Nährlösung, Puffersubstanz und GDF-5 behandelt wurde (E).

Nach einem Versuchszeitraum von neun Tagen wurden die Wundauflagen entfernt und je zwei 0,5 cm tiefe Biopsien aus dem Rand- und Zentrumsbereich der Wunden für die Histologie entnommen. Als wesentlichstes Ergebnis war festzustellen, dass die mit dem Wachstumsfaktor GDF-5 (C) aber auch allein mit der Trehalose-1% (B) behandelten Wunden komplett geheilt und annähernd homogen zu dem umgebenden, gesunden Gewebe waren. Unter den behandelten Wunden schnitten die mit Nutriflex®-Lösung (D) versorgten Wunden durchweg am schlechtesten ab. Insgesamt waren sowohl Proliferation als auch Migration der Keratinozyten und Fibroblasten in der in vivo Studie unter dem Einfluss von GDF-5 erhöht, was zu einem besseren Ergebnis in der Wundheilung führte.

In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass sich durch Applikation von GDF-5 auch der Heilungsverlauf tief dermalen Wunden verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe optimiert. Das entscheidende Kriterium für diese Ergebnisse stellte der aus klinischer Sicht relevante Verschluss der Wundoberfläche durch eine neugebildete Epithelschicht dar. Wie aus der Physiologie der Wundheilung bekannt, ist der Wundverschluss ein komplexer Vorgang aus verschiedenen Mechanismen wie Zellproliferation und -migration, überwiegend reguliert durch die Mediatoren und Wachstumsfaktoren. Der beschleunigte Wundverschluss durch Applikation von GDF-5 lässt folglich die Annahme zu, dass dieser Wachstumsfaktor in verschiedenen Wundheilungsphasen die obengenannten Mechanismen positiv steuern kann.

Bereits in vitro Vorversuche haben eine positive Wirkung von GDF-5 auf die Proliferation von Keratinozyten bestätigt. Dieser Fakt kann eine entscheidende Rolle in der beschleunigten Wundheilung spielen, da die erhöhte Migration randständiger Keratinozyten für einen raschen Wundverschluss von Vorteil wäre. (Plettig, J et al. 2014 ; Schiefer, J. L., et al. 2017).

Neben der Keratinozytenproliferation und -migration, die durch dermale Fibroblasten unterstützt wird, zählen auch die Rekrutierung eines Entzündungsinfiltrates ins Wundgranulationsgewebe sowie die Bildung neuer Blutgefäße zu den essentiellen Schritten in der Wundheilung (Sena, Sumner et al. 2007, Hayashi, Zhao et al. 2011, Zhang, Yang et al. 2011, Cheng, Yang et al. 2012). Diese Schritte werden sämtlich von GDF-5 beeinflusst, wie durch verschiedene Experimente belegt wurde. So wurde in einem einfachen, aber effektiven in vivo Modellversuch ein Kollagengel mit und ohne GDF-5 (1 µg/ml) zwischen zwei Ringe gespannt, von einer Silikonkammer überzogen und auf die Rückenmuskelfaszie von Mäusen transplantiert. Histologische Untersuchungen nach ein bis sechs Wochen belegten, dass die Applikation von GDF-5 die Bildung eines Wundgranulationsgewebes beschleunigt, ohne dabei die physiologische Reifung des Granulationsgewebes zu verhindern. GDF-5 induziert eine im Vergleich zur Kontrolle frühere Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie darauf folgend eine frühere und verstärkte Angiogenese in dem durch die Transplantation induzierten Granulationsgewebe (Yamashita, Shimizu et al. 1997).

### **4.3 Konzentrationsabhängiger Einfluss von GDF-5**

Anhand der vorliegenden Ergebnisse und einer Vielzahl von Studien konnte bereits die positive Wirkung des Wachstumsfaktors GDF-5 auf die Wundheilung bestätigt werden. Einen interessanten Aspekt stellt in diesem Zusammenhang jedoch die Frage nach der optimalen Dosierung des Wachstumsfaktors dar. In der vorliegenden Studie wurden vier verschiedene Konzentrationen von GDF-5

eingesetzt. Hierbei waren vor allem in der Gruppe der Mehrfachapplikation große Unterschiede zwischen den einzelnen Dosisgruppen zu beobachten. Die Konzentration 500 ng GDF-5 zeigte insgesamt mit einer Verbesserung der Wundheilungsdauer um 1,0 Tage verglichen mit der niedrigsten (100 ng GDF5) und höchsten (5000 ng GDF5) Dosierung des Wachstumsfaktors die besten Ergebnisse. Auch die Epidermisdicke ließ bei dieser Konzentration einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den höchstdosierten Gruppen erkennen.

Im Rahmen einiger Vorstudien in Kooperation mit der Charité Berlin wurde *in vitro* die optimale GDF-5-Dosis für die Proliferation und Migration von Keratinozyten und dermalen Fibroblasten ermittelt, um anschließend in einem Schweinemodell die potentielle Wirkung auf oberflächliche Wunden zu testen. Zur Dosisfindung wurde in einem ersten Durchgang mit einer großen Variationsbreite und in einem zweiten Durchgang mit einer mittleren Variationsbreite des Faktors gearbeitet. Dafür wurden jeweils acht Biopsien für neun Tage in Kultur beobachtet. Die Ergebnisse zeigten sowohl für das Fibroblasten- als auch für das Keratinozytenwachstum eine Abhängigkeit von der GDF-5-Konzentration. In beiden Fällen lag die optimale GDF-5-Konzentration für maximale Proliferation und Zelldichte bei 50 ng/ml.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse auf eine konzentrationsabhängige Optimierung der Wundheilung oberflächlicher und tief dermalen Wunden durch die positive Wirkung von GDF-5 schließen.

#### **4.4 Frequenzabhängiger Einfluss von GDF-5**

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der Applikationshäufigkeit von GDF-5 auf die Wundheilung als weiterer zu untersuchender Ansatz evaluiert. Durch die wiederholte Applikation von GDF-5 wurden signifikante Verbesserungen der Wundheilung, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch im Vergleich zur Gruppe der Einfachapplikation, erzielt.

Wie bereits erwähnt, führt die reduzierte Blutversorgung in den Wunden zu degenerativen Prozessen im Weichgewebe und diese häufig zu offenen, dauerhaften Geschwüren (chronische Wunden / diabetische Geschwüre).

Gerade hier ist von GDF-5 eine sehr positive Wirkung zu erwarten, da gezeigt werden konnte, dass GDF-5 die Bildung eines Wundgranulationsgewebes beschleunigt und die physiologische Angiogenese, der eine Gefäßreifung folgt, stimuliert. Dieser Vorgang findet in der Proliferationsphase der Wundheilung zwischen Tag 4 und Tag 16 statt (Yamashita, Shimizu et al. 1997, Sena, Sumner et al. 2007, Hayashi, Zhao et al. 2011, James, Kumbar et al. 2011, Zhang, Yang et al. 2011, Cheng, Yang et al. 2012). In diesem Zusammenhang konnte durch die wiederholte Applikation von GDF-5 (alle zwei Tage) in dem der Studie zugrundeliegenden Tierversuch eine Aufrechterhaltung der GDF-5-Konzentration gerade in dieser Phase des Wundheilungsverlaufs protegiert werden.

Unter Betrachtung des prozentualen Wundverschlusses aller Gruppen in der Übersicht lässt sich ab Tag 8 ein beschleunigter Wundverschluss in der Gruppe der Mehrfachapplikation feststellen

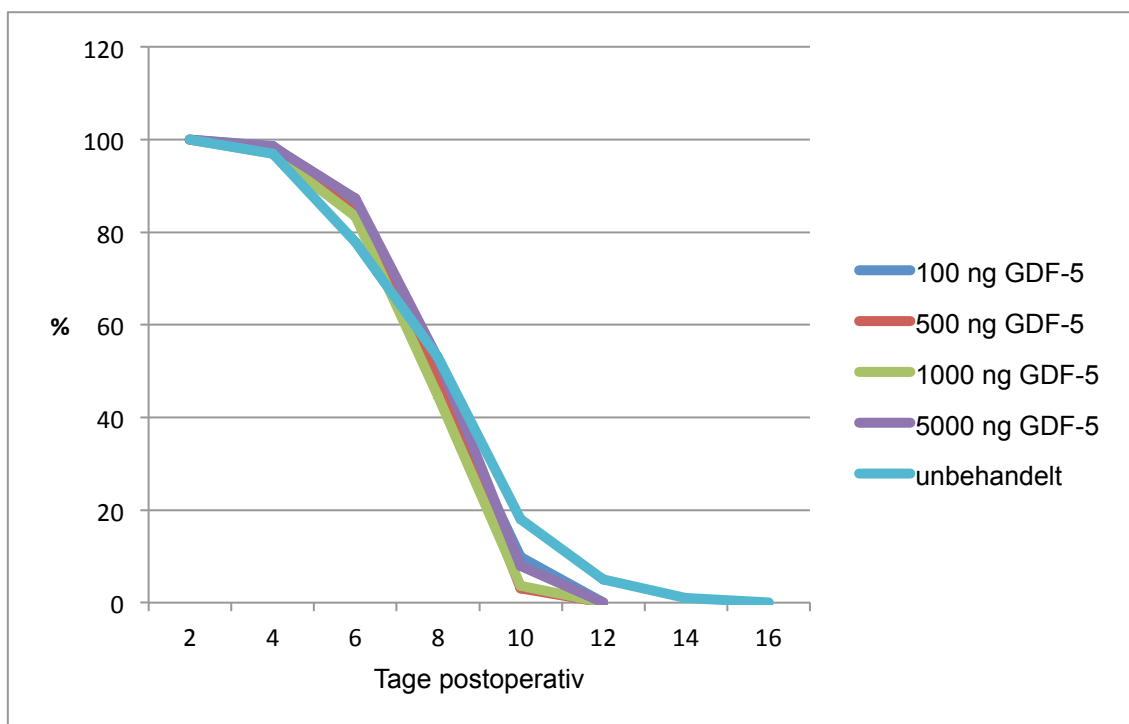


Abbildung 22: Prozentualer Verlauf der Wundheilung, Mehrfachapplikation

). Bezugnehmend auf die physiologischen Wundheilungsphasen entspricht dieser Zeitraum dem Beginn der Reparationsphase und somit der Phase der Proliferation und Migration der Keratinozyten sowie Fibroblasten. Wie aus den in vitro Versuchen ersichtlich, stimuliert GDF-5 diese Vorgänge, welche eine entscheidende Rolle in der beschleunigten Wundheilung spielen, da die erhöhte Proliferation und Migration randständiger Keratinozyten den Wundverschluss beschleunigen. Angesichts dieser Tatsachen könnte die kürzere Verschlusszeit der Wunden auf eine konstante Konzentration von GDF-5 durch die Mehrfachapplikation zurückzuführen sein. Neben diesem planimetrischen Unterschied war bei Mehrfachapplikation von GDF-5 histologisch eine signifikant erhöhte Zellzahl zu erkennen.

### **4.5 Stellenwert der Kollagenmatrix als GDF-5 Träger**

Während Kollagenmatrices über lange Zeit lediglich als Gerüst betrachtet wurden, die der mechanischen Unterstützung von Zellen oder als Gleitlager dienen, kommt heute der Wahl des geeigneten Trägermaterials beim Tissue Engineering eine große Bedeutung zu. Unverzichtbar erscheint die Matrix bei der Wundheilung nach Verletzungen. Daher rückt sie immer stärker ins Blickfeld der Regenerativen Medizin. Von vorrangiger Bedeutung ist die Biokompatibilität, also die Verträglichkeit mit Körpergewebe. Dadurch wird gewährleistet, dass die Matrix in das körpereigene Gewebe integriert wird und keine immunologische oder inflammatorische Reaktion stattfindet. Die Struktur der Matrix entscheidet über die Porosität und die damit verbundene Einsprossung und Verteilung der Zellen innerhalb der Matrix. Die Verbindung zwischen einzelnen Poren ist für die Nährstoffdiffusion und Neovaskularisation maßgeblich. Kollagen hat sich als biokompatibler, resorbierbarer Arzneimittelträger und als Matrix für das Zellwachstum in der Wundheilung klinisch bewährt und stellt den wesentlichen organischen Matrixbestandteil in Knochen dar.

Kollagen-basierte Biomaterialien tierischer Herkunft werden bereits seit Jahren in der Medizin eingesetzt. Insbesondere in klinisch anwendbaren Produkten zur Blutstillung, als Duraersatz oder auch in verschiedenen Feldern der Plastischen Chirurgie konnten sich Kollagene als Trägermaterial oder Wundaufgabe etablieren. Kollagene vom Typ I unterscheiden sich zwischen den einzelnen Spezies nur geringfügig und verfügen im Vergleich zu vielen anderen Biomaterialien über sehr gute Resorptionseigenschaften (Hotten, Neidhardt et al. 1994, Yoshimoto, Yamamoto et al. 2006). Da kein ausgeprägtes Identifikationsmuster vorhanden ist und der enzymatische Abbau keine toxischen Abbauprodukte inkludiert, gelten aufgereinigte Kollagen I-Materialien in der Regel als biokompatibel (Nishitoh, Ichijo et al. 1996).

In der vorliegenden Studie wurde als Trägermatrix für GDF-5 eine neuartige Matrix aus einem Gelatine-Kollagen-Gerüst verwendet, welches durch ein standardisiertes Spinnverfahren hergestellt wird. Dieses Spinnverfahren

kombiniert Fasern der Dicke 2  $\mu\text{m}$  und 10  $\mu\text{m}$ . Abbildung 2 zeigt diese Fasern in einem rasterelektronenmikroskopischen Bild. Die Porengrößen liegen von den Gerüststärken unabhängig im Bereich von 35 bis 70  $\mu\text{m}$ .

Matrices, insbesondere Kollagen-Matrices, werden häufig für die Arzneimittelabgabe verwendet. Sie dienen als Biomodulatoren, die beispielsweise durch Freisetzung von Antibiotika Infektionen entgegenwirken, während die Wachstumsfaktoren die Wundheilung beschleunigen (Boateng, Matthews et al. 2008). Letztere sind die wichtigsten Mediatoren aller Phasen der Wundheilung. Sie sind insbesondere für die Behandlung von chronischen Wunden von großer Bedeutung, da gerade solche Wundmilieus aufgrund geringer Konzentrationen von Wachstumsfaktoren eine verzögerte Heilung aufweisen (Mulder, Wallin et al. 2012, Holmes, Wrobel et al. 2013).

Hori et al. verwendete in seinen Studien Gelatine als Hauptgerüst für den Transfer und die Lieferung einiger für die Wundheilung entscheidender Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel insulin-like growth factor 1 (IGF-1), fibroblast growth factor (FGF) und epidermal growth factor (EGF). Darüber hinaus können Gelatine-Kollagen-Matrices durch ihre definierte Biodegradation zu einer kontinuierlichen und steuerbaren Freisetzung von Botenstoffen wie Antibiotika und Wachstumsfaktoren führen. (Hori, Sotozono et al. 2007, Lee, Nakagawa et al. 2007).

Das in der vorliegenden Studie als Trägermatrix verwendete Vlies wurde in Zusammenarbeit mit Freudenberg New Technologies SE & Co. KG (Weinheim, Deutschland) und Biopharm GmbH (Heidelberg, Deutschland) entwickelt. Es wird durch eine neuartige Industriedrehspinnung bei niedrigen Temperaturen hergestellt, die gesundheitsschädigende Lösungsmittel reduziert und die empfindlichen Polymere während der Verarbeitung schützt. Das Vlies ist bioresorbierbar, nicht vernetzt und besteht aus Fasern mit einer bimodalen Verteilung. Im Rahmen diverser Vorversuche wurde die *in vitro* und *in vivo* Biokompatibilität des Scaffolds positiv getestet. Dieses wies eine gute Biodegradation und Gewebeintegration auf (Held et al. 2016, Petersen et al. 2016). Die Einbindung von GDF-5 in das Scaffold erfolgte standardisiert und ist

in allen Entwicklungsstadien überprüfbar. Auch die Freisetzung von GDF-5 aus dem Scaffold ist vom Hersteller und den Industriepartnern definiert und wurde bereits in Vorversuchen evaluiert.

### **4.6 Minipig als Tiermodell**

Vor der Durchführung erster klinischer Studien sind Tierversuche im Großtiermodell unumgänglich. Derzeit existieren für viele Forschungsprojekte keine alternativen Verfahren. Künstliche Hautmodelle oder Zellkulturen, welche eine adäquate Übertragung der in vitro gewonnenen Daten auf klinische Wunden zulassen oder einem in vivo Erkenntnisgewinn nahekommen, existieren nicht.

Auf dem Markt existieren mittlerweile zahlreiche kommerzielle Hautmodelle für spezifische Versuchszwecke (MatTek Corp., L'Oréal, SkinEthic, Organogenesis etc.) (Papanas and Maltezos 2007). Sie lassen sich generell in reine Keratinozyten-Modelle (Monolayer-Kulturen oder voll differenzierte Modelle) für die epidermale Forschung und in hautäquivalente Modelle mit dermalen Anteilen unterteilen (z. B. „Episkin“ von L'Oréal).

Die Verwendung von Hautmodellen hat die Zahl der Tierversuche für Hautverträglichkeitsstudien in der Pharmazie und Kosmetik rapide gesenkt (Papanas and Maltezos 2007). Allerdings ist jedes Hautmodell standardisiert und würde natürliche Schwankungen bei der Fragestellung ausgrenzen. Zudem ist jedes Modell in seinen Möglichkeiten limitiert und nicht in der Lage, einen so komplexen Vorgang, wie ihn die Wundheilung darstellt, adäquat zu simulieren (Papanas and Maltezos 2007). Gemeint sind vor allem die Migration randständiger Keratinozyten, die allgemeine Regeneration aus der Dermis heraus, die Beteiligung von natürlichen endogenen Wachstumsfaktoren, Vitaminen, Salzen etc., die Revaskularisierung im Wundgewebe (Angiogenese) sowie immunologische und entzündliche Reaktionen.

Im Rahmen von in vitro Studien konnten in humanen Zellen signifikante Ergebnisse erzielt werden, die auf einen positiven in vivo Effekt bei der Wundheilung durch GDF-5 hindeuten. In vorhandenen Vorstudien in Kooperation mit der Charité Berlin wurde in einem ähnlichen Versuchsaufbau ebenfalls im Großtiermodell eine positive Wirkung von GDF-5 auf die Wundheilung oberflächlicher Wunden nachgewiesen.

Ein Aspekt, der weitere in vivo Versuche unerlässlich macht, ist die Überprüfung der Auswirkungen des Wundmilieus tief dermalen Wunden auf den Wachstumsfaktor. Es ist völlig unbekannt, wie das Wundmilieu die GDF-5-Aktivitäten beeinflusst, da sich schwankende pH-Verhältnisse in der Wunde ergeben können, der Faktor verdünnt wird und z.B. mit unzähligen Metaboliten in Kontakt treten.

Schweine sind aufgrund zahlreicher Übereinstimmungen mit dem Menschen in der Dermatologie ein anerkanntes Hautmodell und werden in diesem Zusammenhang zahlreich in der Literatur beschrieben (Qvist, Hoeck et al. 2000, Hunziker 2002). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die humane Wundheilung ist geboten, da zudem eine anatomische Verwandtschaft der Haut besteht. Als Funktions- und Strukturmodell für die Erforschung der menschlichen Haut kommen hellhäutige Hausschweine wie das Deutsche Edelschwein oder das Göttinger Miniaturschwein in Frage (Romano and Balaguer 1991, Hom, Unger et al. 2005, Netzlaff, Schaefer et al. 2006).

Die Schweine-Epidermis hat sowohl im anatomischen Aufbau als auch in biochemischen und physiologischen Stoffwechselbereichen große Ähnlichkeiten zur menschlichen Epidermis (Archambeau and Bennett 1984, Barbero and Frasnich 2009). Eine deutliche Parallele stellt zum Beispiel die Erneuerungsrate der Epidermis dar, welche beim Menschen 28 und beim Schwein 30 Tage beträgt. Auch die Passage der vitalen Epidermis (13 Tage beim Menschen und 10 bis 14 Tage beim Schwein) sowie die Entwicklung der epidermalen Barriere und der Permeabilität für viele Substanzen ist sehr ähnlich.

Wie bereits die Epidermis lässt auch die Dermis strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen porcinem und menschlichem Integument erkennen. So sind die Anordnung und Verteilung der Bindegewebelemente in beiden Modellen sehr ähnlich. Aber auch wichtige biochemische Parameter wie Glykosaminoglykane, Glykoproteine und Proteoglykane ähneln in Gehalt, Struktur und Verteilung denen der menschlichen Dermis. Einer der wichtigsten Parameter ist jedoch das vorkommende Kollagen. Der Aufbau der Aminosäureketten  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Ketten ist beim porcinen und menschlichen Kollagen fast identisch (Heinrich, Lange et al. 1971, Allam and Heidemann 1974). Weitere Ähnlichkeiten lassen sich im Bereich der Blutversorgung beobachten. Beide verfügen über eine Gefäßsystemstruktur, welche in der Lage ist, schnell Wärme abzugeben. Größere Unterschiede sind in der Subkutis-Region zu erkennen. Obwohl die relative Dicke von Epidermis und Dermis des Schweines der menschlichen Haut sehr ähnlich ist, weist die porcine Subkutis durch starke Fetteinlagerungen keinerlei Ähnlichkeit auf. Sie ist mit kräftigen Kollagenfaserbündeln durchzogen und in ihrer Kompaktheit nicht mit der menschlichen Subkutis vergleichbar.

Einen weiteren Aspekt stellt die Wundkontraktion bei Vollhautdefekten dar. Bei Nagetieren wird die Wundheilung stark durch die Kontraktion des unter der Haut liegenden Musculus panniculus carnosus beeinflusst (Kennedy and Cliff 1979). Studien zeigen aber, dass die Wundkontraktion beim Schweinmodell im Gegensatz zum Rattenmodell wesentlich geringer ist (Chvapil and Chvapil 1992). Demnach beträgt beim Schwein die Wundkontraktion bei Vollhautdefekten nach einer Woche etwa 40 Prozent. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen dieser Studie nahezu überein. Abgesehen von anatomischen Vor- und Nachteilen scheint auch die Wahl der Wundplatzierung eine Rolle zu spielen. Lateral gesetzte Wunden weisen eine stärkere Kontraktion auf als paraspinale Wunden am Rücken (Chvapil and Chvapil 1992).

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Studie das Göttinger Minipig als Versuchstier eingesetzt. Die Tiere wurden im Alter von 39 Wochen von der Firma Ellegaard Göttingen Minipigs A/S, bezogen, welche auf langjährige Erfahrung in der Züchtung von Göttinger Minipigs zurückblickt. Vor

Versuchsbeginn wurde eine vierwöchige Konditionierung der Schweine eingeleitet, um den täglichen Umgang mit den Tieren sowie die Durchführung von Verbandwechseln, Applikationen und planimetrischer Dokumentationen sicherzustellen.

### **4.7 Stellenwert der Konditionierung**

Für jede Art der Arbeit mit Tieren ist ein tiefgreifendes Verständnis für die beteiligten Spezies von größter Bedeutung. Dies trifft ebenso für die Durchführung von Studien mit Göttinger Minischweinen in einer Forschungsumgebung zu. Das Grundverhalten des Göttinger Miniaturschweins unterscheidet sich nicht erheblich von dem anderer Schweinestämme. Jedoch hat das Göttinger Minipig im Vergleich zu traditionellen Schweinerassen, die stressanfällig und zum Teil aggressiv sind, ein freundliches und ruhiges Wesen (Crick, Sheppard et al. 1998). Menschen, die bereits Erfahrung im Umgang mit Hunden haben, können grundsätzlich ihre Interaktionsfähigkeit nutzen. Sie sollten sich jedoch darüber im Klaren sein, dass Hunde vor langer Zeit für die menschliche Gesellschaft gezüchtet wurden und deren Verhalten verstehen, während Schweine als Nahrungsquelle domestiziert wurden. Ein weiterer wichtiger Unterschied liegt darin begründet, dass Schweine keine Raubtiere, sondern Beutetiere sind, und sich deshalb gegenüber Menschen sehr scheu und vorsichtig verhalten. Es erfordert einige Mühe und Zeit, das Vertrauen der Tiere zu gewinnen. Anschließend können Göttinger Minischweine jedoch konditioniert werden, um an einer Studie teilzunehmen. Die Akklimatisierung und Konditionierung der Schweine führt zur drastischen Reduktion des Stresspotenzials für alle Beteiligten und trägt zum Erfolg der Studie bei.

Im Rahmen der vorliegenden Studie zeichneten sich nach vier Wochen Eingewöhnung und intensiver Konditionierung erhebliche Erleichterungen im Umgang sowie große Fortschritte in Bezug auf die Mitarbeit der Tiere während der Versuche ab. Jedoch sollten individuelle Unterschiede bei den Tieren nicht

außer Acht gelassen werden. Diese zeigten sich beispielsweise durch den bei einzelnen Tieren unterschiedlichen Zeitaufwand für Verbandswechsel und Fotodokumentation. Insgesamt trug die anfängliche Investition von Zeit und Geduld für die Konditionierung maßgeblich zur stressarmen Durchführung des Versuchs sowie zum Erfolg der Studie bei.

### **4.8 Limitation in Studiendesign und Durchführung**

Anhand der gewonnenen Daten war es möglich, eine Reihe von Erkenntnissen über die Wirkung von GDF-5 und die Wundheilung von Vollhautdefekten aufzuzeigen. Nicht in allen Bereichen der Studie konnten jedoch statistisch signifikante Ergebnisse festgestellt werden. Um im Hinblick auf die unterschiedlichen Wundauflagen detaillierte Aussagen zu ermöglichen, sind größere Fallzahlen oder kleinere Variationen erforderlich. Eine Erhöhung der Wundzahl pro Tier würde das Risiko der Kontaminationen und Kreuzwirkungen steigern. Um diesen systematischen Fehler zu vermeiden, empfiehlt Glerup eine Anzahl von maximal acht Wunden von jeweils 2 cm pro Tier (Glerup 2011). Eine Erhöhung der Tierzahl würde im Großtiermodell hingegen mit erheblichen Mehrkosten für die Anschaffung und den Unterhalt der Tiere einhergehen und wäre aus ethischer Sicht problematisch zu betrachten. In Anbetracht der klinischen Relevanz ist das Schweinmodell für die Wundheilung unersetzlich. Die Ergebnisse der Schweinmodell-Studien korrelieren zu 78 Prozent mit den Ergebnissen von Studien an Menschen. Bei kleinen Säugetieren ist dagegen eine Korrelation von nur 53 Prozent zu erkennen (Sullivan, Eaglstein et al. 2001).

Die Applikation von GDF-5 auf tief dermale Wunden erfolgte, wie obenstehend erwähnt, mittels eines Kollagen-Scaffolds. Diese Kombination bietet eine gute Grundlage für die Entwicklung dermalen Wundauflagen mit GDF-5 für den klinischen Einsatz. Kritisch sollte allerdings hinterfragt werden, inwieweit das Scaffold selbst die Wundheilungsprozesse beeinflusst. Diese Fragestellung ist

aktueller Gegenstand weiterer tierexperimenteller Studien, welche die dermale Regeneration unter alleiniger Verwendung von Scaffolds in unterschiedlichen Konstellationen untersuchen. Ungeachtet dessen lag der Fokus in der vorliegenden Arbeit auf der Wirkung von GDF-5, für dessen Applikation bisher keine adäquate Alternative zum verwendeten Kollagen-Vlies zur Verfügung stand. Darüber hinaus werden Kollagen-basierte Matrices in der Forschung nach wie vor als Goldstandard für Anwendungen des Tissue Engineering und die Übertragung von Substanzen in in vivo Modellen verwendet.

Eine systemische Wirkung von GDF-5 über das Blutgefäßsystem könnte als weiterer kritischer Aspekt der Studie betrachtet werden. Allerdings würde eine potentielle Kreuzwirkung von GDF-5 über das Blutgefäßsystem zwischen den Wunden auch den Heilungsverlauf der Kontrollwunden (unbehandelte Wunden ohne GDF-5) positiv beeinflussen. Ungeachtet dessen konnte in regelmäßigen Blutuntersuchungen während der gesamten Studiendauer keine erhöhte Wachstumsfaktorkonzentration nachgewiesen werden.

### **4.9 Aussichten und klinische Relevanz**

In Deutschland werden jährlich circa 3,5 Millionen Menschen wegen chronischer Wunden behandelt. Dabei entstehen schätzungsweise Kosten in Höhe von rund fünf Milliarden Euro, die in diesem Maße nicht notwendig wären. Darüber hinaus ist die Versorgung der betroffenen Patienten nach wie vor häufig unbefriedigend. Nach monate- oder jahrelangem Behandlungsverlauf droht den Betroffenen in vielen Fällen dennoch die Extremitätenamputation. In Deutschland liegt die Amputationsrate nach wie vor bei jährlich über 40.000.

Auf Basis von bereits in vitro evaluierten Daten sowie Ergebnissen aus der Literatur bezüglich der regenerativen Wirkung von GDF-5 konnte mit der vorliegenden Untersuchung eine signifikante Optimierung der Heilung tiefer dermaler Wunden in vivo gezeigt werden. Für die Applikation von GDF-5 wurde gemeinsam mit den Industriepartnern ein Kollagen-Vlies als Trägermatrix

gewählt, welches bereits in Vorversuchen eine hervorragende Biokompatibilität aufwies. Folglich wurde ein Kombinationspräparat aus GDF-5 und Vlies untersucht, welches sowohl inhaltlich als auch strukturell hervorragende Eigenschaften aufweist, um als potentielle Wundauflage den Weg in die Patientenbehandlung zu finden. Dies setzt allerdings weitere klinische Pilot- und Multicenterstudien, sowie Untersuchungen über die optimale Konzentration und Dosisanalyse des Wachstumsfaktors voraus.

Hinsichtlich der klinischen Problematik tief dermalen Wunden wurde häufig auf chronische Wunden insbesondere bei Diabetikern hingewiesen. Mit der vorliegenden Untersuchung wurde zunächst die Wirkung von GDF-5 unter physiologischen Bedingungen in vivo getestet. So konnten einige wertvolle Referenzparameter definiert werden, die eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen bieten. Nachfolgende Studien zur Evaluation der Wirkung von GDF-5 auf chronische Wunden bei Vorliegen von Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus sind bereits in einem Diabetes-Großtiermodell geplant.

Trotz rasanter Fortschritte in der Regenerativen und Rekonstruktiven Medizin ist der Bedarf an innovativen Verfahren zur Verbesserung der Heilungserfolge bei komplexen Wunden nach wie vor sehr groß. Die hier gewonnenen Daten bieten eine gute Voraussetzung für weitere detaillierte klinische Studien über Biomaterialien und Indikatoren für zukünftige Verfahren im Bereich der Regenerativen Medizin und Rekonstruktiven Chirurgie.

### **5 Zusammenfassung**

In Deutschland werden jährlich circa 3,5 Millionen Menschen wegen chronischer Wunden behandelt. Dabei entstehen schätzungsweise Kosten in Höhe von rund fünf Milliarden Euro. Darüber hinaus ist die Versorgung der betroffenen Patienten nach wie vor in vielen Fällen unbefriedigend.

Der komplexe Vorgang der Wundheilung wird unter anderem von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren reguliert und gesteuert. Diese beeinflussen durch verschiedene Mechanismen sowohl molekulare als auch zelluläre Vorgänge der Wundheilung.

Das humane GDF-5 (auch als BMP-14 oder CDMP-1 bekannt) ist ein gut charakterisiertes, hochwirksames Peptidhormon, welches die Entwicklung vieler Zellen und Gewebe im embryonalen und reifen Stadium beeinflusst. Weiterhin spielt GDF-5 eine entscheidende Rolle in der Umformung und Neubildung von Blutgefäßen, Nerven und Weichgewebe und bewirkt eine erhöhte Proliferation und Migration von 3T3 Fibroblasten in vitro. Neben der bekannten Induktion von Knochen und Knorpel wurden inzwischen einige weitere Eigenschaften dieses Proteins entdeckt, die eine entscheidende Rolle in der Wundheilung übernehmen könnten.

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der vorliegenden Studie die Wirkung des GDF-5 in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Heilung tief dermaler Wunden in einem Göttinger Minipigmodell untersucht.

In der Studie wurden 60 tief dermale Wunden an Göttinger Minipigs (2,0 cm Durchmesser, paravertebral) randomisiert mit unterschiedlichen Konzentrationen GDF-5 behandelt. Als Trägermatrix wurde ein biodegradables Kollagen-Vlies verwendet, in dem GDF-5 industriell standardisiert eingebunden wurde. Die Wundheilung wurde im Verlauf einer Behandlungsdauer von 21 Tagen planimetrisch, histologisch und im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe evaluiert.

In allen Gruppen war innerhalb der Behandlungsdauer ein kompletter Wundverschluss zu beobachten. Die systematische Evaluation zeigte neben

einer beschleunigten Wundheilung eine signifikante Zunahme der Epidermisdicke und der epidermalen Zellzahl durch die Behandlung mit GDF-5 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die besten Ergebnisse im Hinblick auf histologische Hautqualität und Geschwindigkeit der Wundheilung konnten durch Mehrfachapplikation (insbesondere in der Gruppe mit 500 ng GDF-5) nachgewiesen werden.

Trotz rasanter Fortschritte in der Medizin ist der Bedarf an innovativen Verfahren zu Verbesserung der Heilungserfolge bei komplexen Wunden nach wie vor sehr groß. Die hier gewonnenen Daten bieten eine gute Voraussetzung für weitere detaillierte Studien über die verwendeten Biomaterialien um deren Einsatz in der Regenerativen Medizin und Rekonstruktiven Chirurgie weiter zu evaluieren.

### 6 Literaturverzeichnis

Ackermann, M. R. (2009). "Wundheilung und Angiogenese." J. F. Z. Donald M. McGavin Pathologie der Haustiere: Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie(1.Auflage): 163-180.

Allam, S. S. and E. Heidemann (1974). "Isolation, characterization and comparative studies of the N-terminal peptides from soluble pig skin collagen." FEBS Lett **39**(2): 187-189.

Archambeau, J. O. and G. W. Bennett (1984). "Quantification of morphologic, cytologic, and kinetic parameters of unirradiated swine skin: a histologic model." Radiat Res **98**(2): 254-273.

Ashcroft, G. S., S. J. Mills and J. J. Ashworth (2002). "Ageing and wound healing." Biogerontology **3**(6): 337-345.

Barbero, A. M. and H. F. Frasch (2009). "Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review." Toxicol In Vitro **23**(1): 1-13.

Basile, P., T. Dadali, J. Jacobson, S. Hasslund, M. Ulrich-Vinther, K. Soballe, Y. Nishio, M. H. Drissi, H. N. Langstein, D. J. Mitten, R. J. O'Keefe, E. M. Schwarz and H. A. Awad (2008). "Freeze-dried tendon allografts as tissue-engineering scaffolds for Gdf5 gene delivery." Mol Ther **16**(3): 466-473.

Boateng, J. S., K. H. Matthews, H. N. Stevens and G. M. Eccleston (2008). "Wound healing dressings and drug delivery systems: a review." J Pharm Sci **97**(8): 2892-2923.

Breuing, K., C. Andree, G. Helo, J. Slama, P. Y. Liu and E. Eriksson (1997). "Growth factors in the repair of partial thickness porcine skin wounds." Plast Reconstr Surg **100**(3): 657-664.

Briggs, M. and K. Flemming (2007). "Living with leg ulceration: a synthesis of qualitative research." J Adv Nurs **59**(4): 319-328.

Broughton, G., 2nd, J. E. Janis and C. E. Attinger (2006). "The basic science of wound healing." Plast Reconstr Surg **117**(7 Suppl): 12S-34S.

Cheng, X., T. Yang, W. Meng, H. Liu, T. Zhang and R. Shi (2012). "Overexpression of GDF5 through an adenovirus vector stimulates osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro and in vivo." Cells Tissues Organs **196**(1): 56-67.

Chvapil, M. and T. A. Chvapil (1992). "Wound-healing models in the miniature Yucatan Pig. Swine as models in biomedical research." Iowa State University Press: 265-289.

Clark, R. A. (1993). "Biology of dermal wound repair." Dermatol Clin **11**(4): 647-666.

Coerper, S., G. Koveker, T. Gottwald and H. D. Becker (1996). "[Cutaneous wound healing: clinical evaluation of locally active growth factors--an overview]." Zentralbl Chir **121 Suppl**: 49-51.

Crick, S. J., M. N. Sheppard, S. Y. Ho, L. Gebstein and R. H. Anderson (1998). "Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure." J Anat **193 ( Pt 1)**: 105-119.

Cromack, D. T., M. B. Sporn, A. B. Roberts, M. J. Merino, L. L. Dart and J. A. Norton (1987). "Transforming growth factor beta levels in rat wound chambers." J Surg Res **42**(6): 622-628.

Crowe, M. J., T. Doetschman and D. G. Greenhalgh (2000). "Delayed wound healing in immunodeficient TGF-beta 1 knockout mice." J Invest Dermatol **115**(1): 3-11.

Eneroth, M. and B. M. Persson (1993). "Risk factors for failed healing in amputation for vascular disease. A prospective, consecutive study of 177 cases." Acta Orthop Scand **64**(3): 369-372.

Fleischmann, W., M. K. Russ and D. Moch (1998). "[Surgical wound treatment]." Chirurg **69**(2): W222-232.

Fu, X., L. Fang, H. Li, X. Li, B. Cheng and Z. Sheng (2007). "Adipose tissue extract enhances skin wound healing." Wound Repair Regen **15**(4): 540-548.

Galiano, R. D., O. M. Tepper, C. R. Pelo, K. A. Bhatt, M. Callaghan, N. Bastidas, S. Bunting, H. G. Steinmetz and G. C. Gurtner (2004). "Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells." Am J Pathol **164**(6): 1935-1947.

Garrett, B. and S. B. Garrett (1997). "Cellular communication and the action of growth factors during wound healing." J Wound Care **6**(6): 277-280.

Gilboa, L., A. Nohe, T. Geissendorfer, W. Sebald, Y. I. Henis and P. Knaus (2000). "Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live

cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors." Mol Biol Cell **11**(3): 1023-1035.

Glerup, P. (2011). "Wound healing models." P.A. McAnulty, A.D. Dayan, N.-C. Ganderup, K.L. Hastings (Eds.) The minipig in biomedical research.

Grose, R. and S. Werner (2004). "Wound-healing studies in transgenic and knockout mice." Mol Biotechnol **28**(2): 147-166.

Harding, K. G., H. L. Morris and G. K. Patel (2002). "Science, medicine and the future: healing chronic wounds." BMJ **324**(7330): 160-163.

Hayashi, M., C. Zhao, K. N. An and P. C. Amadio (2011). "The effects of growth and differentiation factor 5 on bone marrow stromal cell transplants in an in vitro tendon healing model." J Hand Surg Eur Vol **36**(4): 271-279.

Heinrich, W., P. M. Lange, T. Stirtz, C. Iancu and E. Heidemann (1971). "Isolation and characterization of the large cyanogen bromide peptides from the alpha1- and alpha2-chains of pig skin collagen." FEBS Lett **16**(1): 63-67.

Held, M., A. Rahmanian-Schwarz, J. Schiefer, R. Rath, J. O. Werner, S. Rahmanian, H. E. Schaller and W. Petersen (2016). "A Novel Collagen-Gelatin Scaffold for the Treatment of Deep Dermal Wounds-An Evaluation in a Minipig Model." Dermatol Surg **42**(6): 751-756.

Herber, O. R., W. Schnepf and M. A. Rieger (2007). "A systematic review on the impact of leg ulceration on patients' quality of life." Health Qual Life Outcomes **5**: 44.

Holmes, C., J. S. Wrobel, M. P. Maceachern and B. R. Boles (2013). "Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: a systematic review." Diabetes Metab Syndr Obes **6**: 17-29.

Hom, D. B., G. M. Unger, K. J. Pernell and J. C. Manivel (2005). "Improving surgical wound healing with basic fibroblast growth factor after radiation." Laryngoscope **115**(3): 412-422.

Hori, K., C. Sotozono, J. Hamuro, K. Yamasaki, Y. Kimura, M. Ozeki, Y. Tabata and S. Kinoshita (2007). "Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing." J Control Release **118**(2): 169-176.

Hotten, G., H. Neidhardt, B. Jacobowsky and J. Pohl (1994). "Cloning and expression of recombinant human growth/differentiation factor 5." Biochem Biophys Res Commun **204**(2): 646-652.

Hunt, T. K. (1988). "The physiology of wound healing." Ann Emerg Med **17**(12): 1265-1273.

Hunziker, E. B. (2002). "Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects." Osteoarthritis Cartilage **10**(6): 432-463.

James, R., S. G. Kumbar, C. T. Laurencin, G. Balian and A. B. Chhabra (2011). "Tendon tissue engineering: adipose-derived stem cell and GDF-5 mediated regeneration using electrospun matrix systems." Biomed Mater **6**(2): 025011.

Kennedy, D. F. and W. J. Cliff (1979). "A systematic study of wound contraction in mammalian skin." Pathology **11**(2): 207-222.

Kiritsy, C. P., A. B. Lynch and S. E. Lynch (1993). "Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review." Crit Rev Oral Biol Med **4**(5): 729-760.

Koveker, G. B. (2000). "Growth factors in clinical practice." Int J Clin Pract **54**(9): 590-593.

Kremer, M., E. Lang and A. C. Berger (2000). "Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix(Integra artificial skin)." Br J Plast Surg **53**(6): 459-465.

Lawrence, W. T. and R. F. Diegelmann (1994). "Growth factors in wound healing." Clin Dermatol **12**(1): 157-169.

Lazarus, G. S., D. M. Cooper, D. R. Knighton, R. E. Percoraro, G. Rodeheaver and M. C. Robson (1994). "Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing." Wound Repair Regen **2**(3): 165-170.

Lee, K. Y., T. Nakagawa, T. Okano, R. Hori, K. Ono, Y. Tabata, S. H. Lee and J. Ito (2007). "Novel therapy for hearing loss: delivery of insulin-like growth factor 1 to the cochlea using gelatin hydrogel." Otol Neurotol **28**(7): 976-981.

Lutz, M. and P. Knaus (2002). "Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network." Cell Signal **14**(12): 977-988.

Luyten, F. P. (1997). "Cartilage-derived morphogenetic protein-1." Int J Biochem Cell Biol **29**(11): 1241-1244.

Martin, G. R. and R. Timpl (1987). "Laminin and other basement membrane components." Annu Rev Cell Biol **3**: 57-85.

Matoltsy, A. G. (1986). "Dermis. Biology of the Integument." Springer- Verlag **2**: 272-277.

Mulder, G., K. Wallin and M. Tenenhaus (2012). "Regenerative materials that facilitate wound healing." Clin Plast Surg **39**(3): 249-267.

Netzlaff, F., U. F. Schaefer, C. M. Lehr, P. Meiers, J. Stahl, M. Kietzmann and F. Niedorf (2006). "Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments." Altern Lab Anim **34**(5): 499-513.

Nishitoh, H., H. Ichijo, M. Kimura, T. Matsumoto, F. Makishima, A. Yamaguchi, H. Yamashita, S. Enomoto and K. Miyazono (1996). "Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5." J Biol Chem **271**(35): 21345-21352.

Nohe, A., E. Keating, P. Knaus and N. O. Petersen (2004). "Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors." Cell Signal **16**(3): 291-299.

Papanas, N. and E. Maltezos (2007). "Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers: new technologies, any promises?" Int J Low Extrem Wounds **6**(1): 37-53.

Persoon, A., M. M. Heinen, C. J. van der Vleuten, M. J. de Rooij, P. C. van de Kerkhof and T. van Achterberg (2004). "Leg ulcers: a review of their impact on daily life." J Clin Nurs **13**(3): 341-354.

Peters, K. M., K. Koberg, T. Rosendahl, B. Klosterhalfen, A. Straub and G. Zwadlo-Klarwasser (1996). "Macrophage reactions in septic arthritis." Arch Orthop Trauma Surg **115**(6): 347-350.

Petersen, W., A. Rahmanian-Schwarz, J. O. Werner, J. Schiefer, J. Rothenberger, G. Hubner, H. E. Schaller and M. Held (2016). "The use of collagen-based matrices in the treatment of full-thickness wounds." Burns **42**(6): 1257-1264.

Piazuelo, E., P. Jimenez, A. Lanas, A. Garcia, F. Esteva and R. Sainz (2000). "Platelet-derived growth factor and epidermal growth factor play a major role in human colonic fibroblast repair activities." Eur Surg Res **32**(3): 191-196.

Plettig, J. J., CM.; Bräutigam, K.; Knöspel, F.; Wönne, EC.; Schubert, F.; Plöger, F.; Unger, JK.; Reutzel-Selke, A.; Bornmann, R.; Zeilinger, K.; Gerlach, JC. (2015). "Feasibility study of an active wound dressing based on hollow fiber membranes in a porcine wound model." Burns **41**(4): 778-788.

Pschyrembel W (1998). "Pschyrembel Klinisches Wörterbuch."

Qvist, M. H., U. Hoeck, B. Kreilgaard, F. Madsen and S. Frokjaer (2000). "Evaluation of Gottingen minipig skin for transdermal in vitro permeation studies." Eur J Pharm Sci **11**(1): 59-68.

Romano, J. and L. Balaguer (1991). "Ultrastructural identification of Langerhans cells in normal swine epidermis." J Anat **179**: 43-46.

Röthel, H. (1997). "Basisinformationen zum Wundmanagement (I): Die Reinigung der Wunde." Hartmann WundForum **1**: 24-28.

Scheid, A., M. Meuli, M. Gassmann and R. H. Wenger (2000). "Genetically modified mouse models in studies on cutaneous wound healing." Exp Physiol **85**(6): 687-704.

Schiefer, J. L., M. Held, P. C. Fuchs, E. Demir, F. Ploger, H. E. Schaller and A. Rahmanian-Schwarz (2017). "Growth Differentiation Factor 5 Accelerates Wound Closure and Improves Skin Quality During Repair of Full-Thickness Skin Defects." Adv Skin Wound Care **30**(5): 223-229.

Sena, K., D. R. Sumner and A. S. Viridi (2007). "Modulation of VEGF expression in rat bone marrow stromal cells by GDF-5." Connect Tissue Res **48**(6): 324-331.

Storm, E. E., T. V. Huynh, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, D. M. Kingsley and S. J. Lee (1994). "Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily." Nature **368**(6472): 639-643.

Sullivan, T. P., W. H. Eaglstein, S. C. Davis and P. Mertz (2001). "The pig as a model for human wound healing." Wound Repair Regen **9**(2): 66-76.

Tsang, M. W., W. K. Wong, C. S. Hung, K. M. Lai, W. Tang, E. Y. Cheung, G. Kam, L. Leung, C. W. Chan, C. M. Chu and E. K. Lam (2003). "Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers." Diabetes Care **26**(6): 1856-1861.

Vogt, P. M., P. Kolokythas, A. Niederbichler, K. Knobloch, K. Reimers and C. Y. Choi (2007). "[Innovative wound therapy and skin substitutes for burns]." Chirurg **78**(4): 335-342.

Weise, K. and M. Schaffer (2000). "[Treatment strategies in wound healing disorders]." Unfallchirurg **103**(2): 100-109.

Welsch, U. (2005). Haut. Sobotta Lehrbuch Histologie. München, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. **Auflage: 2**: 559-568.

Werner, S. and R. Grose (2003). "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." Physiol Rev **83**(3): 835-870.

Yamashita, H., A. Shimizu, M. Kato, H. Nishitoh, H. Ichijo, A. Hanyu, I. Morita, M. Kimura, F. Makishima and K. Miyazono (1997). "Growth/differentiation factor-5 induces angiogenesis in vivo." Exp Cell Res **235**(1): 218-226.

Yang, L., C. X. Qiu, A. Ludlow, M. W. Ferguson and G. Brunner (1999). "Active transforming growth factor-beta in wound repair: determination using a new assay." Am J Pathol **154**(1): 105-111.

Yoshimoto, T., M. Yamamoto, H. Kadomatsu, K. Sakoda, Y. Yonamine and Y. Izumi (2006). "Recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) induced bone formation in murine calvariae." J Periodontal Res **41**(2): 140-147.

Zeng, Q., X. Li, G. Beck, G. Balian and F. H. Shen (2007). "Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation and increases vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in fat-derived stromal cells in vitro." Bone **40**(2): 374-381.

Zhang, B., S. Yang, Z. Sun, Y. Zhang, T. Xia, W. Xu and S. Ye (2011). "Human mesenchymal stem cells induced by growth differentiation factor 5: an improved self-assembly tissue engineering method for cartilage repair." Tissue Eng Part C Methods **17**(12): 1189-1199.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wundplatzierungen .....	15
Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopisches Bild (500-fache Vergrößerung) .....	19
Abbildung 3: A) Struktur von GDF-5. GDF-5 ist ein dimeres Protein der TGF- $\beta$ Superproteinfamilie. Die Untereinheiten (gelb und grün) sind über eine Schwefelbrücke miteinander verbunden. Durch Reduktionsmittel wie DTT wird die Schwefelbrücke gespalten und das Molekül wird in die beiden Untereinheiten überführt. B) Analyse von rhGDF-5 im SDS PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. Das Protein wurde unter nicht- reduzierenden (- DTT) und reduzierenden Bedingungen (+ DTT) analysiert. M = Protein-Molekulargewichtsmarker.....	20
Abbildung 4: Als Nachweis für die biologische Aktivität wurde rhGDF-5 im ALP Assay mit MCHT1/26-Zellen getestet. rhGDF-5 wurde in einer Konzentration von 0 bis 1200 ng/ml eingesetzt. Der durch die Alkalische Phosphatase induzierte Substratumsatz von p-Nitrophenylphosphat wurde bei einer Absorption von 405 nm gemessen.....	22
Abbildung 5: In Schlinge liegendes Minipig.....	24
Abbildung 6: Platzierung der nichtklebenden Membranen und der Kleber- und Verschlussfolie.....	25
Abbildung 7: Anziehen der Jacke und Befestigen mit Fixomull.....	25
Abbildung 8: Befestigung der Jacke an den Beinen mit Fixomull .....	26
Abbildung 9: Markierung der Wundflächen und äußeren Quadrate.....	27
Abbildung 10: Tätowierung.....	27
Abbildung 11: Operation der Wunden .....	28
Abbildung 12: Zweimaliges Falten der Wundauflage .....	29

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 13: Einbringen der Wundaufgabe in die Wunde.....	29
Abbildung 14: Obduktion .....	30
Abbildung 15: Stativ für die standardisierte Fotodokumentation .....	32
Abbildung 16: Beispiel für die planimetrische Auswertung des prozentualen Wundverschlusses. Grün: Nicht-epithelialisierter Wundbereich; Rot: Äußeres tätowiertes Quadrat .....	33
Abbildung 17: Messung der Epidermisdicke .....	35
Abbildung 18: Berechnung der Epidermiszellzahl.....	36
Abbildung 19: Wundverschlusszeiten Einfachapplikation vs. Kontrollgruppe ...	40
Abbildung 20: Wundverschlusszeiten Mehrfachapplikation vs. Kontrollgruppe	41
Abbildung 21: Wundverschlusszeiten Einfach- vs. Mehrfachapplikation .....	42
Abbildung 22: Prozentualer Verlauf der Wundheilung, Mehrfachapplikation ....	43
Abbildung 23: Epidermisdicke, Einfachapplikation vs. Kontrollgruppe.....	49
Abbildung 24: Epidermisdicke, Mehrfachapplikation vs. Kontrollgruppe.....	50
Abbildung 25: Epidermisdicke, Einfach- vs. Mehrfachapplikation .....	51
Abbildung 26: Epidermiszellzahl, Einfachapplikation vs. Kontrollgruppe .....	53
Abbildung 27: Epidermiszellzahl, Mehrfachapplikation vs. Kontrollgruppe .....	54
Abbildung 28: Epidermiszellzahl, Einfach- vs. Mehrfachapplikation .....	55
Abbildung 29: Beispielhafte Bilder aller Wunden an den postoperativen Tagen 2, 6, 10, 14 und 20. ....	58
Abbildung 30: Beispiel für histologische Bilder der unbehandelten Kontrollgruppe: Hautschichten, Vergrößerung: 20x, Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	59

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 31: Beispiel für histologische Bilder mit Einfachapplikation von 500 ng GDF-5: Hautschichten, Vergrößerung: 20x, Hämatoxilin-Eosin-Färbung .....	60
Abbildung 32: Beispiel für histologische Bilder mit Mehrfachapplikation von 1000 ng GDF-5: Hautschichten, Vergrößerung: 20x, Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	61

### 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Materialien.....	11
Tabelle 2: Liste der verwendeten Instrumente .....	12
Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	13
Tabelle 4: Liste der verwendeten Programme .....	13
Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf, Experiment Teil I.....	16
Tabelle 6: Zeitlicher Verlauf, Experiment Teil.....	17
Tabelle 7: Gewicht der Minipigs .....	23
Tabelle 8: Wundverschlusszeiten.....	39
Tabelle 9: Prozentualer Verlauf der Wundheilung, Kontrollgruppe. Werte: prozentuale Angabe Restdefekt.....	44
Tabelle 10: Prozentualer Verlauf der Wundheilung, Einmalapplikation. Werte: prozentuale Angabe Restdefekt.....	45
Tabelle 11: Prozentualer Verlauf der Wundheilung, Mehrfachapplikation. Werte: prozentuale Angabe Restdefekt.....	46
Tabelle 12: Epidermisdicke, Einfachapplikation .....	47
Tabelle 13: Epidermisdicke, Mehrfachapplikation .....	48
Tabelle 14: Epidermiszellzahl, Einfachapplikation .....	52
Tabelle 15: Epidermiszellzahl, Mehrfachapplikation .....	52

### **9 Erklärung zum Eigenanteil**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und Verbrennungschirurgie an der Eberhard Karls Universität Tübingen unter Betreuung von PD Dr. med. Manuel Held durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden von mir in Zusammenarbeit mit Dr. Jennifer Schiefer, Dr. Wiebke Peterson, Dr. Rebecca Rath und Dr. Jan-Ole Werner durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie durch mich.

Darüber hinaus wurde unser Team bei der histologischen Verarbeitung der Proben von Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Pathologie Tübingen unterstützt.

Ich versichere, dass Manuskript selbständig nach Anleitung durch PD Dr. med. Manuel Held verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Shahab Rahmanian

### **10 Danksagung**

Großer Dank gilt Herrn PD. Dr. Manuell Held für die Unterstützung bei dem ganzen Projekt.

Auch bei meiner Familie, Freunden und dem gesamten Team möchte ich mich recht herzlich für die Unterstützung bedanken