

Aus dem
Institut für Laboratoriumsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Daniel Teupser

und der

Klinik für Allgemeine Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

Verbesserung der Wundheilung durch die lokale Hemmung
von Matrix-Metalloproteinasen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nuray Dagdelen, geb. Baylan
aus
Lauingen (Donau)

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Sommerhoff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Elisabeth Messmer

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Frank Rösken

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2018

Für meinen
Sami Kaan und Ferid

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9

1	Einleitung	
1.1	Phasengerechte Wundheilung _____	11
1.1.1	Exsudative Phase _____	11
1.1.2	Proliferative Phase _____	14
1.1.3	Reparative Phase _____	15
1.2	Chronische Wunde _____	15
1.2.1	Definition _____	15
1.2.2	Pathogenese _____	15
1.3	Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) _____	18
1.3.1	Systematik _____	18
1.3.2	Struktur _____	21
1.3.3	Biologische Funktionen _____	23
1.3.4	Regulation der MMP-Aktivität _____	23
1.3.5	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) _____	25
1.4	Synthetische Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren (MMPI) _____	27
1.4.1	MMPIs in klinischen Studien _____	27
1.4.2	Der Inhibitor Ro 28-2653 _____	29
1.5	Zielsetzung der Arbeit _____	31
2	Material und Methoden	
2.1	Bezugsquellen _____	33
2.2	Tierkollektiv und Tiermodell _____	35
2.3	Versuchsprotokoll _____	35
2.3.1	Induktion einer diabetischen Stoffwechsellage _____	36
2.3.2	Narkose _____	37
2.3.3	Operative Wundsetzung und Implantation des PVE-Ringes _____	38
2.4	Verbandswechsel _____	41

2.5	Digitale Fotodokumentation _____	43
2.6	Planimetrie der Wunden _____	43
2.7	Analyse der systemischen Konzentration des Inhibitors Ro 28-2653 _____	44
2.8	Gewebeentnahme für die histologische Untersuchung _____	44
2.9	Histologie der Wunden _____	45
2.9.1	Vorbereitung der Gewebeproben _____	45
2.9.2	Paraffineinbettung _____	45
2.9.3	Schneiden der Gewebeblöcke _____	46
2.9.4	Entparaffinieren _____	46
2.9.5	Histologische Färbungen _____	47
2.9.6	Dehydrierung _____	48
2.10	Mikroskopische Analyse _____	48
2.11	Statistische Analyse _____	49
3	Ergebnisse	
3.1	Etablierung des Tiermodells: Kontrollgruppe (K) und Tiere mit diabetischer Stoffwechsellage (D) _____	51
3.1.1	Die Entwicklung des Körpergewichtes _____	51
3.1.2	Makroskopische Analyse der Wundheilung _____	52
3.1.3	Quantifizierung von Granulation und Epithelialisierung mittels Planimetrie _____	54
3.2	Histologische Untersuchung der Wunden _____	56
3.2.1	HE-Färbung _____	56
3.2.2	EvG-Färbung _____	58
3.3	Einfluss des MMPI Ro 28-2653 auf die Wundheilung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage _____	60
3.3.1	Die Entwicklung des Körpergewichtes _____	60
3.3.2	Granulationsgewebe bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Applikation von Ro 28-2653 – Makroskopische Analyse _____	61

3.3.3	Granulationsgewebe bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage mit und ohne Applikation von Ro 28-2653 – Quantifizierung _____	63
3.3.4	Epithelialisierung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage mit und ohne Applikation von Ro 28-2653 – Makroskopische Analyse _____	64
3.3.5	Epithelialisierung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage mit und ohne Applikation von Ro 28-2653 – Quantifizierung _____	65
3.3.6	Einfluss von Placebo auf die Wundheilung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage _____	66
3.4	Systemische Konzentration von Ro 28-2653 _____	68
4	Diskussion	
4.1	Das Tiermodell _____	69
4.2	Einfluss des Geschlechts der Ratten _____	71
4.3	Einfluss des toxischen Diabetes und des Gewichtes der Tiere auf die Wundheilung _____	72
4.4	Einfluss der Isofluran-Narkose _____	73
4.5	Einfluss der bakteriellen Kontamination auf die Wundheilung _____	74
4.6	Wundplanimetrie _____	76
4.7	Einfluss der Trägersubstanz auf die Wundheilung _____	76
4.8	Einfluss des Inhibitors Ro 28-2653 auf die Wundheilung _____	77
5	Zusammenfassung _____	83
6	Summary _____	85
7	Literaturverzeichnis _____	87

Abkürzungsverzeichnis

APMA	Aminoquecksilberacetat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CCD	Charge-Coupled Device
CMS	Core MultiShell nanotransporters
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EvG	Elastica van Giesson
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
IE	Internationale Einheiten
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-4 / IL-10	Interleukin -4 / -10
KG	Körpergewicht
KGF	Keratinocyte Growth Factor
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MT-MMPs	Membran-type MMPs
pAVK	periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PVE	PolyVinylEthylen
PVP	PolyVinylPirrolidon
RASI-1	Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed-1
SLN	Solid Lipid Nanoparticles
STZ	Streptozotocin
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

Die Wundheilung ist heute im Rahmen des dermatographischen Wandels, der chirurgischen Versorgung bis ins hohe Alter, der zunehmenden Verwendung alloplastischer Materialien und der häufigen Begleiterkrankungen und Stoffwechselstörungen ein zentrales Thema der Chirurgie. Eine sachgerechte Wundbehandlung und die Kontrolle der Komplikationen sind unabdingbar für eine regelrechte, ungestört ablaufende Wundheilung. Voraussetzung dafür ist ein physiologisches Wundmilieu mit einer komplex geregelten Abfolge von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellpopulationen (u.a. Granulozyten, Fibroblasten, Endothelzellen), Bestandteilen der extrazellulären Matrix und löslichen Mediatorssubstanzen wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Proteasen und deren Inhibitoren. Das Ziel ist der schnelle Wundverschluss zur Verhinderung von Infektionen der Wunde mit pathogenen Keimen und die Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion.

Jegliche Störung der Wundheilung kann zur Entwicklung einer chronischen Wunde führen – ein kostenintensives Problem des Gesundheitswesens. Die Zahl der Patienten mit anhaltenden Wundheilungsstörungen in Deutschland wird auf 2,5 bis 3,5 Millionen geschätzt [IGSF 2007; Becker 2009]. Die daraus entstehenden Kosten für ambulante und stationäre Behandlungen werden mit jährlich mit etwa 5 Milliarden Euro beziffert [Horch 2008]. Besonders ältere Menschen mit zusätzlichen Risikofaktoren wie periphere arterielle Verschlusskrankheit, chronische venöse Insuffizienz oder Diabetes mellitus sind häufig betroffen. Trotz vielversprechender Therapieansätze der letzten Jahre u.a. in Form von Wundaufgaben ist die Rezidivrate mit 30-60% immer noch sehr hoch [Schmelz et al. 2013; Strien 2002]. Insbesondere bei multimorbiden Patienten mit entgleister Stoffwechsellage entstehen häufig ausgedehnte Gewebe-defekte, begleitet von Infektionen bis hin zum Verlust der jeweiligen Extremität (ca. 60.000 Amputationen, vor allem der unteren Extremität, pro Jahr in Deutschland) [Müchler 2008].

1.1 Phasengerechte Wundheilung

Bei jeder Verletzung des Gewebes läuft eine sequenzielle Kaskade von unterschiedlichen Prozessen zellulärer Aktivität mit dem Ziel des Wundverschlusses ab. Die komplexen Regulationsmechanismen sind in ihrer biochemischen Entität noch nicht vollständig erforscht, während der Ablauf der Wundheilung auf histologischer

Ebene relativ gut dokumentiert ist.

Aus didaktischen Gründen wird die Wundheilung überwiegend in drei Phasen eingeteilt, die allerdings zeitlich überlappen und sich nicht scharf voneinander trennen lassen [Schäffer et al. 1999; Broughton et al. 2006]:

- Exsudative Phase (Entzündungsphase)
- Proliferative Phase (Reparaturphase)
- Reparative Phase (Differenzierungs-/Umbauphase)

Der zeitliche Ablauf der einzelnen Phasen ist in Abbildung 1 dargestellt.

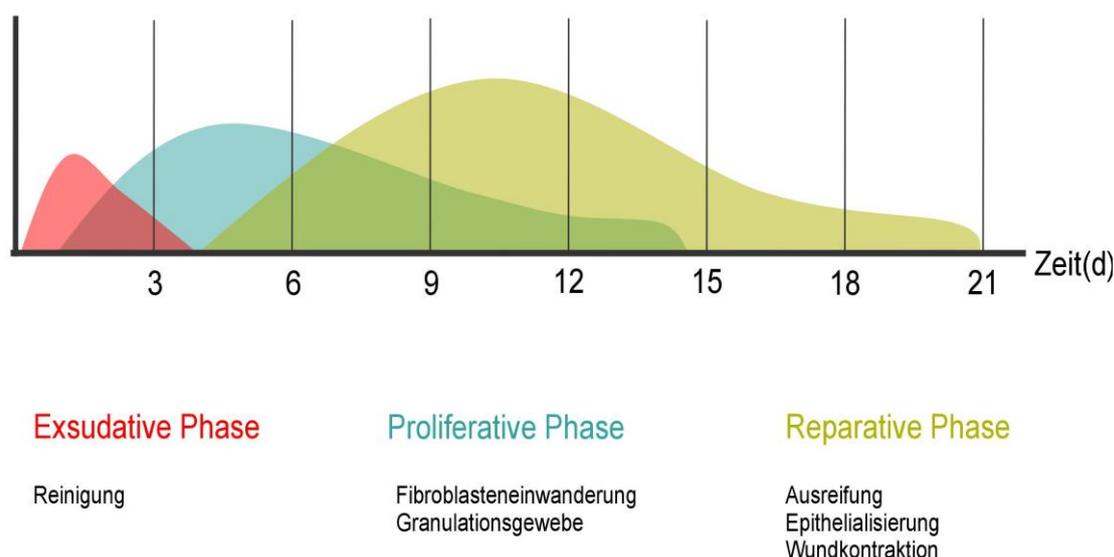


Abb. 1: Phasen der Wundheilung [modifiziert nach Schäffer et al. 1999; Broughton et al. 2006].

1.1.1 Exsudative Phase (Entzündungsphase)

Dauer: wenige Tage

Mit der Wundsetzung treten Blut und Plasma in den extravasalen Raum aus. Verletzte Gefäße kontrahieren schnell, um den Blutverlust gering zu halten. Gleichzeitig aktivieren aus verletzten Zellen ins Geweben freigesetzte Faktoren die Gerinnungs- und Komplementkaskaden. Innerhalb von kurzer Zeit kommt es zu einem provisorischen Wundverschluss, bestehend aus Fibrin, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und Thrombozytenaggregaten. Das in dieser Phase gebildete Fibrin dient später als provisorische Matrix für die zelluläre Migration.

Aktivierte Thrombozyten stellen in dieser Phase der Wundheilung die größte Fraktion an Zellen und sind unerlässlich für den normalen Verlauf der nun folgenden entzündlichen Phase. Sie sezernieren Wachstumsfaktoren wie EGF, PDGF, IGF-1, TGF- β und TNF- α . Diese wirken chemotaktisch u.a. auf Monozyten und neutrophile Granulozyten, die folglich aktiv in die Wunde einwandern [Chen et al. 2009; Schäffer et al. 1999; Hofstädter 1995; Mast et al. 1996; Martin et al. 2005].

Frühe Entzündungsphase:

Nach 48 Stunden ist die höchste Konzentration von Granulozyten erreicht. Sie setzen entzündungsfördernde Zytokine wie TNF- α und Interleukine frei, phagozytieren Bakterien und beseitigen u.a. mit Hilfe von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) denaturierte extrazelluläre Matrixbestandteile. *David et al. (2001)* konnten zeigen, dass in den ersten beiden Tagen vor allem die Aktivität von MMP-9 erhöht ist [David et al. 2001]. Andererseits steigt die Konzentration von MMP-2 und erreicht an Tag 4 die höchste Konzentration [Tarlton et al. 1997]. Die Verletzung induziert somit den Anstieg von MMP-2 und -9, allerdings in unterschiedlichem Maße. Während MMP-2 – verglichen mit unverletzter Haut – eine doppelt so hohe Konzentration erreicht, steigt sie bei MMP-9 bis auf das 10-fache [Agren et al. 2001]. Diese anfängliche Aktivität der beiden Proteinase ist wichtig für das Débridement von zerstörten extrazellulären Proteinen.

Späte Entzündungsphase:

Ab dem zweiten Tag erscheinen Makrophagen im Wundgebiet, die aus den im Blut zirkulierenden Monozyten differenzieren. Sie stellen die größte Zellfraktion zwischen dem 3. und 5. Tag der Heilung. Ihnen kommt bei der initialen Infektabwehr, dem Abräumen avitaler Gewebsanteile sowie der durch lösliche Mediatoren vermittelten Bildung des Granulationsgewebes eine wichtige Bedeutung zu. Neben der Stimulation der Proliferation von Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen durch Bildung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen helfen Makrophagen auch bei der Präsentation von Antigenen. Hierbei werden abgefangene und teilweise auch abgebaute Antigene den Lymphozyten in einer erkennbaren Form präsentiert.

Um den 5. Tag erscheinen auch Lymphozyten in der Wunde und erreichen am 7. Tag der Heilung ihre höchste Konzentration. Während der späten Entzündungsphase bzw. der frühen Reparationsphase modulieren verschiedene Subtypen von

Lymphozyten die bis dahin gebildete provisorische Extrazellulärmatrix, die v.a. aus Fibrin, Fibronectin und Glykosaminoglykanen (v. a. Hyaluronsäure) besteht [Schäffer et al. 1999; Hofstädter 1995; Mast et al. 1996; Hatz 1995].

Die dominierende Metalloproteinasen dieser späten Entzündungsphase sind laut Untersuchungen von *Nwomeh et al. (1998, 1999)* MMP-1 und MMP-8, wobei bei regelrecht heilenden Wunden eher Pro-Formen gefunden werden, in chronischen Wunden dagegen die aktive Form. Die Konzentration von MMP-8 ist am Tag 4 am höchsten, gefolgt von MMP-1 an Tag 7. Während der gesamten Beobachtungszeit ist das Maximum von MMP-8 deutlich höher als das von MMP-1 [Nwomeh et al. 1998]. Auch konnte eine flüchtige Aktivitätserhöhung von MMP-3 von *Arumugram et al.* identifiziert werden, wobei sich diese mit dem Beginn der Wundkontraktion überschneidet [Arumugram et al. 1999].

1.1.2 Proliferative Phase (Reparaturphase)

Dauer: bis zu mehreren Wochen

Die „proliferative“ Phase der Wundheilung ist charakterisiert durch die Neoangiogenese und die Fibroblastenproliferation. Die zuvor gebildete provisorische Matrix wird wieder abgebaut und durch ein gefäßreiches Gewebe, das Granulationsgewebe, ersetzt. Dieses besteht aus einem Netzwerk von Fibroblasten, Entzündungszellen und Endothelzellen. Die Zahl der Makrophagen und der neutrophilen Granulozyten nimmt ab dem 6. Tag kontinuierlich ab, um den 7. Tag sind Fibroblasten die dominierende Zellpopulation. Zusammen mit Endothelzellen und Keratinozyten synthetisieren sie nun vermehrt Wachstumsfaktoren u.a. IGF-1, bFGF, PDGF, VEGF, KGF und Kollagen. Parallel dazu stimuliert VEGF die Neubildung von Blutgefäßen durch Proliferation von Endothelzellen. Das nun neu entstandene Gewebe besteht überwiegend aus Kollagen Typ III, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen wie Chondroitinsulfat und Dermatansulfat [Arnold et al. 1991; Huey et al. 1980; Schäffer et al. 1999; Hofstädter 1995]. Auch in diesem Abschnitt der Wundheilung kommt den Matrix-Metalloproteinasen eine wesentliche Bedeutung zu, denn die Konzentration der aktivierten Form von MMP-2 ist wichtig für die Keratinozytenmigration [Mirastschijski et al. 2002].

1.1.3 Reporative Phase (Differenzierungs-/Umbauphase)

Dauer: mehrere Monate

In diesem Stadium der Wundheilung enden die Angiogenese und die Proliferation, es beginnt die Wundmodulation in dem entstandenen Narbengewebe. Ziel ist die Bildung eines belastungsstabilen Gewebes, das durch den Umbau der Kollagenstruktur gewährleistet wird.

Während zunächst Kollagentyp III in der neuen Matrix einer Wunde dominiert, besteht die reife Narbe ebenso wie normale Haut zu 90% aus Kollagentyp I [Thomas et al. 1995]. Diese Umwandlung von Kollagentyp III in Typ I wird durch induktiv bzw. inhibitorisch wirkende Signalmoleküle (TNF- α , IL-1 β) und des davon abhängigen Konzentrationsgleichgewichts zwischen MMPs und TIMPs ermöglicht. Durch Quervernetzung, Verdickung und Ausrichtung der Kollagenbündel entlang der Belastungsrichtung entsteht schließlich eine belastungsstabile reife Narbe [Schäffer et al. 1999; Struck et al. 1987; Mast et al. 1996].

1.2 Chronische Wunde

1.2.1 Definition

Der Begriff der pathologischen Wundheilung umfasst eine große Spannweite von Wundheilungsanomalien. Diese reicht von einer überschießenden Gewebe-Neubildung z.B. bei hypertrophen Narben und Keloiden auf der einen Seite bis zum vermehrten Gewebeabbau bei der Entstehung chronischer Wunden [Mirastschijski et al. 2002]. Per Definition handelt es sich um eine chronische Wundheilungsstörung, wenn eine Wunde nicht innerhalb von sechs Wochen bis drei Monaten nach dem Auftreten der Verletzung trotz kausaler Therapie abgeheilt ist.

1.2.2 Pathogenese

Während bei der phasengerechten Wundheilung die Entzündungsphase am Anfang der Heilungskaskade steht und von der Reparaturphase abgelöst wird, kommt es bei der chronischen Wunde zu einer rezidivierenden Entzündungsreaktion. Auslösende bzw. unterhaltende Umstände dieser Entzündungsreaktion werden in intrinsische und extrinsische Faktoren eingeteilt. Zu den extrinsischen Ursachen gehören beispiels-

weise neben OP-Kautelen (OP-Dauer, -Technik, -Gebiet, Nahtmaterial) die gleichzeitige Medikation (z.B. Zytostatika), aber auch die Kontamination (mangelnde Asepsis der OP, Drainagen, nosokomiale Infektionen). Demgegenüber stehen intrinsische Auslöser wie Perfusionsstörungen (z.B. pAVK), die Immunitätslage (z.B. HIV-Infektion) und Alter des Patienten, Ernährungszustand (z.B. Tumorkachexie, Adipositas) und die Stoffwechsellage (z.B. Leberzirrhose, Diabetes mellitus) [Lawrence 1992; Dittrich 1971].

Ätiologisch ist derzeit wahrscheinlich die diabetische Stoffwechsellage der häufigste Trigger einer chronischen Wundheilungsstörung. Am Beispiel des diabetischen Fußes als typische Wundheilungsstörung sollen im Folgenden die Zusammenhänge verdeutlicht werden. Bedingt durch einen langfristig bestehenden Diabetes mellitus kommt es zu einer diabetischen Neuropathie. Der Verlust der Sensibilität verhindert das rechtzeitige Erkennen von Fremdkörpern in Schuhen oder Verletzungen an den Füßen. Dies zieht einen erhöhten mechanischen Stress der Ferse und des Kallus nach sich, was wiederum zu intermittierender oder anhaltender Ischämie führt. Demzufolge kommt es zu einem Druckgeschwür.

Zusätzlich zur Neuropathie neigen Diabetiker zu einer Angiopathie. Die Anzahl der Kapillaren ist bei Patienten mit Langzeitdiabetes deutlich vermindert [Schwartz et al. 1999]. Hinzu kommt, dass bei der sogenannten Mikro- und Makroangiopathie eine endotheliale Dysfunktion besteht, mit Verlust der antithrombotischen und anti-inflammatorischen Potenz sowie der mangelnden Reaktionsfähigkeit auf vasodilatatorische Stimuli. Damit kommt es zur Zunahme des oxidativen Stresses, was im Sinne des Circulus vitiosus zu einer weiteren Schädigung des Endothels führt [Janiak et al. 2002].

Im Übrigen kommt es zu einer geringgradigen Infektion, es strömen immer wieder Entzündungszellen in das Wundbett ein und produzieren vermehrt TNF- α und IL-1 β [Ravanti et al. 2000]. Diese beiden Botenstoffe haben entscheidende Wirkung auf die Heilung von Hautwunden. TNF- α -Konzentrationen, wie sie in normalen, nicht-infizierten Hautwunden vorliegen, unterstützen die Heilung; mit dem Fortschreiten des Heilungsprozesses kommt es zu einer stetigen Abnahme ihrer Konzentration. Bei chronischen Wunden jedoch liegen die Konzentrationen von TNF- α und IL-1 β ungefähr 100-fach höher als bei normalen Wunden. Daraus resultiert über mehrere Zwischenschritte eine Steigerung der MMP-Produktion und gleichzeitig eine drastische Reduktion der Bildung von TIMPs [Rayment et al. 2008]. Es folgt ein reziprokes Konzentrationsverhältnis zwischen MMPs und TIMPs (MMPs $\uparrow\uparrow$, TIMPs $\downarrow\downarrow$), das

schließlich zum Abbau von essentiellen Matrixbestandteilen und zur Degradation von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren führt. Die Wunde wird oder bleibt chronisch, d.h. sie verbleibt in der Entzündungsphase und kann nicht in die Reparatur- bzw. Umbauphase übergehen [Mast et al. 1996]. Die komplexen Vorgänge der normalen bzw. gestörten Wundheilung sind in Abbildung 2 schematisch gegenübergestellt.

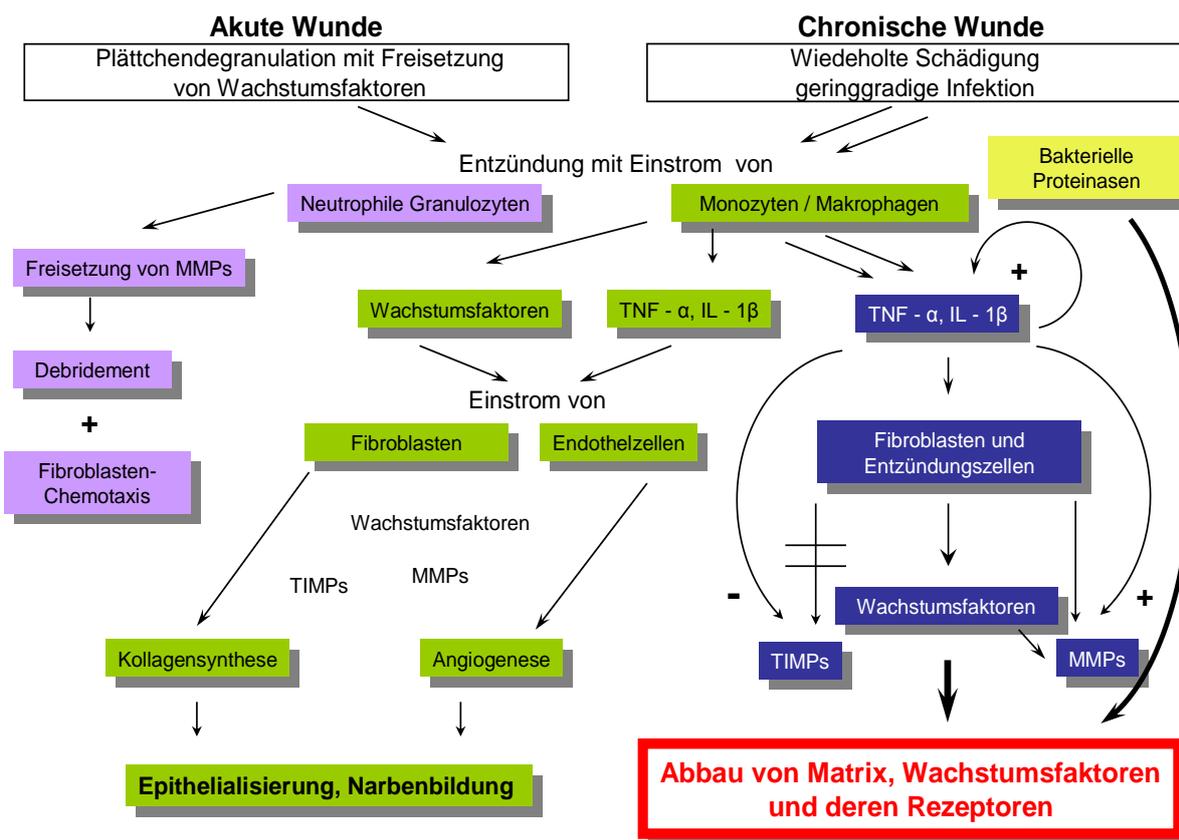


Abb. 2: Regelrechte Wundheilung und Wundheilungsstörung [zusammengestellt aus Tarnuzzer et al. 1996; Trengrove et al. 1999; Mast et al. 1996; Murphy et al. 1980]

Auf der Basis der oben geschilderten pathophysiologischen Zusammenhängen sind verschiedene Schlüsselmechanismen der Regulation erkennbar, an denen eine potentielle Therapie ansetzen könnte:

- Wachstumsfaktoren
- Zytokine
- Metalloproteinasen und Proteinase-Inhibitoren

Aus Abbildung 2 wird ersichtlich, dass MMPs und TIMPs eine besonders wichtige

Stellung bei den komplexen Schritten der Wundheilung einnehmen, so dass wir uns auf diese Enzymgruppen konzentriert haben.

1.3 Matrix-Metalloproteinasen

1.3.1 Systematik

Matrix-Metalloproteinasen bilden eine Familie Zink-abhängiger Endopeptidasen, die in ihrer Struktur und Funktion einander ähnlich sind, sich in ihrer Substratspezifität jedoch unterscheiden. Sie kommen in nahezu allen Geweben vor und werden von vielen Zellpopulationen (u. a. Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Granulozyten und Makrophagen) konstitutiv oder induziert exprimiert und sezerniert [Parsons et al. 1997; Mauch 1998; Lafleur et al. 2001]. Derzeit sind 25 verschiedene MMPs beschrieben, wovon ≥ 21 in humanem Gewebe nachgewiesen wurden [Egeblad et al. 2002; Visse et al. 2003; Massova et al. 1998, Parks et al. 2004]. Ursprünglich wurden die MMPs aufgrund ihrer Substratspezifität im Wesentlichen in sechs Gruppen unterteilt (s.a. Tabelle 1):

- Kollagenasen
- Stromelysine
- Matrilysine
- Gelatinasen
- MT-MMPs
- noch nicht klassifizierte MMPs

Kollagenasen

Die Kollagenasen sind die als erstes entdeckten und am besten untersuchten MMPs. Zu ihnen zählen MMP-1, MMP-8, MMP-13 und MMP-18. Sie katalysieren den ersten Schritt bei der Degradation von faserigem Kollagen Typ I und III, indem sie die native Tripelhelix in zwei unterschiedlich grosse Fragmente spalten. Diese zerfallen dann spontan bei physiologischen Temperaturen in kleinere Peptide, die von unspezifischeren Proteasen, aber auch von Metalloproteinasen weiter abgebaut werden können [Mauch 1998]. Da Kollagenasen die einzigen bekannten Säugetier-Proteinasen sind, die in der Lage sind, faserige Kollagene zu spalten, ist ihre Anwesenheit unerlässlich für den Umbau von Geweben mit viel Kollagen, zu denen auch die Haut gehört.

Stromelysine

Unter diesem Begriff werden die MMPs -3, -10 und -11 subsumiert. Sie haben eine breite Substratspezifität und degradieren verschiedenste Bestandteile der extrazellulären Matrix, aber auch viele andere Proteine wie z.B. TNF- α -Vorstufen.

Matrilysine

Zu dieser Gruppe gehören MMP-7 und MMP-26. Bedingt durch das Fehlen der Haemopexin-ähnlichen Domäne haben sie das niedrigste Molekulargewicht unter den MMPs.

Gelatinasen

Gelatinase A (MMP-2) und Gelatinase B (MMP-9) bauen Kollagene der Basalmembranen sowie denaturierte Kollagene (Kollagen IV) und Gelatine ab. MMP-2 ist vielleicht die am weitesten verbreitete Proteinase und wurde u.a. in Hautfibroblasten, Keratinozyten, Chondrozyten, Endothelzellen, Monozyten und anderen normalen und transformierten Zellen gefunden. MMP-9 wird in Keratinozyten, Leukozyten, Monozyten, Makrophagen und in einigen malignen oder transformierten Zellen produziert.

MT-MMPs

Die Membran-Typ-Metalloproteinasen sind eine erst später entdeckte Subgruppe der MMP-Familie, die sich durch eine transmembrane Domäne auszeichnen. Sie sind deshalb mit der Zellmembran verbunden und entfalten ihre Aktivität an der Zelloberfläche. MMP-14 und MMP-16 spielen insbesondere bei der Aktivierung von MMP-2 eine Rolle. Neuere Untersuchungen zeigen, dass MMP-14 aber auch in der Lage ist, unterschiedliche extrazelluläre Matrixproteine selbst abzubauen [Pei et al. 1995].

Noch nicht klassifizierte MMPs

Derzeit zählen sieben MMPs zu dieser Gruppe. MMP-12 wird hauptsächlich von Makrophagen sezerniert und degradiert viele verschiedene Proteine (Tab. 1). MMP-19 wurde bei Patienten mit rheumatoider Arthritis gefunden, daher zunächst der Name RASI-1. MMP-20 scheint bisher eine zahnspezifische MMP zu sein; ihre Sekretion ist beschränkt auf Zahnzellen. MMP-22 wird in Fibroblasten von Hühnern gebildet und verdaut Gelatine. MMP-23 ist ein transmembranales Protein und wird in

reproduktiven Geweben gebildet. Die Sekretion der erst kürzlich entdeckten MMP-28 scheint eine Rolle bei der Hämostase und Wundheilung zu spielen [Ahtikoski 2003].

Untergruppe / Synonym	MMP	Substrate	Aktivatoren
Kollagenasen			
Interstitialkollagenase	MMP-1	fibrilläres und nicht fibrilläres Kollagen (Typ I, II, III, VI, X) Gelatin, Entaktin, Aggrecan, Versican	Plasmin MMP-3, MMP-7, MMP-10
Neutrophilen-Kollagenase	MMP-8	fibrilläre Kollagene (Typ I, II, III, VII, VIII, X), Proteoglykane	MMP-3, MMP-7, MMP-10
Kollagenase-3	MMP-13	fibrilläre Kollagene (Typ I, II, III, IV, IX, X, XIV), Gelatin, Perlecan	Plasmin, MT-MMP, MMP-14 MMP-2, MMP-3, MMP-10
Kollagenase-4	MMP-18	Kollagene (Typ I, II, III) (kein humanes Ortholog)	
Stromelysine			
Stromelysin	MMP-3	Proteoglykane, Laminin, Fibronectin, Gelatin, Elastin, Kollagene (Typ II, IV, IX, X, XI)	Plasmin, Tryptase
Stromelysin-2	MMP-10	Entactin, pro-MMP-5, Kollagen Typ III, IV, V, Fibronectin	Elastase
Stromelysin-3	MMP-11	Serpine, α -Protienase-Inhibitor, Aggrecan, Laminin	Furin
Matrilysine			
Matrilysin-1, PUMP-1	MMP-7	fibrilläre Kollagene (Typ I, II, III), Proteoglykane, Laminin	MMP-3, MMP-7, MMP-10
Matrilysin-2, Endometase	MMP-26	Gelatin, Kollagen Typ IV, Fibronectin	
Gelatinasen			
Gelatinase A	MMP-2	Gelatin, Laminin, Fibronectin, Elastin Kollagene (Typ I, II, III, IV, V, VII, X, XI)	MT-MMP MMP-1, MMP-13
Gelatinase B	MMP-9	Gelatin, Kollagen (Typ IV, V, VII, XIV), Fibronectin, Elastin	Plasmin, MT-MMP MMP-3, MMP-13, MMP-27
MT-MMPs			
MT1-MMP	MMP-14	Pro-MMP-2, Pro-MMP-13, Gelatin, Kollagene (Typ I, II, III)	Furin, Plasmin
MT2-MMP	MMP-15	Pro-MMP-2, Fibronectin, Gelatin, Tenascin C, Laminin	
MT3-MMP	MMP-16	Pro-MMP-2, Kollagen Typ III, Fibronectin, Gelatin	MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	Gelatin, Fibrin, Fibrinogen	
MT5-MMP	MMP-24	Pro-MMP-2, Pro-MMP-9, Fibronectin, Gelatin	
MT6-MMP	MMP-25	Pro-MMP-2, Kollagen Typ IV, Gelatin, Fibronectin	
Andere MMPs			
Metallo-Elastase	MMP-12	Elastin, Kollagen IV, Laminin, Fibronectin, Gelatin	
RASI-1	MMP-19	Gelatin, Kollagen IV, Laminin	
Enamelysin	MMP-20	Amelogenin, Gelatin	MT1-MMP
X-MMP	MMP-21	?	
MMP-27, C-MMP	MMP-22	Gelatin	
CA-MMP	MMP-23A	?	
-	MMP-23B	?	
Epilysin	MMP-28	?	Furin

Tab. 1: Die Familie der Matrix-Metalloproteinasen [zusammengestellt aus Mauch 1998; Parsons et al. 1997; Weckroth et al. 1996; Stracke et al. 2000; Uria et al. 2000; Ahtikoski 2003; Visse et al. 2003; Kontogiorgis et al. 2005; Chakraborti et al. 2003].

1.3.2 Struktur

Die Erkenntnis, dass die Substratspezifität der MMPs wesentlich breiter als initial angenommen ist, führte dazu, dass die initiale Klassifikation anhand ihrer Substrate nicht mehr sinnvoll erschien. Sie wurden deshalb durch eine sequentielle Nummerierung der MMPs abgelöst. Erst die Aufklärung der Primär- und Tertiärstrukturen führte zu der heute üblichen „strukturellen“ Einteilung.

Charakteristisch für alle MMPs ist ihre Domänenstruktur. Alle MMPs bestehen mindestens aus einer Prä-, Pro- und katalytische Domäne. Bei einigen MMP-Subtypen werden diese Haupt-Domänen ergänzt durch einige weitere Domänen (Abb. 3). Diese funktionellen Untereinheiten bestehen aus je 10-100 Aminosäure-Resten und sind durch eine oder mehrere Disulfidbrücken stabilisiert [Bork et al. 1996].

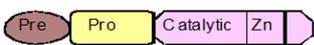
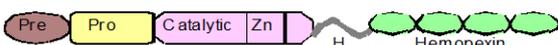
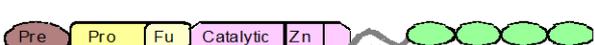
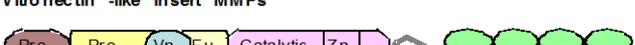
Minimal -domain MMPs 	MMP -7 MMP -26
Simple hemopexin -domain -containing MMPs 	MMP -1 MMP -10 MMP -19 MMP -3 MMP -12 MMP -8 MMP -13
Gelatin -binding MMPs 	MMP -2 MMP -9
Furin-activated secreted MMPs 	MMP -11 MMP -28
Vitronectin -like insert MMPs 	MMP -21
Transmembrane MMPs 	MMP -14 MMP -16 MMP -15 MMP -24
GPI -anchored MMPs 	MMP -17 MMP -25
Type II transmembrane MMPs 	MMP -23

Abb. 3: Einteilung der MMPs entsprechend ihrer Proteinstruktur [modif. nach Egeblad et al. 2002]:

Pre	Prä-Domäne, Signalpeptid	Fi	Fibronektin-ähnl. Wiederholungen
Pro	Propeptid	Hemopexin	Hämopexin-ähnl. Domäne
Catalytic	katalytische Domäne	TM	Transmembran-Domäne
Fu	Furin-Spaltstelle	CA	Cystein-Anker
H	Hinge-Region	Ig-like	Immunglobulin-ähnl. Domäne
Vn	Vitronectin-ähnl. Domäne	Cy	cytoplasmatische Domäne
SA	Signalanker		

Das Signalpeptid

Die N-terminale Prä-Domäne, auch Signalpeptid genannt, besteht aus etwa 25 Aminosäuren. Während der Proteinsynthese kennzeichnet sie das entstehende Protein als sekretorisches Protein und dirigiert den Transport in den extrazellulären Raum [Visse et al. 2003].

Das Propeptid

Die darauf folgende, etwa 80 Aminosäuren umfassende Pro-Domäne dient als interner Inhibitor. Ein Zysteinrest innerhalb einer hoch konservierten Sequenz dieser Domäne bindet an das Zink-Ion des katalytischen Zentrums und hält dadurch das Enzym in einem inaktiven Zustand. Diese Zystein-Zink-Bindung führt zu einer Faltung des Propeptids über die katalytische Domäne und verhindert den Zugang vom Substrat in das aktive Zentrum des Enzyms [Van Wart et al. 1990].

Die Furin-Spaltstelle

Einige MMPs besitzen am C-terminalen Ende des Propeptids ein aus 10 Aminosäuren bestehendes Erkennungsmotiv für Furin-ähnliche Serinproteasen. Sie können deshalb vor bzw. während der Sekretion in den extrazellulären Raum durch Furin-ähnliche Proprotein-Konvertasen aktiviert werden [Pei et al. 1995, Caley et al. 2015].

Die katalytische Domäne

Die katalytische Domäne umfasst circa 170 Aminosäuren und beherbergt das katalytische Zentrum mit einem Zink-Ion, welches für die proteolytische Aktivität essentiell ist [Wetmore et al. 1996; Bode et al. 1999; Housley et al. 1993]. Die Gelatinasen weisen einen etwa 175 Aminosäure großen Abschnitt auf, der in die katalytische Domäne inseriert ist. Diese Insertion besteht aus drei Wiederholungen, die dem Typ II-Motiv der kollagenbindenden Domäne des Fibronektins ähneln, und ist wesentlich für die Substratspezifität dieser Enzyme (vgl. Abb. 3).

Die Hämapexin-ähnliche Domäne

Bei nahezu allen MMPs (außer bei MMP-7, -23 und -26) schließt sich an das C-terminale Ende der katalytischen Domäne die Hämapexin-ähnliche Domäne an, die über eine prolinreiche, flexible Verbindungsregion, „hinge-Region“ genannt, verbunden ist. Die Hämapexin-ähnliche Domäne weist circa 200 Aminosäuren auf und ist für die Substratspezifität mit verantwortlich, insbesondere bei MMP-1, -3, -10

und -11. Sie ist für die proteolytische Aktivität der MMPs nicht essentiell, vermittelt aber die Wechselbeziehung zwischen MMPs und ihren physiologischen Substraten und Inhibitoren, den TIMPs [Sanchez-Lopez et al. 1993; Gomis-Rüth et al. 1997].

Die Transmembran-Domäne

Die membrangebundenen MMPs (MT-MMPs) werden nach ihrer unterschiedlichen Verankerung in der Membran in drei Gruppen eingeteilt. Die Typ I - transmembranen MMPs (MMP-14, -15, -16 und -24) enthalten neben der Transmembran-Domäne eine aus etwa 20 Aminosäuren bestehende zytoplasmatische Domäne. Bei der Transmembran-MMP Typ II (MMP-23) grenzt direkt an das katalytische Zentrum eine Cysteinreiche Region, gefolgt von einer hydrophoben Region von 17 Aminosäuren und der Immunglobulin-ähnlichen Domäne. Die letzte Untergruppe bilden MMP-17 und MMP-25, die durch einen Glykosyl-Phosphatid-Inositol-Anker (GPI-Anker) mit der Membran verbunden sind [Egeblad et al. 2002].

1.3.3 Biologische Funktionen

Die extrazelluläre Matrix ist nicht nur ein essentielles Gerüst der Gewebe und Bindeglied für unterschiedliche Zellen, vielmehr finden hier unzählige biologische Abläufe statt. MMPs sind in der Lage, unterschiedliche extrazelluläre Matrixanteile zu spalten und sind somit an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Einige der wesentlichen Funktionen der MMPs sind [Moses 1997; Mauch 1998; Hatz 1995]:

- Regelung von Zellmigration in unterschiedlichen Geweben [Gill et al. 2008]
- Fragmentation von Basalmembranen und Degradation von extrazellulären Matrixanteilen
- Abbau von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren an Zielzellen [Mast et al. 1996]

1.3.4 Regulation der MMP-Aktivität

Zum Schutz vor überschießenden, pathologischen Reaktionen ist die Regulation der Aktivität der MMPs von essentieller Bedeutung. MMPs werden daher auf verschiedenen Ebenen wie Transkription, Expression, Aktivierung und Inhibition sowie durch ihre Lokalisation (extra-intrazellulär) und durch die Substratspezifität

streng reguliert [Sternlicht et al. 2000; Parks et al. 2004].

Synthese und Sekretion

Die erste Kontrollstufe ist die Transkriptionsebene. Die Expression von MMPs wird durch eine Vielzahl stimulierender und supprimierender Faktoren kontrolliert [Nagase 1997]. Während z.B. TNF- α , IL-1 β , EGF oder PDGF die Produktion der MMPs stimulieren, können TGF- β , γ -Interferon, IL-4 und IL-10 sie inhibieren [Zhang et al. 1998; Trengrove et al. 1999; Hatz 1995; McLennan et al. 2000]. Eine weitere Regulation der MMPs erfolgt über die Steuerung der Freisetzung intrazellulär gespeicherter MMPs [Sternlicht et al. 2000; Benyon et al. 2001; Overall et al. 1991].

Zymogen-Aktivierung

Die MMPs werden, wie nahezu alle Proteasen, als inaktive Vorstufen - Zymogene - produziert und müssen aktiviert werden, um eine Wirkung entfalten zu können. Die Pro-Enzyme können *in vivo* durch Proteasen wie Plasmin, Trypsin, Chymotrypsin, Kathepsine und Kallikreine, sowie *in vitro* chemisch durch Reagenzien wie z.B. Quecksilber(II)chlorid oder APMA (4-AminoPhenylMercuric Acetate) aktiviert werden [Nagase et al. 1992]. MMPs werden in der Regel nach der Sekretion im Extrazellulärraum aktiviert, Ausnahmen bilden MMP-11 und MMP-14, für welche auch eine intrazelluläre Aktivierung nachgewiesen werden konnte [Pei et al. 1995; Sato et al. 1996].

Viele Metalloproteinasen besitzen selbst die Fähigkeit, andere Mitglieder der MMP-Familie zu aktivieren [Parsons et al. 1997; Zhao et al. 2004]. Die MMPs bilden somit ein Netzwerk und kooperieren eng miteinander. Die Aktivierung eines Enzyms kann folglich eine komplette Kaskade der Enzym-Aktivierung in Gang setzen (Abb. 4).

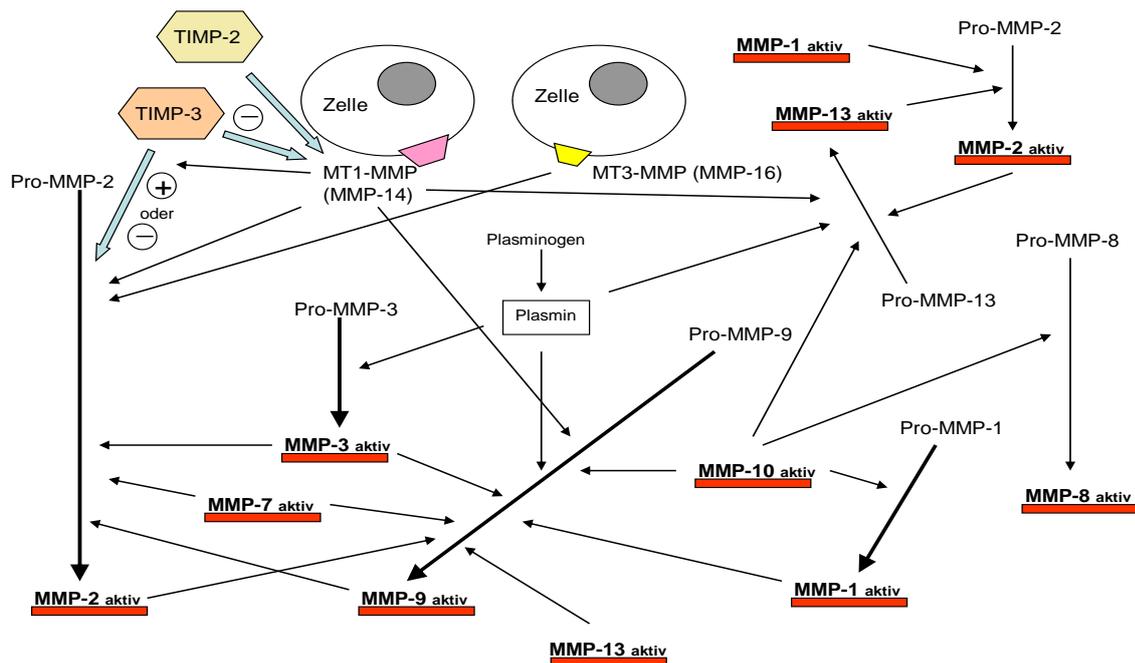


Abb. 4: Aktivierungskaskaden der MMPs [zusammengestellt aus Parsons et al. 1997; Toth et al. 2003; Knauper et al. 1996; Okada et al. 1997; Brown 1999; Wysocki et al. 1999; Rechart et al. 2000; Zhao et al. 2004; Cowell et al. 1998; Ahtikoski 2003, Visse et al. 2003; Pei et al. 1996].

1.3.5 Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinasen (TIMPs)

Eine wesentliche Ebene der Regulation bilden die physiologischen Inhibitoren der MMPs, die TIMPs, die die Aktivität der MMPs sehr effizient hemmen können [Nagase et al. 1999; Gill et al. 2008]. TIMP-1 wurde erstmals 1975 in Zellkultur-Medien humaner Fibroblasten und in humanem Serum nachgewiesen [Bauer et al. 1975] und ist in der Lage, Kollagenase-Aktivität zu hemmen [Woolley et al. 1975, Gasson et al. 1985]. Seither wurden weitere 3 TIMPs (TIMP-2, -3 und -4) beschrieben [Brew et al. 2000]. Es handelt sich um kleine Proteine mit 21 bis 28 kDa, die von vielen unterschiedlichen Zellpopulationen sezerniert werden. Die TIMPs sind hinsichtlich Sequenz und Proteinstruktur eng verwandt. Sie besitzen eine N- und eine C-terminale Domäne, bestehend aus etwa 125 und 65 Aminosäuren, die jeweils durch drei Disulfidbrücken stabilisiert werden. TIMP-1 (28 kDa) und -3 (24 kDa) sind glykosyliert, TIMP-2 (22 kDa) und TIMP-4 (23 kDa) hingegen nicht [Magdolen et al. 2002; Apte et al. 1995] (Abb. 5).

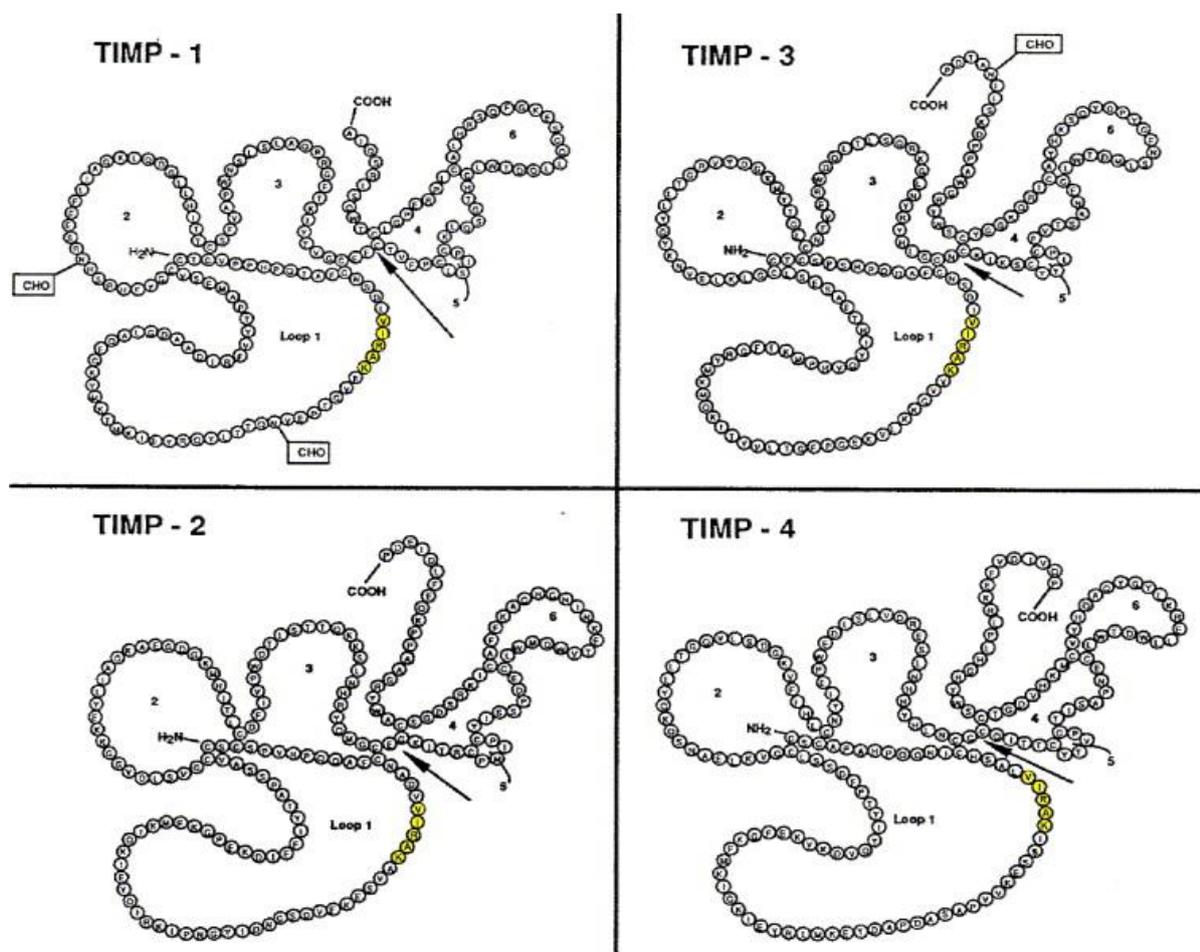


Abb. 5: Primärstrukturen der TIMPs [Lambert et al. 2004]. Die Pfeile markieren die Verbindungsstellen der N- und C-terminalen Domäne.

Alle TIMPs haben die Fähigkeit, MMPs zu inhibieren, sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Affinität zu bestimmten MMPs, ihrer Regulation und ihrer Löslichkeit: TIMP-1, -2 und -4 liegen in löslicher Form vor, TIMP-3 ist an die extrazelluläre Matrix gebunden [Vaalamo et al. 1996; Lambert et al. 2004, Nieuwesteeg et al. 2014]. Die unterschiedlichen TIMPs werden von Keratinozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelialzellen sezerniert [Gomez et al. 1997], können aber auch an der Zelloberfläche gebunden (wie TIMP-3) oder mit membrangebundenen MMPs assoziiert vorkommen [Magdolen et al. 2002]. TIMP-2 kann v.a. in Plazentagewebe [Nissi et al. 2013], TIMP-1 hauptsächlich in Knochen- und Ovarialgewebe [Hu et al. 2012] nachgewiesen werden. TIMP-3 wird während Knochen- und Haarwachstum exprimiert [Higgins et al. 2011] und konnte auch aus Haut-, Brust- und Dickdarm-Gewebe sowie aus Gewebe von Darmgeschwüren [Bell et al. 2014] isoliert werden.

Da angenommen wird, dass Wundheilungsstörungen ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs zugrundeliegt, liegt der Gedanke nahe, dass der Überschuss an

MMP durch die Applikation von exogenen TIMPs therapeutisch angegangen werden kann. Aufgrund des relativ hohen Molekulargewichts der TIMPs (20 bis 30 kDa) und ihrer kurzen biologischen Halbwertszeit eignen sie sich jedoch nicht für eine pharmakologische Therapie [Wojtowicz-Praga et al. 1997], so dass hier primär synthetische Inhibitoren zum Einsatz kommen müssen.

1.4 Synthetische Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren (MMPI)

Die MMPs sind bei vielen physiologischen Prozessen, aber auch Erkrankungen maßgeblich beteiligt. Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass sie insbesondere bei Entzündungen wie Arthritis [Vincenti et al. 2002] und Periodontitis [Oyarzún et al. 2010], aber auch bei der Tumorinvasion und Metastasierung eine wichtige Rolle spielen [Kaehaeri et al. 1999]. Aufgrund der Beteiligung beim Tumorgeschehen standen MMP-Inhibitoren über lange Zeit im Mittelpunkt der pharmazeutischen Forschung.

1.4.1 MMPIs in klinischen Studien

Die Entwicklung synthetischer MMP-Inhibitoren basierte initial auf der Chelierung des im katalytischen Zentrum befindlichen Zink-Ions. Anhand der Position des Zink-bindenden Liganden können MMPIs in C- und N-terminale Inhibitoren eingeteilt werden. Untersuchungen zeigten jedoch sehr früh, dass C-terminale Inhibitoren ein deutlich höheres inhibitorisches Potential besaßen als N-terminale [Moore et al. 1986]. Die Kombination, d.h. eine zentrale chelierende Gruppe, führte schließlich zu Inhibitoren, die neben einer guten Selektivität auch adäquate Hemmwirkungen zeigten [Krumme et al. 1998; Schröder et al. 2001; Gavuzzo et al. 2000].

Erste Vertreter der sogenannten „first generation“ MMP-Inhibitoren waren Batimastat und Marimastat. Batimastat wies *in vitro* ein sehr hohes inhibitorisches Potential auf und wurde bei T-Zell-Lymphomen *in vivo* eingesetzt. Doch die überraschende Begünstigung der Bildung von Lebermetastasen [Kruger et al. 2001] sowie die fehlende orale Bioverfügbarkeit führte bald zur Entwicklung von Marimastat mit verbessertem Löslichkeitsverhalten und der Möglichkeit der oralen Applikation [Millar et al. 1998]. Der Einsatz des Marimastat zeigte jedoch in Phase-II-Studien an Patienten mit fortgeschrittenem Pankreas- [Bramhall et al. 2001] wie auch Magen-Carcinom [Nelson et al. 2000] keine signifikanten Unterschiede in Überlebenszeit zur Kontrollgruppe. Probleme mit der metabolischen Instabilität der damals entwickelten Substanzen und weitere erhebliche Nebenwirkungen bei *in vivo*-Versuchen führten zum vorzeitigen Abbruch

der Studien [Rudek et al. 2001] und zur intensivierten Entwicklung der „second generation“ Inhibitoren, zu denen unter anderem Tanomastat, Metastat und Prinomastat gehören. Im Vergleich zu den „first generation“ Inhibitoren zeichnen sich diese neuen MMPI durch eine bessere metabolische Stabilität und eine bessere MMP-Selektivität aus [Hirte et al. 2006]. Metastat zeigte in klinischen Studien einen inhibitorischen Effekt auf Osteosarkomzellen [Lukkonen et al. 2000], während bei Gabe von Prinomastat bei fortgeschrittenem Lungen- und Prostata-Carcinom stabile Krankheitsverläufe über einige Monate erreicht werden konnte [Lee et al. 2001].

Später wurden weitere hochselektive synthetische MMPI entwickelt, die andere MMPs oder Gruppen hemmen. Sie fanden in unterschiedlichen Bereichen Anwendung und wurden teilweise auch in klinischen Studien untersucht [Lein et al. 2002]. Viele dieser Studien mussten jedoch aufgrund Nebenwirkungen, fehlender Effektivität und hoher Toxizität vorzeitig abgebrochen werden [Santos et al. 1997; Tamura et al. 1998]. Einige der Inhibitoren und ihre Einsatzgebiete sind in Tabelle 2 dargestellt.

Gesellschaft	Inhibitorname	Einsatzgebiet
Agouron	Prinomastat (AG3340)	Tumor
Bayer	Tanomastat (BAY 12-9566)	Tumor
British Biotech	Marimastat (BB-2516)	Tumor
British Biotech	Batimastat (BB94)	Tumor
Novartis	CGS 27023A	Tumor
Chiroscience	D2163	Tumor
Chiroscience	D1927	Tumor
CollaGenex	Metastat (Col-3)	Tumor
Bristol-Myers Squibb	BMS-275291	Tumor
Chiroscience	D5410	entzündl. Darmerkr.
British Biotech	BB-3644	Multiple Sklerose
Roche	Ro 32-3555	Arthritis
Roche	Ro 28-2653	Tumor
Roche Biosciences	RS 130830	Osteoarthritis

Tab. 2: Synthetische MMPI [modifiziert nach Brown 1999; Borchert 2003; Coussens 2002; Hirte et al. 2006; Lewis et al. 1997; Brouwer et al. 2013, Liechti et al. 2015].

1.4.2 Der Inhibitor Ro 28-2653

Ro 28-2653 gehört in die Gruppe der Pyrimidin-2,4,6-trione-Derivate, die seit Langem als Sedativa und Antiepileptika klinisch verwendet werden. Grams *et al.* bemerkten 2001 im Rahmen von Untersuchungen, dass diese Substanz die Fähigkeit besitzt, sehr effizient Zink zu chelieren und MMPs zu inhibieren [Grams *et al.* 2001]. Die bereits klinisch erprobte Bioverfügbarkeit von 30-60% legte nahe, diese Substanz hinsichtlich der MMP-Selektivität zu optimieren. Im Rahmen der chemischen Weiterentwicklung entstand schließlich ein Inhibitor mit einer deutlichen Selektivität gegenüber MMP-2, MMP-9, MT1- (= MMP-14) und MT3-MMP (= MMP-16) [Lein *et al.* 2002]. Zur gleichen Zeit entdeckte auch Roche Nutley die Leitstruktur der Inhibitorsubstanz unabhängig von Grams' Forschergruppe – es entstand Ro 28-2653 [Maquoi *et al.* 2004] (Abb. 6). Die *in vitro*-Wirksamkeit gegenüber weitere MMPs von Ro 28-2653 im Vergleich zu Batimastat ist in der Tabelle 3 dargestellt.

MMP	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8	MMP-9	MMP-14	MMP-16
Ro 28-2653	16000	10	1800	15	12	10	23
Batimastat	25	32	67	27	23	19	29

Tab. 3: IC₅₀ – Werte (mittlere inhibitorische Konzentration) von Ro 28-2653 und Batimastat [Grams *et al.* 2001]. Wertangaben in nM.

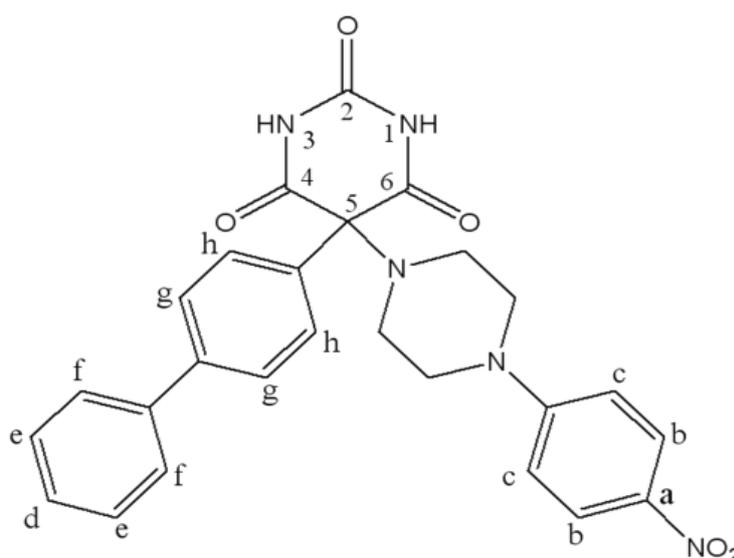


Abb. 6: Chemische Struktur von Ro 28-2653 (auch Icol genannt) [aus Piette *et al.* 2006]

Im Gegensatz zu den „first generation“ Inhibitoren zeigte sich bei dieser Substanzklasse ein einheitlicheres Wirkungsprofil ohne die von Marimastat und Batimastat bekannte paradoxe Regulation bestimmter MMPs, wie zum Beispiel der Angiogenese-stimulierenden MMP-9 [Maquoi et al. 2004]. Desweiteren konnte nur eine geringe Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität, die Ausdruck einer zytotoxischen und apoptoseinduzierenden Wirkung sein kann, nachgewiesen und ein deutlich selteneres Auftreten von unerwünschten muskulo-skelettalen Nebenwirkungen beobachtet werden [Opalka et al. 2002].

Der Effekt von Ro 28-2653 wurde in mehreren *in vivo* Studien mit sehr unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Positive Auswirkungen konnten bei Schlaganfall [Nagel et al. 2011], gegen Tumorinvasion [Lein et al. 2002], Angiogenese [Maquoi et al. 2004], Tumorwachstum und Metastasierung bereits gesichert werden [Arlt et al. 2002].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Der phasengerechte Ablauf von der Wundheilung wird elementar beeinflusst durch das Vorkommen und Gleichgewicht von unterschiedlichsten Mediatoren. Die lokale Ausgewogenheit von MMPs und deren Inhibitoren, den TIMPs, hat dabei eine große Bedeutung. Die erhöhte Aktivität von Metalloproteinasen führt zum vermehrten Abbau wichtiger Proteine, Mediatoren und Wachstumsfaktoren in der Wunde und könnte zur Entstehung eines gestörten Wundmilieus beitragen.

Ziel dieser Studie war es daher, die Wirkung der topischen Gabe eines MMPI (Ro 28 26-53) makroskopisch wie mikroskopisch zu untersuchen. Hierzu sollte zunächst ein Tiermodell für chronische (diabetische) Wunden etabliert und die lokale Wirkung von Ro 28-2653 hinsichtlich Granulation und Epithelialisierung bei Tieren mit regelrechter und diabetischer Stoffwechsellage mittels Fotometrie und Histologie untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellen

Tiere

Sprague Dawley-Ratten
Firma Elevage Janvier, Le Genest-Saint
Isle, Frankreich

Tierhaltung

Einzelkäfig Macrolon
Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen
Altromin[®]- Standard-Diät Ratten
Altromin GmbH & Co. KG, Lage

Wundsetzung und Verbandswechsel

'Narkosekammer' Sharps Containers	BD, Franklin Lakes, USA
Narkosetopf Vapor 19.1	Drägerwerk AG, Lübeck
OP-Tisch	Meuwing-Braun Süssel, Germering
OP-Leuchte	Berchtold, Tuttlingen
Wärmematte Acculux	Witte + Sutor GmbH, Murrhardt
Schermaschine/Scherkopf	Hauptner, München
Waage Multina plus	Soehnle GmbH & Co. KG, Murrhardt
Besteck-Wanne	Warwick Sasco Ltd., UK
Präparierinstrumente	Aesculap, Tuttlingen
Faden Monofil Prolene 3/0	Ethicon, Norderstedt
Sterile Handschuhe Micro-Touch	Johnson & Johnson, USA
Implantat: Polyethylen Dichtungstopfen	Späh GmbH & Co. KG, Scheer
Revolverlochzange	Kayser, Plaidt
Inzisionsfolie Opsite 10*14 cm	Smith & Nephew, England
Kompressen Gazin, 16fach, steril	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf
Mullbinden, Moll elast [®] haft, 6 cm*4m	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf
Klebeband	Johnson & Johnson, USA
Glucometer Elite 2000 + Sensoren	Bayer, Leverkusen
Präzisionswaage Precisa	Sartorius, Göttingen
Olympus Digital Camera C2500L	Olympus Optical Co. Ltd., Japan
MMP-Inhibitor Ro 28-2653	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

Wundspülung und Gewebeentnahme

Varipette	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen ep T.I.P.S.	Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen Discardit II, 2 ml, steril	Becton & Dickinson, USA
Einmalspritzen Discardit II, 20 ml, steril	Becton & Dickinson, USA
Microlance 3, 0,7*30 mm, steril	Becton & Dickinson, USA
Skalpell Feather [®] Gr. 11 und Gr. 20	Feather Safety Razor, Japan

Chemikalien und Lösungen

Isofluran, 250 ml	Abbott, USA
Narcoren	Merial GmbH, Hallbergmoos
Pentobarbital-Natrium	Merial GmbH, Hallbergmoos
Streptozotozin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaCl, 0,9 %, 50 ml, steril	Deltaselect GmbH, München

Histologische Arbeiten

Shandon Processor 2LE	Shandon Southern Products, England
Rotationsmikrotom HM 355	Microm International GmbH, Walldorf
Klingen N35H	Feather, Japan
Objektträger Super Frost	Menzel, Burgdorf
Deckgläser	Menzel, Burgdorf
Eukitt [®]	O. Kindler GmbH u. Co., Freiburg
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Lichtmikroskop Axioskop	Carl Zeiss, Jena
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glyzerin, Xylol, Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Paraplast [®]	Carl Roth GmbH u. Co. KG, Karlsruhe
Mayers Hämalau	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt
Resorcin-Fuchsin nach Weigert	Waldeck Division Chroma, Münster
Eisenhämatoxylin A nach Weigert	Waldeck Division Chroma, Münster
Eisenhämatoxylin B nach Weigert	Waldeck Division Chroma, Münster
Pikrofuchsin van Gieson	Waldeck Division Chroma, Münster

Software

Tracer, Version 2.0	University of Glamorgan, UK
Bildanalyse KS 400, Version 3.9	Cals Zeiss Vision, Jena
SigmaStat, Version 3.0	SPSS Inc., USA
SigmaPlot, Version 8.0	SPSS Inc., USA

2.2 Tierkollektiv und Tiermodell

Die initialen Untersuchungen zur Etablierung des Wundheilungs-Modells, insbesondere die Konzeption, die Induktion der diabetischen Stoffwechsellage, Fotodokumentation und Planimetrie der Wunden wurden gemeinsam mit Herrn Dr. med. Okan Safak im Tierlabor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt [Safak 2011].

Die Studie wurde von der Tierschutzkommission der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 211-2531-112/99) und erfolgte unter Beachtung des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland von 1990. Die Haltung der Tiere richtete sich nach den vorgeschriebenen Richtlinien.

Die Untersuchung erfolgte an sechs bis acht Wochen alten, männlichen Sprague Dawley Ratten mit einem Initialgewicht von 300 Gramm ($\pm 15\%$). In der Tierhaltung herrschte eine Raumtemperatur von 24°C, relative Luftfeuchtigkeit von 40% und ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden. Leitungswasser und Nahrung (Altromin® Standard-Diät Ratten/Mäuse) standen ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden nach einer Akklimatisierungsphase von 7 Tagen mit einem Gewicht von 300 g ($\pm 15\%$) in die Studie aufgenommen. Nach der OP wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten.

2.3 Versuchsprotokoll

Für das Versuchsvorhaben wurden Tiere in vier Gruppen je n=8 untersucht und verglichen:

- I Kontrollgruppe (= K)
- II Tiere mit diabetischer Stoffwechsellage ohne Behandlung (= D)
- III Tiere mit diabetischer Stoffwechsellage mit Inhibitor-Behandlung (= D-IB)
- IV Tiere mit diabetischer Stoffwechsellage mit Placebo-Behandlung (= D-PB)

Die Beobachtungsdauer der Tiere nach Wundsetzung betrug 18 Tage, wobei die Operation den Beginn der Beobachtungszeit markierte (Abb. 7). Alle 3 Tage wurde ein standardisierter Verbandswechsel durchgeführt. Die Versuchsreihe endete am 18. Tag mit der Gewebeentnahme und Opfierung der Tiere.

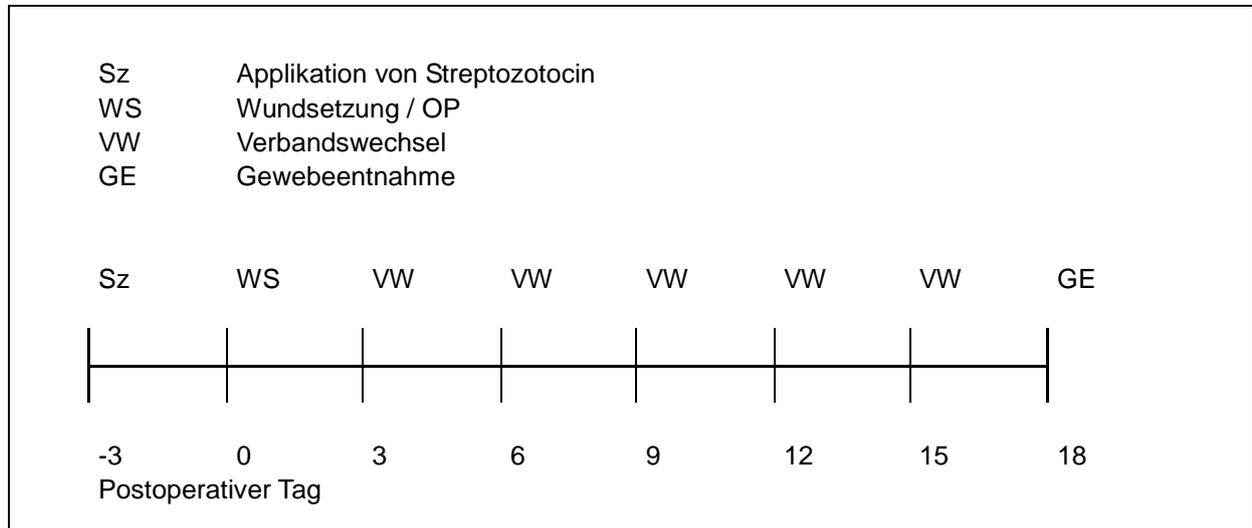


Abb. 7: Versuchsverlauf

2.3.1 Induktion einer diabetischen Stoffwechsellage

Die Induktion einer diabetischen Stoffwechsellage als Auslöser der Wundheilungsstörung erfolgte bei den Tieren durch die bereits in vielen anderen Studien [Hayashi et al. 1994; Kohnert et al. 1989] angewandte Methode der einmaligen gewichtsadaptierten intraperitonealen Applikation des Zytostatikums Streptozotocin mit 25 mg (entspr. ≥ 65 mg/kg KG) drei Tage vor Versuchsbeginn. Die Blutentnahme zur Blutzuckerkontrolle erfolgte 3 Tage später aus einer Schwanzvene des Versuchstieres (Abb. 8). Einschlusskriterium war ein Blutzucker > 300 mg/dl. Bei Tieren, die nach der ersten Gabe von Streptozotocin keine diabetische Stoffwechsellage entwickelt hatten, erfolgte eine weitere Injektion mit einer reduzierten Dosis von 20 mg. Tiere, die auch nach dieser Gabe keinen Diabetes aufwiesen, wurden nicht in die Versuchsreihe aufgenommen.



Abb. 8: Messung des Blutzuckers an der gestauten Schwanzvene

2.3.2 Narkose

Der Eingriff und die darauf folgenden Verbandswechsel erfolgten unter Isofluran-Inhalationsnarkose. Die Narkoseeinleitung wurde in einem Kunststoffbehälter vorgenommen, der nach Platzierung der Ratte mit einer Plastikfolie abgedeckt wurde. Das Narkose-Gasgemisch, zunächst 4,5 Vol% Isofluran / 6 l O₂, konnte über eine mittige Perforation in der Plastikfolie zugeführt werden (Abb. 9). Nach ca. einer Minute konnte dann die narkotisierte Ratte wieder herausgenommen werden und erhielt die weiterführende Narkose über Maske mit 1,5 Vol% Isofluran / 3 l O₂.



Abb. 9: Initiale Narkotisierung der Ratte [modif. nach Safak 2011]

2.3.3 Operative Wundsetzung und Implantation des PVE-Ringes

Der komplette Eingriff erfolgte in Bauchlage. Bei den Versuchstieren wurde zunächst der OP-Bereich mit einem Langhaarschneider rasiert und die Schnittführungslinien aufgezeichnet (Abb. 10 und 11).



Abb. 10 und 11: Rasur des OP-Bereiches und Aufzeichnung der Schnittführungslinien [Abb. 11 modif. nach Safak 2011]

Nach Umlagern der Tiere auf den OP-Tisch wurde das OP-Gebiet steril abgewaschen. Nach der Überprüfung der Narkosetiefe durch Setzen eines Schmerzimpulses am Schwanz der Ratte wurde am Rücken medial eine Längsinzision gesetzt (Abb. 12) und beidseits auf der Muskelfaszie des M. latissimus dorsi stumpf nach lateral präpariert (Abb. 13).



Abb. 12 und 13: Mediane Längsinzision und stumpfe Präparation der seitlichen Taschen auf dem M. latissimus dorsi [Abb. 13 modif. nach Safak 2011]

Unterhalb der beiden Scapulae wurde nach Anheben der Dermis und des subkutanen

Gewebes mit einer chirurgischen Pinzette durch eine kreisförmige Exzision ein definierter Gewebedefekt mit 1,1 cm Durchmesser auf beiden Seiten gleichermaßen gesetzt. (Abb 14). Nun wurde beidseits ein an der Basis mit 8 kreisförmigen Perforationen versehener Polyethylenring (Abb. 16) eingesetzt und auf dem M. latissimus dorsi transkutan mit 4 Einzelknopfnähten fixiert (Abb. 15).

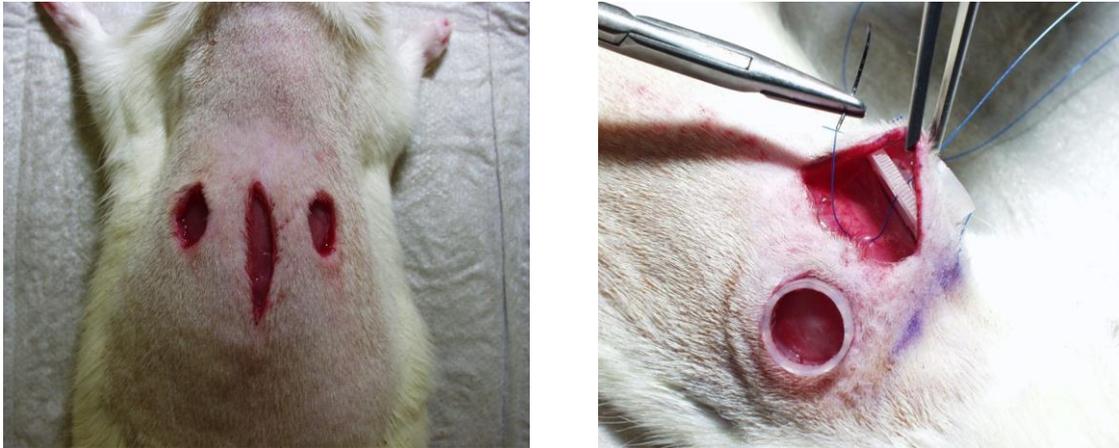


Abb. 14 und 15: Status nach standardisierter Wunsetzung mit Ringeinlage und Fixation auf der Muskelfaszie mit 4 Einzelknopfnähten [modif. nach Safak 2011]

Durch die spezielle Form des Ringes (Abb. 16) mit seitlichen Perforationen wird die für Ratten charakteristische Wundkontraktion verhindert, gleichzeitig das Einwachsen von neu gebildetem Gewebe vom Wundgrund sowie den Wundrändern aber ermöglicht.



Wunddurchmesser	1,1 cm
Wundfläche	0,95 cm ²
Perforationsfläche	0,82 cm ²

Abb. 16: Der Polyethylenring [modif. nach Safak 2011]

Der dorsale Zugang, über den die Präparation der Seitentaschen und Implantation der Ringe erfolgte, wurde durch 4 bis 6 Einzelknopfnähte wieder verschlossen (Abb. 17). Nach ausgiebiger Spülung der Wunden innerhalb der PE-Ringe mit 0,9%iger NaCl-Lösung wurden sie mit steriler Opsite-Folie abgedeckt (Abb. 18). Anschließend wurde ein mit gefalteten Kompressen abgepufferter, gut sitzender, elastischer Verband angelegt (Abb. 19 und 20). Die Schnitt-Naht-Zeit betrug ca. 20 Minuten.

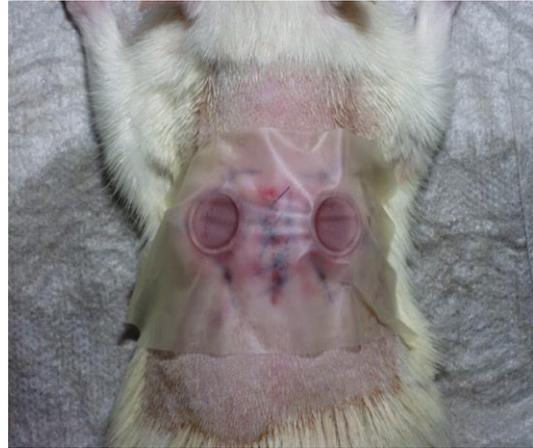


Abb. 17 und 18: Situs nach Wundverschluss und Versorgung mit Opsite-Folie



Abb. 19 und 20: Abpuffern der Wunden mit gefalteten Kompressen und Tier nach Anlage des selbsthaftenden Verbandes [Abb. 20 modif. nach Safak 2011]. Die vorderen Beine der Ratte sind funktionell nicht beeinträchtigt.

Zur Reduktion des postoperativen Stress erhielten alle Tiere mit diabetischer Stoffwechsellage postoperativ einmalig 0,04 IE / 0,1 ml NaCl Normalinsulin (entspricht 8 IE bei erwachsenen Menschen) intraperitoneal.

Die Ausleitung der Narkose erfolgte anschließend im jeweiligen Käfig des Tieres unter stressfreien Bedingungen.

2.4 Verbandswechsel

Der Verbandswechsel erfolgte an den postoperativen Tagen 3, 6, 9, 12, 15 und 18 in standardisierter Weise. Bei jedem Verbandswechsel wurden folgende Schritte in gleicher Reihenfolge durchgeführt und auf dem Verlaufsprotokoll dokumentiert (Abb. 21):

Bei allen Tiergruppen

- Narkotisierung des Tieres wie bei der Wundsetzung
- Entfernen des Verbandes und kurzes Débridement der Wunde
- Gründliche und vorsichtige Reinigung des verbliebenen Wundschorfes mit einer Mikropinzette und NaCl-getränkten Wattestäbchen
- Stichprobenartige Abnahme von mikrobiologischem Wundabstrich
- Großzügige Spülung der Wunde mit ca. 5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung. Reinigung und Trocknung des Areals um beide Kammern mit Mullkompressen
- Getrennte standardisierte Fotodokumentation der Wunden beidseits mit einer Digitalkamera
- Messung des Blutzuckers aus einem Blutstropfen aus der gestauten Schwanzvene des Tieres
- Bei Tieren mit BZ-Wert > 600 mg/dl intraperitoneale Applikation von Normalinsulin (0,04 IE/0,1 ml NaCl) zur Verhinderung eines diabetischen Kommas
- Abdichten der Wunden mit einer Opsite-Folie und anschließender Verband
- Dokumentation des Allgemeinzustandes und der Daten der jeweiligen Ratte auf einem mit der Rattennummer versehenen Verlaufsprotokoll (Abb. 21).

Bei den Versuchsgruppen D-IB bzw. D-PB zusätzlich

- lokale Applikation von jeweils 100 mg Inhibitor (Ro 28-2653) bzw. 50 mg Trägersubstanz, gelöst in 300 µl DMSO, an den postoperativen Tagen 3, 6, 9 und 12 in den Wundbereich innerhalb vom Polyethylenring
- Entnahme von 200 – 400 µl EDTA-Blut aus einer Schwanzvene zur Analyse der systemischen Inhibitorkonzentration

Verlaufsprotokoll

Tiernummer :

Tiergruppe :

OP-Zeitpunkt:

Narkoseart: Isofluran-Gasnarkose

Rattenart: Sprague-Dawley, männlich

Datum	Art des Eingriffes	POP Tag	Foto Nr.	Gewicht	Bemerkungen
			li re		

Abb. 21: Verlaufsprotokoll mit Dokumentation von Datum, Gewicht, postop. Tag, Blutzucker, Bemerkungen (z.B. Allgemeinzustand der Ratte) und der Fotonummern

2.5 Digitale Fotodokumentation

Der Fortschritt der Wundheilung wurde bei jedem Verbandswechsel qualitativ beschrieben und mittels digitaler Fotografie festgehalten. Die Aufnahme erfolgte mit einer Olympus Digital-Kamera C2500L standardisiert in orthogradem Winkel über der Wunde, formatfüllend unter Verwendung eines Stativs und somit gleichem Abstand des Objektivs zur Wunde. Zur Beschriftung wurde ein Schild mit Angabe der Rattennummer und der erfassten Seite, zur späteren Skalierung eine Messlatte direkt an der Wunde platziert und auf dem Foto mit abgelichtet (Abb. 22).

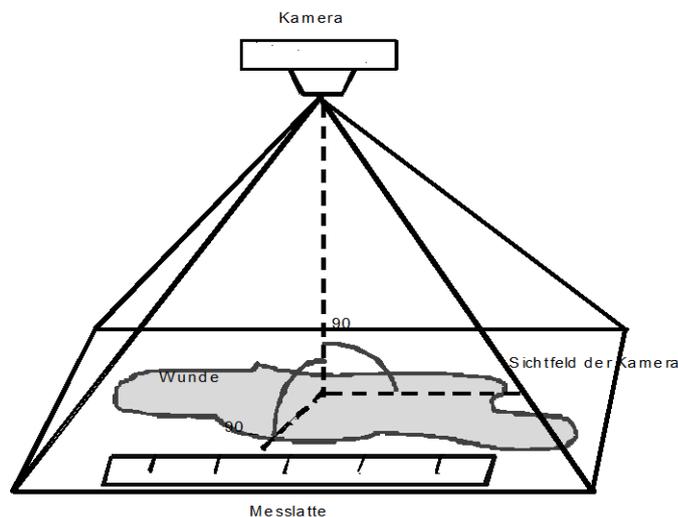


Abb. 22: Schema der standardisierten Wundphotographie

2.6 Planimetrie der Wunden

Für die Quantifizierung der makroskopischen Wundheilung wurden die digitalen Aufnahmen der Wunden in das computergestützte Programm für offline-Planimetrie Tracer (Version 2.0, Univ. of Glamorgan, UK) eingelesen. Bewertet wurden das Granulationsgewebe sowie die Epithelialisierung zu den jeweiligen Verbandwechseln (Tag 3, 6, 9, 12, 15 und 18). Zunächst erfolgte die Skalierung unter Zuhilfenahme der mitfotografierten Messlatte im Bild. Anschließend wurde die Wunde - nach einer genauen visuellen Analyse - Punkt für Punkt umfahren und die jeweiligen Grenzflächen für Granulation und Epithelialisierung markiert. Das Granulationsgewebe zeigte sich als rote, körnige Schicht, das sich gut von der Faszie des M. latissimus

dorsi unterscheiden ließ. Das Epithel, das sich auf dem Granulationsgewebe bildete, war als weißliche, wolkige und faserreiche Schicht zu identifizieren. Die so gekennzeichneten Wundflächen wurden schließlich vom absoluten Flächenwert (entspr. der vom PVE-Ring eingegrenzten Fläche: 0,95 cm²) subtrahiert und dadurch die Granulations- bzw. die Epithelfläche berechnet.

2.7 Analyse der systemischen Konzentration des Inhibitors Ro 28-2653

Zur Bestimmung der systemischen Konzentration des MMPI Ro 28-2853 wurden die aus der Schwanzvene der Tiere entnommenen Blutproben zur Analytik an die Firma Roche Diagnostics GmbH, Pharma Research (Penzberg, Deutschland) versandt. Die quantitative Analyse erfolgte mittels der sogenannten High Pressure/Performance Liquid Chromatography (HPLC). Diese Technik wird in der Medizin u.A. zur Bestimmung von Hämoglobinen, Aminosäuren, Porphyrinen, Hormonen, Vitaminen, Spurenelementen, Medikamenten, Drogen, Alkohol und anderen Giften in darauf spezialisierten Labors angewandt [Mitulovic et al. 2006; Sutton et al. 1985; Diliberto et al. 1988].

2.8 Gewebeentnahme für die histologische Untersuchung

Am 18. postoperativen Tag wurde zunächst der standardisierte Verbandswechsel durchgeführt. Anschließend wurde den Tieren eine letale Dosis Pentobarbital-Natrium intraperitoneal appliziert. Danach wurden die beiden Polyethylenringe medial über die mittige Längsinzision der OP mit einem 12er Skalpell allseitig mit einem Hautabstand von ca. 0,5 cm umschnitten. Das nun von den Seiten her mobile Hautareal mit den Wundkammern wurde unter Mitnahme einer dünnen Schicht des M. latissimus dorsi von der Unterlage entfernt und auf einer sterilen Kompresse abgelegt. Hier wurde mit einem spitzen Einweg-Skalpell das in dem Ring befindliche Gewebe umschnitten und in toto entfernt. Nach Markierung mit Fäden wurde das Gewebe in einem Behälter mit 4%iger Formaldehyd-Lösung aufbewahrt und bis zur histologischen Untersuchung kühl und dunkel gelagert.

2.9 Histologie der Wunden

Zur qualitativen Beurteilung der Unterschiede auf zellulärer Ebene zwischen dem Wundgewebe der Tiere mit normaler und diabetischer Stoffwechsellage wurde aus den Gewebeproben der Tiergruppen K und D Gewebeschnitte zur histologischen Untersuchung angefertigt. Hierzu wurden Schnitte aus dem Wundrand sowie dem Wundgrund verwendet und die Färbungen HE und EvG eingesetzt. Die histologischen Schnitte aus dem Wundgewebe der Tiere wurden im Institut für Anatomie unter der Betreuung von Prof. Dr. med. R. Putz angefertigt und zusammen mit Frau PD Dr. rer. nat Anette Lebeau im Pathologischen Institut Campus Innenstadt der LMU München beurteilt.

2.9.1 Vorbereitung der Gewebeproben

50 g EDTA wurde in 1000 ml destilliertem Wasser unter stetiger Durchmischung mit dem Magnetrührer gelöst und somit eine 5%ige EDTA-Lösung hergestellt. Die jeweiligen Gewebelöcke wurden in dieser EDTA-Lösung bei 37°C im Brutschrank eingelagert und die Lösung jeden zweiten Tag erneuert. Pro Gramm Gewebemasse wurde hierbei ca. 100 ml EDTA-Lösung verwendet. Dieser Vorgang wurde solange fortgesetzt, bis die gewünschte Konsistenz des Gewebes erreicht wurde. Anschließend wurden die Proben für zwei Stunden fließend gewässert, um das EDTA auszuspülen. Abschließend wurden die Proben in einem Plastikeinbettbehälter platziert und für 24 Stunden im Dehydrierungsautomaten Shandon Processor 2LE entwässert.

2.9.2 Paraffineinbettung

Nach der Dehydrierung wurden die Gewebeproben in die mit flüssigem Paraffin gefüllten Kammern des Einbettautomaten gelegt. Diese wurden dann in mit Glycerin ausgeriebene und zur Hälfte mit flüssigem Paraffin befüllte Metallformen transferiert und endgültig in Paraffin eingebettet. Nachdem das Paraffin in den Metallbehältern ausgehärtet war, wurden die Gewebeproben samt Plastikbehälter aus der Metallform gelöst und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.9.3 Schneiden der Gewebeblöcke

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden die ausgehärteten Gewebeblöcke in das Mikrotom eingespannt und mittels D-Messer in einer Schichtdicke von 8 µm geschnitten. Danach wurden die einzelnen Schnitte mittels Pinzette vorsichtig abgehoben und in kaltes Aqua dest. gegeben. Nachdem die Schnitte durch die Oberflächenspannung des Wassers ausreichend ausgezogen waren wurden sie in ein 50°C warmes Wasserbad gegeben und dadurch nochmals gestreckt und geglättet. Später wurden die Schnitte auf Objektträger transferiert, auf einer Wärmeplatte bei 40°C angetrocknet und anschließend über Nacht bei 37°C im Brutschrank weiter getrocknet.

2.9.4 Entparaffinieren

Vor der Färbung wurden die Objektträger für ca. fünf Minuten auf eine Wärmeplatte bei 60°C gelegt, um das in den Präparaten verbliebene Paraffin zu schmelzen. Nach erneutem Abkühlen der Objektträger wurden diese in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert:

Xylol	2 x 5 Min.
Ethanol 100%	2 x 5 Min.
Ethanol 90%	5 Min.
Ethanol 80%	5 Min.
Ethanol 70%	5 Min.
Ethanol 50%	5 Min.
Aqua dest.	5 Min.

Die Objektträger wurden hierzu zweimal hintereinander für jeweils 5 Minuten in mit Xylol gefüllte Behälter platziert. Anschließend wurden sie wie oben aufgelistet jeweils für 5 Minuten in die Ethanolreihen eingetaucht und schließlich das verbliebene Ethanol durch Aqua dest. abgespült.

2.9.5 Histologische Färbungen

Hämalaun-Eosin- (HE-) Färbung

Als Übersichtsfärbung zur Darstellung histologischer Strukturen im Bereich der Wunde und des Granulations-/Narbengewebes wurde eine Hämatoxylin-Eosin Färbung angefertigt. Die HE-Färbung ist eine der am häufigsten angewandten histologischen Färbetechniken, nicht nur, weil sie relativ einfach durchzuführen ist, sondern weil sie auch eine detailreiche Erfassung unterschiedlicher Zellpopulationen ermöglicht [Godwin 2011]. Sie basiert auf dem Prinzip der Oxidation von Hämatoxylin zu dem blauen Farbstoff Hämatein, der in der Lage ist, mit basophilen Strukturen wie etwa den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA im Zellkern zu interagieren. Azidophile Strukturen wie das Zytoplasma oder viele Interzellulärsbstanzen (Bindegewebe und Muskelfasern) werden rot gefärbt.

Für unsere Färbung wurde das Protokoll nach Mayer angewandt [Mülisch 2010]. Bevor die Schnitte in die Farblösung gebracht wurden, erfolgte ein zweimalig kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser. Danach wurden die Objektträger für 10 Minuten in Hämalaun gegeben, um dann 10 Minuten unter fließendem Wasser gebläut zu werden. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit 0,1%igem Eosin.

Durchführung:	Aqua dest.	2x kurz
	Hämalaun-Kernfärbung nach Mayer	10 Min.
	Bläuen unter fließendem Wasser	10 Min.
	Gegenfärben mit Eosin 0,1%	10 Min.

Die Schnitte wurden zuletzt mit Aqua dest. von der überschüssigen Farblösung befreit und der aufsteigenden Alkoholreihe zur Dehydrierung (s. 2.9.6) zugeführt.

Elastica-van-Gieson- (EvG-) Färbung

Bei der EvG-Färbung kann das Bindegewebe, insbesondere das Kollagen, besser dargestellt werden, weil bei dieser Färbung selektiv elastische Fasern und Kollagengewebe farblich markiert werden. Resorcinfuchsin verleiht den elastischen Fasern eine schwärzlich-braune Farbe, während Zellkerne schwarz-braun bis schwarz und Muskulatur gelblich erscheinen. Kollagengewebe hingegen wird rötlich

dargestellt [Mulisch 2010]. Da diese detaillierte Information zur besseren Interpretation des Wundgewebes unverzichtbar ist wurde diese Färbung ergänzend zur HE-Übersichtsfärbung angefertigt.

Durchführung:	Resorcinlösung	15 Min.
	Ethanol 96%	2 Min.
	Eisenhämatoxylin n. Weigert	5 Min.
	Warmes fließendes Leitungswasser	10 Min.
	Pikrofuchsinlösung	5 Min.
	Ethanol 96%	2 Min.

Abschließend werden die Schritte zur Dehydrierung (wie unter 2.9.6 beschrieben) angewandt.

2.9.6 Dehydrierung

Zur Dehydrierung der Schnitte wurde folgende Alkoholreihe verwendet:

Ethanol 80%	2 Min.
Ethanol 96%	2 Min
Ethanol 100%	2 Min
Xylol	2x 2 Min.

Die Objektträger wurden nacheinander für jeweils zwei Minuten der oben aufgelisteten aufsteigenden Ethanolreihe zugeführt und schließlich zweimal für zwei Minuten in Xylol eingetaucht.

Abschließend wurden die Präparate mit Eukitt[®] (Fa. O. Kindler GmbH & Co.) eingedeckelt und konserviert. Nach ordnungsgemäßer Beschriftung wurden die nun gefärbten Schnitte in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.10 Mikroskopische Analyse

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mittels Lichtmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss, Jena). Die in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen wurden mit einer CCD-Kamera

aufgenommen und mit der Bildanalysesoftware KD 400 (Version 3.0, Carl Zeiss Vision) bearbeitet.

Repräsentative Gewebeschnitte aus dem Wundgrund sowie den Wundrändern beider Tiergruppen wurden nach histomorphologischen Gesichtspunkten miteinander verglichen. Dabei diente die HE-Färbung der Eruierung möglicher Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung zwischen den Wunden gesunder und diabetisierter Tiere. Eine weitere Charakterisierung bezüglich deren Zusammensetzung aus elastischen und kollagenen Fasern konnte mit der EvG-Färbung erfolgen, was eine indirekte Aussage über die Güte und Stabilität der Wunden zuließ.

Aufgrund des deskriptiven Charakters der histologischen Studie wurde auf eine statistische Auswertung der histologischen Präparate verzichtet.

2.11 Statistische Analyse

Zur Erstellung der Ergebnis-Tabellen wurde aus den zwei Wunden jedes Tieres ein Mittelwert errechnet. Als Fehlerindikator diente die einfache Standardabweichung (SD) für Stichproben. Diese Werte wurden anschließend für die deskriptive statistische Kalkulation und zur Signifikanzberechnung herangezogen. Zur Auswertung diente das Statistikprogramm „SigmaStat 3.0“ (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois). Für den Datenvergleich der jeweiligen beiden Gruppen und den Messwerten zu unterschiedlichen Zeitpunkten diente bei Normalverteilung die Varianzanalyse ANOVA One Way Repeated Measures Analysis of Variance, bei einer Abweichung von der Normalverteilung die ANOVA Friedman on Ranks. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant, $p \leq 0,001$ als hoch signifikant gewertet. Bei statistischer Signifikanz wurde als Post-Hoc Test zum Vergleich der beiden Gruppen die Student-Newman-Keuls-Methode gewählt.

Die Grafiken wurden mit Microsoft Excel 2002 erstellt.

3 Ergebnisse

Die Etablierung des Tiermodells, insbesondere die Konzeption, Induktion der diabetischen Stoffwechselsituation, Fotodokumentation und Planimetrie der Wunden wurde gemeinsam mit Herrn Dr. Okan Safak in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH), Klinikumsstandort Innenstadt der LMU München durchgeführt.

3.1 Etablierung des Tiermodells: Kontrollgruppe (K) und Tiere mit diabetischer Stoffwechsellage (D)

Ein Tiermodell zur Untersuchung der Wundheilung bei diabetischer Stoffwechsellage wurde basierend auf Vorarbeiten von *Koschnik et al. (1997)* etabliert. Zur Untersuchung von makroskopischen und mikroskopischen Unterschieden zwischen regelrechter und gestörter Wundheilung wurde neben der Kontrollgruppe mit regelrechtem Metabolismus eine Vergleichsgruppe mit diabetischer Stoffwechsellage gebildet. Bei allen Tieren beider Gruppen (je n=8) wurden Polyethylen-Kammern mit seitlichen Perforationen auf den M. latissimus dorsi eingesetzt (vgl. Kapitel 2.3.3) und der Wundheilungsverlauf sowie der Zustand der Tiere regelmäßig dokumentiert (vgl. Kapitel 2.4).

3.1.1 Die Entwicklung des Körpergewichtes

Als Maß für den Allgemeinzustand wurde das Gewicht der Tiere jeden 3. Tag im Rahmen des Verbandwechsels bestimmt. In allen Versuchsgruppen nahm das Gewicht der Tiere nach Versuchsbeginn ab. Während sich bei Tieren mit regelrechter Stoffwechselsituation ab dem 6. postoperativem Tag ein Plateau einstellte, setzte sich bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage hingegen die Gewichtsabnahme bis zum Ende der Beobachtungszeit fort. Die Reduktion des Initialgewichts bei Tieren der Kontrollgruppe lag bei 25%, bei Tieren mit diabetischer Stoffwechselsituation hingegen bei 40% (Abb. 23). Da dieser Effekt bereits bei Durchführung von Pilotexperimenten aufgefallen war, wurden tendentiell schwerere Tiere für die Gruppen mit diabetischer Stoffwechsellage ausgewählt. Diese Maßnahme sollte eine Verzerrung der Ergebnisse durch die stark katabole Stoffwechselsituation bei diesen Tiergruppen kompensieren. Demnach wurden für die Gruppen D, D-IB und D-PB (vgl. Kap. 3.3) Tiere mit einem Körpergewicht von mindestens 300 bis 350 g gewählt, während das Ausgangsgewicht der Tiere aus der Kontrollgruppe bei 280 bis 300 g lag.

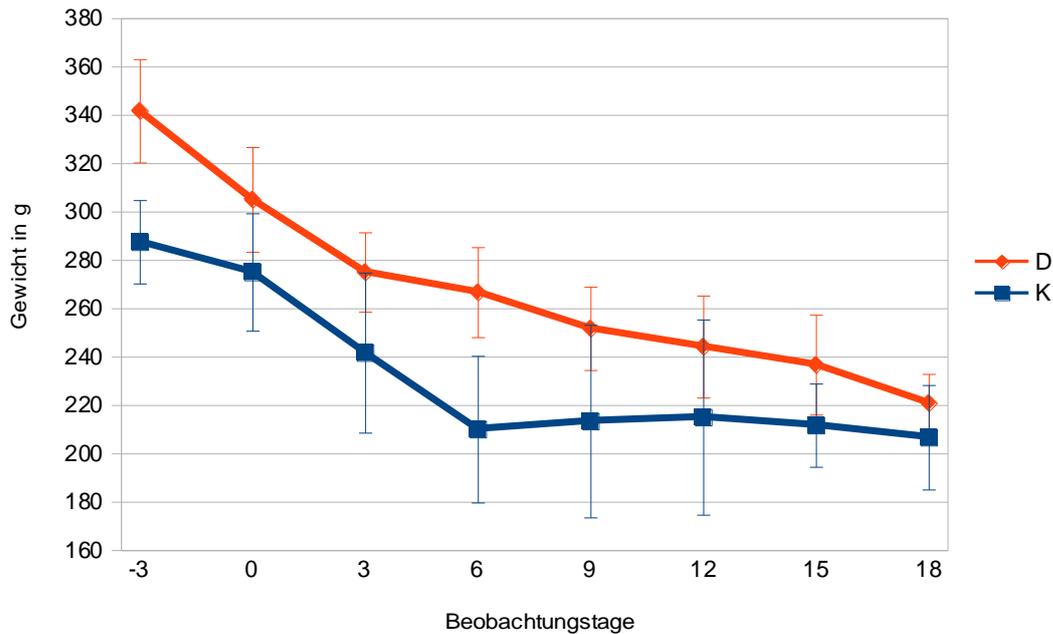


Abb. 23: Entwicklung des Körpergewichts bei Tieren der Gruppen K und D über den Beobachtungszeitraum von 18+3 Tagen (Mittelwert \pm SD, n=8 je Gruppe)

3.1.2 Makroskopische Analyse der Wundheilung

Zur qualitativen Erfassung der Wundheilung wurde die Entwicklung jeder Wunde während den Verbandswechseln (an Tag 3, 6, 9, 12, 15, 18) standardisiert digital fotografiert und später analysiert.

Die Analyse und der Vergleich der Wunden beider Gruppe zeigten bereits ab dem 3. postoperativen Tag einen deutlichen Unterschied (Abb. 24 a und b). Bei der Kontrollgruppe konnte bereits ab Tag 3 ein kontinuierliches Einwachsen von Granulationsgewebe in das Wundbett durch die seitlichen Perforationen am PVE-Ring beobachtet werden. Etwas phasenverschoben (ab Tag 6) folgte auch die Epithelialisierung der Wunde. Am Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 18) war der Ring bei den Kontrolltieren reizlos und nahezu komplett in die Haut eingewachsen (Abb. 24 a). Bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage bildete sich Granulationsgewebe hingegen nur zögerlich, das deutlich fragiler wirkte. Die Epithelialisierung erfolgte nur unvollständig und in zart-wolkiger Form. Am 18. postoperativen Tag präsentierte sich die Wunde der Diabetes-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nur schmierig-wolkig belegt und fein überzogen von einem optisch deutlich dünner imponierenden Gewebe (Abb. 24 b).

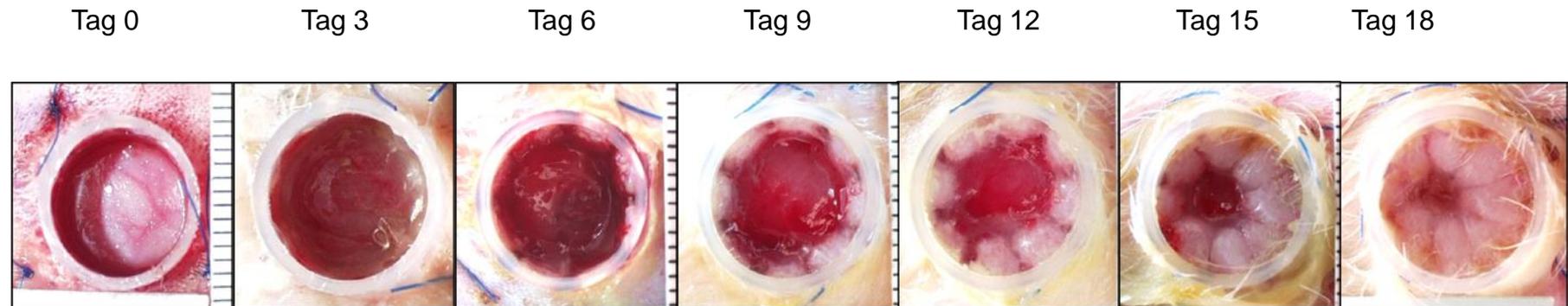


Abb. 24a: Die Wunden bei Tieren der Kontrollgruppe zeigen ein kontinuierliches Einwachsen von Granulationsgewebe. An Tag 18 ist der Ring reizlos und nahezu komplett eingewachsen.

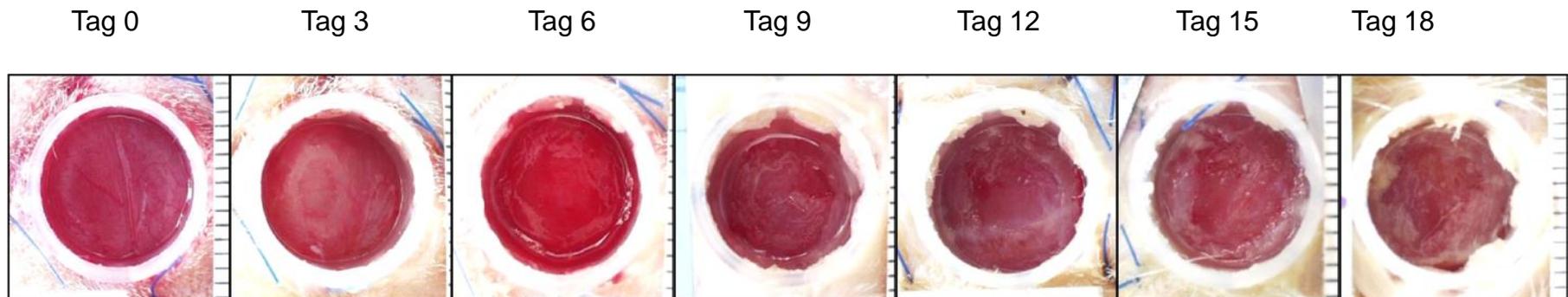


Abb. 24b: Bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage zeigt sich nur allmählich ab Tag 9 Granulationsgewebe. An Tag 18 zeigt sich die Wunde fein überzogen von einem optisch dünn imponierendem Gewebe.

3.1.3 Quantifizierung von Granulationsgewebe und Epithelialisierung mittels Planimetrie

Für die Quantifizierung des Granulationsgewebes sowie der Epithelialisierung wurden die digitalen Aufnahmen der Wunden in das computergestützte Programm für offline-Planimetrie 'Tracer' eingelesen (vgl. Kapitel 2.5 und 2.6).

Die Wunden der Tiere aus der Kontrollgruppe entwickelten sich im Beobachtungszeitraum regelrecht. Bereits an Tag 6 nach Wundsetzung war etwa 75 % der Wundfläche granuliert. Ab dem 12. postoperativen Tag war die Gesamtfläche im PE-Ring (entspr. 0,95 cm²) nahezu komplett von Granulationsgewebe bedeckt. Dagegen heilten die Wunden der Tiere mit diabetischer Stoffwechsellage nur langsam und wiesen erst am 18. postoperativen Tag eine fast vollständige Granulationsschicht auf (Abb. 25). Die Auswertung und der Vergleich der Daten beider Gruppen zeigte ab Tag 3 eine statistisch signifikant ($p < 0,05$), an den Tagen 6 bis 12 eine hochsignifikant ($p < 0,001$) bessere Bildung von Granulationsgewebe bei den Tieren der Kontrollgruppe.

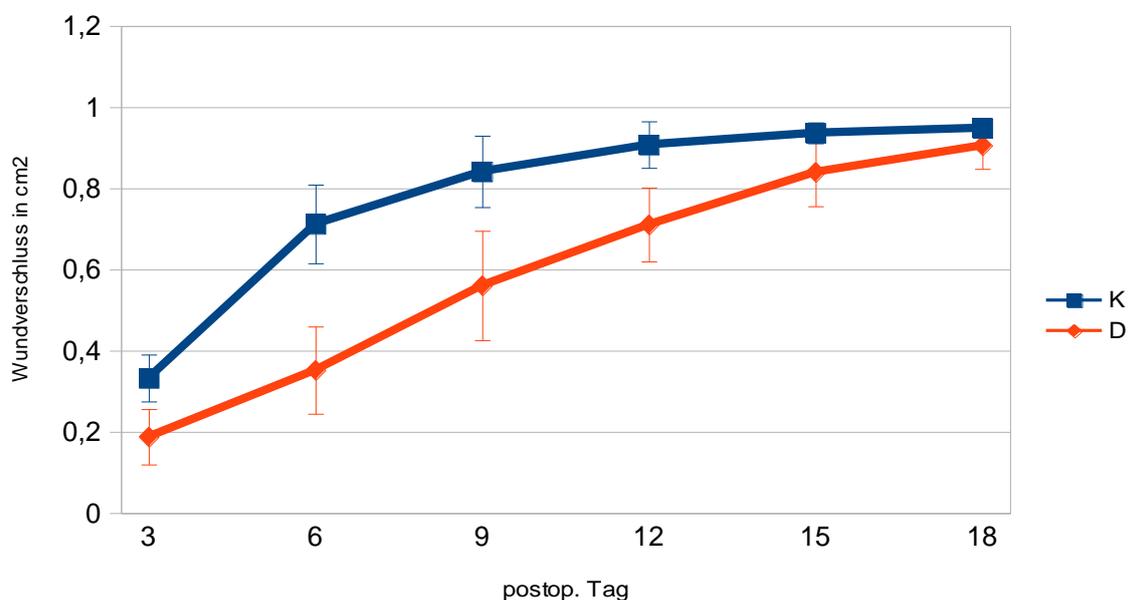


Abb. 25: Bildung von Granulationsgewebe bei Tieren der Kontrollgruppe und bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage, je n=8.

Bei der Bildung von Wundepithel verhielten sich die beiden Gruppen etwas unterschiedlich: die Ausbildung von Epithel erfolgte bei der Kontrollgruppe zwar etwas zeitversetzt zur Granulation, war jedoch insbesondere ab Tag 9 eindeutig zubeobachten. Die Verlaufskurve der Wunden dieser Tiere war insbesondere bis Tag 12 deutlich ansteigend und flachte ab Tag 15 sichtbar ab. Bei der Gruppe mit diabetischer Stoffwechsellaage entwickelte sich hingegen das Epithel nur langsam und erkennbar zeitversetzt. Der Kurvenverlauf gestaltete sich hier vergleichsweise linear und zeigte bis zum Ende der Beobachtung eine zögerliche, aber kontinuierliche Wundepithelialisierung. Auch wenn die Epithelfläche bei Tieren mit regelrechter Stoffwechselsituation von Tag 9 bis Tag 15 verdoppelte (40% vs. 84%), blieb sie selbst bei dieser Gruppe nur unvollständig. Während bei der Kontrollgruppe die Wundfläche am 18. Tag insgesamt 0,91 cm² von Epithel überzogen war, betrug die Fläche des Wundepithels bei Tieren mit Diabetes mellitus nur 0,70 cm². Der Unterschied beider Gruppen hinsichtlich Epithelialisierung der Wunden war an Tag 6 und 9 statistisch signifikant ($p < 0,05$), ab Tag 12 bis 18 hochsignifikant ($p < 0,001$). Insbesondere dieser - auch makroskopische (s. Kap. 3.1.2) - Unterschied konnte als Beleg für eine Wundheilungsstörung festgehalten werden und bestätigte das Vorliegen einer gestörten Wundheilung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage (Abb. 26).

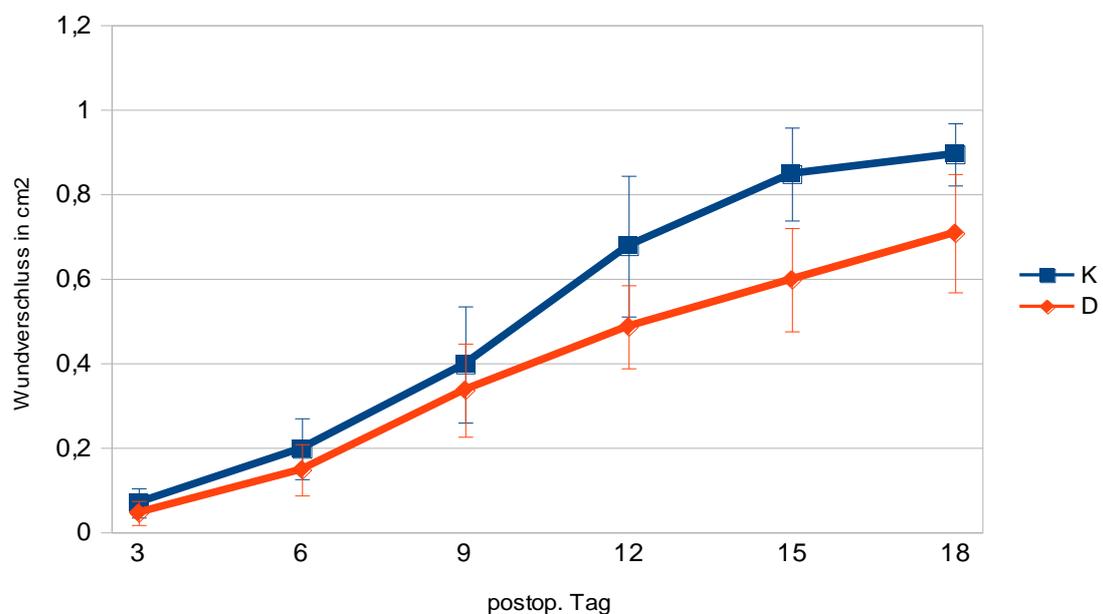


Abb. 26: Epithelialisierung bei Tieren der Kontrollgruppe und Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage, je n=8

3.2 Histologische Untersuchung der Wunden

Zum orientierenden Vergleich der Wundbeschaffenheiten bei Tieren der Kontrollgruppe und den Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage wurde bei einigen Tieren eine histologische Probe vom Wundgewebe am 18. postoperativen Tag entnommen und repräsentative Schnitte mittels HE sowie EvG zum Nachweis von elastischen Fasern und Kollagen angefertigt.

3.2.1 HE-Färbung

Die lichtmikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte in der HE-Färbung zeigte in Wunden von Tieren der Kontrollgruppe ein homogenes und ruhiges Zellbild, das klare Übergänge der einzelnen Zellschichten erkennen lässt und von Fibroblasten und Fibrozyten geprägt war. Die Epithelialisierung war hier weitgehend abgeschlossen und die Vaskularisierung des Gewebes regelrecht ausgebildet (Abb. 27, 2a).

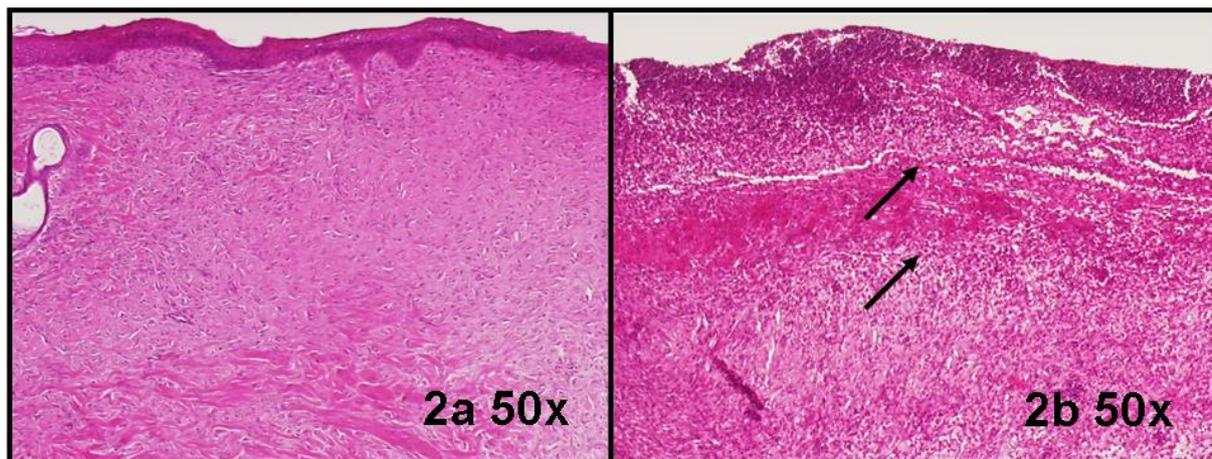


Abb. 27: Histologie der Wunde am 18. postoperativen Tag. HE Färbung, 50-fache Vergrößerung, 2a) Kontrollgruppe, 2b) Tiere mit diabetischer Stoffwechsellaage.

Dagegen dominierte bei der Histologie von Wunden der Gruppe mit diabetischer Stoffwechselsituation ein sehr unruhiges Zellbild mit massiver Infiltration aller Schichten durch Entzündungszellen (Abb. 27, 2b und Abb. 28 a-d). Hier konnte die Aufteilung in drei Schichten im Sinne eines klassischen Ulkus (Detritusschicht, Granulationsschicht, Narbenschicht) beobachtet werden. Die Übergänge der Schichten sind in Abb. 27, 2b durch Pfeile gekennzeichnet. Das entzündliche Infiltrat der Detritusschicht war durchsetzt von vielen mononuklearen Zellen (Abb. 28 b, Pfeil), während in der Granulationsschicht große Mengen Histiozyten und

Granulozyten (Abb. 28 c und d, Pfeile) vorkamen. Die Vaskularisierung zeigte im Vergleich zu den Wunden der Kontrollgruppe eine sichtlich spärlichere Ausbildung (vgl. Abb. 27 2a mit 2b).

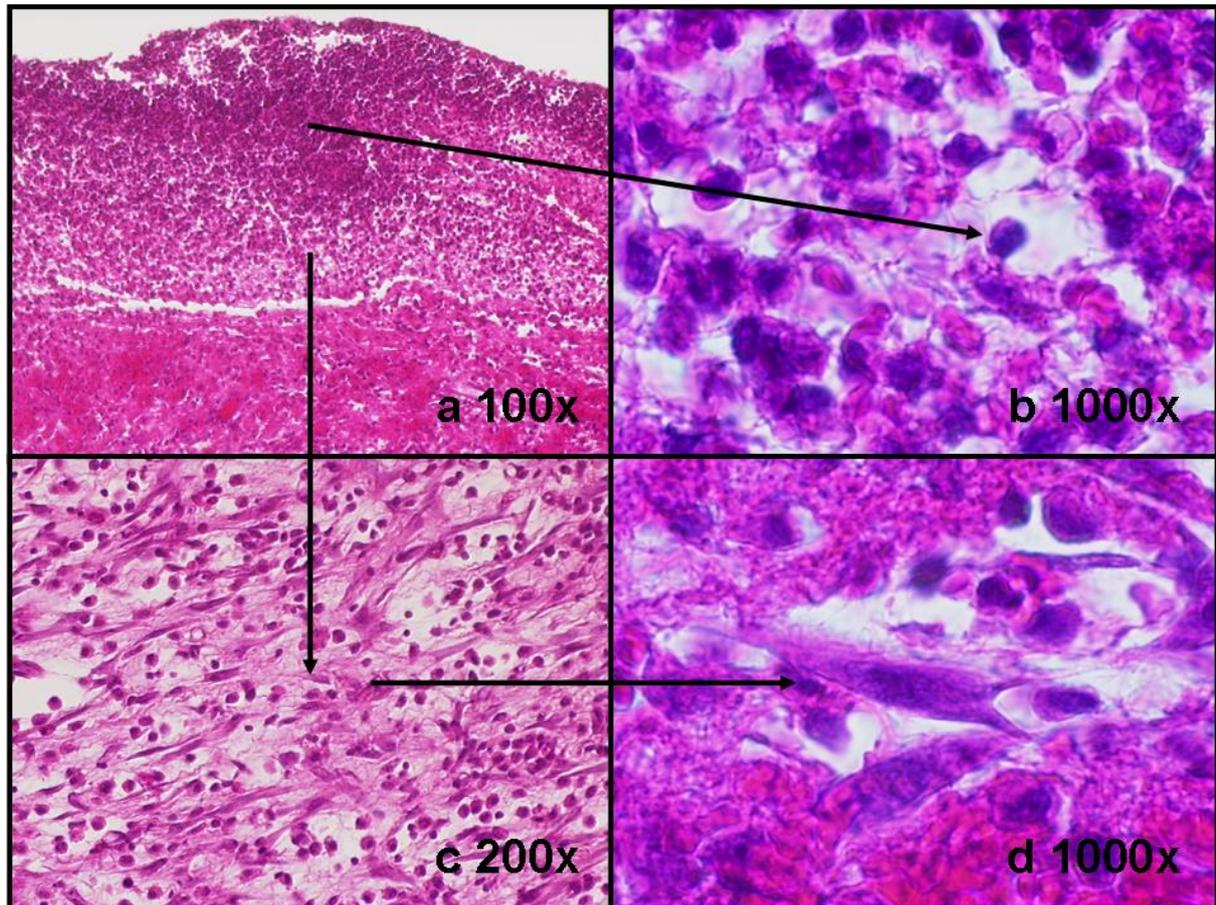


Abb. 28: Histologie der Wunde eines Tieres mit diabetischer Stoffwechsellage am 18. postoperativen Tag. HE- Färbung.

Diese Beobachtungen beweisen demnach auch auf mikroskopischer Ebene das Vorhandensein einer chronischen Entzündungsreaktion in Wunden bei diabetischer Stoffwechselsituation und bestätigen hiermit die bereits in der Makroskopie festgehaltenen Unterschiede beider Gruppen hinsichtlich der Wundheilung (s. 24a und b).

3.2.2 EvG-Färbung

Die EVG Färbung zeigte im Narbengewebe von Kontrolltieren eine hohe Anzahl an systematisch und dicht gepackten Kollagenfasern, während bei diabetischen Tieren Kollagenfaserbündel nur spärlich im Bereich der Narbenschicht zu finden sind (Abb. 29 3a und 3b).

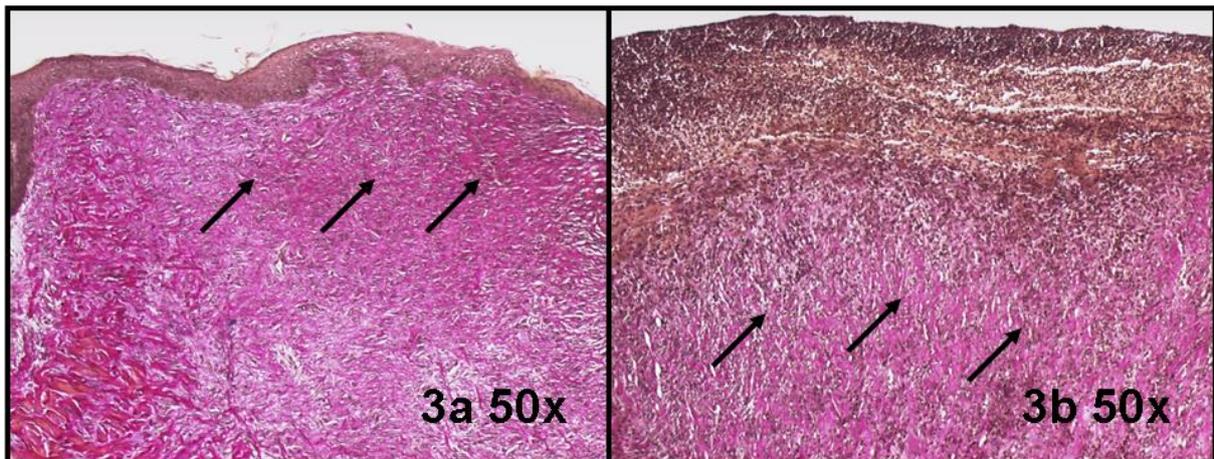


Abb. 29: Histologie der Wunde am 18. postoperativen Tag bei Kontrolltieren und Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage. EvG Färbung.

Die Epithelschicht der Wunden gesunder Tiere weist 6-8 Schichten von Epithelzellen auf (Abb 30 a, b, Pfeil). Tiefere Schichten sind durch Fibroblasten und Fibrozyten (Abb 30 c, Pfeil) sowie dicht gepackte Kollagenfasern (Abb 30 d, Pfeil) geprägt. Diese klassische Schichtung ist bei den Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage nicht gegeben. Während sich bei gesunden Wunden eine dichte und koordinierte Anordnung kollagener Fasern in den klar abzugrenzenden Wundschichten findet (Abb. 29, 3a und 30 a-d), kann bei den diabetischen Wunden ein nicht geordnetes und optisch dominanter wirkendes Kollagen-Durcheinander ausgemacht werden (Abb. 29, 3b, Pfeile). Die Detritusschicht diabetischer Wunden stellt sich relativ breit dar, der Kollagen-Umsatz ist insbesondere im Vergleich zum Bild gesunder Tiere in allen Schichten erhöht (vgl. Abb. 29, 3a und 3b).

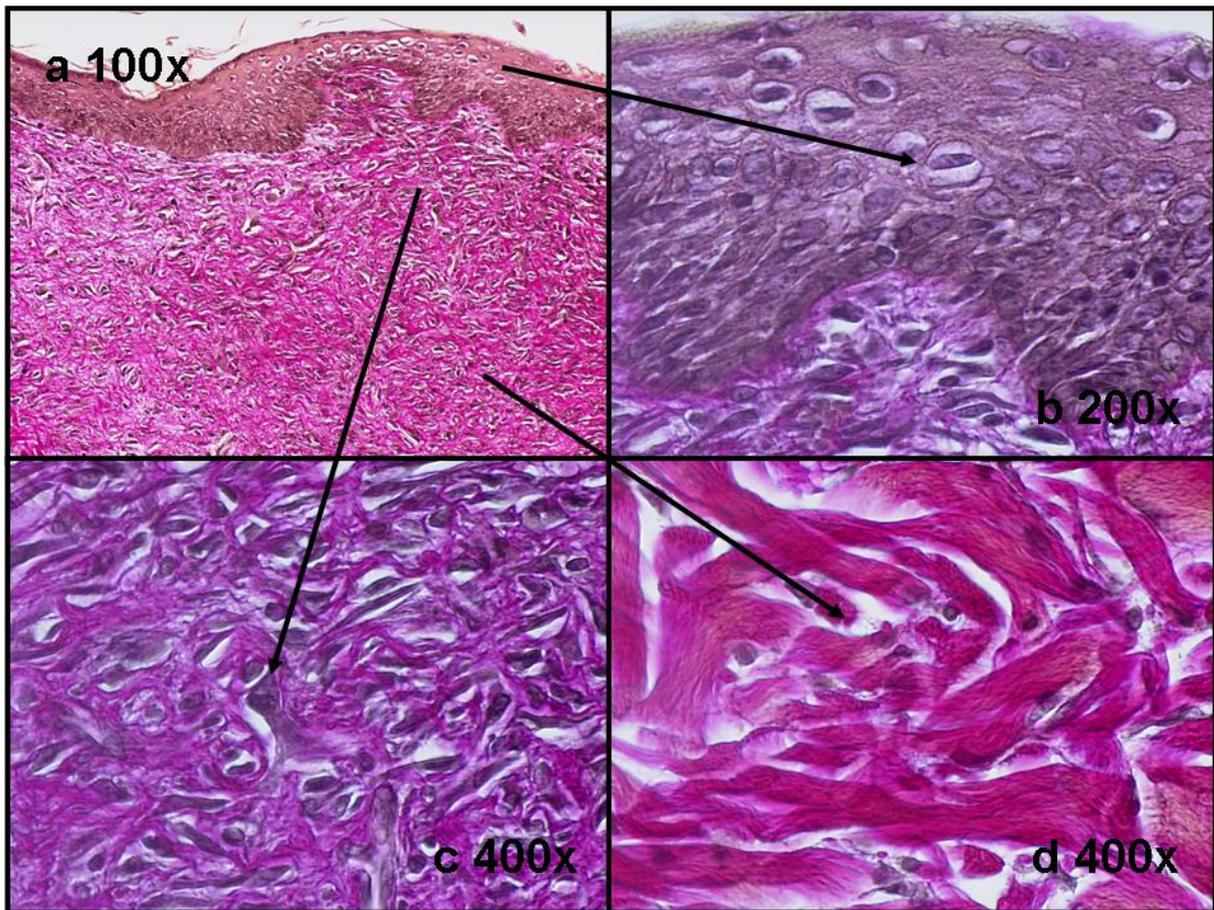


Abb. 30: Histologie der Wunde eines Kontrolltieres am 18. postoperativen Tag. EvG Färbung.

3.3 Einfluss des Matrix-Metalloproteinase-Inhibitors Ro 28-2653 auf die Wundheilung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage

Um den Einfluss der Applikation eines Matrix-Metalloproteinase-Inhibitors (MMPI) auf die Wundheilung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage zu untersuchen, wurden im zweiten Teil der Studie zwei Gruppen mit je n=8 Tieren gebildet: an den Tagen 3, 6, 9 und 12 erhielt die Gruppe D-IB lokal den Inhibitor Ro 28-2653, die Gruppe D-PB die Trägersubstanz des zu untersuchenden MMPI. Durch die letztere Gruppe sollte ein möglicher Placebo-Effekt des Inhibitors festgehalten bzw. ausgeschlossen werden.

3.3.1 Die Entwicklung des Körpergewichtes

Wie zu erwarten war, wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen Gruppen mit diabetischer Stoffwechsellaage (D, D-IB und D-PB) aufgrund der katabolen Stoffwechselsituation eine ähnliche Gewichtsentwicklung beobachtet (vgl. 3.1.1). Statistisch signifikante Unterschiede wie zwischen den Gruppen K und D bestanden hier hingegen nicht. Während die Gewichtsabnahme in den Gruppen D und D-IB nahezu identisch verlaufen (absoluter Gewichtsverlust Gruppe D: 35%, Gruppe D-IB: 34%), zeigt sich ab dem Zeitpunkt der Applikation der jeweiligen Substanz insbesondere bei der Gruppe D-IB ein geringerer Gewichtsverlust als in der Gruppe D-PB (Gewichtsverlust D-PB: 40%). Die Gewichtsabnahme der Gruppe D-PB entwickelt sich initial langsamer, schreitet jedoch ab Tag 0 bzw. 3 etwas rascher fort als bei den übrigen Gruppen mit diabetischer Stoffwechselsituation. Warum der allgemeine Gewichtsverlust bei Tieren dieser Gruppe im Vergleich zu den Gruppen D und D-IB bis zum Ende der Beobachtungszeitraumes etwas höher ausfällt, bleibt unklar (Abb. 31).

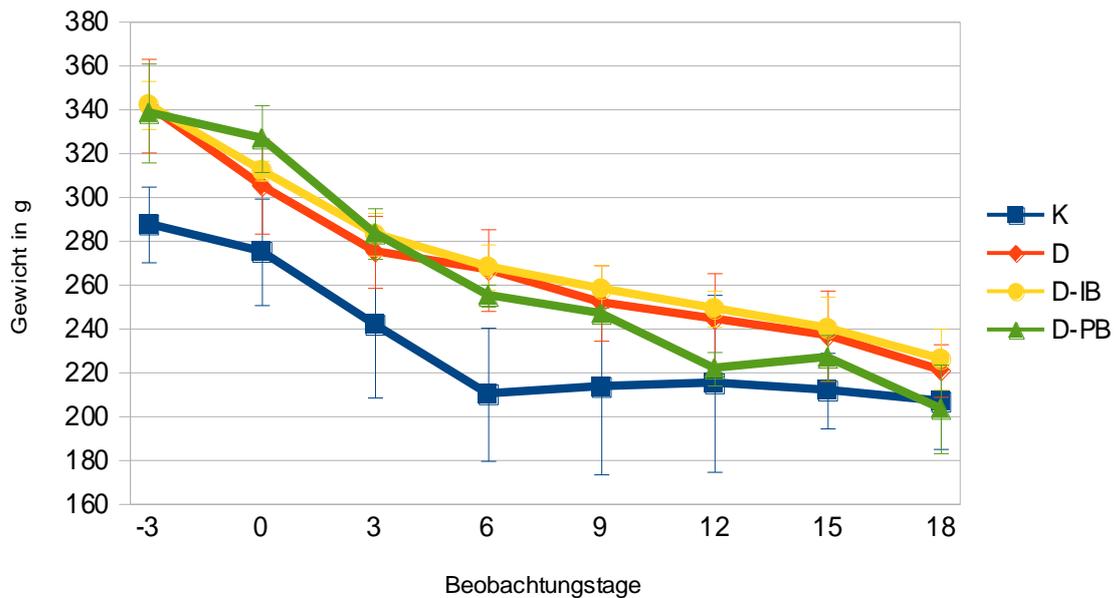


Abb. 31: Entwicklung des Körpergewichts bei allen Tiergruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum (Mittelwert \pm SD, n=8 je Gruppe)

3.3.2 Granulationsgewebe bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Applikation von Ro 28-2653 – Makroskopische Analyse

Nach Beginn der Applikation des Inhibitors Ro 28-2653 ab Tag 3 konnte zwischen den Tiergruppen mit diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Inhibitor-Applikation sowohl makroskopisch als auch quantitativ ab dem 6. postoperativen Tag ein signifikanter Unterschied bei der Bildung von Granulationsgewebe beobachtet werden.

Die Fotos am 3. postoperativen Tag wurden vor der ersten Applikation der jeweiligen Behandlung aufgenommen. Makroskopisch war in beiden Versuchsgruppen eine ähnlich große Fläche der Wunde mit Granulationsgewebe bedeckt (Abb. 32 a und b). Ab Tag 6 zeigte sich bereits ein gut erkennbarer Unterschied zwischen beiden Gruppen: während bei Tieren ohne Inhibitor-Behandlung das Granulationsgewebe seitlich zapfenartig an mehreren Stellen Richtung Wundzentrum zu ragen begann (Abb. 32 c und e), war bei den Tieren mit Applikation von Ro 28-2653 seitlich eher zirkulär und homogen einwachsendes Gewebe zum Untergrund erkennbar (Abb. 32 d und f). An Tag 9 ist bei Tieren ohne Behandlung das Wundzentrum nahezu frei von Granulationsgewebe (Abb. 32 g), während bei Tieren mit Inhibitorgabe nur noch ein kleiner Bereich ohne Granulationsgewebe rechts oben im Wundbereich erkennbar ist (Abb. 32 h, Markierung).

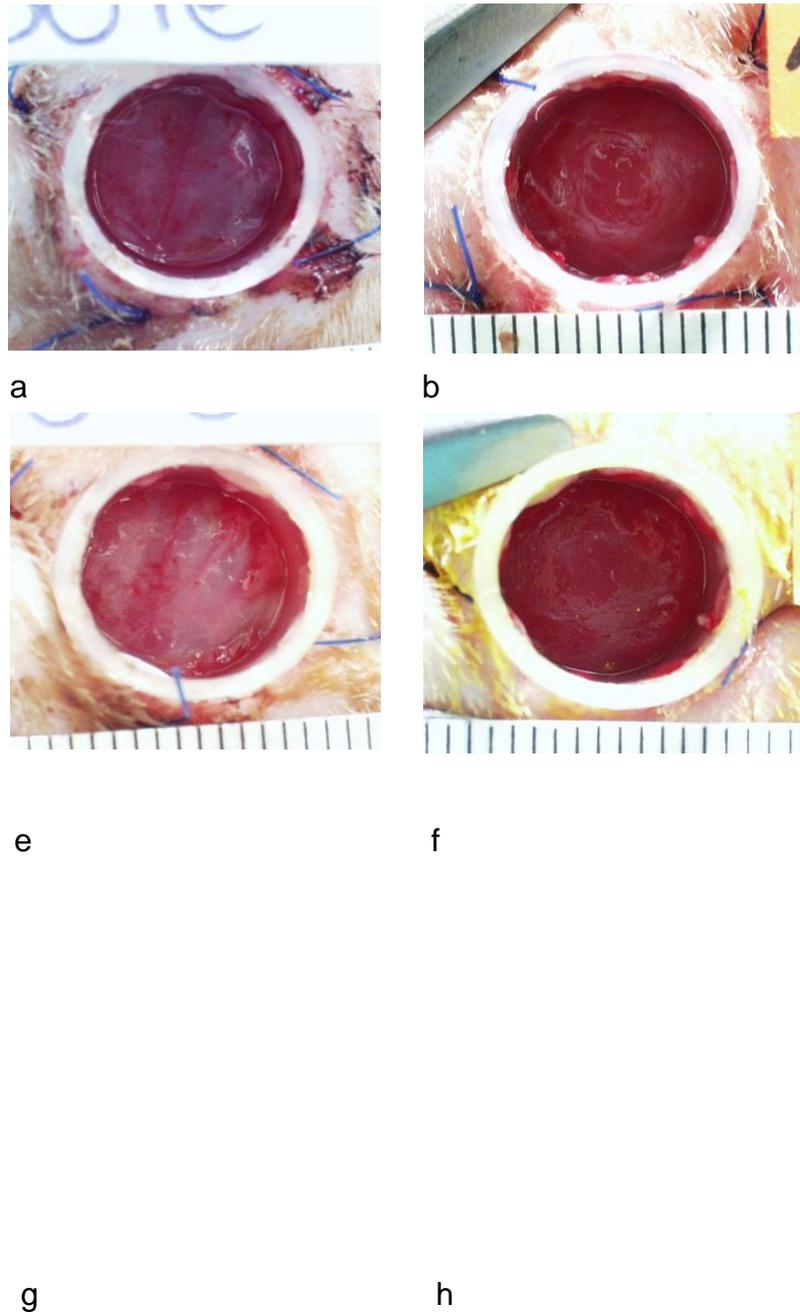


Abb. 32: Granulationsgewebe bei Wunden von Tieren mit diabetischer Stoffwechselage: links ohne, rechts mit Inhibitor-Behandlung. a und b zeigen die Granulationsfläche am 3., c und d den 6. postoperativen Tag. Zur Verdeutlichung der zur Auswertung herangezogenen Granulationsfläche ist bei e und f die Fläche am 3. postop. Tag beispielhaft markiert. g und h zeigen die Granulation mit am 9. postoperativen Tag.

An Tag 18 ist schließlich in beiden Tiergruppen der Wundgrund nahezu vollständig von Granulationsgewebe überzogen, wobei das Gewebe bei Tieren mit Inhibitorbehandlung optisch etwas dicker und robuster imponiert als bei Tieren ohne Inhibitoranwendung (vgl. Abb. 33 a und b).

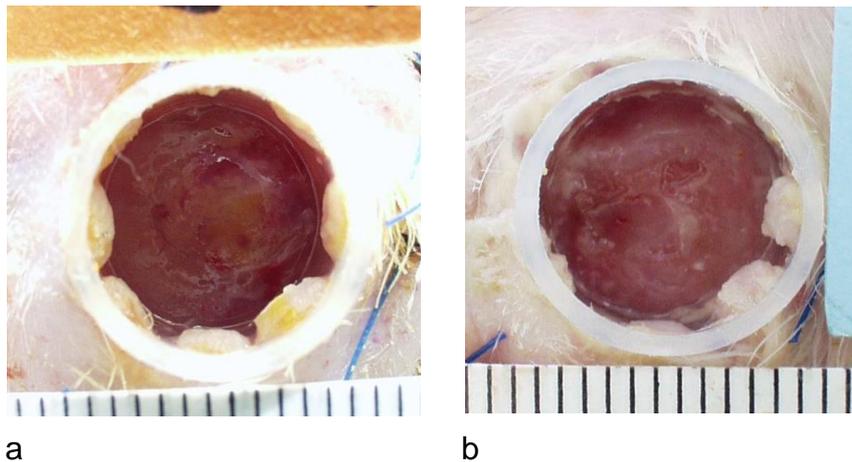


Abb. 33: Wunden am 18. postoperativen Tag: Tiere mit diabetischer Stoffwechsellage: ohne Behandlung (a), mit Behandlung (b)

3.3.3 Granulationsgewebe bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Applikation von Ro 28-2653 – Quantifizierung

Um den Einfluss von Ro 28-2653 auf die Ausbildung von Granulationsgewebe quantitativ zu erfassen wurde auch bei diesen experimentellen Gruppen die Bildung von Granulationsgewebe und Epithel planimetrisch quantifiziert. Die Granulation schreitet bei der Gruppe mit Inhibitor-Anwendung insbesondere zu Beginn der Wundheilung deutlich schneller voran und weist an Tag 6 eine mehr als doppelt so große Fläche auf wie bei Tieren ohne Behandlung (72% vs. 35%). Dieser Unterschied führt dazu, dass bei Tieren mit Inhibitor-Behandlung die Wunde bereits an Tag 9 nahezu vollständig mit Granulationsgewebe bedeckt ist. Bei Tieren ohne Behandlung verläuft die Wundheilung deutlich langsamer: hier zeigt sich von Beginn an eine deutlich langsame Bildung von Granulationsgewebe (Abb. 34).

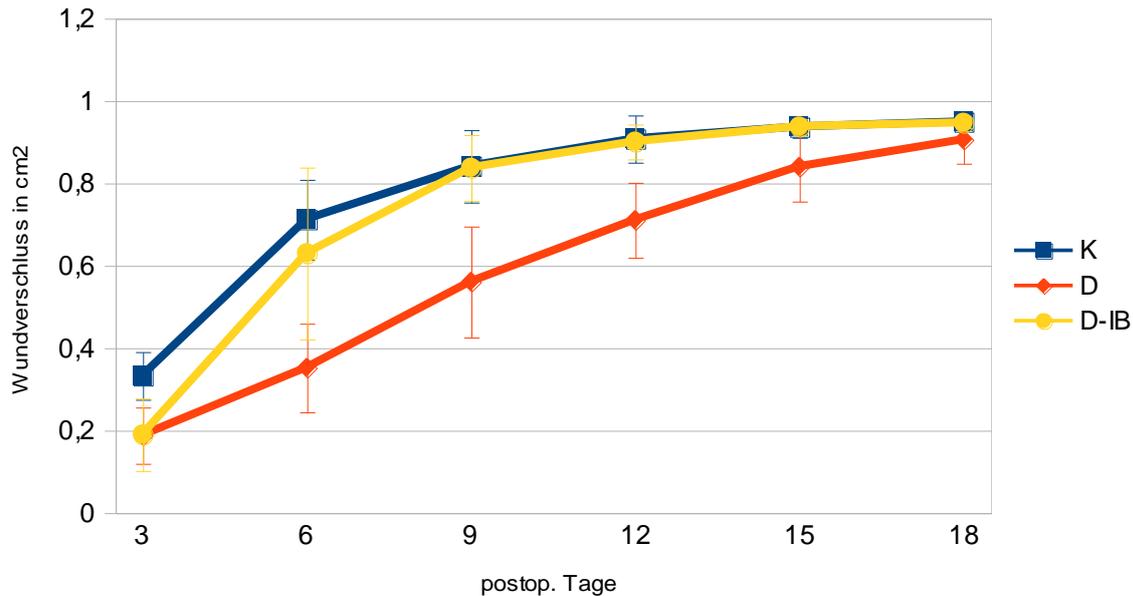


Abb.34: Bildung von Granulationsgewebe bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Inhibitor-Behandlung versus Tiere der Kontrollgruppe, n=8 je Gruppe.

Insgesamt gesehen verlaufen die Wundheilungskurven von Tieren aus der Kontrollgruppe und Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage und Inhibitor-Applikation sehr ähnlich: beide Gruppen zeigen insbesondere in den ersten Tagen nach Wundsetzung eine sehr schnell voranschreitende Bildung von Granulationsgewebe und lassen ab Tag 9 einen nahezu identischen Verlauf der Wundheilungskurven erkennen. Die Therapie mit Ro 28-2653 führt demgemäß bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage zur signifikanten Verbesserung der Granulation und zeigt ab Tag 9 einen ähnlichen Wundheilungsverlauf wie bei Tieren mit regelrechter Stoffwechselsituation (Abb. 34).

3.3.4 Epithelialisierung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechselage mit und ohne Applikation von Ro 28-2653 – Makroskopische Analyse

Makroskopisch lässt sich die Epithelialisierung als weißlich-wolkige Schicht erkennen und kann somit auch gut zum rötlich erscheinenden Granulationsgewebe abgegrenzt werden. Die Epithelialisierung ist bei Tieren mit topischer Inhibitor-Gabe bereits ab 9. postoperativem Tag deutlich besser zu erkennen als bei Tieren ohne Behandlung und zeigt ab Tag 12 bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes signifikant größere Epithelflächen (Abb. 35 a bis d). Während bei den nicht-behandelten Tieren die Epithelialisierung bis zuletzt im Zentrum der Wunde ausbleibt (Abb. 35 a und c), ist

die Fläche im PE-Ring bei Tieren mit Inhibitorgabe am 18. postoperativen Tag nahezu vollständig mit Epithel bedeckt (Abb. 35 d).

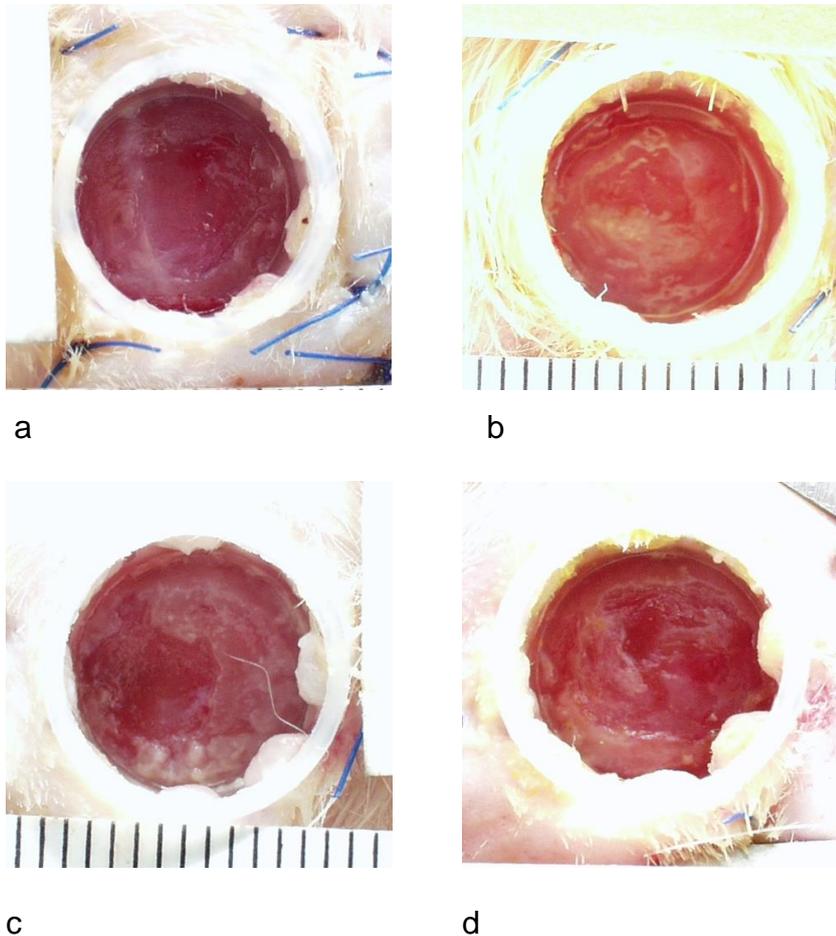


Abb. 35: Epithelialisierung am 12. bzw. 18. postoperativen Tag; Tiere mit diabetischer Stoffwechsellage ohne (a, c) und mit Inhibitor-Behandlung (b, d).

3.3.5 Epithelialisierung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Applikation von Ro 28-2653 – Quantifizierung

Die planimetrische Analyse der Epithelfläche zeigt ähnliche Tendenzen wie bei der Granulation: während bei Tieren ohne Behandlung auch hier eine eher linear verlaufende Heilungskurve festgestellt werden kann, ist am 9. postoperativen Tag bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage und Inhibitor-Behandlung eine statistisch signifikant höhere Epithelialisierung im Vergleich zu Tieren ohne Behandlung erkennbar. Die Wunden der Inhibitor-Gruppe zeigen auch hier eine deutliche Tendenz in Richtung regelrechter Wundheilung (Abb. 36).

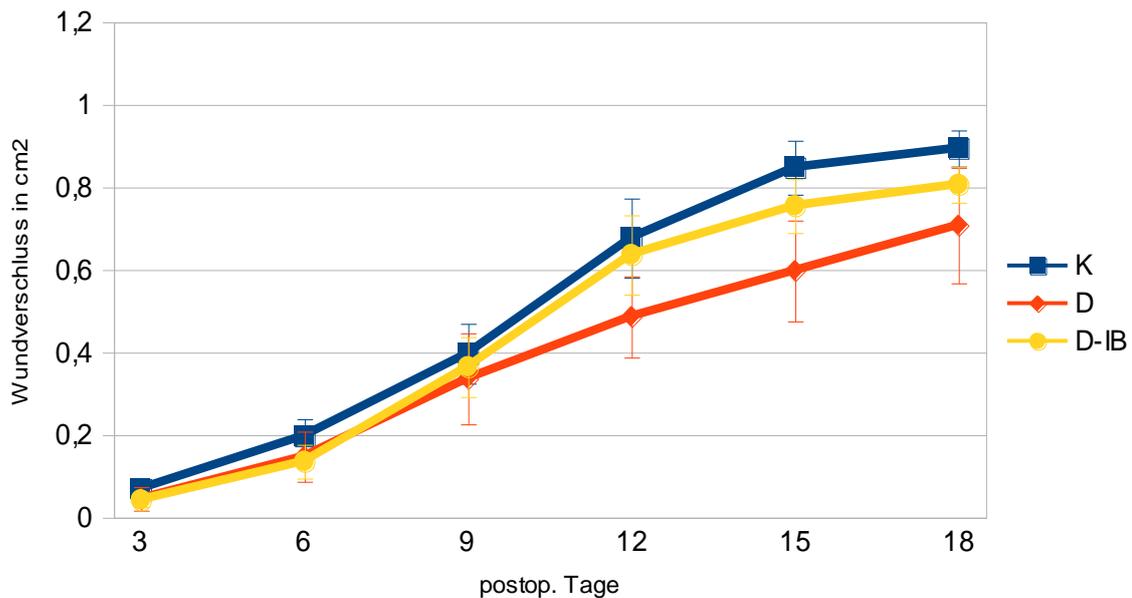


Abb. 36: Epithelialisierung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Inhibitor-Behandlung versus Tiere der Kontrollgruppe, n=8 je Gruppe.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Wunden bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage mit Inhibitor-Applikation deutlich besser heilen als die Wunden von unbehandelten Tieren. Auch stellt sich das Wundgewebe bei dem Inhibitor-Kollektiv etwas sauberer dar und die Wachstumstendenz der Kutis und Subkutis ist besser ausgeprägt. Dies bestätigt die Annahme, dass durch die Applikation eines MMP-Inhibitors insbesondere in der Anfangsphase eine Verbesserung der Wundheilung erzielt werden kann.

3.3.6 Einfluss von Placebo auf die Wundheilung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage

Um die Frage zu klären, welche Auswirkungen die Placebo-Behandlung auf die Wundheilungstendenz der diabetischen Tiere hat, wurde einer Tiergruppe die Trägersubstanz des Inhibitors Ro 28-2653 verabreicht. Der Vergleich der jeweiligen Tiergruppen bestätigte die Annahme, dass die alleinige Applikation von Placebo nicht zu einem signifikanten Unterschied in der Wundheilung (Epithelialisierung wie auch Granulation) im Vergleich zu Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage ohne Behandlung führt. Es zeichnete sich eher die Tendenz zu einer geringen Verzögerung der Wundheilung bei Tieren ab, die die alleinige Trägersubstanz appliziert bekamen. Eine Signifikanz der Unterschiede konnte jedoch an keinem der Untersuchungstage

nachgewiesen werden (Abb. 37 und 38).

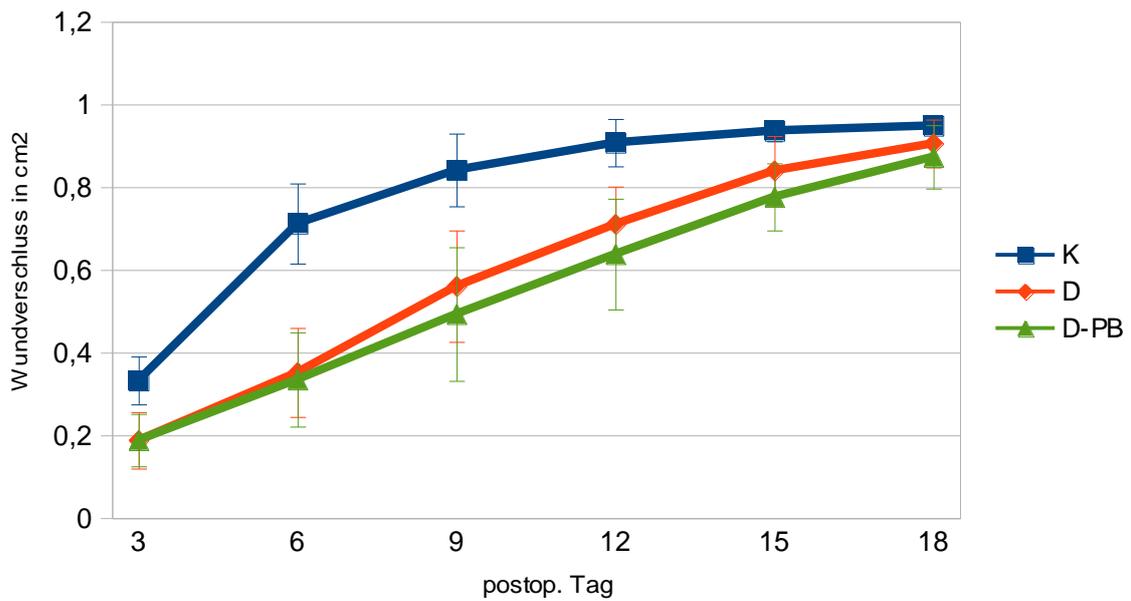


Abb. 37: Bildung von Granulationsgewebe bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage und Placebo-Applikation versus keine Behandlung, n=8 je Gruppe.

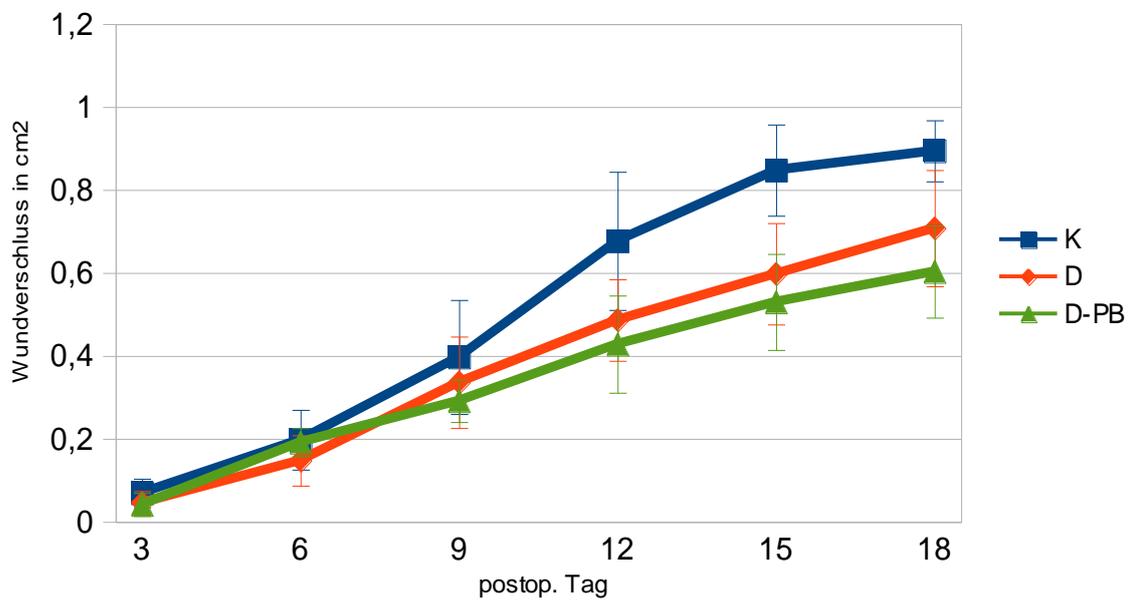


Abb.38: Epithelialisierung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage und Placebo-Applikation versus keine Behandlung, n=8 je Gruppe.

3.4 Systemische Konzentration von Ro 28-2653

Zum Ausschluss einer systemischen Wirkung des Inhibitors wurde bei einer Gruppe von Tieren (n=8) mit lokaler Inhibitor-Applikation an den Beobachtungstagen Blut aus der Schwanzvene entnommen und zur Untersuchung an die Firma Roche Diagnostics übersendet. Die Untersuchungen der Plasmaproben ergaben an allen Beobachtungstagen Konzentrationen unter der Nachweisgrenze von 250 ng/ml.

4 Diskussion

4.1 Das Tiermodell

Grundsätzlich sollten Wundheilungsmodelle die in der Klinik anzutreffende Wundsituation und den Heilungsverlauf möglichst exakt widerspiegeln. Gleichzeitig müssen sie aber vielen weiteren Anforderungen wie Handhabung, Kosten und Ethik gerecht werden. Die in aktuellen Studien verwendeten Wundheilungsmodelle können grob in *in vivo*- und *in vitro*-Modelle unterteilt werden. *In vitro*-Modelle ermöglichen es, einzelne Zell- und Organkulturen aus geringsten Mengen des entsprechenden Gewebes zu züchten und zu untersuchen [Baschong 1998]. Am häufigsten kommen hier Zellkulturen zum Einsatz, wobei zumeist Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und Makrophagen untersucht werden [Gottrup et al. 2000]. Die Vorteile von Untersuchungen dieser Art sind die schnelle Durchführbarkeit, einfache Ausrichtung, geringe Kosten, die Möglichkeit der Beobachtung einzelner Zelltypen und die fehlende Notwendigkeit der Auseinandersetzung mit ethischen Fragen. Der größte Nachteil besteht allerdings in der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf komplexere Organismen wie z.B. den Menschen.

In *in vivo*-Modellen können dagegen klinische Gegebenheiten besser nachempfunden werden, wobei Wundmodellen am Menschen aus ethischen Gründen enge Grenzen gesetzt sind. Für die Klärung von Fragestellungen zur Granulation, zum Wundverschluss unter dem Einfluss verschiedenster Promotoren und Inhibitoren, aber auch zu histologischen Untersuchungen können jedoch Tiermodelle gute Dienste leisten. Hierzu bieten sich grundsätzlich Versuche an Groß- und Kleintieren an, wobei Untersuchungen an Schweinen [Baschong 1998], am Modell des Fledermausflügels, Kaninchenohrkammern [Sandison 1924] und dem Ohr der haarlosen Maus [Barker et al. 1989; Algire 1943] bevorzugt werden. Nicht zu vergessen ist hier auch das Modell der Rückenammern bei verschiedenen Kleintieren [Knighton et al. 1981].

Unter den Großtieren hat sich das Schwein aufgrund der Übereinstimmung des Aufbaus und der Physiologie des Schweinehautgewebes mit der menschlichen Haut durchgesetzt. Der Wundverschluss erfolgt hier wie auch beim Menschen hauptsächlich durch Reepithelialisierung [Meyer et al. 1978; Hartwell 1955]. Obwohl die Anatomie und Physiologie der Haut des Schweins der des Menschen sehr ähnlich sind und viele Untersuchungen das Schweinmodell als das optimale Evaluationswerkzeug ansehen [Sullivan et al. 2001], sind Kleintiermodelle für die Grundlagenforschung praktischer. Im Vergleich zu Großtieren ist

die Haltung weniger anspruchsvoll, die Kosten sind niedriger und die Verfügbarkeit der Tiere ist größer. Üblicherweise werden für Wundheilungsstudien mittelgroße Nager wie Ratten und Meerschweinchen herangezogen, da sie unproblematischer in Gruppen gehalten werden können. In den letzten Jahren hat sich insbesondere die Ratte als das am häufigsten benutzte Kleintier in der Wundheilungsforschung durchgesetzt.

Das Defektwundmodell an der Ratte wurde von *Koschnick et al. 1997* konzipiert und bietet die Möglichkeit, unter Ausschaltung der Wundkontraktion die Gewebe-neubildung, Reepithelialisierung und Neovaskularisierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten quantitativ zu beurteilen. Hierzu werden den Tieren zumeist auf dem Rücken nach Wundsetzung Polyvinyl-, Polyurethan- oder Cellulosekammern implantiert, wobei Inzisions- und Exzisionswunden gleichermaßen verwendet werden [Dorsett-Martin 2004].

In unserer Studie haben wir das Kleintiermodell mit der von *Koschnick et al.* entwickelten Wundsetzungstechnik verwendet. Dieses Modell bot neben der einfachen und kostengünstigen Tierhaltung auch die Beurteilungsmöglichkeit einer standardisierten, durch den PVE-Ring vorgegebenen Wundfläche. Die spezielle Form mit den seitlichen Perforationen ermöglichte eine Stabilisierung der Wundränder ohne größere Beeinträchtigung der Gewebsproliferation in die Wunde. Durch die Isolation des Behandlungsareals über die vorgegebene Form der Wundkammer war gleichzeitig eine einfache Applikation des Inhibitors und das lokale Verweilen der Substanz gewährleistet. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse ist jedoch aufgrund der strukturellen und funktionellen Unterschiede zwischen der Haut des Menschen und der Ratte nur eingeschränkt möglich. Die Ratten gehören zu den sogenannten „loose-skin animals“, d. h. die Haut liegt, im Vergleich zur mit der Subkutis fest verwachsenen menschlichen Haut [Deutschmann 2005], dem darunter liegenden Gewebe nur locker auf. Auch der Gefäßverlauf in der Subkutis ist bei den Ratten anders als beim Menschen. Das Wundheilungsverhalten dieser Tiere wird wesentlich beeinflusst von dem sogenannten Panniculus Carnosus, einem dem Platysma des Menschen entsprechende, subkutane, glatte Muskulatur, die den Wundverschluss durch Wundkontraktion ermöglicht [Davidson 1998]. Der Einsatz des PVE-Ringes in unserer Studie verhindert jedoch die Wundkontraktion und gleicht diesen Nachteil dieses Tiermodells aus.

Die Implantation von Polyethylen in der Endoprothetik und rekonstruktiven Chirurgie z.B. des Auges ist bereits jahrzentlang bekannt und war problemlos [Janecka 2000; Ries 2005; Garibaldi et al. 2007]. Das Material ist chemisch und biologisch inert [Metzger 2004], allerdings wird in der Literatur die Ausbildung von Fremdkörpergraulomen unter PVE beschrieben [Chuo et

al. 2009; Sargeant et al. 2006]. Die Behinderung der Wundkontraktion, der Re-Epithelialisierung und der Re-Kapillarisation sind zusätzliche Faktoren, die sich negativ auf die Wundheilung auswirken können [Broughton et al. 2006]. Die Methode nach hat sich in unserer Studie weitestgehend bewährt: bei allen Tieren mit normaler Stoffwechsellage kam es am 18. postoperativen Tag zu einer vollständigen Granulation und Epithelialisierung und dem Verschluss der Wunde. Lediglich bei einem Versuchstier mit diabetischer Stoffwechsellage entstand im unteren Bereich des PVE-Ring-Rahmens ein Druckulcus. Diese Einzelbeobachtung liegt aber durchaus noch im Rahmen der natürlichen Varianz der Wundheilung.

4.2 Einfluss des Geschlechts der Ratten

Benus et al. (1991) beschreiben aggressives Verhalten bei Ratten als eine Art der aktiven Bewältigung von Umwelt-Herausforderungen, die je nach Gattung der Ratte unterschiedlich ausgeprägt ist. Untersuchungen zur Aggressivität von Sprague Dawley-Ratten zufolge ist bei weiblichen Tieren dieses Stammes zeitweise die Angriffslust und die Angstbereitschaft erhöht [Rima et al. 2009; Mayer et al. 1987]. Insbesondere betrifft dies die Phasen der Schwangerschaft und Stillzeit, aber auch unabhängig davon kann es zu hormonabhängigen Attacken gegen gleichgeschlechtliche Eindringlinge kommen [Albert et al. 1989].

Im Rahmen dieser Studie wurden deshalb nur männliche Ratten verwendet, um den monatlichen Zyklus und die damit verbundenen hormonellen Schwankungen der weiblichen Tiere und folglich die Aggressivität zu umgehen. Der Nachteil der Haltung männlicher Nager liegt allerdings darin, dass es beim Durchmischen etablierter Gruppen erwachsener Tiere zu äußerst aggressivem Verhalten gegeneinander kommen kann [Leshner et al. 1975]. Dies zwang uns zu einer isolierten Haltung der Tiere, insbesondere in der postoperativen Phase.

4.3 Einfluss des toxischen Diabetes und des Gewichtes der Tiere auf die Wundheilung

Die Applikation von Streptozotocin ist eine der am häufigsten angewandten Methoden zur experimentellen Induktion eines insulinabhängigen Diabetes mellitus [Rees et al. 2005]. Streptozotocin kommt in 2 anomerischen Formen (α und β) vor und wird in der Behandlung von Inselzelltumoren des Pankreas und einiger neuro-endokriner Tumoren verwendet [Strosberg et al. 2007]. Die selektive Zytotoxizität auf pankreatische β -Zellen prädestiniert die Substanz zum Einsatz für Untersuchungen an Tiermodellen mit iatrogen ausgelöster diabetischer Stoffwechsellage. Zur Applikation und Dosis gibt es unterschiedliche Protokolle. Die einmalige intraperitoneale Injektion einer hohen Dosis von 60 mg/kg KG [Akbarzadeh et al. 2007] bis 220 mg/kg KG [Ceylan-Isik et al. 2006] oder multiple i.p.-Applikationen von 5 x 40 mg/kg KG [Rossini et al. 1977] oder 4 bzw. 6 x 35 mg/kg KG [Lee et al. 2006; Hedge et al. 2003] wurden beschrieben. Diese Auswahl der Verabreichung entscheidet über die Art des Diabetes mellitus, der induziert wird [Junod et al. 1969; Like et al. 1976]: Während die mehrfach wiederholte Gabe einen nicht Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (NIDDM) verursacht, führt die einmalige Abgabe zur Manifestation eines "insulin-dependent diabetes mellitus" (IDDM).

In dieser Studie wurde die einmalige Verabreichung von Streptozotocin in der Dosierung von 65 mg/kg KG i.p. 3 Tage vor Versuchsbeginn gewählt, dies entspricht der standardisierten Dosis von 25 mg Streptozotocin pro Tier. Die gewählte Dosis lag somit knapp über der von Akbarzadeh et al. (2007) verwendeten Schwelle für die Induktion eines toxischen IDDM, lag andererseits weit unter den in der Literatur erwähnten Höchstdosen von 220 mg/kg KG, die zu Nebenwirkungen wie der Entstehung von Kardiomyopathien führen können [Ceylan-Isik et al. 2006]. Für die Induktion der diabetischen Stoffwechsellage wurden 63 Tiere rekrutiert. Während 49 Tiere nach der Gabe von Streptozotocin einen manifesten Diabetes entwickelten, konnte bei 14 Tieren mit einem Körpergewicht von 335 - 345 g ein Diabetes erst nach einer weiteren Streptozotocin-Injektion von 20 mg/kg KG induziert werden. Dieser Effekt beruht bei gleichen Einschlusskriterien der Tiere am ehesten auf einer unterschiedlich ausgeprägten Reparations- und Regenerationsfähigkeit des Rattenpankreas nach Verabreichung von Noxen [Rossini et al. 1977; Logothepopoulos et al. 1968]. Die These der biologischen Varianz der Tiere als mögliche Ursache für die Notwendigkeit von unterschiedlichen Streptozotocin-Dosen wird auch unterstützt von den Arbeiten von Axler (1982) und Povoski et al. (1993),

die eine Beeinträchtigung der Wirksamkeit von Streptozotocin in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, pH-Wert und Erhitzung auf 37°C ausschließen konnten.

Ein Zusammenhang zwischen Streptozotocin-Dosis, Hyperglykämie-Ausprägung und Gewicht ist in mehreren Arbeiten beschrieben [Beale et al. 1997, Schaffer et al. 1997, Povoski et al. 1993; Protz 2007; Dittrich 1971]. Hierbei wird bei manifestem Diabetes überwiegend eine Gewichtsabnahme beobachtet [Kerner et al. 2001; Nakhoda et al. 1977], wie auch bei Tieren unserer Studie. Dieser Gewichtsverlust ist am ehesten bedingt durch die katabole Stoffwechsellage des Organismus mit Mangel an Proteinsynthese, Dehydratation, vermehrtem Fettsäurenabbau und daraus resultierender Ketoazidose. Sicherlich kann auch der OP-Stress und Wundschmerz als weiterer wichtiger ursächlicher Kofaktor angesehen werden.

4.4 Einfluss der Isofluran-Narkose

Die Injektionsanästhesie ist bei experimentellen Arbeiten mit Labortieren nach wie vor die Narkosemethode der Wahl. Um negative Einflüsse der konventionellen Injektionsanästhesien wie Hypothermie [Flecknell et al. 1991], lange Ausleitungsphasen, Herz-/Kreislaufprobleme [Hall et al. 2001] und Atemdepression [Sedgwick et al. 1992] weitgehend zu eliminieren wurde insbesondere für Kleintiere eine vollständig antagonisierbare Kombinationsanästhesie entwickelt. Bei Ratten wurde dafür die Kombination aus $\alpha 2$ -Agonisten (Medetomidin), Benzodiazepin (Midazolam), Opioid (Fentanyl) und deren Antagonisten Atipamezol, Flumazenil und Naloxon etabliert [Mantel 1999].

Dennoch ist der Einsatz der Inhalationsanästhesie bei Ratten der Injektionsanästhesie in vielerlei Hinsicht überlegen und wird von vielen Autoren präferiert [Hall et al. 2001; Sedgwick et al. 1992; Thurmon et al. 1996]. Die Einleitung erfolgt angesichts des schnellen An- und Abflutens vom Inhalationsgas wesentlich stressärmer und die Narkosetiefe lässt sich sehr viel besser steuern. Daher entschieden wir uns bei unserer Studie für diese Narkoseform. Die alleinige Inhalationsanästhesie hat jedoch auch den Nachteil, dass sie kreislaufbelastender ist und zu einer Atemdepression führen kann. Die Auswirkung dieser Anästhesieform auf die Mikrozirkulation und den Blutdruck ist in mehreren Studien untersucht worden [Baez et al. 1964; Morisaki et al. 1997]: so führt Isofluran (1,0 Vol%) beim Goldhamster zu einem signifikanten Abfall des mittleren arteriellen Druckes und einer nicht signifikanten Konstriktion der kleinen Arteriolen (Durchmesser <25 μm) [Bohrer et al. 1987] und beim Menschen zu einem Abfall des dermalen Gefäßwiderstandes [Longnecker

1984]. In unseren Untersuchungen traten Narkosekomplikationen hingegen insbesondere bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage auf. Bei etwa 15% der Tiere mit induziertem Diabetes mellitus kam es bei Ausleitung der Narkose ein aussergewöhnlichen Bronchospasmus, der bei 2/3 der Tiere auch zum Tod führte. Die allgemeine Komplikationsrate der Isofluran-Gasnarkose liegt in unserer Studie deutlich über der in der Fachliteratur angegebenen Häufigkeiten von $\geq 1/10.000$ und $< 1/1.000$ (Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen, 28.03.2013, Fachinformation Isofluranhaltiger Arzneispezialitäten). Diese deutlich abweichende Inzidenz liegt am ehesten an dem Allgemeinzustand der Tiere, das durch den Diabetes mellitus deutlich schlechter war als bei Tieren mit normaler Stoffwechsellage. Des weiteren wäre auch eine nicht optimal auf die Bedürfnisse der Ratten abgestimmte Narkoseführung als Ursache zu denken. Abschließend kann jedoch konstatiert werden, dass die verwendete Narkoseart für diese Studie eine geeignete und einfach durchzuführende Methode war, die eine noch akzeptable Ausfallrate aufwies.

4.5 Einfluss der bakteriellen Kontamination auf die Wundheilung

Die Rolle von Bakterien bei der Wundheilung ist seit Jahren ein Diskussionsthema. Einige Untersuchungen deuten auf eine positive Beeinflussung der Wundheilung durch Bakterien: *Edwards et al. (2004)* konnten zeigen, dass trotz dichter Kolonisation mit Mikroorganismen keine negative Auswirkungen auf die Wunde zu verzeichnen sind. Gleichwohl sind die nachteiligen Auswirkungen von invasiv pathogenen Keimen wie *Clostridium perfringens* und *Streptococcus pyogenes* anerkannt [Kujath et al. 2007]. Einzelne Untersuchungen konnten indes auch beweisen, dass Keime des physiologischen Biofilms des Menschen (wie beispielsweise *Staphylococcus aureus*) gleichermaßen Infektionen verursachen können [Ethunandan et al. 2004]. In der Wundmikrobiologie gilt es daher generell zu unterscheiden, ob die vorhandenen Keime als Biofilm, Kontamination oder Infektion zu bezeichnen sind. Von Biofilm wird beim Wachstum einer großen Anzahl von fest an einer Grenzfläche haftenden Bakterien innerhalb einer dreidimensionalen Matrix gesprochen. Unter geeigneten Bedingungen können alle Bakterien einen Biofilm aufbauen. Sie sind dynamische heterogene Lebensgemeinschaften, die sich kontinuierlich verändern. Sie können aus einer einzigen Bakterien- oder Pilzart bestehen oder, was häufiger vorkommt, polymikrobiell sein. Die meisten Bakterienarten, die Infektionen verursachen, gehören zur normalen Mikroflora des Menschen [Steven et al. 2004].

Nach *Broughton et al. (2006)* stellen PVE-Implantate ein Reservoir für Bakterien dar und verlängern demzufolge die Inflammationsphase über zusätzlich interagierende bakterielle Proteinasen [McCarty et al. 2012]. Da in unserem Experiment der PVE-Ring unter semisterilen Bedingungen implantiert wurde, ist zweifelsohne von einer bakteriellen Kontamination auszugehen. Daher wurden stichprobenartig Spülflüssigkeiten unterschiedlicher Versuchsgruppen und das Wundgewebe auf eine bakterielle Besiedelung hin untersucht und eine starke Besiedelung der Wunden mit *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Corynebakterium species* und *hämolyisierende Streptokokken der Gruppe G* verzeichnet. Die Bakterienpopulationen waren nahezu bei jedem Tier identisch. Da die Wundheilung jedoch bei Tieren der Kontrollgruppe trotz Kontamination die Inflammationsphase überwinden konnte, konnte dieser Aspekt als nicht relevant eingestuft werden. Trotz steriler OP-Konditionen findet die Heilung bei einer Wunde am Patienten gleichermaßen nicht unter sterilen Kautelen statt. Bei der Wundversorgung kommt es zumeist zu einer ungewollten Kontamination, die jedoch in den meisten Fällen die Wundheilung nicht beeinträchtigt, so auch bei den Tieren der Kontrollgruppe. Dieses Faktum ist hingegen bei Tiergruppen mit diabetischer Stoffwechsellage etwas kritischer zu beurteilen. Es ist durchaus denkbar, dass das ohnehin bestehende Ungleichgewicht zwischen Proteinasen und deren Inhibitoren durch zusätzliche Bakterien-Proteinasen (vgl. hierzu auch Abb. 1) noch weiter unterstützt wurde.

Die Wirksamkeit einer Hautantiseptik mit PVP-Jod durch eine Jod-imprägnierte Folie mit und ohne vorherige Hautantiseptik wurden bereits von verschiedenen Gruppen untersucht. Die Folie entfaltete eine eindeutige antiseptische Wirksamkeit, auch konnte die Wundkontamination postoperativ bei Anwendung dieser Folien von 15% auf 1,6% reduziert werden [Fairclough et al. 1986; Dewan et al. 1987]. An experimentellen Wunden bei Ratten wurde beispielsweise 2% Povidon-Jod ohne negativen Einfluss auf die Wundheilung angewandt, während die Wundheilung durch eine 5%ige Jodkonzentration dagegen bereits gehemmt wurde [Kallenberger et al. 1991]. Der Ersatz der Opsite-Folie durch eine 2%ige Jod-imprägnierte Folie direkt nach OP bzw. bei Verbandswechsel kann eine etwaige exzessive bakterielle Kolonisation und folglich die zusätzliche Degradation des Granulationsgewebes und der Epithelschicht durch bakterielle Proteasen dezimieren und stellt möglicherweise einen vielversprechenden Lösungsansatz dar.

4.6 Wundplanimetrie

Zur quantitativen Erfassung der Wundfläche gehört neben Vermessungen von histologischen Schnitten der Wunden [Chvapil et al. 1988] die Auswertung von manuell nachgezeichneten Wunden auf Folien. Dabei wird auf dem Computerbildschirm, der die Aufnahme der Wunde zeigt, eine Klarsichtfolie gehalten und der Wundrand kann mit einem Stift nachgezeichnet werden [Gowland Hopkins et al. 1983]. Wir haben den Zustand der Wunde an den jeweiligen Verbandswechsel-Tagen nach dem ausführlichen Débridement optisch mittels Digitalfotografie dokumentiert und mit Hilfe eines computerassistierten Planimetrie-Programms quantitativ ausgewertet. Wichtig für die exakte Auswertung der Bilder war vor allem eine gute Qualität der Aufnahmen. Fehlerquellen wie Unschärfe des Fotos durch fehlende Fokussierung und nicht genau orthotope Aufnahmen wurden dadurch eliminiert, dass jede Wunde mittels Verwendung eines Stativs mehrfach abfotografiert und das beste Bild verwendet wurde (vgl. Kap. 2.5, 3.1.2, 3.3.2 und 3.3.4). Die Bewertung von Granulation und Epithelialisierung des Wundgewebes auf den Fotos erfolgte subjektiv. Intraindividuelle Fehlbeurteilungen können hier grundsätzlich nicht absolut eliminiert werden, in der Literatur ist eine Varianz von etwa 10% beschrieben. Diese Disparität liegt interindividuell noch deutlich höher [Plassmann et al. 1994]. Daher wurden die Fotos durch zwei Beobachter gemeinsam und in Absprache mit erfahrenen Kollegen ausgewertet. Um die Varianz der Auswertung und Fehlbeurteilungen zu minimieren und eine größtmögliche Objektivität zu gewährleisten wurden alle Wunddokumentationen durch die gleichen Beobachter evaluiert.

4.7 Einfluss der Trägersubstanz auf die Wundheilung

Die lokale Verabreichung von Wirksubstanzen erfordert die Verwendung von Trägersystemen, die am Wirkort die adäquate Versorgung der Wunde mit der applizierten Substanz gewährleisten. Hierzu wurden in den letzten Jahrzehnten unterschiedliche Arzneistoff-Trägersysteme entwickelt und untersucht, wie z.B. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) oder Core MultiShell nanotransporters (CMS) [Wolf et al. 2009; Höntzke et al. 2014]. Die spezielle Bauweise der Transporter mit lipophiler Innenschale und einer hydrophilen Außenhülle ermöglicht den Einschluss und die Einkapselung einer breiten Vielfalt von Gastmolekülen, die so in unterschiedliche Gewebearten transportiert werden können. *Mühlen et al. 1998* konnte die Abgabe von Prednisolon durch Beladung auf SLN über

einen Zeitraum von 5 Wochen beobachten, während andere Gruppen eine kontinuierliche Verteilung der geladenen Wirksubstanzen über mindestens 24 Stunden sowie über einige Tage belegen konnten [Hu et al. 2002, Jennings et al. 2000a]. Beide Systeme (SLN und CMS) ermöglichen eine fortwährende Abgabe der geladenen Partikel über unterschiedliche Zeiträume und beeinflussen den Effekt des Wirkstoffes nicht nachteilig, sondern verstärken diese sogar [Wolf et al. 2009, Haag et al. 2011, Höntzke et al. 2014]. Viele diese Untersuchungen wurden jedoch *in vitro* durchgeführt und die Aussagen somit nicht direkt auf unsere Studienergebnisse zu übertragen. Die Reaktionen der Substanzen können *in vivo* deutlich unterschiedlich ausfallen. Einige Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Hemmung der Zellmigration in Wunden durch SLN wie auch CMS sehr unwahrscheinlich ist [Wolf 2009]. Andere Gruppen konnten allerdings direkt oder indirekt durch Nanopartikel vermittelte inflammatorische Reaktionen wie auch Hinweise auf Wechselwirkungen mit Wund-Proteinen konstatieren [Dong et al. 2008; Schneider et al. 2009]. Ähnliche Tendenzen hinsichtlich Beeinflussung der Wundheilung konnten wir in unserer Studie beobachten: Die Granulation wie auch die Epithelialisierung der Wunden diabetischer Tiere mit Behandlung von Trägersubstanz (Placebo) zeigten tendenziell eine etwas schlechtere Wundheilung an als bei Tieren ohne Behandlung. Dieser Trend ist am ehesten auf die Interaktion von Nanopartikeln in der Trägersubstanz mit den unterschiedlichen Immunzell-Linien im Wundgeschehen und der dadurch veränderten Immunantwort zu erklären [Dobrovolskaia et al. 2008]. Es ist anzunehmen, dass die veränderte mechanische Belastung der Wunde bei Träger-Applikation im Vergleich zu Tieren ohne Therapie zu einer erhöhten Immunantwort führt und dadurch die Wundheilung vergleichsweise negativ beeinflusst. Da sich die Ergebnisse von Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage mit und ohne Placebo-Behandlung jedoch statistisch nicht signifikant unterscheiden, wurde der Effekt in dieser Studie nicht weiter berücksichtigt.

4.8 Einfluss des Inhibitors Ro 28-2653 auf die Wundheilung

Experimentelle Therapieansätze zur Verbesserung der Wundheilung beruhten bisher meist auf der lokalen Substitution von Wachstumsfaktoren und/oder Matrixproteinen [Chen et al. 1999, Robson 1991]. Neuere Studien haben auch die Stimulation der in der Wunde befindlichen Zellpopulationen wie z.B. Fibroblasten mittels Gentransfer untersucht [Petrie et al. 2003; Wei et al. 1999; Rosenthal et al. 1997; Jeschke et al. 1999]. Obwohl beide Ansätze durchaus vielversprechende Ergebnisse aufweisen, stellen sie keinen kausalen Therapieansatz dar.

Die proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix ist essentiell für die Wundreparatur und das Remodeling der kutanen Verletzung [Yager et al. 1999]. Einige Studien haben Einblicke in die komplexe Aktion der MMPs in der Wundheilung gegeben: MMP-2 und MMP-9 sind entscheidende Mediatoren beim physiologischen Verlauf der Wundheilung, wobei MT-MMP1 (=MMP-14) als Aktivator beider Enzyme fungiert (Abb. 3) und insbesondere am 5. postoperativen Tag vermehrt detektiert werden konnte (Abb. 39) [Pei et al. 2000; Okada et al. 1997]. MMP-2 und MMP-9 spielen in den ersten 3 Tagen nach Wundsetzung eine essentielle Rolle und können anfangs in sehr hohen Konzentrationen detektiert werden [Hu et al. 2012, Nissinen et al. 2015]. MMP-1 hingegen ist bedeutend für die Proliferationsphase von Granulation und Epithelialisierung und ermöglicht u.a. die Verbreitung und Bewegung der Keratinozyten im kollagenreichen Wundbett [Hu et al. 2001]. Die Hochregulierung beginnt am 3. postoperativen Tag [Petri et al. 1997] und dauert bis zum 14. Tag, wobei am 7. Tag ein Maximum zu verzeichnen ist [Nwomeh et al. 1998]. MMP-2 findet sich zudem auch in der Phase des Remodelings. Maximale Werte dieser Proteinase werden am 5. postoperativen Tag detektiert und fallen bis zum 14. Tag wieder etwas ab [Inkinen et al. 2000; Okada et al. 1997]. *Mirastschijski (2002)* wie auch *Osborne et al. (2002)* konnten außerdem feststellen, dass die Aktivität von MMP-2 zusammen mit MMP-9 eine entscheidende Rolle bei der Keratinozytenmigration spielt. MMP-8 wird vor allem in heilenden Wunden gefunden [Armstrong et al. 2002], wobei ihr Maximum an Tag 4 beobachtet wird und TIMP-1 gleichzeitig kaum nachzuweisen ist. Ihre Konzentrationen liegen zu allen Phasen der Wundheilung 100- bis 200-fach höher als die von MMP-1 [Nwomeh et al. 1998] (Abb. 39).

Ein weitere beachtliche Rolle kommt der MMP-10 in der Remodelingphase zu, während sie bei der Entstehung von chronischen Wunden kaum Bedeutung hat [Rechardt et al. 2000; Elomaa et al. 2000]. Untersuchungen in chronischen wie in akuten Wunden zu unterschiedlichen Zeitpunkten konnten bei der Expression von MMP-1, MMP-3 und MMP-10 keine signifikanten Unterschiede feststellen [Saarialho-Kere 1998]. Zwei Arbeitsgruppen konnten belegen, dass MMP-9 insbesondere in der frühen Wundheilungsphase einen beachtlichen Beitrag zur Entstehung und Reifung des Granulationsgewebes leistet [David et al. 2001; Inkinen et al. 2000]. Außerdem konnte an MMP-9-defekten Mäusen gezeigt werden, dass die Proteinase auch essentiell für die Epithelialisierung ist, da an Gelatinase-defizienten Mäusen erhebliche Defekte bei Entstehung der epithelialen Basalmembran erkannt werden konnten [Mohan et al. 2002]. Als Fazit dieser Untersuchungen kann demzufolge festgehalten werden, dass insbesondere die Proteinasen MMP-1, MMP-2,

MMP-8, MMP-9 und MT-MMP1 (MMP-14) eine entscheidende Rolle bei dem Wundheilungsprozess spielen.

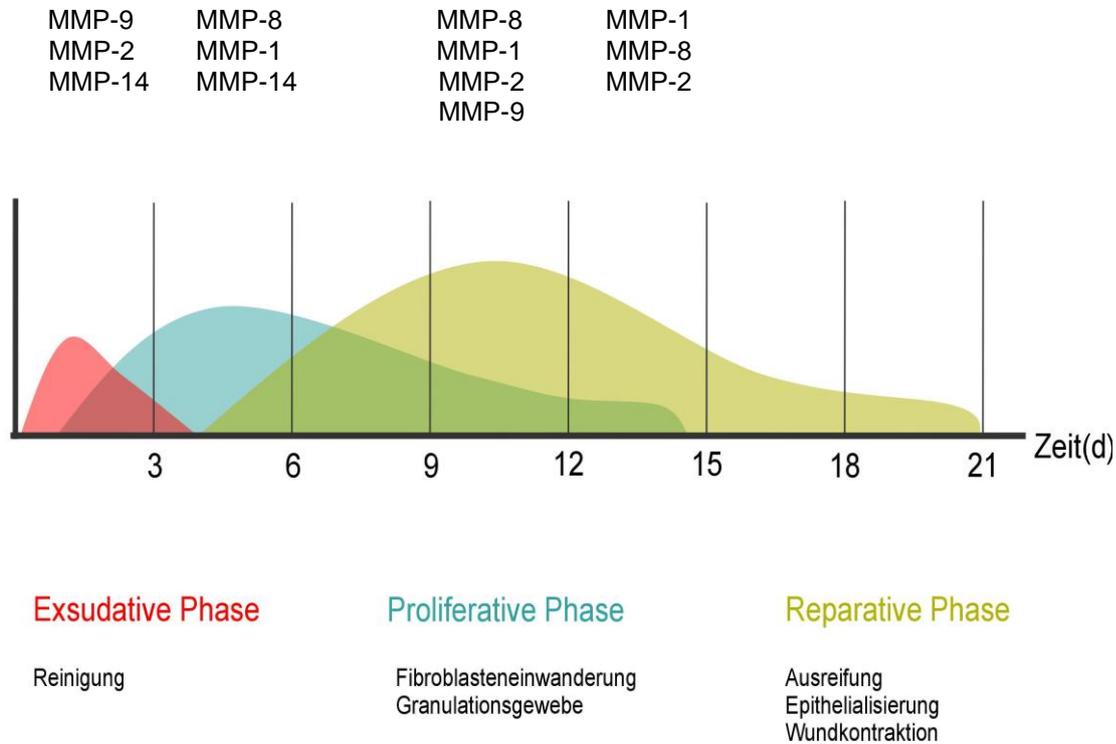


Abb. 39: Wundheilungsphasen mit relevanten MMPs [modifiziert und zusammengestellt nach Schäffer 1999; Broughton et al. 2006; Hu et al. 2012; Inkinen et al. 2000; Okada et al. 1997; Petri et al. 1997; Armstrong et al. 2002; Nissinen et al. 2015].

Bei der Konzeption der Studie erschien uns eine gezielte Modulation dieser Schlüsselenzyme (Abb. 39) als ein vielversprechender kausaler Ansatz für die Behandlung von Wundheilungsstörungen. Der Inhibitor Ro 28-2653 mit einer spezifischen Wirksamkeit gegen MMP-2, MMP-8, MMP-9 und MMP-14 wurde gewählt, um gezielt diese für die Wundheilung bedeutenden MMPs zu modulieren (Tab. 4).

MMP	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8	MMP-9	MMP-14	MMP-16
Ro 28-2653	16000	10	1800	15	12	10	23

Tab. 4: IC₅₀ – Werte (mittlere inhibitorische Konzentration) von Ro 28-2653 [Grams et al. 2001]. Wertangaben in nM.

Die Anwendung des Inhibitors Ro 28-2653 führt in unserer Studie zu einer verbesserten Granulation und Epithelialisierung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage im

Vergleich zu Tieren ohne Behandlung (Abb. 34 und 36). Im exemplarischen makroskopischen Vergleich der Tiere aus der Kontrollgruppe und Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage und Inhibitor-Anwendung ist jedoch die unterschiedliche Wundmorphologie deutlich erkennbar. Wundgewebe von Kontrolltieren erscheinen stabiler und insgesamt dicker als das Wundgewebe diabetischer Tiere mit und ohne Inhibitor-Behandlung. Die Ursache dafür kann einerseits die katabole Stoffwechsellage und die fehlenden körperlichen Ressourcen bei Ratten mit diabetischer Stoffwechsellage, andererseits jedoch auch die applizierte Menge des Inhibitors sein. *Lein et al. (2002)* konnten auch einen Zusammenhang der Dosis von Ro 28-2653 und dem erzielten tumorhemmenden Effekt in Untersuchungen an Ratten mit Prostatakarzinom aufzeigen. Auch wäre der Zeitpunkt der Applikation des Inhibitors ein wichtiger Ansatzpunkt. Insbesondere die unterschiedlichen Vorkommen und Konzentrationen der MMPs in den jeweiligen Wundheilungsphasen gilt es weiter zu berücksichtigen: die immense Bedeutung der beiden MMPs 2 und 9 zu Beginn der Wundheilung [Hu et al. 2012, Nissinen et al. 2015] kann dazu führen, Inhibitoren zu entwickeln, die gerade zu Beginn zu einer weniger starken Inhibition dieser Enzyme führen. Die Hemmung der MMP-1, welche für die Proliferationsphase der Granulation und der Epithelialisierung sehr wichtig ist [Hu et al. 2001], scheint zu Beginn gut mit Ro 28-2653 (vgl. Tab. 4) eingestellt zu sein. Hier wäre zu erkunden, ob eine spätere Veränderung der mittleren inhibitorischen Konzentration passender erscheint und somit auch die Festigkeit beider Gewebearten positiv beeinflusst. Schliesslich gehört MMP-8 als Leit-MMP von heilenden Wunden gewiss zu den Enzymen, dessen Unterdrückung eine weitere wesentliche Rolle auf die Wundheilung bei diabetischer Stoffwechsellage hat. Ihre Konzentration wird von *Nwomeh et al. 1998* zu jeder Phase der Wundheilung um ein mehrfaches stärker detektiert als MMP-1. Der Vergleich der mittleren inhibitorischen Konzentrationen des Inhibitors in Bezug auf die beiden genannten Enzyme zeigt hier jedoch ein reziprokes Verhältnis. Die geringer ausgeprägte Hemmung von MMP-8 und die damit eher rekonstruierte *in-vivo*-Situation von heilenden Wunden wäre hier ein weiterer wichtiger Punkt.

Durch die Entwicklung und phasengerechte Applikation angepasster Mengen von unterschiedlichen MMP-Inhibitoren zu verschiedenen postoperativen Zeitpunkten könnte eine gezieltere Hemmung der MMPs erreicht werden. Dies würde einer ungewollten Miterfassung der phasengerecht wichtigen MMPs vorbeugen und gleichzeitig der nachteiligen vermehrten Aktivität von anderen MMPs gezielt entgegenwirken.

Für die Entwicklung eines optimalen Therapie-Regimes bei chronischen Wunden zur

Wiederherstellung von geregelten Konzentrationsverhältnissen von MMPs und MMPis wird noch weitere Forschung und Untersuchung notwendig sein, welches insbesondere das Verständnis von Zusammenhängen und Wirkungen der MMPs mit- und untereinander erfordert.

5 Zusammenfassung

Ein geregelter Ablauf von komplexen zellulären und biochemischen Reaktionen ist eine Voraussetzung für eine komplikationslos ablaufende Wundheilung. Proteasen, insbesondere die Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), sind entscheidend bei den Gewebeumbauprozessen beteiligt. Eine Störung des physiologischen Konzentrationsverhältnisses der MMPs und deren physiologischen Inhibitoren (TIMPs), führt zu einer dramatischen Erhöhung der Proteasenaktivität in der Wunde. Die Folge ist eine vermehrte Degradation von Extrazellulärmatrix, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. In der Wunde entsteht eine Entzündungsreaktion, die persistiert und sich in der Ausbildung einer chronischen Wundheilungsstörung zeigt.

Ziel unserer Untersuchungen war es, die Veränderung von Wunden bei Tieren nach iatrogen induzierter diabetischer Stoffwechsellage mit bzw. ohne topische Applikation eines synthetischen MMP-Inhibitors makroskopisch und planimetrisch zu evaluieren. Als Modell wurde das von *Koschnik et al. (1997)* beschriebene Defektwundmodell an der Ratte etabliert und modifiziert. Die makroskopische und quantitative Erfassung von Wunden der Tieren mit regelrechter und diabetischer Stoffwechsellage zeigte deutliche Unterschiede hinsichtlich der Wundfläche und der Wundmorphologie. Die Evaluierung der Wundqualität erfolgte mittels getrennter quantitativer Erfassung von Granulation und Epithelialisierung. Wunden von diabetischen Tieren heilten im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe langsamer, unvollständiger und zeigten ein qualitativ minderwertiger und dünner erscheinendes Wundgewebe. Orientierende histologische Untersuchungen konnten diese These unterstützen. Die Applikation des synthetischen Inhibitors Ro 28-2653 in weiteren Untersuchungen führte zu einer signifikant besseren Wundheilung bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage, während Tiere mit Placebo-Behandlung tendenziell eher schlechtere Wundheilungsergebnisse lieferten. Durch die lokale Anwendung des MMP-Inhibitors wurden messbare Plasmaspiegel vermieden und somit systemische Nebenwirkungen weitgehend ausgeschlossen.

Unsere Ergebnisse stützen somit die Annahme, dass die vermehrte MMP-Aktivität aufgrund gestörter Konzentrationsverhältnisse von MMP zu TIMPs zu einem gestörten Wundmilieu beitragen und die lokale Inhibition der MMP-Aktivität durch Verwendung von MMPI die Wundheilung positiv beeinflussen kann.

Weitere Untersuchungen mit individuell weiter adaptierten MMP-Inhibitoren, eventuell in Kombination mit Applikation weiterer für die Wundheilung bedeutender Agenzien

(z.B. Wachstumsfaktoren) stellt damit einen kausalen und vielversprechenden Therapieansatz zur Behandlung chronischer Wundheilungsstörungen dar.

6 Summary

A regulated flow of complex cellular and biochemical reactions is a prerequisite for a complication-free wound healing. Proteases, particularly the group of matrix metalloproteinases, are involved decisively in the tissue remodeling processes. A disturbance of the physiological concentration ratio of the MMPs and their physiological inhibitors, the TIMPs, can lead to a dramatic increase in the protease activity in the wound. The result is an increased degradation of extracellular matrix, cytokines and growth factors. In the wound persists an inflammatory response, which manifests itself in the formation of a chronic wound healing disorder.

The aim of our study was to evaluate the macroscopic and planimetric changes of wounds in animals after iatrogenic induced diabetic metabolic condition after topical application of a synthetic MMP inhibitor. The defect wound model of Koschnik et al. (1997) in the rat was modified and established for this study. The macroscopic and quantitative detection of wounds in the animals with regular and diabetic metabolic condition showed significant differences in the wound surface and the wound morphology. The evaluation of wound quality was carried out by separate quantitative detection of granulation and epithelialization. Compared to the control group, wounds of diabetic animals healed slowly and showed a lower quality and thinner appearing wound tissue. Orientating histological studies could support this thesis. The application of synthetic inhibitor Ro 28-2653 in further investigations resulted in a significantly better wound healing in animals with diabetic metabolic condition, while animals with placebo treatment tended to show poorer wound healing results. By the local application of the MMPI measurable plasma levels were avoided and therefore systemic side effects largely excluded.

Therefore our results support the hypothesis that the increased MMP activity due to impaired concentration ratios of MMP to TIMP contribute to impaired wound environment and that the local inhibition of MMP activity can be influence wound healing positively by using MMPI. Thus, further investigations with individually adapted MMPI concentrations, possibly in combination with further application of important wound healing agents (for example, growth factors) represents a causal and promising therapeutic approach for the treatment of chronic wound healing disorders.

7 Literaturverzeichnis

- Agren MS., Mirastschijski U, Karlsmark T, Saarialho-Kere UK.** Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds. *Exp Dermatol* (2001) 10: 337-348.
- Ahtikoski A.** Synthesis and degradation of muscle collagen during immobilization, glucocorticoid treatment and in neuromuscular diseases. (2003) ISBN951-42-7237-4.
- Akbarzadeh A, Norouzi D, Mehrabi MR, Jamshidi S, Farhangi A, Allah Verdi A, Mofidian SMA, Rad BL.** Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem* (2007) 22(2): 60-64.
- Albert DJ, Petrovic DM, Walsh ML.** Ovariectomy attenuates aggression by female rats cohabitating with sexually active sterile males. *Physiol & Behav* (1989) 45(2): 225-228.
- Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishani NS, Hawkes SP, Werb Z.** Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* (1996) 122: 1723-1736.
- Algire GH.** An adaptation of the transparent-chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* (1943) 4: 1-11.
- Apte SS, Olsen BR, Murphy G.** The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activity define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem* (1995) 270: 14313-14318.
- Arlt M, Kopitz C, Pennington C, Watson KLM, Krell HW, Bode W, Gansbacher B, Khokha R, Dylan RE, Krüger A.** Increase in Gelatinase-specificity of Matrix Metalloproteinase Inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res* (2002) 62(10): 5543-5550.
- Armstrong DG, Jude EB.** The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Pediatr Med Assoc* (2002) 92(1): 12-18.
- Arnold F, West D.** Angiogenesis in Wound Healing. *Pharmac Ther* (1991) 52: 407-422.
- Arumugam S, Jang YC, Chen-Jensen C, Gibran NS, Isik F.** Temporal activity of plasminogen activators and matrix metalloproteinases during cutaneous wound repair. *Surgery* (1999) 125: 587-593.
- Axler DA.** Stability of the diabetogenic activity of streptozotocin. *IRCS Med Sci* (1982) 10: 157.
- Baez S, Price HL, Cohen PJ.** Effects of anesthetics on the circulation. *Anesth and Microcirc* (1964): 182-198.
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G.** Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Science* (2002) 115: 3719-3727.
- Banks V.** Wound assessment methods. *J Wound Care* (1998) 7(4): 211-212.
- Barker JH, Hammersen F, Bondar I, Uhl E, Galla TJ, Menger MD, Messmer K.** The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation. *Plast Reconstr Surg* (1989) 83(6): 948-959.
- Baschong W.** Wundheilungsmodelle – Möglichkeiten und Grenzen. *Hartmann Wundforum* (1998): 1: 16-19.
- Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ.** Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* (1975) 64: 232-240.
- Beale RJ, Bryg DJ, Bihari DJ.** Immunonutrition in the critically ill: a systematic review of clinical outcome. *Crit Care Med* (1997) 25: 1489-1496.
- Beattie GJ, Young HA, Smyth JF.** Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB-94 in patients with malignant ascites. *Clin Cancer Res* (1998) 4: 1899-1902.
- Becker R.** Untersuchung der Qualität integrierter chronischer Wundversorgung anhand von Patientendaten des Wundzentrum Bremen. Dissertation zur Erlangung des Dr. Public Health des Fachbereiches Human- und Gesundheitswissenschaften der Universität Bremen, 2009.
- Beekman B, Verzijl N, de Roos JA, Koopman JL, TeKoppele JM.** Doxycycline inhibits collagen synthesis by bovine chondrocytes cultured in alginate. *Biochem Biophys Res Commun* (1997) 237(1): 107-110.

- Bell IM, Amooscato F, Biancheri P, Curciarello R, Macdonald T.** PWE-074 Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase (timp)-3 Reduces Pro-inflammatory Cytokine Production By Ulcerative Colitis Mucosa Cultured Ex Vivo. *Gut* (2014) 63(1): 156.
- Benus RF, Bohus B, Koolhaas JM, van Oortmerssen GA.** Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia* (1991): 47: 1008-1019.
- Benyon RC, Arthur MJ.** Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin liver Dis* (2001) 21: 373-384.
- Bertholet P, Gueders M, Dive G, Albert A, Barillaro V, Perly B, Cataldo D, Piel G, Delattre L, Evrard B.** The effect of cyclodextrins on the aqueous solubility of a new MMP inhibitor: phase solubility, ¹H-NMR spectroscopy and molecular modeling studies, preparation and stability study of nebulizable solutions. *J Pharm Pharmaceut Sci* (2005) 8(2): 164-175.
- Birkedal-Hansen, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Sato H, Seiki M, Reynolds JJ, Murphy G.** Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev in Oral Biol and Med* (1993) 4: 197-250.
- Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K.** Structural properties of matrix metalloproteinases. *CMLS* (1999) 55: 639-652.
- Bohrer H, Frost L, Funk W.** Direkte Beobachtung der Mikrozirkulation unter Isofluran-Anästhesie. *Anästh Intensivther Notfallmed* (1987) 22: 84-89.
- Bork P, Downing AK, Kieffer B, Campbell ID.** Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Q Rev Biophys* (1996) 29: 119-167.
- Borchert D.** Derø Einfluß on Batimastat auf Prostatakarzinom-Zelllinien und den Dunning- Tumor der Ratte. *Dt Nationalbib* (2003) <http://d-nb.info/974307823>.
- Bramhall SR, Rosemurgy A, Brown PC, Bowry C, Buckels JAC.** Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J of Clin Oncol* (2001) 19(15): 3447-3455.
- Brandstetter H, Grams F, Glitz D, Lang A, Huber R, Bode W, Krell HW, Engh RA.** The 1.8-Å Crystal Structure of a Matrix Metalloproteinase 8-Barbiturate Inhibitor Complex Reveals a Previously Unobserved Mechanism for Collagenase Substrate Recognition. *J Biol Chem* (2001) 276(20): 17405-17412.
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H.** Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta* (2000) 1477: 267-283.
- Broughton G, Janis JE, Attinger CE.** The basic science of wound healing. *Plast Reconst Surg* (2006) 117(7 Suppl): 12-34.
- Brouwer MD, McIntyre P, Prasad K, van de Beek D.** Corticosteroids for acute bacterial meningitis. Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Coch Database Syst Rev* (2013)6; CD004405.
- Brown PD.** Clinical studies with matrix metalloproteinase inhibitors. *APMIS* (1999) 107: 174-180.
- Bullen EC, Longaker MT, Updike DL, Benton R, Ladin D, Hou Z, Howard EW.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *J Inv Dermatol* (1995) 104(2): 236-240.
- Caley MP, Martins VLC, O'Toole EA.** Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care* (2015) 4(4): 225-234.
- Ceylan-Isik AF, LaCour KH, Ren J.** Sex difference in cardiomyocyte function in normal and metallothionein transgenic mice: the effect of diabetes mellitus. *J Appl Physiol* (2006) 100(5): 1638-1646.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T.** Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* (2003) 253: 269-85.
- Chen WY, Abatangelo G.** Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Rep Reg* (1999) 7(2): 79-89.
- Chen P, Parks WC.** Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *J Cell Biochem* (2009) 108: 1233–1243.
- Chuo JW, Dolman PJ, Ng TL, Buffam FV, White VA.** Clinical and histopathologic review of 18 explanted porous polyethylene orbital implants. *Ophthal* (2009) 2: 349-354.

- Chvapil M, Gaines JA, Chvapil TA, Benson D, Tellez C.** An optimal morphometric method for quantitating wound epithelization. *J Surg Res* (1988) 44: 266-276.
- Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Wahl LM.** Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J Biol Chem* (1992) 267: 515-519.
- Coussens LM.** Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer-Trials and Tribulations. *Science* (2002) 295(5564): 2387-2392.
- Cowell S, Knauper V, Stewart ML, D'Ortho MP, Stanton H, Hembry RM, Lopez-Otin C, Reynolds JJ, Murphy G.** Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem J* (1998) 331(2): 453-458.
- Cullen B, Smith R, McCulloch E, Silcock D, Morrison L.** Mechanism of action of Promogran, a protease modulating matrix for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound Rep Reg* (2002) 10(1): 16-25.
- David H-KM, Jan-Kan C, Wan-Soo K, Yan-Xia H, Hui-Chuan W, Ray J-FT, David GH, Fen Z.** Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in inflammation-induced corneal neovascularization. *Ophth Res* (2001) 33: 353-362.
- Davidson JM.** Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res* (1998) 290: 1-11.
- Deutschmann G.** Die Haut und ihre Anhangsgebilde. *Springer Wien* (2005), [ISBN 3-211-83670-5](#).
- De la Garza-Rodea AS, Knaän-Shanzer S, den Hartigh JD, Verhaegen APL, van Bekkum DW.** Anomer-equilibrated streptozotocin solution fort he induction of experimental diabetes in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* (2010) 49(1): 40-44.
- Dewan PA, Van Rij AM, Robinson RG, Skeggs GB, Fergus M.** The use of an iodophor-impregnated plastic incise drape in abdominal surgery--a controlled clinical trial. *Aust NZ J Surg* (1987) 57(11): 859-863.
- Diliberto JJ, Usha G, Birnbaum LS.** Disposition of citral in male Fischer rats. *Drug Metab Disp* (1988) 16(5): 721-727.
- Dittrich H.** Wundheilungsstörungen und septische Chirurgie (Teil 1). *Der Chirurg* (1971) 7: 289-295.
- Dobrowolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE.** Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Mol Pharm* (2008) 5(4): 487-495.
- Dong Z, Soon Choi D.** Hydroxypropyl Methylcellulose Acetate Succinate: Potential Drug-Excipient Incompatibility. *AAPS Pharm Sci Tech* (2008) 9(3): 991-997.
- Dorsett-Martin WA.** Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Rep Reg* (2004) 12(6): 591-599.
- Dowd SE, Sun Y, Secor PR.** Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol* (2008) 8(1): 43.
- Edwards R, Harding KG.** Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis* (2004) 17(2): 91-96.
- Egeblad M, Werb Z.** New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* (2002) 2(3): 161-174.
- Elomaa O, Vaalamo M, Paakkonen K, Jahkola T, Hook-Nikanne J, Hembry RM, Hakkinen L, Kere J, Saarialho-Kere U.** Stromelysin-2 is upregulates during normal wound repair and is induced by cytokines. *J Inv Dermatol* (2000) 115(5): 778-787.
- Ethunandan M, Ansell M, Mellor TK, Brennan PA.** Skin necrosis of a pectoralis major myocutaneous flap, caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. [Brit J Oral Maxillofac Surg](#) (2004) [42\(1\)](#): 38-40.
- Fairclough JA, Johnson D, Mackie I.** The prevention of wound contamination by skin organisms by the pre-operative application of an iodophor impregnated plastic adhesive drape. *J Int Med Res* (1986) 14(2):105-109.
- Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K.** Nonrandom distribution of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in chronic wounds. *J Clin Microbiol* (2009) 47: 4084-4089.

- Finzel BC, Baldwin ET, Bryant GL, Hess GF Jr., Wilks JW, Trepod CM, Mott JE, Marshall VP, Petzold GL, Poorman RA, O'Sullivan TJ, Schostarez HJ, Mitchell MA.** Structural characterizations of nonpeptidic thiazolidine inhibitors of matrix metalloproteinases reveal the basis for stromelysin selectivity. *Prot Sci* (1998) 7: 2118-2126.
- Fernandez-Catalan C, Bode W, Huber R, Turk D, Calvete JJ, Lichte A, Tschesche H, Maskos K.** Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *EMBO J* (1998) 17(17): 5238-5248.
- Flanagan M.** Wound measurement: Can it help us to monitor progression to healing? *J Wound Care* (2003a) 12(5): 189-194.
- Flecknell PA, Hu C, Liles HJ.** Fentanyl and medetomidine anaesthesia in the rat. *J Vet Anaesth* (1991) 18: 53.
- Foda HD, Zucker S.** Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Inv New Drugs* (1998) 16: 303-313.
- Fowlkes JL, Serra DM, Nagase H, Thraillkill KM.** MMPs are IGFBP-degrading proteinases: Implications for cell proliferation and tissue growth. *Ann NY Acad Sci* (1999) 878: 696-699.
- Galea CA, Nguyen HM, George Chandy K, Smith BJ, Norton RS.** Domain structure and function of matrix metalloprotease 23 (MMP-23): role in potassium channel trafficking. *Cell Mol Life Sci* (2014); 71(7): 1191-1210.
- Garibaldi DC, Iliff NT, Grant MP, Merbs SL.** Use of porous polyethylene with embedded titanium in orbital reconstruction: a review of 106 patients. *Ophthal Plast Reconstr Surg* (2007) 23(6): 439-444.
- Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE.** Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature* (1985) 315(6022): 768-771.
- Gavuzzo E, Pochetti G, Mazza F, Gallina C, Gorini B, D'Alessio S, Pieper M, Tschesche H, Tucker PA.** Two crystal structures of human neutrophil collagenase, one complexed with a primed and the other with an unprimed-side inhibitor: Implications for drug design. *J Med Chem* (2000) 43: 3377-3385.
- Gerasimidi-Vazeou A, Dionne K, Gentile F, Hazlett T, Lysaght M, Hegre O.** Reversal of streptozotocin diabetes in nonimmunosuppressed mice with immunoisolated xenogenetic rat islets. *Transplant Proc* (1992) 24: 667-668.
- Gill SE, Parks WC.** Metalloproteinases and Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing. *Int J Biochem Cell Biol* (2008) 40(6-7): 1334-1347.
- Godwin A.** Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review. *Int J Res Rev Appl Sci* (2011) 1: 24-34.
- Goldman R, Salcido R.** More than one way to measure a wound: An overview of tools and techniques. *Adv Skin & Wound Care* (2002) 15(5): 236-243.
- Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T.** Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* (1998) 12(2): 12-26.
- Golub LM, McNamara TF, D'Angelo G, Greenwald RA, Ramamurthy NS.** A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. *J Dent Res* (1987) 66(8): 1310-1314.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshij H.** Tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* (1997) 74: 111-122.
- Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W.** Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* (1997) 389: 77-81.
- Goodson WH, Hunt TK.** Wound healing and the diabetic patient. *Surg Gynecol Obstet* (1979) 149: 600-609.
- Gottrup F, Agren MS, Karlsmark T.** Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Rep Reg* (2000) 8(2): 83-96.
- Gowland Hopkins NF, Jamieson CW.** Antibiotic concentration in exsudate in venous ulcers: the prediction of ulcer healing rate. *Brit J Surg* (1983) 70: 532-534.
- Grams F, Brandstetter H.** Pyrimidin-2,4,6-trions: a new effective and selective class of matrix metalloproteinase inhibitors. *Biol Chem* (2001) 328(8): 1277-1285.

- Gross J, Lapiere CM.** Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci* (1962) USA 48: 1014-1022.
- Haag SF, Fleige E, Chen M, Fahr A, Teutloff C, Bittl R, Lademann J, Schäfer-Korting M, Haag R, Meinke MC.** Skin penetration enhancement of core-multishell nanotransporters and ivasomes measured by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Int J Pharm* (2011) 416(6): 223-228.
- Hall LW, Clarke KW, Trim CM.** Anaesthesia of the species rodents. In: *Veterinary Anaesthesia*, 10. Aufl., Saunders Elsevier, London, UK, (2001): 463-467.
- Hartwell SW.** The mechanism of healing in human wounds. Springfield, IL: Charles Thomas, 1955.
- Hatz RA.** Die Bedeutung der Kollagenase in der Wundheilung. *Hartmann Wundforum* (1995) 1: 22-27.
- Hayashi T, Hashimoto S, Kameyama Y.** Reduced streptozotocin-induced insulinitis in CD-1 mice by treatment with anti-intercellular adhesion molecule-1 and anti-lymphocyte function associated antigen-1 monoclonal antibodies together with lactic dehydrogenase virus infection. *Int J Exp Pathol* (1994) 75(2): 117-121.
- Hedge KR, Henein MG, Varma SD.** Establishment of mouse as an animal model for study of diabetic cataracts: biochemical studies. *Diab Obes Metab* (2003) 5(2): 113-119.
- Heidemann C, Du Y, Scheidt-Nave C.** Diabetes mellitus in Deutschland. Hrsg. Robert Koch-Institut Berlin. *GBE kompakt* (2011) 2(3). www.rki.de/gbe-kompakt.
- Hess CT.** The art of skin and wound care documentation. *Adv Skin&Wound Care* (2005) 18(1): 43-53.
- Higgins CA, Gillian EW, Colin ABJ.** Modulation in proteolytic activity is identified as a hallmark of exogen by transcriptional profiling of hair follicles. *J Inv Dermatol* (2011) 131(12): 2349-2357.
- Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ.** Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* (1998) 95: 365-377.
- Hirte H, Vergote IB, Jeffrey JR, Grimshaw RN, Coppieters S, Schwartz B, Tu D, Sadura A, Brundage M, Seymour L.** A phase III randomized trial of BAY 12-9566 (tanomastat) as maintenance therapy in patients with advanced ovarian cancer responsive to primary surgery and paclitaxel/platinum containing chemotherapy: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study. *Gynecol Oncol* (2006) Aug 102(2): 300-308.
- Höntzke S, Fleige E, Nurita I, Haag R, Schäfer-Korting M, Kuchler S.** CMS nanotransporters for topical delivery of dexamethasone. (2014) Freie Universität Berlin, Deutschland.
- Hofstädter F.** Pathologie der Wundheilung. *Der Chirurg* (1995) 66: 174-181.
- Horch RE, Nord D, Augustin M, Germann G, Leffler M, Dragu A.** Ökonomische Aspekte in der chirurgischen Wundbehandlung. *Der Chirurg* (2008) 79 (6): 518-525.
- Horn T.** Lokale Wundaufgaben: Übersicht und Klassifikation. *Chir Gastroenterol* (2006) 22: 147-154.
- Housley TJ, Baumann AP, Braun ID, Davis G, Seperack PK, Wilhelm SM.** Recombinant Chinese hamster ovary cell matrix metalloprotease-3 (MMP-3, stromelysin-1). Role of calcium in promatrix metalloprotease-3 (pro-MMP-3, pro-stromelysin-1) activation and thermostability of the low mass catalytic domain of MMP-3. *J Biol Chem* (1993) 268: 4481-4487.
- Howarth FC, Qureshi A, Shahin A, Lukic ML.** Effects of single high-dose and multiple low-dose streptozotocin on contraction and intracellular Ca²⁺ in ventricular myocytes from diabetes resistant and susceptible rats. *Mol Cell Biochem* (2005) 269: 103-108.
- Hu DH, Chen B.** The biological effect of matrix metalloproteinase-1 in epidermal repair. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* (2001) 15(4): 248-251.
- Hu FQ, Yuan H, Zhang HH, Fang M.** Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int J Pharm* (2002) 239: 121-128.
- Hu X, Li D, Zhang W, Zhou J, Tang B, Li L.** Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion. *Arch Gynecol Obstet* (2012) 286: 1537-1543.
- Huey J, Narayanan HS, Jones K.** Effect of epidermal growth factor on the synthetic activity of human fibroblasts. *Bioch Biophys Acta* (1980) 632: 227-233.
- IGSF** Institut für Gesundheits-System-Forschung GmbH, 2007.

- Inkinen K, Turakainen H, Wolff H, Ravanti L, Kahari VM, Ahonen J.** Expression and activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in experimental granulation tissue. *APMIS* (2000) 108(5): 318-328.
- Isaksen B, Fagerhol MK.** Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *J Clin Pathol: Mol Pathol* (2001) 54: 289-292.
- Janecka IP.** New Reconstructive Technologies in Skull Base Surgery Role of Titanium Mesh and Porous Polyethylene. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* (2000) 126(3): 396-401.
- Janiak P, Laine P, Grataloup Y, Luyt CE, Bidouard JP, Michel JB, O'Connor SE, Herbert JM.** Serotonin receptor blockade improves distal perfusion after lower limb ischemia in the fatty Zucker rat. *Cardiovasc Res* (2002) 56(2): 293-302.
- Jenning V, Schäfer-Korting M, Gohla S.** Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release and properties. *J Control Release* (2000a): 66: 115-126.
- Jenning V, Thunemann AF, Gohla SH.** Characterization of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm* (2000b) 199:167-177.
- Jeschke MG, Barrow RE, Hawkins HK, Chrysopoulos MT, Perez-Polo JR, Herndon DN.** Effect of multiple gene transfers of insulin-growth factor I complementary DNA gene constructs in rats after thermal injury. *Arch Surg* (1999) 134(10): 1137-1141.
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE.** Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* (1969) 48(11): 2129-2139.
- Kaehaeri VM, Saarialho-Kere U.** Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* (1997) 6(5): 199-213.
- Kaehaeri VM, Saarialho-Kere U.** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* (1999) 31(1): 34-45.
- Kallenberger A, Kallenberger C, Willenegger H.** Experimentelle Untersuchungen zur Gewebeverträglichkeit von Antiseptika. *Hyg Med* (1991) 16: 383-395.
- Kang T, Nagase H, Pei D.** Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the transGolgi network. *Cancer Res* (2002) 62: 675-681.
- Kanvar YS, Ota K, Yang Q, Wada J, Kashihara N, Tian Y, Wallner EI.** Role of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT-1-MMP), MMP-2 and its inhibitor in nephrogenesis. *Am J Physiol* (1999) 277: 934-947.
- Kerner W, Fuchs C, Redaelli M, Böhm BO, Köbberling J, Scherbaum WA, Tillil H.** Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Dt. Diab. Ges. (DDG) e.V.* (2001), Bochum.
- Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR.** Matrix turnover. *J of Orthodontics* (2000) 27(3): 227-233.
- Klein SA, Anderson GL, Kennedy AB, Bond SJ.** The effects of a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor on characteristics of wound healing. *J Invest Surg* (2002) 15(4): 199-207.
- Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G.** Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* (1996) 271(29): 17124-17131.
- Knighton DR, Silver IA, Hunt TK.** Regulation of wound healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentrations. *Surgery* (1981) 90: 262-270.
- Köster I, Huppertz E, Schubert I.** Fortschreibung der KoDiM-Studie: Kosten des Diabetes mellitus 2000 - 2009. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (2012), 137: 1013-1016.
- Kohnert KD, Ziegler B, Fält K, Ziegler M.** Augmentation of streptozotocin-induced hyperglycemia in mice by prior treatment with complete Freund's adjuvant. *Int J Pancreatol* (April 1989) 4 (3): 321-333.
- Kolb H.** Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozotocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diab Metab Rev* (1987) 3: 751-778.
- Kontogiorgis CA, Papaioannou P, Hadjipavlou-Litina DJ.** Matrix metalloproteinase inhibitors: a review on pharmacophore mapping and (Q)SARs results. *Curr Med Chem* (2005) 12(3):339-55. Review.
- Koolhaas JM, Korte SM, de Boer SF, van der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, de Jong IC, Ruis MAW, Blokhuis HJ.** Coping styles in animals: Current status in behaviour and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* (1999) 23: 925-935.

- Koschnik M, Roesken F, Räkens H, Siebenschuh I, Menger MD, Mutschler W.** Ein neues Modell zur quantitativen Analyse der Wundheilung von Defektwunden. *Langenbecks Arch Chir Suppl Chir Forum* (1997) 97: 511-514.
- Kramer A, Assadian O, Lademann J.** Prävention postoperativer Wundinfektionen durch Abkleben des OP-Felds mit Iod-impregnierter Inzisionsfolie (Ioban® 2). *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* (2010) 5(2): ISSN 1863-5245.
- Kruger A, Soeltl R, Sopov I, Kopitz C, Arlt M, Magdolen V, Harbeck N, Gänsbacher B, Schmitt M.** Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res* (2001) 61(4): 1272-1275.
- Krumme D, Wenzel H, Tschesche H.** Hydroxamate derivatives of substrate-analogous peptides containing aminomalonic acid are potent inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett* (1998) 436: 209-212.
- Krumme D, Tschesche H.** Oxal hydroxamic acid derivatives with inhibitory activity against matrix metalloproteinases. *Bioorg Med Chem Lett* (2002) 12: 933-936.
- Kujath P, Eckmann C, Bouchard R, Esnaashari H.** Complicated Skin and Soft Tissue Infections. *Zentralbl Chir* (2007) 132(5): 411-418.
- Lafleur MA, Forsyth PA, Atkinson S, Murphy G, Edwards DR.** Perivascular Cells Regulate Endothelial Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase Activity. *Bioch Biophys Res Com* (2001) 282: 463-473.
- Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E.** TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* (2004) 49 (3): 187-198.
- Langton KP, Barker MD, McKie N.** Localization of the functional domains of human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and the effects of a Sorsby's fundus dystrophy mutation. *J Biol Chem* (1998) 273: 16778-16781.
- Lawrence WT.** Clinical management of nonhealing wound. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ. Wound healing – biochemical and clinical aspects. (1992). Philadelphia: WB Saunders: 541-561.
- Leco KJ, Khokha R, Pavloff N.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* (1994) 269: 9352-9360.
- Lee MH, Golub ML, Cao J, Teronen O, Laitinen M, Salo T, Zucker S, Sorsa T.** CMT-3, a non-antimicrobial tetracycline (TC), inhibits MT1-MMP activity: relevance to cancer. *Curr Med Chem* (2001) 8(3): 257-260.
- Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop DJ.** Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/Scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) 103(46): 17438-17443.
- Lehrke M, Greif M, Broedl UC, Lebherz C, Laubender RP, Becker A, von Ziegler F, Tittus J, Reiser M, Becker C, Göke B, Steinbeck G, Leber AW, Parhofer KG.** MMP-1 serum levels predict coronary atherosclerosis in humans. *Cardiovasc Diab* (2009) 8: 50.
- Leibovich SJ, Ross R.** Die Rolle der Fresszelle Wunde in der Reparatur. Eine Studie mit Hydrokortison und antimacrophage Serum. *Am J Pathol* (1975) 78(1): 71-100.
- Lein M, Jung K, Le DK, Hasan T, Ortel B, Borchert D, Giessing M, Schnorr D, Loening SA.** Synthetic inhibitor of matrix metalloproteinase (Batimastat) reduces the prostate cancer growth in a orthotopic rat model. *Prostate* (2000) 43: 77-82.
- Lein M, Jung K, Ortel B, Stephan C, Rothaug W, Juchem R, Johannsen M, Deger S, Schnorr D, Loening S, Krell HW.** The new synthetic matrix metalloproteinase inhibitor (Roche 28-2653) reduces tumor growth and prolongs survival in a prostate cancer standard rat model. *Oncogene* (2002) 21: 2089-2096.
- Leshner AI, Moyer JA.** Androgens and agonistic behavior in mice: relevance to aggression and irrelevance to avoidance-of-attack. *Physiol Behav* (1975) 15: 695-699.
- Leslie WT, Bonomi PD.** Novel treatments in non-small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* (2004) Feb18 (1): 245-67.
- Lewis EJ, Bishop J, Bottomley KM, Bradshaw D, Brewster M, Broadhurst MJ, Brown PA, Budd JM, Elliott L, Greenham AK, Johnson WH, Nixon JS, Rose F, Sutton B, Wilson K.** Ro 32-3555, an

orally active collagenase inhibitor, prevents cartilage breakdown in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* (1997) 121(3): 540-546.

Liebl A, Neiß A, Spannheimer A, Reitberger U, Wagner T, Görtz A. Kosten des Diabetes Typ-2 in Deutschland, Ergebnisse der CODE-2- Studie. *Dt Med Wochenschr* (2001) 126: 585-589.

Liechti FD, Bächtold F, Grandgirard D, Leppert D, Leib SL. The matrix metalloproteinase inhibitor RS-130830 attenuates brain injury in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroinflammation* (2015) 12(1):1.

Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. *Science* (1976) 193: 415-417.

Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetol* (2002) 45(7): 1011-1016.

Logothepopoulos J, Rorosky S. Mitotic activity of islet cells in alloxan and streptozotocin diabetic mice studied by autoradiography. *Diabetes* (1968) 17(1): 306.

Longnecker DE. Effects of general anesthetics on the microcirculation. *Microcirc Endoth Lymphatics* (1984) 1(2): 129-150.

Lukkonen A, Sorsa T, Salo T, Tervahatjala T, Koivunen E, Golub L, Simon S, Stenman UH. Down-regulation of trypsinogen-2 expression by chemically modified tetracyclines: Association with reduced cancer cell migration. *Int J Cancer* (2000) 86(4): 577-581.

Ma DHK, Chen JK, Kim WS, Hao YX, Wu HC, Tsai RJF, Hwang DG, Zhang F. Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 and Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 1 and 2 in Inflammation-Induced Corneal Neovascularization. *Ophth Res* (2001) 33: 353-362.

Madlener M, Parks WC, Werner S. Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Their Physiological Inhibitors (TIMPs) Are Differentially Expressed during Excisional Skin Wound Repair. *Exp Cell Res* (1998) 242: 201-210.

Magdolen U, Krol J, Sato S, Müller MM, Sperl S, Krüger A, Schmitt M, Magdolen V. Natural inhibitors of tumor-associated proteases. *Radiol Oncol* (2002) 36(2): 131-143.

Mangoldt D, Sinn B, Lein M, Krell HW, Schnorr D, Loening SA, Jung K. The novel synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases Ro 28-2653 induces apoptosis in Dunning tumor cells. *Apoptosis* (2002) 7(3): 217-220.

Mantel R. Zur Anästhesie bei der Ratte mit den vollständig antagonisierbaren Anästhetika Medetomidin/Midazolam/Fentanyl. *Vet Med Diss München* (1999).

Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification. *The FASEB J* (1998) 12: 1075-1095.

Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* (2005) 15(11): 599-607.

Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Rep Reg* (1996) 4: 411-420.

Mathe D. Dyslipidemia and diabetes: animal models. *Diab Metabol* (1995) 21: 106-111.

Mauch C. Regulation of connective tissue turnover by cell-matrix interactions. *Arch Dermatol Res* (1998) 290(Suppl.): 30-36.

Maquoi E, Sounni NE, Devy L, Olivier F, Frankenne F, Krell HW, Grams F, Foidart JM, Noël A. Anti-invasive, Antitumoral and Antiangiogenic Efficacy of a Pyrimidine-2,4,6-trione Derivative, an Orally Active and Selective Matrix Metalloproteinase Inhibitor. *Clin Cancer Res* (2004) 10(6): 4038-4047.

Mayer AD, Reisbick S, Siegel HI, Rosenblatt JS. Maternal aggression in rats: Changes over pregnancy and lactation in a sprague-dawley strain. *Aggress Behav* (1987) 13(1): 29-43.

McCarty SM, Cochrane CA, Clegg PD, Percival SL. The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: a focus upon the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing. *Wound Rep Regen* (2012) 20(2): 125-136.

McLennan SV, Fisher E, Martell SY, Death AK, Williams PF, Lyons JG, Yue DK. Effects of glucose on matrix metalloproteinase and plasmin activities in mesangial cells: possible role in diabetic nephropathy. *Kidney Int* (2000) 77: 81-87.

- Metzger A.** Polyethylene Terephthalate and the Pillar™ Palatal Implant: its historical usage and durability in medical applications. *Restore Medical Inc* (2004).
- Meyer W, Schwarz R, Neurand K.** The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Curr Probl Dermatol* (1978) 7: 39-52.
- Millar AW, Brown PD, Moore J, Galloway WA, Cornish AG, Leehan TJ, Lynch KP.** Results of single and repeat dose studies of the oral matrix metalloproteinase inhibitor marimastat in healthy male volunteers. *Br J Clin Pharmacol* (1998) 45: 21-26.
- Mirastschijski U, Impola U, Jahkola T, Karlsmark T, Agren MS, Saarialho-Kere U.** Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds. *Hum Pathol* (2002) 33(3): 355-364.
- Mirastschijski U, Impola U, Karlsdal MA, Saarialho-Kere U, Agren MS.** Matrix metalloproteinase inhibitor BB-3130 unlike the serine proteinase inhibitor aprotinin abrogates epidermal healing of human skin wounds ex vivo. *J Inv Dermatol* (2002) 118(1): 55-64.
- Mitulovic G, Mechtler K.** HPLC techniques for proteomics analysis - a short overview of latest developments. *Briefings in Functional Genomics* (2006) 5(4): 249-260.
- Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WV, McCabe F, Russo LA, Lee Y, McCarthy BE, Wollenberg KR, Jester JV, Wang M, Welgus HG, Shipley JM, Senior RM, Fini ME.** Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem* (2002) 277(3): 2065-2072.
- Moore WM, Spilburg CA.** Purification of human collagenases with a hydroxamic acid affinity column. *Biochem* (1986) 25: 5189-5195.
- Moore WM, Spilburg CA.** Peptide hydroxamic acids inhibit skin collagenase. *Biochem Biophys Res Comm* (1986) 136: 390-395.
- Morisaki H, Suematsu M, Wakabayashi Y, Moro-oka S, Fukushima K, Ishimura Y, Takeda J.** Leucocyte-endothelium interaction in the rat mesenteric microcirculation during halothane or sevoflurane anesthesia. *Anesthesiology* (1997) 87(3): 591-598.
- Moses MA.** The Regulation of Neovascularization by Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors. *Stem Cells* (1997) 15(3): 180-189.
- Moses MA, Marikovsky M, Harper JW, Vogt P, Eriksson E, Klagsbrun M, Langer R.** Temporal study of the activity of matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during wound healing. *J Cell Biochem*(1996) 60: 379-386.
- Müchler B.** Medizin: In Deutschland wird zu viel amputiert. Nachrichten Gesundheit. Welt Online, 24.09.2008. URL: <http://www.welt.de/gesundheit/article2488345/In-Deutschland-wird-zu-viel-amputiert.html>
- Mühlen A, Schwarz C, Mehnert W.** Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm* (1998) 45(2): 149-155.
- Mulisch M, Welsch U (Hrsg.).** Romeis Mikroskopische Techniken. 18. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010, [ISBN 978-3-8274-1676-6](https://doi.org/10.1007/978-3-8274-1676-6), S. 214-220.
- Murphy G, Bretz U, Baggiolini M, Reynolds JJ.** The latent collagenase and gelatinase of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Biochem* (1980) 192: 517-525.
- Nagase H.** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* (1997) 378: 151-160.
- Nagase H, Woessner JF.** Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* (1999)v 274: 21491-21494.
- [Nagase H, Suzuki K, Morodomi T, Enghild JJ, Salvesen G.](#) Activation mechanisms of the precursors of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3. [Matrix Supp](#) (1992) 1: 237-244.
- Nagel S, Heinemann PV, Heiland S, Koziol J, Gardner H, Wagner S.** Selective MMP-Inhibition with Ro 28-2653 in acute experimental stroke--a magnetic resonance imaging efficacy study. *Brain Res* (2011) 12(1368): 264-270.
- Nakhoda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB.** The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diab* (1977) 26: 100-112.
- Neely AN, Clendering CE, Gardner J, Greenhalgh DG, Warden GD.** Gelatinase activity in keloids and hypertrophic scars. *Wound Rep Reg* (1999) 7(3): 166-171.

- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM.** Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* (2000) 18(5): 1135-1135.
- Nieuwesteeg MA, Willson JA, Cepeda M, Fox MA, Damjanovski S.** Functional Characterization of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) N- and C-Terminal Domains during *Xenopus laevis* Development. *Sci World J* (2014), Article ID 467907, 10 pages.
- Nissi R, Talvensaaari-Mattila A, Kotila V, Niinimäki M, Järvelä I, Turpeenniemi-Hujanen T.** Circulating matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-2/TIMP-2 complex are associated with spontaneous early pregnancy failure. *Repr Biol Endocrinol* (2013) 11.2.
- Nissinen LM, Kähari V-M.** Collagen turnover in Wound Repair – A Macrophage Connection. *J Inv Dermatol* (2015) 135: 2350-2352.
- Noel A, Maquoi E, Devy L, Olivier F, Roland G, Tiefenthaler G, Krell H, Foidart J.** Antitumor and antiangiogenic activities of RO 28-2653, a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin Cancer Res* (2000) 6: 4524 (Abstr.).
- Noonberg SB, Benz CC.** Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs* (2000) 59: 753-767.
- Nwomeh BC, Liang HX, Diegelmann RF, Cohen IK, Yager DR.** Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. *Wound Rep Reg* (1998) 6(2): 127-134.
- Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK, Yager DR.** MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *J Surg Res* (1999) 81: 189-195.
- Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, Rio MC, Basset P.** Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *J Cell Biol* (1997) 137(1): 67-77.
- Opalka JR, Gellerich FN, Kling L, Müller-Beckmann B, Zierz S.** Effect of the new matrix metalloproteinase inhibitor RO-28-2653 on mitochondrial function. *Biochem Pharmacol* (2002) 63: 725-732.
- Osborne CS, Schmid P.** Epidermal-dermal interactions regulate gelatinase activity in Apligraf, a tissue-engineered human skin equivalent. *Brit J Dermatol* (2002) 146: 26-31.
- Oyarzún A, Arancibia R, Hidalgo R, Peñafiel C, Cáceres M, González MJ, Martínez J, Smith PC.** Involvement of MT1-MMP and TIMP-2 in human periodontal disease. *Oral Diseases* (2010) 16, 388–395.
- Overall CM, Wrana JL, Sodek J.** Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* (1991) 266: 14064-14071.
- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS.** Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* (2004) 4: 617-629.
- Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJL.** Matrix metalloproteinases (Review). *Brit J Surg* (1997) 84: 160-166.
- Pei D, Weiss SJ.** Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* (1995) 375: 244-247.
- Pei D, Weiss SJ.** Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem* (1996) 271: 9135-9140.
- Pei D, Kang T, Qi H.** Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J Biol Chem* (2000) Oct 27; 275(43): 33988-33997.
- Pelka RB.** Expertise zur Kostensituation bei chronischen Wunden (Dekubitus und Ulcus cruris), Hrsg. Initiative Chronische Wunden (ICW) Uslar-Sohlingen (1997).
- Percival SL, Emanuel C, Cutting KF, Williams DW.** Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int Wound J* (2012) 9: 14-32.
- Petri JB, König S, Haupt B, Haustein UF, Herrmann K.** Molecular analysis of different phases in human wound healing. *Exp Dermatol* (1997) 6(3): 133-139.

- Petrie NC, Yao F, Eriksson E.** Gene therapy in wound healing. *Surg Clin North Am* (2003) 83: 597.
- Piette M, Evrard B, Franken F, Chiap P, Bertholet P, Castagne D, Foidart JM, Delattre L, Piel G.** Pharmacokinetic study of a new synthetic MMP inhibitor (Ro 28-2653) after IV and oral administration of cyclodextrin solutions. *Eur J Pharm Sci* (2006) 28(3): 189-195.
- Plassmann P, Melhuish JP, Harding KG.** Methods of measuring wound size: a comparatively study. *Ostomy Wound Manage* (1994) 40(7): 50-52, 54, 56-60.
- Povoski SP, McCullough PJ, Zhou W, Bell RH.** Induction of diabetes mellitus in Syrian golden hamsters using stored equilibrium solutions of streptozotocin. *Lab Anim Sci* (1993) 43(3): 310-314.
- Prokash MK, Sharma LK.** Studies in wound healing in experimental diabetes mellitus. *J Surg Res* (1974) 22: 221-227.
- Protz K.** Einfluss der Ernährung auf die Wundheilung. *Das Thema* (2007) 43: 3-6.
- Ravanti L, Kahari VM.** Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med* (2000) 6: 391-407.
- Rayment EA, Upton Z, Shooter GK.** Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *Br J Dermatol* (2008) 158(5): 951-961.
- Rechardt O, Elomaa O, Vaalamo M, Paakkonen K, Jahkola T, Hook-Nikanne J, Hembry RM, Hakkinen L, Kere J, Saarialho-Kere U.** Stromelysin-2 is upregulated during normal wound repair and is induced by cytokines. *J Inv Dermatol* (2000) 115(5): 778-787.
- Rees DA, Alcolado JC.** Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* (2005) 22: 359-370.
- Ries MD.** Enhanced polyethylene implants: have we been there before? *Instr Course Lect* (2005) 54: 189-192.
- Rima BN, Bardi M, Friedenber JM, Christon LM, Karelina KE, Lambert KG, Kinsley CH.** Reproductive experience and the response of female Sprague-Dawley rats to fear and stress. *Comp Med* (2009) 59(5): 437-443.
- Robson MC.** Growth factors as wound healing agents. *Curr Opin Biotechnol* (1991) 2(6): 863-867.
- Robson MC.** Wound infection: A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surg Clin North Am* (1997) 77: 637.
- Robson MC, Stenberg BD, Hegggers JP.** Wound healing alterations caused by infection. *Clin Plast Surg* 1(1990) 7(3): 485-492.
- Rosenthal FM, Cao L, Tanczos E, Kopp J, Andree C, Stark GB, Mertelsmann R, Kulmburg R.** Paracrine stimulation of keratinocytes in vitro and continuous delivery of epidermal growth factor to wounds in vivo by genetically modified fibroblasts transfected with a novel chimeric construct. *In Vivo* (1997) 11(3): 201-208.
- Rossini AA, Like AA, Dulin WE, Cahill GF.** Pancreatic beta cell toxicity by streptozotocin anomers. *Diabetes* (1977) 26(12): 1120-1124.
- Rudek MA, Figg WD, Dyer V, Dahut W, Turner ML, Steinberg SM, Liewehr DJ, Kohler DR, Pluda JM, Reed E.** Phase I clinical trial of oral COL-3, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with refractory metastatic cancer. *J Clin Oncol* (2001) 19(2): 584-592.
- Ryan ME, Usman A, Ramamurthy NS, Golub LM, Greenwald RA.** Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Curr Med Chem* (2001) 8(3): 305-316.
- Saarialho-Kere UK.** Patterns of matrix metalloproteinases and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res* (1998) 290(Suppl.): 47-54.
- Safak O.** Proteolyse essentieller Wachstumsfaktoren bei verzögerter Wundheilung im Exzisionswundmodell der Ratte. (2011) Dissertation, LMU München.
- Sanchez-Lopez R, Alexander CM, Behrendtsen O, Breathnach R, Werb Z.** Role of zinc-binding and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *J Biol Chem* (1993) 268: 7238-7247.
- Sandison JC.** A new method for the study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec* (1924) 28: 281- 287.

- Santos O, McDermott CD, Daniels RF, Appelt K.** Rodent pharmacokinetic and anti-tumor efficacy studies with a series of synthetic inhibitors of matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metast* (1997) 15: 499-508.
- Sargeant A, Goswami T.** Pathophysiological aspects of hip implants. *J Surg Orthop Adv* (2006) 15(2): 111-112.
- Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M.** Activation of a recombinant Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett* (1996) 393: 101-104.
- Sato H, Takino T, Okada Y et al.** A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* (1994) 370: 61-65.
- Sato T, Foged NT, Delasissé JM.** The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. *J Bone Mineral Res* (1998) 13: 59-66.
- Schäffer M, Becker H-D.** Immunregulation der Wundheilung. *Der Chirurg* (1999) 70: 897-908.
- Schaffer MR, Tantry U, Ahrendt GM, Wasserkrug HL, Barbul A.** Acute protein-calorie malnutrition impairs wound healing: a possible role of decreased wound nitric oxide synthesis. *J Am Coll Surg* (1997) 184(1): 37-43.
- Schmelz U, Schulte C.** Etablierung von Standardmethoden zur mikrobiologischen und anwendungstechnischen Validierung von Wundverbänden. Abstract Uni Göttingen 2013.
- Schneider M, Stracke M, Hansen S, Schaefer UF.** Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermatoendokrinol* (2009) 1(4): 197-206.
- Schröder J, Wenzel H, Stammler HG, Stammler A, Neumann B, Tschesche H.** Novel heterocyclic inhibitors of matrix metalloproteinases: Three 6H-1,3,4- Thiadiazines. *Acta Cryst* (2001) C57: 593-596.
- Schröder J, Henke A, Wenzel H, Brandstetter H, Stammler HG, Pfeiffer WD, Tschesche H.** Structure-based Design and Synthesis of Potent Matrix Metalloproteinase Inhibitors Derived from a 6H-12,3,4-Thiadiazine Scaffold. *J Med Chem* (2001) 44: 3231-3243.
- Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, Daly JM, Galloway AC, Fischer JE.** Principles of surgery (1999) 7. Aufl.: 285-295.
- Schwarzkopf A.** Die Mikrobiologie der Wunde. *ZfW* (2002) 7: 214-216.
- Schwarzkopf A.** Betrachtungen zur Hygiene bei der Wundversorgung. *ZfW* (2003) 8: 82-84.
- Sedgwick CJ, Erhardt W, Korbel R, Lendl C.** Anästhesie bei Reptilien, Vögeln, Primaten, Kaninchen und kleinen Nagern. In: Palleford RR, Erhardt W (Hrsg.). Anästhesie beim Kleintier. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York (1992): 374-384.
- Shapiro SD, Kobayashi DK, Welgus HG.** Identification of TIMP-2 in human alveolar macrophages. Regulation of biosynthesis is opposite to that of metalloproteinases and TIMP-1. [J Biol Chem](#) (1992) 267(20): 13890-13894.
- Sohail A, Sun Q, Zhao H, Bernardo MM, Cho J-A, Fridman R.** MT4(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer. *Can Metast Rev* (2008) 27: 289-302.
- Sternlicht MD, Cousseins LM, Vu TH, Werb Z.** Biology and regulation of matrix metalloproteinases. In *Matrix metalloproteinases Inhibitors in Cancer Therapy* (2000): 1-37. ISBN 13: 978-1-59259-011-7. Humana Press, Totowa.
- Sternlicht MD, Werb Z.** How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Ann Rev Cell Dev Biol* (2001) 17: 463-516.
- Steven L, Percival SL, Bowler PG.** Biofilm und seine potentielle Rolle in der Wundheilung. *Wounds* (2004) 16(7): 234-240.
- Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendás AM, Smith B, López-Otin C, Murphy G, Knäuper V.** Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. *J Biol Chem* (2000) 275(20): 14809-14816.
- Stricklin GP, Jeffrey JJ, Roswit WT, Eisen AZ.** Regulation of Matrix Accumulation. *Biochem* (1983) 22: 61-68.

- Strien L.** Chronische Wunden: Rezidive nach erfolgreicher Behandlung – eine klinische Studie. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, 2002.
- Strongin A, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI.** Mechanism of cell surface activation of 72kDa type IV collagenase. *J Biol Chem* (1995) 270: 5331-5338.
- Strosberg J, Hoffe S, Gardner N, Choi J, Kvols L.** Effective treatment of locally advanced endocrine tumors of the pancreas with chemoradiotherapy. *Neuroendocrinology* (2007) 85: 216–220.
- Struck H, Wokalek H, Schöpf E (Hrsg.).** Biochemie der Wundheilung, in: Wundheilung: Theoretische und praktische Aspekte, 4-14. (1987). Berlin, Springer Verlag.
- Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P.** The pig as a model for human wound healing. *Wound Rep Reg* (2001) 9(2): 66-76.
- Sutton D, Sangster S, Caldwell, J.** Dose-dependent variation in the disposition of eugenol in the rat. *Biochem Pharmacol* (1985) 34(3): 465-466.
- Soo MD, Shaw WW, Zhang MD, Longacker MT, Howard EW, Ting K.** Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg* (2000) 105(2): 638-647.
- Sottrup-Jensen L, Birkedal-Hansen H.** Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. *J Biol Chem* (1989) 264: 393-401.
- Tamura Y, Watanabe F, Nakatani T, Yasui K, Fuji M, Komurasaki T, Tsuzuki H, Maekawa R, Yoshioka T, Kawada K, Sugita K, Ohtani M.** Highly selective and orally active inhibitors of type IV collagenase (MMP-9 and MMP-2): N-sulfonylamino acid derivatives. *J Med Chem* (1998) 41: 640-649.
- Tarleton JF, Vickery CJ, Leaper DJ, Bailer AJ.** Postsurgical wound progression monitored by temporal changes in the expression of matrix metalloproteinase-9. *Br J Dermatol* (1997) 137: 506-516.
- Tarnuzzer RW, Schultz GS.** Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Rep Reg* (1996) 4: 321-325.
- Terasaki K, Kanzaki T, Aoki T, Iwata K, Saito I.** Effects of recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (rh-TIMP-2) on migration of epidermal keratinocytes in vitro and wound healing in vivo. *J Dermatol* (2003) 30(3); 165-172.
- Thomas DW, O'Neill ID, Harding KG, Sheperd JP.** Cutaneous wound healing a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg* (1995) 53: 442-447.
- Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ.** Anaesthesia of wild, exotic and laboratory animals. In: Lumb&Jones Veterinary Anesthesia. 3. Aufl., Williams&Wilkins, Baltimore (1996): 52-60.
- Toth M, Chvyrkova I, Bernando MM, Hernandez-Barrantes S, Fridman R.** Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 308(2): 386-395.
- Trengrove N J, Stacey M, Macauley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, Schultz G.** Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep Reg* (1999) 7 (6): 442-452.
- Uitto VJ, Firth JD, Nip L, Golub LM.** Doxycycline and chemically modified tetracyclines inhibit gelatinase A (MMP-2) gene expression in human skin keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci* (1994) 732: 140-151.
- Uria JA, López-Otin C.** Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency and activity. *Cancer Res* (2000) 60: 4745-4751.
- Vaalamo M, Weckroth M, Puolakkainen P, Kere J, Saarinen P, Lauharanta J, Saarialho-Kere UK.** Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds. *Br J Dermatol* (1996) 135(1): 52-59.
- Van Wart HE, Birkedal-Hansen H.** The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87: 5578-5582.

- Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, Knäuper V, Murphy G, López-Otín C.** Cloning and Characterization of Human MMP-23, a New Matrix Metalloproteinase Predominantly Expressed in Reproductive Tissues and Lacking Conserved Domains in Other Family Members. *J Biol Chem* (1999) 274(8): 4570-4576.
- Veves A, Sheehan P, Pham HT.** A randomized, controlled trial of Promogran (a collagen/oxidized regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcers. *Arch Surg* (2002) 137(7): 822-827.
- Verstappen J, Von den Hoff JW.** Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res* (2006) 85, 1074-1084.
- Vincenti MP, Brinckerhoff CE.** Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res* (2002) 4: 157-164.
- Visse R, Nagase H.** Matrix metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function and Biochemistry. *Circ Res* (2003) 92: 827-839.
- Vu TH, Werb Z.** Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* (2000) 14: 2123-2133.
- Weckroth M, Vaheri A, Lauharanta J, Sorsa T, Kontinen YT.** Matrix Metalloproteinases, Gelatinase and Collagenase, in Chronic Leg Ulcers. *J Inv Dermatol* (1996) 106: 1119-1124.
- Wei MQ, Lejniaks DV, Ramesh N, Lau S, Osborne WR.** Sustained gene expression in transplanted skin fibroblasts in rats. *Gene-Ther.* (1999) 6(5): 840-844.
- Wellhausen SR.** Definition of streptozotocin toxicity for primary lymphoid tissues. *Diabetes* (1986) 35: 1404-1411.
- Wetmore DR, Hardman KD.** Roles of the propeptide and metal ions in the folding and stability of the catalytic domain of stromelysins (matrix metalloproteinase 3). *Biochem* (1996) 35: 6549-6558.
- Wilson GL.** Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol* (1990) 156: 27-54.
- Winter G.** Formation of the scab and the rate of epithelisation of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature* (1962) 193: 293-294.
- Woessner JF, Nagase H.** Matrix metalloproteinases and TIMPs. New York (2000): Oxford Univ Press.
- Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ.** Matrix metalloproteinase inhibitors. *Inv New Drugs* (1997) 15(1): 61-75.
- Wolf NB, Kuchler S, Radowski MR, Blaschke T, Kramer KD, Weindl G, Kleuser B, Haag R, Schäfer-Korting M.** Influences of opioids and nanoparticles on in vitro wound healing models. *Eur J Pharm Biopharm* (2009) 73(1): 34-42.
- Wolf N.** Topische Applikation von Opioiden: Einfluss auf die Wundheilung und Untersuchung möglicher Trägersysteme. (2009) Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Woolley DE, Roberts DR, Evanson JM.** Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochem Biophys Res Commun* (1975) 66: 747-754.
- Wysocki AB, Kusakabe AO, Chang S, Tuan TL.** Temporal expression of urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and gelatinase-B in chronic wound fluid switches from a chronic to acute wound profile with progression to healing. *Wound Rep Reg* (1999) 7(3): 154-165.
- Yager DR, Zhang LY, Liang HX, Diegelmann RF, Cohen IK.** Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Inv Dermatol* (1996) 107(5): 743-748.
- Yager DR, Nwomeh BC.** The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Rep Reg* (1999) 7: 433-441.
- Yue DK, Swanson B, McLennan S, Marsh M, Spaliviero J, Delbridge L, Reeve T, Turtle JR.** Abnormalities of granulation tissue and collagen formation in experimental diabetes, uremia and malnutrition. *Diab Med* (1986) 3: 221-225.
- Yue DK, McLennan S, Marsh M, Mai YW, Spaliviero J, Delbridge L, Reeve T, Turtle JR.** Effects of experimental diabetes, uremia, and malnutrition on wound healing. *Diab* (1987) 36: 295-299.

Zhang Y, McCluskey K, Fujii K, Wahl LM. Differential Regulation of Monocyte Matrix Metalloproteinase and TIMP-1 Production by TNF- α , Granulocyte-Macrophage CSF, and IL-1 β Through Prostaglandin-Dependent and -Independent Mechanisms. *J Immunol* (1998) 161: 3071-3076.

Zhao H, Bernando MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, Kashiwagi M, Soloway PD, De Clerk YA, Fridman R. Differential Inhibition of Membrane Type (MT3)-Matrix Metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 Regulates Pro-MMP-2 Activation. *J Biol Chem* (2004) 279(10): 8592-8601.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Disseration mit dem Thema

Verbesserung der Wundheilung durch die lokale Hemmung von Matrix-Metalloproteinasen

selbstständig verfasst und keiner anderen als die von mir im Literaturverzeichnis angegebenen Werke / Hilfsmittel bedient habe. Die Stellen der Arbeit, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, wurden in jedem Fall unter Angabe ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 14.06.2018

Nuray Dagdelen