

Dermale Regeneration mit einer porcinen Kollagen-I/III-Membran-  
Experimentelle Untersuchung von Epithelisierung, Vaskularisation  
und Matrixintegration

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Dr. med. Falk Wehrhan  
geboren am 10.09.1975 in Jena**

**Gutachter**

1. ....

2. ....

3. ....

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

## Abkürzungsverzeichnis

HE	Hematoxylin- histologische Routinefärbung zur Übersicht bezüglich Gewebestruktur und Kernzahl
PBS	phosphate buffered saline-Standard-Puffer in der Immunhistochemie
TBS	Tris buffered saline-Standard-Puffer in der Immunhistochemie
TGF $\beta_{1,2,3}$	Transforming Growth Factor beta- proliferativ wirksames pleiotropes Zytokin, von dem bei Mammalia 3 Isoformen (TGF $\beta_{1,2,3}$ ) bekannt sind
TGF $\beta$ R-II	Transforming Growth Factor beta Receptor II- Rezeptor für TGF $\beta$ , insbesondere an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt
TGF $\beta$ R-III	Growth Factor beta Receptor III- Rezeptor für TGF $\beta$ , nicht an der Signaltransduktion beteiligt, spezifischer Neoangiogenesemarker
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor- Zytokin und potenter Angiogenesestimulus

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1. <i>Klinischer Hintergrund</i>	8
2.2. <i>Kenntnisstand</i>	8
2.2.1. Kollagenmatrices und Biomechanik	8
2.2.2. Epithelisierung, Vaskularisation und Zell-Matrix-Interaktion	9
2.2.3. TGF $\beta$ -Expression und Regulation der Wundheilung	9
<b>3. Ziele der Arbeit und Fragestellungen</b>	<b>11</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
4.1. <i>Tiermodell und Versuchsdesign</i>	12
4.2. <i>Narkoseverfahren und perioperatives Management</i>	13
4.3. <i>Probengewinnung zur Gewebeanalyse</i>	14
4.4. <i>Analysemethoden</i>	14
4.4.1. Probenaufbereitung für Immunhistochemie und Immunoblot	14
4.4.2. Immunhistochemische Färbung	14
4.4.3. Histochemische Sirius-Rot-Färbung	17
4.4.4. Histochemische Hematoxylin-Färbung	17
4.4.5. Immunoblot-Analyse	17
4.5. <i>Qualitative und quantitative Analyseverfahren</i>	19
4.5.1. Qualitative und semiquantitative Expressionsbestimmung	19
4.5.2. Statistische Analyse	20
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>20</b>
5.1. <i>Tierexperimentelle Ergebnisse</i>	20
5.2. <i>Qualitative Ergebnisse</i>	20
5.2.1. Expression von Zytokeratin 5/6	20
5.2.2. Expression von TGF $\beta$ R-III	21
5.2.3. Sirius-Rot-Färbung und Polarisationsmikroskopie	22
5.2.4. Immunoblot-Analysen	23
5.3. <i>Quantitative Resultate</i>	25
5.3.1. Epitheldickenmessung	25
5.3.2. TGF $\beta$ R-III-assoziierte Neovaskularisation	26
<b>6. Diskussion</b>	<b>28</b>
<b>7. Schlußfolgerung</b>	<b>30</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>31</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>38</b>
9.1. <i>Lebenslauf</i>	38
9.2. <i>Danksagung</i>	39
9.3. <i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	40

## 1. Zusammenfassung

### **Fragestellung und Ziele:**

Das autologe Transplantat ist die Therapie der Wahl zur Regeneration dermalen Vollhautdefekte. Limitierte Verfügbarkeit und Morbidität der Spenderregion motivieren die Entwicklung Kollagen-basierter dermalen Substitute. Kritische Parameter beim klinischen Einsatz derartiger artifizieller Konstrukte sind Epithelisierung, Vaskularisation und narbige Schrumpfung.

Das Ziel des vorliegenden Dissertationsprojektes bestand in der experimentellen Evaluation einer biodegradierbaren, porkinen Kollagen-I/III-Matrix bezüglich der Eigenschaften Epithelisierung, Vaskularisation und Matrixremodeling im Vergleich zur Standardtherapie des autologen Spalthauttransplantates als Substitut dermalen Defekte.

### **Methodik:**

An 21 adulten Hausschweinen wurden auf der Ohrrückseite jeweils 3 standardisierte dermale Vollhautdefekte generiert. Je Tier wurde ein Defekt mit Spalthaut-Transplantat, einer mit der porkinen Kollagen I/III-Membran und einer durch freie Granulation zur Ausheilung gebracht. An den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 7, 14 und 28 wurden jeweils 3 Tiere befriedet und Proben der Defektmodaltäten der histologischen (HE, Sirius-Rot), immunohistochemischen (TGF $\beta$ R-III, Zytokeratin 5/6) und der immunchemischen (TGF $\beta$ <sub>1</sub>, TGF $\beta$ <sub>3</sub>, Smad 2/3) Analyse zugeführt. Untersuchte Zielparameter waren die mittlere Epitheldicke, die TGF $\beta$ R-III-assoziierte Neovaskularisation, die Matrixintegration und die TGF $\beta$ <sub>1</sub>-stimulierte Fibroproliferation zu jedem Untersuchungszeitpunkt.

### **Ergebnisse und Diskussion:**

Epithelisierung und Neovaskularisation unterschieden sich nicht signifikant zwischen Spalthaut-gedecktem und Membran-gedecktem Defekt. Demgegenüber zeigte der Defekt der freien Granulation eine signifikant verzögerte Epithelisierung und Vaskularisation. Die TGF $\beta$ <sub>1</sub>/ Smad 2/3-assoziierte Fibroproliferation war in den Defekten der freien Granulation gegenüber den Spalthaut- und Membran-gedeckten Defekten gesteigert, die Expression des antifibrotischen TGF $\beta$ <sub>3</sub> supprimiert. Das eingebrachte Kollagen der Membran konnte bis zum 7. postoperativen Tag vom ortsständigen Gewebe ohne Anhalt für Inflammation differenziert werden.

In der Zusammenschau zeigte die porkine Kollagen-I/III-Membran ein bezüglich Keratinozyten-, Endothelzell- und Fibroblastenmigration, Proliferation und

Differenzierung günstiges Microenvironment. Die dermale Regeneration von Vollhautdefekten kann durch Einsatz der Membran im Vergleich zur freien Granulation beschleunigt und durch Vermeidung eines Spalthauttransplantates die Morbidität der Spenderregion vermindert werden.

**Ausblick:**

Die untersuchte Membran ist insbesondere wegen ihrer Basalmembran-ähnlichen Oberflächenmikrostruktur und ihrer geringen Fibrorestimulation als Matrix für tissue-engineering Projekte mit Kultivation autologer Keratinozyten unter Erhalt der Differenzierungsmerkmale geeignet. Es sollten zusätzlich Untersuchungen und gegebenenfalls Modifikationen der Membran bezüglich ihrer mechanischen Festigkeit, beispielsweise durch Integration von Hyaluronat, durchgeführt werden, da eine längere Persistenz der Kollagenmatrix in-vivo bei der Regeneration ausgedehnter Defekte sinnvoll wäre.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Klinischer Hintergrund**

Für die Rekonstruktion dermalen Defekte stellt die primäre Rekonstruktion die chirurgische Methode der Wahl dar. In Abhängigkeit von der Defektgröße sind jedoch der Einsatz von Spalthaut-transplantaten, lokale Lappenplastiken und gegebenenfalls der mikrochirurgische Gewebettransfer zur Herstellung der Gewebeintegrität notwendig (Boyce et al. 1995, Brown et al. 1990, Hoffmann et al. 1998, Sanders and McKelvy 1976). Da der autologe Gewebettransfer mit einer Morbidität in der Donorregion behaftet ist, sind zahlreiche experimentelle und klinische Ansätze zur Generierung eines dermalen, biokompatiblen Substitutes entwickelt worden. Diese umfassen kultivierte, autologe Keratinozytensuspensionen, biodegradierbare Matrices und in-vitro konfektionierte mehrschichtige, dermale Hautäquivalente (Boyce et al. 2002, Boyce and Hansbrough 1988, Coulomb and Dubertret 2002, Rennekampff et al. 1996, Tsai et al. 1997). Die Kollagentypen I und III, quantitativ bedeutsame Bestandteile der humanen, dermalen Matrix, stellen etablierte Materialien für derartige tissue-engineering-Konzepte dar (Boyce 2001, Boyce and Hansbrough 1988, Friess et al. 1999). Kollagenmatrices zeigten im klinischen Einsatz eine lokale Stimulation der Fibroblastenproliferation und trugen zu einer verminderten Wundspannung mit konsekutiv reduzierter Narbenbildung bei (Lamme et al. 1996).

### **2.2. Kenntnisstand**

#### **2.2.1. Kollagenmatrices und Biomechanik**

Modifikationen der mechanischen Beschaffenheit von Kollagenmatrices, insbesondere Optimierung der Mikroporosität und Integration weiterer Matrixbestandteile wie Hyaluronat, führten zu einer verbesserten Infiltration für Fibroblasten in-vitro und einer erhöhten mechanischen Belastbarkeit (Cooper et al. 1991, Cooper and Hansbrough 1991, de Vries et al. 1995). Obwohl biodegradierbare Kollagenmatrices die Narbenbildung reduzieren und zu einer verbesserten Architektur des induzierten Regeneratgewebes beitragen, erzielte keine azelluläre Matrix bisher dermale Regeneration im Sinne einer restitutio ad integrum. Die Reepithelisierung zeigte sich hier als besonders kritisch bezüglich

einer möglichen Induktion durch biodegradierbare Membranen (Auger et al. 1995, Bell et al. 1991, Bohnert et al. 1986, Boyce et al. 1995).

### **2.2.2. Epithelisierung, Vaskularisation und Zell-Matrix-Interaktion**

Die Reepithelisierung ist von Bedeutung für die Defektregeneration, weil Keratinozyten das angiogene Zytokin VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) sezernieren (Szpaderska et al. 2005, Szpaderska and DiPietro 2003). Da das autologe Vollhauttransplantat weiterhin den Goldstandard der dermalen Defektregeneration darstellt, zielten die experimentellen und klinischen Ansätze auf eine in-vitro-Konfektion mehrschichtiger, differenzierter Konstrukte, bestehend aus biodegradierbarer Matrix, Fibroblasten und Keratinozyten (Gustafson and Kratz 1999, Kangesu et al. 1993). Unter Berücksichtigung der klinischen Erfahrung, dass sich der Erfolg solcher, in-vitro in organotypischer Kultur generierter, differenzierter, mehrschichtiger, dermalen Konstrukte nicht signifikant vom Einsatz simpler Keratinozyten-beschichteter Membranen unterschied, fokussierte sich die Entwicklung und der Einsatz von Zell-Matrix-Konstrukten auf die Transplantation von prä- oder postkonfluent mit Keratinozyten oder Fibroblasten besiedelten biodegradierbaren Membranen (Gustafson and Kratz 1999, Kangesu et al. 1993). Klinische Studien zeigten eine verminderte Vaskularisation mit erhöhter Transplantatverlustrate als vordringliches Problem bei der Anwendung von in-vitro generierten dermalen Substituten selbst bei ersatzstarkem, nicht durch Entzündung, Malnutrition oder Fibrose geschädigtem Transplantatlager (Sahota et al. 2003, Sahota et al. 2004, Schultz et al. 2003). Weiterhin ist die Adhärenz von Keratinozyten, bzw. die Epithelisierung der Membran abhängig von der Mikrotextur der Membranoberfläche und bisher nicht optimiert (Downing et al. 2005). Daher sollten vor in-vivo-Einsatz die Epithel- und Vaskularisations-permissiven Eigenschaften einer biodegradierbaren Membran überprüft werden.

### **2.2.3. TGF $\beta$ -Expression und Regulation der Wundheilung**

Für die Regulation von Vaskularisation und Reepithelisierung sind die fibroproliferativ und angiogen wirksamen Zytokine TGF $\beta$  (Transforming Growth factor beta) und VEGF und deren Rezeptoren, insbesondere TGF $\beta$ R-II und TGF $\beta$ R-III von Bedeutung.



TGF- $\beta$  soll in geringen Konzentrationen angiogenesefördernd, in höheren Dosen dagegen hemmend wirken (Fajardo et al. 1996, Yang and Moses 1990). Andere Autoren gehen von einer Hemmung der Angiogenese und der Vaskularisation durch TGF- $\beta$  aus. Experimentelle Untersuchungen ergaben einen unterschiedlichen Einfluß von TGF- $\beta$  in vivo und in vitro. Während ein angiogenesefördernder Effekt in vitro gezeigt werden konnte (Sankar et al. 1996, Yang and Moses 1990), lehnen verschiedene Autoren eine Angiogenesepromotion durch TGF- $\beta$  in vivo ab (Roberts et al. 1986). TGF $\beta$ R-II vermittelt die kontrollierte Keratinozytenmigration im Wundgebiet und ist so maßgeblich an der primären Wiederherstellung der Oberflächenintegrität beteiligt (Gold et al. 1997). Matures, funktionales dermales Epithel ist durch Zytokeratin 5/6-Expression der Keratinozyten gekennzeichnet (Auger et al. 1995, Bhora et al. 1995, Fleischmajer et al. 1993, Mackenzie and Hill 1984). TGF $\beta$ R-III stellt einen sensitiven Marker neugebildeter Kapillaren vom 0.-14. Tag dar (Koleva et al. 2006, Wehrhan et al. 2004a, Wipff et al. 2006). TGF $\beta$  induziert in der Reepithelisierungsphase die Expression von Integrinen, welche die Migration von Keratinozyten zur Wundoberfläche koordinieren (Gailit et al. 1994). Die Fibroblastenproliferation und Fibroblastenmigration in das Wundgebiet sowie die Kollagensynthese werden durch TGF $\beta$  in der Proliferationsphase vermittelt (Kishi et al. 1999, Reed et al. 1994, Wang et al. 2000). Insbesondere wird die Expression der Kollagene I und III gefördert (Pablos et al. 1995). In der Remodelingphase hat TGF $\beta$  durch Steuerung des Integrin-Expressionsmusters auf Fibroblasten Einfluß auf die Zusammensetzung und Vernetzung der definitiven Kollagene (Frank et al. 1996, Heino et al. 1989, Kagami et al. 1993). Somit bestimmt die TGF $\beta$ -Expression die Zusammensetzung und Qualität des Regeneratgewebes im Wundheilungsgebiet mit (Kishi et al. 1999, Lorenz and Adzick 1993). Die Rezeptorkinase des aktivierten TGF $\beta$ R-I phosphoryliert spezifisch Smad 2/3-Proteine als intrazelluläre signal-downstream-Effektoren (Liu et al. 1997).

In der Literatur wurde ein biologisch antagonistischer Effekt der TGF- $\beta$ -Isoformen, insbesondere von TGF $\beta$ <sub>1</sub> und TGF $\beta$ <sub>3</sub> beschrieben (O'Kane and Ferguson 1997). Es wurde bei der Heilung experimenteller Hautwunden an der Ratte eine verbesserte Hautarchitektur der Neodermis unter Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen TGF $\beta$ <sub>1+2</sub> bei gleichzeitiger exogener

Applikation von TGF $\beta_3$  gesehen (Shah M 1995). In Keloiden wurde eine erhöhte Expression für TGF $\beta_{1+2}$  bei gegenüber regelrechtem Hautgewebe nicht erhöhtem TGF $\beta_3$ -Expressionsgrad gefunden (Lee et al. 1999). Es zeigte sich vermehrte m-RNA für TGF $\beta_{1+2}$  in entzündlich und fibrotisch veränderter Haut bei gleichem m-RNA-Gehalt für TGF $\beta_3$  fibrotischer und gesunder Haut. Gesichert ist die Induktion von Fibrose durch TGF $\beta_1$  (Lin et al. 1995, Rodemann et al. 1996, Shihab et al. 1995, Shinozaki et al. 1997, Yamamoto et al. 1994). Hingegen gilt TGF $\beta_3$  als fibroprotektiv (Lee et al. 1999):

### **3. Ziele der Arbeit und Fragestellungen**

Das Ziel des vorliegenden Dissertationsprojektes war die Evaluation einer biodegradierbaren, porösen Kollagen-I/III-Membran als Vollhaut-Substitut auf experimentellen, dermalen Wunden im Vergleich zur Standardtherapie, der Anwendung eines Spalthaut-Transplantates, und im Vergleich zur freien, offenen Granulation. Ein wünschenswerter klinischer Einsatz der Membran wären dermale Defekte, die alternativ mit Spalthaut gedeckt würden und mit dem Risiko der Morbidität in der Donorregion verknüpft sind bzw. die Reduktion narbiger Schrumpfung in Defekten, die gewöhnlich der freien Granulation überlassen werden (palatinale Schleimhauttransplant-Entnahmeregionen). Die Neovaskularisation während der Membran- und Transplantateinheilung wurde spezifisch durch TGF $\beta$ R-III-labeling adressiert, um eine mögliche, verzögerte Membran-/ Transplantatvaskularisation vom Lager aus zu erfassen. TGF $\beta$ R-III zeigt gefäßbezogen eine strikte Assoziation zu neugebildeten Kapillaren (Torsney et al. 2002, Wehrhan et al. 2004a). Weiterhin sollte die Integration und Degradation der Membran während der Einheilung und deren Einfluß auf die Gewebearchitektur untersucht werden. Dazu bietet die Untersuchung von Sirius-Rot- gefärbten histologischen Präparaten im gekreuzt polarisierten Licht auf Grund der Doppelbrechung von Kollagenstrukturen eine Möglichkeit zur Strukturbeurteilung (Dayan et al. 1989). Bei Anwendung dieser Methode ist eine Differenzierung von Membran- und Gewebekollagen (Struktur, Orientierung, Bündeldicke) möglich. Die Ziele des vorliegenden Dissertationsprojektes lassen sich in folgenden Fragestellungen zusammenfassen:

1. Beschleunigt die porcine Kollagen-I/III-Membran die Reepithelisierung im Vergleich zur freien Granulation ?
2. Findet eine verzögerte Vaskularisation des Wundgebietes bei Einsatz der Membran im Vergleich zu Spalthaut-Transplantat und freier Granulation statt?
3. Welchen Einfluß hat die Kollagenmembran auf die Struktur des Regeneratgewebes?
4. Stimuliert die Kollagenmembran Fibroproliferation und Narbenbildung stärker als freie Granulation und Spalthaut-Transplantat?

## **4. Material und Methoden**

### **4.1. Tiermodell und Versuchsdesign**

Als Versuchstier wurde das adulte Hausschwein gewählt, da es sich für Studien der Wundheilung und Geweberegeneration besonders eignet. Seine morphologischen und anatomischen Gegebenheiten bilden die Voraussetzung für die Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen. Das gewählte Versuchstier ist als Großtier, ebenso wie das Schaf und der Hund, für die experimentelle Transplantationschirurgie geeignet (Honig et al. 1997). Gewebedurchblutung, zirkulatorische Vorgänge und Wundheilung sind mit den Verhältnissen beim Menschen zu vergleichen. 21 Tiere (Alter: 6 Monate, Körpergewicht 80-110 kg) kamen im Rahmen der Studie zum Einsatz (Tierversuchsgenehmigung bei der Bezirksregierung von Mittelfranken liegt vor, Kennung 621-2531.31-06/02).

An jedem Schwein wurden auf der Ohrrückseite jeweils 2 Vollhautdefekte (2 x 3 cm) geschaffen (Abb. 1).

### **Experimentelles Modell am Schweineohr zum Regenerationsvergleich der 3 Defektmodalitäten**

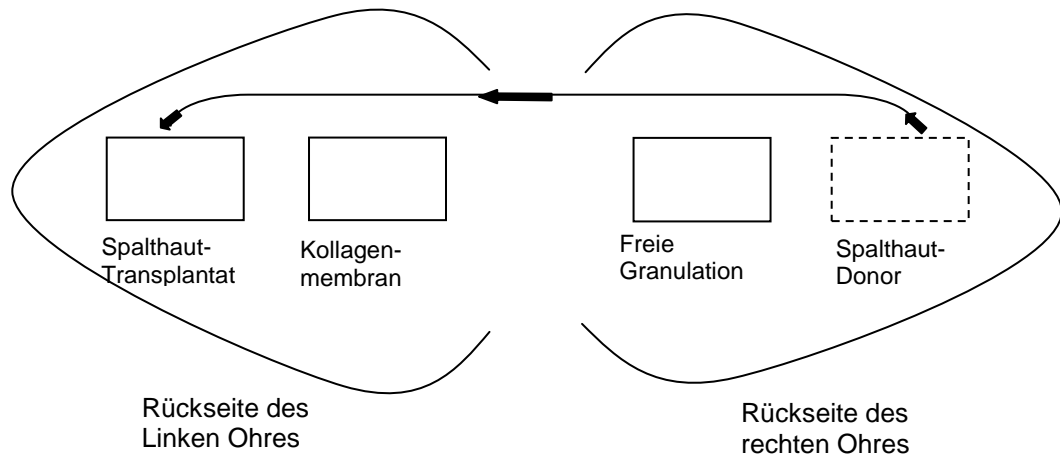


Abb.1: Das Schema zeigt die Lokalisation der 3 Defektmodalitäten (je 2x3 cm) an der Ohrrückseite; Tierversuchsnr. 621-2531.31-06/02 Regierung von Mittelfranken

Je Tier wurde ein Defekt mit Spalthaut-Transplantat, einer mit der Kollagen I/III-Membran (collagen I/III membrane, Nr. 10826, Geistlich Pharma AG, Wohlhausen, Schweiz). Die Adaptation der Membran und des Spalthaut-Transplantates wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 3-0, Ethicon, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. An den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 7, 14, 21 und 28 wurden jeweils 3 Tiere befriedet und die Defektregionen asserviert.

#### **4.2. Narkoseverfahren und perioperatives Management**

Alle Eingriffe erfolgten in Intubationsnarkose. Die Tiere erfuhren eine perioperative Antibiose 1h präoperativ bis 2 Tage postoperativ zur Verringerung von Infektionsrisiken (Streptomycin, 0,5g/d, Grünenthal, Stollberg, Germany). Die Narkoseeinleitung erfolgte durch Inhalation von Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott, Wiesbaden Deutschland). An das Kreislaufsystem des Narkoseapparates (Tiberius 19, Draeger, Bremen, Deutschland) war ein handelsüblicher Tubus angeschlossen, über den das Schwein Isofluran in einer Dosierung von 3,5 – 4,5 Vol % über einen Gasverdampfer (Draeger, Bremen Deutschland) inhalierte. Als Trägergas wurde reiner Sauerstoff verwendet.

### **4.3. Probengewinnung zur Gewebeanalyse**

Die Proben wurden jeweils als 3-5 mm breite Streifen in Vollhautstärke so genommen, dass der Übergangsbereich zwischen Membran bzw. Spalthaut-Transplantat im Bereich des Wundgrundes und der lateralen Ränder vollständig erfasst wurde. Unmittelbar im Anschluß an die Probenentnahme wurden die Präparate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C asserviert.

### **4.4. Analysemethoden**

#### **4.4.1. Probenaufbereitung für Immunhistochemie und Immunoblot**

Die geplanten proteinchemischen Nachweisreaktionen setzen nicht denaturiertes Protein voraus, daher wurden die diesbezüglich vorgesehenen Proben bis unmittelbar vor die Lyse strikt bei -80°C ohne Unterbrechung der Kühlkette asserviert. Bezüglich der Aufbereitung und Fixation für die Paraffinimmunhistochemie konnte auf die Erfahrungen der eigenen Arbeitsgruppe bei der Optimierung des Fixationsverfahrens zur späteren immunhistochemischen Zytokindetektion und dem Nachweis intrazellulärer, phosphorylierter Proteine zurückgegriffen werden (Schultze-Mosgau et al. 2002, Schultze-Mosgau et al. 2003a, Schultze-Mosgau et al. 2003b, Schultze-Mosgau et al. 2004a, Schultze-Mosgau et al. 2006, Wehrhan et al. 2004a, Wehrhan et al. 2004b). Als Optimum erwies sich bei der Fixation eine 4%-ige Formaldehydlösung (phosphatgepuffert, pH 7,6, 4 °C) bei einer Fixationsdauer von 6 Stunden. Die formalinfixierten Proben wurden dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Gewebeschnitte wurden als Längsschnitte (3 µm Schichtdicke, Schlittenmikrotom Jung HN 40, Leica, Nussloch, Deutschland) senkrecht zum Verlauf des Übergangsbereiches zwischen Membran/ Spalthaut-Transplantat und Wundgrund und senkrecht zur Hautoberfläche angefertigt.

#### **4.4.2. Immunhistochemische Färbung**

##### **ABC-Methode**

Zur Lokalisation einer Expression von Zytokeratin 5/6 und TGFβ-RIII erfolgte der spezifische Nachweis mit Hilfe der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-(ABC-POX)-Methode (Lloyd et al. 1985). Hierbei wird die Affinität von Biotin zu Avidin genutzt. Nach spezifischer Bindung eines Primärantikörpers an das nachzuweisende Epitop wird ein biotin-markierter Sekundärantikörper eingesetzt, der spezifisch für die Bindung an den Primärantikörper ist.

Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Der Komplex ist so konstruiert, daß ein Molekül Avidin drei Moleküle Biotin binden kann und somit zur Bindung sowohl der biotinmarkierten Sekundärantikörper als auch der biotinmarkierten Meerrettichperoxidase-Moleküle zur Verfügung steht. Es kommt es zu einer Komplexbildung mit Konzentration mehrerer Peroxidase-Moleküle am Sekundärantikörper. In der chromogenen Nachweisreaktion wird an der durch den Sekundärantikörper bestimmten Stelle ein Farbsubstrat enzymatisch (Meerrettichperoxidase) umgesetzt. Die Lokalisation der Farbreaktion repräsentiert das mit dem Primärantikörper gesuchte Antigen. In der vorliegenden Arbeit kamen alle gesuchten Epitope von Zytokeratin 5/6 und TGFβR-III durch diese Methode zur farblichen Darstellung.

#### Färbeprotokoll

In Vorbereitung auf die immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (Xylol 100% 2 x 15 min.; Propanol 100 %, 95 %, 90 %, 70 % je 2 x 5 min). Nach Hydrierung in Phosphatpuffer (TBS) (0,05 M Tris/ HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,6) (5 min., 22 °C) wurde, um falsch positive Färbresultate zu vermeiden, zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %, 20 min., 20 °C) verwendet. Die Demaskierung der für die Primärantikörperbindung relevanten Epitope von Zytokeratin 5/6 und TGFβR-III wurde mit einem enzymatischen Verfahren unter Verwendung von Proteaselösung durchgeführt. Als Protease diente 0,1%-ige Trypsin-CaCl<sub>2</sub>-Lösung (0,2 g Schweinepankreas-Trypsin (ICN Biomedicals Inc, Eschwege, Deutschland), 0,2 g CaCl<sub>2</sub>, 200 ml TBS, pH > 7,8; im Wasserbad bei 37 °C). Einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers an den Gewebeschnitt aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen beugte eine elektrische Neutralisierung des Gewebeschnittes vor. Der Ansatz bestand aus dem unspezifischen Blockiermedium Blotto (Ansatz: 500 µg Magermilchpulver + 50 µl TBS + 50 µl Tween 20<sup>®</sup>; Magermilchpulver und Tween 20<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt, Deutschland) und Normalserum der Spezies, in welcher der Sekundärantikörper gewonnen wurde (Blotto und Normalserum im Verhältnis 5:1, 22 °C, 30 min). Die Epitopmarkierung auf dem Gewebeschnitt erfolgte während der Inkubation der Präparate mit einem polyklonalen Primärantikörper für alle Färbungen einheitlich in einer feuchten, dunklen Kammer (4°C, 12 h)

unter Verwendung der in Tab. 1 angegebenen Antikörperverdünnungen. Als Verdünnungsmedium diente TBS mit einem BSA-Anteil von 2,5 % (bovines Serumalbumin 2,5 %, Dako, Glostrup, Dänemark).

<b>Verwendete Primärantikörper (Immunhistochemie)</b>				
<b>gesuchtes Protein</b>	<b>Bindungs lokalisation</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
TGFβR-III	Carboxy-terminales Ende	Ziege anti-human/ Schwein TGFβR-III-IgG	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Zytokeratin 5/6	Interne Region, nicht näher angegeben	Ziege anti human/ Schwein Zytokeratin 5/6-IgG	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Tab. 1: Tabelle 1 zeigt die verwendeten Primärantikörper. Es wurden für die immunhistochemische Nachweisreaktion die angegebenen polyklonalen, affinitätsgereinigten Primärantikörper in den angegebenen Konzentrationen und der angegebenen Spezifität eingesetzt.

<b>Verwendete Sekundärantikörper (Immunhistochemie)</b>				
<b>gesuchtes Protein</b>	<b>Spezies</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
TGFβR-III	Ziege	Anti-Ziegen-IgG, biotinyll.	1:300	Dako, Glostrup, Dänemark
Zytokeratin 5/6	Ziege	Anti-Ziegen-IgG, biotinyll.	1:300	Dako, Glostrup, Dänemark

Tab. 2: Die Tabelle 2 zeigt die verwendeten Sekundärantikörper. Es wurden die angegebenen Sekundärantikörper aus den aufgeführten Spezies eingesetzt.

Als Sekundärantikörper wurde jeweils ein biotinylierter, polyklonaler Antikörper eingesetzt (30 min, RT). Verdünnt wurde mit TBS. Antikörperspezies, Antikörperspezifität und die benutzte Verdünnung sind aus Tab. 2 ersichtlich. Anschließend wurde mit dem Avidin-Biotin/Meerrettich-Peroxidasekomplex (ABC/HRP-Komplex, DAKO, Glostrup, Dänemark, 30 min, RT) inkubiert. Sämtliche Inkubationsschritte erfolgten bei den jeweils angegebenen Temperaturen in einer feuchten Kammer. Als Substrat für die chromogene Nachweisreaktion wurde AEC (0,02% 3-Amino-9-Ethylcarbazol in 50 mM Acetatpuffer pH 5; 5,5 % Dimethylformid, Dako, Glostrup, Dänemark) benutzt. Zur Kontrastverstärkung und verbesserten Auswertbarkeit wurden die Zellkerne

auf dem Gewebeschnitt mit Hämatoxylin (DAKO, Glostrup, Dänemark) gegengefärbt.

Von jeder Gewebeprobe wurden drei konsekutiv gewonnene Schnitte auf einem Objektträger prozessiert. Dabei diente jeweils einer als Negativkontrolle. Dieser wurde identisch behandelt, jedoch der Inkubationsschritt mit dem Primärantikörper durch Inkubation mit BSA (bovines Serumalbumin) ersetzt. In jeder Färbeserie wurde als Positivkontrolle ein bekannt positives Präparat mitgeführt.

#### **4.4.3. Histochemische Sirius-Rot-Färbung**

Ein histologisches Präparat jeder Probe wurde der Sirius-Rot-Färbung unterzogen.

##### **Färbeprotokoll**

Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur eine Stunde in 0,1% Sirius-Rot Lösung (Sigma-Aldrich, München) in gesättigter Pikrinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert und danach in 70% HCl-Ethanol differenziert (Merck, Darmstadt, Deutschland).

#### **4.4.4. Histochemische Hematoxylin-Färbung**

Ein histologisches Präparat jeder Probe wurde der konventionellen HE-Färbung gemäß Standardprotokoll unterzogen.

#### **4.4.5. Immunoblot-Analyse**

Zum semiquantitativen Expressionsvergleich der Zytokine  $TGF\beta_1$  und  $TGF\beta_3$  sowie zur Evaluation von Smad 2/3 wurde die Methode des konventionellen Immuno-Blots (Western-Blot) angewendet (Burnette 1981, Towbin et al. 1979). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des lysierten Proteingemisches erfolgte die Nachweisreaktion über spezifische Primärantikörperbindung, Brückenantikörper und Kopplung mit einem Chemoluminiszenzfarbstoff. Detektiert wurde mit einem digitalen Chemoluminiszenz-Nachweissystem. Zur quantitativen Vergleichbarkeit der Zytokin-Expression wurde von jeder Probe die gleiche Proteinmenge eingesetzt und dieses durch  $\beta$ -Aktin-Expressionsnachweis bei jedem Blot (housekeeping-gene) verifiziert als normalisierte Proteinratio (Gibbs et al. 2003, Schultze-Mosgau et al. 2006).



### Immunoblot-Protokoll

Die gefrorenen Proben wurden mechanisch mit einem Disperser in RIPA-Puffer lysiert (Ultra Turax, IKA, Staufen, Deutschland; 50 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Deoxycholat, Proteaseinhibitoren: 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 µg/ml Pepstatin, 10 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin). Die Protein-Konzentrationen wurden anschließend im Protein-Assay bestimmt (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Das lysierte Protein wurde jeweils zu 15 µg je Kammer in der Gelelektrophorese eingesetzt (4-12% Polyacrylamid-Gel, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und aufgetrennt. Nach Elektrophorese wurde auf eine Transfermembran (Nitrozellulose-Membran, Invitrogen) mit einem Protean-System (Biorad, München, Deutschland). Die Membran wurde anschließend in Blockierlösung 30 min inkubiert (PBS: 5% Magermilchpulver, 0,1 % Tween 20, Merck). Es folgte die Inkubation mit den spezifischen, Primärantikörpern (Tab. 3) 12 h bei 4°C unter kontinuierlicher Bewegung.

<b>Verwendete Primärantikörper (Immunoblot)</b>				
<b>gesuchtes Protein</b>	<b>Bindungs-lokalisierung</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
TGFβ <sub>1</sub>	Carboxy-terminales Ende	Huhn anti-Schwein-TGFβ <sub>1</sub> -IgG	1:500	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
TGFβ <sub>3</sub>	Carboxy-terminales Ende	Kaninchen anti Schwein TGFβ <sub>3</sub> -IgG	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Smad 2/3	Interne Region, nicht näher angegeben	Maus anti-hum./Schwein-Ig G	1:100	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
β-Aktin	Interne Region, nicht näher angegeben	Kaninchen anti hum./Schwein-IgG	1:100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Tab. 3: Tabelle 3 zeigt die im Immunoblot eingesetzten primären Antikörper. Dabei wird Smad 2/3 in der phosphorylierten, biologisch aktiven Form detektiert. Auf Grund der Komplexbildung Smad2 + Smad3 wird im Immunoblot eine entsprechende Doppelbande gefunden (Abb. 5c).

<b>Verwendete Sekundärantikörper (Immunoblot)</b>				
<b>gesuchtes Protein</b>	<b>Spezies</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
TGF $\beta_1$	Ziege	Anti-Huhn-IgG, biotinyll.	1:1000	Vector Laboratories, Burlingame, USA
TGF $\beta_3$ , $\beta$ -Aktin	Ziege	Anti-Kaninchen-IgG, biotinyll.	1:1000	Dako, Glostrup, Dänemark
Smad 2/3	Kaninchen	Anti-Maus-IgG, biotinyll.	1:1000	Dako, Glostrup, Dänemark

Tab. 4 Tabelle 4 zeigt die bei den Immunoblot-analysen verwendeten sekundären, biotinmarkierten Antikörper. In vergleichenden Vorversuchen wurde die Stabilität und Spezies-Spezifität der sekundären Antikörper geprüft und optimiert, um Fehlbanden zu eliminieren.

Es folgte die Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern gemäß der in Tab. 4 angegebenen Konzentrationen für 30 min. Die Farbreaktion wurde mit dem Chemoluminiszenzsystem ECL entwickelt (ECL, Amersham Pharmarcia, Freiburg, Deutschland). Als Ladekontrolle zur Bestätigung gleicher Proteinkonzentrationen in jedem Blot, um die quantitative Vergleichbarkeit der Resultate zu gewährleisten, wurde  $\beta$ -Actin jeweils bestimmt und detektiert.

#### **4.5. Qualitative und quantitative Analyseverfahren**

##### **4.5.1. Qualitative und semiquantitative Expressionsbestimmung**

Im Hellfeldmikroskop (Axioskop, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden bei 50-400 facher Vergrößerung Lokalisation und Verteilung der Keratinozyten (Zytokeratin 5/6) und neugebildeter Kapillaren (TGF $\beta$ R-III) im Übergangsbereich zwischen Transplantat (Kollagen-Membran bzw. Spalthaut) oder Granulationsgewebe und dem ortsständigen Gewebe in den verschiedenen experimentellen Wundheilungsmodalitäten untersucht. Drei Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung je Gewebeschnitt, Probenlokalisierung, Tier, Tag und Gruppe wurden mit einer CCD- Kamera digitalisiert (Kappa, Gleichen, Germany). Verwendet wurde dazu das Softwaresystem Optimas 6.5 (Stemmer, Puchheim, Germany). Zur quantitativen Erfassung der Vaskularisation und zum Vergleich der Therapiemodalitäten bezüglich der Rekapillarisation wurde die relative Kapillarfläche je Gesichtsfeld aus dem Verhältnis TGF $\beta$ R-III-positiver Kapillarfläche zur Gesamtfläche bestimmt. Die Reepithelisierung wurde

quantitativ durch die Bestimmung der mittleren Epitheldicke zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt erfasst. Dazu erfolgte an der kalibrierten, standardisierten, mikroskopischen 200-fachen Vergrößerung das Ausmessen der Epitheldicken (Zytokeratin 5/6-positive Epithelien an beiden Rändern und in der Mitte des Defektes zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt und die Bildung eines Mittelwertes. Die Sirius-Rot gefärbten Schnitte wurden im gekreuzt polarisierten Licht analysiert (Junqueira et al. 1978, Junqueira et al. 1979). Faserorientierung und Packungsdichte wurden so visualisiert. Die dargestellten Farben im polarisierten Licht korrespondieren mit der Faserdicke, Grüntöne in der Darstellung entsprechen einer Faserdicke  $< 0,8 \mu\text{m}$ , Gelb-Rot-Töne einer Dicke von ca  $1,6- 2,4 \mu\text{m}$  (Dayan et al. 1989, Dayan et al. 1993).

#### **4.5.2. Statistische Analyse**

Die Daten aus mehreren Schnitten je Probe und Tier sowie aus gleichartigen Proben je Tier wurden aggregiert. Zur Darstellung der quantitativen Daten kamen ohne Annahme einer Normalverteilung der Mittelwert und die Standardabweichung. Die Überprüfung auf Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test und dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Zweiseitige p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als signifikant angesehen. Alle Berechnungen erfolgten mit dem Programm SPSS V.12 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

## **5. Ergebnisse**

### **5.1. Tierexperimentelle Ergebnisse**

Alle Tiere überlebten regelhaft im Untersuchungszeitraum, es trat kein drop out auf. Zu allen postoperativen Untersuchungszeitpunkten lagen keine Wundheilungsstörungen in den experimentellen Defekten vor. Keine klinischen Zeichen von Infektion oder Verlust-/ Teilverlust der Membran waren zu beobachten.

### **5.2. Qualitative Ergebnisse**

#### **5.2.1. Expression von Zytokeratin 5/6**

Die immunhistochemische Färbung von Zytokeratin 5/6 zeigte ein intaktes, maturiertes Epithel im Bereich der Membran-versorgten Defekte ab dem 5. postoperativen Tag (Abb. 2a, b).

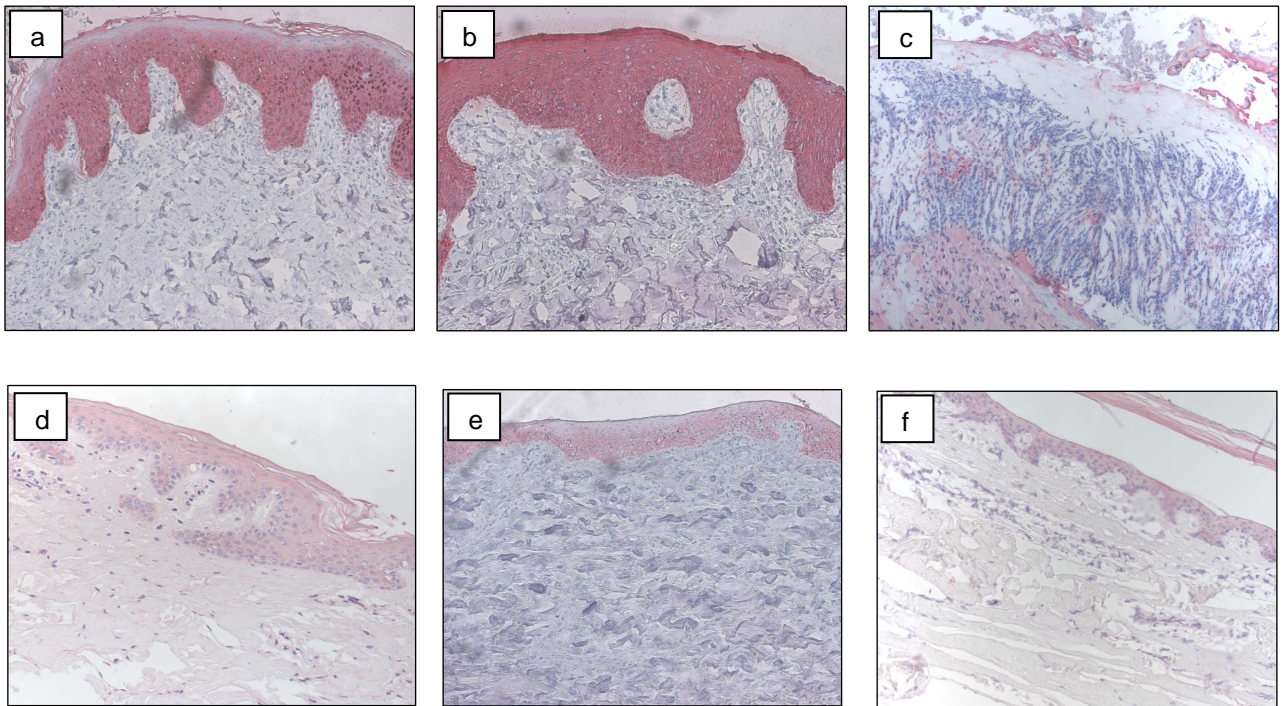


Abb. 2: Am 5. postoperativen Tag zeigte der Granulationsdefekt (2c) im Vergleich zu Spalthaut- und Membran-gedecktem Defekt (2a,b) kein geschlossenes Epithel. Am 28. postoperativen Tag wurde kein klinischer und histologischer Unterschied zwischen den Defektmodalitäten bezüglich der Epithelisierung gesehen (2d,e,f). (Originalvergrößerung x 200).

Der freie Granulationsdefekt zeigte am 5. Tag einen inkompletten Epithelschluss mit Fibrinbelag und Detritus (Abb. 2c). Ein intaktes Epithel wurde am 7. postoperativen Tag bei der freien Granulation erreicht. Am Ende der Untersuchungsperiode, dem 28. postoperativen Tag, zeigten sich keine klinisch evidenten Unterschiede bezüglich der drei unterschiedlichen Behandlungsmodalitäten. Eine komplette Epithelisierung lag am 28. postoperativen Tag bei allen Defektmodalitäten vor (Fig. 2d, e, f).

### 5.2.2. Expression von TGF $\beta$ R-III

Die TGF $\beta$ R-III-assoziierte immunhistochemische Markierung neugebildeter Kapillaren wurde ab dem 1. postoperativen Tag nur in der Gruppe der Spalthaut-Transplantat-verschlossenen Defekte gesehen (Abb. 3a, b, c). Am 7. postoperativen Tag wurden TGF $\beta$ R-III-positive Kapillaren in den Übergangszonen aller Defektmodalitäten gesehen (Abb. 3d, e, f). Am 28. postoperativen Tag, dem Zeitpunkt der klinisch in allen Defektarten

abgeschlossenen Heilung, wurden TGF $\beta$ R-III exprimierende Kapillaren ausschließlich in der Gruppe der freien Granulation gefunden.

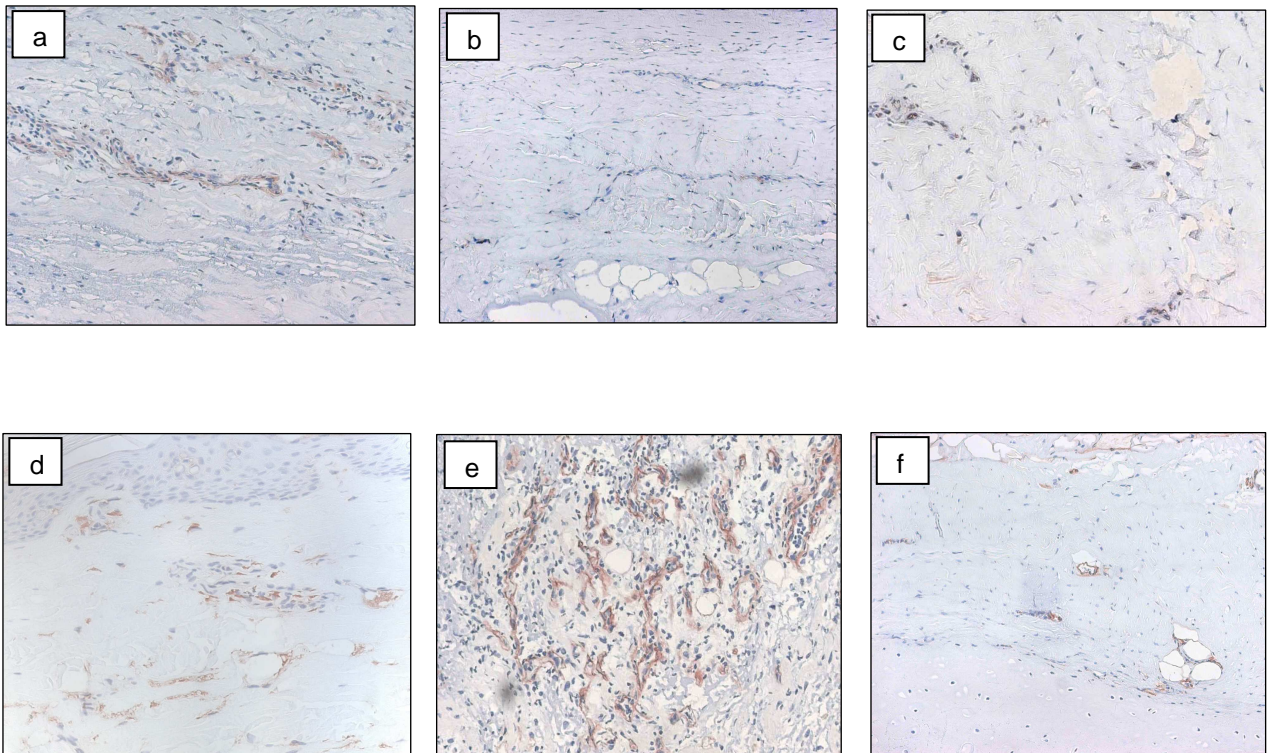


Abb. 3: Eine TGF $\beta$ R-III-assoziierte Neovaskularisation wurde am 1. postoperativen Tag ausschließlich in den Spalthaut-bedeckten Defekten (3a) gesehen. Am 7. postoperativen Tag wurden TGF $\beta$ R-III-positive Kapillaren in allen Defektmodalitäten Spalthaut-Transplantat (3d), Membran-Deckung (3e) und freier Granulation (3f) mit maximaler Ausprägung im Membran-gedeckten Defekt (3e) gesehen. (Originalvergrößerung x 200).

### 5.2.3. Sirius-Rot-Färbung und Polarisationsmikroskopie

Die Analyse der Sirius-Rot-Färbung im gekreuzt polarisierten Licht zeigte im Bereich der Membraneinheilung eine vom Wundgrund unterscheidbare Kollagenstruktur bis zum 7. postoperativen Tag (Abb. 4a, b). Am ersten postoperativen Tag zeigte sich im Bereich der Membran ihre originäre Struktur, bestehend aus kompakten, dichten, geschichteten äußeren Kollagenpaketen und der inneren, porösen Struktur (Abb. 4a). Homogen grüne Polarisationsfarben zeigten die homogene Verteilung des Kollagen I und III der artifiziellen Membran. Am 7. postoperativen Tag wurde ein Verlust der Membranstratifizierung gesehen (Abb. 4b), entsprechend rötlichen und gelblichen Polarisations-Farbtönen in der Membranzone. Diese wiesen auf nunmehr dickere Kollagenbündel im Membranbereich hin. Am 14. postoperativen Tag wurde kein Unterschied in Struktur, Orientierung, Faser-



und Bündeldicke und Kollagenarchitektur zwischen Membranseite und Lager gesehen.

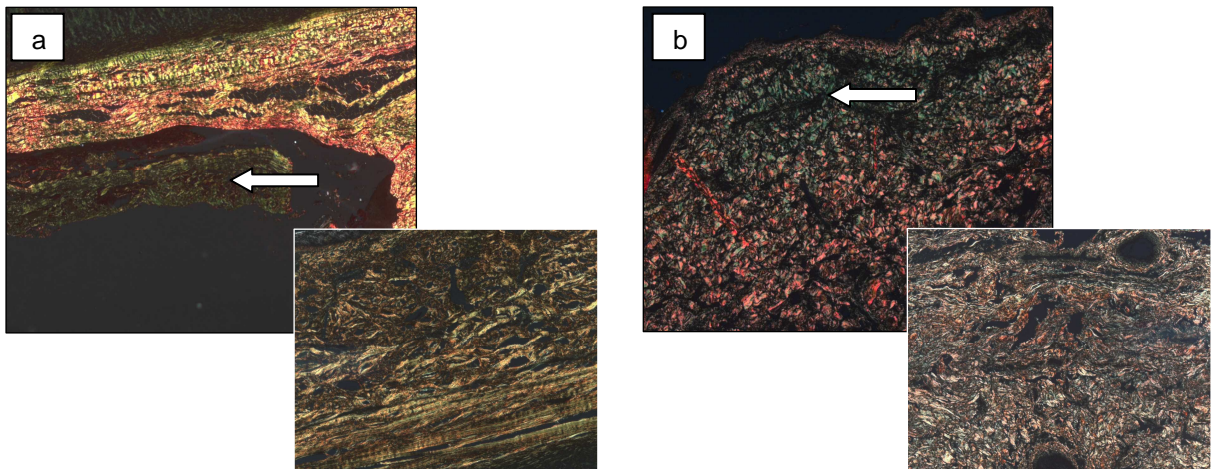


Abb. 4: Die Untersuchung im Lichtmikroskop zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern der Sirius-Rot gefärbten Präparate zeigte am ersten postoperativen Tag in der Übersichtsvergrößerung (x200) rötlich- gelbliche Polarisationsfarben im Bereich des ortständigen Gewebes (4a) mit klarer Abgrenzbarkeit der Membran (4a Pfeil), die sich in der Vergrößerung (x400) grünlich-gelblich mit stratifizierter Struktur darstellte. Ein Verlust der Membranstratifikation wurde am 7. postoperativen Tag (4b + 4b Detailvergrößerung) mit Zeichen der Membrandegradation gesehen. Das Neuaufreten rötlicher und gelblicher Polarisation im Bereich der Membran (4b Pfeil) weist auf eine Neusynthese dickerer Kollagenfasern (1.6-2.4  $\mu\text{m}$ ) hin.

#### 5.2.4. Immunoblot-Analysen

Die Immunoblot-Analyse der untersuchten Proben zeigte eine Expression von  $\text{TGF}\beta_1$  während der Wundheilung in allen Defektmodalitäten bis zum 14. postoperativen Tag. Die höchste Expression wurde in der Zone der freien Granulation gefunden (Abb. 5a). Der Expressionsgrad für  $\text{TGF}\beta_1$  im Spalthaut- und im Membran-bedeckten Defekt war vergleichbar, jedoch geringer als im Defekt der freien Granulation. Die normalisierte Proteinratio, bezogen auf  $\beta$ -Aktin, zeigte gleiche Proteinbeladungen aller durchgeführten Messungen.

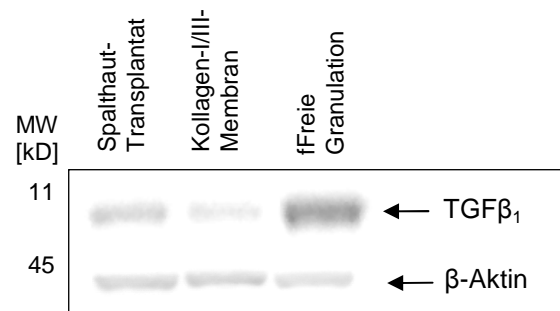


Abb. 5a: Der Immunoblot für TGFβ<sub>1</sub> zeigte am 14. postoperativen Tag die höchste Expression im Defekt der freien Granulation. Die normalisierte Proteinratio zeigte gleiche Expression für β-Aktin und damit gleiche Gesamtproteinmengen. Eine quantitative Vergleichbarkeit der Resultate ist so gewährleistet

Der TGFβ<sub>3</sub>-Immunoblot zeigte am 14. postoperativen Tag den gleichen Expressionsgrad für TGFβ<sub>3</sub> in der Spalthaut- und der Membrangruppe (Abb. 5b). Die TGFβ<sub>3</sub>-Expression im Defekt der freien Granulation war jedoch demgegenüber vermindert.

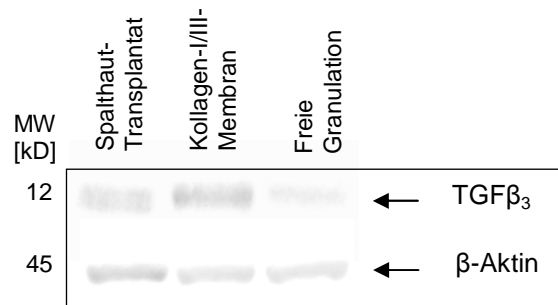


Abb. 5b: Der Immunoblot für TGFβ<sub>3</sub> zeigte am 14. postoperativen Tag die geringste Expression im Defekt der freien Granulation. Die normalisierte Proteinratio zeigte gleiche Expression für β-Aktin und damit gleiche Gesamtproteinmengen. Eine quantitative Vergleichbarkeit der Resultate ist so gewährleistet

Die Smad 2/3-Expression, induziert durch TGF $\beta_1$ , zeigte am 14. postoperativen Tag ebenfalls im Defekt der freien Granulation (Abb. 5c) ein größeres Ausmaß als in den Defekten, die mit Spalthaut bzw. porkiner Kollagen I/III-Membran versorgt wurden.

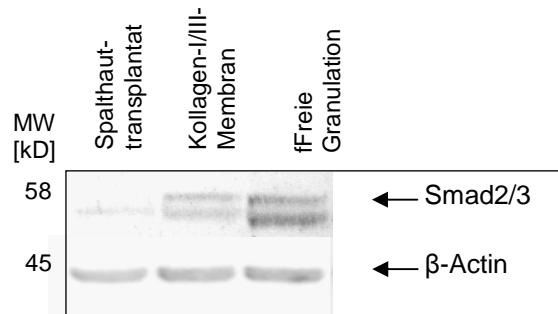


Abb. 5c: Der Immunoblot für Smad 2/3 zeigte am 14. postoperativen Tag die höchste Expression im Defekt der freien Granulation. Die normalisierte Proteinratio zeigte gleiche Expression für  $\beta$ -Aktin und damit gleiche Gesamtproteinmengen. Eine quantitative Vergleichbarkeit der Resultate ist so gewährleistet

### 5.3. Quantitative Resultate

#### 5.3.1. Epitheldickenmessung

Die mittlere Epitheldicke während der Wundheilung aller Defektmodalitäten vom 1. bis zum 28. postoperativen Tag ist in Abb.6 angegeben. Die mittlere Epitheldicke der Spalthaut-gedeckten Defekte zeigte nur geringgradige Schwankungen im zeitlichen Verlauf mit einer mittleren Epitheldicke von 100  $\mu\text{m}$  vom 1. postoperativen Tag an. Die Membran-gedeckten Defekte erreichten eine Epithel-Integrität am 5. postoperativen Tag mit einer mittleren Epitheldicke von 255  $\mu\text{m}$  während des Untersuchungszeitraums. Die mittlere Epitheldicke am 5. postoperativen Tag (257  $\mu\text{m}$ ) war signifikant größer als die Epitheldicke der Spalthaut-gedeckten Defekte zum gleichen Untersuchungszeitpunkt (75  $\mu\text{m}$ ,  $p < 0,03$ ) und signifikant größer als in der Defektmodalität der freien Granulation (152  $\mu\text{m}$ ,  $p < 0,05$ ). Am 7. postoperativen Tag, dem Zeitpunkt, an dem alle Defektmodalitäten die Gewebeintegrität erreichten, war die mittlere Epitheldicke (257  $\mu\text{m}$ ) der Membran-gedeckten Defekte ebenfalls größer als die der Spalthaut-gedeckten Defekte (104  $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ). Am 28. postoperativen Tag zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Epitheldicke



aller Defektmodalitäten. Die mittlere Epitheldicke aller Defektarten betrug dann 103  $\mu\text{m}$ .

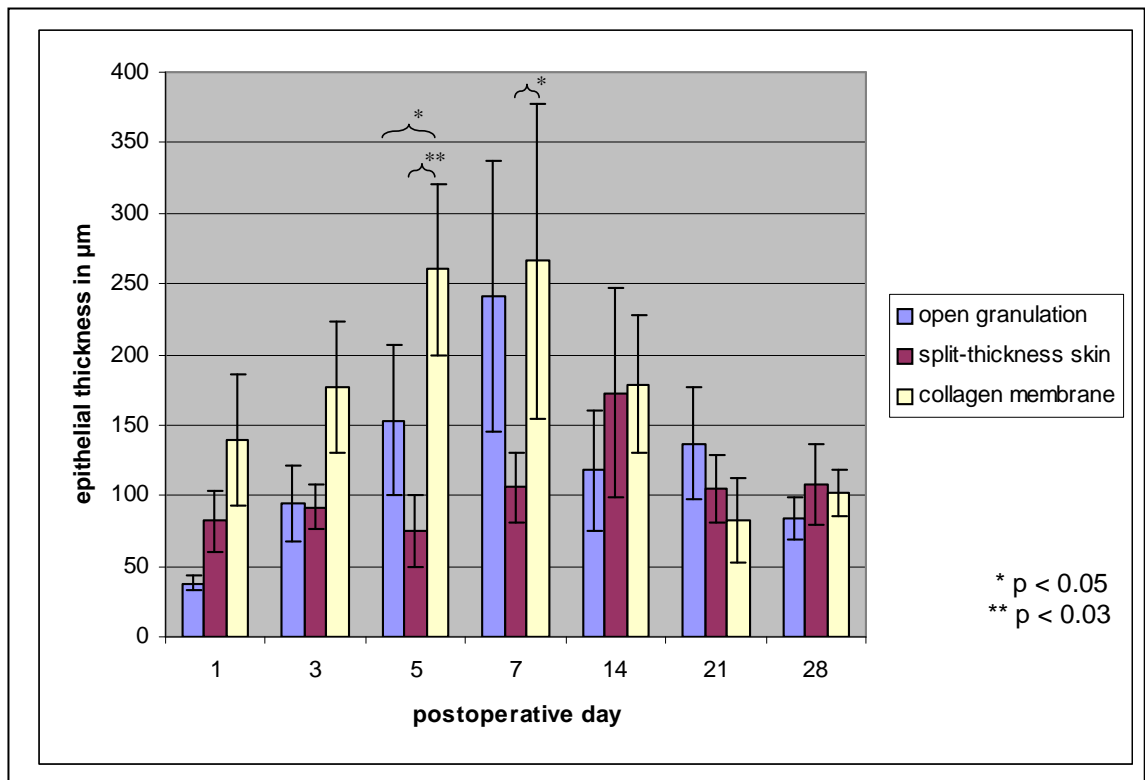


Abb. 6: Abbildung 6 zeigt die mittlere Epitheldicke im zeitlichen Verlauf.

Am 5. postoperativen Tag wurde die Epithelintegrität über der Kollagen-I/III-Membran erreicht, im Bereich der freien Granulation am 7. postoperativen Tag. Die mittlere Epitheldicke im Membran- und Spalthaut-gedeckten Defekt war bis zum 14. postoperativen Tag signifikant größer als im Defekt der freien Granulation. Am 28. postoperativen Tag, dem Ende des Untersuchungszeitraums bestanden klinisch und bezüglich der Epitheldicke keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Defektmodalitäten.

### 5.3.2. TGF $\beta$ R-III-assoziierte Neovaskularisation

Die relative, TGF $\beta$ R-III-positive Kapillarquerschnittsfläche neugebildeter Kapillaren im Vergleich der Heilung der Defektmodalitäten freie Granulation, Spalthaut-Transplantat und porkine Kollagen-I/III-Membran ist in Abb. 7 dargestellt. TGF $\beta$ R-III-markierte Kapillaren und dementsprechend die TGF $\beta$ R-III-positive Kapillarquerschnittsfläche wurde am 1. postoperativen Tag ausschließlich in der Spalthautgruppe nachgewiesen. Am 3. postoperativen Tag wurde eine mittlere, relative TGF $\beta$ R-III-positive Kapillarfläche von 2,21 % in der Spalthautgruppe gemessen, nicht signifikant verschieden von der mittleren TGF $\beta$ R-III-positiven, relativen Kapillarfläche in der Membran-Gruppe (1,92 %). Die TGF $\beta$ R-III-assoziierte Kapillarfläche in der Defektzone der freien Granulation war am 3. postoperativen Tag signifikant geringer im Vergleich zu

den anderen Modalitäten (0,91%,  $p < 0,05$ ). Am 7. postoperativen Tag wurde ein signifikanter Unterschied für die relative, TGF $\beta$ R-III-positive Kapillarfläche zwischen den Spalthaut-gedeckten Defekten (1,78 %) und den Kollagenmembran-gedeckten Defekten (2,84 %,  $p < 0,03$  %). Beide Behandlungsmodalitäten unterschieden sich signifikant von der freien Granulation (1,24 %,  $p < 0,05$ ). Am 14. postoperativen Tag war die mittlere TGF $\beta$ R-III-positive Kapillarfläche in den Membran-bedeckten Defekten (2,43 %) signifikant größer als in den Spalthaut-bedeckten Defekten (1,13 %,  $p < 0,05$ ), jedoch nicht signifikant unterschieden von der freien Granulation (1,32 %,  $p < 0,05$ ). Am 21. postoperativen Tag und am 28. postoperativen Tag zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der TGF $\beta$ R-III-assoziierten Neovaskularisation in allen Behandlungsmodalitäten.

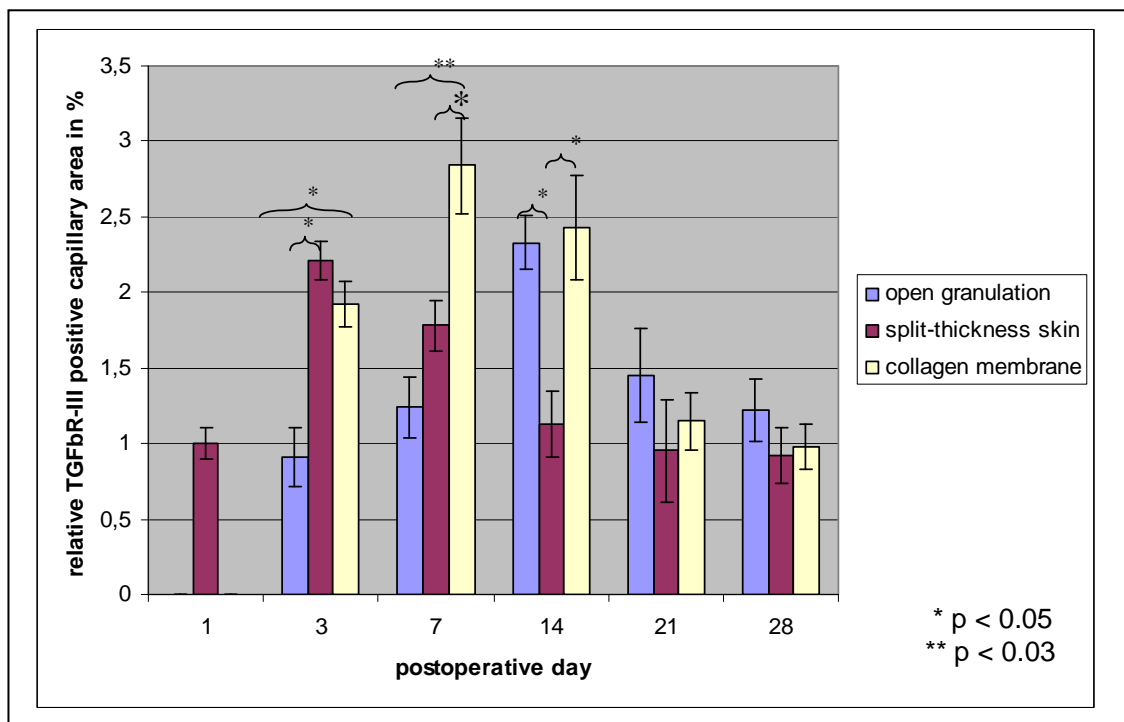


Abb. 7: Abbildung 7 zeigt die quantitative Auswertung der relativen TGF $\beta$ R-III-positiven Kapillarfläche im zeitlichen Verlauf. Am 3. und 7. postoperativen Tag war die TGF $\beta$ R-III-assoziierte Neovaskularisation in den Membran-gedeckten Defekten signifikant größer ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,003$ ) als in den der freien Granulation überlassenen Defekten. Das Maximum der TGF $\beta$ R-III-assoziierten Neovaskularisation wurde am 3. postoperativen Tag in den Spalthaut-Defekten, am 7. Tag in den Membran-gedeckten Defekten und am 14. Tag in den Defekten der freien Granulation erreicht.

## 6. Diskussion

Das Ziel des Dissertationsprojektes war die Evaluation der porkinen Kollagen-I/III-Membran als dermales Substitut zur Regeneration von Vollhaut-Defekten unter der Perspektive der Vermeidung autologer Transplantate (Ophof et al. 2002, Ophof et al. 2004). Die experimentelle Studie fokussierte die epitheliale und vaskuläre Integration der Membran in das ortsständige Gewebe, da Epithelisierung und Vaskularisation artifizieller Membranen die kritischen Aspekte darstellen (Sahota et al. 2003, Sahota et al. 2004).

Die Ergebnisse zeigten eine signifikant ( $p < 0,05$ ) beschleunigte Epithelisierung von Vollhautdefekten (5. postoperativer Tag), wenn sie mit der Membran gedeckt wurden, im Vergleich zur freien Granulation. Diese Tatsache und die Beobachtung einer gleichzeitig dickeren Epithelschicht weisen auf einen permissiven Effekt dieser porkinen Kollagen I/III-Membran bezüglich des Attachments und der Proliferation von Keratinozyten des stratum basale hin (Dale et al. 1990). Die Nachweisbarkeit von Zytokeratin 5/6-positiven Keratinozyten der Basalschicht zu allen Untersuchungszeitpunkten belegt die Persistenz der Differenzierungsmerkmale basaler Keratinozyten und weist auf eine basalmembranartige Struktur der Kollagen-Membran-Oberfläche hin (Lavker and Sun 1982). Dies ist insbesondere unter dem Aspekt einer möglichst geringen Narbenbildung von Wichtigkeit, da die Generierung einer Basalmembran in-vitro kritisch ist und die Zerstörung/ das Fehlen der Basalmembran bei Wundheilungsvorgängen zu einer epithelial-mesenchymalen Transition der Keratinozyten mit Umdifferenzierung in Myofibroblasten führt (Kapoun et al. 2006, Smith et al. 2006, Torday and Rehan 2006, Willis et al. 2006, Zweers et al. 2006). Diese sind maßgeblich an der Synthese von kontraktile Narbenkomponenten beteiligt und somit ursächlich für die narbige Schrumpfung (Schultze-Mosgau et al. 2004b, Schultze-Mosgau et al. 2006, Wehrhan et al. 2004a, Wehrhan et al. 2004b).

Unter Berücksichtigung der eigenen experimentellen Resultate und der Berichte anderer Autoren zum Zusammenhang zwischen Mikrostruktur der Kollagenmembran-Oberfläche und Ausbildung des dermal-epidermalen Interface erscheint die porkine Kollagen-I/III-Membran für das bioengineering dermalen Analoga geeignet (Auger et al. 1995, Auger et al. 1998, Bagot et al.

1988, Bell et al. 1991). Die histologische Untersuchung im Rahmen dieser Studie zeigte eine vergleichbare Epitheltopografie am 5. postoperativen Tag zwischen Spalthaut-Epithel und epithelisierter Membran. Die frühzeitige Epithelisierung ist Voraussetzung für eine Vaskularisation, da Keratinozyten VEGF sezernieren und Neoangiogenese mit initiieren (Nissen et al. 1998, Szpaderska et al. 2005, Szpaderska and DiPietro 2003). Der experimentell erfolgreiche Einsatz der Membran bezüglich der Epithelisierung wird durch die Beobachtung einer kongruenten Epithelformation bei Defektdeckung mit Membran im Vergleich zur Spalthaut-Deckung ohne klinisch evidente Unterschiede am 28. postoperativen Tag unterstützt.

Die Vaskularisation der Membran erreichte das Niveau der Spalthaut-bedeckten Defekte am 7. postoperativen Tag. Dies ist von Bedeutung, da früher klinischer Mißerfolg artifizieller, dermalen Substitute häufig in einer insuffizienten Vaskularisation begründet ist (Sahota et al. 2003, Sahota et al. 2004). Im Spalthaut-Transplantat bilden sich Anastomosen zwischen präexistenten Kapillaren im Transplantat und dem Wundbett nach 48-72 h aus, eine klinisch suffiziente Vaskularisation vom nicht kompromittierten Lager aus findet ab dem 7. postoperativen Tag statt (Heiner et al. 1984, Karl et al. 1980, Tilgner et al. 1989). Die TGF $\beta$ R-III-positive Neovaskularisation der Kollagenmembran erreichte ein absolut höheres Niveau als im Spalthaut-transplantat (3. postoperativer Tag), jedoch zeitlich verzögert (7. postoperativer Tag). Während das Spalthaut-Transplantat durch Neoangiogenese und Anastomosierung mit präexistenten Kapillaren vaskulär erschlossen wird, findet in der Kollagen-Membran ausschließlich Neoangiogenese statt. Unter Berücksichtigung der Spezifität von TGF $\beta$ R-III für Neokapillaren zeigen die Resultate der vorliegenden Studie eine dem Spalthauttransplantat entsprechende Vaskularisation am 7. postoperativen Tag und somit eine der Standardbehandlung von Vollhautdefekten vergleichbare, frühzeitige Vaskularisation der Membran (Torsney et al. 2002, Wehrhan et al. 2004a).

Die erhöhte Expression von TGF $\beta$ <sub>1</sub> und geringere Expression von TGF $\beta$ <sub>3</sub> am 14. postoperativen Tag in den Defekten der freien Granulation sind erklärbar mit einer prolongierten Proliferationsphase im Vergleich zur Einheilung des Spalthaut-Transplantates oder der Kollagenmembran. Diese Expressionsprofile sind konsistent zur klinischen Beobachtung vermehrter Narbenbildung und narbiger Schrumpfung nach freier Granulation, da TGF $\beta$ <sub>1</sub> profibrotisch und

TGF $\beta_3$  diesbezüglich antagonistisch wirkt .(Adzick and Lorenz 1994) (Lee et al. 1999) (Wehrhan et al. 2004a,Wehrhan et al. 2004b): Die Dynamik und das Ausmaß des Matrix-remodelling bei der Membranintegration scheinen der Spalthaut-Tranplantat-Einheilung vergleichbar zu sein, wie quantitativ vergleichbare Expressionsraten für TGF $\beta_1$  und TGF $\beta_3$  am 14. postoperativen Tag in beiden Defektmodalitäten belegen. Diese Interpretation lässt sich durch Analyse der Smad 2/3-Expression stützen. Die TGF $\beta_1$ -stimulierte und assoziierte Smad 2/3-Expression war am 14. postoperativen Tag in den Defekten der freien Granulation gegenüber den Membran-/Spalthaut-gedeckten Defekten erhöht. Die Smad 2/3-Expression unterschied sich wenig zwischen Membran- und Spalthaut-gedecktem Defekt. Diese Beobachtung weisen auf einen möglichen, klinisch vergleichbaren Einsatz der Membran wie autologe Spalthauttransplantate bei der Versorgung dermalen Defekte bezüglich der Fibroproliferation und narbigen Schrumpfung hin.

Die Nachweisbarkeit des Membrankollagens bis zum 7. postoperativen Tag im polarisierten Licht ist konsistent zu Erfahrungen anderer Autoren, die ebenfalls eine Persistenz eingebrachten Kollagens von 5-21 Tagen angeben.(Dayan et al. 1989,Junqueira et al. 1979). Experimentell zeigten humane Fibroblasten in artifiziellen Kollagen-I-Matrices die Dichte humaner Dermis am 28. Tag nach Inokkulation (Coulomb and Dubertret 2002,Helary et al. 2005).

## **7. Schlußfolgerung**

Die vorliegende experimentelle Studie zeigt die Einsetzbarkeit der porkinen Kollagen I/III-Membran als Substitut zur Regeneration von Vollhautdefekten. Die Membran weist eine permissive Mikrostruktur der Oberfläche zur frühzeitigen Migration von Keratinozyten unter Erhalt der Differenzierungsmerkmale auf und ermöglicht eine gegenüber der freien Granulation beschleunigte Regeneration funktionalen, dermalen Epithels. Die Neovaskularisation der Kollagenmembran entspricht in ihrer Kinetik der vaskulären Erschließung bei der Standardtherapie, dem autologen Spalthaut-Tranplantat. Die gezeigten Eigenschaften qualifizieren die porkine Kollagen-I/III-Membran neben dem Einsatz als Vollhaut-Substitut als Matrix für tissue-engineering-Projekte, da aufgrund des nachgewiesenen permissiven Microenvironmentes Keratinozyten, mikrovaskuläre, dermale Endothelzellen und Fibroblasten in der Membranmatrix proliferieren und differenzieren.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Adzick NS and Lorenz HP. 1994. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. *Ann Surg.* 220(1):10-18.
2. Auger FA, Lopez Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noel B, Goulet F, Germain L. 1995. Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 31(6):432-439.
3. Auger FA, Rouabhia M, Goulet F, Berthod F, Moulin V, Germain L. 1998. Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Med Biol Eng Comput.* 36(6):801-812.
4. Bagot M, Bertaux B, Heslan M, Coulomb B, Dubertret L. 1988. Reconstructed human epidermis: absence of Langerhans cells and failure to stimulate allogeneic lymphocytes in vitro. *Clin Exp Immunol.* 71(1):138-143.
5. Bell E, Rosenberg M, Kemp P, Gay R, Green GD, Muthukumaran N, Nolte C. 1991. Recipes for reconstituting skin. *J Biomech Eng.* 113(2):113-119.
6. Bhora FY, Dunkin BJ, Batzri S, Aly HM, Bass BL, Sidawy AN, Harmon JW. 1995. Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin. *J Surg Res.* 59(2):236-244.
7. Bohnert A, Hornung J, Mackenzie IC, Fusenig NE. 1986. Epithelial-mesenchymal interactions control basement membrane production and differentiation in cultured and transplanted mouse keratinocytes. *Cell Tissue Res.* 244(2):413-429.
8. Boyce ST. 2001. Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes. *Burns.* 27(5):523-533.
9. Boyce ST, Goretsky MJ, Greenhalgh DG, Kagan RJ, Rieman MT, Warden GD. 1995. Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. *Ann Surg.* 222(6):743-752.
10. Boyce ST and Hansbrough JF. 1988. Biologic attachment, growth, and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes on a graftable collagen and chondroitin-6-sulfate substrate. *Surgery.* 103(4):421-431.
11. Boyce ST, Kagan RJ, Yakuboff KP, Meyer NA, Rieman MT, Greenhalgh DG, Warden GD. 2002. Cultured skin substitutes reduce donor skin harvesting for closure of excised, full-thickness burns. *Ann Surg.* 235(2):269-279.
12. Brown D, Garner W, Young VL. 1990. Skin grafting: dermal components in inhibition of wound contraction. *South Med J.* 83(7):789-795.
13. Burnette WN. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose

and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 112(2):195-203.

14. Cooper ML and Hansbrough JF. 1991. Use of a composite skin graft composed of cultured human keratinocytes and fibroblasts and a collagen-GAG matrix to cover full-thickness wounds on athymic mice. *Surgery.* 109(2):198-207.
15. Cooper ML, Hansbrough JF, Spielvogel RL, Cohen R, Bartel RL, Naughton G. 1991. In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. *Biomaterials.* 12(2):243-248.
16. Coulomb B and Dubertret L. 2002. Skin cell culture and wound healing. *Wound Repair Regen.* 10(2):109-112.
17. Dale BA, Salonen J, Jones AH. 1990. New approaches and concepts in the study of differentiation of oral epithelia. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1(3):167-190.
18. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. 1989. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry.* 93(1):27-29.
19. Dayan D, Waner T, Tal H, Nyska A. 1993. Polarization microscopy of picosirius red-stained collagen from oxodipine-induced hyperplastic gingiva of beagle dogs. *Int J Exp Pathol.* 74(3):225-228.
20. de Vries HJ, Zeegelaar JE, Middelkoop E, Gijsbers G, van MJ, Wildevuur CH, Westerhof W. 1995. Reduced wound contraction and scar formation in punch biopsy wounds. Native collagen dermal substitutes. A clinical study. *Br J Dermatol.* 132(5):690-697.
21. Downing BR, Cornwell K, Toner M, Pins GD. 2005. The influence of microtextured basal lamina analog topography on keratinocyte function and epidermal organization. *J Biomed Mater Res.* 72A(1):47-56.
22. Fajardo LF, Prionas SD, Kwan HH, Kowalski J, Allison AC. 1996. Transforming growth factor beta1 induces angiogenesis in vivo with a threshold pattern. *Lab Invest.* 74(3):600-608.
23. Fleischmajer R, MacDonald ED, Contard P, Perlish JS. 1993. Immunocytochemistry of a keratinocyte-fibroblast co-culture model for reconstruction of human skin. *J Histochem Cytochem.* 41(9):1359-1366.
24. Frank R, Adelman-Grill BC, Herrmann K, Haustein UF, Petri JB, Heckmann M. 1996. Transforming growth factor-beta controls cell-matrix interaction of microvascular dermal endothelial cells by downregulation of integrin expression. *J Invest Dermatol.* 106(1):36-41.
25. Friess W, Uludag H, Foskett S, Biron R, Sargeant C. 1999. Characterization of absorbable collagen sponges as recombinant human bone morphogenetic protein-2 carriers. *Int J Pharm.* 185(1):51-60.
26. Gailit J, Welch MP, Clark RA. 1994. TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol.* 103(2):221-227.

27. Gibbs PJ, Cameron C, Tan LC, Sadek SA, Howell WM. 2003. House keeping genes and gene expression analysis in transplant recipients: a note of caution. *Transpl Immunol.* 12(1):89-97.
28. Gold LI, Sung JJ, Siebert JW, Longaker MT. 1997. Type I (RI) and type II (RII) receptors for transforming growth factor-beta isoforms are expressed subsequent to transforming growth factor-beta ligands during excisional wound repair. *Am J Pathol.* 50(1):209-222.
29. Gustafson CJ and Kratz G. 1999. Cultured autologous keratinocytes on a cell-free dermis in the treatment of full-thickness wounds. *Burns.* 25(4):331-335.
30. Heiner H, Tilgner A, Oswald P, Ermich T. 1984. The effect of inadequate venous or arterial blood supply on the survival of abdominal islands flaps in rats. *Acta Chir Plast.* 26(1):1-10.
31. Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massague J. 1989. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem.* 264(1):380-388.
32. Helary C, Foucault-Bertaud A, Godeau G, Coulomb B, Guille MM. 2005. Fibroblast populated dense collagen matrices: cell migration, cell density and metalloproteinases expression. *Biomaterials.* 26(13):1533-1543.
33. Hoffmann J, Ehrenfeld M, Hwang S, Schwenzler N. 1998. Complications after microsurgical tissue transfer in the head and neck region. *J Craniomaxillofac Surg.* 26(4):255-259.
34. Honig JF, Merten HA, Ficker E. 1997. [Multi-point contact (MPC) osteosynthesis plate. 1: Animal experiment histomorphologic studies in the Gottingen minipig]. *Unfallchirurgie.* 23(6):227-237.
35. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 11(4):447-455.
36. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. 1978. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn.* 41(3):267-274.
37. Kagami S, Border WA, Ruoslahti E, Noble NA. 1993. Coordinated expression of beta 1 integrins and transforming growth factor-beta-induced matrix proteins in glomerulonephritis. *Lab Invest.* 69(1):68-76.
38. Kangesu T, Navsaria HA, Manek S, Shurey CB, Jones CR, Fryer PR, Leigh IM, Green CJ. 1993. A porcine model using skin graft chambers for studies on cultured keratinocytes. *Br J Plast Surg.* 46(5):393-400.
39. Kapoun AM, Gaspar NJ, Wang Y, Damm D, Liu YW, O'young G, Quon D, Lam A, Munson K, Tran TT, Ma JY, Murphy A, Dugar S, Chakravarty S, Protter AA, Wen FQ, Liu X, Rennard SI, Higgins LS. 2006. Transforming growth factor-beta receptor type 1 (TGFbetaRI) kinase activity but not p38 activation is required for TGFbetaRI-induced myofibroblast differentiation and profibrotic gene expression. *Mol Pharmacol.* 70(2):518-531.



40. Karl P, Tilgner A, Heiner H. 1980. Histopathologic findings in a human arterial anastomosis after free flap transfer. *J Microsurg.* 1(5):394-398.
41. Kishi K, Nakajima H, Tajima S. 1999. Differential responses of collagen and glycosaminoglycan syntheses and cell proliferation to exogenous transforming growth factor beta 1 in the developing mouse skin fibroblasts in culture. *Br J Plast Surg.* 52(7):579-582.
42. Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A, Vary CP. 2006. Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem.* 281(35):25110-25123.
43. Lamme EN, de Vries HJ, van Veen H, Gabbiani G, Westerhof W, Middelkoop E. 1996. Extracellular matrix characterization during healing of full-thickness wounds treated with a collagen/elastin dermal substitute shows improved skin regeneration in pigs. *J Histochem Cytochem.* 44(11):1311-1322.
44. Lavker RM and Sun TT. 1982. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science.* 215(4537):1239-1241.
45. Lee TY, Chin GS, Kim WJ, Chau D, Gittes GK, Longaker MT. 1999. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann Plast Surg.* 43(2):179-184.
46. Lin RY, Sullivan KM, Argenta PA, Meuli M, Lorenz HP, Adzick NS. 1995. Exogenous transforming growth factor-beta amplifies its own expression and induces scar formation in a model of human fetal skin repair. *Ann Surg.* 222(2):146-154.
47. Liu F, Poupponnot C, Massague J. 1997. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev.* 11(23):3157-3167.
48. Lloyd RV, Schmidt K, Blaivas L, McCoy JP, Wilson BS. 1985. A rapid immunostaining method utilizing preformed antibody-avidin-biotin-peroxidase complexes. *Am J Clin Pathol.* 83(5):636-639.
49. Lorenz HP and Adzick NS. 1993. Scarless skin wound repair in the fetus. *West J Med.* 159(3):350-355.
50. Mackenzie IC and Hill MW. 1984. Connective tissue influences on patterns of epithelial architecture and keratinization in skin and oral mucosa of the adult mouse. *Cell Tissue Res.* 235(3):551-559.
51. Nissen NN, Poverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. 1998. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol.* 152(6):1445-1452.
52. O'Kane S and Ferguson MW. 1997. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 29(1):63-78.
53. Ophof R, Maltha JC, Von den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM. 2004. Histologic evaluation of skin-derived and collagen-based substrates implanted in palatal wounds. *Wound Repair Regen.* 12(5):528-538.

54. Ophof R, van Rheden RE, Von den HJ, Schalkwijk J, Kuijpers-Jagtman AM. 2002. Oral keratinocytes cultured on dermal matrices form a mucosa-like tissue. *Biomaterials*. 23(17):3741-3748.
55. Pablos JL, Everett ET, Harley R, Le Roy EC, Norris JS. 1995. Transforming growth factor-beta 1 and collagen gene expression during postnatal skin development and fibrosis in the tight-skin mouse. *Lab Invest*. 72(6):670-678.
56. Reed MJ, Vernon RB, Abrass IB, Sage EH. 1994. TGF-beta 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J Cell Physiol*. 158(1):169-179.
57. Rennekampff HO, Kiessig V, Hansbrough JF. 1996. Current concepts in the development of cultured skin replacements. *J Surg Res*. 62(2):288-295.
58. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, . 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(12):4167-4171.
59. Rodemann HP, Binder A, Burger A, Guven N, Loffler H, Bamberg M. 1996. The underlying cellular mechanism of fibrosis. *Kidney Int Suppl*. 54(S32-S36).
60. Sahota PS, Burn JL, Brown NJ, MacNeil S. 2004. Approaches to improve angiogenesis in tissue-engineered skin. *Wound Repair Regen*. 12(6):635-642.
61. Sahota PS, Burn JL, Heaton M, Freedlander E, Suvarna SK, Brown NJ, Mac NS. 2003. Development of a reconstructed human skin model for angiogenesis. *Wound Repair Regen*. 11(4):275-284.
62. Sanders B and McKelvy B. 1976. Split-thickness skin grafts transplanted over exposed maxillary bone in dogs. *J Oral Surg*. 34(6):510-513.
63. Sankar S, Mahooti-Brooks N, Bensen L, McCarthy TL, Centrella M, Madri JA. 1996. Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest*. 97(6):1436-1446.
64. Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, Romanelli M, Stacey MC, Teot L, Vanscheidt W. 2003. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen*. 11 Suppl 1(S1-S28).
65. Schultze-Mosgau S, Blaese MA, Grabenbauer G, Wehrhan F, Kopp J, Amann K, Rodemann HP, Rodel F. 2004a. Smad-3 and Smad-7 expression following anti-transforming growth factor beta 1 (TGFbeta(1))-treatment in irradiated rat tissue. *Radiother Oncol*. 70(3):249-259.
66. Schultze-Mosgau S, Kopp J, Thorwarth M, Rodel F, Melnychenko I, Grabenbauer GG, Amann K, Wehrhan F. 2006. Plasminogen activator inhibitor-I-related regulation of procollagen I (alpha(1) and alpha(2)) by antitransforming growth factor-beta(1) treatment during radiation-impaired wound healing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 64(1):280-288.

67. Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Amann K, Radespiel-Troger M, Rodel F, Grabenbauer GG. 2003a. In Vivo TGF-beta 3 expression during wound healing in irradiated tissue. An experimental study. *Strahlenther Onkol.* 179(6):410-416.
68. Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Grabenbauer G, Amann K, Radespiel-Troger M, Neukam FW, Rodel F. 2002. Transforming growth factor beta1 and beta2 (TGFbeta(1) / TGFbeta(2)) profile changes in previously irradiated free flap beds. *Head Neck.* 24(1):33-41.
69. Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Rodel F, Amann K, Radespiel-Troger M, Grabenbauer GG. 2003b. Transforming growth factor-beta receptor-II up-regulation during wound healing in previously irradiated graft beds in vivo. *Wound Repair Regen.* 11(4):297-305.
70. Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Rodel F, Amann K, Radespiel-Troger M, Kopp J, Grabenbauer G. 2004b. Anti-TGFbeta1 antibody for modulation of expression of endogenous transforming growth factor beta 1 to prevent fibrosis after plastic surgery in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 42(2):112-119.
71. Shah M. 1995. Neutralisation of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 or exogenous addition of TGF- $\beta$ 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci.* 108(985-1002).
72. Shihab FS, Yamamoto T, Nast CC, Cohen AH, Noble NA, Gold LI, Border WA. 1995. Transforming growth factor-beta and matrix protein expression in acute and chronic rejection of human renal allografts. *J Am Soc Nephrol.* 6(2):286-294.
73. Shinozaki M, Kawara S, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takehara K. 1997. Induction of subcutaneous tissue fibrosis in newborn mice by transforming growth factor beta-simultaneous application with basic fibroblast growth factor causes persistent fibrosis corrected and republished in *Biochem Biophys Res Commun.* 240(2):292-7. *Biochem Biophys Res Commun.* 237(2):292-296.
74. Smith PC, Caceres M, Martinez J. 2006. Induction of the myofibroblastic phenotype in human gingival fibroblasts by transforming growth factor-beta1: role of RhoA-ROCK and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways. *J Periodontal Res.* 41(5):418-425.
75. Szpaderska AM and DiPietro LA. 2003. In vitro matrigel angiogenesis model. *Methods Mol Med.* 78(311-315).
76. Szpaderska AM, Walsh CG, Steinberg MJ, DiPietro LA. 2005. Distinct patterns of angiogenesis in oral and skin wounds. *J Dent Res.* 84(4):309-314.
77. Tilgner A, Herrberger U, Schumann D. 1989. Neovascularization of the myocutaneous rectus abdominis island flap in the rat. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe.* 22(5):302-307.
78. Torday J and Rehan VK. 2006. The Evolutionary Continuum from Lung Development to Homeostasis and Repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (elektronische Vorabpublikation in medline).

79. Torsney E, Charlton R, Parums D, Collis M, Arthur HM. 2002. Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm Res*. 51(9):464-470.
80. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(9):4350-4354.
81. Tsai CY, Ueda M, Hata K, Horie K, Hibino Y, Sugimura Y, Toriyama K, Torii S. 1997. Clinical results of cultured epithelial cell grafting in the oral and maxillofacial region. *J Craniomaxillofac Surg*. 25(1):4-8.
82. Wang JF, Olson ME, Reno CR, Kulyk W, Wright JB, Hart DA. 2000. Molecular and cell biology of skin wound healing in a pig model. *Connect Tissue Res*. 41(3):195-211.
83. Wehrhan F, Grabenbauer GG, Rodel F, Amann K, Schultze-Mosgau S. 2004a. Exogenous Modulation of TGF-beta(1) Influences TGF-betaR-III-Associated Vascularization during Wound Healing in Irradiated Tissue. *Strahlenther Onkol*. 180(8):526-533.
84. Wehrhan F, Rodel F, Grabenbauer GG, Amann K, Bruckl W, Schultze-Mosgau S. 2004b. Transforming growth factor beta 1 dependent regulation of Tenascin-C in radiation impaired wound healing. *Radiother Oncol*. 72(3):297-303.
85. Willis BC, duBois RM, Borok Z. 2006. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc*. 3(4):377-382.
86. Wipff J, Kahan A, Hachulla E, Sibilia J, Cabane J, Meyer O, Mouthon L, Guillemin L, Junien C, Boileau C, Allanore Y. 2006. Association between an endoglin gene polymorphism and systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension. *Rheumatology (Oxford)*. (elektronische Vorabpublikation in medline).
87. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. 1994. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int*. 45(3):916-927.
88. Yang EY and Moses HL. 1990. Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol*. 111(2):731-741.
89. Zweers MC, Davidson JM, Pozzi A, Hallinger R, Janz K, Quondamatteo F, Leutgeb B, Krieg T, Eckes B. 2006. Integrin alpha2beta1 Is Required for Regulation of Murine Wound Angiogenesis but Is Dispensable for Reepithelialization. *J Invest Dermatol*. (elektronische Vorabpublikation in medline).

## 9. Anhang

### 9.1. Lebenslauf

Wehrhan, Falk

geboren am 10.09.75 in Jena

- |           |  |
|-----------|--|
| 1982-1990 | Besuch Grundschule Polytechnische Oberschule „Talschule“ in Jena   |
| 1990-1994 | Besuch Carl-Zeiss-Gymnasium (Spezialschulenteil) mit Spezialklassen naturwissenschaftlich-technischer Richtung, Jena   |
| 1994      | Abitur in Jena   |
| 1994-1995 | Grundwehrdienst als Hochgebirgsjäger im Gebirgsjägerbataillon 232 in Bischofswiesen/Strub  |
| 1996-2002 | Studium der Humanmedizin an der Universität Erlangen-Nürnberg, dabei Bearbeitung des humanmedizinischen Dissertationsprojektes in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau/ Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie an der Universität Erlangen-Nürnberg |
| 2002      | Staatsexamen Humanmedizin und Approbation als Arzt   |
| 2002-2005 | wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der Universität Erlangen-Nürnberg  |
| 2003      | Promotion zum Dr. med.   |
| 2002-2006 | Studium der Zahnheilkunde an den Universitäten Erlangen-Nürnberg und Jena  |
| 2005-2006 | wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie/ Plastische Chirurgie der Universität Jena   |
| 2006      | Staatsexamen Zahnheilkunde und Approbation als Zahnarzt  |

Jena, den 20.12.06

## **9.2.Danksagung**

Meinem wissenschaftlichen Lehrer und Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau danke ich für die freundschaftliche Betreuung bei der Bearbeitung des Dissertationsprojektes. In sieben Jahren gemeinsamer Arbeit war er mir bei der Erlernung eines effizienten wissenschaftlichen Arbeitsstiles und der Unterweisung im Umgang mit universitären Forschungsstrukturen ein Lehrer auf dem Weg zur wissenschaftlichen Selbständigkeit.

Frau Prof. Dr. K. Amann danke ich für die langfristige Kooperation und insbesondere für die fachliche Unterstützung bei der Etablierung der Immunhistochemie.

Für die geduldige, technische Unterstützung bei zeitaufwendigen Routinearbeiten im Labor danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen meiner Arbeitsgruppe, Frau A. Kosel, Frau M. Ramming und Frau N. Moll.

Für meine fachliche und intellektuelle Weiterentwicklung, die Einordnung der experimentellen Resultate in übergeordnete klinisch-theoretische Zusammenhänge, anregende Diskussionen und die Konkretisierung der eigenen Einsichten bezüglich Fibroseprogression und Wundheilung danke ich insbesondere Prof. Dr. Dr. P. Hyckel und meinem Onkel, Dr. K. Schilling.

Meinen Eltern, Frau Dr. O. Wehrhan und Herrn Dr. G. Wehrhan, danke ich für die nicht selbstverständliche, finanzielle Absicherung wesentlicher Teile des Studiums der Zahnheilkunde.

### **9.3.Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau (Terversuchsplanung und Operation der Tiere),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 20.12.06