

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine Chirurgie Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. H. D. Becker**

**Untersuchung zur Herstellung und Anwendung  
autologer thrombozytärer Wachstumsfaktoren  
bei chronischen therapierefraktären Wunden**

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

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

**vorgelegt von  
Ralph Michael Weber  
aus  
Ludwigsburg**

**2003**

**Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen**

**1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Sessler**

**2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff**

---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Problem chronischer Wunden</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Kutane Wundheilung</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Die gestörte Wundheilung chronischer Wunden</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Die Rolle der Wachstumsfaktoren in der Wundheilung</b>	<b>6</b>
1.4.1 Platelet-Derived Growth Factor	7
1.4.2 Transforming Growth Factor-beta	8
1.4.3 basic Fibroblast Growth Factor	9
1.4.4 Epidermal Growth Factor	9
<b>1.5 Fragestellung</b>	<b>10</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Patienten</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Studiendurchführung</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Herstellung der autologen thrombozytären         Wachstumsfaktorenlösung</b>	<b>15</b>
2.3.1 Eigenblutspende	15
2.3.2 SORIN-Methode	15
2.3.3 SAA-Methode	16
2.3.4 Thrombozytendegranulation	17
<b>2.4 Bestimmung der <math>\beta</math>-Thromboglobulin- und Wachstums-         Faktorenkonzentrationen</b>	<b>18</b>

<b>2.5 Biopsieentnahme, histologische und immunhistochemische Färbungen</b>	<b>21</b>
2.5.1 Biopsieentnahme	21
2.5.2 Herstellung von Paraffinschnitten	21
2.5.3 Hämalaun-Eosin-Färbung	21
2.5.4 Immunhistochemische CD34- und PCNA-Färbungen	22
<b>2.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen</b>	<b>23</b>
2.6.1 CD34-Auswertung	24
2.6.2 PCNA-Auswertung	25
<b>2.7 Statistische Auswertung</b>	<b>26</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>27</b>
<b>3.1 SORIN und SAA-Methode</b>	<b>27</b>
3.1.1 Komplikationen	27
3.1.2 Thrombozytengehalt	27
<b>3.2 Analyse der Wachstumsfaktorenlösung</b>	<b>30</b>
3.2.1 $\beta$ -Thromboglobulin	30
3.2.2 PDGF-AB	31
3.2.3 TGF- $\beta_1$	32
3.2.4 EGF	32
3.2.5 bFGF	33
<b>3.3 Korrelation der Thrombozytenkonzentration im Vollblut und der Thrombozytenkonzentration vor Degranulation</b>	<b>34</b>
<b>3.4 Korrelation der Thrombozytenkonzentration und der <math>\beta</math>-Thromboglobulinkonzentration</b>	<b>35</b>
<b>3.5 Korrelation der <math>\beta</math>-Thromboglobulinkonzentration und der Wachstumsfaktorkonzentrationen</b>	<b>35</b>
<b>3.6 Histologische und immunhistochemische Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.6.1 Morphologische Unterschiede in der Hämalaun-Eosin-Färbung	38
3.6.2 CD34-positive Gefäße pro mm <sup>2</sup>	39

3.6.3	PCNA-positive Zellen in der Epidermis	40
3.6.4	PCNA-positive Zellen pro mm <sup>2</sup> im Korium und Granulationsgewebe	41
<b>3.7</b>	<b>Wirksamkeit und Verträglichkeit der Wachstumsfaktorenlösung</b>	<b>42</b>
3.7.1	Wirksamkeit in der SORIN-Gruppe	42
3.7.2	Unerwünschte lokale oder systemische Ereignisse in der SORIN-Gruppe	43
3.7.3	Wirksamkeit in der SAA-Gruppe	43
3.7.4	Unerwünschte lokale oder systemische Ereignisse in der SAA-Gruppe	43
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
4.1	Studiendurchführung und Wirksamkeit der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung	48
4.2	Beurteilung der SORIN- und SAA-Methode	55
4.3	Histologische und immunhistochemische Ergebnisse	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>88</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbachol
aFGF	acidic fibroblast growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
CVI	chronisch-venöse Insuffizienz
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
FDA	Federal Drug Administration
FGF	fibroblast growth factor
HEPES	N 2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL-1	Interleukin-1
kD	Kilodalton
PAP	plättchenarmes Plasma
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet-derived growth factor
PNP	Polyneuropathie
PRP	plättchenreiches Plasma
SAA	Standard-Arbeitsanweisung
SD	Standardabweichung
β-TG	beta-Thromboglobulin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
tcpO <sub>2</sub>	transkutaner Sauerstoffpartialdruck
TGF-α	transforming growth factor α
TGF-β	transforming growth factor β
TK	Thrombozytenkonzentrat
TKE	Einzelthrombozytenkonzentrat
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
U/min.	Umdrehungen pro Minute

**1.1 Das Problem chronischer Wunden**

Die Behandlung chronischer Wunden stellt nach wie vor ein großes medizinisches und sozioökonomisches Problem dar. Nach neueren Schätzungen leiden in den USA etwa 6,5 Millionen Menschen an chronischen Wunden, die durch unzureichende Druckentlastung, chronisch-venöse Insuffizienz oder Diabetes mellitus hervorgerufen werden (Singer und Clark, 1999). In Deutschland geht man derzeit von ungefähr 2 Millionen Patienten mit einer chronischen Wunde aus (Debus et al., 2000). Mit der zunehmenden Lebenserwartung wird ein weiterer Anstieg der Häufigkeit von Wundheilungsproblemen in der Zukunft angenommen. Nicht heilende Wunden zählen nach der Gangrän und der Infektion zu den häufigsten Ursachen einer Gliedmaßenamputation (Doucette et al., 1989).

Als chronische Wunde oder Ulkus wird eine Wunde bezeichnet, die trotz ursachenbezogener und konsequenter lokaler Therapie makroskopisch keine Tendenz der Heilung aufweist (Coerper und Köveker, 1993). Nach Wollina (2000) spricht man von einer chronischen Wunde, wenn innerhalb von 3 Monaten kein Wundverschluss erfolgt oder nach 2 Wochen keinerlei Heilungstendenz erkennbar ist.

Das Ulcus cruris als häufigste chronische Wunde (Eaglstein und Falanga, 1997) wird hauptsächlich durch eine chronisch-venöse Insuffizienz, eine arterielle Durchblutungsstörung, einen Diabetes mellitus oder deren Kombinationen hervorgerufen.

Die genaue Diagnose und Behandlung der Wundätiologie sollte bei chronischen Wunden immer an erster Stelle in der Wundbehandlung stehen. So sollte bei jedem Patienten, der eine chronische Wunde hat und an einer CVI leidet, eine

Kompressionstherapie der unteren Extremität durchgeführt werden. Bei Diabetikern sollte eine möglichst optimale Einstellung der Blutglukosewerte angestrebt werden und bei neuropathischen Druckulzera eine Entlastung der betroffenen Wundregion erfolgen. Bei Patienten mit einer pAVK muss die Möglichkeit einer Revaskularisierung geprüft, und falls möglich, konsequent durchgeführt werden.

In den letzten Jahren konnte die Behandlung chronischer Wunden in speziellen, interdisziplinären Wundzentren durch konsequente Behandlung der Wundätiologie und dem Einsatz einer sogenannten „good wound care“ (Wieman et al., 1998) als gemeinsamer Standard verbessert werden. Die „good wound care“ umfasst ein scharfes Debridement, einen täglichen Verbandswechsel mit feuchten Kochsalzkompressen, eine Druckentlastung und eine Infektionsbekämpfung.

Trotz konsequenter Anwendung aller zur Verfügung stehender prophylaktischer und kausalthérapeutischer, konventioneller und plastisch-rekonstruktiver Möglichkeiten in den Wundzentren gibt es immer noch eine beträchtliche Zahl an chronischen Wunden, die nicht zur Abheilung gebracht werden können und die für die betroffenen Patienten einen großen Leidensdruck darstellen.

Aus diesem Grund wurde in Ergänzung der oben genannten Wundbehandlungsstrategien nach neuen Wegen zur direkten Stimulation der gestörten kutanen Wundheilung gesucht. Eine dieser Möglichkeiten fand man in der topischen Applikation von Wachstumsfaktoren zu chronischen Wunden.

Neben dem Einsatz rekombinant hergestellter Wachstumsfaktoren konnte auch mit physiologischen Wachstumsfaktorenlösungen, die aus den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gewonnen wurden, in der Behandlung chronischer Wunden Erfolge erzielt werden und erweiterten die therapeutischen Möglichkeiten.

### 1.2 Kutane Wundheilung

Bei der kutanen Wundheilung muss man 3 Wundformen unterscheiden: Spalthautwunden, bei denen die Epidermis und nur die oberflächlichen Schichten der Dermis verletzt sind. Vollhautwunden, bei denen die Epidermis und die komplette Dermis betroffen sind und verloren gehen und komplexe Wunden, bei denen Sehnen, Bänder oder Knochen mitbetroffen sind (Knighton und Fiegel, 1991). Die verschiedenen Formen der chronischen Beinulzera werden zur Gruppe der Vollhautwunden gezählt (Mustoe et al., 1991). Vollhautwunden heilen in erster Linie durch die Bildung und Organisation eines Granulationsgewebes. Die Wundrandkontraktion spielt nur eine untergeordnete Rolle (Knighton und Fiegel, 1991).

In akuten Vollhautwunden läuft die Wundheilung in einem zeitlich geordneten Prozeß ab, der eine komplexe Abfolge von Wechselwirkungen zwischen Zellen, Zytokinen, Enzymen und extrazellulärer Matrix darstellt (Mast und Schultz, 1996). Dieser Vorgang, der bis heute nicht vollständig geklärt ist, wird hier kurz dargestellt, da er zum Verständnis für das Entstehen und die Persistenz chronischer Wunden wichtig ist.

Die Wundheilung läuft in 3 Phasen ab, die sich zeitlich überlappen (Singer und Clark, 1999) und die alle von Wachstumsfaktoren kontrolliert und reguliert werden (Steed, 1997).

Die Entzündungsphase beginnt mit der Gewebsverletzung und der Schädigung von Blutgefäßen, wodurch die Blutgerinnung, die Aktivierung des Komplementsystems und die Thrombozytenaggregation ausgelöst werden (Flesch et al., 1994). Neben der Aggregation und der Bildung des Thrombus kommt es durch die Freisetzung von Thrombin und ADP zur Degranulation der in den Thrombozyten gespeicherten  $\alpha$ -Granula. Dies wird heute als erster regulierender Schritt der Gewebereparatur angesehen (Mast und Schultz, 1996). Aus den  $\alpha$ -Granula werden neben Histamin, Serotonin,  $\beta$ -Thromboglobulin und Fibronectin auch mehrere Wachstumsfaktoren freigesetzt,

die für die Einleitung der Kaskade, die zur Wundheilung führt, eine wichtige Rolle spielen (Bennett und Schultz, 1993).

Durch diese thrombozytären Wachstumsfaktoren und weitere chemotaktische Faktoren kommt es am 1. Tag nach der Verletzung zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Wunde und etwas später auch von Makrophagen, die die Neutrophilen und Zellreste phagozytieren. Die Makrophagen selbst sezernieren eine große Zahl verschiedener Wachstumsfaktoren und entzündungsfördernder Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1), um die nächste Phase, die Phase der Wundreparatur, einzuleiten (Kingsnorth und Slavin, 1991). In dieser Phase wird die während der Entzündungsphase provisorisch hergestellte extrazelluläre Matrix, die hauptsächlich aus Fibrin, Fibronectin und Glykosaminoglykane besteht, ersetzt. Die Wachstumsfaktoren stimulieren den Einstrom von Fibroblasten, Keratinozyten und Gefäßendothelzellen in die provisorische Matrix, um die Bildung des Granulationsgewebes und die Epithelialisierung einzuleiten. Auch diese Zellen sezernieren wiederum spezielle Wachstumsfaktoren.

Nach Bildung des Granulationsgewebes setzt die dritte Phase der Wundheilung ein, die Umbauphase. In dieser Phase wird ein Gleichgewicht zwischen der Synthese neuer Matrixbestandteile und ihrem Abbau durch Metalloproteinasen hergestellt. Es kommt zu einem Rückgang der Zellularität und der Vaskularisierung, wodurch das endgültige Narbengewebe entsteht.

### **1.3 Die gestörte Wundheilung chronischer Wunden**

Chronische Wunden nehmen an dem Regelkreis normaler kutaner Wundheilung nicht oder nur unvollständig teil (Vogt et al., 1999). Unabhängig von der Ursache, die zu der Wundheilungsstörung geführt hat, konnte bei chronischen Wunden eine Störung oder ein Fehlen zellulärer und molekularer Signale gefunden werden, die den normalen Wundheilungsprozess verhindern. So fanden sich in den Wunden von Patienten mit chronischen Druckulzera weniger Fibroblasten, die zudem nicht aktiviert waren (Pierce et al., 1994). Greenhalgh et al. (1990) und Brown et al. (1997) beobachteten bei diabetischen Mäusen und Ratten, dass im Vergleich zu gesunden Tieren weniger

Granulationsgewebe gebildet wurde und die Zellinfiltration geringer, bzw. verspätet war. Mast und Schultz (1996) und Tarnuzzer et al. (1997) postulierten, dass in chronischen Wunden durch wiederholte Traumata, Ischämien und Infektionen die Spiegel an entzündungsfördernden Zytokinen und Matrixmetalloproteinasen erhöht und die Spiegel an Wachstumsfaktoren herabgesetzt sind. Dies bestätigten die Ergebnisse von Cooper et al. (1994), die herabgesetzte Spiegel für die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- $\beta$ , bFGF und EGF in der Wundflüssigkeit von chronischen Druckulzera im Vergleich zu akuter Wundflüssigkeit fanden. Verglichen mit akuter Mastektomieflüssigkeit fand sich eine 125fach erhöhte Proteasenaktivität in chronischen Wunden (Vogt et al., 2000).

Die Wundflüssigkeit aus chronisch-venösen Ulzera führte im Gegensatz zu Wundflüssigkeit aus akuten Wunden zu keiner DNA-Synthese in Fibroblastenkulturen (Bennett und Schultz, 1993) und war auch nicht in der Lage, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten in vitro zur Proliferation zu stimulieren (Bucalo et al., 1989; Katz et al., 1991).

Pierce et al. (1995) konnten zeigen, dass PDGF in menschlichen Druckulzera vermindert vorhanden ist, und dass die exogene Applikation von PDGF zu diesen Wunden zu einer höheren Synthese von PDGF durch die rekrutierten und aktivierten Wundzellen führt.

Seiler (1996) konnte nachweisen, daß am unmittelbaren Ulkusrand die Auswachsrate von Keratinozyten nur 5-7%, in 5cm Entfernung vom Ulkusrand 50% und in der Kontrollhaut 80% beträgt. Als mögliche Erklärung dieser Beobachtung wurde ein Fehlen bestimmter Wachstumsfaktoren mit ausgeprägter chemotaktischer Wirkung (z. B. TGF- $\beta$ ) diskutiert.

Falanga et al. (1993) stellten die sog. „Trap-Hypothese“ auf, wonach es bei chronisch-venösen Ulzera zu einem Ausströmen von Makromolekülen wie Fibrinogen, Albumin und  $\alpha$ -2-Makroglobulin aus dem Gefäßsystem in die Dermis kommt, welche dann die Wachstumsfaktoren „abfangen“.

### 1.4 Die Rolle der Wachstumsfaktoren in der Wundheilung

Wie sich bei der Beschreibung der kutanen Wundheilung gezeigt hat, werden alle Phasen der Wundheilung entweder direkt oder indirekt durch Wachstumsfaktoren kontrolliert (Steed 1997). In chronischen Wunden ist dieser komplexe Regulationsprozess durch die Wachstumsfaktoren gestört. Bei den Wachstumsfaktoren handelt es sich um eine Untergruppe der Zytokine. Sie besitzen eine Polypeptidstruktur, binden an spezifische Rezeptoren und lösen ihre Wirkung durch Bildung eines spezifischen Wachstumsfaktoren-Rezeptorkomplexes aus. Nach der Fortleitung über eine intrazelluläre Signalkaskade und Initiierung der Zellantwort (Chemotaxis, Zellmotilität, Proliferation, Transformation, Proteinsynthese etc.) findet die Inaktivierung durch eine Endozytose des Faktor-Rezeptorkomplexes statt (Vogt et al., 1998). Man unterscheidet die Wachstumsfaktoren hinsichtlich ihrer Proliferationseigenschaften in Kompetenz- und Progressionsfaktoren (Flesch et al., 1994). Als Kompetenzfaktoren werden die Wachstumsfaktoren bezeichnet, die Zellen aus der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzykluses mobilisieren. Dazu zählen PDGF und EGF. Die Progressionsfaktoren, zu denen z. B. IGF-I gehört, bewirken, dass die kompetente Zelle definitiv in die Phase der DNA-Replikation eintreten. Wachstumsfaktoren können auf verschiedene Weise in der Wunde wirken. Substanzen wie IGF-I werden u. a. im Plasma an Transportproteine gebunden und wirken in endokriner Form. PDGF und TGF- $\beta$  werden von einer Zelle sezerniert und wirken auf andere Zellen (parakrine Wirkung). Als dritte Wirkform gibt es autokrine Wachstumsfaktoren, wie z.B. FGF, welche die eigene Proliferation stimulieren (Coerper und Köveker, 1993).

In den folgenden Abschnitten werden die für die Wundheilung am besten charakterisierten und von uns untersuchten Wachstumsfaktoren und ihre für die Wundheilung wichtigen Wirkungen beschrieben. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Quellen dieser Wachstumsfaktoren.

Die wichtigsten Wachstumsfaktoren und ihre Quellen in der Wundheilung				
	PDGF	TGF- $\beta$	bFGF	EGF
Thrombozyten	X	X	?	X
Makrophagen	X	X	X	X
Fibroblasten	X	X	X	
Keratinocyten	X	X	X	X
Endothelzellen	X		X	

**Tabelle 1:** Die untersuchten Wachstumsfaktoren und ihre Quellen in der Wundheilung (modifiziert nach Lippert, H.: Wundatlas, Barth Verlag in MVH Medizinverlage, Heidelberg 2001)

#### 1.4.1 Platelet Derived Growth Factor

PDGF ist ein Dimer mit einem Molekulargewicht von 30 kD, das sich aus den Peptidketten A und/oder B zusammen setzt. Daraus resultieren die drei Isoformen AA, AB und BB. Er wurde ursprünglich in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gefunden (Ross et al., 1974) und erhielt daher seinen Namen. Er wird aber auch von Endothelzellen, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Keratinocyten produziert (Ansel et al., 1993; Meyer-Ingold und Eichner, 1995). Es gibt zwei spezifische PDGF-Rezeptoren. An den  $\alpha$ -Rezeptor binden alle drei Isoformen, während der  $\beta$ -Rezeptor nur die  $\beta$ -Kette und somit das BB-Homodimer mit hoher Affinität, das AB-Heterodimer mit geringerer Affinität und das AA-Homodimer gar nicht bindet (Lippert, 2001). Den  $\beta$ -Rezeptor findet man minimal, bzw. gar nicht in gesunder Haut (Reuterdaahl et al., 1993; Knaub et al., 1995), er kommt aber in Vollhautwunden vor, jedoch nicht mehr nach der Reepithelialisierung (Meyer-Ingold und Eichner, 1995). Außerdem wurde der  $\beta$ -Rezeptor in chronisch-venösen Ulzera in Fibroblasten und in Zellen unterhalb der Epidermis des Wundrands gefunden (Peus et al., 1995).

In den Thrombozyten sind alle drei Isoformen enthalten. Die häufigste Isoform in humanen Thrombozyten ist AB (60-70%) gefolgt von BB (20-30%) (Hammacher et al., 1988; Hart et al., 1990).

PDGF wirkt vornehmlich auf mesenchymale Zellen. Der Faktor wirkt u.a. chemotaktisch auf Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten und glatte Muskelzellen und ist ein potentes Mitogen für diese Zellen (Ross et al., 1986; Pierce et al., 1991). Dabei hat PDGF-AB im Vergleich zu den beiden anderen Isoformen die höchste Potenz (Siegbahn et al., 1990). Hart et al. (1990) konnten in einer Studie, die die mitogene Aktivität der PDGF-Isoformen untersuchte, für PDGF-AB eine etwa 3-fach höhere Aktivität als für PDGF-BB finden.

### 1.4.2 Transforming Growth Factor beta

Die aktive Form von TGF- $\beta$  ist ein Homodimer mit einem Molekülgewicht von 25 kD, das aus zwei Peptidketten besteht (Vogt, 1999). TGF- $\beta$  kann in vielen Zellen gefunden werden, u. a. in Thrombozyten (Assoian und Sporn, 1986), Makrophagen und Lymphozyten. Der Faktor wird von den Zellen in einer hochmolekularen latenten Form sezerniert (Wakefield et al., 1988), die erst aktiviert werden muss. Diese Aktivierung erfolgt in den Wunden wahrscheinlich durch Proteasen oder durch den dort herrschenden niedrigen pH-Wert (Benett und Schultz, 1993).

Gegenwärtig sind 5 Isoformen (TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ , TGF- $\beta_3$ , TGF- $\beta_4$ , TGF- $\beta_5$ ) bekannt, von denen jedoch nur die ersten 3 beim Menschen vorkommen (Lippert, 2001). TGF- $\beta_1$  ist in vivo am häufigsten und wurde in der höchsten Konzentration in menschlichen Thrombozyten gefunden (Ibelgaufts, 1992).

TGF- $\beta$  wirkt sowohl stimulierend als auch inhibierend auf Zellen, auch in Abhängigkeit vom Zusammenwirken mit anderen Wachstumsfaktoren (Roberts et al., 1985). Er inhibiert die Proliferation von Epithel- oder Endothelzellen (Müller et al., 1987) und stimuliert die Proliferation von Fibroblasten (Soma und Grotendorst, 1989; Cromack et al., 1993). TGF- $\beta$  erhöht ebenso wie PDGF die Kollagensynthese durch Fibroblasten (Sporn et al., 1983) und deren Chemotaxis (Postlewaithe et al., 1987).

Schmid et al. (1993) zeigten, dass in chronischen Druckulzera im Gegensatz zu akuten Wunden kein TGF- $\beta_1$  exprimiert wird.

### 1.4.3 basic Fibroblast Growth Factor

Zur FGF-Familie gehören mindestens neun Mitglieder, von denen FGF-1 (acidicFGF) und FGF-2 (basicFGF) am besten charakterisiert sind (Lippert, 2001). Beide haben ein Molekulargewicht von 15 kD. bFGF hat eine 50-100-fach stärkere Wirkung als aFGF (Ibelgaufits, 1992) und ist auch die weit besser untersuchte Isoform in der Wundheilung.

FGF sind keine humoralen Faktoren, sondern sind in die Basalmembran von FGF-produzierenden Zellen (Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Keratinozyten) eingebettet (Gospodarowicz, 1991), und werden bei Verletzung der Zellen aktiviert (Folkman und Klagsbrun, 1987). Ob bFGF auch in Thrombozyten gespeichert wird, wird derzeit noch diskutiert.

Das in der extrazellulären Matrix vorkommende Heparinsulfat bildet einen Komplex mit FGF und schützt so aFGF und bFGF vor der Inaktivierung (Gospodarowicz et al., 1987).

bFGF spielt eine wichtige Rolle sowohl in der regenerativen als auch neoplastischen Angiogenese (Vogt, 1999). Er stimuliert die Chemotaxis und Proliferation von Endothelzellen (Gospodarowicz, 1991), wirkt aber auch auf Fibroblasten, glatte Muskelzellen und weitere Zellen. Der DNA-, Protein- und Kollagengehalt im Granulationsgewebe wird signifikant erhöht durch den Einfluss von bFGF (Broadley et al., 1989).

### 1.4.4 Epidermal Growth Factor

EGF wurde 1962 als erster Wachstumsfaktor von Cohen entdeckt. Er hat ein Molekulargewicht von 6 kD und bindet an den EGF-Rezeptor, an den auch TGF- $\alpha$  (Lippert, 2001) und weitere Proteine binden. EGF lässt sich in fast allen menschlichen Körperflüssigkeiten nachweisen und ist auch in Thrombozyten gespeichert (Vogt 1999; Oka und Orth, 1983; King et al., 1991).

EGF stimuliert die Proliferation und Migration von epithelialen Zellen (Brown et al., 1986 und 1989), wirkt auf die Angiogenese (Grotendorst et al., 1989) und stimuliert die Kollagensynthese durch Fibroblasten (Laato et al., 1987).

### 1.5 Fragestellung

Thrombozytäre Wachstumsfaktorkombinationen wurden seit 1986 in mehreren Studien zur Stimulation der Wundheilung bei chronischen Hautwunden eingesetzt. In der Mehrzahl der Studien konnte die Wundheilung durch eine Zunahme des Granulationsgewebes und eine Wundverkleinerung durch Epithelialisierung angeregt werden und eine signifikante erhöhte Abheilungsrate erzielt werden. Die bisher in der Tübinger Wundsprechstunde zum Einsatz gekommene autologe thrombozytäre Wachstumsfaktorkombination wird aus 250 ml Patientenblut gewonnen und in einem auswärtigen Labor hergestellt.

Die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommene autologe thrombozytäre Wachstumsfaktorkombination wurde durch zwei unterschiedliche Methoden aus 500 ml Vollblut von 21 Patienten gewonnen und sollte eine kosten- und zeitsparende Alternative zu der oben genannten Wachstumsfaktorkombination darstellen. Beide Methoden sollten auf eine zukünftige klinische Einsatzfähigkeit beurteilt werden und die Wachstumsfaktorkombinationen auf ihren Faktorenhalt untersucht werden. In der anschließenden ambulanten Anwendungsbeobachtung über 28 Tage wurde die Wirksamkeit und Verträglichkeit der autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung in der Behandlung chronischer Hautwunden makroskopisch und mikroskopisch beurteilt.

**2.1 Patienten**

In die Studie wurden insgesamt 21 Patienten im Zeitraum von Februar 1998 bis Oktober 1998 aufgenommen. 19 der 21 Patienten waren Patienten der Wundsprechstunde der Chirurgischen Klinik der Universitätsklinik Tübingen und 2 der 21 Patienten waren Patienten der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen. Die Ein – und Ausschlusskriterien sind in Abb. 1 aufgeführt.

**Einschlusskriterien:**

- Patienten, die älter als 18 Jahre sind
- Patienten beiderlei Geschlechts
- Thrombozytenkonzentration  $\geq 100.000/\mu\text{L}$  im Vollblut
- Das Vorhandensein von mindestens einer chronischen Wunde, die mindestens 8 Wochen alt ist
- Eine im Periwundbereich gemessene transkutane Sauerstoffspannung ( $\text{tcpO}_2$  –Wert) von  $\geq 20\text{mm Hg}$
- Einwilligungsfähigkeit

**Ausschlusskriterien:**

- Kontraindikationen für eine Eigenblutspende nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin
- Schwangerschaft
- klinisch infizierte Wunden
- maligne Erkrankungen
- nachgewiesene Vaskulitis
- nachgewiesene Hepatitis- oder HIV- Infektion
- systemische Kortikosteroidtherapie

**Abb. 1:** Ein- und Ausschlusskriterien

## Material und Methoden

Das Alter der 21 Patienten lag zu Beginn der Anwendung zwischen 49 Jahren und 83 Jahren, mit einem mittleren Alter von 64,1 Jahren.

Bei den Patienten lag mindestens eine chronische Wunde vor, die seit mindestens 8 Wochen bestand und sich bisher unter dem Einsatz der „good wound care“ und anderer Therapieversuche als therapierefraktär erwiesen hatte. Der Zeitpunkt, an dem die chronische Wunde zum ersten Mal aufgetreten war, wurde anamnestisch erfasst. Daraus errechnete sich bis zum ersten Einsatz der Wachstumsfaktorenlösung die sog. Ulkusanamnesedauer.

Diese Ulkusanamnesedauer betrug bei den 21 Patienten zwischen 2 Monaten und 60 Monaten mit einer mittleren Dauer von 15,6 Monaten.

Tabelle 2 zeigt einen Vergleich der wichtigsten Patientendaten zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

<b>Charakterisierung des Patientenguts</b>		
	<b>SORIN-Gruppe (n=10)</b>	<b>SAA-Gruppe (n=11)</b>
<b>Alter (Jahre) *</b>	62,9 +/- 7,8	65,3 +/- 11,0
<b>Männlich (Anzahl)</b>	4	5
<b>Wundätiologie (Anzahl)</b>		
• CVI	6	4
• pAVK	2	0
• Diabetes mellitus	1	4
• Mischätiologie aus ersten 3 Punkten	0	3
• PNP unklarer Genese	1	0
<b>Wundanamnese (Monate) *</b>	16,6 +/- 12,9	14,4 +/- 17,9
<b>Wundlokalisierung (Anzahl)</b>		
• Unterschenkel	7	7
• Zehen	3	1
• plantar		1
• Ferse		2
<b>tcpO<sub>2</sub> (mmHg) *</b>	52,4 +/- 13,4	38,6 +/- 20,0
<b>Thrombozyten im Vollblut (pro ml) *</b>	254100 +/- 104699	267333 +/- 33109

\* Werte als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben

**Tabelle 2:** Vergleich der Patientendaten zwischen beiden Behandlungsgruppen

### 2.2 Studiendurchführung

Bei der durchgeführten Studie handelte es sich um eine klinische Anwendungsstudie, bei der 21 Patienten mit chronischen Wunden mit einer autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung über einen Zeitraum von 28 Tagen behandelt wurden. Die Herstellung der Wachstumsfaktorenkombination erfüllte die Richtlinien des Arzneimittelgesetzes und wurde durch die Regierungsbehörde Tübingen geprüft.

Bei 10 der Patienten wurde die Wachstumsfaktorenlösung mit der unter 2.3.2 beschriebenen sog. SORIN-Methode gewonnen (SORIN-Gruppe), bei den anderen 11 Patienten mit der unter 2.3.3 beschriebenen sog. SAA-Methode (SAA-Gruppe). Bei einem der 11 Patienten aus der SAA-Gruppe wurde nach der 28-tägigen Behandlung mit der Wachstumsfaktorenlösung eine erneute Eigenblutspende und Gewinnung der Wachstumsfaktorenlösung mit der SAA-Methode durchgeführt.

Die Auswahl zu den beiden Verfahren erfolgte zufällig.

Am Tag nach der Eigenblutspende (Tag 1) begann die Behandlung mit der autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung.

Vor dem ersten Auftragen der Wachstumsfaktorenlösung wurde ein chirurgisches Wunddebridement durchgeführt, um Nekrosen und Fibrinbeläge zu entfernen.

Nach dem Wunddebridement wurde die Wunde mit dem Wundscore der Wundsprechstunde der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen (siehe Anlage) beurteilt, der dort in Anlehnung an den Wundscore von Knighton et al. (1986) seit einigen Jahren zum Einsatz kommt. Damit wurde die Ausdehnung der Wunde (Beteiligung der Dermis, Subcutis, Faszie, Muskel, Sehnen/Knochen/Bänder/Gelenke), die Menge und Farbe des Granulationsgewebes, der Epithelialisierungsgrad, das Vorhandensein von Fibrinbelägen oder Nekrosen und das Vorliegen einer Infektion oder einer Umgebungsreaktion beurteilt. Bei den Kontrollbesuchen an den Tagen 7, 14, 21 und 28 wurde jeweils ein neuer Wundscore erhoben und zusätzlich eine kurze

## **Material und Methoden**

---

handschriftliche Beschreibung der Wundverhältnisse angefertigt. Nach Abschluss des Behandlungszeitraumes von 28 Tagen konnte mit Hilfe dieser Daten eine beschreibende Analyse der Wirksamkeit erfolgen.

Neben der Wirksamkeit wurden so auch die unter der Therapie aufgetretenen unerwünschten lokalen oder systemischen Ereignisse erfasst. Unter einem unerwünschten lokalen Ereignis wurden die Ereignisse verstanden, welche die chronische Wunde selbst oder die unmittelbare Umgebung der chronischen Wunde betrafen. Darunter fielen das Auftreten eines Erythems oder eines Ödems, ein vom Patienten geäußertes Brenn- oder Juckreiz und Schmerzempfindungen.

Unter einem systemischen Ereignis wurde eine allergische Reaktion oder die Entwicklung einer Sepsis verstanden.

Während dem Wunddebridement und der Wundbeurteilung wurde eine 2ml-Spritze der Wachstumsfaktorenlösung aufgetaut und anschließend auf die Wunde getropft. Die Wunde wurde danach mit einer sterilen Kompresse, einer Fettgaze und einer erneuten sterilen Kompresse abgedeckt und verbunden. Im 12-stündigen Wechsel erfolgte der Verbandswechsel mit einer mit 0,9%iger NaCl-Lösung befeuchteten sterilen Kompresse anstelle der Wachstumsfaktorenkombination.

Der Patient und seine Angehörigen wurden ausführlich mit der Verbandstechnik vertraut gemacht, so dass sie in der Lage waren, den zweimal täglich anfallenden Verbandswechsel und die Wachstumsfaktorenapplikation selbständig zu Hause durchzuführen.

Am 1. Behandlungstag (nach erfolgtem Debridement und vor der ersten Applikation der Wachstumsfaktorenlösung) und nach 14-tägiger Behandlung mit der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung wurden den Patienten Wundrandbiopsien, am 1. Behandlungstag zusätzlich eine Oberschenkelbiopsie entnommen. Diese Biopsieentnahme wurde nur nach vorheriger Einwilligungserklärung des Patienten durchgeführt.

## **2.3 Herstellung der autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung**

### **2.3.1 Eigenblutspende**

Die autologe thrombozytäre Wachstumsfaktorenlösung wurde aus dem Vollblut einer 500ml Eigenblutspende gewonnen.

Nach Vorliegen der Einschlusskriterien zu einer Behandlung mit der autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung wurde bei den Patienten die Möglichkeit einer Eigenblutspende nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin geprüft. Nach Überprüfung der Spendefähigkeit und nach Unterschreiben einer Einverständniserklärung für die Eigenblutspende wurde der Patient in die Abteilung für Transfusionsmedizin mit Blutbank der Klinik für Anästhesiologie und Transfusionsmedizin der Universität Tübingen überwiesen. Dort wurde dem Patienten eine Vollblutspende von 500ml und eine Blutprobe (EDTA-Monovette) zur Bestimmung der Thrombozytenzahl aus dem Vollblut entnommen. Die Vollblutspende wurde in einem Vollblutbeutel aufbewahrt, der 70ml einer CPD-Antikoagulan-Lösung enthielt. Der Vollblutbeutel war Teil eines 4-fach Beutelsystems zur weiteren Verarbeitung der Vollblutspende.

Anschließend wurde der steril verschlossene Vollblutbeutel mit einer der beiden unter 2.3.2 und 2.3.3 beschriebenen Methoden sofort weiterverarbeitet.

### **2.3.2 SORIN-Methode**

Der Vollblutbeutel wurde an ein mobiles, vollautomatisches Blutkomponenten-Separationssystem (Zellseparator) der Baureihe Compact-A der Fa. Dideco/Sorin Biomedica (Puchheim) durch „sterile docking“ angeschlossen. Ein neu entwickeltes, geschlossenes 2-fach Beutelsystem (Az. Deutsches Patentamt 197 33 899.2) wurde im Vorfeld mit einer 55ml-Plasmasequestrierglocke (Fa. Dideco/Sorin Biomedica, Puchheim) steril verbunden und verpackt. Am Tag der Eigenblutspende wurde diese Vorrichtung

aus 2-fach Beutelsystem und Plasmasequestrierglocke durch „sterile docking“ ebenfalls an das Blutkomponenten-Separationssystem angeschlossen.

Das Vollblut wurde bei Raumtemperatur bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 5600U/min zentrifugiert, bis die vom Buffy-Coat und Plasma separierte Erythrozytenschicht einen Infrarotsender passiert hatte. Dadurch wurde die Zentrifugationsgeschwindigkeit auf 2400U/min zur weiteren Plasmaseparation gesenkt. Bei einer Zentrifugationszeit von 10 Minuten wurde das Plasma in ein plättchenreiches und plättchenarmes Plasma aufgespalten. Das plättchenreiche Plasma wurde in einen Beutel des 2-fach Beutelsystems gepumpt, das Erythrozytenkonzentrat und das plättchenarme Plasma in den anderen Beutel.

### **2.3.3 SAA-Methode**

Die SAA-Methode entspricht der Standard-Arbeitsanweisung (SAA) für die Verarbeitung von Vollblutspenden und für die Herstellung von Einzel-Thrombozytenkonzentraten der Abteilung für Transfusionsmedizin mit Blutbank der Universität Tübingen.

Das 4-fach Beutelsystem mit dem Vollblutbeutel wurde in einer Großzentrifuge (Heraeus Cryofuge, Fa. Hereaus, Hanau) bei 3800U/min für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde aus dem Vollblutbeutel in einer Opti-Press II (Fa. Baxter, München-Unterschleißheim) mit einem speziellen Programm (Geräteprogramm 1-4) der Buffy-Coat abgepresst und in den TKE-Beutel überführt.

Aus dem Buffy-Coat wurde nach einer Lagerungszeit von mindestens 2 Stunden nach der Standard-Arbeitsanweisung für die Herstellung von Einzel-Thrombozytenkonzentraten der Abteilung für Transfusionsmedizin mit Blutbank der Universität Tübingen ein Thrombozytenkonzentrat hergestellt. Der TKE-Beutel wurde bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 1040U/min für 6 Minuten zentrifugiert und im Anschluss in der Opti-Press II mit einem weiteren speziellen Programm (Geräteprogramm 2-4) abgepresst. Der Abpressvorgang

endete automatisch, sobald die Erythrozytengrenzschicht einen Hämoglobin-Detektor erreichte.

Anschließend wurde der TKE-Beutel für 24 Stunden auf einer Schaukel gelagert, um eine Resuspension der Thrombozyten zu erreichen.

### 2.3.4 Thrombozytendegranulation

Alle im folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter laminar-airflow-Bedingungen einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Das Ende eines Infusionsbesteckes (Infasid-P Plus, Fa. Asid Bonz, Böblingen) wurde an den Beutel, der das PRP oder das TK enthielt, angeschweißt. Dieses Ende ist mit einem Lueranschluss ausgestattet. An diesen Anschluss wurde ein Discifix Dreiwegehahn (Fa. B. Braun, Melsungen) angeschlossen, über den 10ml einer Thrombin-Calcium-Lösung zugeführt wurden (Thrombin-JMI, 1,000 U.S. Units, Fa. Gentrac, Inc., Middleton, Wisconsin, USA / 10ml Calcium 8,4%, Fa. Braun, Melsungen). Durch diese Thrombin-Calcium-Lösung kommt es zur Degranulation der  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten und damit zur Freisetzung der thrombozytären Wachstumsfaktoren. Vor der Zugabe der Thrombin-Calcium-Lösung wurde aus dem plättchenreichen Plasma oder Thrombozytenkonzentrat eine Probe von 2ml entnommen und daraus die Thrombozytenzahl vor der Degranulation bestimmt.

Nach 10 Minuten wurde die Wachstumsfaktorenlösung über den Dreiwegehahn in 2ml-Einmalspritzen (Fa. Braun, Melsungen) mit Lueranschluß abgefüllt. Die 2ml-Einmalspritzen wurden mit sterilen Combi-Stoppfern (Fa. Braun, Melsungen) verschlossen und mit Etiketten beklebt, die die Spritzen als autologes Blutpräparat kennzeichnen, das nur zur äußerlichen Anwendung auf Wunden nach Anweisung des Arztes zu verwenden sei. Außerdem wurde auf den Etiketten der Name des Patienten, sein Geburtsdatum und die Haltbarkeit der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung vermerkt. Jede 2ml-Spritze wurde einzeln in Folie eingeschweißt und dann in Einheiten zu je 10 Stück

abgepackt. Bis zur ersten Anwendung und zur Bestimmung der Wachstumsfaktorkonzentrationen wurden die Spritzen bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Den Patienten wurden die für die häusliche Anwendung vorgesehenen abgepackten Spritzen in einer Kühlbox mit nach Hause gegeben und sollten dort im Gefrierfach gelagert werden. Täglich sollte eine Spritze unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut werden.

### 2.4 Bestimmung der $\beta$ -Thromboglobulin- und Wachstumsfaktorkonzentrationen

Die Bestimmung der jeweiligen Antigenkonzentrationen erfolgte mit heterogenen, nicht-kompetitiven enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Ein nicht-kompetitiver ELISA wird aufgrund seines Reaktionsaufbaus auch als Sandwich-Test bezeichnet. Bei einem solchen Test liegen gegen das zu bestimmende Antigen gerichtete spezifische Antikörper vor, die an eine Trägersubstanz auf einer Mikrotitrationsplatte gebunden sind. Nach Zugabe der Probe, die das entsprechende Antigen enthält, kommt es nach einer Inkubationszeit zu einer quantitativen Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. In dem nachfolgenden Schritt lagern sich Enzym-markierte Antikörper an die gebildeten Immunkomplexe an. Durch Zugabe eines chromogenen Substrates, welches durch die Enzym-markierten Antikörper umgesetzt wird, kommt es zu einem Farbumschlag, der photometrisch bestimmt werden kann und durch einen Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität der Menge an gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexen entspricht. Als heterogen wird ein ELISA bezeichnet, wenn vor jedem Arbeitsschritt die Entfernung freier Bindungen durch intensive Waschvorgänge durchgeführt werden muss.

Die Bestimmungen der Konzentrationen von PDGF-AB, TGF- $\beta_1$ , EGF und basicFGF aus der Wachstumsfaktorkombination wurden mit den Quantikine™ ELISA-Testkits der Firma R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

durchgeführt. Die Bestimmung von  $\beta$ -Thromboglobulin erfolgte mit dem Asserachrom  $\beta$ -TG-ELISA der Firma Diagnostica Stago, Asnières-sur Seine, Frankreich.

Für die photometrische Auswertung wurde der ELISA-Reader Milenia der Firma Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA und als Software das Programm SOFTmax eingesetzt.

Nachfolgend wird die Durchführung des PDGF-AB-ELISA stellvertretend für die anderen ELISA beschrieben. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die verwendeten Verdünnungen und die Anzahl der Bestimmungen bei den einzelnen ELISA.

Die Standardreihe bestand aus 7 Verdünnungen mit Calibrator Diluent RD5 und beinhaltete als niedrigste Konzentration einen Wert von 31,2pg/ml und als höchste Konzentration einen Wert von 2000pg/ml. Die mit Calibrator Diluent RD5 verdünnten Proben und Standards (200 $\mu$ l/well) wurden in die Platte pipettiert und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein 3-maliger Waschvorgang mit der Waschlösung (200  $\mu$ l/well) und die Zugabe von 200 $\mu$ l des Sandwich-Antikörpers (polyklonaler Antikörper gegen PDGF-AB mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert), der für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem 3-maligem Waschen wurden 200 $\mu$ l der chromogenen Substratlösung hinzugegeben und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 50 $\mu$ l einer Stopplösung kam es zu einem Farbumschlag, dessen Extinktion innerhalb von 30min im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen wurde. Um optische Unregelmäßigkeiten der Mikrotitrationsplatte auszugleichen, wurde eine Wellenlängenkorrektur bei 540nm durchgeführt. Bei dem  $\beta$ -TG-ELISA wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 492nm gemessen.

Aus den Doppelbestimmungen der Standardkonzentrationen wurde eine Eichkurve erstellt. Auf die Ordinate wurde die Extinktion, auf die Abszisse die

## Material und Methoden

---

Konzentration in pg/ml aufgetragen. Im linearen Meßbereich führte eine Zunahme der Konzentration zu einem proportionalen Anstieg der Extinktion. Damit ist die Steigung der Eichkurve in diesem Messbereich konstant, und nur Extinktionswerte, die in diesem Bereich liegen wurden zur Konzentrationsberechnung der Probe herangezogen. Dadurch mussten bei den verschiedenen ELISA unterschiedlich viele Verdünnungen eingesetzt werden.

Eine Besonderheit gab es bei dem TGF- $\beta_1$ -ELISA. Vor der Messung musste das in den Proben latent vorliegende TGF- $\beta_1$  in immunoreaktives TGF- $\beta_1$ , das von dem ELISA-Test erfasst werden kann, aktiviert werden. Dazu wurden 0,1ml der Probe mit 0,1ml einer 2,5normalen Eisessig-/10molaren Harnstofflösung für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe mit 0,1ml einer 2,7normalen NaOH-/1molaren HEPES-Lösung neutralisiert.

ELISA	Verdünnungen	Anzahl der Bestimmungen
PDGF-AB	1:25 1:50 1:100 1:500	Doppelbestimmungen
TGF- $\beta_1$	1:27,5 1:275	Doppelbestimmungen
EGF	Unverdünnt 1:10	Doppelbestimmungen
bFGF	Unverdünnt	Dreifachbestimmungen
$\beta$ -Thromboglobulin	1:1000 1:1500 1:3000 1:4000	Einfachbestimmungen

**Tabelle 3:** Anzahl der Bestimmung und Verdünnungsstufen bei den ELISA

## **2.5 Biopsieentnahme, histologische und immunhistochemische Färbungen**

### **2.5.1 Biopsieentnahme**

Nach der Injektion eines Lokalanästhetikums wurde unmittelbar vor Beginn der Wachstumsfaktorenbehandlung am Oberschenkel des behandelten Beines und am Wundrand eine Punchbiopsie entnommen (Stanzendurchmesser 4mm). Nach 14-tägiger Behandlung mit der Wachstumsfaktorenkombination wurde erneut am Wundrand eine Punchbiopsie entnommen. Nach der Entnahme wurden die Biopsien in 4%igem Paraformaldehyd (pH 7,2) für 24h fixiert.

Bei 2 Patienten der SAA-Gruppe wurden keine Biopsien entnommen, da sie die Entnahme ablehnten. Bei weiteren 2 Patienten in dieser Gruppe und 2 Patienten der SORIN-Gruppe wurden am 14. Behandlungstag keine Wundrandbiopsien entnommen, da auch sie eine erneute Biopsieentnahme ablehnten.

### **2.5.2 Herstellung von Paraffinschnitten**

Die fixierten Biopsien wurden 30min unter fließendem Wasser gespült und anschließend in den Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat (Modell Jung TP 1050, Fa. Leica, Bensheim) gelegt, wo sie vollautomatisch mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert wurden und mit Paraffin (Paraplast, Fa. Roth, Karlsruhe) infiltriert werden.

Mit einem Mikrotom (RM 2035 Biocut, Fa. Leica, Bensheim) wurden von den Biopsien 1µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezo- gen. Die Objektträger wurden vorher zur besseren Anhaftung mit Aptex<sup>®</sup> (Fa. Merck, Darmstadt) beschichtet.

### **2.5.3 Hämalaun-Eosin-Färbung**

Zur Beurteilung morphologischer Veränderungen wurde eine Standardfärbung mit Hämalaun-Eosin (HE-Färbung) durchgeführt. Nach der Entparaffinierung in

Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte zur Kernfärbung 10min in einer 1:5 verdünnten Hämalaunlösung nach Mayer (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt. Anschließend wurden sie 10min unter fließendem Leitungswasser gespült und 30sek in 1%iger wässriger Eosinlösung (Fa. Merck, Darmstadt) gegengefärbt. Nach einem kurzen Waschvorgang in aqua dest. werden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, einige Minuten in Xylol belassen und mit Roti-Histokitt (Fa. Roth, Karlsruhe) eingebettet.

### **2.5.4 Immunhistochemische CD34- und PCNA-Färbungen**

Für die Darstellung der Zellproliferation und den Nachweis von Blutgefäßen wurden die Oberschenkel- und Wundrandbiopsien mit den beiden Antikörpern PCNA und CD34 angefärbt. Nach Inkubation mit diesen spezifischen Antikörpern (Primärantikörper) wird ein mit Biotin konjugierter zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) zugegeben, der an den Primärantikörper bindet (Sekundärkomplex). Der mit Peroxidase konjugierte StreptAvidin-Biotin-Komplex bindet durch die hohe Affinität des StreptAvidins zu Biotin an die Biotinmoleküle des Sekundärkomplexes. Als Substrat für die Peroxidase dient ein AEC-Komplex. Durch die Reaktion der Peroxidase mit dem AEC-Komplex entsteht ein braun-rötliches Farbprodukt.

Die Paraffinschnitte wurden durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und kurz in aqua dest. gespült. Anschließend wurden sie in Citratpuffer (pH 6,0) gelegt und 20min in der Mikrowelle bei 650 Watt erhitzt, um die durch die Formaldehydfixierung maskierten Gewebsantigene wieder freizulegen. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Schnitte 5min in TBS-Puffer (pH 7,6) gewaschen.

Vor der Zugabe des Primärantikörpers wurden die Präparate 20min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer mit normalem Kaninchenserum (Fa. Dako Diagnostika, Hamburg, 1:5 verdünnt mit PBS-Puffer) inkubiert, um unspezifische Bindungen im Gewebe zu verhindern. Nun erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer mit dem jeweils spezifischen

Primärantikörper (PCNA-AB-1, monoklonales Mäuse-IgG, 1:75 mit TBS-Puffer verdünnt, Fa. Oncogene Science, Boston, MA, USA und CD34, monoklonaler Mäuse-IgG, 1:50 mit TBS-Puffer verdünnt, Fa. Sigma, Taufkirchen).

Am nächsten Tag wurden die Schnitte, wie auch nach jedem der folgenden Schritte, jeweils 15min mit TBS-Puffer gespült. Es folgt die Zugabe des Sekundärantikörpers für 30min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer (Anti-Maus-IgG, Fa. Dako Diagnostika, Hamburg, 1:1 mit humanem Normalserum der Fa. Dako Diagnostika, Hamburg versetzt und anschließend 1:400 mit 5%igem BSA/TBS-Puffer verdünnt). Anschließend wurde ein Methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gemisch im Verhältnis 125ml:3ml für 25min zugegeben, um die endogene Peroxidase zu blockieren.

Danach wurde der StreptAvidin-Komplex (Fa. Dako Diagnostika, Hamburg) aufpipettiert und für 30min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer belassen. Nach einer Inkubationszeit von 15min in der AEC-Komplex-Lösung (Fa. Sigma, Taufkirchen) und das Abstoppen der Reaktion in Leitungswasser.

Die Gegenfärbung erfolgte durch Eintauchen in Mayers Hämalaun für 10sek. Abschließend wurden die Schnitte in Glycerin-Gelatine eingebettet.

### **2.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen**

Für die Detektion der PCNA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> und der Gefäßdichte pro mm<sup>2</sup> unterhalb der Epidermis bzw. im Granulationsgewebe wurde das digitale Bildanalysesystem Quantimet 600S (Fa. Leica, Bensheim) eingesetzt. Es besteht aus einem Leitz-Mikroskop DM RBE, einer Sony-3CCD-Farbvideokamera und einem PC mit der Bildverarbeitungssoftware QUIPS-Routines (Quantimet Interactive Programming System) der Fa. Leica, Bensheim. Dieses System ermöglicht, immunhistochemische Präparate teilweise oder vollständig automatisiert zu quantifizieren. Das analoge Farbbild wird über die Videokamera aufgenommen, in ein elektrisches Bild umgewandelt und dann von einem Digitalkonverter in Grauwerten digitalisiert. Anhand der unterschiedlichen Grauwerte wird die immunhistochemische Färbung von der Bildverarbeitungssoftware erfasst.

Die PCNA-positiven Zellen in der Epidermis wurden bei einer 200-fachen Vergrößerung unter einem Axiophot-Mikroskop (Fa. Zeiss, Frankfurt) ohne Bildanalysesystem ausgewertet.

### **2.6.1 CD34-Auswertung**

Die CD34-gefärbten Präparate wurden mit einem für diese Auswertung geschriebenen QUIPS-Programm analysiert. Die Auswertung erfolgte bei einer 600-fachen Vergrößerung.

Pro Schnitt wurden die 6 Felder mit der größten Anzahl an CD34-positiven Gefäßen vom Untersucher ausgewählt.

In einem ersten Schritt wurden die CD34-positiven Gefäßwände mit Hilfe der Maus auf dem PC-Bildschirm umfahren. Dabei wurde jedes CD34-angefärbte Lumen und jede positive CD34-Zelle ohne Lumen als einzelnes Gefäß gewertet.

Im zweiten Schritt wurde der Anteil des Feldes umfahren, der Korium bzw. Granulationsgewebe entsprach. Aus den Daten der 6 Felder errechnete das Programm die Zahl an gezählten CD34-positiven Gefäßen, die Fläche an Korium bzw. Granulationsgewebe in den 6 ausgezählten Feldern und daraus die Anzahl CD34-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup>.

In die Auswertung konnten nur 17 (9 aus der SORIN-Gruppe und 8 aus der SAA-Gruppe) der insgesamt 19 Wundbiopsien, die am 1. Behandlungstag entnommen worden waren, übernommen werden, da bei 2 Biopsien nur die Epidermis und Hornschicht vorhanden war. Bei den Wundrandbiopsien, die am 14. Behandlungstag entnommen worden waren, konnten nur 11 (5 aus der SORIN-Gruppe und 6 aus der SAA-Gruppe) der insgesamt 14 Biopsien ausgewertet werden. Bei den Oberschenkelbiopsien gingen 14 (6 aus der SORIN-Gruppe und 8 aus der SAA-Gruppe) von insgesamt 19 Biopsien in die Auswertung ein, da das Gewebe bei 5 Biopsien nach dem Kochen in der Mikrowelle so aufgelockert gewesen war, dass die immunhistochemische Färbung nicht mehr das Antigen detektieren konnte.

### 2.6.2 PCNA-Auswertung

Wiederum wurde ein für diese Auswertung programmiertes QUIPS-Programm eingesetzt. Die Auswertung erfolgte bei 600-facher Vergrößerung.

Bei der PCNA-Auswertung wurde in jeder Biopsie vom Untersucher ein Referenzfeld ausgewählt, mit dessen Hilfe ein Schwellenwert für die Erfassung der braun-rötlich gefärbten PCNA-positiven Zellkerne gesetzt wurde. Anschließend wurden vom Untersucher die 3 Felder im Korium bzw. im Granulationsgewebe ausgewählt, welche die meisten PCNA-positiven Zellen enthielten. In diesen 3 Feldern wurden die PCNA-positiven Zellen, deren Farbintensität über dem Schwellenwert lag, vom Programm automatisch detektiert. Um zu vermeiden, dass Zellen, deren Zellkerne inhomogen gefärbt waren, mehrfach gezählt wurden, wurde die Detektion manuell vom Untersucher nachbearbeitet. Im letzten Schritt wurde wiederum der Anteil des Feldes umfahren, der dem Korium bzw. Granulationsgewebe entsprach.

In den 3 Feldern wurde die Anzahl PCNA-positiver Zellen, die Fläche an Korium bzw. Granulationsgewebe und daraus die Anzahl PCNA-positiver Zellen pro  $\text{mm}^2$  berechnet.

Bei der inhomogenen PCNA-Färbung und aufgrund der bei der Auswertung der CD34-Färbung genannten Gründe konnten nur 11 (5 aus der SORIN-Gruppe und 6 aus der SAA-Gruppe) der insgesamt 19 Wundbiopsien, die am 1. Behandlungstag entnommen worden waren, in die Auswertung genommen werden. Ebenso konnten nur 10 (jeweils 5 aus der SORIN- und SAA-Gruppe) der insgesamt 14 Wundbiopsien, die am 14. Behandlungstag entnommen worden waren, und 17 (7 aus der SORIN-Gruppe und 10 aus der SAA-Gruppe) der insgesamt 19 Oberschenkelbiopsien ausgewertet werden.

### 2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Wachstumsfaktorenanalyse beider Gruppen erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaStat (Version 2.0, Fa. SPSS Science, Chicago, Il., USA). Der Vergleich der Thrombozyten-,  $\beta$ -TG-, PDGF-AB- und TGF- $\beta$ 1-Konzentration zwischen der SORIN- und SAA-Gruppe wurde mit einem unpaaren t-test durchgeführt. Der Vergleich der EGF-Konzentration beider Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test, da keine Normalverteilung vorlag.

Die Korrelationsanalyse wurde ebenfalls mit Hilfe des Programms SigmaStat durchgeführt. Der Test auf positive Korrelation erfolgte durch die Berechnung der linearen Regression. Als Ergebnis wird der Korrelationskoeffizient  $R^2$  angegeben.

Bei den Ergebnissen der CD34- und PCNA-Färbung wurde keine statistische Auswertung durchgeführt, da die Fallzahl zu gering war und eine sehr große Streuung der Werte vorlag. Deshalb wurde in beiden Gruppen nur der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

**3.1 SORIN- und SAA-Methode****3.1.1 Komplikationen**

Bei der SAA-Methode zur Gewinnung des Thrombozytenkonzentrates traten keine technischen Probleme auf. Bei einer Patientin in dieser Gruppe war die Eigenblutspende nur bis zu einem Volumen von 230ml anstelle der vorgesehenen 500ml möglich, da während der Eigenblutspende Kreislaufprobleme auftraten.

Bei dem Einsatz des Zellseparators zur Gewinnung des plättchenreichen Plasmas (SORIN-Methode) traten in 5 von 10 Anwendungsfällen technische Probleme auf. In 3 Fällen war das sog. „Spülblutvolumen“ nicht ausreichend, um das gesamte plättchenreiche Plasma nach der Zentrifugation in den vorgesehenen Auffangbeutel zu pumpen. Daraus resultierte ein geringeres Volumen an plättchenreichem Plasma. In 2 Fällen kam es während des Zentrifugationsvorganges zu einem Austritt von geringen Mengen an Patientenblut aus der Plasmasequestrierglocke. Da die Plasmasequestrierglocke von einer Schutzglocke eingeschlossen ist, bestand keine Gefahr, mit dem Patientenblut in Kontakt zu kommen. Die mikrobiologische Untersuchung des ausgetretenen Blutes ergab keinen Hinweis auf eine bakterielle Kontamination des Patientenblutes.

**3.1.2 Thrombozytengehalt**

Die Thrombozytenkonzentration im Thrombozytenkonzentrat lag in der SAA-Gruppe mit 1021.900 Thrombozyten/ $\mu$ l deutlich über der Thrombozytenkonzentration im Vollblut (267.333 Thrombozyten/ $\mu$ l).

## Ergebnisse

---

In der SORIN-Gruppe fand sich nur ein minimaler Anstieg der Thrombozytenkonzentration im plättchenreichen Plasma (258.356 Thrombozyten/ $\mu$ l) im Vergleich zum Vollblut (254.100 Thrombozyten/ $\mu$ l). Bei 5 der 10 Patienten in der SORIN-Gruppe lagen die Thrombozytenkonzentrationen im plättchenreichen Plasma nach der Verarbeitung sogar unter den Thrombozytenkonzentrationen im Vollblut.

Während sich die Thrombozytenkonzentration im Vollblut zwischen beiden Gruppen nicht unterschieden ( $p=0,716$ ), gab es bei der Thrombozytenkonzentration im plättchenreichen Plasma der SORIN-Gruppe und der Thrombozytenkonzentration im Thrombozytenkonzentrat der SAA-Gruppe einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p<0,001$ ).

Die Thrombozytenkonzentration im Vollblut sind in Tabelle 4 statistisch ausgewertet und werden in Abb. 2 graphisch dargestellt. Die Thrombozytenkonzentrationen im plättchenreichen Plasma (PRP) und im Thrombozytenkonzentrat (TK) sind in Tabelle 5 statistisch ausgewertet und werden in Abb. 3 graphisch dargestellt.

	<b>SORIN-Gruppe</b>	<b>SAA-Gruppe</b>
<b>Mittelwert in /<math>\mu</math>l</b>	254100	267333
<b>Standardabweichung</b>	104699	33109
<b>Anzahl n</b>	10	12
<b>p</b>	0,716	

**Tabelle 4:** Thrombozytenkonzentration im Vollblut  
und statistische Auswertung

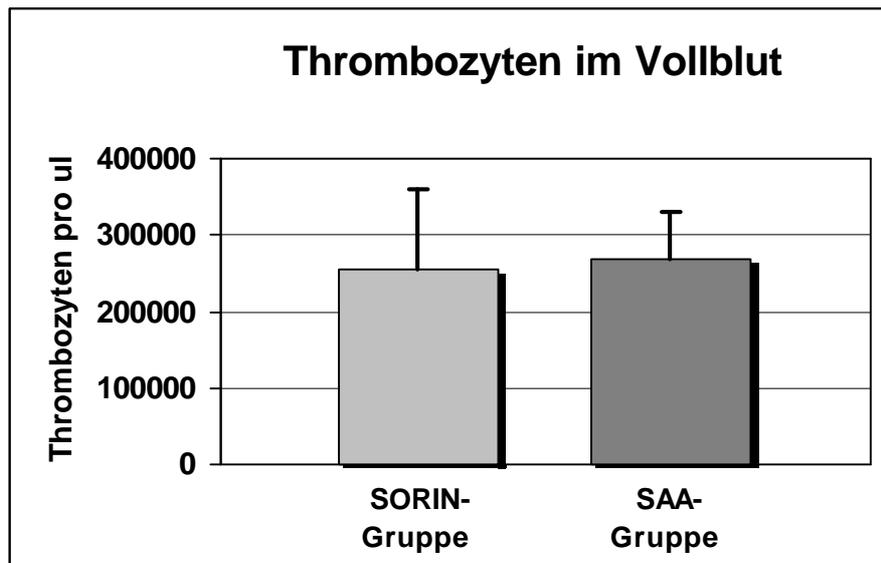


Abb. 2: Vergleich der Thrombozytenkonzentration im Vollblut

	SORIN-Gruppe	SAA-Gruppe
<b>Mittelwert in /µl</b>	258356	102190
<b>Standardabweichung</b>	177734	345956
<b>Anzahl n</b>	9	10
<b>p</b>	<0,001	

Tabelle 5: Thrombozytenkonzentration im PRP und TK und statistische Auswertung

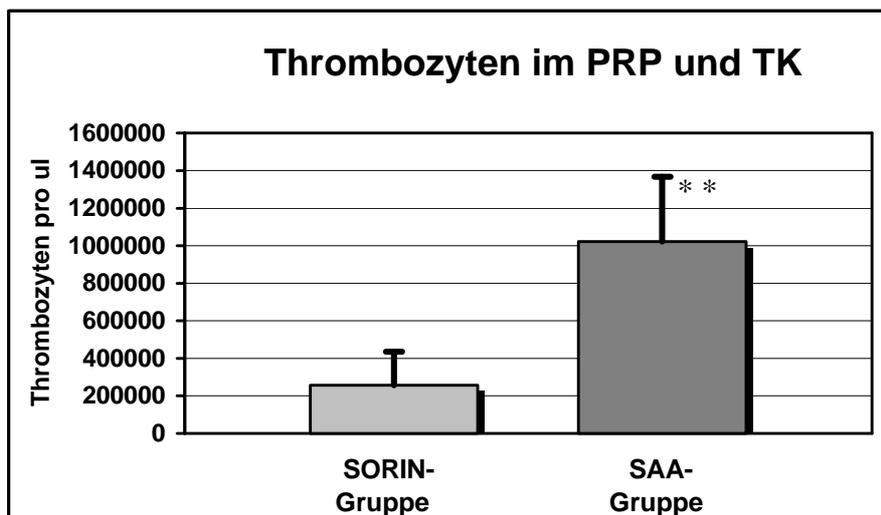


Abb. 3: Vergleich der Thrombozytenkonzentration im plättchenreichen Plasma (SORIN-Gruppe) und im Thrombozytenkonzentrat (SAA-Gruppe)

\*\* signifikant bei  $p < 0,001$

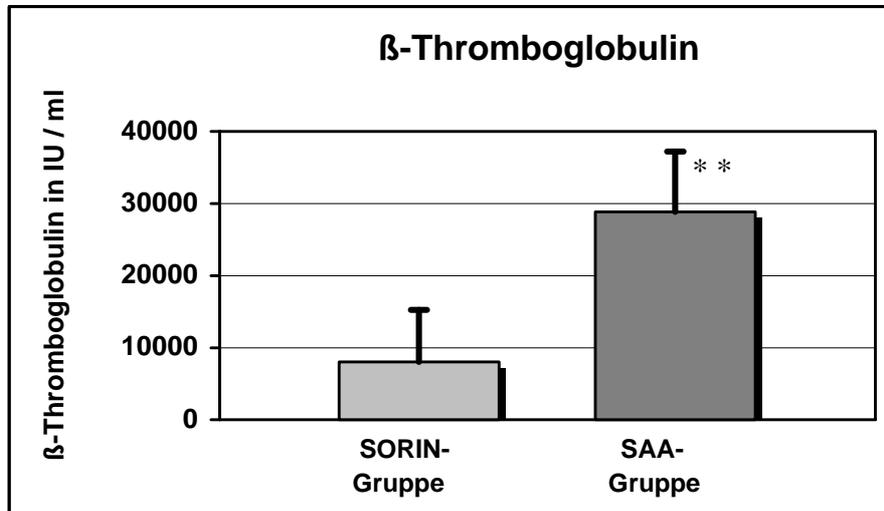
### 3.2 Analyse der Wachstumsfaktorenlösung

#### 3.2.1 $\beta$ -Thromboglobulin

Die  $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration war in der SAA-Gruppe signifikant höher als in der SORIN-Gruppe ( $p < 0,001$ ). Die erhobenen Daten sind in Tabelle 6 statistisch ausgewertet und werden in Abb. 4 graphisch dargestellt.

	SORIN-Gruppe	SAA-Gruppe
Mittelwert in IU/ml	8006	28814
Standardabweichung	7721	8406
Anzahl n	9	9
p	<0,001	

**Tabelle 6:**  $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration und statistische Auswertung



**Abb. 4:** Vergleich der  $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration

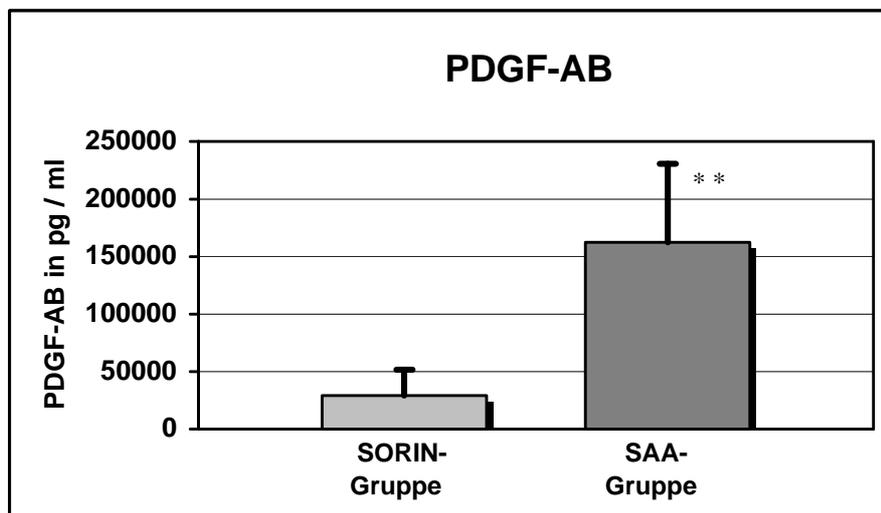
\*\* signifikant bei  $p < 0,001$

### 3.2.2 PDGF-AB

Die PDGF-AB-Konzentrationen zeigten in beiden Gruppen die von allen Wachstumsfaktoren höchsten Konzentrationen in der Wachstumsfaktorenlösung. Dabei war die PDGF-AB-Konzentration in der SAA-Gruppe statistisch signifikant höher als in der SORIN-Gruppe ( $p < 0,001$ ). Tabelle 7 zeigt die gemessenen Werte und die statistische Auswertung. Abb. 5 zeigt die PDGF-AB-Konzentration in beiden Gruppen.

	SORIN-Gruppe	SAA-Gruppe
<b>Mittelwert in pg/ml</b>	28889	162164
<b>Standardabweichung</b>	22609	68466
<b>Anzahl n</b>	10	12
<b>p</b>	<0,001	

**Tabelle 7:** PDGF-AB-Konzentration und statistische Auswertung



**Abb. 5:** Vergleich der PDGF-AB-Konzentrationen

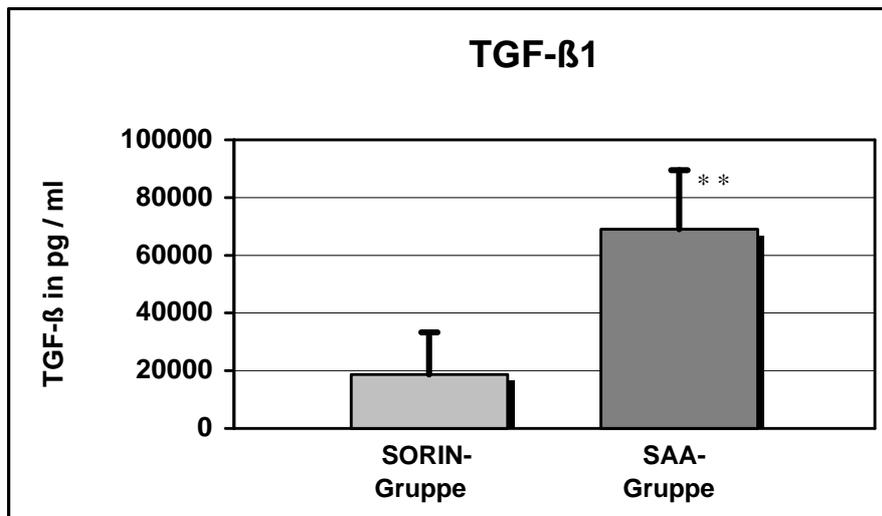
\*\* signifikant bei  $p < 0,001$

### 3.2.3 TGF- $\beta_1$

Die TGF- $\beta_1$ -Konzentration war in der SAA-Gruppe ebenfalls statistisch signifikant höher als in der SORIN-Gruppe ( $p < 0,001$ ). Die Werte sind in Tabelle 8 und Abb. 6 dargestellt.

	SORIN-Gruppe	SAA-Gruppe
<b>Mittelwert in pg/ml</b>	18689	69087
<b>Standardabweichung</b>	14587	20418
<b>Anzahl n</b>	10	12
<b>p</b>	<0,001	

**Tabelle 8:** TGF- $\beta_1$ -Konzentration und statistische Auswertung



**Abb. 6:** Vergleich der TGF- $\beta_1$ -Konzentration

\*\* signifikant bei  $p < 0,001$

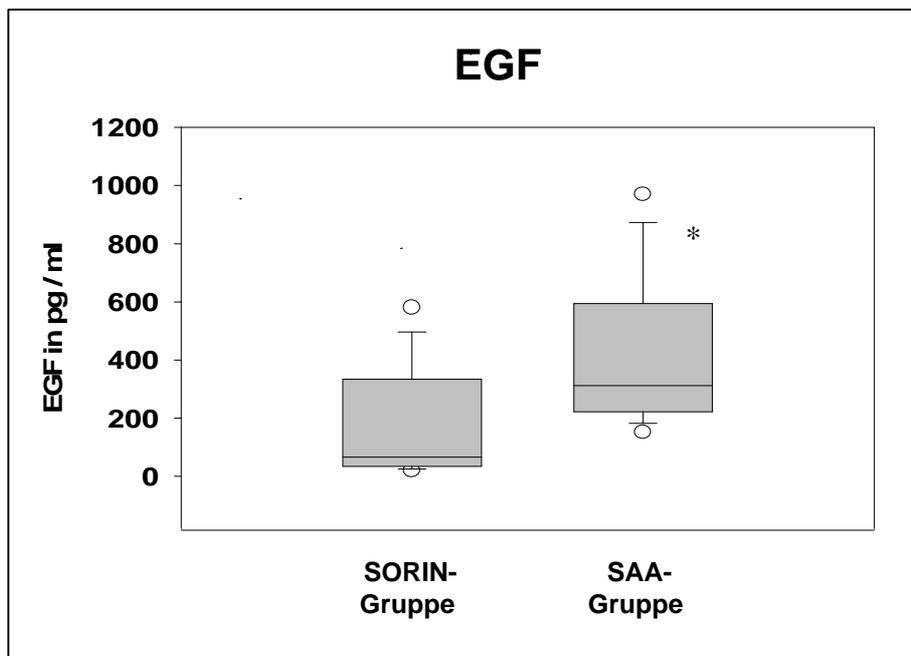
### 3.2.4 EGF-Konzentration

Da keine Normalverteilung vorlag wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt, um die EGF-Konzentration beider Gruppe zu vergleichen. Die EGF-Konzentration war in der SAA-Gruppe ebenfalls statistisch signifikant

erhöht gegenüber der EGF-Konzentration in der SORIN-Gruppe ( $p=0,028$ ). In beiden Gruppen lag sie aber deutlich unter den PDGF-AB- und TGF- $\beta_1$ -Konzentrationen. Die EGF-Konzentrationen werden in Tabelle 9 mit der statistischen Auswertung und in Abb. 7 graphisch dargestellt.

	SORIN-Gruppe	SAA-Gruppe
<b>Median in pg/ml</b>	65,71	311,80
<b>25%-Perzentil</b>	34,12	221,58
<b>75%-Perzentil</b>	33,28	594,60
<b>Anzahl n</b>	9	11
<b>p</b>	0,028	

**Tabelle 9:** EGF-Konzentration und statistische Auswertung



**Abb. 7:** Vergleich der EGF-Konzentration (dargestellt als Box Plot mit Medianwerten, 25%- und 75%-Perzentil)  
\* signifikant bei  $p<0,05$

### 3.2.5 bFGF

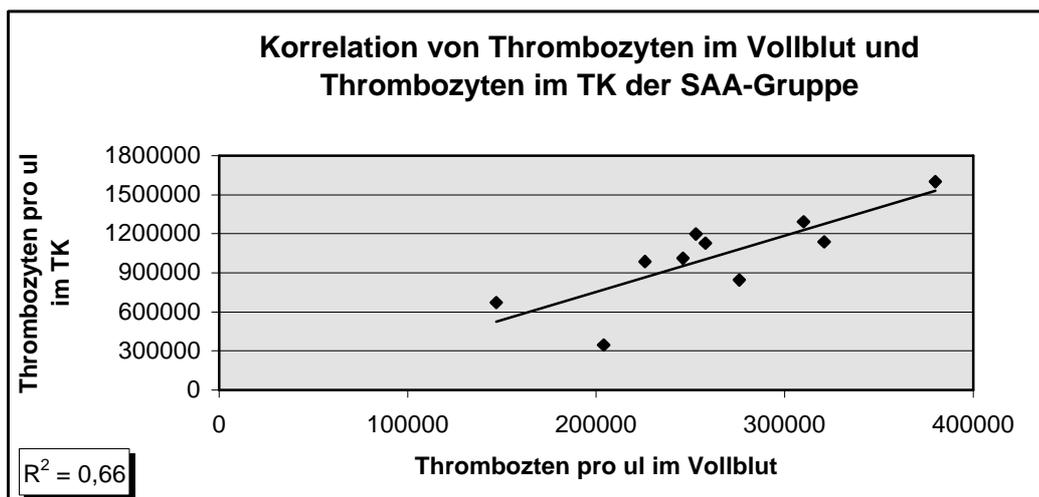
Eine im linearen Messbereich (10–640pg/ml) des ELISA liegende Konzentration für bFGF fand sich lediglich in 2 der 21 unverdünnt untersuchten Wachstumsfaktorenlösungen. Beide Werte (19,86pg/ml und 14,56pg/ml)

stammten von 2 Patienten aus der SAA-Gruppe. Die mit 19,86pg/ml höchste Konzentration wurde in der Wachstumsfaktorenlösung gemessen, in der auch für die anderen Wachstumsfaktoren und  $\beta$ -Thromboglobulin die höchsten Konzentrationen ermittelt wurden.

Da nur 2 Konzentrationen im linearen Meßbereich lagen, wurde keine statistische Auswertung und Korrelationsanalyse durchgeführt.

### 3.3 Korrelation der Thrombozytenkonzentration im Vollblut und der Thrombozytenkonzentration vor Degranulation

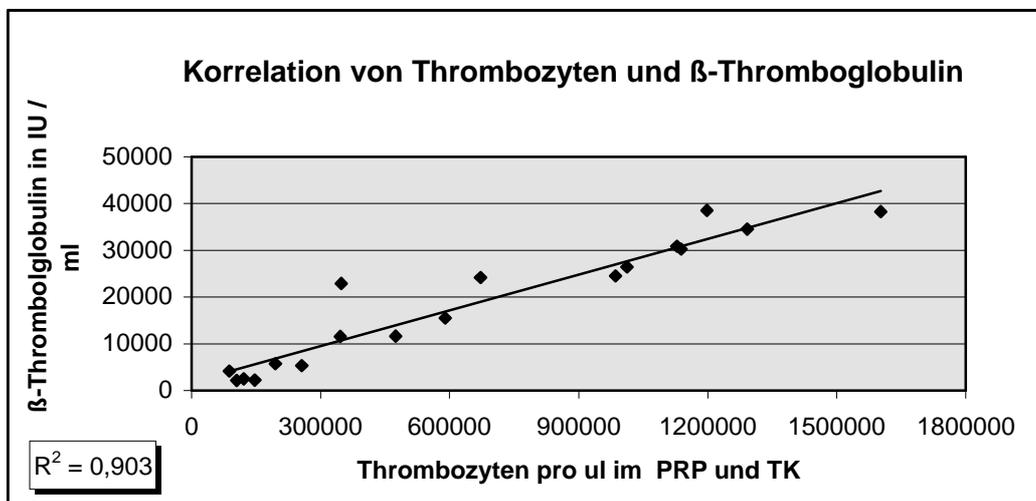
Während sich in der SAA-Gruppe eine positive Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration im Vollblut und der Thrombozytenkonzentration in dem Thrombozytenkonzentrat fand (Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,66$ ), gab es in der SORIN-Gruppe keine positive Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration im Vollblut und der Thrombozytenkonzentration im plättchenreichen Plasma ( $R^2 = 0,218$ ). In Abb. 8 ist die positive Korrelation mit dem Wert des Korrelationskoeffizienten  $R^2$  für die SAA-Gruppe dargestellt.



**Abb. 8:** Korrelation der Thrombozytenkonzentrationen im Vollblut und der Thrombozytenkonzentration im Thrombozytenkonzentrat (TK) in der SAA-Gruppe

### 3.4 Korrelation der Thrombozytenkonzentration vor Degranulation und der $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration

Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration vor der Degranulation im plättchenreichen Plasma und Thrombozytenkonzentrat und der  $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration in beiden Gruppen ( $R^2 = 0,903$ ). Die Korrelation ist in Abb. 9 mit dem Wert des Korrelationskoeffizienten  $R^2$  dargestellt.



**Abb. 9:** Korrelation der Thrombozytenkonzentration im plättchenreichen Plasma (PRP) und Thrombozytenkonzentrat (TK) und der  $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration in beiden Gruppen

### 3.5 Korrelation der $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration und der Wachstumsfaktorenkonzentrationen

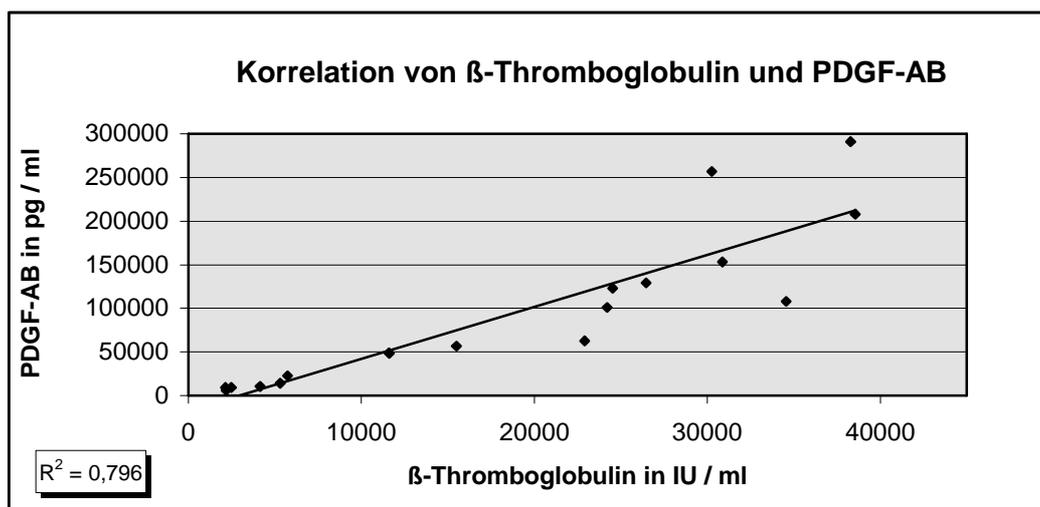
Die Korrelationsanalyse zwischen der  $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration und den in der Wachstumsfaktorenlösung beider Gruppen gefundenen Konzentrationen für PDGF-AB, TGF- $\beta_1$  und EGF ergaben für alle 3 Wachstumsfaktoren eine positive Korrelation zu  $\beta$ -Thromboglobulin.

## Ergebnisse

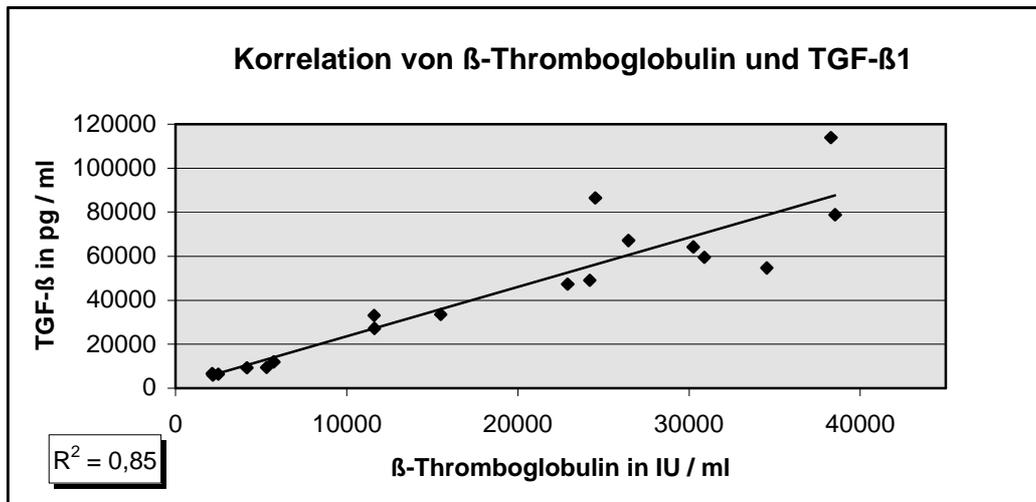
---

Der Korrelationskoeffizienten  $R^2$  lag aber mit 0,53 bei der Korrelation zwischen der  $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration und der EGF-Konzentration deutlich unter den Korrelationskoeffizienten, die sich bei den Korrelationen der  $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration und den PDGF-AB- und TGF- $\beta_1$ -Konzentrationen ergaben. Der Korrelationskoeffizient  $R^2$  bei der Korrelation zwischen  $\beta$ -TG und PDGF-AB betrug 0,796, bei der Korrelation zwischen  $\beta$ -TG und TGF- $\beta_1$  0,85.

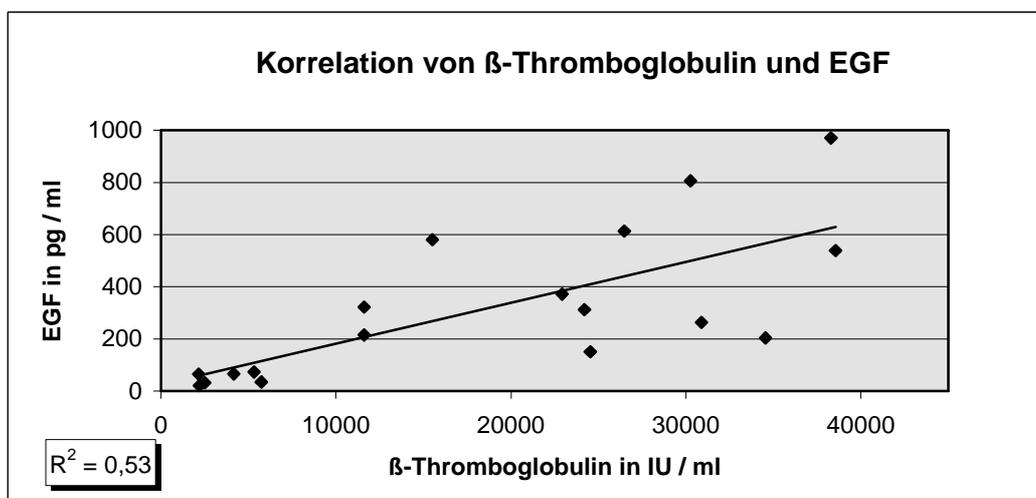
Die Korrelationen zwischen der  $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration und den Konzentrationen der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF- $\beta_1$  und EGF sind in den Abbildungen 10-12 mit dem Korrelationskoeffizienten  $R^2$  graphisch dargestellt.



**Abb. 10:** Korrelation der  $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration und der PDGF-AB-Konzentration in beiden Gruppen



**Abb. 11:** Korrelation der  $\beta$ -Thromboglobulin und der TGF- $\beta$ <sub>1</sub>-Konzentration in beiden Gruppen



**Abb. 12:** Korrelation der  $\beta$ -Thromboglobulinkonzentration und der EGF-Konzentration in beiden Gruppen

### 3.6 Histologische und immunhistochemische Ergebnisse

Aufgrund der unterschiedlichen Zahl ausgewerteter Präparate sowohl in der HE-Färbung als auch in den immunhistochemischen Färbungen wurde keine statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt. Stattdessen wurde ein beschreibender Vergleich der Ergebnisse beider Patientengruppen gewählt.

#### 3.6.1 Morphologische Unterschiede in der HE-Färbung

Die Oberschenkelbiopsien zeigten in der HE-Färbung das normale histologische Bild der Haut mit ihrem dreischichtigen Bau aus Epidermis, Korium und Subcutis. Die Epidermis bestand in allen Biopsien aus 6-8 Zellreihen und einer dünnen Hornschicht. Im Korium fanden sich nur wenige Zellen, in einer Biopsie auch vereinzelt Zellnester aus Rundzellen.

Dagegen fand sich in den Wundrandbiopsien teilweise Granulationsgewebe, das noch nicht von einer Epithelschicht überdeckt war und Wundrandgewebe, das eine Epidermis aufwies.

Die Wundrandbiopsien sowohl des 1. als auch des 14. Behandlungstages sind mikroskopisch deutlich von gesunder Haut zu unterscheiden. Sie weisen eine verdickte Epidermis mit deutlich mehr Zellreihen auf. In keiner Wundrandbiopsie fanden sich nur 6-8 Zellreihen wie in der gesunden Haut. Die Epidermis wies bei allen Wunden 10-20 Zellreihen auf. In einer Biopsie wurden sogar bis zu 40 Zellreihen gezählt. In vielen Fällen war die Epidermis zapfenförmig verdickt. Auch die Hornschicht war bei fast allen Wundrandbiopsien im Vergleich zu gesunder Haut verdickt. Im Granulationsgewebe und auch im Korium fanden sich deutlich mehr Zellen als in gesunder Haut. Diese Zellen lagen z. T. in Zellnestern vor, in einer Biopsie des 1. Behandlungstages deutlich um die Gefäße gruppiert.

In der HE-Färbung konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen den Biopsien, die am 1. Behandlungstag entnommen worden waren und den Biopsien des 14. Behandlungstages festgestellt werden. Auch konnte kein

Einfluss der unterschiedlich hergestellten Wachstumsfaktorenlösungen auf die Wundrandbiopsien des 14. Behandlungstages gesehen werden.

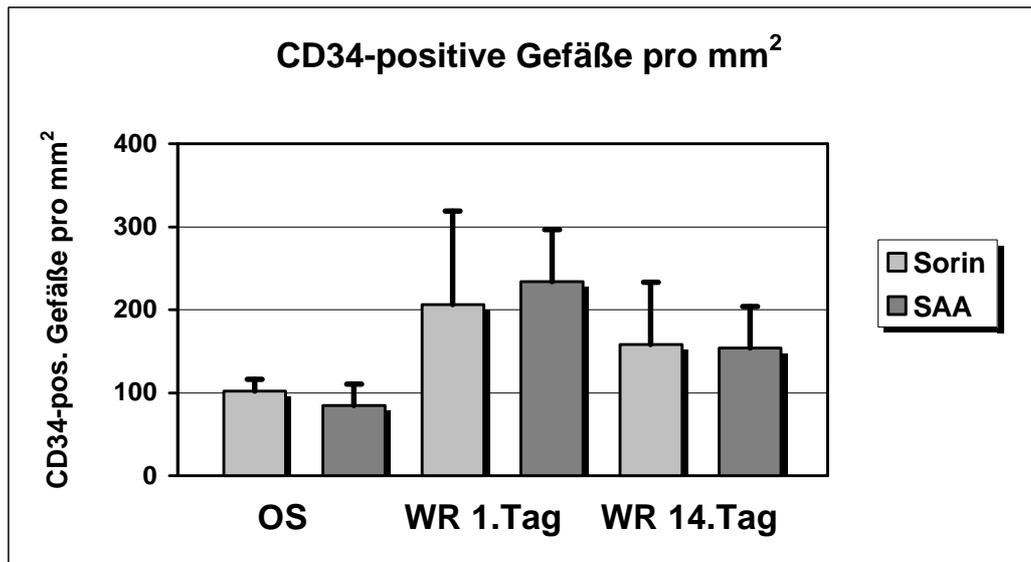
### **3.6.2 CD34-positive Gefäße pro mm<sup>2</sup>**

In der SORIN-Gruppe wurden in den ausgewerteten Oberschenkelbiopsien für die CD34-positiven Gefäße ein Mittelwert von 102 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> gefunden. In der SAA-Gruppe betrug der Mittelwert 84 CD34-positive Gefäße pro mm<sup>2</sup> in den Oberschenkelbiopsien.

In den Wundrandbiopsien des 1. Behandlungstages wurden in beiden Gruppen deutlich mehr CD34-positive Gefäße als in den Oberschenkelbiopsien gefunden, wobei sich mit durchschnittlich 206 CD34-positiven Gefäßen etwas mehr angefärbte Gefäße in der SAA-Gruppe fanden. Nach dem Behandlungszeitraum von 14 Tagen zeigte sich in beiden Gruppen ein Rückgang der CD34-positiven Gefäße auf etwa den gleichen Wert (158 Gefäße in der SORIN-Gruppe vs. 154 Gefäße in der SAA-Gruppe), der aber immer noch deutlich über den Werten in der gesunden Haut liegt. Für beide Gruppen werden die Mittelwerte mit Standardabweichung der CD34-positiven Gefäße pro mm<sup>2</sup> in Tabelle 10 dargestellt und in Abb. 13 graphisch aufbereitet.

	SORIN-Gruppe			SAA-Gruppe		
	OS	WR 1	WR 14	OS	WR 1	WR 14
<b>Mittelwert</b>	102	206	158	84	234	154
<b>Standardabweichung</b>	14,6	112,7	75,1	26,2	62,8	49,7

**Tabelle 10:** CD34-positive Gefäße pro mm<sup>2</sup> in den Oberschenkelbiopsien (OS) und den Wundrandbiopsien am 1. und 14. Behandlungstag (WR 1) und (WR 14)



**Abb 13:** CD34-positive Gefäße pro mm<sup>2</sup> in den Biopsien beider Gruppen (OS: Oberschenkel, WR: Wundrand)

### 3.6.3 PCNA-positive Zellen in der Epidermis

Sowohl in der Epidermis der Oberschenkelbiopsien als auch in der Epidermis der Wundrandbiopsien (sofern vorhanden) wiesen nur die Keratinozyten der Basalzellschicht und der Suprabasalzellschicht ein PCNA-positives Signal auf. Insgesamt gab es sehr große Unterschiede in der Anzahl der PCNA-positiven Zellen in der Epidermis in allen 3 Biopsiegruppen. So reichte bei den Oberschenkelbiopsien das Spektrum PCNA-positiver Keratinozyten von keiner Anfärbung in der gesamten Biopsie, über vereinzelt positive Zellen bis zur Anfärbung jeder 2. basalen Zelle. Allerdings fand man bei 10 Oberschenkelbiopsien und damit bei der Mehrheit der ausgewerteten Oberschenkel-biopsien keine oder nur vereinzelt PCNA-positive Zellen.

Im Gegensatz dazu gab es bei den Wundrandbiopsien des 1. Behandlungstag nur zwei Biopsien, die keine PCNA-positive Zelle in der Epidermis aufwiesen und bei den Wundrandbiopsien des 14. Behandlungstag keine Biopsie, die nicht PCNA-positive Keratinozyten zeigte. Bei den meisten Wundrandbiopsien fand sich eine fast durchgängige Anfärbbarkeit der basalen und suprabasalen Keratinozyten. Die Wundrandbiopsien des 14. Behandlungstages wiesen eine

etwas höhere Zahl PCNA-positiver Zellen gegenüber den Biopsien des 1. Behandlungstages auf. Es fand sich aber kein Unterschied zwischen beiden Behandlungsgruppen.

### **3.6.4 PCNA-positive Zellen pro mm<sup>2</sup> im Korium und Granulationsgewebe**

Die Ergebnisse der ausgezählten PCNA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> ergaben große Unterschiede zwischen den einzelnen Wundrandbiopsien und den beiden Behandlungsgruppen.

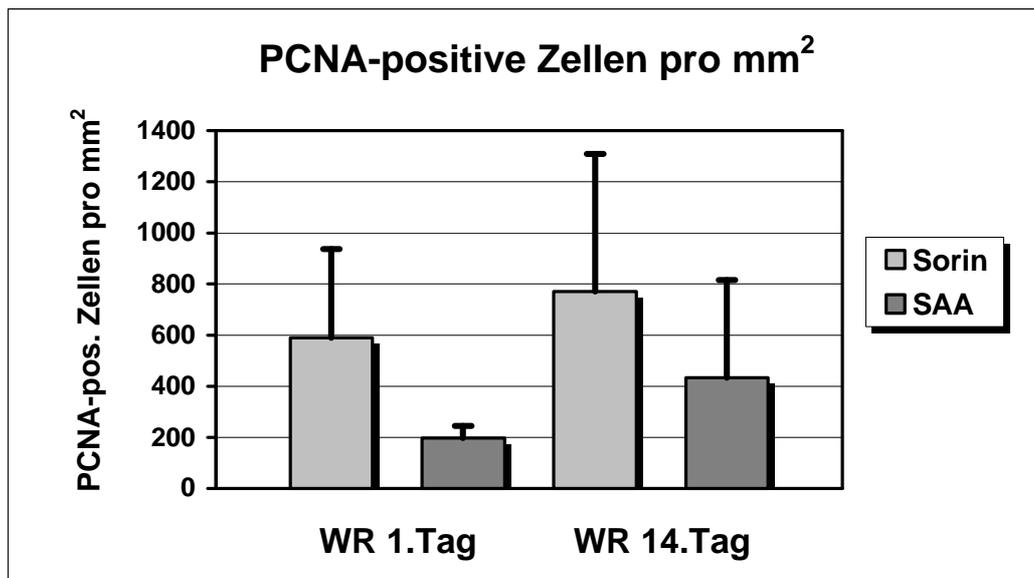
In der SORIN-Gruppe fand sich in den Wundrandbiopsien des 1. Behandlungstages ein Mittelwert von 589 PCNA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup>, während sich in der SAA-Gruppe nur ein Mittelwert von 197 PCNA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> fand. Nach der 14-tägigen Behandlung mit der Wachstumsfaktorenlösung stieg in beiden Gruppen die Zahl der PCNA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> an. Der größere Anstieg wurde in der SAA-Gruppe verzeichnet, wo sich ein Mittelwert von 433 PCNA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> im Vergleich zu 770 PCNA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> in der SORIN-Gruppe fand.

In den Oberschenkelbiopsien wurden dagegen keine bis maximal 10 PCNA-positive Zellen im gesamten Korium gefunden.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der PCNA-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> in den Wundrandbiopsien beider Gruppen sind in Tabelle 11 und Abb. 14 dargestellt.

	<b>SORIN-Gruppe</b>		<b>SAA-Gruppe</b>	
	<b>WR 1</b>	<b>WR 14</b>	<b>WR 1</b>	<b>WR 14</b>
<b>Mittelwert</b>	589	770	197	433
<b>Standardabweichung</b>	348,3	538,1	47,1	382,7

**Tabelle 11:** PCNA-positive Zellen pro mm<sup>2</sup> im Korium und Granulationsgewebe in den Wundrandbiopsien am 1. und 14. Behandlungstag (WR 1, WR 14)



**Abb. 14:** PCNA-positive Zellen pro mm<sup>2</sup> im Korium und Granulationsgewebe und in den Wundrandbiopsien beider Gruppen

### 3.7 Wirksamkeit und Verträglichkeit der Wachstumsfaktorenlösung

#### 3.7.1 Wirksamkeit in der SORIN-Gruppe

Bei 4 von 10 behandelten Patienten konnte am Ende des Behandlungszeitraum eine Zunahme des Granulationsgewebes festgestellt werden. Bei 2 dieser 4 Patienten konnte ihm Anschluß an die Behandlung eine Deckung der chronischen Wunde mit einer Spalthautdeckung durchgeführt werden.

Bei 3 weiteren der 10 Patienten konnte eine sichtbare Wundverkleinerung (durch Epithelialisierung oder Wundrandkontraktion) festgestellt werden.

Bei 3 von 10 Patienten kam es zu keiner Verbesserung der Wundverhältnisse oder zu einer sichtbaren Abheilungstendenz.

Bei einem dieser 3 Patienten konnte trotz 28-tägiger Behandlung eine Amputation der betroffenen Zehe nicht verhindert werden.

Bei einem weiteren dieser 3 Patienten kam es unter der Therapie zu einer Zunahme der schon vor dem initialen Debridement bestehenden fibrinösen Beläge.

### **3.7.2 Unerwünschte lokale oder systemische Ereignisse in der SORIN-Gruppe**

2 der 10 Patienten äußerten während des Therapiezeitraumes zunehmende Schmerzen im Wundbereich und bei beiden wurde ein die Wunde umgebendes Erythem festgestellt. In beiden Fällen lag eine Infektion der chronischen Wunde vor, die mit einer oralen Antibiotikatherapie behandelt werden konnte.

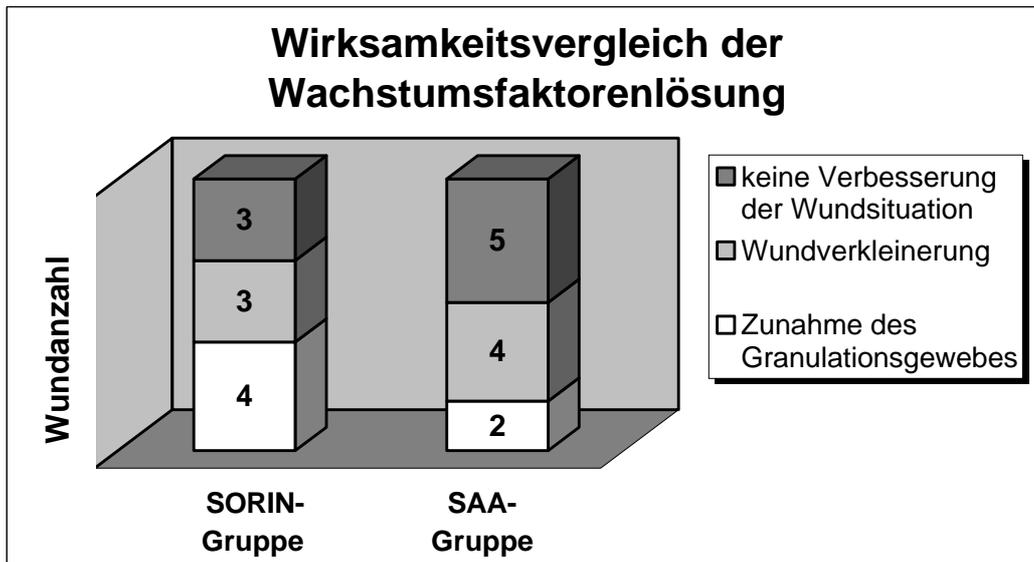
### **3.7.3 Wirksamkeit in der SAA-Gruppe**

Bei 2 von 11 behandelten Patienten konnte eine Zunahme des Granulationsgewebes festgestellt werden. Bei einem dieser beiden Pat. konnte im Anschluß an die Behandlung eine Mesh graft-Deckung durchgeführt werden. Bei 4 weiteren Patienten kam es zu einer sichtbaren Wundverkleinerung (durch Epithelialisierung oder Wundrandkontraktion).

Bei 5 der 11 Patienten kam es zu keiner Verbesserung der Wundverhältnisse oder zu einer sichtbaren Abheilungstendenz.

### **3.7.4 Unerwünschte lokale oder systemische Ereignisse in der SAA-Gruppe**

Bei einem der 11 Patienten trat während des Behandlungszeitraumes ein Juckreiz auf.



**Abb. 15:** Wirksamkeitsvergleich der Wachstumsfaktorenlösung zwischen beiden Behandlungsgruppen

Zwei unterschiedliche Methoden zur Gewinnung einer autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung sowie deren Einsatz in der Behandlung chronischer Hautwunden sind Gegenstand dieser Arbeit.

Wachstumsfaktoren spielen im Prozeß der kutanen Wundheilung eine entscheidende regulatorische Rolle. Da das Zusammenspiel der Wachstumsfaktoren in chronischen Wunden offenbar gestört ist (Robson et al., 2000), wurden einzelne rekombinant hergestellte Wachstumsfaktoren in der Behandlung chronischer Wunden des Menschen eingesetzt. Mit vier der am besten charakterisierten Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- $\beta$ , bFGF und EGF), die von uns auf ihre Konzentration in der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung untersucht wurden, wurde eine Stimulation der Heilungsvorgänge in chronischen Wunden versucht.

In einer Studie an 35 Patienten mit venösen Ulzera konnten Falanga et al. (1992) mit 10 $\mu$ g/ml EGF über maximal 10 Wochen einen positiven, aber nicht signifikanten Effekt auf die Abheilung beobachten. Brown et al. (1991) erreichten bei 8 von 9 Patienten mit chronischen Wunden unterschiedlicher Ätiologie mit 10 $\mu$ g/g EGF eine komplette Abheilung nach einer mittleren Behandlungszeit von  $34 \pm 26$  Tagen.

Auch mit rekombinantem bFGF in Konzentrationen von 100-1000 $\mu$ g/ml konnten infizierte Dekubitalulzera zur schnelleren Abheilung gebracht werden (Robson et al., 1992). Nach 30 Tagen wiesen 60% der mit bFGF behandelten Patienten und nur 29% der Kontrollpatienten eine 70%ige Verkleinerung der Wundfläche auf. In den Wundbiopsien wurde eine vermehrte Kapillareinsprossung und Fibroblastenproliferation bei den mit bFGF behandelten Wunden beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte in einer weiteren bFGF-Studie mit 17 Patienten, die ein neuropathisches Fußulcus aufwiesen, kein besseres Ergebnis im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden (Richard et al., 1995).

Die meisten Erfahrungen wurden bisher mit dem Einsatz von PDGF-BB gemacht, das im Gegensatz zu PDGF-AB rekombinant hergestellt werden kann. Robson et al. (1992) demonstrierten, dass fünf mit 100µg/ml PDGF-BB behandelte chronische Druckulzera eine signifikant bessere Heilungsrate gegenüber den mit Placebo behandelten Wunden aufwiesen. Histologisch fand sich ein vermehrter Fibroblasten- und Endothelzelleinstrom in die Wunden. Mustoe et al. (1994) konnten bei 27 Patienten mit chronischen Druckulzera, die über einen Zeitraum von 28 Tagen entweder 100 oder 300µg/ml PDGF-BB erhielten, eine signifikante Verkleinerung des Wundvolumens erzielen. Eine von Smiell et al. (1999) durchgeführte Metaanalyse unter Einschluss von 4 randomisierten, doppelblinden und plazebokontrollierten Studien (Steed, 1995, Wieman et al., 1998, d'Hemecourt et al., 1998, Wieman, 1998) mit insgesamt 922 Patienten kam zu dem Ergebnis, daß der Einsatz von 100µg/g Becaplermingel, das als Wirkstoff rekombinantes PDGF-BB enthält, die Komplettheilung bei chronischen, nicht heilenden, diabetisch-neuropathischen Ulzera der unteren Extremität mit einer Größe unter 5cm<sup>2</sup> signifikant verbessert. Diese Studien führten dazu, dass Becaplermin 0,01% als Regranex® zuerst durch die FDA und inzwischen auch in Deutschland zur Behandlung des diabetischen Ulcus zugelassen wurde. In einer folgenden Studie konnten die guten Ergebnisse mit Becaplermingel 0,01% bei 73 Patienten mit chronischen Ulzera der unteren Extremität bestätigt werden. 95% der Ulzera waren nach 9 Wochen komplett abgeheilt (Guzman-Gardearzal et al., 2000).

Der Prozess der kutanen Wundheilung wird aber nicht durch einzelne Wachstumsfaktoren gesteuert, sondern durch das zeitlich geordnete Zusammenspiel mehrerer Wachstumsfaktoren (Robinson, 1993). Auch in vitro (Assoian et al., 1984, Lynch et al., 1987, Gospodarowicz et al., 1990) und in verschiedenen Tiermodellen der chronischen Hautwunde (Lawrence et al., 1986, Hebda, 1988, Hennessey et al., 1990, Brown et al., 1994) gab es Hinweise, dass die Kombination mehrerer Wachstumsfaktoren der Applikation von Einzelfaktoren überlegen sein könnte. Nach Nath und Gulati (1998) ist

daher die Wundbehandlung mit einer Wachstumsfaktorenkombination effektiver als die mit Einzelfaktoren.

Die Thrombozyten mit ihren  $\alpha$ -Granula stellen eine wichtige Quelle für eine Reihe von Wachstumsfaktoren dar, die in allen Phasen der Wundheilung eine Rolle spielen. Sie sind die entscheidende Wachstumsfaktorenquelle zu Beginn der Wundheilung, wenn die Thrombozytenaggregation und -degranulation durch Thrombin ausgelöst wird. Daneben kommt es aber auch im weiteren Verlauf des Heilungsprozesses zu einer Degranulation der  $\alpha$ -Granula, da die Thrombozyten durch die lockeren Zellverbindungen von neu gebildeten Kapillaren austreten und dann ihre Wachstumsfaktoren in der Wunde freisetzen (Knighton und Fiegel, 1991).

Eine aus den Thrombozyten gewonnene Wachstumsfaktorenlösung stellt also eine physiologisches Gemisch mehrerer in der Wundheilung wirksamer Wachstumsfaktoren dar. Mit einer solchen Kombination konnten Rutherford und Ross (1976) sowie Senior et al. (1983) einen wachstumsstimulierenden Effekt auf Fibroblasten und glatte Muskelzellen in vitro nachweisen. Die spezifische Kombination der Wachstumsfaktoren in den Thrombozyten erwies sich in vitro in Bezug auf die maximale Stimulation der Fibroblastenproliferation als effektiver im Vergleich zu folgenden Wachstumsfaktorenkombinationen: PDGF + EGF + TGF- $\beta$  / PDGF + EGF + IGF-1 / bFGF + EGF (Newman et al., 1990).

Auch im Tiermodell waren die durch Thrombin aus den Thrombozyten freigesetzten Wachstumsfaktoren wirksam. In Kaninchenhornhäuten wurde eine Angiogenese und eine Kollagensynthese nach Injektion dieser Wachstumsfaktorenlösung beobachtet (Knighton et al., 1982).

Diese positiven Ergebnisse führten zu der Überlegung, thrombozytäre Wachstumsfaktoren zur Stimulation chronischer Wunden einzusetzen.

### 4.1 Studiendurchführung und Wirksamkeit der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung

1986 setzten Knighton et al. eine autologe thrombozytäre Wachstumsfaktorenkombination, die als Platelet-derived Wound Healing Formula (PDWHF®) bezeichnet wurde, erstmals in der topischen Behandlung chronischer Wunden unterschiedlicher Ätiologie ein (Diabetes mellitus, Dekubitalulzera, CVI, pAVK, Vaskulitiden, Traumata). 41 Patienten mit insgesamt 71 Wunden wurden mit der PDWHF-Lösung behandelt. In durchschnittlich 10,6 Wochen konnten alle Wunden zur Abheilung, d.h. zur 100%igen Epithelialisierung, gebracht werden. In einer sich anschließenden randomisierten, prospektiven Studie wurde der Einsatz der autologen PDWHF-Lösung im Vergleich zu einer Placebolösung getestet (Knighton et al., 1990). Hierbei war die Wundätiologie wie bei unserem Patientkollektiv heterogen. 17 der 21 mit der PDWHF-Lösung behandelten Wunden waren nach 8 Wochen komplett abgeheilt. Bei den verbleibenden 4 Wunden konnte eine Wundverkleinerung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu waren nur 2 der 13 mit Placebo behandelten Wunden komplett abgeheilt; bei 4 der 13 Wunden fand sich eine Wundverkleinerung.

In einer weiteren randomisierten, prospektiven, doppelblinden und placebokontrollierten Studie zeigte die Applikation der PDWHF-Lösung bei 10 Patienten mit 17 Wunden unterschiedlicher Ätiologie nach einem Behandlungszeitraum von 12 Wochen keine verbesserte Abheilung (Krupski et al., 1991). 4 der 17 Wunden konnten zur Abheilung gebracht werden, während in der Placebogruppe 3 von 9 Wunden komplett abheilten.

In diesen Studien wurde die thrombozytäre Wachstumsfaktorenkombination mit einem mikrokristallinen Kollagengel vermischt auf die Wunden aufgetragen. Da nach Steed (1997) dieses Kollagengel ein potenter Stimulator von Thrombozyten ist und der Effekt des Kollagens auf die Wundheilung bisher nicht getestet wurde, haben wir auf Kollagengel als Vehikel für die thrombozytäre Wachstumsfaktorenkombination verzichtet. Ein weiterer Unterschied liegt in dem Behandlungsprotokoll. Während in den von Knighton

und Krupski durchgeführten Studien die Wachstumsfaktorenkombination im 12stündigen Wechsel mit Silbersulfadiazin auf die Wunden aufgetragen wurde, führten wir den 12stündigen Verbandswechsel mit 0,9%iger NaCl-Lösung durch, da man davon ausgehen muß, daß Silbersulfadiazin als lokal wirksames Antibiotikum in den chronisch bakteriell kontaminierten Wunden (Coerper et al., 1995) einen positiven Effekt auf die Wundheilung hat.

In der von Coerper et al. (1995) durchgeführten prospektiven Studie, in der 24 Patienten mit 36 Ulzera aufgrund der einheitlichen Ätiologie CVI mit PDWHF behandelt worden waren, wurde eine wundheilungsfördernde Wirkung der PDWHF-Therapie beschrieben. Bei den Behandlungsergebnissen wurde zwischen 2 Ulzeragruppen unterschieden. 15 von 20 kleineren Ulzera ( $<5000\text{mm}^2$ ) konnten innerhalb von 16 Wochen zur Abheilung gebracht werden. Bei den größeren Ulzera ( $>5000\text{mm}^2$ ) konnte nach 2-3wöchiger PDWHF-Therapie bei 10 der 16 Patienten eine sauberes, gut durchblutetes und infektfreies Granulationsgewebe als Voraussetzung für eine Spalthautdeckung erreicht werden. In 10 Fällen heilte das Spalthauttransplantat vollständig ein, bei 5 Transplantaten konnten kleinere Defekte nach erneuter Behandlung mit PDWHF zur Abheilung gebracht werden. So waren in dieser Gruppe 15 der 16 großen Ulzera nach durchschnittlich 13 Wochen abgeheilt.

Dagegen wurde eine fragliche Wirksamkeit der PDWHF-Lösung in einer neueren Studie gefunden (Reutter et al., 1999). Auch bei diesen Patienten lag eine chronische Wunde aufgrund einer CVI vor. In dieser Studie wurden 9 Patienten mit einer autologen PDWHF-Lösung und 6 Patienten mit einer Plazebolösung über einen Zeitraum von mindestens 60 Tagen behandelt. In beiden Behandlungsgruppen gab es keine Veränderung der Ulkusfläche, aber die 2 einzigen während der Studiendauer abgeheilten Ulzera entstammten der Verumgruppe. Außerdem wurde eine tendenzielle Zunahme der kapillären Dichte und des  $\text{tcpO}_2$  am Ulkusrand bei den Patienten der PDWHF-Gruppe festgestellt. Bei den Patienten der Plazebogruppe stagnierten beiden Parameter, so daß die Autoren eine neoangiogenetische Eigenschaft der PDWHF-Lösung vermuteten.

## Diskussion

---

Die PDWHF-Lösungen bei Coerper et al. und Reutter et al. waren im Gegensatz zu der bei uns zum Einsatz gekommenen Wachstumsfaktorenlösung mit einer Pufferlösung verdünnt. Wir verzichteten auf eine Verdünnung, um die Wachstumsfaktoren in möglichst hoher Konzentration zum Einsatz zu bringen.

Neben dem Einsatz von autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenkombinationen wurden auch homolog und heterolog hergestellte thrombozytäre Wachstumsfaktorenkombinationen in der Behandlung chronischer Wunden beim Menschen eingesetzt. Bei homolog hergestelltem PDWHF (HPDWHF), das auch unter dem Begriff CT-102 geführt wurde, wurde die thrombozytäre Wachstumsfaktorenkombination aus dem Blut eines gesunden Spenders gewonnen.

In einer von Atri et al. (1990) durchgeführten Untersuchung wurden 23 Patienten mit 27 Hautwunden unterschiedlicher Ätiologie eingeschlossen. Alle Patienten wurden zuerst über einen Zeitraum von 3 Monaten einer kontrollierten Wundbehandlung mit NaCl- und Silbersulfadiazin-Verbänden zugeführt. Nach diesen 3 Monaten waren nur 3 Hautwunden abgeheilt. Daraufhin wurden die nicht geheilten Wunden mit der HPDWHF-Lösung behandelt und alle Wunden konnten nach durchschnittlich 9,6 Wochen zur kompletten Abheilung gebracht werden. Die Autoren lösten das Problem der fehlenden Kontrollgruppe dadurch, daß jede Wunde als ihre eigene Kontrolle fungierte. Dieser Ansatz wurde auch von uns gewählt, da sich nach Vogt et al. (2000) und Debus et al. (2000) bei chronischen Wunden des Menschen die unterschiedlichsten klinischen Ausgangsbedingungen finden, während in tierexperimentellen Untersuchungen standardisierte Wundmodelle vorliegen. Das macht eine Randomisierung äußerst schwierig.

Die von uns behandelten chronischen Wunden hatten eine Anamnesedauer von durchschnittlich 16,6 Monaten in der SORIN-Gruppe und 14,4 Monaten in der SAA-Gruppe. 19 der 21 Wunden waren vor der Behandlung im Rahmen unserer Studie in der Wundsprechstunde einer „good wound care“ und diversen

Therapien zugeführt worden. Daher sahen auch wir jede Wunde als ihre eigene Kontrolle an und verzichteten auf eine Kontrollgruppe.

In den beiden anderen mit einer HPDWHF-Lösung durchgeführten Studien (Steed et al., 1992; Holloway et al., 1993) wurden ausschließlich chronische diabetische Ulzera behandelt. Beide Studien waren randomisiert, doppelblind und plazebokontrolliert. In der Steed-Studie heilten 5 von 7 mit HPDWHF behandelten diabetischen Ulzera innerhalb von 15 Wochen ab, während in der Plazebogruppe nur eines der 6 Ulzera nach 20 Wochen abgeheilt war. Bei Holloway et al. (1993) konnten innerhalb von 20 Wochen 80% der mit CT-102 (0,01%) behandelten Wunden und nur 29% der mit Plazebo behandelten Wunden zur kompletten Abheilung gebracht werden.

In der einzigen randomisierten, plazebokontrollierten Doppelblindstudie, in der eine heterologe PDWHF-Lösung zum Einsatz kam, wurden 24 Patienten mit chronischen diabetischen Ulzera über maximal 20 Wochen behandelt (Wunderlich, 1997). Lediglich in der Behandlungsdauer bis zum Erreichen von 50% der ursprünglichen Wundfläche konnte eine verbesserte Wundheilung in der mit Wachstumsfaktoren behandelten Patientengruppe erreicht werden.

Da viele Patienten mit chronischen Wunden gleichzeitig an Anämien und kardiovaskulären Krankheiten leiden, ist eine Eigenblutspende nicht immer möglich. Homolog und heterolog gewonnenes Blut steht dagegen in den Blutbanken in ausreichender Menge zur Verfügung und macht damit die Eigenblutspende überflüssig. Der große Nachteil homolog und heterolog gewonnener thrombozytärer Wachstumsfaktorenlösungen liegt aber in dem Infektionsrisiko. Die HPDWHF-Lösungen müssen auf verschiedene durch Blutprodukte übertragbare Viruserkrankungen wie HIV, Hepatitis B und C und CMV getestet werden. Dadurch verteuert sich die Herstellung der HPDWHF-Lösung. Bei autolog gewonnenen Wachstumsfaktorenkombinationen stellt sich dieses Problem nicht (Steed, 1997).

Die „good wound care“ in Verbindung mit einem 12stündigen Verbandswechsel kam bei uns wie in allen anderen Studien zum Einsatz. Die 28-tägige

Behandlung konnte von den Patienten beider Gruppen nach der Einweisung ohne Probleme ambulant mit wöchentlichen Besuchen in der Wundsprechstunde durchgeführt werden.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der von uns durchgeführten Behandlung und den anderen dargestellten Studien lag in der Behandlungsdauer. Da die Menge an thrombozytärer Wachstumsfaktorenlösung sowohl in der SORIN- als auch in der SAA-Gruppe zwischen 70 und 80ml lag, konnten maximal 35-40 2ml-Spritzen hergestellt werden, da keine weitere Verdünnung oder der Zusatz einer Trägersubstanz erfolgte. Dadurch war der Anwendungszeitraum auf 35-40 Tage beschränkt. Wir entschieden uns für eine einheitliche Behandlungsdauer von 28 Tagen, die aber im Vergleich mit den Behandlungszeiträumen der anderen Studien am kürzesten war. Dennoch haben die Studien von Brown et al. (1991), Robson et al. (1992) und Coerper et al. (1995) gezeigt, daß auch nach einem kürzeren Zeitraum ein möglicher positiver Effekt einer topischen Wachstumsfaktorenapplikation nachweisbar ist.

In einem Behandlungszeitraum von 28 Tagen ist es sicherlich nicht möglich, einen Großteil der 21 behandelten Problemwunden zur kompletten Abheilung, also zur 100%igen Epithelialisierung zu bringen. Deshalb lassen sich unsere Behandlungsergebnisse nur begrenzt mit den Ergebnissen der meisten anderen Studien vergleichen, die als Endpunkt die komplette Epithelialisierung hatten.

In beiden Behandlungsgruppen konnte keine Wunde im Beobachtungszeitraum zur kompletten Abheilung gebracht werden. Überraschenderweise waren die Behandlungsergebnisse in der SORIN-Gruppe etwas besser als in der SAA-Gruppe, obwohl sich in der Wachstumsfaktorenkombination der SAA-Gruppe signifikant höhere Konzentrationen der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF- $\beta_1$  und EGF fanden. In der SORIN-Gruppe kam es bei 3 der 10 Patienten zu keiner Verbesserung der Wundverhältnisse, während in der SAA-Gruppe bei 5 der 11 Patienten keine Heilungstendenz festgestellt werden konnte. Diese Beobachtung bestätigt die bisher nicht geklärte Frage der optimalen Konzentration an thrombozytären Wachstumsfaktoren (Steed, 1997) und einer

eventuellen zeitlich unterschiedlichen Applikation der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren in den verschiedenen Stadien der Wundheilung (Robinson, 1993).

Allerdings muß man berücksichtigen, daß in der SAA-Gruppe 3 Patienten eine chronische Wunde aufgrund einer Mischätiologie aus CVI, pAVK und/oder Diabetes mellitus aufwies, während in der SORIN-Gruppe kein Patient eine solche Mischätiologie aufwies. Es ist davon auszugehen, daß eine chronische Wunde, die ihre Ätiologie in einer Kombination mehrerer Grundkrankheiten hat, schwieriger zu therapieren ist, als eine chronische Wunde, die auf einer Ätiologie beruht.

Bei 7 der 10 Patienten der SORIN-Gruppe und bei 6 der 11 Patienten der SAA-Gruppe konnte eine Verbesserung der Wundsituation in Form einer Wundverkleinerung durch Epithelialisierung und Wundrandkontraktion und einer Zunahme des Granulationsgewebes erreicht werden, was bei dem problematischen Wundkollektiv, dokumentiert durch die lange Ulkusanamnesedauer von durchschnittlich 15,6 Monaten und den bereits im Rahmen der Wundsprechstunde erfolgten optimierten Behandlungsmaßnahmen, nicht unterschätzt werden darf. Bei 3 der 21 Patienten konnte im Anschluß an die Wachstumsfaktorenbehandlung eine Spalthautdeckung vorgenommen werden, die ohne die vorausgehende Wachstumsfaktorenapplikation nicht hätte durchgeführt werden können.

Neben der Behandlungsdauer spielt die Wahl der Applikationsform der Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle. Brown et al. (1988) konnten im Rattenwundmodell zeigen, daß die einmalige Gabe von EGF und TGF- $\beta$ , die in Liposomen inkorporiert wurden, im Gegensatz zur einmaligen Gabe der nicht inkorporierten Wachstumsfaktoren die Wundreifestigkeit, Kollagenbildung und Fibroblastenproliferation nach 7 und 14 Tagen signifikant verbesserten. Ksander et al. (1990) erzielten in verschiedenen tierischen Vollhautwunden bessere Heilungsergebnisse bei den Wunden, die mit Thrombozytenextrakten in Verbindung mit einem Kollagen/Heparin-Vehikel behandelt wurden, als in den Wunden, die allein mit dem Thrombozytenextrakt behandelt wurden.

Puolakkainen et al. (1995) setzten ein Polyoxamergel als Trägersubstanz in Verbindung mit TGF- $\beta_1$  in der Behandlung von Vollhautwundwunden bei Ratten ein und konnten damit eine verzögerte Freisetzung und eine beschleunigte Abheilung erreichen. Auch Robson et al. (2000) betonte, daß für die Neoangiogenese eine prolongierte, konstante Freisetzung der Wachstumsfaktoren notwendig ist.

Die von uns eingesetzte Wachstumsfaktorenlösung wurde ohne Vehikel auf die Wunde aufgetragen, so daß man wahrscheinlich davon ausgehen kann, daß eine Kombination mit einer geeigneten Trägersubstanz zu einer verlängerten Verfügbarkeit der Wachstumsfaktoren in der Wunde führt.

Bei der Beurteilung der Verträglichkeit wurden ähnlich gute Ergebnisse wie bei den anderen Studien gefunden. Nur bei einem Patienten der SAA-Gruppe trat ein unerwünschtes lokales Ergebnis in Form eines Juckreizes auf, der wahrscheinlich durch die Wachstumsfaktorenlösung ausgelöst wurde. Die beiden in der SORIN-Gruppe festgestellten unerwünschten lokalen Ereignisse wurden durch eine Wundinfektion ausgelöst und konnten antibiotisch gut behandelt werden. Ob ein Zusammenhang zwischen den Wundinfektionen und der Applikation der Wachstumsfaktorenlösung bestand, konnte nicht geklärt werden.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß die größtenteils positiven Ergebnisse, die mit dem Einsatz thrombozytärer Wachstumsfaktorenlösungen erzielt worden waren, nur eingeschränkt bei unseren 21 Patienten bestätigt werden konnten. Das liegt zum einen sicherlich an der relativ kurzen Behandlungsdauer von 28 Tagen und an dem Verzicht auf eine Trägersubstanz, die eine kontinuierliche Freisetzung der Wachstumsfaktoren über einen längeren Zeitraum garantiert. Hier wäre beispielsweise ein Wachstumsfaktorengel auf der Grundlage von Alginaten oder Methylcellulose denkbar.

Auf der anderen Seite muß man die erzielten Behandlungsergebnisse und – erfolge unter der Berücksichtigung des ausgewählten Wundkollektivs sehen.

Es handelte sich bei sämtlichen behandelten Wunden um Wunden, die sich in einem spezialisierten Wundzentrum mit den verfügbaren „konventionellen“ Behandlungsmethoden und dem Einsatz der „good wound care“ als bisher therapierefraktär gezeigt hatten und keine Verbesserung der Wundsituation oder sogar Abheilung gezeigt hatten. Bei diesen „Problemwunden“ unter den chronischen Wunden konnten wir bei der Mehrzahl der Wunden eine Verbesserung der Wundsituation erzielen, die unter anderem auch die Durchführung von Spalthauttransplantationen ermöglichte. Daher ist der Einsatz einer durch unsere beiden Methoden gewonnenen autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung bei chronischen Wunden, bei denen die anderen Behandlungsmaßnahmen nicht zum Erfolg führten, als rationale Therapieerweiterung unserer Meinung nach gerechtfertigt.

Eine abschließende Beurteilung des Einsatzes einer durch unsere beiden Methoden hergestellten autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung in der Behandlung chronischer Wunden kann aber nicht durch eine Studie mit 21 Patienten erfolgen. Dazu muß eine prospektive, randomisierte, doppelblinde und plazebokontrollierte Studie mit einer erheblich größeren Patientenzahl durchgeführt werden. In einer solchen Studie muß auch die wichtige Frage einer Rezidivhäufigkeit geklärt werden.

### **4.2 Beurteilung der SORIN- und SAA-Methode**

Bei der SORIN-Methode wurde ein Zellseparator zur Verarbeitung von Blutprodukten eingesetzt. In diesen Zellseparator wurde eine neu entwickelte Einheit aus einem 2-Beutel-System und einer 55ml-Plasmasequestrierglocke eingesetzt. Der Vorteil dieser Methode liegt in dem möglichen Einsatz als mobiles „bedside-Verfahren“, das auch in kleineren Einrichtungen eingesetzt werden kann.

Bei der SAA-Methode handelt es sich um ein etabliertes Verfahren zur Herstellung von Einzel-Thrombozytenkonzentraten der Abteilung für

## Diskussion

---

Transfusionsmedizin mit Blutbank der Universität Tübingen, das die entsprechende technische Ausrüstung einer solchen Einrichtung voraussetzt.

Aus dem durch beide Methoden gewonnenen plättchenreichen Plasma bzw. Thrombozytenkonzentrat wurde dann durch Zugabe von Thrombin und Calcium die thrombozytäre Wachstumsfaktorenlösung gewonnen.

Diese beiden Methoden sollen im folgenden mit den bisher in der Literatur beschriebenen Methoden und deren Ergebnissen verglichen werden und auf eine zukünftige Einsatzfähigkeit beurteilt werden.

Die von Knighton et al. (1986 und 1990), Krupski et al. (1991) und Atri et al. (1990) eingesetzten PDWHF-Lösungen wurden alle aus 60ml Vollblut gewonnen. Die PDWHF-Lösungen in den Studien von Coerper et al. (1995), Wunderlich (1997) und Reutter et al. (1999) wurden jeweils aus 200ml Vollblut gewonnen und dann durch die Fa. Curative Technologies, Moers, hergestellt. Bei Wang et al. (1996) wurde aus 500ml Vollblut eines Patienten mit multiplen Verbrennungswunden eine PDWHF-Lösung gewonnen. Wir wählten ebenfalls 500 ml Vollblut als Ausgangsvolumen zur Herstellung der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung.

Der Vorteil der größeren Vollblutmenge von 500ml liegt in der größeren absoluten Thrombozytenzahl. Dem steht aber der Nachteil der größeren Kreislaufbelastung des Patienten gegenüber, wie sich auch bei uns in einem Fall gezeigt hat. Da die meisten Patienten mit chronischen Wunden älter sind und häufig an weiteren kardiovaskulären Krankheiten leiden, ist dieser Aspekt nicht zu vernachlässigen. Bei der SORIN-Methode ist ein Einsatz von weniger als 500ml Vollblut nicht möglich, da sonst das „Spülblutvolumen“ nicht ausreicht, das plättchenreiche Plasma in den Auffangbeutel zu pumpen. Hier wäre der Einsatz einer isotonischen Kochsalzlösung als Ersatz für das fehlende „Spülblutvolumen“ denkbar.

Der Austritt von Patientenblut aus der Plasmasequestrierglocke bei der Herstellung des plättchenreichen Plasmas bei 2 Patienten der SORIN-Gruppe stellt einen weiteren Nachteil der SORIN-Methode dar. Hier muß geprüft werden, ob ein Blutaustritt durch den Austausch der Dichtungen verhindert werden kann.

In allen Studien wurde durch einen Zentrifugationsvorgang aus dem Vollblut ein plättchenreiches Plasma hergestellt, aus dem durch eine weitere Zentrifugation ein Thrombozytenkonzentrat gewonnen wurde. Die Zentrifugationsgeschwindigkeiten und -zeiten variierten in den einzelnen Studien.

Bei der SORIN-Methode wurde durch zwei sich unmittelbar anschließende Zentrifugationen ein plättchenreiches Plasma gewonnen, aus dem anschließend keine weitere Konzentration der Thrombozyten erfolgte. Bei der SAA-Methode wurde durch eine Zentrifugation aus dem Vollblut der Buffy-Coat, der die Thrombozyten und Leukozyten enthält, und nach einer Resuspensionszeit durch eine weitere Zentrifugation das Thrombozytenkonzentrat gewonnen.

Wie der Vergleich der Thrombozytenkonzentration im Vollblut mit der Thrombozytenkonzentration im plättchenreichen Plasma bei der SORIN-Methode zeigte, fand sich nur ein minimaler Anstieg der Thrombozytenkonzentration im plättchenreichen Plasma. Die gewünschte Anreicherung der Thrombozyten wurde also mit dieser Methode nicht erreicht. Dagegen war die Thrombozytenkonzentration in dem durch die SAA-Methode hergestellten Thrombozytenkonzentrat beinahe vierfach höher als die Thrombozytenkonzentration im Vollblut.

Durch Zusatz einer Thrombin-Calcium-Lösung wurde aus den in dem plättchenreichen Plasma und dem Thrombozytenkonzentrat enthaltenen Thrombozyten eine Degranulation der  $\alpha$ -Granula erreicht. Diese Methode wurde erstmals von Knighton et al. (1982) eingesetzt und bisher auch in allen weiteren Studien zur Herstellung einer thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung so beibehalten. Thrombin selbst trägt nach Ksander (1990) nicht zur Wundheilung bei.

Während das Volumen der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung bei Wang et al. (1996) 20ml und bei Knighton et al. (1986 und 1990) und Atri (1990) 10ml betrug, konnten wir mit beiden Methoden zwischen 50 und 70ml an thrombozytärer Wachstumsfaktorenlösung gewinnen. Der Unterschied zu den

## Diskussion

---

Studien von Knighton et al. (1986 und 1989) und Atri (1990) liegt darin begründet, daß das Ausgangsblutvolumen nur 60ml betrug.

Im Gegensatz zu den 10ml-Portionen, die in den Studien von Knighton et al. (1986 und 1990), Atri et al. (1990), Coerper et al. (1995) und Wunderlich (1997) zur Anwendung kamen, füllten wir die thrombozytäre Wachstumsfaktorenlösung in 2ml-Spritzen ab. Dies hat den Vorteil, daß pro Anwendungstag eine neue 2ml-Spritze aufgetaut werden kann und so ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Wachstumsfaktorenlösung, wie sie bei der Verwendung des 10ml-Aliquots nicht zu vermeiden ist, wegfällt.

Die Quantifizierung der in der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung enthaltenen Einzelfaktoren und des  $\beta$ -Thromboglobulins erfolgte wie in den anderen Studien mit der ELISA-Technik.

$\beta$ -Thromboglobulin ( $\beta$ -TG) ist ein thrombozytenspezifisches Protein, das in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichert ist und bei der Degranulation von Thrombozyten freigesetzt wird (Kaplan et al., 1979). Es hat ein Molekülgewicht von 35,4 kD (Kaplan und Owen, 1981) und ist identisch mit low-affinity platelet factor 4 (LA-PF4). Es ist also nicht nur ein Markerprotein für die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten, sondern wirkt auch selbst als Wachstumsfaktor chemotaktisch auf Fibroblasten (Senior et al., 1983). Die durchschnittliche Serumkonzentration liegt bei 20.670ng/ml (Bowen-Pope et al., 1984).

In der SORIN-Gruppe lag die  $\beta$ -TG-Konzentration mit 8.006ng/ml unter der Serumkonzentration und signifikant unter der  $\beta$ -TG-Konzentration in der SAA-Gruppe (28.814ng/ml). Die positive Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration im plättchenreichen Plasma bzw. im Thrombozytenkonzentrat und der  $\beta$ -TG-Konzentration zeigt, daß das gemessene  $\beta$ -TG auch in unserer Studie als Markerprotein für die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten angesehen werden kann.

In den vergleichbaren Studien mit thrombozytären Wachstumsfaktorenlösungen wurde  $\beta$ -TG in den Studien von Krupski et al. (1991), Holloway et al. (1993), Coerper et al. (1995) und Reutter et al. (1999) bestimmt. In der bei Krupski et

al. (1991) eingesetzten PDWHF-Lösung fanden sich  $\beta$ -TG-Konzentrationen zwischen 1.000ng/ml und 7.000ng/ml, aber erst Konzentrationen von  $\geq 15.000$ ng/ml werden als optimal angesehen (Krupski et al., 1991). Demzufolge liegt die  $\beta$ -TG-Konzentration in der SAA-Gruppe im optimalen Bereich, während sich die  $\beta$ -TG-Konzentration in der SORIN-Gruppe darunter befindet. Bei Holloway et al. (1993) wurde die homologe PDWHF-Lösung auf die  $\beta$ -TG-Konzentration von 24mg/ml je Lot standardisiert und liegt damit um den Faktor 1.000 höher als die  $\beta$ -TG-Konzentration in der SAA-Gruppe. Bei Coerper et al. (1995) wurde die PFDWHF-Lösung auf eine  $\beta$ -TG-Konzentration von 30 $\mu$ g/ml, bei Reutter et al. (1999) auf 300ng/ml verdünnt. Die bei Coerper et al. (1995) eingesetzte Wachstumsfaktorenlösung wies eine ähnliche  $\beta$ -TG-Konzentration wie in der SAA-Gruppe auf, während sich in der bei Reutter et al. (1999) eingesetzten PDWHF-Lösung sehr viel niedrigere Konzentrationen an  $\beta$ -TG fanden.

Die  $\beta$ -TG-Konzentrationen waren also in den beiden Studien (Krupski et al., 1991; Reutter et al., 1999), die keinen positiven Effekt der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung feststellen konnten, sehr viel niedriger.

Nach Holloway et al. (1993) besteht eine enge Korrelation zwischen der  $\beta$ -TG-Konzentration und den Konzentrationen der anderen in der Wachstumsfaktorenlösung vorkommenden Wachstumsfaktoren.

Aus diesem Grund korrelierten wir die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF- $\beta_1$  und EGF mit der  $\beta$ -TG-Konzentration. Für die Konzentrationen von PDGF-AB und TGF- $\beta_1$  fanden wir eine deutlich positive Korrelation. Diese positive Korrelation deckt sich mit den Ergebnissen von Assoian und Sporn (1986).

Die Korrelation zwischen der EGF-Konzentration und der  $\beta$ -TG-Konzentration zeigte ebenfalls eine positive Korrelation. Der Korrelationskoeffizient lag aber mit 0,53 deutlich unter den Korrelationskoeffizienten für die Korrelationen von  $\beta$ -TG und PDGF-AB bzw. TGF- $\beta_1$  (0,796 bzw. 0,85).

Die 3 Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF- $\beta_1$  und EGF sind daher wie  $\beta$ -TG in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichert und werden bei der

Thrombozytendegranulation in unsere Wachstumsfaktorenlösung freigesetzt. EGF ist in sehr viel geringerer Konzentration als die beiden anderen Wachstumsfaktoren vorhanden, was sich auch in der nur leicht positiven Korrelation zwischen  $\beta$ -TG und EGF widerspiegelt.

Dagegen konnten für bFGF nur zwei im unteren Bereich des linearen Meßbereichs liegende Konzentrationen gefunden werden. bFGF ist demnach nur in sehr geringer Konzentration in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichert. Das bestätigt die Aussage von Gospodarowicz (1991), wonach bFGF in die Basalmembran von FGF-produzierenden Zellen (Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Keratinozyten) eingebettet ist, zu denen die Thrombozyten nicht gezählt werden.

Die von uns ermittelten Konzentrationen von PDGF-AB zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. In der SORIN-Gruppe wurde eine PDGF-AB-Konzentration von 28.889pg/ml gefunden, während sie in der SAA-Gruppe bei 162.164pg/ml lag. Damit liegen die Konzentrationen beider Gruppen deutlich über den von Coerper et al. (1995) und Wunderlich (1997) ermittelten Konzentrationen von 2.630pg/ml und 1.500pg/ml. Bei Wang et al. (1996) wurde mit 5.222pg/ml ebenfalls eine niedrigere Konzentration für PDGF-AB gefunden.

Auch bei der TGF- $\beta_1$ -Konzentration gab es einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (18.689pg/ml in der SORIN-Gruppe vs. 69.087pg/ml in der SAA-Gruppe). Die TGF- $\beta_1$ -Konzentration beider Gruppen liegt ungefähr um den Faktor 0,5 unter den PDGF-AB-Konzentrationen und bestätigt damit die von Herndon et al. (1992) gefundenen Ergebnisse, daß TGF- $\beta_1$  in ähnlichen Konzentrationen in den Thrombozyten vorhanden ist wie PDGF. Wieder liegen die Konzentrationen in beiden Gruppen deutlich über den bei Coerper et al. (1995) und Wunderlich (1997) ermittelten TGF- $\beta_1$ -Konzentrationen (214pg/ml und 600pg/ml).

EGF war in deutlich niedrigerer Konzentration als PDGF-AB und TGF- $\beta_1$  in der Wachstumsfaktorenlösung enthalten. Auch bei der EGF-Konzentration gab es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der SAA- und der SORIN-

Gruppe mit Medianwerten von 311,8pg/ml vs. 65,7pg/ml. In der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung bei Wang et al. (1996) wurde für EGF mit 245pg/ml eine ähnliche Konzentration gefunden.

Wie die gemessenen Konzentrationen zeigen, kann mit beiden von uns eingesetzten Methoden eine thrombozytäre Wachstumsfaktorenlösung gewonnen werden, welche die erwarteten Wachstumsfaktoren PDGF-AB und TGF- $\beta_1$  in hohen Konzentrationen und EGF in geringerer Konzentration enthält. Zwischen beiden Methoden besteht aber ein signifikanter Unterschied in den gemessenen Konzentrationen der einzelnen Wachstumsfaktoren.

Obwohl die durch die SAA-Methode hergestellte Wachstumsfaktorenlösung signifikant höhere Wachstumsfaktorenkonzentrationen enthielt, schnitt sie bei den Wundheilungsergebnissen etwas schlechter ab als die durch die SORIN-Methode hergestellte Wachstumsfaktorenlösung. Damit wird wieder das zentrale Problem beim Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Wundbehandlung, nämlich die Frage nach der optimalen Konzentration, aufgeworfen (Steed, 1997).

In chronischen Ulzera wurden folgende Konzentrationsbereiche für die von uns untersuchten Wachstumsfaktoren gefunden: PDGF 49-867pg/ml, TGF- $\beta$  war in 17 von 20 Ulzera nicht detektierbar, EGF nicht-detektierbar-247pg/ml, bFGF 47-697pg/ml (Cooper et al., 1994). Robson et al. (2000) bestätigten diese Wachstumsfaktorenkonzentrationen in chronischen Druckulzera.

Die bei in-vitro-Untersuchungen eingesetzten Wachstumsfaktoren zeigten im Konzentrationsbereich von ng/ml die besten Ergebnisse hinsichtlich Proliferation und Chemotaxis der in der Wundheilung relevanten Zellen (Senior et al., 1983; Hebda et al., 1988). Dagegen wurden in der Behandlung chronischer Wunden beim Menschen mit Einzelfaktoren signifikant bessere Abheilungsergebnisse nur mit Wachstumsfaktorenkonzentrationen im  $\mu\text{g/ml}$ -Bereich gefunden (u. a. Falanga et al., 1992; Robson et al., 1992; Mustoe et al., 1994; Smiell et al., 1999).

Solch hohe Wachstumsfaktorenkonzentrationen werden in unserer wie in den anderen thrombozytären Wachstumsfaktorenlösungen nicht erreicht. Dennoch konnten mit thrombozytären Wachstumsfaktorenlösungen ebenso gute

Ergebnisse wie mit der Einzelfaktorenapplikation erzielt werden. Deshalb spielt wahrscheinlich nicht nur die absolute Konzentration eine wichtige Rolle. Eine physiologische Kombination und die richtigen Konzentrationsverhältnisse der Wachstumsfaktoren untereinander scheinen zusätzlich wichtige Faktoren zu sein.

Die Frage nach der optimalen Konzentration und Zusammensetzung einer Wachstumsfaktorenlösung bleibt aber weiterhin ungeklärt und limitiert den Einsatz thrombozytärer Wachstumsfaktorenlösungen in der Wundbehandlung.

### **4.3 Histologische und immunhistochemische Ergebnisse**

Neben der makroskopischen Beurteilung der Wundverhältnisse führten wir zusätzlich Biopsieentnahmen durch, um den Effekt der topischen Applikation der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung auch auf mikroskopischer Ebene beurteilen zu können. Eine Oberschenkelbiopsie, die am gleichen Bein entnommen wurde, diente dem Vergleich mit normaler Haut.

Da nicht von allen Patienten Oberschenkel- und Wundrandbiopsien entnommen bzw. ausgewertet werden konnten und Wundrandbiopsien mit einem Durchmesser von 4mm immer nur einen kleinen Ausschnitt der chronischen Wunden zeigen, muss man davon ausgehen, dass unsere Ergebnisse nur einen begrenzten Aussagewert haben. Im Gegensatz dazu können die im Tiermodell erzeugten chronischen Wunden in toto entnommen und analysiert werden. Bei den menschlichen Wundrandbiopsien bleibt immer die Frage offen, ob der gewählte Ausschnitt für die ganze Wunde repräsentativ ist (Pierce et al., 1994). Dieses Problem trägt sicherlich zu den z. T. sehr heterogenen Ergebnissen bei den von uns untersuchten Parametern bei.

Die Wundrandbiopsien waren in der HE-Färbung deutlich von normaler Haut zu unterscheiden. Die Epidermis wies sowohl in den Wundrandbiopsien am 1. Behandlungstag als auch am 14. Behandlungstag eine deutlich höhere Zahl an Zellreihen und eine verdickte Hornschicht auf. Im Granulationsgewebe und

auch im Korium der Wundrandbiopsien waren viele Rundzellen zu sehen. In allen Wundrandbiopsien zeigte sich das Bild einer deutlichen Akanthose und eines Entzündungsprozesses, was in Einklang mit den Ergebnissen von Andriessen et al. (1995) bei chronischen Wunden steht. Ein morphologischer Unterschied nach 14-tägiger Behandlung mit der Wachstumsfaktorenlösung konnte in beiden Behandlungsgruppen nicht festgestellt werden.

Die Neubildung von Blutgefäßen (Neoangiogenese) stellt für die Wunde einen essentiellen Prozeß dar, da durch neu einsprossende Kapillaren der für die weiteren Heilungsvorgänge notwendige Sauerstofftransport in das Narbengewebe erfolgt (Vogt et al., 2000). In Arbeiten mit tierischen Wundmodellen konnte eine Zunahme der Gefäße durch eine Migration und Proliferation von Endothelzellen unter dem Einfluß einer Wachstumsfaktorenbehandlung mit rekombinantem bFGF beobachtet werden (Tsuboi und Rifkin, 1990; Pierce et al., 1992; Tanaka et al., 1996). Dagegen führte die Applikation von bFGF bei Mustoe et al. (1991) zu keiner signifikanten Zunahme der Neoangiogenese.

Bei der Applikation von TGF- $\beta_1$  wurde ebenfalls eine signifikante Induktion der Angiogenese in der Wundheilung von Mäusen gefunden (Fajardo et al., 1996). Beim Menschen konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. So führte der Einsatz von rekombinantem bFGF bei chronischen Druckulzera zu einer deutlichen Zunahme der Kapillardichte (Robson et al., 1992). Eine erhöhte Neoangiogenese in Druckulzera wurde auch nach der Behandlung mit PDGF-BB berichtet (Pierce et al., 1994). Trotz der fraglichen Wirksamkeit der bei ihnen eingesetzten PDWHF-Lösung konnten Reutter et al. (1999) eine Zunahme der Kapillardichte am Ulcusrand durch Kapillaroskopie feststellen und vermuteten daher eine neoangiogenetische Eigenschaft für die PDWHF-Lösung.

Um den Effekt der thrombozytären Wachstumsfaktorenkombination auf die Gefäßdichte zu untersuchen, wählten wir die immunhistochemische Anfärbung der vaskulären Endothelzellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das CD34-Antigen. Dieser Antikörper richtet sich gegen ein glykosyliertes Transmembranprotein, das sich in Endothelzellen und menschlichen

Blutvorläuferzellen findet (Fina et al., 1990). Wie bei Kimura et al. (1998) und Yoshida et al. (2000) beschrieben, wurden die Regionen mit der höchsten Gefäßdichte ausgewählt und dort die Gefäßzahl pro  $\text{mm}^2$  mit Hilfe des Quantimet 600-Systems bestimmt.

Im Vergleich zu den Oberschenkelbiopsien lag die Gefäßdichte in den Wundrandbiopsien beider Gruppen vor der Wachstumsfaktorenbehandlung etwa doppelt so hoch. Nach der 14-tägigen Behandlungszeit hatte die Gefäßdichte jedoch nicht wie erwartet zugenommen, sondern abgenommen. Sie lag aber immer noch deutlich über der Anzahl CD34-positiver Gefäße in der gesunden Haut. Eine mögliche Erklärung für ein Ausbleiben einer Neoangiogenese könnte darin liegen, daß der Wachstumsfaktor mit der höchsten angiogenetischen Potenz (Folkman und Klagsbrun, 1987), bFGF, praktisch nicht in unserer Wachstumsfaktorenlösung vorhanden war. Eine weitere wahrscheinliche Erklärung liegt in der subjektiven Auswahl der Biopsieregionen, in der die Gefäßdichte bestimmt wurden. In den Wundrandbiopsien des 1. Behandlungstages wurde mit Werten zwischen 78 und 438 CD34-positiven Gefäßen pro  $\text{mm}^2$  eine sehr große Variabilität in der Anzahl CD34-positiver Gefäße gefunden. Auch Pierce et al. (1994) fanden in den mit PDGF-BB behandelten Wunden eine sehr große Variabilität der Gefäßdichte in ihren Punchbiopsien.

Der Prozeß der Wundheilung geht neben einer Neoangiogenese mit einer gesteigerten Proliferation der bei der Wundheilung beteiligten Zellen einher. Diese Proliferationsrate wird auch durch Wachstumsfaktoren gesteuert. So wirken PDGF und EGF auf Zellen im  $G_0$ -Stadium (Knighton et al., 1990) und bewirken einen Eintritt dieser Zellen in die S-Phase (Brown et al., 1986).

Das proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ist ein Zellkernprotein, das während der S-Phase des Zellzykluses synthetisiert wird und ein obligatorischer Kofaktor der DNA-Polymerase  $\delta$  ist (Levine et al., 1998). Die Anzahl PCNA-positiver Zellen eignet sich als Index für die Zellproliferation (Hall et al., 1990).

Die immunhistochemische Anfärbung von Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen PCNA stellt hierbei eine etablierte Methode dar (Garcia et al., 1989).

Wie bei der CD34-Auswertung wurden auch bei der PCNA-Auswertung die Regionen mit der stärksten Anfärbung vom Untersucher ausgewählt, wie es in den Untersuchungen von Garcia et al. (1989) und Mattern et al. (1997) praktiziert worden war.

In der Epidermis der Oberschenkelbiopsien fanden wir trotz der Variabilität in der Anzahl der PCNA-positiven Zellen keine oder nur vereinzelte positive Zellen in der basalen und suprabasalen Zellreihe. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Levine et al. (1998) und Furukawa et al. (1992).

Die Epidermis in den Wundrandbiopsien wies dagegen in der Mehrzahl eine durchgängige Anfärbbarkeit der basalen und suprabasalen Keratinozyten auf. In zwei Wundrandbiopsien des 1. Behandlungstages wurden allerdings keine PCNA-positive Zellen gefunden. Abgesehen von diesen beiden Wundrandbiopsien, konnten wir keine Unterschiede zwischen den Wundrandbiopsien des 1. und des 14. Behandlungstages feststellen. Insbesondere eine Zunahme der PCNA-positiven Zellen in der Epidermis nach 14-tägiger Behandlung war nicht zu sehen. Andriessen et al. (1995) postulierten, daß die epidermale Proliferation bei chronischen Ulzera im Vergleich zur normalen Wundheilung nicht gestört ist. Wenn diese Hypothese zutrifft, dann sollte die Behandlung chronischer Wunden mit einer Wachstumsfaktorenlösung auch zu keiner Änderung der Proliferationsrate in der Epidermis führen und wäre eine mögliche Erklärung unserer Ergebnisse.

Auch bei der Zahl der PCNA-positiven Zellen im Korium und Granulationsgewebe gab es eine erhebliche Variabilität in der Anzahl PCNA-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> in den Wundrandbiopsien. Das könnte zum einen daran liegen, daß die PCNA-Färbung eine sehr inhomogene Färbung ist, bei der u. a. die Fixierungszeit der Biopsien in Formalin eine entscheidende Rolle spielt (Hall et al., 1990). Vier der Wundrandbiopsien waren etwas länger in dem 4%igen Paraformaldehyd aufbewahrt worden. Zum anderen können die großen Unterschiede auch auf die in den ausgezählten Feldern vorherrschende Zellart

zurückzuführen sein, wie Garcia et al. (1989) betonen. Wählt der Untersucher ein Feld aus, in dem hauptsächlich Entzündungszellen zu finden sind, muss man davon ausgehen, daß die Zellen in diesem Feld eine höhere Proliferationsrate aufweisen als in einem Feld, in dem mehrheitlich Stromazellen vorkommen. Wir analysierten sowohl das Granulationsgewebe als auch das Korium in den Wundrandbiopsien. Da das Granulationsgewebe die größere Anzahl an Entzündungszellen enthält, kann die Auswahl der am stärksten gefärbten Felder das Ergebnis trotz der automatisierten Detektion der PCNA-positiven Zellen stark beeinflussen und zu der beobachteten großen Variabilität führen.

In den Oberschenkelbiopsien waren nur ganz vereinzelt PCNA-positive Zellen im Korium vorhanden. Im Gegensatz dazu waren in den Wundrandbiopsien des 1. Behandlungstages deutlich mehr proliferierende Zellen zu sehen. Zwischen beiden Gruppen gab es einen deutlichen Unterschied in der Anzahl PCNA-positiver Zellen (598 in der SORIN-Gruppe vs. 197 in der SAA-Gruppe), der auf oben angeführte Gründe zurückgeführt werden muss. In beiden Behandlungsgruppen kam es zu einer Zunahme der PCNA-positiven Zellen nach der 14-tägigen Behandlung mit dem thrombozytären Wachstumsfaktorengemisch. Der stärkere Anstieg wurde dabei in der SAA-Gruppe verzeichnet (770 in der SORIN-Gruppe vs. 433 in der SAA-Gruppe). In beiden Gruppen lag also in den von uns untersuchten Wundrandbiopsien eine stärkere Proliferationsrate nach der 14-tägigen Behandlung mit der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung vor. Dies könnte auf die Wirkung der hinsichtlich der Proliferation als Kompetenzfaktoren anzusehenden Wachstumsfaktoren PDGF und EGF zurückzuführen sein, die sich ja beide in der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung fanden.

Zusammenfassend läßt sich nur eine eingeschränkte Aussage aus den histologischen und immunhistochemischen Ergebnissen ableiten, was natürlich auch an der begrenzten Zahl an Wundrandbiopsien liegt. Alle Wundrandbiopsien des 1. und 14. Behandlungstages unterschieden sich von der gesunden Haut deutlich in ihrer Morphologie, Gefäßdichte und

Proliferationsrate. Eine vermehrte Neoangiogenese konnte nach einer 14-tägigen Behandlungszeit mit der thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung nicht gefunden werden. Dagegen kam es im Granulationsgewebe und im Korium zu einer Zunahme der Proliferationsrate, während die Keratinozyten keine erhöhte Proliferation zeigten. Auch auf mikroskopischer Ebene konnte also kein eindeutiger wundheilungsfördernder Effekt durch die thrombozytäre Wachstumsfaktorenlösung beobachtet werden.

Trotz der Behandlung chronischer Wunden in spezialisierten, interdisziplinären Wundzentren erweisen sich viele chronische Wunden nach Einsatz standardisierter prophylaktischer und kausalthérapeutischer Behandlungsmöglichkeiten als weiterhin therapierefraktär. Mit der topischen Anwendung von thrombozytären Wachstumsfaktoren konnte in früheren Studien die Wundheilung bei chronischen Wunden beschleunigt werden und diese zur vollständigen Abheilung gebracht werden. In dieser Arbeit kamen zwei unterschiedliche Methoden zur Herstellung einer autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenkombination aus 500ml Patientenblut zum Einsatz, die auf eine zukünftige routinemäßige klinische Anwendung und auf ihre Wachstumsfaktorkonzentrationen untersucht wurden. In einer sich anschließenden Anwendungsstudie wurde der wundheilungsfördernde Effekt der Wachstumsfaktorenkombinationen in einem Behandlungszeitraum von 28 Tagen bei 21 Patienten mit chronischen Hautwunden überprüft.

Die SORIN-Methode (10 Patienten) zeigte sich sowohl durch technische Probleme als auch durch eine signifikant niedrigere Konzentration an gewonnenen Thrombozyten und an den Wachstumsfaktoren PDGF-AB, TGF- $\beta_1$  und EGF gegenüber der SAA-Methode (11 Patienten) unterlegen. Eine Korrelationsanalyse konnte zeigen, daß diese Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten stammen und durch die Degranulation der  $\alpha$ -Granula freigesetzt werden. bFGF konnte dagegen nur in 2 der 21 thrombozytären Wachstumsfaktorenkombinationen nachgewiesen werden. Nach der 28-tägigen ambulanten Behandlungszeit konnte keine der 21 chronischen Wunden zur kompletten Abheilung (100%ige Epithelialisierung) gebracht werden. Bei 7 von 10 Wunden der SORIN-Gruppe und bei 6 von 11 Wunden der SAA-Gruppe konnte jedoch eine Verbesserung der Wundsituation durch Wundverkleinerung und Zunahme des Granulationsgewebes erreicht werden, was bei dem kurzen Behandlungszeitraum und dem negativ selektierten Wundkollektiv nicht

unterschätzt werden darf. Bei den mit den höheren Wachstumsfaktorkonzentrationen behandelten chronischen Wunden der SAA-Gruppe zeigte sich keine verbesserte Wundheilung gegenüber den Wunden der SORIN-Gruppe. Histologisch und immunhistochemisch konnte nach einem 14-tägigen Behandlungszeitraum eine Zunahme der proliferierenden Zellen in den chronischen Wunden gefunden werden, während sich die Zahl an Blutgefäßen nicht veränderte.

Eine abschließende Beurteilung eines Einsatzes einer durch unsere beiden Methoden gewonnenen autologen thrombozytären Wachstumsfaktorkombination bei chronischen Wunden kann aber nur nach Durchführung einer plazebokontrollierten, doppelblinden Folgestudie mit einer größeren Patientenzahl erfolgen. In einer solchen Studie sollte außerdem ein längerer Beobachtungszeitraum gewählt werden, um die wichtige Frage einer Rezidivhäufigkeit der chronischen Wunden klären zu können.

**Andriessen, M. P., van Bergen, B. H., Spruijt, K. I., Go, I. H., Schalkwijk, J., van de Kerkhof, P. C.**

Epidermal proliferation is not impaired in chronic venous ulcers  
Acta Derm.Venereol. (1995) 75: 459-462

**Ansel, J. C., Tiesman, J. P., Olerud, J. E., Krueger, J. G., Krane, J. F., Tara, D. C., Shipley, G. D., Gilbertson, D., Usui, M. L., Hart, C. E.**

Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor  
J.Clin.Invest. (1993) 92: 671-678

**Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M., Sporn, M. B.**

Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization  
J.Biol.Chem. (1983) 258: 7155-7160

**Assoian, R. K., Grotendorst, G. R., Miller, D. M., Sporn, M. B.**

Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets  
Nature (1984) 309: 804-806

**Assoian, R. K., Sporn, M. B.**

Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells  
J.Cell Biol. (1986) 102: 1217-1223

**Atri, S. C., Misra, J., Bisht, D., Misra, K.**

Use of homologous platelet factors in achieving total healing of recalcitrant skin ulcers  
Surgery (1990) 108: 508-512

**Bennett, N. T., Schultz, G. S.**

Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors  
Am.J.Surg. (1993) 165: 728-737

**Bennett, N. T., Schultz, G. S.**

Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing  
Am.J.Surg. (1993) 166: 74-81

- Bowen-Pope, D. F., Malpass, T. W., Foster, D. M., Ross, R.**  
Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity, and rate of clearance  
Blood (1984) 64: 458-469
- Broadley, K. N., Aquino, A. M., Woodward, S. C., Buckley-Sturrock, A., Sato, Y., Rifkin, D. B., Davidson, J. M.**  
Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair  
Lab Invest (1989) 61: 571-575
- Brown, D. L., Kao, W. W., Greenhalgh, D. G.**  
Apoptosis down-regulates inflammation under the advancing epithelial wound edge: delayed patterns in diabetes and improvement with topical growth factors  
Surgery (1997) 121: 372-380
- Brown, G. L., Curtsinger, L., Brightwell, J. R., Ackerman, D. M., Tobin, G. R., Polk, H. C., George-Nascimento, C., Valenzuela, P., Schultz, G. S.**  
Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor  
J.Exp.Med. (1986) 163: 1319-1324
- Brown, G. L., Curtsinger, L. J., White, M., Mitchell, R. O., Pietsch, J., Nordquist, R., von Fraunhofer, A., Schultz, G. S.**  
Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- beta  
Ann.Surg. (1988) 208: 788-794
- Brown, G. L., Nanney, L. B., Griffen, J., Cramer, A. B., Yancey, J. M., Curtsinger, L. J., Holtzin, L., Schultz, G. S., Jurkiewicz, M. J., Lynch, J. B.**  
Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor  
N.Engl.J.Med. (1989) 321: 76-79
- Brown, G. L., Curtsinger, L., Jurkiewicz, M. J., Nahai, F., Schultz, G.**  
Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor  
Plast.Reconstr.Surg. (1991) 88: 189-194
- Brown, R. L., Breeden, M. P., Greenhalgh, D. G.**  
PDGF and TGF-alpha act synergistically to improve wound healing in the genetically diabetic mouse  
J.Surg.Res. (1994) 56: 562-570
- Bucalo, B., Eaglstein, W. H., Falanga, V.**  
The effect of chronic wound fluid cell proliferation in vitro (abstr.)  
J.Invest.Dermatol. (1989) 92: 408
- Coerper, S., Köveker, G. B.**  
Stimulation der Wundheilung durch thrombozytäre Wachstumsfaktoren  
in: Sedlarik, K.: Wundheilung, 291-297  
2.Aufl., Gustav Fischer Verlag, Jena (1993)

**Coerper, S., Köveker, G. B., Flesch, I., Becker, H. D.**

Ulcus Cruris Venosum: Chirurgisches Debridement, antibiotische Therapie und Stimulation mit thrombozytären Wachstumsfaktoren  
Langenbecks Arch.Chir. (1995) 380: 102-107

**Cohen, S.**

Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal  
J.Biol.Chem. (1962) 237: 1555-1562

**Cooper, D. M., Yu, E. Z., Hennessey, P., Ko, F., Robson, M. C.**

Determination of endogenous cytokines in chronic wounds  
Ann.Surg. (1994) 219: 688-691

**Cromack, D. T., Pierce, G. F., Mustoe, T. A.**

TGF-beta and PDGF mediated tissue repair: identifying mechanisms of action using impaired and normal models of wound healing  
Prog.Clin.Biol.Res. (1991) 365: 359-373

**Cromack, D. T., Porras-Reyes, B., Purdy, J. A., Pierce, G. F., Mustoe, T. A.**

Acceleration of tissue repair by transforming growth factor beta 1: identification of in vivo mechanism of action with radiotherapy-induced specific healing deficits  
Surgery (1993) 113: 36-42

**d'Hemecourt, P. A., Smiell, J. M., Karim, M. R.**

Sodium carboxymethylcellulose aqueous-based gel vs. becaplermin gel in patients with nonhealing lower extremity diabetic ulcers  
Wounds (1998) 10: 69-75

**Debus, E. S., Schmidt, K., Ziegler, U. E., Thiede, A.**

Die Rolle der Wachstumsfaktoren in der Wundheilung  
Zentralbl.Chir. (2000) Suppl 1: 49-55

**Debus, E. S., Schmidt, K., Ziegler, U. E., Thiede, A.**

Wachstumsfaktoren in der Wundheilung  
Zeitschrift für Wundheilung (2000) 12: 14-33

**Doucette, M. M., Fylling, C. P., Knighton, D. R.**

Amputation prevention in a high-risk population through comprehensive wound-healing protocol  
Arch.Phys.Med.Rehab. (1989) 70: 780-785

**Eaglstein, W. H., Falanga, V.**

Chronic wounds  
Surg.Clin.North Am. (1997) 77: 689-700

**Fajardo, L. F., Prionas, S. D., Kwan, H. H., Kowalski, J., Allison, A. C.**  
Transforming growth factor beta1 induces angiogenesis in vivo with a threshold pattern  
Lab Invest (1996) 74: 600-608

**Falanga, V., Eaglstein, W. H., Bucalo, B., Katz, M. H., Harris, B., Carson, P.**  
Topical use of human recombinant epidermal growth factor (h-EGF) in venous ulcers  
J.Dermatol.Surg.Oncol. (1992) 18: 604-606

**Falanga, V.**  
Chronic wounds: pathophysiologic and experimental considerations  
J.Invest Dermatol. (1993) 100: 721-725

**Falanga, V., Eaglstein, W. H.**  
The "trap hypothesis" of venous ulceration  
Lancet (1993) 341: 1006-1008

**Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A., Greaves, M. F.**  
Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells  
Blood (1990) 75: 2417-2426

**Flesch, I., Köveker, G.B., Tolksdorf-Kremmer, A., Coerper, S., Becker, H. D.**  
Stimulation der Wundheilung mit thrombozytären Wachstumsfaktoren bei der Behandlung chronisch nicht-heilender Wunden  
Handchir.Mikrochir.Plast.Chir. (1994) 26: 160-164

**Folkman, J., Klagsbrun, M.**  
Angiogenic factors  
Science (1987) 235: 442-447

**Furukawa, F., Imamura, S., Fujita, M., Kinoshita, K., Yoshitake, K., Brown, W. R., Norris, D. A.**  
Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen/cyclin in human skin  
Arch.Dermatol.Res. (1992) 284: 86-91

**Garcia, R. L., Coltrera, M. D., Gown, A. M.**  
Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis  
Am.J.Pathol. (1989) 134: 733-739

**Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L., Neufeld, G.**  
Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor  
Endocr.Rev. (1987) 8: 95-114

**Gospodarowicz, D., Plouet, J., Malerstein, B.**

Comparison of the ability of basic and acidic fibroblast growth factor to stimulate the proliferation of an established keratinocyte cell line: modulation of their biological effects by heparin, transforming growth factor beta (TGF beta), and epidermal growth factor (EGF)

J.Cell Physiol. (1990) 142: 325-333

**Gospodarowicz, D.**

Biological activities of fibroblast growth factors

Ann.N.Y.Acad.Sci. (1991) 638:1-8

**Greenhalgh, D. G., Sprugel, K. H., Murray, M. J., Ross, R.**

PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse

Am.J.Pathol. (1990) 136: 1235-1246

**Grotendorst, G. R., Soma, Y., Takehara, K., Charette, M.**

EGF and TGF-alpha are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration

J.Cell Physiol. (1989) 139: 617-623

**Guzman-Gerdezabal, E., Salas-Colin, S., Paz-Janeiro, J. L., Alvarado-Ruiz, R., Garcia-Salazar, R.**

Treatment of Chronic Ulcers in the Lower Extremities with Topical Becaplermin Gel .01%: A Multicenter Open-label Study

Advances in Therapy (2000) 4: 184-189

**Hall, P. A., Levison, D. A., Woods, A. L., Yu, C. C., Kellock, D. B., Watkins, J. A., Barnes, D. M., Gillett, C. E., Camplejohn, R., Dover, R., .**

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms

J.Pathol. (1990) 162: 285-294

**Hammacher, A., Hellmann, U., Johnsson, A., Ostman, A., Gunnarsson, K., Westermarck, B., Wasteson, A., Heldin, C. H.**

A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain

J.Biol.Chem. (1988) 263: 16493-16498

**Hart, C. E., Bailey, M., Curtis, D. A., Osborn, S., Raines, E., Ross, R., Forstrom, J. W.**

Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets

Biochemistry (1990) 29: 166-172

**Hebda, P. A.**

Stimulatory effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on epidermal cell outgrowth from porcine skin explant cultures

J.Invest. Dermatol. (1988) 91: 440-445

**Hennessey, P. J., Black, C. T., Andrassy, R. J.**

EGF increases short-term type I collagen accumulation during wound healing in diabetic rats

J.Pediatr.Surg. (1990) 25: 893-897

**Herndon, D. N., Hayward, P. G., Rutan, R. L., Barrow, R. E.**

Growth hormones and factors in surgical patients

Adv.Surg. (1992) 25: 65-97

**Holloway, G. A., Steed, D. L., DeMarco, M. J., Masumoto, T., Moosa, H. H., Webster, M. W., Bunt, T. J., Polansky, M.**

A Randomized, Controlled, Multicenter, Dose Response Trial of Activated Platelet Supernatant, Topical CT-102 in Chronic, Nonhealing, Diabetic Wounds  
Wounds (1993) 4: 198-206

**Ibelgaufts, H.**

Lexikon Zytokine

Medikon Verlag, München (1992)

**Kaplan, D. R., Chao, F. C., Stiles, C. D., Antoniades, H. N., Scher, C. D.**

Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts

Blood (1979) 53: 1043-1052

**Kaplan, K. L., Owen, J.**

Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo

Blood (1981) 57: 199-202

**Katz, M. H., Alvarez, A. F., Kirsner, R. S., Eaglstein, W. H., Falanga, V.**

Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth

J.Am.Acad.Dermatol. (1991) 25: 1054-1058

**Kimura, H., Nakajima, T., Kagawa, K., Deguchi, T., Kakusui, M., Katagishi, T., Okanou, T., Kashima, K., Ashihara, T.**

Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry

Liver (1998) 18: 14-19

**King, L. E., Gates, R. E., Stoscheck, G. M., Nanney, L. B.**

The EGF/TGF $\alpha$  receptor in skin

J.Invest Dermatol. (1990) 94: 164S-170S

**Kingsnorth, A. N., Slavin, J.**

Peptide growth factors and wound healing

Br.J.Surg. (1991) 78: 1286-1290

**Knighton, D. R., Hunt, T. K., Thakral, K. K., Goodson, W. H.**

Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis  
Ann.Surg. (1982) 196: 379-388

**Knighton, D. R., Ciresi, K. F., Fiegel, V. D., Austin, L. L., Butler, E. L.**

Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF)  
Ann.Surg. (1986) 204: 322-330

**Knighton, D. R., Ciresi, K., Fiegel, V. D., Schumerth, S., Butler, E., Cerra, F.**

Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula  
Surg.Gynecol.Obstet. (1990) 170: 56-60

**Knighton, D. R., Fiegel, V. D.**

Regulation of cutaneous wound healing by growth factors and the microenvironment  
Invest. Radiol. (1991) 26: 604-611

**Krupski, W. C., Reilly, L. M., Perez, S., Moss, K. M., Crombleholme, P. A., Rapp, J. H.**

A prospective randomized trial of autologous platelet-derived wound healing factors for treatment of chronic nonhealing wounds: a preliminary report  
J.Vasc.Surg. (1991) 14: 526-532

**Ksander, G. A., Ogawa, Y., Chu, G. H., McMullin, H., Rosenblatt, J. S., McPherson, J. M.**

Exogenous transforming growth factor-beta 2 enhances connective tissue formation and wound strength in guinea pig dermal wounds healing by secondary intent  
Ann.Surg. (1990) 211: 288-294

**Laato, M., Kahari, V. M., Niinikoski, J., Vuorio, E.**

Epidermal growth factor increases collagen production in granulation tissue by stimulation of fibroblast proliferation and not by activation of procollagen genes  
Biochem.J. (1987) 247: 385-388

**Lawrence, W. T., Norton, J. A., Sporn, M. B., Gorschboth, C., Grotendorst, G. R.**

The reversal of an Adriamycin induced healing impairment with chemoattractants and growth factors  
Ann.Surg. (1986) 203: 142-147

**Levine, R., Agren, M. S., Mertz, P. M.**

Effect of occlusion on cell proliferation during epidermal healing  
J.Cutan.Med.Surg. (1998) 2: 193-198

**Lippert, H.**

Wundatlas - Wunde, Wundbehandlung und Wundheilung  
Barth Verlag in MVH Medizinverlage, Heidelberg (2001)

**Lynch, S. E., Nixon, J. C., Colvin, R. B., Antoniadis, H. N.**

Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (1987) 84: 7696-7700

**Mast, B. A., Schultz, G. A.**

Interactions of cytokines, growth factors and proteases in acute and chronic wounds  
Wound.Repair Regen. (1996) 4: 411-420

**Mattern, J., Koomagi, R., Volm, M.**

Coexpression of VEGF and bFGF in human epidermoid lung carcinoma is associated with increased vessel density  
Anticancer Res. (1997) 17: 2249-2252

**Meyer-Ingold, W., Eichner, W.**

Platelet-derived growth factor  
Cell Biol.Int. (1995) 19: 389-398

**Muller, G., Behrens, J., Nussbaumer, U., Bohlen, P., Birchmeier, W.**

Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (1987) 84: 5600-5604

**Mustoe, T. A., Pierce, G. F., Morishima, C., Deuel, T. F.**

Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model  
J.Clin.Invest (1991) 87: 694-703

**Mustoe, T. A., Cutler, N. R., Allman, R. M., Goode, P. S., Deuel, T. F., Prause, J. A., Bear, M., Serdar, C. M., Pierce, G. F.**

A phase II study to evaluate recombinant platelet-derived growth factor- BB in the treatment of stage 3 and 4 pressure ulcers  
Arch.Surg. (1994) 129: 213-219

**Nath, C., Gulati, S. C.**

Role of cytokines in healing chronic skin wounds  
Acta Haematol. (1998) 99: 175-179

**Newman, D.**

Effect of platelet derived wound healing factors (PDWHF) on fibroblast mitogenic assay (abstract)  
J.Cell Biochem. (1990) Suppl. 14E: 253

**Oka, Y., Orth, D. N.**

Human plasma epidermal growth factor/beta-urogastrone is associated with blood platelets

J.Clin.Invest (1983) 72: 249-259

**Peus, D., Jungtäubl, H., Knaub, S., Leuker, A., Gerecht, K., Ostendorf, R., Meyer-Ingold, W., Wlaschek, M.**

Localization of platelet-derived growth factor receptor subunit expression in chronic venous leg ulcers

Wound.Repair Regen. (1995) 3: 116-122

**Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Altmann, B. W., Deuel, T. F., Thomason, A.**

Role of platelet-derived growth factor in wound healing

J.Cell Biochem. (1991) 45: 319-326

**Pierce, G. F., Tarpley, J. E., Yanagihara, D., Mustoe, T. A., Fox, G. M., Thomason, A.**

Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair

Am.J.Pathol. (1992) 140: 1375-1388

**Pierce, G. F., Tarpley, J. E., Allman, R. M., Goode, P. S., Serdar, C. M., Morris, B., Mustoe, T. A., Vande, B. J.**

Tissue repair processes in healing chronic pressure ulcers treated with recombinant platelet-derived growth factor BB

Am.J.Pathol. (1994) 145: 1399-1410

**Pierce, G. F., Tarpley, J. E., Tseng, J., Bready, J., Chang, D., Kenney, W. C., Rudolph, R., Robson, M. C., Vande, B. J., Reid, P., .**

Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds

J.Clin.Invest (1995) 96: 1336-1350

**Postlethwaite, A. E., Keski-Oja, J., Moses, H. L., Kang, A. H.**

Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta

J.Exp.Med. (1987) 165: 251-256

**Puolakkainen, P. A., Twardzik, D. R., Ranchalis, J. E., Pankey, S. C., Reed, M. J., Gombotz, W. R.**

The enhancement in wound healing by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) depends on the topical delivery system

J.Surg.Res. (1995) 58: 321-329

**Reutter, H., Bort, S., Jung, M. F., Klyszcz, T., Schippert, W., Zuder, D., Junger, M.**

Fraglich Wirksamkeit autologer thrombozytärer Wachstumsfaktoren (PDWHF) in der Behandlung venöser Beinulzera  
Hautarzt (1999) 50: 859-865

**Richard, J. L., Parer-Richard, C., Daures, J. P., Clouet, S., Vannereau, D., Bringer, J., Rodier, M., Jacob, C., Comte-Bardonnet, M.**

Effect of topical basic fibroblast growth factor on the healing of chronic diabetic neuropathic ulcer of the foot. A pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled study  
Diabetes Care (1995) 18: 64-69

**Roberts, A. B., Anzano, M. A., Wakefield, L. M., Roche, N. S., Stern, D. F., Sporn, M. B.**

Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (1985) 82: 119-123

**Robinson, C. J.**

Growth factors: therapeutic advances in wound healing  
Ann.Med. (1993) 25: 535-538

**Robson, M. C., Phillips, L. G., Lawrence, W. T., Bishop, J. B., Youngerman, J. S., Hayward, P. G., Broemeling, L. D., Heggors, J. P.**

The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores  
Ann.Surg. (1992) 216: 401-406

**Robson, M. C., Phillips, L. G., Thomason, A., Robson, L. E., Pierce, G. F.**  
Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers  
Lancet (1992) 339: 23-25

**Robson, M. C., Hill, D. P., Smith, P. D., Wang, X., Meyer-Siegler, K., Ko, F., VandeBerg, J. S., Payne, W. G., Ochs, D., Robson, L. E.**

Sequential cytokine therapy for pressure ulcers: clinical and mechanistic response  
Ann.Surg. (2000) 231: 600-611

**Ross, R., Glomset, J. A. K. B. H. L.**

A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (1974) 71: 1207-1210

**Ross, R., Raines, E. W., Bowen-Pope, D. F.**

The biology of platelet-derived growth factor  
Cell (1986) 46: 155-169

**Rutherford, R. B., Ross, R.**

Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate  
J.Cell Biol. (1976) 69: 196-203

**Schmid, P., Cox, D., Bilbe, G., McMaster, G., Morrison, C., Stahelin, H., Luscher, N., Seiler, W.**

TGF-beta s and TGF-beta type II receptor in human epidermis: differential expression in acute and chronic skin wounds  
J.Pathol. (1993) 171: 191-197

**Senior, R. M., Griffin, G. L., Huang, J. S., Walz, D. A., Deuel, T. F.**

Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts  
J.Cell Biol. (1983) 96: 382-385

**Siegbahn, A., Hammacher, A., Westermarck, B., Heldin, C. H.**

Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes  
J.Clin.Invest (1990) 85: 916-920

**Singer, A. J., Clark, R. A.**

Cutaneous wound healing  
N.Engl.J.Med. (1999) 341: 738-746

**Smiell, J. M., Wieman, T. J., Steed, D. L., Perry, B. A., Sampson, A. R., Schwab, B. H.**

Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies  
Wound.Repair Regen. (1999) 7: 335-346

**Soma, Y., Grotendorst, G. R.**

TGF-beta stimulates primary human skin fibroblast DNA synthesis via an autocrine production of PDGF-related peptides  
J.Cell Physiol (1989) 140: 246-253

**Sporn, M. B., Roberts, A. B., Shull, J. H., Smith, J. M., Ward, J. M., Sodek, J.**

Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo  
Science (1983) 219: 1329-1331

**Steed, D. L., Goslen, J. B., Holloway, G. A., Malone, J. M., Bunt, T. J., Webster, M. W.**

Randomized prospective double-blind trial in healing chronic diabetic foot ulcers. CT-102 activated platelet supernatant, topical versus placebo  
Diabetes Care (1992) 15: 1598-1604

**Steed, D. L.**

Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. Diabetic Ulcer Study Group  
J.Vasc.Surg. (1995) 21: 71-78

**Steed, D. L.**

The role of growth factors in wound healing  
Surg.Clin.North Am. (1997) 77: 575-586

**Tanaka, E., Ase, K., Okuda, T., Okumura, M., Nogimori, K.**

Mechanism of acceleration of wound healing by basic fibroblast growth factor in genetically diabetic mice  
Biol.Pharm.Bull. (1996) 19: 1141-1148

**Tarnuzzer, R. W., Macauley, S. P., Mast, B. A.**

Epidermal growth factor in wound healing: a model for the molecular pathogenesis of chronic wounds  
in: Ziegler, T., Pierce, G., Herndon, D.: Growth Factors and Wound Healing: 206-228, Springer Verlag, New York (1997)

**Tsuboi, R., Rifkin, D. B.**

Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice  
J.Exp.Med. (1990) 172: 245-251

**Vogt, P. M., Peter, F. W., Topsakal, E., Torres, A., Steinau, H. U.**

Zum Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Therapie chronischer Wunden  
Chirurg (1998) 69: 1197-1206

**Vogt, P. M.**

Kutane Wundheilung  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1999)

**Vogt, P. M., Drücke, D., Mühlberger, T., Homann, H. H., Steinau, H. U.**

Klinischer Einsatz von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in der Wundheilung  
Zentralbl.Chir 125 (2000) Suppl 1: 65-68

**Wakefield, L. M., Smith, D. M., Flanders, K. C., Sporn, M. B.**

Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences  
J.Biol.Chem. (1988) 263: 7646-7654

**Wang, H. J., Wan, H. L., Yang, T. S., Wang, D. S., Chen, T. M., Chang, D. M.**

Acceleration of skin graft healing by growth factors  
Burns (1996) 22: 10-14

**Wieman, T. J., Smiell, J. M., Su, Y.**

Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo- controlled double-blind study  
Diabetes Care (1998) 21: 822-827

**Wieman, T. J.**

Clinical efficacy of becaplermin (rhPDGF-BB) gel  
Am.J.Surg. (1998) 176 (Suppl.): 74S-79S

**Wollina, U.**

Therapie chronischer Wunden - Stiefkind der modernen Medizin?  
Akt.Dermatol. (2000) Sonderheft 1: 20-28

**Wunderlich, J.**

Beurteilung der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit einer heterologen "Wachstumsfaktorenkombination" (PDGF, TGF- $\beta$ , ?-Thromboglobulin) in der Behandlung chronisch diabetischer Ulcera  
Med. Dissertation, Universität Tübingen (1997)

**Yoshida, Y., Kurokawa, T., Fukuno, N., Nishikawa, Y., Kamitani, N., Kotsuji, F.**

Markers of apoptosis and angiogenesis indicate that carcinomatous components play an important role in the malignant behavior of uterine carcinosarcoma  
Hum.Pathol. (2000) 31: 1448-1454

## Stammblatt

Name: \_\_\_\_\_ Gebdatum: \_\_\_\_\_ Behjahr: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 Behnr.: \_\_\_/\_\_\_

Diagnosen: 1. DM 2. CVI 3. PNP  
 4. AVK 5. sonstige

Rezidiv: 0  
 Konsiliarisch: 0  
 nicht aus Kreis Tübingen: 0

Wunde	Lokal.	Grad
1		
2		
3		

<b>Grad:</b> 1=oberflächlich 2=subkutan 3=Faszie 4=Muskel 5=Sehnen, Knochen
--

<b>OP-Art:</b> 1=Debridement 2=MTK-Resektion 3=Knochenresektic 4=Zehenamp. 5=Vorfußamp. 6=U` Schenkelamp. 7=O` Schenkelamp. 8=Venen-Amp. 9=Mesh
--

Stationäre Behandlungen:

Von	Bis	Infektion	OP

Operationen:

	Datum	Art
1		
2		
3		
4		
5		

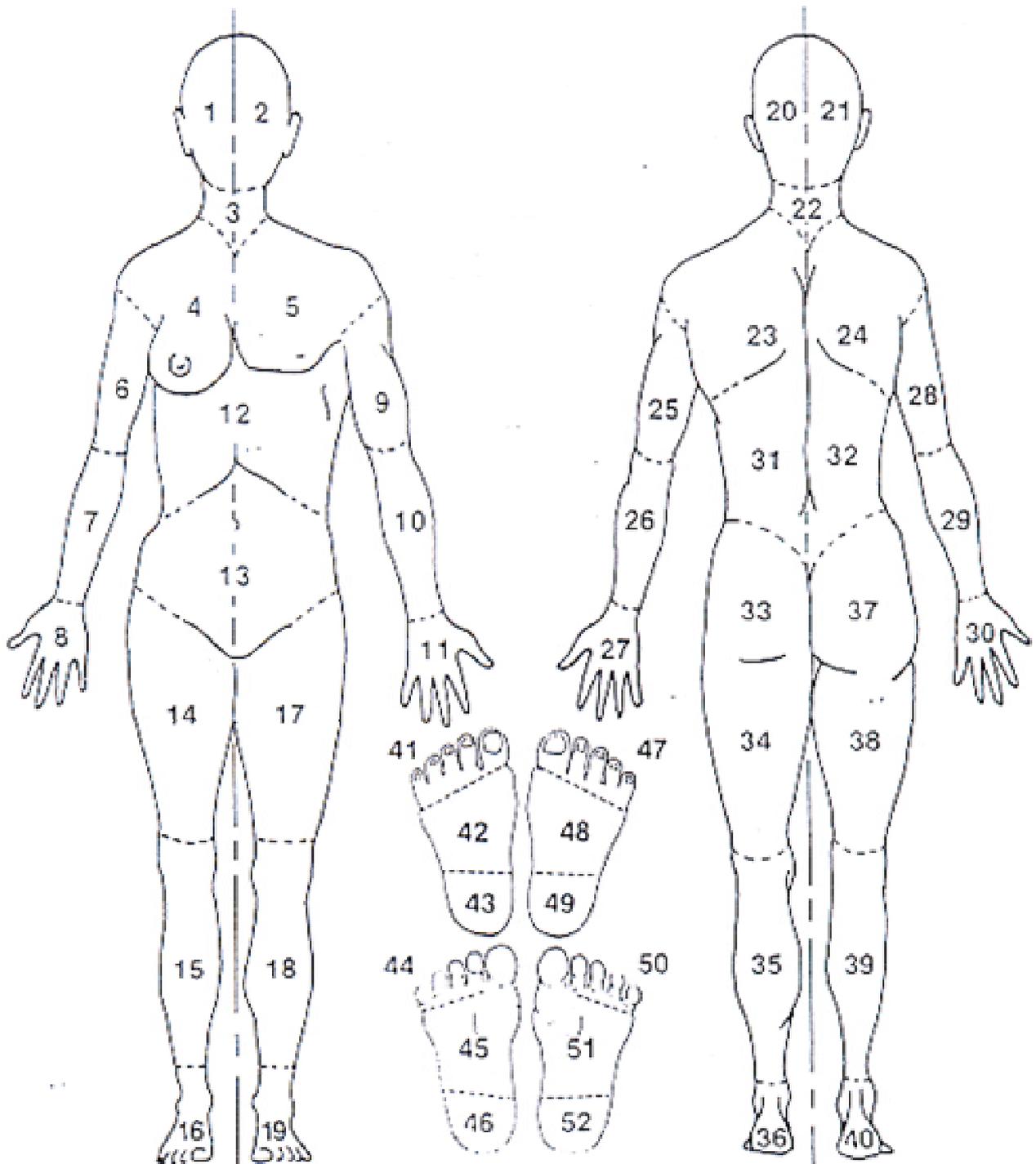
	Datum	Art
6		
7		
8		
9		
10		

1. Abgeheilt:
2. Abbruch durch uns:
3. Abbruch durch Patier
4. Weitere beh. durch F
5. Amputation:

Beh. Beg.: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 Ende: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 Abschluß:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
Januar																																
Februar																																
März																																
April																																
Mai																																
Juni																																
Juli																																
August																																
September																																
Oktober																																
November																																
Dezember																																

## Wundlokalisationsdiagramm



Name: _____	Geb.datum: _____	Wunde: 1 2 3
		Beh. Nr.: _____

Woche:                                                   

Datum:            \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_

Größe:            \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_

Untermindert:                                           

Infektion:                                               

Grading:                                                

Funct. Ass.:                                            

Hyperkeratose:                                          

Granulation:                                            

Farbe:                                                   

Konsistenz:                                             

Debrid. major:                                          

Debrid. minor:                                          

Datum des  
Debrid.:         \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_    \_\_\_\_\_

Nekrosen:                                               

Knochen/Sehnen:                                        

Unterstützende  
Maßnahmen:                                            

Lokale Therapie:                                        

Compliance:                                            

Abgeheilt:

### Infektion:

- 0 = kein Infekt
- 1 = leichte Rötung
- 2 = Ödem, Schmerz, Antibiose
- 3 = stationäre Behandlung erforderlich

### Schweregrad:

- 1 = Dermis
- 2 = Subcutis
- 3 = Faszien
- 4 = Muskel
- 5 = Sehnen/Knochen/Bänder/Gelenke

### Funct. Ass.:

- 1 = weniger als 100% epithelialisiert
- 2 = dünne Epithelschicht, nicht belastungsstabil, Schutzverband
- 3 = dicke Epithelschicht, belastungsstabil, kein Verband erforderlich

### Granulationsgewebe:

#### Menge:

- 0 = nicht vorhanden
- 1 =  $\frac{1}{4}$  gefüllt
- 2 =  $\frac{1}{2}$  gefüllt
- 3 =  $\frac{3}{4}$  gefüllt
- 4 = vollständig gefüllt

#### Farbe:

- 0 = nicht vorhanden
- 1 = blass
- 2 = rosa
- 3 = rot

#### Konsistenz:

- 0 = nicht vorhanden
- 1 = schwammig
- 2 = fest

### Lokale Therapie:

- 1 = NaCl
- 2 = HCV
- 3 = Jodoform
- 4 = PDWHF
- 5 = Studie
- 6 = andere
- 7 = TGFß

### Unterst. Maßnahmen:

- 1 = Fersenschuh
- 2 = Orth. Schuh
- 3 = Orthese
- 4 = Gehstützen
- 5 = Rollstuhl
- 6 = Immobilisation
- 7 = Elast. Verband
- 8 = andere

### Compliance:

- 0 = gut
- 1 = mäßig
- 2 = schlecht

Diese Doktorarbeit wurde an der Klinik für Allgemeinchirurgie mit Poliklinik der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H. D. Becker) in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Transfusionsmedizin mit Blutbank der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Transfusionsmedizin (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H. Northoff) durchgeführt. Mein Dank gilt beiden Ärztlichen Direktoren für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. M. Sessler danke ich für die sehr gute Betreuung während der Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. I. Flesch für das interessante Thema der Arbeit, die hervorragende freundschaftliche Betreuung, die ständige Unterstützung in den vergangenen Jahren sowie die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Ein großer Dank gilt auch Frau Dr. S. Wagner für die vielen Ratschläge und Anregungen, die ständige Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Hilfestellungen bei den laborchemischen und statistischen Fragen.

Herrn Dr. R. Hörnlein danke ich für die gute Zusammenarbeit und die stete Ansprechbarkeit in der Abteilung für Transfusionsmedizin mit Blutbank.

Frau J. Hahn, Frau B. Proksch und Frau E. Schröder danke ich besonders für die große Hilfsbereitschaft und die vielen Anregungen bei den histochemischen, immunhistochemischen und ELISA-Untersuchungen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Wundsprechstunde danke ich für die Unterstützung bei der Betreuung der Studienpatienten und den Biopsieentnahmen.

In meinem langjährigen Tübinger Mitbewohner und Freund Mathias Ley hatte ich während der Arbeit immer einen Ansprech- und Diskussionspartner, der mich -als Leidensgenosse- oft wieder aufbaute und mir ein Schmunzeln abrang.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich während meines gesamten Studiums in jeglicher Form unterstützt und mich stets motiviert haben, und an meine Freundin, die mit ihrer Geduld, Aufmunterung und vielen Tipps viel zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Name: Ralph Michael Weber  
Geburtsdatum: 6. Dezember 1974  
Geburtsort: Ludwigsburg  
Familienstand: ledig

Ausbildung und  
beruflicher Werdegang:

1981 - 1985	Eichendorff-Grundschule in Ludwigsburg
1985 - 1994	Mörrike-Gymnasium in Ludwigsburg
10/1994 - 01/1995	Krankenpflegedienst am Kreiskrankenhaus Ludwigsburg
04/1995 – 11/2001	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls- Universität Tübingen
Frühjahr 1997	Ärztliche Vorprüfung
Frühjahr 1998	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Herbst 2000	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2000 – 09/2001	Praktisches Jahr am Städtischen Krankenhaus Sindelfingen (Chirurgie, Innere Medizin, Neurologie) und an der Louisiana State University, New Orleans, USA (Innere Medizin)
15.11.2001	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 02/2002	Arzt im Praktikum an der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Essen